



Doctoral Thesis

Nachweis von Basalmembrankollagenfragmenten im Serum von Tumorpatienten

Author(s):

Rentsch, Beatrix

Publication Date:

1987

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000413806> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 8359

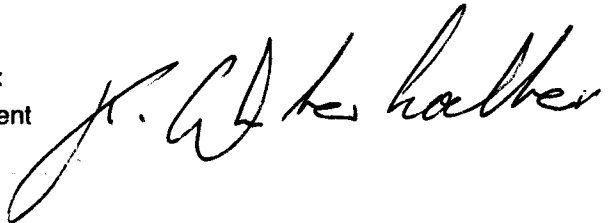
NACHWEIS VON BASALMEMBRANKOLLAGENFRAGMENTEN IM SERUM VON TUMORPATIENTEN

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von
Beatrix Rentsch
Dipl. Natw. ETH
geboren am 30. Juni 1959
von Büchsen (FR) und Zürich (ZH)

Angenommen auf Antrag von:
Prof. K.H. Winterhalter, Referent
Prof. H. Binz, Korreferent
Dr. B.F. Odermatt, Korreferent



Zürich 1987

ADAG Administration & Druck AG

ZUSAMMENFASSUNG

Ein Radioimmunoassay mit monoklonalen Antikörpern gegen Kollagen IV-Fragmente (in Form eines "Sandwich"-Assays) wurde entwickelt. Dieses Testsystem erlaubt den Nachweis von Kollagen IV-Fragmenten in vitro, Prokollagen IV im Ueberstand der Prokollagen IV-synthetisierenden Zelllinie HT-1080 und Kollagen IV im Serum.

Bei zehn Prozent der Seren von Patientinnen mit gynäkologischen Tumoren wurde im Vergleich mit Kontrollseren eine Erhöhung des Kollagen IV-Anteils nachgewiesen.

Es besteht allerdings keine Korrelation zwischen der mit RIA nachgewiesener Kollagen IV-Menge und Tumortyp bzw. klinisch nachgewiesener Invasivität- und Metastasenbildung.

Genau charakterisierte monoklonale Antikörper, gegen die Haupthelix gerichtet, wurden verwendet. Zum Fangen des Antigens diente ein sequentieller AK, C IV 4. Zum Nachweis des gebundenen Antigens wurden zwei iodinierte konformationelle AK, C IV 22 und C IV 29 eingesetzt. Alle diese AK binden auf der Haupthelix des Kollagen IV-Moleküls 60-80 nm von der 7S-Domäne entfernt. Die Bindungsstellen auf dem Molekül wurden auf tetramerem Kollagen IV nach Rotationsbedampfung im Elektronenmikroskop lokalisiert.

Die monoklonalen AK zeigten im Assay, verglichen mit polyklonalen Kaninchenseren, eine höhere Spezifität.

Um das Spektrum des Assays zu erweitern, wurde versucht, monoklonale AK gegen weitere Domänen des Moleküls herzustellen. Immunisierung mit pepsinisiertem Kollagen IV induzierte beinahe ausschliesslich AK gegen den "Knickbereich" der Tripelhelix, etwa 30-80 nm von der 7S-Domäne entfernt.

Andere Domänen wurden aus menschlichem Gewebe separat isoliert und direkt zur Immunisierung verwendet. Neben langem 7S-Kollagen und der NC1-Domäne wurde auch kurzes 7S-Kollagen aus langem 7S-Kollagen mittels Trypsinverdauung hergestellt.

Mehrere konformationelle und sequentielle AK waren gegen die NC1-Domäne gerichtet. Trotz mehrerer Fusionen resultierten nur drei Klone gegen die 7S-Domäne. Von diesen drei Klonen erhielten wir einen konformationellen AK mit etwas rätselhaften Eigenschaften, sowie zwei sequentielle AK gegen Enzymspaltstellen (kurze bzw. lange Form).

SUMMARY

A radioimmunoassay for type IV collagen fragments was developed with monoclonal antibodies in the form of a sandwich-assay. This assay enabled us to measure in vitro fragments of pepsinized collagen IV in vitro and procollagen IV in the supernatant of the procollagen IV-producing cell line HT-1080. Collagen IV-fragments in serum could also be measured.

Ten percent of the sera from patients with gynecological tumors showed elevated levels of collagen type IV as compared to control sera. No correlation was found between the measured collagen type IV-level and the clinical diagnosis of tumortype, invasiveness and metastasis.

In this assay monoclonal antibodies against the major triple helix of the collagen molecule have been used. The antigen was captured with a sequential antibody, C IV 4. After incubating with the antigen, the amount of bound antigen was quantitated with two iodinated conformational antibodies, C IV 22 and C IV 29.

All these antibodies have their epitopes on the triple helix 60-80 nm away from the 7S-domain. The binding-sites were localized on tetrameric collagen IV after rotary-shadowing in the electron microscope.

The monoclonal antibodies showed a higher specificity in the assay than polyclonal antisera of rabbits.

To enlarge the range of the assay several attempts to produce antibodies against other domains were undertaken.

Immunisation of mice with pepsinized collagen IV resulted in antibodies binding to the "bend region" of the major triple helix, 30-80 nm away from the 7S-domain. To induce antibodies against other domains such domains were isolated separately and used directly for immunizing mice. The long form of 7S-collagen and the NC1-domain have been prepared. After trypsin digestion it was also possible to produce the short form of 7S-collagen from the long form of human origin.

Several sequential and conformational antibodies against the NC1-domain were characterized.

In spite of several fusion experiments with the 7S-domain, only three clones directed against it could be produced: A conformational one with a bit dubious binding qualities and two sequential ones directed to enzyme cleavage sites (short or long form respectively).