

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit konnten zwei Antikörper gewonnen und die sie induzierenden Antigene identifiziert werden. MAK 05.1.14 erkennt CEA, MAK 03.1.1 collagene Strukturen.

Die Identifizierung des Antigens, die Spezifität des Antikörpers sowie die Bedeutung des Antigens als Tumormarker werden im folgenden diskutiert.

### 4.1 03.1.1

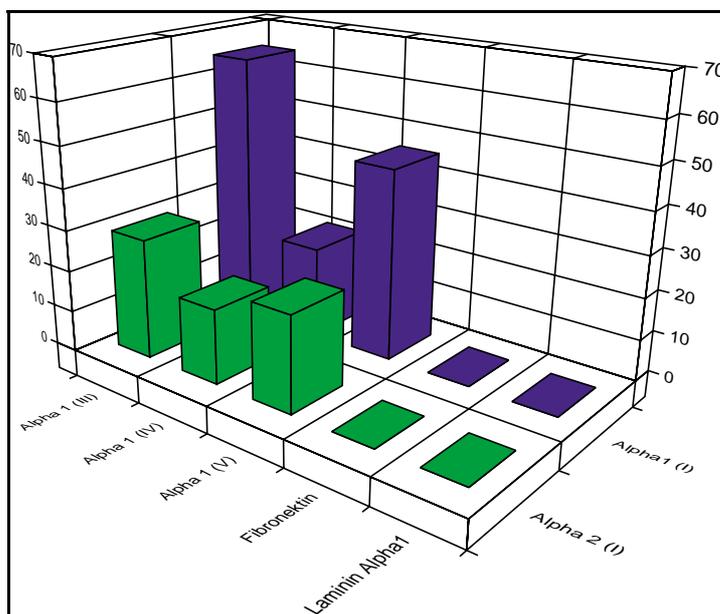
#### 4.1.1 Identifizierung des Antigens

Bei der Identifizierung des Antigens von MAK 03.1.1 gestaltete sich der Anreicherungsprozess schwierig. Durch Immunpräzipitation konnte keine ausreichende Menge antigenen Proteins angereichert werden, um eine Sequenzierung folgen zu lassen. Auch die Immunaффinitätschromatographie brachte kein besseres Ergebnis. Dies stellte die Löslichkeit des Proteins sowie die Affinität zwischen Antikörper und Antigen in Frage. Erst die mehrfache Fraktionierung des Proteinsolubilisats über Chromatographie-Säulen (MonoQ/MonoS), die auf ein kationisches Protein hinwies, die enzymatische Spaltung in Peptide, die Auftrennung mittels RP-HPLC und die massenspektrometrische Vermessung der Peptidfragmente führte zum Erfolg, so dass dann einige Fragmente der N-terminalen Sequenzierung zugeführt werden konnten. Mehrere Fragmente konnten eindeutig der  $\alpha$ 1-Kette von Collagen I zugeordnet werden.

Um Gewissheit über die korrekte Zuordnung des identifizierten Proteins zum Antigen zu erhalten, wurde die Spezifität des MAK 03.1.1 in einem Immunblot mit kommerziellem Collagen I geprüft. Zusätzlich sollte die Reaktivität des Antikörpers mit strukturverwandten Proteinen der extrazellulären Matrix getestet werden. Bei niedrigen Proteinmengen erkannte der Antikörper ausschließlich die Collagene I und III. Nur bei hohen Proteinmengen zeigte sich neben einer starken Reaktion mit den Collagenen I und III auch eine Kreuzreaktivität mit Collagen IV und V sowie Fibronectin.

Ein Sequenzvergleich der Hauptketten der einzelnen interzellulären Proteine gibt Aufschluss über homologe Bereiche und unterstreicht die Wahrscheinlichkeit der Kreuzreaktivität zwischen Collagen I und III.

Abbildung 29 zeigt auf der z-Achse die Anzahl der identischen Sequenzbereiche bei einer hypothetischen Epitopgröße von 8 Aminosäuren. Die Längen der meisten antigenen Determinanten bewegen sich in diesem Größenbereich.



