

Aus dem Labor für Immuntherapie
der Medizinischen Klinik I für Innere Medizin
der Universität zu Köln
und dem Institut für Immunologie und Molekularbiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Immunologisches Screening von λ -Phagen-cDNA-
Expressionsbanken zur Detektion
neuer tumorassoziierter Antigene**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Ute Goerres
Tierärztin aus Rheydt
Berlin, 2000

Journal-Nr.: 2435

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Amtierender Dekan: Univ.-Prof. Dr. G. Hildebrandt

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. M. F. G. Schmidt

Zweiter Gutachter: PD Dr. med. A. Engert

Tag der Promotion: 18. Januar 2001

Für meine Eltern
und für Markus

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Immuntherapie maligner Erkrankungen	1
1.1.1 Tumorstoffe und dendritische Zellen	1
1.1.2 Antikörper	3
1.1.2.1 Unkonjugierte Antikörper.....	4
1.1.2.2 Konjugierte Antikörper.....	5
1.1.3 Immuntherapie des Mammakarzinoms.....	7
1.2 Generierung neuer tumorspezifischer Antikörper für die Immuntherapie.....	8
1.2.1 Die Hybridom-Technologie	8
1.2.2 Die phage display Technik	10
1.2.2.1 Das Prinzip: Exprimierung von Antikörpern auf der Oberfläche filamentöser Phagen	10
1.2.2.2 Erstellung von phage display Antikörperbibliotheken	12
1.2.2.3 Selektion von phage display Antikörperbibliotheken	14
1.2.2.4 Charakterisierung der selektionierten Antikörper	15
1.3 Detektion neuer tumorassoziierter Antigene als Zielstrukturen für die Immuntherapie	16
1.3.1 Detektion tumorassoziierter Antigene mit T-Zellen.....	17
1.3.2 Screening von cDNA-Expressionbanken	17
1.3.2.1 Lambda-Phagen-Vektoren.....	18
1.3.2.2 Screening von λ -Phagen-cDNA-Expressionsbanken mit Antikörpern.....	24
1.3.2.3 Das SEREX-System	25
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	26
2 Material	28
2.1 Stammlösungen und Puffer	28
2.2 Lösungen und Puffer für die Agarosegelelektrophorese.....	29
2.3 Medien und Zusätze für die Bakterienkultur	29
2.4 Bakterienstämme.....	31
2.5 Bakteriophagen	31
2.6 Zelllinien	32
2.7 DNA-/RNA-Produkte	32
2.8 Primer.....	33
2.9 Enzyme.....	34
2.10 Antikörper	34
2.11 Kit-Systeme.....	35
3 Methoden	36
3.1 Erstellung einer Mammakarzinom-spezifischen cDNA-Expressionsbank in λ -Phagen	36
3.1.1 RNA-Isolierung aus Zellen.....	36
3.1.2 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	37
3.1.3 Agarosegelelektrophorese.....	37
3.1.4 cDNA-Synthese	39
3.1.5 Größenfraktionierung der cDNA mit Sepharose-Säulen.....	43
3.1.6 Mengenbestimmung der cDNA mittels Ethidium Bromide Plate Assay	44

