



**Generierung und funktionelle Charakterisierung
intrazellulärer Antikörperfragmente gerichtet
gegen die zytoplasmatische Domäne von
Wachstumsfaktor-Rezeptoren
der ErbB-Familie**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Stephen Hyland
aus Roehampton, Großbritannien

Frankfurt am Main, Mai 2003
(DF1)

vom Fachbereich 14 (Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften) der Johann
Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:

Gutachter:

Datum der Disputation:

Meinem Vater

Michael Hyland
(1946-2001)

Zusammenfassung

Bemerkenswerte Fortschritte in der rekombinanten Antikörpertechnologie und die Entwicklung unterschiedlichster Antikörperformate zur Expression in Bakterien, niederen und höheren Eukaryonten haben Antikörperderivaten vielfältige Anwendungsbereiche eröffnet. Hierzu gehört beispielsweise ihr Einsatz als experimentelle Wirkstoffe in der Tumorthherapie, wo einige dieser Ansätze bereits in klinischen Studien evaluiert werden. Daneben könnten rekombinante Antikörperderivate aber auch eine zunehmend wichtige Rolle in der funktionellen Genomik spielen, beispielsweise bei der Aufklärung der Funktion medizinisch relevanter Genprodukte.

So stellt der gezielte Einsatz intrazellulär exprimierter single-chain Fv Antikörperfragmente (scFvs) grundsätzlich einen viel versprechenden Ansatz zur selektiven Interferenz mit der Funktion intrazellulärer Proteine dar. Solche scFv Fragmente sind jedoch nach Expression im Zytosol aufgrund des dort vorherrschenden reduzierenden Milieus häufig inaktiv, was auf die nicht erfolgte Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken zurückzuführen ist, die normalerweise in den variablen Domänen von Antikörpern vorliegen. Nur wenige, bisher meist sehr aufwendig durch individuelle Analyse einzelner Moleküle identifizierte scFvs weisen eine ausreichend hohe intramolekulare Stabilität auf, um den Verlust der Disulfidbindungen kompensieren zu können und unter diesen Bedingungen aktiv zu sein. Dies steht bislang einer breiten Anwendung zytoplasmatischer scFvs entgegen.

Ziel dieser Arbeit war es, ausgehend von hochdiversen scFv Antikörper-Bibliotheken („Libraries“) direkt solche selten auftretenden scFv Antikörperfragmente zu isolieren, die trotz des reduzierenden Milieus im Zytosol von Säugerzellen aktiv sind und hochspezifisch an die intrazellulären Domänen von ErbB-Rezeptoren wie dem Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) oder dem nahe verwandten ErbB2 Molekül binden. Diese ErbB-Rezeptoren sind in einer Reihe humaner Tumore überexprimiert. Als wichtige signalleitende Moleküle tragen sie zur malignen Transformation von Zellen bei und spielen eine wichtige Rolle in der Tumorentstehung und –progression. Sie stellen daher viel versprechende Zielstrukturen für die Entwicklung neuartiger Wirkstoffe dar.

Auf der Grundlage des Yeast Two-Hybrid Systems wurde ein *in vivo* Assay etabliert, der das Screening von scFv Libraries nach ErbB-spezifischen scFvs unter intrazellulären Bedingungen in Hefezellen erlaubt. Während es nicht möglich war, in einer im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten anti-ErbB2 scFv-Library und einer mit 8×10^5 unabhängigen Klonen wenig diversen anti-EGFR scFv-Library intrazellulär aktive ErbB-spezifische scFv Antikörper nachzuweisen, konnte eine zweite anti-EGFR scFv-Library aufgrund ihrer großen Komplexität von 2×10^8 nicht komplett in Hefezellen gescreent werden. Die Library wurde daher zunächst durch wenige Runden Phagen Biopanning präselektioniert, um so die Diversität der Library auf ein Maß zu reduzieren, das eine weitere Selektion *in vivo* durch Yeast Two-Hybrid Screening zuließ. Mit Hilfe dieser Kombination aus *in vitro* Präselektion und *in vivo* Assay gelang es, verschiedene intrazellulär aktive EGFR-spezifische scFv Fragmente aus einer anti-EGFR scFv-Library zu isolieren.

Durch GST „pull-down“ Experimente und Koimmunpräzipitationsexperimente konnten deren Spezifität und intrazelluläre Aktivität in Säugerzellen *in vitro* und *in vivo* verifiziert werden. Wie durch Konfokale Laserscanning Mikroskopie gezeigt wurde, koloalisieren die isolierten scFv Antikörper mit EGFR an der Zellmembran EGFR-überexprimierender humaner Tumorzellen. Ein direkter Effekt der Expression der EGFR-spezifischen scFvs auf die Autophosphorylierung des Rezeptors und auf die Proliferation von EGFR-exprimierenden Mausfibroblasten wurde jedoch nicht beobachtet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass mit Hilfe des hier entwickelten Konzepts intrazellulär aktive EGFR-spezifische scFv Fragmente aus einer hochdiversen scFv-Library isoliert werden konnten. Prinzipiell sollte diese Strategie auch auf die Gewinnung intrazellulär aktiver scFv Antikörperfragmente anwendbar sein, die spezifisch an andere zytoplasmatische Zielmoleküle binden. Daneben könnten die Spezifität und intrazelluläre Aktivität der bereits isolierten EGFR-spezifischen scFv Fragmente genutzt werden, um z.B. durch Fusion mit Lokalisierungssignalen, Enzymen oder bestimmten Protein-Protein-Interaktionsdomänen die Signalleitung des EGFR gezielt zu beeinflussen. Entsprechende Ansätze werden gegenwärtig in der Arbeitsgruppe weiter verfolgt.

Abkürzungsverzeichnis

3-AT	3-Amino-1,2,4-triazol
AR	Amphiregulin
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
BTC	Betacellulin
CD	cluster of differentiation
CDK	cyclin dependent kinase
cDNA	complementary DNA
CDR	complementarity determining region
CIP	calf intestine phosphatase
CTL	cytotoxic T lymphocyte
DIP	delayed infectivity panning
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat (N = G, A, T und C)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor (epidermal growth factor receptor)
EGTA	Ethylenglykol- <i>bis</i> -[Aminethylether]-Tetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
Epiregulin	Epiregulin
Fab	antigenbindendes Fragment eines Antikörpers (fragment antibody binding)

FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fv	variables Fragment eines Antikörpers
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
GST	Gutathion-S-transferase
h	Stunde(n)
HB-EGF	heparin-binding EGF
HRP	horseraddish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
Ig	Immunglobulin
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- -D-thiogalactopyranosid
Jak	Janus Kinase
kDa	Kilodalton
LB Medium	Luria-Bertani Medium
mAb	monoclonal antibody
MAPK	mitogen activated protein kinase
min	Minute(n)
mRNA	messenger RNA
NRG	Neuregulin
OD	optische Dichte
omp	outer membrane protein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEG	Polyethylenglykol
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RT-PCR	reverse transcription-PCR

<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
scFv	single-chain Fv-Fragment
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SH2	Src homology 2 domain
STAT	signal transducer and activator of transcription
TBS	Tris-buffered saline
TGF-	transforming growth factor-
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen/Volumen
V _H	variable Domäne der schweren Kette eines Antikörpers
V _L	variable Domäne der leichten Kette eines Antikörpers
w/v	Masse/Volumen
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und deren Rolle als Regulatoren intrazellulärer Signaltransduktionswege	1
1.2	Die ErbB-Rezeptorfamilie	2
1.2.1	Die Familie der EGF-ähnlichen Liganden	2
1.2.2	ErbB-Rezeptor-Aktivierung	4
1.2.3	ErbB-Rezeptor-aktivierte Signaltransduktionswege	8
1.2.4	Rezeptorinternalisierung aktivierter ErbB-Rezeptoren	10
1.2.5	Die Funktion von Rezeptoren der ErbB-Rezeptorfamilie in normalem Gewebe	12
1.2.6	Die Rolle der EGF-Rezeptorfamilie und Liganden bei der Tumorentstehung und Progression	13
1.3	Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie als Angriffspunkte für eine gezielte Krebstherapie	15
1.3.1	Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren („low molecular weight inhibitors“)	16
1.3.2	Monoklonale Antikörper in der Krebstherapie	16
1.3.3	Rekombinante Antikörperderivate	18
1.4	Intrazelluläre Expression von ErbB-spezifischen scFv Antikörperfragmenten ..	20
1.4.1	Hohe strukturelle Stabilität als Voraussetzung für die Funktionalität zytoplasmatischer Antikörperfragmente	21
1.4.2	Wege zur Isolierung von scFv Antikörperfragmenten mit großer intrinsischer Stabilität.....	22
1.4.3	Selektion antigenspezifischer Antikörperfragmente	24
1.4.4	Das Yeast Two-Hybrid System.....	25
1.5	Aufgabenstellung und Zielsetzung	26
2.	Material und Methoden	28
2.1	Materialien	28
2.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	28
2.1.2	Antikörper	28
2.1.3	Puffer	29
2.1.4	Plasmide	30
2.1.5	Oligonukleotide	34
2.1.6	Bakterienstämme und Anzuchtbedingungen.....	36
2.1.7	<i>S. cerevisiae</i> Hefestämme und Anzuchtbedingungen	37
2.1.8	Zelllinien	38
2.2	Methoden	39
2.2.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen und Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	39
2.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	39

2.2.3	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und Elution von Restriktionsfragmenten aus Agarosegelen.....	40
2.2.4	Ligation von DNA Fragmenten.....	40
2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	40
2.2.6	Expression und Reinigung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i>	41
2.2.7	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	42
2.2.8	Nachweis von Proteinen durch Coomassie Färbung und Western blot.....	42
2.2.9	Immunisierung von Mäusen mit rekombinatem Protein.....	42
2.2.10	Isolierung von RNA aus Milzzellen.....	43
2.2.11	Klonierung einer anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary.....	44
2.2.12	Screening der anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary mittels Phage Display Biopanning.....	45
2.2.13	Screening der anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary mittels „Delayed Infectivity Panning“ (DIP).....	46
2.2.14	Phagenfällung.....	46
2.2.15	Bestimmung des Phagentiters.....	47
2.2.16	Amplifikation selektionierter Phagenklone zur Untersuchung im Phagen ELISA.....	47
2.2.17	Phagen ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).....	47
2.2.18	Herstellung und Transformation kompetenter Hefen.....	48
2.2.19	Analyse der Proteinexpression in Hefezellen.....	48
2.2.20	Plasmidreinigung aus Hefezellen.....	49
2.2.21	Yeast Two-Hybrid Screening.....	49
2.2.22	Transiente und stabile Transfektion eukaryontischer Zellen.....	50
2.2.23	GST „pull-down“ Assay.....	51
2.2.24	Immunpräzipitation.....	51
2.2.25	Konfokale Laserscanning Mikroskopie.....	52
2.2.26	Proliferationsassay.....	52

3. Ergebnisse 54

3.1 Ausgangsposition und Fragestellung..... 54

3.2 Konstruktion einer anti-ErbB2 Phagemid Immunlibrary..... 54

3.2.1	Klonierung, bakterielle Expression und Reinigung rekombinanter zytoplasmatischer Domäne des humanen ErbB2.....	55
3.2.2	Immunisierung von BALB/c Mäusen mit rekombinanter zytoplasmatischer Domäne des humanen ErbB2.....	57
3.2.3	Konstruktion einer anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary.....	59
3.2.4	Screening der anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary mittels Phagen Biopanning.....	60
3.2.5	Screening der anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary mittels Delayed Infectivity Panning (DIP).....	61
3.2.6	Charakterisierung selektionierter Phagen mittels „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA).....	63
3.2.7	Zusammenfassung des Abschnitts 3.2.....	65

3.3 Yeast Two-Hybrid Screening als Strategie zur Isolierung ErbB-spezifischer scFv Antikörperfragmente..... 66

3.3.1	Verfügbare anti-EGFR Phagemid Immunlibraries.....	66
3.3.2	Yeast Two-Hybrid Screening einer unselektierten anti-EGFR scFv-Immunlibrary mit Hilfe des MATCHMAKER I Systems.....	67

3.4	Yeast Two-Hybrid Screening einer zweiten anti-EGFR scFv-Immunity mit Hilfe des MATCHMAKER III Systems: Isolierung und funktionelle Charakterisierung von 5 EGFR-spezifischen scFv Antikörperfragmenten	69
3.4.1	Ausgangspunkt	69
3.4.2	Konstruktion einer Hefelibrary zur Expression EGFR-spezifischer scFv Fragmente	71
3.4.3	Selektion EGFR-spezifischer scFv Antikörperfragmente mit Hilfe der Yeast Two-Hybrid Methode	73
3.4.4	Molekulare Analyse der isolierten EGFR-spezifischen scFv Fragmente	74
3.4.5	Zusammenfassung der Abschnitte 3.3 und 3.4.....	76
3.5	Funktionelle Charakterisierung der isolierten EGFR-spezifischen scFv Antikörperfragmente	76
3.5.1	Bindungsstudien mit <i>in vitro</i> translatierten EGFR-spezifischen scFv Fragmenten ...	76
3.5.2	Interaktion der scFv Antikörperfragmente mit EGFR im Zytoplasma von Säugerzellen	79
3.5.3	Intrazelluläre Lokalisation der scFv Fragmente in humanen Krebszellen	81
3.5.4	Effekt zytoplasmatischer Expression von scFv Fragmenten auf EGF-abhängige Aktivierung des EGFR	82
3.5.5	Untersuchung des Einflusses von scFv-Expression auf die Proliferation von NE-1 Zellen.....	84
3.5.6	Zusammenfassung des Abschnitts 3.5.....	86
4.	Diskussion	88
5.	Literaturverzeichnis	100

1. Einleitung

1.1 Rezeptor-Tyrosin-Kinasen und deren Rolle als Regulatoren intrazellulärer Signaltransduktionswege

In multizellulären Organismen ist die Kommunikation zwischen individuellen Zellen eine absolute Voraussetzung für die Regulation komplexer biologischer Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Motilität und Zelltod. Eine Vielfalt spezialisierter Botenstoffe, die an spezifische zelluläre Rezeptoren der Zielzelle binden und deren Aktivität regulieren, ermöglicht es den Zellen, miteinander in Kontakt zu treten.

Die Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs), eine Untergruppe transmembraner Rezeptoren, die mit intrinsischer Liganden-stimulierbarer Protein-Tyrosin-Kinase-Aktivität ausgestattet sind, spielt eine wichtige Rolle in der Übermittlung vieler dieser Signale in das Zellinnere. Sie liegen in strukturell verschiedenen Formen vor, die in etwa 20 funktionell verwandte Subfamilien unterteilt werden können (Abb. 1.1).

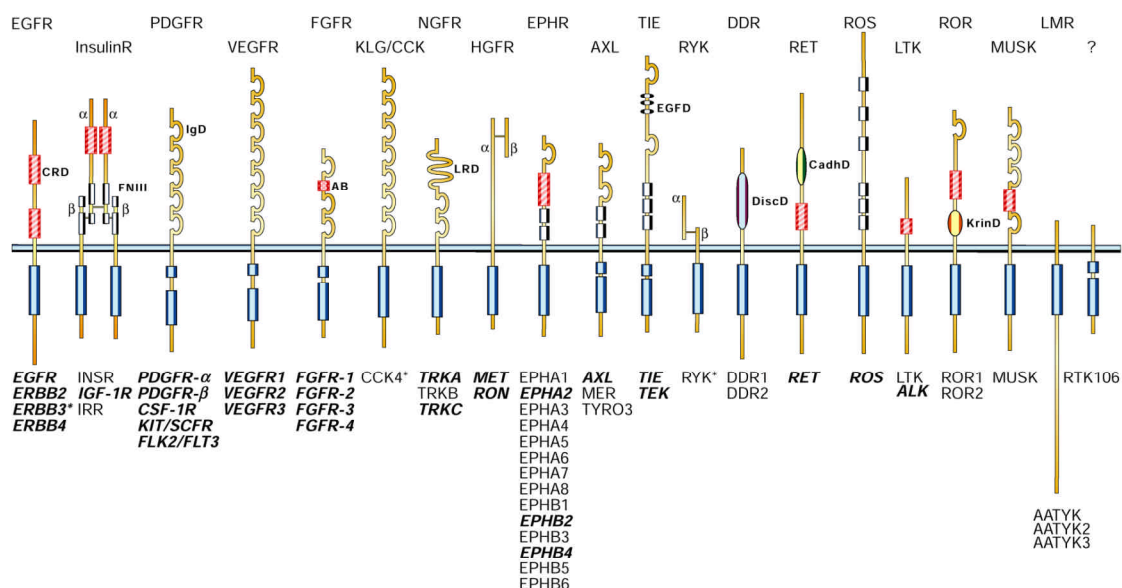


Abb. 1.1 Humane Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Der Rezeptorprototyp jeder Familie ist oberhalb des Schemas angegeben und die bekannten Mitglieder sind unterhalb aufgeführt. Abkürzungen der Rezeptorprototypen: EGFR, epidermal growth factor receptor; InsR, insulin receptor; PDGFR, platelet-derived growth factor receptor; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor; FGFR, fibroblast growth factor receptor; KLG/CCK, colon carcinoma kinase; NGFR, nerve growth factor receptor; HGFR, hepatocyte growth factor receptor; EphR, ephrin receptor; Axl, eine Tyro3 PTK; TIE, tyrosine kinase receptor in endothelial cells; RYK, receptor related to tyrosine kinases; DDR, discoidin domain receptor; Ret, rearranged during transfection; ROS, RTK expressed in some epithelial cell types; LTK; leukocyte tyrosine kinase; ROR, receptor orphan; MuSK, muscle-specific kinase; LMR, Lemur. Andere Abkürzungen: AB, acidic box; CadhD, cadherin-like domain; CRD, cysteine-rich domain; DiscD, discoidin-like domain; EGFD, epidermal growth factor-like domain; FNIII, fibronectin type III-like domain; IgD, immunoglobulin-like domain; KrinD, kringle-like domain; LRD, leucine-rich domain. Die Symbole und bezeichnen voneinander getrennte RTK Untereinheiten. Fett und kursiv gedruckte RPTK Mitglieder stehen in Zusammenhang mit humanen Tumoren. Ein Stern bedeutet, dass dieses Mitglied keine intrinsische Kinaseaktivität besitzt. (Abb. aus (Blume-Jensen & Hunter, 2001))

Die Signalleitung über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wird durch Ligand-vermittelte Rezeptor-Oligomerisierung initiiert, die zu einer Aktivierung der katalytischen Aktivität und zur Autophosphorylierung von Tyrosinresten in den Rezeptoruntereinheiten führt. Phosphorylierte Tyrosinreste vermitteln die spezifische Bindung zytoplasmatischer Signaltransduktionsmoleküle mit „Src homology-2“ (SH2) und „protein tyrosine-binding“ (PTB) Domänen.

Normalerweise werden Rezeptor-Tyrosin-Kinasen durch vielschichtige autoinhibitorische Mechanismen streng reguliert, die eine ungewollte Aktivierung der Proteinkinaseaktivität verhindern. Durch Mutation, strukturelle Veränderung oder Überexpression können aus Rezeptor-Tyrosin-Kinasen jedoch Proteine entstehen, die der Kontrolle autoinhibitorischer Mechanismen nicht mehr vollständig unterliegen und dadurch zu zellulärer Transformation beitragen.

Die erste Rezeptor-Tyrosin-Kinase, die entdeckt wurde, war der epidermale Wachstumsfaktor Rezeptor (epidermal growth factor receptor, EGFR, ErbB) (Carpenter *et al.*, 1978). Die meisten Funktionsmechanismen der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, sowie viele der Mechanismen der Aktivierung und Rekrutierung intrazellulärer Signaltransduktionsmoleküle nach Rezeptoraktivierung, wurden am Beispiel des EGFR und anderer Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie erforscht (Schlessinger, 2000).

1.2 Die ErbB-Rezeptorfamilie

Die ErbB-Rezeptorfamilie besteht aus vier eng miteinander verwandten Rezeptoren, dem EGFR (ErbB), ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4) (Prenzel *et al.*, 2001).

Wie andere Rezeptor-Tyrosin-Kinasen besitzen die Rezeptoren der ErbB-Rezeptorfamilie eine extrazelluläre Ligand-bindende Domäne, gefolgt von einer einzigen kurzen -helikalen Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne. Diese enthält eine von regulatorischen Sequenzen umgebene, enzymatisch aktive Protein-Tyrosin-Kinase-Domäne, die den Transfer der -Phosphatgruppe von ATP auf die Hydroxylgruppe von Protein-Tyrosinresten katalysiert (siehe auch Abb.1.1). Eine Ausnahme bildet ErbB3, dessen Protein-Tyrosin-Kinase-Domäne enzymatisch inaktiv ist. Daher kann ErbB3 nur in Heterokomplexen mit anderen ErbB-Familienmitgliedern Wachstumsfaktorsignale ins Zytosol weiterleiten.

Mit Ausnahme von ErbB2, für das bislang kein hochaffiner Ligand beschrieben ist, werden ErbB-Rezeptoren durch eine Reihe verschiedener Peptidliganden aktiviert.

1.2.1 Die Familie der EGF-ähnlichen Liganden

Mehr als zehn mitogene Wachstumsfaktoren binden an die Mitglieder der ErbB-Familie. Sie bilden die Familie der EGF-ähnlichen Liganden und können in vier Unterfamilien unterteilt werden, die durch verschiedene Spezifitäten charakterisiert sind. Epidermal growth factor (EGF), Amphiregulin (AR) und transforming growth factor- (TGF-) binden spezifisch an EGFR, während Betacellulin (BTC), heparin-binding EGF (HB-EGF) und Epiregulin (EPR) Spezifität sowohl für EGFR als auch für ErbB4 besitzen.

Neureguline (NRG) bilden die dritte und vierte Ligandenunterfamilie. NRG-1 und NRG-2 binden an ErbB3 sowie an ErbB4, während NRG-3 und NRG-4 lediglich an ErbB4 binden (siehe auch Abb. 1.2). Die Vielfalt und teilweise Redundanz der EGF-ähnlichen Liganden erlaubt eine subtile Regulation der ErbB-Signalleitung.

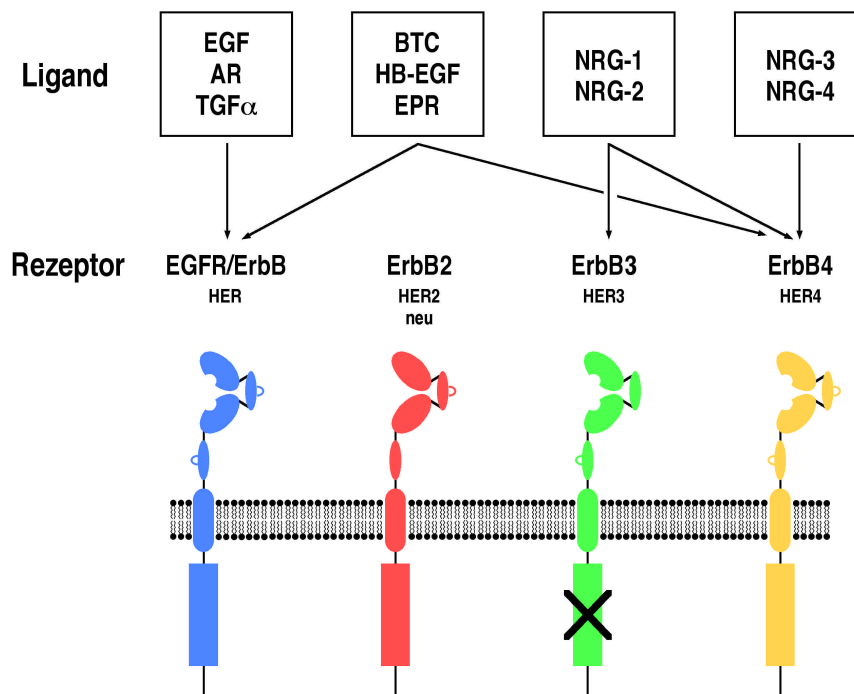


Abb. 1.2 Bindungsspezifitäten EGF-verwandter Peptidwachstumsfaktoren. Vier Kategorien von Liganden binden an die ErbB-Rezeptorfamilie. Epidermal growth factor (EGF), Amphiregulin (AR) und transforming growth factor- (TGF-) binden an EGFR; Betacellulin (BTC), heparin-binding EGF (HB-EGF) und Epiregulin (EPR) binden an EGFR und ErbB4; Neuregulin-1 (NRG-1) und NRG-2 binden an ErbB3 und ErbB4; NRG-3 und NRG-4 binden an ErbB4. (Abb. verändert nach C. Hartmann, unveröffentlicht)

Alle hochaffinen Mitglieder dieser EGF Familie der Wachstumsfaktoren besitzen eine EGF-ähnliche Domäne, die allen ErbB-bindenden Wachstumsfaktoren und einigen Proteinen der extrazellulären Matrix gemein ist. Hierbei handelt es sich um ein Motiv aus etwa 50 Aminosäureresten, das sechs Cysteinreste beinhaltet, die drei konservierte Disulfidbrücken ausbilden. Die Disulfidbrücken unterteilen die EGF-ähnliche Domäne in den A-, B- und C-loop. Der A-loop enthält eine kleine α -helikale Struktur, der B-loop bildet ein zwei-strängiges antiparalleles β -Faltblatt aus, und der C-loop ist Teil eines zweiten antiparallelen β -Faltblatts (Abb. 1.3).

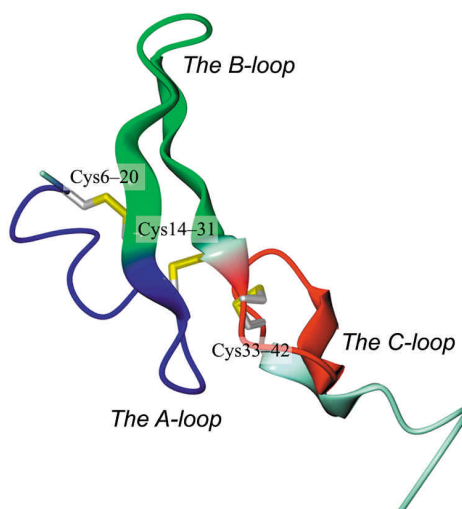


Abb. 1.3 EGF Struktur. A-, B- und C-loops sind in blau, grün bzw. rot gezeigt. Die loops sind durch Disulfidbrücken stabilisiert. (Abb. aus (Ogiso *et al.*, 2002))

Abgesehen von sechs Cysteinen und drei weiteren konservierten Aminosäuren ist die paarweise Sequenzidentität zwischen den Liganden mit oft weniger als 35% relativ gering. Dreidimensionale Strukturen wurden durch Kernresonanzspektroskopie (NMR) für EGF, TGF- und NRG-1, bzw. durch Röntgenstrukturanalyse für HB-EGF im Komplex mit Diphtherietoxin und EGF gelöst (Garrett *et al.*, 2002).

Die EGF-ähnliche Domäne ist meist Teil eines großen transmembranen Vorläuferproteins, das weitere strukturelle Motive, wie zum Beispiel Immunglobulin-ähnliche Domänen, Heparinbindungsstellen und glykosylierte Linker beinhaltet. Dieses Vorläuferprotein wird durch Metalloproteasen gespalten, wodurch der Ligand in den extrazellulären Raum freigesetzt wird. Expression und Prozessierung der Vorläuferproteine sind streng reguliert (Massague & Pandiella, 1993).

1.2.2 ErbB-Rezeptor-Aktivierung

Die Dimerisierung eines Wachstumsfaktorrezeptors stellt die erste Stufe der Signalleitung nach Ligandenbindung an den Rezeptor dar. Obwohl EGFR die erste Rezeptor-Tyrosin-Kinase war, für die gezeigt wurde, dass Rezeptordimerisierung der zentrale Aktivierungsschritt ist (Yarden & Schlessinger, 1987a; Yarden & Schlessinger, 1987b), blieb der Aktivierungsmechanismus durch Ligandenbindung lange Zeit wenig verstanden. Durch kalorimetrische Messungen und Kleinwinkelröntgenstreuung („small-angle X-ray scattering“) konnte gezeigt werden, dass die Assoziation zweier monomerer (1:1) EGF-EGFR Komplexe zur Rezeptordimerisierung führt (Lemmon *et al.*, 1997). Zwei prinzipielle Mechanismen wurden vorgeschlagen. Danach könnte die Dimerisierung aus der möglicherweise bivalenten Bindung zweier EGF hervorgehen (Liganden-vermittelte Rezeptordimerisierung) und/oder durch Liganden-induzierte Rezeptor-Rezeptor Wechselwirkungen ausgelöst werden.

Kürzlich erschienene Veröffentlichungen über die Struktur der extrazellulären Domäne im Komplex mit den Liganden EGF bzw. TGF- geben neue Einblicke in die Mechanismen und Folgen der Ligandenbindung an den EGFR (Garrett *et al.*, 2002; Ogiso *et al.*, 2002). Dabei lieferten beide Untersuchungen ein annähernd gleiches Bild eines 2:2 Rezeptor:Ligand Komplexes (siehe Abb. 1.4 A).

Die Röntgenstrukturen zeigen, dass EGF und TGF- sehr ähnliche Kontakte zum EGFR-Molekül ausbilden. Die extrazelluläre Domäne des EGFR besteht aus vier Subdomänen, die als Domänen I, II, III und IV oder L1, S1, L2 und S2 bezeichnet werden. In der Röntgenstruktur bindet der B-loop von EGF an die Domäne I, während Reste des A-loops und der C-terminalen Region von EGF mit der Domäne III des EGFR wechselwirken (siehe Abb. 1.4 B). Die gewonnenen Informationen über Bindungsstellen von EGF und TGF- am EGFR decken sich mit den Ergebnissen aus Mutationsexperimenten und chemischen Crosslinking-Experimenten. In beiden Kristallstrukturen lagen die Rezeptoren als Dimere vor. Die vermutlich physiologisch relevante relative Orientierung der dimerisierten EGF Rezeptoren zueinander wird als „Rücken an Rücken“ bezeichnet. In dieser Ausrichtung dimerisiert die extrazelluläre Domäne des EGFR ausschließlich aufgrund von Wechselwirkungen zwischen den beiden Rezeptormolekülen unter Beteiligung einer Dimerisierungsschleife mit β -Haarnadelstruktur, die aus den Cysteinreichen Regionen der Domänen II der zwei aneinandergrenzenden extrazellulären Domänen herausragt („dimerization loop“).

Punktmutationen in der EGFR cDNA, die zum Austausch wichtiger Aminosäurereste führen, oder Deletion der Dimerisierungsschleife inhibieren die EGF-induzierte Signalleitung durch den EGFR und bestätigen somit die Beteiligung der Dimerisierungsschleife an der Rezeptordimerisierung (Ogiso *et al.*, 2002). Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse erscheint das Modell der Liganden-vermittelten EGFR Dimerisierung als Folge der Bivalenz von EGF gegenüber EGFR (Gullick, 1994) als widerlegt. Stattdessen unterstützen die Ergebnisse beider Röntgenstrukturanalysen das Modell der Rezeptor-vermittelten Dimerisierung, in dem die Bindung von EGF eine Konformationsänderung am EGFR induziert, die eine Rezeptor-Rezeptor Interaktionsstelle in der extrazellulären Domäne freilegt, so dass die EGFR Monomere nach EGF-Bindung dimerisieren können (Abb. 1.4 C).

In beiden Veröffentlichungen der Röntgenstruktur des EGFR bleibt jedoch die Rolle der zweiten Cystein-reichen Domäne S2 bzw. IV. weitgehend unklar, da diese in einer der beiden Publikationen größtenteils deletiert war (Garrett *et al.*, 2002), während sie in der zweiten überwiegend ungeordnet vorlag (Ogiso *et al.*, 2002). Aufschluss könnte die Veröffentlichung der Röntgenkristallstruktur von ErbB3 geben (Cho & Leahy, 2002). Hiernach könnte die Domäne IV eine autoinhibitorische Funktion übernehmen und durch Bindung an die Dimerisierungsschleife in Domäne II die relative Orientierung von Domäne I und III zueinander dahingehend beeinflussen, dass die Bindungsaffinität an EGF vermindert wird (Abb. 1.4 D).

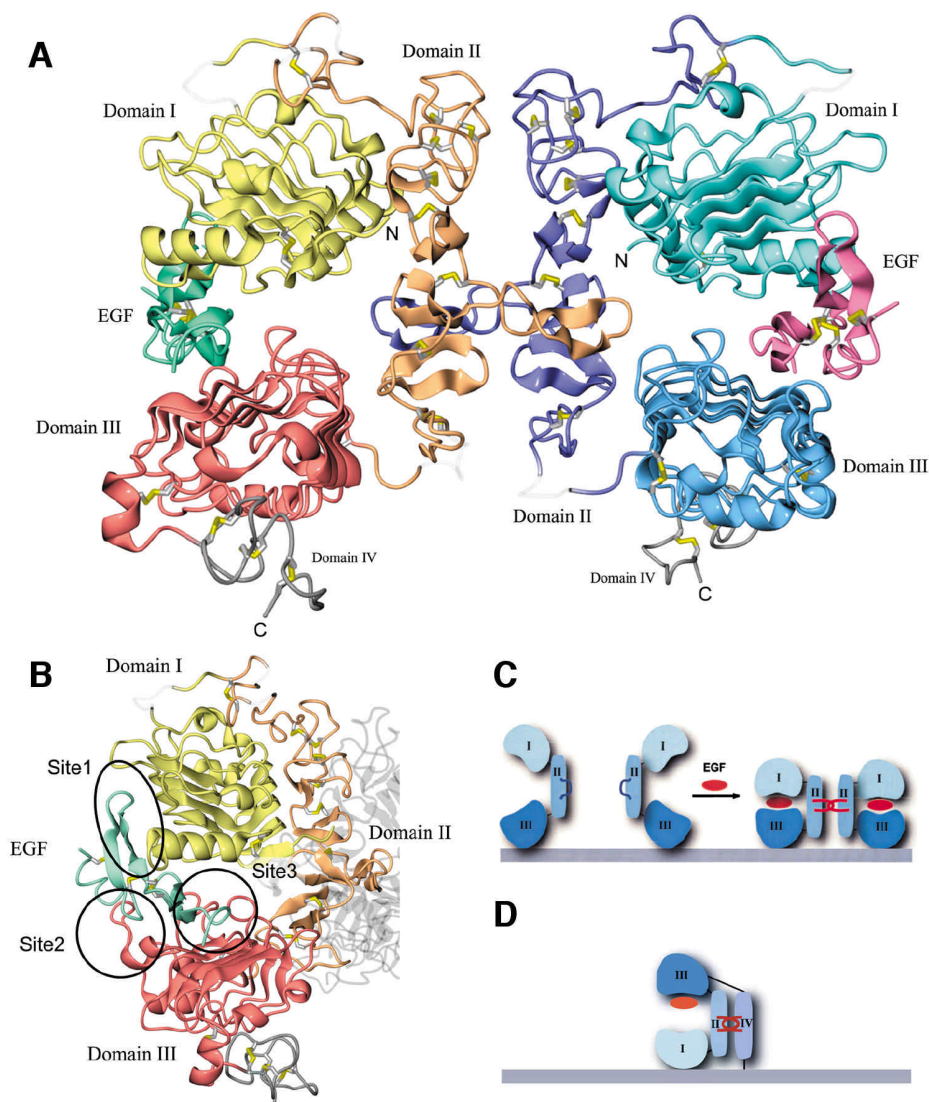


Abb. 1.4 (A) Bändermodell eines vertikal orientierten 2:2 EGF:EGFR Komplexes. Ein EGF Molekül ist grün, das andere ist pink markiert. Die Domänen I, II, III und IV des einen Rezeptors sind gelb, orange, rot bzw. grau gefärbt. Die Domänen I, II, III und IV des anderen Rezeptors sind zyan, dunkelblau, hellblau bzw. grau gefärbt. Der größte Teil der Domäne IV ist ungeordnet. Die Disulfidbrücken sind gelb. Zwischenstücke, die nicht eindeutig zugewiesen werden konnten, sind transparent dargestellt. Die extrazelluläre Domäne des EGFR dimerisiert ausschließlich aufgrund von Wechselwirkungen zwischen den beiden Rezeptormolekülen unter Beteiligung einer Dimerisierungsschleife, die aus den Domänen II der zwei aneinandergrenzenden extrazellulären Domänen herausragt. **(B) Mapping der Interaktionsstellen im Bändermodell von EGFR und EGF.** Die drei Bindungsstellen an der Grenzfläche sind gekennzeichnet. EGF und EGFR Domänen sind wie in Abb. 4 A gefärbt. **(C) „Rücken an Rücken“ Orientierung der EGFR-Dimere im Komplex mit EGF.** Modell der Rezeptor-vermittelten Dimersisierung, in dem die Bindung des Liganden eine Konformationsänderung am EGFR induziert, die eine Rezeptor-Rezeptor Interaktionsstelle („dimerization loop“, rot) in der extrazellulären Domäne freilegt, so dass die EGFR Monomere nach Ligandenbindung dimerisieren können. Es wird angenommen, dass der „dimerization loop“ im unbesetzten Rezeptor eine Konformation (blau) annimmt, die eine Rezeptor-Rezeptor-Interaktion nicht zulässt. **(D) Ein Modell für die Autoinhibition des EGFR basierend auf der Struktur von ErbB3** (Cho & Leahy, 2002). Die Autoinhibition wird durch Kontakte zwischen den Domänen II und IV vermittelt, welche die relative Orientierung zwischen den Domänen I und III fixieren, so dass die Bindungsaffinität des Rezeptors an EGF verringert ist. (Abb. 1.4 A, B aus (Ogiso *et al.*, 2002); Abb. 1.4 C, D aus (Schlessinger, 2002))

Weitgehend unverstanden bleibt auch, wie die extrazelluläre Ligand-induzierte Rezeptordimerisierung die zytoplasmatische Protein-Tyrosin-Kinaseaktivität anregt. Es wird angenommen, dass die meisten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen im nicht-signaltransduzierenden Zustand eine geringe basale Kinaseaktivität besitzen, die durch Wachstumsfaktorbindung, Rezeptoroligomerisierung und nachfolgender Transphosphorylierung von Tyrosinresten deutlich gesteigert wird. Insbesondere die einleitende Tyrosinphosphorylierung der Aktivierungsschleife („activation loop“) ermöglicht volle katalytische Aktivität und somit rasche Phosphorylierung von Substratbindungsstellen an anderen Stellen der intrazellulären Domäne der Rezeptoren (Hubbard *et al.*, 2000). In Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, für die Kristallstrukturen der unphosphorylierten und phosphorylierten Kinasedomäne verfügbar sind, bewirkt die Phosphorylierung der Aktivierungsschleife eine deutliche strukturelle Reorganisation, die eine sterische und/oder chemische Hemmung des katalytischen Zentrums aufhebt.

Im Gegensatz zu anderen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen sind EGFR, ErbB2 und ErbB4 die einzigen bisher bekannten Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die diese einleitende Tyrosinphosphorylierung der Aktivierungsschleife für ihre volle katalytische Aktivität nicht benötigen. In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung der EGFR-Kinasedomänenstruktur ohne oder im Komplex mit einem Kinaseinhibitor konnte gezeigt werden, dass die Aktivierungsschleife des EGFR bereits ohne Tyrosinphosphorylierung eine Konformation annimmt, die der des phosphorylierten, aktivierten Insulinrezeptors gleicht (siehe Abb. 1.5 A, B) (Stamos *et al.*, 2002).

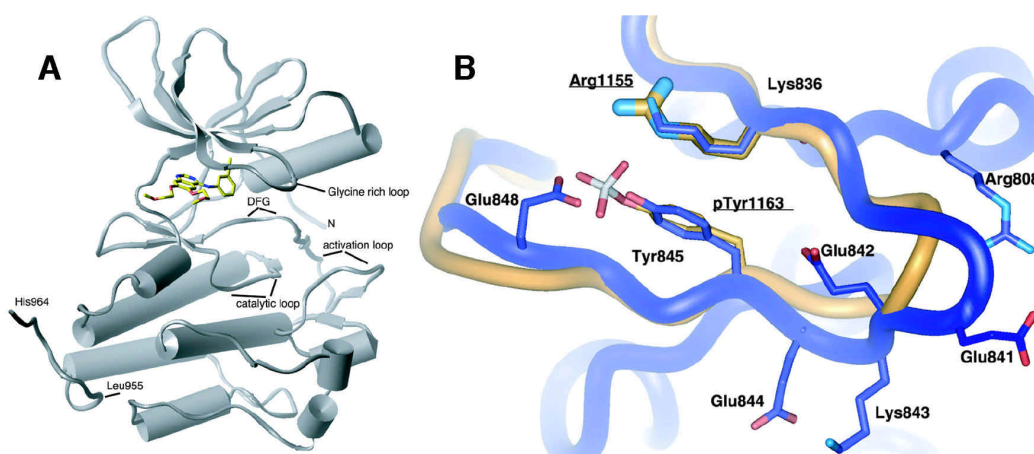


Abb. 1.5 (A) **Die EGFR Kinasedomäne.** Der Kinaseinhibitor Erlotinib befindet sich in der Spalte zwischen dem N-terminalen und C-terminalen Lappen. (B) **Vergleich der Aktivierungsschleifen des EGFR und IR.** Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen der unphosphorylierten Aktivierungsschleife der EGFR Kinase (blau) und der phosphorylierten Aktivierungsschleife der Insulin-Rezeptor-Kinase (p-IRK) (gelb). Die hydrophobe Interaktion zwischen Lys836 und Tyr845 entspricht fast exakt der Interaktion zwischen Arg1155 und Tyr1163 der p-IRK (unterstrichen). Die Anwesenheit der vier Glutamatreste in diesem Teil der EGFR Kinase wurde als Grund für deren intrinsische katalytische Aktivität vorgeschlagen. (Abb. aus (Stamos *et al.*, 2002))

Daher sind ErbB-Rezeptoren, deren Tyrosinrest in der Aktivierungsschleife unphosphoryliert ist, weit weniger autoinhibiert als inaktive Formen anderer Protein-

Tyrosin-Kinasen. Diese besondere Eigenschaft könnte teilweise erklären, warum ErbB-Familienmitglieder so häufig in der Transformation von Zellen involviert sind.

1.2.3 ErbB-Rezeptor-aktivierte Signaltransduktionswege

Während der Nematode *Caenorhabditis elegans* und die Fruchtfliege *Drosophila melongaster* mit je einem Rezeptor, Let23 bzw. DER, und einem bzw. vier Liganden noch ursprüngliche lineare Versionen des ErbB-Signaltransduktionsweges besitzen, hat sich dieser Weg in höheren Organismen zu einem komplexen, interaktiven und vielschichtigen Regulationsnetzwerk entwickelt, das durch kombinatorische Expression und Aktivierung seiner Komponenten die kontextspezifische Steuerung verschiedenster biologischer Prozesse erlaubt (siehe Abb. 1.6).

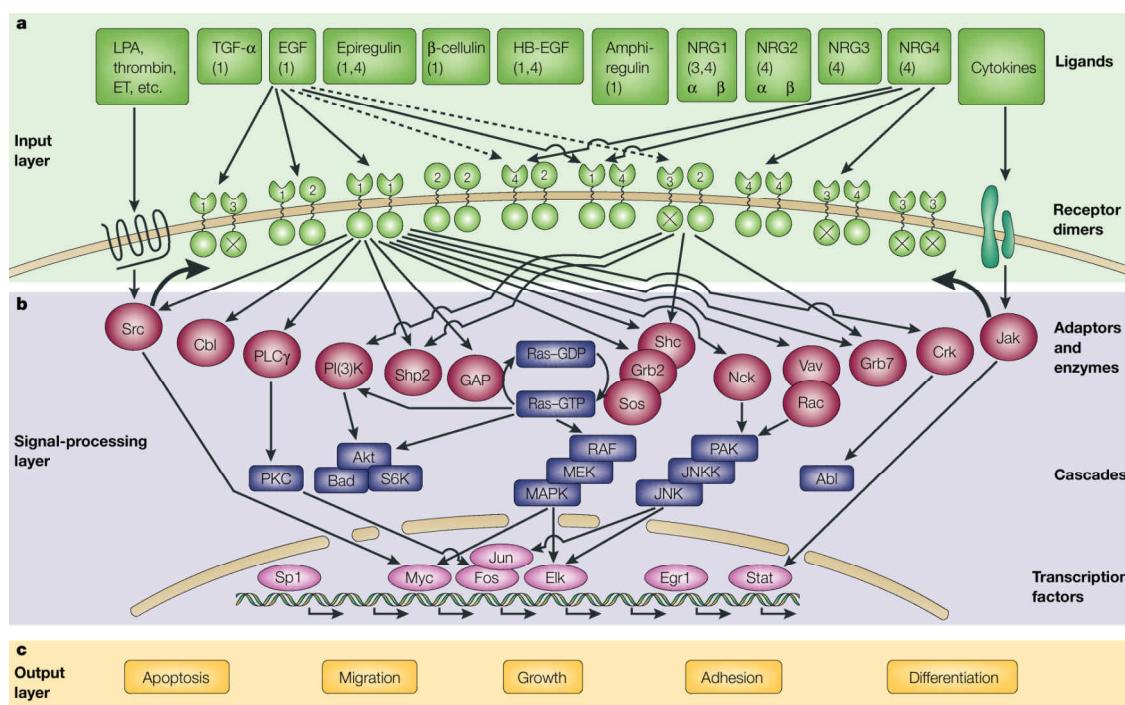


Abb. 1.6 Das ErbB Signalleitungsnetzwerk. (A) Liganden und die zehn dimeren Rezeptorkombinationen bilden die „input layer“. Die Zahlen in jedem Ligandenkästchen weisen auf die jeweiligen ErbB-Rezeptoren hin, die diesen Liganden hochaffin binden. Zur Vereinfachung sind die Spezifitäten der Rezeptorbindung nur für EGF und NRG-4 gezeigt. ErbB2 bindet keinen Liganden mit hoher Affinität, und ErbB3 Homodimere sind katalytisch inaktiv (durchgestrichene Kinasedomänen). Transregulierung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (wie Rezeptoren für Lysophosphatidsäure [LPA], Thrombin und Endothelin [ET]) und Zytokinrezeptoren sind durch breite Pfeile gekennzeichnet. (B) Die Signalleitung zur „adaptor/enzyme“ Ebene ist nur für zwei Rezeptordimere gezeigt: für das schwach mitogene EGFR Homodimer und das relativ potente ErbB2-ErbB3 Heterodimer. Nur manche der Signalwege und Transkriptionsfaktoren sind in dieser Ebene aufgeführt. (C) Wie deren Aktivierung in die spezifischen zellulären Antworten übersetzt wird, ist bislang kaum verstanden. (Abl, eine proto-onkogene Tyrosinkinase, deren Substrate bisher kaum bekannt sind; Akt, eine Serin/Threoninkinase, die das anti-apoptotische Protein Bad und die ribosomale S6 Kinase (S6K) phosphoryliert; GAP, GTPase activating protein; HB-EGF, heparin-binding EGF; JAK, janus kinase; PKC, protein kinase C; PLC, phospholipase C; Shp2, Src homology domain-2-containing protein tyrosine phosphatase 2; Stat, signal transducer and activator of transcription; RAF-MEK-MAPK und PAK-JNKK-JNK, zwei Kaskaden von Serin/Threoninkinasen, die die Aktivität einer Reihe von Transkriptionsfaktoren regulieren.) (Abb. aus (Yarden & Sliwkowski, 2001))

So gibt es beim Menschen bereits auf der Ebene der Liganden mehr als zehn Wachstumsfaktoren, die mit verschiedenen Spezifitäten und Affinitäten an drei der vier Mitglieder der ErbB-Familie binden und durch unterschiedliche pH-Stabilität das „trafficking“ der Rezeptoren unterschiedlich beeinflussen können. Ferner können sich durch Homo- und Heterodimerisierung der Rezeptoren theoretisch zehn verschiedene Dimerkombinationen bilden. Welche Tyrosinreste der ErbB-Rezeptoren nach Dimerisierung phosphoryliert werden, und welche Proteine somit an den Rezeptor binden, wird durch die Identität des Liganden sowie durch den Dimerisierungspartner bestimmt (Graus-Porta *et al.*, 1997; Olayioye *et al.*, 1998).

Neben der Ebene der kombinatorischen Kontrolle gibt es weitere Ebenen der ErbB-Signalleitung, die ebenfalls eine wichtige Rolle in der Feinregulation spielen könnten, jedoch weit weniger erforscht und verstanden sind. Dazu gehören die Auswirkungen zeitlicher Aspekte wie Dauer und Amplitude des Signals (Marshall, 1995), aber auch ortsspezifische Gesichtspunkte wie Vorhandensein und Expressionsniveau der einzelnen Komponenten im jeweiligen Gewebe.

Die Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste der ErbB-Familienmitglieder schafft Bindungsstellen für SH2- und PTB-Domäne-enthaltende Proteine. Manche dieser Proteine sind Enzyme, die durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert werden, wie z.B. Src, Phospholipase C (PLC) und Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K). Andere Proteine wie Shc, Grb2, Grb7, Nck, Crk und Gab1 sind Adaptorproteine, die ErbB-Rezeptoren mit darunterliegenden Signalwegen verbinden.

Einer dieser Signalwege, der Ras-aktivierte „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK) Signalweg, wird von allen ErbB-Liganden aktiviert. Dabei wird der Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor SOS durch Shc und/oder Grb2 vermittelte Kopplung an den ErbB-Rezeptor rekrutiert, so dass das membranverankerte kleine G-Protein Ras durch Austausch von GDP durch GTP aktiviert werden kann. Im GTP-gebundenen Zustand interagiert Ras mit mehreren Effektorproteinen, wie zum Beispiel PI3K und der Serin-/Threoninkinase Raf. Aktiviertes Raf löst eine Signalkaskade aus, die über MEK und Erk1/2 zur Phosphorylierung und Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren führt (Yarden & Sliwkowski, 2001).

Auch die PI3K-aktivierten PDK1- und Akt-Signalwege werden durch die meisten Ligand-stimulierten ErbB-Dimere aktiviert. Die Kinetik und Stärke der PI3K-Aktivierung sind jedoch unterschiedlich, da PI3K mit ErbB3 und ErbB4 direkt, aber mit EGFR und ErbB2 nur indirekt interagieren kann (Yarden & Sliwkowski, 2001). Aktivierte PI3K phosphoryliert das membranständige Phosphatidylinositol (4, 5) bis-phosphat (Ptd Ins (4, 5) P₂) an der 3'-Position. Das resultierende Ptd Ins (3, 4, 5) P₃ aktiviert die Serin-/Threoninkinase PDK1, die ihrerseits die Serin-/Threoninkinase Akt aktiviert. Akt wirkt durch Phosphorylierung und Inaktivierung von Bad anti-apoptotisch. Daneben inaktiviert Akt den Forkhead-verwandten Transkriptionsfaktor FKHRL-1, so dass proapoptotische Gene des Fas-Liganden und Bid und das Zellzyklus-inhibierende p27^{Kip1} nicht mehr transkribiert werden. Akt trägt auch zur Aktivierung der p70S6 Kinase bei, die unter anderem Proteintranslation und den Zellzyklus reguliert (Pene *et al.*, 2002).

