

Universitätsklinikum des Saarlandes und Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes

Innere Medizin I – Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie & Rheumatologie
Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Stephan Stilgenbauer

Antigene zur B-Zellrezeptor-gerichteten Therapie des diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
„Doktorin der Medizin“ der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES**

2020

Vorgelegt von

Natalia Quiroga Arauco

Geboren am 20.04.1991 in La Paz, Bolivien

Tag der Promotion: 26.02.2021

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

Berichterstatter: Priv. -Doz. Dr. Frank Neumann

Prof. Dr. Norbert Graf

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	<i>I</i>
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	<i>IV</i>
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>VII</i>
1 Zusammenfassung	8
2 Summary	9
3 Einleitung	10
3.1 <i>Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL)</i>	<i>10</i>
3.2 <i>Targeted Therapy</i>	<i>12</i>
3.2.1 <i>ABC-DLBCL und Targeted Therapy</i>	<i>13</i>
3.2.2 <i>BARs: B-Zell-Rezeptorantigene zum reversen Targeting von Tumoren</i>	<i>14</i>
3.2.3 <i>Spezifische Antigene von Rezeptoren maligner B-Zellen</i>	<i>14</i>
3.2.4 <i>Für die Studie ausgewählte BARs</i>	<i>19</i>
3.3 <i>Die Maus als Versuchstier</i>	<i>20</i>
3.3.1 <i>Die SCID/beige-Mäuse</i>	<i>21</i>
3.3.2 <i>Tumormodell: Subkutane Inokulation humaner Tumorzellen</i>	<i>21</i>
3.3.3 <i>Matrigel</i>	<i>22</i>
3.4 <i>Positronen-Emissions-Tomographie / Computertomographie</i>	<i>23</i>
4 Ziele der Arbeit	25
5 Materialien und Methoden	26
5.1 <i>Materialien</i>	<i>26</i>
5.1.1 <i>Geräte und Instrumente</i>	<i>26</i>
5.1.2 <i>Lösungen und Chemikalien</i>	<i>27</i>
5.1.3 <i>Pharmaka und molekularbiologisch hergestellte Konstrukte</i>	<i>28</i>
5.1.4 <i>Zelllinien</i>	<i>29</i>
5.2 <i>Methoden</i>	<i>29</i>
5.2.1 <i>Zellkultur</i>	<i>29</i>
5.2.2 <i>Bestimmung der Zellzahl</i>	<i>30</i>

5.2.3	<i>In vitro</i> Experimente: Zytotoxizitäts Assay	30
5.2.4	Aufarbeitung von DLBCL-Zelllinien zur Applikation in SCID/beige-Mäuse ..	33
5.2.5	BARs.....	34
5.2.6	<i>In vivo</i> Experimente	34
5.2.7	Etablierung des Tumormodells	37
5.2.8	Behandlung der Tiere mit ARS2-BAR.....	38
5.2.9	Behandlung mit einer höheren Dosis.....	39
5.2.10	PET/CT- Untersuchung.....	40
5.2.11	Statistik und Fotobearbeitung	41
6	Ergebnisse	42
6.1	Zytotoxizitätsassay.....	42
6.1.1	Test gegen OCI-Ly3 und HBL-1	42
6.1.2	Test gegen U2932 und TMD-8	43
6.2	Ergebnisse des <i>in vivo</i> Tumormodells	46
6.2.1	Etablierung des Tumormodells	46
6.2.2	Erste Applikation der BAR-Toxine	58
6.3	Zweite Applikation der BAR-Toxine	61
6.3.1	PET-CT- Untersuchung	62
7	Diskussion	65
7.1	Einordnung der Ergebnisse	65
7.1.1	Mögliche Einflüsse der eingesetzten Methoden	65
7.1.2	Möglicher Einfluss der eingesetzten <i>in vitro</i> Nachweismethode der Zytolyse 65	
7.1.3	<i>In vivo</i> Tests der BARs im Mausmodell	66
7.1.4	Beurteilung des Tumorwachstums.....	67
7.2	Nachweis und Charakterisierung der Wirkung des ARS2-BAR <i>in vitro</i>	67
7.2.1	<i>In vitro</i> Versuche	67
7.2.2	<i>In vivo</i> Versuche	69

7.2.3	<i>PET-Versuche</i>	72
7.3	<i>Therapeutische Optionen für BARs</i>	74
7.4	<i>Schlussfolgerung</i>	77
8	<i>Literaturverzeichnis</i>	78
9	<i>Publikationen</i>	84
10	<i>Danksagung</i>	85

