

4 Ergebnisse

4.1 Erstellung einer Mammakarzinom-spezifischen cDNA-Expressionsbank in λ -Phagen

4.1.1 RNA-Isolierung aus den Mammakarzinom-Zelllinien BT-474 und 8701-BC

Von jeder Zelllinie wurden 4×10^7 Zellen eingesetzt. Für die RNA-Extraktion wurden je 4 RNeasy-Säulen verwendet (1×10^7 Zellen/Säule). Je 2 μ l der RNA-Präparationen wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen, um sicherzustellen, daß keine Degradation vorlag. Intakte RNA zeigt im Gel ein typisches Bandenmuster mit einer 18S rRNA- und einer 28S tRNA-Bande.

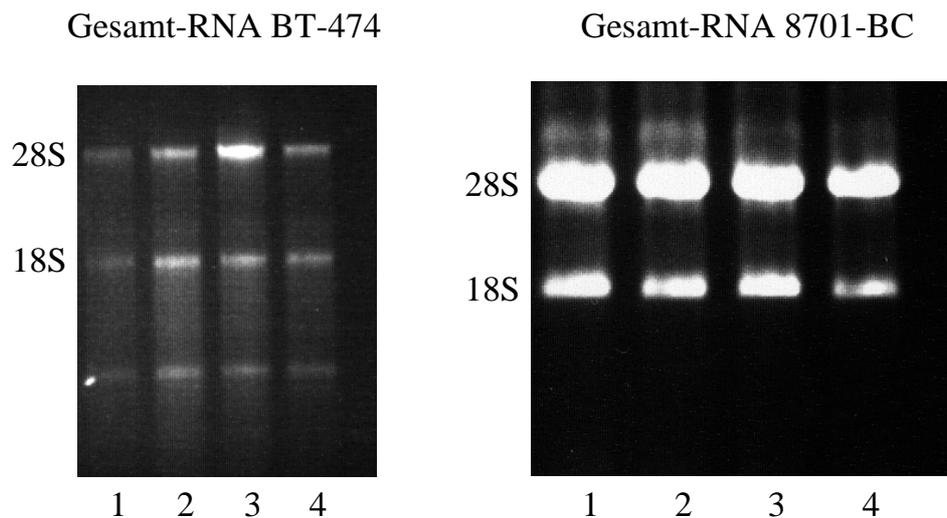


Abbildung 4.1.1 Qualitätskontrolle der Mammakarzinom-Gesamt-RNA-Präparationen.

Die RNA-Konzentration und -Reinheit wurde durch photometrische Messung bestimmt.

Formel zur Berechnung der RNA-Konzentration:

$$40 \times \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g RNA/ml}$$

<i>Probe</i> (je 1×10^7 Zellen)	<i>Proben-</i> <i>volumen</i>	<i>OD 260</i>	<i>OD 280</i>	<i>OD 260/</i> <i>OD 280</i>	$\mu\text{g RNA/}$ <i>ml</i>	$\mu\text{g RNA/}$ <i>Probe</i>	$\mu\text{g RNA/}$ μl
1	83 μl	0,181	0,112	1,62	720	59,8	
2	83 μl	0,200	0,125	1,60	800	66,4	
3+4	186 μl	0,165	0,102	1,62	660	122,8	
Summe (Probe 1-4 gepoolt)	350 μl					249,0	
mRNA (~2% der Gesamt-RNA)						~5,0 μg	0,71

Tabelle 4.1.1.1 Konzentration und Reinheit RNA 8701-BC.

<i>Probe</i> (je 1×10^7 Zellen)	<i>Proben-</i> <i>volumen</i>	<i>OD 260</i>	<i>OD 280</i>	<i>OD 260/</i> <i>OD 280</i>	$\mu\text{g RNA/}$ <i>ml</i>	$\mu\text{g RNA/}$ <i>Probe</i>	$\mu\text{g RNA/}$ μl
1-4 (gepoolt)	375 μl	0,176	0,121	1,45	704	269	
mRNA (~2% der Gesamt-RNA)						~5,4 μg	0,72

Tabelle 4.1.1.2 Konzentration und Reinheit RNA BT-474.

4.1.2 cDNA-Synthese

In die cDNA-Synthese kann ein maximales Volumen von 37,5 μl RNA eingesetzt werden. Daher wurde die Gesamt-RNA durch eine Ethanol-fällung aufkonzentriert. Die RNA-Präparationen beider Zelllinien wurden gepoolt, über Nacht gefällt und das Pellet in 25 μl DEPC- H_2O resuspendiert.

Vor der Fällung betrug die Menge an mRNA ca. 10,4 μg (siehe Tabellen 4.4.1.1 + 2). Erfahrungsgemäß beträgt der Verlust bei der Fällung etwa 20%, so daß von einer mRNA-Menge von 8,3 μg in 25 μl ausgegangen wurde. Da für die cDNA-Synthese laut Herstellerangaben 5 μg mRNA eingesetzt werden sollen, wurden 15 μl der aufkonzentrierten RNA verwendet. Die Größenfraktionierung der fertig verdauten cDNA mittels Sepharose-Säulen dient der Entfernung von DNA-Molekülen < 400 bp. Es wurden 3 Fraktionen eluiert und von jeder Fraktion 5 μl auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

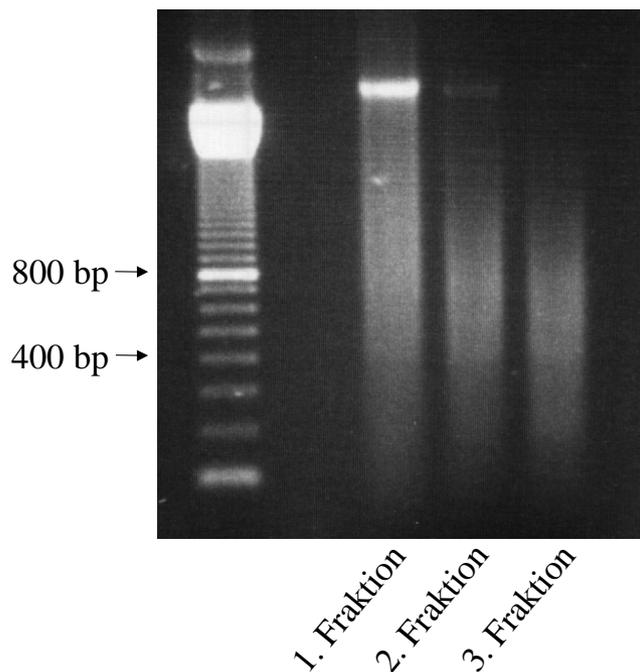


Abbildung 4.1.2.1 cDNA nach Größenfraktionierung mit Sepharose-Säulen.
5 μ l cDNA/Lane.

Die Sepharosesäulen bilden ein Molekularsieb, welches von großen Nucleinsäuren zuerst passiert wird, da sie aufgrund der größeren Molekülmasse die Gelpartikel schneller verdrängen. Daher befinden sich in der ersten eluierten Fraktion die größten DNA-Fragmente. Im Gel ist deutlich eine Anreicherung der DNA-Moleküle ab 400 bp zu erkennen. Kleinere Nucleinsäuren wurden jedoch offensichtlich nicht vollständig entfernt. Wie zu erwarten, enthält die erste Fraktion die größten DNA-Fragmente, während im 2. und 3. Eluat Moleküle > 1300 bp fast völlig fehlen. Da in der cDNA-Bank möglichst vollständige Gene exprimiert werden sollen, wurde für die Ligation nur DNA der 1. Fraktion verwendet. Diese wurde Phenol-Chloroform extrahiert, gefällt und in 5 μ l ddH₂O resuspendiert.

Das Verhältnis Vektor : cDNA ist für eine erfolgreiche Klonierung von großer Bedeutung. Wird zuviel oder zuwenig cDNA eingesetzt, führt dies zu schlechten Ligationsergebnissen und somit zu einer verminderten Qualität der Expressionsbibliothek. Da cDNA aus DNA-Molekülen unterschiedlicher Größe besteht, zeigt sich in der Gelelektrophorese keine distinkte Bande. Die cDNA wird der Größe nach aufgetrennt und „schmiert“ über die Länge des Gels. Daher ist eine Quantifizierung mittels Gelelektrophorese und Mengenstandards nicht möglich. Auch eine photometrische Bestimmung der Konzentration ist aufgrund des geringen cDNA-Volumens (5 μ l) kaum durchführbar.

Der „Ethidium Bromide Plate Assay“ bietet den Vorteil, durch Einsatz von wenig Volumen die cDNA-Menge recht genau abschätzen zu können. Je 0,5 μ l eines Mengenstandards (Standardreihe von 5 ng-100 ng/0,5 μ l) sowie 0,5 μ l cDNA wurden auf ein Agarosegel pipettiert.

Unter UV-Licht kann durch Vergleich der Fluoreszenzintensität der cDNA-Probe mit der Standardreihe die cDNA-Menge genau bestimmt werden.

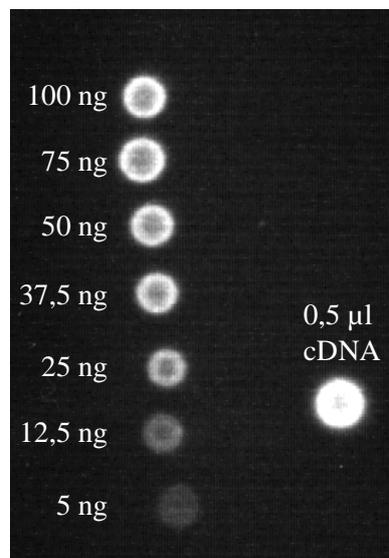


Abbildung 4.1.2.2 Bestimmung der cDNA-Konzentration im Ethidium Bromide Plate Assay. Probenvolumen Standardreihe und cDNA je 0,5 µl.

Die cDNA-Konzentration betrug ca. 150 ng/0,5 µl. Dies ergab eine Gesamtmenge von 1350 ng in 4,5 µl.

4.1.3 Ligation der cDNA in den λ -Phagen-Vektor ZAP® II

Um das optimale Vektor : Insert Verhältnis zu bestimmen, wurden zwei Ligationen mit unterschiedlichen cDNA-Mengen und gleicher Vektormenge (1µg) angesetzt:

Ligation 1: 0,5 µl cDNA ~150 ng (Vektor : Insert = 6,7:1)

Ligation 2: 0,3 µl cDNA ~100 ng (Vektor : Insert = 10:1)

Aussagen über die Qualität der Ligation und damit auch der Expressionsbank ergeben sich erst nach dem Verpacken der rekombinanten DNA und der Titerbestimmung samt Blau-Weiß-Selektion.

4.1.4 Verpackungsreaktion (packaging reaction) und Titerbestimmung der Primärbibliothek mit Blau-Weiß-Selektion

Die nach dem Verpacken entstandenen λ -Phagenpartikel tragen rekombinante DNA und exprimieren die klonierte Mammakarzinom-spezifische cDNA als Fusionsprotein mit β -Galac-

tosidase. Diese Bank wird auch als Primärbibliothek bezeichnet, welche bestimmte Qualitätsmerkmale erfüllen sollte. Solche Merkmale betreffen die Anzahl der erhaltenen Phagen (plaque forming units = pfu) sowie den Anteil rekombinanter (ein cDNA-Insert tragenden) und nicht rekombinanter („leerer“) Phagen an der Gesamtbibliothek. Eine Primärbibliothek, die aus 5 µg mRNA erstellt wurde, sollte mindestens $2,5 \times 10^6$ rekombinante Klone (pfu) ergeben (Sambrook et al., 1989). Die Expressionsbank sollte nicht viel mehr als 5% nicht rekombinante Phagen bzw. weniger als 100.000 nicht rekombinante Klone pro µg Vektor enthalten. Der Anteil rekombinanter Klone sollte 10-100fach höher sein als der nicht rekombinanter. Ein weiteres Qualitätsmerkmal ist die Gesamtzahl der Phagen. Eine Verpackungsreaktion sollte mehr als 50.000 pfu ergeben (Manual ZAP-cDNA® Gigapack® III Gold Cloning Kit, Stratagene, 1998).

Um dies zu überprüfen, wird von den 5 µl Ligation zunächst 1 µl verpackt und von den entstandenen Phagen der Titer sowie der Anteil nicht rekombinanter Phagen durch eine Blau-Weiß-Selektion bestimmt. Werden die geforderten Kriterien erfüllt, können die restlichen 4 µl der Ligation in 4 getrennten Reaktionsansätzen verpackt werden. Weist die Bank nicht die geforderten Eigenschaften auf, so müssen weitere Ligationen mit unterschiedlichen cDNA-Mengen durchgeführt und verpackt werden.

Von Ligation 1 + 2 wurden je 1 µl (Pack. I) verpackt und eine Titerbestimmung mit Blau-Weiß-Selektion durchgeführt. Da alle geforderten Parameter erfüllt wurden, konnten auch die restlichen 4 µl verpackt werden (Pack II-V).

Die entstandenen Primärbibliotheken wurden als Bib. 8701-BC/BT-474 bezeichnet und konnten wie folgt charakterisiert werden:

Geforderte Qualitätsmerkmale der Primärbibliothek:

- ≥ 50.000 pfu/packaging reaction
- < 100.000 nicht Rekomb./µg Vektor
- 10-100fach mehr Rekombinante als nicht Rekombinante (Faktor)
- $> 2,5 \times 10^6$ Rekombinante/µg Vektor (gesamte Primärbibliothek, Summe der packaging reactions)
- $< 5\%$ nicht Rekombinante

Ligation 1

Pack. reaction	pfu/ml	pfu/pack. reaction	Rekomb./ ml	Nicht Rekomb./ ml	pfu/ µg Vektor	Rekomb./ µg Vektor	Nicht Rekomb./ µg Vektor	Faktor
I	221.000	110.500	214.000	7.000	552.500	535.000	17.500	31
II	114.000	57.000	112.000	2.000	285.000	280.000	5.000	56
III	252.000	126.000	251.000	1.000	630.000	627.500	2.500	251
IV	272.000	134.000	268.000	4.000	680.000	670.000	10.000	67
V	217.000	108.500	214.000	3.000	542.500	535.000	7.500	71
Summe					2,69 x 10 ⁶	2,65 x 10⁶	42.500	
						Nicht Rekomb. 1,6% Faktor 62		

Tabelle 4.1.4.1 Parameter Primärbib. 8701-BC/BT-474 Ligation 1 (~150 ng cDNA).
Geforderte Qualitätsmerkmale sind fettgedruckt.

Ligation 2

Pack. reaction	pfu/ml	pfu/pack. reaction	Rekomb./ ml	Nicht Rekomb./ ml	pfu/ µg Vektor	Rekomb./ µg Vektor	Nicht Rekomb./ µg Vektor	Faktor
I	196.000	98.000	192.000	4.000	490.000	480.000	10.000	48
II	332.000	166.000	327.000	5.000	830.000	817.500	12.500	65
III	354.000	177.000	347.000	7.000	885.000	867.500	17.500	50
IV	231.000	115.500	230.000	1.000	577.500	575.000	2.500	230
V	93.000	46.500	90.000	3.000	232.500	225.000	7.500	30
Summe					3,0 x 10 ⁶	2,97 x 10⁶	50.000	
						Nicht Rekomb. 1,7% Faktor 59		

Tabelle 4.1.4.2 Parameter Primärbib. 8701-BC/BT-474 Ligation 2 (~100 ng cDNA).
Geforderte Qualitätsmerkmale sind fettgedruckt.

Alle Verpackungsreaktionen (außer Lig. 2 Pack. reaction V) ergaben deutlich mehr als 50.000 pfu. Die gesamte Primärbibliothek (Ligation 1+2) enthielt $2,8 \times 10^6$ rekombinante und 46.250 nicht rekombinante Klone pro μg Vektor. Dies ergab 60,5 fach mehr Phagen mit als ohne Insert. Der Anteil nicht rekombinanter Phagen an der Gesamt-Primärbibliothek betrug 1,62%.

4.1.5 Amplifizierung der Primärbibliothek

Um eine stabile Bibliothek zu etablieren, müssen die Klone der Primärbibliothek nochmals vermehrt werden. Dies erfolgt in zwei getrennten, sogenannten Amplifizierungsreaktionen. Pro Amplifizierung wurde jeweils die Hälfte der Phagen der Verpackungsreaktionen (Ligation 1 + 2) ausplattiert. Von Verpackungsansätzen mit einem Titer von 100.000 pfu oder mehr wurde jeweils die Hälfte auf einer großen Platte ausgestrichen, lag der Titer nur bei 50.000 pfu, wurden 25.000 Phagen auf einer kleinen Platte angezogen. Nach der Plauebildung wurde SM-Puffer auf den Agar gegeben (9 ml/ große Platte, 4 ml/kleine Platte) und die Platten bei 4°C und leichtem Schütteln über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde der Puffer von allen Platten gesammelt, gepoolt und aufgereinigt. Die amplifizierte Bibliothek enthält also alle Klone der Ligationen 1 + 2. Das Endvolumen der 1. Amplifizierung betrug nach Aufreinigung 50 ml, das der 2. Amplifizierung 60 ml. 750 μl Aliquots wurden mit 7% (Endkonzentration) DMSO versetzt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. 1,8 ml Aliquots wurden unter Zusatz von 0,3% (Endkonzentration) Chloroform bei 4°C gelagert.