Trotz Überschneidungen in der Nutzung von Signalwegen kann jeder ErbB-Rezeptor nur mit einem bestimmten Satz von Signalproteinen wechselwirken. Beispielsweise kann EGFR mit der Ubiquitinligase Cbl, dem Adaptorprotein Grb2 und PLC, das die sekundären Botenstoffe Diacylglycerin und Inositol(1,4,5)-trisphosphat bildet, interagieren, ErbB3 jedoch nicht (Pero *et al.*, 2002). Umgekehrt bindet ErbB3 an Grb7, EGFR hingegen nicht (Fiddes *et al.*, 1998).

Gleichzeitige Aktivierung des MAPK-Signalwegs, der Stress-aktivierten Proteinkinase-Kaskaden mit Jun N-terminalen Kinasen (JNKs) und den p38 MAPKs, der Proteinkinase C (PKC) und des Akt-Signalwegs werden im Zellkern in bestimmte Transkriptionsmuster übersetzt, wobei Transkriptionsfaktoren wie die Protoonkogene *myc*, *jun* und *fos*, aber auch Zinkfinger enthaltende Transkriptionsfaktoren wie Sp1 und Egr1 eine wichtige Rolle spielen (Yarden & Sliwkowski, 2001).

Die dadurch erzeugten zellulären Antworten reichen von Zellteilung und Migration zu Adhäsion, Differenzierung und Resistenz gegen Apoptose. Jedoch sind die genauen Abläufe, die zu diesen zellulären Antworten führen, bisher wenig verstanden.

1.2.4 Rezeptorinternalisierung aktivierter ErbB-Rezeptoren

Die Endozytose und der sich anschließende Abbau bzw. die Wiederverwendung der aktivierten ErbB-Rezeptoren stellen den wichtigsten Regulationspunkt für die Amplitude und Kinetik des Peptidhormonsignals dar. So befinden sich unbesetzte EGFR-Moleküle vor der Zugabe des Liganden in Caveolen und nicht-caveolären Plasmamembrandomänen. Nach der Bindung der Wachstumsfaktoren und der dadurch induzierten Rezeptordimerisierung reichern sich die Rezeptoren in Clathrin-überzogenen Regionen der Plasmamembran („clathrin coated pits“) an, welche sich einstülpen, um Clathrin-überzogene Vesikel zu bilden. Diese reifen zu frühen Endosomen heran, und nach etwa 10-15 min reichern sich die Ligand-Rezeptorkomplexe in den relativ großen, perinukleären „multivesicular bodies“ (MVBs) an, was mit einer stetigen Abnahme des pH einhergeht. Hier entscheidet sich, ob die Rezeptoren abgebaut oder nach Dissoziation der Liganden über tubuläre Strukturen zur Zellmembran zurücktransportiert und wiederverwendet werden. Bleiben die Ligand-Rezeptorkomplexe stabil und die Rezeptoren somit aktiv, werden die Rezeptoren in innere vesikuläre Strukturen der MVBs abgekapselt, die zu späten Endosomen reifen und mit den lysosomalen Kompartimenten fusionieren, wo EGFR letztlich durch proteolytische Enzyme abgebaut wird (siehe auch Abb. 1.7) (Carpenter, 2000; Stahl & Barbieri, 2002; Waterman & Yarden, 2001).

Interessanterweise ist die Endozytose der anderen drei ErbB-Familienmitglieder beeinträchtigt, und sie werden nach Internalisierung viel häufiger an die Zelloberfläche zurücktransportiert und wiederverwendet als EGFR (Baulida *et al.*, 1996). Ob die Rezeptordimere lysosomal abgebaut oder zur Wiederverwendung an die Zelloberfläche zurücktransportiert werden, hängt in erster Linie von der Komposition des Rezeptordimers ab: EGFR Homodimere werden überwiegend zum Lysosom transportiert, während ErbB3 enthaltende Heterodimere zumeist wiederverwendet werden. Die Heterodimerisierung mit ErbB2 verringert das Maß an Endozytose und verstärkt die Wiederverwendung des

Dimerisierungspartners (Lenferink *et al.*, 1998). Rezeptor-Internalisierung ist außerdem abhängig von strukturellen Motiven in der C-terminalen Rezeptordomäne, während die Sortierung im frühen Endosom von den verschiedenen Stabilitäten der Ligand-Rezeptor-Komplexe und deren Dissoziation im leicht sauren Milieu abhängig ist.

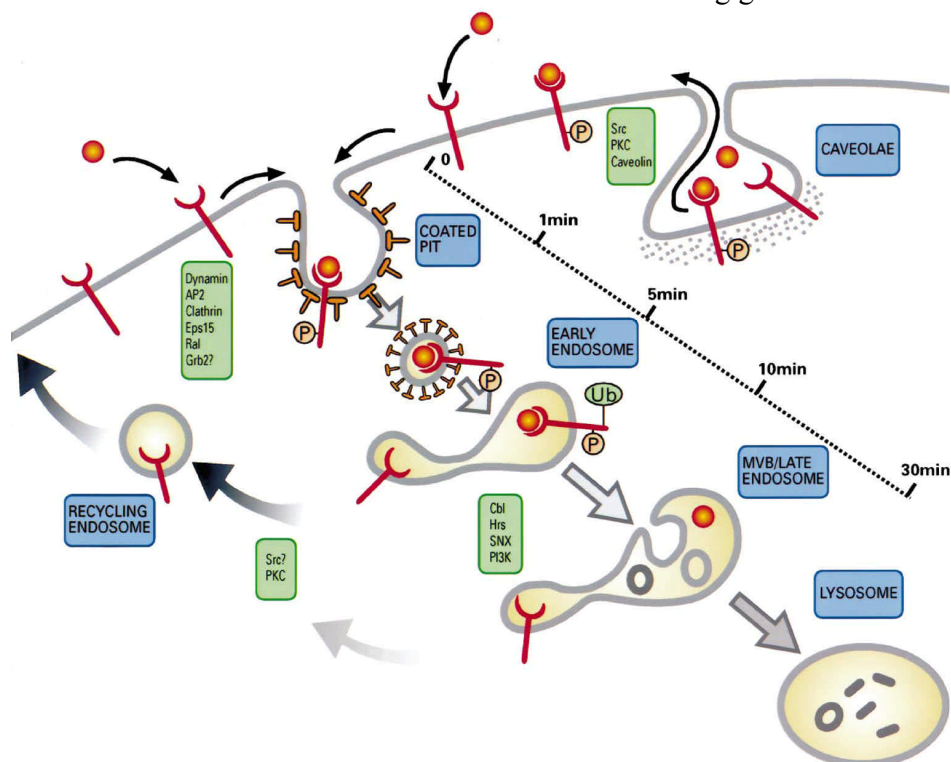


Abb. 1.7 Modell der Endozytose von Rezeptortyrosinkinasen am Beispiel des EGFR. Gezeigt ist die Hauptroute der Endozytose ausgehend von den Clathrin-überzogenen Gruben und die dazugehörige Zeitachse. Unbesetzte Rezeptoren können konzentriert in Caveolen oder in nicht-caveolären Regionen der Zelloberfläche vorliegen. Nach Ligandenbindung und Aktivierung der intrinsischen Kinase translozieren caveoläre Rezeptoren jedoch aus den Caveolen. Die potentiellen Hauptbeteiligten der caveolären Speicherung und des Austritts aus den Caveolen sind aufgelistet. Der Mechanismus, der die Rekrutierung des AP2 Komplexes und der Clathrinhülle ermöglicht, wird durch eine Vielzahl von Adaptoren und Enzymen reguliert, u.a. durch Dynamin und Eps15. Nach der Bildung von Clathrin-überzogenen Vesikeln und frühen Endosomen, die sich durch Entfernung der Clathrinhülle bilden, findet ein zweites Sortieren statt. Aktive Rezeptoren werden in inneren vesikulären Strukturen der multivesikulären Körper (MVB) abgeschieden. Auf der anderen Seite werden Rezeptoren, deren Liganden durch den sauren pH im endosomalen Kompartiment freigesetzt wurden, in tubuläre Strukturen geleitet. Der Sortierungsprozess scheint die Rekrutierung von c-Cbl, Rezeptorubiquitinierung und inneren vesikulären Transport, der durch Lipidkinasen reguliert wird, mit einzubeziehen. Die Rückkehr der Rezeptoren zur Plasmamembran geht von allen endosomalen Kompartimenten aus, doch die Effizienz lässt nach, je tiefer das Kompartiment im Zytosol liegt. In die Rückkehr aus dem tubulären Teil der MVB könnten spezifische Proteinkinasen wie PKC und Src involviert sein. (Abb. aus (Waterman & Yarden, 2001))

Dissoziiert der Ligand-Rezeptor-Komplex, wird der Rezeptor zurück an die Zellmembran transportiert, wie das für Komplexe des EGFR mit TGF- und NRG der Fall ist. Dissoziiert der Komplex nicht, wie beispielsweise der EGF/EGFR-Komplex, führt die anhaltende Aktivierung der Tyrosinphosphorylierung zur Rekrutierung der E3 Ubiquitinligase c-Cbl, die präferentiell an EGFR-Dimere bindet (Muthuswamy *et al.*, 1999). Diese dirigiert die Rezeptoren durch Ubiquitinierung in lysosomale Kompartimente, wo sie durch proteolytische Enzyme abgebaut werden (Waterman *et al.*, 1998). Kürzlich

wurde c-Cbl aufgrund der Rekrutierung von CIN85 und Endophilin, das eine Rolle in der Kontrolle Clathrin-vermittelter Endozytose spielt, auch eine Funktion in der Auslösung Ligand-induzierter Internalisierung des EGFR zugeschrieben (Soubeyran *et al.*, 2002).

1.2.5 Die Funktion von Rezeptoren der ErbB-Rezeptorfamilie in normalem Gewebe

ErbB-Rezeptoren besitzen eine zentrale Funktion in der Entwicklung, Proliferation und Differenzierung von Zellen verschiedenster Gewebe (Olayioye *et al.*, 2000). Die Expression der ErbB-Familienmitglieder ist dabei streng reguliert, und ein Verlust der Regulation kann für die Zellen gravierende Konsequenzen haben.

Im adulten Organismus sind die Rezeptoren der ErbB-Familie in einer Reihe verschiedener Zell- und Gewebetypen exprimiert. So befindet sich EGFR auf allen epithelialen und stromalen Zellen, auf verschiedenen Zelltypen neuronalen Ursprungs sowie auf bestimmten Gliazellen und glatten Muskelzellen. In polarisierten Epithelzellen ist die Expression des EGFR zumeist auf die basolaterale Seite beschränkt (Wells, 1999). ErbB2 wird im adulten Organismus ebenfalls auf einer Vielzahl verschiedener Zell- und Gewebearten exprimiert, nicht jedoch auf Zellen hämatopoetischer Herkunft. So wird ErbB2 unter anderem in der Haut, besonders in der mittleren und oberen Epidermis, aber auch im gastrointestinalen Epithel, im Epithel der Brust und der Ovarien exprimiert (Hynes & Stern, 1994).

Anders als EGFR und ErbB2, die auch von mesenchymalem Gewebe exprimiert werden, werden ErbB3 und ErbB4 nicht in Fibroblasten exprimiert und ihre Expression in Epithelzellen ist auf bestimmte Organe beschränkt. Umgekehrt deutet die Tatsache, dass mesenchymale Zellen die Hauptproduzenten der Liganden für ErbB3 und ErbB4 sind, darauf hin, dass diese Rezeptoren eine Rolle in der Wechselwirkung zwischen Mesenchym und Epithelium spielen könnten (Chen *et al.*, 1996).

Erkenntnisse über die Rolle einzelner ErbB-Rezeptoren und ihrer spezifischen Liganden in der embryonalen Entwicklung von Säugern wurden vor allem durch Untersuchungen an knock-out und transgenen Mäusen gewonnen. Danach sind alle Nullmutationen einzelner ErbB-Familienmitglieder letal. Studien an transgenen Mäusen und *in vitro* Studien weisen auf eine Rolle des EGFR in der Proliferation und Differenzierung epithelialer Strukturen im Gastrointestinaltrakt, in der Bauchspeicheldrüse, Lunge und Haut hin (Miettinen *et al.*, 1995). Mäuse, die eine Nullmutation im EGFR-Gen tragen, weisen ein verlangsamtes Wachstum auf und sterben, je nach genetischem Hintergrund, in verschiedenen Stadien ihrer Entwicklung. Ausschlaggebend für pränatale Letalität sind hierbei wahrscheinlich Defekte in der Entwicklung der Plazenta, während Missbildungen in der Lunge, aber auch massive Apoptose in bestimmten Regionen des Gehirns für den postnatalen Tod der Mäuse verantwortlich sein dürften (Sibilia *et al.*, 1998). Während EGFR und seine Liganden hauptsächlich in der Wechselwirkung zwischen Mesenchym und Epithelium involviert sind, sind NRGs und ihre Rezeptoren an der Interaktion zwischen Nerven und ihren Zielzellen beteiligt und für die normale Entwicklung neuronaler Strukturen und des Herzens notwendig. So weisen ErbB2 und ErbB4 Null Mäuse Missbildungen der

Trabeculae des Herzens auf und sterben noch während der Schwangerschaft an Tag E10.5 der Embryonalentwicklung (Gassmann *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995). Auch ErbB3-defiziente Mäuse überleben nur bis zum Tag E13.5 und leiden an einer fehlerhaften Entwicklung des Herzens (Erickson *et al.*, 1997). Mäuse ohne ErbB2, ErbB3 oder NRG-1 zeigen außerdem eine Fehlentwicklung des sympathischen Nervensystems, was durch eine veränderte Migration neuronaler Vorläuferzellen aus der Neuralleiste verursacht wird (Britsch *et al.*, 1998).

1.2.6 Die Rolle der EGF-Rezeptorfamilie und Liganden bei der Tumorentstehung und Progression

Die Entstehung von Tumoren verläuft über eine schrittweise Akkumulation genetischer Veränderungen, die normale Gewebszellen in maligne Krebszellen verwandeln. Die zentralen Merkmale der Krebsentwicklung sind dabei genetische Veränderungen, die den Zellen die Fähigkeit verleihen, unabhängig von Wachstumsfaktoren zu proliferieren, unempfindlich gegenüber wachstumshemmenden Signalen zu sein, der Apoptose zu entgehen, sich uneingeschränkt zu teilen, die Angiogenese zu steuern und in umliegendes Gewebe einzuwandern und zu metastasieren (Hanahan & Weinberg, 2000).

Aufgrund der starken proliferativen, aber auch der anti-apoptotischen Signale, die durch ErbB-Rezeptoren erzeugt werden, spielen die Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie eine wichtige Rolle in der Entstehung verschiedener humaner Tumore und dienen als prognostische Marker und therapeutische Angriffspunkte. Die Tumorzellen entgehen der Abhängigkeit von exogenen Signalen des umgebenden Gewebes, indem ihre Rezeptoren durch Überexpression, Genamplifikation, konstitutiv aktive Mutanten und autokrine Ligandstimulation hyperaktiviert werden. Normale Zellen benötigen hingegen zumeist parakrine mitogene Wachstumssignale, um aus dem Ruhezustand in einen aktiven proliferativen Zustand zu wechseln. In Tabelle 1.1 sind Beispiele für die Bedeutung einzelner ErbB-Rezeptoren und Liganden in humanen Tumoren aufgeführt.

Molekül	Art der Deregulierung	Art des Tumors	Bemerkungen	Referenzen
Liganden				
TGF-	Überexpression	Prostata	Von Stroma exprimiert in frühem Androgen-abhängigem Prostatakrebs und in fortgeschrittenen Androgen-unabhängigen Tumoren	(Scher <i>et al.</i> , 1995)
	Überexpression	Pankreas	Korreliert mit Tumorgroße und geringerer Überlebensrate des Patienten; könnte durch Überexpression von Ki-Ras verursacht sein, das auch die Expression von HB-EGF und NRG-1 treibt.	(Yamanaka <i>et al.</i> , 1993)

Molekül	Art der Deregulierung	Art des Tumors	Bemerkungen	Referenzen
	Überexpression	Lunge, Ovarien, Kolon	Korreliert mit schlechter Prognose bei Koexpression des EGFR	(Salomon <i>et al.</i> , 1995)
NRG-1	Überexpression	Mammaadenokarzinom	Notwendig, jedoch nicht hinreichend für Tumorentstehung in Tiermodellen	(Krane & Leder, 1996)
Rezeptoren				
EGFR	Überexpression	Kopf und Nacken, Brust, Blase, Prostata, Niere, nicht-kleinzelliges Bronchiakarzinom	Bedeutsamer Indikator für Wiederauftreten in operablen Brusttumoren; verbunden mit kürzerer, krankheitsfreier Zeit und Gesamtüberlebenszeit bei fortgeschrittenem Brustkrebs; könnte als prognostischer Marker für Blasen- und Prostatakrebs und nicht-kleinzelliges Bronchiakarzinom dienen	(Gorgoulis <i>et al.</i> , 1992; Irish & Bernstein, 1993)
	Überexpression	Gliom	Amplifikation tritt in 40% aller Gliome auf; Überexpression korreliert mit höherem Malignitätsgrad und verringerter Überlebenszeit	(Wong <i>et al.</i> , 1992)
	Mutation	Gliom, nicht-kleinzelliges Bronchiakarzinom, Medulloblastom, Ovarial- und Brustkarzinom	Deletion eines Teils der extrazellulären Domäne resultiert in einem konstitutiv aktiven Rezeptor	(Moscattello <i>et al.</i> , 1995; Pedersen <i>et al.</i> , 2001)
ErbB2	Überexpression	Brust, Lunge, Pankreas, Kolon, Ösophagus, Endometrium, Zervix	Überexpression aufgrund von Genamplifikation in 15-30% aller invasiven duktaalen Brusttumore. Überexpression korreliert mit Tumorgröße, Streuung des Tumors in die Lymphknoten, hohem Malignitätsgrad, hohem Prozentsatz an Zellen in der S-Phase, Aneuploidie und dem Fehlen von Steroidhormonrezeptoren	(Ross & Fletcher, 1998)
ErbB3	Expression	Brust, Kolon, Magen, Prostata, andere Karzinome	Überexpression von c-ErbB3 korreliert mit Lymphknotenmetastasen und könnte eine wichtige Rolle in der Progression von nicht-invasivem zu invasivem Mammakarzinom spielen.	(Maurer <i>et al.</i> , 1998; Naidu <i>et al.</i> , 1998)

Molekül	Art der Deregulierung	Art des Tumors	Bemerkungen	Referenzen
			ErbB2 und ErbB3, nicht aber EGFR, tragen zu Tumorwachstum und -progression von Kolonkarzinomen bei.	
	Überexpression	Orales Plattenepithelkarzinom	Überexpression korreliert mit Lymphknotenmetastasen und geringerer Überlebenszeit des Patienten	(Shintani <i>et al.</i> , 1995; Xia <i>et al.</i> , 1999)
ErbB4	Verminderte Expression	Brust, Prostata	Korreliert mit einem differenzierten Phänotyp	(Kew <i>et al.</i> , 2000)
	Expression	Medulloblastom im Kindesalter	Koexpression mit ErbB2 korreliert mit schlechter Prognose für den Patienten	(Gilbertson <i>et al.</i> , 1997)

Tabelle 1.1 Expression von ErbB-Rezeptoren und Liganden in humanen Tumoren (aus (Yarden & Sliwkowski, 2001)).

1.3 Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie als Angriffspunkte für eine gezielte Krebstherapie

Die älteste und in vielen Fällen wirksamste Krebstherapie ist die operative Entfernung von Tumoren. Können Tumore operativ jedoch nicht vollständig entfernt werden, oder haben sie bereits metastasiert, könnten ErbB-Rezeptoren ein geeignetes Ziel für eine gezielte Krebstherapie sein. Zwar stellen die Strahlentherapie und die Chemotherapie gängige Methoden der Tumorbekämpfung dar, doch sind sie auch für sich teilendes gesundes Gewebe stark toxisch und daher mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden. Ein Schwerpunkt der heutigen Krebsforschung ist daher die Entwicklung neuer, gezielter Therapieformen, die sich die Unterschiede in den Eigenschaften maligner und gesunder Zellen zunutze machen, um Krebszellen spezifisch abzutöten. Aufgrund ihrer häufigen Überexpression in Krebszellen, ihrer extrazellulären Zugänglichkeit und ihrer zentralen Bedeutung in einer Reihe verschiedener solider Tumore stellen ErbB-Rezeptoren, insbesondere EGFR und ErbB2, attraktive Angriffspunkte für eine gezielte Krebstherapie dar.

In einer Anzahl verschiedener Ansätze wird versucht, Rezeptorexpression, Rezeptoraktivierung oder enzymatische Aktivität der Rezeptoren z.B. mittels extrazellulär bindender monoklonaler Antikörper oder intrazellulär wirksamer Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren zu inhibieren oder unter Nutzung der Rezeptorinternalisierung Toxine in Krebszellen einzuschleusen. Einige dieser Ansätze sind im Folgenden eingehender beschrieben.

1.3.1 Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren („low molecular weight inhibitors“)

Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren sind kleine Moleküle, die direkt die intrazelluläre Rezeptor-Tyrosin-Kinase und dadurch die Rezeptorphosphorylierung inhibieren, indem sie die ATP- oder Substratbindung blockieren. Da Peptide, die die Substratbindung inhibieren, kaum oder gar nicht von intakten Zellen aufgenommen werden können, handelt es sich bei der Mehrzahl der heutigen Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren um Inhibitoren der ATP-Bindung. Als kleine heterozyklische Moleküle imitieren sie die Purinstruktur des ATPs, werden daher leicht von den Zellen aufgenommen und kompetitieren mit dem Mg-ATP Komplex um die ATP-Bindungsstelle am Rezeptor. Die Entdeckung natürlich vorkommender Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren wie Herbizymycin, Genistein und Emodin führte über die kombinatorische Chemie zur Entwicklung synthetischer Molekülbanken, aus denen durch „high-throughput screening“ (HTS) hochspezifische Inhibitoren gewonnen wurden. Viele dieser Substanzen binden mit hoher Spezifität im niederen nanomolaren Bereich an ErbB-Rezeptoren, was erstaunlich ist, da die Bindung von ATP eine generelle Eigenschaft aller Tyrosinkinasen darstellt.

Zur Zeit sind einige ErbB-spezifische Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren verschiedener Hersteller wie z.B. ZD 1839 (Iressa; AstraZeneca Pharmaceuticals LP, Wilmington, DE, USA), OSI-744 (Tarceva; OSI Pharmaceuticals, Uniondale, NY, USA; Genentech, South San Francisco, CA, USA; Hoffman LaRoche, Nutley, NJ, USA), PKI166 (Novartis Pharma, Basel, CH) und CI-1033 (Pfizer Pharmaceuticals, Groton, CT, USA) Gegenstand klinischer Studien (Goel *et al.*, 2002; Modi & Seidman, 2002). Trotz der lang anhaltenden Inhibition der Rezeptorfunktion durch reversible 4-Anilinoquinazolin-Inhibitoren wie ZD 1839 und OSI-744, die bereits in klinischen Studien der Phase III bzw. Phase II/III getestet werden, und ihrer hohen Affinität erschwert die hohe intrazelluläre ATP-Konzentration das Erreichen einer ausreichenden InhibitorKonzentration *in vivo*, um EGF-stimulierte Signaltransduktion über längere Zeiträume kompetitiv komplett zu inhibieren. In einer neuen Generation von Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren, wie im Falle des CI-1033, könnte dieses Problem durch die Einführung einer Acrylamid Seitengruppe in Position 6 am 4-Anilinoquinazolin Grundgerüst gelöst werden. Diese alkyliert einen Cysteinrest am Rande der ATP-Bindungstasche des EGFR und bindet den Inhibitor dadurch irreversibel an den Rezeptor (Fry, 2000). Theoretische Vorteile der Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren gegenüber monoklonalen Antikörpern (siehe unten) sind die bessere Gewebepenetration und die Möglichkeit der oralen Applikation. Abzuwarten bleibt jedoch, ob, wie im Falle des Bcr-Abl Kinase Inhibitors STI-571 (Glivec, Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland), beim Einsatz dieser Inhibitoren in der Klinik Resistenzen entstehen (Gorre *et al.*, 2001).

1.3.2 Monoklonale Antikörper in der Krebstherapie

Die Verwendung von monoklonalen Antikörpern („monoclonal antibodies“, mAbs) gegen die extrazellulären Domänen von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen ist eine Alternative zum Einsatz von Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitoren. Die extrazellulären Domänen

verschiedener Rezeptoren unterscheiden sich in ihrer Primärstruktur oft sehr stark voneinander, was die Entwicklung hochspezifischer Wirkstoffe, die andere Rezeptoren nicht beeinflussen, erleichtert.

Die Wirkungsmechanismen monoklonaler Antikörper sind vielseitig und können die Blockade der Ligandenbindung, die Inhibition der Rezeptordimerisierung, eine verstärkte Rezeptordegradierung und die Rekrutierung von Immuneffektorzellen einschließen.

Herceptin ist eine humanisierte Form des murinen monoklonalen Antikörpers 4D5, dessen Epitopbindungsregionen auf ein humanes IgG₁ Gerüst übertragen wurden, um unerwünschte Immunreaktionen gegen den murinen Fc Teil des 4D5 Antikörpers zu verhindern. Der Antikörper bindet nahe der Transmembrandomäne von ErbB2. Antikörperbindung führt zur Herunterregulation des ErbB2 Moleküls auf der Zelloberfläche und zur Induktion des Zyklin-abhängigen Kinaseinhibitors p27^{Kip1}, was die Zahl der Zellen in der S-Phase verringert (Sliwkowski *et al.*, 1999). Die Aktivierung und Rekrutierung von Immuneffektorzellen zum ErbB2-überexprimierenden Tumor könnte ebenfalls zum Wirkungsmechanismus von Herceptin beitragen (Clynes *et al.*, 2000). Eine Phase III Studie verglich die Wirksamkeit einer Kombination von Herceptin und Chemotherapie (Doxorubicin und Zyklophosphamid) mit einer Standard-Chemotherapie (Doxorubicin und Zyklophosphamid) in Patientinnen mit metastasierendem Brustkrebs, die nicht mit Anthrazyklinen vorbehandelt waren (Slamon *et al.*, 2001). Die Ansprechrate betrug 50% in der Kombinationstherapiegruppe, verglichen mit 32% in der Standard-Chemotherapiegruppe. In einer Folgestudie betrug die durchschnittliche Überlebenszeit 25.1 Monate für die Kombinationstherapiegruppe und 20.3 Monate für die Standard-Chemotherapiegruppe. Funktionsstörungen des Herzens wurden als unerwartete Nebenwirkung in 27% der Patientinnen der Kombinationstherapiegruppe und in 8% der Standard-Chemotherapiegruppe beobachtet.

C225 (Cetuximab; Imclone Systems, Sommerville, NJ, USA) ist ein antagonistischer EGFR-spezifischer Antikörper. Es handelt sich hierbei um einen human:murinen chimären mAb, der mit höherer Affinität an EGFR bindet als dessen natürliche Liganden (Modi & Seidman, 2002). C225 bewirkt die Herunterregulierung des Rezeptors und inhibiert die Proliferation von Krebszellen. Der genaue Mechanismus ist noch nicht vollständig verstanden, jedoch scheinen sich mehrere Effekte zu überlagern. Die Inhibition der CDK-2, ausgelöst durch erhöhte p27^{Kip1} Mengen, verursacht einen Zellzyklusarrest in der G1 Phase. Außerdem tragen die Zunahme proapoptotischer Moleküle, die Inhibition der Angiogenese, Inhibition der Metastasierung durch erniedrigte Mengen an Metalloprotease-9 und die Stimulation einer Immunantwort über Komplement- und Antikörper-abhängige, zellvermittelte Zytotoxizität zur Wirkung von C225 bei (Mendelsohn, 2002).

Zahlreiche Phase I und Phase II Studien wurden mit C225 bereits durchgeführt. Als eine häufige Nebenwirkung wurde dabei das Auftreten eines akneförmigen Hautausschlags beschrieben. Eine Phase III Studie mit Kopf- und Nackenkrebs wurde mit Cisplatin und C225 oder Cisplatin und Placebo durchgeführt. Dabei zeigten 22.6% der Patienten, die mit C225 und Cisplatin behandelt wurden, einen partiellen Therapieerfolg, gegenüber 9.3% in

der Cisplatin-Gruppe (Mendelsohn, 2002). Die Ergebnisse einer weiteren Phase III Studie mit Kolorektalkarzinompatienten, die mit Irinotecan mit oder ohne C225 behandelt wurden, werden noch erwartet. Obwohl die Wirksamkeit von C225 als Krebstherapeutikum mehrfach gezeigt wurde, verzögern Patentangelegenheiten und Probleme bei der Zulassung von C225 durch die FDA die Markteinführung dieses Antikörpers (Dove, 2002).

1.3.3 Rekombinante Antikörperderivate

Bereits vor mehr als 40 Jahren konnte gezeigt werden, dass die proteolytische Spaltung („limited digestion“) von Antikörpern zu aktiven Antikörperfragmenten führt. So resultiert der begrenzte Verdau von Immunglobulin G (IgG) durch die Protease Papain in zwei Fab Fragmenten („Fragment antibody binding“) und einem Fc Fragment („Fragment crystallizable“) pro verdautem Antikörpermolekül (Porter, 1959), während der Verdau mit Pepsin zu vielen kleinen Fc Fragmenten und einem bivalenten $F(ab')_2$ Fragment führt (Nisonoff, 1960), in dem die beiden Antigen-erkennenden Arme des natürlichen Antikörpers durch zwei Disulfidbrücken verknüpft bleiben.

In den letzten 15 Jahren führten große Fortschritte in der rekombinanten Antikörpertechnologie zur Entwicklung einer Vielzahl verschiedener Antikörperformate, von denen einige in Abb. 1.8 gezeigt sind.

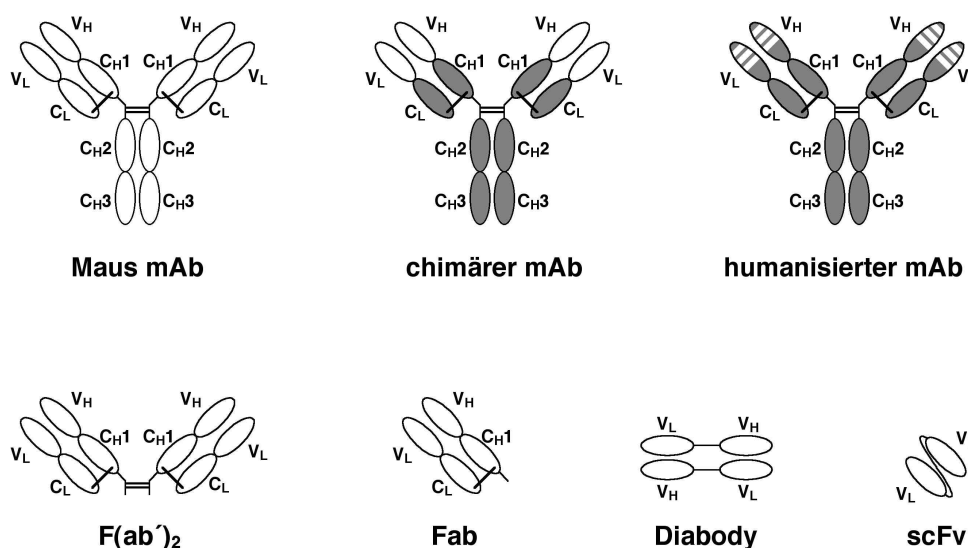


Abb. 1.8 Schematische Darstellung verschiedener Antikörperformate. Humane Anteile des chimären bzw. humanisierten mAb sind grau hinterlegt, murine Anteile weiß.

Unter Nutzung der hoch affinen und spezifischen Antigenbindung natürlicher Antikörper bieten diese Moleküle ein weites Feld neuer Anwendungsmöglichkeiten in der Krebstherapie. Im Folgenden sind einige Antikörperformate und Beispiele ihrer Derivate und Anwendungen beschrieben.

Fab Fragmente werden durch Assoziation der gesamten leichten Antikörperkette mit dem Fd-Teil der schweren Kette gebildet. Beide Ketten sind durch eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verbunden, die auch im natürlichen Antikörper existiert. Um die simultane Expression der leichten Kette und des Fd-Teils der schweren Kette zu gewährleisten, werden üblicherweise bicistronische Vektoren verwendet. Im Vergleich zum ursprünglichen Antikörper sind Fab Fragmente jedoch mit etwa einem Drittel der Molmasse deutlich kleiner und monovalent. Die kovalente Kopplung ErbB2-spezifischer Fab Fragmente mit Virosomen (Waelti *et al.*, 2002) und Liposomen (Park *et al.*, 2002) für den gezielten Einsatz dieser Partikel gegen ErbB2-überexprimierende Krebszellen sind Beispiele für die Verwendung von Fab Fragmenten in der Tumorthherapie.

Das kleinste Antikörperformat ist das Fv Fragment, das durch die Assoziation der Antigen-erkennenden variablen Domänen der schweren (V_H) und der leichten (V_L) Antikörperketten entsteht (Better *et al.*, 1988; Skerra & Plückthun, 1988). Jedoch dissoziieren Fv Fragmente aufgrund der schwachen hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den beiden variablen Domänen leicht. Zur Stabilisierung von Fv Fragmenten können die variablen Domänen durch ein 15-20 Aminosäuren langes flexibles Linkerpeptid kovalent miteinander verknüpft werden. Das daraus resultierende Antikörperfragment wird als „single-chain Fv“ Fragment (scFv) bezeichnet (Bird *et al.*, 1988; Huston *et al.*, 1988; Winter & Milstein, 1991). Das flexible Linkerpeptid im scFv kann zwar eine vorübergehende Dissoziation der variablen Domänen der schweren und leichten Kette nicht verhindern, doch wird die Wahrscheinlichkeit einer anschließenden Re-Assoziation erhöht. Assoziiert die V_H eines Moleküls mit der V_L eines anderen Moleküls, und umgekehrt, entsteht dabei ein bivalentes scFv-Dimer, das als „diabody“ bezeichnet wird. ScFv Fragmente liegen daher meist in zwei Formen vor: Als Monomer und Dimer. Das Gleichgewicht kann zugunsten des „diabody“ verschoben werden, wenn die Länge des Peptidlikers von 15 auf fünf Aminosäurereste verkürzt wird, so dass eine intramolekulare Assoziation der variablen Domänen nicht mehr möglich ist. Die Dissoziationsrate des „diabody“ ist deutlich niedriger als die des parentalen scFv (Le Gall *et al.*, 1999) und die Verkürzung des Peptidlikers macht eine proteolytische Spaltung, die gelegentlich beobachtet wird, weniger wahrscheinlich (Chames & Baty, 2000).

Für viele Anwendungen ist das scFv Fragment das Antikörperformat der Wahl. Es kann in einer Reihe verschiedener Wirtszellen exprimiert werden, die von Bakterien über Hefe bis hin zu Säugerzellen und Pflanzenzellen reichen. Bei einer Molmasse von nur etwa 30 kDa bindet es mit einer Affinität an das Antigen, die mit der des natürlichen Antikörpers vergleichbar ist. Da das scFv Fragment auf einem einzigen Gen kodiert ist, eignet sich dieses Antikörperformat hervorragend zur Herstellung von Fusionsproteinen, die unter Ausnutzung der hoch affinen Bindung präferentiell an ein Tumor-spezifisches Oberflächenantigen binden.

Auf diese Weise wurde eine Reihe verschiedener heterologer Effektor-domänen mit ErbB-Rezeptor-spezifischen scFv Fragmenten fusioniert, so dass sie gezielt gegen ErbB-Rezeptor-überexprimierende Tumorzellen eingesetzt werden konnten. Durch rezeptorvermittelte Endozytose konnten so bakterielle Toxine (Azemar *et al.*, 2000;

Kreitman, 1999; Pastan & FitzGerald, 1991; Schmidt *et al.*, 1996; Wels *et al.*, 1992) und Plasmid-DNA (Uherek *et al.*, 1998), die durch eine DNA-Bindungsdomäne mit dem Antikörper verbunden war, in Tumorzellen eingeschleust werden. Durch Antikörpervermittelte Bindung T-Zell-kostimulierender Proteine an ErbB2 Moleküle auf der Zelloberfläche von Tumorzellen konnte eine erhöhte Proliferation syngener T-Zellen erreicht werden (Gerstmayer *et al.*, 1997).

Ferner wurden durch Expression eines chimären Antigenrezeptors bestehend aus der T-Zellrezeptor-assoziierten α -Kette (CD247) und dem ErbB2-spezifischen scFv(FRP5) in zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) (Altenschmidt *et al.*, 1996) bzw. Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (Uherek *et al.*, 2002) ErbB2-spezifische Immuneffektorzellen erzeugt, die eine effiziente und spezifische Lyse ErbB2-exprimierender Tumorzellen bewirkten.

1.4 Intrazelluläre Expression von ErbB-spezifischen scFv Antikörperfragmenten

Ein vielversprechender Ansatz zur Inhibition der Funktion von ErbB-Rezeptoren ist die intrazelluläre Expression von scFv Antikörperfragmenten. Intrazelluläre Antikörper („Intrabodies“) stellen eine neuartige Anwendung rekombinanter Antikörper dar. Das Konzept basiert auf der Expression eines Antikörperfragments innerhalb von Zellen und der Bindung an das jeweilige Antigen, so dass das Antigen durch Inhibition der Interaktion mit anderen Proteinen, oder durch eine veränderte Lokalisierung, inaktiviert wird (Biocca *et al.*, 1994; Richardson & Marasco, 1995). Durch die Verwendung gut charakterisierter Signalsequenzen können scFv Fragmente in verschiedene Kompartimente von Säugerzellen, wie zum Beispiel in das Endoplasmatische Retikulum (ER), den Nukleus, das Zytosol, die Mitochondrien oder den sekretorischen Weg, dirigiert werden, wo sie ihr Zielantigen neutralisieren können.

Antagonistische scFv Antikörperfragmente können nach Sekretion in den extrazellulären Raum in autokriner Weise ErbB-Rezeptoren inhibieren. Dies wurde unter anderem für das vom murinen 225 anti-EGFR Antikörper abgeleitete scFv(225) Fragment gezeigt, das durch ein N-terminales Signalpeptid zum sekretorischen Weg dirigiert wird und daher mit scFv(225)S bezeichnet wurde. EGFR exprimierende NIH/3T3 Zellen (NE1 Zellen), die mit scFv(225)S transfiziert wurden, wiesen verglichen mit den WT NE1 Zellen eine um 30% reduzierte Gesamt-EGFR Proteinmenge auf. Ebenso war die Tyrosinphosphorylierung des EGFR in diesen Zellen um 50% erniedrigt und Matrix-unabhängiges Zellwachstum im Weichagar um mehr als 40% reduziert (Beerli *et al.*, 1994a). Durch C-terminale Fusion eines zusätzlichen KDEL-Signalpeptids wurde das Antikörperfragment scFv(225)R erzeugt. Das Signalpeptid soll die Retention (R) des scFv Antikörpers im ER transfizierter Zellen bewirken, wo das scFv Fragment an EGFR binden kann und den Transport des Rezeptors an die Zellmembran hemmt. ScFv(225)R-exprimierende NE1-Zellen wiesen eine um 9% geringere Gesamt-EGFR Menge, eine um 24% verminderte EGFR Tyrosinphosphorylierung und eine um 33% kleinere Zahl EGF-induzierter Kolonien im Weichagar auf (Beerli *et al.*, 1994a). Ein weiteres EGFR spezifisches Antikörperfragment

(scFv(R1)R) reduzierte die Gesamt-EGFR-Menge um mehr als 60%, die EGFR Tyrosinphosphorylierung um mehr als 70% und die Zahl der EGF-induzierten Kolonien im Weichagar um 60% (Jannot *et al.*, 1996).

Durch intrazelluläre Expression des ErbB2 spezifischen scFv(FRP5)R konnte der transformierte Phänotyp von NIH/3T3 Fibroblasten, die eine konstitutiv aktive Mutante des ErbB2 exprimieren (NIH/ErbB2*), komplett aufgehoben werden. Verglichen mit WT NIH/ErbB2*-Zellen war das Wachstum der transduzierten Zellen im Weichagar zu über 90% inhibiert (Beerli *et al.*, 1994b; Beerli *et al.*, 1996).

Kürzlich wurde in einem gentherapeutischen Ansatz zum ersten Mal ein Intrabody in Tumorpatienten getestet. In einer klinischen Studie der Phase I wurden Patientinnen mit wiederkehrendem Ovarialkarzinom intraperitoneal replikationsinkompetente Adenoviren (Ad21) injiziert, die für den ER-ständigen anti-ErbB2 scFv(e23) Antikörper kodieren. Durch RT-PCR konnte gezeigt werden, dass das Transgen nach Vektor-vermitteltem Transfer in 10 von 14 Patientinnen exprimiert wurde. Ein eindeutiger klinischer Nutzen wurde allerdings nicht beobachtet (Alvarez *et al.*, 2000).

Während in den beschriebenen Beispielen intrazelluläre Antikörperfragmente an die extrazellulären Domänen von ErbB-Rezeptoren binden, sollte es prinzipiell auch möglich sein, durch zytoplasmatische Expression von Antikörperfragmenten mit Bindungsspezifität für die intrazellulären Domänen von ErbB-Rezeptoren die ErbB-Signalleitung zu beeinflussen. Gegenstand und Ziel dieser Arbeit war daher die Isolierung von scFv Fragmenten, die nach Expression im Zytoplasma spezifisch an die intrazelluläre Domäne von ErbB-Rezeptoren binden. Das im Zytosol vorherrschende Milieu stellt dabei besondere Anforderungen an die Beschaffenheit der scFv Antikörper, die im Folgenden näher beschrieben sind.

1.4.1 Hohe strukturelle Stabilität als Voraussetzung für die Funktionalität zytoplasmatischer Antikörperfragmente

Immunglobuline werden normalerweise in den extrazellulären Raum sekretiert oder auf der Oberfläche von Zellen präsentiert, um als Antigenrezeptor zu dienen. Die Anforderungen an die Antikörperstabilität üben einen ständigen Selektionsdruck auf die Beibehaltung von Disulfidbindungen in den Immunglobulinomänen aus. Die Disulfidbrücken werden während des Sekretionsprozesses im endoplasmatischen Retikulum gebildet. Auch in den variablen Antikörperdomänen der schweren (V_H) und der leichten (V_L) Antikörperketten befindet sich jeweils eine Disulfidbrücke, die eine -Sandwichstruktur stabilisiert (Ohage & Steipe, 1999). Die vier Cysteinreste L23 und L88 in V_L und H22 und H92 in V_H (Nummerierung nach (Kabat, 1991)) sind äußerst stark konserviert. Durch Auswertung der Kabat Datenbank (Stand 1996) wurde die Häufigkeit abweichender Aminosäurereste in einer dieser Positionen auf 0.5% für V_H und 0.6% für V_L abgeschätzt (Proba *et al.*, 1997). Die starke Konservierung dieser Cysteinreste kann dadurch erklärt werden, dass die Disulfidbindungen mit 4-5 kcal/mol einen großen Beitrag zur Stabilität der Antikörperdomänen leisten (Frisch *et al.*, 1996; Goto & Hamaguchi, 1979). Durch den Verlust der Disulfidbindungen im reduzierenden Milieu des Zytoplasmas werden intrazelluläre

Antikörperfragmente stark destabilisiert. Die Destabilisierung führt häufig zur Bildung falsch gefalteter, unlöslicher Proteine. Dies erklärt das häufige Auftreten von Proteinaggregaten und den vielfach beobachteten Verlust der Antigenbindung bei zytoplasmatischer scFv-Expression (Cattaneo & Biocca, 1999).

Eine Reihe von Veröffentlichungen beschreibt jedoch Intrabodies, die trotz des im Zytosol vorherrschenden reduzierenden Milieus stabil und aktiv sind. Beispielsweise wurden zytoplasmatische scFv Fragmente zur intrazellulären Immunisierung gegen Genprodukte des HIV-1 (Duan *et al.*, 1994; Marasco *et al.*, 1993; Mhashilkar *et al.*, 1997) und des Ras Proto-Onkogenprodukts (Biocca *et al.*, 1994) eingesetzt.

Dass dabei die Löslichkeit und korrekte Faltung des scFv Antikörpers nicht unbedingt eine Voraussetzung für eine effiziente Inhibition ist, wurde anhand von PLC –spezifischen scFv Antikörpern (Yi *et al.*, 2001) und Intrabodies gegen p53 (Lener *et al.*, 2000) nachgewiesen. Lener *et al.* zeigten, dass eine Palette Phagen-abgeleiteter anti-p21Ras-scFv Antikörper Ras *in vivo* inaktivieren konnten, obwohl sie nicht mit der intrinsischen GTPase-Aktivität und der Raf-Bindungsaktivität von Ras interferierten. Stattdessen aggregierten die Antikörper in Säugerzellen, was die Existenz in einer intermediären Faltungszwischenstufe nahelegt, die bereits eine spezifische Bindung aufweist, so dass das Antigen durch intrazelluläre „Koaggregation“ sequestriert wird.

Ein Beispiel für den potentiellen Einsatz intrazellulärer scFv-Expression zur Inhibition des Wachstums und der Metastasierung solider Tumore ist ein anti-ATF-1 scFv Antikörper (ATF-1: activating transcription factor-1). Expression dieses scFv Antikörpers in Melanomzellen führte zu einer Verminderung CRE-abhängiger Promotoraktivierung (CREs: cAMP-responsive elements), verringertem Tumorwachstum und reduzierter Metastasierung in Nacktmäusen (Jean *et al.*, 2000).

Die hier aufgeführten Beispiele zeigen, dass manche scFv Antikörper nach zytoplasmatischer Expression ihre Aktivität auch in Abwesenheit intramolekularer Disulfidbindungen beibehalten. Die meisten scFv Fragmente sind unter diesen Bedingungen jedoch inaktiv (Worn & Plückthun, 2001). Nach Wörn und Plückthun ist eine hohe intrinsische thermodynamische Stabilität des Disulfid-enthaltenden scFv eine Grundvoraussetzung für die scFv-Aktivität nach Verlust beider Disulfidbrücken (Worn & Plückthun, 1998). Nach diesem Konzept kann der Stabilitätsverlust nach Reduktion der Disulfidbindungen im Zytosol durch andere intramolekulare Kräfte kompensiert werden, falls diese groß genug sind. Mehrere Veröffentlichungen berichten über Ansätze zur Gewinnung von scFv Fragmenten mit hoher thermodynamischer Stabilität, von denen einige im folgenden Abschnitt beschrieben sind.

1.4.2 Wege zur Isolierung von scFv Antikörperfragmenten mit großer intrinsischer Stabilität

Die in der Literatur beschriebenen Strategien zur Isolierung thermodynamisch stabiler scFv Antikörperfragmente können in zwei Gruppen unterteilt werden. Zum einen wird versucht, mittels „protein engineering“ einzelne Antikörperfragmente gezielt zu stabilisieren und für den intrazellulären Gebrauch zu optimieren. Zum anderen können durch ein gezieltes

Screening von scFv-Bibliotheken („libraries“) antigenspezifische scFv Fragmente mit hoher Stabilität selektioniert werden. Eine Mischung beider Ansätze stellen die evolutionären Strategien dar. Hier wird ähnlich der natürlichen Evolution abwechselnd selektioniert und mutiert. Durch „protein engineering“ Methoden, wie zum Beispiel „error-prone PCR“ (Fromant *et al.*, 1995), „DNA shuffling“ (Stemmer, 1994) und „cassette mutagenesis“ (Wells *et al.*, 1985), wird in die selektionierten Antikörperfragmente künstlich wieder Diversität eingeführt und anschließend erneut selektioniert.

In „protein engineering“ Ansätzen dienen Proteinstrukturen und Sequenzstatistiken als Grundlage zur Vorhersage von stabilisierenden Mutationen, die durch gezielte Punktmutationen in das jeweilige scFv Fragment eingeführt werden. Alternativ können auch die komplementaritätsbestimmenden Regionen („complementarity determining regions“, CDRs) eines antigenspezifischen Antikörperfragments mit geringerer Stabilität auf ein außergewöhnlich stabiles Proteingerüst („framework“) übertragen werden („loop grafting“). Bei genauerer Betrachtung basieren „protein engineering“ Ansätze jedoch auf der Hypothese, dass Erkenntnisse, die empirisch aus der Stabilisierung einzelner scFvs gewonnen wurden, auf andere scFv Antikörperfragmente anwendbar sind und dass die Übertragung von CDRs auf ein stabileres Proteingerüst dessen Stabilität und die Konformation der CDRs nicht beeinflusst. Häufig müssen Proteingerüst und die zu übertragenden CDRs aber aneinander angepasst werden, um so sterische Widersprüche im Hybrid-scFv zu vermeiden (Worn & Plückthun, 2001). Durch Vergleich der Röntgenstrukturen oder Homologiemodelle des CDR Akzeptors und des Donors können derartige Widersprüche vorhergesagt werden.

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte konnte beispielsweise der scFv Antikörper 4D5 MOC-B generiert werden, indem die CDRs des anti-epithelial glycoprotein-2 scFv MOC31 auf das thermodynamisch besonders stabile Proteingerüst des anti-ErbB2 scFv 4D5 übertragen wurden. Zusätzlich wurden acht Aminosäurereste im V_H-framework von scFv 4D5 gegen die entsprechenden Aminosäuren des ursprünglichen scFv MOC31 ausgetauscht. Das so erzeugte scFv 4D5 MOC-B Antikörperfragment weist eine deutlich höhere Serumstabilität bei 37 °C und eine bessere Expression auf als das ursprüngliche scFv MOC31 Fragment bei vergleichbaren Antigen-Bindungseigenschaften (Willuda *et al.*, 1999).

Ein weiterer Ansatz zur Stabilisierung von Antikörperfragmenten ist die Identifizierung potentiell destabilisierender Aminosäurereste durch Auswertung von Sequenzstatistiken. Dahinter steht die Annahme, dass die Konsensussequenz von Immunglobulinen das Resultat eines Selektionsdrucks auf die Antikörperstabilität und die heterodimeren Wechselwirkungen zwischen schweren und leichten Ketten widerspiegelt. Das statistische Auftreten einer Aminosäure in einer bestimmten Position des Proteingerüsts wird dabei näherungsweise als Maß für den Beitrag zur Stabilität von Antikörpern gewertet („canonical sequence approximation“ (Steipe *et al.*, 1994)).

