

3 Ergebnisse

3.1 Ausgangssituation

Zwei Mäuse wurden über 3 Monate im Abstand von 2 Wochen mit jeweils 200µg der aus Coloncarcinomgewebe gewonnenen Asialoproteine (siehe Methoden Kap. 2.2.4.1) intraperitoneal immunisiert.

Die Plasmazellen der Mäuse wurden asserviert und nach der Methode von Köhler und Milstein mit Myelomzellen fusioniert.

Ausgangspunkt dieser Arbeit waren 756 Primärkulturen, die im ELISA zunächst auf ihre Antikörperproduktion und dann auf ihre Spezifität bezüglich Coloncarcinomgewebe getestet wurden. Diese sind noch nicht zwangsläufig monoklonal.

So konnten in dieser Phase 14 Kulturen (1,85% der Ausgangsmenge) ausselektiert werden, die zunächst nach der Limited-Dilution-Methode (Coller und Coller) kloniert wurden, um Monoklonalität zu gewährleisten.

Um Klone mit einer langen Lebensdauer und großen Stabilität zu bevorzugen, wurden die Klone mittels der Limited-Dilution-Methode subkloniert und unter mikroskopischer Kontrolle herangezüchtet. Die Hybridome kolonisierten nach ungefähr 3 Tagen und verdoppelten sich von diesem Zeitpunkt an täglich.

Die Subklone wurden dann gemäss der Affinität ihrer Antikörper im ELISA zu Membranpräparationen des colorektalen Carcinoms selektiert.

Die Nomenklatur der Subklone bezieht sich zum einen auf die Nummer des Primärklons (01-14), die Anzahl der Subklonierungen (1 oder 2) sowie zum Schluss die Nummer des Subklons (Beispiel: 05.1.14).

3.2 Selektion von Klonen

3.2.1 Kriterien der Selektionierung

Zur weiteren Charakterisierung wurden Subklone ausgewählt, die bestimmte Bedingungen erfüllten. Zum einen sollten die Subklone näher untersucht werden, deren Antikörper eine besonders hohe Affinität zu Colonicarcinomgewebe aber nur eine geringe Affinität zu Normalgewebe aufweisen. Diese Eigenschaft sollte in einem Differential-ELISA auf das Solubilisat einer Rohmembranpräparation von Carcinom- bzw. Normalgewebe überprüft werden.

Um zu überprüfen, ob das Antigen im Western-Blot darstellbar ist, wurde das Colonicarcinommaterial im Immunblot mit den Zellkulturüberständen der Klone, welche im ELISA spezifisch reagiert hatten, getestet werden. So konnten das scheinbare Molekulargewicht sowie Anzahl und Schärfe der im Immunblot erkannten Banden bestimmt werden. Die ausgewählten Subklone sollten sich weiterhin in der Zellkultur stabil verhalten und eine möglichst große Antikörperproduktion aufweisen.

3.2.2 Auswahl zweier Subklone

Im Differential-ELISA zeigten die Subklone von 03, 04, 05 und 06 die beste Spezifität für Colonicarcinomgewebsproteine (siehe Abbildung 2) im Vergleich zu den anderen Primärklonen 01-14. Es zeigte sich die Bedeutung der Subklonierung, da bei den einzelnen Subklonen teilweise große Unterschiede bestehen. Während die Subklone aus 05 homogen erschienen, verhielten sich die Subklone aus 03 offensichtlich sehr unterschiedlich in ihrer Antikörperproduktion. So gab es Subklone, die ohne Antikörperproduktion waren, Subklone mit guter Spezifität und Subklone, die nur einen starken Hintergrund aber keine Spezifität aufwiesen.

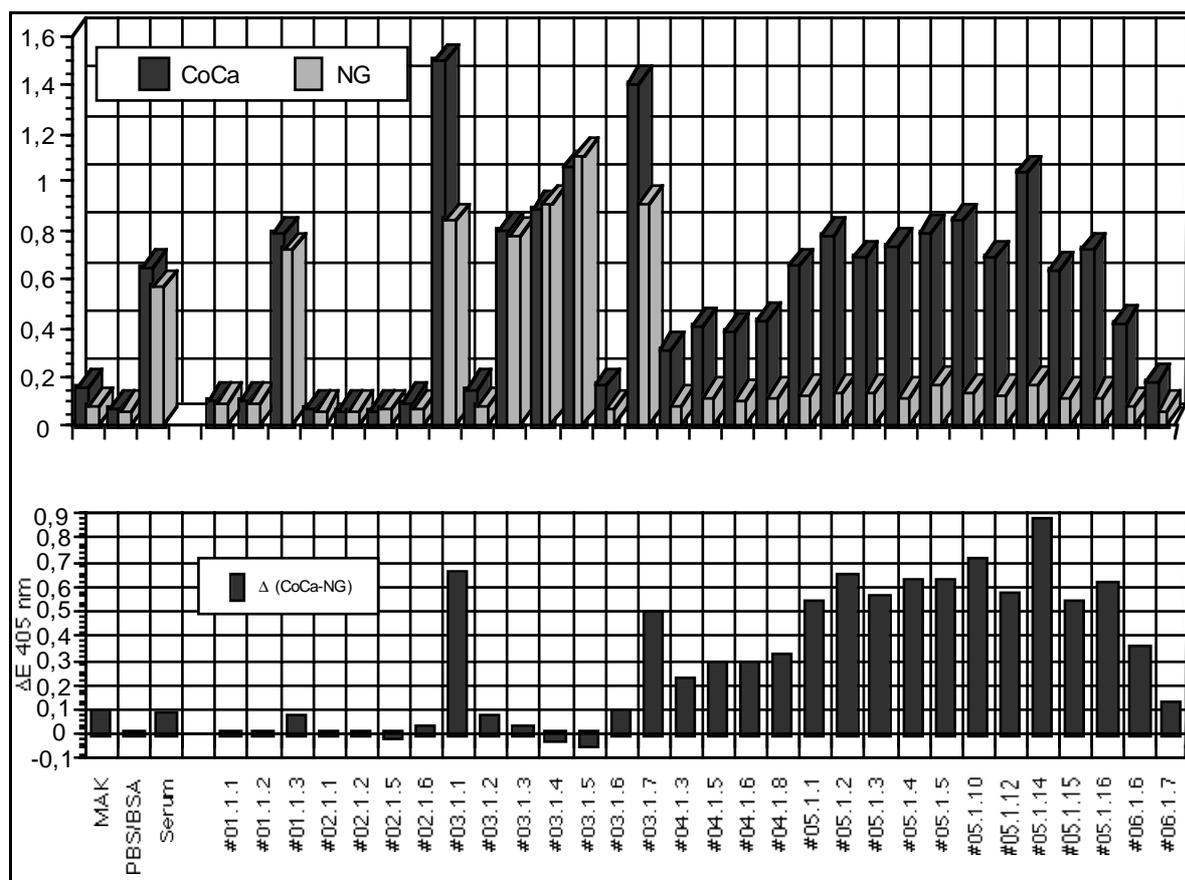


Abbildung 2

Differential-ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Membranbestandteile von colorectalem Carcinom und Normalgewebe.

Im unteren Diagramm ist der Extinktionsunterschied des Signals auf Carcinom- und Normalgewebe zu sehen. Als Negativkontrollen dienen das Antikörpermedium sowie PBS/1%BSA, als Positivkontrolle und Beschichtungskontrolle das Anti-Serum der Spendermaus.

Die Detektion erfolgte mit dem alk. Phosphatase-System (siehe Methoden Kap. 2.2.5.1.2).

Die Subklone, die im ELISA ein spezifisches Signal für Colocarzinomgewebe aufwiesen, wurden nun im Immunblot auf elektrophoretisch getrennten Carcinomproteinen getestet.

Durch paralleles Auftragen zweier Marker (siehe Methoden), die Proteine mit definierten Molekulargewichten enthielten, neben der Probe, konnte das relative Molekulargewicht bestimmt werden.

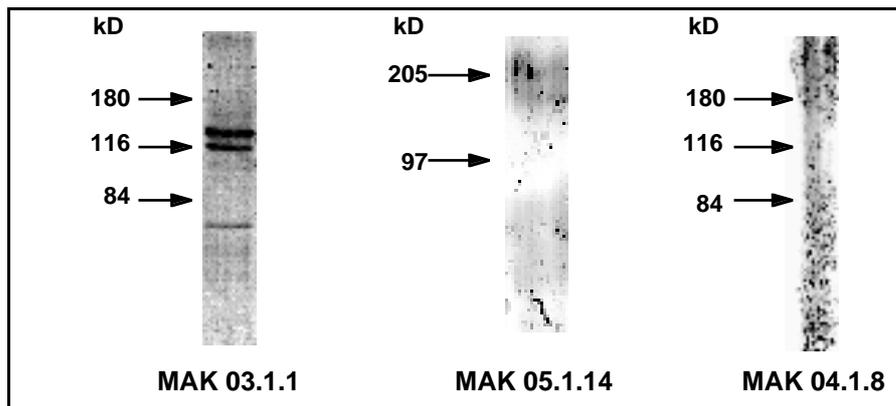


Abbildung 3

Western-Blot mit ausgewählten MAK zum Nachweis von Antigenen aus colorectalem Carcinomgewebe
 Nach SDS-PAGE einer Rohmembranpräparation von Colonicarcinomgewebe und anschließendem Western-Blot wurde die Blotmembran mit Zellkulturüberstand des entsprechenden Klones inkubiert. Die Detektion erfolgte mit dem alkalische Phosphatase-System (siehe Methoden Kap. 2.2.5.4).

MAK 03.1.1 erkennt zwei scharfe Banden bei 143kD und 120kD. MAK 05.1.14 erkennt eine inhomogene Bande im Bereich 150-200kD und ein verschmiertes Signal im Bereich zwischen 50kD und 90kD. MAK 04.1.8 reagiert nur unspezifisch.

05.1.14 (wie auch die nicht gezeigten Subklone 05.1.6 und 05.1.12) und 06.1.6 (sowie 06.1.7) zeigen eine inhomogene Bande im Molekularbereich 150-200kD und ein verschmiertes Signal im Bereich zwischen 50 und 90kd.

Die Subklone 03.1.1 (sowie 03.1.7) detektierten zwei Banden bei 143kD und 120kD.

Die Antikörper der Hybridomzellsubklone 04.1.1, 04.1.2, 04.1.3, 04.1.4, 04.1.5 und 04.1.8 ließen unter diesen Bedingungen keine Banden hervortreten.

Die Subklone 06.1.6 und 06.1.7 stellten in der Folgezeit ihre Antikörperproduktion ein (siehe Abbildung 4). Für weitere Untersuchungen wurden die Subklone 03.1.1 und 05.1.14 ausgewählt, die sich sowohl durch eine im ELISA nachgewiesene Spezifität als auch durch gutes Wachstums- und Produktionsverhalten in der Zellkultur auszeichneten.

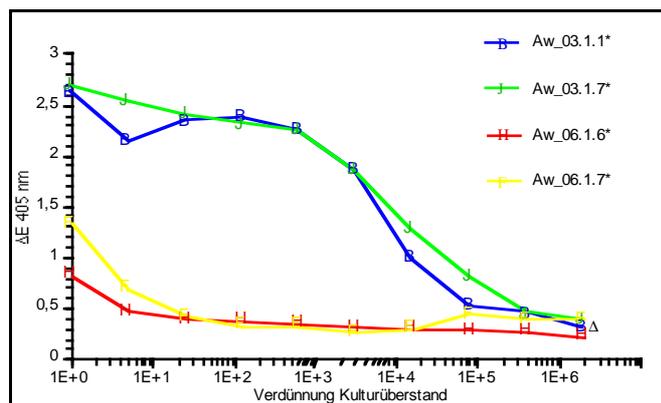


Abbildung 4

Antikörperkonzentrationsbestimmung im Zellkulturüberstand der Klone 03.1.1, 03.1.7, 06.1.6 und 06.1.7.

Zur Kontrolle der Antikörperproduktion wurde nach 3-tägigem Wachstum mit einer Standardkurve von Maus-IgG der Titer bestimmt. (siehe Methoden Kap. 2.2.5.3)

Die Klone 06.1.1 und 06.1.7 produzieren keine Antikörper mehr.

