

Aus der Medizinischen Universitätsklinik
Abteilung Innere Medizin III (Kardiologie und Angiologie)
Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. C. Bode

**Bifunktionale Fusionsproteine:
Kombination hochselektiver, direkter Faktor Xa Inhibition
mit aktivierungsspezifischer GP IIb/IIIa Blockade einerseits,
und zielgerichtetem Fibrin-Targeting andererseits**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur
Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät
der
Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg im Breisgau

vorgelegt im Dezember 2004
von
Patrick Jaminet
geboren in Ludwigshafen

Dekan: Prof. Dr. med. Christoph Peters
Erster Gutachter: PD Dr. Karlheinz Peter
Zweiter Gutachter: PD Dr. Karl-Georg Fischer
Jahr der Promotion: 2006

Inhaltsverzeichnis

<u>1. EINLEITUNG</u>	7
<u>1.1. Thrombose und Herzinfarkt</u>	7
<u>1.1.1. Die Thrombose</u>	7
<u>1.1.2. Der Myokardinfarkt</u>	7
<u>1.2. Das Gerinnungssystem</u>	8
<u>1.2.1 Die primäre Hämostase</u>	8
<u>1.2.2. Die sekundäre Hämostase</u>	10
<u>1.2.3. Physiologische Gerinnungsinhibitoren</u>	13
<u>1.2.4. Fibrinolyse</u>	14
<u>1.2.5. Das thrombozytäre Integrin GP IIb/IIIa</u>	14
<u>1.3. Gerinnungshemmende Pharmaka</u>	16
<u>1.3.1. Antithrombozytäre Substanzen</u>	16
<u>1. Acetylsalizylsäure</u>	16
<u>2. Thienopyridine (Ticlopidin, Clopidogrel)</u>	16
<u>1.3.2. Eine neue Generation von GP IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten, Prototyp: MA2</u>	17
<u>1.3.3. Antikoagulantien</u>	17
<u>1. Unfraktioniertes Heparin</u>	17
<u>2. Niedermolekulares Heparin (LMWH = Low Molecular Weight Heparin)</u>	18
<u>3. Hirudin</u>	18
<u>4. Phyllochinonantagonisten</u>	18
<u>5. Hochspezifische Faktor Xa Inhibition</u>	18
<u>1.3.4. Tick Anticoagulant Peptide (TAP)</u>	19
<u>1.4. Die single-chain Antikörper (scFv)</u>	20
<u>1.5. Therapeutische Antikörperfusionsproteine</u>	22
<u>1.5.1. Das fibrinspezifische Fusionsprotein scFv_{59d8}-TAP</u>	22
<u>1.5.2. Das thrombozytenspezifische Fusionsprotein scFv_{MA2}-TAP</u>	23

<u>2. MATERIALIEN</u>	24
<u>2.1. Materialien der gentechnischen Arbeiten</u>	24
<u>2.1.1. Kultivierung von Bakterien</u>	24
<u>1. Kultivierung von E.coli in Medium</u>	24
<u>2. Kultivierung von E.coli auf Agar</u>	24
<u>2.1.2. Glycerolstocks</u>	24
<u>2.1.3. Isolation von Plasmid-DNA aus E.coli</u>	25
<u>2.1.4. Agarose-Gel-Elektrophorese</u>	25
<u>2.1.5. DNA-Restriktion</u>	25
<u>2.1.6. Gelelution von DNA-Fragmenten</u>	25
<u>2.1.7. DNA-Konzentrationsbestimmung</u>	26
<u>2.1.8. Dephosphorylierung</u>	26
<u>2.1.9. DNA-Ligation</u>	26
<u>2.1.10. DNA-Transformation und Selektion eines Plasmid-positiven Klons</u>	26
<u>2.1.11. Polymerase-Chain-Reaction (PCR)</u>	26
<u>2.1.12. Herstellung einer natürlichen Phagenbibliothek</u>	26
<u>2.1.13. Phage-display durch oberflächenverankerte scFv auf filamentösen Phagen und Panning</u>	27
<u>2.2. Materialien der proteinbiochemischen Arbeiten</u>	27
<u>2.2.1. Induktion der Proteinexpression</u>	27
<u>2.2.2. Protein-Isolation</u>	28
<u>2.2.3. Protein-Aufreinigung durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie</u>	28
<u>2.2.4. Dialyse</u>	29
<u>2.2.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</u>	29
<u>2.2.6. Coomassie-Färbung von SDS-PAGelen</u>	30
<u>2.2.7. Western-Blot</u>	30
<u>2.2.8. Immunfärbung der geblotteten Proteine</u>	31
<u>2.2.9. Protein-Konzentrations-Bestimmung</u>	31

1. <u>Absorptionsmessung bei $\lambda = 280$ nm</u>	31
2. <u>BCA Protein-Assay</u>	31
2.3. <u>Materialien der funktionellen Testung</u>.....	32
2.3.1. <u>ELISA (Enzyme-Linked immuno sorbent assay)</u>	32
2.3.2. <u>Faktor-Xa-Inhibitions-Assay</u>	33
2.3.3. <u>Bifunktionaler Assay für die Konstrukte scFV_{59d8}-TAP und scFV_{59d8}-Xa-TAP</u>	33
2.3.4. <u>Blutentnahme</u>	33
2.3.5. <u>Herstellung von PRP (Platelet Rich Plasma) und PPP (Platelet Poor Plasma)</u>	34
2.3.6. <u>Waschen der Thrombozyten</u>	34
2.3.7. <u>FACS-Analyse von Thrombozyten</u>	34
2.3.8. <u>Bifunktionaler Assay für das Konstrukt scFV_{MA2}-TAP</u>	35
2.3.9. <u>Aggregometrie</u>	35
2.3.10. <u>Hemmung der Aggregatbildung nach Induktion durch Thrombozyten-Clot</u>	35
2.3.11. <u>Nachweis der Bindung von scFV_{MA2}-TAP an adhärenenten Thrombozyten</u>	35
(Targeting).....	35
2.3.12. <u>Whole-Blood-Clot-Assay</u>	36
3. <u>METHODIK</u>.....	37
3.1. <u>Methoden der gentechnischen Arbeiten</u>.....	37
3.1.1. <u>Kultivierung von Bakterien</u>	37
1. <u>Kultivierung von E.coli in Medium</u>	37
2. <u>Kultivierung von E.coli auf Agar</u>	37
3.1.2. <u>Glycerolstocks</u>	38
3.1.3. <u>Isolation von Plasmid-DNA aus E.coli</u>	38
3.1.4. <u>Agarose-Gel-Elektrophorese</u>	38
3.1.5. <u>DNA-Restriktion</u>	39
3.1.6. <u>Gelelution von DNA-Fragmenten</u>	39
3.1.7. <u>DNA-Konzentrationsbestimmung</u>	39

3.1.8. Dephosphorylierung	40
3.1.9. DNA-Ligation	40
3.1.10. Bakterien-Transformation und Selektion eines Plasmid-positiven Klons	40
3.1.11. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR = Polymerase Chain Reaction)	41
3.1.12. Herstellung einer natürlichen Phagen-Bibliothek	42
3.1.13. Phage-display durch oberflächenverankerte scFv auf filamentösen Phagen	42
3.1.14. Panning	44
3.2. Methoden der proteinbiochemischen Arbeiten	46
3.2.1. Induktion der Proteinexpression	46
1. Expression der Konstrukte scFv _{MA2} , scFv _{MA2} -TAP, scFv _{MA2mut} -TAP.....	46
2. Expression der Konstrukte scFv _{59d8} , scFv _{59d8} -TAP, scFv _{59d8} -Xa-TAP	46
3.2.2. Protein-Isolation	46
1. Periplasma-Präparation.....	46
2. BugBuster (Novagen) Präparation.....	47
3.2.3. Protein-Aufreinigung durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie	47
3.2.4. Dialyse	48
3.2.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	48
3.2.6. Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	49
3.2.7. Western-Blot	49
3.2.8. Immunfärbung geblotteter Proteine	50
3.2.9. Protein-Konzentrations-Bestimmung	50
1. Absorptionsmessung bei $\lambda = 280 \text{ nm}$	50
2. BCA-Protein Assay nach Lowry	51
3.3. Methoden der funktionellen Testung	51
3.3.1. ELISA (Enzyme-Linked immuno sorbent assay)	51
3.3.2. Faktor-Xa-Inhibitions-Assay	52
3.3.3. Bifunktionaler Assay für die Konstrukte scFv_{59d8}-TAP und scFv_{59d8}-Xa-TAP	53
3.3.4. Blutentnahme	53

3.3.5. Herstellung von PRP (Platelet Rich Plasma) und PPP (Platelet Poor Plasma)	54
3.3.6. Waschen der Thrombozyten	54
3.3.7. FACS-Analyse von Thrombozyten	54
3.3.8. Bifunktionaler Assay für das Konstrukt scFv_{MA2}-TAP	55
3.3.9. Aggregometrie	56
3.3.10. Hemmung der Aggregatbildung nach Induktion durch Thrombozyten-Clot	56
3.3.11. Nachweis der Bindung von scFv_{MA2}-TAP an adhärenenten Thrombozyten (Targeting)	56
3.3.12. Whole-Blood-Clot-Assay	57
4. ERGEBNISSE	58
4.1. Ergebnisse der gentechnischen Arbeiten	58
4.1.1. Das Fusionsprotein scFv_{59d8}-TAP	58
1. Klonierung des scFv_{59d8}-TAP	58
2. Umklonierung des scFv_{59d8}-TAP in den Vektor pHog21	58
3. Klonierung einer Faktor Xa Schnittstelle zwischen scFv_{59d8} und TAP mittels PCR	61
4. Herstellung eines konformationsspezifischen single-chain Antikörpers gegen den aktivierten Zustand des GP IIb/IIIa Rezeptors durch Phage-display	62
5. Klonierung der Konstrukte scFv_{MA2}-TAP und scFv_{MA2mut}-TAP	64
4.2. Ergebnisse der proteinbiochemischen Arbeiten	65
4.2.1. Präparation der Konstrukte scFv_{59d8}-TAP und scFv_{59d8}-Xa-TAP	65
4.2.2. Präparation der Konstrukte scFv_{MA2}, scFv_{MA2}-TAP und scFv_{MA2mut}-TAP	66
4.2.3. scFv_{59d8}-Xa-TAP: Faktor Xa-induzierte proteolytische Abspaltung des TAP	67
4.3. Ergebnisse der funktionellen Testung	68
4.3.1. Funktionalität und Charakter der scFv_{59d8}-TAP und scFv_{59d8}-Xa-TAP	68
1. Vergleichende ELISA-Analysen	68
2. Vergleichende Faktor Xa Inhibition	69
3. Whole-Blood-Clot-Assay mit den scFv_{59d8}-TAP, scFv_{59d8}-TAP und rTAP	70
4.3.2. Funktionalität und Charakter des scFv_{MA2}-TAP	71
1. Bindung von scFv_{MA2}, scFv_{MA2}-TAP, scFv_{MA2mut}-TAP an aktivierte Thrombozyten	71
2. Faktor-Xa-Inhibition von scFv_{MA2}, scFv_{MA2}-TAP und scFv_{MA2mut}-TAP	71

<u>3. Nachweis der Fibrinogen-Verdrängung vom GP IIb/IIIa Rezeptor durch die Konstrukte scFv_{MA2}-TAP und scFv_{MA2}</u>	72
<u>4. Bifunktionaler Assay für das Fusionsprotein scFv_{MA2}-TAP</u>	73
<u>5. Hemmung der Thrombozytenaggregation</u>	73
<u>6. Hemmung der Aggregatbildung nach Induktion durch Thrombozyten-Clot</u>	74
<u>7. Bindung von scFv_{MA2}-TAP an adhärenente Thrombozyten, Nachweis eines Targeting</u> ...	74
<u>5. DISKUSSION</u>	76
<u>5.1. Die Fusionsproteine scFv_{59d8}-TAP und scFv_{59d8}-Xa-TAP</u>	76
<u>5.2. Das Fusionsprotein scFv_{MA2}-TAP</u>	79
<u>6. ZUSAMMENFASSUNG</u>	82
<u>7. SEQUENZEN</u>	83
<u>7.1. ScFv_{59d8}-TAP</u>	83
<u>7.2. scFv_{59d8}-Xa-TAP</u>	85
<u>7.3. scFv_{MA2}-TAP</u>	87
<u>8. LITERATURVERZEICHNIS</u>	89
<u>9. PUBLIKATIONEN</u>	97
<u>10. LEBENSLAUF</u>	98
<u>11. DANKSAGUNG</u>	101

1. Einleitung

1.1. Thrombose und Herzinfarkt

1.1.1. Die Thrombose

Bei ganz alltäglichen Verletzungen kann man beobachten, wie das Blut nach einer Weile gerinnt und die Wunde verschließt. Findet dieselbe Gerinnung innerhalb der Gefäße statt, so spricht man von einer Thrombose. In nur wenigen Stunden kann so ein kleines Gerinnsel zu einem Blutpfropf heranwachsen, der die Gefäße verstopft. Bevorzugt bilden sich solche Thrombosen in den Venen der Beine.

Die VIRCHOWsche Trias beschreibt die drei wesentlichen Faktoren für die Entstehung einer Thrombose: 1. Endothelfunktion, 2. Koagulabilität des Blutes 3. Strömungsgeschwindigkeit des Blutes. Ist einer dieser Faktoren gestört, kann eine Aktivierung des hämostatischen Systems eine Thrombose oder Embolie bedingen, die die Perfusion wichtiger Organe vermindert.

Je nach Ort der Thrombose unterscheidet sich die Beschaffenheit der Thromben: Im venösen System mit langsam fließendem Blut entstehen fibrinreiche thrombozytenarme Thromben, wobei Erythrozyten in das Fibrinnetz eingebunden sind, weshalb sie auch als rote Thromben bezeichnet werden. Diese Form venöser Thromben entsteht vor allem in den tiefen Beinvenen. Ihre bröckeligen Enden können abreißen und damit zur thromboembolischen Komplikation der Lungenembolie führen. Die sog. weißen Thromben sind dagegen fibrinarm und thrombozytenreich. Sie entstehen im arteriellen System, in dem der Blutfluss schneller ist und die Scherkräfte, welche die Thrombozyten aktivieren, höher sind. Die Ablösung dieser wandständigen Thromben führt ebenfalls zur Embolie mit temporärer oder permanenter Ischämie distal gelegener Regionen.

1.1.2. Der Myokardinfarkt

Der Myokardinfarkt entsteht meist auf dem Boden eines thrombotischen Verschlusses einer bereits atherosklerotisch veränderten Koronararterie. Das Fortschreiten einer Atherosklerose bis zum thrombotischen Verschluss ist ein multifaktorieller Prozess. In den meisten Fällen kommt es durch Fissur, Ruptur und Ulzeration einer instabilen Plaque zu lokal thrombogenen

Bedingungen. Der hier entstehende Thrombus verschließt das Gefäß und führt zur Infarzierung des versorgten Areals.

Der thrombotische Verschluss einer Koronararterie mit Folge eines Myokardinfarktes ist eine der häufigsten Morbiditäts- und Mortalitätsursachen in den Industrieländern.

1.2. Das Gerinnungssystem

Das Gerinnungssystem zählt zu einer Vielzahl von Abwehrmechanismen des Körpers, welche essentiell für ein normales Leben sind. Es schützt einerseits den Körper vor übermäßigem Blutverlust und sorgt andererseits für einen normalen Blutfluss in den Gefäßen. Das Eindringen von Mikroorganismen wird durch einen temporären Pfropf aus Blutplättchen und Fibrin verhindert. Dieser wird zu einem späteren Zeitpunkt wieder aufgelöst, um die Blutzirkulation nicht zu stören. Dabei leitet die Gerinnung die Bildung von neuem Bindegewebe und die zeitgleich stattfindende Revaskularisation ein.

Die Hämostase wird durch komplex miteinander verbundene Subsysteme gewährleistet:

1. Primäre Hämostase (thrombozytäres System)
2. Sekundäre Hämostase (plasmatisches System)
3. System der physiologischen Gerinnungsinhibitoren
4. Fibrinolyse

In den folgenden Kapiteln werden die Subsysteme und ihre Vernetzung untereinander näher beschrieben.

1.2.1 Die primäre Hämostase

Der erste effiziente Schritt, Blutverluste zu verhindern, ist die Fähigkeit der Gefäße zur **Vasokonstriktion**. Das autonome Nervensystem, die glatten Muskelzellen und einige Mediatoren wie Serotonin, Epinephrin und Noradrenalin wirken dabei eng zusammen. Die Vasokonstriktion verläuft sehr schnell und kann in kleinen Gefäßen Blutungen effektiv stillen. Bei größeren Läsionen stehen andere Mechanismen zur Verfügung.

Die **Adhäsion** von noch ruhenden Blutplättchen an die verletzte Gefäßwand ist der erste Schritt der primären Hämostase und wird primäre Adhäsion genannt. Anlagerung von schon

aktivierten Thrombozyten an Strukturen des Subendothels wird als sekundäre Adhäsion bezeichnet. Die primäre Adhäsion führt zur Formveränderung, Spreizung und Aktivierung der adhärenen Plättchen mit nachfolgender Sekretion von Granulainhaltsstoffen und Aggregatbildung. Der Adhäsionsvorgang wird durch thrombozytäre Membranglykoproteine gesteuert. Thrombozyten besitzen eine Reihe von membranständigen Adhäsionsrezeptoren, die spezifische Strukturkomponenten der extrazellulären Matrix im Bereich des Subendothels und der Media erkennen. Kollagene vom Typ I und III sind die am häufigsten vorkommenden Strukturproteine. Fibronektin und Laminin sind die Hauptkomponenten nicht-kollagener Adhäsionsproteine, welche in der extrazellulären Matrix vorkommen.

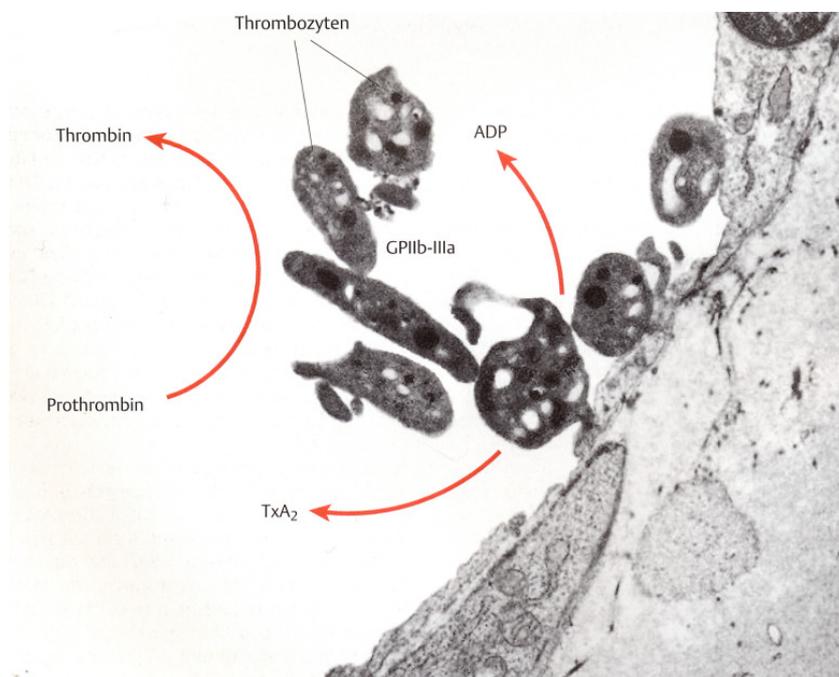


Abb. 1.a. Adhäsion und Aggregation im Bereich einer Endothelläsion (Gawaz M. (1999) Das Blutplättchen. Thieme, Stuttgart)

In Stromgebieten mit hoher Scherkraft wird über Interaktion des thrombozytären Rezeptors für von-Willebrand-Faktor (Glykoprotein Ib-V-IX) mit kollagenimmobilisiertem vWF der erste Kontakt zirkulierender Blutplättchen mit der Zellwandläsion hergestellt. Bei niedrigem *shear stress* kommt die Adhäsion über die Kollagenrezeptoren GP Ia-IIa und GP VI zustande. Durch Kollagen wird das Glykoprotein GP IIb/IIIa vorstimuliert, wodurch es in die Lage kommt, unter hohen Scherkräften neben Fibrinogen ebenfalls vWF zu binden. Insbesondere die Bindung des thrombozytären Kollagenrezeptors an Kollagen führt zur Aktivierung und

Formveränderung der adhärenen Plättchen. Die Bildung von Pseudopodien kann eine effektive Abdichtung der Gefäßwandläsion begünstigen.

Durch die Aktivierung werden Granulainhaltsstoffe freigesetzt, wodurch die Plättchen zur **Aggregation** angeregt werden. Aggregation nennt man den Vorgang der Koadhäsion zwischen zwei Thrombozyten. Zwei Phasen der Aggregation werden unterschieden: die primäre und sekundäre Aggregation. Während der primären Phase werden Thrombozyten reversibel über Fibrinogenbrücken miteinander verbunden.

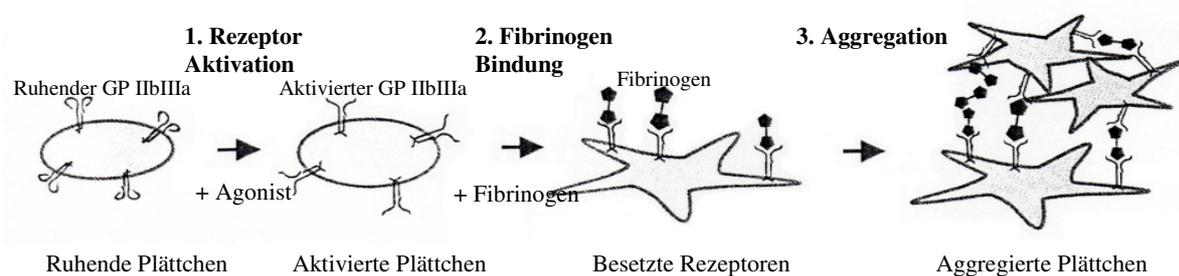


Abb. 1.b. Schematische Darstellung der Rezeptoraktivierung und nachfolgenden Fibrinogenbindung

Die sekundäre Aggregation tritt nach Aggregationsbeginn verzögert auf und beginnt, sobald der Thrombozyt Granulainhaltsstoffe freisetzt. Drei Bedingungen sind für eine normal verlaufende Aggregation obligat: Scherkraft, Kalzium und Fibrinogen. Des weiteren kommt dem Glykoprotein GP IIb/IIIa auf der Thrombozytenoberfläche zentrale Bedeutung zu. In ruhendem Zustand kann kein lösliches plasmatisches Fibrinogen an die Thrombozytenoberfläche binden. Erst nach Aktivierung des Blutplättchens kommt es im Bereich des GP IIb/IIIa-Komplexes zur Freilegung von Bindungsstellen für Fibrinogen. Diese Bindung ist streng kalziumabhängig. Im Zeitverlauf von 10 – 30 Minuten erfolgt eine irreversible Stabilisierung der Fibrinogenbindung.

1.2.2. Die sekundäre Hämostase

Das primäre Plättchenaggregat ist relativ instabil. Eine effiziente Blutstillung erfordert die Konsolidierung des plättchenreichen Thrombus. Die sekundäre Hämostase beginnt mit der Aktivierung der Gerinnungskaskade und Bildung von Thrombin und Fibrin in der Umgebung des Plättchenaggregats. Anlagerung von Fibrin an das Plättchenaggregat führt über

Quervernetzung der Blutplättchen zur Konsolidierung des Thrombus und durch Gerinnselretraktion zur Verfestigung des hämostatischen Blutkuchens.

Aus historischen Gründen wird die Blutgerinnung in das intrinsische und das extrinsische System unterteilt, die in eine gemeinsame Endstrecke münden: Aktivierung von Faktor X, Bildung von Thrombin aus Prothrombin und Fibrinogenspaltung zu Fibrin.

Die Aktivierung der Koagulation über den **extrinsischen** Weg erfolgt im Vergleich zum intrinsischen Weg schnell und spielt eine wesentliche Rolle bei akuten thrombotischen Mechanismen im Bereich atherosklerotisch veränderter Gefäße. Im extrinsischen System ist „tissue factor“ (TF) der Hauptmediator. TF ist ein integrales Membranprotein, welches vorwiegend auf Gefäßwandzellen, jedoch auch auf zirkulierenden Blutzellen (Monozyten) vorkommt. In der subendothelialen Matrix ist es reichlich vorhanden. Nach einer Verletzung, während einer Entzündung oder durch Endotoxine bei Sepsis, wird TF auf der Endotheloberfläche präsentiert oder neu synthetisiert. TF bildet mit Faktor VIIa einen Komplex, welcher in der Lage ist, den Faktor X zu aktivieren. Diese Reaktion läuft viel schneller in Anwesenheit von Phospholipiden und Kalzium ab. Geringe Mengen an aktiviertem Faktor VIIa sind immer im Blut vorhanden sein, um mit TF zu reagieren.

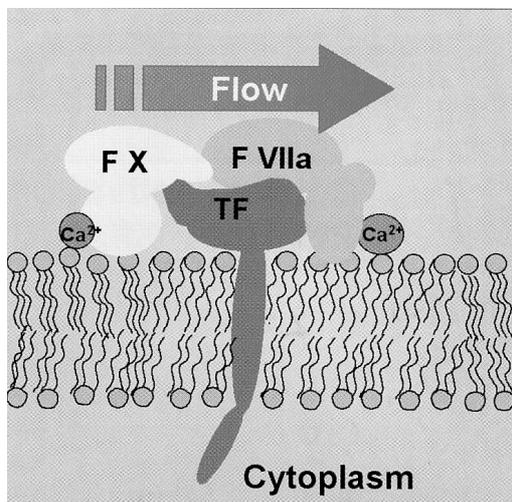


Abb. 1.c. Extrinsische Aktivierung der Gerinnung über Tissue Factor und Faktor VIIa

Das **intrinsische System** wird vor allem durch den Kontakt mit negativ geladenen Oberflächen wie Glas oder Plastik aktiviert. Im biologischen System können dies negativ geladene Membranbestandteile, wie z. Bsp. Sulfatide sein, die nach einer Verletzung in Kontakt mit Blut kommen. Auf diesen Oberflächen wird als erster Schritt Faktor XII aktiviert. Faktor XIIa aktiviert seinerseits Faktor XI, welcher wiederum Faktor IX zu IXa umwandelt. Letzterer ist selbst schon imstande in geringem Maßstab den Faktor X zu aktivieren. Diese

Reaktion läuft jedoch nur sehr langsam ab. Faktor IXa bedarf der Komplexbildung (Tenasekomplex) mit F VIIIa, um effektiv, zusammen mit Phospholipiden und Kalzium, den Faktor X zu aktivieren.

Extrinsisches und intrinsisches System münden also in die gleiche Endstrecke, nämlich der Aktivierung von Faktor X. Interessanter Weise sind beide Systeme eng miteinander verknüpft: Faktor VIIa ist beispielsweise der stärkste Aktivator von Faktor IX.