Auch eine Kombination von „loop grafting“ und „canonical sequence approximation“ ist möglich. So wurden unter Berücksichtigung von Sequenzstatistiken stabilisierende Punktmutationen in die V -Domäne des murinen Antikörpers McPC603 (Skerra & Plückthun, 1988) eingeführt (Ohage *et al.*, 1997). Auf das so stabilisierte V -Gerüst

wurden anschließend die CDRs der V_L des esterolytischen Antikörpers 17E4 übertragen (Ohage & Steipe, 1999). Die dabei entstandene Hybrid- V_L wurde gemeinsam mit einer Hybrid- V_H , die durch Übertragung der CDRs des esterolytischen Antikörpers 17E4 auf das stabile V_H -Gerüst des Antikörpers B1-8 hervorging (Wirtz & Steipe, 1999), als zytoplasmatisch funktionelles Fv-Fragment exprimiert (Ohage *et al.*, 1999). Dies zeigt, dass rational vorhergesagte stabilisierende Punktmutationen zur Konstruktion hyperstabiler Antikörpergerüste beitragen können.

Dennoch stellt dieser Ansatz eine starke Vereinfachung dar, da Interaktionen zwischen Aminosäureresten, die nur als Gruppe ausgetauscht werden sollten, unberücksichtigt bleiben (Worn & Plückthun, 2001).

In „protein engineering“ Ansätzen können einzelne scFv Antikörperfragmente mit hohem Zeit- und Arbeitsaufwand stabilisiert werden. Ob sich die dabei gewonnenen Erkenntnisse auch auf die Stabilisierung anderer scFv Antikörperfragmente anwenden lassen, ist häufig jedoch kaum vorhersehbar. Zum heutigen Zeitpunkt sind präzise Prognosen über Proteinfaltungsprozesse noch nicht möglich, und es konnten noch nicht genügend intrazellulär stabile scFv Antikörper identifiziert werden, um für die Übertragung beliebiger CDRs ein passendes scFv-Gerüst zu haben (Worn & Plückthun, 2001).

Alternativ zur gezielten Optimierung einzelner scFv Fragmente durch „protein engineering“ können auch Screening-Strategien angewendet werden. Dabei wird eine scFv-Library generiert, die in einem zweiten Schritt einem Selektionsdruck unterworfen wird, der die Selektion von scFv Fragmenten mit erhöhter Stabilität ermöglicht. Im folgenden Abschnitt sind einige etablierte Methoden zur Selektion antigenspezifischer Antikörperfragmente beschrieben.

1.4.3 Selektion antigenspezifischer Antikörperfragmente

Das Grundprinzip aller Methoden zur Selektion antigenspezifischer scFv Antikörperfragmente ist die Verknüpfung des Genotyps, der auf DNA- oder mRNA-Ebene kodiert ist, mit dem Bindungsphänotyp des jeweiligen scFv Antikörperfragments.

Auf besonders kompakte Weise wurde dieses Prinzip in der „Ribosome Display“ Methode (Hanes & Plückthun, 1997) umgesetzt, in der das *in vitro* translatierte scFv Fragment sowie dessen kodierende mRNA mit dem Ribosom verbunden bleiben. Dies wird dadurch erreicht, dass die Translation der mRNA aufgrund des Fehlens eines Stoppkodons nicht mit der Dissoziation des scFv-Ribosom-mRNA-Komplexes endet. Die Translation erfolgt *in vitro* unter Zugabe verschiedener Faktoren, die die Stabilität der scFv-Ribosom-mRNA-Komplexe erhöhen und eine korrekte Faltung der scFv Antikörper unterstützen. Die Translation wird durch Abkühlung des Translationsansatzes terminiert. Die Zugabe von Magnesiumacetat stabilisiert die entstandenen scFv-Ribosom-mRNA-Komplexe. Eine Library derartiger scFv-Ribosom-mRNA-Komplexe wird mit immobilisiertem Antigen inkubiert und ungebundene Komplexe werden durch Waschen entfernt. Komplexe, die an das immobilisierte Antigen gebunden haben, werden eluiert und die darin enthaltenen mRNA-Moleküle werden mittels RT-PCR amplifiziert. Die so erhaltene DNA kann durch

Sequenzierung analysiert, oder *in vitro* transkribiert und einem weiteren Ribosome Display Zyklus zugeführt werden.

In der „Phage Display“ Methode (Winter *et al.*, 1994) und im „Delayed Infectivity Panning“ (DIP) (Benhar *et al.*, 2000) ist die genetische Information des scFv Antikörpers als Teil des Genoms filamentöser M13Bakteriophagen in Form von einzelsträngiger DNA hinterlegt. Der scFv Antikörper ist an ein Protein der Phagenhülle, an das Gen III-Produkt, fusioniert. Aus einer Library solcher Phagen können durch Phage Display Biopanning antigenspezifische Phagen selektioniert werden, indem die scFv-Phagenlibrary mit immobilisiertem Antigen inkubiert wird. Anschließend werden ungebundene Phagen entfernt und die gebundenen Phagen eluiert. Die eluierten Phagen werden zur Infektion von Bakterien verwendet und so amplifiziert. Durch mehrmalige Wiederholung dieser Schritte können Phagen mit antigenspezifischen scFvs angereichert werden, während Phagen mit unspezifischen scFvs eliminiert werden.

Im Delayed Infectivity Panning, einer Variation des Phage Display, wird das Antigen direkt auf der Zelloberfläche von Bakterien präsentiert. Bei einer Temperatur unterhalb von 16 °C exprimieren diese Bakterien den für die Infektion mit Phagen notwendigen F-Pilus nicht. Nach Bindung antigenspezifischer Phagen und Entfernen ungebundener Phagen wird durch eine Erhöhung der Temperatur auf 37 °C die Expression des F-Pilus induziert, so dass die gebundenen Phagen die Bakterien infizieren und anschließend amplifiziert werden, ohne dass dafür ein Elutionsschritt notwendig ist. Der Anreicherungsfaktor antigenspezifischer Phagen liegt bei DIP mit bis zu 1×10^6 deutlich höher als bei herkömmlichem Phage Display Biopanning (Benhar *et al.*, 2000). Ein weiterer Vorteil der DIP Methode ist die bakterielle Expression des Antigens als Oberflächenprotein, was die Reinigung rekombinanten Antigens überflüssig macht.

Ein Nachteil der bisher genannten Selektionsmethoden ist, dass nur indirekt auf intrazelluläre Stabilität selektioniert werden kann. So wurde im Ribosome Display durch Zugabe von DTT ein künstliches reduzierendes Milieu *in vitro* erzeugt, um so scFv Fragmente zu isolieren, die ohne intramolekulare Disulfidbindungen an ihr Antigen binden (Jermutus *et al.*, 2001). Im Phage Display wurden durch Erhöhung der Temperatur oder Zugabe denaturierender Reagenzien wie z.B. Guanidiniumhydrochlorid Bedingungen geschaffen, die erhöhte Ansprüche an die Stabilität der scFv Fragmente stellen (Jung *et al.*, 1999).

Ein weit verbreitetes Selektionssystem zum direkten Nachweis von Protein-Protein-Wechselwirkungen *in vivo* in eukaryontischen Zellen ist das Yeast Two-Hybrid System (Fields & Song, 1989). Da dieses auch für die direkte Selektion intrazellulär aktiver antigenspezifischer Antikörperfragmente sehr interessant ist, wird es im Folgenden näher beschrieben.

1.4.4 Das Yeast Two-Hybrid System

Die Grundlage des Yeast Two-Hybrid Systems ist die Beobachtung, dass einige Transkriptionsfaktoren physikalisch in zwei separate funktionelle Domänen, die DNA Bindungsdomäne (DNA BD) und die Transkriptionsaktivierungsdomäne (AD), getrennt

werden können. Die gängigen Yeast Two-Hybrid Systeme verwenden hierzu die GAL4 oder LexA DNA BD mit einer GAL4, VP16 oder B42 AD (Stephens & Banting, 2000). Unabhängig voneinander können die DNA BD und AD nicht als Transkriptionsfaktor fungieren, doch wenn sie sich in räumlicher Nähe zueinander befinden, wird die Funktion des Transkriptionsfaktors wiederhergestellt. Dieses Phänomen wird im Yeast Two-Hybrid System genutzt, indem Hefezellen mit Plasmiden transfiziert werden, die beispielsweise eine Library unabhängiger GAL4 AD Fusionsproteine („prey“ Moleküle) bzw. ein GAL4 DNA BD Fusionsprotein („bait“ Molekül) kodieren. Trägt ein Hefeklon ein „prey“ Molekül, das mit dem „bait“ Molekül interagiert, so wird aufgrund der relativen räumlichen Nähe von GAL4 AD und GAL4 DNA BD ein funktioneller Transkriptionsfaktor generiert. Dieser kann dann die Transkription von Reporter Genen initiieren, die in das Genom der Hefezellen integriert sind. Einige dieser Reporter Genprodukte ermöglichen es dem Hefeklon, auf speziellen Selektionsplatten zu wachsen. Zum Beispiel können Hefeklone, die das *His3* Genprodukt (His3p, Imidazolglycerolphosphat-Dehydratase) exprimieren, auf Histidin-freiem Selektionsmedium (-His) herangezogen werden. Andere Reporter Genprodukte wie z.B. die β -Galaktosidase oder die α -Galaktosidase setzen farbloses X- β -Gal bzw. α -Gal in einen blauen Farbstoff um und erlauben durch diese Farbreaktion den Nachweis positiver Klone. Aus solchen Hefeklonen wird anschließend die DNA des „prey“ Plasmids isoliert und sequenziert. In weiterführenden Experimenten können dann die Eigenschaften des im „prey“ Plasmid kodierten Proteins untersucht werden.

1.5 Aufgabenstellung und Zielsetzung

ErbB-Rezeptor-Genamplifikation und β -Proteinüberexpression wurden in einer Reihe unterschiedlicher humaner Glioblastome und Tumore epithelialen Ursprungs beobachtet und spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Entwicklung dieser Tumore. Daher wurden verschiedene therapeutische Strategien entwickelt, um gezielt in die Funktion von ErbB-Rezeptoren einzugreifen. Eine Reihe dieser Ansätze basiert auf der Verwendung von Antikörpern oder Antikörperfragmenten, die spezifisch an die extrazellulären Domänen der ErbB-Rezeptoren binden. Die zytoplasmatische Expression von Antikörperfragmenten in Säugerzellen ist ebenfalls ein vielversprechender Ansatz zur Inhibition der Funktion ausgewählter Zielantigene in lebenden Zellen. Aufgrund des reduzierenden zytosolischen Milieus und der daraus folgenden Destabilisierung der Antikörperfragmente durch Reduktion intramolekularer Disulfidbrücken ist dieses Konzept bislang jedoch in seiner Verwendbarkeit limitiert. Zu Beginn dieser Arbeit war kein Antikörper beschrieben, der nach intrazellulärer Expression spezifisch an die intrazellulären Domänen von ErbB-Rezeptoren bindet. Ferner basierten die veröffentlichten Strategien zur Isolierung intrazellulär aktiver Antikörperfragmente auf der aufwendigen artifiziellen Stabilisierung einzelner rekombinanter Antikörperfragmente durch „protein engineering“ oder dem Screening von Antikörper-Libraries unter *in vitro* Bedingungen mittels Phagen Biopanning mit anschließender individueller Analyse der *in vivo* Stabilität und Aktivität in Säugerzellen.

Ziel dieser Arbeit war es, aus hochdiversen scFv-Libraries Antikörperfragmente zu isolieren, die trotz des reduzierenden Milieus im Zytosol von Säugerzellen aktiv sind und hochspezifisch an die intrazellulären Domänen der ErbB-Rezeptoren EGFR oder ErbB2 binden. Um direkt auf intrazelluläre Stabilität von scFv Fragmenten in lebenden Zellen selektionieren zu können, wurde hierzu versucht, ein entsprechendes Yeast Two-Hybrid Screening System aufzubauen. Dabei galt es zu untersuchen, ob so intrazellulär aktive ErbB-spezifische scFv Fragmente direkt aus scFv-Libraries isoliert werden können. Dies würde eine komplexe Stabilisierung einzelner Antikörper durch „protein engineering“ bzw. die aufwendige individuelle Analyse einzelner scFv Fragmente in Säugerzellen überflüssig machen. Zu Beginn dieser Arbeit war das Yeast Two-Hybrid System bereits eine etablierte Methode zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen in lebenden eukaryontischen Zellen. Eine Verwendung dieses Systems zur Selektion antigenspezifischer scFv Antikörperfragmente war jedoch nicht publiziert. Das Yeast Two-Hybrid System musste zunächst so modifiziert werden, dass scFv Antikörper, die an die intrazelluläre Domäne des als „bait“ verwendeten ErbB-Rezeptors binden, aus einer kombinatorischen scFv-Library isoliert werden können. Dabei galt es, potentielle Limitationen dieses Systems zu identifizieren und in einer Strategie zur Selektion intrazellulär aktiver scFv Fragmente zu berücksichtigen.

Neben der Etablierung dieser Strategie war es erforderlich, die isolierten scFv Antikörperfragmente in unabhängigen Experimenten zu charakterisieren, um so deren Spezifität und intrazelluläre Aktivität zu verifizieren. Da berichtet wurde, dass die intrazelluläre Expression von scFv Fragmenten die intrazelluläre Lokalisierung mancher Zielantigene verändern kann (Lener *et al.*, 2000; Yi *et al.*, 2001), musste experimentell geprüft werden, ob die Lokalisierung der ErbB-Zielantigene durch die zytoplasmatische Expression ErbB-spezifischer Antikörper beeinflusst wird. Ferner galt es zu untersuchen, inwiefern die enzymatische Aktivität, die Autophosphorylierung und die Signalleitung der ErbB-Wachstumsfaktorrezeptoren durch die intrazelluläre Expression ErbB-spezifischer Intrabodies moduliert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Grundchemikalien (Reinheitsgrad p.a.) wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma-Aldrich (Taufstein) bezogen. Enzyme und Puffer für die Molekularbiologie stammten von New England Biolabs (Schwalbach) oder Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), Molekulargewichtsmarker für Proteine und DNA Fragmente von Invitrogen (Karlsruhe). Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde der Protein Assay Kit von Biorad (München) verwendet. Die Zutaten zur Herstellung bakterieller Wachstumsmedien lieferte Invitrogen (Karlsruhe). Sämtliche Medien, Antibiotika und Zusätze zur Kultur von Säugerzellen wurden von Biowhittaker (Verviers, Belgien) bezogen. Fötale Kälberserum lieferte PAA (Cölbe). Sämtliche Hefemedien wurden von Qbiogene (Carlsbad, CA, USA) bezogen. Chromatographische Medien sowie Säulen und Geräte zur Proteinreinigung stammten von Amersham Biosciences (Freiburg). Plastikwaren und Filtersysteme für das Labor und die Zellkultur wurden von den Firmen Costar (Bodenheim), Greiner (Frickenhausen), Schleicher & Schuell (Dassel) oder Becton Dickinson (Heidelberg) bezogen, Elektroporationsküvetten von Invitrogen (Karlsruhe). Oligonukleotide wurden von MWG-Biotech (Ebersberg) geliefert.

2.1.2 Antikörper

Bezeichnung:	Quelle (Org.):	Typ:	Spezifität:	Bezugsquelle:
Anti-fd BacterioPhage	Kaninchen	polykl.	anti-M13 pVIII	Sigma-Aldrich, Taufstein
21N	Kaninchen	polykl.	anti-ErbB2	N. E. Hynes, Friedrich Miescher Institut, Basel, CH
15E	Kaninchen	polykl.	anti-EGFR	N. E. Hynes, Friedrich Miescher Institut, Basel, CH
C225 (Cetuximab [®] , Erbix) Erbix	Fv Maus/ Rest Mensch	monokl.	anti-EGFR	John Mendelsohn, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA
EGFR (1005) sc-03	Kaninchen	polykl.	anti-EGFR	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg

Bezeichnung:	Quelle (Org.):	Typ:	Spezifität:	Bezugsquelle:
GAL4 DNA-BD	Maus	monokl.	anti-GAL4 DNA BD	BD Biosciences CLONTECH, Palo Alto, CA, USA
9E10	Maus	monokl.	anti-Myc Epitop	(Evan <i>et al.</i> , 1985)
Anti-HA High Affinity	Ratte	monokl.	anti-HA-tag, Epitop aus dem Hämagglutinin des humanen Influenzavirus	Roche Diagnostics, Mannheim
Alexa Fluor [®] 633 goat anti-human IgG (H+L)	Ziege	polykl.	anti-hu IgG (Fc)	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Alexa Fluor [®] 488 goat anti-rat IgG (H+L)	Ziege	polykl.	anti-rat IgG (Fc)	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Anti-mouse IgG peroxidase	Ziege	polykl.	anti-Maus/HRP	Sigma-Aldrich, Taufstein
Anti-rat IgG peroxidase	Ziege	polykl.	anti-Ratte/HRP	Sigma-Aldrich, Taufstein
Anti-rabbit IgG peroxidase	Ziege	polykl.	anti-Kaninchen /HRP	Sigma-Aldrich, Taufstein

2.1.3 Puffer

PBS	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.4 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4
PBST	PBS + 0.05% (v/v) Tween 20 (Sigma-Aldrich, Taufstein)
TBS	10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl
TTBS	TBS + 0.05% (v/v) Tween 20 (Sigma-Aldrich, Taufstein)
TE	10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0
SDS-Gelelektrophoresepuffer	250 mM Glycin, 0.1% (w/v) SDS, 25 mM Tris, pH 8.3
Proteinauftragspuffer	125 mM Tris pH 6.8, 2.5% (w/v) SDS, 10% (v/v) Glycerin,

für SDS-PAGE	0.1% (w/v) Bromphenolblau (+ 2% (v/v) -Mercaptoethanol bei Elektrophorese unter reduzierenden Bedingungen)
Färbelösung für Polyacrylamidgele	30% (v/v) Methanol, 10% Essigsäure (v/v), 0.25% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250
Entfärber für Polyacrylamidgele	30% Methanol (v/v), 10% (v/v) Essigsäure
TAE-Laufpuffer zur Agarosegelelektrophorese	40 mM Tris, 1 mM EDTA, mit Essigsäure auf pH 8.0 eingestellt
6x DNA-Auftragspuffer	15% (w/v) Ficoll 400, 0.25% (w/v) Bromphenolblau und 0.25% (w/v) Xylencyanol

Alle weiteren in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen sind an entsprechender Stelle angegeben.

2.1.4 Plasmide

Name:	Verwendungszweck/kodiertes Insert:	Referenz:
--------------	---	------------------

Phagemid Vektoren:

pHEN1	Modifizierter pUC119 Vektor zur periplasmatischen Expression von scFv Fragmenten mit C-terminalem myc Tag in Nichtrepressorstämmen, die bei Expression in <i>E. coli supE</i> Stämmen C-terminal gekoppelt sind an das Phagen pIII Hüllprotein; Amp Resistenz, <i>lacZ</i> Promotor, N-terminales Signalpeptid der Pectatlyase (<i>pelB</i>), <i>SfiI/NotI</i> Schnittstellen, myc Tag, amber Stoppkodon, C-terminales fd- <i>GenIII</i> Fragment	(Hoogenboom <i>et al.</i> , 1991)
pHEN2	basierend auf pHEN1, His Tag vor dem myc Tag	(Griffiths <i>et al.</i> , 1994)
pCANTAB 5E	Amp Resistenz, <i>lac</i> Promotor, <i>Gen III</i> leader Sequenz (AS 1-15), <i>SfiI</i> - und <i>NotI</i> Schnittstellen, fd- <i>GenIII</i> Fragment	Amersham Biosciences

pComb3H	Amp Resistenz, <i>lac</i> Promotor, <i>ompA</i> leader Sequenz, 2 inkompatible <i>SfiI</i> -Schnittstellen, fd- <i>GenIII</i> Fragment (AS 230-406)	(Rader & Barbas, 1997)
---------	---	------------------------

Bakterielle Expressionsvektoren:

pIB-Tx	Zur Expression von Fusionsproteinen, die in der äußeren Membran von <i>E. coli</i> inseriert sind; Kan Resistenz, <i>lpp-lac</i> Promotor, N-terminales Lpp Signalpeptid und OmpA Fragment	(Benhar <i>et al.</i> , 2000)
pIB-Tx-ErbB2	Zur Präsentation der zytoplasmatischen Domänen des humanen ErbB2 auf der äußeren Membran von <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pGEX-4T1	Zur Expression von Fusionsproteinen mit N-terminaler Glutathion S Transferase (GST) zur Affinitätsreinigung; Amp Resistenz, <i>tac</i> Promotor, Glutathion S Transferase, Thrombin Erkennungssequenz, MCS	Amersham Biosciences (Freiburg)
pGEX-4T1-ErbB2	Zur Expression der zytoplasmatischen Domänen des humanen ErbB2 fusioniert an GST	diese Arbeit
pGEX-4T1-EGFR	Zur Expression der zytoplasmatischen Domänen des humanen EGFR fusioniert an GST	diese Arbeit
pGEX-4T1-A	Zur Expression eines Fragments der zytoplasmatischen Domänen des humanen EGFR (AS 645-1011) fusioniert an GST	diese Arbeit
pGEX-4T1-B	Zur Expression eines Fragments der zytoplasmatischen Domänen des humanen EGFR (AS 645-916) fusioniert an GST	diese Arbeit
pGEX-4T1-C	Zur Expression eines Fragments der zytoplasmatischen Domänen des humanen EGFR (AS 918-1186) fusioniert an GST	diese Arbeit

pGEX-4T1-D	Zur Expression eines Fragments der zytoplasmatischen Domänen des humanen EGFR (AS 645-1153) fusioniert an GST	diese Arbeit
pRSET (N*H)-ErbB2	Expressionsvektor für die Ni ²⁺ -Affinitätschromatographie; Amp Resistenz, T7 Promotor, 6 His N-terminal und ein Myc-Epitop und 6 His C-terminal fusioniert an die zytoplasmatischen Domänen des humanen ErbB2	diese Arbeit

Hefeexpressionsvektoren:

pGAD424	„prey“ Klonierungsvektor des MATCHMAKER I Systems; Leu als Selektionsmarker in <i>S. cerevisiae</i> , Amp Resistenz in <i>E. coli</i>	CLONTECH
pGBT9	„bait“ Klonierungsvektor des MATCHMAKER I Systems, Trp als Selektionsmarker in <i>S. cerevisiae</i> , Amp Resistenz in <i>E. coli</i>	CLONTECH
pGBT9-EGFR	„bait“ Expressionsvektor; GAL4 DNA BD N-terminal an die zytoplasmatischen Domänen des humanen EGFR fusioniert	diese Arbeit
pGADT7	„prey“ Klonierungsvektor des MATCHMAKER III Systems; Leu als Selektionsmarker in <i>S. cerevisiae</i> , Amp Resistenz in <i>E. coli</i>	CLONTECH
pGADT7-scFv(9E10) <i>SfiI/SfiI</i>	„prey“ Klonierungsvektor; GAL4 AD N-terminal an scFv(9E10) fusioniert; konstruiert als Klonierungsvektor für scFv Antikörperfragmente mit endständigen <i>SfiI</i> Schnittstellen	diese Arbeit
pGADT7-scFv 2	GAL4 AD N-terminal an scFv 2 fusioniert	diese Arbeit
pGADT7-scFv 8	GAL4 AD N-terminal an scFv 8 fusioniert	diese Arbeit
pGADT7-scFv 22	GAL4 AD N-terminal an scFv 22 fusioniert	diese Arbeit
pGADT7-scFv 29	GAL4 AD N-terminal an scFv 29 fusioniert	diese Arbeit

pGADT7-scFv 30	GAL4 AD N-terminal an scFv 30 fusioniert	diese Arbeit
pGBKT7	„bait“ Klonierungsvektor des MATCHMAKER III Systems, Trp als Selektionsmarker in <i>S. cerevisiae</i> , Kan Resistenz in <i>E. coli</i>	CLONTECH
pGBKT7-EGFR	„bait“ Expressionsvektor; GAL4 DNA BD N-terminal an die zytoplasmatischen Domänen des humanen EGFR fusioniert	diese Arbeit

Expressionsvektoren für Säugerzellen:

pLTR-EGFR	Zur Expression des humanen EGFR in Säugerzellen	(Hills <i>et al.</i> , 1995)
pcDNA3.1-scFv 14E6	Klonierungsvektor mit <i>SfiI/SfiI</i> Schnittstellen zur Expression von scFv Fragmenten mit HA Tag in Säugerzellen; Zeocin als Selektionsmarker für Säugerzellen; Amp Resistenz in <i>E. coli</i>	R. Beerli, unveröffentlichte Ergebnisse
pcDNA3.1-scFv 2	Zur Expression von HA-scFv 2 in Säugerzellen	diese Arbeit
pcDNA3.1-scFv 8	Zur Expression von HA-scFv 8 in Säugerzellen	diese Arbeit
pcDNA3.1-scFv 22	Zur Expression von HA-scFv 22 in Säugerzellen	diese Arbeit
pcDNA3.1-scFv 29	Zur Expression von HA-scFv 29 in Säugerzellen	diese Arbeit
pcDNA3.1-scFv 30	Zur Expression von HA-scFv 30 in Säugerzellen	diese Arbeit
pcDNA3.1-scFv(9E10)	Zur Expression von HA-scFv(9E10) in Säugerzellen	diese Arbeit

2.1.5 Oligonukleotide

PCR-Oligonukleotide zur Amplifikation der für die zytoplasmatischen Domänen des humanen ErbB2 kodierenden cDNA Sequenz unter Einführung einer *NcoI* Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende und einer *BglII* Restriktionsschnittstelle am 3'-Ende. Das resultierende PCR-Fragment wurde zur Klonierung der Vektoren pIB-Tx-ErbB2 und pH6T-ErbB2 verwendet:

DIP FOR erbB2 cytopl.:

5'-ggtggctccatggcgAAGCGACGGCAGCAGAAGATCC-3'

DIP REV erbB2 cytopl.:

5'-gccggaagatctttaCACTGGCACGTCCAGACCCAGG-3'

PCR-Oligonukleotide zur Amplifikation der für die zytoplasmatischen Domänen des humanen ErbB2 kodierenden cDNA Sequenz unter Einführung einer *SalI* und *XhoI* Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende und einer *XbaI* und *NotI* Restriktionsschnittstelle am 3'-Ende. Das resultierende PCR-Fragment wurde zur Klonierung des Vektors pGEX-4T1-ErbB2 verwendet:

erbB2 Sal Xho FOR:

5'-aaaaaagtcgactcgagAAGCGACGGCAGCAGAAGATCC-3'

erbB2 Xba Not REV:

5'-aaaaaagcggcgcgctctagaACTGGCACGTCCAGACC-3'

PCR-Oligonukleotide zur Amplifikation der für die zytoplasmatische Domäne des humanen EGFR kodierenden cDNA Sequenz unter Einführung einer *SalI* und *XhoI* Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende und einer *XbaI* und *NotI* Restriktionsschnittstelle am 3'-Ende. Das resultierende PCR-Fragment wurde zur Klonierung des Vektors pGEX-4T1-EGFR verwendet:

EGFR *Sal Xho* FOR:

5'-aaaaaagtcgactcgagCGAAGGCGCCACATCGTTC-3'

EGFR *Xba Not* REV new:

5'-aaaaaagcggcgcgctctagaGCTCCAATAAATTCAGTGC-3'

PCR-Oligonukleotide zur Amplifikation der für die zytoplasmatische Domäne des humanen ErbB2 kodierenden cDNA Sequenz unter Einführung einer *XhoI* und *SalI* Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende und einer *BglIII* und *NheI* Restriktionsschnittstelle am 3'-Ende. Das resultierende PCR-Fragment wurde mit *XhoI* und *NheI* geschnitten und zur Klonierung des Vektors pRSET (N*H)-ErbB2 verwendet:

pRSET-ErbB2 FOR:

5'-aaaaaactcgagcgtcgacAAGCGACGGCAGCAGAAGATCC-3'

pRSET-ErbB2 REV:

5'-aaaaaactcgagcgtcgacAAGCGACGGCAGCAGAAGATCC-3'

PCR-Oligonukleotide zur Amplifikation der für die zytoplasmatische Domäne des humanen EGFR kodierenden cDNA Sequenz unter Einführung einer *SmaI* Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende und einer *SalI* Restriktionsschnittstelle am 3'-Ende. Das resultierende PCR-Fragment wurde zur Klonierung des Vektors pGBT9-EGFR verwendet:

EGFR 5' *SmaI*:

5'-ggcctcccggggCGAAGGCGCCAC-3'

EGFR 3' *SalI*:

5'-atactagtcgacgtggTCATGCTCC-3'

PCR-Oligonukleotide zur Einführung zweier inkompatibler *SfiI* Schnittstellen in den Hefevektor pGADT7 über Amplifikation des scFv(9E10) Antikörperfragments. Das resultierende PCR-Fragment besitzt eine *NdeI* und *SfiI* Restriktionsschnittstelle am 5'-Ende und eine *SalI* und *SfiI* Restriktionsschnittstelle am 3'-Ende und wurde über *NdeI* und *SalI* in pGADT7 kloniert. Der Vektor wurde pGADT7-scFv(9E10) *SfiI/SfiI* genannt.

pGADT7-scFv-FOR:

5'-aaaaacatattgcccaggcggccCAGGT(G/C)(AC)A(A/G)CTGCAG(G/C)AGTC(A/T)GG-3'

pGADT7-scFv(*Xba*)-REV:

5'-aaaaaagagctcactctagacggccggcctggccAA(G/T)CTCGAG(C/T)TT(G/T)GT(G/C)C-3'

Oligonukleotide zur Einführung einer *SfiI* und *NotI* Schnittstelle in den Hefevektor pGAD424. Nach „Annealing“ wurden die Oligonukleotide zwischen die *EcoRI* und *BamHI*-Schnittstellen in Vektor pGAD424 inseriert.

pGAD B/E:

5'-GATCCGCGGCCGCGGCCGGCTGGGCCCCG-3'

pGAD E/B:

5'-AATTCGGGGCCCAGCCGGCCGCGGCCGCG-3'

PCR-Oligonukleotide zur Amplifikation der in pGADT7-Derivaten enthaltenen scFv Antikörpersequenzen. Die resultierenden PCR-Fragmente wurden zur Restriktionsanalyse mit *MvaI* verwendet. Beide Oligonukleotide wurden auch für die Sequenzierung der in pGADT7-Derivaten enthaltenen scFv Antikörpersequenzen eingesetzt:

T7 Sequencing Primer:

5'-TAATACGACTCACTATAGGGC-3'

3' AD Sequencing Primer:

5'-AGATGGTGCACGATGCACAG-3'

PCR-Oligonukleotide zur Amplifikation der in der pGADT7-Hefelibrary enthaltenen Sequenzen der V_L einschließlich der Linkers. Die resultierenden PCR-Fragmente wurden zur Abschätzung des Anteils von scFv mit langem oder kurzem Linker gelelektrophoretisch getrennt.

R.Beerli Sfi FOR:

5'-CGCTCATATGGCCCAGGCGGCC-3'

RB Xba (Linker) REV:

5'-GGAAGATCTAGAGGAACCACC-3'

2.1.6 Bakterienstämme und Anzuchtbedingungen

Stamm:	Genotyp:	Referenz:
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac^qΔM15 Tn10</i> (Tc ^R)]	Stratagene
BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	<i>E. coli B F ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) dcm⁺ Tet^rgalλ(DE3) endA Hte</i> [<i>argU ileY leuW</i> Cm ^R]	Stratagene
BL21-CodonPlus(DE3)-RP	<i>E. coli B F ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) dcm⁺ Tet^rgalλ(DE3) endA Hte</i> [<i>argU proL</i> Cm ^R]	Stratagene

Rosetta-gami(DE3)	<i>Δara-leu7697 ΔlacX74 ΔphoAPvuII phoR</i> Novagen <i>araD139 galE galK rpsL F'[lac⁺(lacI^q) pro] gor522::Tn 10 (Tc^R) trxB::kan (DE3) argU araW ileX glyT leuW proL metT thrT tyrU thrU (Cm^R)</i>
TG-1	<i>supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5</i> Stratagene <i>(r_k⁻ m_k⁻) [F' traD36 proAB lacI^qZΔM15]</i>

Die Abkürzungen der Genotypen beziehen sich auf die Nomenklatur von B. Bachmann (Bachmann, 1990). Plasmidhaltige Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C und 200 Upm in LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika (Roche Diagnostics, Mannheim) angezogen. Die langfristige Lagerung plasmidhaltiger Bakterienstämme erfolgte bei -80 °C in LB-Medium mit 15% Glycerin. Phageninfizierte Bakterien wurden in 2YT Medium angezogen.

2YT Medium	16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl
2YTA Medium	2YT Medium mit 100 µg/ml Ampicillin
2YTAK Medium	2YT Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin
2YTAG Medium	2YT Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 1% Glukose

2.1.7 *S. cerevisiae* Hefestämme und Anzuchtbedingungen

Stamm:	Genotyp:	Referenz:
HF7c	<i>MATa, ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-801, trp 1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, URA3 :: GAL4_{17-mers(x3)}-CYC1_{TATA}-lacZ</i>	(Feilotter <i>et al.</i> , 1994)
AH109	<i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, MEL1 GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3 :: MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	(James <i>et al.</i> , 1996)

Die verwendeten Hefestämme wurden auf YPD-Agar in einem Brutschrank (Heareus, Fellbach) bei 30 °C kultiviert. Flüssigkulturen wurden in YPD-Medium in einem Schüttler (Ismatec Laboratoriumstechnik, Zürich, CH) bei 30 °C inkubiert. Transformierte Hefen wurden im entsprechenden Selektionsmedium bzw. auf den entsprechenden Selektionsplatten kultiviert. Die langfristige Lagerung der Hefestämme erfolgte bei -80 °C

in YPD-Medium oder dem entsprechenden Selektionsmedium mit jeweils 25% (v/v) Glycerin. Sämtliche Hefemedien wurden von Qbiogene (Carlsbad, CA, USA) bezogen.

Dropout Base (DOB)	1.7 g/l Yeast Nitrogen Base, 20 g/l Dextrose, 5 g/l Ammoniumsulfat
Dropout Base Agar (DOBA)	1.7 g/l Yeast Nitrogen Base, 20 g/l Dextrose, 5 g/l Ammoniumsulfat, 17 g/l Agar
Complete Supplement Mixture (CSM)	10 mg/l Adenin, 50 mg/l Arginin, 80 mg/l Aspartat, 20 mg/l Histidin, 50 mg/l Isoleucin, 100 mg/l Leucin, 50 mg/l Lysin, 20 mg/l Methionin, 50 mg/l Phenylalanin, 100 mg/l Threonin, 50 mg/l Tryptophan, 50 mg/l Tyrosin, 20 mg/l Uracil, 140 mg/l Valin
X- -Gal Stammlösung	2 mg/ml in Dimethylformamid

Flüssigselektionsmedien wurden mit 27 g/l DOB und der vom Hersteller angegebenen Menge CSM (ohne die entsprechenden Aminosäuren) angesetzt. Plattenselektionsmedien wurden mit 43.7 g/l DOBA und der vom Hersteller angegebenen Menge CSM (ohne die entsprechenden Aminosäuren) angesetzt.

Beispielsweise wurde (-Trp) Plattenselektionsmedium mit 43.7 g/l DOBA und 0.74 g/l CSM (-Trp) angesetzt. (-Trp, -Leu, -His, -Ade, +X- -Gal) Plattenselektionsmedium wurde zunächst ohne X- -Gal angesetzt, das nach dem Autoklavieren in einer Konzentration von 20 mg/l zugegeben wurde.

2.1.8 Zelllinien

Zelllinie:	Typ:	Medium:	Referenz/ATCC-Nr.:
COS-7	SV40-transformierte Affennierenfibroblasten (Grüne Meerkatze, Cercopithecus aethiops)	DMEM	CRL-1651; (Gluzman, 1981)
A431	humanes epidermales Vulvakarzinom	DMEM	CRL-1555; (Giard <i>et al.</i> , 1973)
NE-1	murine NIH 3T3 Fibroblasten stabil transduziert mit humaner EGFR cDNA	DMEM	(Beerli <i>et al.</i> , 1994a)

Die verwendeten Säugerzelllinien wurden im Brutschrank (Binder, Tuttlingen) bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert, zweimal wöchentlich mit frischem Medium versorgt und nach Bedarf mindestens einmal pro Woche abgelöst und verdünnt frisch ausgesät. Für die

Kultur der Zellen wurden dem jeweiligen Wachstumsmedium 10% hitzeinaktiviertes FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugegeben. FCS wurde zur Inaktivierung von Komplement vor Gebrauch 30 min bei 56 °C erhitzt. Die Langzeitaufbewahrung erfolgte in flüssigem Stickstoff in einem Medium aus FCS und 10% DMSO (Carl Roth, Karlsruhe).

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen und Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Lösung I 150 mM RbCl₂, 50 mM MnCl₂, 30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl₂, 13% (v/v) Glycerin, pH 5.8, sterilfiltriert

Lösung II 10 mM MOPS, 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂, 13% (v/v) Glycerin, pH 7.0, sterilfiltriert

500 ml Bakterienkultur wurden in LB-Medium bis zu einer OD_{600nm} von 0.48-0.5 herangezogen und anschließend bei 4 °C für 10 min mit 860 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden in 170 ml eiskalter Lösung I resuspendiert und 1-2 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension wie oben beschrieben zentrifugiert und das Zellpellet in 12.5 ml eiskalter Lösung II resuspendiert. Die Zellen wurden in Aliquots zu 250 µl schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation wurden kompetente *E. coli* Zellen zunächst auf Eis aufgetaut. 100 µl Bakteriensuspension wurden mit 0.1-1 µg gereinigter Plasmid-DNA bzw. der Hälfte eines Ligationsansatzes vermischt und für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschritt von 1.5 min bei 42 °C (für BL21 Stämme 30 sec.) , 2 min Inkubation auf Eis und 1 h Schütteln bei 37 °C in 1 ml LB Medium. Danach wurden die Bakterien auf Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und weiter bei 37 °C inkubiert. Die Konzentrationen der eingesetzten Antibiotika betragen 100 µg/ml für Ampicillin, 50 µg/ml für Kanamycin und 20 µg/ml für Tetracyclin.

2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden Kits der Firma Qiagen (Hilden) gemäß den Anleitungen des Herstellers verwendet. Dabei wurde zur analytischen DNA-Isolierung ("Miniprep") der Qiaprep spin- und zur präparativen DNA-Isolierung der Plasmid Midi- bzw. Plasmid Maxi-Kit benutzt. Nach alkalischer Lyse der Zellen und RNaseA-Behandlung des Lysats wurde dieses zunächst mit Natriumacetat neutralisiert und dann zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene Plasmid-DNA wurde dann bei geringer Salzkonzentration an eine säulengepackte Silikatmatrix adsorbiert. Auf einen Waschschrift bei mittlerer Salzkonzentration zur Entfernung von RNA, Proteinen und niedermolekularen

Verunreinigungen folgte die Elution der DNA in 1.25 M NaCl sowie die Präzipitation mit Propanol-2 zur Konzentrierung und Entsalzung.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte durch Messung der Extinktion bei 260 nm in 1 cm Quarzküvetten. Nach Chargaff (1955) entspricht eine $OD_{260\text{ nm}}=1$ einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA und 37 µg/ml einzelsträngiger DNA.

2.2.3 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und Elution von Restriktionsfragmenten aus Agarosegelen

Zur Spaltung von Plasmid-DNA wurden mindestens 5 U/µg DNA des entsprechenden Restriktionsenzym in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet. Zur Vermeidung von unspezifischer Aktivität des Restriktionsenzym wurde darauf geachtet, daß der Restriktionsansatz nicht mehr als 5% Glycerin enthielt. Die Inkubationszeit betrug in der Regel 1-3 h bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur. Die Reaktion wurde durch Hitzeinaktivierung oder durch Zugabe von DNA-Auftragspuffer gestoppt.

Zur Vermeidung eines Ringschlusses des zur Ligation eingesetzten linearisierten Plasmids wurden Plasmide im Anschluss an einen Restriktionsverdau üblicherweise an ihren 5'-Enden dephosphoryliert. Hierzu wurde 1 U Alkalische Phosphatase (Calf Intestine Phosphatase; CIP; New England Biolabs, Schwalbach) in den für 10 min bei 75 °C inaktivierten Restriktionsansatz gegeben und anschließend 30 min bei 37 °C inkubiert.

Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte durch Elektrophorese in 0.6-2.5%-igen Agarosegelen in TAE Laufpuffer bei 8 Volt/cm Gellänge. Zur Elution von DNA Fragmenten aus Agarosegelen wurde der Qiaquick-Gelextraktionskit der Firma Qiagen (Hilden) entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet.

2.2.4 Ligation von DNA Fragmenten

Zur Ligation wurde Vektor-DNA und DNA-Insert in verschiedenen molaren Verhältnissen (von ca. 1:10 bis 1:1) eingesetzt. Die Ligation erfolgte bei 16 °C über Nacht in einem Volumen von 20 µl im vom Hersteller gelieferten Ligasepuffer und 1 Weiss-Einheit an T4-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim).

2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA Fragmenten erfolgte in einem GeneAmp 9600 Thermocycler (Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA). Das Reaktionsvolumen betrug 50 oder 100 µl bestehend aus der DNA-Matrize (ca. 50 ng Plasmid-DNA), 1 Unit Vent DNA Polymerase (New England Biolabs, Schwalbach), Vent DNA Polymerasepuffer, je 25 pmol der entsprechenden Oligonukleotidprimer und 200 µM jedes der vier Desoxyribonukleotide. Die Polymerase wurde nach 5 min Denaturierung der DNA-Matrize bei 94 °C zugegeben. Falls nicht anders angegeben, wurde das Anlagern der Primer für 1 min bei 55 °C, die Polymerasereaktion 1 min bei 72 °C und die Denaturierung 1 min bei 94 °C jeweils für 30 Zyklen durchgeführt. Anschließend wurden die amplifizierten DNA Fragmente durch Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und analysiert bzw. isoliert.

2.2.6 Expression und Reinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli*

Puffer A	8 M Harnstoff, 50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl
Puffer B	50 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 3 mM PMSF

Die Expression rekombinanter Proteine wurde in den *E. coli*-Stämmen XL1-Blue, BL21-CodonPlus(DE3)-RP bzw -RIL oder Rosetta-gami(DE3) durchgeführt, die das jeweilige Expressionsplasmid enthielten. Übernachtskulturen wurden aus einzelnen Kolonien in 200 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin herangezogen. Dazu wurden 600 ml des gleichen Mediums gegeben, und die Kultur wurde in 2 l Schikanekolben bei 37 °C bis zu einer OD_{600 nm} von 0.8-1.0 herangezogen. Die Induktion erfolgte mit 0.5-1.0 mM IPTG für 90 min bei RT und 150 Upm. Zur Generierung von unlöslichen Proteinaggregaten („inclusion bodies“) wurde mit 1 mM IPTG 5-6 h bei 37 °C und 150 Upm induziert. Die Bakterien wurden bei 4400 x g für 10 min zentrifugiert und direkt lysiert oder bis zur Reinigung der rekombinanten Proteine bei -80 °C gelagert.

Für die denaturierende Reinigung rekombinanter *E. coli* Proteine wurde der Zellaufschluß in Puffer A durchgeführt, für die Reinigung von „inclusion bodies“ oder für die native Reinigung in Puffer B. Bakterienpellets aus 0.8 l Kulturen von induzierten Bakterien wurden in 30 ml des entsprechenden Puffers resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte unter Verwendung einer French[®] Pressure Cell Press (SLM-Aminco, Spectronic Instruments, Cheshire, WA, USA).

Zur Reinigung von „inclusion bodies“ wurden die Lysate 10 min bei 5000-10000 x g und 4 °C zentrifugiert, wobei aufgrund ihrer hohen Dichte vorwiegend „inclusion bodies“ sedimentiert werden, während unlösliche Zellbestandteile wegen ihrer geringeren Dichte deutlich langsamer sedimentieren. Die Pellets wurden in Puffer B resuspendiert und nochmals 10 min bei 5000-10000 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Pellets in Puffer A gelöst und wie die Lysate für die denaturierende und native Reinigung weiterbehandelt.

Die Proben wurden für 30 min bei 40000 x g und 4 °C zentrifugiert, um unlösliche Zellbestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde zusätzlich durch Faltenfilter filtriert. Die denaturierende Reinigung mit Hilfe einer FPLC (Pharmacia) bei RT durchgeführt. Die native Reinigung erfolgte bei 4 °C unter Verwendung einer Äkta FPLC Anlage (Amersham Biosciences).

Die in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Proteine enthalten jeweils Abschnitte aus sechs Histidinen (His-Tag), die eine Reinigung der Proteine mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie erlauben. Hierfür wurden Pharmacia C10/10 Säulen mit 5 ml suspendierter "Chelating Sepharose" gefüllt und mit 50 ml H₂O gewaschen. Anschließend wurde 2% ige (w/v) NiSO₄-Lösung (30 ml) durch die Matrix gepumpt und ungebundene Nickelionen mit H₂O (15 ml) entfernt. Daraufhin wurde die Säule mit 20 ml des jeweiligen Ausgangspuffers äquilibriert. Das Lysat wurde mit einer Flußrate von 1 ml/min durch die Säule gepumpt. Danach wurde die Säule mit je 50 ml des jeweiligen Ausgangspuffers, sowie des Ausgangspuffers mit 40 mM Imidazol gewaschen. Spezifisch gebundene Proteine wurden in 250 mM Imidazol enthaltendem Auftragspuffer eluiert. Die

Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE und nachfolgender Coomassie Färbung analysiert.

2.2.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Proteinproben wurden für 5 min in Auftragspuffer bei 96 °C denaturiert und dann durch SDS-PAGE (Sambrook *et al.*, 1989) in Mini-Protean II Kammern von Biorad (München) aufgetrennt. Die Elektrophorese durch das Sammelgel erfolgte bei 100-140 V und durch das Trenngel bei 130-170 V.

2.2.8 Nachweis von Proteinen durch Coomassie Färbung und Western blot

Anodenpuffer I	300 mM Tris, 20% (v/v) Ethanol, pH 10.4
Anodenpuffer II	25 mM Tris, 20% (v/v) Ethanol, pH 10.4
Kathodenpuffer	25 mM Tris, 40 mM 6-Amino-n-hexansäure, 20% (v/v) Ethanol, pH 10.4
Strippingpuffer	100 mM DTT, 2% /w/v SDS, 100 mM Tris-HCl, pH 6.8

Zur direkten Proteinfärbung wurde das Gel danach für 2 h in Färbelösung gelegt und anschließend bis zum gewünschten Maß entfärbt. Alternativ wurden die Proteine in Halbtrockenblotkammern von Froebel (Lindau) auf Immobilon-P Membranen von Millipore übertragen (Blotaufbau: Drei Lagen Whatman 3MM Papier in Anodenpuffer I, drei Lagen in Anodenpuffer II, Membran, SDS-Polyacrylamidgel, drei Lagen Whatman 3MM Papier in Kathodenpuffer). Die Membran wurde vorher kurz in Ethanol und anschließend in Anodenpuffer II getränkt. Die Elektrophorese wurde für 50 min bei 1 mA/cm² Membranfläche durchgeführt. Um unspezifische Antikörperbindung auf der Membran zu minimieren, wurde die Membran 15 min mit 3% fettfreiem Milchpulver (Sigma-Aldrich, Taufstein) in TTBS geblockt. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte für 60 min, die Inkubation mit dem zweiten, HRP-konjugierten Antikörper für 20 min, jeweils in 3% fettfreiem Milchpulver in TTBS. Nach der Inkubation mit dem Erstantikörper wurde die Membran dreimal für 3 min mit TTBS gewaschen, vor der Nachweisreaktion außerdem zusätzlich mit TBS. Der Bindungsnachweis der Antikörper erfolgte mit dem ECL-Chemolumineszenzsystem von Amersham Biosciences (Freiburg) entsprechend den Angaben des Herstellers.

In manchen Fällen wurden Membranen „gestrippt“ und mit einem anderen Erstantikörper hybridisiert. Zum „Stripping“ der Membran wurde diese bei 70 °C 40 min in Strippingpuffer inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 3 min mit TTBS gewaschen und 15 min mit 3% fettfreiem Milchpulver in TTBS geblockt. Anschließend wurde wie oben beschrieben mit Erst- und Zweitantikörper hybridisiert.

2.2.9 Immunisierung von Mäusen mit rekombinantem Protein

Die Immunisierung von BALB/c Mäusen wurde mit rekombinanter gereinigter zytoplasmatischer Domäne des humanen ErbB2 durchgeführt.

Zur Kontrolle wurden den Mäusen vor der ersten Immunisierung zunächst ca. 50 µl Blut abgenommen, das zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung eingefroren wurde.

Der erste Immunisierungsschritt erfolgte am Tag 1 durch intraperitoneale Injektion einer Lösung von 50 µg mittels denaturierender Nickel-Affinitätschromatographie gereinigter zytoplasmatischer Domäne des humanen ErbB2 in 300 µl PBS.

An Tag 12 wurden den Mäusen zur Kontrolle ca. 50 µl Blut abgenommen, das zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung eingefroren wurde.

Der erste „boost“ erfolgte am Tag 21 durch intraperitoneale Injektion einer Lösung von 30 µg mittels denaturierender Nickel-Affinitätschromatographie gereinigter zytoplasmatischer Domäne des humanen ErbB2 in 200 µl PBS.

An Tag 33 wurden den Mäusen zur Kontrolle ca. 50 µl Blut abgenommen, das zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung eingefroren wurde.

Der zweite „boost“ erfolgte am Tag 39 durch intravenöse Injektion einer Lösung von 30 µg mittels nativer Nickel-Affinitätschromatographie gereinigter zytoplasmatischer Domäne des humanen ErbB2 in 200 µl PBS.

An Tag 42 wurden zur Kontrolle ca. 50 µl Blut entnommen und zentrifugiert. Zur Kontrolle der Immunisierung wurden die Seren im Western blot auf ihre Spezifität für ErbB2 getestet. Die Mäuse wurden getötet, die Milzen entnommen und diese bis zu deren direkt anschließenden Weiterverwendung auf Eis gekühlt.

2.2.10 Isolierung von RNA aus Milzzellen

Die Isolierung von mRNA aus den Mäusemilzen erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurde die Gesamt-RNA aus den Milzen isoliert. Hierzu wurde das RNeasy[®] Midi Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Anschließend wurde die mRNA mit Hilfe des PolyATtract[®] mRNA Isolation System III Kit (Promega, Madison, WI, USA) isoliert. Die unten beschriebenen Puffer waren jeweils in den Kits enthalten.