3.2.3 Eigenschaften der ausgewählten Subklone

3.2.3.1 Bestimmung des Immunglobulin-Subtyps

Die Bestimmung der Immunglobulin-Subklasse ist zur Adaptation einiger Methoden zur Reinigung und Charakterisierung von Antigenen und Antikörpern unerlässlich. So sind zum Beispiel die Bindungsverhältnisse zu Protein G-Sepharose bzw. Protein A-Sepharose und zum Sekundärantikörper je nach Subklasse unterschiedlich.

Für alle getesteten Klone ergab sich die Subklasse IgG₁ kappa, 03.1.7 produzierte zusätzlich Antikörper der Klasse IgG_{2a}.

Hybridomklon	Isotyp	Leichte Kette
03.1.1	IgG ₁	kappa
03.1.7	IgG ₁ / (IgG _{2a})	kappa
05.1.12	IgG ₁	kappa
05.1.14	IgG ₁	kappa

Tabelle 1: Immunglobulinisotypen der etablierten Monoklonalen Antikörper.

Die Bestimmung der Immunglobulin-Subklassen erfolgte durch einen Peroxidase gekoppelten Anti-Maus-Antikörper mit dem Mouse-Monoclonal-Antibody-Isotyping-Kit der Firma Amersham (siehe Methoden Kap. 33). 03.1.7 produzierte Antikörper der Klasse IgG₁ und IgG_{2a} und war somit nicht monoklonal. Nach Subklonierung konnte nur noch der IgG₁-Isotyp nachgewiesen werden.

Aufgrund der Produktion zweier verschiedener Antikörperklassen handelte es sich bei 03.1.7 nicht um eine monoklonale Zellkultur. Nach erneuter Subklonierung konnte nur noch der IgG₁-Isotyp nachgewiesen werden.

3.2.3.2 Subklonierung des MAK 05.1.14 und Vergleich der Affinitäten der Subklone zum Antigen

Um die Stabilität des Zellklones nachzuweisen und die Monoklonalität weiter zu sichern, wurden Subklone von 05.1.14 erstellt und in der Nomenklatur mit 05.2.X bezeichnet. Die Zellklone zeigten keine nennenswerten Unterschiede in Wachstumsverhalten und Antikörperproduktion im Vergleich zum Mutterklon. Das Antigenmuster im Westernblot war identisch. Die Stabilität der Zellklone wurde durch Einfrieren und Auftauen nicht beeinträchtigt.

3.3 Grundeigenschaften der Antigen-Antikörperreaktion von MAK 03.1.1 und MAK 05.1.14

3.3.1 Affinitätsmessung im Titrations-ELISA

Erneut wurden die Subklone im ELISA bezüglich ihrer Affinitäten überprüft. In einem ELISA, bei dem die Antikörperkonzentration schrittweise titriert wurde, wurde die konzentrationsabhängige Reaktion auf Colonicarcinom- und Normalgewebe überprüft. Dieser Versuch dient auch dazu, die optimale Verdünnung des Kulturüberstandes für Tests im ELISA herauszufinden, welche sich im linearen Bereich der Kurve befinden sollte.

Bei 03.1.1 fällt bei höheren Konzentrationen auch ein stärkeres Signal auf Normalgewebe auf.

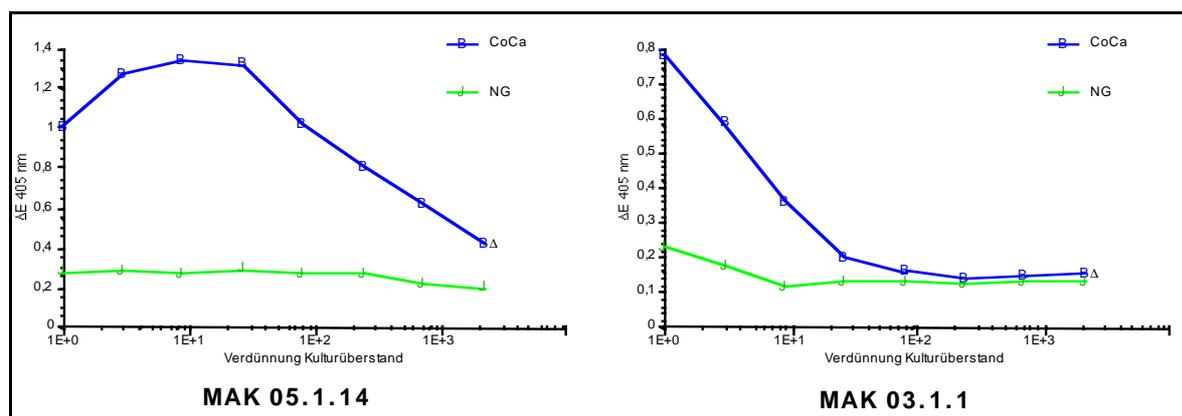


Abbildung 5

ELISA mit MAK 03.1.1, sowie MAK 05.1.14 gegen Coloncarcinom- und Normalgewebe (1µg)

Der Zellkulturüberstand wurde jeweils in verschiedenen Verdünnungsstufen aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit dem Peroxidase-System (siehe Methoden Kap. 2.2.5.1.1).

3.3.2 Solubilisationsversuche

Zur Charakterisierung und Identifizierung des Antigens müssen die schwer löslichen Membranproteine über ein Solubilisationsverfahren angereichert werden. Um herauszufinden, welche Detergenzien am ehesten geeignet sind, das Antigen aus dem Carcinomgewebe bzw. einer Membranpräparation herauszulösen, wurden unterschiedliche Solubilisationspuffer geprüft. Mit ihnen wurden Nativpräparate von Coloncarcinomgewebe sowie Normalgewebe und verschiedene Tumor-Zelllinien solubilisiert.

Die Tumoraufarbeitung erfolgte dabei nach sorgfältiger Präparation aus dem Resektat durch Zermörserung auf flüssigem Stickstoff und anschließender Evaporation.

Solubilisationspuffer	Proteinkonzentration	Blotqualität	Eigenschaften der Detergenzien
RIPA	+++	+++	SDS-Gehalt - nicht geeignet für HPLC.
8 M Harnstoff	++	++	Keine Proteinbestimmung möglich. Puffer instabil.
Puffer B	(+)	-	

Tabelle 2: Solubilisierungseigenschaften verschiedener Puffer

Die größte Proteinmenge erbrachte der RIPA-Puffer. Es stellte sich hierbei heraus, dass weder das Kochen bei 95°C noch die Zugabe eines Reduktionsmittels (DTT) die Solubilisierung beeinflussten. Dagegen ist trotz der guten Ergebnisse der RIPA-Puffer aufgrund seines SDS-Gehalts nicht für alle Reinigungsmethoden, etwa HPLC-Trennungen, geeignet. Wir verwendeten die RIPA-Solubilisierung für alle immunologischen Reinigungsverfahren. "Puffer B" war fast überhaupt nicht, Harnstoff dagegen gut geeignet, das Antigen zu extrahieren.

Für HPLC-Trennungen ist die Harnstoffsolubilisierung gut geeignet, während Proteinbestimmungen durch den Harnstoffgehalt nur semiquantitativ möglich sind. Es stellte sich heraus, dass die größten Mengen an Protein durch eine kurze Ultraschallstoßbehandlung auf Eis in einem 8M Harnstoffpuffer, der ein Reduktionsmittel enthält, gelöst werden konnten. Weiterhin sollte das Solubilisat ungekocht auf das SDS-PAGE-Gel aufgetragen werden.

3.3.3 Nachweis der Antigene auf Colon-Carcinom-Zelllinien

Neben Resektionsmaterial sollte auch versucht werden, das Antigen auf Tumor-Zelllinien nachzuweisen. Dies gewährleistet eine bessere Reproduzierbarkeit der Versuche und erleichtert durch die reduzierte Proteinanzahl eine Reinigung. Die Subklone 03.1.1 und 05.1.14 wurden daher im Immunblot auf Rohmembranpräparationen, wie auch auf Proteinsolubilisaten der Coloncarcinom-Zelllinien SW620, HT29 und LS180 getestet. Es zeigte sich jedoch bei keiner der Zelllinien eine Antigendetektion im ELISA oder Western-Blot, so dass die weiteren Versuche mit Nativmaterial durchgeführt wurden.

3.4 Anreicherung der Antigene von MAK 03.1.1 und 05.1.14 durch Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation ermöglicht es, die natürlicherweise bestehende Bindungsaffinität im Antigen/Antikörperkomplex auszunutzen, indem man das Antigen aus dem Gesamtsolubilisat extrahiert und anreichert.

3.4.1 Überprüfung der Affinität zwischen den Antikörpern und Protein A- bzw. Protein G-Sepharose

Protein G zeigt gegenüber Protein A ein unterschiedliches Verhalten bezüglich der Bindung an F_c-Teilen von Antikörpern, abhängig von der Spezies, von der die Antikörper stammen, und ihrem Isotyp.

Es war ausreichend, den Antikörper eines Hybridomzellklons für die Untersuchung auszuwählen, da es sich ja bei allen Klonen um Mausantikörper derselben Maus handelte.

Im Folgenden wurde die Konjugation mit MAK 03.1.1 durchgeführt.

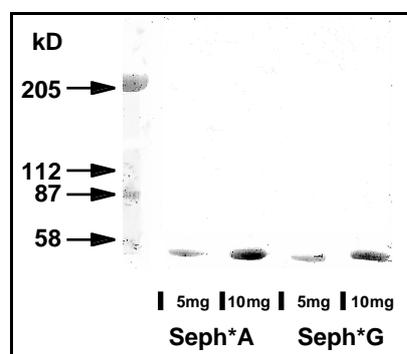


Abbildung 6

Blot des Konjugats aus ProteinG- bzw. ProteinA-Sepharose und Zellkulturüberstand von 03.1.1.

5mg und 10mg ProteinG- bzw. ProteinA-Sepharose wurden mit 1ml serumfreiem Kulturüberstand von Klon 03.1.1 in einer Menge von 200µg MAK/ml inkubiert und bei 4°C über Nacht geschüttelt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde das Präzipitat aus Sepharose, Protein G/A und MAK 03.1.1 pelletiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Methoden Kap. 2.2.6.1) und nach Elektroblothing mit Ponceau-Rot angefärbt (siehe Methoden Kap. 2.2.6.3. und 2.2.6.5.).

Der anschließende Elektroblo zeigt nach Ponceaufärbung die schweren Ketten des MAK als Bande bei 50kD. Sowohl Protein A als auch Protein G banden MAK 03.1.1 deutlich.

3.4.2 SDS-PAGE und Western-Blot der Präzipitate von MAK 03.1.1

Gemäß des in Kapitel 3.4.1 beschriebenen Bindungsverhaltens führten wir die folgenden Immunpräzipitationen mit Protein G-Sepharose durch. Die zuvor im Western-Blot detektierten Banden bei 143kd und 120kd zeigten sich deutlich im Restsolubilisat, konnten jedoch nur schlecht präzipitiert werden. Der Antikörper ist schwach nachweisbar.

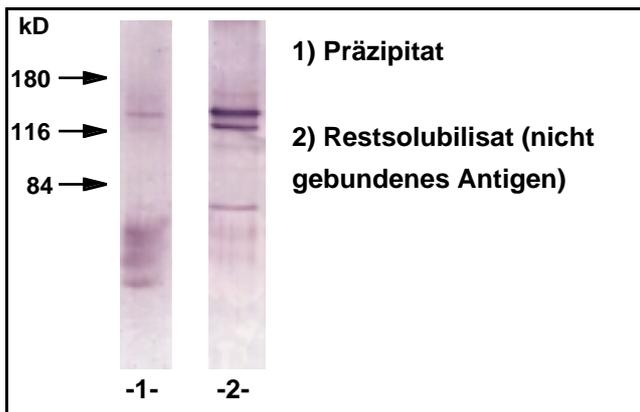


Abbildung 7

Western-Blot des Präzipitats von MAK 03.1.1, detektiert mit MAK 03.1.1

Die Protein G-Sepharose wurde mit Proteinsolubilisat inkubiert (Proteingehalt 9mg/ml) (siehe Methoden Kap. 2.2.5.5).

