

Aus dem
Institut für Molekularbiologie und Biochemie
des Fachbereichs Grundlagenmedizin
der Freien Universität Berlin
(Arbeitsgruppe Prof. Dr. W. Reutter)

**Gewinnung zweier monoklonaler Antikörper gegen
Proteine des colorectalen Carcinoms**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
am Fachbereich Humanmedizin
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Philipp Kiewe
aus Berlin

Niklas Noack
aus Freiburg im Breisgau

Berlin 2002

Referent: Prof. Dr. W. Reutter

Koreferent: Prof. Dr. Th. Blankenstein

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Humanmedizin der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 13.12.2002

Vorwort

Die vorliegende Dissertation ist aufgrund des Umfangs der Aufgabenstellung eine Gemeinschaftsarbeit von Philipp Kiewe und Niklas Noack.

Einleitung, sämtliche methodischen und alle Selektionsschritte, die zur Auswahl der beiden etablierten Antikörper führten, wurden gemeinschaftlich erarbeitet und durchgeführt.

Niklas Noack beschäftigte sich im weiteren Verlauf der Arbeit hauptsächlich mit der Charakterisierung und Identifizierung von MAK 03.1.1, entsprechend den Kapiteln 3.8 und 4.1.

Philipp Kiewe untersuchte parallel auf gleiche Weise MAK 05.1.14, entsprechend den Kapiteln 3.6, 3.7 und 4.2.

INHALTSVERZEICHNIS

Vorwort.....	1
Abkürzungen.....	6
1 Einleitung und Zielsetzung	7
1.1 Colorectales Carcinom	7
1.2 Transformierte colorectale Zellen als Carcinominduktoren .	10
1.3 Tumormarker	12
1.4 Immunglobuline	12
1.5 Polyklonale und monoklonale Antikörper.....	13
1.6 Diagnostische Verfahren zur Tumordetektion	14
1.7 Immuntherapie beim colorectalen Carcinom.....	17
1.8 Zielsetzung und Strategie.....	18
2 Material und Methoden	22
2.1 Material	22
2.1.1 Chemikalien.....	22
2.1.2 Zellkulturmaterialien	22
2.1.3 Gewebe und Serumproben	22
2.1.4 Zelllinien.....	22
2.1.5 Primärantikörper	23
2.1.6 Proteine	23
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Zellkultur.....	23
2.2.1.1 Puffer und Nährmedien.....	23
2.2.1.2 Passage der Zellen <i>in vitro</i>	24
2.2.1.3 Einfrieren von Zellen	25
2.2.1.4 Auftauen von Zellen.....	25
2.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl.....	25
2.2.1.6 Limited-Dilution.....	26
2.2.2 Analytische Methodik	26
2.2.2.1 Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure	26
2.2.2.2 Konzentrieren und Entsalzen von Proteinproben	27
2.2.2.3 N-Terminale Sequenzbestimmung von Proteinen.....	28
2.2.2.4 Massenbestimmung von Peptiden mit der MALDI-TOF MS	28
2.2.3 Präparation von Colocarzinomen	30
2.2.4 Aufarbeitung von Plasmamembranen.....	30
2.2.4.1 Gewinnung von Plasmamembranen aus Patientenmaterial.....	30
2.2.4.2 Gewinnung von Plasmamembranen aus CarcinomZelllinien	31