Zur Isolierung der Gesamt-RNA wurden die entnommenen Milzen der mit rekombinanter zytoplasmatischer Domäne des humanem ErbB2 immunisierten BALB/c Mäuse einzeln in RLT Puffer aufgenommen. Dieser Hochsalzpuffer enthält Guanidinisothiozyanat, das stark denaturierend wirkt und daher RNasen denaturiert. Mit Hilfe eines ULTRA-TURRAX T25 Homogenisators (Janke & Kunkel-IKA-Labortechnik, Staufen) wurden die Milzen 60 sec unter Eiskühlung homogenisiert. Das Milzlysate wurde 10 min bei 5000 x g zentrifugiert und der Überstand wurde mit 1 Volumen 70%igem Ethanol versetzt. Das Gemisch wurde auf eine RNeasy Säule gegeben und zentrifugiert. Die an die Silikagelmembran gebundene Gesamt-RNA wurde durch einen Waschschrift mit RW1 Puffer und zwei Waschschriften mit RPE Puffer von Kontaminationen befreit. Die Gesamt-RNA wurde mit RNase freiem Wasser eluiert.

Zur Isolierung der mRNA aus der Gesamt-RNA wurde die Hälfte der aus den jeweiligen Mäusemilzen gewonnenen Gesamt-RNA 10 min bei 65 °C inkubiert, biotinylierte Oligo-(dT) Sonde („probe“) wurde zugegeben und das Gemisch wurde auf RT abgekühlt, so dass die biotinylierten Oligo-(dT) Sonden an die 3'-poly(A) Sequenz der mRNA binden

konnten. Streptavidin gekoppelte paramagnetische Partikel, an die die Oligo-(dT)-mRNA Hybride aufgrund der Streptavidin-Biotin Interaktion binden, wurden zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Mit Hilfe eines Magneten wurden die paramagnetischen Partikel von der flüssigen Phase abgetrennt und mehrmals mit 0.1x SSC Puffer gewaschen. Unter Zugabe von RNase freiem Wasser wurde die mRNA von den paramagnetischen Partikeln eluiert. Das Eluat wurde bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.2.11 Klonierung einer anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary

Die Klonierung einer Maus anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary erfolgte unter Verwendung des Mouse ScFv Module als Komponente des Recombinant Phage Antibody Systems (Amersham Biosciences, Freiburg).

Ausgehend von der mRNA, die aus den Milzen der immunisierten BALB/c Mäuse gewonnen worden war, wurde unter Einsatz des Enzyms M-MuLV Reverse Transkriptase als Komponente des „Primed First-Strand Mix“ ein cDNA Einzelstrang Abbild der mRNA synthetisiert. Um Sekundärstrukturen der mRNA zu eliminieren, die bei der Einzelstrang cDNA Synthese stören, wurde die mRNA zunächst 10 min auf $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe des „Primed First-Strand Mix“ wurde der Reaktionsansatz eine Stunde bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert.

Die so synthetisierte Einzelstrang-cDNA wurde anschließend als template für die PCR Amplifikation der variablen Domänen der leichten und der schweren Antikörperketten verwendet. Nach Zugabe von dNTPs, Taq DNA Polymerase und eines spezifischen Oligonukleotidgemisches zur Amplifikation der variablen Domänen der leichten bzw. schweren Antikörperketten wurden 30 Zyklen des folgenden PCR Programms durchgeführt: 30 sec $94\text{ }^{\circ}\text{C}$; 1 min $55\text{ }^{\circ}\text{C}$; 1 min $72\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Die PCR Produkte wurden über ein 1.5%iges Agarosegel getrennt und die amplifizierten variablen Domänen der leichten und der schweren Antikörperketten wurden aus dem Gel ausgeschnitten, extrahiert und quantifiziert.

Je 50 ng der variablen Domänen der schweren und der leichten Antikörperketten wurden unter Zugabe von dNTPs, MgCl_2 , Taq DNA Polymerase, PCR Puffer und Linkeroligonukleotiden durch 7 Zyklen des folgenden Programms verknüpft: 1 min $94\text{ }^{\circ}\text{C}$; 4 min $63\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hierbei lagern sich Sequenzen der variablen Domänen der schweren und der leichten Antikörperketten, die zu den Linkeroligonukleotiden komplementär sind, an die Linkeroligonukleotide an und werden durch die Taq DNA Polymerase miteinander verbunden („overlap extension PCR“).

Die so entstandenen scFv Sequenzen wurden unter Zugabe von endständigen PCR Primern, die die *SfiI* bzw. *NotI* Schnittstellen einführen, amplifiziert. Das PCR Produkt wurde über ein 1.5%iges Agarosegel aufgetrennt und die scFv Bande bei ca. 750 bp ausgeschnitten, extrahiert und quantifiziert.

Die isolierten scFv Antikörperfragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *SfiI* und *NotI* geschnitten, über ein 1.5%iges Agarosegel aufgetrennt und die scFv Bande ausgeschnitten, extrahiert und quantifiziert.

SfiI und *NotI* geschnittener Phagemid Vektor pHEN2 wurde mit den *SfiI* und *NotI* geschnittenen scFv Antikörperfragmenten im Massenverhältnis 1:1 ligiert.

20 Ansätze von je 100 µl elektrokompenten *E. coli* TG-1 Zellen wurden mit je 5 µl Ligationsansatz elektroporiert, auf 2YTA Platten ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die über Nacht gewachsenen Kolonien wurden in 2YTA Medium aufgenommen und durchmischt.

500 µl dieser Originallibrary wurden zum Animpfen einer Kultur verwendet, die zur Phagengewinnung mit Helferphage M13KO7 infiziert wurde. Mit weiteren 500 µl wurde eine Kultur angeimpft, die zur Gewinnung von pHEN2 scFv Library Plasmid verwendet wurde. Die restliche Originallibrary wurde als Glycerinstocks bei -80 °C eingefroren.

2.2.12 Screening der anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary mittels Phage Display Biopanning

Zur Beschichtung einer Kunststoffmatrix mit Antigen wurden 4 Polystyrenröhrchen (Nunc, Wiesbaden) über Nacht mit 50 µg/ml, 10 µg/ml, 5 µg/ml bzw. 2.5 µg/ml rekombinanter intrazellulärer Domäne des humanen ErbB2 in je 4 ml 50 mM Natriumhydrogencarbonat, pH 9.6 bei 4 °C inkubiert, zusammen mit 4 Kontrollröhrchen, die 4 ml 50 mM Natriumhydrogencarbonat, pH 9.6 enthielten. Alle Röhrchen wurden einmal mit PBS gewaschen, mit 2% Milchpulver in PBS über Nacht bei 4 °C geblockt, abschließend 2x mit PBS gewaschen und bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert.

Im ersten Biopanning wurden 10¹¹ cfu anti-ErbB2 Library Phagenpartikel in 4 ml 2% Milchpulver in PBS in das mit 50 µg/ml rekombinanter intrazellulärer Domäne des humanen ErbB2 beschichtete Polystyrenröhrchen bzw. in ein Kontrollröhrchen gegeben und 2 Stunden bei RT inkubiert. Ungebundene Phagen wurden in 10 Waschschritten mit PBST und 10 Waschschritten mit PBS entfernt. Zur Elution der gebundenen Phagen wurden die Röhrchen nach Zugabe von 1 ml 100 mM Triethylamin in H₂O 30 min bei RT invertiert. Zur Neutralisation wurde das Eluat in 0.5 ml 1 M Tris, pH 7.5 gegeben. 300 µl Eluat wurden als Sicherheitsreserve bei 4 °C aufbewahrt. Die restlichen 1.2 ml wurden zur Infektion von 9 ml einer sich in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase befindlichen TG-1 Kultur verwendet. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurde ein Aliquot zur Bestimmung der Anzahl infizierter TG-1 Zellen entnommen. Die restliche *E. coli* TG-1 Kultur wurde halbiert und eine Hälfte wurde auf 2YTA Platten ausplattiert, über Nacht bei 37 °C inkubiert, mit 2YTA Medium abgespült und bei -80 °C als Glycerinstocks eingefroren. Zur zweiten Hälfte der *E. coli* TG-1 Kultur wurden 4.5 ml 2YTAG und 10¹⁰ cfu M13KO7 Helferphage zugegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen zentrifugiert, in 20 ml 2YTAK resuspendiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert.

Die *E. coli* TG-1 Kultur wurde zentrifugiert und die Phagen aus dem Überstand gefällt, titriert und in einer zweiten Biopanning-Runde eingesetzt.

Insgesamt vier Biopanning-Runden wurden durchgeführt. Im Gegensatz zur ersten Biopanning-Runde wurden in den Runden 2-4 abnehmende Mengen Antigen (s.o.) eingesetzt und 20 statt 10 Waschschriffe durchgeführt.

2.2.13 Screening der anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary mittels „Delayed Infectivity Panning“ (DIP)

E. coli TG-1 Zellen wurden mit dem Vektor pIB-Tx-ErbB2 transformiert und in LB Medium mit 25 µg/ml Kanamycin über mehrere Tage bei 16 °C herangezogen. Die Antigenpräsentation wurde in einem „spun-cell“ ELISA Experiment nachgewiesen.

Zur Selektion ErbB2-spezifischer Phagen wurde 1 OD_{600 nm} pIB-Tx-ErbB2 transformierter *E. coli* TG-1 Zellen mit kaltem PBST gewaschen und in 1ml PBST mit 1×10^{11} cfu anti-ErbB2 Library Phagenpartikeln resuspendiert und eine Stunde auf Eis inkubiert. (Unter der Annahme, daß 10% der Phagenpartikel scFv präsentieren, entspricht dies 10^{10} cfu eingesetzter scFv-präsentierender Phagenpartikel.) Durch 3 Waschschriffe mit kaltem PBST und 3 Waschschriffe mit 2YTKG wurden ungebundene Phagen entfernt. Die Zellen wurden in 1 ml 2YTKG resuspendiert und zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Ausgehend von dieser *E. coli* TG-1 Kultur wurde ein Aliquot zur Bestimmung der Anzahl infizierter TG-1 Zellen entnommen. Die restliche *E. coli* TG-1 Kultur wurde halbiert und eine Hälfte wurde auf 2YTA Platten ausplattiert, über Nacht bei 37 °C inkubiert, mit 2YTA Medium abgespült und als Glycerinstocks bei -80 °C eingefroren. Zur zweiten Hälfte der *E. coli* TG-1 Kultur wurden 4.5 ml 2YTAK und 10^{10} cfu R408 Helferphage (Stratagene, Amsterdam NL) zugegeben. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen zentrifugiert, in 20 ml 2YTAK resuspendiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die *E. coli* TG-1 Kultur wurde zentrifugiert und die Phagen aus dem Überstand gefällt, titriert und in einer zweiten Runde DIP eingesetzt.

2.2.14 Phagenfällung

PEG/NaCl 20% (w/v) Polyethylenglykol 6000, 2.5 M NaCl

Zur Phagenfällung wurde Überstand einer *E. coli* TG-1 Kultur, die mit selektionierten Phagemids aus einer DIP Runde oder einer Biopanning Runde infiziert und mit Helferphagen superinfiziert worden war, mit 1/5 Volumen PEG/NaCl versetzt und mindestens 2 h bei 4 °C inkubiert. Die Fällung der Phagenpartikel erfolgte durch 15 min Zentrifugation bei 14000 x g und 4 °C. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und verworfen. Das weiße Phagenpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert und zur Abtrennung eventuell mitgefällter *E. coli* Zellen in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß 5 min bei 14000 x g zentrifugiert. Der Phagenüberstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und bei 4 °C gelagert.

2.2.15 Bestimmung des Phagentiters

Zur Bestimmung des Phagentiters wurden eine *E. coli* TG-1 Kultur bis zu einer OD_{600 nm} von 0.4 - 0.5 herangezogen. Je 90 µl dieser TG-1 Kultur wurden mit je 10 µl Phagen verschiedener Verdünnungen infiziert. Ausgehend von den unverdünnten Phagen wurden die Phagen in 1:10 Verdünnungsschritten verdünnt. Nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C wurden für jede Verdünnung je 2x10 µl Kultur auf eine 2YTA Platte aufgetropft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die Zahl der bei der größten Verdünnung gewachsenen Kolonien wurde für beide 10 µl Tropfen bestimmt und ein Mittelwert gebildet. Aus diesem Mittelwert wurde unter Berücksichtigung der Verdünnung auf den Phagentiter in [cfu/ml] rückgerechnet.

2.2.16 Amplifikation selektionierter Phagenklone zur Untersuchung im Phagen ELISA

Zur Amplifikation selektionierter Phagenklone wurden Phagen aus dem Output der zweiten DIP Runde, wie unter 2.2.15 beschrieben, in verschiedenen Verdünnungen zur Infektion von *E. coli* TG-1 Zellen verwendet. Infizierte *E. coli* wurden auf 2YTA Platten über Nacht bei 30 °C herangezogen. Anschließend wurden einzelstehende Kolonien gepickt und zum Animpfen von je 150 µl 2YTAG verwendet, die pro Vertiefung in einer 96 well Mikrotiterplatte vorgelegt worden waren. Zur Kontrolle wurden vier Vertiefungen der Mikrotiterplatte nicht mit Phagen-infizierten *E. coli* angeimpft. Die Mikrotiterplatte („masterplate“) wurde abgedeckt und über Nacht bei 30 °C und 150 Upm inkubiert. Anschließend wurden jeweils 22 µl pro Vertiefung abgenommen und zusammen mit 128 µl 2YTAG und 3.8 x 10⁹ cfu M13KO7 Helferphage pro Vertiefung in einer zweiten 96 well Mikrotiterplatte („rescueplate“) 2 h bei 37 °C und 150 Ump inkubiert. Die „rescueplate“ wurde 15 min bei 4000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden in eine frische, mit BSA beschichtete 96 well Mikrotiterplatte überführt und im Phagen ELISA (siehe 2.2.17) auf spezifische Bindung an ErbB2 und unspezifische Bindung an BSA getestet.

2.2.17 Phagen ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

coating Lösung:	10 µg/ml zu immobilisierendes Protein in 0.8 M Harnstoff, 25 mM Imidazol, 40 mM NaHCO ₃ , pH 9.6
blocking Lösung:	3% (w/v) Milchpulver in PBS
Entwicklungspuffer:	1 mg/ml ABTS in ABTS Puffer (Roche Diagnostics, Mannheim)

Die Bindung von scFv-Phagen an ErbB2 wurde in Phagen ELISA Experimenten getestet. Dazu wurde jeweils 1 µg Protein in 100 µl coating Lösung je Vertiefung in 96 well Mikrotiterplatten geben und über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Üblicherweise wurden hierzu Mikrotiterplatten zur Hälfte mit ErbB2 und zur anderen Hälfte mit BSA beschichtet, so dass die Bindung der scFv-Phagenklone an ErbB2 und BSA auf der selben Platte

getestet werden konnte. Die Vertiefungen wurden sechs mal mit PBST gewaschen und anschließend 3 h bei RT mit 200 µl blocking Lösung je Vertiefung inkubiert und erneut drei mal mit PBST gewaschen. Danach wurden jeweils 100 µl Phagenüberstand, die von der „rescueplate“ Mikrotiterplatte (siehe 2.2.16) entnommen und 1:1 mit PBST verdünnt worden waren, pro Vertiefung der 96 well Mikrotiterplatte zugegeben und 2 h bei RT inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen mit PBST wurden 100 µl Anti-fd BacterioPhage Erstantikörper in einer Verdünnung von 1:2500 zugegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST wurden 100 µl Anti-Kaninchen/HRP Zweitantikörper in einer Verdünnung von 1:5000 zugegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach erneutem sechsmaligem Waschen mit PBST wurde die Färbereaktion durch Zugabe von 100 µl Entwicklungspuffer je Vertiefung gestartet. Nach ca. 30 min wurde die Absorption bei 405 nm in einem ELISA-Reader (Dynatech) bestimmt.

2.2.18 Herstellung und Transformation kompetenter Hefen

10x LiAc	1 M Lithiumacetat (LiAc), mit Essigsäure auf pH 7.5 eingestellt, autoklaviert
10x TE	0.1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.5, autoklaviert
50% PEG	50% (w/v) PEG 4000, autoklaviert
PEG/LiAc Lösung	8 Teile 50% (w/v) PEG, 1 Teil 10x TE, 1 Teil 10x LiAc

Zur Herstellung kompetenter Hefen wurde eine Vorkultur von 100 ml YPD Medium oder entsprechendem Selektionsmedium mit einer einzelnen Hefekolonie angeimpft. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 30 °C und 250 Upm geschüttelt und zum Animpfen von 500 ml YPD Medium oder entsprechendem Selektionsmedium zu einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0.2 verwendet. Die Kultur wurde bei 30 °C und 250 Upm etwa 3 h bis zu einer $OD_{600\text{ nm}}$ von 0.5-0.6 geschüttelt und anschließend 5 min bei 1000 x g und RT zentrifugiert. Die Hefezellen wurden mit sterilem 1 x TE gewaschen und in 1.5 ml sterilem 1 x TE/LiAc resuspendiert.

Zur Transformation kompetenter Hefen wurden 1-2 µg Hefevektor DNA und 200 µg Lachssperma DNA vorgelegt. Nach Zugabe von 100 µl kompetenter Hefezellen und 600 µl PEG/LiAc Lösung wurde der Transformationsansatz 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von 70 µl DMSO wurden die Zellen 15 min einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Zellen zentrifugiert, einmal mit 1 x TE gewaschen, in 0.5 ml 1 x TE resuspendiert und ausplattiert.

2.2.19 Analyse der Proteinexpression in Hefezellen

Basis-Aufschlusspuffer	8 M Harnstoff, 5%(w/v) SDS, 40 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1 mM EDTA, 0.4 mg/ml Bromphenolblau
------------------------	--

Aufschlusspuffer 1 ml Basis-Aufschlusspuffer, 10 µl β -Mercaptoethanol, 5 mM PMSF, Complete EDTA-free protease inhibitor mix (Roche Diagnostics, Mannheim)

Zur Analyse der Proteinexpression in Hefe wurden mit Einzelklonen angeimpfte 5 ml Vorkulturen über Nacht bei 30 °C herangezogen. Diese Vorkulturen wurden zum Animpfen von 20 ml Kulturen verwendet. Bei einer OD_{600 nm} von 0.4 - 0.6 wurde ein Volumen, das 15 ml einer Kultur mit einer OD_{600 nm} von 0.5 entspricht, auf 20 ml Eis gegeben, das in 50 ml Kunststoffröhrchen vorgelegt worden war. Anschließend wurden diese bei 4 °C 5 min bei 1000 x g zentrifugiert. Danach wurden die Zellen mit 50 ml kaltem H₂O gewaschen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Zum Aufschluss der Hefezellen wurden 80 µl säurebehandelter Glasperlen (Roth, Karlsruhe) und 100 µl Aufschlusspuffer vorgelegt und bei 70 °C vorinkubiert. Nach Zugabe der schockgefrorenen und wieder aufgetauten Zellen und 10 min Inkubation bei 70 °C wurde 2 min gevortext. Glasperlen, Zelltrümmer und verbliebene intakte Zellen wurden durch 5 min Zentrifugation bei 4 °C und 14000 Upm in einer Eppendorf Tischzentrifuge abgetrennt. Der Überstand wurde abgenommen und auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von weiteren 50 µl Aufschlusspuffer und 5 min Inkubation bei 95 °C wurde erneut 2 min gevortext und zentrifugiert. Der zweite Überstand wurde mit dem ersten vereinigt und ein Aliquot von 50 µl auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Der Nachweis der Proteine erfolgte mittels Western blot.

2.2.20 Plasmidreinigung aus Hefezellen

Zur Isolierung von Hefepiasmiden wurden mit Einzelklonen angeimpfte 5 ml Vorkulturen über Nacht bei 30 °C herangezogen. 1 ml der Vorkultur wurde zentrifugiert. In Analogie zur analytischen DNA-Isolierung ("Miniprep") aus *E. coli* wurde das Qiaprep spin-Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Abweichend zum Protokoll für *E. coli* wurden die Zellen während der alkalischen Lyse zusätzlich mechanisch mit Hilfe von Glasperlen aufgeschlossen.

2.2.21 Yeast Two-Hybrid Screening

Die Durchführung des Yeast Two-Hybrid Screenings erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden die Hefezellen mit dem „bait“ Vektor transformiert. Im MATCHMAKER I System handelt es sich hierbei um den Vektor pGBT9-EGFR, im MATCHMAKER III System um den Vektor pGBKT7-EGFR. Transformierte Hefezellen wurden auf Selektionsplatten ohne Tryptophan (-Trp) herangezogen. Einzelne Klone der transformierten Hefen wurden auf Expression des GAL4 DNA BD-EGFR Fusionsproteins untersucht. In einem zweiten Schritt wurde ein mit dem „bait“ Vektor transformierter Hefeklon mit der „prey“ Vektor scFv Library transformiert. Im MATCHMAKER I System handelt es sich hierbei um die pGAD424-scFv Library, im MATCHMAKER III System um die pGADT7-scFv Library. Bei einer Library Transformation wurden üblicherweise 10-15 der oben genannten Ansätze

mit je 4 µg Vektor-DNA transformiert und anschließend vereinigt. Zur Kontrolle der Transformationseffizienz wurde ein Aliquot der so transformierten Hefezellen in verschiedenen Verdünnungen auf Selektionsplatten ohne Tryptophan und Leucin (-Trp, -Leu) herangezogen. Die restlichen transformierten Hefezellen wurden auf Selektionsplatten ohne Tryptophan, Leucin und Histidin (-Trp, -Leu, -His) (MATCHMAKER I System) bzw. Selektionsplatten ohne Tryptophan, Leucin, Histidin, Adenin und mit 20 µg/ml X- -Gal (-Trp, -Leu, -His, -Ade, +X- -Gal) (MATCHMAKER III System) herangezogen.

Die im MATCHMAKER I System auf den Selektionsplatten (-Trp, -Leu, -His) gewachsenen Klone wurden auf zwei Selektionsplatten (-Trp, -Leu, -His) überpickt. Nach Heranwachsen der Hefezellen wurde auf eine der Platten ein Rundfilter aufgelegt und gleichmäßig angedrückt. Um eine Zuordnung der Hefeklone zu ermöglichen, wurden asymmetrisch zwei Löcher durch den Filter in das Medium gestochen. Der Filter wurde mit den Zellen nach oben 10 sec in flüssigem Stickstoff schockgefroren, anschließend bei RT aufgetaut und mit den Zellen nach oben auf einen zweiten, mit 1.8 ml Z Puffer/X-gal Lösung getränkten Filter aufgelegt. Während 30 min bis 8 h Inkubation bei 30 °C wurden die Filter in regelmäßigen Abständen nach Blaufärbung untersucht.

Kolonien, die im MATCHMAKER III System auf den Selektionsplatten (-Trp, -Leu, -His, -Ade, +X- -Gal) gewachsen waren, konnten direkt auf Blaufärbung von X- -Gal untersucht werden.

Aus Hefeklonen, die im Galaktosidaseassay positiv waren, wurde der „prey“ Vektor isoliert und retransformiert in *E. coli*. Nach Plasmidpräparation wurden die darin kodierten scFv Gene mittels PCR amplifiziert, mit dem Restriktionsenzym *MvaI* geschnitten und auf einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Anhand der Restriktionsmuster wurden Gruppen gleicher Restriktionsmuster gebildet. Je ein Prototyp „prey“ Vektor eines Restriktionsmusters wurde retransformiert in den mit dem „bait“ Vektor transformierten Hefeklon. Konnten erneut Klone auf den Selektionsplatten wachsen, und wurde erneut eine Blaufärbung im Galaktosidase Assay beobachtet, wurde von einer positiven Interaktion zwischen „bait“ und „prey“ ausgegangen.

2.2.22 Transiente und stabile Transfektion eukaryontischer Zellen

Zur Transfektion eukaryontischer Zellen wurden 4×10^5 Zellen pro 6 cm Platte ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Vor Zugabe der Transfektionskomplexe wurde das Medium durch frisches Medium ausgetauscht.

Als Transfektionsagens wurde FuGENE 6 (Roche Diagnostics, Mannheim) eingesetzt. 6 µl FuGENE 6 wurden in 100 µl serumfreies Medium pipettiert. Anschließend wurden 2 µg Plasmid DNA zugegeben. Nach 15 min Inkubation bei RT wurden die Transfektionskomplexe tropfenweise über die 6 cm Zellkulturplatten verteilt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C mit den Transfektionskomplexen inkubiert, bevor das Medium gegen frisches Medium ausgetauscht wurde.

Transient transfizierte Zellen wurden gewöhnlich 48 –72 h nach der Transfektion geerntet. Zur Selektion stabil transfizierter eukaryontischer Zellen wurde 3 – 4 Tage nach der Transfektion mit der Selektion auf Antibiotikaresistenz begonnen. Zur Generierung von Einzelklonen wurden die transfizierten Zellen so verdünnt, dass 200 µl Medium, die in jede Vertiefung der 96er Mikrotiterplatten gegeben wurden, theoretisch 0.5 Zellen enthalten waren. Die Zellen wurden unter ständiger Selektion mit Antibiotika herangezogen.

2.2.23 GST „pull-down“ Assay

GST „pull-down“ Bindungspuffer: 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10% (v/v) Glycerin, 0.1% (v/v) NP-40, 0.3 mM DTT, 1mM EDTA, Complete EDTA-free protease inhibitor mix (Roche Diagnostics, Mannheim)

Zur Durchführung von GST „pull-down“ Assays wurden scFv Antikörperfragmente in Gegenwart von ³⁵S-markiertem Methionin und unter der Verwendung des TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega, Madison, WI, USA) *in vitro* translatiert. Ein T7 Promotor im pGADT7 Vektor erlaubt den direkten Einsatz von pGADT7 Derivaten als Matrize in der *in vitro* Translation.

Zur Expression rekombinanter GST Fusionsproteine wurden *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP (Stratagene, La Jolla, CA USA) mit den entsprechenden pGEX-4T1 Derivaten transformiert, in LB Medium mit 100 µg/ml Amp zu einer OD_{600 nm} von 0.8 herangezogen, mit 1 mM IPTG induziert und über Nacht bei 20 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Lysate wurden bei 4 °C und 40000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei 4 °C eine Stunde mit Glutathionsepharose (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) inkubiert. Danach wurde die Glutathionsepharose 4 mal mit PBS gewaschen.

Pro Bindungsreaktion wurden üblicherweise 1 µg rekombinantes GST Fusionsprotein oder 10 µg GST als Negativkontrolle eingesetzt. Nach Zugabe radioaktiv markierter *in vitro* translaterter scFv Fragmente in 1.3 ml GST „pull-down“ Bindungspuffer wurden die Ansätze 2 h bei 4 °C in einem Rotator inkubiert. Die Glutathionsepharose wurde drei mal mit GST „pull-down“ Bindungspuffer gewaschen, in 25 µl 5x SDS Ladepuffer resuspendiert, 5 min auf 95 °C erhitzt, zentrifugiert und der Überstand auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Zur Abschätzung der Bindungseffizienz wurden 10% der eingesetzten Menge an radioaktiv markierten *in vitro* translaterter scFv Fragmenten als Kontrolle aufgetragen.

2.2.24 Immunpräzipitation

Co-IP Puffer: 1% (v/v) Triton X-100, 50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, und Complete EDTA-free protease inhibitor mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen der intrazellulären Domäne des humanen EGFR und scFv Antikörperfragmenten wurden COS-7 Zellen mit den Vektoren pLTR-EGFR und pcDNA3.1-scFv 2, 8, 22, 29 bzw. 30 kotransfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit PBS gewaschen, mit 2 ml kaltem Co-IP Puffer lysiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lysate 15 min bei 4 °C und 14000 x g zentrifugiert. Um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen, wurden 900 µl Überstand zusammen mit 50 µl einer 50%igen Protein G Sepharosesuspension 3 h bei 4 °C rotiert. Die Protein G Sepharose wurde durch Zentrifugation sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und zusammen mit 2 µg C-225 anti-EGFR 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die EGFR Immunkomplexe mit 50 µl einer 50%igen Protein G Sepharosesuspension 3 h bei 4 °C rotiert. Die Immunpräzipitate wurden 3 mal mit Co-IP Puffer gewaschen, in 50 µl SDS Ladepuffer 5 min bei 95 °C inkubiert und auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Als Kontrolle wurden die Eluate der Protein G Sepharosebeads, die nur mit den Lysaten, jedoch ohne Antikörper inkubiert worden waren, aufgetragen. Die Immunpräzipitate wurden durch Western blot unter Verwendung des Ratte anti-HA High Affinity IgG als Erstantikörper und des anti-Ratte/HRP als Zweitantikörper analysiert.

2.2.25 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

A-431 Zellen wurden transient mit den Vektoren pcDNA3.1-scFv 2, 30 bzw. scFv (9E10) transfiziert und auf beschichteten Objektträgern (Lab-TekTM chamber slides, Nunc, Wiesbaden) ausgesät. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen 10 min bei RT mit 3% Paraformaldehyd fixiert und 5 min bei RT mit 0.1% Triton-X-100 in PBS permeabilisiert. Die permeabilisierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und 1 h bei RT mit den Erstantikörpern humanisierter C-225 anti-EGFR und Ratte anti-HA High Affinity IgG in 3% BSA in PBS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2 mal mit PBS gewaschen und 1 h bei RT mit den Zweitantikörpern Alexa Fluor[®] 633 goat anti-human IgG (H+L) und Alexa Fluor[®] 488 goat anti-rat IgG (H+L) in 3% BSA in PBS inkubiert. Die Zellen wurden unter Verwendung eines Konfokalen Laserscanning Mikroskops (Leica DM IRBE, Leica Mikrosysteme, Bensheim) und einem 63 x Objektiv (HCX PL APO, Leica Mikrosysteme, Bensheim) untersucht. Bildausschnitte wurden mit Adobe Photoshop 5.0.2 bearbeitet.

2.2.26 Proliferationsassay

Das Wachstum von Zellen kann mittels Methyl-³H-Thymidin-Einbau in die DNA von sich teilenden Zellen quantifiziert werden. Dazu wurden 3×10^3 stabil transfizierte NE-1 Zellen pro Vertiefung einer 96er Mikrotiterplatte ausgesät. Nach Absetzen der Zellen wurden diese mit Medium ohne oder mit 50 pM EGF bei 37 °C, 5% CO₂ inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (ca. 9 h, 33 h und 57 h nach Absetzen der Zellen) wurden 0.5 µCi Methyl-³H-Thymidin zugegeben und die Mikrotiterplatten weitere 15 h bei 37 °C, 5% CO₂ inkubiert. Dabei wird um so mehr Radioaktivität in die DNA inkorporiert, je mehr Zellteilungen stattfinden. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA abgelöst und mit Hilfe eines „cell harvesters“ (FilterMate; PerkinElmer

Life Sciences, Boston, MA, USA) geerntet, wobei die Zellen mit Wasser (bidest.) aus den Vertiefungen der 96-well Mikrotiterplatte herausgewaschen wurden. Aufgrund des osmotischen Schocks platzten die Zellen und Zellorganellen, wobei die DNA der Zellen freigesetzt wurde. Zellfragmente und DNA wurden durch eine Fieberglasfiltermembran geleitet. Aufgrund ihrer Größe kann intakte DNA die Membran nicht passieren und bleibt auf der Membran zurück. Die Membran wurde getrocknet, mit Scintillationsflüssigkeit benetzt und die Radioaktivität, die proportional zur Zellzahl bzw. zur Zahl der Zellteilungen während der Inkubation mit Methyl-³H-Thymidin ist, in einem Scintillationszähler (TopCount, PerkinElmer Life Sciences) gemessen (counts per minute, cpm).

3. Ergebnisse

3.1 Ausgangsposition und Fragestellung

Die intrazelluläre Expression von single-chain Fv Antikörperfragmenten (scFvs) stellt einen vielversprechenden Ansatz zur selektiven Inhibition intrazellulärer Proteine dar. Durch die Verwendung gut charakterisierter Signalsequenzen können scFv Fragmente in verschiedene Kompartimente von Säugerzellen, wie zum Beispiel in das Endoplasmatische Retikulum (ER), den Nukleus, das Zytosol, die Mitochondrien oder den sekretorischen Weg, dirigiert werden, wo sie ihr Zielantigen neutralisieren können. Viele therapeutisch interessante intrazelluläre Proteine sind im Zytosol eukaryontischer Zellen lokalisiert. Aufgrund des reduzierenden zytoplasmatischen Milieus und der damit verbundenen Destabilisierung durch Verlust zweier intramolekularer Disulfidbindungen stellt der zytoplasmatische Einsatz von scFv Fragmenten hohe Anforderungen an die intrazelluläre Stabilität der Antikörperfragmente. Eine Reihe von Veröffentlichungen beschreiben die gezielte und aufwendige Stabilisierung einzelner Antikörperfragmente mittels „protein engineering“, andere die Isolierung antigenspezifischer scFv Fragmente durch Phagen Biopanning hochdiverser Antikörperlibraries und anschließende Analyse der *in vivo* Stabilität und Funktionalität in Säugerzellen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, durch die Entwicklung geeigneter Screeningsysteme zytoplasmatisch aktive scFv Antikörperfragmente direkt aus diversen Antikörperlibraries zu isolieren. Als Modellsystem wurden die Zielantigene EGFR und ErbB2 gewählt, die Mitglieder der ErbB-Wachstumsfaktorrezeptorfamilie sind und durch ihren Beitrag zur malignen Transformation von Zellen eine wichtige Rolle in der Tumorbilogie und als Zielstrukturen für die Entwicklung therapeutischer Wirkstoffe spielen.

Die Yeast Two-Hybrid Methode ist ein etabliertes System, mit dem Protein-Protein-Wechselwirkungen unter *in vivo* Bedingungen in lebenden eukaryontischen Zellen untersucht werden können. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig überprüft, ob das Yeast Two-Hybrid System auch geeignet ist, um Antikörper/Antigen Interaktionen mit ErbB-Rezeptoren als Zielstruktur zu charakterisieren. Während für die Isolierung EGFR-spezifischer scFv Antikörper auf bereits vorhandene validierte scFv-Libraries zurückgegriffen werden konnte, stand für ErbB2 als Zielantigen keine geeignete anti-ErbB2 scFv-Library zur Verfügung. Daher wurde zunächst versucht, eine anti-ErbB2 scFv-Library zu generieren.

3.2 Konstruktion einer anti-ErbB2 Phagemid Immunlibrary

Die folgenden Ergebnisse beschreiben die Konstruktion einer anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary, die aus der Milz cDNA von Mäusen abgeleitet wurde, welche mit rekombinanter intrazellulärer Domäne des humanen ErbB2 immunisiert worden waren. Eine Übersicht der Konstruktion der anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary ist in Abb. 3.1 gezeigt.

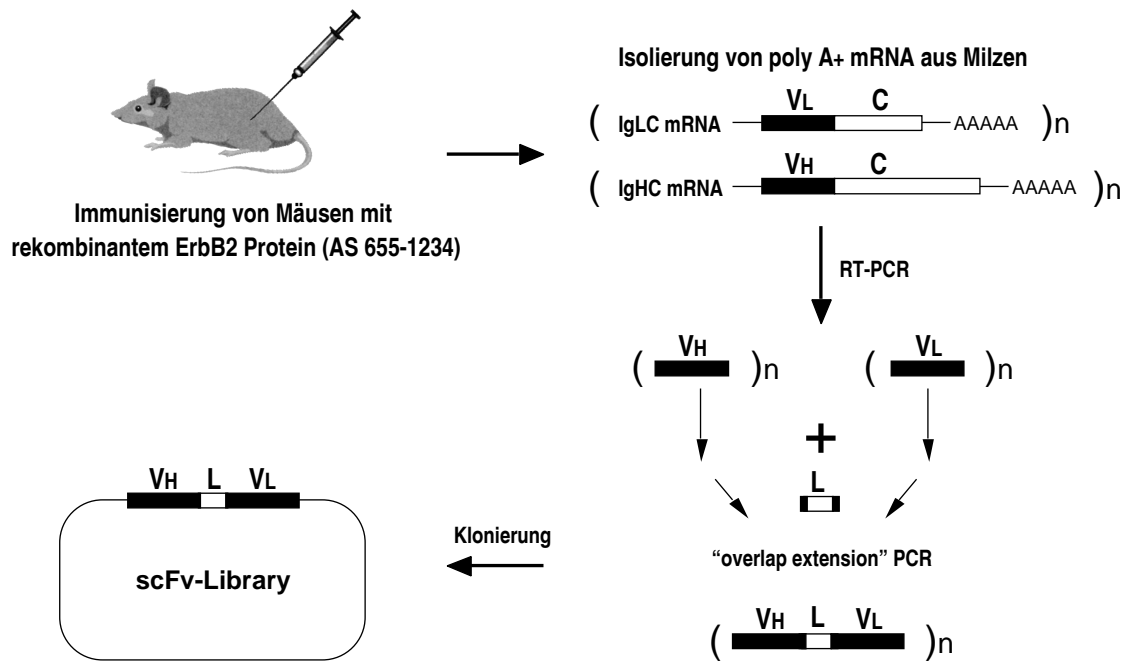


Abb. 3.1 Konstruktion einer anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary. Aus den Milzen von BALB/c Mäusen, die mit gereinigter rekombinanter zytoplasmatischer Domäne von ErbB2 immunisiert worden waren, wurde mRNA isoliert, die als Matrize zur Generierung von cDNA mittels RT-PCR diente. Regionen, die für die variablen Domänen der schweren und leichten Antikörperketten kodieren, wurden durch PCR amplifiziert und durch „overlap extension“ PCR miteinander verbunden. Anschließend wurde die resultierende scFv Library in den Phagemid Vektor pHEN2 inseriert.

3.2.1 Klonierung, bakterielle Expression und Reinigung rekombinanter zytoplasmatischer Domäne des humanen ErbB2

Zur Herstellung der für die Immunisierung benötigten zytoplasmatischen Domäne des humanen ErbB2 wurde ein Vektor für die bakterielle Expression rekombinanten Proteins konstruiert. Hierfür wurde ein ErbB2 cDNA Fragment, das für die Aminosäuren 655-1234 der prozessierten Kette („mature chain“) kodiert, unter Verwendung der Oligonukleotide pRSET-ErbB2 FOR und pRSET-ErbB2 REV und der Matrize pSV-erbB2 über PCR amplifiziert und anschließend zwischen die *XhoI* und *NheI*-Restriktionsschnittstellen des Vektors pRSET (N*/H) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von P. Hublitz; siehe auch Abschnitt 2.1.4) inseriert. Das resultierende Konstrukt pRSET (N*H)-erbB2 (Abb. 3.2) enthält in einem offenen Leseraster ein N-terminales Hexahistidinepitop für die Ni²⁺-Affinitätschromatographie und ein Myc-Epitop zur Detektion mittels eines spezifischen Antikörpers, gefolgt von der für die zytoplasmatische Domäne von ErbB2 kodierenden cDNA Sequenz und einem C-terminalen Hexahistidinepitop, was durch Restriktionsspaltungen und Sequenzierung verifiziert wurde.

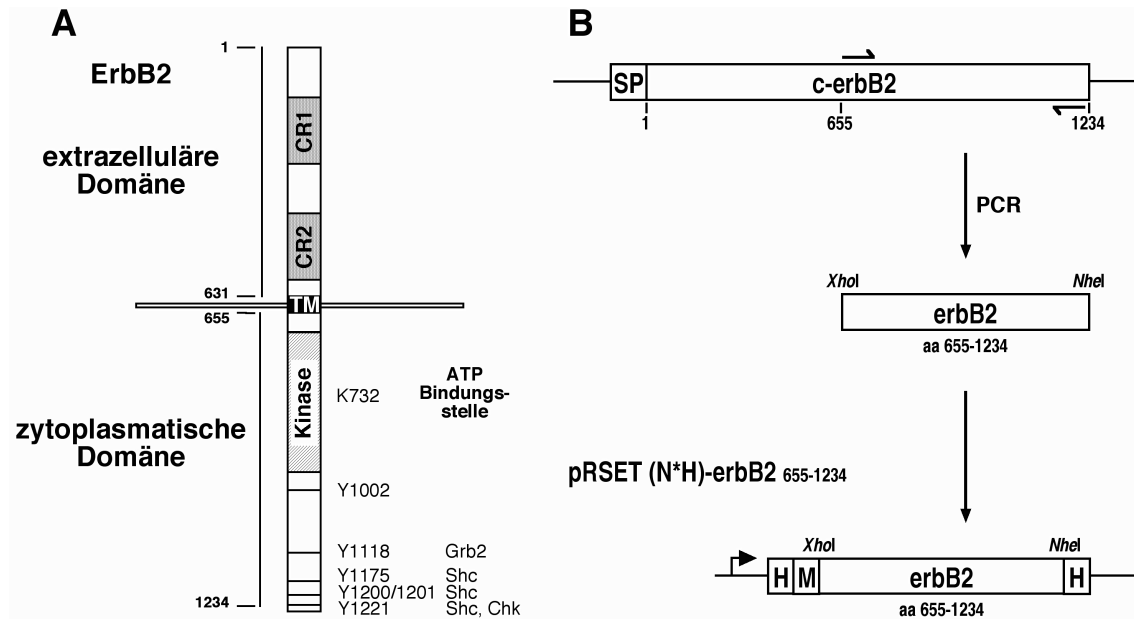


Abb. 3.2 (A) **Struktur des prozessierten ErbB2 Moleküls.** Wie alle ErbB-Familienmitglieder besitzt ErbB2 zwei Cystein-reiche Domänen in seiner glykosylierten N-terminalen extrazellulären Domäne, eine einzelne α -helikale Transmembrandomäne und eine zyttoplasmatische Kinasedomäne, die von einer C-terminalen Sequenz mit autophosphorylierbaren Tyrosinresten flankiert ist, welche als Bindungsstellen für verschiedene Signalweiterleitende Moleküle dienen. Ein natürlicher hochaffiner Ligand für ErbB2 ist bisher nicht bekannt. (B) **Konstruktion eines Vektors zur Expression der zyttoplasmatischen Domäne des humanen ErbB2.** Ein ErbB2 cDNA Fragment, das für die Aminosäuren 655-1234 der prozessierten Kette kodiert, wurde unter Verwendung der PCR-Oligonukleotide pRSET-erbB2 FOR und pRSET-erbB2 REV amplifiziert und anschließend zwischen die *XhoI* und *NheI*-Restriktionsschnittstellen des Vektors pRSET (N*/H) inseriert, der die Expression des ErbB2-Fragments mit N-terminalem Hexahistidinepitop und Myc-Epitop und C-terminalem Hexahistidinepitop ermöglicht.

Das Plasmid wurde in *E. coli* transformiert. In einer Flüssigkultur transformierter Bakterien wurde die Proteinexpression durch Zugabe von IPTG induziert.

Die Menge an exprimiertem rekombinantem Protein war bei Verwendung des *E. coli* Stammes XL1-Blue sehr gering (Daten nicht gezeigt). Ein möglicher Grund hierfür ist die Häufung von Kodons in der cDNA des humanen ErbB2, die in *E. coli* Genen nur sehr selten vorkommen. So weist diese Sequenz 29 für Expression in *E. coli* ungünstige Prolin-Kodons (CCC) und 10 ungünstige Arginin-Kodons (2x(AGA) bzw. 8x(AGG)) auf. Unter Verwendung des Kodon-optimierten Stammes BL21-CodonPlus(DE3)-RP konnte die Menge an exprimierter zyttoplasmatischer Domäne von ErbB2 erheblich gesteigert werden (siehe Abb. 3.3 A, B).

Die Reinigung des rekombinanten Proteins erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in Anwesenheit von 8 M Harnstoff oder unter nativen Bedingungen (siehe auch Abschnitt 2.2.6). In der Regel kann bei Proteinreinigungen unter denaturierenden Bedingungen ein höherer Reinheitsgrad des gereinigten Proteins erzielt werden als unter nativen Bedingungen. Ein hoher Reinheitsgrad des für die erste Immunisierung eingesetzten Proteins ist von entscheidender Bedeutung für die Spezifität der induzierten Immunantwort (Ausubel, 1994). Die Verwendung von denaturierend gereinigtem Protein zur Immunisierung könnte jedoch die Erzeugung einer Immunantwort gegen potentielle immunogene Konformationsepitope verhindern, da die ursprüngliche Tertiärstruktur des

Antigens unter Einwirkung des Harnstoffs verloren geht. Daher wurde das rekombinante ErbB2 Antigen auch unter nativen Bedingungen gereinigt, um durch Immunisierung mit nativem Protein auch gegen Konformationsepitope eine humorale Immunantwort zu induzieren.

Zur Reinigung unter denaturierenden Bedingungen wurden zunächst „inclusion bodies“ isoliert und in 8 M Harnstoff gelöst. Anschließend wurde das rekombinante Protein in Gegenwart von 8 M Harnstoff mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatographie gereinigt. In der Coomassie Färbung ist das zytoplasmatische Fragment des humanen ErbB2 als Hauptbande mit einem errechneten Molekulargewicht von 69 kDa zu erkennen. Dass es sich bei dieser Bande um das rekombinante ErbB2 handelt, wurde im Western blot unter Verwendung von anti-ErbB2 Antikörper (21 N) und anti-Myc-Epitop Antikörper (9E10) bestätigt (vgl. Abb. 3.3 A).

Für die Proteinreinigung unter nativen Bedingungen wurde Gesamtzellextrakt als Ausgangsmaterial verwendet. Es zeigte sich, dass das Eluat der nativen Reinigung mit anderen Proteinen verunreinigt ist. Die Bande, die in der Coomassie Färbung das höchste Molekulargewicht aufwies, wurde im Western blot als zytoplasmatische Domäne des ErbB2 identifiziert (vgl. Abb. 3.3 B).

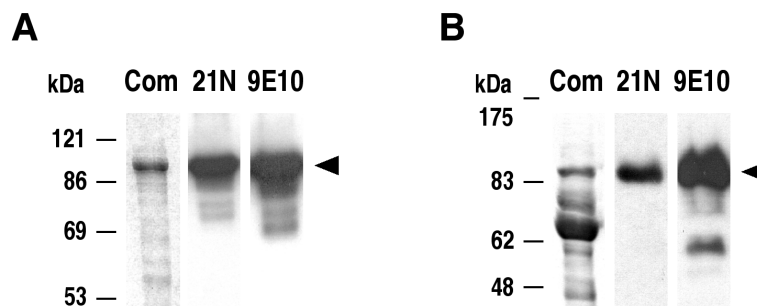


Abb. 3.3 Bakterielle Expression der intrazellulären Domäne von humanem ErbB2. Rekombinante zytoplasmatische Domäne von ErbB2 (Pfeil) wurde aus *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RP unter denaturierenden (A) und nativen (B) Bedingungen gereinigt und mittels SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese mit Coomassie Färbung (links) und Western blot Analyse mit polyklonalem anti-ErbB2 Antikörper 21N (Mitte) und anti-Myc Antikörper 9E10 (rechts) untersucht.

3.2.2 Immunisierung von BALB/c Mäusen mit rekombinanter zytoplasmatischer Domäne des humanen ErbB2

Drei weibliche BALB/c Mäuse wurden mit gereinigter rekombinanter zytoplasmatischer Domäne des humanen ErbB2 immunisiert (Abb. 3.4; siehe auch Abschnitt 2.2.9). Im ersten Immunisierungsschritt und im ersten „boost“ wurden 50 μg bzw. 30 μg des denaturierend gereinigten Antigens intraperitoneal injiziert. Hingegen erfolgte der zweite „boost“ durch intravenöse Injektion von 30 μg des unter nativen Bedingungen gereinigten Antigens, wobei der geringere Reinheitsgrad des nativen Proteins toleriert werden kann, da die ersten beiden Immunisierungsschritte mit sehr sauberem Protein erfolgten und das weniger reine Material etwa ein Drittel (Ausubel, 1994) spezifisches Antigen enthält (vgl. Abb. 3.3 B).

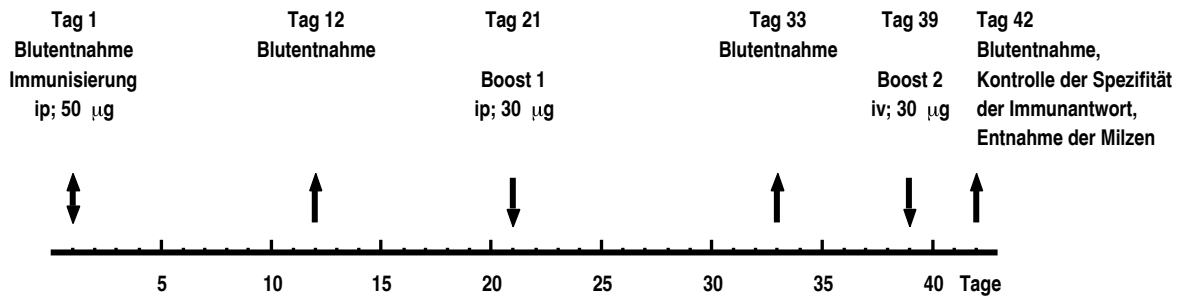


Abb. 3.4 Schematische Darstellung der Immunisierung von Mäusen mit rekombinanter zytoplasmatischer Domäne von ErbB2. Im Verlauf von 6 Wochen wurden 3 BALB/c Mäusen 3 Injektionen eines gereinigten rekombinanten ErbB2-Fragments verabreicht. In den ersten beiden Immunisierungsschritten an Tag 1 und Tag 21 wurden 50 µg bzw. 30 µg denaturierend gereinigtes Antigen intraperitoneal (ip), im letzten Immunisierungsschritt an Tag 39 wurden 30 µg nativ gereinigtes Antigen intravenös (iv) injiziert. An Tag 42 wurden die Mäuse getötet und die Milzen entnommen. Blutentnahmen an Tag 1, 12, 33 und 42 dienten als Kontrolle für den Verlauf der Immunisierung (vgl. Abb. 3.5).

Um den Erfolg der Immunisierung zu kontrollieren, wurden 12 Tage nach der ersten Immunisierung und nach dem ersten „boost“ bzw. 3 Tage nach dem zweiten „boost“ entnommene Serumproben im Western blot auf Spezifität für ErbB2 untersucht. Hierzu wurde rekombinante intrazelluläre Domäne des humanen ErbB2 auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und anschließend auf eine Membran geblottet. Diese wurde in identische Streifen geschnitten, die im Western blot mit 250fach verdünnten Seren inkubiert wurden, die aus den entnommenen Blutproben gewonnen worden waren (vgl. Abb. 3.5).