Das Präzipitat wurde pelletiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Methoden Kap. 2.2.6.1). Der anschließende Western-Blot (siehe Methoden Kap. 2.2.6.3) wurde mit MAK 03.1.1 inkubiert. Entwicklung mit alk. Phosphatase (siehe Methoden Kap. 2.2.5.4).

3.4.3 SDS-PAGE und Western-Blot des Präzipitats von MAK 05.1.14

Mit identischer Vorgehensweise wurde mit MAK 05.1.14 präzipitiert. Der schon zuvor gesehene heterogene Bandenbereich bestätigte sich in der hier nicht gezeigten Silberfärbung und im anschließenden Western-Blot.

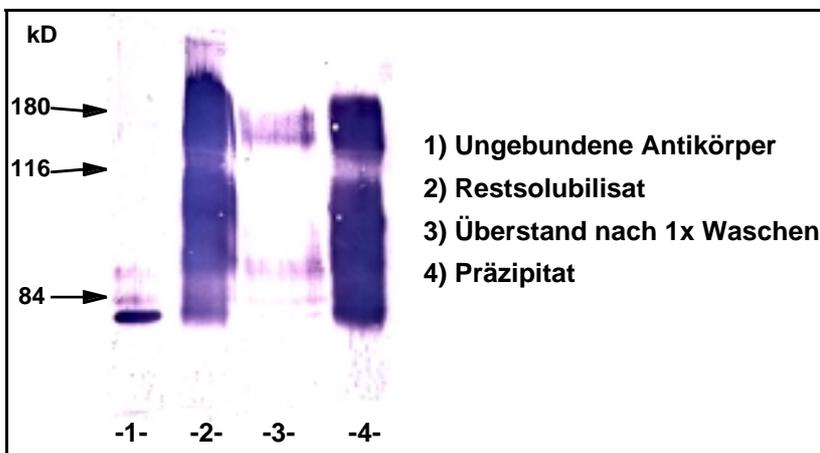


Abbildung 8

Western-Blot des Präzipitats von MAK 05.1.14, detektiert mit MAK 05.1.14

Die Protein G-Sepharose wurde mit Proteinsolubilisat inkubiert (Proteingehalt 9mg/ml) (siehe Methoden Kap. 2.2.5.5).

Das Präzipitat wurde pelletiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Methoden Kap. 2.2.6.1). Der anschließende Western-Blot (siehe Methoden Kap. 2.2.6.3) wurde mit MAK 05.1.14 inkubiert. Entwicklung mit alk. Phosphatase (siehe Methoden Kap. 2.2.5.4)

3.5 Anreicherung der Antigene von MAK 03.1.1 und 05.1.14 durch Immunaффinitätschromatographie

Weitere Anreicherungsversuche wurden notwendig, um eine ausreichende Menge an isoliertem Antigen für die N-terminale Sequenzanalyse zu erhalten. Dafür ist eine deutlich sichtbare Bande in der Coomassiefärbung, die etwa 1µg Protein entspricht, wünschenswert. Die Immunaффinitätschromatographie bietet den Vorteil der mehrmaligen Nutzung und damit der Möglichkeit, größere Mengen an Antigen aufzureinigen zu können.

3.5.1 IAC mit MAK 03.1.1 und MAK 05.1.14

Die Antikörper wurden nun kovalent an Protein G-Sepharose gebunden und mit einem Proteinsolubilisat inkubiert. Das Antigen wurde im pH-Schock eluiert (siehe Methoden Kap. 2.2.7.4).

3.5.2 SDS-PAGE und Western-Blot des Eluats von MAK 03.1.1

Im Silbergel zeigten sich nur schwache Antigenbanden, deren Proteine für eine Sequenzierung in zu geringer Konzentration vorlagen. Hierfür wäre eine Anfärbung mit Coomassie-Blue notwendig gewesen. Die Affinität zum Antikörper war jedoch nicht ausreichend, um größere Mengen mittels Immunchromatographie anzureichern. Im Immunblot zeigte sich, dass ein großer Teil des Antigens im Solubilisat verbleibt, bzw. durch die Waschschrirte verloren geht.

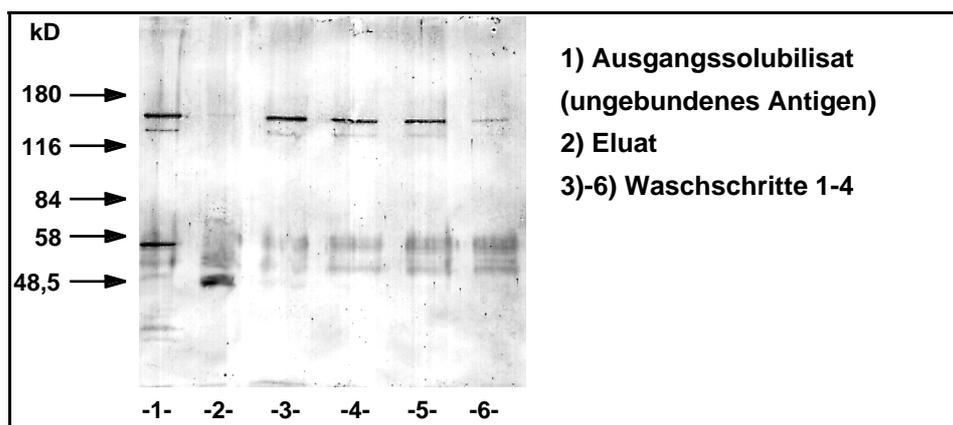


Abbildung 9

Immunblot nach IAC 03.1.1, Elutionsfraktion, ungebundenes Antigen und Waschschritte

Die Elutionsfraktionen mit IAC 03.1.1 (siehe Methoden Kap. 2.2.7.4) wurden eingengt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Methoden Kap. 2.2.6.1). Im Immunblot mit MAK 03.1.1 (siehe Methoden Kap. 2.2.5.4) zeigen sich die Banden des Antigens. Das Antigen läßt sich im Eluat nicht nachweisen, da es bereits in den Waschfraktionen verloren geht.

Der Versuch, das Antigen von MAK 03.1.1 durch Immunpräzipitation oder Immunitätschromatographie zu reinigen, wurde aufgegeben und der Weg einer proteinbiochemischen Anreicherung mittels HPLC besprochen (siehe Kapitel 3.8).

3.5.3 SDS-PAGE und Western-Blot des Eluats von MAK 05.1.14

Die Elutionsfraktionen aus IAC 05.1.14 zeigten im Silbergel das gleiche Bandenmuster wie die Voruntersuchungen. In einem anschließenden Immunblot bestätigte sich der Befund als Antigen von MAK 05.1.14.

Die Anreicherung des Antigens von MAK 05.1.14 war erfolgreich und gelang in ausreichenden Mengen, so dass mit dem Sammeln von Eluat aus der IAC an MAK 05.1.14 begonnen wurde.

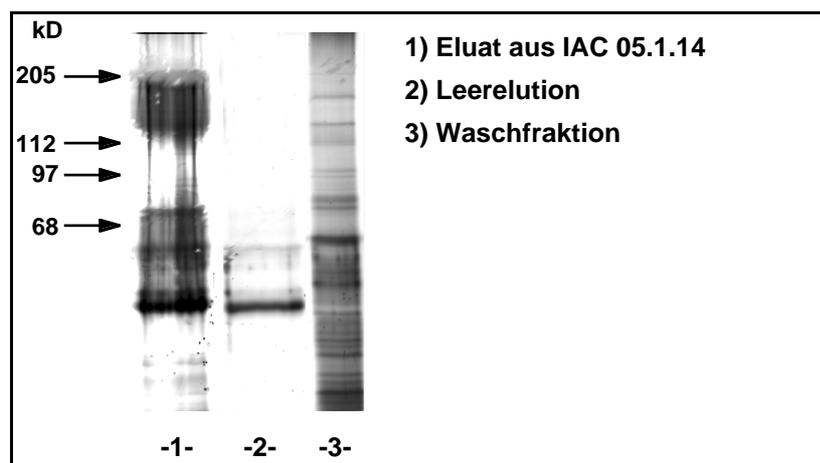


Abbildung 10

SDS-PAGE der Elution aus IAC 05.1.14 mit Silberfärbung

Die Elutionsfraktionen mit IAC 05.1.14 (siehe Methoden Kap. 2.2.7.4) wurden eingengt und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Methoden Kap. 2.2.6.1). In der Silberfärbung zeigt sich das antigene Bandenmuster. Negativkontrolle ist eine Leerelution ohne vorherige Inkubation mit Proteinsolubilisat. Das Antigen zeigt sich im Eluat deutlich angereichert.

3.6 Charakterisierung des Antigens von MAK 05.1.14

3.6.1 Präparativer PVDF-Blot des Eluats der Immunaффinitätschromatographie an MAK 05.1.14

Das Eluat aus 3 Chromatographie-Läufen wurde gesammelt und in der Vakuumzentrifuge eingengt. Nach elektrophoretischer Auftrennung und anschließendem Blotting auf eine PVDF-Membran wurde diese mit Ponceau-Rot gefärbt. Es zeigten sich deutlich angefärbt die erwarteten inhomogenen Banden zwischen 150-200kD, sowie zwischen 50-90kD. Der genannte obere Molekulargewichtsbereich wurde ausgeschnitten und der Sequenzanalyse nach Edman zugeführt.

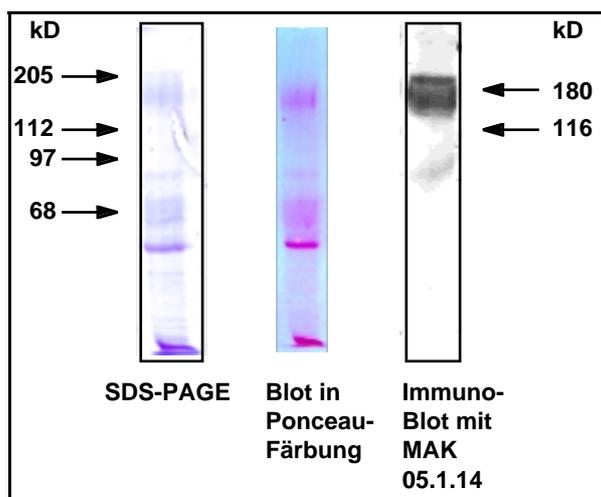


Abbildung 11
 Gesammelte Elutionsfraktionen aus IAC 05.1.14: SDS-PAGE in Coomassiefärbung, Western-Blot in Ponceaufärbung und Immunoblot mit MAK 05.1.14
 (siehe Methoden Kap. 2.2.6.2.1, 2.2.6.5 und 2.2.5.4)

3.6.2 N-Terminale Sequenzbestimmung nach EDMAN und Datenbankvergleich

Die Ansequenzierung des N-terminalen Endes der ausgeschnittenen Proteinbande ergab eine Sequenz von 12 Aminosäuren, von denen 5 nicht zugeordnet werden konnten. Nach Datenbankvergleich über den ExPasy-Server konnte die Sequenz mit hundertprozentiger Übereinstimmung dem N-Terminus des Carcinoembryonic-Antigen (CEA) zugeordnet werden, der bei Aminosäure Nr. 35 beginnt. Die ersten 34 Aminosäuren entsprechen dem Signalpeptid, welches nach der Translation abgespalten wird.

Aminosäuresequenz N-terminal von AG 05.1.14

X Leu Thr Ile Glu X X Pro Phe X X Ala

SwissProt P06731, CCEM_HUMAN (CEA)

Lys Leu Thr Ile Glu Ser Thr Pro Phr Asn Val Ala

3.6.3 Enzymverdau mit PNGase-F und Neuraminidase

Um die Beteiligung von Kohlenhydraten am Epitop zu überprüfen, wurde das Antigen mit Glykosidasen behandelt. PNGaseF (aus *Flavobacterium meningosepticum*) spaltet sämtliche N-Glykane vom Proteingerüst ab, Neuraminidasen (aus *Arthrobacter ureafaciens*) entfernen Sialinsäuren.

