ETH zürich

ETH Library

L1-CAM as antigen recognized by the anti-neuroblastoma specific mAb chCE7

Isolation and expression patterns

Doctoral Thesis

Author(s):
Meli, Marina L.

Publication date:
1999

Permanent link:
https://doi.org/https://doi.org/10.3929/ethz-a-003836871

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 No.13251

L1-CAM as antigen recognized by the anti-neuroblastoma specific mAb chCE7: Isolation and expression patterns

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH (ETHZ)
for the degree of
Doctor of Natural Sciences
at the Department of Pharmacy

Presented by

Marina L. Meli

Dipl. Natw. ETHZ
born the 5th February 1971
in Sorengo, Ticino
Swiss citizen

accepted on recommendation of
Prof. Dr. Gerd Folkers, examiner
Prof. Dr. P. August Schubiger, co-examiner
Dr. Ilse Novak-Hofer, co-examiner

Zürich 1999

Summary

chCE7 is a chimeric monoclonal antibody (mAb) with a high affinity for neuroblastoma. Scintigraphies of neuroblastoma patients with ^{131}I-chCE7 showed a high accumulation of the antibody in metastasis. On neuroblastoma cells and on a renal carcinoma cell line (Föhn) the antibody recognizes a 200 kDa cell surface protein.

The antigen was partially purified through immunoaffinity chromatography from cell extracts of about $2x10^8$ cells (SK-N-BE(2)c and Föhn). Antigen positive fractions were immunoprecipitated and separated with SDS-PAGE under reducing conditions and then blotted onto a PVDF-membrane. The bands, that corresponded to the antigen, were cut out of the blots and, after deblocking of the N-Terminus, fifteen and eighteen amino acids (SK-N-BE(2)c and Föhn respectively) from the N-Terminus of the protein could be sequenced.

Sequence comparisons in the data banks identified the „chCE7-antigen" as a L1-CAM homologous protein. L1-CAM is a cell adhesion molecule that plays an important role in the development of fetal brain. Mutations in the L1-CAM gene are connected with heavy neurological pathologies, that are summarized under the name of CRASH syndrome.

The protein, which was purified by means of mAb chCE7, showed a deletion of five amino acids at the N-Terminus, corresponding to a deletion of exon 2 of L1-CAM gene. Partial cloning by RT-PCR with L1-specific primers showed that in neuroblastoma cells both isoforms, the „full-length" and a exon2/exon27-deleted form were present.

Additional renal carcinoma cells were tested for the expression of L1-CAM: five of six were found positive and expressed only the deleted isoform. Only a weak reaction was found when normal adult renal tissue was analyzed, in contrast normal human brain cortex tissue, which reacted strongly with chCE7. Additionally, fifteen renal tumor tissue slices of different origin were tested: five of them were positive.

Northern blot analyses showed that in the tumor cells a correlation exists between protein- and mRNA expression. As well, L1-CAM mRNA was found in normal tissues like brain, kidney, small intestine, stomach and placenta. In contrast, L1-CAM mRNA could not be found in heart, liver, colon, lung, muscle, spleen and testis.

Some renal tumors show genetic aberrations in chromosome Xq28, where the L1-CAM gene is localized. Analysis of more renal tumor tissues are necessary in order to examine a possible correlation between genetic modifications in these tumors and changes of the L1-CAM gene expression. Further examinations over a possible diagnostic and/or therapeutic application of chCE7 with certain renal tumors additionally to the application with neuroblastoma will follow. Biochemical characterization of the found L1-CAM isoforms should give information, whether these proteins show tumor specific determinants and how their expression on tumor cells is regulated.

Zusammenfassung

chCE7 ist ein chimärer monoklonaler Antikörper (mAk) mit einer sehr hohen Affinität für Neuroblastoma. Szintigrafien mit ^{131}I-chCE7 von Neuroblastoma-Patienten zeigten eine hohe Aufnahme des Antikörpers in Metastasen. Auf Neuroblastomazellen und auf einer Nierenkarzinomzellinie (Föhn) erkennt der Antikörper ein 200 kDa Zelloberflächenprotein.

Das Antigen wurde durch Immunaffinitätschromatographie aus Zellextrakten von $2x10^8$ Zellen (SK-N-BE(2)c und Föhn) gereinigt. Antigen-positive Fraktionen wurden immunpräzipitiert und mit SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Bande, die dem Antigen entsprach, wurde aus Western Blots (PVDF-Membran) ausgeschnitten und, nach Deblockierung des N-Terminus, wurden fünfzehn bzw. achtzehn Aminosäuren (SK-N-BE(2)c respektiv Föhn) des N-terminalen Teiles des Proteins sequenziert.

Sequenzvergleiche in den Datenbanken identifizierten das „chCE7-Antigen" als ein L1-CAM homologes Protein. L1-CAM ist eine Zelladhäsionsmolekül, das eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von foetalem Gehirn spielt. Mutationen im L1-CAM Gen sind mit schweren neurologischen Pathologien verbunden, die unter dem Namen CRASH-Syndrom zusammengefasst werden.

Das Protein, welches mittels mAk chCE7 gereinigt wurde, war gekennzeichnet durch eine Deletion von fünf Aminosäuren am N-Terminus, die auf dem L1-Gen einer Deletion vom Exon 2 entsprach. Partielle Klonierung durch RT-PCR mit L1-spezifischen Primers zeigte, dass in Neuroblastomazellen die beiden Isoformen, die „full-lenght" Form und die Form mit einer Deletion sowohl im Exon 2 als auch im Exon 27 vorhanden waren. Weitere Nierenkarzinomzellen wurden auch auf die Expression von L1-CAM getestet: fünf von sechs waren positiv und enthalten nur die deletierte Isoform. Nur eine sehr schwache Reaktion konnte nachgewiesen werden wenn normales erwachsenes Nierengewebe analysiert wurde, hingegen eine starke Reaktion mit dem normalen Hirn-Cortex Gewebe wurde nachgewiesen. Zusätzlich wurden auch fünfzehn Nierentumorgewebe verschiedenen Ursprungs getestet: fünf davon waren positiv.