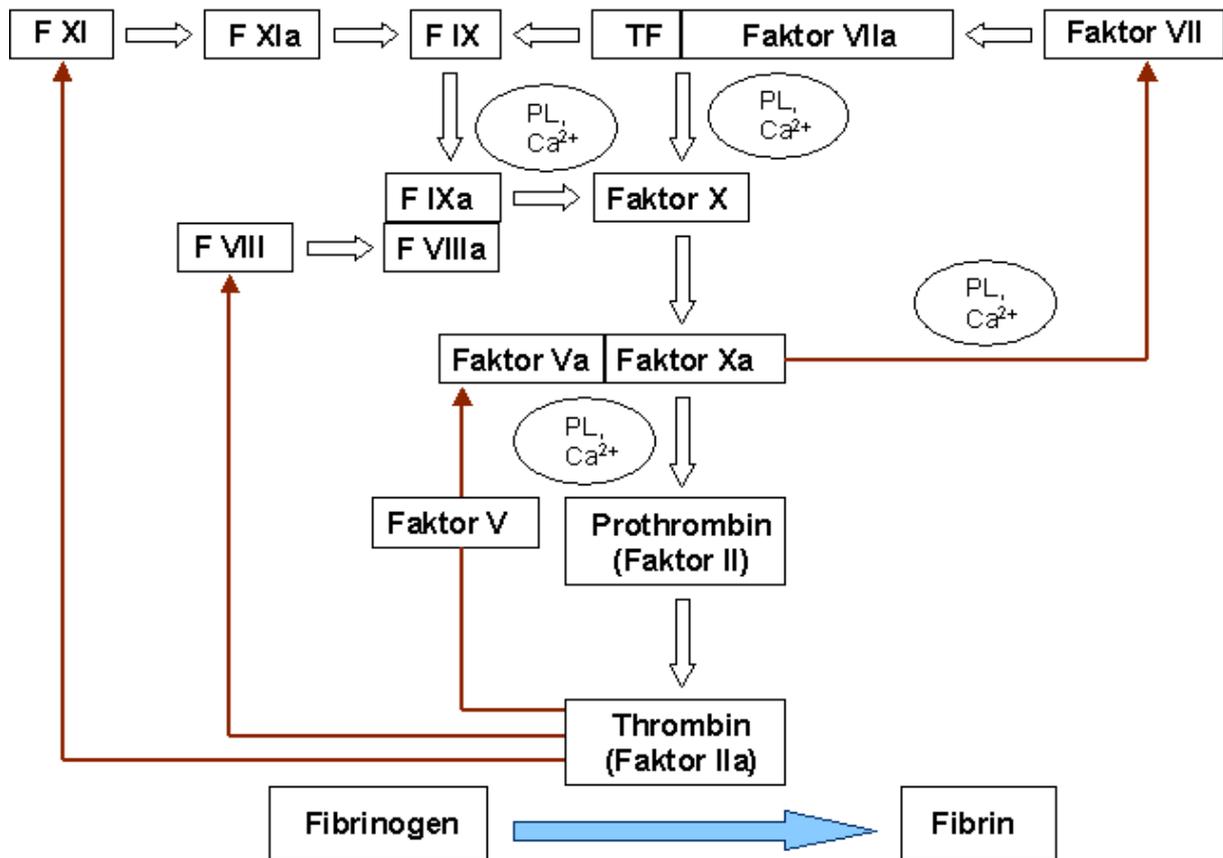


Abb. 1.d. Die Gerinnungskaskade

Faktor Xa ist allein schon imstande, Prothrombin in Thrombin umzusetzen. Diese Reaktion läuft jedoch um Zehnerpotenzen schneller im sog. Prothrombinasekomplex (Faktor Xa, Faktor Va, Phospholipide, Kalzium) und in plättchenreichem Plasma ab. Entscheidend für die prokoagulatorische Wirkung von Thrombozyten sind ihre Phospholipide, genannt Plättchenfaktor 3 (PF3). Die aktivierte Thrombozytenoberfläche ist das optimale Milieu für die perfekte Funktionalität sowohl des Prothrombinasekomplexes als auch des Tenasekomplexes. Des Weiteren sind 25 % des Faktor V in den Thrombozyten gespeichert und werden in der Umgebung aktivierter Thrombozyten vermehrt freigesetzt.

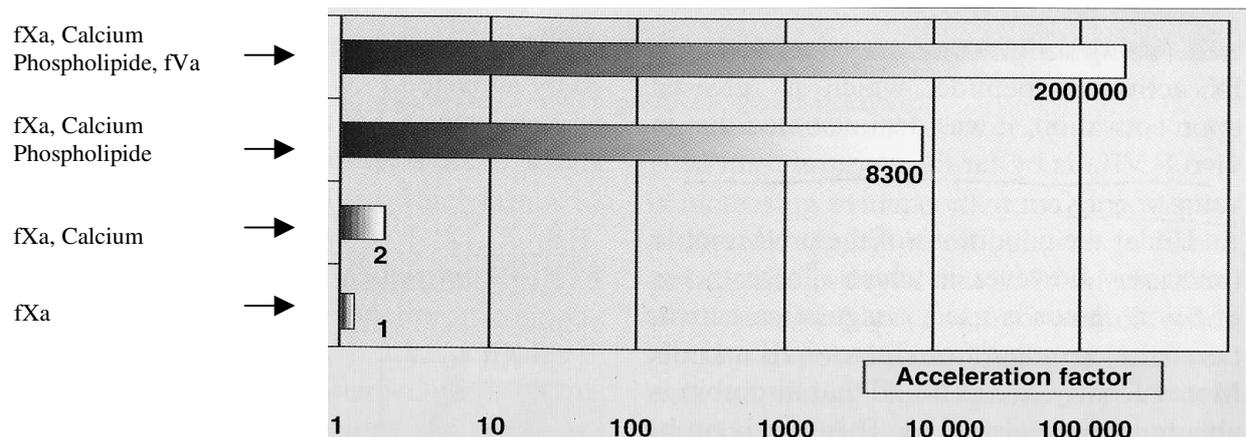


Abb. 1.e. Die Rolle der Kofaktoren in der Thrombinformation

Geringe Mengen an neu gebildetem Thrombin verstärken die gesamte Koagulationskaskade durch potentes positives Feedback: Aktivierung von Faktor V, Faktor VIII und Faktor XI. Thrombin katalysiert in der Endphase der Gerinnung die Formation von unlöslichem Fibrin aus Fibrinogen durch eine Reihe von proteolytischen Reaktionen. Fibrin polymerisiert zu einem Netzwerk, welches immer noch aktives Thrombin gebunden hat, und schließlich durch Faktor XIII kalziumabhängig quervernetzt wird.

1.2.3. Physiologische Gerinnungsinhibitoren

Zwei Stoffwechselwege halten die Blutgerinnung unter Kontrolle und schützen den Körper vor Thrombosen:

1. Die Proteaseinhibitoren, welche aktivierte Gerinnungsfaktoren hemmen
2. Der Protein C Stoffwechsel

Der wichtigste plasmatische **Proteaseinhibitor** ist Antithrombin (AT, früher AT III). Sein Angriffsort ist Thrombin, neben Faktor Xa und Faktor IXa. Es sei kurz darauf hingewiesen, dass Heparin die Wirkung von Antithrombin stark potenziert (s.u.). Ein Inhibitor des extrinsischen Systems ist der „tissue factor pathway inhibitor“ (TFPI), der zwei aktive Taschen besitzt: einerseits hemmt er den Faktor Xa, andererseits den Komplex von TF und Faktor VIIa. Der wichtigste Hemmer des intrinsischen Systems ist der C1 Inhibitor: er neutralisiert unter anderem die Faktoren XIIa und XIa.

Neben der Wirkung von Antithrombin und TFPI ist der **Protein C Stoffwechsel** die beste Abwehr gegen Thrombose. Aktiviertes Protein C ist eine spezifische Protease welche in

Anwesenheit von Kalzium und Phospholipiden die Faktoren Va und VIIIa inhibiert. Kofaktoren sind Protein S und Faktor V (nicht aktiviert). Das Membranprotein Thrombomodulin bindet Thrombin und moduliert auf der einen Seite einige seiner prokoagulanten Funktionen, auf der anderen Seite aktiviert der Komplex aus Thrombin und Thrombomodulin das Protein C.

1.2.4. Fibrinolyse

Sowohl in akuten Situationen (Verletzung) als auch ständig unter physiologischen Bedingungen kommt es zur Fibrinbildung. Diesem hämostatischen Prozess steht ausgleichend das System der Fibrinolyse gegenüber, so dass es zu einem Gleichgewicht zwischen Fibrinbildung und –auflösung kommt. Hauptfigur des fibrinolytischen Systems ist die Serinprotease Plasmin, welches durch proteolytische Aktivierung aus seinem Proenzym Plasminogen entsteht.

Das Fibrinolyse-System ist, ähnlich dem Gerinnungssystem, in einen intrinsischen und einen extrinsischen Teil gegliedert. Beim extrinsischen System stammen die Plasminogenaktivatoren aus dem Gewebe (z. Bsp. t-PA, Urokinase). Sie wandeln Plasminogen direkt in Plasmin um, ohne konkrete Proaktivatoren zu benötigen. Beim intrinsischen System stammen die Plasminogenaktivatoren aus dem Blut (z. Bsp. Faktor XII). Zu ihrer Aktivierung sind verschiedene Proaktivatoren nötig. Das aktive Plasmin spaltet das polymere Fibrinnetz auf.

1.2.5. Das thrombozytäre Integrin GP IIb/IIIa

Integrine sind Adhäsionsrezeptoren, die Strukturen des Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix verbinden. Sie kommen ubiquitär vor und finden sich auf nahezu allen Zellen. Neben der Thrombozytenadhäsion und –aggregation sind Integrine an der Gewebeentwicklung und –differenzierung, am Krebszellwachstum und der Metastasierung beteiligt.

Integrine sind nicht-kovalent verbundene Heterodimere, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit. Sie interagieren mit einer Vielzahl von Glykoproteinen, die Bestandteil der extrazellulären Matrix sind oder auch in löslicher Form im Plasma vorkommen. Die β_1 - und β_3 -Integrine erkennen die Arginin-Glycin-Aspartat(RGD)-Aminosäuresequenz. Die RGD-

Sequenz ist Bestandteil einer Vielzahl von extrazellulären Matrixproteinen und findet sich auch im Fibrinogenmolekül.

Das Glykoprotein I**IIb/IIIa** ($\alpha_{IIb}\beta_3$) gehört zu den β_3 -Integrinen und ist Bestandteil der thrombozytären Plasmamembran, des offenen kanalikulären Systems und der α -Granula. Es ist mengenmäßig das am häufigsten vorkommende Membranglykoprotein der Blutplättchen (60000-100000 Rezeptoren pro Thrombozyt). Zentrale Aufgabe des GP I**IIb/IIIa** Rezeptors ist die Bindung von löslichem Fibrinogen an die aktivierte Thrombozytenoberfläche, dem ersten Schritt der Thrombozytenaggregation. Unter physiologischen Verhältnissen tragen zirkulierende Blutplättchen einen nicht aktivierten GP I**IIb/IIIa** Rezeptor an ihrer Oberfläche (niedrigaffiner Funktionszustand). In diesem Zustand kann der Rezeptor nur immobilisiertes, nicht aber lösliches plasmatisches Fibrinogen binden. Aktivierung der Thrombozyten führt zur raschen Konformationsänderung des GP I**IIb/IIIa**-Komplexes und zur Freilegung von hochaffinen Fibrinogenbindungsstellen (aktivierter hochaffiner Funktionszustand).

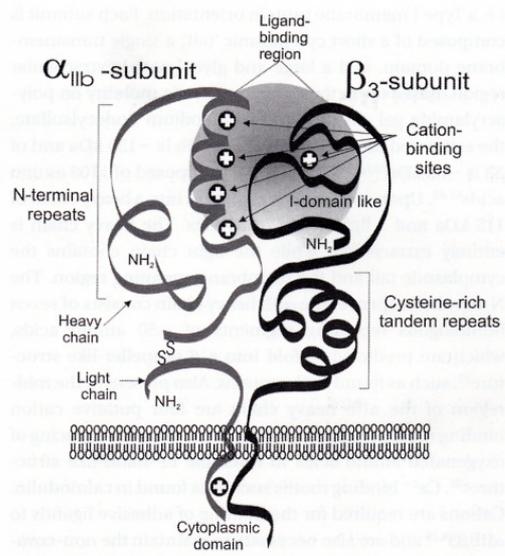


Abb 1.f. Rezeptorstruktur des Membranglykoproteins GP I**IIb/IIIa**

Fibrinogen besitzt im wesentliche zwei Aminosäuresequenzen, die RGD- und die KQAGDV-Sequenz, über die es mit dem Rezeptor in Kontakt treten kann. Diese Signalsequenzen werden von spezifischen Bindungsregionen innerhalb des Moleküls erkannt. Die Bindung von Fibrinogen an den aktivierten GP I**IIb/IIIa**-Rezeptor induziert eine weitere Konformationsänderung des Rezeptors mit Freilegung von kryptischen Epitopen (LIBS = ligandeninduzierte Bindungsstellen) (ligandenbesetzter Funktionszustand). Diese Konformationsänderung reguliert Mechanismen, welche an der transmembranen Signaltransduktion und der irreversiblen Fibrinogenbindung an den Rezeptor beteiligt sind

(„postoccupancy events“). Interessanterweise können kleine Peptide vom RGD- oder KQAGDV-Typ oder synthetische Fibrinogenrezeptorantagonisten an den nicht-aktivierten Rezeptor binden und zur Konformationsänderung führen (intrinsische Aktivität von GP IIb/IIIa-Antagonisten). Daneben können durch die intrinsische Aktivität der GP IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten unter bestimmten Bedingungen proaggregatorische Effekte induziert werden (Peter et al. 2000).

1.3. Gerinnungshemmende Pharmaka

1.3.1. Antithrombozytäre Substanzen

In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl von Medikamenten entwickelt, die diskrete Mechanismen der Thrombozyten beeinflussen. Die antithrombozytären Pharmaka können im wesentlichen in drei Gruppen unterteilt werden.

1. *Acetylsalizylsäure*

ASS hemmt selektiv und irreversibel die Zyklooxygenase I, ein ubiquitär im Organismus vorkommendes Enzym, das die Biosynthese von Prostaglandinen und anderen Eikosanoiden katalysiert. In den Blutplättchen wird hauptsächlich die Synthese von Thromboxan inhibiert, welches vasokonstriktorisch wirkt und die Aggregation der Thrombozyten fördert.

2. *Thienopyridine (Ticlopidin, Clopidogrel)*

Bisher nur unvollständig charakterisierte Metaboliten der Thienopyridine interferieren mit der ADP-induzierten Thrombozytenaktivierung und hemmen die Thrombozyten wie ASS irreversibel durch Blockade des ADP P2Y₁₂ Rezeptors.

3. GP IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten

Handelsübliche GP IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten blockieren, unabhängig von der Art der Aktivierung, die Fibrinogenbindung und hemmen dadurch effektiv die Aggregation. Bisher wurden vier Antagonisten in großen klinischen Studien der Phase III untersucht.

Abciximab®

Bereits in den frühen achtziger Jahren wurde von Coller und Mitarbeitern der Mausantikörper 7E3 entwickelt, welcher den GP IIb/IIIa-Komplex blockiert. Abciximab ist ein humanisiertes

chimerisches Fab-Fragment, das nur noch die variable Region des ursprünglichen Mausantikörpers besitzt.

Eptifibatide®

Eptifibatide, ein zyklisches KGD-Peptid, bindet kompetitiv im Bereich der RGD-Erkennungsregion des GP IIb/IIIa-Rezeptors.

Aggrastat®, Lamifiban®

Aggrastat ist eine chemische Substanz, die entsprechend der dreidimensionalen Struktur des RGD-Peptides modelliert wurde.

1.3.2. Eine neue Generation von GP IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten, Prototyp: MA2

Ein durch "antibody phage-display Technologie" hergestellter single-chain Antikörper MA2 zeigt viele Vorteile gegenüber handelsüblichen Präparaten. Er zeichnet sich aus durch eine sehr hohe Spezifität für der aktivierten hochaffinen Zustand des GP IIb/IIIa-Rezeptors, so dass er nahezu ausschließlich an aktivierte Plättchen bindet. MA2 ist in der Lage, die Bindung von löslichem Fibrinogen zu blockieren und die Plättchenaggregation effektiv zu hemmen. Er inhibiert hingegen nicht die Adhäsion von nicht-aktivierten Plättchen auf immobilisiertem Fibrinogen. Die Ausbildung eines Plättchen-Monolayers am Ort einer Gefäßläsion ist also wenig beeinträchtigt. Des weiteren zeigt MA2 durch seine Aktivierungsspezifität keine intrinsische Aktivierung der ruhenden Plättchen und keine LIBS-Expression. Eine gefürchtete Komplikation der eingesetzten GP IIb/IIIa-Blocker, die Thrombozytopenie, könnte somit verhindert werden, da die körpereigene Immunantwort hauptsächlich gegen diese LIBS-Epitope gerichtet ist. Weiterhin könnte dadurch vermutlich der Thrombozyten-aktivierende Effekt der bisherigen GP IIb/IIIa-Blocker verhindert werden.

1.3.3. Antikoagulantien

1. Unfraktioniertes Heparin

Heparin ist das im nicht-ambulantem Bereich am häufigsten eingesetzte Antikoagulans. Es kommt v.a. in den Granula der Mastzellen und basophilen Granulozyten vor. Bei der Mastzelldegranulation (z. Bsp. bei allergischen Reaktionen) bewirkt Heparin die verminderte Gerinnbarkeit des Blutes.

Heparin verstärkt die Wirkung der antikoagulatorisch wirkenden Faktoren Antithrombin und Heparin-Cofaktor II. In erster Linie inhibiert der Heparin-AT-Komplex den Faktor Xa und

Thrombin. Der Heparin-Heparin-Cofaktor II-Komplex hemmt nur Thrombin. Prinzipiell scheinen nur die freien Formen der Hämostase-Faktoren inhibiert zu werden, nicht jedoch die an den Clot gebundenen. Nach der Bindung an den Faktor Xa und Thrombin dissoziiert der Heparin-AT-Komplex und Heparin wird frei, um weiteres AT bindend zu aktivieren. Die Affinität des Komplexes zu Faktor Xa ist wesentlich höher als die zu Thrombin.

Heparin wird aus Geweben (Schweinedarm, Rinderlunge) extrahiert.

2. *Niedermolekulares Heparin (LMWH = Low Molecular Weight Heparin)*

Niedermolekulare Heparine sind chemisch oder enzymatisch depolymerisierte Formen des Heparins. Die Ratio zwischen der Anti-Xa- und Anti-Thrombin-Inhibition ist im Gegensatz zu unfraktioniertem Heparin deutlich zugunsten des Faktor Xa verschoben.

3. *Hirudin*

Hirudin ist ein direkter Thrombin-Inhibitor, der, im Gegensatz zu indirekten Hemmern wie Heparin, einen außerordentlich stabilen Komplex mit Thrombin eingeht. Ein weiterer entscheidender Vorteil besteht darin, dass nicht nur freies, sondern auch an den Thrombus gebundenes Thrombin inhibiert wird. Gerade die Thrombus-gebundenen Faktoren sind besonders potente Aktivatoren der Hämostase. Des weiteren ist Hirudin resistent gegen endogene Inaktivatoren des hämostasiologischen Systems, denn es besitzt im menschlichen Organismus keinen natürlichen Inhibitor.

4. *Phyllochinonantagonisten*

Derivate des Cumarins, das in vielen Pflanzen als Glykosid enthalten ist, sind derzeit noch die Mittel der Wahl zur oralen Dauerantikoagulation. Sie inhibieren kompetitiv Vitamin K, das zur hepatischen Synthese der Hämostasefaktoren Thrombin, VII, IX und X notwendig ist. Unter Cumarin-Einfluss entstehen inkomplette Profaktoren, deren koagulatorische Aktivität stark abgeschwächt ist.

5. *Hochspezifische Faktor Xa Inhibition*

Zusammen mit dem Faktor Va bildet der Faktor Xa (fXa) den Prothrombinasekomplex auf der Oberfläche von Blutplättchen. Thrombus-assoziiertes fXa ist resistent gegen die indirekte Hemmung durch Antithrombin (AT) (Weitz et al. 1990), wodurch die rekurrente arterielle Thrombose trotz Antikoagulation mit Heparin erklärt wird. Weil der limitierende Faktor der Thrombin-Bildung der Faktor Xa ist (Rand et al. 1996), bildet er einen interessanten pharmakologischen Angriffspunkt am Konvergenzpunkt des intrinsischen und extrinsischen Gerinnungssystems. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass die direkte fXa Inhibition effektiv die Thrombusformation und sogar die Plättchenanlagerung hemmt (Schaffer et al.

1991), bei weitem besser als die direkte Thrombininhibition (Lynch et al. 1994) oder die indirekte fXa Inhibition durch LMWH (Prasa et al. 1997).

1.3.4. Tick Anticoagulant Peptide (TAP)

TAP ist ein neuartiger Serinprotease-Inhibitor, welcher sehr spezifisch den Faktor Xa hemmt. Ursprünglich wurde das aus 60 Aminosäuren bestehende Protein aus der Zecke *Ornithodoros moubata* isoliert (Waxman et al. 1990). Die Aminosäuresequenz zeigt eine gewisse Homologie zu den sogenannten Kunitz-Inhibitoren. Im Gegensatz zu diesen wirkt TAP hochspezifisch und vermag sogar im 300-fachen molaren Überschuss weder Kallikrein, VIIa, Trypsin, Chymotrypsin, noch Thrombin zu inhibieren. Auch rekombinantes rTAP wirkt hochselektiv gegen Faktor Xa (Neeper et al. 1990).

Der Reaktionsmechanismus der Inhibition ist komplex und einzigartig (Jordan et al. 1990; Dunwiddie et al. 1992; Jordan et al. 1992; Antuch et al. 1994; Lim-Wilby et al. 1995). Enzym und Inhibitor bilden schnell einen niedrig-affinen Komplex wobei die sog. "secondary binding site" am C-terminalen Ende eine entscheidende Rolle spielt (Wei et al. 1998; Wei et al. 1999). Interessanterweise bindet diese Region des rTAP auch noch an den Faktor Xa wenn dessen aktive Tasche blockiert ist (Jordan, Mao et al. 1992). In einem zweiten Schritt kann durch die hierdurch induzierte Umlagerung das N-terminale Ende die funktionelle Domäne des Faktor Xa sehr stabil blockieren. Beachtenswert für die antithrombotische Wirkung des rTAP ist weiterhin, dass der Faktor Xa im Prothrombinasekomplex (mit Faktor Va, Phospholipiden und Kalzium) 30 mal besser durch rTAP inhibiert wird als Faktor Xa alleine (Krishnaswamy et al. 1994). Die Hemmung spielt sich also insbesondere am Ort der Gerinnungsvorgänge (Gefäßläsion usw.) ab.

Durch die hohe Selektivität besitzt rTAP indirekt einen hervorragenden Hemmeffekt auf die Thrombinbildung, welcher sich signifikant von den bekannten LMWH abhebt (Prasa, Svendsen et al. 1997). rTAP zeichnet sich in verschiedenen Modellen und Studien als ausgezeichneten und sehr potenten Thromboseinhibitor ab (Schaffer, Davidson et al. 1991; Vlasuk et al. 1991; Sitko et al. 1992; McKenzie et al. 1996; Wong et al. 2000; Abendschein et al. 2001).

1.4. Die single-chain Antikörper (scFv)

Single-chain Antikörper sind rekombinante, über Linker verbundene Immunglobulin-Derivate aus den variablen Regionen der schweren und leichten Kette.

Antikörper sind Teil des Immunsystems, deren Hauptaufgabe es ist, Pathogene spezifisch zu binden und zu markieren. Sie bestehen aus zwei identischen schweren Ketten und zwei identischen leichten Ketten, die sowohl durch kovalente Bindungen (Disulfidbrücken) als auch durch nicht-kovalente Bindungen (Wasserstoffbrücken) verbunden werden.

Die Antigen-Bindungsspezifität eines Antikörpers wird nur von einem kleinen Teil des Gesamtproteins vermittelt: den *variablen* Regionen. Diese bestehen aus drei bis vier unterschiedlichen Modulen, die während der Differenzierung der B-Lymphozyten in jeder Zelle anders zusammengesetzt werden. Innerhalb jeder Variablen Region finden sich jeweils drei Peptidabschnitte von ca. 5 – 15 Aminosäuren, die eine Vielzahl unterschiedlicher Peptidsequenzen enthalten können. Diese *hypervariablen* Regionen sind über die Länge der Antikörpersequenz verteilt. Sie finden sich jedoch immer an der Außenseite des fertig gefalteten Antikörpers zusammen. Insgesamt sechs dieser hypervariablen Regionen (je drei der variablen Regionen der schweren und der leichten Kette) stellen die eigentliche Kontaktstelle des Antikörpers zum Antigen dar. Man nennt sie auch CDR (*complementary determining regions*). Der restliche Teil der variablen Regionen hat dabei die Aufgabe, die räumliche Struktur der hypervariablen Bereiche zu stabilisieren.

Die beiden variablen Domänen der leichten und schweren Kette bilden gemeinsam die Antigenbindungsstelle. Der Zusammenhalt dieser Domänen alleine ist jedoch relativ schwach. Zusätzliche Bindungen sind notwendig, um das Antikörpermolekül zu stabilisieren. Diese Bindungen werden durch die *konstanten Regionen* bereitgestellt. Eine Disulfidbrücke zwischen den konstanten Regionen der leichten und der schweren Kette sorgt für deren kovalenten Zusammenhalt. Weitere Disulfidbrücken verbinden die konstanten Domänen der schweren Ketten zu einem Dimer. Je zwei gleiche Antigenbindungsstellen werden also in einem Molekülkomplex vereinigt und geben dadurch der Antikörpergrundstruktur ihre charakteristische Y-Form.

Aufgrund ihrer spezifischen Bindungseigenschaften haben Antikörper seit Jahrzehnten eine große Bedeutung für Forschung und Diagnose. Die klassische Herstellung von Antikörpern definierter Spezifität beruht auf der Immunisierung von Versuchstieren mit einem Antigen.

Die so gewonnenen Antiseren enthalten ein Gemisch von Antikörpern verschiedener Bindungsspezifitäten; man spricht von *polyklonalen Antikörpern*.

In den siebziger Jahren wurde von Köhler und Milstein eine neue Methode zur Antikörpergewinnung entwickelt, die Hybridomtechnik (Kohler and Milstein 1975). Hierdurch war es zum ersten Mal möglich, *monoklonale Antikörper* mit definierter Spezifität herzustellen.

Für viele Anwendungen wird eine möglichst kleine antigenbindende Einheit benötigt. Praktisch handhabbar waren dabei vor der Entwicklung der rekombinanten Technologie nur die sog. *Fab-Fragmente*, die durch Proteaseverdau aus herkömmlichen Antikörpern entstehen. Ein Fab-Fragment besteht aus den variablen Regionen beider Ketten, die durch jeweils eine anschließende konstante Region zusammengehalten werden.

In den letzten Jahren wurde mit der Konstruktion von *rekombinanten Antikörpern* ein auf gentechnologischen Methoden beruhender Weg zur Herstellung von Antikörperfragmenten eröffnet. Dabei wurden die Antikörper nicht mehr in einem Versuchstier erzeugt, sondern *in vitro* in Bakterien oder Zellkulturzellen. Im Mittelpunkt steht dabei der antigenbindende Teil des Antikörpers. Das kleinste Molekül, das noch die gesamte Bindungsstelle enthält, besteht nur noch aus den variablen Regionen der schweren und leichten Kette (VH und VL, s. Abb.). Diese Fragmente werden Fv (Fragment des variablen Teils) genannt. Da ihnen die kovalente Verknüpfung durch die konstanten Ketten fehlt, müssen sie stabilisiert werden. Meist werden dafür die variablen Domänen durch einen Peptid-Linker zu einem einzigen Proteinstrang verbunden. Dabei entstehen die sog. *single-chain-Fv-Fragmente* (= scFv-Antikörper).