Zum einen reduziert eine Deglykosylierung die Heterogenität des Molekulargewichts, zum anderen lässt sich eine Aussage darüber treffen, ob es sich um ein Glykan- oder Proteinepitop handelt und ob Neuraminsäuren bei der Antikörperdetektion eine Rolle spielen.

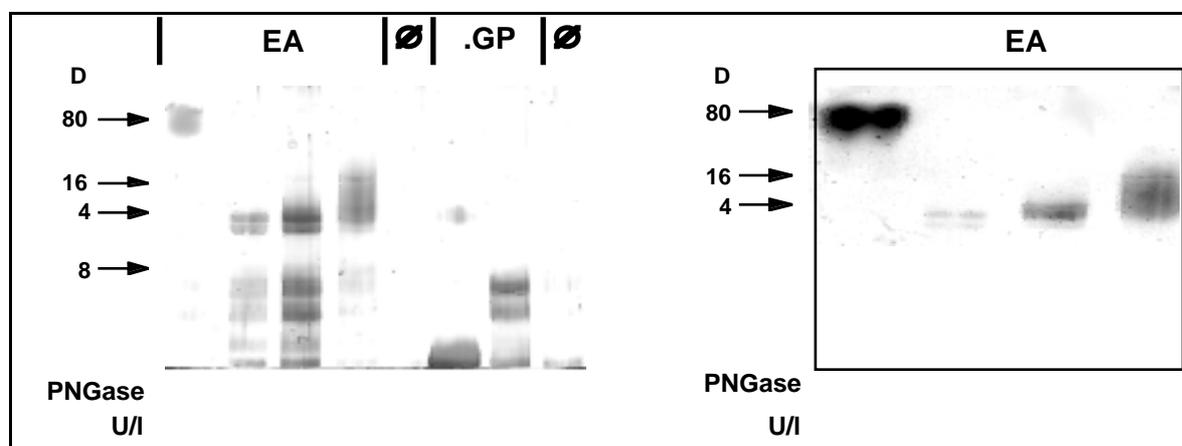


Abbildung 12

SDS-PAGE mit Silberfärbung und Immunblot mit MAK 05.1.14 des Enzymverdaus von CEA mit PNGase-F

2µl gereinigtes CEA (siehe Material Kap. 2.1.6) wurden mit verschiedenen Konzentrationen PNGase-F inkubiert (Methoden Kap. 2.2.8.2). Positivkontrolle war α 1-saures Glycoprotein. Negativkontrolle waren ein Ansatz ohne Enzym sowie ein Leerverdau. 80% der Probe wurden nach SDS-PAGE silbergefärbt (Methoden Kap. 2.2.6.1), 20% der Probe nach Elektrophorese und Western-Blot mit MAK 05.1.14 inkubiert und mit dem Luminolsystem detektiert (Methoden Kap. 2.2.5.4). In der Silberfärbung (links) zeigt sich durch Reduktion des relativen Molekulargewichts der erfolgreiche Verdau. Der Western-Blot zeigt, dass eine Detektion der verdauten Fraktionen mit MAK 05.1.14 noch möglich ist.

Mit zunehmender PNGaseF-Konzentration verschwindet der inhomogene Bandenbereich heterogen glycosylierter Proteine und reduziert sich auf zwei Banden unterhalb des 84kD-Markers. Auch diese werden von MAK 05.1.14 schwach erkannt. α 1-Saures Glykoprotein ist ein Protein mit schwer zugänglichen N-Glykanen und ist eine Positivkontrolle für den erfolgreichen Verdau.

Der zweite Ansatz wurde analog mit Neuraminidase durchgeführt.

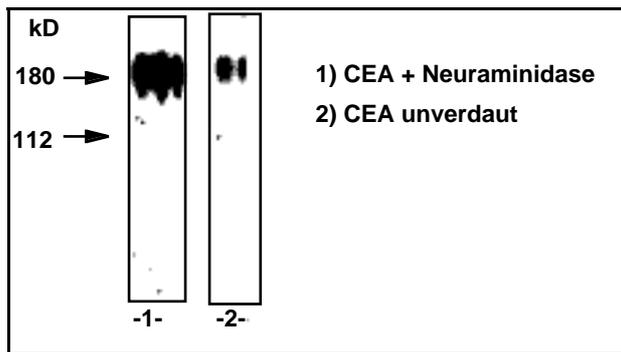


Abbildung 13

Immunblot mit MAK 05.1.14 nach SDS-PAGE des Enzymverdaus von CEA mit Neuraminidase

2µl gereinigtes CEA (siehe Material Kap. 2.1.6) wurde mit 1 U/l Neuraminidase aus *Arthrobacter ureafaciens* inkubiert (Methoden Kap. 2.2.8.1). Die Probe wurde elektrophoretisch getrennt, anschließend geblottet und mit MAK 05.1.14 im Luminolsystem detektiert (Methoden s.o.)

Das Signal von MAK 05.1.14 ist hier nach Verdau mit Neuraminidase deutlich stärker als ohne Enzymsatz bei gleichen Antigenmengen.

3.6.4 Immunhistochemische Färbung eines Schnittes aus einem Colonicarcinompräparat

Um das Antigen im Nativpräparat zu lokalisieren und Aussagen über seine Verteilung und Carcinomspezifität treffen zu können, wurden Gewebeschnitte aus dem Übergangsbereich zwischen Colonicarcinomgewebe und normalem Colongewebe mit MAK 05.1.14 inkubiert. Die Detektion erfolgte nach dem APAAP-System. Diese Arbeiten wurden am Institut für Pathologie der FU-Berlin durchgeführt.

Es zeigen sich mikroskopisch im Carcinombereich deutlich die ubiquitär angefärbten neoplastischen Colonicrypten. Im gesunden Gewebe wird lediglich der apikale Bereich der Zellen und der die Lumina auskleidende Schleim angefärbt.

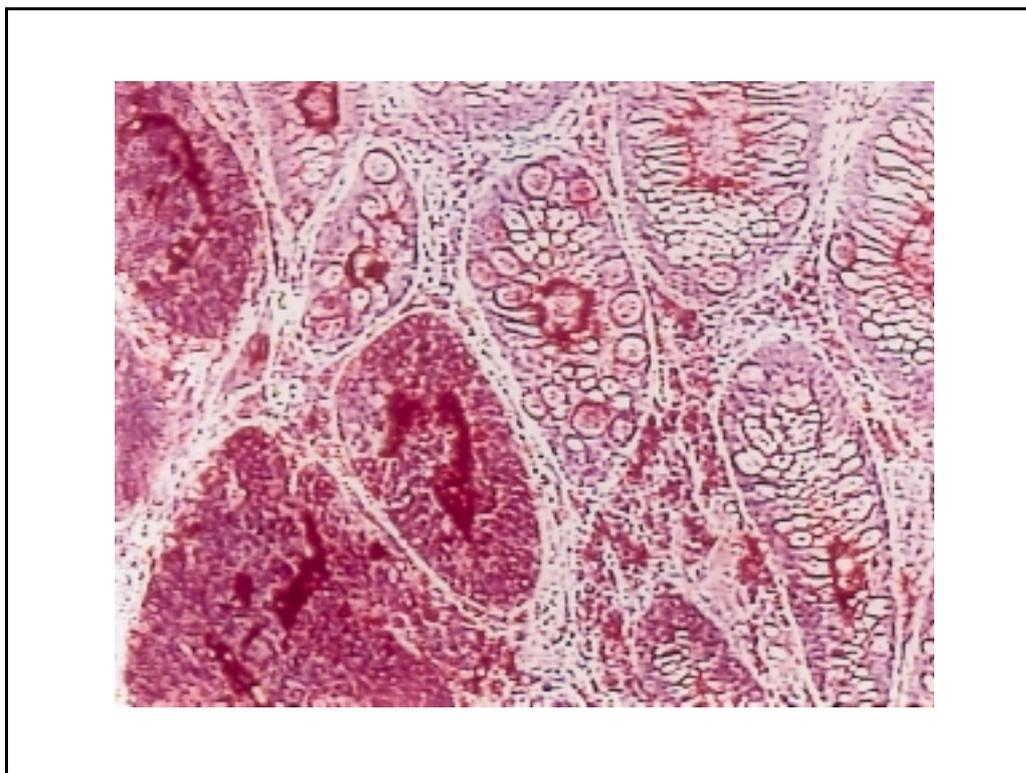


Abbildung 14

Immunohistochemische Färbung eines Paraffinschnittes mit MAK 05.1.14 am Übergang Colonicarcinom zu normalem Colongewebe. Die Detektion erfolgte mit dem APAAP-System (siehe Methoden Kap. 2.2.9.1) In der linken Bildhälfte finden sich die für Colonicarcinom typischen Epithelzellneoplasien mit deutlicher intensiverer Färbung aufgrund der verstärkten CEA-Expression.

3.7 Charakterisierung des MAK 05.1.14

3.7.1 Immunpräzipitation von Carcinomsolubilisat mit MAK 05.1.14 und Referenz-anti-CEA mit gekreuzter Detektion

Um die Spezifität des MAK 05.1.14 für CEA zu testen und eventuelle Kreuzreaktivitäten gegen andere Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie (NCA, C-CAM) nachzuweisen, wurde das Carcinomgewebesolubilisat zunächst an MAK 05.1.14 bzw. einem kommerziellen Antikörper gegen CEA der Firma DAKO präzipitiert und jeweils mit dem anderen Antikörper detektiert.

Im ersten Ansatz wurde das Solubilisat mit dem Referenz-anti-CEA Antikörper präzipitiert. Dieser Antikörper hatte für die Immunpräzipitation nur unzureichende Eigenschaften, im silbergefärbten SDS-PAGE-Gel war das Antigen kaum nachweisbar.

Dennoch konnte in einem anschließenden Immunblot mit MAK 05.1.14 das Protein im erwarteten Bereich nachgewiesen werden.

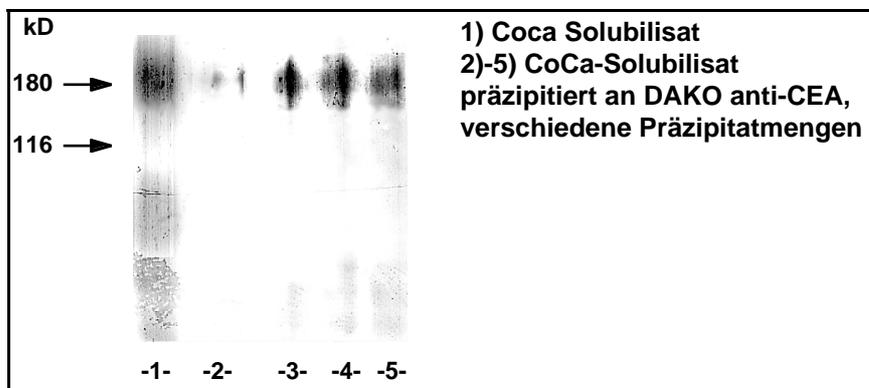


Abbildung 15

Immunblot mit MAK 05.1.14 auf das Präzipitat von Referenz-anti-CEA und Colonicarcinom-Proteinsolubilisation.

1 ml Proteinsolubilisat wurde mit 10mg Sepharose A*MAK DAKO- α -CEA (1:100) inkubiert (Methoden Kap. 2.2.5.5). Das gewaschene Präzipitat wurde elektrophoretisch getrennt und dann nach Western-Blotting mit MAK 05.1.14 im Luminolverfahren detektiert (Methoden Kap. 2.2.5.4).

Im zweiten Ansatz wurde mit MAK 05.1.14 präzipitiert. Es bestätigte sich im gefärbten SDS-PAGE Gel, dass sich das Antigen gut präzipitieren ließ (siehe Kap. 3.4.3).

Im Immunblot mit dem Referenz-anti-CEA Antikörper zeigte sich jedoch, dass das Antigen zwar im erwarteten Bereich nachgewiesen werden konnte, allerdings im Vergleich zu den Kontrollen (Carcinomgewebesolubilisation sowie gereinigtes CEA der Firma Calbiochem) eher schwach. Anstatt dessen konnten offensichtlich beträchtliche Mengen eines Proteins mit einem M_r um 90k angereichert werden, das bei der Gesamtcarcinomsolubilisation nicht detektiert werden kann.