2.2.4.3 Delipidierung	31
2.2.4.4 Desialylierung.....	32
2.2.4.5 Solubilisierung von Membranproteinen	32
2.2.4.6 Gewinnung von Solubilisaten aus Colocarzinom-Gesamtgewebe	34
2.2.5 Immunochemische Methoden.....	34
2.2.5.1 ELISA.....	34
2.2.5.1.1 ELISA-Detektion mit Peroxidase.....	34
2.2.5.1.2 ELISA-Detektion mit Alkalischer Phosphatase.....	35
2.2.5.1.3 Differentieller ELISA auf Rohmembranproteinen.....	36
2.2.5.1.4 ELISA mit serieller Verdünnung.....	37
2.2.5.2 Bestimmung des Immunglobulin-Typs.....	37
2.2.5.3 Antikörperkonzentrationsbestimmung mit Wandantikörpern.....	37
2.2.5.4 Immunblot.....	39
2.2.5.5 Immunpräzipitation	41
2.2.6 Elektrophoretische Methoden	42
2.2.6.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	42
2.2.6.2 Gelfixierung und -färbung.....	46
2.2.6.2.1 Coomassie-Blue Färbung.....	46
2.2.6.2.2 Silberfärbung.....	47
2.2.6.3 Western-Blot.....	48
2.2.6.4 Präparativer Western-Blot mit PVDF-Membran.....	49
2.2.6.5 Färbung der Blotmembran mit Ponceau-Rot.....	50
2.2.7 Chromatographische Methoden.....	50
2.2.7.1 High-Performance-Liquid- Chromatography über MonoQ	50
2.2.7.2 HPLC über MonoS	51
2.2.7.3 RP18-HPLC von Peptiden (Micro-HPLC)	52
2.2.7.4 Immunaффinitätschromatographie	52
2.2.8 Enzymatische Verdauungen.....	53
2.2.8.1 Desialylierung mit Neuraminidase.....	53
2.2.8.2 PNGase-F-Verdau von Glycoproteinen.....	54
2.2.8.3 Trypsin-Verdau.....	55
2.2.8.4 Chymotrypsin-Verdau	55
2.2.8.5 Pronase-Verdau	55
2.2.8.6 In-Gel-Verdau von Proteinen mit Trypsin.....	56
2.2.9 Histologien.....	58
2.2.9.1 Färbung mit APAAP-System	58

3 Ergebnisse	59
---------------------	-----------

3.1 Ausgangssituation	59
3.2 Selektion von Klonen	60
3.2.1 Kriterien der Selektionierung.....	60
3.2.2 Auswahl zweier Subklone.....	60
3.2.3 Eigenschaften der ausgewählten Subklone	63

3.2.3.1 Bestimmung des Immunglobulin-Subtyps.....	63
3.2.3.2 Subklonierung des MAK 05.1.14 und Vergleich der Affinitäten der Subklone zum Antigen	64
3.3 Grundeigenschaften der Antigen-Antikörperreaktion von MAK 03.1.1 und MAK 05.1.14	64
3.3.1 Affinitätsmessung im Titrations-ELISA.....	64
3.3.2 Solubilisationsversuche	65
3.3.3 Nachweis der Antigene auf Colon-Carcinom-Zelllinien.....	66
3.4 Anreicherung der Antigene von MAK 03.1.1 und 05.1.14 durch Immunpräzipitation.....	66
3.4.1 Überprüfung der Affinität zwischen den Antikörpern und Protein A- bzw. Protein G-Sepharose.....	67
3.4.2 SDS-PAGE und Western-Blot der Präzipitate von MAK 03.1.1	67
3.4.3 SDS-PAGE und Western-Blot des Präzipitats von MAK 05.1.14.....	68
3.5 Anreicherung der Antigene von MAK 03.1.1 und 05.1.14 durch Immunaффinitätschromatographie.....	69
3.5.1 IAC mit MAK 03.1.1 und MAK 05.1.14	69
3.5.2 SDS-PAGE und Western-Blot des Eluats von MAK 03.1.1.....	69
3.5.3 SDS-PAGE und Western-Blot des Eluats von MAK 05.1.14.....	70
3.6 Charakterisierung des Antigens von MAK 05.1.14	71
3.6.1 Präparativer PVDF-Blot des Eluats der Immunaффinitätschromatographie an MAK 05.1.14.....	71
3.6.2 N-Terminale Sequenzbestimmung nach EDMAN und Datenbankvergleich.....	72
3.6.3 Enzymverdau mit PNGase-F und Neuraminidase	73
3.6.4 Immunhistochemische Färbung eines Schnittes aus einem Colonicarcinompräparat..	74
3.7 Charakterisierung des MAK 05.1.14	75
3.7.1 Immunpräzipitation von Carcinomsolubilisat mit MAK 05.1.14 und Referenz-anti-CEA mit gekreuzter Detektion.....	75
3.7.2 Reaktion des MAK 05.1.14 mit löslichem Serum-CEA	77
3.7.3 Reaktion des MAK 05.1.14 mit Zellkulturüberstand der Zelllinie LS180.....	77
3.8 Charakterisierung des Antigens von 03.1.1	78
3.8.1 Anreicherung und Identifizierung des Antigens von MAK 03.1.1	78
3.8.1 Fraktionierung der Membranproteinsolubilisation durch HPLC über MonoQ	79
3.8.1.1 Test der Fraktionen im Immunblot.....	79
3.8.1.2 Präparativer PVDF-Blot der Fraktionen mit Antigengehalt und N-terminale Sequenzbestimmung nach Edman.....	80
3.8.2 Anreicherung des Antigens mittels MonoQ-HPLC.....	81
3.8.2.1 Präparatives Gel mit Coomassiefärbung.....	81
3.8.3 Antigenidentifizierung nach In-Gel-Verdau der ausgeschnittenen Banden.....	82
3.8.4 Anreicherung des Antigens aus der MonoQ-Fraktion mittels MonoS-HPLC.....	82
3.8.4.1 Immunblot der Fraktionen nach MonoS.....	83
3.8.4.2 Enzymatischer Verdau der antigenhaltigen Fraktion	84