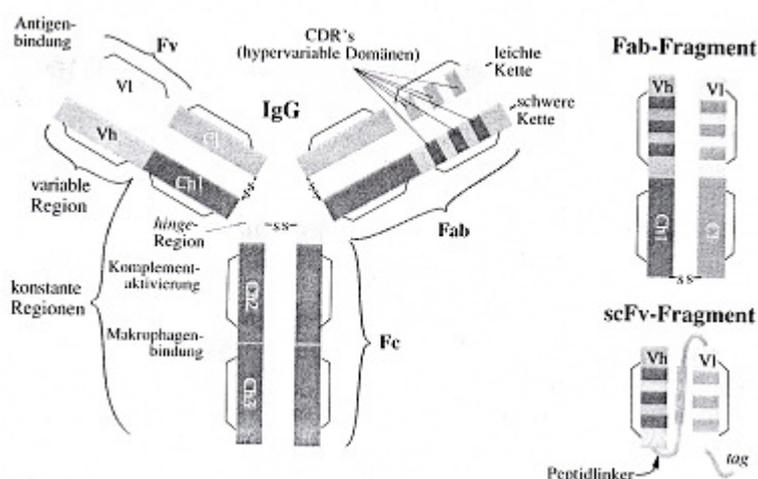


Abb. 1.g. Schematische Darstellung eines Immunglobulins und davon abgeleiteten antigenbindenden Teilstücken (Breitling F, Dübel S (1997) Rekombinante Antikörper. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin)

Die Verwendung von scFv hat viele potentiellen Vorteile : sie können in prokaryontischen Systemen exprimiert werden, die sich durch schnelle, ergiebige und stabile Expression auszeichnen. Die Bakterienklone sind in ihrer Handhabung, Kultur, Analyse und Lagerung meist einfacher und billiger als die entsprechenden Hybridom-Zellklone. Des weiteren ist ihre immunogene Potenz gering (Rodwell 1989), aufgrund der Abwesenheit der Komplement-System aktivierenden Fc-Region (Bird et al. 1988).

1.5. Therapeutische Antikörperfusionsproteine

Im venösen System bestehen Thromben hauptsächlich aus einem Fibrinnetzwerk mit eingeschlossenen Blutplättchen und Erythrozyten, während arterielle Thromben zum größten Teil aus wandständigen Thrombozyten zusammengesetzt sind. Um die therapeutische Wirksamkeit von Antikoagulantien zu verstärken und gleichzeitig die unerwünschten systemischen Nebenwirkungen zu verringern, wäre es sinnvoll, diese am Ort der Gerinnung an den Thromben zu konzentrieren. Dies lässt sich durch Fusionierung der Antikoagulantien mit Antikörpern erreichen, welche eine Spezifität für die Oberfläche von sich bildenden Thromben besitzen.

Im Fall von venösen Gerinnseln bietet sich die Kopplung von Hämostatika an fibrinspezifische Antikörper an, um sie am gewünschten Wirkort zu konzentrieren. Damit liegen die Antikoagulantien in lokal erhöhten und systemisch niedrigen Konzentrationen vor. Man spricht von einem *Targeting*. Da arterielle Thromben hauptsächlich aus Thrombozyten bestehen, bietet sich hier die Fusionierung an thrombozytenspezifische Antikörper an.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Fusionsproteine hergestellt und ausgetestet : 1. TAP wurde an den fibrinspezifischen scFv_{59d8} gekoppelt

2. TAP wurde an den thrombozytenspezifischen scFv_{MA2} gekoppelt

Beide Konstrukte sollen hier kurz vorgestellt werden.

1.5.1. Das fibrinspezifische Fusionsprotein scFv_{59d8}-TAP

Der scFv_{59d8} bindet mit hoher Spezifität an die ersten 7 aminoterminalen Aminosäuren der β -Kette des Fibrins (β_{1-7}), nicht aber an Fibrinogen (Hui et al.). Durch Abspaltung des Fibrinopeptids B von der β -Kette des Fibrinogens durch Thrombin werden in der β -Kette

diese 7 Aminosäuren als angreifbares Epitop präsentiert. In dieser Arbeit wurde das synthetisch hergestellte β_{1-7} -Peptid als spezifisches Antigen verwendet. Als Negativ-Kontrolle wurde ein unspezifisches Peptid-Antigen mit dem im hämostasiologischen System häufig vorkommenden RGD-Motiv verwendet.

Die Kopplung des Antifibrin-Antikörpers wurde ursprünglich mit Plasminogenaktivatoren durchgeführt, wobei für diese Versuche kein scFv, sondern ein kompletter Antikörper eingesetzt wurde (Bode et al. 1985). Hieraus entwickelte sich die Idee, Antikoagulantien mit dem fibrinspezifischen scFv_{59d8} zu koppeln (Peter, Graeber et al. 2000). Dadurch sollte ein Targeting der antikoagulatorisch wirksamen Substanzen an den Thrombus erreicht werden. Die vorliegende Arbeit untersucht u.a. die Fusionierung des oben beschriebenen Faktor Xa Inhibitors TAP mit dem scFv_{59d8}. Ziel war dessen lokale Anreicherung am fibrinreichen *venösen* Thrombus mit geringen systemischen Nebenwirkungen.

1.5.2. Das thrombozytenspezifische Fusionsprotein scFv_{MA2}-TAP

Der scFv_{MA2} ist ein aktivierungsspezifischer GP IIb/IIIa-Rezeptorblocker und besitzt gegenüber den handelsüblichen Thrombozytenaggregationshemmern viele Vorteile (s.u. 2.3.2.). Die Fusionierung des thrombozytenspezifischen scFv_{MA2} mit dem Faktor Xa Inhibitor TAP schließt eine therapeutische Lücke: bifunktionale Proteine aus einer thrombozytenhemmenden und einer antikoagulatorischen Domäne besitzen zwei antihämostatisch wirksame Funktionen. Während der GP IIb/IIIa blockierende Antikörper die Thrombozytenaggregation (primäre Hämostase) hemmt, inhibiert das Antikoagulans TAP die Fibrinbildung (sekundäre Hämostase). Da beide Teile des hämostatischen Systems (Aggregation und Koagulation) eng miteinander verknüpft sind und sich gegenseitig aktivieren, potenziert sich die inhibitorische Wirkung des bifunktionalen Moleküls. Weiterhin kann man ein Targeting des Fusionsproteins am thrombozytenreichen Thrombus des *arteriellen* Systems (z.Bsp. in den Koronarien) erreichen.

2. Materialien

Alle Lösungen (z. Bsp. Medien oder Puffer) wurden, wenn nicht anders erwähnt, mit Aqua destillata angefertigt.

2.1. Materialien der gentechnischen Arbeiten

2.1.1. Kultivierung von Bakterien

1. Kultivierung von *E.coli* in Medium

LB Medium	Luria Broth Base (Miller's LB Broth Base) GIBCOBRL, Paisley, Scotland, #12795-027
Ampicillin	GERBU Biotechnik, Gaiberg, Deutschland, #1046
Glucose	ROTH, Karlsruhe, Deutschland, #6887.1
TG1 <i>E.coli</i>	TG1 Electroporation Competent Cells Stratagene, La Jolla, USA, #200123
XL1-Blue <i>E.coli</i>	XL1-Blue Competent Cells Stratagene, La Jolla, USA, #200249

2. Kultivierung von *E.coli* auf Agar

LB Agar	LB AGAR (LENNOX L AGAR) GIBCOBRL, Paisley, Scotland, #22700-025
Ampicillin	GERBU Biotechnik, Gaiberg, Deutschland, #1046
Glucose	ROTH, Karlsruhe, Deutschland, #6887.1

2.1.2. Glycerolstocks

Glycerol	SIGMA – Aldrich, Steinheim, Deutschland, #G5516
Trockeneis	
Ethanol	Mallinckrodt Baker BV, Deventer, Holland, #8006

2.1.3. Isolation von Plasmid-DNA aus E.coli

QIAprep-spin®-Plasmid-Preparation-Kit, QIAGEN, Hilden, Deutschland, #27106

2.1.4. Agarose-Gel-Elektrophorese

Agarose	Agarose NEEO Ultra-Qualität ROTH, Karlsruhe, Deutschland, #2267.2
50 x TAE Stammlösung	2M Tris (SIGMA – Aldrich, Steinheim, Deutschland, #T-6791) 5mM EDTA (ROTH, Karlsruhe, Deutschland, #8040) 5,5 % vol % conc. Essigsäure (MERCK, Darmstadt, Deutschland, #1.00063.1011)
Ethidiumbromid	GERBU Biotechnik, Gaiberg, Deutschland, #3041
6x DNA-Ladepuffer	Blue/Orange 6x Loading Dye 0,03 % Bromphenolblau, 0,03 % Xylencyanol, 0,4 % Orange G, 10 mM Tris HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0 Promega, Madison, USA, #G1881
DNA Marker	SmartLadder (200-10000 bp), EUROAGENTEC, Seraing, Belgien, #MW-1700-02

2.1.5. DNA-Restriktion

Enzyme	Typ-II-Restriktionsendonukleasen der Firma Roche, Mannheim, Deutschland
Puffer	spezielle 10x-Puffer Systeme, kompatibel zu den jeweiligen Endonukleasen, Roche

2.1.6. Gelelution von DNA-Fragmenten

QIAquick®-Gel-Extraction-Kit, QIAGEN, Hilden, Deutschland, #28704

2.1.7. DNA-Konzentrationsbestimmung

Es wurden die gleichen Materialien wie zur Agarose-Gel-Elektrophorese benutzt.

2.1.8. Dephosphorylierung

AP-ase (CIP)	Alkalische Phosphatase (calf intestine phosphatase) 10x Puffer, zur AP-ase kompatibel Roche, Mannheim, Deutschland, #713023
--------------	---

2.1.9. DNA-Ligation

Rapid DNA-Ligation Kit, Roche, Mannheim, Deutschland, #1635379

2.1.10. DNA-Transformation und Selektion eines Plasmid-positiven Klons

SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland, #15544-034
TG1 Bakterien	TG1 Electroporation Competent Cells Stratagene, La Jolla, USA, #200123

2.1.11. Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

Taq PCR Master Mix Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland, #201443
Primer	MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland

2.1.12. Herstellung einer natürlichen Phagenbibliothek

Die Phagenbibliothek wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Firma *Affimed Therapeutics*, Heidelberg, Deutschland.

2.1.13. Phage-display durch oberflächenverankerte scFv auf filamentösen Phagen und Panning

HEPES modifizierte Tyrode	HEPES (ROTH, Karlsruhe, Deutschland, #9105.2), 150 mM NaCl (MERCK, Darmstadt, Deutschland, #106400), 2.5 mM KCl (MERCK, Darmstadt, Deutschland, #1.05.001.1000), 1.2 mM NaHCO ₃ (ROTH, Karlsruhe, Deutschland, #8551.1), 2 mM MgCl ₂ (SIGMA – Aldrich, Steinheim, Deutschland, #M-8266), 2 mM CaCl ₂ (ROTH, Karlsruhe, Deutschland, #A.119.1), 0.1 % BSA (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland, #11930), 0.1 % Glucose (ROTH, Karlsruhe, Deutschland, #6887.1)
M13K07 Helfer Phagen	Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ, USA, #27-1524-01
PVP	Phagenverdünnender Puffer 10 mM Tris (SIGMA – Aldrich), 20 mM NaCl (MERCK), 2mM EDTA (ROTH), pH 7,5
Elutionspuffer	0,1 M Glycin (GERBU Biotechnik, Gaiberg, Deutschland, #1023), pH 2,2
Neutralisationspuffer	2 M Tris (SIGMA – Aldrich), pH 8
ReoPro®	Abciximab, Centocor B.V., Leiden, Niederlande
Tetracycline	SIGMA-Aldrich, Steinheim, Deutschland, #T-7660
Kanamycin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland, #55-0204
PEG	Polyethylenglykol, ROTH, Karlsruhe, Deutschland, #0158.1

2.2. Materialien der proteinbiochemischen Arbeiten

2.2.1. Induktion der Proteinexpression

TG1 Bakterien	TG1 Electroporation Competent Cells Stratagene, La Jolla, USA, #200123
Vector	pHog21
IPTG	Isopröpyl-, D-thiogalactopyranoside

	GERBU Biotechnik, Gaiberg, Deutschland, #1010
LB Medium	Luria Broth Base (Miller's LB Broth Base) GIBCOBRL, Paisley, Scotland, #12795-027

2.2.2. Protein-Isolation

Periplasmaschocklösung	20 % Saccharose (GERBU Biotechnik, Gaiberg, Deutschland, #1331), 50 mM Tris (SIGMA – Aldrich), 1 mM EDTA (ROTH), pH 8
BugBuster Protein	Novagen, Inc., Madison, US, #70921-4
Extraction Reagent	
Benzonase Nuclease	Novagen, #70746-3

2.2.3. Protein-Aufreinigung durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie

Ni ⁺ NTA Agarose	QIAGEN, Hilden, Deutschland, #30210
Dialysepuffer A	50 mM NaH ₂ PO ₄ (SIGMA – Aldrich, Steinheim, Deutschland, #S-9638), 300 mM NaCl (MERCK, Darmstadt, Deutschland, #106400), 10 mM Imidazol (SIGMA – Aldrich, Steinheim, Deutschland, #I – 2399), pH 8
Waschpuffer B	50 mM NaH ₂ PO ₄ (SIGMA – Aldrich), 300 mM NaCl (MERCK), 20 mM Imidazol (SIGMA – Aldrich), pH 8
Elutionspuffer C	50 mM NaH ₂ PO ₄ (SIGMA – Aldrich), 300 mM NaCl (MERCK), 250 mM Imidazol (SIGMA – Aldrich), pH 8

2.2.4. Dialyse

Dialysepuffer A	50 mM NaH ₂ PO ₄ (SIGMA – Aldrich, Steinheim, Deutschland, #S-9638), 300 mM NaCl (MERCK, Darmstadt, Deutschland, #106400), 10 mM Imidazol (SIGMA – Aldrich, Steinheim, Deutschland, #I – 2399), pH 8
PBS – Puffer	Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline without Ca and Mg Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien, #BE17-515F
Dialysemembran	Spectra/Por® molecular porous membrane tubing Spektrum Laboratories, Inc., Rancho Dominguez, CA, USA
Dialysekammern	Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassette (Extra-Strength) Pierce, Rockford, IL, USA, #66380

2.2.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Probenpuffer 5x	250 mM Tris (SIGMA – Aldrich), 10 % Sodium Dodecylsulfat (GERBU Biotechnik, Gaiberg, Deutschland, #1113), 0,5 % Bromphenolblau (SIGMA – Aldrich, Steinheim, Deutschland, #B 5525), 50 % Glycerol (SIGMA – Aldrich, Steinheim, Deutschland #G5516), 500 mM Dithiothreitol (ROTH, Karlsruhe, Deutschland, #6908.1)
Acrylamid 4 K Lösung 30 %	AppliChem, Darmstadt, Deutschland, #1672
TEMED Lösung	N-,N-,N-,N-Tetramethylethylendiamin AppliChem, Darmstadt, Deutschland, #1148
APS	Ammoniumpersulfat (SIGMA – Aldrich, Steinheim, Deutschland, #A-7460)

1,5 M Tris Puffer pH 8,8

0,5 M Tris Puffer pH 6,8

Elektrophoresepuffer 25 mM Tris (SIGMA –Aldrich), 190 mM Glycin (GERBU Biotechnik, Gaiberg, Deutschland, #1023), 0,1 % SDS (GERBU)

Protein Marker

Prestained Protein Marker Broad Range

New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland, #7708

Fertiggele

Ready Gel, BIO-RAD, Hercules, CA, USA

12% Tris-HCl, #161-1120

4 – 20 % Tris-HCl, #161-1177

2.2.6. Coomassie-Färbung von SDS-PAGelen

Bio-Safe Coomassie

BIO-RAD, #161-0786

2.2.7. Western-Blot

5x Towbin Puffer

125 mM Tris (SIGMA - Aldrich), 960 mM Glycin (GERBU Biotechnik), 1 ml 10 % SDS (GERBU)

1x Towbin Puffer

700 ml H₂O, 200 ml 5x Towbin Puffer, 100 ml Methanol (MERCK, Darmstadt, Deutschland, #106007)

Gold Färbung

Colloidal Gold Total Protein Stain

BIO-RAD, Hercules, CA, USA, #170-6527

2.2.8. Immunfärbung der geblotteten Proteine

PBS-Tween	PBS mit 0,2 % Tween 20 (ROTH, Karlsruhe, Deutschland, #9127.1)
Blockpuffer	PBS-Tween mit 1% BSA Albumin Bovine Fraction V (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland, #11930)
Anti-His ₆ -HRP-Antikörper	Roche, Mannheim, Deutschland, #1965085
Chemilumineszenz-Substrat	SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Pierce, Rockford, IL, USA, #34080

2.2.9. Protein-Konzentrations-Bestimmung

1. Absorptionsmessung bei $\lambda = 280 \text{ nm}$

Die Protein-Konzentrations-Bestimmung mittels Photometrie erforderte keine speziellen Materialien.

2. BCA Protein-Assay

BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL, USA, #23225
BSA-Standard-Lösungen	arithmetische Verdünnungsreihe von bovinem Serumalbumin (SERVA, Heidelberg, Deutschland) in folgenden Konzentrationen: 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 50, 25 $\mu\text{g/ml}$

2.3. Materialien der funktionellen Testung

2.3.1. ELISA (Enzyme-Linked immuno sorbent assay)

β_{1-7} -Peptid	Gly-His-Arg-Pro-Leu-Asp-Lys-Cys; Reinheit > 90 %; MWG-BIOTECH, Ebersberg, Deutschland
β_{1-7} -Peptid-Lösung	2 μ g/ml in Coating-Puffer
GRGDSP-Peptid	Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro
GRGDSP-Lösung	2 μ g/ml in Coating-Puffer
Coating-Puffer	1,6 g/l Na_2CO_3 (MERCCK, Darmstadt, Deutschland, #1.06392.0500), 3 g/l NaHCO_3 (ROTH, Karlsruhe, Deutschland, #8551.1), pH 9,6
Block Puffer	PBS, 1 % BSA
Fab $_{59d8}$	gewonnen aus Aszites
Wasch Puffer	PBS, 0,05 % (v/v) Tween 20 (ROTH, Karlsruhe, Deutschland)
Anti-His $_6$ -Antikörper	Penta · His Antibody QIAGEN, Hilden, Deutschland, #34660
Sekundärantikörper	Goat-Anti-Mouse
TMB Peroxidase Substrat	Pierce, Rockford, IL, USA, #1854050

2.3.2. Faktor-Xa-Inhibitions-Assay

Factor Xa	humaner aktivierter Faktor Xa Enzyme Research Labs, South Bend, IN, USA, #HFXA1011
Tyrode Puffer	150 mM NaCl (MERCK), 2.5 mM KCl (MERCK, Darmstadt, Deutschland, #1.05.001.1000), 1.2 mM NaHCO ₃ (ROTH), 2 mM MgCl ₂ (SIGMA – Aldrich, Steinheim, Deutschland, #M-8266), 2 mM CaCl ₂ (ROTH, Karlsruhe, Deutschland, #A.119.1), 0.1 % BSA (SERVA), 0.1 % Glucose (ROTH)
Spektrozyme fXa	chromogenes Substrat für den Nachweis von aktiviertem fXa American Diagnostica, Greenwich, USA, #222L

2.3.3. Bifunktionaler Assay für die Konstrukte scFv_{59d8}-TAP und scFv_{59d8}-Xa-TAP

S. u. 2.3.1. und 2.3.2.

2.3.4. Blutentnahme

S-Monovette 5 ml	enthält 0,5 ml Citratlösung Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland, #05.1071
Butterfly®-21	Abbott, Sligo, Ireland, #4492A05

2.3.5. Herstellung von PRP (Platelet Rich Plasma) und PPP (Platelet Poor Plasma)

Es wurden keine speziellen Materialien verwendet.

2.3.6. Waschen der Thrombozyten

Sepharose CL-2B	SIGMA – Aldrich, Steinheim, Deutschland, #CL-2B-300
Tyrode Puffer	s.u. 2.3.2.
Säulen	Disposable 5 ml Polypropylene Columns Pierce, Rockford, USA, #29922

2.3.7. FACS-Analyse von Thrombozyten

Tyrode Puffer	s.u. 2.3.2.
ADP	Mölab, Hilden, Deutschland, #0203011
CellFIX™	Fixationslösung BD Biosciences, Erembodegem, Belgien, #340181
Anti-His(6)-FITC	FITC-gekoppelter Anti-His(6)-Antikörper Dianova, Hamburg, Deutschland, #Dia920
Fibrinogen-Antikörper	WAK-Chemie Medical GmbH, Steinbach, Deutschland

2.3.12. Whole-Blood-Clot-Assay

Aktiviertes PTT Reagenz	Dade® Actin® FS Aktiviertes PTT-Reagenz Dade Behring, Marburg, Deutschland, #B4218-20
I ¹²⁵ Fibrinogen	Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK, #IM53
CaCl ₂	ROTH, Karlsruhe, Deutschland, #A119.1
Rotilabo®-Silikon-Schlauch	Innen-Ø 4 mm, ROTH, #9566.1
PBS Puffer	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline without Ca and Mg Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien, #BE17-515F

3. Methodik

3.1. Methoden der gentechnischen Arbeiten

3.1.1. Kultivierung von Bakterien

1. Kultivierung von E.coli in Medium

Das LB Medium wurde entsprechend den Angaben des Herstellers in ddH₂O gelöst und für 15 min bei 121 °C autoklaviert. Anschließend wurde Ampicillin in einer Konzentration von 50 µg/ml addiert und das Medium bei 4 °C gelagert. Zum Herstellen einer Vorkultur wurden zu 5 ml Medium sterilfiltrierte Glukose (Endkonzentration 0,1 M) hinzugegeben. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde eine gepickte Einzelkolonie in das Medium überführt und bei 37 °C und 280 rpm für 8 h inkubiert.

Entsprechend den Anwendungen wurden verschiedene E.coli Kulturen in diversen Volumina bei unterschiedlichen Temperaturen für eine entsprechende Zeit inkubiert.

2. Kultivierung von E.coli auf Agar

Zur Agar-Platten-Herstellung wurde LB Agar entsprechend den Angaben des Herstellers in ddH₂O gelöst und für 15 min bei 121 °C autoklaviert. Nach dem Abkühlen des Agars auf 50 °C wurde unter ständigem Rühren sterilfiltriertes Ampicillin in einer Konzentration von 50 µg/ml hinzugegeben. Je 30 ml wurden in sterile Petrischalen gegossen. Nach Aushärtung des Agars wurden die Schalen bei 4 °C gelagert.

Mittels einer sterilen Impföse wurden die Bakterien einer Übernachtskultur ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von 16 h bei 37 °C wurden die Platten mit deutlichen Einzelkolonien bei 4 °C gelagert.

3.1.2. Glycerolstocks

Glycerolstocks erlauben es, Bakterienkulturen dauerhaft haltbar zu machen. Hierzu wurde zu 750 µl einer frischen stationären Bakterienkultur 250 µl steriles Glycerol pipettiert. Diese Mischung wurde schockgefroren (in Ethanol mit Trockeneis) und dann bei – 80 °C gelagert.

3.1.3. Isolation von Plasmid-DNA aus E.coli

Zur Präparation und Purifikation von Plasmid-DNA aus E.coli wurden die entsprechenden Protokolle und Systeme der Fa. QIAGEN (Hilden) verwendet. Die Methode basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterien mit Extraktion der DNA und ihrer Bindung an eine Silikat-Membran unter Bedingungen hoher Salzkonzentrationen und niederer pH-Werte (< 7,5). Unter basischem pH und niederen Salzkonzentrationen kann die gebundene und gewaschene DNA eluiert werden. Die Methode basiert auf dem Prinzip der Anionenaustauschchromatographie.

3.1.4. Agarose-Gel-Elektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gel-Elektrophorese können DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Durch Variation des Agarose Gehaltes kann auf die aufzutrennenden Fragmentgrößen Einfluss genommen werden.

Die Agarose wurde zu 0,5 – 3 % in TAE-Puffer gelöst, bis zur vollständigen Klärung aufgeköcht und in eine mit einem Kamm versehene Gelkammer gegossen. Nach Polymerisation und Abkühlung wurde der Kamm aus dem nun festen Gel gezogen. In die entstandenen Taschen wurden die mit 6xDNA-Ladepuffer versetzten DNA-Proben geladen. Hierauf wurde das Gel bei 5 V/cm Elektrodenabstand laufen gelassen. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wurden bei ihrem Lauf in Richtung Anode entsprechend ihrer Größe und Schwere aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel 10 min in einem Ethidiumbromid-Bad inkubiert. Ethidiumbromid interkaliert in der DNA und fluoresziert unter UV-Licht, so dass auf diese Weise die DNA bezüglich ihrer Fragmente im Vergleich zu einem DNA-Marker analysiert und präpariert werden konnte.

3.1.5. DNA-Restriktion

Der analytische Restriktionsverdau von DNA dient der Charakterisierung von Plasmiden. Von präparativer Restriktion spricht man bei der Gewinnung von DNA-Fragmenten in größerem Maßstab für die in vitro Rekombination neuer Plasmide. Unter Verwendung von maximal 10% Restriktions-Endonukleasen unterschiedlicher Aktivitäten und Spezifitäten (je nach Applikation) und exakt 10% enzyspezifischen 10 x Puffers wurde der Verdau bei ebenfalls enzyspezifischen Temperaturen für 1 – 2 h inkubiert. Die Reaktionsbedingungen folgten den Herstellerangaben. Der Restriktionsansatz wurde anschließend in einem entsprechenden Agarose-Gel ausgewertet.

3.1.6. Gelelution von DNA-Fragmenten

Um gezielt verdaute DNA-Fragmente definierter Größe aus dem Agarose-Gel zu isolieren, wurde das QIAGEN Gel-Aufreinigungs-Kit verwendet. Dabei wurde das selektiv exzidierte Gelstück mit der Zielfragment-Bande zunächst durch Erhitzen bei 50 °C depolymerisiert. Die darin enthaltene DNA (> 100 bp) bindet bei einem pH < 7,5 unter hohen Salzkonzentrationen selektiv an die Silikat-Membran von Ionenaustauscher-Säulen. Gelöste Agarose und andere Verunreinigungen werden nicht gebunden bzw. durch einen Waschschrift entfernt. Die gereinigte DNA wurde anschließend unter basischem pH und niederen Salzkonzentrationen von der Membran eluiert.

3.1.7. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration einer Probe wurde photometrisch bestimmt. Dabei wurde die wässrige DNA-Probe gegen eine Messung von Wasser abgeglichen. Die Messungen der Absorption erfolgten bei den Wellenlängen $\lambda_1 = 260$ nm und $\lambda_2 = 280$ nm. Bei 260 nm haben Nukleinsäuren, bei 280 nm Proteine ihr Absorptionsmaximum. Eine optische Dichte von 1,0 bei einer Wellenlänge von 260 nm entspricht ungefähr einer DNA-Konzentration von 50 mg/ml, einer RNA-Konzentration von 40 mg/ml und einer Oligonukleotidkonzentration von 30 mg/ml. Die Messung bei 280 nm dient der Detektion von eventuellen Verunreinigungen durch Proteine.

3.1.8. Dephosphorylierung

Um die Ausbeute an Produkten der Ligation von Vektor und Insert zu erhöhen, wurden die 5'-terminalen Phosphatgruppen des Vektors (nur des Vektors!) mit Hilfe des Enzyms Alkalische Phosphatase (CIP = calf intestine phosphatase) abgespalten. Der Vektor wird an der Religation gehindert, da hierbei die veresternde Kondensation zwischen den 5'-Phosphatgruppen und den 3'-Hydroxylgruppen nicht mehr stattfindet. Für die Ligation zwischen Insert und Vektor stehen die nicht behandelten 5'-Termini des Inserts zur Verfügung. Die Präferenz des Inserts als Ligationspartner für den Vektor wurde zusätzlich durch einen molaren Überschuss an Insert im Ligationsansatz verstärkt.

CIP arbeitet in praktisch jedem Puffer, inklusive allen gängigen Restriktionspuffern. Die Dephosphorylierung erfolgte durch Addition von 1 µl CIP zum Restriktionsansatz des Vektors. Inaktiviert wurde die alkalische Phosphatase durch Gelelektrophorese.