3.1.7	Ligation der cDNA in λ -Phagen-Vektor ZAP® II	45
3.1.8	Verpackungsreaktion	45
3.1.9	Titerbestimmung der Primärbibliothek mit Blau-Weiß-Selektion	46
3.1.10	Amplifizierung der Primärbibliothek.....	48
3.1.11	Lagerung der cDNA-Expressionsbank	49
3.2	Immunisierung von Mäusen mit Membranfraktionen	49
3.2.1	Präparation der Membranfraktionen.....	49
3.2.2	Immunisierung von Balb/c-Mäusen.....	50
3.2.3	Kontrolle des Antikörpertiters mittels ELISA.....	50
3.3	Screening der Mammakarzinom-spezifischen cDNA-Expressionsbank mit Serum immunisierter Mäuse (SEREX)	50
3.3.1	Absättigung des Serums gegen E.coli-Proteine durch Pseudoscreening.....	50
3.3.2	Ausplattieren der cDNA-Expressionsbank und Übertragung der Phagenplaques auf Nitrozellulosefilter (Plaque Lift)	52
3.3.3	Inkubation der Filter mit Serum	54
3.3.4	Nachweis gebundener Antikörper im APAAP-Assay (Alkalische Phosphatase-Anti Alkalische Phosphatase-Assay)	54
3.3.5	Separation positiver Plaques von der Platte.....	56
3.3.6	Subklonierung positiver Phagen zur Vereinzelung positiver Plaques	57
3.3.7	Excision des p-Bluescript-Plasmids aus λ -Phagen mit ExAssist Helferphagen.....	57
3.3.8	Plasmid-DNA-Minipräparation	58
3.3.9	Anlegen von Bakterien-Glycerolstämmen.....	60
3.3.10	Restriktionsverdau des pBluescript-Plasmids und Größenbestimmung des Inserts im Gel.....	60
3.3.11	Plasmid-Sequenzierung nach der Didesoxy-Methode.....	61
3.4	Genexpressionsanalysen	62
3.4.1	Polymerase chain reaction (PCR).....	62
3.4.2	One Step RT-PCR.....	64
3.4.3	Quantifizierung der Genexpression mittels real time PCR auf dem LightCycler™	65
3.4.3.1	Besonderheiten der PCR-Reaktionskomponenten für die Quantifizierung.....	65
3.4.3.2	Quantifizierung eines Gens in Gewebeproben cDNA.....	65
3.5	Klonierung des CD30-Antigens in λ -Phagen	69
3.5.1	Amplifizierung des CD30-Antigens aus dem Vector pcDNA 3.....	69
3.5.2	Restriktionsverdau CD30-Antigen und λ -Phagen-DNA	69
3.5.3	DNA-Gelextraktion	70
3.5.4	Dephosphorylierung und Ethanolpräzipitation der ZAP® II-DNA	71
3.5.5	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration von Insert und Vektor mit DNA-Standards	72
3.5.6	Ligation der CD30-Antigen-DNA in den λ -Phagen-Vektor ZAP® II.....	72
3.5.7	Etablierung eines stabilen, CD30-Antigen exprimierenden λ -Phagen-Klons	73
3.6	Screening eines Gemisches aus Mammakarzinom-spezifischer cDNA-Expressionsbank und CD30-Antigen-Phagen mit einem anti-CD30 scFv (Ki-4) auf filamentösen Phagen	74
3.6.1	Ausstreichen des Ki-4-Bakterienklons auf Minimalmedium	74
3.6.2	Mischen und Ausplattieren der λ -Phagen.....	75
3.6.3	Gewinnung der Ki-4 scFv-tragenden filamentösen Phagen (phage rescue)....	75

3.6.4	Titerbestimmung phage rescue	76
3.6.5	Selektion der filamentösen Phagen auf Plaque Lifts	77
3.6.6	Nachweis gebundener Phagen	77
4	Ergebnisse	78
4.1	Erstellung einer Mammakarzinom-spezifischen cDNA-Expressionsbank in λ -Phagen	78
4.1.1	RNA-Isolierung aus den Mammakarzinom-Zelllinien BT-474 und 8701-BC.....	78
4.1.2	cDNA-Synthese	79
4.1.3	Ligation der cDNA in den λ -Phagen-Vektor ZAP® II	81
4.1.4	Verpackungsreaktion (packaging reaction) und Titerbestimmung der Primärbibliothek mit Blau-Weiß-Selektion	81
4.1.5	Amplifizierung der Primärbibliothek.....	84
4.2	Immunisierung von Mäusen mit Membranfraktionen	86
4.3	Screening der Mammakarzinom-spezifischen cDNA-Expressionsbank mit Serum immunisierter Mäuse (SEREX)	86
4.3.1	1. Screening	86
4.3.2	2. Screening	87
4.3.3	3. Screening	87
4.4	Analyse der Inserts positiver Klone des 3. Screenings	88
4.4.1	Excision	88
4.4.2	Sequenzierung der Inserts mit Primern T3 und T7.....	89
4.4.2.1	Sequenzierung Inserts 6/8/3 + 6/8/4 (2100 bp, deutlich positiv).....	89
4.4.2.2	Sequenzierung Insert 6/18/8 (1150 bp, schwach positiv).....	92
4.5	Genexpressionsanalysen	95
4.5.1	Nachweis der Rheb-Genexpression in Mammakarzinom- und normalen Brustepithelzellen mittels qualitativer PCR und RT-PCR.....	95
4.5.2	Quantifizierung der Rheb-Genexpression in cDNA von Mammakarzinom- und normalem Brustgewebe mittels real time PCR und LightCycler™	97
4.5.2.1	Beschreibung des LightCycler™ Systems	97
4.5.2.2	Erstellung einer Standard-Verdünnungsreihe des Rheb-Gens	97
4.5.2.3	Photometrische Bestimmung der cDNA-Konzentration von Mammakarzinom und Normalgewebe	98
4.5.2.4	Quantifizierung des Rheb-Gens in einer Normalgewebe- und sechs Mammakarzinom-cDNA-Proben.....	99
4.6	Etablierung eines Modellsystems zur Detektion des Zielantigens eines auf filamentösen Phagen exprimierten scFv in einer λ -Phagen-cDNA- Expressionsbank.....	106
4.6.1	Klonierung des CD30-Antigens in λ -Phagen	106
4.6.2	Screening eines Gemisches aus Mammakarzinom-spezifischer cDNA- Expressionsbank und CD30- λ -Phagen mit einem anti-CD30 scFv (Ki-4) auf filamentösen Phagen.....	109
4.6.3	Excision CD30-positiver Klone des Screenings mit Ki-4-scFv-Phagen	114
4.6.4	Kompetition der Bindung Ki-4-scFv filamentöser Phagen mit monoklonalem Ki-4-Antikörper	114
5	Diskussion.....	117
5.1	Erstellung einer Mammakarzinom-spezifischen λ -Phagen-cDNA- Expressionsbank.....	118
5.2	Screening der Mammakarzinom-spezifischen cDNA-Expressionsbank mit Serum immunisierter Mäuse (SEREX).....	119