Abkürzungsverzeichnis

aalPI	engl: Age adapted International Prognostic Index, deutsch: altersadaptierter internationaler Prognostischer Index
ABC	engl: Activated B-Cell, deutsch: Aktivierter B-Zell
ATP	Adenosintriphosphat
ARS2	Arsenite Resistance Protein 2
BAR	B-Zell-Rezeptorantigene zum reversen Targeting
BCR	engl: B-Cell-Receptor, deutsch: B-Zell-Rezeptor
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CAR	engl: Chimeric-Antigen-Receptor, deutsch: Chimäre Antigenrezeptoren
CDX	engl: Cell-line Derived Xenograft, deutsch: Xenograft aus Zelllinie
CHOP	Polychemotherapie Schema bestehend aus Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon
CML	Chronische Myeloische Leukämie
CT	Computertomographie
d	Tag
d. h.	das heißt
DLBCL	Diffus Großzelliges B-Zell-Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraessigsäure
ECOG	European Cooperative Onkology Group-Score
ETA	Exotoxin A von Pseudomonas Auriginosa
F	Fluor
Fab	engl: Fragment Antigene-binding, deutsch: Antigen bindendes Fragment
FCS	Fetales Kälberserum

FDG	Fluordesoxyglucose
G	Gewichtskraft
Ga	Gallium
GCB	Keimzentrum B-Zelle(n)
GEP	Genexpressionsprofile
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
HWZ	Halbwertszeit
I	Jod
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie
INT	Iodonitrotetrazoliumchlorid
i. p.	Intraperitoneal
IPI	International Prognostic Index
i. v.	Intravenös
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Maus
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
NCCN-IPI	Enhanced International Prognostic Index
NF κ B	engl: Nuclear Factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-Cells
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen

nm	Nanometer
NOS	engl: Not Otherwise Specified
NRBI	Neurabin-I
o. g.	Oben genannt
PAS	Pro-Ala-Ser
PBMC	englisch: Peripheral Blood Mononuclear Cells deutsch: Mononukläre Zellen des peripheren Bluts
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PEG	Polyethylenglykol
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
R-CHOP	Polychemotherapie Schema bestehend aus CHOP und Rituximab
RPMI	Roswell Park Memorial Medium
s	Sekunde
SCID	Severe combined Immunodeficiency
scFv	engl. Single chain variable Fragment
TCR	T-Zell-Rezeptor
u. a.	Unter anderem
V	Volumen
v. a.	Vor allem
vs.	Versus
z. B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vorwärts vs. Rückwärtstargeting.	17
Abbildung 2: Wirkungsprinzip der BAR-Toxine.	18
Abbildung 3: Pipettierschema des Zytotoxizitätssassays gegen OCI-Ly3 und HBL-1. ..	32
Abbildung 4: Pipettierschema des Zytotoxizitätssassays gegen U2932 und TMD-8.	33
Abbildung 5: Subkutane Inokulation der Tumorzellen.	36
Abbildung 6: Zeitschema des Versuchs zur Etablierung des Tumormodells.	38
Abbildung 7: Zeitschema des ersten Versuchs zur Behandlung mit den BARs.	39
Abbildung 8: Zeitschema des zweiten Versuchs zur Behandlung mit den BARs.	40
Abbildung 9: Zeitschema der PET/CT-Untersuchung.	41
Abbildung 10: Ergebnis des Zytotoxizitätssassays gegen OCI-Ly3 und HBL-1.	43
Abbildung 11: Ergebnis des Zytotoxizitätssassays gegen U2932 und TMD-8.	44
Abbildung 12: Vergleich der Sensitivität gegen das ARS2-BAR-Toxin der eingesetzten ARS2-spezifischen Zelllinien.	45
Abbildung 13: Histologische Färbung der Tumoren.	46
Abbildung 14: Tumorwachstumskurve der mit OCI-Ly3-Zellen inokulierten Tiere.	48
Abbildung 15: Tumorwachstumskurve der mit U2932-Zellen inokulierten Tiere.	49
Abbildung 16: Tumorwachstumskurve der mit HBL-1-Zellen inokulierten Tiere.	50
Abbildung 17: Tumorwachstumskurve der mit TMD-8-Zellen inokulierten Tiere.	51
Abbildung 18: Unterschiede von Tier zu Tier in der OCI-Ly3-Kohorte.	52
Abbildung 19: Unterschiede von Tier zu Tier in der U2932-Tierkohorte.	53
Abbildung 20: Varianz von Tier zu Tier in der HBL-1-Kohorte.	54
Abbildung 21: Varianz von Tier zu Tier in der TMD-8- Kohorte.	55
Abbildung 22: Unterschied des Tumorwachstums der vier Zelllinien.	56
Abbildung 23: Wachstumskurve der mit ARS2-BAR-Toxin oder NRBI-BAR-Toxin behandelten Tiergruppen.	59
Abbildung 24: Zwei mit OCI-Ly3-Zellen inokulierte Mäuse am Tag des Versuchsabbruchs.	60
Abbildung 25: Volumina der OCI-LY3-Tumoren der mit ARS2-BAR-Toxin oder NRBI-BAR-Toxin behandelten Mäusen.	62
Abbildung 26: Ergebnisse der PET-CT Untersuchung:	63
Abbildung 27: Zeit/Aktivitäts-Diagramme der Nieren, des Blutpools über dem Herz und der Tumoren.	64
Abbildung 28: Alternative Gestaltungsmöglichkeiten der BARs zum therapeutischen Einsatz.	76