**Abbildung 29**  
Anzahl der Sequenzhomologien bei einer hypothetischen Epitopgröße von 8 Aminosäuren.

Dem Diagramm ist zu entnehmen, dass besonders zwischen der alpha1-Kette von Collagen I und der alpha1-Kette von Collagen III ausgeprägte Homologien bestehen. Dies bietet eine Erklärungsmöglichkeit für die gute Reaktion des Antikörpers mit beiden Collagen-Typen. Eine starke Reaktion auf Collagen V ließ sich hingegen nicht nachweisen, obgleich auch hier Sequenzhomologien bestehen. Fibronectin und Laminin weisen bei einer Epitopgröße von 8 Aminosäuren keine Homologien zu Collagen I auf.

Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass der MAK 03.1.1 ein gemeinsames Epitop auf den Collagenen I und III erkennt.

### 4.1.2 Spezifität

Die Spezifität des ausgewählten Antikörpers 03.1.1 für Tumorgewebe, und innerhalb einer Probe hinsichtlich eines oder mehrerer Proteine, wurde zur Bestätigung der Selektion mit drei komplementären Verfahren überprüft.

In einem differenzierteren ELISA, bei dem die Antigenkonzentration optimiert war, wurde zunächst der Antikörper erneut auf seine Affinität zu Rohmembranpräparationen getestet. Der Titer lag dabei um ein fünffaches höher als bei Normalgewebe, wodurch die Vorbefunde der Selektionsphase bestätigt wurden. Diese Methode testet eine grobe Zellpräparation und lässt somit zu, dass der Antikörper möglicherweise gleiche Epitope auf mehreren Antigen-Formen erkennt.

Der Western-Blot macht dem Antikörper solubilisierte Membranproteine zugänglich, trennt sie nach Größe und lässt eine Differenzierung nach ihrem Molekulargewicht zu. Es stellten sich zwei scharfe Banden dar, wobei die Hauptbande bei  $M_r$  143k gemessen wurde.

Zur Darstellung der Verteilung des Antigens in nativem Gewebe ist die immunhistologische Färbung am besten geeignet. Hier zeigte sich eine ausschließliche Anfärbung im Bereich der extrazellulären Matrix. Ein signifikanter Unterschied zu Normalgewebe ließ sich allerdings nicht ermitteln.

Da die Immunisierungsfraction aus einem Pool von Resektaten verschiedener Patienten stammte, konnte man nicht ausschließen, dass es sich bei den erkannten Antigenen um Proteine handelt, die in nur einem ganz bestimmten Biopsat eines einzigen Patienten vorkommen. Dieses Risiko wurde dadurch gemindert, dass im Laufe der Arbeit noch zwei weitere Carcinomgewebepools völlig anderer Patienten aufgearbeitet und getestet wurden, bei denen sich die Proteine ausnahmslos nachweisen ließen. Ausserdem kann ein übergreifendes Vorkommen durch Verwendung permanenter Tumor-Zelllinien überprüft werden. Die Untersuchung solcher Zellen erlaubt ferner Aussagen über die Lokalisation des Antigens.

Es wurden Membranproteine der permanenten menschlichen Tumor-Zelllinien SW620, HT29 und LS180 im Immunblot untersucht. SW620 stammt aus einer

Lymphknotenmetastase eines Colocarzinoms, HAT29 aus einem mittelgradig differenzierten Adenocarcinom des Colons, und LS180 enthält Zellen eines Colonadenocarcinoms vom Dukes Typ B. Das Antigen wurde in keiner Zellpräparation gefunden. Das deutet darauf hin, dass das Antigen entweder im extrazellulären Tumorgewebe angereichert wird oder aus der extrazellulären Matrix stammt.

#### 4.1.3 Collagen Typ I und III in Tumoren

Collagen I und III sind wichtige Strukturbestandteile der extrazellulären Matrix. Die Proteinketten des Primärtranskripts (Prä-Procollagen) zeichnen sich durch eine regelmäßige Wiederholung der Aminosäuren Glycin-X-Y aus. Es folgt eine Zusammenlagerung der verschiedenen Ketten zu Tripelhelices und eine umfangreiche intrazelluläre Prozessierung, bei der die Eisen- und Vitamin C-abhängige Hydroxylierung von Prolin und Lysin, die N-Glykosylierung sowie die Disulfidbrückenbildung von Cysteinen eine wichtige Rolle spielen. Nach der Sekretion als Procollagen erfolgt extrazellulär eine limitierte Proteolyse und, nach erneut Vitamin C- und Eisen-abhängiger Oxidierung durch die Lysyloxidase, die Quervernetzung der Tripelhelices zum später unlöslichen Collagen (Stryer).