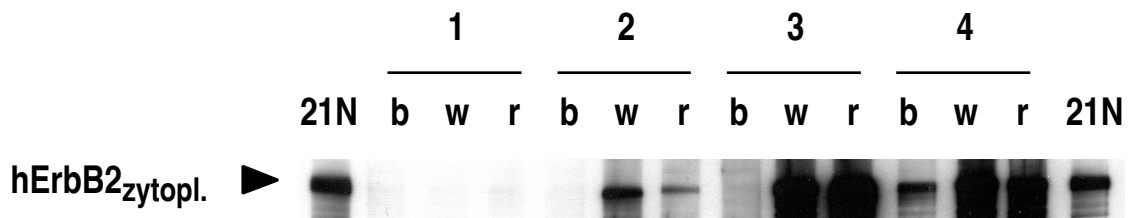


Abb. 3.5 Kontrolle der humoralen Immunantwort in drei Mäusen (b, w, r), die mit rekombinanter zytoplasmatischer Domäne des humanen ErbB2 immunisiert wurden. Aus entnommenem Blut (vgl. Abb. 3.4) gewonnenes Serum wurde in einer Verdünnung von 1:250 in Western blot Experimenten mit gereinigtem Antigen verwendet und mit HRP-gekoppeltem polyklonalem anti-Maus Antikörper detektiert. Die Proben wurden vor (1) und nach (2) der Immunisierung bzw. nach dem ersten (3) und zweiten (4) entnommen. Der polyklonale anti-ErbB2 Antikörper 21N diente als Positivkontrolle für die Detektion von humanem ErbB2.

Es zeigte sich, dass die Seren, die vor der ersten Immunisierung entnommen worden waren, keine Antikörper gegen die intrazelluläre Domäne des humanen ErbB2 enthielten. Dagegen konnte bereits nach der ersten Immunisierung bei zwei Mäusen eine humorale Immunantwort detektiert werden, die durch den ersten „boost“ deutlich verstärkt wurde und nach dem zweiten „boost“ konstant blieb. Im Gegensatz hierzu war bei der dritten Maus („b“) erst nach dem zweiten „boost“ eine schwache Bande im Western blot zu erkennen. Der polyklonale anti-ErbB2 Antikörper 21N diente als Positivkontrolle für die Detektion der ErbB2 Bande.

3.2.3 Konstruktion einer anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary

Nachdem im Western blot eine Immunantwort gegen humanes ErbB2 bestätigt worden war, wurden die immunisierten Mäuse getötet und die Milzen entnommen. Aus den Milzen wurde zunächst die Gesamt-RNA isoliert (siehe auch Abschnitt 2.2.10), aus der dann die mRNA isoliert wurde. Die mRNA diente als Matrize („template“) für die Generierung von cDNA, die durch RT-PCR unter Verwendung eines pd(N)₆ Oligonukleotidgemisches und M-MuLV Reverse Transkriptase erhalten wurde. Diese wurde wiederum zur Amplifikation der cDNA Sequenzen der variablen Domänen der leichten (V_L) und schweren (V_H) Antikörperketten mit V_L- und V_H-spezifischen Oligonukleotiden (siehe auch Abschnitt 2.2.11) eingesetzt (vgl. Abb. 3.6 A).

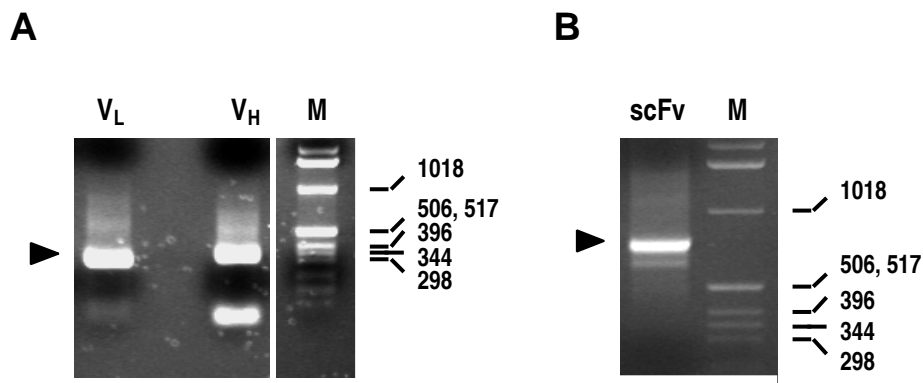


Abb. 3.6 Gelelektrophoretische Analyse PCR-amplifizierter Antikörper-DNA Fragmente. Die aus der Milz-mRNA immunisierter Mäuse gewonnene cDNA diente als Matrize für die Amplifikation von Sequenzen, die für die variablen Domänen der leichten (V_L) und schweren Antkörperketten (V_H) kodieren (A). Je eine V_L und V_H wurden über eine Linkersequenz durch „overlap extension“ PCR miteinander verbunden. Die resultierenden scFv Genfragmente weisen eine Größe von ca. 750 bp auf (B).

Anschließend wurden nach dem Zufallsprinzip je eine V_L und V_H durch Linkeroligonukleotide mittels „overlap extension“ PCR zu scFv Genfragmenten verknüpft (vgl. Abb. 3.6 B). Diese wurden nach Restriktionsspaltung zwischen die *Sfi*I und *Not*I-Restriktionsschnittstellen des Phagemidvektors pHEN2 (Griffiths *et al.*, 1994) inseriert. Mittels Elektroporation wurde die so entstandene anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary in *E. coli* TG-1 Zellen transformiert. Durch serielle Verdünnung wurde die Komplexität der anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary mit 1.2×10^7 bestimmt. Stichproben zufällig ausgewählter Einzelklone, die dieser Library entnommen wurden, enthielten ausschließlich Phagemids mit scFv-Insert (Daten nicht gezeigt). Nach Infektion der transformierten *E. coli* TG-1 Zellen mit Helferphage wurden aus dem Überstand der abzentrifugierten *E. coli* Kultur Phagen präzipitiert.

3.2.4 Screening der anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary mittels Phagen Biopanning

Um zu prüfen, ob in der so generierten anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary ErbB2-spezifische Binder enthalten sind, wurde versucht, mittels Phagen Biopanning ErbB2-spezifische scFv Phagen anzureichern. Hierzu wurden Kunststoffröhrchen mit gereinigter zytoplasmatischer Domäne von ErbB2 beschichtet. Die Antigen-beschichtete Oberfläche diente als Matrix für die Bindung ErbB2-spezifischer Phagen. Insgesamt wurden vier Runden Phagen Biopanning durchgeführt. Die Zahl der in der jeweiligen Biopanning-Runde eingesetzten bzw. eluierten Phagen ist in Tabelle 3.1 wiedergegeben.

Panning Runde	Input	Output	Output/Input
1	1.6×10^{11}	1.8×10^6	1.1×10^{-5}
2	0.6×10^{11}	9.0×10^5	1.5×10^{-5}
3	1.2×10^{11}	2.7×10^6	2.3×10^{-5}
4	1.1×10^{11}	3.6×10^6	3.3×10^{-5}

Tabelle 3.1 Selektion von scFv Antikörper-Phagen durch Biopanning

Wie aus Tabelle 3.1 ersichtlich, hat sich das Verhältnis Output/Input im Verlauf des Biopannings nur unwesentlich verändert. Daher war nicht davon auszugehen, dass ErbB2-spezifische scFv Antikörper Phagen in den vier durchgeführten Biopanning-Runden angereichert wurden. Möglicherweise führte die zufällige Kombination von V_H und V_L verschiedener Antikörper nur in wenigen Fällen zu funktionellen scFv-Fragmenten, so dass die Frequenz ErbB2-spezifischer scFv-Fragmente innerhalb der scFv-Library für eine effiziente Anreicherung zu gering war. Doch auch eine ineffiziente Beschichtung der Kunststoffmatrix oder eine Faltung des unter denaturierenden Bedingungen gereinigten Proteins in eine unphysiologische Konformation könnte das Ausbleiben einer Anreicherung von scFv Antikörper Phagen erklären. Um dies auszuschließen und um die scFv-Phagenmid Immunlibrary in einem unabhängigen Experiment auf den Gehalt an ErbB2-Bindern zu prüfen, wurde die Ausgangslibrary mittels Delayed Infectivity Panning untersucht. Hierbei wird das Antigen auf der Oberfläche von *E. coli* Zellen exprimiert (siehe Abschnitt 3.2.5), die gleichzeitig zur Phagenamplifikation und als Antigen-präsentierende Matrix für das Phagen Biopanning dienen. Die Expression und Reinigung des rekombinanten Proteins sowie die Beschichtung einer Kunststoffmatrix sind daher nicht notwendig und somit keine potentiellen Fehlerquellen bei der Selektion antigenspezifischer Binder.

3.2.5 Screening der anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary mittels Delayed Infectivity Panning (DIP)

Delayed Infectivity Panning (Abb. 3.7) stellt ein für Biopanning-Experimente geeignetes Selektionsverfahren dar (Benhar *et al.*, 2000). Dabei werden *E. coli* Bakterien durch Transformation mit dem pIB-Tx Vektor, in den die cDNA des Zielantigens inseriert wurde, zur IPTG-induzierbaren Expression eines durch Fusion mit Lpp-OmpA' in der äußeren Zellmembran verankerten Antigens befähigt. Antigen-präsentierende *E. coli* Bakterien werden anschließend mit einer Phagen-Library inkubiert, und ungebundene Phagen werden durch mehrere Waschschrte entfernt. Um *E. coli* Bakterien infizieren zu können, sind M13-Bakteriophagen auf die Expression des F-Pilus an der Bakterienoberfläche angewiesen. Es wurde beobachtet, dass der F-Pilus bei einer Temperatur unterhalb von 16 °C nicht exprimiert wird. Daher werden die Bakterien bei einer Temperatur von 16 °C herangezogen, mit der Phagen-Library inkubiert und gewaschen. Anschließend wird die Expression des F-Pilus durch Temperaturerhöhung auf 37 °C induziert, was zur Infektion von *E. coli* Bakterien mit gebundenen antigenspezifischen Phagen führt. Die Phagen werden anschließend amplifiziert und, wie in Abschnitt 2.2.13 beschrieben, in einer weiteren DIP-Runde selektioniert oder in Bindungsstudien charakterisiert.

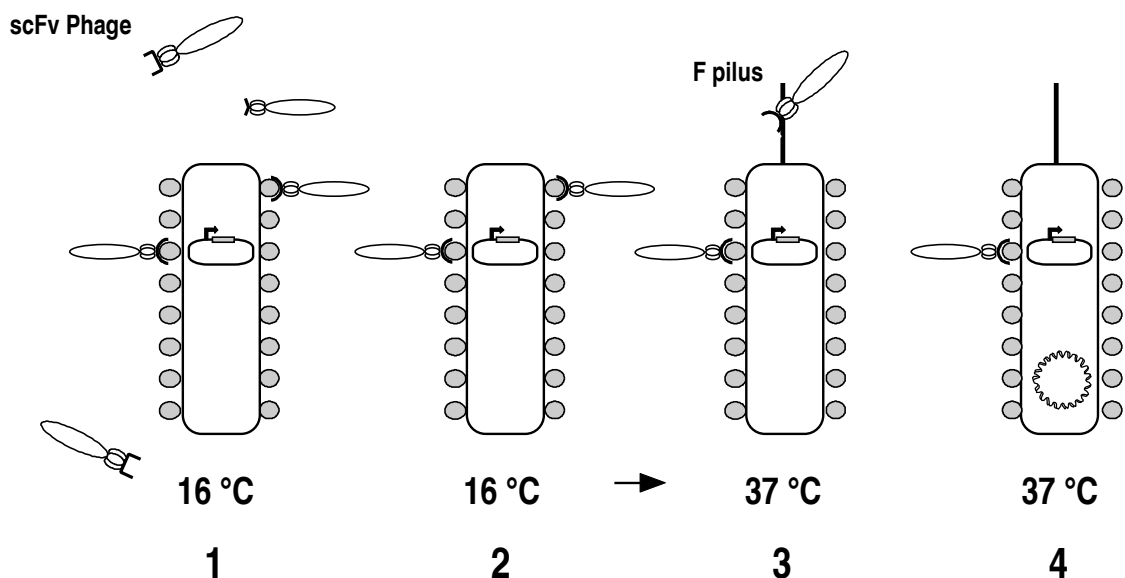


Abb. 3.7 Schematische Darstellung der „Delayed Infectivity Panning“ Selektion (DIP). (1) Antigen-präsentierende *E. coli* werden bei 16 °C herangezogen (F-Pilus wird nicht exprimiert) und mit Antikörper-präsentierenden Phagen gemischt. antigenspezifische Phagen binden an die Zellen. (2) Ungebundene Phagen werden durch Waschen entfernt. (3) Die Temperatur wird auf 37 °C erhöht, gebundene Phagen dissoziieren vom Antigen und infizieren eine beliebige *E. coli* Zelle über den F-Pilus. (4) Infizierte Zellen tragen sowohl den Vektor für bakterielle Präsentation des Antigens als auch das Phagen genom.

Zur Expression Membran-gebundener zytoplasmatischer Domäne von ErbB2 (AS 655-1234) in *E. coli* wurde ein ErbB2 cDNA Fragment unter Verwendung der Oligonukleotide DIP FOR *erbB2* cytopl. und DIP REV *erbB2* cytopl. über PCR amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *BglII* verdaut und mit dem *NcoI* und *BamHI*-geschnittenen

Vektor pIB-Tx (freundlicherweise von I. Benhar zur Verfügung gestellt) ligiert. Das daraus resultierende Plasmid pIB-Tx-ErbB2 enthält in einem offenen Leseraster die genetische Information für ein N-terminales Lpp Signalpeptid (AS 1-9), ein OmpA' Fragment (AS 46-159) und die zytoplasmatische Domäne des humanen ErbB2 (AS 655-1234) (Abb. 3.8 A).

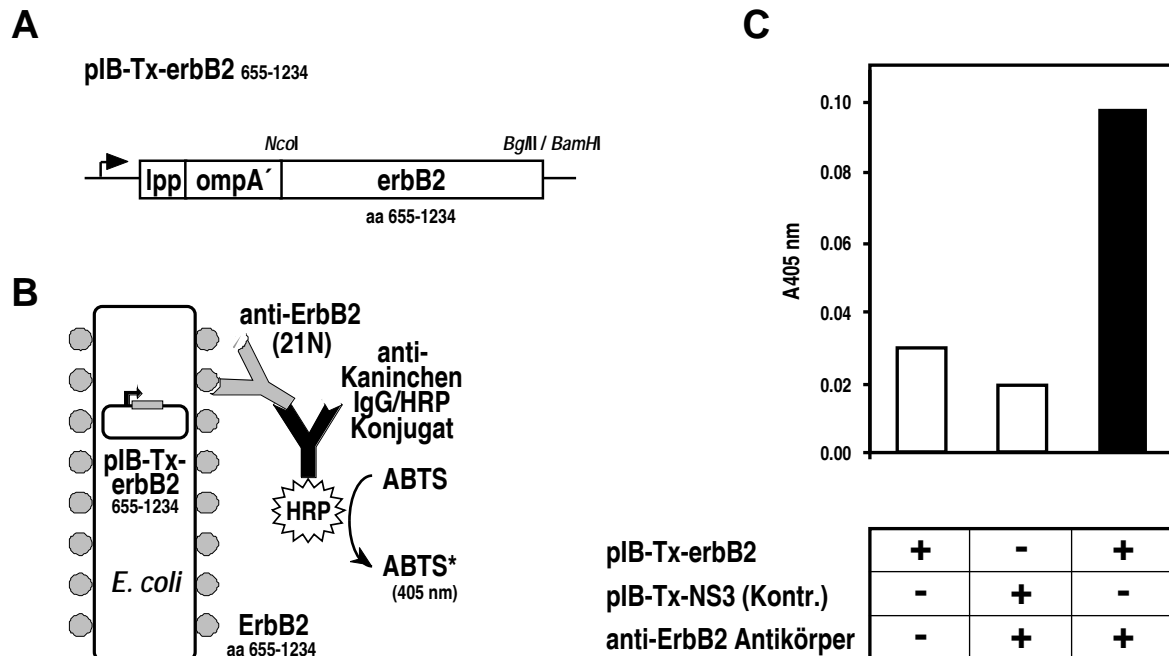


Abb. 3.8 Nachweis der Antigenpräsentation auf der Oberfläche von *E. coli*. Schematische Darstellung des Vektors pIB-Tx-erbB2 für die bakterielle Präsentation der intrazellulären Domäne des humanen ErbB2 (A). Die Expression des ErbB2-Antigens an der Zelloberfläche von *E. coli* wurde durch „spun-cell“ ELISA Experimente nachgewiesen, wie es schematisch in (B) gezeigt ist. In (C) ist das Ergebnis eines „spun-cell“ ELISA Experiments zum Nachweis der ErbB2-Antigenpräsentation auf *E. coli* dargestellt (gefüllter Balken; rechts). Als Spezifitätskontrolle wurde das Experiment auch in Abwesenheit des 21N anti-ErbB2 Antikörpers durchgeführt (links). Als weitere Kontrolle wurden Zellen verwendet, die den Vektor pIB-Tx-NS3 tragen und ein irrelevantes Antigen präsentieren (Mitte).

Das Fusionsprotein wurde in *E. coli* TG-1 Zellen exprimiert, die bei 16 °C herangezogen wurden. Die Expression des rekombinanten OmpA'-ErbB2-Fusionsproteins wurde mittels „spun-cell“ ELISA unter Verwendung eines polyklonalen anti-ErbB2 Antikörpers nachgewiesen (Abb. 3.8 B, Abb. 3.8 C).

Die im Vergleich zu Kontrollen erhöhte Bindung an ErbB2-Vektor-tragende *E. coli* Bakterien spricht für eine korrekte Expression des OmpA'-ErbB2-Fusionsproteins an der Oberfläche dieser Zellen. Der im „spun-cell“ ELISA für ErbB2-Vektor-tragende *E. coli* Bakterien gemessene absolute Absorptionswert ist mit 0.1 hingegen relativ niedrig, was auf eine schwache Expression des OmpA'-ErbB2-Fusionsproteins schließen lässt.

Anschließend wurden die Bakterien bei einer Temperatur unterhalb von 16 °C mit der oben beschriebenen anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary inkubiert. Nach Entfernung ungebundener Phagen wurde die Temperatur zur Infektion auf 37 °C erhöht, infizierte Zellen wurden amplifiziert und mit Helferphage superinfiziert. Aus den Kulturüberständen wurden Phagen gewonnen, die in der nächsten DIP-Runde eingesetzt wurden.

Die Komplexität der Phagen Library wurde bereits in der ersten Runde DIP von 1.2×10^7 auf 3.5×10^3 reduziert, was für eine stringente und effiziente Selektion der Phagenlibrary spricht. Aus diesem Grund wurden lediglich zwei Runden DIP durchgeführt. Die Zahl der in der jeweiligen Biopanning Runde eingesetzten bzw. eluierten Phagen ist in Tabelle 3.2 wiedergegeben.

DIP Runde	Input	Output	Output/Input
1	3.0×10^{11}	3.5×10^3	1.1×10^{-8}
2	6.0×10^{11}	4.0×10^5	6.7×10^{-7}

Tabelle 3.2 Selektion von scFv Antikörper Phagen durch DIP mit ErbB2-präsentierenden *E. coli*

3.2.6 Charakterisierung selektionierter Phagen mittels „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA)

Zur Charakterisierung der im DIP selektionierten scFv-exprimierenden Phagen wurden *E. coli* TG-1 Zellen mit dem Output der zweiten DIP-Runde infiziert und auf 2YTA Platten herangezogen. Zur Herstellung von Phagenüberständen wurden Flüssigkulturen mit Einzelkolonien angeimpft und mit Helferphage infiziert. Die Phagenüberstände von 91 Einzelkolonien wurden in ELISA Experimenten auf ihre Bindung an die rekombinante intrazelluläre Domäne des humanen ErbB2 untersucht (Abb. 3.9). Hierzu wurde die Oberfläche von Mikrotiterplatten mit rekombinantem ErbB2-Antigen beschichtet. Die Platten wurden mit scFv-Phagen inkubiert und gewaschen. Die Menge gebundener Phagen wurde unter Verwendung von anti-fd Bakteriophagen IgG, gefolgt von Spezies-spezifischem HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper und Zugabe des Peroxidasesubstrats ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure]) durch Messung der Lichtabsorption (405 nm) des entstandenen blaugrünen Reaktionsproduktes quantifiziert. Zur Spezifitätskontrolle wurde die Bindung der Phagen an BSA gemessen. Als Negativkontrolle wurde M13KO7 Helferphage eingesetzt, der keine scFv GenIII Fusionsproteine trägt (Abb. 3.9; #A1). In vier Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurde kein Phagenüberstand pipettiert. Diese Vertiefungen wurden ansonsten analog der restlichen Mikrotiterplatte behandelt. Sie dienen als Kontrolle für die unspezifische Bindung der im ELISA verwendeten Antikörper an die beschichteten Vertiefungen (Abb. 3.9; #B1-E1). Die gewonnenen Daten zeigen, dass die im Phagen ELISA gemessenen Absorptionswerte bei ErbB2-beschichteten Vertiefungen, mit einer Ausnahme (B10), deutlich höher sind als bei BSA-beschichteten Vertiefungen. Dies gilt jedoch auch für die Kontrollen ohne Phagenüberstand (Abb. 3.9; #B1-E1), so dass von einer unspezifischen Bindung des verwendeten anti-fd Bakteriophagen Antikörpers bzw. des anti-Maus-HRP Zweitantikörpers an ErbB2 ausgegangen werden muss.

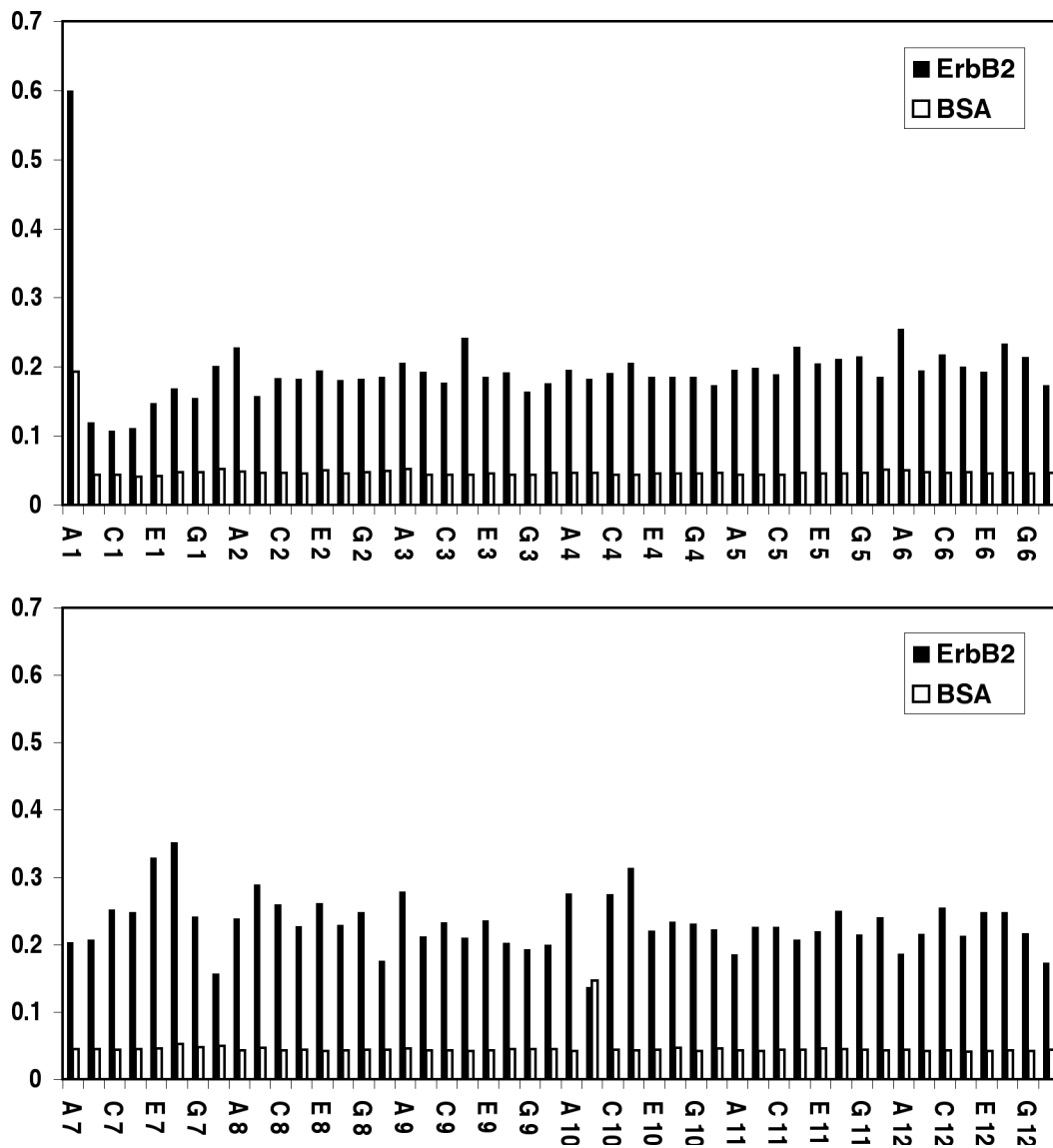


Abb. 3.9 Phagen ELISA von 91 Einzelklonen (F1 bis H12) nach Selektion mit *E. coli* TG-1 pIB-Tx-erbB2. Die Bindung der Phagenklone an rekombinante zytoplasmatische Domäne von ErbB2 ist durch schwarze Balken, unspezifische Bindung an BSA durch weiße Balken dargestellt. Als Kontrolle wurde die Bindung von M13KO7 Helferphagen an ErbB2 und BSA gemessen (A1). Jeweils vier beschichtete Vertiefungen der Mikrotiterplatte (B1-E1), in die kein Phagenüberstand gegeben wurde, dienen als Kontrolle für die unspezifische Bindung der im ELISA verwendeten Antikörper. Nur jeder zweite Klon entlang der x-Achse ist bezeichnet.

Überraschenderweise zeigten die als Negativkontrolle verwendeten kommerziellen M13KO7 Helferphagen den mit Abstand höchsten Wert im ELISA-Experiment (Abb. 3.9; #A1). Dies deutet auf eine unspezifische Bindung der filamentösen Phagen an die intrazelluläre Domäne von ErbB2 oder an Verunreinigungen hin, die in der Präparation des rekombinanten Proteins noch enthalten waren. Ferner enthielt im Gegensatz zur Ausgangslibrary etwa ein Drittel der ausgewählten und untersuchten Einzelklone aus dem Output der zweiten DIP Runde deletierte Phagemids ohne scFv-Genfragmente (Daten nicht gezeigt).

Es ist daher nicht auszuschließen, dass filamentöse Phagen bereits während der Selektion im Delayed Infectivity Panning aufgrund einer starken unspezifischen Interaktion angereichert wurden.

Zwar wurde die Oberflächenexpression von ErbB2 im DIP mittels „spun-cell“ ELISA gezeigt (Abb. 3.8 C) und es konnte eine Anreicherung filamentöser Phagen über zwei DIP-Zyklen beobachtet werden (siehe Tabelle 3.2), doch war im Phagen ELISA im Vergleich zu Kontrollphagen keine eindeutige spezifische Bindung an das dem Immunogen entsprechende rekombinante Protein detektierbar. Daher ist davon auszugehen, dass in der mittels DIP selektionierten Library funktionelle anti-ErbB2 scFv Antikörper nur in geringer Dichte vorhanden sind und die im DIP beobachtete Anreicherung von Phagen sehr wahrscheinlich auf unspezifische Bindungsereignisse zurückzuführen ist. Dies ließ diese anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary als Ausgangspunkt für die Selektion von funktionellen Intrabodies wenig geeignet erscheinen. Anti-ErbB2 scFv-Libraries mit einem verifizierten hohen Anteil an ErbB2-spezifischen Antikörperfragmenten standen jedoch aus anderer Quelle nicht zur Verfügung.

3.2.7 Zusammenfassung des Abschnitts 3.2

Eine anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary wurde aus den Milzen von Mäusen abgeleitet, die mit einem gereinigten rekombinanten ErbB2-Fragment immunisiert worden waren. Um zu prüfen, ob in der Immunlibrary ErbB2-spezifische scFv-Phagemids enthalten sind, wurden mehrere Phagen Biopanning Runden gegen immobilisiertes gereinigtes ErbB2-Antigen durchgeführt. Die Auswertung des Verhältnisses Output/Input hat sich jedoch während des Biopannings nur geringfügig verändert, so dass von einer Anreicherung ErbB2-spezifischer Phagen während der vier Runden Biopanning nicht auszugehen war. Im Gegensatz hierzu konnte die Komplexität der Phagen Library durch Delayed Infectivity Panning bereits nach einer Runde DIP stark reduziert werden. Die Untersuchung der relativen Bindungsstärke und -spezifität DIP-selektionierter scFv-Phageneinzelklone an immobilisiertes ErbB2-Antigen bzw. BSA in ELISA Experimenten zeigte jedoch, dass die Bindung der selektierten scFv-Einzelklone an ErbB2 schwächer als die Bindung von M13KO7 Helferphagen an ErbB2 war, die als Negativkontrolle verwendet worden waren. Daher war nicht auszuschließen, dass die Frequenz funktioneller anti-ErbB2 scFv Antikörper innerhalb der anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary gering ist und filamentöse Phagen bereits während der DIP Selektion aufgrund einer starken unspezifischen Interaktion angereichert wurden. Dies ließ diese anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary als Ausgangspunkt für die Selektion funktioneller Intrabodies wenig geeignet erscheinen. Anti-ErbB2 scFv-Libraries mit einem verifizierten hohen Anteil an ErbB2-spezifischen Antikörperfragmenten standen jedoch aus anderer Quelle nicht zur Verfügung.

Da im Fall von EGFR validierte anti-EGFR Libraries bereits vorhanden und parallel zur Konstruktion der ErbB2-Library vorgenommene Experimente vielversprechender verlaufen waren, konzentrierten sich die weiteren Arbeiten zur Entwicklung geeigneter

Screeningsysteme für die Isolierung intrazellulär aktiver ErbB-spezifischer scFv-Antikörper auf EGFR als Zielstruktur.

3.3 Yeast Two-Hybrid Screening als Strategie zur Isolierung ErbB-spezifischer scFv Antikörperfragmente

3.3.1 Verfügbare anti-EGFR Phagemid Immunlibraries

Im Rahmen einer Kollaboration mit R. Beerli (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA; Friedrich Miescher Institut, Basel, Schweiz) standen zwei anti-EGFR Phagemid Immunlibraries zur Verfügung.

Beide Libraries wurden von R. Beerli hergestellt. Dazu wurden Mäuse mit rekombinanter intrazellulärer Domäne des humanen EGFR immunisiert, die in Insektenzellen exprimiert und gereinigt worden war. Nach Isolierung von mRNA aus den Milzzellen immunisierter Mäuse wurde mittels RT-PCR, wie bereits in Abschnitt 3.2.3 beschrieben, zunächst cDNA generiert, die als Matrize zur Amplifikation von V_L und V_H cDNA Fragmenten unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide diente. V_L und V_H cDNA Fragmente wurden über einen Linkeroligonukleotid durch „overlap extension“ PCR miteinander verknüpft.

Die kleinere der beiden Libraries wurde mit Hilfe des Recombinant Phage Antibody System (RPAS) (Amersham Biosciences) hergestellt. ScFv-DNA Fragmente wurden zwischen *Sfi*I und *Not*I-Restriktionsschnittstellen des pCANTAB 5E Vektors inseriert. Die scFvs in dieser Library bestehen aus der N-terminalen variablen Domäne einer schweren Kette und der C-terminalen variablen Domäne einer leichten Kette, welche durch einen 15 Aminosäuren langen $(G_4S)_3$ Peptidlinker verknüpft sind.

Die zweite Library wurde analog einer von C. Barbas beschriebenen Anleitung hergestellt (Barbas, 2001). Die scFvs in dieser Library bestehen aus der N-terminalen variablen Domäne einer leichten Kette und der C-terminalen variablen Domäne einer schweren Kette, welche durch einen 7 (GGSSRSS) oder einen 18 (SSGGGGSGGGGGSSRSS) Aminosäuren langen Linker verknüpft sind. Die scFv Genfragmente wurden ausgehend von der aus den Milzen immunisierter Mäuse isolierten cDNA generiert. Anschließend wurden die scFv-DNA Fragmente über zwei inkompatible *Sfi*I-Restriktionsschnittstellen mit dem pComb3 Vektor (Rader & Barbas, 1997) ligiert. Die so entstandene Library besitzt eine Komplexität von mehr als 2×10^8 unabhängigen Klonen.

Beide Libraries enthalten EGFR bindende scFv, die mittels Biopanning isoliert werden können (R. Beerli, persönliche Mitteilung). Deshalb wurden sie im Folgenden zur Erarbeitung von Konzepten zur Isolierung und funktionellen Charakterisierung zytoplasmatischer Intrabodies mit EGFR als Zielantigen verwendet. Aufgrund ihrer geringen Größe ist die scFv-Library im pCANTAB 5E Vektor für eine komplette Überführung in Hefe geeignet und kann trotz der relativ geringen Effizienz der Hefetransformation vollständig durch Yeast Two-Hybrid Screening untersucht werden. Daher wurde zunächst versucht, funktionelle Intrabodies durch direkte Anwendung des Yeast Two-Hybrid aus dieser Library zu isolieren.

3.3.2 Yeast Two-Hybrid Screening einer unselektierten anti-EGFR scFv-Immunlibrary mit Hilfe des MATCHMAKER I Systems

Zur Konstruktion eines „bait“ Hefeexpressionsvektors wurde ein EGFR cDNA Fragment, das für die Aminosäuren 645-1186 des prozessierten Rezeptors kodiert, unter Verwendung der Oligonukleotide EGFR 5' *SmaI* und EGFR 3' *SalI* und des pLTR-EGFR Vektors als Matrize mittels PCR amplifiziert und zwischen *SmaI* und *SalI*-Restriktionsschnittstellen in den „bait“ Klonierungsvektor pGBT9 inseriert (Abb. 3.10 B). Diese Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Pia Reiser und Gesa Brochmann-Santos durchgeführt. Der aus dieser Klonierung hervorgegangene Vektor pGBT9-EGFR ermöglicht die Expression eines Fusionsproteins, das aus der GAL4 DNA BD und der zytoplasmatischen Domäne des EGFR besteht. Aufgrund des im pGBT9 Vektor kodierten *Trp1* Gens können Hefezellen, die den Vektor enthalten, auf Tryptophan-freiem Selektionsmedium (-Trp) wachsen.

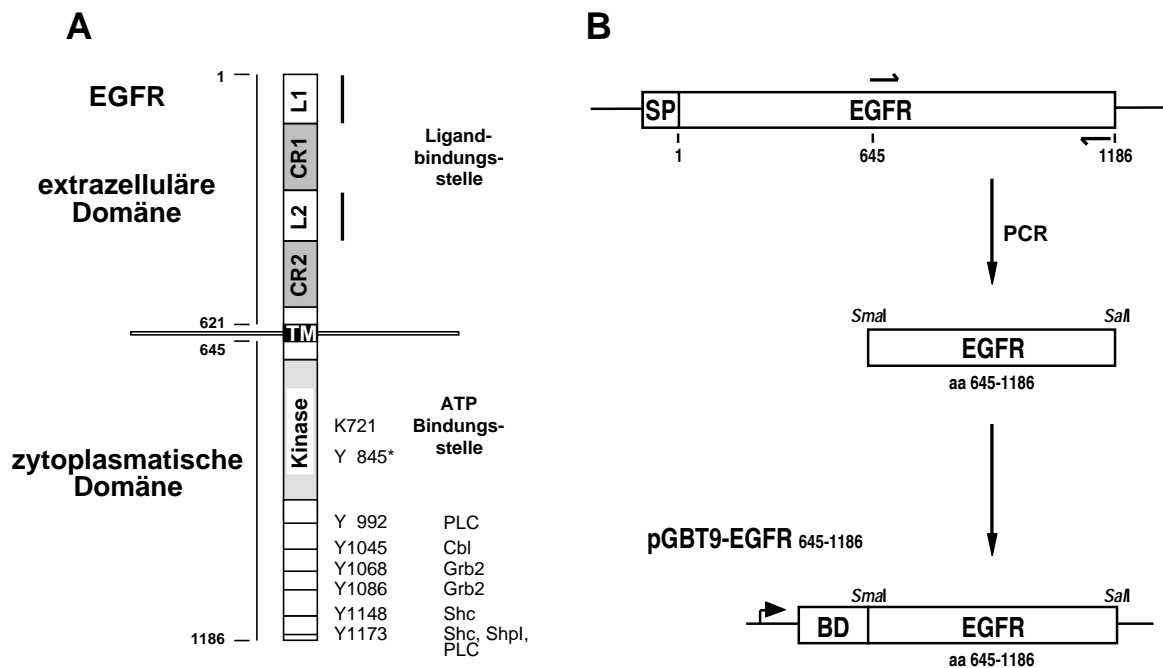


Abb. 3.10 (A) **Struktur des prozessierten EGFR.** EGFR besteht aus einer glykosylierten extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Kinasedomäne, die von einer C-terminalen Sequenz mit autophosphorylierbaren Tyrosinresten flankiert ist, welche als Bindungsstellen für verschiedene Signalweiterleitende Moleküle dienen. Tyrosinrest 845 ist Bestandteil der Aktivierungsschleife innerhalb der Kinasedomäne (*, vgl. auch Abschnitt 1.2.2). (B) **Schematische Darstellung der Konstruktion eines "bait" Hefeexpressionsvektors.** Ein EGFR cDNA Fragment, das für die Aminosäuren 645-1186 der prozessierten Kette kodiert, wurde unter Verwendung der PCR-Oligonukleotide EGFR 5' *SmaI* und EGFR 3' *SalI* amplifiziert und anschließend zwischen die *SmaI* und *SalI*-Restriktionsschnittstellen des Vektors pGBT9 inseriert, der die Expression eines Fusionsproteins aus N-terminaler GAL4 DNA-BD und C-terminalem EGFR-Fragment ermöglicht.

Die scFv-kodierenden Sequenzen der unselektierten Maus anti-EGFR pCANTAB 5E-scFv Immunlibrary wurden zwischen *SfiI* und *NotI*-Schnittstellen in den modifizierten „prey“ Hefevektor pGAD424 inseriert (Abb. 3.11). Dazu wurde zunächst ein Oligonukleotid mit dem *EcoRI* und *BamHI*-geschnittenen pGAD424 Vektor ligiert, das die *SfiI* und *NotI*-Restriktionsschnittstellen in das Konstrukt einführt (siehe auch Abschnitt 2.1.5). Nach

Transformation der resultierenden pGAD424 scFv Antikörperlibrary (Komplexität ca. 8×10^5) in Hefezellen werden die scFv Antikörper als Fusionsproteine in einem offenen Leseraster mit der GAL4 AD exprimiert. Aufgrund des im pGAD424 Vektor kodierten *Leu2* Gens können Hefezellen, die den Vektor enthalten, auf Leucin-freiem Selektionsmedium (-Leu) wachsen.

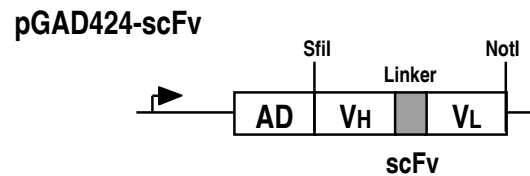


Abb. 3.11 Schematische Darstellung des modifizierten „prey“ Hefeexpressionsvektors. DNA Fragmente, die für scFv Fragmente kodieren und mittels Restriktionsverdau mit *SfiI* und *NotI* aus einer scFv-Phagemid Library isoliert worden waren, wurden zwischen die *SfiI* und *NotI*-Restriktionsschnittstellen eines modifizierten Vektors pGAD424 inseriert, der die Expression eines Fusionsproteins aus N-terminaler GAL4 AD und C-terminalem scFv Antikörper ermöglicht.

Unter Verwendung dieser scFv Antikörperlibrary wurden mehrere Yeast Two-Hybrid Screens durchgeführt (siehe auch Abschnitt 2.2.21). Dazu wurden HF7c Hefezellen, die mit pGBT9-EGFR transformiert und mit der pGAD424 scFv Antikörperlibrary kotransformiert worden waren, auf Selektionsplatten, die kein Tryptophan, Leucin und Histidin enthielten (-Trp, -Leu, -His), selektioniert. Das Prinzip dieses Yeast Two-Hybrid Systems ist in Abb. 3.12 dargestellt. Im Falle eines zytoplasmatisch aktiven EGFR-spezifischen scFv Fragments wird funktionelles GAL4 rekonstituiert und die GAL4-regulierten *His3*- und *lacZ*-Gene werden transkribiert, so dass der Hefeklon auf (-Trp, -Leu, -His) Selektionsmedium wachsen kann und β -Galaktosidase exprimiert. Diese hydrolysiert im β -Gal-Assay 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal), was zur Bildung eines blauen Farbstoffes führt (Abb. 3.12, links). Ist der scFv Antikörper hingegen aufgrund reduzierter intramolekularer Disulfidbindungen falsch gefaltet oder besitzt er keine Spezifität für EGFR, kann der entsprechende Hefeklon unter diesen Bedingungen nicht wachsen (Abb. 3.12, rechts).

In einem typischen Yeast Two-Hybrid Experiment wurden etwa 3×10^6 Transformationsereignisse untersucht. 2.5×10^3 Einzelklone wuchsen auf den (-Trp, -Leu, -His) Selektionsplatten, was die Zahl der erwarteten positiven Einzelklone deutlich übersteigt. 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT) ist ein kompetitiver Inhibitor des *His3* Genprodukts (*His3p*, Imidazolglycerolphosphat-Dehydratase) (Kanazawa *et al.*, 1988) und wird verwendet, um eine Hintergrundaktivität des *His3p* zu inhibieren. Jedoch konnte das Wachstum falsch positiver Klone selbst bei Verwendung von 3-AT nicht unterdrückt werden. Üblicherweise wurden 400 Einzelklone im β -Galaktosidaseassay auf Aktivität der bakteriellen β -Galaktosidase untersucht. Die Mehrzahl der Klone zeigte keine Blaufärbung. Aus mehreren Yeast Two-Hybrid Experimenten konnten insgesamt nur 4 Klone isoliert werden, die im β -Galaktosidaseassay mit X-Gal eine Blaufärbung zeigten. Nach Retransformation der isolierten scFv „prey“ Hefeexpressionsvektoren in Hefen mit EGFR „bait“ Hefeexpressionsvektor konnte dieses Ergebnis jedoch nicht reproduziert

werden, so dass auch bei diesen Klonen von falsch positiven Klonen ausgegangen werden musste.

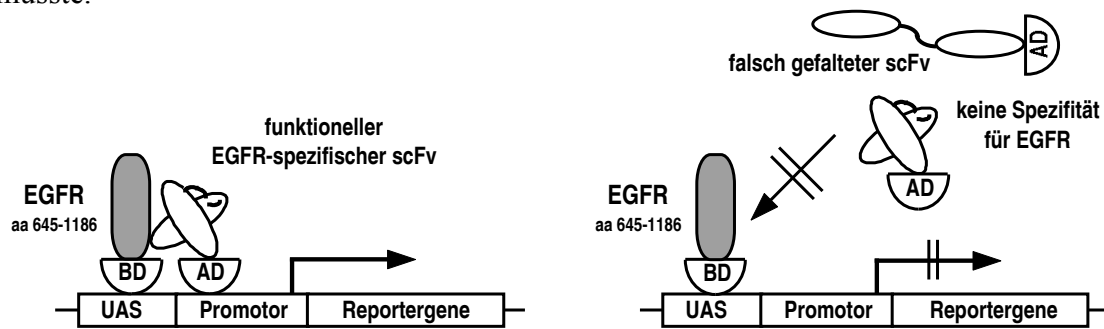


Abb. 3.12 Selektion intrazellulär aktiver EGFR-spezifischer scFv Fragmente durch Yeast Two-Hybrid Screening. Nach Expression korrekt gefalteter, EGFR-bindender scFv Fragmente wird funktionelles GAL4 rekonstituiert und treibt die Expression GAL4-regulierter Reportergene, die in das Genom von *S. cerevisiae* integriert sind (links). In Hefeklonen, die falsch gefaltete Antikörperfragmente oder scFvs, die nicht an EGFR binden, exprimieren, bleiben die GAL4 BD und AD getrennt voneinander, so dass die Transkription der Reportergene nicht induziert wird (rechts).

Während beide Libraries scFv enthalten, die unter oxidierenden Bedingungen als GenIII-Fusion funktionell sind und in Biopanning Experimenten an rekombinanten EGFR binden (R. Beerli, persönliche Mitteilung), ist über die Frequenz funktioneller Intrabodies, die unter reduzierenden Bedingungen aktiv sind, in den unselektierten Immunlibraries nichts bekannt. Möglicherweise ist trotz eines ausreichenden Anteils EGFR-spezifischer Binder die Gesamtzahl funktioneller Intrabodies zu gering, um sie vor dem Hintergrund irrelevanter scFv Antikörper durch direktes Screening der Library zu isolieren. Zusätzlich erschwert das massive Auftreten falsch positiver Klone die Identifizierung relevanter Klone.

Durch die Verwendung einer größeren Library könnte die absolute Anzahl möglicher funktioneller Intrabodies erhöht werden, doch ist das Screening von Libraries mit einer Diversität oberhalb von 10^6 aufgrund der geringen Transformationseffizienzen in Hefezellen nicht praktikabel. Daher wurde im Folgenden zunächst versucht, ausgehend von einer unselektierten Immunlibrary spezifische EGFR-bindende scFv Antikörper über klassisches Biopanning (durchgeführt von R. Beerli) anzureichern. Die resultierende vorselektierte scFv-Bibliothek sollte dadurch bei einer für das Yeast Two-Hybrid System geeigneten Komplexität einen weit höheren Anteil EGFR-spezifischer Antikörper und damit auch möglicher funktioneller EGFR-spezifischer Intrabodies enthalten.

3.4 Yeast Two-Hybrid Screening einer zweiten anti-EGFR scFv-Immunlibrary mit Hilfe des MATCHMAKER III Systems: Isolierung und funktionelle Charakterisierung von 5 EGFR-spezifischen scFv Antikörperfragmenten

3.4.1 Ausgangspunkt

Die in Abschnitt 3.3.1 beschriebene anti-EGFR pComb3H-scFv Immunlibrary war Ausgangspunkt für die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse. Da diese Library mit einer

Komplexität von mehr als 2×10^8 unabhängigen Klonen zu groß für ein direktes Screening in Hefezellen ist, wurden EGFR-spezifische scFv Antikörper durch mehrere Runden Biopanning gegen immobilisierte intrazelluläre EGFR Domäne angereichert. Der Verlauf der Anreicherung ist in Tabelle 3.3 wiedergegeben.

Panning Runde	Input	Output	Output/Input	EGFR ELISA (A405 nm)
Unselektiert	-	-	-	0.149
1	6.0×10^{12}	1.8×10^7	3.0×10^{-6}	0.093
2	2.0×10^{12}	8.4×10^5	4.2×10^{-7}	0.126
3	2.1×10^{12}	2.4×10^7	1.1×10^{-5}	0.663
4	1.1×10^{12}	4.3×10^8	3.9×10^{-4}	0.734

Tabelle 3.3 Anreicherung EGFR-spezifischer scFv Antikörper Phagen durch Biopanning

Diese Arbeiten wurden im Rahmen einer Kollaboration von R. Beerli durchgeführt. In der dritten Biopanning Runde begann das Verhältnis aus Output/Input zuzunehmen. Ferner konnte in ELISA Experimenten eine Zunahme der Bindung an EGFR detektiert werden, was auf eine erfolgreiche Anreicherung EGFR-spezifischer scFvs hindeutet (Abb. 3.13 A, B). Daher wurde der Output der dritten Biopanning Runde zur weiteren Selektion unter *in vivo* Bedingungen im Yeast Two-Hybrid System verwendet.

Zur Vermeidung des massiven Auftretens falsch positiver Klone wurde anstelle des Matchmaker I das Matchmaker III System eingesetzt. Mit Hilfe dieses Systems können falsch positive Klone wesentlich effizienter eliminiert werden, da im Genom des verwendeten Hefestamms AH109 drei unterschiedliche Reportergene, *ADE2*, *HIS3* und *MEL1* (und *lacZ*), integriert sind, die alle unter der Kontrolle verschiedener GAL4 „upstream activating sequences“ (UASs) und TATA-Boxen stehen. Durch die Verwendung der unterschiedlichen UASs und TATA-Boxen können falsch positive Klone, die direkt an zur GAL4 Bindungsstelle benachbarte Sequenzen binden, und solche, die mit an spezifische TATA-Boxen gebundenen Transkriptionsfaktoren interagieren, ausgeschlossen werden.

Die Aktivierung der Reportergene *ADE2* und *HIS3* ermöglicht Wachstum auf Adenin- und Histidin-freien Selektionsplatten, während die Reportergene *MEL1* und *lacZ* für α -Galaktosidase und β -Galaktosidase kodieren. Da die α -Galaktosidase ein sekretiertes Enzym ist, können α -Galaktosidase-exprimierende Klone direkt durch Blaufärbung auf X- β -Gal enthaltenden Selektionsplatten nachgewiesen werden.

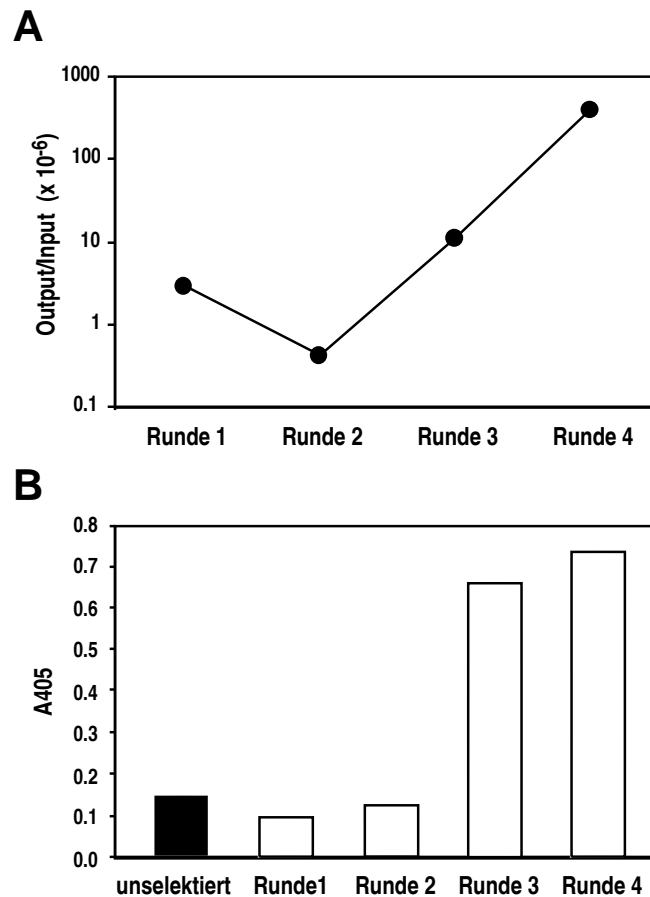


Abb. 3.13 Anreicherung EGFR-spezifischer scFv Antikörper Phagen durch Biopanning. Aus einer anti-EGFR scFv-Phagemid Immunlibrary mit einer Komplexität von 2×10^8 unabhängigen Klonen wurden Antikörper durch mehrere Runden Biopanning gegen immobilisiertes EGFR Antigen angereichert. Nach der dritten Biopanning Runde begann das Verhältnis von Output/Input zuzunehmen. **(A)** In ELISA Experimenten mit immobilisiertem EGFR-Antigen wurde die Bindungsaktivität der nach der angegebenen Biopanning Runde isolierten scFv-Phagen analysiert. **(B)**

3.4.2 Konstruktion einer Hefelibrary zur Expression EGFR-spezifischer scFv Fragmente

Die anti-EGFR scFv-Library, die durch drei Runden Biopanning gegen immobilisierte intrazelluläre Domäne des EGFR präselektioniert worden war, wurde in einen modifizierten „prey“ Hefeexpressionsvektor pGADT7 subkloniert. Hierzu wurde zunächst das Kontrollplasmid pGADT7-scFv(9E10) generiert, das gleichzeitig zwei inkompatible *Sfi*I-Restriktionsschnittstellen enthält, die zur Insertion der präselektierten scFv-Library benutzt wurden. Die cDNA des Myc-tag-spezifischen scFv(9E10) wurde mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide pGADT7-scFv-FOR und pGADT7-scFv(*Xba*)-REV (siehe Abschnitt 2.1.5) amplifiziert. Die Oligonukleotidsequenzen enthalten zwei inkompatible *Sfi*I Restriktionsschnittstellen, die durch Einfügen des PCR Produkts zwischen die *Nde*I und *Sal*I-Restriktionsschnittstellen des pGADT7 Vektors eingeführt wurden. Das hierdurch entstandene pGADT7-scFv(9E10) Konstrukt wurde in Yeast Two-Hybrid Experimenten als Negativkontrolle eingesetzt.