3.8.4.3 Massenbestimmung der Peptide mit der MALDI-TOF MS.....	85
3.8.4.4 Trennung der Peptide durch RP-18-HPLC.....	85
3.8.4.5 Massenbestimmung ausgewählter Fraktionen mit MALDI-TOF-MS.....	87
3.8.4.6 N-Terminale Sequenzbestimmung nach Edman und Sequenzvergleich in Datenbanken.....	87
3.8.5 Reaktivität von MAK 03.1.1 mit verschiedenen Collagenen, Fibronectin und Laminin im Immunblot.....	89
3.8.6 Immunhistochemische Färbung eines Schnittes aus einem Colocarcinompräparat..	90
4 Diskussion	91
4.1 03.1.1	91
4.1.1 Identifizierung des Antigens	91
4.1.2 Spezifität.....	93
4.1.3 Collagen Typ I und III in Tumoren	94
4.1.4 Bedeutung als Tumormarker.....	95
4.2 05.1.14	96
4.2.1 Identifizierung des Antigens	96
4.2.2 Spezifität.....	98
4.2.3 CEA in Tumoren.....	99
4.2.4 Bedeutung als Tumormarker.....	100
4.3 Selektion tumorspezifischer Antikörper	100
4.4 Fazit und Ausblick	101
5 Zusammenfassung	102
6 Literaturverzeichnis	105
Anhang	116

Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
APAAP	Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
BSA	Bovines Serum Albumin
CA	Carcinom
CEA	Carcinoembryonales Antigen
DNA	Desoxyribunucleic Acid
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
FKS	Fötales Kälberserum
HNPCC	Hereditary-Nonpolyposis-Colon-Cancer
HPLC	High-Performance-Liquid-Chromatography
Ig	Immunglobulin
kD	Kilodalton
MAK	Monoklonaler Antikörper
MALDI-TOF	Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionisation-Time-of-Flight
NCA	Nonspecific-Crossreacting-Antigen
NSAID	Nonsteroidal-Antiinflammatory-Drugs
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PKC	Proteinkinase C
PP	Probenpuffer
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RP-HPLC	Reversed-Phase-HPLC
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SPECT	Single-Photon-Emission-Computed-Tomography
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
UICC	Union Internationale Contre le Cancer