5.2.1	Analyse Klon 6/8/3 (deutlich positiv), kodierend für humanes Mitofilin	120
5.2.2	Analyse Klon 6/18/8 (schwach positiv), kodierend für humanes Rheb (<u>R</u> as <u>H</u> omologue <u>E</u> nriched in <u>B</u> rain)	123
5.3	Expressionsanalysen des Rheb-Gens in Mammakarzinom- und normalem Brustgewebe	127
5.4	Etablierung eines Modellsystems zur Detektion des Zielantigens eines auf filamentösen Phagen exprimierten scFv in einer λ -Phagen-cDNA- Expressionsbank	128
6	Zusammenfassung/Summary	136
7	Literaturverzeichnis	140
8	Anhang	148
8.1	Abkürzungsverzeichnis	148
8.2	Chemikalien	151
8.3	Geräte	152
8.4	Sonstiges	153

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. M. F. G. Schmidt für die Betreuung der Doktorarbeit und sein fortwährendes Interesse, obwohl er die Fortschritte immer nur aus der Ferne betrachten konnte.

Die vorliegende Arbeit wurde an der Medizinischen Klinik I für Innere Medizin der Universität zu Köln im Labor für Immuntherapie angefertigt.

Herrn Prof. Diehl danke ich, daß ich meine Arbeit in seiner Abteilung durchführen konnte.

Weiterhin möchte ich Herrn Priv. Doz. Dr. Andreas Engert für die Überlassung der interessanten Aufgabenstellung danken sowie für die Geduld, die er für cDNA-Expressionsbanken und phage display-Probleme aufgebracht hat.

Herrn Dr. Dr. Stefan Barth danke ich für die sachkundige Betreuung, viele ergiebige Diskussionen und unterhaltsame Kickerabende mit der Lab-Crew.

Ganz herzlichen Dank an die Mitglieder der Arbeitsgruppe, die immer meinen Schokoladenvorrat mit mir geteilt haben: An meine Kolleginnen und Kollegen der „ersten Stunde“, Bärbel, Gisela, Silke, Michael H. und Achim, die einen Viehdoktor in die Geheimnisse der Molekularbiologie eingeweiht haben. Dank auch an die „späten Jungs“ Hermann, Mehmet, Michael S. und Thomas sowie an Steffi.

Meinen Eltern möchte ich für ihr Verständnis, die fortwährende Unterstützung, spätabendliche Verpflegung während der Praktika sowie Care-Pakete und tägliche Juist-Postkarten während der Prüfungen danken.

Meinem Mann Markus danke ich für die moralische Aufbauarbeit während der Examen, für sein Verständnis für Wochenendarbeiten und Spätschichten, für die Versorgung mit Gyros und Baguettes im Labor und last but not least für das Ertragen chaotischer Zustände während der Entstehung dieses Werkes.

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die verwendeten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit -einschließlich Tabellen und Abbildungen-, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe.

Lebenslauf

Name		Ute Goerres, geb. Weidenmüller
Anschrift		Krankenhausstr. 117 a 50354 Hürth Tel. (02233) 700174
Geburtsdatum/-ort		23. November 1969 in Rheydt
Nationalität		deutsch
Familienstand		verheiratet
Schulbildung	08/76 - 06/80	Städt. Grundschule Dormagen-Horrem
	08/80 - 05/89	Bettina von Arnim-Gymnasium, Dormagen
Schulabschluß	05/89	Abitur
Studium	10/89 - 03/92	vorklinische Semester Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin
	03/92	Physikum, Freie Universität Berlin
	04/92 - 03/96	klinische Semester Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin
Studienabschluß	03/96	Drittes Staatsexamen Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin
Approbation	03/96	Erteilung der Approbation als Tierärztin
Promotion	05/96	Zulassung zum Promotionsverfahren durch die Promotionskommission des Fachbereichs Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin
Beruflicher Werdegang	seit 01/97	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Labor für Immuntherapie der Medizinischen Klinik I der Universität zu Köln