3.1.9. DNA-Ligation

Mittels der T4-DNA-Ligase wurden die präparierten und aufgereinigten DNA-Fragmente ligiert. Zu diesem Zweck wurde das Rapid-DNA-Ligation-Kit der Firma ROCHE benutzt. 50 ng Vektor und 150 ng Insert wurden in 10 µl DNA-Dilutions-Puffer verdünnt und anschließend mit 10 µl 2 x T4-Ligations-Puffer versetzt. Hierauf erfolgte die Addition von 1 µl T4-Ligase. Nach bereits 5 min Inkubation bei RT war die Ligrationsreaktion abgeschlossen und der Ansatz konnte sofort zur Transformation verwendet werden. Zur Religationskontrolle wurde derselbe Ansatz, nur ohne Insert pipettiert.

3.1.10. Bakterien-Transformation und Selektion eines Plasmid-positiven Klons

500 µl Hitzeschock-kompetente E.coli wurden vorsichtig auf Eis aufgetaut. 100 µl dieser Suspension wurden mit der Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde diese Suspension für 60 sec einer Temperatur von 42 °C ausgesetzt. Durch den Hitzeschock wird die Bakterienmembran für die Plasmid-DNA durchlässiger, welche nun aufgenommen wird. Nach 2 min Inkubation auf Eis wurden 900 µl SOC Medium addiert und das Ganze 1 h bei 37 °C und 280 rpm geschüttelt. 50 – 100 µl transformierter Bakterien wurden auf Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht inkubiert. 5 – 10 Kolonien wurden am folgenden Tag gepickt und in 5 ml LBAG-Medium kultiviert. Nach Aufreinigung der

Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Mini Präp. Kit wurde diese sequenziert. Diese Arbeit wurde von der Firma Medigenomix durchgeführt.

Für den in dieser Arbeit benutzten und später näher beschriebenen Vektor pHog21 wurden folgende Sequenzierungsprimer verwendet:

Forward Primer PRO1: 5'-CTT TCC AGA CGT TAG TAA ATG-3'

Backward Primer HOGA: 5'-GGT CGA CGT TAA CCG ACA AAC-3'

Die Sequenzierungsdaten wurden mittels des Programms BLAST 2 mit der zu erwartenden Sequenz verglichen und der beste Klon für die weiteren Versuche ausgewählt.

3.1.11. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR = Polymerase Chain Reaction)

Die in dieser Arbeit angewandte Amplifikations-PCR wurde nach einem etablierten Standardprotokoll der Firma QIAGEN durchgeführt.

Die Reaktionsansätze besaßen folgende Zusammensetzung in einem Reaktionsvolumen von 100 µl:

- 50 µl MasterMix (2,5 U Taq DNA Polymerase, 1x QIAGEN PCR Puffer mit 1,5 mM MgCl₂, 200 µM von jeder dNTP)
- 10-50 pM Primer
- 100 ng Template-DNA
- auf 100 µl mit Aqua bidest. aufgefüllt

Die Temperatur-Zyklen wurden mit folgendem Temperatur-Zeit-Profil durchlaufen:

- 5 min Denaturieren bei 95 °C
- 30 Zyklen
 - 1 min 95 °C → Denaturierung
 - 1 min 67 °C → Annealing
 - 1 min 72 °C → Extension
- 7 min Endextension bei 72 °C
- Abkühlen auf 4 °C

3.1.12. Herstellung einer natürlichen Phagen-Bibliothek

Die Phagen-Bibliothek wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von *Affimed Therapeutics*, Heidelberg, Deutschland.

Auf die Einzelheiten der aufwendigen Konstruktion einer solchen Bibliothek kann im Rahmen dieser Arbeit nicht in Detail eingegangen werden. Es wird daher auf einschlägige Literatur verwiesen (Little et al. 1999)(F. Breitling, S. Dübel; Rekombinante Antikörper, Spektrum Verlag, 1997).

Aus peripheren Blutlymphozyten fünf gesunder Spender und aus Milzbiopsien sechs weiterer Spender wurde die mRNA mit Hilfe einem Satz speziell angefertigter PCR-Primer in cDNA umgeschrieben. Die variablen Regionen der schweren und leichten Kette wurden getrennt amplifiziert. Mittels eines homologen Set Primer wurden sie reamplifiziert, wobei Restriktionsschnittstellen für die anschließende Klonierung in das Phagemid pEXHAM1 angehängt wurden. Damit hat man die Information für eine schier unbegrenzte Zahl von Antikörpergenen ins Reagenzglas überführt. Aufgrund der Neukombination der schweren und leichten Ketten entsteht kaum ein identisches Antikörperfragment.

Der Vektor pEXHAM1 enthält neben einem His₆-Tag und einem Stop-Codon ein c-myc-Tag zwischen dem neu durch Rekombination eingefügten single-chain Antikörper und dem pIII-Gen (s. unten). Anschließend wurde das Phagemid in *E. coli* XL1 blue transformiert.

3.1.13. Phage-display durch oberflächenverankerte scFv auf filamentösen Phagen

Die Selektion und Isolierung eines bestimmten scFv wurde durch die Kopplung von Gen und Genprodukt möglich. Dieses Selektionsprinzip wurde 1985 durch G.P. Smith auf filamentöse Phagen übertragen. Diese bringen ihren Wirt *E. coli* nicht um, sondern verlangsamen lediglich sein Wachstum auf die Hälfte. Während eines Zellzyklus setzt dabei jedes Bakterium 100-200 Phagenpartikel frei.

Die Phagen sind sehr einfach aufgebaut. Das Genom besteht aus ca. 6500 bp, die von einem Tubulus aus etwa 2700 Proteinen des Genprodukts pVIII umgeben ist. Als einzige zusätzliche Bestandteile befinden sich je zusätzlich 5 Moleküle pVII und pIX an dem einen Ende und pIII und pVI an dem anderen Ende des filamentösen Phagenpartikels. In pIII können fremde Peptidsequenzen an unterschiedlichen Orten integriert werden, ohne dessen Funktion stark zu beeinträchtigen. Damit sind Gen und Genprodukt physisch gekoppelt!

1990 wurde auf diese Weise zum ersten Mal ein scFv in die pIII-Sequenz eingebaut und somit auf der Phagenoberfläche präsentiert. Weil das pIII in jeder Replikationsrunde exprimiert wird, da es für die Infektion der Phagen benötigt wird, wird das pIII-scFv-Fusionsprotein zum Selektionsnachteil. Die Replikation der Phagen ist stark beeinträchtigt. Umgangen wurde diese Problem durch die Verwendung von Phagemidvektoren. Ein Phagemid ist ein ganz normales Plasmid, das eine zusätzliche Eigenschaft besitzt: es enthält eine Sequenz aus dem Phagen genom, die alle Signale für die Verpackung in Phagenpartikel enthält. Bei Anwesenheit eines Helferphagen, der alle anderen Funktionen des filamentösen Phagen beisteuert, wird diese Phagemid-DNA in normale Phagenpartikel eingebaut.

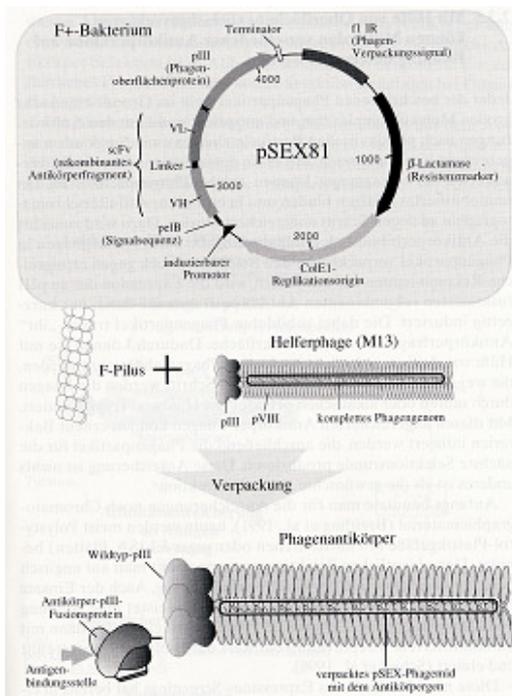


Abb. 3.a. Phagemide sind Plasmide, die zusätzlich ein Verpackungssignal der filamentösen Phagen besitzen. In Anwesenheit eines Helferphagen wird die Phagemid-DNA in Phagenpartikel eingebaut. Wird dabei gleichzeitig das Fusionsprotein scFv-pIII induziert, so entstehen Phagenpartikel, die ein Antikörperfragment auf der Oberfläche verankern. (Breitling F, Dübel S (1997) Rekombinante Antikörper. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin)

Auch in diesem Fall wird das wird der scFv-pIII auf der Phagenoberfläche verankert. Im Phagemid wird dieses Fusionsprotein jedoch nicht konstitutiv exprimiert, wie im obigen Fall, sondern von außen regulierbar unter der Kontrolle eines induzierbaren Promoters. Damit wird der Selektionsnachteil entscheidend gemildert.

3.1.14. Panning

Mit Hilfe des an der Oberfläche verankerten scFv-Fragmentes können die Phagenpartikel an ein immobilisiertes Antigen binden.

Zunächst wird die Antikörperbibliothek durch Zugabe eines Helferphagen in Phagenpartikel verpackt. Um den Selektionsdruck gegen erfolgreiche Rekombinanten zu verhindern, wird die Expression der an pIII fusionierten rekombinanten Antikörperfragmente dabei nur kurzzeitig induziert und können so an „ihr“ Antigen binden. In einem ersten Schritt werden die nicht an das Antigen bindenden Phagen gewaschen. Im nächsten Schritt werden die gebundenen Phagen durch sauren oder alkalischen pH oder mit Hilfe von Trypsin eluiert. Mit diesen angereicherten Antikörper-Phagen können erneut Bakterien infiziert werden, die anschließend die Phagenpartikel für die nächste Selektionsrunde produzieren. Man erreicht so die gewünschte „klonale Selektion“.

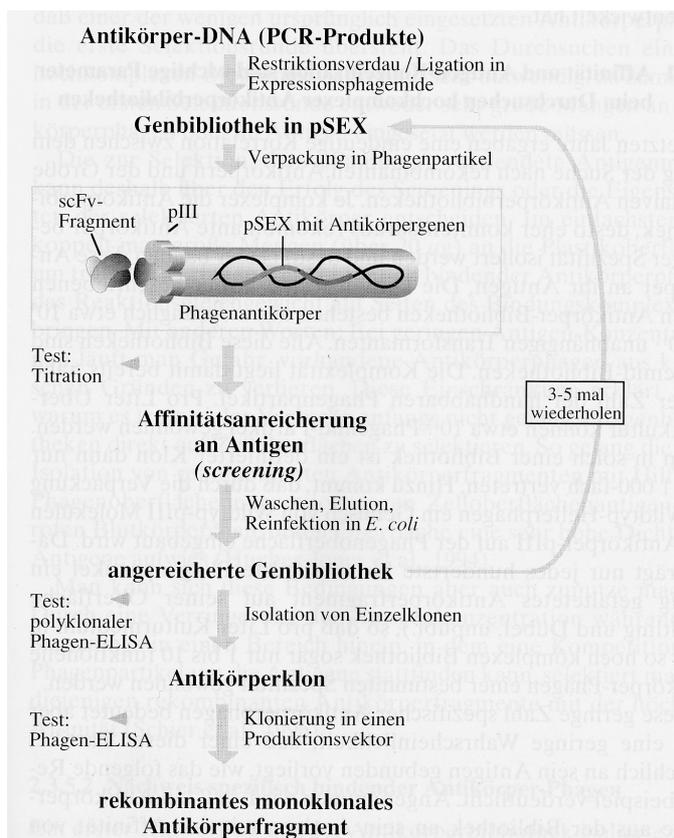


Abb. 3.b. Selektion von Phagen-Antikörpern aus einer Antikörperbibliothek (Breitling F, Dübel S (1997) *Rekombinante Antikörper*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin)

Ein erster Hinweis, ob aus der Antikörperbibliothek isolierte Antikörperfragmente tatsächlich binden, ergibt sich aus der Zahl der Phagenpartikel, die an dem immobilisierten Antigen kleben bleiben. Nimmt diese durch Titrierung bestimmbare Zahl mit den Selektionsrunden zu und bleiben an einem anderen Antigen sehr viel weniger Phagenpartikel kleben, so ist dies ein gutes Zeichen für eine spezifische Bindung des Antikörper-Phagen an sein Antigen.

In dieser Arbeit wurde eine Strategie entwickelt, um möglichst nur Phagen zu selektionieren, welche ausschließlich gegen den aktivierten Zustand des GP IIb/IIIa Rezeptors gerichtet sind. Die erste Panning-Runde wurde auf aktivierten humanen Plättchen vollzogen. $1,8 \times 10^{12}$ Phagen wurden zu 10^6 Thrombozyten in Tyrode Puffer addiert und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Hierauf wurden die Plättchen abzentrifugiert (10 min, 1000g) und der Überstand wurde mit frischen, durch 20 μ M ADP-stimulierten, gewaschenen Plättchen, für eine weitere Stunde inkubiert. Danach wurden die Thrombozyten zweimal in HEPES-modifiziertem Tyrode-Puffer gewaschen. Die gebundenen Phagen wurden durch zwei verschiedene Strategien eluiert: 1. durch Standard-Elution mit 0,1 M Glycin (pH = 2,2) für 15 min, gefolgt von einer Neutralisation mit 1/10 Volumen 2 M Tris HCl (pH = 8), 2. durch kompetitive Elution mittels hohen Abciximab-Konzentrationen (2 mg/ml) für 30 min.

XL 1 Blue E. coli wurden mit den eluierten Phagen infiziert und auf Agar Platten (50 mM Glucose, 10 μ g/ml Ampicillin und 20 μ g/ml Tetrazyklin) ausgestrichen. Die ausplattierten Bakterien wurden resuspendiert und mit M13 KO7 Helferphagen infiziert. Die nach anschließender Inkubation freigesetzten Phagen wurden mit PEG ausgefällt und für weitere zwei Panning-Runden verwendet. Zur Depletion wurden letztere Phagen mit 2×10^7 GP IIb/IIIa exprimierenden Wildtyp-CHO-Zellen inkubiert und zur Selektion mit CHO-Zellen, welche den aktivierten Rezeptor auf ihrer Oberfläche trugen (Peter and O'Toole 1995). Die weiteren Schritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

Zur anschließenden Expression der so erhaltenen spezifischen scFv-Antikörper, wurden diese aus dem pEXHAM1-Phagemid mittels der Restriktionsschnittstellen NcoI und NotI in den Expressionsvektor pHog21 umkloniert. Die Ligationsprodukte wurden in TG1 E. coli transformiert.

3.2. Methoden der proteinbiochemischen Arbeiten

3.2.1. Induktion der Proteinexpression

Die Fusionsproteine wurden in TG1 E.coli exprimiert. Wegen den unterschiedlichen Auswirkungen der Konstrukte auf die Bakterien kamen zwei verschiedene Expressionsmethoden zum Einsatz.

1. Expression der Konstrukte *scFv_{MA2}*, *scFv_{MA2}-TAP*, *scFv_{MA2mut}-TAP*

Hierzu wurde morgens eine frische Kolonie von einer LBAG Agarplatte gepickt und in 500 ml LB Medium mit 50 µg/ml Ampicillin überführt. Diese Kultur wurde für 16-20 h bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Durch Weglassen der Glucose wurde die Expression der Fusionsproteine nicht mehr reprimiert.

2. Expression der Konstrukte *scFv_{59d8}*, *scFv_{59d8}-TAP*, *scFv_{59d8}-Xa-TAP*

Hierzu wurde morgens eine frische Kolonie von einer LBAG Agarplatte gepickt und in 5 ml LBAG Medium überführt. Diese Kultur wurde für 5-8 h bei 37 °C inkubiert und anschließend in 500 ml LBAG weiter hochgezogen. Bei einer optischen Dichte der Kultur von 0,8 – 1 wurden die Bakterien 10 min bei 5500 rpm abzentrifugiert. Resuspendiert in frischen 500 ml LB Medium (ohne Glucose) konnten die E.coli bei 16 – 20 °C und 200 rpm die Konstrukte über Nacht exprimieren.

3.2.2. Protein-Isolation

Zwei Isolations-Methoden kamen unabhängig vom jeweiligen Konstrukt zum Einsatz:

1. Periplasma-Präparation

Hierdurch sollen nur die periplasmatisch exprimierten Proteine des Bakteriums isoliert werden. 500 ml induzierter Bakterienkultur wurden 10 min bei 5500 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 ml eiskaltem Periplasma-Schock-Puffer resuspendiert

und 1 h bei starkem Schütteln und gelegentlichem Vortexen inkubiert. Nach 30 min Zentrifugation bei 30000 g wurde der Überstand über Nacht gegen Lysis-Puffer dialysiert.

2. BugBuster (Novagen) Präparation

Mittels der BugBuster Lösung werden sowohl periplasmatische als auch zytoplasmatische Proteine isoliert. Hierbei wird das Bakterienpellet in 5 ml/g Pellet-Naßgewicht resuspendiert und für 10-15 min bei RT leicht geschüttelt. Anschließend wird der durch 20 min Zentrifugation bei 30000g gewonnene Überstand sofort (ohne Dialyse) aufgereinigt.

3.2.3. Protein-Aufreinigung durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie

Die vom Vektor pHog21 exprimierte Proteine tragen an ihrem C-terminalen Ende ein His₆-Tag. Oligo-Histidin-Peptide können mit hoher Affinität an Ni-, Cu- oder Zn-Ionen binden. Werden solche divalente Kationen an immobilisierten Chelaten gebunden, ermöglichen sie eine chromatographische Anreicherung von Proteinen, die ein Tag aus 3 – 6 Histidinen tragen (Sulkowski 1985). Diese Bindung kann bei nahezu neutralem pH durch einen Überschuss an Imidazol gelöst werden, welches danach durch Dialyse entfernt wird. Diese Methode, abgekürzt IMAC (*immobilised metal affinity chromatography*), war früher schon für die Anreicherung verschiedener Fusionsproteine aus E.coli eingesetzt worden und verbreitete sich sehr schnell als Standardmethode für die Reinigung scFv-Fragmenten (Skerra et al. 1991; Dubel et al. 1992).

Hierzu wurden zu dem Periplasma-Dialysat oder dem BugBuster-Überstand jeweils 0,5 – 2 ml Ni²⁺-NTA-Agarose pipettiert. Darauf folgte eine Schüttelinkubation bei 4 °C für 1 – 2 h, so dass die Fusionsproteine vollständig binden konnten. Anschließend wurde die Agarose mit Wasch-Puffer gewaschen. Die etwas höhere Konzentration an Imidazol im Wasch-Puffer erlaubt, möglichst viele unspezifisch bindenden Proteine zu verdrängen. Nur solche Konstrukte mit einem His₆-Tag bleiben an der Ni²⁺-NTA-Agarose hängen. Nachdem diese sich langsam abgesetzt hat, wurde der Überstand dekantiert und verworfen. Dieser Wasch-Schritt wurde 2 x wiederholt. Die Elution der Fusionsproteine wurde mit Elutionspuffer vollführt. Nach dem erneuten Absetzen der Agarose befanden sich im Überstand die gewünschten Proteine, welche sofort gegen PBS umdialysiert wurden.

3.2.4. Dialyse

Zwei Methoden der Dialyse wurden in der vorgelegten Arbeit verwendet.

1. Größere Volumina von 25 – 100 ml, wie sie bei einer Periplasma-Präparation anfielen, wurden mit den Spektra-Por®-Dialyse-Schläuchen durchgeführt. Hierzu wurde die Flüssigkeit unter Vermeidung von Luftblasenbildung in die Schläuche gefüllt und mit jeweils 2 Clips an beiden Enden verschlossen. Pufferwechsel fanden nach 2, 6, und 12 Stunden statt.
2. Kleinere Volumina von 500 – 3000 µl wurden in Slide-A-Lyzer® Dialyse Kassetten eingefüllt. Die Dialyse war nach einmaligem Pufferwechsel nach 4 Stunden fertig.

3.2.5. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe des SDS-PAGE lassen sich Proteine, nach Denaturierung durch SDS (Natriumdodecylsulfat) und Erhitzen bei 95 °C, nach ihrem Molekulargewicht auftrennen und auf dem Gel durch entsprechende Färbemethoden darstellen.

Je nach Bedarf kann die Acrylamidkonzentration zwischen 7,5% und 20% variieren, wobei im Netzwerk des Polyacrylamids große Moleküle stärker retardiert werden als kleine. Bei niedrigen Acrylamidkonzentrationen ist der molekulare Siebeffekt gering, womit eine Trennung aufgrund des Verhältnisses von Masse zu Ladung gegenüber einer größenabhängigen Trennung überwiegt. Mit zunehmendem Gehalt an Polyacrylamid werden kleinere Proteine stärker aufgetrennt. Zusätzlich kann die Gelelektrophorese in nichtreduzierter und reduzierter Form durchgeführt werden. In letzterem Fall bewirkt die Zugabe von β-Merkaptoethanol eine Spaltung der Disulfid-Brücken, so dass eventuelle Untereinheiten eines Proteins darstellbar sind.

Die im folgenden angegebenen Mengen beziehen sich auf ein 12%iges Polyacrylamidgel der Größe 8,6 cm x 6,8 cm x 1,0 mm.

Für das zuerst zu gießende Trenngel wurden 1,34 ml H₂O, 1 ml 1,5 M Tris pH 8,8, 40 µl 10 % SDS, 20 µl APS-Lösung, 2 µl TEMED und 1,6 ml 30 % Acrylamid gemischt und zwischen zwei Glasplatten gegossen. Direkt nach dem Gießen wurde das Gel mit H₂O überschichtet. Nach ca. 30 min war die Polymerisation des Trenngels abgeschlossen und das Überschichtungswasser wurde abgegossen. Für das anschließende Sammelgel wurden 1 ml H₂O, 415 µl 0,5 M Tris, pH 6,8, 17 µl 10 % SDS, 8,3 µl APS-Lösung, 1,5 µl TEMED und 190 µl 30 % Acrylamid gemischt und zwischen die Glasplatten gegossen. Daraufhin wurden

die Taschenkämme aufgesteckt. Nach 30 minütiger Polymerisation wurden die Taschenkämme gezogen und das Gel in Laufpuffer aufbewahrt.

Pro Geltasche wurden etwa 10 µl in 5x SDS-Puffer aufgenommene Proteine geladen. Die Elektrophorese wurde bei 20 mA für 1 h in Elektrophoresepuffer durchgeführt.

3.2.6. Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Zur Coomassie-Färbung der Proteine wurde das Gel für 1 h bei RT in Coomassie-Färbelösung inkubiert und danach für 1 – 2 h in Wasser gewaschen. Durch mehrmaliges Wechseln des Wassers wurde der unspezifisch, d.h. nicht an Protein gebundene Farbstoff entfernt. Die angefärbten Proteinbanden erschienen blau. Das Gel konnte in Wasser gelagert und fotografiert werden.

3.2.7. Western-Blot

Beim Protein-Blotting wird die gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteinmischung auf eine proteinbindende Membran überführt und dort einer Nachweisreaktion unterzogen, die für bestimmte Proteine der Mischung spezifisch ist oder sein soll. Das Blotting der getrennten Proteine bietet dabei den Vorteil, dass die Membran als Trägermatrix viel einfacher zu handhaben ist als ein Gel und die Proteine auf der Oberfläche der Membran isoliert sind. Ursprünglich wurde die Methode dazu entwickelt, das Molekulargewicht eines Proteinantigens zu bestimmen oder die Spezifität von Antikörpern gegenüber einem in einer Proteinmischung befindlichen Antigen zu überprüfen (Towbin et al. 1979).

Der Transfer muss immer senkrecht zur Trennrichtung erfolgen, damit das Muster der getrennten Proteine auf der Membran exakt dem Trennmuster des Gels entspricht. Zur Durchführung des elektrophoretischen Transfers gibt es mit dem Wet- oder Semi-Dry-Blot zwei Verfahren, die gleichberechtigt nebeneinander existieren. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich das Wet-Blotting angewendet, auf welches näher eingegangen wird.

Unmittelbar nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel 15 min in Towbin-Puffer äquilibriert. Währenddessen wurde die PVDF-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten und wie folgt vorbereitet: 20 sec in Methanol, 2 min in Wasser, 5 min in Towbin-Puffer. Der Zusammenbau des Wet-Blots muss luftblasenfrei erfolgen und bestand aus folgenden Schichten: Schwammtuch – Filterpapier – Gel – Membran – Filterpapier – Schwammtuch.

Anschließend wurde dieses Sandwich so in die Halteschienen der mit Towbin-Puffer gefüllten Blot-Apparatur eingesetzt, dass die Membran zur Anode (+) und das Gel zur Kathode (-) zeigt. Die Elektrophorese wurde 1,5 h bei 295 mA und 100 V im Kühlraum durchgeführt.

Die Effizienz des Blot-Vorgangs konnte mit Hilfe von Färbereagenzien überprüft werden. Weit verbreitet ist die Anfärbung mit kolloidalem Gold. Nach 5 – 10 min in der Lösung ließen sich die Protein-Banden irreversibel rot darstellen. Die Membran wurde kurz mit Wasser abgewaschen und konnte weiterverarbeitet werden.

3.2.8. Immunfärbung geblotteter Proteine

Vor Beginn der Nachweisreaktion bestimmter Proteine müssen Protein-Blots abgesättigt werden. Dieses „Blocken“ dient dazu, überschüssige Proteinbindestellen der Membran abzusättigen und eine unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien zu verhindern. Dies geschah über Nacht bei 4 °C in Block-Puffer.

Ist die Membran geblockt, erfolgt als eigentliche Nachweisreaktion die Bindung des Antikörpers, in unserem Fall eines HRP-konjugierten Anti-His₆-Tag-Antikörpers, an das Zielprotein. Die Inkubationszeit betrug 1 – 2 h bei Raumtemperatur und der Antikörper war 1:5000 in 5 ml Block-Puffer verdünnt. Anschließend wurde die Membran 4 mal 10 min in PBST-Puffer gewaschen. Um das geblottete Protein endgültig sichtbar zu machen, trägt der Antikörper eine Enzymmarkierung zur indirekten Visualisierung. Dabei handelte es sich um die Meerrettichperoxidase HRP. Bei Zugabe entsprechender Substrate liefert das Enzym ein Licht emittierendes Produkt (Chemilumineszenz), welches am Ort seiner Entstehung Licht ausstrahlt. Dokumentiert wurden die Signale mit Hilfe einer sehr sensitiven Kamera.

3.2.9. Protein-Konzentrations-Bestimmung

1. Absorptionsmessung bei $\lambda = 280 \text{ nm}$

Proteine besitzen ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280 \text{ nm}$. Im Vergleich dazu liegt das Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren bei einer Wellenlänge von 260 nm. Über das Lambert-Beersche Absorptionsgesetz kann die Konzentration einer Probe

bestimmt werden. Als Näherung kann angenommen werden, dass eine $OD_{280\text{ nm}} = 1,0$ einer Proteinkonzentration von ca. 1,0 mg/ml entspricht.

2. *BCA-Protein Assay nach Lowry*

Der Assay wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Es wurde eine arithmetische Verdünnungsreihe eines BSA-Standards angelegt. Jeweils 25 μl der Standards und der Proben unbekannter Konzentration wurden in Triplets in die Wells pipettiert. Hinzu addierte man 200 μl des kurz vorher angesetzten BCA-Protein-Reagenzes und inkubierte die Platte für 30 min bei 37 °C. Anhand der BSA-Verdünnungen konnte dann eine Standardkurve erstellt werden, auf der die optische Dichte bei $\lambda=562\text{ nm}$ gegen die Konzentration aufgetragen wurde. Aus dieser Kurve konnten die Konzentrationen der Proben berechnet werden.

3.3. Methoden der funktionellen Testung

3.3.1. ELISA (Enzyme-Linked immuno sorbent assay)

Diese Methode diente zum Nachweis der fibrinspezifischen Bindung der Fusionsproteine scFV_{59d8}, scFV_{59d8}-TAP, scFV_{59d8}-Xa-TAP an das beta₁₋₇-Peptid. Als Negativ-Kontrolle diente das RGD-Peptid. Die Bindung des scFv an das Peptid konnte mittels eines Primär- und eines HRP-gelabelten Sekundärantikörpers nachgewiesen werden.