Zur Subklonierung der präselektierten anti-EGFR scFv-Library wurde das scFv(9E10) Antikörperfragment anschließend gegen die scFv-DNA Sequenzen des Output der dritten Runde Biopanning ausgetauscht. Die Komplexität der daraus resultierenden Hefelibrary wurde mit ca. 1.5×10^5 bestimmt, so dass der Output der dritten Runde Biopanning komplett enthalten sein sollte.

Die Plasmide dieser Hefelibrary kodieren für Fusionsproteine, die aus der GAL4 AD, einer von Influenzavirus abgeleiteten Sequenz (HA-Epitop) für die Detektion mit einem spezifischen Antikörper und einem C-terminalen scFv Antikörper bestehen (Abb. 3.14).

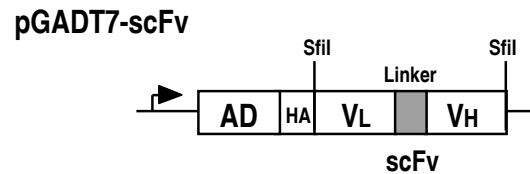


Abb. 3.14 Vektor für die intrazelluläre Expression einer anti-EGFR scFv Antikörperlibrary in Hefe. ScFv Fragmente aus einer präselektierten anti-EGFR Phagemid Library wurden zur Fusion mit der GAL4-Aktivierungsdomäne (AD) und dem Influenzavirus Hemagglutinin tag (HA) in einen modifizierten pGADT7 Yeast Two-Hybrid „prey“ Vektor subkloniert.

Zur Bestimmung des Anteils von scFv Antikörpern mit langer bzw. kurzer Linkersequenz innerhalb der Hefelibrary wurden die VL einschließlich der Linkersequenzen unter Verwendung der Oligonukleotide R.Beerli Sfi FOR und RB Xba (Linker) REV mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte über ein fünfprozentiges Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. Durch die PCR Analyse der unselektierten Hefelibrary konnte gezeigt werden, dass etwa 90% der Plasmide den längeren 18 Aminosäuren langen Linker enthalten, während die restlichen ca. 10% der Plasmide scFv Antikörper aufweisen, in denen die VL und VH durch den kürzeren 7 Aminosäuren langen Linker verknüpft sind (Abb. 3.15).

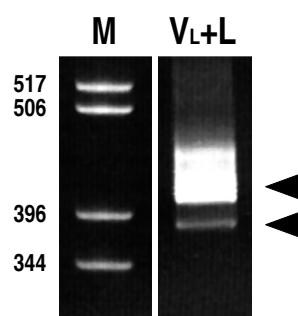


Abb. 3.15 PCR Analyse der unselektierten pGADT7-scFv Hefelibrary. VL einschließlich der Linkersequenzen wurden mittels PCR amplifiziert und zur Bestimmung des relativen Verhältnisses von scFv Antikörpern mit kurzer bzw. langer Linkersequenz über ein fünfprozentiges Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. Für VL einschließlich der kurzen Linkersequenz ist eine Größe von etwa 370 bp zu erwarten, für VL mit der langen Linkersequenz hingegen eine Größe von etwa 400 bp.

Zur Konstruktion eines „bait“ Hefeexpressionsvektors wurde ein EGFR cDNA Fragment, das für die Aminosäurereste 645-1186 kodiert, unter Verwendung der Restriktionsenzyme *Sma*I und *Sal*I aus dem pGBT9-EGFR (siehe Abschnitt 3.3.2) in den Vektor pGBKT7 eingefügt (Abb. 3.16 A). Die Expression des Fusionsproteins aus GAL4 DNA BD und der zytoplasmatischen Domäne des humanen EGFR in Hefe wurde durch Western blot Analyse unter Verwendung von GAL4 DNA BD- und EGFR-spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Abb. 3.16 B).

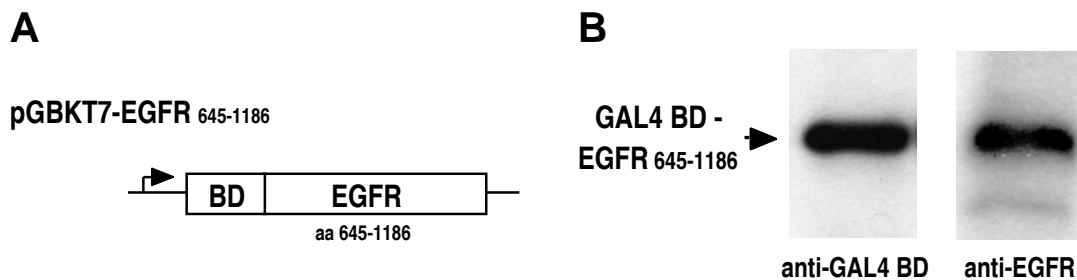


Abb. 3.16 (A) Vektor für die intrazelluläre Expression der zytoplasmatischen Domäne des EGFR in Hefe. Ein cDNA Fragment, das für die intrazelluläre Domäne des humanen EGFR kodiert, wurde wie im Text beschrieben an die GAL4 DNA-bindende Domäne (BD) im „bait“ Vektor pGBKT7 fusioniert. (B) Intrazelluläre Expression der zytoplasmatischen Domäne des EGFR in Hefe. Die Expression des GAL4 BD-EGFR Fusionsproteins wurde durch Western blot Analyse von Hefezelllysaten mit EGFR- und GAL4 BD-spezifischen Antikörpern und anschließenden HRP-gekoppelten Spezies-spezifischen Antikörpern mittels Chemolumineszenzdetektion bestätigt.

3.4.3 Selektion EGFR-spezifischer scFv Antikörperfragmente mit Hilfe der Yeast Two-Hybrid Methode

S. cerevisiae AH109 Zellen wurden sequenziell mit dem Vektor pGBKT7-EGFR und der pGADT7-scFv Library transformiert. Bei intrazellulärer Koexpression des GAL4 DNA BD-EGFR Fusionsproteins und GAL4 AD-scFv Molekülen, die mit EGFR wechselwirken, wird die GAL4 Aktivität rekonstituiert, wodurch die Expression der GAL4 regulierten Reportergene *ADE2*, *HIS3* und *Mel1/lacZ*, die im Genom des Hefestammes integriert sind, aktiviert wird (analog Abb. 3.12, links). Im Gegensatz hierzu können die Reportergene im Fall von scFvs, die falsch gefaltet sind, oder solchen, die nicht an EGFR binden, nicht aktiviert werden, so dass die Hefen nicht auf dem Selektionsmedium wachsen können (analog Abb. 3.12, rechts). Hefezellen mit EGFR „bait“ und scFv „prey“ Vektoren, welche die Reportergene *ADE2* und *HIS3* exprimierten, wurden unter hoch stringenten Bedingungen auf Selektionsplatten in Abwesenheit der Aminosäuren Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin herangezogen (-Trp, -Leu, -His, -Ade). Unter diesen Bedingungen wuchsen 223 Kolonien, die auf auf Selektionsplatten übertragen wurden, welche zusätzlich X- -GAL enthielten (-Trp, -Leu, -His, -Ade, +X- -GAL), um auf Expression des *Mel1* Genprodukts -Galaktosidase zu testen. Die 223 Kolonien zeigten graduelle Unterschiede in der Intensität ihrer Blaufärbung, die von annähernd weiß über hellblau bis zu intensivem türkisblau reichte.

3.4.4 Molekulare Analyse der isolierten EGFR-spezifischen scFv Fragmente

Die Plasmid-DNA von 24 zufällig ausgewählten, β -Galaktosidase exprimierenden Kolonien wurde isoliert. Nach PCR Amplifikation der enthaltenen scFv cDNA Fragmente wurde die Diversität der ausgesuchten scFv Antikörperfragmente durch Restriktionsverdau mit dem häufig schneidenden Restriktionsenzym *MvaI* untersucht. Basierend auf den erhaltenen Restriktionsmustern wurden die analysierten scFv in 5 Gruppen mit identischem Spaltmuster eingeteilt (Abb. 3.17). Diese werden beispielhaft durch scFv # 2 (Gruppe von 13 Klonen), # 8 (Gruppe von 7 Klonen), # 29 (Gruppe von 2 Klonen) repräsentiert.

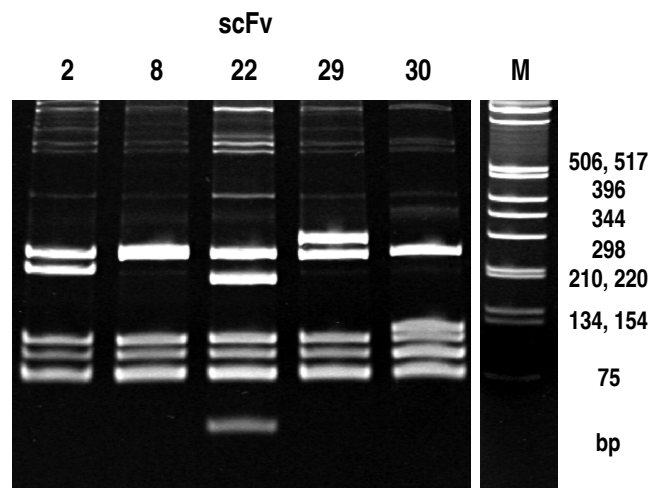


Abb. 3.17 Restriktionsanalyse („fingerprinting“) der Hefe-selektierten scFv Klone. Nach der Yeast Two-Hybrid Selektion wurden einzelne pGADT7-scFv Plasmide isoliert, deren scFv-Anteil durch PCR amplifiziert und mittels Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease *MvaI* analysiert wurde. Aufgrund ihrer DNA „fingerprinting“ Muster wurden die isolierten Klone in fünf verschiedene Gruppen unterteilt, die durch die hier gezeigten scFv Fragmente # 2, 8, 22, 29 und 30 repräsentiert sind.

Die Restriktionsmuster der scFv Klone # 22 und # 30 wurden jeweils nur einmal gefunden. Die Rekonstitution von GAL4 nach Koexpression der einzelnen GAL4 AD-scFv Fragmente und des GAL4 DNA BD-EGFR Proteins wurde nach Amplifikation der Plasmid-DNA in *E. coli* und Retransformation von Hefezellen für alle Klone bestätigt (Abb. 3.18). Im Gegensatz hierzu konnten Hefen, die mit dem „bait“ Expressionsvektor pGBKT7-EGFR und einem „prey“ pGADT7-scFv Kontrollvektor transformiert worden waren, die intrazelluläre Expression eines Fusionsproteins aus der GAL4 AD und dem Myc-tag-spezifischen scFv(9E10) ermöglicht, unter den gleichen Selektionsbedingungen nicht wachsen (Abb. 3.18).

Als zusätzliche Kontrolle wurden Hefezellen mit pGBKT7-EGFR Plasmid und leerem pGADT7 Vektor oder mit leerem pGBKT7 und den isolierten pGADT7-scFv Vektoren transformiert. Diese Hefezellen wuchsen ebenfalls nicht auf den Selektionsplatten (-Trp, -Leu, -His, -Ade, +X- -GAL) (nicht gezeigt).

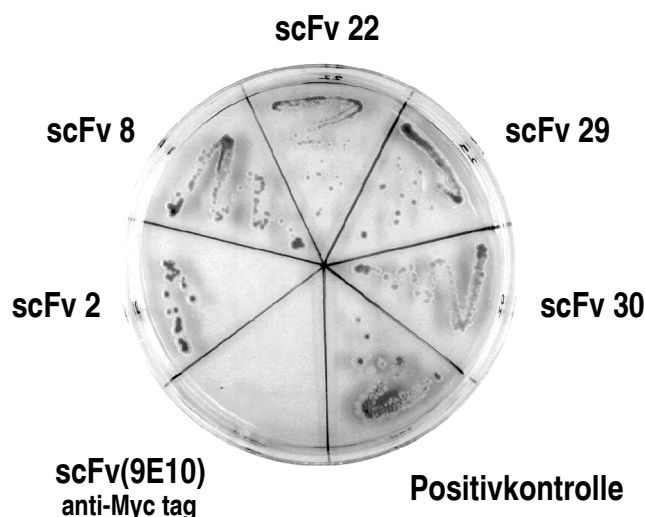


Abb. 3.18 α -Galaktosidase Assay. Hefeklone, die „bait“ und „prey“ Vektoren enthalten und ADE2 und HIS3 Reportergene exprimieren, wurden auf Medien ohne Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin selektiert. Anschließend wurden positive Klone auf Expression der α -Galaktosidase auf X-Gal enthaltendem Medium getestet. Die Abbildung zeigt repräsentative Klone, die die anti-EGFR scFv Fragmente # 2, 8, 22, 29 und 30 exprimieren. Hefezellen, die GAL4 BD-p53 und GAL4 AD-SV40 T Antigen exprimieren, und Zellen, die GAL4 BD-EGFR und ein GAL4 AD Fusionsprotein mit Myc-tag-spezifischem scFv(9E10) exprimieren, dienten als Positiv- bzw. Negativkontrollen.

Bei der Analyse der DNA- und abgeleiteten Aminosäuresequenzen der isolierten scFv Antikörper zeigten sich hohe Homologien in den Gerüstbereichen („frameworks“) der variablen Domänen sowie in den CDRs der leichten und schweren Antikörperketten (Abb. 3.19). Die CDRs der V_H von scFv 22 und 30 waren identisch, doch die V_H Gerüstbereiche dieser Klone waren in 14 Aminosäurepositionen unterschiedlich, was ein Hinweis auf die unabhängige Selektion dieser Antikörperfragmente ist. Während ca. 90% der unselektionierten Hefelibrary aus Plasmiden mit 18 Aminosäurelinker bestanden, enthielt die Mehrzahl der isolierten Klone (scFvs 2, 8, 30) den kurzen 7 Aminosäuren langen Linker.

V_L	CDR1	CDR2	CDR3
scFv 2	KASQNVDTNVA	SASYRYS	QQYNSYPHT
scFv 8	----T-G----	-----	-----
scFv 22	-----G----	-T-S---	-----
scFv 29	-----G----	-----	-----
scFv 30	-----G-A--	--N--T	---S---L-

V_H	CDR1	CDR2	CDR3
scFv 2	TYWMH	EINPSNGRTNYNEKFK	GGLYGPGFAY
scFv 8	-----	----T-----	--N-VNL---
scFv 22	S----	-----	---S-----
scFv 29	-----	-----	-----
scFv 30	S----	-----	---S-----

Abb. 3.19 Sequenzvergleich der komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDRs). Sequenzierung der scFv cDNA der Hefe-selektierten Klone ergab eine hohe Homologie in den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der CDRs in den variablen Domänen der leichten (V_L) und schweren (V_H) Antikörperketten.

3.4.5 Zusammenfassung der Abschnitte 3.3 und 3.4

Um scFv Antikörperfragmente zu isolieren, die in Hefezellen spezifisch an die intrazelluläre Domäne des humanen EGFR binden, wurden zwei anti-EGFR scFv-Immunistructures durch Yeast Two-Hybrid Screening auf EGFR-spezifische Binder untersucht. Direktes Yeast Two-Hybrid Screening einer Hefe-scFv-Immunistructure mit einer Diversität von lediglich 8×10^5 unabhängigen Klonen unter Verwendung des MATCHMAKER I Systems führte nicht zur Isolierung EGFR-spezifischer Intrabodies. Dagegen konnte die Diversität einer zweiten, mit 2×10^8 unabhängigen Klonen deutlich komplexeren anti-EGFR scFv-Library durch drei Runden Biopanning gegen immobilisierte rekombinante intrazelluläre Domäne des EGFR auf ein Maß reduziert werden, das ein direktes Yeast Two-Hybrid Screening erlaubte. Das Screening dieser präselektierten anti-EGFR scFv-Immunistructure unter Verwendung des MATCHMAKER III Systems resultierte in 223 Hefekolonien, die auf (-Trp, -Leu, -His, -Ade) Selektionsplatten wuchsen. Durch Restriktionsverdau der scFv cDNA Fragmente von 24 zufällig ausgewählten, -Galaktosidase exprimierenden Einzelklonen mit dem häufig schneidenden Restriktionsenzym *MvaI* zeigte sich, dass diese mindestens 5 verschiedene unabhängige scFv Klone repräsentierten. Bei der Analyse der DNA- und abgeleiteten Aminosäuresequenzen der isolierten scFv Antikörper zeigten sich hohe Homologien in den Gerüstbereichen („frameworks“) der variablen Domänen sowie in den CDRs der leichten und schweren Antikörperketten.

3.5 Funktionelle Charakterisierung der isolierten EGFR-spezifischen scFv Antikörperfragmente

3.5.1 Bindungsstudien mit *in vitro* translatierten EGFR-spezifischen scFv Fragmenten

Die Wechselwirkung zwischen Hefe-selektierten scFv Antikörperfragmenten und der zytoplasmatischen Domäne des humanen EGFR wurde in Glutathion-S-Transferase „pull-down“ Experimenten als zellfreiem System getestet.

Zur Konstruktion eines bakteriellen Expressionsvektors wurde ein EGFR cDNA Fragment, das für die Aminosäuren 645-1186 des prozessierten Rezeptors kodiert, unter Verwendung der Oligonukleotide EGFR *Sal Xho* FOR und EGFR *Xba Not* REV new mittels PCR amplifiziert und zwischen den *SaI* und *NotI*-Restriktionsschnittstellen in den Vektor pGEX-4T1 eingefügt. Das entstandene Plasmid pGEX-4T1-EGFR enthält in einem offenen Leseraster die genetische Information für ein Fusionsprotein, das aus der Glutathion-S-Transferase aus *Schistosoma japonicum* (AS 1-218) und der kompletten intrazellulären Domäne des EGFR besteht.

Das Fusionsprotein wurde in *E. coli* Rosetta-gami(DE3) Zellen exprimiert. Dieser Stamm exprimiert seltene tRNAs und ermöglicht dadurch die Expression von Genen mit Kodons, die in *E. coli* selten vorkommen (AUA, AGG, AGA, CUA, CCC und GGA).

Zur Herstellung *in vitro* translaterter ³⁵S-markierter scFvs 2, 8, 22, 29 und 30 dienten die pGADT7-scFv 2, 8, 22, 29 und 30 „prey“ Hefevektoren als Matrize. Zwischen der für die

GAL4 AD kodierenden und der für die scFv kodierenden Sequenz befindet sich in diesen Vektoren ein T7 Promotor, der die *in vitro* Transkription der scFv-Sequenz treibt. Wie in Abschnitt 2.2.23 beschrieben, wurde die *in vitro* Transkription/Translation unter Verwendung des TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation Systems (Promega) in Anwesenheit von ^{35}S -markiertem Methionin durchgeführt.

Bakteriell exprimiertes GST-EGFR Protein oder GST Kontrollprotein wurde auf Glutathionsepharose immobilisiert und in Lösung mit *in vitro* translatierten ^{35}S -markierten scFvs 2, 8, 22, 29 und 30 inkubiert (schematisch in Abb. 3.20 A gezeigt). Die gebundenen Proteine wurden nach Präzipitation der Komplexe und mehreren Waschschritten von der Glutathionsepharose eluiert und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Wie in Abb. 3.20 B ersichtlich, binden alle getesteten scFvs spezifisch an rekombinantes GST-EGFR Protein, nicht jedoch an GST allein. Während scFvs 2, 8, 22, und 29 in diesem Assay stark mit EGFR wechselwirken, konnte für *in vitro* translatierten scFv 30 lediglich ein schwaches Signal detektiert werden (Abb. 3.20 B, unten).

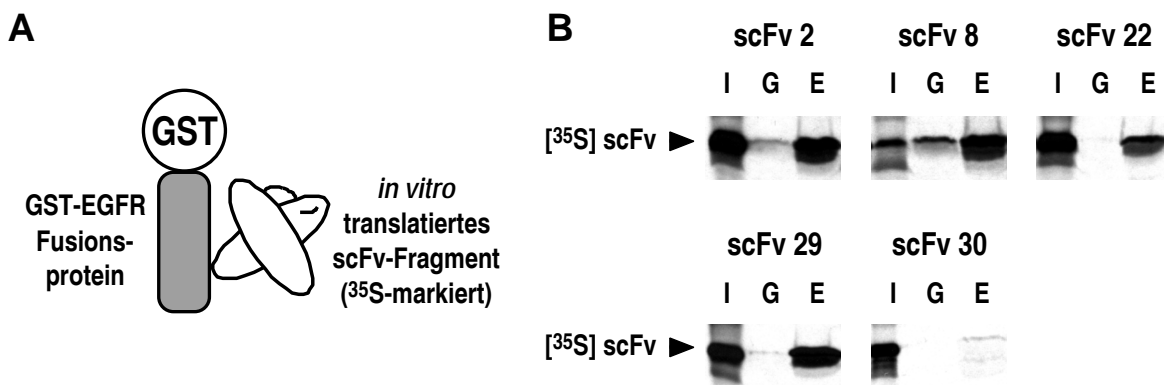


Abb. 3.20 Bindung *in vitro* translaterter scFv Fragmente an EGFR. Wie in (A) schematisch dargestellt, wurde die Bindung Hefe-selektierter scFv Fragmente an den zytoplasmatischen Teil des EGFR in Glutathion S Transferase (GST) „pull-down“ Experimenten unter Verwendung von bakteriell exprimiertem GST-EGFR Fusionsprotein und *in vitro* translatierten, ^{35}S -markierten Antikörperfragmenten untersucht (B). Die Bindung von scFvs an Glutathion-gekoppelte Beads, die entweder GST allein (G) oder GST-EGFR (E) trugen, wurde durch Auftrennung der präzipitierten Proteinkomplexe mittels SDS-PAGE und anschließende Autoradiographie analysiert. Als Kontrolle wurden 10% der eingesetzten scFv Menge („input“) aufgetragen (I).

Aufgrund der hohen Sequenzhomologien in den CDRs der isolierten EGFR-spezifischen scFv Fragmente ist davon auszugehen, dass diese sehr wahrscheinlich ein gemeinsames Epitop der intrazellulären Domäne des EGFR erkennen. Um die Lage dieses Epitops einzugrenzen, wurden mehrere GST Fusionsproteine rekombinant in *E. coli* hergestellt, die verschiedene Teile der zytoplasmatischen Domäne des humanen EGFR enthalten. Sie wurden mit A, B, C und D bezeichnet. Um die Spezifität für EGFR zu bestätigen, wurde ein Fusionsprotein aus GST und der intrazellulären Domäne des humanen ErbB2 generiert, das mit e bezeichnet wurde (Abb. 3.21).

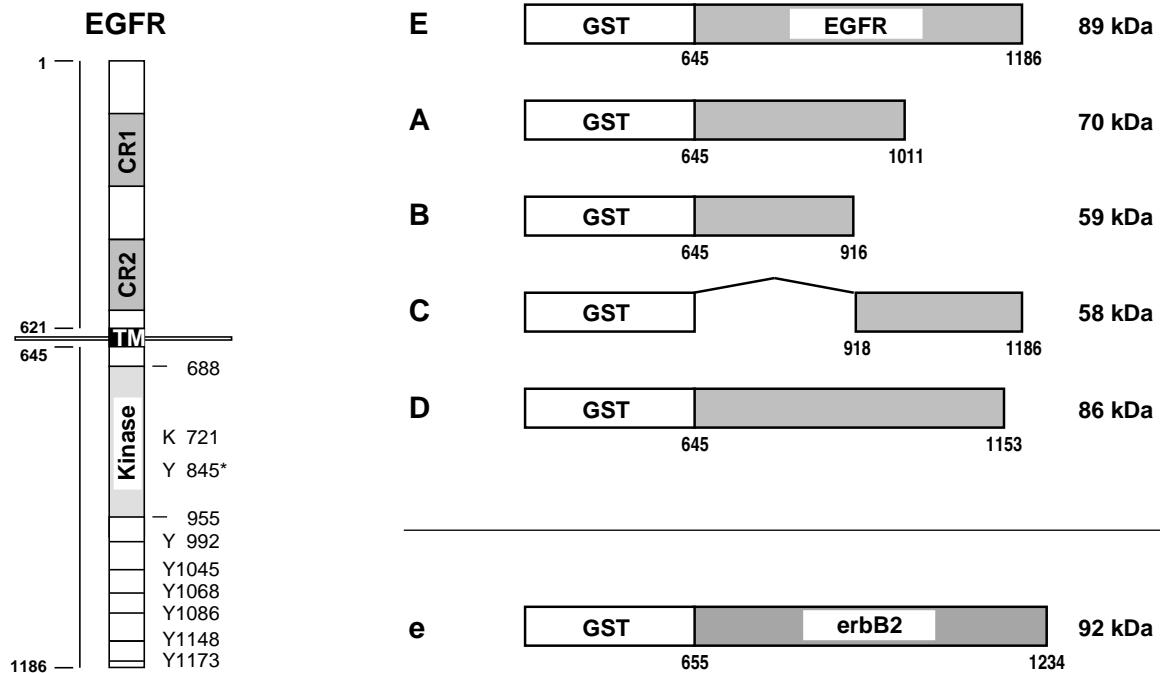


Abb. 3.21 Expressionsplasmide für die Herstellung von Fusionsproteinen aus Glutathion S Transferase (GST) und Fragmenten der intrazellulären Domäne des EGFR bzw. ErbB2. Ausgehend vom Vektor pGEX-4T1-EGFR (E) wurden, wie im Text beschrieben, verschiedene Bereiche des zytoplasmatischen Teils des humanen EGFR an GST fusioniert, um in GST „pull-down“ Experimenten die Bindungsstelle der Hefe-selektierten Klone einzugrenzen. Die resultierenden Fusionsproteine wurden mit A, B, C und D bezeichnet. Ferner wurde die komplette intrazelluläre Domäne des humanen ErbB2 an GST fusioniert (e), um mit Hilfe dieses Fusionsproteins die Spezifität der scFv-Bindung zu untersuchen. Zur Orientierung ist links die Struktur des kompletten EGFR dargestellt.

Unter Verwendung dieser Fusionsproteine wurde ein GST „pull-down“ Experiment mit ^{35}S -markiertem scFv 2 durchgeführt (Abb. 3.22). Während die Bindung an GST-EGFR bestätigt wurde, konnte keine Bindung des scFv 2 Proteins an GST-ErbB2 detektiert werden. Auch band der ^{35}S -markierte scFv 2 Antikörper an keines der Fusionsproteine A, B, C und D. Dieses Ergebnis war unerwartet, denn A und C bzw. D und C weisen überlappende Bereiche auf und decken zusammen die gesamte intrazelluläre Domäne des EGFR ab. Würde das scFv 2 Antikörperfragment ein lineares Epitop erkennen, sollte es an A, B und D, A, C und D, C und D oder ausschließlich an C binden (siehe Abb. 3.21).

Die Beobachtung, dass scFv 2 jedoch an keines der Konstrukte A-D bindet, könnte ein Hinweis darauf sein, dass scFv 2 ein diskontinuierliches Konformationsepitop erkennt, das aufgrund einer Faltung, die sich von der natürlichen Faltung der gesamten intrazellulären Domäne unterscheidet, in den Konstrukten A-D nicht vorkommt. Auch eine Involvierung des extremen C-Terminus (AS 1153-1186) und eines Epitops zwischen AS 645 und 918 in einem erkannten diskontinuierlichen Epitop könnte erklären, dass scFv 2 an A-D nicht bindet, da in keinem der vier Konstrukte A, B, C und D beide Bereiche enthalten sind.

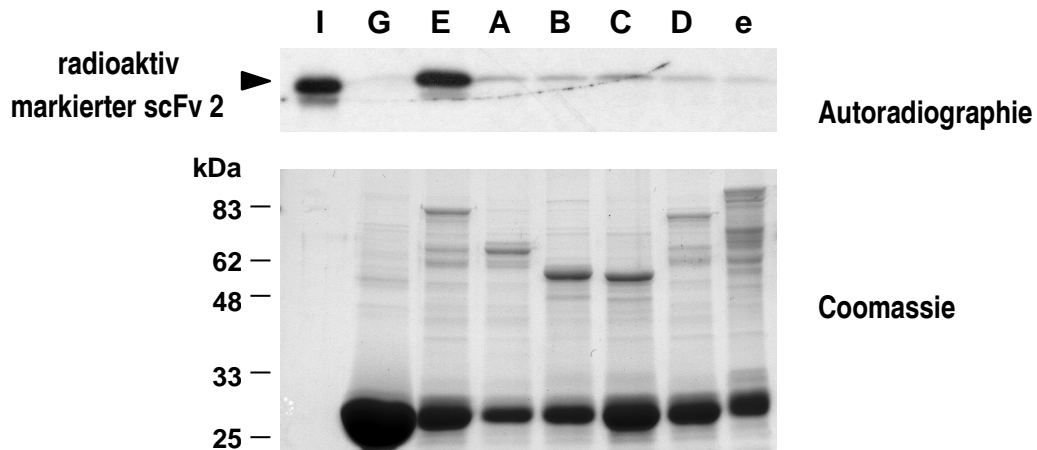


Abb. 3.22 Spezifität der Bindung von *in vitro* translatiertem scFv 2 an EGFR. Die Spezifität der scFv Interaktion mit EGFR wurde zusätzlich durch ein GST „pull-down“ Experiment unter Verwendung von GST (G), GST-EGFR (E), GST-ErbB2 (e) und GST-Fusionsproteinen mit Teilen der intrazellulären Domäne des EGFR (A, B, C und D; siehe auch Abb. 3.21) bestätigt. Die Gegenwart gleicher Mengen an Fusionsproteinen auf den präzipitierten Glutathion-gekoppelten Beads wurde durch Coomassie Färbung von SDS-PAGE Gelen kontrolliert (unteres Feld).

3.5.2 Interaktion der scFv Antikörperfragmente mit EGFR im Zytoplasma von Säugerzellen

Um aufzuklären, ob die im Yeast Two-Hybrid Screen isolierten scFv Fragmente auch bei zytoplasmatischer Expression in Säugerzellen noch funktionell sind und unter intrazellulären Bedingungen an humanen EGFR binden können, wurden Koimmunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Hierzu wurden die scFv Genfragmente von scFv 2, 8, 22, 29, 30 und 9E10 durch Restriktionsverdau mit *Sfi*I aus dem entsprechenden pGADT7-scFv Konstrukt ausgeschnitten und in einen modifizierten pcDNA3.1/Zeo(+) Vektor (freundlicher Weise von R. Beerli zur Verfügung gestellt) inseriert, in den zwischen den *Nhe*I und *Hind*III-Restriktionsschnittstellen zwei inkompatible *Sfi*I-Restriktionsschnittstellen und ein HA-tag eingefügt worden waren.

COS-7 Zellen wurden mit den so konstruierten Plasmiden und mit einem Plasmid, das die cDNA Sequenz für den gesamten humanen EGFR trägt, transient kotransfiziert.

48 h nach Transfektion wurden die Zellen gewaschen und lysiert. Zentrifugierte Lysate wurden mit humanisiertem C225 Antikörper, der an die extrazelluläre Domäne des EGFR bindet, und Protein G Sepharose inkubiert. Nach Präzipitation wurden die gebundenen Proteine mittels SDS-PAGE und Western blot unter Verwendung eines anti-HA Antikörpers untersucht (Abb. 3.23 A). Proteinbanden, die sich bei der für scFv Antikörper zu erwartenden Größe bewegen, wurden vom anti-HA Antikörper in EGFR Immunpräzipitaten von Zellen erkannt, die scFv 2, 8, 29 oder 30 exprimieren.

Dies zeigt, dass diese Antikörperfragmente auch bei zytoplasmatischer Expression funktionell sind und an EGFR binden. Im Gegensatz hierzu konnte der Myc-tag-spezifische scFv(9E10) nicht mit EGFR aus Lysaten von Zellen, die mit dem Kontrollkonstrukt transfiziert waren, kopräzipitiert werden (Abb. 3.23 A, unten).

In EGFR Immunpräzipitaten von scFv 22 exprimierenden Zellen konnte ebenfalls kein Signal detektiert werden, was dadurch erklärt werden könnte, dass scFv 22 in Säugerzellen inaktiv oder die Interaktion mit EGFR zu schwach ist, um sie durch Koimmunpräzipitationsexperimente nachweisen zu können. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass die Proteinmenge des scFv 22 aufgrund einer schwachen Expression in Säugerzellen für eine Koimmunpräzipitation zu gering ist. Tatsächlich zeigten sich nach Auftragen gleicher Gesamtproteinmengen deutliche Unterschiede in den Expressionsniveaus der einzelnen scFv Antikörperfragmente. Dabei wies scFv 22 eine Expression auf, die deutlich geringer als die der anderen scFv Fragmente war und nahe der Nachweisgrenze lag (Abb. 3.23 B).

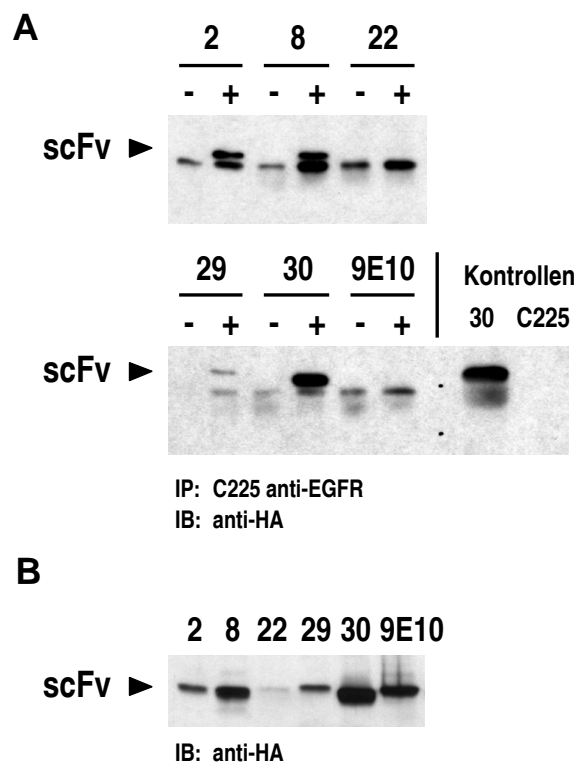


Abb. 3.23 (A) Bindung intrazellulärer scFv Fragmente an EGFR *in vivo*. COS-7 Zellen wurden transient mit Plasmiden, die den gesamten humanen EGFR und HA-markierte EGFR-spezifische Antikörperfragmente kodieren, kotransfiziert. Die Interaktion der zytoplasmatischen scFvs mit EGFR wurde in Koimmunpräzipitationsexperimenten untersucht. Geklärte Zelllysate mit gleicher Gesamtproteinmenge wurden mit humanisiertem C225 Antikörper, der an die extrazelluläre Domäne des EGFR bindet, und Protein G Sepharosebeads (+), oder mit Protein G Sepharosebeads in Abwesenheit von C225 (-) inkubiert. Nach Präzipitation der Beads wurden daran gebundene Proteine mittels SDS-PAGE und Western blot mit Ratte anti-HA IgG, HRP-gekoppeltem Zweitantikörper und anschließender Chemolumineszenzdetektion analysiert. *In vitro* translaterter anti-EGFR scFv 30 diente als Kontrolle für die Detektion der scFv. Spuren, die mit C225 Antikörper oder mit Immunpräzipitaten von Zellen, die mit EGFR Plasmid und cDNA transfiziert wurden, die den Myc-tag-spezifischen scFv(9E10) kodiert, dienten als Negativkontrollen. Eine zusätzliche Proteinbande, die nicht auf scFv zurückzuführen ist, sondern mit den für die Detektion verwendeten Antikörpern kreuzreagiert, läuft unterhalb der EGFR-spezifischen Antikörperfragmente. **(B) Western blot Analyse der relativen scFv-Proteinmengen.** Zur Bestimmung der relativen scFv-Proteinmengen wurden die in (A) beschriebenen geklärten Zelllysate nach Auftragung gleicher Gesamtproteinmengen mittels SDS-PAGE und Western blot mit Ratte anti-HA IgG, HRP-gekoppeltem Zweitantikörper und anschließender Chemolumineszenzdetektion analysiert.

In den meisten Proben wurde eine weitere Bande unterhalb der scFv Bande beobachtet. Bei diesem Protein handelt es sich sehr wahrscheinlich um ein unspezifisch an Protein G bindendes Protein, da es auch bei Inkubation der Zellysate mit Protein G in Abwesenheit des anti-EGFR Antikörpers detektiert wurde (Abb. 3.23 A, mit „-“ bezeichnete Spuren).

3.5.3 Intrazelluläre Lokalisation der scFv Fragmente in humanen Krebszellen

Durch GST „pull-down“ Experimente und Koimmunpräzipitationsexperimente konnte gezeigt werden, dass die isolierten scFv Antikörperfragmente *in vitro* und *in vivo* an EGFR binden. Diese Untersuchungen lassen jedoch keinerlei Rückschlüsse auf die Lokalisation der scFv Antikörper in EGFR-exprimierenden Zellen zu. Gut lösliche, funktionelle antigenspezifische scFv sollten an das Antigen binden. Im Falle zytoplasmatischer EGFR-spezifischer scFv Intrabodies wäre daher in EGFR exprimierenden Zellen eine überwiegende Lokalisation an der Zellmembran zu erwarten. In der Literatur sind jedoch auch scFv Antikörper beschrieben, die in Säugerzellen zur Bildung von Aggregaten neigen und dennoch ihre Antigenbindungseigenschaften beibehalten. In diesen Fällen wurde eine Hemmung der Aktivität der Zielantigene durch Immobilisierung in Antikörperaggregaten berichtet (Cardinale *et al.*, 2001; Lener *et al.*, 2000; Yi *et al.*, 2001).

Zur Untersuchung der Aktivität und Lokalisation der scFv Fragmente nach zytoplasmatischer Expression in humanen Krebszellen wurden humane A431 epidermale Karzinomzellen, die EGFR stark überexprimieren, transient mit Plasmiden transfiziert, die für die HA markierten, EGFR-spezifischen Antikörperfragmente scFv 2 und scFv 30 kodieren (siehe Abschnitt 3.5.2). 48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen auf Anwesenheit und Lokalisation der scFv Fragmente und des EGFR-Zielantigens untersucht. Hierzu wurden anti-HA-tag und anti-EGFR Erstantikörper, bzw. FITC und Cy-5 gekoppelte Zweitantikörper eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen durch Konfokale Laserscanning Mikroskopie untersucht. Wie erwartet, konnte eine starke EGFR-Färbung an der Zellmembran der A431 Zellen beobachtet werden (Abb. 3.24 A, D, G).

Während das Myc-tag-spezifische Kontrollprotein scFv(9E10) diffus über das gesamte Zytosol und, in geringerem Maße, auch im Zellkern der transfizierten Zellen verteilt war (Abb. 3.24 H), befanden sich die anti-EGFR scFvs 2 und 30 ausschließlich an der Zellmembran und an vesikulären Strukturen, die auch mit dem anti-EGFR Antikörper detektiert wurden (Abb. 3.24 B, E). Besonders deutlich sichtbar wird dies durch die gelben Bereiche in den Feldern (Abb. 3.24 C, F), die durch Übereinanderprojizieren der grünen und roten Bereiche in den beiden jeweils links benachbarten Feldern (Abb. 3.24 A+B bzw. D+E) entstanden und auf eine Kollokalisierung von scFv Fragmenten und EGFR hinweisen. Hingegen ist für scFv(9E10), wie zu erwarten, keine Kollokalisierung mit EGFR zu beobachten (Abb. 3.24 I).

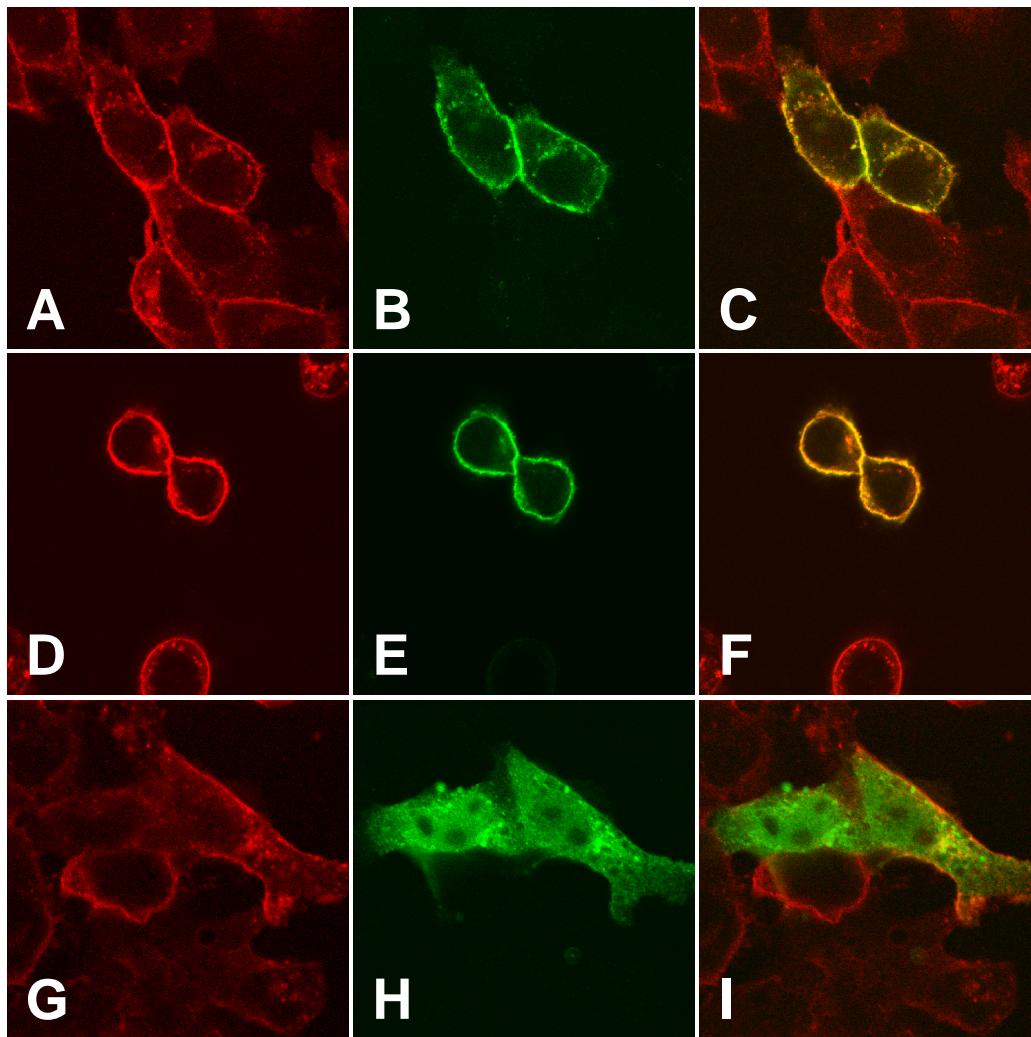


Abb. 3.24 Intrazelluläre Lokalisierung von scFv Fragmenten in A431 Zellen. EGFR überexprimierende A431 Tumorzellen wurden transient mit Plasmiden transfiziert, die für die HA-markierten, EGFR-spezifischen Antikörperfragmente scFv 2 (A, B, C) und scFv 30 (D, E, F) kodieren. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit EGFR-spezifischem C225 Antikörper und anschließendem Cy5-markiertem Zweitantikörper (A, D, G) und HA-tag-spezifischem Antikörper und anschließendem FITC-markiertem Zweitantikörper (B, E, H) gefärbt. Die Lokalisierung wurde mittels Konfokaler Laserscanning Mikroskopie analysiert. Cy5 und FITC Kanäle wurden übereinander projiziert, um Kolokalisierung aufzuzeigen (C, F, I). Myc-tag-spezifischer scFv(9E10) diente als Kontrolle (G, H, I).

3.5.4 Effekt zytoplasmatischer Expression von scFv Fragmenten auf EGF-abhängige Aktivierung des EGFR

Zur Klärung der Frage, ob die zytoplasmatische Expression der im Yeast Two-Hybrid Screen isolierten scFv Fragmente die Liganden-abhängige Aktivierung des humanen EGFR beeinflusst, wurden EGFR exprimierende COS-7 Zellen transient mit Plasmiden transfiziert, die die cDNA Sequenzen für die mit HA-tag fusionierten scFv Fragmente tragen (siehe Abschnitt 3.5.2). Als Kontrolle wurden untransfizierte COS-7 Zellen verwendet. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen, nachdem sie über Nacht in Medium ohne Serum kultiviert worden waren, direkt lysiert (-EGF) oder 5 min mit 50 ng/ml EGF stimuliert und anschließend lysiert (+EGF). Anschließend wurden die Lysate mittels SDS-PAGE und Western blot unter Verwendung verschiedener anti-Phosphotyrosin Antikörper

auf die Phosphorylierung einzelner Tyrosinreste in der zytoplasmatischen Domäne des EGFR untersucht (Abb. 3.25).

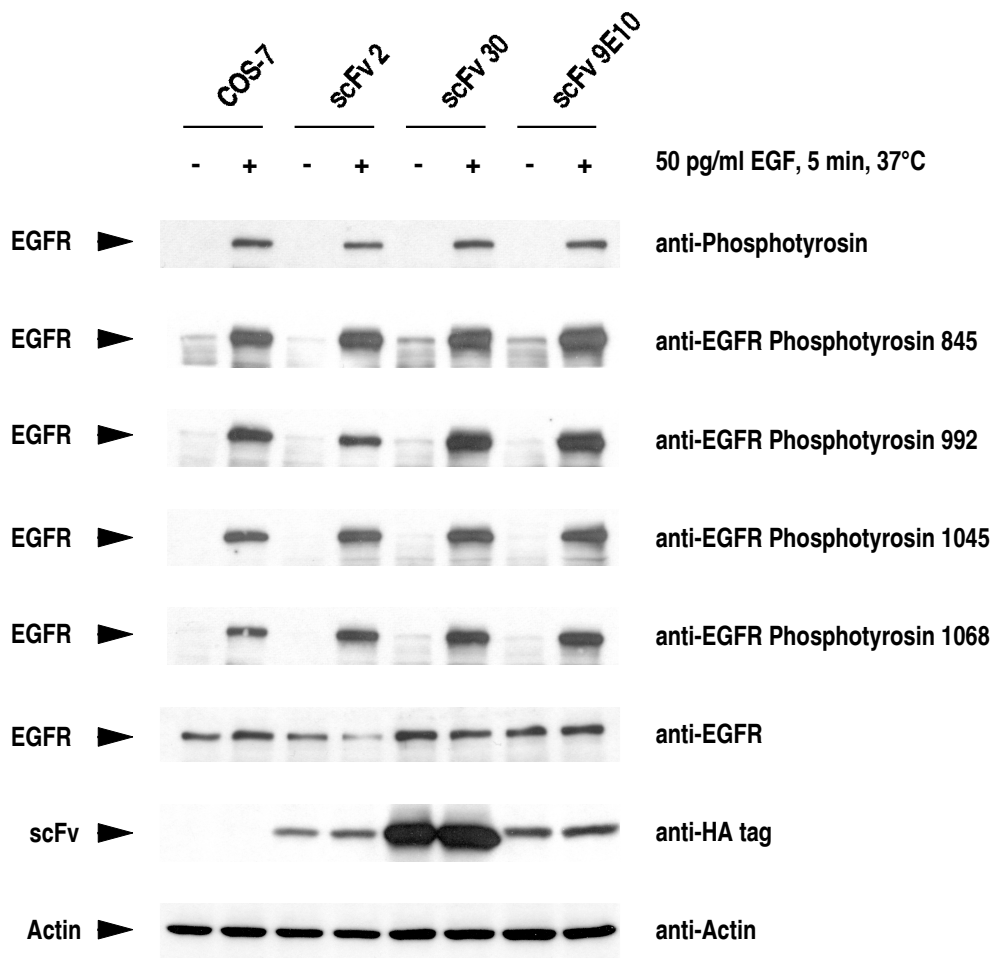


Abb. 3.25 Effekt zytoplasmatischer Expression von scFv Fragmenten auf EGF-induzierte EGFR Tyrosin-Phosphorylierung. EGFR-exprimierende COS-7 Zellen wurden transient mit Plasmiden transfiziert, die für die HA-markierten EGFR-spezifischen Antikörperfragmente scFv 2 und scFv 30 kodieren. Eineinhalb Tage nach Transfektion wurden die Zellen über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert (-) oder 5 min mit 50 ng/ml EGF enthaltendem Medium bei 37 °C inkubiert und dann lysiert (+). Die Zellysate wurden durch Western blot unter Verwendung von Antikörpern analysiert, die generell Phosphotyrosinreste oder spezifische EGFR-Phosphotyrosinreste (845, 992, 1045 und 1068) binden. Als Ladungskontrolle wurde anti-Actin IgG eingesetzt. Anti-HA-tag IgG diente zur Detektion der HA-markierten scFv Fragmente. Zum Vergleich der geladenen Mengen EGFR wurde der mit anti-EGFR Phosphotyrosin 992 entwickelte Western blot gestrippt und mit anti-EGFR IgG entwickelt.