1 Zusammenfassung

Mit der Einführung der Targeted Therapy wurde eine neue Ära der Krebsbehandlung eingeleitet und der Schwerpunkt der Forschung wurde weg von den klassischen Zytostatika in Richtung neuer, personalisierter Therapiestrategien verlagert. Die prominentesten Vertreter dieser neuen Therapeutika sind die monoklonale Antikörper, die spezifisch Antigene auf der Oberfläche von ihren Zielzellen binden. Dadurch wird eine Signalkaskade ausgelöst, die zur Zerstörung der Zielzelle durch andere Komponenten des Immunsystems führt.

Durch die Identifizierung und Charakterisierung Tumor-spezifischer Antigene in unserem Labor, konnten erstmals molekulare Targets definiert werden, die die Basis eines neuen Therapiekonzepts bilden. Dabei handelt es sich um B-Zellrezeptor-Antigene zum Reversen Targeting von Tumoren, kurz BARs genannt. Beim reversen Targeting ist der B-Zell-Rezeptor als membranständiges Immunglobulinmolekül das Ziel (engl. Target) einer Antigen-gebundenen zytotoxischen Substanz. Nur die B-Zellen, deren BCRs das Antigen spezifisch binden, werden von den BAR-Toxinen angegriffen. Gegenüber dem klassischen vorwärts-Targeting gewährleisteten BARs erstmals, dass die Behandlung sich ausschließlich gegen die malignen Zellen richtet.

Ziel dieser Arbeit war es, die Durchführbarkeit einer BAR-Therapie als „Proof-of-Principle“ Studie zu untersuchen. Für die erste Umsetzung eines BAR-Toxins wurde ein Epitop aus dem ARS2-Antigen mit dem Exotoxin A von *Pseudomonas Aeruginosa* als zytotoxische Komponente gekoppelt. Die zytotoxische Wirkung dieses ARS2-BAR-Toxins wurde zunächst mit Hilfe eines Zytotoxizitätsassay *in vitro* getestet. Die *in vitro* Ergebnisse zeigten eine spezifische, konzentrationsabhängige Zytolyse ausschließlich der Zellen, deren BCRs das ARS2-Antigen binden. Um die Wirksamkeit des ARS2-BAR-Toxins *in vivo* zu untersuchen, wurden SCID/beige-Mäuse mit Zellen eines B-Zell-Lymphoms, deren BCRs ARS2-spezifisch erkennen, inokuliert. Anschließend wurden die Volumina der resultierenden Tumoren gemessen. Durch intravenöse Applikation von 16 µg BAR-Toxin am Tag 6 nach Tumorzell-Inokulation, konnte ein statistisch signifikant langsames Wachstum der Tumoren im Vergleich zur Kontrollkohorte erzielt werden. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der Arbeit eine prinzipielle Eignung von BAR-Toxine als absolut tumorselektive Immuntherapeutika der neusten Generation zur Behandlung von B-Zell-Malignitäten.

2 Summary

The introduction of Targeted Therapy ushered in a new era of cancer treatment, and the focus of research shifted away from traditional cytostatic drugs towards new personalized therapeutic strategies. The most prominent representatives of these new therapeutics are monoclonal antibodies that specifically bind antigens on the surface of their target cells. This triggers a signaling cascade that finally leads to the destruction of the target cells by further components of the immune system.