Die benutzten ELISA-Platten waren durch Röntgenstrahlen voraktiviert, d.h. sie trugen vermehrt positive Ladungen. Deshalb erfolgte die Absorption des Antigens (beta₁₋₇-Peptid und RGD-Peptid) in 0,1 M Na-Carbonatpuffer pH 9,6, da bei diesem pH die Säuregruppen des Peptids geladen vorliegen, um so eine effektive Absorption an die Platte zu gewährleisten. Eine 96-Well-ELISA-Platte wurde abwechselnd mit den genannten Peptiden beschichtet. Hierzu wurden jeweils 200 μl einer 20 $\mu\text{g/ml}$ -Lösung des entsprechenden Antigens in Coating-Puffer pro Well aufgetragen und die Platte bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde sie entleert und 5 mal mit PBST-Puffer gewaschen. Hierauf wurden zu jedem Well 300 μl Block-Puffer addiert und die Platte erneut für 2 h bei RT inkubiert. Nach Entleeren der Wells und dreimaligem Waschen wurden die Proben und die Kontrollen aufgetragen und über Nacht bei 4 °C geschüttelt.

Die Aufteilung der Wells der Platte folgte folgendem Prinzip:

- Positiv-Blank : Inkubation der Wells ohne Probe, aber mit Primär- und Sekundärantikörper und Substrat
- Negativ-Blank : Inkubation der Wells nur mit Substrat
- Proben : Inkubation der Wells mit Proben, Primär- und Sekundärantikörper und Substrat
- Positiv-Kontrolle : Inkubation der Wells mit Fab'_{59d8}, Primär- und Sekundärantikörper und Substrat

Am folgenden Morgen wurde die Platte 6 mal gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Zum Nachweis der fibrinspezifischen Bindung der im Vektor pHog21 exprimierten scFv-Fusionsproteine, wurde ein Anti-His₆-Tag-ELISA durchgeführt. Aufgetragen wurden je 100 µl einer 1:5000 in Inkubationspuffer diluierten Anti-His₆-Tag-Antikörper-Lösung. Nach 2 h Inkubation bei RT wurden nach erneutem sechsmaligen Waschen je 100 µl eines 1:2000 in Inkubationspuffer verdünnten Anti-Mouse-HRP-Konjugats. Abschließend wurde die Platte sechsmal gewaschen und 100 µl TMB-Substrat addiert. Nach 15-30 min wurde die Reaktion durch 100 µl 2M H₂SO₄ gestoppt. Die Absorption wurde bei 450 nm gemessen.

3.3.2. Faktor-Xa-Inhibitions-Assay

Dieser Versuch dient dem Nachweis der Inhibition von Faktor Xa , indem die Hemmung einer durch Faktor Xa vermittelten Umwandlung eines chromogenen Substrats mit Absorptionsänderung beobachtet wird. Das Substrat Spectrozyme fXa 222L besitzt die Formel MeO-CO-D-CHG-Gly-Arg-pNA, die für die Prothrombinaktivierung entscheidende Sequenz. Faktor Xa spaltet terminal vom Arg pNA (para-Nitro-Anilin; 4-Nitro-Anilin) ab, wobei eine Zunahme der Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen wird. Durch Inhibition des Faktor Xa sollte die Absorption im Vergleich zu nicht inhibiertem Faktor Xa nicht bzw. nur minimal zunehmen.

Eine 96-Well-Platte wurde für den Faktor-Xa-Inhibitions-Assay in verschiedene Sparten aufgeteilt:

- Arithmetische Reihe von fXa-Standards als Positivkontrolle und Grundlage für eine standardisierte Eichkurve
- Die zu testenden Proben in unterschiedlichen Konzentrationen

- Die Kontrollen (scFv allein, ohne TAP)
- Negativ-Blank, der eine fXa-Inhibition von 100% simuliert (kein fXa aufgetragen)

Durchgeführt wurde der Versuch in Tyrode-Puffer, wobei jeweils 200 μl /Well aufgetragen wurden. Zu 175 μl der unterschiedlich konzentrierten Proben und Standards wurden 10 μl einer Faktor-Xa-Lösung (f.c. 20 nM) hinzugegeben. Nach 20 min Inkubation addierte man 15 μl des chromogenen Substrats Spectrozyme fXa 222, um eine endgültige Konzentration von 375 μM zu erreichen. Bei λ_{405} wurde 5 min später die Absorption gemessen. Die Inhibition wurde ausgedrückt als Differenz der optischen Dichte zwischen den fXa Standards und den Proben.

3.3.3. Bifunktionaler Assay für die Konstrukte scFv_{59d8}-TAP und scFv_{59d8}-Xa-TAP

Zur Darstellung beider Funktionen der Fusionsproteine (antigenbindende Funktion und fXa-inhibitorische Funktion) in Abhängigkeit voneinander wurde folgender Versuchsaufbau angewendet.

Wie unter 4.4.1. beschrieben wurden 96-Well-Platten abwechselnd mit β_{1-7} -Peptid oder RGD-Peptid beschichtet, blockiert und gewaschen. Nach Bindung der Konstrukte wurde in den so vorbereiteten Wells anschließend ein Faktor-Xa-Inhibitionstest durchgeführt, um die inhibitorische Wirkung der gebundenen Fusionsproteine zu testen.

3.3.4. Blutentnahme

Um eine Voraktivierung der Thrombozyten weitgehend zu verhindern, wurde die Blutentnahme so schonend wie möglich durchgeführt. Nach Punktion einer gestauten Vene mit einer 21 Gauge Butterfly-Nadel wurde der Stau gelöst und die ersten 3 ml Blut verworfen. Hierauf wurde die gewünschte Menge Citrat-Blut entnommen. Kontakt mit Glas, längeres Stehenlassen und Schütteln wurden vermieden. Auch wurden die Proben nicht gekühlt, um die Thrombozyten nicht zu deaktivieren

3.3.5. Herstellung von PRP (Platelet Rich Plasma) und PPP (Platelet Poor Plasma)

Durch Abzentrifugieren der roten und weißen Blutzellen bei 1000 rpm kann man die Thrombozyten aus dem Überstand isolieren. Im Gegensatz dazu sedimentieren bei 3000 rpm auch die Thrombozyten und es entsteht PPP (Platelet Poor Plasma).

3.3.6. Waschen der Thrombozyten

Das Waschen der Thrombozyten konnte auf zwei Arten durchgeführt werden.

- Gel – Filtration: 1 ml PRP wurden auf eine mit Tyrode-Puffer äquilibrierte Sepharose 2B Säule geladen und anschließend mit 1 ml Tyrode-Puffer eluiert. Fibrinogen und sonstige Plasmabestandteile verblieben in der Säule.
- Zentrifugation: das PRP wurde 30 sec bei 6000 rpm zentrifugiert. Das Thrombozyten-Pellet wurde in Tyrode-Puffer resuspendiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt.

3.3.7. FACS-Analyse von Thrombozyten

Die Durchflusszytometrie bietet die Möglichkeit an jeder einzelnen Zelle in einer Zellsuspension bestimmte Merkmale, z. Bsp. Größe, Granularität oder Expression von Oberflächenrezeptoren, zu messen. Eine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben (Antikörper, Rezeptoren, Streptavidin, usw.) bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu dokumentieren (FACSCalibur, Becton & Dickinson, San Jose, USA).

Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns usw.) der Zellen gewonnen.

Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen.

Für die Auswertung der gespeicherten Daten stehen im wesentlichen zwei Verfahren zur Verfügung:

- Dotplot: Zwei Parameter werden gegeneinander aufgetragen, wobei jede einzelne Zelle als Punkt dargestellt wird. Einzelne Zellpopulationen können anhand ihrer Größe und/oder Granularität abgegrenzt werden. SSC = Sidewardscatter (Parameter für Granularität), FSC = Forwardscatter (Parameter für Zellgröße)
- Histogramm: Hierbei wird die Häufigkeitsverteilung einer Probe dargestellt. Auf der Y-Achse wird die Häufigkeit, auf der X-Achse die einzelnen Kanäle (relative Fluoreszenz, SSC oder FSC) aufgetragen.

Thrombozyten lassen sich allein anhand ihrer Größe von anderen Blutzellen unterscheiden, hierbei empfiehlt sich für die Messung der sehr kleinen Zellen eine logarithmische Verstärkung der FCS - und SSC - Signale.

Hierzu wurde frisch entnommenes Blut 1/50 in Tyrode-Lösung verdünnt und je 50 µl von dieser Suspension pro Ansatz verwendet. Primärantikörper und eventuell ADP wurden addiert und 10 min bei RT inkubiert bevor der Fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper hinzugegeben wurde. Nach weiteren 10 min wurde das Ganze durch 500 µl Cellfix® 1x fixiert.

3.3.8. Bifunktionaler Assay für das Konstrukt scFv_{MA2}-TAP

Zur Demonstration beider Funktionen des Fusionsproteins scFv_{MA2}-TAP (Bindung an aktivierte Thrombozyten und Inhibition des fXa), diente folgender Versuchsaufbau.

Eine durch Gel-Filtration (siehe unter 4.4.6.) gewaschene Plättchensuspension wurde in 200 µl Fraktionen aliquotiert und bildete die Grundlage für den weiteren Versuch. Zu den Aliquots addierte man das Fusionsprotein scFv_{MA2}-TAP in einer Konzentration von 5 – 10 µg/ml. Die Hälfte der Aliquots wurden durch ADP stimuliert, um die Thrombozyten und somit den GP IIb/IIIa Rezeptor zu aktivieren. Nur in diesen aktivierten Fraktionen konnte scFv_{MA2}-TAP an die Plättchen binden. Daraufhin wurden zu den nicht mit ADP stimulierten Thrombozyten PGE2 (Prostaglandin E2) im Überschuß hinzugegeben um jede weitere

Aktivierung durch die nachfolgende Zentrifugation zu verhindern. Anschließend wurden die Suspensionen für 2 min bei 8000 rpm abzentrifugiert und der Überstand mit nicht gebundenem scFV_{MA2}-TAP verworfen. Resuspendiert wurden die Pellets dann in modifiziertem Tyrode-Puffer.

Die eine Hälfte der Aliquots enthielt aktivierte Thrombozyten mit folglich gebundenem scFV_{MA2}-TAP, die andere zum größten Teil nicht aktivierte Thrombozyten ohne scFV_{MA2}-TAP. Die fXa-inhibitorische Funktion des gebundenen Fusionsproteins wurde wie unter 4.4.2. beschrieben nachgewiesen.

3.3.9. Aggregometrie

Das Aggregometer (PAP 4 Aggregometer, mölab, Hilden, Deutschland) ist im Prinzip ein Photometer, das die Lichtdurchlässigkeit einer Probe von thrombozytenreichem Plasma (PRP) in Vergleich zu thrombozytenarmem Plasma (PPP) misst. Dies hängt vor allem vom Thrombozytengehalt ab, weshalb es unbedingt nötig ist, vor der Messung die Probe auf eine feste Thrombozytenkonzentration einzustellen. Findet eine Aggregation statt, sinken die Aggregate zu Boden und die Thrombozyten verschwinden aus dem Messbereich, wodurch die Lichtdurchlässigkeit ansteigt.

Zum Auslösen der Aggregation wird PRP bei 37 °C mit ADP stimuliert. Weiterhin ist ein Magnetrührer, hier bei 900 rpm, zur Durchmischung der Probe notwendig.

3.3.10. Hemmung der Aggregatbildung nach Induktion durch Thrombozyten-Clot

Zur Herstellung stabiler Thrombozyten-Clots wurden 500 µl PRP durch Zugabe von ADP und Ca²⁺ für 1 – 2 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Clots konnten problemlos durch Ansaugen mittels einer Pipettenspitze aus dem Röhrchen entnommen und zu 1 ml frischem PRP gegeben werden. Durch leichtes Schütteln wurde die Aggregatbildung gestartet.

3.3.11. Nachweis der Bindung von scFV_{MA2}-TAP an adhärenenten Thrombozyten (Targeting)

Eine 24-well Platte wurde über Nacht mit Fibrinogen beschichtet und am nächsten Morgen mit Tyrode-Puffer gewaschen. 150 µl gewaschene Thrombozyten wurden in jedes Well

pipettiert und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach ausgiebigem Wegwaschen der nicht-gebundenen Plättchen wurden zu den mit ADP stimulierten Fibrinogen-adhärenenten Thrombozyten scFV_{MA2}-TAP oder scFV_{MA2mut}-TAP hinzugegeben. 15 min später wurden die Wells 1:5 mit Tyrode verdünnt und der Überstand bis auf 200 µl abgenommen, zu denen man anschließend Faktor Xa zufügte. An die Plättchen gebundener scFV_{MA2}-TAP konnte den hinzugegebenen Faktor Xa inhibieren.

3.3.12. Whole-Blood-Clot-Assay

Der Clot-Assay besteht aus zwei methodische Teilen: der Clot-Herstellung und dem eigentlichen Whole-Blood-Clot-Assay, der in zwei verschiedenen Modifikationen durchgeführt wurde.

Zur Clot-Herstellung wurden zu 20 ml durch Natrium-Citrat decalcifiziertem Vollblut von gesunden Spendern 670 µl einer 0,5 M CaCl₂, 500 µl DADE-Actin®-FS-APPT-Reagenz und 5 µl ¹²⁵Iod-Fibrinogen addiert. Dieses Gemisch wurde sofort in einen Silikon-Schlauch (Innendurchmesser = 4 mm) injiziert. Der Schlauch wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert. Hierauf wurde der Schlauch in 1,5-cm-Portionen geschnitten. Die Clots wurden vorsichtig in Sarstedt-Röhrchen gedrückt und 5 mal in PBS-Puffer gewaschen. Die γ-Aktivitäten der einzelnen Clots wurden mit einem γ-Counter (LB 2103, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) gemessen und nur die Clots für den weiteren Versuch verwendet, die in ihrer γ-Aktivität um weniger als 5 % von einander abwichen.

Der Whole-Blood-Clot-Assay wurde in zwei Modifikationen durchgeführt:

1. 100 µl Probe und 100 µl rekalcifiziertes mit ¹²⁵Iod-Fibinogen versetztes Blut wurden zu den gewaschenen Clots addiert. Das ganze wurde anschließend ca. 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Clots wurden hierauf zehnmal mit PBS gewaschen, wobei der Waschvorgang äußerst vorsichtig durchgeführt werden musste. Abschließend wurde die γ-Aktivität und damit das appositionelle Clot-Wachstum bestimmt.
2. Die gewaschenen Clots wurden mit den entsprechenden Proben und Kontrollen in PBS für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurde der nicht gebundene Antikörper gewaschen und der Clot-Assay wie oben beschrieben durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der gentechnischen Arbeiten

In diesem Kapitel soll auf die Klonierung der vier in dieser Arbeit rekombinant hergestellten Fusionsproteine eingegangen werden. Die gentechnischen Schritte, die den entsprechenden Konstrukten zu Grunde lagen, werden ausführlich in den jeweiligen Kapiteln dargestellt.

4.1.1. Das Fusionsprotein scFv_{59d8}-TAP

1. Klonierung des scFv_{59d8}-TAP

Die Klonierung des Fusionsproteins scFv_{59d8}-TAP erfolgte im Rahmen der Doktorarbeit von IVO TOMIC (Universität Heidelberg).

2. Umklonierung des scFv_{59d8}-TAP in den Vektor pHog21

An der Universität Heidelberg wurde versucht, größere Mengen an Fusionsprotein in dem Vektor pOPE51 zu exprimieren. Den Nachteil dieses Expressionssystems stellt die Aufreinigung über Inclusion Bodies dar. Es handelt sich hierbei um unlösliche Aggregate, die im periplasmatischen Raum der E.coli akkumulieren. Induziert durch IPTG produzieren die Bakterien relativ zu anderen Expressionssystemen große Mengen an Protein, welches jedoch durch ein aufwendiges Denaturierungs- und Renaturierungsverfahren aufgereinigt werden muss. Die korrekte Faltung und dementsprechend die Funktionalität des Konstruktes waren nicht zufriedenstellend gewährleistet.

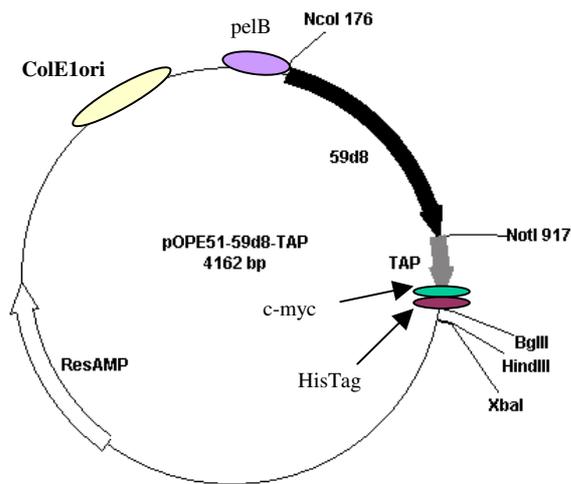


Abb 4.a. Das Plasmid pOPE51-scFv_{59d8}-TAP, ColE1Ori: Origin of replication, pelB: Leadersequenz, ResAMP: Ampicillin-Resistenz, TAP: Tick Anticoagulant Peptide

Durch Umklonierung des scFv_{59d8}-TAP in den Vektor pHOG21 wurde es möglich, größere Mengen an löslichem Fusionsprotein aus dem periplasmatischen Raum zu isolieren. Der verwendete pHOG21 (Klon 33-25), welcher den scFv_{59d8} enthielt, wurde zur Verfügung gestellt von PAUL JUSTIN GRÄBER (Peter, Graeber et al. 2000). Ziel war es, den scFv_{59d8} durch das Fusionsprotein scFv_{59d8}-TAP auszutauschen.

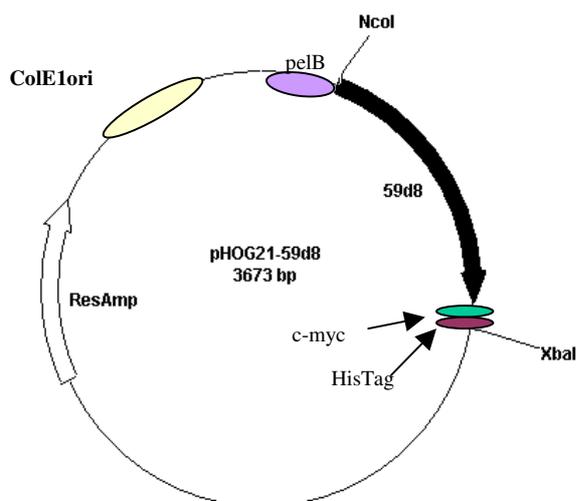


Abb 4.b. Das Plasmid pHOG21-scFv_{59d8}

Als Restriktionsschnittstellen eigneten sich in diesem Fall NcoI und XbaI. NcoI befindet sich in beiden Vektoren innerhalb der 5'-terminal lokalisierten pelB-Leadersequenz, während XbaI 3'-terminal distal vom His-Tag liegt. Die Fragmente wurden ligiert und anschließend wurde das Produkt in kompetente TG1 E.coli transformiert. Die Transformationseffizienz wurde sowohl durch einen Kontrollverdau, als auch durch Sequenzierung (Medigenomix) nachgewiesen.

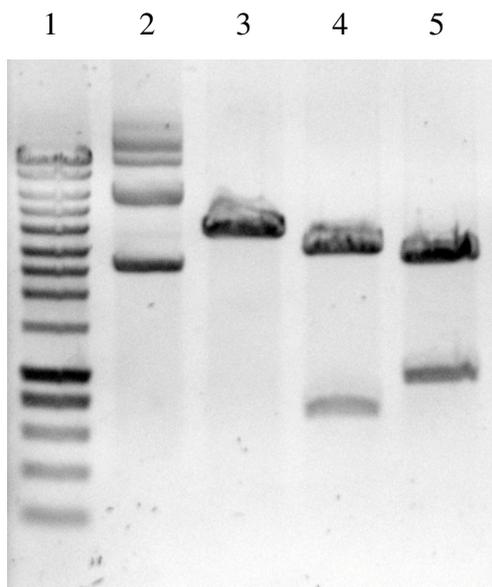


Abb. 4.c. Kontrollverdau der Vektor DNA des Konstruktes scFv_{MA2}-TAP. 1-Marker, 2-ungeschnittener Vektor mit Supercoils, 3-mit NcoI linearisierter Vektor, 4-mit NcoI und NotI herausgeschnittener scFv_{MA2}, 5-mit NcoI und HindIII herausgeschnittenes Konstrukt scFv_{MA2}-TAP

Die folgende Abbildung stellt das fertige Plasmid pHOG21-scFv_{59d8}-TAP dar:

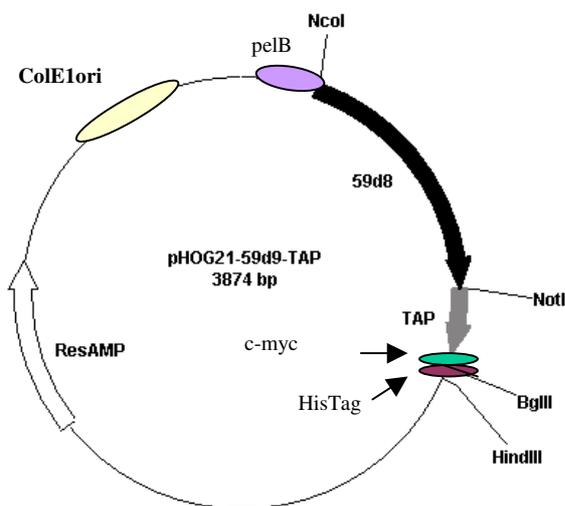


Abb 4.d. Das Plasmid pHOG21-scFv_{59d8}-TAP

3. Klonierung einer Faktor Xa Schnittstelle zwischen scFv_{59d8} und TAP mittels PCR

Eine weitere Erklärung, weshalb das Fusionsprotein scFv_{59d8}-TAP an der Uni Heidelberg nicht die erwartete Funktionalität zeigte, liegt in der Tertiärstruktur des TAP (Wei, Alexander et al. 1998). So soll das N-terminale Ende des TAP über drei Wasserstoffbrücken die aktive Tasche des aktivierten Faktor Xa blockieren. Die Kopplung des TAP an den scFv erfolgt jedoch gerade über dieses N-terminale Ende. Die Möglichkeit einer sterischen Behinderung der funktionellen Domäne durch den scFv_{59d8} leuchtet ein.

Um das N-terminale Ende des TAP freizusetzen, erschien es sinnvoll, zwischen scFv und TAP eine Faktor Xa Schnittstelle einzubauen. Der aktivierte Faktor Xa sollte das TAP abspalten, um sogleich von letzterem blockiert zu werden.

Mittels Überlappungs-Polymerase Kettenreaktion (PCR) wurde das TAP selektiv amplifiziert. Die Primer wurden so ausgewählt, dass am 5'-Ende eine Faktor Xa Schnittstelle addiert wird und am 3'-Ende das eigentlich überflüssige c-myc-Tag eliminiert wird. Des weiteren besitzen die Primer an ihren Enden die passenden Restriktionsstellen (BamHI und BglII) für eine spätere Religation.

Primer Sequenzen:

Xa-Sense: CGG GAT CCA TCG AAG GTC GTT ACA ACC GTC TGT GCA

Xa-Antisense: GAA GAT CTC CTG AGC CTC CAC CGA TGC AAG CGT TGA

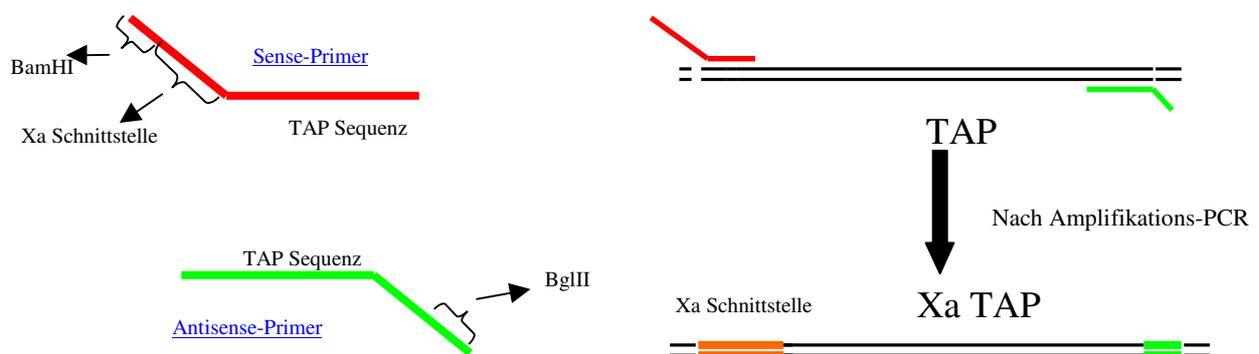


Abb. 4.e. Amplifikations-PCR mit TAP-Flanken-Primern, die eine Xa-Schnittstelle addieren und das c-myc eliminieren, sowie die passenden Restriktionsschnittstellen BamHI und BglII enthalten.

Das PCR-Produkt wurde auf ein Gel aufgetragen und nachfolgend aus diesem aufgereinigt. Für eine spätere Ligation mußten sowohl der Vektor, als auch das Amplifikationsprodukt mit den Restriktionsenzymen BamHI und BglIII geschnitten werden. Nach anschließender Ligation wurde das Produkt in kompetente TG1 E.coli transformiert. Die korrekte Klonierung wurde durch Sequenzierung nachgewiesen und das neu entstandene Konstrukt als scFv_{59d8}-Xa-TAP bezeichnet.

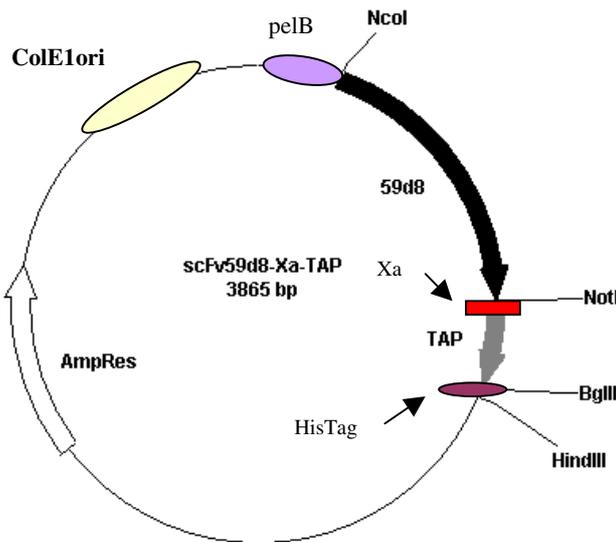


Abb. 4.f. Das Plasmid scFv_{59d8}-Xa-TAP

4. Herstellung eines konformationsspezifischen single-chain Antikörpers gegen den aktivierten Zustand des GP IIb/IIIa Rezeptors durch Phage-display

Zur Selektion von Phagen, welche ausschließlich gegen den aktivierten Zustand des GP IIb/IIIa Rezeptors gerichtet sind, wurde folgende Strategie angewandt: 1. Um unspezifische Bindung weitgehend zu verhindern, wurde ein Wasch-Puffer mit relativ geringem pH verwendet (pH = 6,5) (Tur et al. 2001). 2. Die Panning-Serien wurden auf zwei unterschiedlichen Zellarten durchgeführt (Plättchen und GP IIb/IIIa exprimierende CHO-Zellen). 3. Zur Depletion wurden die Phagen zuerst mit nicht-aktivierten Thrombozyten oder GP IIb/IIIa exprimierenden CHO-Zellen inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden diese Zellen mit den gebundenen Phagen verworfen. 4. Parallel zu der Standard-Elution mit Glycin, wurde eine kompetitive Elution mit Abciximab durchgeführt (Schwarz et al. 2004).