Es zeigte sich, dass die intrazelluläre Expression der im Yeast Two-Hybrid isolierten scFv Antikörper keinen Einfluss auf die Gesamtphosphorylierung des EGFR nach EGF-Stimulation hatte. Unter Verwendung eines Antikörpers mit Spezifität für den phosphorylierten Tyrosinrest 845 im EGFR konnte nachgewiesen werden, dass auch die Phosphorylierung des Tyrosinrestes 845 in der Aktivierungsschleife des Rezeptors von der zytoplasmatischen Expression der scFv Fragmente unbeeinflusst blieb. Hingegen wurde für scFv 2 mit Hilfe des anti-Phosphotyrosin 992 Antikörpers ein leicht verringertes Signal detektiert. Wie sich jedoch nach Stripping der Membran und Rehybridisierung mit anti-EGFR Antikörper zeigte, war die EGFR-Gesamtmenge in dieser Spur erniedrigt, was auf

eine geringere Beladung schließen lässt. Die Tyrosinreste 1045 und 1068 wurden in ihrer EGF-induzierten Phosphorylierung durch intrazelluläre Expression von scFv Antikörpern nicht beeinflusst. Unter Verwendung eines anti-EGFR Antikörpers konnte gezeigt werden, dass die Gesamtmenge an EGFR vor und nach EGF-Zugabe konstant blieb. Anti-HA-tag IgG diente zur Detektion der HA-markierten scFv Antikörper. Aus dieser Analyse ergab sich, dass die Expressionsniveaus des scFv 2 und scFv(9E10) vergleichbar waren, während scFv 30 eine deutlich stärkere Bande aufwies. Als Kontrolle für die Auftragung gleicher Gesamtproteinmengen wurde ein anti-Actin Antikörper verwendet.

3.5.5 Untersuchung des Einflusses von scFv-Expression auf die Proliferation von NE-1 Zellen

Extrazelluläre Signale, die vom EGFR ins Zellinnere weitergeleitet werden, können Wachstum und Proliferation von Zellen induzieren. Daher wurde untersucht, ob die Expression der isolierten scFv Antikörperfragmente die Proliferation von EGFR-exprimierenden Säugerzellen beeinflusst. Hierzu wurden NE-1 Mausfibroblasten, die humanen EGFR stabil exprimieren, stabil mit scFv-Expressionsvektoren transfiziert. Einzelklone stabil transfizierter Zellen wurden unter ständigem Selektionsdruck mit Zeocin herangezogen. Einzelklone, die eine ausreichende Zellzahl erreichten, um durch Western blot analysiert werden zu können, wurden unter Verwendung eines anti-HA Antikörpers auf Expression HA-markierter scFv Fragmente untersucht. In Abb. 3.26 sind die Ergebnisse mehrerer Western blot Experimente zusammengestellt. Sie zeigen die Expression von scFv Antikörpern in verschiedenen Einzelklonen.

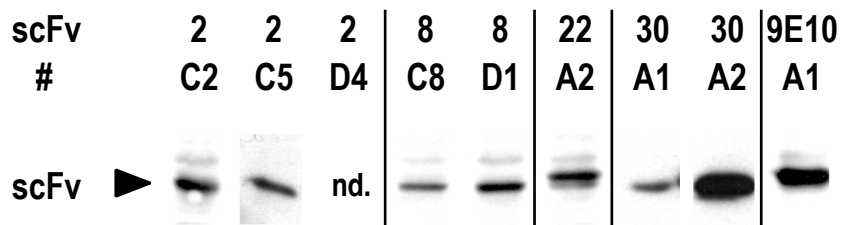


Abb. 3.26 Expression von scFv Fragmenten in stabil transfizierten EGFR-exprimierenden NE-1 Zellen. NE-1 Zellen wurden stabil mit Plasmiden transfiziert, die für die HA-markierten EGFR-spezifischen Antikörperfragmente scFv 2, 8, 22, 29, 30 und scFv(9E10) (Kontrolle) kodieren, und als Einzelklone unter Selektion mit Zeocin herangezogen. Zelllysate der Einzelklone wurden durch Western blot Experimente unter Verwendung von anti-HA IgG und HRP-gekoppeltem Spezies-spezifischem Sekundäntikörper mittels Chemolumineszenz analysiert. Gezeigt sind die Ergebnisse verschiedener Western blot Experimente, die hier in einer Abbildung zusammen dargestellt sind. Außer für scFv 29 konnte für alle scFv Konstrukte mindestens ein Einzelklon selektioniert werden, in dem die Expression von scFv Fragmenten durch Western blot nachweisbar war.

Die Proliferation dieser scFv exprimierenden Einzelklone wurde durch Messung des Einbaus von radioaktiv markiertem Methyl-³H-Thymidin über vier Tage verfolgt (Abb. 3.27). Als Kontrollen wurden untransfizierte NE-1 Zellen und ein Einzelklon verwendet, der den Myc-tag-spezifischen scFv(9E10) exprimiert.

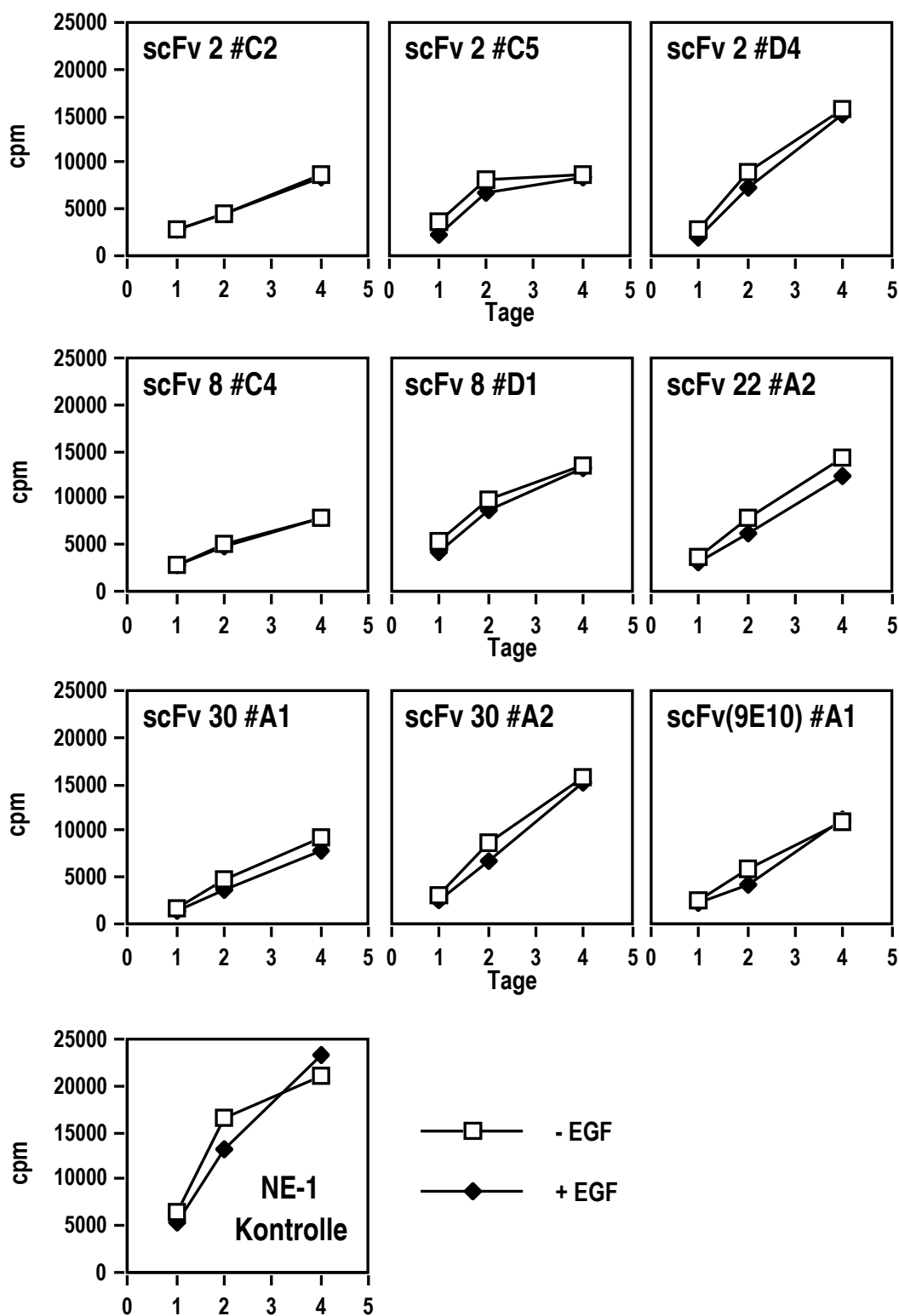


Abb. 3.27 EGF-abhängige Proliferation der mit scFv-cDNA transfizierten NE-1 Einzelklone. 3×10^3 stabil transfizierte NE-1 Zellen wurden pro Vertiefung einer 96er Mikrotiterplatte ausgesät und in Medium ohne oder mit 50 pM EGF kultiviert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 0.5 μ Ci Methyl- 3 H-Thymidin für jeweils 15 h zu den Zellen gegeben. Als Maß für die Proliferation der Zellen wurde die in die DNA inkorporierte Radioaktivität nach 24 h, 48 h und 96 h mit Hilfe eines Szintillationszählers quantifiziert (counts per minute, cpm).

Dabei blieb die Proliferation der Einzelklone sowie der Kontrollzellen durch die Zugabe von EGF nahezu unbeeinflusst. NE-1 Kontrollzellen proliferierten sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von EGF etwas stärker als die scFv exprimierenden Einzelklone. Da jedoch auch der Einzelklon scFv(9E10) #A1 schwächer als die NE-1 Kontrollzellen proliferierte, scheint es sich hierbei um einen generellen Effekt zu handeln, der möglicherweise auf die scFv Expression oder die Selektion mit Zeocin zurückgeführt werden kann.

Parallel wurden Zellen der jeweils gleichen Passage, die im Proliferationsassay eingesetzt wurde, lysiert und mit der Absicht, die relativen Expressionsniveaus zu bestimmen, in einem Western blot Experiment auf scFv Expression untersucht (Abb. 3.28). Überraschenderweise war in acht der neun bereits positiv getesteten Einzelklone keine scFv Expression mehr detektierbar. Lediglich der Einzelklon scFv 30 #A2 zeigte stabile scFv Expression. Der Grund für den Verlust der scFv Expression dürfte jedoch kaum in einem Wachstumsnachteil liegen, der auf anti-EGFR Spezifität der scFv Antikörper zurückzuführen ist, denn auch im Einzelklon scFv(9E10) #A1 war die Expression des scFv Fragments nicht mehr nachweisbar.

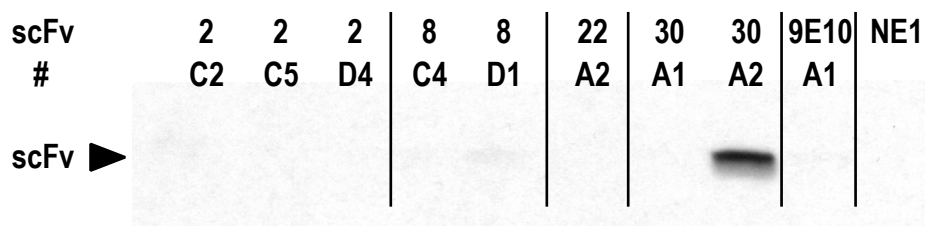


Abb. 3.28 Verlust der scFv-Expression in stabil transfizierten EGFR-exprimierenden NE-1 Zellen. Zelllysate von NE-1 Einzelklonen, die aus der gleichen Passage stammten wie die im Proliferationsassay eingesetzten Zellen (vgl. Abb 3.27) und deren scFv Expression bereits in früheren Passagen nachgewiesen wurde (vgl. Abb. 3.26), wurden zur Bestimmung der relativen scFv- und EGFR-Expressionsniveaus durch Western blot Experimente unter Verwendung von anti-HA IgG bzw. anti-EGFR IgG und HRP-gekoppeltem Spezies-spezifischem Sekundärantikörper mittels Chemolumineszenz analysiert. In acht der neun bereits positiv getesteten Einzelklone ist keine scFv Expression mehr detektierbar.

3.5.6 Zusammenfassung des Abschnitts 3.5

Wie in den Abschnitten 3.5.1-3.5.3 beschrieben, wurde die Interaktion und intrazelluläre Funktionalität der durch Yeast Two-Hybrid Screening isolierten scFv Antikörperfragmente durch unabhängige *in vitro* und *in vivo* Experimente bestätigt. So wurde in GST „pull-down“ Bindungsstudien nachgewiesen, dass die isolierten scFv Antikörper *in vitro* an gereinigte rekombinante intrazelluläre Domäne von EGFR binden. Während es bisher nicht möglich war, mittels GST „pull-down“ Experimenten die Bindungsstelle von scFv 2 am EGFR weiter einzugrenzen, kann aus der Beobachtung, dass scFv 2 nicht an die intrazelluläre Domäne des ErbB-Familienmitglieds ErbB2 bindet, auf eine hohe Spezifität der EGFR Bindung des scFv 2 Fragments geschlossen werden.

Die Funktionalität der scFv Fragmente *in vivo* wurde in Immunpräzipitationsexperimenten gezeigt, in denen vier der fünf isolierten scFv Fragmente nach Expression in COS-7 Zellen

mit EGFR kopräzipitierten. In EGFR-überexprimierenden humanen A431 epidermalen Karzinomzellen wurde die Lokalisation von zwei der fünf scFv Antikörper mittels Konfokaler Laserscanning Mikroskopie untersucht. Dabei konnte eindeutig eine Kolokalisation von humanem EGFR und scFv an der Plasmamembran und an vesikulären Strukturen innerhalb der Zellen beobachtet werden, während der Myc-tag-spezifische scFv(9E10) Antikörper, der als Kontrolle eingesetzt wurde, diffus über das gesamte Zytosol und in geringerem Maße auch im Zellkern der transfizierten Zellen verteilt war.

Für die Beeinflussung der Signalleitung des EGFR durch die zytoplasmatische Expression EGFR-spezifischer scFv Fragmente wurden keine Hinweise gefunden. So zeigten sich keinerlei Veränderungen in der Phosphorylierung spezifischer Tyrosinreste des Rezeptors nach EGF-Stimulation. Auch hatte die stabile Transfektion von NE-1 Zellen mit scFv-Expressionsvektoren keinen signifikanten Einfluss auf deren Proliferation. Allerdings zeigte die Analyse der scFv Expression in höheren Passagen der Zellkultur, dass die Expression der scFv Fragmente in acht von neun stabil transfizierten Einzelklonen verloren gegangen war, so dass ein Effekt auf die Proliferation bei hoher scFv Expression nicht ausgeschlossen werden kann.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob zytoplasmatisch aktive scFv Antikörperfragmente, die an die intrazellulären Domänen von ErbB-Rezeptor-tyrosinkinasen als Zielstrukturen binden, direkt aus diversen Antikörperlibraries isoliert werden können. ScFv Antikörperfragmente, die spezifisch an Wachstumsfaktorrezeptoren binden und direkt in Zielzellen exprimiert werden, stellen ein vielversprechendes Konzept zur selektiven Hemmung der zahlreichen Signalwege dar, die von diesen Rezeptoren ausgehen (Gschwind *et al.*, 2001; Yarden & Sliwkowski, 2001). So konnte in mehreren Veröffentlichungen gezeigt werden, dass scFv Fragmente, die durch Fusion mit einem KDEL-Peptid im Endoplasmatischen Retikulum (ER) verankert sind und spezifisch an die extrazelluläre Rezeptordomäne binden, den Transit des EGFR und des verwandten ErbB2 Moleküls zur Zelloberfläche verhindern konnten. Dadurch wurde das transformierende Potential dieser Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aufgehoben (Beerli *et al.*, 1994b; Beerli *et al.*, 1996; Jannot *et al.*, 1996).

Während die Umgebung im Lumen des ER jedoch optimale Voraussetzungen für die Proteinfaltung und -reifung von Antikörpern bietet, stellt das zytosolische Milieu hohe Anforderungen an die intramolekulare Stabilität intrazellulärer Antikörperfragmente. Im Laufe der Evolution wurden Antikörper für den extrazellulären Einsatz optimiert. Wie auch das Lumen anderer Organellen des sekretorischen Wegs ist das ER extrazytosolisch und daher vergleichbar mit dem extrazellulären Raum. Die Expression im ER stellte daher keine spezielle Anforderungen an die Beschaffenheit der scFv Antikörperfragmente. Hinsichtlich Ionenkonzentrationen, Redoxbedingungen und des Gehalts molekularer Chaperone, die die Proteinfaltung unterstützen (Ellgaard & Helenius, 2003), unterscheidet sich das Milieu des ER jedoch grundsätzlich von dem des Zytosols. Die Gesetzmäßigkeiten der Proteinfaltung im ER sind damit grundlegend verschieden von denen des Zytosols, und gewöhnlich falten sich Proteine, die sich an eine Entstehung im ER angepasst haben, nicht korrekt, wenn sie im Zytosol exprimiert werden, und umgekehrt. Im ER unterliegen neu synthetisierte Proteine einer strengen Qualitätskontrolle und es erfolgen diverse kotranslationale und posttranslationale Modifikationen, wie z.B. die Abspaltung von Signalpeptiden, N-verbundene Glykosylierung und die Bildung von Disulfidbrücken. Die Knüpfung von Disulfidbindungen ist insbesondere auch für die Stabilität von Antikörpern und Antikörperfragmenten von zentraler Bedeutung.

ScFv Antikörperfragmente enthalten vier stark konservierte Cysteine (jeweils zwei in V_H und V_L), die unter oxidierenden Bedingungen, welche im ER und im extrazellulären Raum vorherrschen, Disulfidbrücken ausbilden. Die Disulfidbrücken leisten mit 4-5 kcal/mol einen entscheidenden Beitrag zur Stabilität des scFv Moleküls (Frisch *et al.*, 1996; Goto & Hamaguchi, 1979). Es wurde mehrfach berichtet, dass ein Verlust der Disulfidbrücken bei zytoplasmatischer Expression zumeist zu inaktiven, falsch gefalteten, scFv Antikörpern führt, die eine kürzere Halbwertszeit besitzen und zur Bildung von Proteinaggregaten tendieren (Marasco, 1995; Proba *et al.*, 1997; Visintin *et al.*, 1999; Worn & Plückthun, 2001). Dies erschwert ihre Verwendung zur Inhibition intrazellulärer Zielproteine. Jedoch beschreiben einige Veröffentlichungen scFv Antikörper, die trotz des im Zytosol

vorherrschenden reduzierenden Milieus stabil und aktiv sind (Biocca *et al.*, 1994; Duan *et al.*, 1994; Jean *et al.*, 2000; Marasco *et al.*, 1993; Mhashilkar *et al.*, 1997). Dies zeigt, dass manche scFv Antikörper nach zytoplasmatischer Expression ihre Aktivität auch in Abwesenheit intramolekularer Disulfidbindungen beibehalten. Möglicherweise kann in seltenen Fällen der Verlust beider Disulfidbrücken im Zytosol durch eine hohe intrinsische thermodynamische Stabilität der scFv Fragmente kompensiert werden (Worn & Plückthun, 1998). In der Regel sind scFv Fragmente unter diesen Bedingungen jedoch inaktiv.

Um Antikörperfragmente zu erhalten, die im Zytosol von Säugerzellen funktionell sind und mit der intrazellulären Domäne von ErbB-Rezeptoren wechselwirken, wurden in der vorliegenden Arbeit mehrere anti-ErbB scFv- Antikörperlibraries unter Anwendung verschiedener Screeningstrategien auf ihren Gehalt an ErbB-spezifischen scFv-Fragmenten untersucht.

Als Zielstruktur für die Selektion intrazellulärer scFv Antikörperfragmente diente zunächst das ErbB2 Molekül. ErbB2 wurde in einer Reihe verschiedener humaner Karzinome untersucht, und in zahlreichen Tumoren wurden erhöhte Expressionsniveaus und/oder Genamplifikation nachgewiesen (Menard *et al.*, 2001). Beispielsweise wird Überexpression von ErbB2 in etwa 20% aller Brusttumore beobachtet und ist mit einer schlechten Prognose für die betroffenen Patientinnen verbunden. ErbB2 stellt daher einen wichtigen Angriffspunkt für die Entwicklung spezifischer Tumortherapeutika dar.

Da zu Beginn dieser Arbeit eine anti-ErbB2 scFv-Library nicht zur Verfügung stand, wurde eine anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary generiert, die eine Komplexität von 1.2×10^7 unabhängigen Klonen aufwies. Stichproben zufällig ausgewählter Einzelklone, die dieser Library entnommen wurden, enthielten ausschließlich Phagemids mit scFv-Insert. Durch Phagen Biopanning und Delayed Infectivity Panning wurde versucht, ErbB2-spezifische scFv-Phagen in der scFv-Phagemid Immunlibrary anzureichern. Während im Phagen Biopanning eine Anreicherung nicht zu beobachten war, wurde die Komplexität der scFv-Phagemid Immunlibrary bereits durch eine DIP Runde drastisch reduziert, weshalb insgesamt nur zwei Runden DIP durchgeführt wurden. Unerwarteterweise zeigte sich in ELISA Experimenten jedoch, dass die Reduktion der Komplexität nicht mit einer Anreicherung ErbB2-spezifischer scFv-Phagen einherging. Ferner gab es Hinweise auf eine ausgeprägte unspezifische Wechselwirkung der Phagenpartikel mit ErbB2. So zeigten Kontrollphagen ohne scFv starke Bindung an das verwendete rekombinante ErbB2, und im Gegensatz zur Ausgangslibrary enthielt etwa ein Drittel der ausgewählten und untersuchten Einzelklone aus dem Output der zweiten DIP Runde deletierte Phagemids ohne scFv-Genfragmente.

Es ist bekannt, dass Stabilitätsprobleme des verwendeten Vektors und des DNA Inserts zu einer Anreicherung von Phagemids ohne DNA Insert führen können (Itai Benhar, persönliche Mitteilung). Die Verpackung des Phagemid in die Phagenhülle stellt selbst bereits eine biologische Selektion gegen große Vektoren und deren Inserts dar. Kleine Phagemidgenome werden schneller verpackt als große, so dass deletierte Phagemids nach einer Passage durch die Phagen-verpackte Form einen Selektionsvorteil haben (Barbas, 2001). Dies wird besonders dann offensichtlich, wenn, wie oben beschrieben, deletierte Phagemid Formen nach mehreren Runden Phagen-Selektion auftauchen und wenn keine

funktionelle Selektion für das präsentierte Protein aufrechterhalten wird. Überdies wurde beobachtet, dass Antikörperfragmente ein unterschiedliches Maß an Toxizität bei Expression in *E. coli* zeigen, so dass Bakterien mit einem deletierten Phagemid schneller wachsen. In Abwesenheit einer stringenten Selektion für Antikörper-tragende Phagen kann dies nach einigen Passagen zu einem Verlust der Librarydiversität führen (Barbas, 2001). Eine geringe Antigendichte auf der Oberfläche der für die DIP Selektion verwendeten *E. coli* Zellen könnte ein weiterer möglicher Grund für die Anreicherung von Phagenpartikeln ohne ErbB2-spezifische scFv Antikörperfragmente sein. Wie die im „spun-cell“ ELISA gemessenen Werte zeigen, war das ErbB2-Antigen nur auf *E. coli* Zellen nachweisbar, die mit dem pIB-Tx-ErbB2 Konstrukt zur Oberflächenexpression des Antigens transfiziert worden waren, nicht jedoch auf Kontrollzellen, die ein irrelevantes Konstrukt trugen. Unerwartet war jedoch der gemessene absolute Absorptionswert, der mit 0.1 sehr klein ausfiel und somit ein Hinweis auf eine geringe Antigendichte und -präsentation auf dem in der DIP Selektion verwendeten *E. coli* Zellen sein könnte. Im Vergleich hierzu wurden mit anderen Antigenen Werte zwischen 0.2 und 1.0 gemessen (Benhar *et al.*, 2000). Der plausibelste Grund für die Anreicherung von Phagenpartikeln ohne scFv Fragment dürfte in der beobachteten starken unspezifischen Bindung der Phagenpartikel an ErbB2 liegen. Zwar sollten potentielle hochaffine ErbB2-Binder durch DIP oder Phagen Biopanning trotz unspezifisch bindender Phagen angereichert werden können. Denkbar ist jedoch, dass sich in der anti-ErbB2 scFv-Phagemid Immunlibrary nur scFv-Phagen befinden, die mit mäßiger Affinität spezifisch an ErbB2 binden, und dass der Unterschied der Affinität im Vergleich zur unspezifischen Bindung aller Phagenpartikel an ErbB2 gering ist. In einer solchen Situation könnten sich unspezifisch bindende Phagenpartikel aufgrund ihres hohen Anteils an der Gesamtmenge in der Library enthaltener Phagen gegenüber den mäßig affinen ErbB2-spezifischen Phagen in der Konkurrenz um das ErbB2-Antigen behaupten.

Weder nach vier Phagen Biopanning Runden noch nach zwei Runden DIP Selektion waren hochaffine ErbB2-spezifische scFv-Phagen, die *in vitro* unter oxidierenden Bedingungen spezifisch an ErbB2 binden, in der anti-ErbB2 Phagenlibrary nachweisbar. Da scFv Antikörper, die unter reduzierenden Bedingungen an ErbB2 binden, lediglich einen geringen Prozentsatz der unter oxidierenden Bedingungen bindenden scFv Fragmente darstellen sollten, erschien eine weitere Verwendung dieser Library zur Selektion intrazellulär aktiver scFv Fragmente nicht sinnvoll. Stattdessen konzentrierten sich die nachfolgenden Arbeiten auf zwei anti-EGFR Immunlibraries, die im Rahmen einer Kollaboration von R. Beerli zur Verfügung gestellt wurden. Aus beiden Libraries waren *in vitro* unter oxidierenden Bedingungen EGFR-spezifische Antikörperfragmente isoliert worden (R. Beerli, persönliche Mitteilung und (Hyland *et al.*, 2003)).

Für die Isolierung intrazellulär aktiver scFv Antikörperfragmente erschien das Yeast Two-Hybrid System geeignet. Es ermöglicht die Detektion von Protein-Protein-Wechselwirkungen unter reduzierenden intrazellulären Bedingungen in Hefezellen. Zu Beginn dieser Arbeit existierten keinerlei Veröffentlichungen über die Verwendung des Yeast Two-Hybrid Systems zur Isolierung intrazellulär aktiver scFv Antikörperfragmente. Zwischenzeitlich wurde die prinzipielle Eignung des Yeast Two Hybrid Systems unter

Einsatz definierter intrazellulär stabiler scFv Fragmente als Modellsystem auch von anderen Arbeitsgruppen nachgewiesen (De Jaeger *et al.*, 2000; Visintin *et al.*, 1999). Ferner konnten aus mehreren scFv Libraries durch Yeast Two-Hybrid Screening scFv Antikörper gegen AFT-2 (Portner-Taliana *et al.*, 2000), BCR-ABL (Tse *et al.*, 2002), Syk (Dauvillier *et al.*, 2002) und TAU (Visintin *et al.*, 2002) gewonnen werden.

Da die Effizienz der Hefetransformation stark limitierend wirkt, ist das quantitative Screening kombinatorischer scFv Libraries mit mehr als ca. 10^6 unabhängigen Klonen in einem Yeast Two-Hybrid System nicht praktikabel. Daher wurde zunächst die mit 8×10^5 unabhängigen Klonen kleinere der beiden Libraries direkt in Hefezellen auf ihren Gehalt an EGFR-spezifischen Bindern untersucht. Trotz mehrerer durchgeführter Yeast Two-Hybrid Screens gelang es jedoch nicht, aus dieser Library intrazellulär aktive anti-EGFR scFv Fragmente zu isolieren. Durch eine andere Arbeitsgruppe konnte mit Hilfe eines Modellsystems gezeigt werden, dass ein definiertes antigenspezifisches Antikörperfragment zumindest bis zu einem stöchiometrischen Verhältnis von 1 zu 5×10^5 aus einem Gemisch mit irrelevanten scFvs isoliert werden kann (Visintin *et al.*, 1999). Es ist daher anzunehmen, dass in der oben genannten anti-EGFR Hefelibrary keine funktionelle EGFR-spezifische Intrabodies enthalten sind. Vermutlich war die Diversität der verwendeten Hefelibrary mit 8×10^5 zu gering, um die offensichtlich nur mit sehr geringer Frequenz auftretenden intrazellulär aktiven scFv Fragmente zu isolieren.

Im Gegensatz hierzu wies die zweite zur Verfügung stehende anti-EGFR scFv-Immunity mit 1.2×10^8 unabhängigen Klonen eine Diversität auf, die ein direktes Screening der Library in Hefezellen mit vertretbarem Aufwand nicht zuließ. Um dennoch intrazellulär aktive EGFR-spezifische scFv Antikörperfragmente aus dieser Library zu isolieren, wurde daher eine klassische Selektion von EGFR-bindenden scFvs durch Phagen Biopanning mit anschließendem Screening in einem Yeast Two-Hybrid System kombiniert. Die zugrunde liegende Hypothese war, dass in den ersten Runden des Biopannings zunächst scFv Phagen eliminiert werden, die nicht an EGFR binden, wodurch die Diversität der scFv Library auf ein Maß reduziert werden kann, das ein Screening in Hefezellen erlaubt. Dabei sollten durch Reduzierung des Biopanning auf nur wenige Selektionsschritte diejenigen scFvs, die sich aufgrund ihrer hohen Stabilität am meisten für die intrazelluläre Expression eignen, aber nur eine mäßige Affinität für EGFR aufweisen, in der Library enthalten bleiben. Erst in späteren Biopanning Runden dürften hochaffine, aber möglicherweise instabilere scFv Antikörper diese verdrängen.

In dieser Arbeit wurde eine scFv Library, die von R. Beerli durch drei Runden Phagen Biopanning gegen immobilisierte intrazelluläre Domäne des EGFR präselektioniert war, in Hefezellen auf ihren Gehalt an intrazellulär aktiven EGFR-spezifischen Bindern untersucht. Durch die Präselektion mittels Biopanning konnte die Diversität der scFv Library von 2×10^8 auf einen Wert kleiner 8.4×10^5 (Output Phagen Biopanning Runde 2) reduziert werden. Zur anschließenden Selektion unter intrazellulären Bedingungen wurden die scFv Genfragmente der präselektionierten Library in den „prey“ Hefektor pGADT7 überführt, der die Expression der scFv Fragmente als Fusionsproteine mit N-terminaler GAL4 Aktivierungsdomäne erlaubt. Ferner wurde mit pGBKT7-EGFR ein „bait“ Hefektor konstruiert, der die Expression der kompletten intrazellulären Domäne des

EGFR als Fusionsprotein mit der GAL4 DNA Bindungsdomäne ermöglicht. Das Screening von ca. 1.5×10^5 pGADT7-scFv Plasmiden resultierte in 223 Hefekolonien, die unter stringentesten Selektionsbedingungen wuchsen und mindestens fünf verschiedene unabhängige scFv Klone repräsentierten.

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der isolierten anti-EGFR scFv Antikörper wiesen sowohl in den Gerüstregionen als auch in den komplementaritätsbestimmenden Regionen („complementarity determining regions“, CDRs) starke Homologien auf. Kürzlich wurde beschrieben, dass funktionelle BCR-ABL spezifische Intrabodies, die aus einer Library durch einen Screen in Hefezellen isoliert wurden, ebenfalls nur eine begrenzte Anzahl verschiedener Gerüstregionen trugen. Der Grund dafür könnte in ihrem Beitrag zur verbesserten intrazellulären Stabilität und Löslichkeit liegen (Tse *et al.*, 2002). Doch während in diesem Fall ein hohes Maß an Diversität in den CDR3 Regionen beobachtet wurde, die für die Antigenspezifität am entscheidendsten sind (Xu & Davis, 2000), waren in dieser Arbeit die CDR3 Regionen der unabhängig voneinander isolierten scFv Klone entweder identisch oder unterschieden sich nur in wenigen Aminosäureresten. Möglicherweise sind die meisten der isolierten scFv Fragmente daher gegen das selbe EGFR Epitop gerichtet. Der Grund hierfür könnte in einem immundominanten Epitop liegen, das während des Biopannings der Phage Display Library zur bevorzugten Anreicherung spezifischer scFv Fragmente führte, die an dieses Epitop binden. Denkbar wäre jedoch auch, dass die isolierten Antikörperfragmente eine Sequenz erkennen, die in der in Hefezellen exprimierten zytoplasmatischen Domäne des EGFR besonders gut zugänglich ist.

Die scFv Plasmid Library, die für die Selektion in Hefezellen verwendet wurde, bestand aus einem Gemisch von Antikörperfragmenten, die entweder eine sieben oder eine 18 Aminosäuren lange Linkersequenz enthielten. Die Linkersequenz verknüpft die variablen Domänen der leichten Kette mit denen der schweren Kette. Vor der Selektion in der Hefe trug die Mehrheit der scFvs den langen Linker. Nach der Selektion enthielten 21 der 24 individuell untersuchten anti-EGFR Intrabodies einen kurzen Linker, was auf eine Anreicherung dieser Klone während des Yeast Two-Hybrid Screenings hinweist. Kurze Linkersequenzen verhindern jedoch meist die Bildung monovalenter scFv Fragmente durch intramolekulare Verbindung von V_H und V_L . Stattdessen wird die nichtkovalente Interaktion von V_H und V_L zweier benachbarter scFv Moleküle bevorzugt, was zu einem bivalenten Antikörperfragment führt, das Diabody genannt wird (Holliger *et al.*, 1993). Bivalente Intrabodies binden während des Screenings in Hefezellen aufgrund einer höheren Avidität bei gleicher Affinität möglicherweise stärker an das Zielantigen und könnten daher einen Selektionsvorteil gegenüber monovalenten Molekülen gehabt haben. Da der Wildtyp GAL4 Transkriptionsfaktor als Dimer an die DNA bindet (Marmorstein *et al.*, 1992), könnten Diabodies wegen ihrer Bivalenz jedoch auch die Dimerisierung der GAL4 DNA BD erleichtern, so dass das Diabody Format lediglich aufgrund des Funktionsmechanismus von GAL4 einen Selektionsvorteil in Hefezellen hätte. Möglicherweise ist die präferentielle Anreicherung von scFv Antikörperfragmenten mit kurzem Linkerpeptid aber auch ein Hinweis auf eine generell höhere intrazelluläre Stabilität von Diabodies im Vergleich zu monomeren scFv Antikörpern.

Die relative Stabilität von monovalenten scFvs und bivalenten Diabodies wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So waren die Unterschiede bezüglich der thermodynamischen Stabilität zwischen monomerer und dimerer Form eines anti-Digoxin scFv in Anwesenheit des Antigens klein. In Abwesenheit des Antigens zeigte sich jedoch, dass das monomere scFv Fragment deutlich stabiler war als der dimere Diabody (Worn & Plückthun, 2001). Anderen Veröffentlichung zufolge besitzen Diabodies hingegen eine geringere Dissoziationsrate und eine höhere Stabilität (Chames & Baty, 2000; Le Gall *et al.*, 1999).

Die Interaktion der isolierten Antikörperfragmente mit der intrazellulären Domäne des EGFR wurde *in vitro* durch GST „pull-down“ Experimente bestätigt. Außer scFv 30, der nur schwach an EGFR band, zeigten alle der im Hefescreen isolierten scFv Antikörper eine deutliche Interaktion mit EGFR. Einer der isolierten scFv Antikörper, scFv 2, wurde auch auf Bindung an die zytoplasmatische Domäne des nahe verwandten ErbB2 Moleküls untersucht. Es konnte keine Kreuzreaktivität detektiert werden. Dies dürfte aufgrund der hohen CDR Sequenzhomologie und der wahrscheinlichen Übereinstimmung des erkannten Epitops auch für die anderen vier scFv Antikörperfragmente gelten. Ferner wurde die Bindung von scFv 2 an verschiedene verkürzte Fragmente der intrazellulären Domäne des humanen EGFR in einem GST „pull-down“ Experiment untersucht. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen band scFv 2 jedoch an keines der Fragmente, so dass die Bindungsstelle des scFv Fragments an EGFR noch nicht weiter eingegrenzt werden konnte.

Durch Koimmunopräzipitationsexperimente konnte die intrazelluläre Aktivität der isolierten scFv Antikörper in Säugerzellen experimentell belegt werden. ScFv 30, der in GST „pull-down“ Experimenten nur schwache Interaktion zeigte, band *in vivo* eindeutig an EGFR. Hingegen konnte scFv 22 nicht im Kopräzipitat mit dem Rezeptor nachgewiesen werden. Wie sich jedoch bei der Untersuchung der relativen scFv Proteinmengen in den Zelllysaten der transient transfizierten COS-7 Zellen (scFv 30 > scFv 8 > scFv 2, 29 > scFv 22) zeigte, war scFv 22 kaum nachweisbar, weshalb eine endgültige Aussage über die mögliche *in vivo* Aktivität von scFv 22 in COS-7 Zellen nicht getroffen werden kann.

Zwei der scFv Antikörper, scFv 2 und scFv 30, wurden auch in Kollokalisationsstudien in humanen A431 Tumorzellen getestet. Die EGFR-spezifischen Antikörperfragmente wurden nach zytoplasmatischer Expression zusammen mit dem EGFR an der Plasmamembran der Zellen gefunden, während ein scFv Fragment, das nicht spezifisch an EGFR bindet und als Negativkontrolle verwendet wurde, diffus über das gesamte Zytosol und den Zellkern verteilt war.

Im Falle von p21Ras oder PLC- als Zielantigene inhibierten zytoplasmatische Intrabodies die Aktivität ihrer Zielantigene durch Immobilisierung der Proteine in Antikörperaggregaten. Dies führte zu einer anderen subzellulären Verteilung und zum gesteigerten proteasomalen Abbau der Antikörper-Antigenkomplexe (Cardinale *et al.*, 2001; Lener *et al.*, 2000; Yi *et al.*, 2001). Die p21Ras-spezifischen Intrabodies waren dabei wirksam, ohne dass dazu eine direkte Wechselwirkung mit der intrinsischen GTPase Aktivität notwendig gewesen wäre (Lener *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte

durch Konfokale Laserscanning Mikroskopie gezeigt werden, dass EGFR auch in Anwesenheit zytoplasmatischer scFvs an der Plasmamembran lokalisiert war. Die Intrabodies bildeten keine Aggregate, sondern kolokalisierten mit EGFR Antigen, was eine scFv abhängige Umverteilung des EGFR unwahrscheinlich macht. Jedoch könnte eine Modifizierung der scFv Sequenzen durch Einführung intrazellulärer Routing- oder Ubiquitinierungssignale eine Herunterregulation der EGFR Signalleitung bewirken, indem der Rezeptor in alternative Zellkompartimente redirigiert oder dem proteasomalen Abbau zugeführt wird (Cattaneo & Biocca, 1999; Kile *et al.*, 2002; Parisien *et al.*, 2001; Persic *et al.*, 1997).

In COS-7 Zellen wurde untersucht, ob die Expression zytoplasmatischer EGFR-spezifischer scFv die Aktivierung des EGFR durch seinen natürlichen Liganden EGF beeinflusst. Für den anti-EGFR scFv(225), der die Ligandenbindung an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors blockiert, wurde gezeigt, dass die autokrine Produktion des scFv Fragments die EGF-abhängige Aktivierung und das Wachstum transformierter Zellen inhibiert (Beerli *et al.*, 1994a; Beerli *et al.*, 1996). Im Gegensatz hierzu konnten in EGFR-exprimierenden COS-7 Zellen, die transient mit Konstrukten transformiert wurden, welche die Gene für die zytoplasmatischen Intrabodies enthielten, keine offenkundigen Effekte auf die Rezeptorphosphorylierung in An- oder Abwesenheit von EGF nachgewiesen werden. Dies lässt darauf schließen, dass Sequenzen, die für die EGFR Kinaseaktivität notwendig sind, wie beispielsweise die ATP Bindungsstelle (Russo *et al.*, 1985), durch die isolierten scFv Antikörper nicht direkt blockiert werden.

Um zu prüfen, ob durch Bindung der scFv Fragmente an die intrazelluläre Domäne des EGFR die Autophosphorylierung einzelner Tyrosinreste durch sterische Hinderung inhibiert wird, wurde der Einfluss der scFv Expression auf EGF-induzierte Rezeptor-phosphorylierung unter Verwendung von Antikörpern analysiert, die spezifisch an definierte Phosphotyrosinreste des EGFR binden. Mittels eines spezifischen Antikörpers gegen den phosphorylierten Tyrosinrest 845 in der Aktivierungsschleife des EGFR konnte gezeigt werden, dass die zytoplasmatische Expression der EGFR-spezifischen scFv Fragmente scFv 2 und scFv 30 keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Tyr845 hat. Es wurde publiziert, dass Src bei der Phosphorylierung des EGFR an Tyr845 involviert ist, wodurch die Rezeptorfunktion moduliert wird (Biscardi *et al.*, 1999). In Zellen, die mit scFv 2, nicht aber in Zellen, die mit scFv 30 und Kontroll-scFv(9E10) transfiziert worden waren, wurde mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers gegen phosphoryliertes Tyr992 ein leicht verringertes Signal detektiert. Angesichts der ebenfalls beobachteten erniedrigten EGFR Gesamtmenge in der entsprechenden Spur des SDS Gels dürfte der Grund für das leicht verringerte Signal jedoch eher in einer geringeren Beladung liegen. Im humanen EGFR dient der phosphorylierte Tyrosinrest 992 als direkte Bindungsstelle für Phospholipase C, die durch EGFR phosphoryliert und dadurch aktiviert wird. Aktivierte Phospholipase C katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat in die sekundären Botenstoffe Inositol 1,4,5-trisphosphat und Diacylglycerol. Der phosphorylierte Tyrosinrest 1045 stellt die Bindungsstelle für Cbl dar. Die Bindung von Cbl an den aktivierten EGFR führt zur Rekrutierung der Ubiquitinierungsmaschinerie am Rezeptor und ermöglicht Rezeptorubiquitinierung, -degradation und möglicherweise auch

Rezeptorinternalisierung (Levkowitz *et al.*, 1999; Soubeyran *et al.*, 2002). Phosphorylierung von Tyr1068 stellt hingegen eine direkte Bindungsstelle für die beiden Adapterproteine und Gab1 dar, die zur Aktivierung des MAPK Signalwegs bzw. des PI3K Signalwegs beitragen (Rodrigues *et al.*, 2000; Rojas *et al.*, 1996). Die EGF-induzierte Phosphorylierung der Tyrosinreste 1045 und 1068 wurde durch die intrazelluläre Expression der scFv Antikörper ebenfalls nicht beeinflusst.

Insgesamt konnten keine eindeutigen Effekte auf die Phosphorylierung einzelner Rezeptortyrosinreste nachgewiesen werden. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass Effekte auf die Phosphorylierung anderer Rezeptortyrosinreste und/oder schwache Effekte auf die Interaktion des Rezeptors mit einzelnen Substraten oder Adapterproteinen bestehen.

Bei Untersuchungen mit NE-1 Mausfibroblasten, die stabil mit scFv Expressionsvektoren transfiziert und als Einzelklone herangezogen worden waren, konnte kein signifikanter Einfluss der Expression EGFR-spezifischer scFv Antikörper auf die Proliferation nachgewiesen werden. Zwar wurde beobachtet, dass NE-1 Kontrollzellen sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von EGF etwas stärker als die mit scFv Genfragmenten transfizierten Einzelklone proliferierten, doch war dies auch für einen mit dem scFv(9E10) Kontrollkonstrukt transfizierten Einzelklon zu beobachten. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt auf die Selektion der Einzelklone mit Zeocin zurückzuführen ist. Ein weiterer Grund für die beobachtete geringfügig schwächere Proliferation der mit scFv Genfragmenten transfizierten Einzelklone könnte in einer leichten generellen Toxizität zytoplasmatischer scFv Fragmente liegen. Die Beobachtung, dass die Einzelklone zu Beginn der Selektion, als die scFv Proteinmengen vermutlich noch höher waren, über mehrere Wochen hinweg äußerst langsam proliferierten, unterstützt diese Hypothese. Überdies zeigten alle scFv exprimierenden Einzelklone nur sehr geringe scFv Expressionsniveaus, und abgesehen von Einzelklon scFv 30 #A2 ging die scFv Expression in allen herangezogenen Einzelklonen trotz Selektion mit Zeocin nach mehreren Passagen wieder verloren. Offensichtlich hatten Zellen mit geringer scFv Proteinmenge einen Wachstumsvorteil, so dass die Selektion von Einzelklonen mit einer Selektion gegen die Expression intrazellulärer Antikörperfragmente einherging.

Ein zumindest ausgeglichenes stöchiometrisches Verhältnis zwischen scFv und EGFR Molekülen ist jedoch vermutlich die Voraussetzung für einen biologischen Effekt EGFR-spezifischer scFv Antikörperfragmente auf die Signalleitung des EGFR.

Möglicherweise könnte die Expression von scFv Antikörpern durch Verwendung eines induzierbaren Expressionssystems wie z.B. des Tet-On-Systems (Gossen *et al.*, 1995) gesteigert werden. Mittels dieses Systems wäre es möglich, die scFv Expression erst nach der Selektion stabil transfizierter Einzelklone durch Zugabe von Tetracyclin bzw. des stabileren Tetracyclin-Derivates Doxycyclin zu induzieren, so dass ein Selektionsdruck gegen hohe scFv Proteinmengen sich nicht auswirken könnte. Dieses System hätte ferner den Vorteil, dass der gleiche stabile Klon in An- und Abwesenheit des transfizierten Proteins untersucht werden könnte, so dass klonale Effekte ausgeschlossen sind. Da nach transients Transfektion jedoch ein eindeutiger Effekt auf die enzymatische Aktivität und

die EGF-induzierte Rezeptorphosphorylierung nicht nachweisbar war, erschien der hohe Zeitaufwand, der mit der Etablierung eines stabil transfizierten induzierbaren Expressionssystems verbunden ist, nicht gerechtfertigt.

Eine Reihe verschiedener Strategien ist entwickelt worden, um reproduzierbar intrinsisch stabile Antikörperfragmente zu erzeugen oder zu identifizieren (Worn & Plückthun, 2001). Durch Mutagenese von scFv Antikörperfragmenten und *in vitro* Selektion unter reduzierenden Bedingungen konnten scFv Antikörper isoliert werden, die auch in Abwesenheit von Disulfidbrücken korrekt gefaltet sind (Jermutus *et al.*, 2001), was eine Voraussetzung für funktionelle zytoplasmatische Intrabodies ist (Biocca *et al.*, 1995; Cattaneo & Biocca, 1999). Übertragen der CDRs eines Antikörpers auf das stabilisierte Proteingerüst (Ohage *et al.*, 1999) und Fusion von scFvs an ein anderes Protein, das als Chaperon dient (Bach *et al.*, 2001), führte zur Expression von antigenbindenden Intrabodies in *E. coli*. Diese Strategien könnten auch auf die Expression von scFvs in eukaryontischen Zellen angewendet werden.

Die Expression von scFvs in Hefe ist eine attraktive Alternative zu den oben genannten Ansätzen, da etablierte Methoden zur Verfügung stehen, die das Screening diverser Libraries ermöglichen. Überdies weist die Funktionalität von Antikörperfragmenten im Zytoplasma und im Zellkern niederer eukaryontischer Zellen offenbar auf ihr Verhalten bei Expression im intrazellulären Milieu von Säugerzellen hin (De Jaeger *et al.*, 2000; Tse *et al.*, 2002; Visintin *et al.*, 1999; Worn *et al.*, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Phage Display Methode mit nachfolgender Selektion in einem Yeast Two-Hybrid System ein geeignetes System zur Identifikation EGFR-spezifischer scFv Antikörper darstellt, die nach zytoplasmatischer Expression in Tumorzellen funktionell sind. Die Verwendung der Phage Display Methode ermöglicht dabei die Vorselektion hochdiverser Libraries, die dadurch auf eine Diversität reduziert werden, die ein Screening in Hefezellen unter reduzierenden Bedingungen zulässt.

Eine vergleichbare Strategie zur Isolierung intrazellulär aktiver scFv Antikörperfragmente wurde kürzlich veröffentlicht (Tse *et al.*, 2002). Die Autoren verwendeten jedoch eine mit 6.7×10^9 unabhängigen Klonen über 50mal komplexere, naive scFv Library (Sheets *et al.*, 1998), die durch eine einzige Phagen Biopanning Runde präselektioniert und anschließend durch Yeast Two-Hybrid Screening selektioniert wurde.

Mit Hilfe dieser Strategie konnten für zwei verschiedene Antigene, BCR und ABL, sechs bzw. 12 antigenspezifische intrazellulär aktive scFv Klone identifiziert werden. Wie bereits weiter oben dargestellt, wiesen die CDRs der isolierten BCR- bzw. ABL-spezifischen scFv Antikörper im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit isolierten scFvs deutliche Sequenzunterschiede auf, insbesondere in den Sequenzen der V_H CDR3. Die größere Variabilität der CDR Sequenzen ist wahrscheinlich auf die höhere Diversität der verwendeten Library zurückzuführen. Ferner wurde die Library durch lediglich eine Runde Phagen Biopanning präselektioniert, während die in der vorliegenden Arbeit verwendete, mit 1.2×10^8 unabhängigen Klonen deutlich kleinere anti-EGFR Immunlibrary durch drei Biopanning Runden präselektioniert wurde. Dies könnte bereits zu einer so starken

Verminderung der Librarydiversität geführt haben, dass weitere EGFR-spezifische Binder mit hoher intrazellulärer Stabilität, jedoch schlechterer Affinität verloren gegangen sein könnten.

Immunlibraries weisen normalerweise einen höheren Anteil antigenspezifischer Antikörper auf als naive Nicht-Immunlibraries, da die Immunisierung von Versuchstieren mit einem Antigen zu einer Anreicherung antigenspezifischer B-Zellklone führt, deren mRNA das Ausgangsmaterial für die Konstruktion einer Immunlibrary darstellt. Die Verwendung naiver Libraries mit hoher Diversität stellt besonders dann eine sinnvolle Alternative dar, wenn für ein bestimmtes Antigen keine geeignete Immunlibrary verfügbar ist oder wenn ein immundominantes Epitop im Antigen enthalten ist, so dass bei Verwendung einer Immunlibrary bevorzugt Antikörperfragmente isoliert werden, die an das immundominante Epitop binden. Binder aus naiven Nicht-Immunlibraries erkennen dagegen möglicherweise ein breiteres Spektrum an Antigenepitopen (Sheets *et al.*, 1998).