Helices des Typ I-Collagen bestehen aus zwei  $\alpha 1$ - und zwei  $\alpha 2$ -Ketten, sind ca. 300nm lang und haben zusammen ein relatives Molekulargewicht von  $M_r$  300k (Kreis).

Collagen I und III spielen als wichtigster Bestandteil der extrazellulären Matrix eine bedeutende Rolle in der Tumorbiologie. So können aus biochemischen Veränderungen der einzelnen Ketten, der Vernetzung der Fibrillen sowie dem unterschiedlichen Färbe- und Verteilungsmuster in Gewebeschnitten Schlüsse über Tumororganisation und Malignität gezogen werden.

Collagen I und III zeigen immunhistochemisch in normalem wie malignem Colongewebe eine identische Verteilung. Sie zeigen im Vergleich zu Normalgewebe eine besonders ausgeprägte Färbung im Carcinomstroma, vor allem im Zentrum des Tumors. Auffällig ist, dass die Anfärbung von Collagen I und III unterhalb der die Drüsen umgebenden Basalmembran dieselben Lücken aufweist, die auch von Collagen IV bekannt sind, das die Basalmembran

bildet. Ferner sind Collagen I und III an der invasiven Seite des Tumors vermindert anfärbbar (Hilska et al., 1998), ein Hinweis auf einen Abbau durch Enzyme und dadurch ein Indiz für die Malignität des Prozesses (Forster, 1986).

Kauppila et al. (1998) finden eine verstärkte mRNA-Synthese in Fibroblasten als Ausdruck einer vermehrten Expression von Collagen I und III beim infiltrativen duktalem Mammacarcinom im Vergleich zu Normalgewebe mit geringem Collagenumsatz. Die Verteilung entspricht den Befunden von Hilska et al.

Eine stärkere Invasivität von Tumoren scheint jedoch nicht nur auf Enzymen zu beruhen, die die extrazelluläre Matrix und besonders die Basalmembran angreifen. Pucci-Minafra et al. (1998) diskutieren eine bedeutende Rolle der Disorganisation durch veränderte Collagen-Moleküle sowie eine Fehlregulation der Collagensynthese an der Grenze vom Tumor zum Normalgewebe, da sie in colorectalem Carcinomgewebe sowohl als mRNA-Transkript als auch als Protein keine bzw. nur irreguläre  $\alpha 2$ -Ketten von Collagen I nachweisen konnten.

#### **4.1.4 Bedeutung als Tumormarker**

Der Literatur ist also zu entnehmen, dass das Collagen sich zwar bezüglich seiner Expression und seines Verteilungsmusters in Tumoren gegenüber normalem Gewebe unterscheidet, jedoch keine Spezifität für bestimmte Tumorarten bekannt ist, wie dies von einem Tumormarker gefordert wäre. Die Möglichkeit, dass für bestimmte Tumoren spezifisch veränderte Epitope innerhalb einer Collagenkette existieren, besteht dennoch. Es könnte Ziel einer weiteren Arbeit sein, diesen Nachweis zu erbringen.

Die Spezifität aus den ersten Selektionsschritten (ELISA und Western-Blot) könnte dadurch bedingt sein, dass es aufgrund der stärkeren Heterogenität von Tumorgewebe gegenüber gesundem Colongewebe trotz aller Vorreinigungsmethoden unvermeidbar ist, dass auch größere Mengen an Fremdgewebe, wie Bindegewebe, Fettzellen und gesunde Gewebsanteile, in die Präparation gelangen. Die Mukosa lässt sich von der fibrösen Struktur des Carcinomgewebes nur schlecht isolieren. Dies täuscht unter Umständen im Selektionsprozess eine Spezifität des entsprechenden Antikörpers für Carcinomgewebe vor,

obwohl der Unterschied möglicherweise nur in einer artifiziellen Mehranreicherung von interstitiellem Bindegewebe in der Immunisierungspräparation besteht.

Die Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der Tumorbehandlung sind für diesen MAK nicht zu erkennen, jedoch könnte er für Charakterisierungen der extrazellulären Matrix von Nutzen sein.