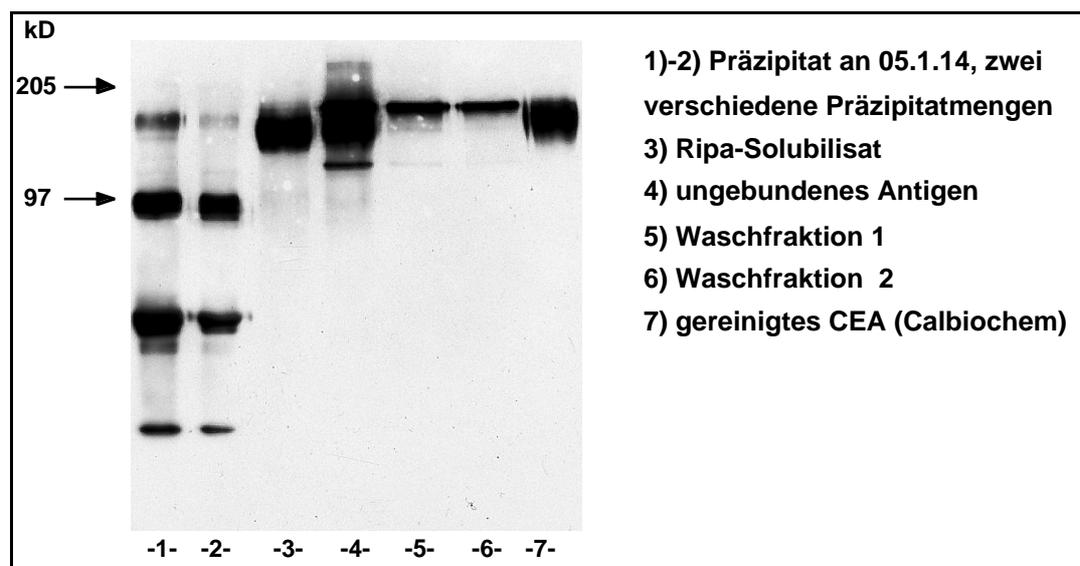


Abbildung 16

Immunblot mit Referenz-anti-CEA (DAKO) auf das Präzipitat von MAK 05.1.14 und Colonicarcinom-Proteinsolubilisation.

1ml Proteinsolubilisat wurde mit 10mg Sepharose A*MAK 05.1.14 (unverdünnter Kulturüberstand) inkubiert (Methoden Kap. 2.2.5.5). Das gewaschene Präzipitat wurde elektrophoretisch getrennt und dann nach Western-Blotting mit Referenz-anti-CEA im Luminolverfahren detektiert (Methoden Kap. 2.2.5.4). Der Referenzantikörper detektiert bei 180kD und zusätzlich bei 90kD Banden im Präzipitat von MAK 05.1.14.

3.7.2 Reaktion des MAK 05.1.14 mit löslichem Serum-CEA

Da die bisherigen Untersuchungen mit dem Antikörper auf Membranpräparationen basierten, sollte überprüft werden, ob auch lösliches CEA von MAK 05.1.14 erkannt wird.

Verschiedene Serumproben mit bekannter CEA-Konzentration (max 200ng/ml) wurden in einem ELISA mit MAK 05.1.14 getestet, es konnte unter diesen Bedingungen jedoch keine Korrelation zwischen CEA-Menge und der Signalstärke im Photometer gefunden werden.

3.7.3 Reaktion des MAK 05.1.14 mit Zellkulturüberstand der Zelllinie LS180

Nach Identifizierung des Antigens von MAK 05.1.14 als CEA bot sich für eine weitergehende Charakterisierung des Epitops sowie der Eigenschaften des Antikörpers die Gewinnung des Proteins aus einer CEA-sezernierenden Zelllinie an. Die Colonicarcinom-Zelllinie LS180 weist eine hohe CEA-Sekretion auf, der Literaturwert (American Tissue Culture Collection) beträgt 1916ng pro 10^6 Zellen pro 10 Tage. Die Zelllinie SW620 dagegen weist keine CEA-Sekretion auf, ihr Kulturüberstand diente als Negativkontrolle.

Der Kulturüberstand von SW620 zeigte erwartungsgemäß weder im ELISA noch im Western-Blot ein Signal.

Der Kulturüberstand von LS180 zeigte sowohl im Titrations-ELISA als auch im Western-Blot ein Signal nach Inkubation mit MAK 05.1.14, welches aber nur schlecht vom Hintergrund (Inkubation ohne ersten Antikörper) abzugrenzen war.

3.8 Charakterisierung des Antigens von 03.1.1

3.8.1 Anreicherung und Identifizierung des Antigens von MAK 03.1.1

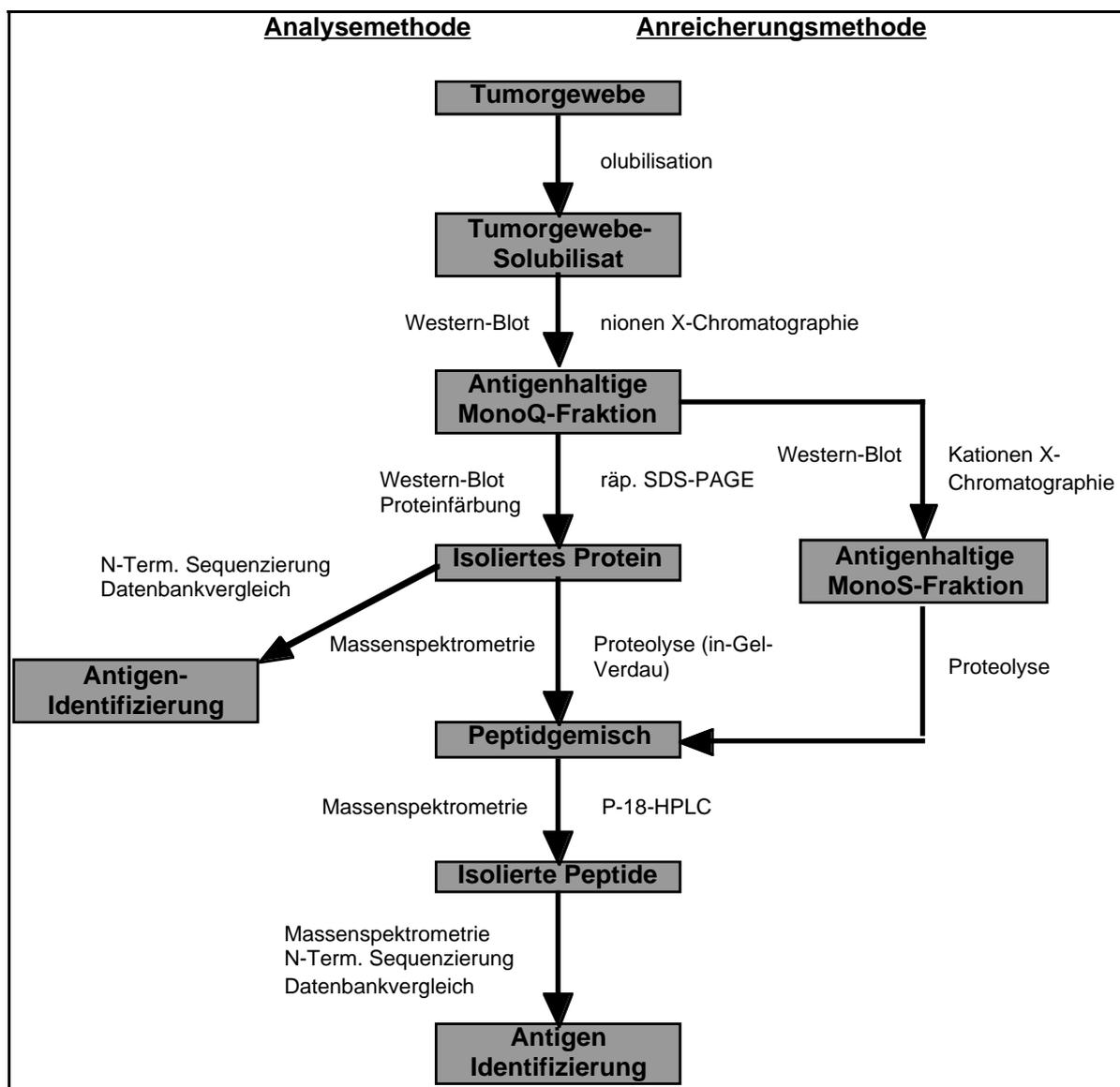


Tabelle 3: Schema der Anreicherung und Identifizierung des Antigens von MAK 03.1.1

Da das 143kD-Antigen mit immunologischen Methoden nur schlecht zu reinigen war, wurde versucht, das Proteingemisch mit chromatographischen Methoden aufzutrennen. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Abfolge der Schritte, die zur Identifizierung des Antigens von MAK 03.1.1 führten.

3.8.1 Fraktionierung der Membranproteinsolubilisation durch HPLC über MonoQ

Für die Anionenaustauschchromatographie wurden zunächst 100µl der Gewebesolubilisation in Harnstoff verwendet. Das Eluat wurde zu je 500µl fraktioniert.

Das Chromatogramm der HPLC über MonoQ zeigte einen hohen Peak für die ersten 5-6 Fraktionen. Dies entspricht dem Durchlauf der ungebundenen Proteine, das bedeutet bei einem Anionenaustauscher die Menge der positiv geladenen und neutralen Proteine. Weiterhin zeigten sich kleinere Peaks in späteren Fraktionen. Das Chromatogramm eines späteren Laufes ist in Kapitel 3.8.2 dargestellt. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen und für eine Immundetektion geblottet.

3.8.1.1 Test der Fraktionen im Immunblot

Im Immunblot wurde das Antigen in der Durchlaufraktion nachgewiesen. Diese enthält zwar viele verschiedene Proteine, dennoch bestand die Chance, das Antigen in einem präparativen Western-Blot darstellen, ausschneiden und sequenzieren zu können.

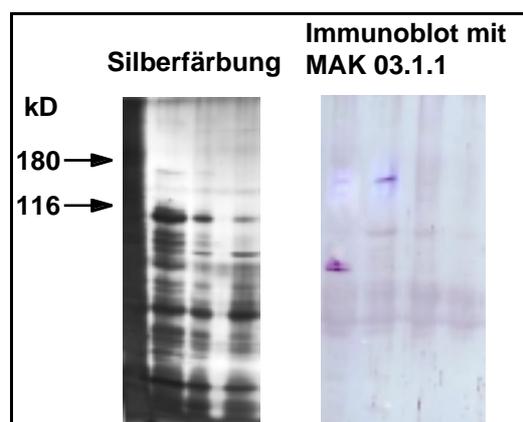


Abbildung 17

SDS-PAGE (siehe Methoden Kap. 2.2.6.1) der Fraktionen 1-14 (Fraktionsgröße 500µl) und Immunblot (siehe Methoden Kap. 2.2.5.4) mit MAK 03.1.1. Die Entwicklung erfolgte mit alk. Phosphatase.

3.8.1.2 Präparativer PVDF-Blot der Fraktionen mit Antigengehalt und N-terminale Sequenzbestimmung nach Edman

Die gesammelten Durchlaufaktionen aus 2 Chromatographieläufen wurden elektrophoretisch getrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Nach Anfärbung mit Ponceau-Rot zeigte sich im oberen Molekulargewichtsbereich eine isolierte Bande, die im Vergleich mit dem Immunblot der Antigenbande entsprach. Die Bande wurde ausgeschnitten und das Protein nach EDMAN sequenziert.