Um die Qualität der amplifizierten Bibliothek zu evaluieren, wurde eine Titerbestimmung mit Blau-Weiß-Selektion durchgeführt.

Geforderte Qualitätsmerkmale der amplifizierten Bibliothek:

- Titer 10^9 - 10^{11} pfu/ml
- 10-100fach mehr Rekombinante als nicht Rekombinante (Faktor)
- < 5% nicht Rekombinante

Amplifizierung	pfu/ml	Rekomb./ ml	Nicht Rekomb./ ml	pfu/ μg Vektor	Rekomb./ μg Vektor	Nicht Rekomb./ μg Vektor	Faktor
I	2,53 x 10⁹	2,49 x 10 ⁹	6 x 10 ⁷	1,39 x 10 ¹¹	1,37 x 10¹¹	3,33 x 10⁹	41
					Nicht Rekomb. 2,4%		
II	1,69 x 10⁹	1,67 x 10 ⁹	3,25 x 10 ⁷	9,93 x 10 ¹⁰	9,79 x 10¹⁰	1,91 x 10⁹	51
					Nicht Rekomb. 1,9%		

Tabelle 4.1.5 Parameter amplifizierte Bib. 8701-BC/BT-474.

Geforderte Qualitätsmerkmale sind fettgedruckt.

Um sicherzustellen, daß die Insertgröße der fertiggestellten Bank ausreicht, um möglichst vollständige Gene zu repräsentieren, wurden von den Blau-Weiß-Selektionen 5 rekombinante Plaques gepickt. Die pBluescript-Phagmide wurden mittels Helferphagen amplifiziert, Plasmid-Mini-Präparationen erstellt (Excision) und die Inserts durch einen EcoR I/Xho I-Verdau herausgeschnitten. Diese wurden in einem 1%igen Agarosegel analysiert und die mittlere Insertgröße ermittelt.

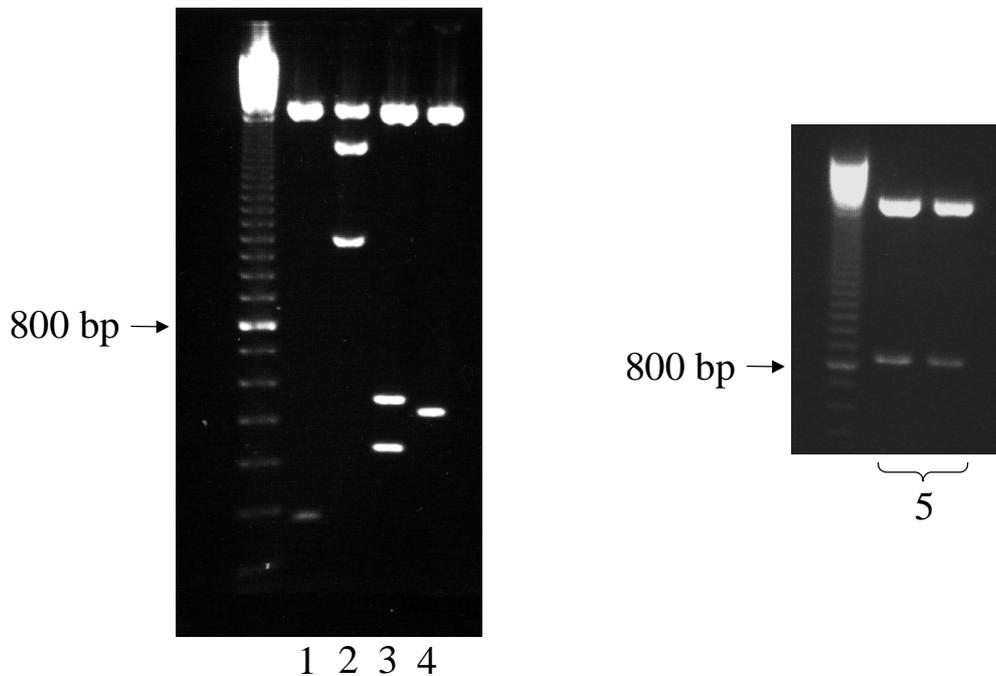


Abbildung 4.1.5 Bestimmung der mittleren Insertgröße der Mammakarzinom-spezifischen Expressionsbibliothek 8701-BC/BT-474.

Das Auftreten zweier Banden in Probe 2 und 3 spricht für das Vorliegen einer zusätzlichen EcoR I- oder Xho I-Schnittstelle innerhalb des Inserts. Zur Bestimmung der Insertgröße wird daher die Länge beider Banden addiert. Es wurden folgende Insertgrößen ermittelt:

Insert 1:	290 bp	}	Mittlere Insertgröße: 1164 bp
Insert 2:	2000 bp		
	<u>+ 1200 bp</u>		
	3200 bp		
Insert 3:	550 bp		
	<u>+ 430 bp</u>		
	980 bp		
Insert 4:	510 bp		
Insert 5:	840 bp		

4.2 Immunisierung von Mäusen mit Membranfraktionen

Die Kontrolle des Antikörpertiters erfolgte im sogenannten Zellmembran-ELISA. Hierbei wurde die spezifische Bindung von Serum-Antikörpern an Membranen der Zelllinie 8701-BC nachgewiesen. Bereits ab der 1. Woche kam es zu einem Anstieg des spezifischen Serum IgG-Spiegels, der ab der 7. Woche in eine Plateauphase überging. Auch in der höchsten Verdünnungsstufe (1:100.000) zeigte sich eine positive Reaktion. Als Kontrolle wurde das Serum einer nicht immunisierten Maus verwendet. Hier kam es zu keiner spezifischen Antikörperreaktion mit der Mammakarzinom-Zelllinie.

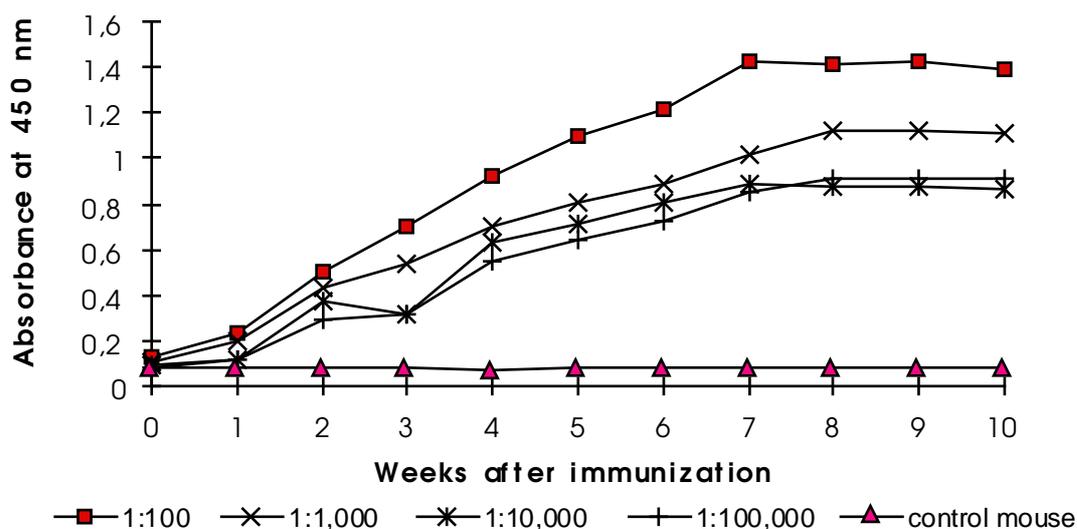


Abbildung 4.2 Dokumentation der membranspezifischen IgG-Antikörperantwort mittels Zellmembran-ELISA. Die spezifische Bindung an Mammakarzinom-Membranfraktionen wurde durch einen IgG-Subklassen-spezifischen Sekundärantikörper nachgewiesen. Die Absorption wurde im ELISA-Reader gemessen.

Für das Screening der Mammakarzinom-spezifischen cDNA-Expressionsbank wurde Serum der 6. Woche verwendet.

4.3 Screening der Mammakarzinom-spezifischen cDNA-Expressionsbank mit Serum immunisierter Mäuse (SEREX)

4.3.1 1. Screening

In einem 1. Screening wurden 6 Filter mit je ~ 40.000 Plaques (240.000 pfu) auf das Vorliegen positiver Serumreaktionen getestet. Das Mausserum wurde gegen Coliprotein abgesättigt und in einer Verdünnung von 1:11.250 eingesetzt. Nach Übertragung der Fusionsprotein-

tragenden Phagenplaques auf Nitrozellulose wurden diese über Nacht bei Raumtemperatur mit Mausserum inkubiert. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte mit dem APAAP-System. Es konnte ein positiver Plaque auf Filter 6 identifiziert und mit einer blauen Pipettenspitze gepickt werden (Klon 6) (Abb. 4.3 A.). Um zu bestätigen, daß tatsächlich eine Serumreaktion gegen ein von den Phagen gebildetes Fusionsprotein vorlag, wurde der positive Plaque gepickt, erneut ausplattiert und mit Serum gescreent. Aufgrund der hohen Plaquedichte beim 1. Screening wurden mit dem positiven Klon auch weitere, nicht positive Phagen ausgestochen und bei der Subklonierung mit ausgestrichen. Es sollten jedoch beim 2. Screening wesentlich mehr positive Plaques sichtbar werden. Für ein 2. Screening wurde etwa die Hälfte der Phagenzahl des 1. Screenings eingesetzt (20.000 pfu), um eine geringere Plaquedichte zu erreichen und somit das Isolieren positiver Plaques zu erleichtern. Diese wurden im 3. Screening in einer so geringen Dichte ausplattiert (500-750 pfu), daß es möglich war, einzelne positive Klone zu isolieren und deren Insert zu sequenzieren.

4.3.2 2. Screening

Klon 6 wurde in einer Dichte von 20.000 pfu/Filter ausplattiert und erneut mit Mausserum inkubiert. Es konnte nachgewiesen werden, daß eine deutlich erhöhte Anzahl positiver Plaques vorlag (Abb. 4.3 B.). Von den Platten des 2. Screens wurden 20 positive Klone aus dem Agar ausgestochen und aufgereinigt (Klone 6/1-6/20). Aufgrund der geringeren Plaquedichte konnten diese Plaques mit kleineren, gelben Pipettenspitzen gepickt werden, so daß neben dem positiven Klon nur 1-2 weitere mit ausgestochen wurden. Werden diese Phagen für ein 3. Screening ausplattiert, sollte daher jeder 2.-3. Klon positiv und infolge einer sehr geringen Plaquedichte auch gut einzeln zu isolieren sein.

4.3.3 3. Screening

Es wurden je 750 pfu der Klone 6/8, 6/13 und 6/18 ausgestrichen, auf Nitrozellulose übertragen und mit dem gleichen Serum inkubiert. Die positiven Signale unterschieden sich in der Farbtintensität nur wenig von den Hintergrundplaques (Abb. 4.3 C.). Aus diesem Grund wurden mehrere deutlich positive (6/8/1-7, 6/13/1-7, 6/18/1-7), sowie vergleichend ein schwächer gefärbter Klon (6/18/8) gepickt und aufgereinigt.

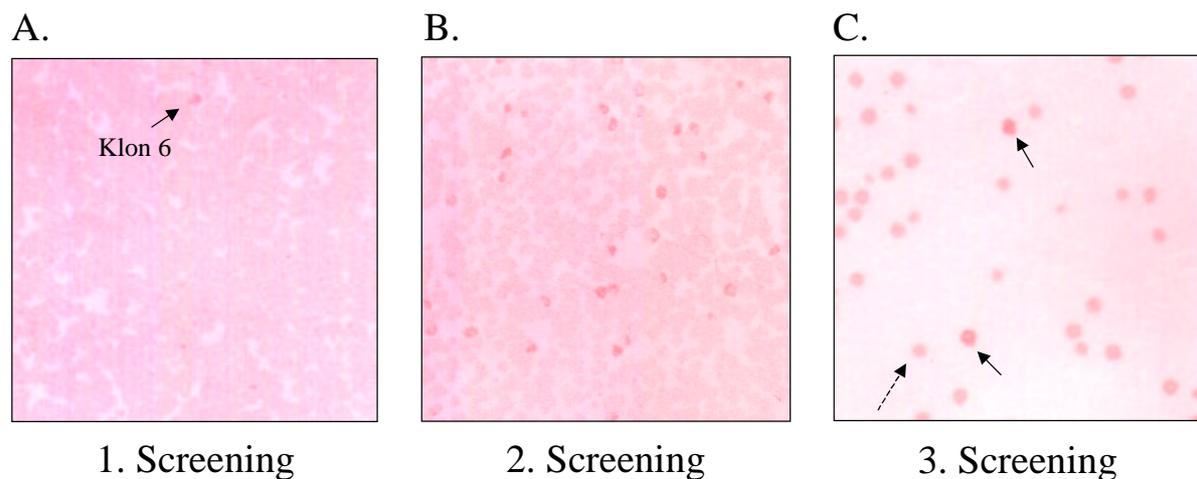


Abbildung 4.3 A.-C. Screening der Mammakarzinom-spezifischen cDNA-Expressionsbank 8701-BC/BT-474 mit Serum einer immunisierten Maus.

- A.** 1. Screening: 40.000 Plaques/Filter. Der positive Klon ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.
- B.** 2. Screening: 20.000 Plaques/Filter. Ausgestrichen wurde Klon 6 des 1. Screenings. Positive Signale sind vermehrt und deutlich zu erkennen.
- C.** 3. Screening: 750 Plaques/Filter. Durchgehende Pfeile kennzeichnen positive Klone, ein Hintergrundplaque ist durch einen gestrichelten Pfeil markiert.

4.4 Analyse der Inserts positiver Klone des 3. Screenings

4.4.1 Excision

Es wurden Excisionen von 6 deutlich positiven sowie vergleichend von dem schwach positiven Klon vorgenommen:

6/8/3 + 6/8/4	positiv
6/13/6 + 6/13/7	positiv
6/18/6 + 6/18/7	positiv
6/18/8	schwach positiv

Nach Plasmidpräparation und EcoR I/Xho I-Verdau wurden die Insertgrößen in einem 1%igen Agarosegel analysiert.

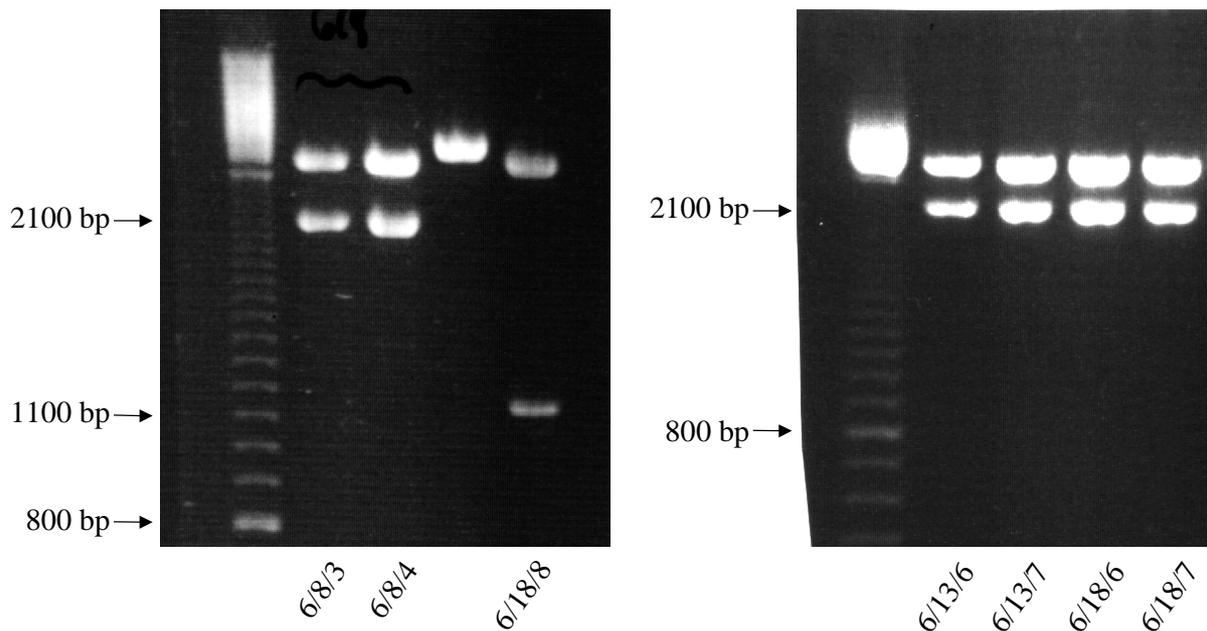


Abbildung 4.4.1 Analyse positiver Klone des 3. Screenings. Die Plasmidpräparationen wurden EcoR I/Xho I verdaut und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

Es ist zu erkennen, daß alle deutlich positiven Klone das gleiche, ca. 2100 bp große Insert enthalten. Der schwach positive Klon (6/18/8) zeigt eine andere Bande bei etwa 1100 bp. Die Tatsache, daß alle 6 deutlich positiven Phagen das gleiche Insert repräsentieren, belegt, daß die positiven Signale in den einzelnen Screenings auf diesen Klon zurückgehen. Weiterhin ist zu vermuten, daß es sich bei der lediglich schwach positiven Reaktionen des Klons 6/18/8 im 3. Screening um unspezifische Bindungen handelt. Um die Klone genauer zu untersuchen, wurden Sequenzierungen der Inserts durchgeführt.