Verschiedene naive Nicht-Immunlibraries sind in der Literatur beschrieben, aber nicht alle dürften als Ausgangspunkt für die Isolierung intrazellulär aktiver scFv Antikörperfragmente geeignet sein. Beispielsweise basieren semisynthetische Libraries (de Kruif *et al.*, 1995; Nissim *et al.*, 1994) auf Genen einiger weniger variabler Domänen, in denen natürliche CDR Sequenzen wie die V_H CDR3 gegen randomisierte synthetische Oligonukleotide ausgetauscht wurden. Für die intrazelluläre Stabilität von scFv Fragmenten ist ein außergewöhnlich stabiles Proteingerüst („framework“) unerlässlich (Worn & Plückthun, 2001). In natürlich vorkommenden Antikörpern sind diese besonders stabilen „frameworks“ offenbar jedoch selten, und mit der Verwendung weniger verschiedener Proteingerüste sinkt die Wahrscheinlichkeit, aus diesen semisynthetischen Libraries intrazellulär funktionelle scFv Antikörper zu isolieren.

Zweckdienlicher dürften hoch diverse kombinatorische scFv Nicht-Immunlibraries sein, die aus V_L und V_H-Genen bestehen, welche *in vivo* rearrangiert und *in vitro* zu scFv Fragmenten verknüpft wurden. Beispielsweise stellen die Vaughan-Library (Vaughan *et al.*, 1996) und die Sheets-Library (Sheets *et al.*, 1998) mit 1.4×10^{10} bzw. 6.7×10^9 unabhängigen Klonen hochdiverse Libraries dar, aus denen mittels *in vitro* Screening Verfahren bereits scFv Antikörper isoliert wurden, die mit subnanomolarer Affinität an ihr Antigen binden. Die Sheets-Library diente als Ausgangspunkt für die oben bereits dargestellte *in vivo* Selektion intrazellulär aktiver scFv Fragmente (Tse *et al.*, 2002).

Instabilität des Proteins unter intrazellulären Bedingungen stellt das Haupthindernis für eine effiziente Nutzung von scFv Antikörperfragmenten zur Inhibition oder Modulation von Proteinfunktionen in eukaryontischen Zellen dar. Bisher gibt es keine zuverlässigen Regeln zur Vorhersage von scFv Antikörperstrukturen, die das reduzierende Milieu des Zytoplasmas tolerieren, und die individuelle biochemische Analyse und Verbesserung der Proteinstabilität von scFv Fragmenten ist äußerst aufwendig. In der vorliegenden Arbeit und in mehreren Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen konnten durch Screening in Hefezellen scFv Antikörperfragmente identifiziert werden, die sich durch eine überdurchschnittliche intrazelluläre Stabilität auszeichnen (Auf der Maur *et al.*, 2001;

Hyland *et al.*, 2003; Tanaka & Rabbitts, 2003; Tse *et al.*, 2002; Visintin *et al.*, 2002). Für zwei dieser Antikörperfragmente wurde gezeigt, dass auf der Basis der Gerüstregionen dieser Antikörperfragmente scFv Antikörperlibraries *de novo* konstruiert werden können (Auf der Maur *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2003).

So wurde durch Austausch der V_H CDR3 eines durch „protein engineering“ optimierten GCN4-spezifischen scFv Antikörpers (Auf der Maur *et al.*, 2001; Worn *et al.*, 2000) gegen randomisierte Oligonukleotide eine synthetische scFv Library konstruiert, aus der anschließend durch Yeast Two-Hybrid Screening ein Jun-spezifisches Antikörperfragment isoliert wurde (Auf der Maur *et al.*, 2002).

In einer weiteren Veröffentlichung wurden sogar alle drei V_H CDRs eines durch Yeast Two-Hybrid Screening isolierten anti-ABL scFv Antikörpers (Tse *et al.*, 2002) randomisiert. Anschließend konnten durch Yeast Two-Hybrid Screening der so konstruierten synthetischen scFv Library vier unterschiedliche BCR-ABL-spezifische scFv Antikörperfragmente isoliert werden (Tanaka *et al.*, 2003).

Aufgrund seiner intrazellulären Aktivität und der nach transienter Expression relativ zu den anderen isolierten scFv Fragmenten deutlich höheren scFv Proteinmenge könnte auch das Proteingerüst des EGFR-spezifischen scFv 30 Antikörpers (diese Arbeit) zur Konstruktion einer synthetischen scFv Library geeignet sein.

Daten zur Affinität intrazellulärer scFv, die aus solchen semisynthetischen Libraries isoliert wurden, liegen nicht vor. Generell wurde jedoch beschrieben, dass scFv Fragmente aus semisynthetischen Libraries (de Kruif *et al.*, 1995) in denen die ursprünglichen V_H CDR3 gegen randomisierte synthetische Oligonukleotide ausgetauscht sind, mit 0.1 – 2.5 μ M nur relativ geringe Affinitäten aufweisen (Sheets *et al.*, 1998). Möglicherweise stellt die hohe Frequenz niedrig affiner scFv Antikörper eine prinzipielle Eigenschaft semisynthetischer scFv Libraries dar, da bei der Generierung der Libraries intramolekulare Wechselwirkungen zwischen CDRs und Proteingerüst unberücksichtigt bleiben. Die Übertragung individueller CDRs auf ein definiertes stabileres Proteingerüst hat gezeigt, dass Proteingerüst und die zu übertragenden CDRs häufig aneinander angepasst werden müssen, um sterische Widersprüche im Hybrid-scFv zu vermeiden, welche die Stabilität des Proteingerüsts und die Konformation der CDRs beeinflussen (Worn & Plückthun, 2001). Da bei der Konstruktion einer synthetischen Library individuelle Anpassungen nicht vorgenommen werden können, könnte die Zahl hochaffiner scFv Fragmente innerhalb der Library trotz einer hohen Librarydiversität also gering sein. Inwieweit dies die mögliche biologische Aktivität von Intrabodies aus semisynthetischen Libraries im Vergleich zu nicht modifizierten Libraries beeinflusst, bleibt zu klären.

Durch das in dieser Arbeit etablierte Screening System konnten fünf EGFR-spezifische scFv Antikörper identifiziert werden, die im Zytosol von Säugerzellen aktiv sind und an die zytoplasmatische Domäne des EGFR binden. Ein direkter Effekt dieser Intrabodies auf die Signalleitung des EGFR konnte nicht nachgewiesen werden. Jedoch könnten die guten intrazellulären Antigenbindungseigenschaften der Antikörperfragmente durch Fusion an

Effektormoleküle nutzbar gemacht werden, die beispielsweise die Internalisierung oder den Abbau des EGFR beschleunigen. Als „RING finger“ E3 Ubiquitin Protein Ligase spielt Cbl eine zentrale Rolle in der Ligand-induzierten Polyubiquitinierung des EGFR, die für den lysosomalen Abbau des Rezeptors essentiell ist (Thien & Langdon, 2001). Ferner wurde Cbl kürzlich eine wichtige Funktion bei der Regulation der Rezeptorendozytose zugeschrieben (Soubeyran *et al.*, 2002). Cbl bindet unter physiologischen Bedingungen über die N-terminale SH2 Domäne an den phosphorylierten Tyrosinrest 1045 des EGFR. Ein Austausch der SH2 Domäne von Cbl durch eines der EGFR-spezifischen scFv Moleküle könnte Cbl erlauben, auch an den unphosphorylierten Rezeptor zu binden. Expression eines solchen scFv-Cbl Derivats in EGFR-überexprimierenden Tumorzellen würde möglicherweise den Abbau von EGFR unabhängig von seinem Aktivierungszustand vermitteln und damit das transformierende Potential des Rezeptors verringern. Mit entsprechenden Arbeiten wurde in unserer Arbeitsgruppe begonnen.

Daneben könnte durch Fusion von EGFR-spezifischen intrazellulär aktiven scFv Antikörpern mit Adaptermolekülen, die im natürlichen Kontext nicht mit EGFR wechselwirken, das Spektrum der Signalleitung des EGFR erweitert werden. Damit ließen sich diese Moleküle möglicherweise als neuwertige Werkzeuge für die Untersuchung von Signalleitungsvorgängen einsetzen.

Intrabodies stellen prinzipiell ein attraktives Hilfsmittel zur Charakterisierung der Funktion bekannter, aber auch neu identifizierter Genprodukte dar. Sie können spezifisch gegen einzelne Proteindomänen gerichtet sein und gezielt in verschiedenen Zellkompartimenten exprimiert werden. Die hohe Selektivität intrazellulärer Antikörperfragmente könnte die Modulation der Funktion einer einzelnen Domäne des Zielantigens erlauben (Aramburu *et al.*, 1999), ohne dabei andere Aktivitäten des Proteins zu stören. Somit würde die Wirkung eines potentiellen Wirkstoffes besser nachgeahmt, als dies durch eine komplette Eliminierung des Proteins z.B. durch Verhinderung der Expression mittels RNAi (Fire *et al.*, 1998) möglich wäre. Die Intrabody Technologie stellt daher eine sinnvolle Ergänzung anderer für „functional genomics“ genutzter Strategien dar, wie z.B. Gen „knockout“ (Harris & Foord, 2000), „antisense“ (Giles, 2000) und RNAi (Barstead, 2001).

Bislang war eine breite Anwendung intrazellulärer Antikörperfragmente aufgrund der zumeist beobachteten Instabilität im reduzierenden Milieu des Zytosols nicht möglich.

Neue und optimierte Selektionssysteme für die schnelle Identifizierung besonders stabiler intrazellulär aktiver Antikörperfragmente, wie das im Rahmen dieser Arbeit etablierte Screening System, könnten jedoch eine breitere Nutzung von Intrabodies zur gezielten Interferenz mit zytoplasmatischen Zielstrukturen erlauben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Kombination von Phagen Biopanning und nachfolgendem Yeast Two-Hybrid Screening verlässlich zur Isolierung funktioneller Antikörperfragmente führt. Dies wird auch durch aktuelle Arbeiten anderer Arbeitsgruppen für unterschiedliche zytoplasmatische Zielantigene bestätigt (Tanaka & Rabbitts, 2003; Tse *et al.*, 2002; Visintin *et al.*, 2002). Damit sollte es nun möglich sein, funktionelle, intrazellulär stabile Antikörperfragmente auch gegen eine Vielzahl weiterer intrazellulärer Antigene zu generieren.

5. Literaturverzeichnis

Altenschmidt, U., Kahl, R., Moritz, D., Schnierle, B. S., Gerstmayer, B., Wels, W., and Groner, B. (1996). Cytolysis of tumor cells expressing the Neu/erbB-2, erbB-3, and erbB-4 receptors by genetically targeted naive T lymphocytes, *Clin Cancer Res* 2, 1001-1008.

Alvarez, R. D., Barnes, M. N., Gomez-Navarro, J., Wang, M., Strong, T. V., Arafat, W., Arani, R. B., Johnson, M. R., Roberts, B. L., Siegal, G. P., and Curiel, D. T. (2000). A cancer gene therapy approach utilizing an anti-erbB-2 single-chain antibody-encoding adenovirus (AD21): a phase I trial, *Clin Cancer Res* 6, 3081-7.

Aramburu, J., Yaffe, M. B., Lopez-Rodriguez, C., Cantley, L. C., Hogan, P. G., and Rao, A. (1999). Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A, *Science* 285, 2129-33.

Auf der Maur, A., Escher, D., and Barberis, A. (2001). Antigen-independent selection of stable intracellular single-chain antibodies, *FEBS Lett* 508, 407-12.

Auf der Maur, A., Zahnd, C., Fischer, F., Spinelli, S., Honegger, A., Cambillau, C., Escher, D., Plückthun, A., and Barberis, A. (2002). Direct in vivo screening of intrabody libraries constructed on a highly stable single-chain framework, *J Biol Chem* 277, 45075-85.

Ausubel, F. M. (1994). *Current protocols in molecular biology* (New York :, John Wiley & Sons).

Azemar, M., Schmidt, M., Arlt, F., Kennel, P., Brandt, B., Papadimitriou, A., Groner, B., and Wels, W. (2000). Recombinant antibody toxins specific for ErbB2 and EGF receptor inhibit the in vitro growth of human head and neck cancer cells and cause rapid tumor regression in vivo, *Int J Cancer* 86, 269-275.

Bach, H., Mazor, Y., Shaky, S., Shoham-Lev, A., Berdichevsky, Y., Gutnick, D. L., and Benhar, I. (2001). Escherichia coli maltose-binding protein as a molecular chaperone for recombinant intracellular cytoplasmic single-chain antibodies, *J Mol Biol* 312, 79-93.

Bachmann, B. J. (1990). Linkage map of Escherichia coli K-12, edition 8, *Microbiol Rev* 54, 130-97.

Barbas, C. F. (2001). *Phage display : a laboratory manual* (Cold Spring Harbor, NY :, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Barstead, R. (2001). Genome-wide RNAi, *Curr Opin Chem Biol* 5, 63-6.

Baulida, J., Kraus, M. H., Alimandi, M., Di Fiore, P. P., and Carpenter, G. (1996). All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired, *J Biol Chem* 271, 5251-7.

Beerli, R. R., Wels, W., and Hynes, N. E. (1994a). Autocrine inhibition of the epidermal growth factor receptor by intracellular expression of a single-chain antibody, *Biochem Biophys Res Commun* 204, 666-72.

Beerli, R. R., Wels, W., and Hynes, N. E. (1994b). Intracellular expression of single chain antibodies reverts ErbB-2 transformation, *J Biol Chem* 269, 23931-6.

Beerli, R. R., Wels, W., and Hynes, N. E. (1996). Inhibition of signaling from Type 1 receptor tyrosine kinases via intracellular expression of single-chain antibodies, *Breast Cancer Res Treat* 38, 11-7.

Benhar, I., Azriel, R., Nahary, L., Shaky, S., Berdichevsky, Y., Tamarkin, A., and Wels, W. (2000). Highly efficient selection of phage antibodies mediated by display of antigen as Lpp-OmpA' fusions on live bacteria, *J Mol Biol* 301, 893-904.

Better, M., Chang, C. P., Robinson, R. R., and Horwitz, A. H. (1988). Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment, *Science* 240, 1041-3.

Biocca, S., Pierandrei-Amaldi, P., Campioni, N., and Cattaneo, A. (1994). Intracellular immunization with cytosolic recombinant antibodies, *Biotechnology (N Y)* 12, 396-9.

Biocca, S., Ruberti, F., Tafani, M., Pierandrei-Amaldi, P., and Cattaneo, A. (1995). Redox state of single chain Fv fragments targeted to the endoplasmic reticulum, cytosol and mitochondria, *Biotechnology (N Y)* 13, 1110-5.

Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S. M., Lee, T., Pope, S. H., Riordan, G. S., and Whitlow, M. (1988). Single-chain antigen-binding proteins, *Science* 242, 423-6.

Biscardi, J. S., Maa, M. C., Tice, D. A., Cox, M. E., Leu, T. H., and Parsons, S. J. (1999). c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and Tyr1101 is associated with modulation of receptor function, *J Biol Chem* 274, 8335-43.

Blume-Jensen, P., and Hunter, T. (2001). Oncogenic kinase signalling, *Nature* 411, 355-65.

Britsch, S., Li, L., Kirchhoff, S., Theuring, F., Brinkmann, V., Birchmeier, C., and Riethmacher, D. (1998). The ErbB2 and ErbB3 receptors and their ligand, neuregulin-1, are essential for development of the sympathetic nervous system, *Genes Dev* 12, 1825-36.

Cardinale, A., Filesi, I., and Biocca, S. (2001). Aggresome formation by anti-Ras intracellular scFv fragments. The fate of the antigen-antibody complex, *Eur J Biochem* 268, 268-77.

Carpenter, G. (2000). The EGF receptor: a nexus for trafficking and signaling, *Bioessays* 22, 697-707.

- Carpenter, G., King, L., Jr., and Cohen, S. (1978). Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro, *Nature* 276, 409-10.
- Cattaneo, A., and Biocca, S. (1999). The selection of intracellular antibodies, *Trends Biotechnol* 17, 115-21.
- Chames, P., and Baty, D. (2000). Antibody engineering and its applications in tumor targeting and intracellular immunization, *FEMS Microbiol Lett* 189, 1-8.
- Chen, X., Levkowitz, G., Tzahar, E., Karunakaran, D., Lavi, S., Ben-Baruch, N., Leitner, O., Ratzkin, B. J., Bacus, S. S., and Yarden, Y. (1996). An immunological approach reveals biological differences between the two NDF/heregulin receptors, ErbB-3 and ErbB-4, *J Biol Chem* 271, 7620-9.
- Cho, H. S., and Leahy, D. J. (2002). Structure of the extracellular region of HER3 reveals an interdomain tether, *Science* 297, 1330-3.
- Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G., and Ravetch, J. V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets, *Nat Med* 6, 443-6.
- Dauvillier, S., Merida, P., Visintin, M., Cattaneo, A., Bonnerot, C., and Dariavach, P. (2002). Intracellular single-chain variable fragments directed to the Src homology 2 domains of Syk partially inhibit Fc epsilon RI signaling in the RBL-2H3 cell line, *J Immunol* 169, 2274-83.
- De Jaeger, G., Fiers, E., Eeckhout, D., and Depicker, A. (2000). Analysis of the interaction between single-chain variable fragments and their antigen in a reducing intracellular environment using the two-hybrid system, *FEBS Lett* 467, 316-20.
- de Kruijf, J., Boel, E., Logtenberg, T., Nissim, A., Hoogenboom, H. R., Tomlinson, I. M., Flynn, G., Midgley, C., Lane, D., and Winter, G. (1995). Selection and application of human single chain Fv antibody fragments from a semi-synthetic phage antibody display library with designed CDR3 regions, *J Mol Biol* 248, 97-105.
- Dove, A. (2002). Promising drug is victim of bad business, *Nat Med* 8, 199.
- Duan, L., Bagasra, O., Laughlin, M. A., Oakes, J. W., and Pomerantz, R. J. (1994). Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by an intracellular anti-Rev single-chain antibody, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5075-9.
- Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum, *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 181-91.

Erickson, S. L., O'Shea, K. S., Ghaboosi, N., Loverro, L., Frantz, G., Bauer, M., Lu, L. H., and Moore, M. W. (1997). ErbB3 is required for normal cerebellar and cardiac development: a comparison with ErbB2-and heregulin-deficient mice, *Development* *124*, 4999-5011.

Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G., and Bishop, J. M. (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product, *Mol Cell Biol* *5*, 3610-6.

Feilotter, H. E., Hannon, G. J., Ruddell, C. J., and Beach, D. (1994). Construction of an improved host strain for two hybrid screening, *Nucleic Acids Res* *22*, 1502-3.

Fiddes, R. J., Campbell, D. H., Janes, P. W., Sivertsen, S. P., Sasaki, H., Wallasch, C., and Daly, R. J. (1998). Analysis of Grb7 recruitment by heregulin-activated erbB receptors reveals a novel target selectivity for erbB3, *J Biol Chem* *273*, 7717-24.

Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions, *Nature* *340*, 245-6.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* *391*, 806-11.

Frisch, C., Kolmar, H., Schmidt, A., Kleemann, G., Reinhardt, A., Pohl, E., Uson, I., Schneider, T. R., and Fritz, H. J. (1996). Contribution of the intramolecular disulfide bridge to the folding stability of REIv, the variable domain of a human immunoglobulin kappa light chain, *Fold Des* *1*, 431-40.

Fromant, M., Blanquet, S., and Plateau, P. (1995). Direct random mutagenesis of gene-sized DNA fragments using polymerase chain reaction, *Anal Biochem* *224*, 347-53.

Fry, D. W. (2000). Site-directed irreversible inhibitors of the erbB family of receptor tyrosine kinases as novel chemotherapeutic agents for cancer, *Anticancer Drug Des* *15*, 3-16.

Fujiwara, K., Poikonen, K., Aleman, L., Valtavaara, M., Saksela, K., and Mayer, B. J. (2002). A single-chain antibody/epitope system for functional analysis of protein-protein interactions, *Biochemistry* *41*, 12729-38.

Garrett, T., McKern, N., Lou, M., Elleman, T., Adams, T., Lovrecz, G., Zhu, H., Walker, F., Frenkel, M., Hoyne, P., *et al.* (2002). Crystal Structure of a Truncated Epidermal Growth Factor Receptor Extracellular Domain Bound to Transforming Growth Factor alpha, *Cell* *110*, 763.

Gassmann, M., Casagrande, F., Orioli, D., Simon, H., Lai, C., Klein, R., and Lemke, G. (1995). Aberrant neural and cardiac development in mice lacking the ErbB4 neuregulin receptor, *Nature* *378*, 390-4.

Gerstmayer, B., Altenschmidt, U., Hoffmann, M., and Wels, W. (1997). Costimulation of T cell proliferation by a chimeric B7-2 antibody fusion protein specifically targeted to cells expressing the erbB2 proto-oncogene, *J Immunol* 158, 4584-4590.

Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., and Parks, W. P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors, *J Natl Cancer Inst* 51, 1417-23.

Gilbertson, R. J., Perry, R. H., Kelly, P. J., Pearson, A. D., and Lunec, J. (1997). Prognostic significance of HER2 and HER4 coexpression in childhood medulloblastoma, *Cancer Res* 57, 3272-80.

Giles, R. V. (2000). Antisense oligonucleotide technology: from EST to therapeutics, *Curr Opin Mol Ther* 2, 238-52.

Gluzman, Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants, *Cell* 23, 175-82.

Goel, S., Mani, S., and Perez-Soler, R. (2002). Tyrosine kinase inhibitors: a clinical perspective, *Curr Oncol Rep* 4, 9-19.

Gorgoulis, V., Aninos, D., Mikou, P., Kanavaros, P., Karameris, A., Joardanoglou, J., Rasidakis, A., Veslemes, M., Ozanne, B., and Spandidos, D. A. (1992). Expression of EGF, TGF-alpha and EGFR in squamous cell lung carcinomas, *Anticancer Res* 12, 1183-7.

Gorre, M. E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P. N., and Sawyers, C. L. (2001). Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification, *Science* 293, 876-80.

Gossen, M., Freundlieb, S., Bender, G., Muller, G., Hillen, W., and Bujard, H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells, *Science* 268, 1766-9.

Goto, Y., and Hamaguchi, K. (1979). The role of the intrachain disulfide bond in the conformation and stability of the constant fragment of the immunoglobulin light chain, *J Biochem (Tokyo)* 86, 1433-41.

Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Daly, J. M., and Hynes, N. E. (1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling, *Embo J* 16, 1647-55.

Griffiths, A. D., Williams, S. C., Hartley, O., Tomlinson, I. M., Waterhouse, P., Crosby, W. L., Kontermann, R. E., Jones, P. T., Low, N. M., Allison, T. J., and *et al.* (1994). Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires, *Embo J* 13, 3245-60.

Gschwind, A., Zwick, E., Prenzel, N., Leserer, M., and Ullrich, A. (2001). Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission, *Oncogene* 20, 1594-600.

Gullick, W. J. (1994). A new model for the interaction of EGF-like ligands with their receptors: the new one-two, *Eur J Cancer* 30A, 2186.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer, *Cell* 100, 57-70.

Hanes, J., and Plückthun, A. (1997). In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4937-42.

Harris, S., and Foord, S. M. (2000). Transgenic gene knock-outs: functional genomics and therapeutic target selection, *Pharmacogenomics* 1, 433-43.

Hills, D., Rowlinson-Busza, G., and Gullick, W. J. (1995). Specific targeting of a mutant, activated FGF receptor found in glioblastoma using a monoclonal antibody, *Int J Cancer* 63, 537-43.

Holliger, P., Prospero, T., and Winter, G. (1993). "Diabodies": small bivalent and bispecific antibody fragments, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6444-8.

Hoogenboom, H. R., Griffiths, A. D., Johnson, K. S., Chiswell, D. J., Hudson, P., and Winter, G. (1991). Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains, *Nucleic Acids Res* 19, 4133-7.

Hubbard, S. R., Till, J. H., Yarden, Y., and Schlessinger, J. (2000). Protein tyrosine kinase structure and function, *Annu Rev Biochem* 69, 373-98. purified epidermal growth factor receptor.

Huston, J. S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M. S., Novotny, J., Margolies, M. N., Ridge, R. J., Brucoleri, R. E., Haber, E., Crea, R., and *et al.* (1988). Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 5879-83.

Hyland, S., Beerli, R. R., Barbas, C. F., Hynes, N. E., and Wels, W. (2003). Generation and functional characterization of intracellular antibodies interacting with the kinase domain of human EGF receptor, *Oncogene* 22, 1557-67.

Hynes, N. E., and Stern, D. F. (1994). The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer, *Biochim Biophys Acta* 1198, 165-84.

Irish, J. C., and Bernstein, A. (1993). Oncogenes in head and neck cancer, *Laryngoscope* *103*, 42-52.

James, P., Halladay, J., and Craig, E. A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast, *Genetics* *144*, 1425-36.

Jannot, C. B., Beerli, R. R., Mason, S., Gullick, W. J., and Hynes, N. E. (1996). Intracellular expression of a single-chain antibody directed to the EGFR leads to growth inhibition of tumor cells, *Oncogene* *13*, 275-82.

Jean, D., Tellez, C., Huang, S., Davis, D. W., Bruns, C. J., McConkey, D. J., Hinrichs, S. H., and Bar-Eli, M. (2000). Inhibition of tumor growth and metastasis of human melanoma by intracellular anti-ATF-1 single chain Fv fragment, *Oncogene* *19*, 2721-30.

Jermutus, L., Honegger, A., Schwesinger, F., Hanes, J., and Plückthun, A. (2001). Tailoring in vitro evolution for protein affinity or stability, *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 75-80.

Jung, S., Honegger, A., and Plückthun, A. (1999). Selection for improved protein stability by phage display, *J Mol Biol* *294*, 163-80.

Kabat, E. A. (1991). Sequences of proteins of immunological interest (Bethesda, MD :, U.S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health).

Kanazawa, S., Driscoll, M., and Struhl, K. (1988). ATR1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a transmembrane protein required for aminotriazole resistance, *Mol Cell Biol* *8*, 664-73.

Kew, T. Y., Bell, J. A., Pinder, S. E., Denley, H., Srinivasan, R., Gullick, W. J., Nicholson, R. I., Blamey, R. W., and Ellis, I. O. (2000). c-erbB-4 protein expression in human breast cancer, *Br J Cancer* *82*, 1163-70.

Kile, B. T., Schulman, B. A., Alexander, W. S., Nicola, N. A., Martin, H. M., and Hilton, D. J. (2002). The SOCS box: a tale of destruction and degradation, *Trends Biochem Sci* *27*, 235-41.

Krane, I. M., and Leder, P. (1996). NDF/hereregulin induces persistence of terminal end buds and adenocarcinomas in the mammary glands of transgenic mice, *Oncogene* *12*, 1781-8.

Kreitman, R. J. (1999). Immunotoxins in cancer therapy, *Curr Opin Immunol* *11*, 570-8.

Le Gall, F., Kipriyanov, S. M., Moldenhauer, G., and Little, M. (1999). Di-, tri- and tetrameric single chain Fv antibody fragments against human CD19: effect of valency on cell binding, *FEBS Lett* *453*, 164-8.

Lee, K. F., Simon, H., Chen, H., Bates, B., Hung, M. C., and Hauser, C. (1995). Requirement for neuregulin receptor erbB2 in neural and cardiac development, *Nature* *378*, 394-8.

Lemmon, M. A., Bu, Z., Ladbury, J. E., Zhou, M., Pinchasi, D., Lax, I., Engelman, D. M., and Schlessinger, J. (1997). Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer, *Embo J* 16, 281-94.

Lener, M., Horn, I. R., Cardinale, A., Messina, S., Nielsen, U. B., Rybak, S. M., Hoogenboom, H. R., Cattaneo, A., and Biocca, S. (2000). Diverting a protein from its cellular location by intracellular antibodies. The case of p21Ras, *Eur J Biochem* 267, 1196-205.

Lenferink, A. E., Pinkas-Kramarski, R., van de Poll, M. L., van Vugt, M. J., Klapper, L. N., Tzahar, E., Waterman, H., Sela, M., van Zoelen, E. J., and Yarden, Y. (1998). Differential endocytic routing of homo- and hetero-dimeric ErbB tyrosine kinases confers signaling superiority to receptor heterodimers, *Embo J* 17, 3385-97.

Levkowitz, G., Waterman, H., Ettenberg, S. A., Katz, M., Tsygankov, A. Y., Alroy, I., Lavi, S., Iwai, K., Reiss, Y., Ciechanover, A., *et al.* (1999). Ubiquitin ligase activity and tyrosine phosphorylation underlie suppression of growth factor signaling by c-Cbl/Sli-1, *Mol Cell* 4, 1029-40.

Marasco, W. A. (1995). Intracellular antibodies (intrabodies) as research reagents and therapeutic molecules for gene therapy, *Immunotechnology* 1, 1-19.

Marasco, W. A., Haseltine, W. A., and Chen, S. Y. (1993). Design, intracellular expression, and activity of a human anti-human immunodeficiency virus type 1 gp120 single-chain antibody, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 7889-93.

Marmorstein, R., Carey, M., Ptashne, M., and Harrison, S. C. (1992). DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex, *Nature* 356, 408-14.

Marshall, C. J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation, *Cell* 80, 179-85.

Massague, J., and Pandiella, A. (1993). Membrane-anchored growth factors, *Annu Rev Biochem* 62, 515-41.

Maurer, C. A., Friess, H., Kretschmann, B., Zimmermann, A., Stauffer, A., Baer, H. U., Korc, M., and Buchler, M. W. (1998). Increased expression of erbB3 in colorectal cancer is associated with concomitant increase in the level of erbB2, *Hum Pathol* 29, 771-7.

Menard, S., Casalini, P., Campiglio, M., Pupa, S., Agresti, R., and Tagliabue, E. (2001). HER2 overexpression in various tumor types, focussing on its relationship to the development of invasive breast cancer, *Ann Oncol* 12, S15-9.

- Mendelsohn, J. (2002). Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy, *J Clin Oncol* 20, 1S-13S.
- Mhashilkar, A. M., Biswas, D. K., LaVecchio, J., Pardee, A. B., and Marasco, W. A. (1997). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro by a novel combination of anti-Tat single-chain intrabodies and NF-kappa B antagonists, *J Virol* 71, 6486-94.
- Miettinen, P. J., Berger, J. E., Meneses, J., Phung, Y., Pedersen, R. A., Werb, Z., and Derynck, R. (1995). Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor, *Nature* 376, 337-41.
- Modi, S., and Seidman, A. D. (2002). An update on epidermal growth factor receptor inhibitors, *Curr Oncol Rep* 4, 47-55.
- Moscattello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., Biegel, J. A., Hayes, R. L., and Wong, A. J. (1995). Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors, *Cancer Res* 55, 5536-9.
- Muthuswamy, S. K., Gilman, M., and Brugge, J. S. (1999). Controlled dimerization of ErbB receptors provides evidence for differential signaling by homo- and heterodimers, *Mol Cell Biol* 19, 6845-57.
- Naidu, R., Yadav, M., Nair, S., and Kutty, M. K. (1998). Expression of c-erbB3 protein in primary breast carcinomas, *Br J Cancer* 78, 1385-90.
- Nisonoff, A., Wissler, F. C., Lipman, L. N., and Woernley, D. L. (1960). *Arch Biochem Biophys* 89, 230.
- Nissim, A., Hoogenboom, H. R., Tomlinson, I. M., Flynn, G., Midgley, C., Lane, D., and Winter, G. (1994). Antibody fragments from a 'single pot' phage display library as immunochemical reagents, *Embo J* 13, 692-8.
- Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains, *Cell* 110, 775.
- Ohage, E., and Steipe, B. (1999). Intrabody construction and expression. I. The critical role of VL domain stability, *J Mol Biol* 291, 1119-28.
- Ohage, E. C., Graml, W., Walter, M. M., Steinbacher, S., and Steipe, B. (1997). Beta-turn propensities as paradigms for the analysis of structural motifs to engineer protein stability, *Protein Sci* 6, 233-41.

- Ohage, E. C., Wirtz, P., Barnikow, J., and Steipe, B. (1999). Intrabody construction and expression. II. A synthetic catalytic Fv fragment, *J Mol Biol* 291, 1129-34.
- Olayioye, M. A., Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Rohrer, J., Gay, B., and Hynes, N. E. (1998). ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner, *Mol Cell Biol* 18, 5042-51.
- Olayioye, M. A., Neve, R. M., Lane, H. A., and Hynes, N. E. (2000). The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer, *Embo J* 19, 3159-67.
- Parisien, J. P., Lau, J. F., Rodriguez, J. J., Sullivan, B. M., Moscona, A., Parks, G. D., Lamb, R. A., and Horvath, C. M. (2001). The V protein of human parainfluenza virus 2 antagonizes type I interferon responses by destabilizing signal transducer and activator of transcription 2, *Virology* 283, 230-9.
- Park, J. W., Hong, K., Kirpotin, D. B., Colbern, G., Shalaby, R., Baselga, J., Shao, Y., Nielsen, U. B., Marks, J. D., Moore, D., *et al.* (2002). Anti-HER2 immunoliposomes: enhanced efficacy attributable to targeted delivery, *Clin Cancer Res* 8, 1172-81.
- Pastan, I., and FitzGerald, D. (1991). Recombinant toxins for cancer treatment, *Science* 254, 1173-7.
- Pedersen, M. W., Meltorn, M., Damstrup, L., and Poulsen, H. S. (2001). The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy, *Ann Oncol* 12, 745-60.
- Pene, F., Claessens, Y. E., Muller, O., Viguie, F., Mayeux, P., Dreyfus, F., Lacombe, C., and Bouscary, D. (2002). Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma, *Oncogene* 21, 6587-97.
- Pero, S. C., Oligino, L., Daly, R. J., Soden, A. L., Liu, C., Roller, P. P., Li, P., and Krag, D. N. (2002). Identification of novel non-phosphorylated ligands, which bind selectively to the SH2 domain of Grb7, *J Biol Chem* 277, 11918-26.
- Persic, L., Righi, M., Roberts, A., Hoogenboom, H. R., Cattaneo, A., and Bradbury, A. (1997). Targeting vectors for intracellular immunisation, *Gene* 187, 1-8.
- Porter, R. R. (1959). *Biochem J*, 119.
- Portner-Taliana, A., Russell, M., Froning, K. J., Budworth, P. R., Comiskey, J. D., and Hoeffler, J. P. (2000). In vivo selection of single-chain antibodies using a yeast two-hybrid system, *J Immunol Methods* 238, 161-72.

Prenzel, N., Fischer, O. M., Streit, S., Hart, S., and Ullrich, A. (2001). The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification, *Endocr Relat Cancer* 8, 11-31.

Proba, K., Honegger, A., and Plückthun, A. (1997). A natural antibody missing a cysteine in VH: consequences for thermodynamic stability and folding, *J Mol Biol* 265, 161-72.

Rader, C., and Barbas, C. F., 3rd (1997). Phage display of combinatorial antibody libraries, *Curr Opin Biotechnol* 8, 503-8.

Richardson, J. H., and Marasco, W. A. (1995). Intracellular antibodies: development and therapeutic potential, *Trends Biotechnol* 13, 306-10.

Rodrigues, G. A., Falasca, M., Zhang, Z., Ong, S. H., and Schlessinger, J. (2000). A novel positive feedback loop mediated by the docking protein Gab1 and phosphatidylinositol 3-kinase in epidermal growth factor receptor signaling, *Mol Cell Biol* 20, 1448-59.

Rojas, M., Yao, S., and Lin, Y. Z. (1996). Controlling epidermal growth factor (EGF)-stimulated Ras activation in intact cells by a cell-permeable peptide mimicking phosphorylated EGF receptor, *J Biol Chem* 271, 27456-61.

Ross, J. S., and Fletcher, J. A. (1998). The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy, *Stem Cells* 16, 413-28.

Russo, M. W., Lukas, T. J., Cohen, S., and Staros, J. V. (1985). Identification of residues in the nucleotide binding site of the epidermal growth factor receptor/kinase, *J Biol Chem* 260, 5205-8.

Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies, *Crit Rev Oncol Hematol* 19, 183-232.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning : a laboratory manual* (Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory).

Scher, H. I., Sarkis, A., Reuter, V., Cohen, D., Netto, G., Petrylak, D., Lianes, P., Fuks, Z., Mendelsohn, J., and Cordon-Cardo, C. (1995). Changing pattern of expression of the epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in the progression of prostatic neoplasms, *Clin Cancer Res* 1, 545-50.

Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases, *Cell* 103, 211-25.

Schlessinger, J. (2002). Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor, *Cell* 110, 669-72.

Schmidt, M., Hynes, N. E., Groner, B., and Wels, W. (1996). A bivalent single-chain antibody-toxin specific for ErbB-2 and the EGF receptor, *Int J Cancer* *65*, 538-546.

Sheets, M. D., Amersdorfer, P., Finnern, R., Sargent, P., Lindquist, E., Schier, R., Hemingsen, G., Wong, C., Gerhart, J. C., Marks, J. D., and Lindqvist, E. (1998). Efficient construction of a large nonimmune phage antibody library: the production of high-affinity human single-chain antibodies to protein antigens, *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 6157-62.

Shintani, S., Funayama, T., Yoshihama, Y., Alcalde, R. E., and Matsumura, T. (1995). Prognostic significance of ERBB3 overexpression in oral squamous cell carcinoma, *Cancer Lett* *95*, 79-83.

Sibilia, M., Steinbach, J. P., Stingl, L., Aguzzi, A., and Wagner, E. F. (1998). A strain-independent postnatal neurodegeneration in mice lacking the EGF receptor, *Embo J* *17*, 719-31.

Skerra, A., and Plückthun, A. (1988). Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*, *Science* *240*, 1038-41.

Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., *et al.* (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2, *N Engl J Med* *344*, 783-92.

Sliwkowski, M. X., Lofgren, J. A., Lewis, G. D., Hotaling, T. E., Fendly, B. M., and Fox, J. A. (1999). Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin), *Semin Oncol* *26*, 60-70.

Soubeyran, P., Kowanetz, K., Szymkiewicz, I., Langdon, W. Y., and Dikic, I. (2002). Cbl-CIN85-endophilin complex mediates ligand-induced downregulation of EGF receptors, *Nature* *416*, 183-7.

Stahl, P. D., and Barbieri, M. A. (2002). Multivesicular bodies and multivesicular endosomes: the "ins and outs" of endosomal traffic, *Sci STKE* *2002*, E32.

Stamos, J., Sliwkowski, M. X., and Eigenbrot, C. (2002). Structure of the EGF receptor kinase domain alone and in complex with a4-anilinoquinazoline inhibitor, *J Biol Chem* *23*, 23.

Steipe, B., Schiller, B., Plückthun, A., and Steinbacher, S. (1994). Sequence statistics reliably predict stabilizing mutations in a protein domain, *J Mol Biol* *240*, 188-92.

Stemmer, W. P. (1994). Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling, *Nature* *370*, 389-91.

Stephens, D. J., and Banting, G. (2000). The use of yeast two-hybrid screens in studies of protein:protein interactions involved in trafficking, *Traffic* *1*, 763-8.

- Tanaka, T., Chung, G. T., Forster, A., Lobato, M. N., and Rabbitts, T. H. (2003). De novo production of diverse intracellular antibody libraries, *Nucleic Acids Res* *31*, e23.
- Tanaka, T., and Rabbitts, T. H. (2003). Intrabodies based on intracellular capture frameworks that bind the RAS protein with high affinity and impair oncogenic transformation, *Embo J* *22*, 1025-35.
- Thien, C. B., and Langdon, W. Y. (2001). Cbl: many adaptations to regulate protein tyrosine kinases, *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*, 294-307.
- Tse, E., Lobato, M. N., Forster, A., Tanaka, T., Chung, G. T., and Rabbitts, T. H. (2002). Intracellular Antibody Capture Technology: Application to Selection of Intracellular Antibodies Recognising the BCR-ABL Oncogenic Protein, *J Mol Biol* *317*, 85-94.
- Uherek, C., Fominaya, J., and Wels, W. (1998). A modular DNA carrier protein based on the structure of diphtheria toxin mediates target cell-specific gene delivery, *J Biol Chem* *273*, 8835-8841.
- Uherek, C., Tonn, T., Uherek, B., Becker, S., Schnierle, B., Klingemann, H. G., and Wels, W. (2002). Retargeting of natural killer-cell cytolytic activity to ErbB2-expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction, *Blood* *100*, 1265-73.
- Vaughan, T. J., Williams, A. J., Pritchard, K., Osbourn, J. K., Pope, A. R., Earnshaw, J. C., McCafferty, J., Hodits, R. A., Wilton, J., and Johnson, K. S. (1996). Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library, *Nat Biotechnol* *14*, 309-14.
- Visintin, M., Settanni, G., Maritan, A., Graziosi, S., Marks, J. D., and Cattaneo, A. (2002). The intracellular antibody capture technology (IACT): towards a consensus sequence for intracellular antibodies, *J Mol Biol* *317*, 73-83.
- Visintin, M., Tse, E., Axelson, H., Rabbitts, T. H., and Cattaneo, A. (1999). Selection of antibodies for intracellular function using a two-hybrid in vivo system, *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 11723-8.
- Waelti, E., Wegmann, N., Schwaninger, R., Wetterwald, A., Wingenfeld, C., Rothen-Rutishauser, B., and Gimmi, C. D. (2002). Targeting her-2/neu with antirat Neu virosomes for cancer therapy, *Cancer Res* *62*, 437-44.
- Waterman, H., Sabanai, I., Geiger, B., and Yarden, Y. (1998). Alternative intracellular routing of ErbB receptors may determine signaling potency, *J Biol Chem* *273*, 13819-27.
- Waterman, H., and Yarden, Y. (2001). Molecular mechanisms underlying endocytosis and sorting of ErbB receptor tyrosine kinases, *FEBS Lett* *490*, 142-52.

- Wells, A. (1999). EGF receptor, *Int J Biochem Cell Biol* 31, 637-43.
- Wells, J. A., Vasser, M., and Powers, D. B. (1985). Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites, *Gene* 34, 315-23.
- Wels, W., Harwerth, I. M., Mueller, M., Groner, B., and Hynes, N. E. (1992). Selective inhibition of tumor cell growth by a recombinant single-chain antibody-toxin specific for the erbB-2 receptor, *Cancer Res* 52, 6310-6317.
- Willuda, J., Honegger, A., Waibel, R., Schubiger, P. A., Stahel, R., Zangemeister-Wittke, U., and Plückthun, A. (1999). High thermal stability is essential for tumor targeting of antibody fragments: engineering of a humanized anti-epithelial glycoprotein-2 (epithelial cell adhesion molecule) single-chain Fv fragment, *Cancer Res* 59, 5758-67.
- Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E., and Hoogenboom, H. R. (1994). Making antibodies by phage display technology, *Annu Rev Immunol* 12, 433-55.
- Winter, G., and Milstein, C. (1991). Man-made antibodies, *Nature* 349, 293-9.
- Wirtz, P., and Steipe, B. (1999). Intrabody construction and expression III: engineering hyperstable V(H) domains, *Protein Sci* 8, 2245-50.
- Wong, A. J., Ruppert, J. M., Bigner, S. H., Grzeschik, C. H., Humphrey, P. A., Bigner, D. S., and Vogelstein, B. (1992). Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2965-9.
- Worn, A., Auf der Maur, A., Escher, D., Honegger, A., Barberis, A., and Plückthun, A. (2000). Correlation between in vitro stability and in vivo performance of anti-GCN4 intrabodies as cytoplasmic inhibitors, *J Biol Chem* 275, 2795-803.
- Worn, A., and Plückthun, A. (1998). An intrinsically stable antibody scFv fragment can tolerate the loss of both disulfide bonds and fold correctly, *FEBS Lett* 427, 357-61.
- Worn, A., and Plückthun, A. (2001). Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments, *J Mol Biol* 305, 989-1010.
- Xia, W., Lau, Y. K., Zhang, H. Z., Xiao, F. Y., Johnston, D. A., Liu, A. R., Li, L., Katz, R. L., and Hung, M. C. (1999). Combination of EGFR, HER-2/neu, and HER-3 is a stronger predictor for the outcome of oral squamous cell carcinoma than any individual family members, *Clin Cancer Res* 5, 4164-74.

Xu, J. L., and Davis, M. M. (2000). Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities, *Immunity* 13, 37-45.

Yamanaka, Y., Friess, H., Kobrin, M. S., Buchler, M., Beger, H. G., and Korc, M. (1993). Coexpression of epidermal growth factor receptor and ligands in human pancreatic cancer is associated with enhanced tumor aggressiveness, *Anticancer Res* 13, 565-9.

Yarden, Y., and Schlessinger, J. (1987a). Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of the purified epidermal growth factor receptor, *Biochemistry* 26, 1443-51.

Yarden, Y., and Schlessinger, J. (1987b). Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation, *Biochemistry* 26, 1434-42.

Yarden, Y., and Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 127-37.

Yi, K. S., Chung, J. H., Lee, Y. H., Chung, H. G., Kim, I. J., Suh, B. C., Kim, E., Cocco, L., Ryu, S. H., and Suh, P. G. (2001). Inhibition of the EGF-induced activation of phospholipase C-gamma1 by a single chain antibody fragment, *Oncogene* 20, 7954-64.

Lebenslauf

Name Stephen Hyland
Geburtsdatum und -ort 29. April 1971, Roehampton, Großbritannien
Familienstand Verheiratet
Staatsangehörigkeit Deutsch

Schulbildung Grundschule March
Kreisgymnasium Gundelfingen
Mai 1990 Abitur

Studium Grundstudium Chemie an der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg
November 1992 Vordiplom

Hauptstudium Chemie an der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg
August 1997 Diplom

Diplomarbeit Von November 1996 bis Juli 1997 Diplomarbeit am Institut
für Organische Chemie und Biochemie, Albert-Ludwigs-
Universität Freiburg bei Prof. Dr. D. Jahn
„Klonierung und Charakterisierung der Gene der
Nitratatmung aus *Pseudomonas aeruginosa*“

Doktorarbeit Von Januar 1998 bis Oktober 1998 am Institut für
experimentelle Krebsforschung, Klinik für Tumorbiologie,
Freiburg
November 1998 Umzug nach Frankfurt
Seit November 1998 am Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am
Main, bei Prof. Dr. W. Wels
„Generierung und funktionelle Charakterisierung
intrazellulärer Antikörperfragmente gerichtet gegen die
zytoplasmatische Domäne von Wachstumsfaktor-Rezeptoren
der ErbB-Familie“

Publikationen

Hyland, S., Beerli, R. R., Barbas, C. F., Hynes, N. E., and Wels, W. (2003). Generation and functional characterization of intracellular antibodies interacting with the kinase domain of human EGF receptor, *Oncogene* 22, 1557-67.

Poster

Stephen Hyland, Roger R. Beerli, Carlos F. Barbas III, Nancy E. Hynes und Winfried Wels (2003)

Generation and functional characterization of intracellular antibodies interacting with the kinase domain of human EGF receptor
12th AEK Cancer Congress, Würzburg

Stephen Hyland, Nancy E. Hynes, Roger R. Beerli und Winfried Wels (2002)

EGFR specific antibody fragments for intracellular expression and interference with EGFR signaling
EMBL/SALK/EMBO Conference on Oncogenes and Growth Control, Heidelberg

Stephen Hyland, Nancy E. Hynes, Roger R. Beerli und Winfried Wels (2001)

EGFR specific antibody fragments for intracellular expression and interference with EGFR signaling
EMBO/FEBS advanced lecture course „Molecular Mechanisms in Signal Transduction“, Spetses, Griechenland

Stephen Hyland, Nancy E. Hynes, Roger R. Beerli und Winfried Wels (2001)

EGFR specific antibody fragments for intracellular expression and interference with EGFR signaling
11th AEK Cancer Congress, Heidelberg

Vorträge

November 2001

Antibody Phage Display and Yeast Two-Hybrid Screening for the Isolation of Single-Chain Antibody Fragments with Increased Intracellular Stability
„Molecular Intervention as Alternate Therapy in Cancer“ Symposium, Tata Memorial Hospital, Bombay, Indien

Danksagungen

Bei Herrn Prof. Dr. Winfried Wels möchte ich mich für Bereitstellung des interessanten Themas sowie für die intensive Betreuung der Doktorarbeit bedanken. Neben vielen hilfreichen Anregungen gab er mir die Gelegenheit, meine eigenen Ideen umzusetzen. Es hat viel Spaß gemacht, diese Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Ferner möchte ich mich dafür bedanken, dass im Rahmen der Dissertation interessante Kollaborationen und Auslandsaufenthalte in Israel, Indien und Griechenland möglich waren, die für mich sowohl fachlich als auch persönlich eine wertvolle Erfahrung darstellen.

Herrn Prof. Dr. Robert Tampé bin ich sehr dankbar für die externe Betreuung meiner Doktorarbeit im Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt.

Dem Direktor des Georg-Speyer-Hauses, Herrn Prof. Dr. Bernd Groner, danke ich für viele wissenschaftliche Diskussionen und seine Unterstützung und Empfehlungen.

Alle ehemaligen und gegenwärtigen Mitglieder der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Winfried Wels sorgten stets für eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor. Besonders dem „harten Freiburger Kern“ gilt mein Dank für die freundschaftliche gegenseitige Hilfsbereitschaft während des Umzugs aus Freiburg und danach, als wir unser Labor quasi neu aufbauen mussten. Dr. Christoph Uherek, Ulrike Giesübel, Florian Rohrbach und Cord Hartmann danke ich für ihre Tipps und Anregungen beim Zusammenschreiben.

Sehr viel Dank schulde ich Dr. Roger Beerli für seine Unterstützung, viele hilfreiche Anregungen und die Bereitstellung seiner scFv Libraries.

Chris Königs und Dr. Martin Zörnig gilt mein Dank für viele gute Ratschläge und Ermunterungen. Bedanken möchte ich mich auch bei PD Dr. Barbara Schnierle für die zahlreichen kompetenten Anregungen während der häufigen Fahrten nach Freiburg und zurück. Wiebke Baum gilt mein Dank für geduldige Einführung in die Konfokale

Laserscanning Mikroskopie. Gesa Brochmann-Santos danke ich für ihre große Hilfsbereitschaft. Wir alle haben sie und ihren Sinn für Humor sehr vermisst in Frankfurt.

Dr. Itai Benhar an der Universität Tel Aviv möchte ich für seine große Unterstützung während meines Forschungsaufenthaltes in Israel danken. Seine Gruppe, allen voran Ronit Azriel, war außerordentlich hilfsbereit. Der German-Israeli Foundation for Scientific Research and Development (G.I.F.) danke ich für die Finanzierung dieses Forschungsaufenthaltes und die Förderung des Projekts.

Danken möchte ich auch Dr. Dilip Bandyopadhyay für die Gastfreundschaft während meines Auslandsaufenthalts am Tata Memorial Centre in Bombay.

Meinen Eltern danke ich für ihre großartige Unterstützung, die mich über all die Jahre meiner Ausbildung begleitete. Für die vielen aufmunternden Worte möchte ich ihnen und meiner Schwester danken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Bine dafür, dass sie aus dem schönen Freiburg nach Frankfurt nachgezogen ist und immer für mich da war. Auf ihre Hilfe war stets Verlass.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Frankfurt am Main, Mai 2003

Stephen Hyland