## **4.2 05.1.14**

### **4.2.1 Identifizierung des Antigens**

Um das Antigen für eine Identifizierung anzureichern, wurden verschiedene Solubilisationspuffer getestet, von denen sich der RIPA-Puffer als am wirksamsten erwies.

Für eine zweifelsfreie Zuordnung von Antikörper und entsprechendem Antigen ist eine Immunpräzipitation die sicherste Methode, da hierbei deren natürliche Bindungskräfte zur Anreicherung ausgenutzt werden. Dies gelang bereits in der einfachen Immunpräzipitation und konnte, um eine größere Ausbeute an Antigen zu erhalten, mittels Immunaффinitätschromatographie mit kovalent gekoppeltem MAK 05.1.14 fortgeführt werden. Die nach präparativem Elektrobplot ausgeschnittene Proteinbande enthält hierbei eindeutig das vom Antikörper erkannte Epitop.

Die obere, stärkere der beiden Banden wurde sequenziert, die Aminosäuresequenz ergab in einer Länge von 12 Aminosäuren nach Datenbankvergleich exakt den N-Terminus von Carcinoembryonalem Antigen (CEA) bzw. Nonspecific-Crossreacting-Antigen (NCA). Aufgrund des Molekulargewichts der ausgeschnittenen Bande kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dieser oberen Bande um CEA handelt, das in glycosylierter Form ein  $M_r$  von etwa 180k besitzt.

Um Aufschluss darüber zu gewinnen, um welches Protein es sich bei der zweiten, tieferen Bande handelt, sowie um mögliche Kreuzreaktivitäten des MAK 05.1.14 mit anderen Mitgliedern der CEA-Familie zu bestimmen, wurde eine gekreuzte Präzipitation durchgeführt, bei der im einen Ansatz Carcinomgewebesolubilisat, das mit einem käuflichen anti-CEA-Antikörper präzipitiert wurde, mit MAK 05.1.14 detektiert wurde, zum anderen

Carcinomgewebesolubilisat, das an MAK 05.1.14 präzipitiert wurde, mit dem kommerziellen Antikörper detektiert wurde. Das Ergebnis zeigte zum einen, dass CEA eindeutig als Antigen nachgewiesen werden konnte, zum anderen, dass von MAK 05.1.14 im Gegensatz zu dem käuflichen Antikörper zusätzlich größere Mengen eines Proteins angereichert werden, dessen rel. Molekulargewicht mit ca.  $M_r$  95k der schon bekannten unteren Bande im Western-Blot entspricht. Dies zeigt zum einen, dass der kommerzielle Antikörper nicht hochspezifisch für CEA ist, und zum anderen, dass sich offensichtlich größere Mengen eines kreuzreagierenden Proteins mit MAK 05.1.14 anreichern lassen. Es liegt nahe, aufgrund der ausgeprägten Sequenzhomologien anzunehmen, dass es sich hierbei um NCA handelt.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob es sich bei dem erkannten Epitop um ein Polypeptid oder ein N-Glykan handelt. Der erfolgreiche Verdau mit PNGaseF zeigte sich nach SDS-PAGE in der Silberfärbung mit dem Verschwinden der für Glykoproteine charakteristischen bräunlichen Verfärbung sowie in der Reduktion des verschmierten Bereichs auf zwei scharfe Banden. Diese Banden wurden auch im anschließenden Immunblot detektiert, so dass es sich hier eindeutig um ein Proteinepitop handelt.

Die Tatsache, dass die beiden Banden mit einem  $M_r$  zwischen 75k und 80k zunächst einen Widerspruch zu der errechneten Molekülgröße von 73kD darstellen, erklären Garcia et al. (1991) dadurch, dass einige der 28 potentiellen Glykosylierungsstellen im Molekül dem Enzym nicht zugänglich sind.

Nach Verdau mit Neuraminidase änderte sich am scheinbaren Molekulargewicht von CEA in der Silberfärbung wenig. Der Immunblot mit MAK 05.1.14 zeigte jedoch bei äquimolaren Antigenmengen eine deutlich stärkere Detektion des desialylierten Proteins. Da die Antikörper nach Immunisierung der Maus mit desialyliertem Carcinomgewebe gewonnen wurden, überrascht dieses Ergebnis nicht und unterstützt die Hypothese, dass Neuraminsäuren eine Rolle in der Maskierung von Tumorepitopen spielen.