4.4.2 Sequenzierung der Inserts mit Primern T3 und T7

Der T3-Primer lagert sich 64 bp 5' der EcoR I-Schnittstelle an, der T7-Primer 20 bp 3' der Xho I-Konsensus-Sequenz. Es werden also das Insert sowie kurze Stücke der Vektor-DNA sequenziert. Um die Inserts genau zu charakterisieren, wurde die DNA-Sequenz mit dem „DNA Strider“-Programm im Vektorleserahmen in Protein übersetzt. Es wurden EMBL-Datenbankabfragen sowohl mit der Nukleotid- als auch mit der Aminosäuresequenz durchgeführt, um Homologien zu bereits bekannten Genen zu ermitteln.

4.4.2.1 Sequenzierung Inserts 6/8/3 + 6/8/4 (2100 bp, deutlich positiv)

Wie zu erwarten, kodieren beide 2100 bp Inserts für eine identische Sequenz. Da in jeder Sequenzierungsreaktion nur etwa 600 bp lesbar sind, wurden interne Primer (Mitofilin For + Back) erstellt, um die Sequenz in ihrer Gesamtheit zu erfassen.

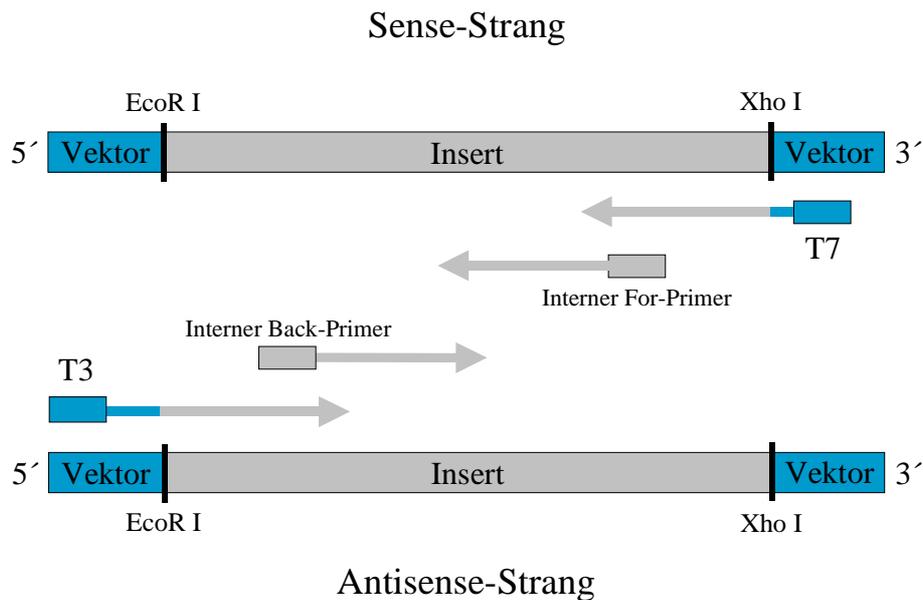


Abbildung 4.4.2.1.1 Schematische Darstellung der Sequenzierung von Insert 6/8/3 + 6/8/4.

Die Datenbankabfrage ergab eine 97,1%ige Nukleinsäure-Identität mit humanem Mitofilin (GenBank Accession No. L42572), einem Transmembranprotein der inneren Mitochondrienmembran. Die Sequenz weist einen offenen Leserahmen von 1830 Nukleotiden auf, welcher sich in Übereinstimmung mit dem Vektor befindet. Das zugehörige Protein wird also im richtigen Leseraster translatiert. Nach dem Stop-Codon folgen 434 nicht translatierte Basenpaare, die ein poly (A['])-Signal (AATAAA) enthalten. Weitere DNA-Homologien bestehen zu humanem Motorprotein (97,06%, GenBank Accession No. D21094)) und zur Sequenz eines US-Patentes für Malignitätsmarker der inneren Kernmatrix (96,5%, GenBank Accession No. AR019265).

Die größte Aminosäureidentität zeigte das 2100 bp-Insert ebenfalls mit humanem Mitofilin und Motorprotein (98,5%). Die DNA-Sequenz des positiven Klon wurde in der GenBank Datenbank hinterlegt und trägt die Accession No. AF148646.

Vector *EcoRI*
 CCC CCG GGC TGC AGG AAT TCG

1/1 31/11
 GCA CGA GCT CCA GCT TCT TTA ACA GCA GGT GAT ACC CTG TCA GTC CCA GCC CCT GCA GTT
 A R A P A S L T A G D T L S V P A P A V

61/21 91/31
 CAG CCT GAG GAA TCT TTA AAA ACT GAT TAC CCT GAA ATT GGT GAA GGA AAA CCC ACA CCT
 Q P E E S L K T D Y P E I G E G K P T P

121/41 151/51
 GCG CTT TCA GAA GAA GCA TCT TCA TCT TCT ATA AGG GAG CGA CCA CCT GAA GAA GTT GCA
 A L S E E A S S S S I R E R P P E E V A

181/61 211/71
 GCT CGC CTT GCA CAA CAG GAA AAA CAA GAA CAA GTT AAA ATT GAG TCT CTA GCC AAG AGC
 A R L A Q Q E K Q E Q V K I E S L A K S

241/81 271/91
 TTA GAA GAT GCT CTG AGG CAA ACT GCA AGT GTC ACT CTG CAG GCT ATT GCA GCT CAG AAT
 L E D A L R Q T A S V T L Q A I A A Q N

301/101 331/111
 GCT GCG GTC CAG GCT GTC AAT GCA CAC TCC AAC ATA TTG AAA GCC GCC ATG GAC AAT TCT
 A A V Q A V N A H S N I L K A A M D N S

361/121 391/131
 GAG ATT GCA GGT GAG AAG AAA TCT GCT CAG TGG CGC ACA GTG GAG GGT GCA TTG AAG GAA
 E I A G E K K S A Q W R T V E G A L K E

421/141 451/151
 CGC AGA AAG GCA GTA GAT GAA GCT GCC GAT GCC CTT CTC AAA GCC AAA GAA GAG TTA GAG
 R R K A V D E A A D A L L K A K E E L E

481/161 511/171
 AAG ATG AAA AGT GTG ATT GAA AAT ACA AAG AAA AAA GAG GTT GCT GGG GCC AAG CCT CAT
 K M K S V I E N T K K K E V A G A K P H

541/181 571/191
 ATA TCT GCT GCA GAG GGT AAA CTT CAC AAC ATG ATA GTT GAT CTG GAT AAT GTG GTC AAA
 I S A A E G K L H N M I V D L D N V V K

601/201 631/211
 AAG GTC CAA GCA GCT CAG TCT GAG GCT AAG GTT GTA TCT CAG TAT CAT GAG CTG GTG GTC
 K V Q A A Q S E A K V V S Q Y H E L V V

661/221 691/231
 CAA GCT CGG GAC GAC TTT AAA CGA GAG CTG GAC AGT ATT ACT CCA GAA GTC CTT CCT GGG
 Q A R D D F K R E L D S I T P E V L P G

721/241 751/251
 TGG AAA GGA ATG ACT GAC AAG CTC TCT ACT GAT GAT CTG AAC TCC CTG ATT GCT CAT GCA
 W K G M T D K L S T D D L N S L I A H A

781/261 811/271
 CAT CGT CGA ATC GAT CAG CTG AAC AGA GAG CTG GCA GAA CAG AAG GCC ACT GAA AAG CAG
 H R R I D Q L N R E L A E Q K A T E K Q

841/281 871/291
 CAC ATC ACG TTA GCC TTG GAG AAA CAA AAG CTG GAA GAA AAG CGA GCA TTT GAC TCT GCA
 H I T L A L E K Q K L E E K R A F D S A

901/301 931/311
 GTA GCA AAA GCA TTA GAA CAT CAC AGA AGT GAA ATA CAG GCT GAA CAG GAC AGA AAG ATA
 V A K A L E H H R S E I Q A E Q D R K I

961/321 991/331
 GAG GAA GTC AGA GAT GCC ATG GAG AAT GAA ATG AGA ACC CAG CTT CGC CGA CAG GCA GCT
 E E V R D A M E N E M R T Q L R R Q A A

1021/341 1051/351
 GCC CAC ACT GAT CAC TTG CGA GAT GTC CTT AGG GTA CAA GAA CAG GAA CTG AAG TCT GAG
 A H T D H L R D V L R V Q E Q E L K S E

1081/361 1111/371
 TTT GAG CAG AAC CTG TCT GAG AAA CTC TCT GAA CAA GAA TTA CAG TTT CGT CGT CTC AGT
 F E Q N L S E K L S E Q E L Q F R R L S

1141/381 1171/391
 CAA GAG CAA GTT GAC AAC TTT ACT CTG GAT ATA AAC ACT GCC TAT GCC AGA CTC AGA GGA
 Q E Q V D N F T L D I N T A Y A R L R G

1201/401 1231/411
 ATC GAA CAG GCT GTT CAG AGT CAT GCA GTT GCC GAA GAA GAA GCT AGA AAA GCC CAC CAA
 I E Q A V Q S H A V A E E E A R K A H Q

```

1261/421          1291/431
CTC TGG CTT TCA GTG GAG GCA TTA AAG TAC AGC ATG AAG ACC TCA TCT GCA GAA ACA CCT
L  W  L  S  V  E  A  L  K  Y  S  M  K  T  S  S  A  E  T  P
1321/441          1351/451
ACT ATC CCG CTG GGT AGT GCA GTT GAG GCC ATC AAA GCC AAC TGT TCT GAT AAC GAA TTT
T  I  P  L  G  S  A  V  E  A  I  K  A  N  C  S  D  N  E  F
1381/461          1411/471
ACC CAA GCT TTA ACC GCA GCT ATC CCT CCA GAG TCC CTG ACC CGT GGG GTG TAC AGT GAA
T  Q  A  L  T  A  A  I  P  P  E  S  L  T  R  G  V  Y  S  E
1441/481          1471/491
GAG ACC CTT AGA GCC CGT TTC TAT GCT GTT CAA AAA CTG GCC CGA AGG GTA GCA ATG ATT
E  T  L  R  A  R  F  Y  A  V  Q  K  L  A  R  R  V  A  M  I
1501/501          1531/511
GAT GAA ACC AGA AAT AGC TTG TAC CAG TAC TTC CTC TCC TAC CTA CAG TCC CTG CTC CTA
D  E  T  R  N  S  L  Y  Q  Y  F  L  S  Y  L  Q  S  L  L  L
1561/521          1591/531
TTC CCG CCT CAG CAA CTA AAG CCG CCC CCG GAG CTT TGC CCT GAG GAT ATA AAC ACA TTT
F  P  P  Q  Q  L  K  P  P  P  E  L  C  P  E  D  I  N  T  F
1621/541          1651/551
AAA TTA CTG TCA TAT GCT TCC TAT TGC ATT GAG CAT GGT GAT CTG GAG CTA GCA GCA AAG
K  L  L  S  Y  A  S  Y  C  I  E  H  G  D  L  E  L  A  A  K
1681/561          1711/571
TTT GTC AAT CAG CTG AAG GGG GAA TCC AGA CGA GTG GCA CAG GAC TGG CTC AAG GAA GCC
F  V  N  Q  L  K  G  E  S  R  R  V  A  Q  D  W  L  K  E  A
1741/581          1771/591
CGA ATG ACC CTA GAA ACG AAA CAG ATA GTG GAA ATC CTG ACA GCG TAT GCC AGC GCC GTA
R  M  T  L  E  T  K  Q  I  V  E  I  L  T  A  Y  A  S  A  V
1801/601          1831/611
GGA ATA GGA ACC ACT CAA GTG CAG CCA GAG TAA
G  I  G  T  T  Q  V  Q  P  E  *

```

```

GGTCTAGGAAGATTTTCGTAAAGTCGTATTTTCATGTCAAAGGAAATCAGCAGTGATAGATGAAGGGTTCGCAACAAGGGT
CTCAGAATTGTCTAGAAATGAGCAGGTTTACAAGTACTGTTCTAAATGTTAACACCTGTTGCACTTATATCTTTCCATT
TGCTATCATGTGAGTGAAGTCCAGGAGTGCTTTCTTTGCAACTTGTGTAACATTTTTCTGTTTTTTCAGGTTTTACTGAT
GAGGCTTGTGAGGCCAATCAAATAATGTTTGTGATCTCTACTACTGTTGATTTTGANCANGGAGCAAAGTGAATAAAGC
AACAAAGATGAAAACGAAAAGNAANAAAAANCAAAAAAAGCANGAGGGAGGGN

```

Abbildung 4.4.2.1.2 Nukleotid-und Aminosäuresequenz Insert 6/8/3.

Das Stop-Codon ist mit einem Stern markiert, das poly (A['])-Signal ist unterstrichen.

4.4.2.2 Sequenzierung Insert 6/18/8 (1150 bp, schwach positiv)

Eine EMBL-Datenbankabfrage ergab eine 98%ige Nukleinsäureidentität mit dem humanen Rheb-Gen (Ras Homologue Enriched in Brain). Dieses befindet sich jedoch nicht in Übereinstimmung mit dem Vektorleseraster, so daß nicht das zugehörige Rheb-Protein von den Phagen exprimiert wird. Wird die Insertsequenz im Vektorleserahmen in Protein übersetzt, wird bereits nach 72 Aminosäuren ein Stop-Codon erreicht. Eine weitergehende Analyse der Insertsequenz von Klon 6/18/8 zeigt, daß das gesamte Rheb-Gen mit Start- und Stop-Codon enthalten ist. Wird der Vektorleserahmen außer Acht gelassen, so ergibt sich ein offener Leseraster von 552 Nukleotiden mit 160 bp vor dem Startcodon, die nicht translatiert werden. Dem Stop-Codon folgen 398 bp, welche nicht abgelesen werden und ein poly(A['])-Signal (AATAAA) enthalten. Wird Insert 6/18/8 im korrekten Leseraster des Rheb-Genes in Protein übersetzt, so ergibt sich eine 100%ige Identität mit humanem Rheb-Protein. Die Sequenz des Klons 6/18/8 erhielt die GenBank Accession No. AF 148645.

Vektorleserahmen			EcoR I	R G A S E L A R G S R A	
6/18/8	1	ccccgggct	gcaggaattc	ggcagcagga	gcgagcagc tagctagagg cagccgcgcc
Vektorleserahmen		R R R P C S V C R S P P A R P P P I A A			
6/18/8	61	cgccgccc	cctgctctgt	atgccgctct	ccccggcgc ggccgccc gatcgcagca
Vektorleserahmen		A G A A A A V D V V G P G			
6/18/8	121	gcaggagccg	ccgccccc	ggttgatgtg	ggtggcccg gg
Vektorleserahmen		L R R P P R C R S P S P G R S R S W A T			
6/18/8	163	ctgaggaggc	cgccaagatg	ccgcagtcca	agtccccgaa gatcgcgac ctgggctacc
Rheb-Leserahmen				P Q S K S R K I A I L G Y	
Vektorleserahmen		G L W G N P H ★			
6/18/8	204	ggctctgtggg	gaaatcctca	tTgacgattc	aatttggtga aggccaattt gtggactcct
	15	<u>R S V G K S S</u>	<u>L T I Q F V E G Q F</u>	<u>V D S</u>	
		G1			
6/18/8	223	acgatccaac	catagaaaac	acttttaca	agttgatcac agtaaatgga caagaatc
	35	<u>Y D P T I E N T F T K</u>	<u>L I T V N G Q E Y</u>		
		G2			
6/18/8	283	atcttcaact	tgtagacaca	gctgggcaag	atgaatattc tatctttcct cagacctact
	55	<u>H L Q L V D T A G Q D</u>	<u>E Y S I F P Q T Y</u>		
		G3			
6/18/8	343	ccatagatat	taatggctat	attcttgtgt	attctgttac atcaatcaaa agttttgaag
	75	<u>S I D I N G Y I L V Y S V T S I K S F E</u>			
6/18/8	403	tgattaaagt	tatccatggc	aaattattgg	atatgggtggg gaaagtacaa atacctatta
	95	<u>V I K V I H G K L L D M V G K V Q I P I</u>			
6/18/8	463	tgttggttg	gaataagaaa	gacctgcata	tggaaagggt gatcagttat gaagaagga
	115	<u>M L V G N K K D L H M E R V I S Y E E G</u>			
		G4			
6/18/8	523	aagctttggc	agaatcttgg	aatgcagctt	ttttggaatc ttctgctaaa gaaaatcaga
	135	<u>K A L A E S W N A A F L E S S A K E N Q</u>			
		G5			
6/18/8	583	ctgctgttga	tgttttttaga	aggataattt	tggaggcaga aaaaatggat ggggcagctt
	155	<u>T A V D V F R R I I L E A E K M D G A A</u>			
6/18/8	643	cacaaggcaa	gtcttcatgc	tccggtgatg	T ga
	175	<u>S Q G K S S C S V M ★</u>			
		CAAX box			

ttctgctgtgaagcctgaggacactgggaatatattctacctgaagaagcaaaactgccgttctccttgaagatcaacta
 tgcttctttttctctgttaacctgaaagataccatttgggtcagagctcccctcccttcagattatgttaactctgag
 tctgtccaaatgagttcacttccattttcaaattttaagcaatcatattttcaatttatattgtatttcttaata
 tgaccaagaattttatcggcattaattttcagtgtagttgtgtttaaaataatgtaaatcaaaaatgatgcatatt
 gttacantactattaactaggcttcaatatatcagtgtttattnaaaatgtgttaatgtatacttgtaaaaaatagcg
 gaaaacctgggaaatnccccnagaancgaggaagnna

Abbildung 4.4.2.2 Nukleotid-und Aminosäuresequenz Insert 6/18/8.