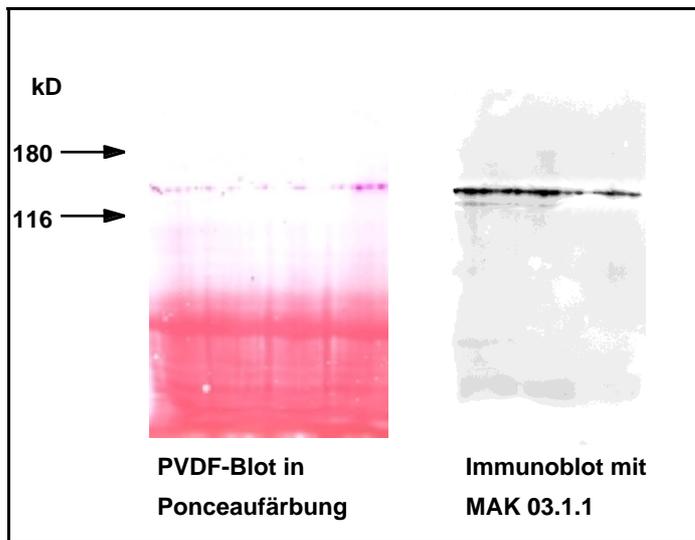


Abbildung 18

Die konzentrierten Fraktionen 1+2 nach 2 Durchläufen der Proteinsolubilisation in 8M Harnstoff (siehe Methoden Kap. 2.2.7.1) wurden konzentriert (siehe Methoden Kap. 2.2.2.2) und elektrophoretisch über mehrere Spuren aufgetrennt (siehe Methoden Kap. 2.2.6.1). Nach anschließendem Blotting auf eine PVDF-Membran (siehe Methoden Kap. 2.2.6.4) wurde mit Ponceau-Rot gefärbt (siehe Methoden Kap. 2.2.6.5). Gleichzeitig wurde ein Immunblot mit MAK 03.1.1 durchgeführt, die Entwicklung erfolgte im Luminol-Verfahren (siehe Methoden Kap. 2.2.5.4).

Die Ansequenzierung der ausgeschnittenen Proteinbande brachte kein Ergebnis, es konnten keine Aminosäuresequenzen entschlüsselt werden.

3.8.2 Anreicherung des Antigens mittels MonoQ-HPLC

Zur Anreicherung des 143kd Antigens wurden sechs Läufe mit jeweils 400 μ l Harnstoffsolubilisat durchgeführt (Gesamtproteinmenge: 20 μ g). Die Fraktionsgröße betrug diesmal 1ml. Die Fraktionen, die im Chromatogramm als Durchlauf erschienen wurden gesammelt und mittels Ultrafiltration konzentriert.

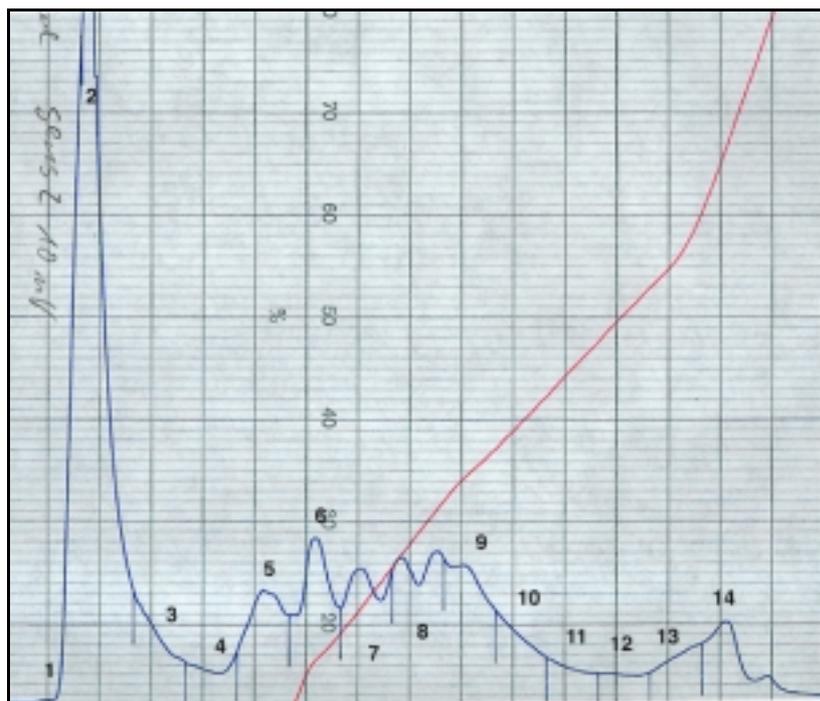


Abbildung 19

Chromatogramm eines HPLC Laufs über eine MonoQ Säule (siehe Methoden Kap. 2.2.7.1)

Die rote Gerade zeigt den ansteigenden Salzgradienten. Die Fraktionsgröße beträgt 1ml. Die größte Proteinmenge erscheint in den ersten Fraktionen, die dem Durchlauf der ungebundenen Proteine entsprechen.

3.8.2.1 Präparatives Gel mit Coomassiefärbung

Zur Identifizierung sollte das über MonoQ angereicherte Protein elektrophoretisch aufgetrennt und nach Coomassie gefärbt werden. Die Proteinbande sollte anschließend ausgeschnitten und im Gel mit Trypsin verdaut werden. Die gewonnenen Peptide können eluiert und mit dem MALDI-TOF-MS vermessen werden. Im Gel zeigten sich nach Coomassiefärbung deutlich die beiden Antigenbanden um 140kD. Diese wurden ausgeschnitten.

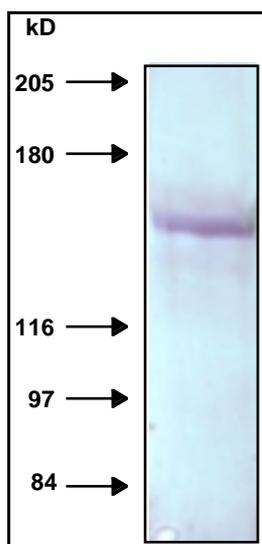


Abbildung 20

Immunoblot mit MAK 03.1.1. Die Durchlaufraktionen aus 6 Läufen über MonoQ wurden konzentriert (siehe Methoden Kap. 2.2.2.2) und elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Methoden Kap. 2.2.6.1). Ein Teil wurde anschließend geblottet, mit MAK 03.1.1 detektiert und mit alk. Phosphatase entwickelt (siehe Methoden Kap. 2.2.5.4).

3.8.3 Antigenidentifizierung nach In-Gel-Verdau der ausgeschnittenen Banden

Die ausgeschnittenen Banden wurden zermörsert und nach Vorschrift im Gel verdaut. Anschließend wurden die vermuteten Peptide eluiert. Das Massenspektrum des Eluats zeigte keine signifikanten Peaks im Vergleich zur Kontrolle. Auch nach Auftrennung über Reversed-Phase-HPLC zeigten sich keine signifikanten Unterschiede von der Leerkontrolle. Einzelne Fraktionen, die schwache Peaks im Chromatogramm gezeigt hatten, wurden erneut im MALDI-TOF-MS vermessen, wobei jedoch keine eindeutige Peptidmasse identifiziert werden konnte.

3.8.4 Anreicherung des Antigens aus der MonoQ-Fraktion mittels MonoS-HPLC

Um das Antigen einem kontrollierten, optimalen Verdau zu unterziehen, ist es notwendig, es gereinigt und in gelöster Form vorliegen zu haben. Da die Durchlaufraktion der MonoQ-Säule jedoch keineswegs frei von anderen Proteinen ist, musste ein weiterer Chromatographieschritt eingefügt werden. Aufgrund der Annahme, dass es sich beim

Durchlauf um positiv geladene Proteine handelt, wurde eine Kationen-Austausch-Chromatographie angeschlossen. Die Durchlaufaktionen mehrerer Läufe über eine MonoQ-Säule wurden gesammelt und anschließend über eine MonoS-Säule gegeben. Das MonoS-Chromatogramm ist in Abbildung 21 dargestellt.

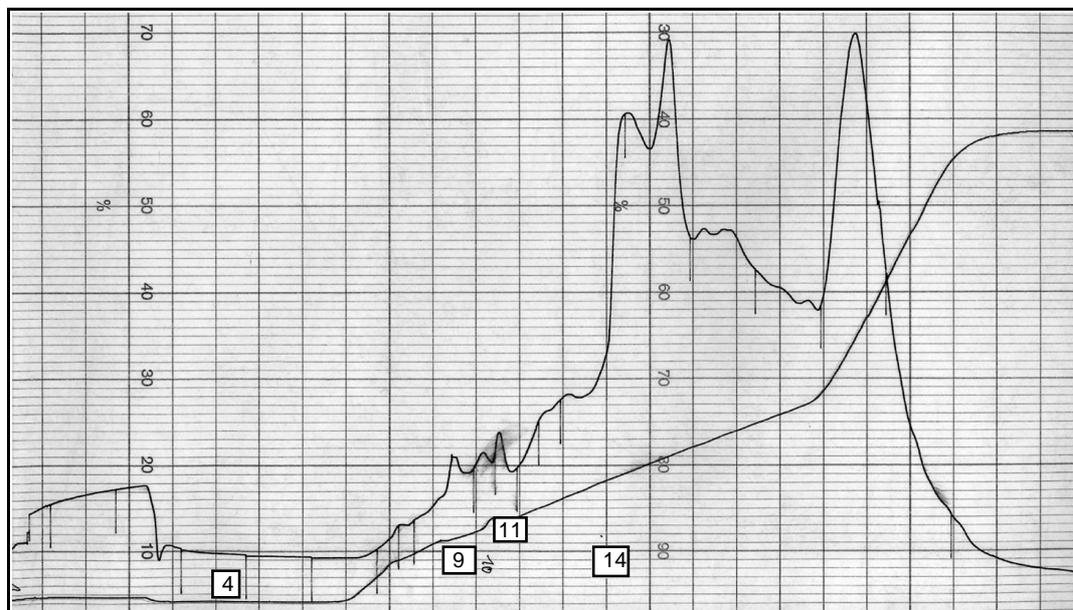


Abbildung 21

Das Chromatogramm zeigt einen Lauf der gesammelten Durchlaufaktionen aus 6 MonoQ-Läufen über MonoS (siehe Methoden Kap. 2.2.7.2). Im späteren Immunblot zeigte sich, dass die Fraktionen 10 und 11 das Antigen enthalten.

Die einzelnen Fraktionen wurden auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen und für die Immundetektion geblottet.

3.8.4.1 Immunblot der Fraktionen nach MonoS

Im Immunblot wurde das Antigen in den Fraktionen 10 und 11 detektiert. Im silbergefärbten SDS-PAGE-Gel zeigten sich die gleichen Banden isoliert von anderen Proteinen, so dass die Vorbedingungen für einen enzymatischen Verdau gegeben waren.