By identifying and characterizing tumor-specific antigens in our laboratory, molecular targets could be defined for the first time, which build the basis for a new kind of immunotherapy.

These are B-cell receptor antigens for reverse targeting of tumors, or BARs for short. In reverse targeting, the B-cell receptor as a membrane-bound immunoglobulin molecule is the target of an antigen-bound cytotoxic substance. Only those B cells, whose BCR specifically bind the antigen, are attacked by the BAR-toxins. In contrast to classical forward targeting, BARs guarantee for the first time that the treatment is directed exclusively against the malignant cells.

The aim of this work was to investigate the feasibility of a BAR-Toxin therapy as a "proof-of-principle" study. For the first implementation of a BAR-toxin, an epitope from the ARS2 antigen was coupled with Exotoxin A from *Pseudomonas Aeruginosa* as cytotoxic component. The cytotoxic effect of this ARS2-BAR toxin was first tested *in vitro* by means of cytotoxicity assays.

The *in vitro* results showed a specific, concentration-dependent cytolysis exclusively of cells whose BCR bind the ARS2 antigen. To investigate the efficacy of the ARS2-BAR-toxin *in vivo*, SCID/beige-mice were inoculated with cells of a B-cell lymphoma whose BCRs recognize ARS2 specifically. Subsequently the volumes of the resulting tumors were measured. By intravenous application of 16 µg BAR toxin on day 6 after tumor cell inoculation, a statistically significant growth inhibition of the tumors was achieved in comparison to the control cohort.

In summary, the results of the work confirm the basic suitability of BAR-toxins as absolutely tumor-selective immunotherapeutics of the latest generation for the treatment of B-cell malignancies.

3 Einleitung

3.1 Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL)

Die malignen Lymphome sind eine heterogene Gruppe neoplastischer Erkrankungen, die ihren Ursprung in Zellen des lymphatischen Systems (Lymphozyten) haben. Man unterscheidet zwischen Hodgkin- (charakterisiert durch den histologischen Nachweis von Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen) und Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL). Non-Hodgkin-Lymphome werden in B- und T-Zell-Lymphome unterteilt, wobei das betroffene Reifungsstadium darüber entscheidet, ob ein aggressives oder ein indolentes Lymphom entsteht. Beim diffus großzelligen B-Zell-Lymphom handelt es sich um ein aggressives, hoch malignes Lymphom, das sowohl in den lymphatischen (Lymphknoten, Milz, Knochenmark) als auch in den extralymphatischen Organen (Zentralnervensystem (ZNS), gastrointestinales System, Lunge) entstehen kann. Epidemiologisch betrachtet, ist es mit einem Anteil von 30 % das häufigste NHL, wobei die Inzidenz in Europa 3-4 Neuerkrankungen pro 100.000 Bewohner in einem Jahr beträgt (Pfreundschuh, 2016). Trotz hoher Aggressivität ist das DLBCL prinzipiell in jedem Stadium heilbar. Klinisch führen die schnelle Vermehrung und Ansammlung der entarteten Lymphozyten zu schmerzlosen, in Größe zunehmenden Lymphknoten und Splenomegalie. Das Knochenmark kann ebenfalls durch die malignen Zellen befallen und verdrängt werden, was eine Anämie (mit Müdigkeit, und Abgeschlagenheit), Leukopenie (mit Infektanfälligkeit) und Thrombozytopenie (mit Blutungsneigung) als Folge haben kann. Die sogenannte „B-Symptomatik“ wird durch Fieber ($>38\text{ °C}$), extremer Nachtschweiß und ungewollter Gewichtsverlust ($>10\%$ des Körpergewichts innerhalb 6 Monaten) charakterisiert und ist als prognostisch ungünstig zu betrachten.

Histologisch unterteilt man das DLBCL anhand seiner Ursprungszelle („cell of origin“) mit Hilfe von Genexpressionsprofilen (GEP). Man unterscheidet zwischen Keimzentrumstyp (Germinal Center B-Cell, GCB), Aktivierter-B-Zell-Typ (ABC), und solchen DLBCL, die zu keiner der beiden Kategorien zugeordnet werden können (unklassifizierbar). Diese werden dann als „Not Otherwise Specified“ (NOS) bezeichnet. Beide Hauptuntergruppen unterscheiden sich bezüglich ihrer zu Grunde liegenden chromosomalen Aberrationen, Signalwegen und Prognosen. (Swerdlow et al., 2016).