Start-Codons sind grün, Stop-Codons rot unterlegt. Die Aminosäuresequenz im Vektorleserahmen ist dunkelgrün, die Aminosäuresequenz im korrekten Rheb-Gen-Leserahmen ist blau dargestellt. GTP-Bindungsdomänen (G1-G5) sowie die CAAX-Box sind unterstrichen. Die EcoR I-Schnittstelle sowie das Poly(A['])-Signal sind grau hinterlegt.

Obwohl keine Serum-Reaktion gegen das Rheb-Protein vorliegt, ist das Vorkommen dieses Gens in einer Mammakarzinom-spezifischen cDNA-Bank von Interesse. Das Rheb-Gen repräsentiert ein Ras-Homolog, welches in den fünf GTP-Bindungsdomänen (G1-G5) die größten Ähnlichkeiten mit Ras aufweist. Zudem kodiert die Rheb-Sequenz an Position 15 und 16 für Arginin und Serin. Ras-Proteine, welche diese Aminosäuren an den homologen Positionen 12 und 13 statt Glycin enthalten, sind onkogen. Die Substitution von Glycin durch Arginin führt dazu, daß Ras ständig in seiner aktiven, GTP-gebunden Form vorliegt und durch GTPasen nicht inaktiviert werden kann. Es kommt zu einer ständigen Aktivierung des Ras-Signaltransduktionsweges, welche wiederum die Transformation der Zelle und abweichendes Wachstumsverhalten bedingt.

Das Vorkommen des Rheb-Gens in einer Mammakarzinom-spezifischen cDNA-Expressionsbank zeigt, daß das Gen in den Zellen abgelesen wird und als mRNA vorliegt. Das Gen ist also in den Zellen der Mammakarzinom-Zelllinien aktiv. Da onkogen mutierte Ras-Gene an der Entstehung von 30% aller Tumorarten beteiligt sind, ergibt sich die Frage, ob das Ras-ähnliche Rheb-Gen in der Entwicklung von Brustkrebs eine Rolle spielt. Um dies zu untersuchen, wurden Genexpressionanalysen von Mammakarzinom- und Brustepithelzelllinien sowie von Tumorgewebe und normalem Brustgewebe durchgeführt.

4.5 Genexpressionsanalysen

4.5.1 Nachweis der Rheb-Genexpression in Mammakarzinom- und normalen Brustepithelzellen mittels qualitativer PCR und RT-PCR

Zunächst wurde evaluiert, ob das Rheb-Gen auch in einer normalen Brustepithelzelle exprimiert wird, oder ob es sich um ein Mammakarzinom-spezifisches Gen handelt. Hierzu wurde die Gesamt-RNA aus der Mammakarzinom-Zelle 8701-BC sowie aus der Brustepithelzelle 184 A1 isoliert und eine RT-PCR mit Rheb-spezifischen Primern durchgeführt. Diese amplifizieren ein 400 bp-Fragment des Rheb-Gens.

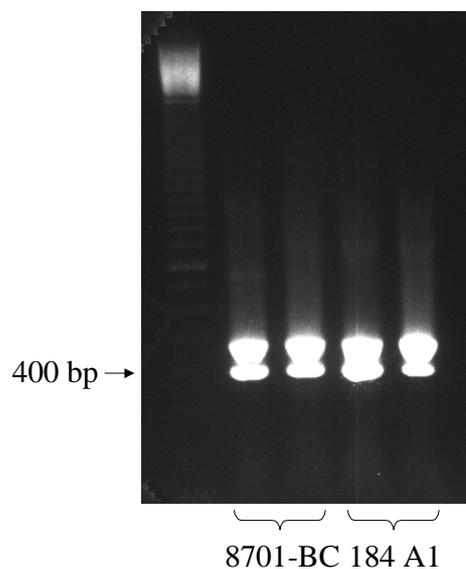


Abbildung 4.5.1.1 Nachweis der Rheb-Genexpression in RNA der Zelllinien 8701-BC (Mammakarzinom) und 184 A1 (normales Brustepithel) mittels RT-PCR. Größe der amplifizierten Rheb-Sequenz: 400 bp.

Das Auftreten einer Doppelbande bei 400 bp weist darauf hin, daß die RNA-Präparation genomische DNA enthielt. Die obere Bande ist etwas größer als 400 bp und repräsentiert wahrscheinlich das Rheb-Amplifikat aus genomischer DNA, welches noch Introns beinhaltet. Da das Rheb-Gen in beiden Zelllinien nachgewiesen werden konnte, handelt es sich nicht um ein spezifisches, nur im Mammakarzinom exprimiertes Gen. Auch die Intensität des Signals im Gel zeigt keinen Unterschied zwischen maligner und Normalgewebezelle.

Um zu überprüfen, ob diese Aussagen auch für die Rheb-Genexpression in Primärtumor-material und Normalgewebe zutreffen, wurde eine PCR mit den entsprechenden cDNAs als Template durchgeführt.

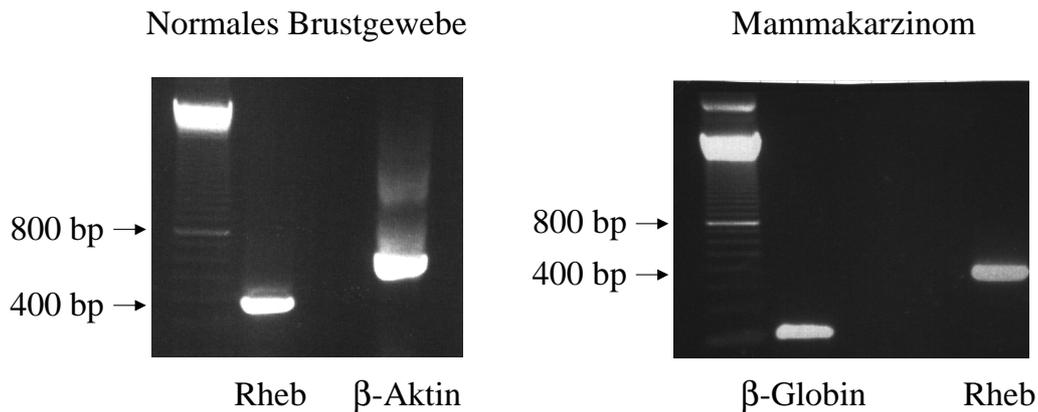


Abbildung 4.5.1.2 Nachweis der Rheb-Genexpression in der cDNA eines duktales, invasiven Mammakarzinoms und in normalem Brustgewebe. Als Kontrolle wurde jeweils ein „housekeeping“ Gen amplifiziert (β -Aktin, β -Globin). Größe der amplifizierten Rheb-Sequenz: 400 bp.

Sowohl malignes als auch Normalgewebe zeigen eine deutliche, 400 bp große Bande. Somit konnte bestätigt werden, daß die Genexpression in den untersuchten Zelllinien die Verhältnisse in den Originalgewebeproben widerspiegelt.

Es ist bekannt, daß das Ras-Gen in etwa 70% der Brustkrebsfälle überexprimiert wird und zudem mit invasivem Wachstum und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen korreliert ist (Clair et al., 1987, Miyakis et al., 1998). Onkogene Punktmutationen, die im Rheb-Gen vorhanden sind, konnten für Ras jedoch nur in 6,5% der Mammakarzinome nachgewiesen werden. Da vermutet wird, daß neben Ras weitere Proteine der Ras-Familie an der Entartung von Brustepithelzellen beteiligt sind (Clark & Der, 1995), könnte dies auch für das Ras-Homolog Rheb zutreffen. Um die Rolle des Rheb-Gens genauer zu untersuchen, sollte zunächst analysiert werden, ob das Gen im Vergleich zu Normalgewebe im Mammakarzinom einer veränderten Expression unterliegt.

Mit qualitativen PCR-Methoden läßt sich keine Aussage über die absolute Menge des Rheb-Gens in den jeweiligen Geweben machen. Anhand der Bandenstärke im Gel kann allenfalls eine grobe Mengenabschätzung vorgenommen werden. Da es sich um das Endprodukt einer PCR-Reaktion handelt, wird die Mengenbestimmung jedoch durch limitierende Faktoren in der Reaktion wie Primer-, dNTP- und Enzymmenge beeinträchtigt.

Für die genaue Quantifizierung des Rheb-Gens in normalem Brustepithel sowie Tumorgewebe wurde daher die sogenannte „real-time PCR Technologie“ verwendet. Diese basiert auf der Mengenbestimmung eines PCR-Produktes in der logarithmischen Phase der Reaktion anhand des Fluoreszenzvergleiches mit einer Standardkurve.

4.5.2 Quantifizierung der Rheb-Genexpression in cDNA von Mammakarzinom- und normalem Brustgewebe mittels real time PCR und LightCycler™

4.5.2.1 Beschreibung des LightCycler™ Systems

Der LightCycler™ bietet im Vergleich zu herkömmlichen PCR-Maschinen einige Vorteile. Die PCR-Reaktionen werden in einem kleinen Volumen (20µl) in Glaskapillaren durchgeführt. Aufgrund der relativ zum Volumen großen Kapillaren-Oberfläche kommt zu einem sehr effektiven Wärmetransfer. Dies ermöglicht ein schnelles Wechseln zwischen den einzelnen Temperaturen eines Zyklus. Eine PCR auf dem LightCycler™ benötigt daher weniger als 30 min.

Weiterhin beinhaltet das Gerät ein Fluorimeter, welches es gestattet, das Signal einer mit Fluoreszenz-Farbstoff markierten DNA-Probe zu messen. Durch den Vergleich der Signalstärke unterschiedlicher PCR-Ansätze kann eine genaue Quantifizierung erfolgen. Eine solche ist zu jeder Zeit der PCR-Reaktion möglich und gibt die genaue Menge des amplifizierten Produktes zu einem bestimmten Zeitpunkt an (real time PCR). Zumeist erfolgt eine Quantifizierung nach jedem PCR-Zyklus, so daß die PCR-Kinetik während eines Laufes auf dem Bildschirm mitverfolgt werden kann. Als Fluoreszenz-Farbstoff wird SYBR® Green I verwendet, welches vor Beginn der PCR zum Reaktionsansatz gegeben wird und sich in jeden neu synthetisierten DNA-Strang einlagert. Das Fluoreszenzsignal nimmt also im Verlaufe einer PCR immer mehr zu.

Mit einer Schmelzkurven-Analyse kann bestimmt werden, ob in der PCR die gewünschte Sequenz amplifiziert wurde. Jedes DNA-Fragment besitzt eine charakteristische Schmelztemperatur, definiert als der Temperaturwert (T_m), bei dem 50% der DNA einzelsträngig vorliegen. Dieser wird hauptsächlich vom Guanin- und Cytosin-Gehalt der DNA bestimmt. Wird der T_m -Wert erreicht, kommt es zu einem Fluoreszenzabfall, bedingt durch Freisetzung des SYBR® Greens aus dem denaturierenden Doppelstrang. Nach dem PCR-Lauf wird durch das Gerät automatisch eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt, indem bei kontinuierlich gemessener Fluoreszenz graduell die Temperatur erhöht wird.

4.5.2.2 Erstellung einer Standard-Verdünnungsreihe des Rheb-Gens

Um die genaue Menge des Amplifikates zu bestimmen, wurde zunächst ein externer Rheb-Standard erstellt. Hierfür wurde mit einer herkömmlichen PCR die gewünschte Rheb-Gensequenz aus einer beliebigen cDNA-Probe (Tumor oder Normalgewebe) amplifiziert und aufgereinigt. Dieses Produkt wurde 1:100 verdünnt und von der verdünnten DNA eine Zehner-Verdünnungsreihe (1:1 bis 1:100.000) erstellt (Standardreihe = externer Standard). Im LightCycler™-Programm werden die Werte der Verdünnungsreihe als Standards definiert. Das Programm errechnet aus den Mengen der PCR-Produkte der jeweiligen Verdünnung eine Standardkurve. Diese wird für die Berechnung der Menge des gleichen Amplifikates in Tumor cDNA und in Normalgewebe cDNA zugrunde gelegt.

4.5.2.3 Photometrische Bestimmung der cDNA-Konzentration von Mammakarzinom und Normalgewebe

Es sollte die Expression des Rheb-Gens in sechs Tumor-cDNA-Proben mit der in einer Normalgewebeprobe verglichen werden. Daher mußten in jede PCR-Reaktion gleiche Mengen cDNA eingesetzt werden. Von Bedeutung waren hierbei nicht die absoluten Konzentrationen, sondern das Mengenverhältnis der Tumor- zur Normalgewebe-cDNA.

Der OD₂₆₀-Wert der Normalgewebe cDNA-Probe wurde als Referenzwert festgesetzt. Diese Zahl wurde durch die OD₂₆₀-Werte der jeweiligen Tumor-cDNA geteilt (Quotient). Das Volumen der in die PCR eingesetzten cDNAs wurde wie folgt bestimmt: Vom Referenzwert (Normalgewebe) wurde 1 µl verwendet, von den anderen Proben der Quotientenwert in µl.

Für die LightCycler™-PCR wurde 1 µl Normalgewebe-cDNA verwendet und mit 1 µl H₂O auf das erforderliche Volumen von 2 µl aufgefüllt. Von der Tumor-cDNA wurde der jeweilige Quotientenwert eingesetzt und ebenfalls auf ein Volumen von 2 µl gebracht.