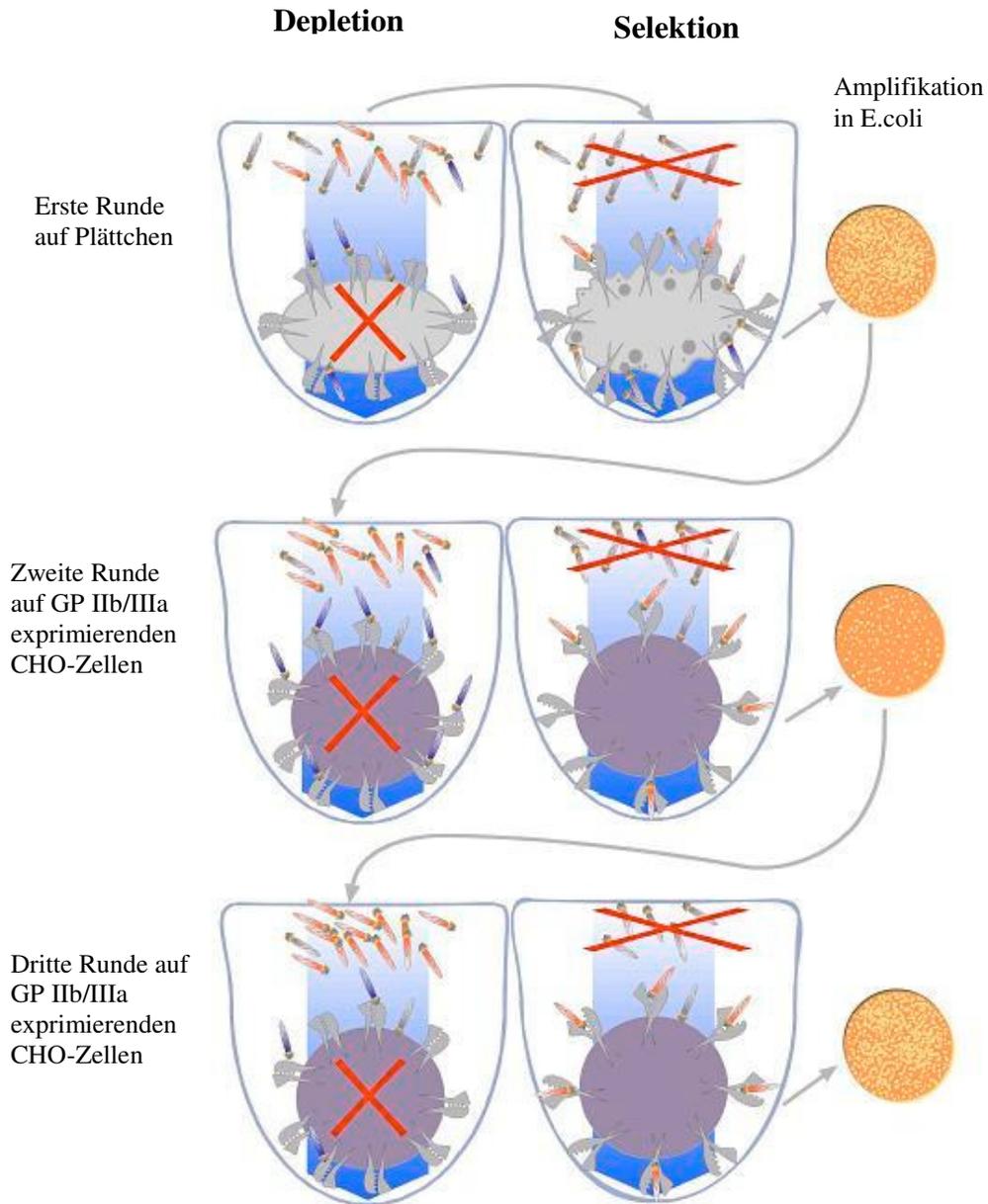


Abb. 4.g. Panning-Strategie

Aus den so erhaltenen sehr spezifischen scFv-Antikörpern wurde in dieser Arbeit insbesondere der scFv_{MA2} weiter untersucht und mit dem Faktor Xa Inhibitor TAP fusioniert. Als nicht-bindende Kontrolle wurde der scFv_{MA2mut} verwendet. Bei letzterem wurde lediglich die RGD-Sequenz durch AND ersetzt, wodurch jegliche Bindung komplett inhibiert wurde (s.u.).

5. Klonierung der Konstrukte *scFv_{MA2}-TAP* und *scFv_{MA2mut}-TAP*

Das Fusionsprotein *scFv_{MA2}-TAP* besteht aus dem aktivierungsspezifischen GP IIb/IIIa Rezeptorblocker und einem Inhibitor des aktivierten Faktor Xa. Dieses Konstrukt sollte die Vorteile einer selektiven Thrombozytenblockade mit denen einer spezifischen Hemmung des plasmatischen Gerinnungssystems verbinden.

Die Kopplung der beiden *scFv*-Fragmente an das TAP erwies sich als relativ einfach. So wurde aus dem Plasmid *pHog21-scFv_{59d8}-TAP* lediglich die *scFv_{59d8}*-DNA herausgeschnitten und einerseits durch *scFv_{MA2}*, andererseits durch *scFv_{MA2mut}* ersetzt. Als Restriktionsschnittstellen boten sich *NcoI* und *NotI* an, welche exakt die single-chain Antikörper-Sequenzen flankieren.

Die folgenden beiden Abbildungen zeigen die Plasmide *pHog21-scFv_{MA2}-TAP* und *pHog21-scFv_{MA2mut}-TAP*:

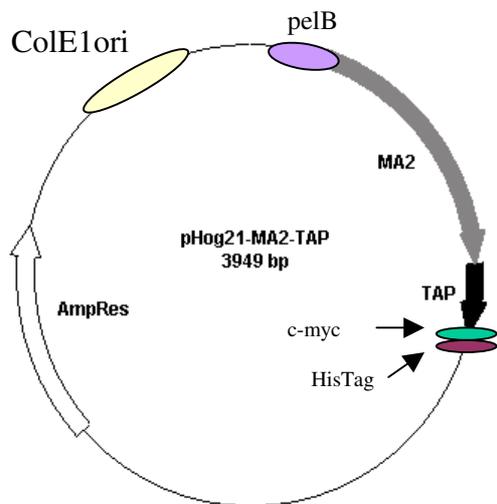


Abb. 4.h. Das Plasmid *pHog21-scFv_{MA2}-TAP*

4.2. Ergebnisse der proteinbiochemischen Arbeiten

In diesem Kapitel wird näher auf die Expression und Aufreinigung der verschiedenen Fusionsproteine eingegangen. Ausbeute und Reinheit werden beschrieben sowie die Präsenz der Faktor-Xa-Schnittstelle eindrucksvoll dargestellt.

4.2.1. Präparation der Konstrukte scFv_{59d8}-TAP und scFv_{59d8}-Xa-TAP

Die Expression dieser beiden Fusionsproteine gestaltete sich als äußerst schwierig. TG1 E.coli wurden bei 37 °C kultiviert, wobei die Transkription durch Zugabe von Glucose in einer Konzentration von 0,1 mM effektiv gehemmt wurde. Bei Expressionstemperaturen um 28 °C und höher wurden die Bakterien lytisch, eine weitere Aufreinigung war unmöglich. Auch die Addition von IPTG erwies sich nicht als erfolgsversprechend. Hierdurch erreicht man eine sehr hohe Transkriptionsrate, wobei wiederum die hohe Konzentration an Fusionsprotein eine Lyse der Bakterien zur Folge hatte. Die Annahme ist berechtigt, dass diese Konstrukte, exprimiert im Vektorsystem pHog21, toxisch für die TG1 E.coli sind.

Umgangen wurde dieses Problem durch Expression bei niedrigen Temperaturen im Bereich von 16 – 20 °C ohne Zugabe von IPTG. Zwar sezernierten die TG1 E.coli weniger, dafür aber korrekt gefaltetes Protein, in den periplasmatischen Raum.

Nachfolgende Abbildung zeigt exemplarisch die beiden Elutionsschritte einer Purifikation mittels BugBuster.

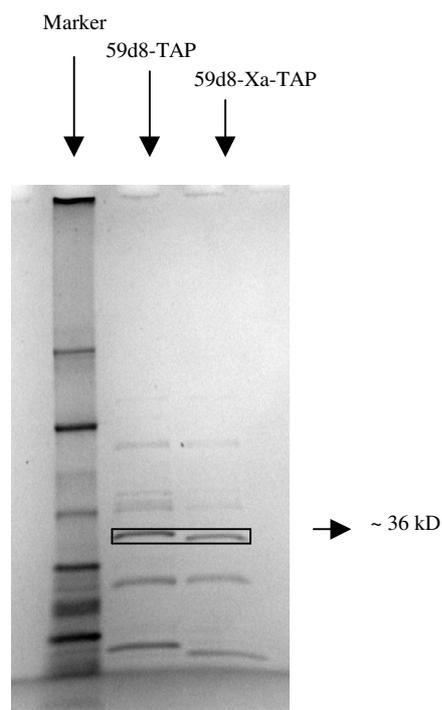


Abb. 4.j. Coomassie-Färbung eines SDS-PAGEs, aufgetragen sind die beiden Elutionen der Aufreinigung der Konstrukte scFv_{59d8}-TAP und scFv_{59d8}-Xa-TAP

Da das BugBuster-Reagenz sowohl die periplasmatischen als auch die zytoplasmatischen Proteine freisetzt, sind die Banden an Fremdprotein relativ stark ausgeprägt. Die ungenügende Reinheit dieses Purifikats mag in der Anwesenheit von Histidin-reichen bakteriellen Proteinen begründet sein. Nach anschließender Dialyse des Eluates erreichte man geschätzte Fusionsproteingesamtmengen von ca. 100 – 200 µg.

Versuche einer Aufreinigung mit Periplasmaschock-Puffer waren erfolglos, da die Proteinkonzentration extrem gering war.

4.2.2. Präparation der Konstrukte scFv_{MA2}, scFv_{MA2}-TAP und scFv_{MA2mut}-TAP

Die Expression und Aufreinigung dieser Konstrukte war problemlos und die Ausbeute an aktivem Protein war sehr hoch. Aus einem Liter Bakterienkultur ließen sich innerhalb von 24 Stunden 1 – 2 mg an Konstrukt gewinnen. Die unter 5.1.1. genannten Schwierigkeiten traten bei einer Expressionstemperatur von 28 °C nicht auf. Eine deutliche Lyse der Bakterien zeigte sich in keinem Fall.

Zwei Methoden der Aufreinigung standen zur Verfügung: BugBuster oder Periplasmaschock-Puffer. Während das BugBuster-Reagenz zusätzlich zytoplasmatische Proteine freisetzt, beschränkt sich der Periplasmaschock-Puffer auf das osmotische Aufreißen des periplasmatischen Raumes. Folglich finden sich im Purifikat letzterer Methode viel weniger Fremdproteine, die Gesamtausbeute ist jedoch etwas geringer.

Die nächste Abbildung soll die Zwischenschritte einer BugBuster-Präparation im Vergleich zu einer Periplasma-Präparation verdeutlichen.

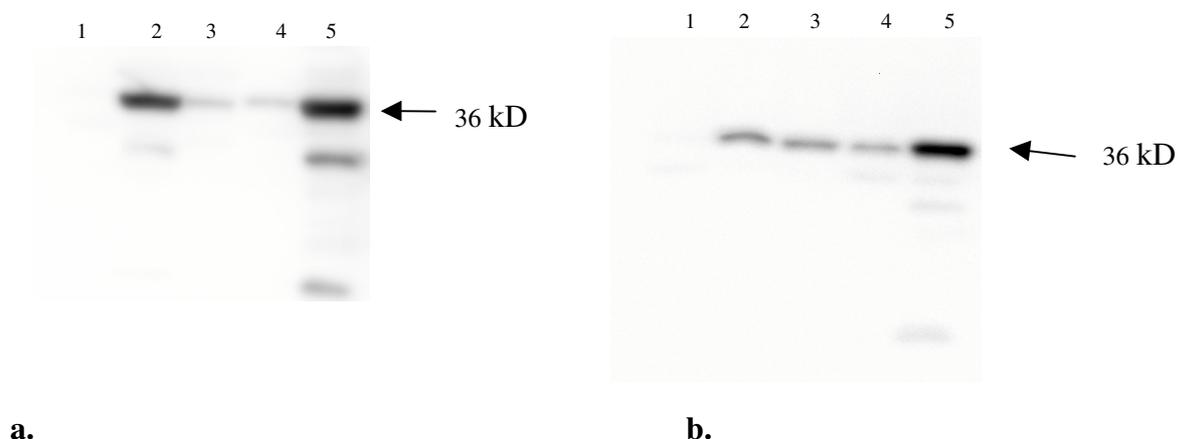


Abb. 4.k. Westen Blot Analyse zweier exemplarischer Aufreinigungen des Fusionsproteins scFv_{MA2}-TAP a) mit BugBuster, b) mit Periplasmaschock-Puffer. 1: Bakterienüberstand, 2: mit BugBuster oder Periplasmaschock-Puffer freigesetzte Proteine, 3: Überstand nach erfolgreicher Bindung der Fusionsproteine an die Agarose, 4: Waschschrift, 5. Elution der agarosegebundenen Proteine

Mit BugBuster erreichte man Proteingesamtmengen von ca. 1 – 2 mg aus einem Liter Kultur, mit Periplasmaschock-Puffer immerhin noch 500 – 1000 µg.

4.2.3. scFv_{59d8}-Xa-TAP: Faktor Xa-induzierte proteolytische Abspaltung des TAP

Die Inkubation des Fusionsproteins scFv_{59d8}-Xa-TAP mit Faktor Xa bewirkt dessen proteolytische Spaltung in scFv_{59d8} und TAP an der durch Rekombination künstlich eingefügten Faktor-Xa-Erkennungssequenz. Ziel war es das TAP freizusetzen, so dass dieses den Faktor Xa sofort inhibieren konnte.

Folgende Abbildung demonstriert die Aufspaltung des Fusionsproteins in seine Fragmente. Durch Kolloidgoldfärbung konnten alle Proteine auf der Membran sichtbar gemacht werden. Man erkennt deutlich das Auftauchen einer 29 kDa Bande (scFv_{59d8}) und einer 7 kDa Bande (TAP), sowie das Verschwinden der 36 kDa Bande (scFv_{59d8}-TAP).

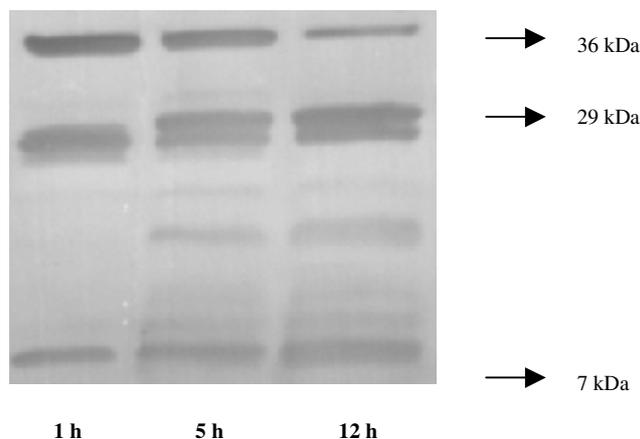


Abb. 4.1. Kolloidgoldfärbung des zeitlichen Verlaufs der in vitro ablaufenden Proteolyse durch den Faktor Xa

Die Western-Blot-Analyse des gleichen Ansatzes zeigt ebenfalls deutlich das Verschwinden der 36 kDa Bande (scFv_{59d8}-Xa-TAP) und das Auftauchen der 7 kDa Bande (TAP). Als Detektions-Tag diente das His-Tag, welches sich am 3'-Ende des TAP befindet. Eine 29 kDa Bande (scFv_{59d8}) ist also nicht sichtbar, weil diese kein His-Tag enthält.

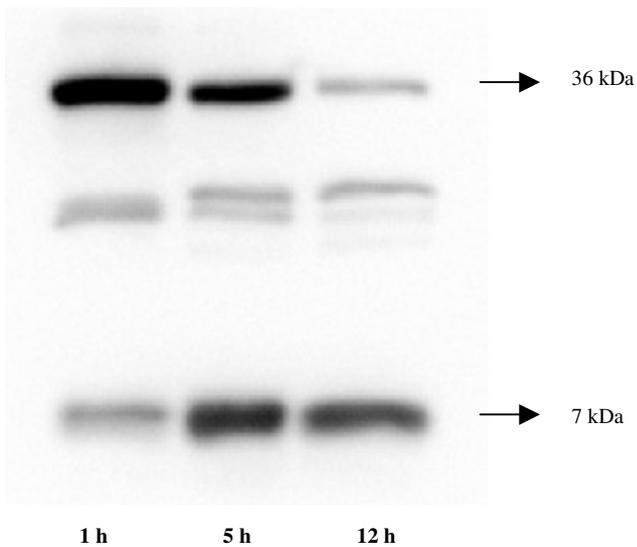


Abb. 4.m. Western-Blot-Analyse des zeitlichen Verlaufs der in vitro ablaufenden Proteolyse durch den Faktor Xa

4.3. Ergebnisse der funktionellen Testung

In diesem Kapitel wird die Funktionalität der einzelnen Konstrukte näher untersucht. Dabei wird sowohl die Antikörperfunktion als auch die Faktor Xa-inhibitorische Funktion nachgewiesen. Des weiteren wird auf das Zusammenwirken beider Komponenten eingegangen.

4.3.1. Funktionalität und Charakter der scFv_{59d8}-TAP und scFv_{59d8}-Xa-TAP

1. Vergleichende ELISA-Analysen

Die aus dem Vektor pHog21 aufgereinigten Konstrukte wurden auf ihre spezifische Antigen-Affinität getestet, bevor sie weiter analysiert wurden. Folgende repräsentative ELISA-Analyse soll die Bindung der oben genannten Fusionsproteine an die Fibrin-Sequenz β_{1-7} verdeutlichen. Auch Fab' _{59d8} und IgG _{59d8} wurden auf Bindung untersucht.

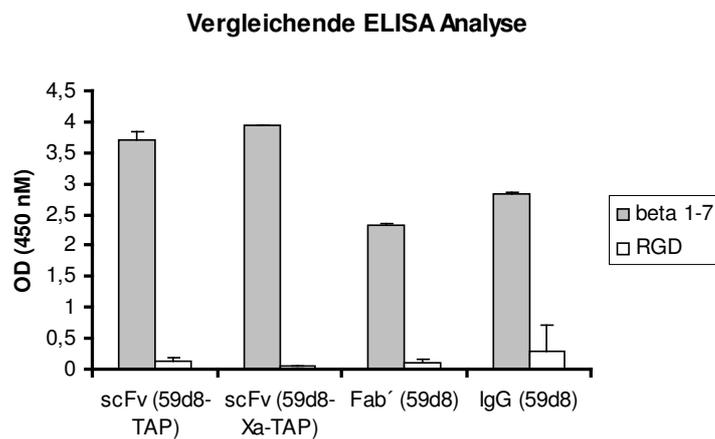


Abb. 4.n. ELISA-Analyse zum Vergleich der spezifischen Antigen-Affinitäten des scFv_{59d8}-TAP, des scFv_{59d8}-Xa-TAP, Fab' _{59d8}, IgG_{59d8}

Diese Analyse zeigt, dass die spezifischen Antigen-Affinitäten miteinander vergleichbar sind. Die scheinbar bessere Bindung der beiden scFv-Konstrukte beruht wahrscheinlich darauf, dass IgG und Fab' jeweils zwei β_{1-7} -Peptide binden, die scFv nur eins. Weder die rekombinante Fusionierung des scFv_{59d8} mit dem TAP, noch das Einfügen einer Faktor-Xa-Schnittstelle führten zum Verlust der spezifischen Antigen-Affinität. Auf dem Kontrollpeptid RGD konnte keine Bindung nachgewiesen werden.

2. Vergleichende Faktor Xa Inhibition

Mit diesem Versuch sollte festgestellt werden, ob das rekombinante Einfügen einer Faktor Xa Schnittstelle zwischen scFv_{59d8} und TAP Einfluss auf die Xa-inhibitorische Potenz hatte. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der beiden Fusionsproteine vergleichbar war.

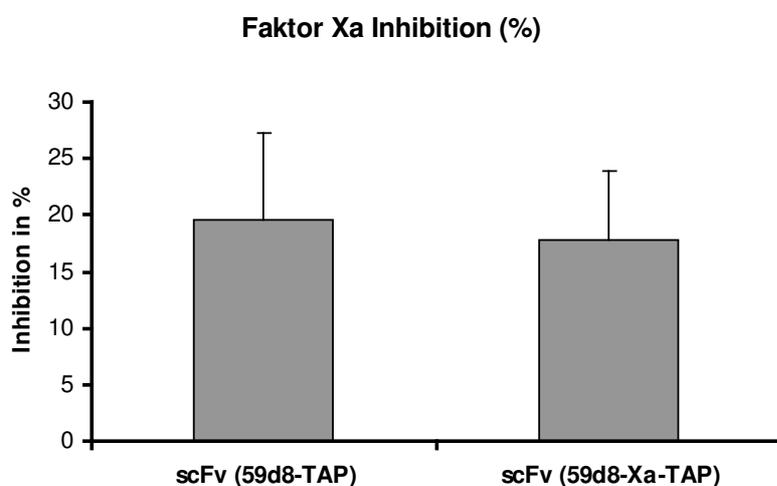


Abb. 4.o. Vergleichende Faktor Xa Inhibition, wobei die Fusionsproteine spezifisch an das Antigen β_{1-7} -Peptid gebunden vorliegen

Der addierte Faktor Xa wird gleichermaßen von den beiden Konstrukten inhibiert. Die eingefügte Schnittstelle bleibt ohne Auswirkung. Selbst im später beschriebenen Clot-Assay wurde kein Unterschied festgestellt.

3. Whole-Blood-Clot-Assay mit den *scFv_{59d8}-TAP*, *scFv_{59d8}-TAP* und *rTAP*

Mit Hilfe des Clot-Assays konnte der in-vivo-Situation näher gekommen werden: Vollblut enthält alle notwendigen Faktoren und Kofaktoren, welche für eine optimale Gerinnung verantwortlich sind. Dies sind beispielsweise thrombozytäre Phospholipid-Membranen, Calcium-Ionen, Faktor V usw. Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Inhibition des appositionellen Clot-Wachstums in Anwesenheit von *scFv_{59d8}-TAP*, die deutlich stärker war als die durch *scFv_{MA2mut}-TAP* oder rekombinantes *rTAP*. Die beiden letzt genannten Proteine dienten als Kontrolle, um ein Targeting nachzuweisen.

Vergleich 59d8-TAP mit MA2mut-TAP und rTAP

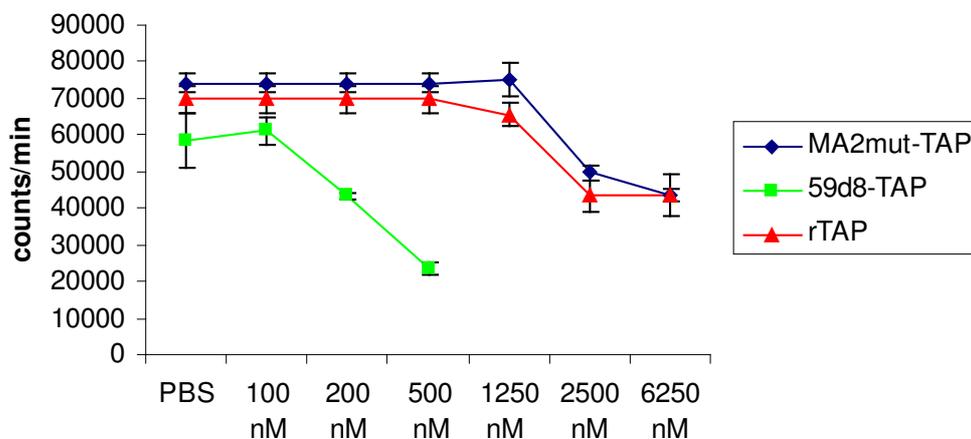


Abb. 4.p. Inhibition des appositionellen Clot-Wachstums durch den *scFv_{59d8}-TAP* und der Vergleich mit dem Kontrollantikörper *scFv_{MA2mut}-TAP* und dem rekombinant hergestellten *rTAP*.

Im Vergleich der Appositions-Inhibition ergibt sich ein Faktor ~10, um den das Fusionsprotein *scFv_{59d8}-TAP* stärker antikoagulatorisch wirksam war als der Kontrollantikörper *scFv_{MA2mut}-TAP* und *rTAP*. Zwischen den beiden Fusionsproteinen *scFv_{59d8}-TAP* und *scFv_{59d8}-Xa-TAP* ließen sich auch im Clot Assay keine signifikanten Unterschiede darstellen.

Abschließend sei noch angemerkt, dass die Faktor Xa inhibitorische Wirkung des scFv_{59d8}-TAP und des scFv_{MA2mut}-TAP vergleichbar waren.

4.3.2. Funktionalität und Charakter des scFv_{MA2}-TAP

1. Bindung von scFv_{MA2}, scFv_{MA2}-TAP, scFv_{MA2mut}-TAP an aktivierte Thrombozyten

Vor der eingehenden Untersuchung des Fusionsproteins scFv_{MA2}-TAP musste zuerst dessen Bindung an aktivierte Thrombozyten nachgewiesen werden. FACS-Analysen konnten dies eindrucksvoll bestätigen.

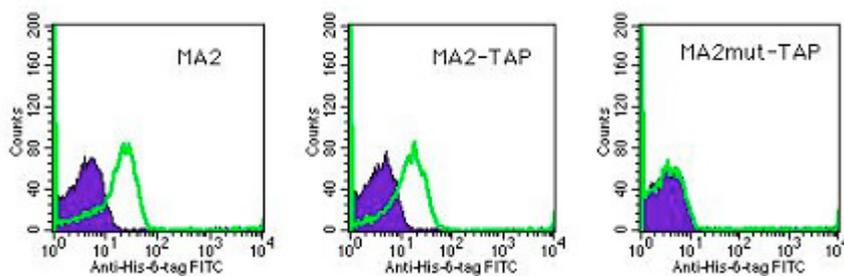


Abb. 4.q. Vergleichende FACS Analyse. Blau: Fluoreszenz nicht-aktivierter Thrombozyten. Grün: Fluoreszenz aktivierter Thrombozyten.

Es wird deutlich, dass die Bindungskapazität des Fusionsproteins scFv_{MA2}-TAP durch die Kopplung nicht beeinträchtigt wurde. Gleich dem scFv_{MA2} bindet der scFv_{MA2}-TAP ausschließlich an den aktivierten GP IIb/IIIa Rezeptor, im Gegensatz zu dem scFv_{MA2mut}-TAP, der seine Bindungsfähigkeit durch den Austausch von RGD durch AND komplett verloren hat.

2. Faktor-Xa-Inhibition von scFv_{MA2}, scFv_{MA2}-TAP und scFv_{MA2mut}-TAP

Neben der Bindung an aktivierte Thrombozyten besitzt das Konstrukt scFv_{MA2}-TAP eine potente Faktor-Xa-inhibitorische Wirkung. Anhand des oben beschriebenen Faktor-Xa-Inhibitions-Assays konnte eine Hemmung des Faktor Xa schon mit extrem kleinen Konzentrationen an Fusionsprotein erreicht werden. Der scFv_{MA2mut}-TAP zeigt die gleiche fXa-inhibitorische Potenz wie der scFv_{MA2}-TAP, bei allerdings verllorener Bindungskapazität.