### 4.2.2 Spezifität

In einem differenzierteren ELISA, wie bei MAK 03.1.1, wurde bei optimierter Antigenkonzentration für Carcinomgewebe ein fast 200fach höherer Titer als für Normalgewebe gemessen. Dies spricht für eine gute Spezifität des Antikörpers für die Carcinomgewebepräparation.

Im Western-Blot stellten sich mit hoher Signalstärke zwei inhomogene Bandenbereiche im Bereich zwischen  $M_r$  150k und 200k sowie zwischen  $M_r$  50k und 90k dar. Dies war ein Hinweis, dass es sich bei dem Antigen bzw. den Antigenen um Glykoproteine handelt, da sich diese aufgrund ihres sehr heterogenen Glykosylierungsmusters im Western-Blot verschmiert darstellen. Nach Verdau mit PNGaseF reduzierte sich dieses Muster auf zwei scharfe Banden bei  $M_r$  75k und 80k.

Um schließlich auch im Nativgewebe eine Carcinomspezifität des Antikörpers nachzuweisen, wurden verschiedene Gewebeschnitte am Übergang von Carcinom- zu Normalgewebe mit dem MAK 05.1.14 immunhistochemisch gefärbt. Hierbei zeigte sich, dass in den Krypten des Normalgewebes lediglich der Schleimfilm an der apikalen Zellmembran angefärbt wird, während im Bereich des Carcinomgewebes die entarteten Tumorzellen ubiquitär eine starke Rotfärbung aufweisen.

Durch diese drei komplementären Verfahren konnte eine hohe Affinität des Antikörpers zu Carcinomgewebe nachgewiesen werden.

Wie auch bei MAK 03.1.1 ließen sich im Western-Blot keine Antigenbanden in einer Präparation aus Tumorzelllinien nachweisen.

In den Kulturüberständen der CEA-produzierenden Zelllinie LS180 konnte CEA mit MAK 05.1.14 nicht nachgewiesen werden. Es muss davon ausgegangen werden, dass diese spezielle, in der Arbeitsgruppe seit langem in Kultur gehaltene Zelllinie, ihre CEA-Produktion reduziert hat, bzw. die Nachweisgrenze des ELISA für extrem niedrige Konzentrationen zu hoch liegt.

### 4.2.3 CEA in Tumoren

Zahlreiche Arbeiten haben zur Strukturaufklärung von CEA beigetragen. Es handelt sich um ein apikales Membranprotein, welches auf Colonzellen exprimiert wird (Ahnen et al. 1982) und über eine Glykosylphosphatidylinositolbindung in der Membran verankert ist (Hefta et al., 1988). Die Primärstruktur zeigt, dass es sich um ein Mitglied der Immunglobulin-superfamilie handelt, sie weist sieben stark konservierte Schleifendomänen auf (Paxton et al., 1987). CEA ist stark glykosyliert; über 50% des Molekulargewichts wird durch N-glykosidisch gebundene Oligosaccharide bestimmt, die an 28 potenziellen Glycosylierungsstellen aufzufinden sind. O-Glykosylierungen fehlen oder sind unbedeutend (Paxton et al., 1987). Das scheinbare Molekulargewicht von CEA beträgt etwa  $M_r$  180k. Garcia et al (1991) fanden Unterschiede im Molekulargewicht je nach Malignitätsgrad des zugrundeliegenden Tumors, welche durch eine unterschiedliche Glykosylierung bedingt sind. Die Primärstruktur des Core-Proteins wurde durch Klonierung der komplementären DNA, welche sowohl aus Coloncarcinomgewebe als auch aus den Zelllinien LS180 und LS174T gewonnen wurde, bestimmt. Es handelt sich um ein Polypeptid mit 702 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 72.300D (Beauchemin et al., 1987).