Um ungenaue Mengenbestimmungen durch Schwankungen bei der photometrischen Messung zu vermeiden, wurden von jeder cDNA-Probe Doppelwerte ermittelt und der Mittelwert für die Berechnungen des in die PCR einzusetzenden Volumens herangezogen.

cDNA	Normalgewebe	Ma-Ca 1	Ma-Ca 2	Ma-Ca 3	Ma-Ca 4
A 260 1:500 Verd. cDNA	0,039	0,030	0,050	0,022	0,023
Quotient A 260 Normal-Gewebe/A 260 Tumor		1,3	0,8	1,8	1,7
µl cDNA/PCR	1,0	1,3	0,8	1,8	1,7
µl H ₂ O/PCR	1,0	0,7	1,2	0,2	0,3
µl Gesamtvolumen cDNA/PCR	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

Tabelle 4.5.2.3 A Photometrische Bestimmung der cDNA-Konzentration von Normalgewebe und Mammakarzinomen 1-4 (Verdünnung 1:500) sowie Berechnung der in die LightCycler™-PCR einzusetzenden Volumina.

cDNA	Normalgewebe	Ma-Ca 5	Ma-Ca 6
A 260 1:250 Verd. cDNA	0,1365	0,1365	0,1195
Quotient A 260 Normal-Gewebe/A 260 Tumor		1,0	1,14
µl cDNA/PCR	1,0	1,0	1,1
µl H ₂ O/PCR	1,0	1,0	0,9
µl Gesamtvolumen cDNA/PCR	2,0	2,0	2,0

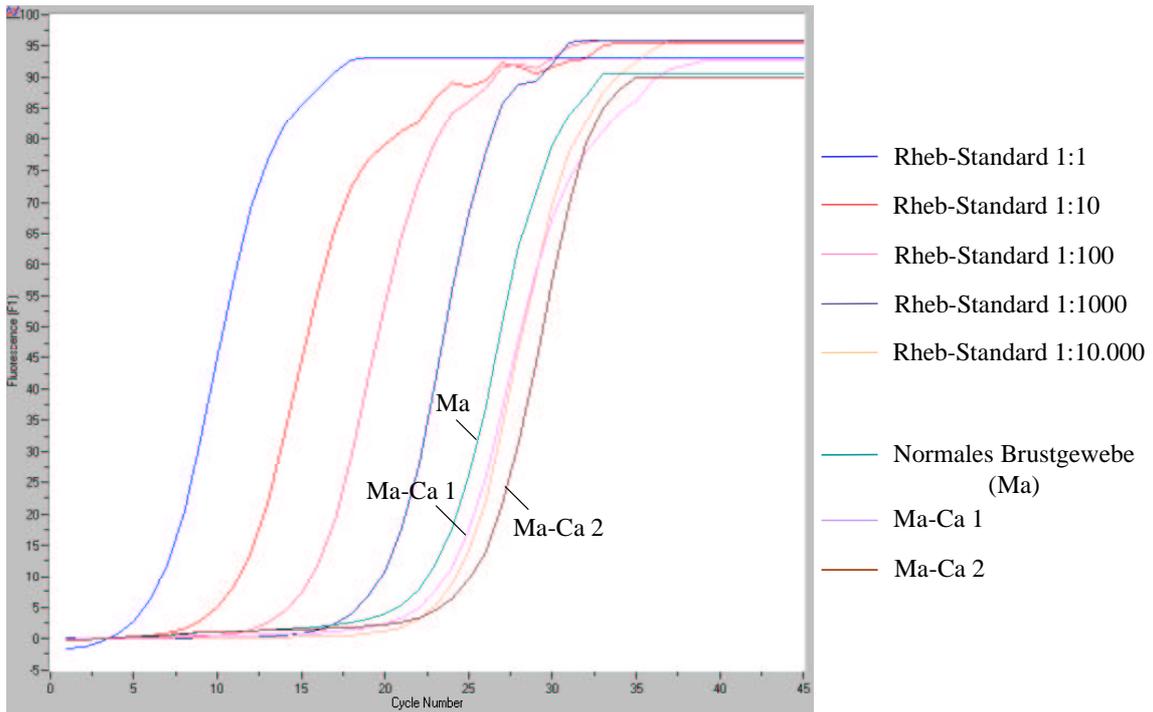
Tabelle 4.5.2.3 B Photometrische Bestimmung der cDNA-Konzentration von Normalgewebe und Mammakarzinomen 5+6 (Verdünnung 1:250) sowie Berechnung der in die LightCycler™-PCR einzusetzenden Volumina.

4.5.2.4 Quantifizierung des Rheb-Gens in einer Normalgewebe- und sechs Mammakarzinom-cDNA-Proben

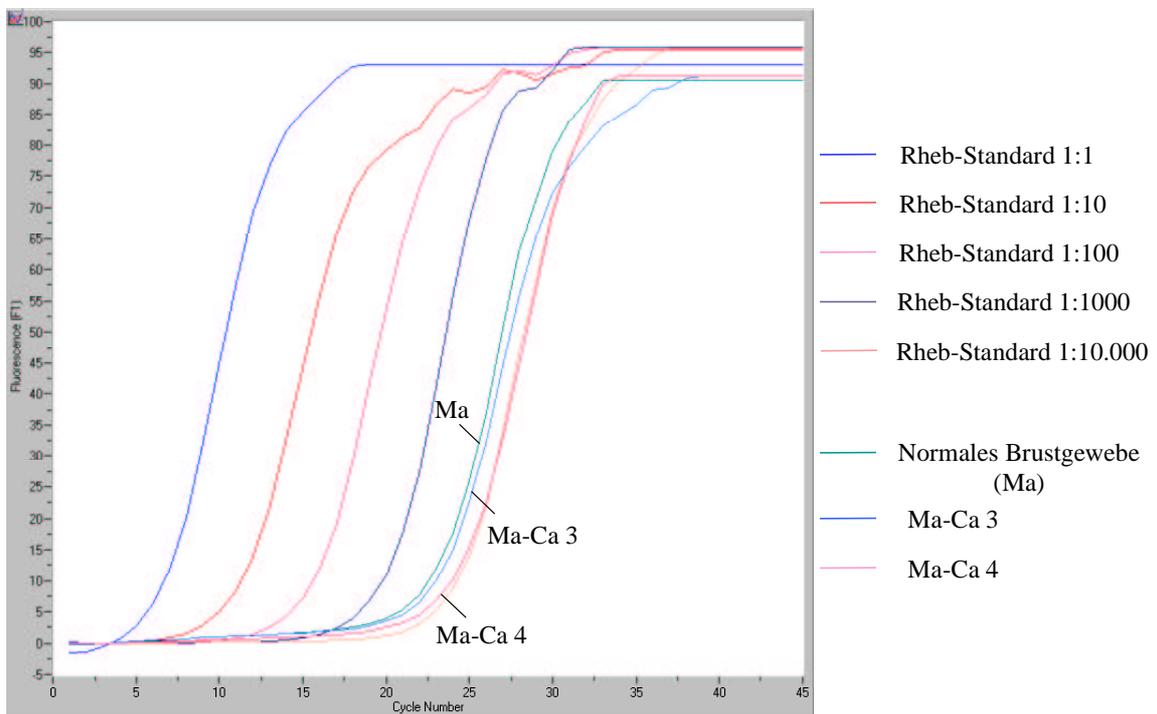
Für eine Quantifizierungs-PCR wurden als Template je 2 µl der jeweiligen Verdünnung der Rheb-Standardreihe eingesetzt sowie gleiche Mengen cDNA einer Normalgewebe- (Ma) und sechs unterschiedlicher Mammakarzinomgewebe-Proben (Ma-Ca 1-6). Bei den sechs Mammakarzinomen handelt es sich um duktal invasive Karzinome, die von verschiedenen Patientinnen stammen. Es wurden die gleichen Rheb-spezifischen Primer verwendet, wie für die qualitativen Analysen. Eine exakte Quantifizierung sollte immer in der logarithmischen Phase einer PCR-Reaktion erfolgen und nicht am Ende, da dann limitierende Faktoren wie Enzym-, dNTP- und Primermenge zum Tragen kommen. Der LightCycler™ mißt die Fluoreszenzintensität der einzelnen Proben jeweils am Ende jedes Zyklus und speichert diese in Form einer Sättigungskurve. Man erhält für die Standardverdünnungen sowie für die verschiedenen cDNAs jeweils eine Kurve. Diese gibt die Fluoreszenzintensität (= Menge des PCR-Produktes, y-Achse) in Abhängigkeit von der Zykluszahl (x-Achse) wieder. Je größer die Ausgangskonzentration des Templates, also die Menge des Rheb-Gens in einer Standard- oder cDNA-Probe, desto kleiner ist die Zykluszahl, bei der die Fluoreszenz erstmalig sichtbar wird. Daher erscheinen zuerst die Kurven der geringsten Verdünnungen der Standardreihe. Die Kurven der Normalgewebe- und Ma-Ca-cDNA-Proben befinden sich im Koordinatensystem weiter rechts in räumlicher Nähe zu höheren Verdünnungen der Standardreihe. Aus der Tatsache, ob die Kurve der Ma-Ca-cDNA bei höheren oder niedrigeren Zykluszahlen erscheint, als die der Normalgewebe-cDNA, kann also geschlossen werden, ob weniger oder mehr Kopien des Rheb-Gens in der Ausgangsprobe vorhanden sind (Abb. 4.5.2.4.1 A).

Um labortechnisch bedingte Fehler auszuschließen, wurden die PCRs der Standardverdünnungen in Zweifach-, die der zu quantifizierenden Gewebe-cDNAs in Dreifachansätzen ausgeführt. In den Abbildungen 4.5.2.4.1 A ist jeweils eine der drei Kurven für Normalgewebe (Ma) und Mammakarzinome (Ma-Ca 1-6) repräsentativ dargestellt, um die unterschiedlich hohe Rheb-Genexpression in Normal- und Tumorgewebe zu verdeutlichen. Die Werte für Ma-Ca 1-4 und für Ma-Ca 5 + 6 wurden jeweils in einem LightCycler™-Lauf mit den Werten für normales Brustgewebe verglichen. Da die Gewebe-cDNA-PCRs im ersten Quantifizierungsexperiment (Ma-Ca 1-4) Fluoreszenzwerte ergaben, die nahe der höchsten Standardverdünnung (1:10.000) lagen, wurde im zweiten Lauf (Ma-Ca 5 + 6) eine weitere Standardverdünnung eingesetzt (1:1 bis 1:100.000).

Rheb-Standards, Ma, Ma-Ca 1 + 2



Rheb-Standards, Ma, Ma-Ca 3 + 4



Rheb-Standards, Ma, Ma-Ca 5 + 6

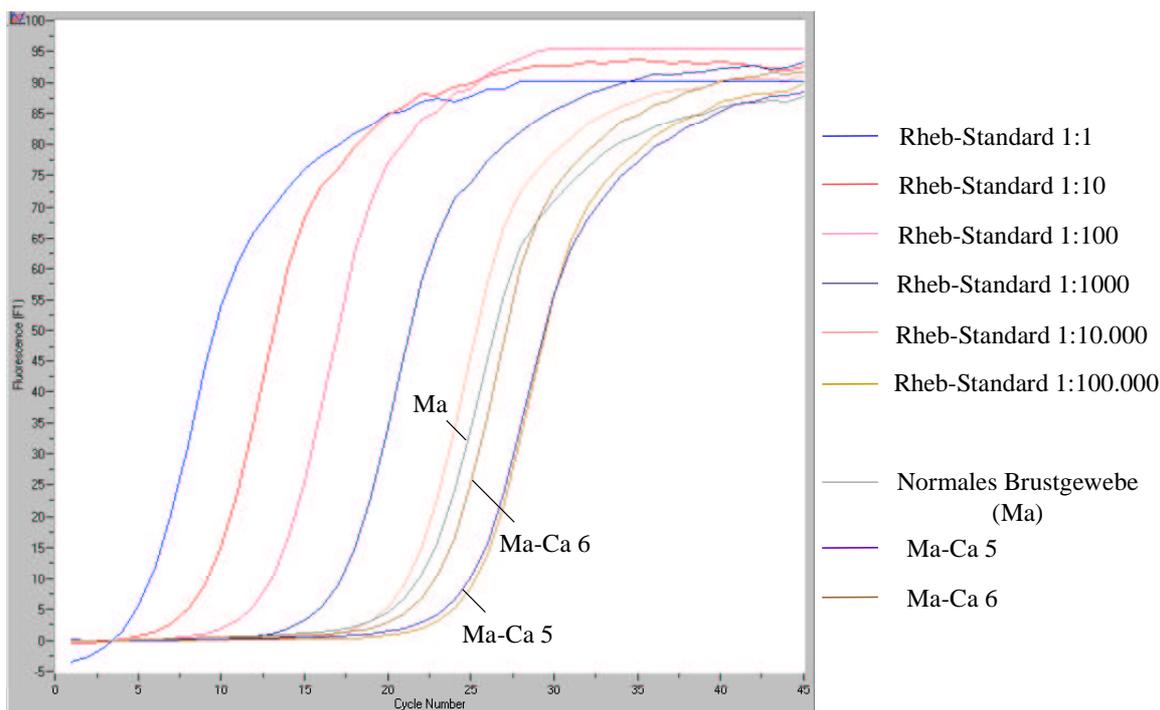
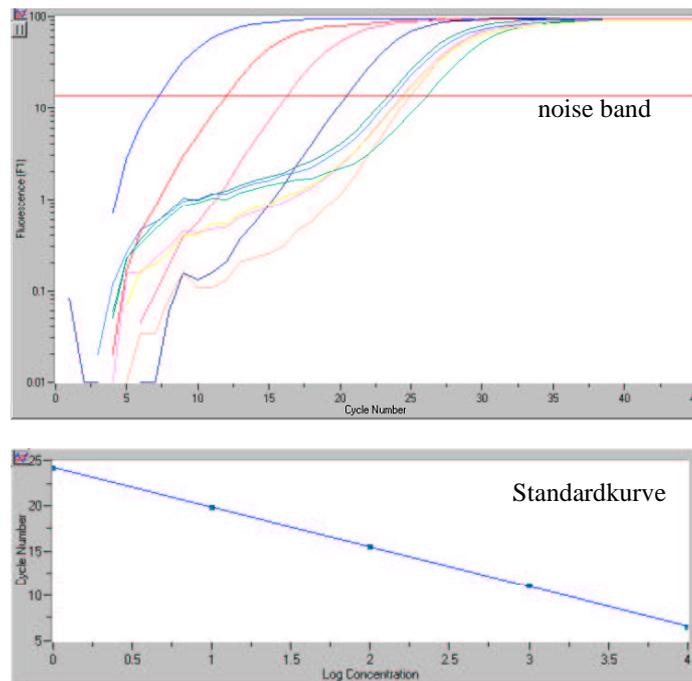


Abbildung 4.5.2.4.1 A PCR-Kurven der Rheb-Gen-Amplifikationsprodukte in Normal- und Mammakarzinom-Gewebe.

Die genaue Quantifizierung der Rheb-Genexpression erfolgt mit dem LightCycler™-Programm. Zunächst wird eine sogenannte „noise band“ gesetzt, d. h. es wird auf einer bestimmten Höhe durch alle Kurven eine Gerade gelegt (Abb. 4.5.2.4.1 B). Die Fluoreszenz unterhalb dieser Gerade bleibt als Hintergrundfluoreszenz unberücksichtigt. Zu jeder Fluoreszenzkurve der Standards wird die Zykluszahl, bei der die Kurve die noise band schneidet, gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen. Aus diesen Punkten wird eine Regressionsgerade für die Standardverdünnungen erstellt, die das Verhältnis der Zykluszahl zum Logarithmus der Template-Konzentration darstellt (Abb. 4.5.2.4.1 B). Die Schnittpunkte der Geraden von Normal- und Tumorgewebe-cDNA mit der noise band ergeben ebenfalls eine bestimmte Zykluszahl. Die Zykluszahl kann auf der Standardkurve einer bestimmten Template-Konzentration zugeordnet werden. Die Fluoreszenz der cDNA-Amplifikate am Ende eines bestimmten Zyklus der logarithmischen Phase wird also mit der Fluoreszenz der Standardkurve zum gleichen Zeitpunkt verglichen. Das Programm errechnet automatisch eine sogenannte „virtuelle Kopienzahl“ des Rheb-Gens für die jeweiligen Standard- und cDNA-Proben. Die Kopienzahl des Gens in Tumor- und Normalgewebe wird somit auf eine externe Standardkurve bezogen und kann auf diese Weise verglichen werden.

Rheb-Standards, Ma, Ma-Ca 1-4



Rheb-Standards, Ma, Ma-Ca 5 + 6

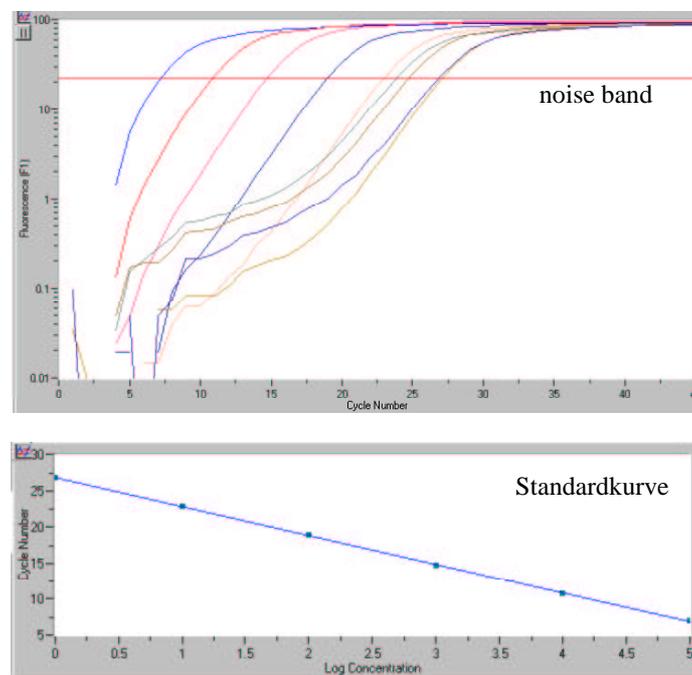
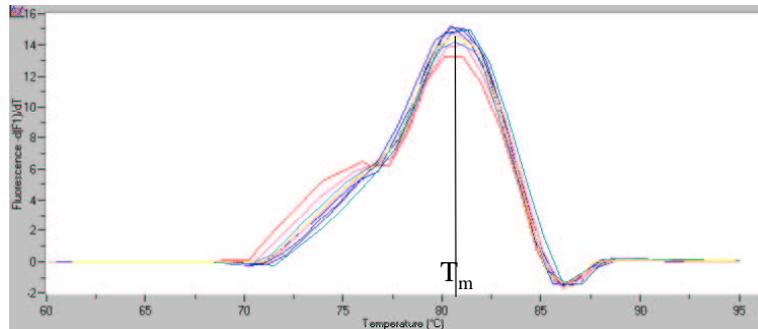


Abbildung 4.5.2.4.1 B Setzen der noise band und Generierung einer Regressionsgerade der Rheb-Gen-Standardverdünnungen.