Vergleichende Faktor-Xa-Inhibition

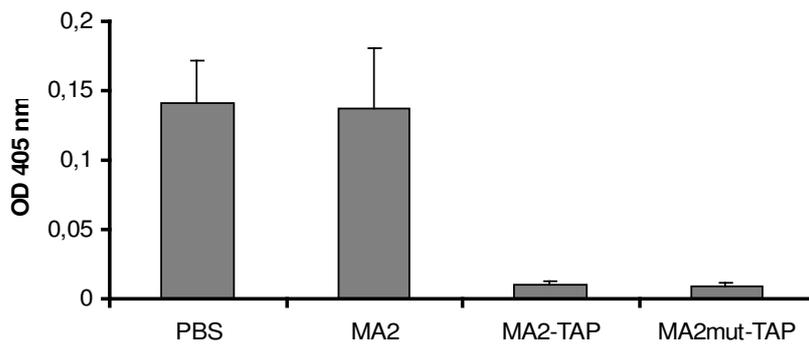


Abb. 4.r. Vergleichende Faktor-Xa-Inhibition. Die beiden TAP-fusionierten Konstrukte zeigen im Gegensatz zum scFv_{MA2} und zum PBS Puffer eine deutliche fXa inhibitorische Potenz.

Je weniger Faktor Xa inhibiert wurde, desto stärker ist der Farbumschlag des chromogenen Substrates und somit die optische Dichte (OD). Die beiden TAP-fusionierten Proteine zeigen eine sehr hohe fXa inhibitorische Potenz.

3. Nachweis der Fibrinogen-Verdrängung vom GP IIb/IIIa Rezeptor durch die Konstrukte scFv_{MA2}-TAP und scFv_{MA2}

Dieser Versuch soll veranschaulichen, wie an Thrombozyten gebundenes Fibrinogen durch die Proteine scFv_{MA2}-TAP und scFv_{MA2} vom Rezeptor verdrängt wird. Ein Fibrinogen-Antikörper wurde zu diesem Zweck zu aktivierten Thrombozyten gegeben, zu denen man oben genannte Proteine addierte. Deutlich zu erkennen ist der Rückgang der Fluoreszenz nach Zugabe der beiden Konstrukte.

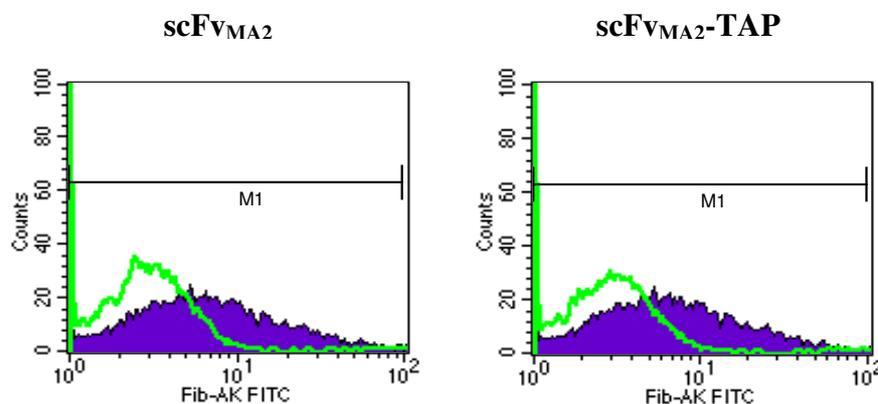


Abb. 4.t. Fibrinogen-Verdrängung durch scFv_{MA2}-TAP und scFv_{MA2} im Vergleich. Blau: Fluoreszenz ohne Zugabe von Konstrukt. Grün: Fluoreszenz nach Zugabe von scFv_{MA2} und scFv_{MA2}-TAP.

4. Bifunktionaler Assay für das Fusionsprotein scFv_{MA2}-TAP

Nach Aktivierung der Plättchen, waren diese in der Lage, das Fusionsprotein scFv_{MA2}-TAP zu binden und selbst eine fXa inhibitorische Potenz zu erlangen. Im Gegensatz zu nicht aktivierten Thrombozyten war die Wirkung des gebundenen TAP identisch mit der Kontrolle (gleiche Menge scFv_{MA2}-TAP, aber keine Thrombozyten), was darauf schließen lässt, dass quasi jedes einzelne Molekül an Plättchen gebunden vorlag!

Die schwache Inhibition von unstimulierten Thrombozyten ist wahrscheinlich auf die unvermeidbare Aktivierung durch Manipulationen und Zentrifugationsschritte zu erklären.

Bindung von MA2-TAP ausschließlich an aktivierte Thrombozyten

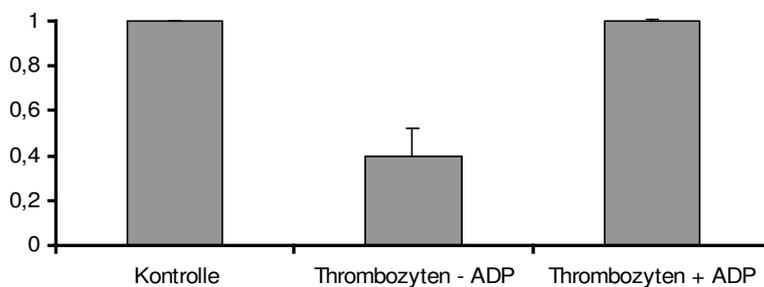


Abb. 4.u. Faktor Xa Inhibition in Abhängigkeit vom Aktivierungsstatus der Thrombozyten

5. Hemmung der Thrombozytenaggregation

Gleich dem scFv_{MA2} ist auch das gekoppelte Protein scFv_{MA2}-TAP zu einer starken Hemmung der Aggregation fähig. Dargestellt sind exemplarisch die Aggregometriekurven von verschiedenen Konzentrationen an Fusionsprotein. Bei ungefähr 50 µg/ml hat man eine komplette Inhibition der Aggregation erreicht.

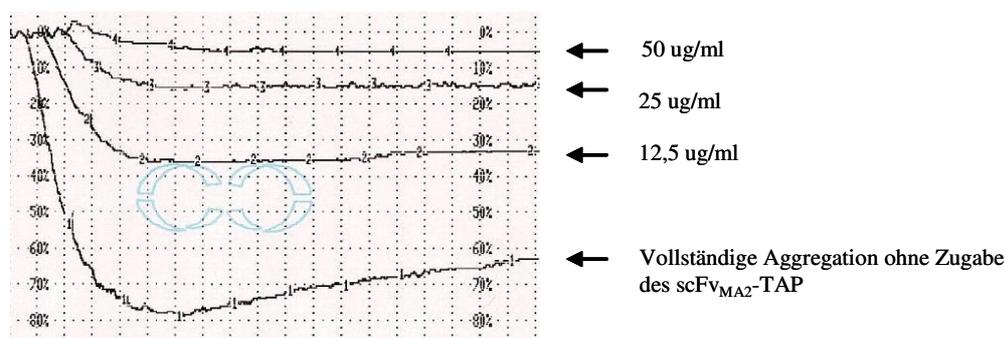
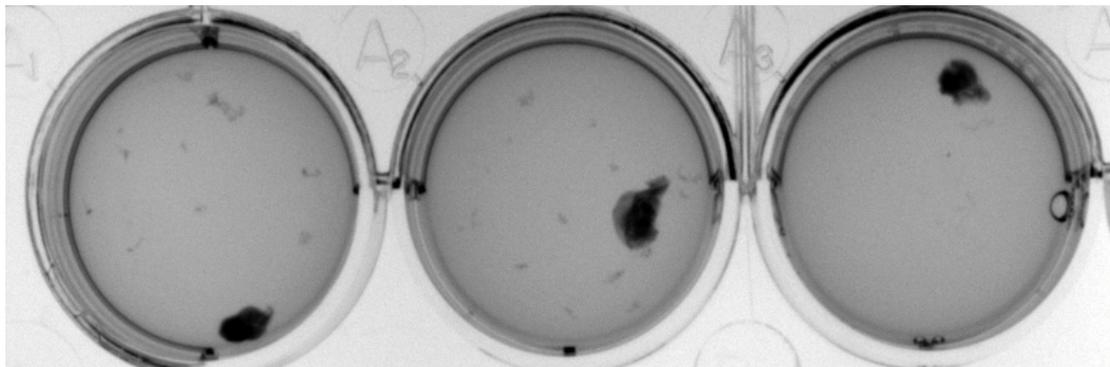


Abb. 4.v. Aggregometriekurven für das Fusionsprotein scFv_{MA2}-TAP

6. Hemmung der Aggregatbildung nach Induktion durch Thrombozyten-Clot

Durch diesen Versuch soll noch einmal anschaulich verdeutlicht werden, wie das Fusionsprotein scFv_{MA2}-TAP, im Gegensatz zu der mutierten Form scFv_{MA2mut}-TAP, die Aggregatbildung verhindert. Die Initiation der Aggregation wurde durch einen Thrombozyten-Clot gestartet. Im PRP mit scFv_{MA2}-TAP zeigten sich keinerlei Aggregate, während die mutierte Form diese nicht verhindern konnte.



PRP + PBS

PRP + MA2mut-TAP

PRP + MA2-TAP

Abb. 4.w. Die Aggregatbildung wird durch Zugabe von scFv_{MA2}-TAP gehemmt.

7. Bindung von scFv_{MA2}-TAP an adhärenente Thrombozyten, Nachweis eines Targeting

Durch die Bindung von scFv_{MA2}-TAP an adhärenente Thrombozyten würde man eine Hemmung des plasmatischen Gerinnungssystems am Ort der höchsten Faktor Xa Konzentration erreichen, nämlich auf der Oberfläche von aktivierten Blutplättchen im Thrombus. Wir konnten zeigen, dass auf Fibrinogen adhärenente Thrombozyten mit gebundenem scFv_{MA2}-TAP den Faktor Xa ausgezeichnet hemmten. Im Gegensatz zum scFv_{MA2}-TAP, wurde durch eine 5-fache Verdünnung der mutierte scFv_{MA2mut}-TAP von der Plättchenoberfläche gewegewaschen und konnte folglich nicht mehr hemmend wirken.

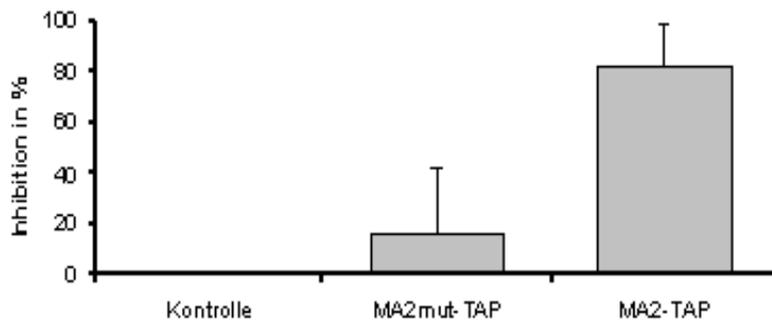


Abb. 4.x. Targeting-Effekt des Fusionsproteins $scFv_{MA2}$ -TAP im Vergleich zu $scFv_{MA2mut}$ -TAP und einer PBS Kontrolle.

Das Konstrukt $scFv_{MA2mut}$ -TAP, ein Fusionsprotein mit gleicher fXa-inhibitorischer Potenz als $scFv_{MA2}$ -TAP, mit jedoch fehlender Plättchenbindung, hat nur einen sehr geringen gerinnungshemmenden Effekt, während $scFv_{MA2}$ -TAP eine ausgezeichnete Inhibition der plasmatischen Gerinnung zeigt.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, kleinstmögliche Fusionsproteine aus einem scFv-Fragment und therapeutisch wichtigen Substanzen auf gentechnischem Weg durch Rekombination der interessierenden Gene herzustellen. Dabei wurde rekombinantes TAP - ein potenter direkter Faktor-Xa-Inhibitor - einerseits mit dem fibrinspezifischen scFv_{59d8} und andererseits mit dem aktivierungsspezifischen GP Iib/IIIa Blocker MA2 fusioniert.

5.1. Die Fusionsproteine scFv_{59d8}-TAP und scFv_{59d8}-Xa-TAP

Das Konstrukt scFv_{59d8}-TAP wurde mit rekombinanter Technologie hergestellt und setzt sich zusammen aus dem fibrinspezifischen scFv_{59d8} (Peter, Graeber et al. 2000) und dem selektiven Faktor-Xa-Inhibitor Tick Anticoagulant Peptide (Neeper, Waxman et al. 1990; Waxman, Smith et al. 1990). Zielsetzung war die Herstellung eines Konstruktes mit maximaler Wirkung des TAP am fibrinreichen Thrombus, während systemisch niedrige Konzentrationen des Konstruktes das Spektrum der Nebenwirkungen einschränken sollen.

Der single-chain Antikörper scFv_{59d8} zeigt eine deutliche Affinität und Spezifität für Fibrin. Er bindet an das β_{1-7} -Peptid des Fibrinmoleküls, das durch Thrombin-vermittelte Abspaltung des Fibrinopeptids B vom Fibrinogenmolekül präsentiert wird. Das Epitop β_{1-7} ist im Fibrinogen konformational verdeckt und so nicht für den scFv_{59d8} zugänglich (Hui, Haber et al. 1983). Der Antikörper zeigt demnach keine Kreuzreaktion gegen Fibrinogen, sondern nur Affinität zu Fibrin. Damit wird deutlich, dass sich das an den scFv_{59d8} gebundene TAP an Orten erhöhter Thrombinkonzentration anreichern wird, da die Fibrinogen-Konversion durch Thrombin verursacht wird.

Ein nicht geringer Teil an aktiviertem Thrombin liegt fibrinengebunden im Thrombus vor und entzieht sich somit einer Antithrombin-vermittelten Inhibition durch Heparin (Weitz, Hudoba et al. 1990). Der an Plättchen gebundene Prothrombinase-Komplex aus Faktor Xa und Va ist

ebenfalls nicht indirekt durch Heparin hemmbar und potenziert kaskadenartig durch Feedback-Mechanismen eine weitere lokale Anflutung von Thrombin (Mann et al. 1990).

Die Thrombusoberfläche selbst wirkt stark thrombogen (Gash et al. 1986), vermutlich direkt bedingt durch das Thrombus-gebundene Thrombin und den Faktor Xa. Nach einer Lysetherapie beobachtet man häufig eine Heparin-resistente Reokklusion (Weitz, Hudoba et al. 1990), welche durch freigelegtes fibrin gebundenes Thrombin und plättchen gebundenen Faktor Xa (Eisenberg et al. 1993) verursacht wird. Therapeutisch lag eine direkte Hemmung dieser prokoagulant Faktoren auf der Hand. Noch immer ist allerdings strittig, ob die Thrombin-Hemmung oder die Faktor-Xa-Inhibition diese Ziele besser erreicht.

Bahnbrechende Arbeiten (Sitko, Ramjit et al. 1992; Eisenberg, Siegel et al. 1993; Prager et al. 1995; McKenzie, Abendschein et al. 1996) konnten zeigen, dass die direkte Thrombin-Inhibition zwar entscheidende Vorteile gegenüber Heparin besitzt, jedoch eine Reokklusion nicht definitiv verhindern kann (Theroux et al. 1992; Gold et al. 1993). Entscheidend ist, dass nach der Thrombin-Inhibition der Prothrombinase-Komplex weiterhin in der Lage ist, Prothrombin effektiv zu aktivieren. Ein Fortschreiten oder Wiederauftreten einer Thrombose scheint nur durch die direkte hochspezifische Faktor-Xa-Inhibition (z.Bsp. durch rTAP) gewährleistet (McKenzie, Abendschein et al. 1996).

Weder Low Molecular Weight Heparin (LMWH), noch direkte Thrombin-Blocker (z.Bsp. Hirudin) konnten ein besseres Unterdrücken des Thrombuswachstums erreichen als das TAP (Prasa, Svendsen et al. 1997). In verschiedenen tierexperimentellen Studien konnte die Effizienz der direkten Inhibition des Faktor Xa (u.a. durch TAP) eindrucksvoll bestätigt werden (Schaffer, Davidson et al. 1991; Lynch, Sitko et al. 1994; Wong, Crain et al. 2000; Abendschein, Baum et al. 2001).

Das neue Pentasaccharid Fondaparinux hemmt zwar selektiv den Faktor Xa, jedoch auch indirekt über AT (Keam and Goa 2002; Morris 2002). Thrombus-gebundener Prothrombinase-Komplex wird weder erreicht, noch inhibiert.

Der Wirkmechanismus des Fusionsproteins scFV_{59d8}-TAP ist neuartig: der fibrinspezifische scFV_{59d8} bewirkt eine lokale Anreicherung des Konstruktes am Thrombus, d.h. am Ort der höchsten Konzentration an Faktor Xa. Da hauptsächlich der Thrombus-gebundene Faktor Xa

für das Fortschreiten einer Thrombose entscheidend ist, ist die erhöhte Konzentration an TAP am Gerinnsel optimal.

Wie wir in dieser Arbeit (Hagemeyer et al. 2004) zeigen konnten, besitzt scFv_{59d8}-TAP eine hohe Faktor-Xa-inhibitorische Potenz. Besonders eindrucksvoll ist die zehnfach bessere Hemmung des Thrombus-Wachstums, verglichen mit einem Konstrukt ohne Targeting, d.h. ohne lokale Anreicherung (s. Abb. 4.p.). An der Thrombus-Oberfläche erhöhte Konzentrationen an TAP hemmen den hier in großen Mengen vorhandenen Faktor Xa. Weiterhin ausschlaggebend für die hervorragende Wirkung des TAP ist dessen bevorzugte Hemmung des im Prothrombinase-Komplex vorliegenden Faktor Xa (Krishnaswamy, Vlasuk et al. 1994) im Vergleich zu freiem Faktor Xa. Da besonders venöse Gerinnsel reich an Fibrin sind, ist eine zukünftige Anwendung des scFv_{59d8}-TAP bei diesem Krankheitsbild im Tierversuch zu überprüfen.

Der Einsatz von single-chain Antikörpern zeigt gegenüber kompletten, durch Immunisierung von Tieren gewonnenen Immunglobulin-Molekülen, deutliche Vorteile. So besitzen sie kürzere Retentionszeiten im Nicht-Ziel-Gewebe und eine bessere Penetration in das Zielgewebe (Haber 1986), eine höhere Plasma-Clearance (Laroche et al. 1991) und eine geringere Immunogenität (Rodwell 1989), die sich sowohl aus der verringerten Größe als auch aus dem Fehlen der Fc-Region (Bird, Hardman et al. 1988), die die Immunantwort vermitteln soll, herleitet. Die rekombinante Technologie erlaubt die kostengünstige Expression der Konstrukte in Bakterien und den einfachen Austausch des Antikörper- oder des TAP-Anteils zum Design von neuartigen Fusionsmolekülen (Peter, Graeber et al. 2000).

Das Einfügen einer Faktor-Xa-Schnittstelle zwischen scFv und TAP stellte sich leider als nicht erfolgsversprechend heraus. Das TAP sollte freigesetzt werden, damit dessen aktives N-terminales Ende (Wei, Alexander et al. 1998) zur Wirkung kommt. Obwohl die Faktor-Xa-Schnittstelle aktiv war (s. Abb. 4.m.), ließ sich kein Unterschied zwischen den beiden Konstrukten scFv_{59d8}-TAP und scFv_{59d8}-Xa-TAP feststellen (s. Abb. 4.o.). Wahrscheinlich wird ein Faktor-Xa-Molekül vom Fusionsprotein abgefangen und nicht-kovalent gebunden, bevor ein zweites Molekül an der Schnittstelle schneiden kann. Es wird demnach kein freies TAP abgespalten, sondern ein Komplex aus Faktor-Xa und TAP, welcher chemisch völlig inert ist.

Eine wesentliche Limitation dieses Projektes lag in der Herstellung ausreichender Mengen an funktionsfähigem Protein. Die präparierten Mengen reichten zwar zur Charakterisierung und funktionellen Testung *in vitro* aus, jedoch müssen wesentlich größere Mengen bereitgestellt werden, um adäquat Tierversuche durchführen zu können. In Abbildung 4.j. wird deutlich, dass das pHog21-Vektorsystem nur sehr bedingt für die Expression von scFv_{59d8}-TAP und scFv_{59d8}-Xa-TAP geeignet ist. Die häufig beobachtete Lyse der Bakterien nach Induktion der Expression spricht für die Toxizität der Fusionsproteine. Da sich andere TAP-gekoppelte Proteine problemlos exprimieren lassen, ist es sehr wahrscheinlich der scFv_{59d8}, der eine optimale Expression durch eine toxische Komponente verhindert. Die Umklonierung in streng regulierte, speziell für giftige Proteine hergestellten Vektoren sollen dieses Hindernis in Zukunft umgehen.

5.2. Das Fusionsprotein scFv_{MA2}-TAP

Zielgerichtetes rTAP ist ein neuer Ansatz in der Therapie der rekurrierenden Thrombose nach sonst einwandfrei gelaufener perkutaner transluminaler koronarer Angioplastie mit oder ohne Einsetzen von Stents. Des weiteren können möglicherweise die thrombotischen Komplikationen der Atherosklerose oder die wiederkehrende Thrombose nach erfolgreicher Thrombolyse effektiv durch scFv_{MA2}-TAP verhindert werden.

Thromben haben eine gerinnungsfördernde Wirkung und können somit eine Rethrombose induzieren (Badimon et al. 1988) oder die Wirksamkeit von fibrinolytischen Pharmaka limitieren (Gash et al. 1986). Dieser Vorgang ist abhängig von der *de novo* Aktivierung von Prothrombin durch den Xa/Va Komplex und nicht durch schon vorhandenes Thrombusgebundenes Thrombin (Prager et al. 1995). Für den Hauptnachteil der Fibrinolyse, nämlich die häufig wiederkehrende Ischämie nach frühem Heparinentzug, wurde lange Zeit fibrin gebundenes Thrombin verantwortlich gemacht, welches der indirekten AT-vermittelten Inhibition durch Heparin entgeht (Weitz, Hudoba et al. 1990). Rand et al. konnten zeigen, dass der Faktor Xa der limitierende Faktor der Thrombinherstellung ist (Rand et al. 1996). Andere Forschungsgruppen bewiesen, dass die direkte AT-unabhängige Thrombinhemmung weniger effektiv ist als die direkte Faktor Xa Inhibition (McKenzie et al. 1996; Lynch et al. 1994; Prasa et al. 1997)

Das Fusionsprotein scFV_{MA2}-TAP kombiniert eine potente direkte Faktor Xa Inhibition mit aktivierungsspezifischer GP IIb/IIIa Blockade und, des weiteren, zielgerichteter Wirkung auf Fibrinogen-anhaftenden Plättchen. Die Bindungskapazität des Fusionsproteins scFV_{MA2}-TAP an den aktivierten GP IIb/IIIa Rezeptor wurde durch die Kopplung nicht beeinträchtigt (Abb. 4.q.). Alle weiteren Qualitäten des scFV_{MA2} (Schwarz et al. 2004) wie z. Bsp. die starke Aggregationshemmung (Abb. 4.v. und Abb. 4.w.) und die Fibrinogenverdrängung (Abb. 4.t.) wurden durch die Fusion ebenfalls nicht geschwächt. Die Faktor Xa inhibierende Potenz des an scFV_{MA2} fusioniertes rTAP konnte eindrucksvoll bestätigt werden (Abb. 4.r.). Sowohl an Plättchen in Suspension (Abb. 4.u.) als auch an Fibrinogen-anhaftenden Plättchen (Abb. 4.x.) ließ sich die potente Faktor Xa Inhibition nachweisen. Durch die Zugabe von scFV_{MA2}-TAP zu den Fibrinogen-adhären Plättchen konnte auch die zielgerichtete Wirkung des Fusionsproteins gezeigt werden: scFV_{MA2mut}-TAP, ein Fusionsprotein mit gleicher Faktor Xa-inhibitorischer Potenz als scFV_{MA2}-TAP, mit jedoch fehlender Plättchenbindung, hatte nur einen sehr geringen gerinnungshemmenden Effekt.

Durch die Anreicherung von scFV_{MA2}-TAP auf der Oberfläche von aktivierten Plättchen werden zwei Ziele erreicht. Einerseits entfaltet rTAP seine inhibitorische Wirkung dort, wo die Konzentration an Faktor Xa am höchsten ist, nämlich in der unmittelbaren Nachbarschaft des plättchengebundenen Prothrombinasekomplexes. Andererseits konnten Krishnaswamy et al. zeigen, dass die Interaktion von Faktor Xa und Faktor Va auf der Plättchenoberfläche zu einer 30fachen Steigerung der Affinität von rTAP zu Faktor Xa führt (Krishnaswamy, Vlasuk et al. 1994). Der inhibitorische Effekt von scFV_{MA2}-TAP auf dem Thrombozyten ist somit weitaus höher als etwa in Suspension.

Neben der Wirkung von rTAP überzeugt scFV_{MA2} ebenfalls durch zahlreiche Funktionen: scFV_{MA2} bindet ausschließlich an aktivierte Plättchen, inhibiert die Fibrinogenbindung an aktivierte Plättchen und blockiert die Thrombozytenaggregation. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass scFV_{MA2} die Plättchenadhäsion, welche durch den nicht-aktivierten GP IIb/IIIa Rezeptor vermittelt wird, nicht beeinträchtigt und des weiteren keine Liganden-induzierte Konformationsänderungen des Rezeptors nach sich zieht (Schwarz et al. 2004).

Orvim et al. zeigten, dass die Kollagen-induzierte Thrombusformation wenig durch rTAP gehemmt wurde. In ihren Versuchen konnte eine signifikante Abnahme der Thrombusbildung nur in Strömungsverhältnissen normaler Koronargefäße gezeigt werden und nicht in solchen

mit hohen Scherkräften, wie sie etwa in atherosklerotisch veränderten Gefäßen anzutreffen sind. Im Gegensatz hierzu wurde die Thrombusformation auf einer tissue factor (TF) beschichteten Oberfläche signifikant durch rTAP gehemmt (Orvim et al. 1995). Die durch tissue factor getriggerte Thrombosebildung ist somit deutlich vom Faktor Xa abhängig. Da am Ort von Gefäßverletzungen sowohl TF als auch eine ganze Reihe von Kollagentypen präsentiert werden, sind für eine optimale Verhinderung der Thrombusformation neben einer potenten Plättcheninhibition ebenfalls eine selektive Faktor Xa Hemmung nötig. Der neu hergestellte scFV_{MA2}-TAP erfüllt beide Aufgaben: auf der einen Seite glänzt er durch eine starke Faktor Xa Inhibition und auf der anderen Seite überzeugt er durch eine Aktivations-spezifische Blockade der Thrombozyten.

Infusionen von GP IIb/IIIa Antagonisten, welche die Thrombusformation hemmen, resultieren in der Ablagerung von einem äußerst prokoagulantem Plättchen-Monolayer (Kirchhofer et al. 1995). Dieser kann selbständig die Gerinnung induzieren und ist Ausgangsbasis für die Fibrinbildung sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter der Infusion von GP IIb/IIIa Antagonisten. Koinfusion eines potenten fXa Inhibitors verhinderte jegliche Fibrinbildung. Diese potentielle prokoagulante Aktivität der GP IIb/IIIa Antagonisten könnte durch scFV_{MA2}-TAP verhindert werden. Der plättchengebundene Prothrombinasekomplex ist ein vielversprechender Angriffspunkt für die Inhibition der Fibrinbildung.

Während der GP IIb/IIIa blockierende Antikörper die Thrombozytenaggregation (primäre Hämostase) hemmt, inhibiert das Antikoagulans TAP die Fibrinbildung (sekundäre Hämostase). Da beide Teile des hämostatischen Systems (Aggregation und Koagulation) eng miteinander verknüpft sind und sich gegenseitig aktivieren, potenziert sich die inhibitorische Wirkung des bifunktionalen Moleküls. Weiterhin erreicht man ein Targeting des Fusionsproteins am thrombozytenreichen Thrombus des *arteriellen* Systems (z.Bsp. in den Koronarien).

6. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es mittels molekularbiologischer Methoden kleinstmögliche, antikoagulatorisch wirksame Fusionsproteine bestehend aus „single-chain“ Antikörperfragmenten und einem potenten, direkten Faktor Xa Inhibitor herzustellen.