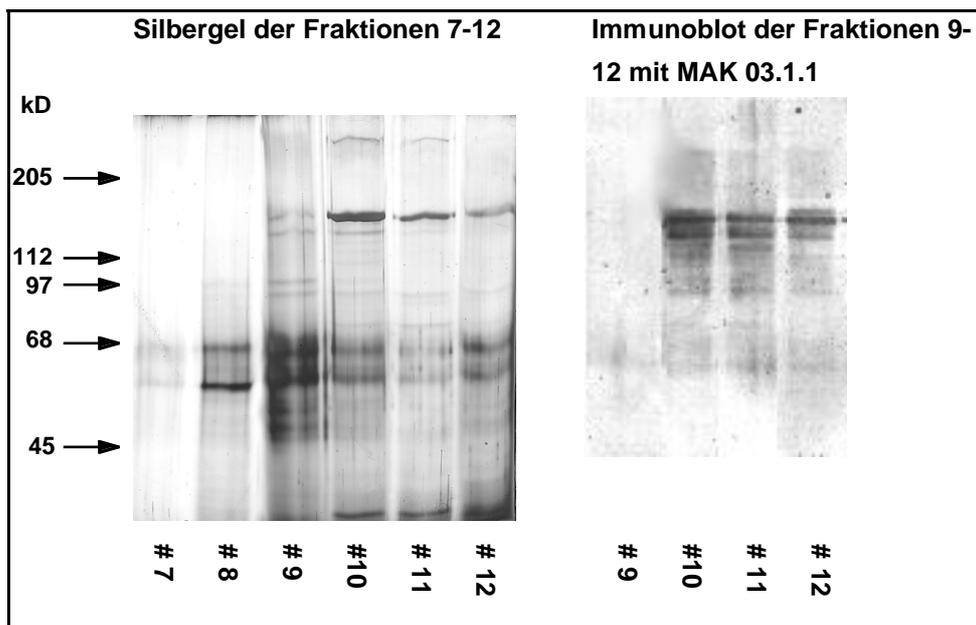


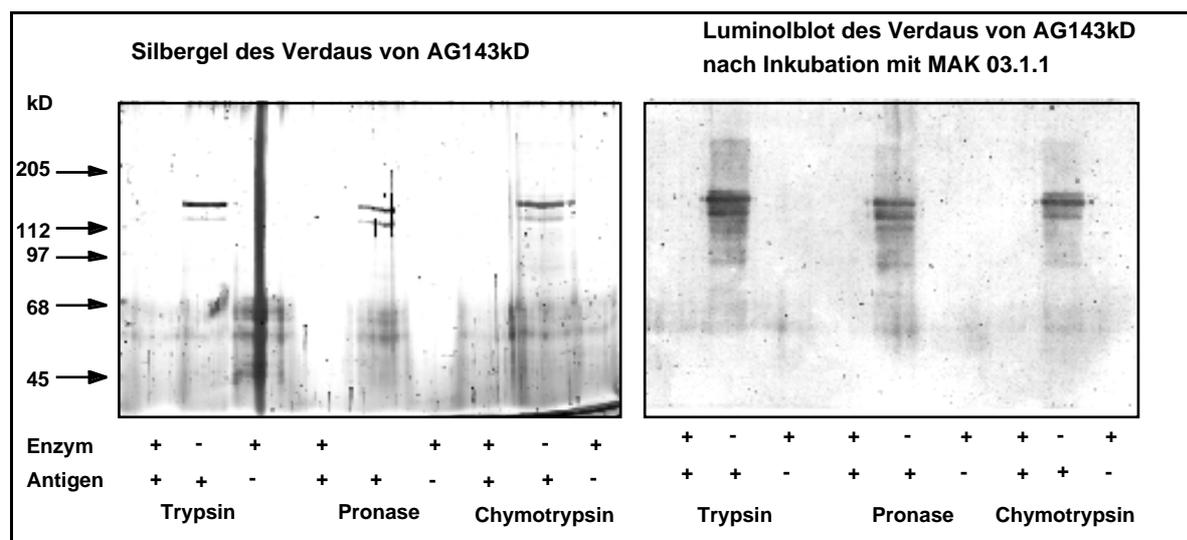
Abbildung 22

Die Fraktionen nach MonoS-Chromatographie wurden elektrophoretisch getrennt und silbergefärbt (siehe Methoden Kap. 2.2.6). Dargestellt sind die Fraktionen 7-12, vor allem in Fraktion 10 lässt sich deutlich das 143kD-Antigen erkennen. Ein ebenfalls durchgeführter Immunoblot mit MAK 03.1.1 bestätigte die Banden als Antigen.

3.8.4.2 Enzymatischer Verdau der antigenhaltigen Fraktion

Wegen des fehlgeschlagenen In-Gel-Verdaus sollte getestet werden, ob das angereicherte Antigen überhaupt einem Verdau durch Proteasen zugänglich ist. Eine antigenhaltige Fraktion wurde daher mit den Enzymen Pronase, Trypsin und Chymotrypsin verdaut. Da Proteinbanden >30kD weder durch Silberfärbung noch nach Antigen detektion im Western-Blot nachweisbar waren, war der Verdau erfolgreich.

Daraufhin wurden die gesammelten Fraktionen 10 und 11 aus 6 Läufen über MonoS mit Trypsin verdaut.

**Abbildung 23**

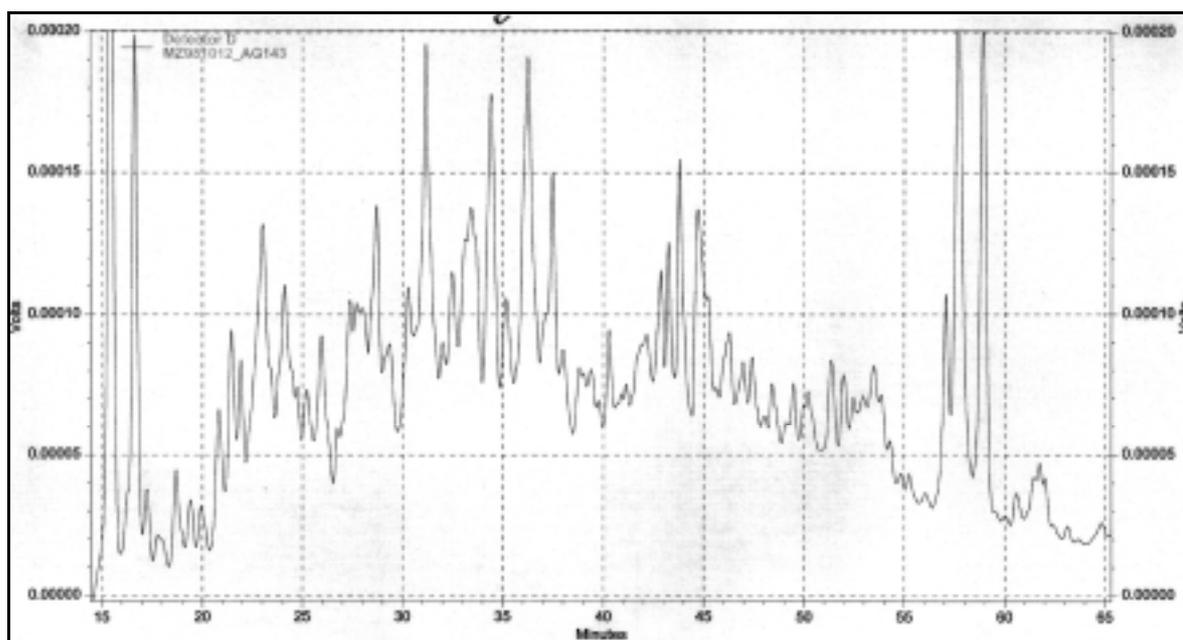
2µl der antigenhaltigen, konzentrierten Fraktionen nach Chromatographie über MonoS wurden mit Trypsin, Pronase und Chymotrypsin verdaut (siehe Methoden Kap. 2.2.8.3 - 2.2.8.5). Als Kontrolle wurde jeweils ein Ansatz ohne Enzym und ein Ansatz ohne Antigen durchgeführt. Die Ansätze wurden elektrophoretisch getrennt und die Antigene im Western-Blot detektiert.

3.8.4.3 Massenbestimmung der Peptide mit der MALDI-TOF-MS

Die gewonnenen Peptide wurden massenspektrometrisch dargestellt. Das Spektrum zeigte Peptidpeaks, die sich deutlich vom Hintergrund abgrenzen ließen. Dieses Ergebnis erlaubte es, das Peptidgemisch weiter über eine Reversed-Phase-HPLC aufzutrennen.

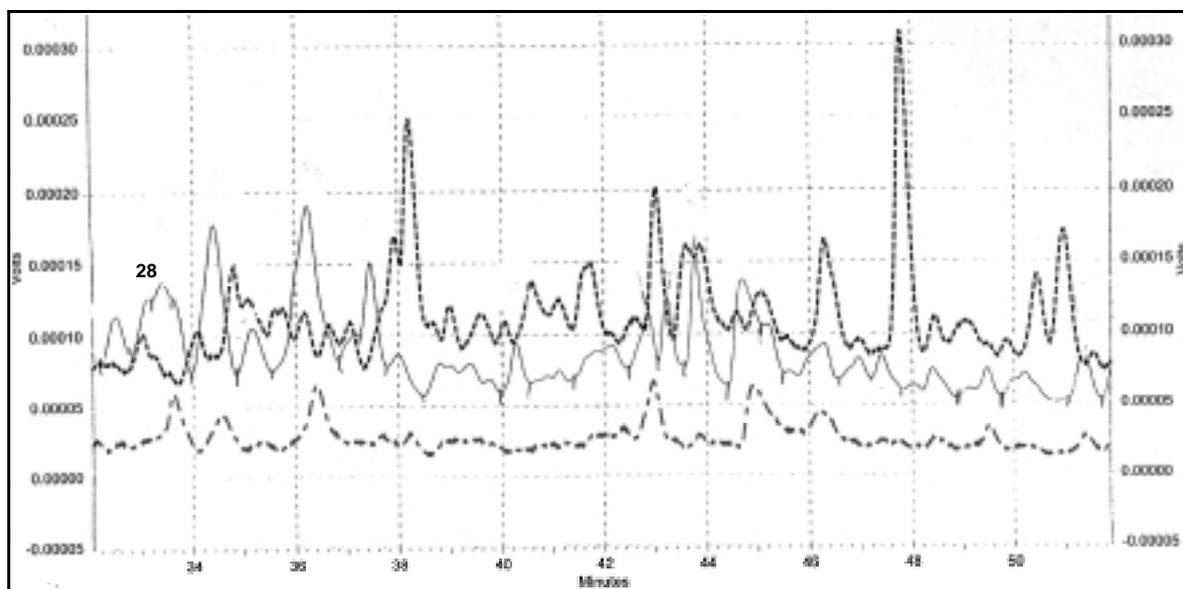
3.8.4.4 Trennung der Peptide durch RP-18-HPLC

Die Peptidmischung wurde über RP-18-HPLC aufgetrennt. Das Chromatogramm zeigte deutliche Signale in einzelnen Fraktionen, die Peaks waren gut vom Hintergrund abzugrenzen.

**Abbildung 24**

Chromatogramm eines HPLC-Laufes des Peptidgemisches der antigenhaltigen Fraktion nach Trennung über MonoS über eine RP-18-Säule (Siehe Methoden Kap.2.2.7.3)

Im Folgenden wurden ausgewählte Fraktionen der Massenspektrometrie zugeführt.

**Abbildung 25**

Das Chromatogramm eines HPLC-Laufes über eine RP-18-Säule (siehe Methoden Kap. 2.2.7.3) zeigt die Fraktionen 27 bis 52 des Peptidgemisches der antigenhaltigen MonoS-Fraktion (Durchgehende Linie). Die gestrichelten Linien markieren eine RP-18-Trennung der proteolytisch verdauten Vor- bzw. Nachfraktion der Trennung über MonoS.

3.8.4.5 Massenbestimmung ausgewählter Fraktionen mit MALDI-TOF-MS

Die Fraktionen 14, 22, 25, 28, 30, 31, 54 und 55 wurden massenspektrometrisch vermessen. Die Fraktionen 14 und 54 erzeugten kein Signal, aus den übrigen wurden die beiden Fraktionen mit den deutlichsten Peaks ausgewählt.

Die Vermessung im Massenspektrometer ergab für die Fraktion 28 einen Haupt-Peak mit einer Masse von 2707.72D. Fraktion 55 wies einen Peak bei einer Masse von 1800 D und einen weiteren bei einer Masse von 8500 D auf.