Die Schmelzkurvenanalysen (Abb. 4.5.2.4.1 C) bestätigen, daß in allen PCR-Reaktionen das Rheb-Gen mit einem T_m -Wert von etwas über 80 °C amplifiziert wurde.

Rheb-Standards, Ma, Ma-Ca 1-4



Rheb-Standards, Ma, Ma-Ca 5+6

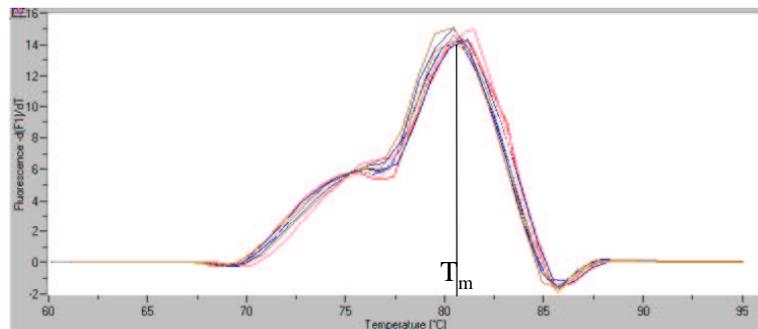


Abbildung 4.5.2.4.1 C Schmelzkurvenanalyse der PCR-Produkte von Standardverdünnungen und Gewebeproben.

Abbildungen 4.5.2.4.1 A zeigen, daß sämtliche Ma-Ca-Kurven zeitlich nach der Kurve für Normalgewebe erscheinen, also die Fluoreszenz erst bei einer späteren Zykluszahl sichtbar wird. Die Ma-Ca-cDNA-Proben enthalten demnach weniger Rheb-Gen-Kopien als die Normalgewebeproben. Dies spiegelt sich auch in den jeweiligen Kopienzahlen des Rheb-Gens für Normal- und Tumorgewebe wieder. Die mittleren Kopienzahlen wurden durch das LightCycler™-Programm nach Vergleich der Gewebeproben-PCR-Produkte mit der Standardkurve quantitativ genau ermittelt.

Probe	Mittlere Kopienzahl	Standard- abweichung	% Expression von normalen Gewebe	Expression in Ma-Ca vermindert um:
Standard 1:1	10.030,0	376,90		
Standard 1:10	1.034,0	132,00		
Standard 1:00	96,5	0,19		
Standard 1:1000	9,7	0,81		
Standard 1:10.000	1,0	0,02		
normales Brustgewebe	2,53	0,30		
Ma-Ca 1	1,41	0,03	55,7	44,3%
Ma-Ca 2	0,66	0,03	26,0	74,0%
Ma-Ca 3	1,90	0,05	75,2	24,8%
Ma-Ca 4	1,35	0,11	53,2	46,8%

Probe	Mittlere Kopienzahl	Standard- abweichung	% Expression von normalen Gewebe	Expression in Ma-Ca vermindert um:
Standard 1:1	97.160,0	1.180,00		
Standard 1:10	10.130,0	178,00		
Standard 1:00	1.051,0	119,80		
Standard 1:1000	97,7	2,32		
Standard 1:10.000	10,0	0,62		
Standard 1:100.000	1,0	0,09		
normales Brustgewebe	6,12	0,63		
Ma-Ca 5	1,08	0,12	17,6	82,4%
Ma-Ca 6	4,07	0,98	66,5	33,5%

Tabellen 4.5.2.4.1 Rheb-Genexpression in cDNA-Proben aus normalem Brustgewebe und sechs duktal invasiven Mammakarzinomen.

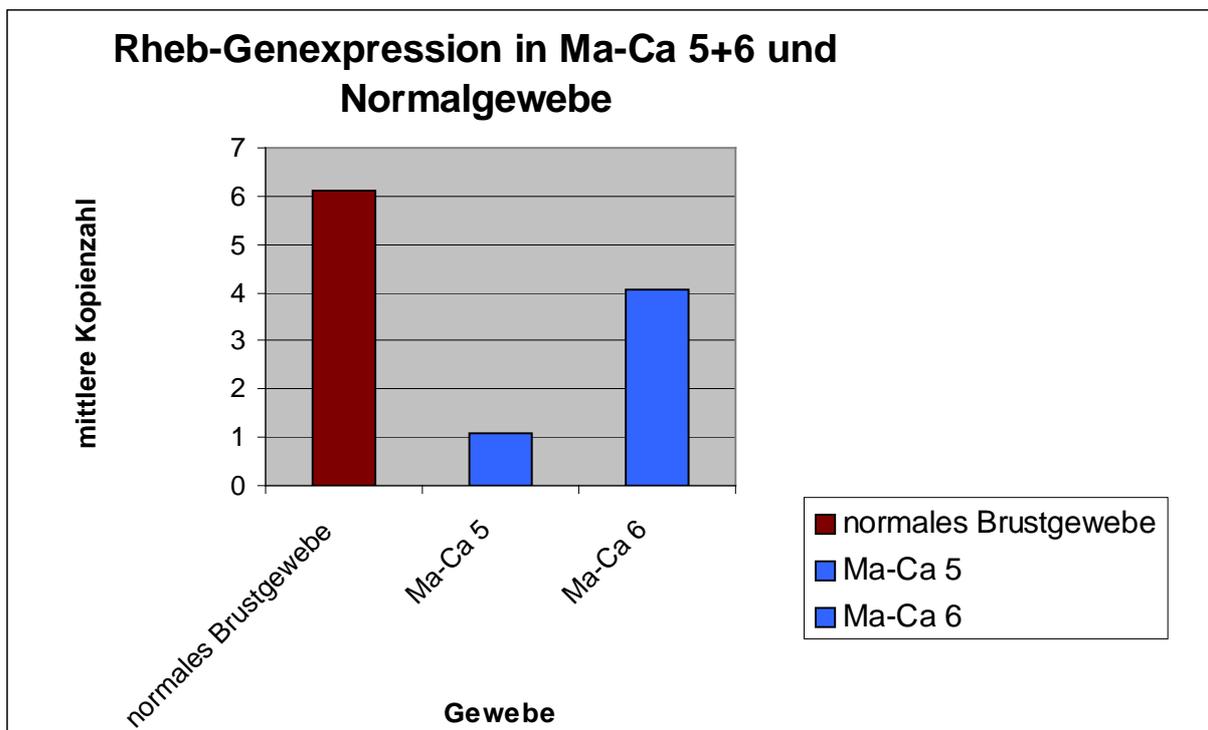
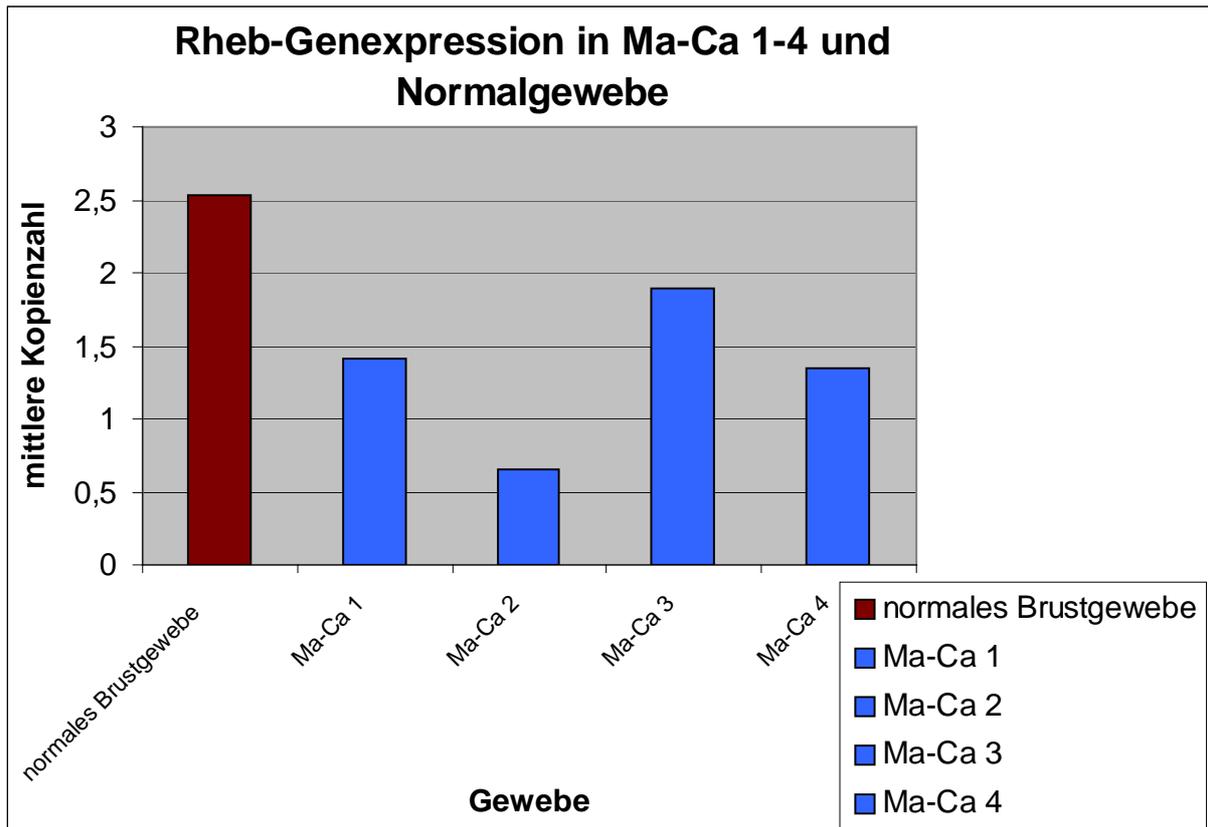


Abbildung 4.5.2.4.2 Rheb-Genexpression in cDNA-Proben aus normalem Brustgewebe und sechs duktal invasiven Mammakarzinomen.

Die vom Programm berechnete mittlere Kopienzahl entspricht nicht der tatsächlich in der cDNA-Probe vorliegenden Anzahl der Rheb-Gen-Kopien. Die Größe der Werte sowohl für Normal- als auch für Tumorgewebe ist abhängig von den gewählten Verdünnungen des externen Standards und dient als Maß für den Vergleich der Genexpression in normalem und entartetem Gewebe.

Die Ergebnisse verdeutlichen, daß die Rheb-Genexpression in allen sechs Mammakarzinomen im Vergleich zu normalem Brustgewebe vermindert ist. Eine nur leicht geringere Expression liegt in Ma-Ca 3 + 6 vor, mit 75,2% und 66,5% bezogen auf die Expression in Normalgewebe. In Ma-Ca 1 + 4 beträgt die Rheb-Gen-Kopienzahl etwa die Hälfte der Kopienzahl von Normalgewebe (55,7% und 53,2%). In Ma-Ca 2 + 5 ist das Gen am stärksten unterexprimiert und erreicht lediglich 26,0% und 17,6% der Kopienzahl von gesundem Brustgewebe. Dies bedeutet eine Verminderung der Genexpression um den Faktor 3,8 bzw. 5,7.

4.6 Etablierung eines Modellsystems zur Detektion des Zielantigens eines auf filamentösen Phagen exprimierten scFv in einer λ -Phagen-cDNA-Expressionsbank

4.6.1 Klonierung des CD30-Antigens in λ -Phagen

Das CD30-Antigen wurde aus dem Plasmid pcDNA3 mit Primern amplifiziert, die eine EcoR I- (CD30-For) bzw. eine Not I-Schnittstelle (CD30-Back) enthielten. Die amplifizierten CD30-Antigen-Fragmente konnten somit EcoR I/Not I geschnitten und in den gleichermaßen verdauten λ -Phagen-Vektor ZAP® II kloniert werden. Zudem wurden die Primer entsprechend des Vektorleserahmens entworfen, so daß der Leserahmen des CD30-Antigens mit dem des Phagen-Vektors übereinstimmt und somit das zugehörige Protein korrekt exprimiert wird. Die Restriktion des Vektors erwies sich aufgrund der Größe (40 kb) als recht schwierig. Vektor und Insert wurden in 10 μ l-Ansätzen mit je 5 U EcoR I und Not I verdaut. Es wurden ein Verdau mit 1,0 μ l amplifiziertem und geextrahiertem CD30-Antigen sowie zwei Verdaus mit 0,2 μ l (200 ng) Vektor-DNA durchgeführt. Die Vektor-DNA wurde vor der Gelextraktion gepoolt. Nach Gelextraktion der Verdaus wurden die Mengen im Agarosegel durch Vergleich mit DNA-Standards bestimmt.

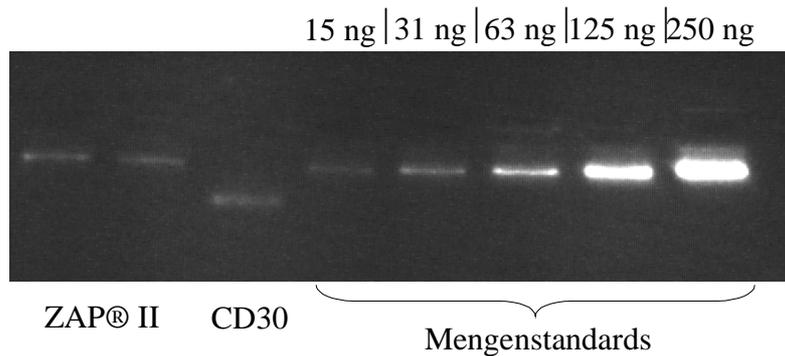


Abbildung 4.6.1.1 Mengenbestimmung CD30-Antigen und ZAP® II nach Verdau und Gelextraktion. Es wurde 1 μ l DNA pro Verdau aufgetragen.

Sowohl das CD30-Antigen als auch der Vektor enthielten ca. 15 ng DNA/ μ l. Dies ergibt bei einem Volumen von 15 μ l nach der Gelextraktion je 225 ng verdaute CD30-Antigen- und Vektor-DNA.

Der ZAP® II-Vektor wurde vor der Ligation dephosphoryliert, anschließend mit Ethanol gefällt und das Pellet in 1,3 μ l ddH₂O aufgenommen. 0,2 μ l des Vektors wurden für eine Mengenbestimmung auf ein Agarosegel aufgetragen. Es ergab sich eine Konzentration von etwa 2 ng/ μ l.

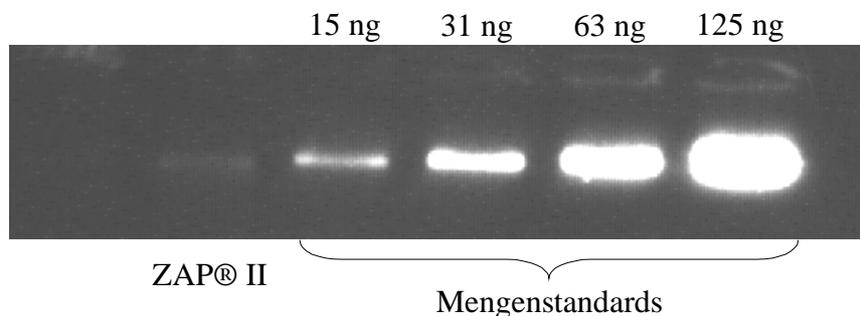


Abbildung 4.6.1.2 Mengenbestimmung ZAP® II-DNA nach Dephosphorylierung und Ethanolfällung. Es wurde 0,2 μ l ZAP® II-DNA aufgetragen.

In die Ligationsreaktion wurden 0,3 μ l ZAP® II-DNA (3 ng) und 0,8 μ l CD30-Antigen-DNA (12 ng) eingesetzt. Die rekombinante DNA wurde in λ -Phagen verpackt und 1/10 der Reaktion (50 μ l) ausplattiert. Es konnten drei rekombinante Plaques gepickt werden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit das CD30-Antigen als Insert enthielten. Die rekombinanten Klone wurden aufgereinigt und enthielten zwischen 10^6 und 10^7 pfu/ml. Um sicherzustellen, daß die Phagen auch tatsächlich das CD30-Antigen im richtigen Leserahmen exprimieren, wurden die drei Klone einer Excision unterzogen und die Inserts sequenziert.