Single-chain Antikörper sind über einen Linker zu einer „Kette“ verbundene Immunglobulin-Derivate, die nur aus den variablen Regionen der schweren und leichten Kette bestehen. Das Tick Anticoagulant Peptide (TAP) ist ein neuartiger Serinprotease-Inhibitor, der sehr effektiv und hochselektiv den Faktor Xa hemmt. In der vorliegenden Arbeit wurde das aus 60 Aminosäuren bestehende Protein an zwei verschiedene single-chain Antikörper fusioniert: 1) an den fibrinspezifischen scFV_{59d8} 2) an den für aktivierte Thrombozyten spezifischen scFV_{MA2}. Die entsprechenden DNA-Stücke wurden mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) fusioniert, in den Vector pHog21 ligiert und in TG1 E. coli exprimiert. Die Hauptschwierigkeit der vorliegenden Promotionsarbeit war die Expression eines korrekt gefalteten Proteins. Eine Optimierung der Proteinexpression und –aufreinigung war nur durch eine Vielzahl systematischer methodischer Untersuchungen möglich.

Das Konstrukt scFV_{59d8}-TAP reichert sich lokal am fibrinreichen *venösen* Thrombus an. Die Fibrinspezifität erlaubt eine hohe TAP Konzentration am Thrombus und somit eine potente Faktor Xa Inhibition auf der Oberfläche des Gerinnsels bei gleichzeitig systemisch niedrigen Konzentrationen an Fusionsprotein. Wir konnten zeigen, dass sich scFV_{59d8}-TAP tatsächlich am Thrombus anreichert und hierdurch zu einer hocheffektiven antikoagulativ wirksamen Substanz wird.

Das Protein scFV_{MA2}-TAP vereint gleichzeitig drei herausragende Qualitäten. Erstens blockiert es ausschließlich den aktivierten Zustand des GP IIb/IIIa Rezeptors der Thrombozyten. Zweitens bewirkt die TAP-Komponente des Konstruktes eine potente Faktor Xa Inhibition neben der effektiven Thrombozyteninhibition und drittens reichert sich das TAP genau dort an, wo die Konzentration an Prothrombinasekomplex am größten ist, nämlich unmittelbar auf der Plättchenoberfläche.

In weiterführenden Arbeiten sollen nun die beschriebenen Vorteile der hergestellten Fusionsproteine in vivo überprüft werden. Die neu hergestellten Antikoagulativa versprechen eine hohe lokale Wirksamkeit bei reduziertem Blutungsrisiko.

7. Sequenzen

7.1. ScFv59d8-TAP

← PelB leader →
 1-39 ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGC TTG CTG
 → NcoI
 40-78 CTG CTG GCA GCT CAG CCG GCC ATG GCG CAG GTG CAG CTG
 79-117 CAG CAG TCT GGG GGA GAC TTA GTG AAG CCT GGA GGG TCC
 118-156 CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC AGT TTC AGC
 157-195 AGC TAT GGC ATG TCT TGG GTT CGC CAG ACT CCA GAC AAG
 196-234 AGG CTG GAG TGG GTC GCA AGT ATT AGT AGT GGT GGA AGG
 235-273 CAC ACC TAC TAT CCA GAC AGT GTG AAG GGG CGA TTC ACC
 274-312 ATT TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAT CTG CAA
 313-351 ATG AGC AGT CTG AAG TCT GAG GAC ACA GCC ATG TAT TTC
 352-390 TGT GCA AGA CAG GAG GGG GAT TAC GAC GAC TGG GGC CAA
 391-429 GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCT TCA GGT GGA GGC GGT TCA
 430-465 GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATC
 466-504 GAG CTC ACT CAG TCT CCA CTC ACT TTG TCG GTT ATC ATT
 505-543 GGA CAA CCA GCC TCC ATC TCT TGC AAG TCA AGT CAG AGC

VH

544-582 CTC TTA TAT AGT GAT GGA ACG ACA TAT TTG AAT TGG TTG

583-621 TTA CAG AGG CCA GGC CAG TCT CCA AAG CGC CTA ATC TAT

622-660 CTG GTG TCT AAA GTG GAC TCT GGA GTC CCT GAC AGG TTC

661-699 ACT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT TTC ACA CTG AAA ATC

700-738 AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT TTG GGA GTT TAT TAT TGC

739-777 TGG CAA GGT ACA CAT TTT CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG

778-816 ACC AAG CTG GAG CTG AAA CGG GCG GCC GCT GGA TCC TAC

NotI

817-855 AAC CGT CTG TGC ATC AAA CCG CGT GAC TGG ATC GAC GAA

856-894 TGC GAC TCC AAC GAA GGT GGT GAA CGT GCT TAC TTC CGT

895-933 AAC GGT AAA GGT GGT TGC GAC TCC TTC TGG ATC TGC CCG

934-972 GAA GAC CAC ACC GGT GCT GAC TAC TAC TCC TCC TAC CGT

973-1011 GAC TGC TTC AAC GCT TGC ATC GGT GGA GGC TCA GAA CAA

1012-1050 **AAG CTG ATC TCA GAA GAA GAT CTA AAC TCA CAT CAC CAT**

c-myc

HisTag →

1051-1062 **CAC CAT CAC TAA**
STOP

VL

TAP

7.2. scFv_{59d8}-Xa-TAP

1-39 ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGC TTG CTG
 40-78 CTG CTG GCA GCT CAG CCG GCC ATG GCG CAG GTG CAG CTG
 79-117 CAG CAG TCT GGG GGA GAC TTA GTG AAG CCT GGA GGG TCC
 118-156 CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC AGT TTC AGC
 157-195 AGC TAT GGC ATG TCT TGG GTT CGC CAG ACT CCA GAC AAG
 196-234 AGG CTG GAG TGG GTC GCA AGT ATT AGT AGT GGT GGA AGG
 235-273 CAC ACC TAC TAT CCA GAC AGT GTG AAG GGG CGA TTC ACC
 274-312 ATT TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAT CTG CAA
 313-351 ATG AGC AGT CTG AAG TCT GAG GAC ACA GCC ATG TAT TTC
 352-390 TGT GCA AGA CAG GAG GGG GAT TAC GAC GAC TGG GGC CAA
 391-429 GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCT TCA GGT GGA GGC GGT TCA
 430-465 GGC GGA GGT GGC TCT GGC GGT GGC GGA TCG GAC ATC
 466-504 GAG CTC ACT CAG TCT CCA CTC ACT TTG TCG GTT ATC ATT
 505-543 GGA CAA CCA GCC TCC ATC TCT TGC AAG TCA AGT CAG AGC
 544-582 CTC TTA TAT AGT GAT GGA ACG ACA TAT TTG AAT TGG TTG

VH

583-621 TTA CAG AGG CCA GGC CAG TCT CCA AAG CGC CTA ATC TAT

622-660 CTG GTG TCT AAA GTG GAC TCT GGA GTC CCT GAC AGG TTC

661-699 ACT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT TTC ACA CTG AAA ATC

700-738 AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT TTG GGA GTT TAT TAT TGC

739-777 TGG CAA GGT ACA CAT TTT CCA TTC ACG TTC GGC TCG GGG

778-816 ACC AAG CTG GAG CTG AAA CGG GCG GCC GCT GGA TCC **ATC**

817-855 **GAA GGT CGT** TAC AAC CGT CTG TGC ATC AAA CCG CGT GAC

856-894 TGG ATC GAC GAA TGC GAC TCC AAC GAA GGT GGT GAA CGT

895-933 GCT TAC TTC CGT AAC GGT AAA GGT GGT TGC GAC TCC TTC

934-972 TGG ATC TGC CCG GAA GAC CAC ACC GGT GCT GAC TAC TAC

973-1011 TCC TCC TAC CGT GAC TGC TTC AAC GCT TGC ATC GGT GGA

1012-1050 GGC TCA GGA GAT CTA AAC TCA **CAT CAC CAT CAC CAT CAC**

1051-1054 **TAA**
STOP

VL

TAP

7.3. scFv_{MA2}-TAP

1-39 ← pelB leader →
 ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGC TTG CTG 40-
 78 → NcoI
 CTG CTG GCA GCT CAG CCG GCC ATG GCG GAA GTG CAG CTG
 79-117 GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAT AAG CCT GGG GCC TCA
 118-156 GTG AAG GTC TCC TGC AAG GCT TCT GGA TAC ACC TTC ACC
 157-195 GGC TAC TAT ATG CAC TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA
 196-234 GGG CTT GAG TGG ATG GGA TGG ATC AAC CCT AAC AGT GGT
 235-273 GGC ACA AAC TAT GCA CAG AAG TTT CAG GGC TGG GTC ACC
 274-312 ATG ACC AGG GAC ACG TCC ATC AGC ACC GCC TAC ATG GAG
 313-351 CTG AGC AGG CTG AGA TCT GAC GAC ACG GCC GTG TAT TAC
 352-390 TGT GCG AGA GGC CGT GCT TTG TAT AAC CGG AAC GAC CGG
 391-429 TCC CCC AAC TGG TTC GAC CCC TGG GGC CAG GGA ACC CTG
 430-468 GTC ACC GTC TCC TCA GGG AGT GCA TCC GCC CCA ACC CTT
 469-507 AAG CTT GAA GAA GGT GAA TTT TCA GAA GCA CGC GTA CAG
 508-546 GCT GTG CTG ACT CAG CCG CCC TCG GTG TCA GTG GCC CCA
 547-585 GGA CAG ACG GCC AGG ATT ACC TGT GGG GGA AAC AAC ATT

VH

586-624 GGA AGT AAA AGT GTG CAG TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGC

625-663 CAG GCC CCT GTG CTG GTC GTC TAT GAT GAT AGC GAC CGG

664-702 CCC TCA GGG ATC CCT GAG CGA TTC TCT GGC TCC AAC TCT

703-741 GGG AAC ATG GCC ACC CTG ACC ATC AGC AGG GTC GAA GCC

742-780 GGG GAT GAG GCC GAC TAT TAC TGT CAG GTG TGG GAT AGT

781-819 AGT AGT GAT CAT GTG GTA TTC GGC GGA GGG ACC AAG CTG

820-858 ACC GTC CTA GGT CAG CCC AAG GCT GCC CCC TCG GTC ACT

859-897 CTG TTC CCG CCG TCC ^{NotI} GCG GCC GCT GGA TCC TAC AAC CGT

898-936 CTG TGC ATC AAA CCG CGT GAC TGG ATC GAC GAA TGC GAC

937-975 TCC AAC GAA GGT GGT GAA CGT GCT TAC TTC CGT AAC GGT

976-1014 AAA GGT GGT TGC GAC TCC TTC TGG ATC TGC CCG GAA GAC

1015-1053 CAC ACC GGT GCT GAC TAC TAC TCC TCC TAC CGT GAC TGC

1054-1092 TTC AAC GCT TGC ATC GGT GGA GGC TCA GAA CAA AAG CTG

1093-1131 ^{c-myc} ATC TCA GAA GAA GAT CTA AAC TCA ^{HisTag} **CAT CAC CAT CAC CAT**

1132-1137 **CAC TAA**
STOP

VL

TAP

8. Literaturverzeichnis

Abendschein DR, Baum PK, Verhallen P, Eisenberg, PR, Sullivan ME, Light DR (2001). "A novel synthetic inhibitor of factor Xa decreases early reocclusion and improves 24-h patency after coronary fibrinolysis in dogs." J Pharmacol Exp Ther **296**(2): 567-72.

Antuch W, Guntert P, Billeter M, Hawthorne T, Grossenbacher H, Wuthrich K (1994). "NMR solution structure of the recombinant tick anticoagulant protein (rTAP), a factor Xa inhibitor from the tick *Ornithodoros moubata*." FEBS Lett **352**(2): 251-7.

Badimon L, Badimon JJ, Turitto VT, Vallabhajosula S, Fuster V (1988). "Platelet thrombus formation on collagen type I. A model of deep vessel injury. Influence of blood rheology, von Willebrand factor, and blood coagulation." Circulation **78**(6): 1431-1442.

Bird RE, Hardman KD, Jacobson JW, Johnson S, Kaufman BM, Lee SM, Lee T, Pope SH, Riordan GS, Whitlow GM (1988). "Single-chain antigen-binding proteins." Science **242**(4877): 423-6.

Bode C, Hanson SR, Schmedtje JF, Haber E, Mehwald P, Kelly AB, Harker LA, Runge MS (1997). "Antithrombotic potency of hirudin is increased in nonhuman primates by fibrin targeting." Circulation **95**(4): 800-4.

Bode C, Hudelmayer M, Mehwald P, Bauer S, Freitag M, von Hodenberg E, Newell JB, Kubler W, Haber E, Runge MS (1994). "Fibrin-targeted recombinant hirudin inhibits fibrin deposition on experimental clots more efficiently than recombinant hirudin." Circulation **90**(4): 1956-63.

- Bode C, Matsueda GR, Hui KY, Haber E (1985). "Antibody-directed urokinase: a specific fibrinolytic agent." Science **229**(4715): 765-7.
- Dubel S, Breitling F, Klewinghaus I, Little M (1992). "Regulated secretion and purification of recombinant antibodies in E. coli." Cell Biophys **21**(1-3): 69-79.
- Dunwiddie CT, Nepper MP, Nutt EM, Waxman L, Smith DE, Hofmann KJ, Lumma PK, Garsky VM, Vlasuk GP (1992). "Site-directed analysis of the functional domains in the factor Xa inhibitor tick anticoagulant peptide: identification of two distinct regions that constitute the enzyme recognition sites." Biochemistry **31**(48): 12126-31.
- Eisenberg PR, Siegel JE, Abendschein DR, Miletich JP (1993). "Importance of factor Xa in determining the procoagulant activity of whole-blood clots." J Clin Invest **91**(5): 1877-83.
- Gash AK, Spann JF, Sherry S, Belber AD, Carabello BA, McDonough MT, Mann RH, McCann WD, Gault JH, Gentzler RD (1986). "Factors influencing reocclusion after coronary thrombolysis for acute myocardial infarction." Am J Cardiol **57**(1): 175-7.
- Gold HK, Torres FW, Garabedian HD, Werner W, Jang IK, Khan A, Hagstrom JN, Yasuda T, Leinbach RC, Newell JB (1993). "Evidence for a rebound coagulation phenomenon after cessation of a 4-hour infusion of a specific thrombin inhibitor in patients with unstable angina pectoris." J Am Coll Cardiol **21**(5): 1039-47.
- Haber E (1986). "Antibodies in cardiovascular diagnosis and therapy." Hosp Pract (Off Ed) **21**(2): 147-57, 161-2, 165-72.

Hagemeyer CE, Tomic I, Jaminet P, Weirich U, Bassler N, Schwarz M, Runge MS, Bode C, Peter K (2004). "Fibrin-targeted direct factor Xa inhibition: construction and characterization of a recombinant factor Xa inhibitor composed of an anti-fibrin single-chain antibody and tick anticoagulant peptide." Thromb Haemost **92**(1): 47-53.

Hui KY, Haber E, Matsueda GR (1983). "Monoclonal antibodies to a synthetic fibrin-like peptide bind to human fibrin but not fibrinogen." Science **222**(4628): 1129-32.

Jordan SP, Mao SS, Lewis SD, Shafer JA (1992). "Reaction pathway for inhibition of blood coagulation factor Xa by tick anticoagulant peptide." Biochemistry **31**(23): 5374-80.

Jordan SP, Waxman L, Smith DE, Vlasuk GP (1990). "Tick anticoagulant peptide: kinetic analysis of the recombinant inhibitor with blood coagulation factor Xa." Biochemistry **29**(50): 11095-100.

Keam SJ and Goa KL (2002). "Fondaparinux sodium." Drugs **62**(11): 1673-85; discussion 1686-7.

Kirchhofer D, Tschopp TB, Steiner B, Baumgartner HR (1995). "Role of collagen-adherent platelets in mediating fibrin formation in flowing whole blood." Blood **86**(10): 3815-3822.

Kohler G and Milstein C (1975). "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity." Nature **256**(5517): 495-7.

Krishnaswamy S, Vlasuk GP, Bergum PW (1994). "Assembly of the prothrombinase complex enhances the inhibition of bovine factor Xa by tick anticoagulant peptide." Biochemistry **33**(25): 7897-907.

- Laroche Y, Demaeyer M, Stassen JM, Gansemans Y, Demarsin E, Matthyssens G, Collen D, Holvoet P (1991). "Characterization of a recombinant single-chain molecule comprising the variable domains of a monoclonal antibody specific for human fibrin fragment D-dimer." J Biol Chem **266**(25): 16343-9.
- Lim-Wilby MS, Hallenga K, de Maeyer M, Lasters I, Vlasuk GP, Brunk TK (1995). "NMR structure determination of tick anticoagulant peptide (TAP)." Protein Sci **4**(2): 178-86.
- Little M, Welschof M, Braunagel M, Hermes I, Christ C, Keller A, Rohrbach P, Kurschner T, Schmidt S, Kleist C, Terness P (1999). "Generation of a large complex antibody library from multiple donors." J Immunol Methods **231**(1-2): 3-9.
- Lynch JJ, Jr., Sitko GR, Mellott MJ, Nutt EM, Lehman ED, Friedman PA, Dunwiddie CT, Vlasuk GP (1994). "Maintenance of canine coronary artery patency following thrombolysis with front loaded plus low dose maintenance conjunctive therapy. A comparison of factor Xa versus thrombin inhibition." Cardiovasc Res **28**(1): 78-85.
- Mann KG, Nesheim ME, Church WR, Haley P, Krishnaswamy S (1990). "Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes." Blood **76**(1): 1-16.
- McKenzie CR, Abendschein DR, Eisenberg PR (1996). "Sustained inhibition of whole-blood clot procoagulant activity by inhibition of thrombus-associated factor Xa." Arterioscler Thromb Vasc Biol **16**(10): 1285-91.
- Morris, E. (2002). "Fondaparinux versus enoxaparin for prevention of venous." Lancet **360**(9345): 1604-5; author reply 1605.

- Neeper MP, Waxman L, Smith DE, Schulman CA, Sardana M, Ellis RW, Schaffer LW, Siegl PK, Vlasuk GP (1990). "Characterization of recombinant tick anticoagulant peptide. A highly selective inhibitor of blood coagulation factor Xa." J Biol Chem **265**(29): 17746-52.
- Orvim U, Barstad RM, Vlasuk GP, Sakariassen KS (1995). "Effect of selective factor Xa inhibition on arterial thrombus formation triggered by tissue factor/factor VIIa or collagen in an ex vivo model of shear-dependent human thrombogenesis." Arterioscl Thromb Vasc Biol **15**: 2188-2194.
- Peter K, Graeber J, Kipriyanov S, Zewe-Welschhof M, Runge MS, Kubler W, Little M, Bode C (2000). "Construction and functional evaluation of a single-chain antibody fusion protein with fibrin targeting and thrombin inhibition after activation by factor Xa." Circulation **101**(10): 1158-64.
- Peter K and O'Toole TE (1995). "Modulation of cell adhesion by changes in alpha L beta 2 (LFA-1, CD11a/CD18) cytoplasmic domain/cytoskeleton interaction." J Exp Med **181**(1): 315-26.
- Prager NA, Abendschein DR, McKenzie CR, Eisenberg PR (1995). "Role of thrombin compared with factor Xa in the procoagulant activity of whole blood clots." Circulation **92**(4): 962-7.
- Prasa D, Svendsen L, Sturzebecher J (1997). "Inhibition of thrombin generation in plasma by inhibitors of factor Xa." Thromb Haemost **78**(4): 1215-20.
- Rand MD, Lock JB, van't Veer C, Gaffney DP, Mann KG (1996). "Blood clotting in minimally altered whole blood." Blood **88**(9): 3432-45.

Rodwell JD (1989). "Engineering monoclonal antibodies." Nature **342**(6245): 99-100.

Schaffer LW, Davidson JT, Vlasuk GP, Siegl PK (1991). "Antithrombotic efficacy of recombinant tick anticoagulant peptide. A potent inhibitor of coagulation factor Xa in a primate model of arterial thrombosis." Circulation **84**(4): 1741-8.

Schwarz M, Rottgen P, Takada Y, Le Gall F, Knackmuss S, Bassler N, Buttner C, Little M, Bode C, Peter K (2004). "Single-chain antibodies for the conformation-specific blockade of activated platelet integrin alphaIIb beta3 designed by subtractive selection from naive human phage libraries." FASEB J. **18**(14): 1704-6.

Sitko GR, Ramjit DR, Stabilito II, Lehman D, Lynch JJ, Vlasuk GP (1992). "Conjunctive enhancement of enzymatic thrombolysis and prevention of thrombotic reocclusion with the selective factor Xa inhibitor, tick anticoagulant peptide. Comparison to hirudin and heparin in a canine model of acute coronary artery thrombosis." Circulation **85**(2): 805-15.

Skerra A, Pfitzinger I, Pluckthun A (1991). "The functional expression of antibody Fv fragments in Escherichia coli: improved vectors and a generally applicable purification technique." Biotechnology (N Y) **9**(3): 273-8.

Theroux P, Waters D, Lam J, Juneau M, McCans J (1992). "Reactivation of unstable angina after the discontinuation of heparin." N Engl J Med **327**(3): 141-5.

- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4.
- Tur MK, Huhn M, Sasse S, Engert A, Barth S (2001). "Selection of scFv phages on intact cells under low pH conditions leads to a significant loss of insert-free phages." Biotechniques **30**(2): 404-8, 410, 412-3.
- Vlasuk GP, Ramjit D, Fujita T, Dunwiddie CT, Nutt EM, Smith DE, Shebuski RJ (1991). "Comparison of the in vivo anticoagulant properties of standard heparin and the highly selective factor Xa inhibitors antistasin and tick anticoagulant peptide (TAP) in a rabbit model of venous thrombosis." Thromb Haemost **65**(3): 257-62.
- Waxman L, Smith DE, Arcuri KE, Vlasuk GP (1990). "Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa." Science **248**(4955): 593-6.
- Wei A, Alexander RS, Duke J, Ross H, Rosenfeld SA, Chang CH (1998). "Unexpected binding mode of tick anticoagulant peptide complexed to bovine factor Xa." J Mol Biol **283**(1): 147-54.
- Wei A, Smallwood A, Alexander RS, Duke J, Ross H, Rosenfeld SA, Chang CH (1999). "Crystallization and preliminary X-ray diffraction data of the complex of recombinant tick anticoagulant peptide (rTAP) and bovine factor Xa." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **55** (Pt 4): 862-4.
- Weitz JI, Hudoba M, Massel D, Maraganore J, Hirsh J (1990). "Clot-bound thrombin is protected from inhibition by heparin-antithrombin III but is susceptible to inactivation by antithrombin III-independent inhibitors." J Clin Invest **86**(2): 385-91.

Wong PC, Crain EJ, Knabb RM, Meade RP, Quan ML, Watson CA, Wexler RR, Wright MR, Slee AM (2000). "Nonpeptide factor Xa inhibitors II. Antithrombotic evaluation in a rabbit model of electrically induced carotid artery thrombosis." J Pharmacol Exp Ther **295**(1): 212-8

9. Publikationen

Christoph E. Hagemeyer, PhD*; Ivo Tomic, MD*; Patrick Jaminet, BA*; Uta Weirich, PhD; Marshall S. Runge, MD, PhD[#]; Christoph Bode, MD; and Karlheinz Peter, MD.

Fibrin-targeted Direct Factor Xa Inhibition: Construction and Characterization of a Recombinant Factor Xa Inhibitor Composed of an Anti-fibrin Single-chain Antibody and Tick Anticoagulant Peptide

*These authors contributed equally to this study

Thromb Haemost. 2004 Jul;92(1):47-53

Schwarz M, Jaminet P, Herzog S, Bassler N, Bode C, Peter K

A Unique Fusion Protein Combines Clot Targeting, Platelet Blockade and Direct Factor Xa Inhibition in One Molecule

JTH, Vol3, Suppl 1, Abstract number: OR332

In Vorbereitung:

Patrick Jaminet, BA; Meike Schwarz, MD; Marshall S. Runge, PhD; Christoph Bode, MD; and Karlheinz Peter, MD.

Development of a Fusion Protein Combining Platelet Targeting, Platelet Blockade and Factor Xa Inhibition.

10. Lebenslauf

25. September 1977: Geburt in D - Ludwigshafen als Sohn von

Marcel Jaminet

Liliane Jaminet-Klemmer

Nationalität : luxemburgisch

1984-1990: Grundschule in Erpeldingen (Luxemburg)

1990-1997: Besuch des französisch-sprachigen Lycée Classique de Diekirch (Luxemburg), Abitur

Klassischer Zweig – Latein, Mathematik, Naturwissenschaften

Frühjahr 1997 : Medizinertest der ZVS

Herbst 1997 : Beginn des Medizinstudiums an der Albert-Ludwigs Universität in Freiburg

Herbst 1999 : Ärztliche Vorprüfung

Herbst 2000 : Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Feb 2001- Jan 2003: Experimentelle Doktorarbeit in der Kardiologie unter der Leitung von PD Dr. med. KH Peter, Thema: *Bifunktionale Fusionsproteine: Kombination hochselektiver, direkter Faktor Xa Inhibition mit aktivierungsspezifischer GP IIb/IIIa Blockade einerseits, und zielgerichtetem Fibrin-Targeting andererseits*

Dezember 2001: USMLE Step 1

November 2002: Forschungsaufenthalt am Royal College of Surgeons, Clinical
Pharmacology, Dublin, Irland

Herbst 2003: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Herbst 2004: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Abschluss des Studiums mit der Gesamtnote 1,0

Famulaturen :

März-April 2000 : Kardiologie (Stat. Von Frerichs III) an der Uniklinik Freiburg

März-April 2001 : Anästhesie und Notfallmedizin am Centre Hospitalier du Nord
(Luxemburg)

August 2001: Kinderurologie (Ambulanz, Station und OP) unter der Leitung von
PD Dr. med. Frankenschmidt an der Uniklinik Freiburg

Praktisches Jahr:

Okt. 03 – Jan. 04: Pädiatrie im Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der
Uniklinik Freiburg

Feb. 04 – Apr. 04: Chirurgie (Schwerpunkt Orthopädie und Traumatologie) am
Hôpital de la Providence in Neuchâtel, Lehrkrankenhaus der
Université de Genève, Schweiz

Mai 04 – Juni 04: Innere Medizin (Gastroenterologie und Rheumatologie) am Sunnybrook Health Sciences Center der University of Toronto, Canada

Juli 04 – August 04: Innere Medizin (Kardiologie und Nephrologie) an der New Royal Infirmary der University of Edinburgh, Großbritannien

Sprachen: Deutsch, Französisch, Englisch, Spanisch (Basics)

11. Danksagung

Herrn PD Dr. Karlheinz Peter möchte ich ganz herzlich danken für die Überlassung des interessanten Themas dieser Arbeit und die hervorragenden Möglichkeiten, es zu bearbeiten, sowie für das Ausarbeiten von Lösungen in quasi aussichtslos erscheinenden Lagen. Durch sein ausgesprochenes Engagement neben seiner verantwortungsvollen Tätigkeit in der Klinik konnte diese Arbeit erfolgreich zum Abschluss gebracht werden. Außerdem möchte ich ihm für die Durchsicht und hilfreichen Anmerkungen zum Manuskript danken.

Bei Dr. Meike Schwarz bedanke ich mich für die Vorarbeit mit der Herstellung des scFV_{MA2} und ihre Hilfestellung und gute Laune während langer Laborarbeitstage.

Ebenso danke ich sehr Frau Nicole Baßler für ihr geduldiges Heranführen an das experimentelle Arbeiten und ihre stete Hilfsbereitschaft auch an stressigen Tagen.

Ivo Tomic danke ich für die Herstellung des scFV_{59d8} und die umfangreiche Einführung in das Thema.

Bei Dr. Ingo Ahrens und Dr. Christoph Hagemeyer sowie bei den Doktoranden Sonja Herzog, Christoph Löffler, Thobias Krauss, Georg Franke und allen anderen möchte ich mich für das ausgesprochen gute Klima im Labor und die erholsamen Stunden danach bedanken.

Meinen Eltern danke ich für fortlaufende Unterstützung und Rückhalt während meines gesamten Studiums.