Es wurden weiterhin einige dem CEA sehr ähnliche Proteine charakterisiert. Einige von ihnen, wie die Nonspecific-Crossreacting-Antigens, sind im normalen Colongewebe nicht nachweisbar und werden offenbar erst während der Carcinogenese exprimiert (Burtin, 1978). Zwei unterschiedliche Varianten des NCA sind bekannt, das eine mit einem  $M_r$  von 55k (Mach, 1972), bekannt als NCA-55, das andere mit einem  $M_r$  von 95k (Buchegger et al., 1984), bekannt als NCA-95. Heute wird nochmals in NCA-90 und NCA-95 unterschieden. Die Gruppe der dem CEA ähnlichen Proteine, welche untereinander eine große Strukturverwandschaft aufweisen, lassen sich in die humane CEA-Familie einteilen.

#### **4.2.4 Bedeutung als Tumormarker**

Die Bedeutung von CEA als Tumormarker für das colorectale Carcinom ist, wie näher in der Einleitung dieser Arbeit erläutert, unumstritten. Die Befunde in dieser Arbeit unterstreichen dies. Der vergebliche Versuch, CEA in humanen Seren bzw. Zellkulturüberständen nachzuweisen, zeigt, dass die Entwicklung eines Testsystems für MAK 05.1.14 und der Vergleich mit etablierten Systemen den Rahmen dieser Arbeit übersteigen würde, zumal herkömmliche Systeme im allgemeinen im Sandwichverfahren mit der Hilfe von Fangantikörpern arbeiten, um auch geringste Serummengen an CEA zu detektieren.

Es ist jedoch fraglich, ob der Antikörper in der Diagnostik und Therapie eine Verbesserung darstellen könnte, da noch andere Mitglieder der CEA-Familie kreuzreagieren. Voraussetzung wäre ein umfassender Vergleich mit bereits bekannten monoklonalen Antikörpern hinsichtlich verschiedener Anwendungsgebiete.

### **4.3 Selektion tumorspezifischer Antikörper**

Bei der Herstellung von Antikörpern spielt, besonders bei Immunisierungen mit einer großen Anzahl an Antigenen, die Wahl des geeigneten Screeningverfahrens zur Isolierung spezifischer Klone eine entscheidende Rolle.

Um aus der großen Anzahl an Kulturüberständen diejenigen zu isolieren, die zum einen eine hohe Affinität zu Tumormembranproteinen, zum anderen nur eine geringe Affinität zu Normalgewebsproteinen aufweisen, musste ein möglichst einfaches und wenig störanfälliges Verfahren zur Selektion verwendet werden.

Häufig werden die gewonnenen Kulturüberstände ausschließlich cytologisch bzw. histologisch gescreent (Park et al., 1991; Oliver et al., 1992; Wewetzer et al., 1996). Ein Nachteil dieses Verfahrens ist jedoch, dass die Natur des Antigens zunächst verborgen bleibt, und das Antigen oft nicht identifizierbar ist.

In dieser Arbeit wurde deshalb der Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA), ein gut reproduzierbares Verfahren, im ersten Selektionsschritt verwendet. Das ELISA-Verfahren

eignet sich für Proteine und Proteingemische, da durch die gute Adsorption von Proteinen an das Polystyrol der Mikrotiterplatten eine relativ große Menge an Antigen angeboten werden kann.

#### **4.4 Fazit und Ausblick**

Im Rahmen dieser Arbeit konnten nach verschiedenen Selektionsschritten aus einem Pool von Zellklonen zwei Antikörper etabliert und ihre antigenen Zielstrukturen identifiziert werden.

Das von MAK 05.1.14 erkannte Protein unterstreicht die bedeutende Stellung von CEA als Tumormarker des colorectalen Carcinoms und validiert sowohl den Selektionsprozess als auch die Methodik dieser Arbeit.

Die Entdeckung eines extrazellulären Matrixproteins durch MAK 03.1.1, die möglicherweise ein Artefakt darstellt, zeigt Schwierigkeiten und Grenzen der hier verwandten Methoden auf.

Der Weg, der hier zur Identifizierung des Antigens führte, ist insgesamt aufwendig und zeitintensiv. Die frühe Festlegung auf eines oder wenige zu untersuchende Antigene, deren Identität bis zur sicheren Sequenzbestimmung unklar bleibt, beinhaltet die Gefahr, ein für die Tumorbiologie eventuell uninteressantes Antigen aufzuspüren.

Ein tumorbiologisch bedeutsamer Befund wäre erst durch eine große Anzahl von Fusionen sicherzustellen. Der zeitliche und personelle Aufwand für ein derartiges Screening ist nur mit automatisierter Arbeit zu leisten.