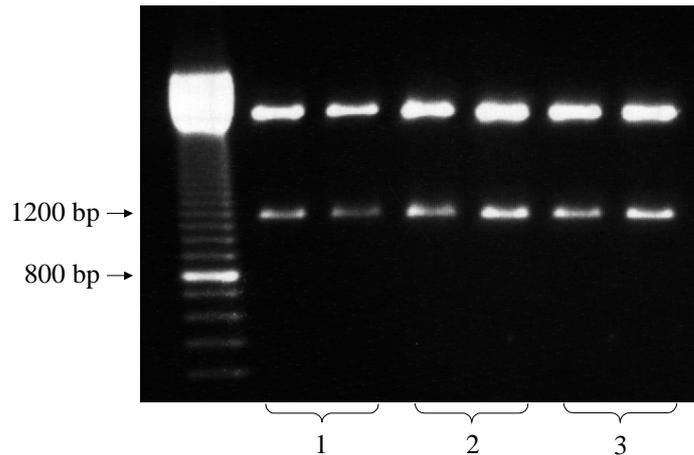


Abbildung 4.6.1.3 Verdau pBluescript-Plasmid nach Excision aus 3 rekombinanten Klonen (1-3). Größe CD30-Antigen: 1147 bp.

Das Gel nach EcoR I/Not I-Verdau zeigt, daß die Inserts der drei Klone zwischen 1100 und 1200 bp liegen und damit die Größe des CD30-Antigens (1147 bp) aufweisen.

Durch die Sequenzierungen wurde nachgewiesen, daß alle drei Klone das CD30-Antigen im richtigen Leserahmen enthalten. Es konnte also davon ausgegangen werden, daß die rekombinanten λ -Phagen das CD30-Antigen korrekt exprimieren. Die CD30-Phagen wurden daraufhin in einer Amplifizierungsreaktion vermehrt, um stabile Klone mit einem hohen Titer zu etablieren. Der Titer betrug $\sim 1 \times 10^{10}$ pfu/ml.

```

1/1   Not I                               31/11
gtg gcg gcc gct ATG CGC GTC CTC CTC GCC GCG CTG GGA CTG CTG TTC CTG GGG GCG CTA
R   P   P   T   M   R   V   L   L   A   A   L   G   L   L   F   L   G   A   L
61/21                               91/31
CGA GCC TTC CCA CAG GAT CGA CCC TTC GAG GAC ACC TGT CAT GGA AAC CCC AGC CAC TAC
R   A   F   P   Q   D   R   P   F   E   D   T   C   H   G   N   P   S   H   Y
121/41                               151/51
TAT GAC AAG GCT GTC AGG AGG TGC TGT TAC CGC TGC CCC ATG GGG CTG TTC CCG ACA CAG
Y   D   K   A   V   R   R   C   C   Y   R   C   P   M   G   L   F   P   T   Q
181/61                               211/71
CAG TGC CCA CAG AGG CCT ACT GAC TGC AGG AAG CAG TGT GAG CCT GAC TAC TAC CTG GAT
Q   C   P   Q   R   P   T   D   C   R   K   Q   C   E   P   D   Y   Y   L   D
241/81                               271/91
GAG GCC GAC CGC TGT ACA GCC TGC GTG ACT TGT TCT CGA GAT GAC CTC GTG GAG AAG ACG
E   A   D   R   C   T   A   C   V   T   C   S   R   D   D   L   V   E   K   T
301/101                               331/111
CCG TGT GCA TGG AAC TCC TCC CGT GTC TGC GAA TGT CGA CCC GGC ATG TTC TGT TCC ACG
P   C   A   W   N   S   S   R   V   C   E   C   R   P   G   M   F   C   S   T
361/121                               391/131
TCT GCC GTC AAC TCC TGT GCC CGC TGC TTC TTC CAT TCT GTC TGT CCG GCA GGG ATG ATT
S   A   V   N   S   C   A   R   C   F   F   H   S   V   C   P   A   G   M   I
421/141                               451/151
GTC AAG TTC CCA GGC ACG GCG CAG AAG AAC ACG GTC TGT GAG CCG GCT TCC CCA GGG GTC
V   K   F   P   G   T   A   Q   K   N   T   V   C   E   P   A   S   P   G   V
481/161                               511/171
AGC CCT GCC TGT GCC AGC CCA GAG AAC TGC AAG GAA CCC TCC AGT GGC ACC ATC CCC CAG
S   P   A   C   A   S   P   E   N   C   K   E   P   S   S   G   T   I   P   Q

```

```

541/181                               571/191
GCC AAG CCC ACC CCG GTG TCC CCA GCA ACC TCC AGT GCC AGC ACC ATG CCT GTA AGA GGG
A  K  P  T  P  V  S  P  A  T  S  S  A  S  T  M  P  V  R  G
601/201                               631/211
GGC ACC CGC CTC GCC CAG GAA GCT GCT TCT AAA CTG ACG AGG GCT CCC GAC TCT CCC TCC
G  T  R  L  A  Q  E  A  A  S  K  L  T  R  A  P  D  S  P  S
661/221                               691/231
TCT GTG GGA AGG CCT AGT TCA GAT CCA GGT CTG TCC CCA ACA CAG CCA TGC CCA GAG GGG
S  V  G  R  P  S  S  D  P  G  L  S  P  T  Q  P  C  P  E  G
721/241                               751/251
TCT GGT GAT TGC AGA AAG CAG TGT GAG CCC GAC TAC TAC CTG GAC GAG GCC GGC CGC TGC
S  G  D  C  R  K  Q  C  E  P  D  Y  Y  L  D  E  A  G  R  C
781/261                               811/271
ACG GCC TGC GTG AGC TGT TCT CGA GAT GAC CTT GTG GAG AAG ACG CCA TGT GCA TGG AAC
T  A  C  V  S  C  S  R  D  D  L  V  E  K  T  P  C  A  W  N
841/281                               871/291
TCC TCC CGC ACC TGC GAA TGT CGA CCT GGC ATG ATC TGT GCC ACA TCA GCC ACC AAC TCC
S  S  R  T  C  E  C  R  P  G  M  I  C  A  T  S  A  T  N  S
901/301                               931/311
TGT GCC CGC TGT GTC CCC TAC CCA ATC TGT GCA GCA GAG ACG GTC ACC AAG CCC CAG GAT
C  A  R  C  V  P  Y  P  I  C  A  A  E  T  V  T  K  P  Q  D
961/321                               991/331
ATG GCT GAG AAG GAC ACC ACC TTT GAG GCG CCA CCC CTG GGG ACC CAG CCG GAC TGC AAC
M  A  E  K  D  T  T  F  E  A  P  P  L  G  T  Q  P  D  C  N
1021/341                              1051/351
CCC ACC CCA GAG AAT GGC GAG GCG CCT GCC AGC ACC AGC CCC ACT CAG AGC TTG CTG GTG
P  T  P  E  N  G  E  A  P  A  S  T  S  P  T  Q  S  L  L  V
1081/361                              1111/371
GAC TCC CAG GCC AGT AAG ACG CTG CCC ATC CCA ACC AGC GCT CCC GTC GCT CTC TCC TCC
D  S  Q  A  S  K  T  L  P  I  P  T  S  A  P  V  A  L  S  S
1141/381                              1171/391
ACG GGG AAG gca gct gcg gaa ttc gat atc aag ctt atc gat acc gtc
T  G  K  A  A  A      EcoR I      Vektor-Sequenz

```

Abbildung 4.6.1.4 Nukleotid und Aminosäuresequenz des CD30-Antigen-Inserts im λ -Phagen-Vektor ZAP® II. Die Vektor-Sequenz ist in kleinen Buchstaben dargestellt. Die Schnittstellen sind grau, das Start-Codon grün hinterlegt.

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

Ziel dieser Arbeiten war es, ein funktionierendes System zu etablieren, welches es ermöglicht, das Zielantigen eines auf filamentösen Phagen exprimierten scFv in einer cDNA-Expressionsbank zu detektieren.

Als Modellsystem wurde das CD30-Antigen und der anti-CD30-Antikörper Ki-4 ausgewählt. Die guten Bindungseigenschaften sowohl des monoklonalen Ki-4 als auch des abgeleiteten scFvs sind bereits bekannt (Klimka et al., 1999). Das CD30-Antigen wird auf Lymphomen (Hodgkin-Lymphom, Non-Hodgkin Lymphom, Burkitt Lymphom, folliculäres Lymphom) exprimiert, kann aber auch bei T-Zell-Leukämien und auf aktivierten T- und B-Zellen nachgewiesen werden. Das Antigen wird bereits in klinischen Studien erfolgreich als Ziel für eine Immuntoxitherapie des Hodgkin-Lymphoms eingesetzt. Als irrelevante, CD30-negative λ -Phagen dienten in dem ausgewählten Modellsystem die Mammakarzinom-spezifischen

Klone, da für diese Tumorart keine CD30-Expression bekannt ist. Der rekombinant hergestellte monoklonale anti-CD30 Antikörper Ki-4 sowie das Ki-4-scFv im Phagmidvektor pC6 standen im Labor zur Verfügung.

Zunächst wurde die Mammakarzinom-spezifische λ -Phagen-Bibliothek mit dem CD30-Antigen-exprimierenden λ -Phagen-Klon im Verhältnis 1:1 gemischt. Demnach müsste die Hälfte der Klone ein positives Signal ergeben. Die Phagen wurden in einer Dichte von ca. 30.000 pfu/15 cm Agarplatte ausgestrichen und die Plaques auf Nitrozellulose übertragen. Um zu überprüfen, ob das CD30-Antigen nach Bindung an den Nitrozellulosefilter noch von dem zugehörigen Antikörper erkannt wird, wurden die Blots mit dem monoklonalen Ki-4 inkubiert. Die Bindung wurde mit einem AP-gekoppelten anti-Maus Antikörper nachgewiesen. Wie erwartet, zeigte etwa die Hälfte der Plaques ein deutlich positives Signal (Abb. 4.6.2.1 A.). Als Negativkontrolle wurde die Mammakarzinom-spezifische Bibliothek ausplattiert und mit Ki-4 inkubiert. Da Mammakarzinome kein CD30 exprimieren, erscheinen in der Negativkontrolle keine positiven Plaques (Abb. 4.6.2.1 B.).

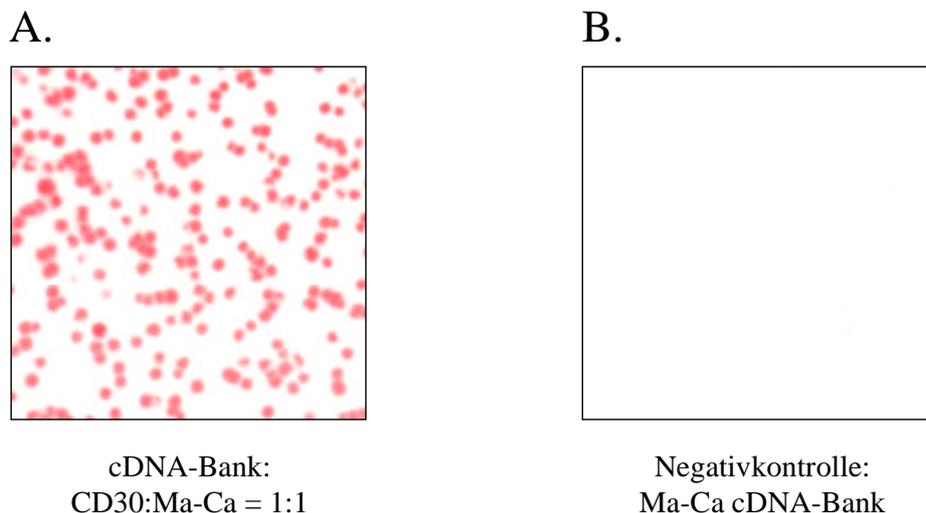


Abbildung 4.6.2.1 Detektion CD30-Antigen exprimierender λ -Phagen-Plaques durch Ki-4 moAk.

- A.** Detektion CD30-Antigen in einem 1:1 Gemisch aus Mammakarzinom-spezifischen und CD30-Phagen durch den monoklonalen anti-CD30 Antikörper Ki-4.
- B.** Negativkontrolle: Keine Detektion von CD30-Antigen in der Mammakarzinom-spezifischen Expressionsbank.

Daraufhin wurden die λ -Phagen wiederum im Verhältnis 1:1 ausplattiert, um zu evaluieren, ob das CD30-Antigen auch von auf filamentösen Phagen exprimiertem Ki-4-scFv erkannt wird. Als Wirtszellen wurden statt X11-Blue MRF⁺ X11-Blue MR gewählt. Diesem Bakterienstamm fehlt das F⁺-Episom, das die Information für die Ausbildung des F⁺-Pilus trägt. Filamentöse Phagen infizieren Bakterien über den F⁺-Pilus und würden auch an die F⁺-Pili der λ -Phagen-Wirtszellen X11-Blue MRF⁺ binden. Daher käme es zu einer Färbung jedes

einzelnen Plaques und CD30-spezifisch bindende filamentöse Phagen könnten nicht detektiert werden.

Die Gewinnung der Ki-4-scFv-tragenden Phagen (phage rescue) ergibt 1 ml mit durchschnittlich 5×10^{13} Phagen. Da aufgrund von Vorversuchen bereits bekannt war, daß eine zu große Menge an filamentösen Phagen pro Blot eine starke unspezifische Bindung nach sich zieht, wurde jeder Filter mit einer unterschiedlichen Konzentration an Ki-4-scFv-Phagen inkubiert. Es sollte die Menge an Ki-4-scFv-tragenden Phagen bestimmt werden, mit der das CD30-Antigen in einem 1:1 Gemisch von irrelevanten (Mammakarzinom-spezifischen) und CD30- λ -Phagen ohne zu starke Hintergrundbildung detektiert wird. Als Positivkontrolle wurde ein Filter mit monoklonalem Ki-4 Antikörper inkubiert. Die gebundenen Ki-4-scFv-Phagen wurden mit einem Maus-anti-M13 Antikörper und anschließend mit einem AP-gekoppelten Ziege anti-Maus Antikörper nachgewiesen.

μl phage rescue pro Blot	1	10	50	100	Positivkontrolle: 100 μ l Ki-4 moAk
Konzentration Ki-4-scFv Phagen pro Blot	5×10^{10}	5×10^{11}	$2,5 \times 10^{12}$	5×10^{12}	
Detektion CD30 positiver Plaques	-	-	+	+	+
Hintergrund	-	-	+/-	+	-

Tabelle 4.6.2.1 Detektion CD30-Antigen exprimierender λ -Phagen-Plaques in einem 1:1 Gemisch aus Mammakarzinom-spezifischen und CD30-Phagen durch unterschiedliche Mengen Ki-4-scFv auf filamentösen Phagen.

Es handelt sich bei der Detektion durch die Ki-4-scFv-Phagen offensichtlich um eine „Alles oder Nichts“-Reaktion. Mit einer Konzentration von 5×10^{10} oder 5×10^{11} kommt es zu keiner nachweisbaren Bindung (Abb. 4.6.2.2 A. + B.). Sowohl $2,5 \times 10^{12}$ als auch 5×10^{12} Ki-4-scFv- Phagen zeigten die bei einer 1:1-Mischung erwartete Färbung der Hälfte der Plaques. Trotz eines intensiven Waschschrilles von einer Stunde vor dem Nachweis der gebundenen Phagen, sind auch alle Hintergrundplaques auf den Filtern zu erkennen. Positive Plaques heben sich dennoch durch ihre dunklere Färbung deutlich ab und können problemlos erkannt werden (Abb. 4.6.2.2 C. + D.). Die positive Reaktion ist jedoch weniger intensiv als die durch den monoklonalen Antikörper hervorgerufenen Signale (Abb. 4.6.2.2 E.). Der mit $2,5 \times 10^{12}$ Ki-scFv-Phagen inkubierte Filter zeigt eine leichte Rosafärbung im mittleren Bereich, die sich bei einer höheren Konzentration von 5×10^{12} Phagen noch verstärkt.