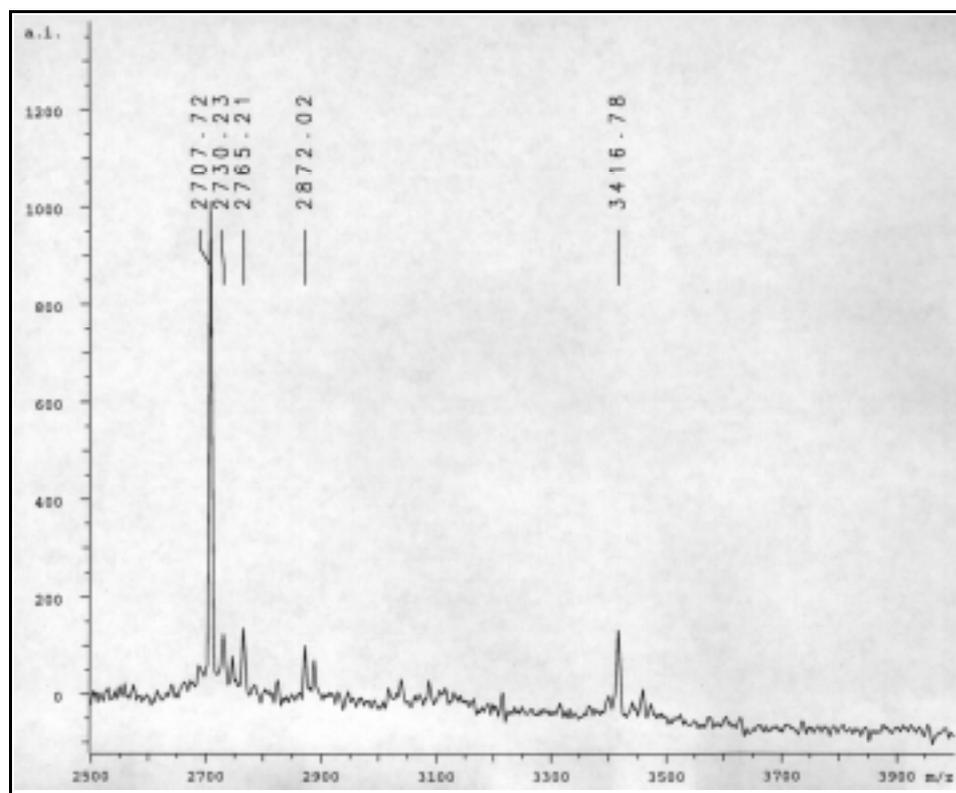


Abbildung 26

Das abgebildete Massenspektrum im MALDI-TOF-MS (siehe Methoden Kap. 2.2.2.4) zeigt einen Hauptpeak der Fraktion 28 bei 2707.72 D. In dieser Fraktion fand sich später eine Hauptsequenz mit 30 Aminosäuren.

3.8.4.6 N-Terminale Sequenzbestimmung nach Edman und Sequenzvergleich in Datenbanken

Nach der Massenbestimmung wurden die beiden Fraktionen der Sequenzanalyse im EDMAN-Abbau unterzogen.

In Fraktion 55 konnte der N-Terminus von Ubiquitin nachgewiesen werden, welches offensichtlich vollständig und ungespalten (M_r : 8565k) vorliegt. Der Peak bei 1800D konnte auch mittels PSD-Fragmentspektrum nicht bestimmt werden.

In Fraktion 28 ließ sich eine Hauptsequenz mit 30 Aminosäuren identifizieren, welche der Position 1112-1141 aus Procollagen alpha-1 entspricht. Die errechnete Masse beträgt 2706 Dalton und stimmt somit mit der massenspektrometrisch bestimmten Masse überein.

Des weiteren fand sich eine Nebensequenz von 33 Aminosäuren, die ebenfalls zweifelsfrei aus Procollagen alpha-1 stammt und mit einer berechneten Masse von 2872 exakt einem im Massenspektrometer bestimmten Neben-Peak entspricht.

<i>Fraktion #</i>	<i>M_r im Massenspektrometer</i>	<i>Edman-Verdau</i>	<i>Ergebnis nach Datenbankvergleich</i>
55	8500	MQIFVKTLTG KTITLEVEPS	N-Terminus von Ubiquitin (ungespalten: 8565kD)
55	1800	nicht möglich	kein Ergebnis, auch nicht im PSD-Fragmentspektrum
28	2707.72	30 AS: GFSG LQGPhPGP hPGShPGEQGPS GA(SGPAGPR)	Pos 1112-1141 von Procollagen alpha-1
28	2872	33 AS: GLTGPIGPhPGP AGAhPGDKGES Gxxx	ProCollagen alpha-1

Tabelle 4

3.8.5 Reaktivität von MAK 03.1.1 mit verschiedenen Collagenen, Fibronectin und Laminin im Immunblot

Zur Überprüfung der Aminosäuresequenzanalyse, sowie um Kreuzreaktivitäten mit anderen Collagenketten und Proteinen der extrazellulären Matrix nachzuweisen, wurde die Reaktivität des MAK 03.1.1 im Immunblot getestet. Unter denaturierenden Bedingungen wurden die humanen Collagene I, III, IV und V (Sigma, München) in verschiedenen Mengen (siehe Abbildung) zusammen mit Fibronectin (3µg und 100ng) und Laminin (3µg) auf ein SDS-PAGE Gel aufgetragen. Nach anschließendem Western-Blot wurde mit MAK 03.1.1 inkubiert.

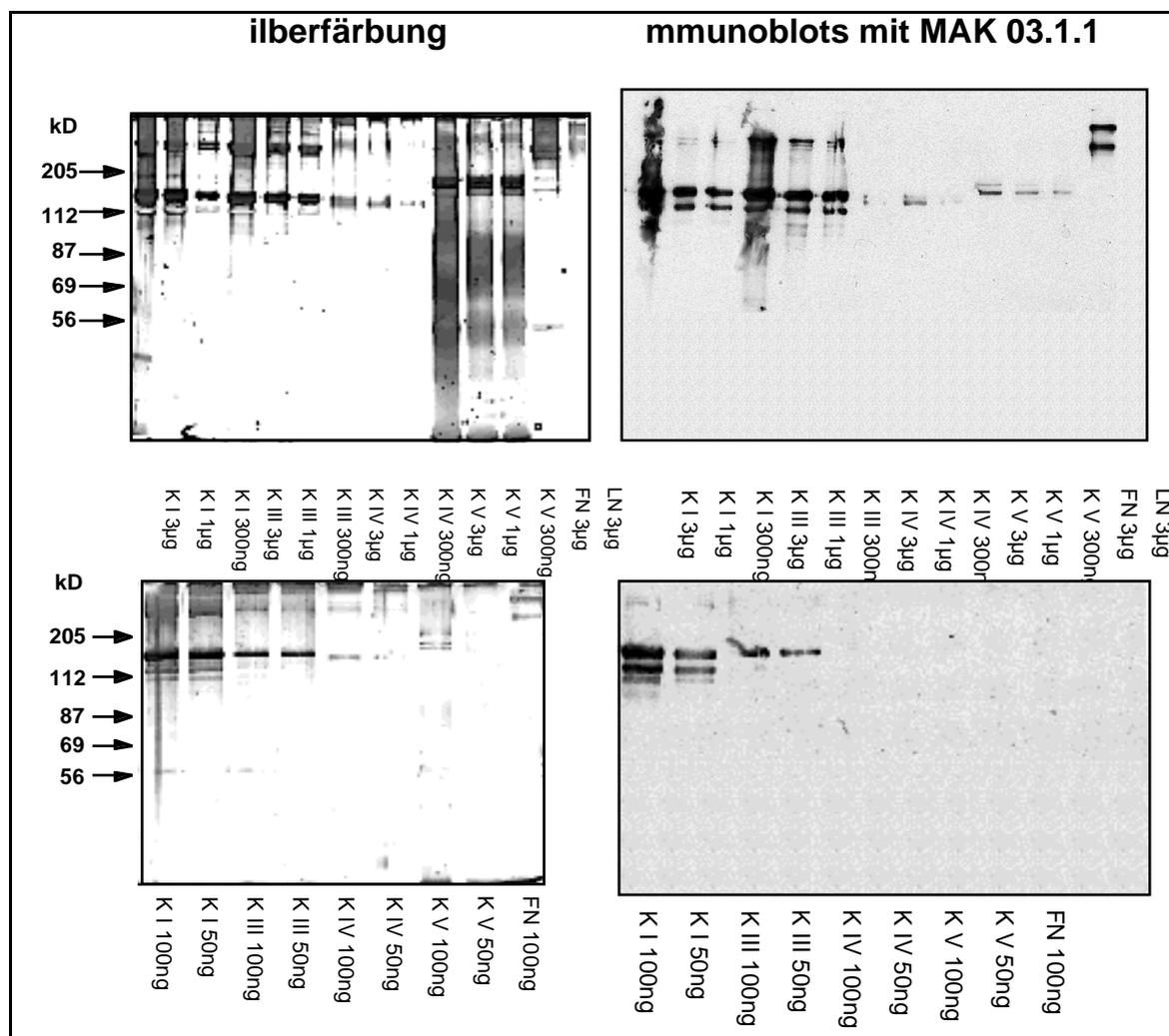


Abbildung 27

Verschiedene Mengen gereinigter Collagene, sowie Fibronectin und Laminin wurden elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Methoden Kap. 2.2.6), anschließend geblottet und die Blotmembran mit MAK 03.1.1 inkubiert (siehe Methoden Kap 2.2.5.4). Die Detektion erfolgte mit dem Luminol-System.

Es zeigt sich ein starkes Signal bei den Collagenen I und III in allen Konzentrationen, sowie bei 3µg Fibronectin. Die Collagene IV und V werden schwächer, bei 100ng und 50ng nicht mehr erkannt. Ebenso kann Fibronectin in einer Menge von 100ng nicht mehr mit dem Antikörper nachgewiesen werden. Laminin wird überhaupt nicht detektiert.

3.8.6 Immunhistochemische Färbung eines Schnittes aus einem Colonicarcinompräparat

Um das Antigen im Nativpräparat zu lokalisieren und Aussagen über seine Verteilung und Carcinomspezifität treffen zu können, wurden Gewebeschnitte aus dem Übergangsbereich zwischen Colonicarcinomgewebe und normalem Colongewebe mit MAK 03.1.1 inkubiert. Die Detektion erfolgte nach dem APAAP-System.

Die angefärbten Strukturen im Darmstroma sind vornehmlich extrazellulär lokalisiert. Eine Aussage, ob die Färbungsintensität zwischen Tumorgewebe und gesundem Darmgewebe differiert, lässt sich in den vorliegenden Schnitten nicht beurteilen.

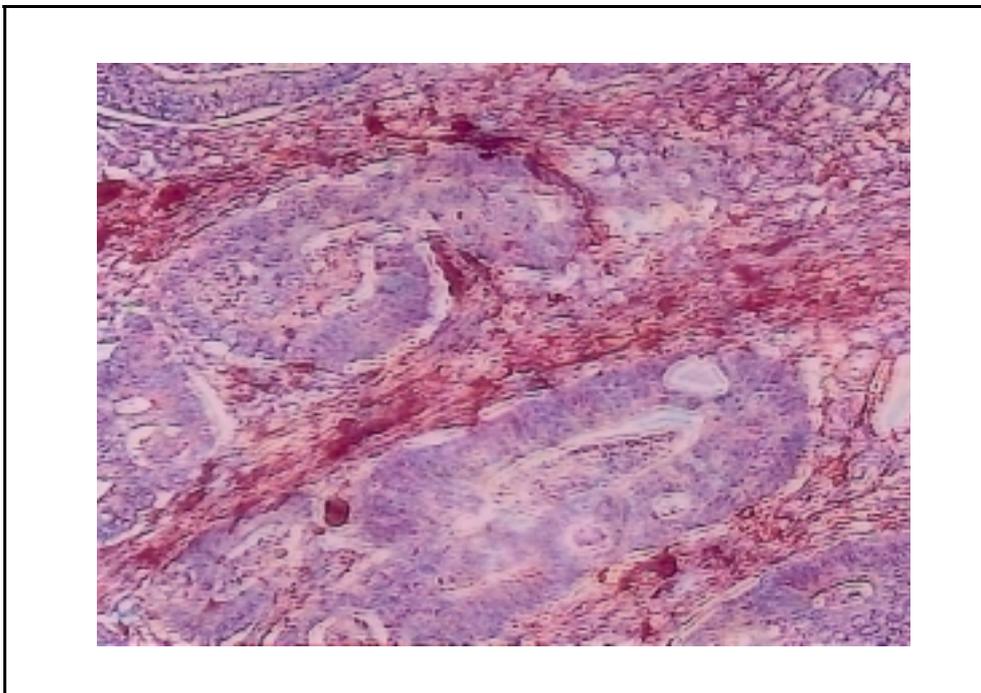


Abbildung 28

Immunhistochemische Färbung eines Paraffinschnittes mit MAK 03.1.1 am Übergang Colonicarcinom zu normalem Colongewebe. Die Detektion erfolgte mit dem APAAP-System (siehe Methoden Kap. 2.2.9.1). Um die neoplastischen Krypten herum ist nur das Carcinomstroma angefärbt.