Der International Prognostic Index (IPI) wurde im Jahre 1993 entwickelt und basiert auf den klinischen Charakteristika von 1.000 Patienten, die die damalige Standard Polychemotherapie mit Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednisolon (CHOP) bekamen

(International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors, 1993). Der IPI berücksichtigt fünf Faktoren, die einen negativen Einfluss in der Prognose haben: Das Alter des Patienten (> 60 Jahre), seinen Allgemeinzustand (quantifiziert nach dem European Cooperative Oncology Group-Score (ECOG), ECOG-Status > 1), einen erhöhten prä-therapeutischen Laktatdehydrogenase (LDH) Spiegel, ein fortgeschrittenes Ausbreitungsstadium nach der Ann-Arbor-Klassifikation (Stadien III und IV) und mehr als einen extralymphatischen Befall. Bei Patienten bis 60 Jahre wird meistens der altersadaptierte IPI angewandt (aaIPI), welcher die Anzahl extranodaler Befälle nicht berücksichtigt. Für jeden zutreffenden Risikofaktor wird ein Punkt vergeben und anschließend werden alle Punkte addiert.

Tabelle 1: Risikofaktoren des Internationalen Prognostischen Index (IPI)

Risikofaktor	Punkte
Alter > 60 Jahre	1
LDH > 1-fache des Normwerts	1
Ann-Arbor Stadium III / IV	1
Extralymphatischer Befall > 0	1
ECOG > 1	1

Der IPI eines Patienten wird berechnet, in dem für jeden erfüllten Risikofaktor ein Punkt vergeben wird und anschließend alle Punkte addiert werden. Je nach ermitteltem IPI erfolgt dann die Einteilung in verschiedenen Risikogruppen.

Nach der Anzahl der bei Diagnosestellung vorhandenen Risikofaktoren, werden vier Risikogruppen unterschieden: niedriges Risiko bei IPI = 0-1 (aaIPI = 0), intermediär-niedriges Risiko bei IPI = 2 (aaIPI = 1), intermediär-hohes Risiko bei IPI = 3 (aaIPI = 2) und hohes Risiko bei IPI = 4-5 (aaIPI = 3). Die prognostische Relevanz des IPIs liegt in der unterschiedlichen 5-Jahres-Überlebensrate der vier Risikogruppen. Die 5-Jahres-Überlebensrate bezeichnet den Anteil an Patienten einer bestimmten Erkrankung, die 5 Jahre nach Diagnosestellung noch am Leben sind. Diese beträgt 73 % für die Patienten der niedrigen Risikogruppe (IPI = 0-1), 51 % für die Patienten der niedrig-intermediären Risikogruppe (IPI = 2), 43 % für die Patienten

der hoch-intermediären Risikogruppe (IPI = 3) und 26 % für die Patienten der hohen Risikogruppe (IPI = 4-5) (International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors, 1993). Außerdem sind andere, IPI unabhängige Risikofaktoren mittlerweile ermittelt worden. Dazu zählen eine große Tumormasse von > 7,5 cm (auch als „bulky disease“ bezeichnet), die doppelte Expression der MYC- und BCL2-Proteine, sowie ein Bruch in dem -MYC oder BCL2-Gen (Pfreundschuh, 2016). „Double Hits“ oder Doppelbrüche in MYC und BCL-2 und der ABC-DLBCL-Typ werden noch kontrovers als weitere mögliche Risikofaktoren diskutiert, da beide mit einer deutlich schlechteren Prognose assoziiert sind (Nowakowski and Czuczman, 2015; Pfreundschuh, 2012). Gleichzeitig bieten diese Gene und Proteine jedoch neue Zielstrukturen für die Entwicklung zielgerichteter Therapiestrategien.

Aktuell erfolgt die Behandlung des DLBCLs an den IPI des Patienten angepasst und hat als Basis eine Polychemotherapie mit CHOP und Rituximab (R-CHOP), sowie eine begleitende Infektionsprophylaxe (Pfreundschuh, 2016). Etwa 40 % der mit R-CHOP behandelten Patienten erleben trotz den verbesserten Therapiemöglichkeiten ein Rezidiv oder entwickeln eine primär refraktäre Erkrankung, was in den meisten Fällen zum Versterben der Patienten führt. Besonders der ABC-Subtyp des DLBCLs zeigt kein gutes Ansprechen auf die R-CHOP Therapie und sollte anders therapiert werden als der GCB-Subtyp (Nowakowski and Czuczman, 2015). Aus diesem Grund wird zurzeit intensiv im Bereich der „Targeted Therapy“ geforscht, um den Patienten in der Zukunft eine personalisierte, an dem zugrundeliegenden Pathomechanismus adaptierte Behandlung anbieten zu können.