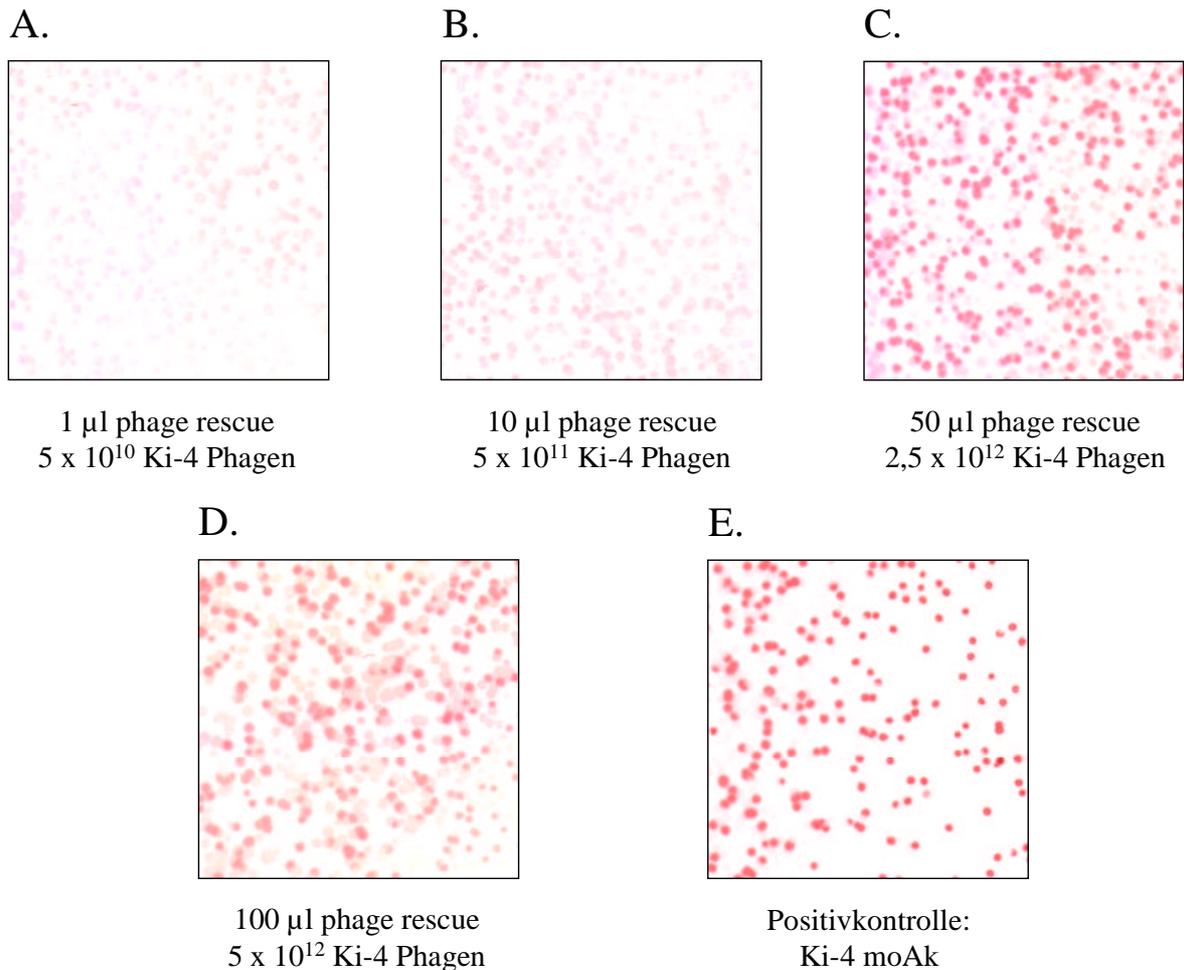


Abbildung 4.6.2.2 A.-E. Detektion CD30-Antigen exprimierender λ -Phagen-Plaques in einem 1:1 Gemisch aus Mammakarzinom-spezifischen und CD30-Phagen durch unterschiedliche Mengen Ki-4-scFv auf filamentösen Phagen.

Die hier anhand eines artifiziellen Systems entwickelte Methode soll dazu dienen, das unbekannte Antigen eines mittels phage display selektierten Antikörperfragmentes in einer cDNA-Expressionsbank zu identifizieren. Eine solche cDNA-Bank umfaßt Tausende nicht relevante Proteine und enthält wahrscheinlich nur wenige Klone, die das gesuchte Antigen exprimieren. Durch eine 1:1-Mischung CD30-positiver mit irrelevanten Klonen enthielt die Hälfte der cDNA-Expressionsbank das Zielantigen, d. h. jeder zweite Plaque ergab eine positive Reaktion. Um nachzuweisen, daß nur wenige CD30-positive Phagen in Tausenden irrelevanter Hintergrundplaques durch das Screening mit Ki-4-scFv-Phagen detektiert werden können, wurde ein 1:200 Gemisch ausplattiert. Pro Platte wurden 4000 λ -Phagen ausgestrichen, dies entspricht etwa 20 positiven Plaques pro Blot.

Die Filter wurden wiederum mit unterschiedlichen Konzentrationen der Ki-4-scFv-Phagen inkubiert und die Bindung wie zuvor beschrieben nachgewiesen.

µl phage rescue pro Blot	10 ⁻²	10 ⁻¹	0,5	1	5	10	50	100	100 µl Ki-4 moAk
Konzentration Ki-4-scFv-Phagen pro Blot	5x10 ⁸	5x10 ⁹	2,5x10 ¹⁰	5x10 ¹⁰	2,5x10 ¹¹	5x10 ¹¹	2,5x10 ¹²	5x10 ¹²	
Anzahl CD30 positiver Plaques	0	0	0	0	0	0	10	8	22
Hintergrund	+	+	+	+	+	+	+++	+++	-

Tabelle 4.6.2.2 Detektion CD30-Antigen exprimierender λ -Phagen-Plaques in einem 1:200 Gemisch aus Mammakarzinom-spezifischen und CD30-Phagen durch unterschiedliche Mengen Ki-4-scFv auf filamentösen Phagen.

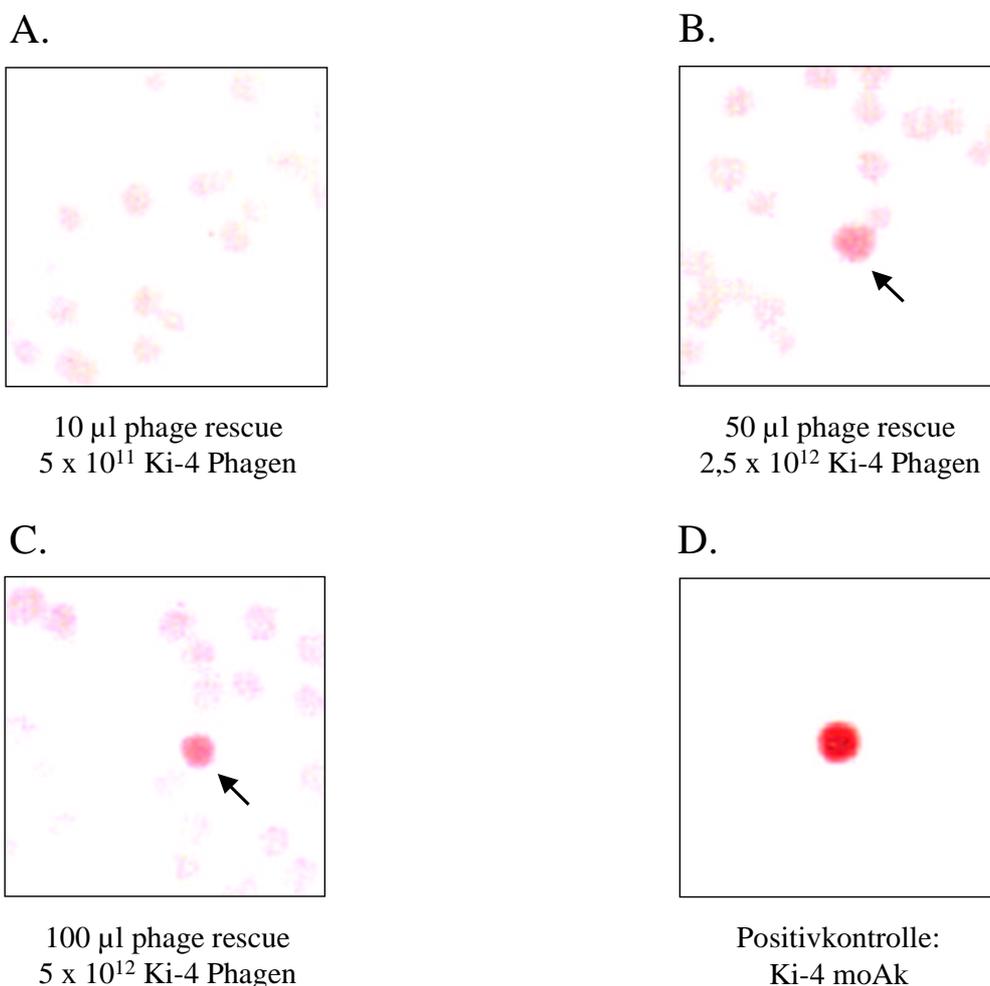


Abbildung 4.6.2.3 A.-D. Detektion CD30-Antigen exprimierender λ -Phagen-Plaques in einem 1:200 Gemisch aus Mammakarzinom-spezifischen und CD30-Phagen durch unterschiedliche Mengen Ki-4-scFv auf filamentösen Phagen.

In der Positivkontrolle mit Ki-4 moAk zeigten sich 22 positive Plaques (Abb. 4.6.2.3 D.). Mit einer Konzentration von 5×10^{12} (100 μ l) Ki-4-scFv-Phagen konnten 8 deutlich positive Klone generiert werden (Abb. 4.6.2.3 C.). Nach Inkubation mit $2,5 \times 10^{12}$ Ki-4-Phagen zeigten sich 10 positive Signale, die jedoch schwächer gefärbt waren (Abb. 4.6.2.3 B.). Die höchsten Konzentrationen an filamentösen Phagen ($2,5 \times 10^{12}$ und 5×10^{12}) pro Blot gehen mit einer starken Hintergrundbildung einher, die durch eine rötliche Färbung des gesamten Filters sowie aller Plaques gekennzeichnet ist (Abb. 4.6.2.3 B. + C.). Geringere Konzentrationen (ab 5×10^{11}) bedingen lediglich eine schwache unspezifische Färbung der Plaques, nicht jedoch der restlichen Filterfläche (Abb. 4.6.2.3 A.). Die Menge an filamentösen Phagen, die benötigt wird, um CD30-positive Klone nachzuweisen, entspricht derjenigen des vorausgegangenen Screenings einer 1:1-Verdünnung der cDNA-Bibliothek ($2,5 \times 10^{12}$ und 5×10^{12}). Die positiven Signale sind schwächer als die in einer 1:1-Verdünnung detektierten und aufgrund der stärkeren Hintergrundfärbung schlechter von nicht positiven Plaques abzugrenzen (Abb. 4.6.2.3 B. + C.).

4.6.3 Excision CD30-positiver Klone des Screenings mit Ki-4-scFv-Phagen

Um zu verifizieren, daß es sich bei den positiven Signalen um das CD30-Antigen handelt, wurden vier positive Plaques gepickt und das pBluescript-Phagmid samt Insert einer Excision unterzogen. Die Plasmide wurden EcoR I/Not I verdaut, um das Insert herauszuschneiden. Alle Klone enthielten ein Insert, welches die Größe des CD30-Antigens aufwies (1147 bp).

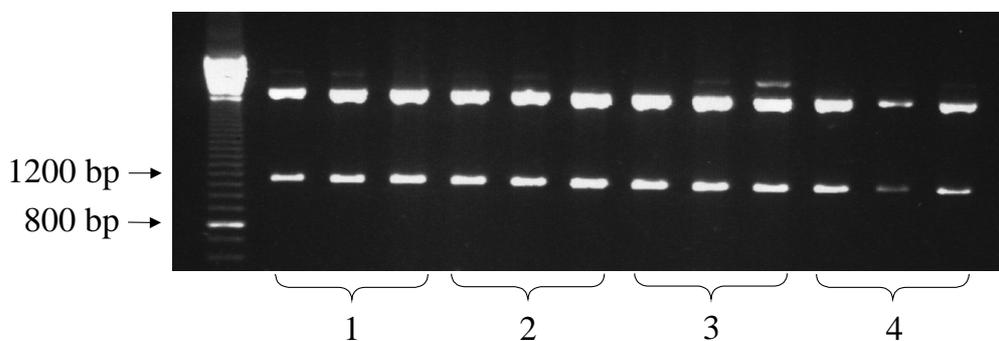


Abbildung 4.6.3 EcoR I/Not I-Verdau der Plasmide (1-4) CD30-positiver λ -Phagen-Klone.

4.6.4 Konkurrenz der Bindung Ki-4-scFv filamentöser Phagen mit monoklonalem Ki-4-Antikörper

Diese Untersuchungen wurden durchgeführt, um nachzuweisen, daß alle positiven Plaques auf spezifische Bindungen der Ki-4-scFv-Phagen an das CD30-Antigen zurückgehen und nicht etwa durch unspezifische Bindungen der filamentösen Phagen hervorgerufen werden. Es wurde wiederum eine 1:1 Mischung aus CD30-positiven und irrelevanten λ -Phagen gescreent.

Es sollte daher die Hälfte der Plaques ein positives Signal ergeben. Jeder Filter wurde gleichzeitig mit 100 μ l Ki-4-scFv-Phagen und absteigenden Konzentrationen an Ki-4 moAk inkubiert. Als Positivkontrolle wurde ein Blot mit 100 μ l Ki-4-scFv filamentösen Phagen ohne Ki-4 moAk gescreent. Da es sich bei dem monoklonalen Ki-4 um einen murinen Antikörper handelt, konnten die gebundenen Phagen nicht mit dem Maus-anti-M13 und einem AP-anti-Maus Antikörper gefärbt werden. Dieser würde beide Antikörperstrukturen detektieren, es sollte jedoch lediglich die Bindung der Ki-4-scFv-Phagen dokumentiert werden. Daher wurden die Filter mit einem Schaf-anti-M13 Antikörper inkubiert und positive Signale mit einem AP-gekoppelten Esel anti-Schaf Immunglobulin nachgewiesen.

μl Ki-4-scFv-Phagen	100	100	100	100	100	100
μl Ki-4 moAk	100	1	10^{-2}	10^{-4}	10^{-6}	-
Konzentration Ki-4 moAk	100 μ g	1 μ g	10 ng	0,1 ng	1 pg	-
Detektion CD30-positive Plaques durch Ki-4-scFv-Phagen	-	-	-	+	+	+

Tabelle 4.6.4 Konkurrenz Ki-4-scFv-Phagen durch unterschiedliche Konzentrationen von Ki-4 moAk.

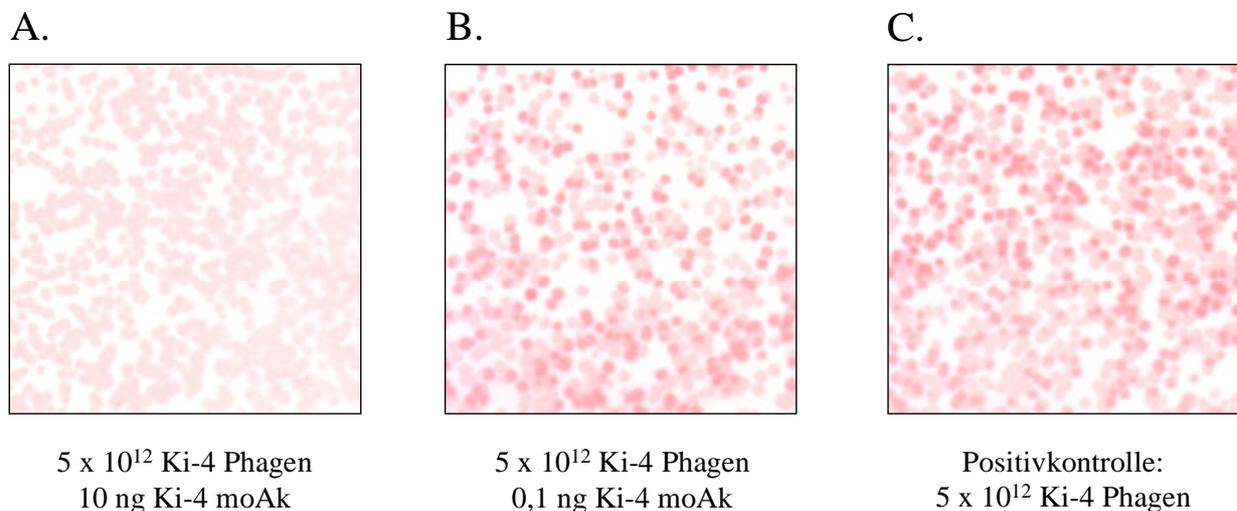


Abbildung 4.6.4 Konkurrenz Ki-4-scFv-Phagen durch unterschiedliche Konzentrationen von Ki-4 moAk. Die Blots wurden jeweils mit 100 μ l Ki-4-scFv-Phagen und absteigenden Konzentrationen an Ki-4 moAk inkubiert.

Bis zu einer Konzentration von 10 ng Ki-4 moAk wurde die Bindung der Ki-4-scFv-Phagen vollständig kompetiert, d.h. alle CD30-positiven Plaques wurden von dem monoklonalen Antikörper erkannt und blockiert. Die Filter wiesen keine positiven Signale auf (Abb. 4.6.4. A.).

Niedrigere Konzentrationen von Ki-4 moAk (0,1 ng, 1 pg) reichten nicht mehr aus, um die Bindung der Ki-4-scFv-Phagen zu inhibieren. Auf diesen Blots zeigte wie erwartet etwa die Hälfte der Klone eine positive Färbung. Es handelt sich also auch hier um eine „Alles oder Nichts“ Reaktion, da die Bindung der scFv-Phagen durch unterschiedliche Konzentrationen des monoklonalen Antikörpers offensichtlich entweder vollständig oder gar nicht blockiert wird.

Durch die Konkurrenzexperimente konnte bestätigt werden, daß die Ki-4-scFv-Phagen und der zugehörige monoklonale Antikörper dasselbe Antigen erkennen und die Bindung der Ki-4-scFv-Phagen an Proteine der λ -Phagen-Plaques spezifisch ist.