Northern blot Analysen zeigten, dass es in den Tumorzellen eine Korrelation zwischen Protein- und mRNA-Expression existiert. L1-CAM mRNA wurde ebenso in normale Geweben wie Hirn, Nieren, Dünndarm, Magen und Plazenta gefunden. Hingegen, in Herz, Leber, Kolon, Milz, Lungen, Muskel und Hoden konnte kein L1-CAM mRNA nachgewiesen werden.

Ein Teil der Nierentumoren zeigt genetische Aberrationen in Chromosom Xq28, wo das L1-CAM Gen lokalisiert ist. Analysen von weiteren Nierentumorgeweben sind vorgesehen, um eine mögliche Korrelation zwischen genetischen Veränderungen in diesen Tumoren und Veränderungen der L1-CAM-Expression zu untersuchen. Weitere Untersuchungen über eine mögliche diagnostische und/oder therapeutische Anwendung von chCE7 bei gewissen Nierentumoren zusätzlich zu der Anwendung bei Neuroblastoma werden folgen. Eine weitere biochemische Charakterisierung der gefundenen L1-CAM Isoformen soll Aufschluss geben, ob diese Proteine tumorspezifische Determinanten aufweisen und wie ihre Expression auf Tumorzellen reguliert wird.

Riassunto

Il chCE7 è un anticorpo monoclonale chimerico con un'alta affinità per il neuroblastoma. Le scintigrafie con ^{131}I-chCE7 effettuate su pazienti affetti da neuroblastoma mostrano una forte accumulazione dell'anticorpo nelle metastasi. Sia sulle cellule del neuroblastoma che sulla linea cellulare di carcinoma renale Föhn, l'anticorpo riconosce una proteina di superficie da 200 kDa.

L'antigene è stato parzialmente purificato tramite cromatografia di affinità da estratti di circa 200 milioni di cellule (SK-N-BE(2)c e Föhn). Le frazioni trovate positive all'antigene sono state immunoprecipitate e, tramite SDS-PAGE, separate in condizioni riducenti. Successivamente sono state transferite su di una membrana di tipo PVDF. Le bande corrispondenti all'antigene sono state ritagliate dalla membrana e, dopo lo sbloccaggio chimico del N-terminus, da quindici (SK-N-BE(2)c) a diciotto aminoacidi (Föhn) a partire dal N-terminus della proteina sono stati sequenziati.

Confrontando la sequenza ottenuta con quelle presenti nelle banche dati, è stato possibile identificare l'antigene dell'anticorpo chCE7 come una proteina omologa alla molecola di adesione cellulare L1 (L1-CAM). La L1-CAM svolge un importante ruolo nello sviluppo del cervello del feto. Mutazioni del gene della L1-CAM provocano gravi patologie neurologiche che sono riassunte sotto il nome di sindrome di CRASH.

La proteina, purificata tramite l'anticorpo chCE7, mostra una delezione di cinque aminoacidi nella regione del N-terminus, questa corrisponde ad una delezione del secondo exone del gene della L1-CAM. La clonanzione parziale del gene della L1-CAM, tramite RT-PCR con primers specifici, ha mostrato la presenza, nelle cellule del neuroblastoma di entrambe le isoforme della L1-CAM, cioè sia la forma originale che quella con delezioni del secondo e del ventisettesimo exone.

Le cellule di sei divarsi tipi di carcinoma renale sono state esaminate sull'espressione della L1-CAM. Cinque esprimono la L1-CAM, ma soltanto l'isoforma con entrambe le delezioni. Una debole reazione con l'anticorpo è stata rilevata all'analisi di normale tessuto renale umano, mentre col normale tessuto cerebrale umano la reazione è stata molto più marcata. Altri quindici tessuti tumorali renali di origine diversa sono stati esaminati: un terzo ha reagito con l'anticorpo.

Le analisi tramite il Northern blot hanno rilevato che, nelle cellule tumorali, esiste una correlazione tra l'espressione della proteina e quella del RNA messaggero. Il mRNA della L1-CAM è presente nei tessuti normali umani del cervello, rene, intestino tenue, stomaco e placenta. Per contro, non ce n'era traccia nei tessuti del cuore, fegato, colon, milza, polmone, muscolo e testicoli.

Alcuni tumori renali presentano aberrazioni genetiche sul cromosoma Xq28, dove è localizzato il gene della L1-CAM. L'analisi di ulteriori tessuti tumorali renali sarà necessaria per poter individuare una possibile correlazione tra le modificazioni genetiche in questi tumori e le variazioni dell'espressione della L1-CAM. Al fine di poter prendere in cosiderazione un'eventuale applicazione dell'anticorpo chCE7 nella diagnostica e nella terapia di alcuni tumori renali, così come è stato fatto per il neuroblastoma, ulteriori analisi saranno necessarie. Una migliore caratterizzazione biochimica delle diverse isoforme della L1-CAM fornirebbe ulteriori informazioni, e, in particolare, se queste proteine sono caratterizzate da specifici determinanti tumorali e come la loro espressione è regolata nelle cellule tumorali.