

5 Zusammenfassung

1. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zuvor etablierte polyklonale Hybridomzellklone teilweise subkloniert und auf ihre Spezifität für Colocarzinom-Gewebeproteine getestet.
2. Die vier Kulturen Aw 03, Aw 04, Aw 05 und Aw 06 bzw. einige ihrer Subklone zeigten in einem optimierten ELISA-Selektionsverfahren die höchste Spezifität.
3. Für die weiteren Untersuchungen wurden die Klone 03.1.1 und 05.1.14 ausgewählt. Ihre monoklonalen Antikörper konnten der Immunglobulinklasse IgG₁-kappa zugeordnet werden. Die aussichtsreichen Klone 06.1.6 und 06.1.7 stellten die Antikörperproduktion irreversibel ein.
4. MAK 03.1.1 erkannte im Western-Blot zwei antigene Proteine mit M_r 143k und M_r 120k, MAK 05.1.14 erkannte zwei inhomogene Banden im Bereich M_r 150-200k sowie ein verschmiertes Signal im Bereich M_r 50-90k.
5. Die Banden des Antigens im Bereich M_r 150-200k und M_r 50-90k wurden mit Hilfe von MAK 05.1.14 genauer proteinbiochemisch charakterisiert:
 - a) Das M_r konnte durch Immunpräzipitation und Immunaффinitätschromatographie im Bereich M_r 150-200k und M_r 50-90k bestätigt werden.
 - b) Die N-terminale Sequenzierung ergab für den Bereich M_r 150-200k eine Sequenz von 12 Aminosäuren, die mit dem N-Terminus von humanem CEA übereinstimmt.
 - c) Der Heterogenität des Antigens ist durch N-Glykane bedingt. Nach deren Abspaltung reduzierte sich das Signal im Immunblot auf zwei Banden unterhalb des 87kD-Markers.

-
- d) Das Antigen von MAK 05.1.14 enthält Sialinsäuren (N-Acetylneuraminsäuren).
 - e) Das Antigen lässt sich immunhistochemisch in Colonicarcinomgewebe nachweisen, nicht jedoch in Normalgewebe.
 - f) Das Antigen wird von kommerziellen anti-CEA Antikörpern erkannt.
6. Der etablierte Antikörper MAK 05.1.14 wurde weiter charakterisiert:
- a) MAK 05.1.14 erkennt auch nach Abspaltung der N-Glykane sein Antigen und damit ein Proteinepitop.
 - b) MAK 05.1.14 detektiert nach Desialylierung das Antigen besser.
 - c) MAK 05.1.14 zeigt kein Signal im Immunblot mit Proteinen der etablierten Colonicarcinomzelllinien LS180, HT29 und SW620.
 - d) MAK 05.1.14 kreuzreagiert möglicherweise mit NCA.
- 7.) Das 143kD-Antigen wurde mit Hilfe von MAK 03.1.1 weiter proteinbiochemisch charakterisiert:
- a) Der Molekulargewichtsbereich konnte im Zuge der Aufreinigung und Anreicherung über Immunpräzipitation, Immunaффinitätschromatographie, MonoQ- und MonoS-HPLC bestätigt werden.
 - b) Tryptische Peptide des antigenen Proteins konnten nach N-terminaler Sequenzierung dem Procollagen alpha-1(I) zugeordnet werden.
 - c) Massenspektrometrische Untersuchungen bestätigten das Vorliegen eines tryptischen Peptids von Procollagen alpha-1(I) bei einer Hauptsequenz mit der Masse 2706kD.

8. Der etablierte Antikörper MAK 03.1.1 wurde weiter charakterisiert:
 - a) Der Antikörper erkennt im Immunblot Collagen I und III. Andere Collagene (IV, V) und Proteine der extrazellulären Matrix (Fibronectin/Laminin) zeigten kein signifikantes Signal.
 - b) MAK 03.1.1 färbt in immunhistochemischen Schnitten von Colonicarcinomgewebe Strukturen der extrazellulären Matrix an.