3.2 Targeted Therapy

In der Onkologie ist die hohe Toxizität konventioneller Chemotherapeutika ein Therapie-limitierender Faktor. Grund dafür ist, dass die Zytotoxizität klassischer Zytostatika sich nicht spezifisch gegen bösartig entarteten Zellen richtet. Stattdessen werden alle (auch physiologisch) sich schnell teilenden Zellen angegriffen, was eine sehr geringe therapeutische Breite als Folge hat. Im Rahmen der Targeted Therapy (gezielten Krebstherapie), werden molekulare Strukturen als Angriffsziele neuer Arzneistoffe verwendet, sodass nur die Zellen geschädigt werden, die solche Zielstrukturen aufweisen. Dadurch kann eine höhere Therapiewirksamkeit und eine bessere Verträglichkeit erreicht werden (Baudino, 2015). Diese Target-spezifische Krebstherapeutika können in zwei Hauptgruppen unterteilt werden: Small molecules (kleine Moleküle) und monoklonale Antikörper.

Small molecules sind niedermolekulare (< 800 Dalton) organische Verbindungen, die entworfen werden um bestimmte Signalwege im Zellinneren zu stören (Joo et al., 2013). Ein

gutes Beispiel ist Imatinib, ein Tyrosinkinase-Inhibitor, der die Behandlung der Chronischen Myeloischen Leukemie (CML) nach seiner Einführung im Jahr 2001 revolutionierte. Pathophysiologisch liegt der CML (u. a.) eine Translokation zwischen Gen 9 und 22 zugrunde, die zur Entstehung des sogenannten „Philadelphia Chromosom“ führt. Das auf dieser Weise entstandenen Fusionsgen „BCR-ABL“, kodiert für eine fehlerhafte Tyrosinkinase mit gesteigerter Aktivität, die gleichzeitig die Apoptose hemmt und die Zellproliferation steigert. Dies kann zur Entstehung unterschiedlicher Neoplasien (hauptsächlich CML, aber auch ALL und andere Erkrankungen) führen. Durch Hemmung dieser fehlerhaften Tyrosinkinase mittels Imatinib ist häufig eine Remission zu erzielen (Ben Abdelwahed et al., 2013).

Monoklonale Antikörper dagegen sind Makromoleküle, die rekombinant hergestellt werden, um gezielt Antigene zu erkennen. Der erste monoklonale Antikörper, der zur Behandlung von Krebs zugelassen wurde, war im Jahr 1997 Rituximab. Dieser bindet an Zellen, die das CD20-Antigen an ihrer Oberfläche exprimieren (B-Lymphozyten) und richtet das körpereigene Immunsystem gegen diese (Weiner, 2010). Es ist einer der prominentesten Vertreter der Targeted Cancer Therapy und heutzutage fester Bestandteil der Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen.

3.2.1 ABC-DLBCL und Targeted Therapy

Die neuen Erkenntnisse bezüglich der Pathomechanismen, die zur Entstehung des DLBCLs führen, haben die Identifikation mehrerer neuer spezifischer Targets ermöglicht, die therapeutisch genutzt werden können.

Der Nuclear Factor “kappa-light-chain-enhancer” of activated B-Cells (NF κ B) ist ein Transkriptionsfaktor, der viele Prozesse der Immunantwort wie Zytokinsekretion, Zellproliferation, Apoptose und Angiogenese reguliert. Die Deregulierung und konstitutive Aktivierung des NF κ B Signalweges spielt eine zentrale Rolle in der Entstehung des ABC-DLBCL-Subtyps und ist für das Überleben der entarteten Zellen notwendig. Die Wirksamkeit mehrerer neuer Therapeutika, die sich gegen molekulare Zielstrukturen des NF κ B-Signalweges richten, ist bereits bestätigt worden (Roschewski et al., 2012). Dazu zählen der Proteasom-Inhibitor Bortezomib (Dunleavy et al., 2009) und der Immunmodulator Lenalidomid (Yang et al., 2012).

Ebenso eine wichtige Rolle spielen Mutationen des B-Zell-Rezeptors, die in ABC-DLBC-Zellen zu chronisch aktiver und Antigen-unabhängiger BCR-Signalgebung führen. Diese ist Voraussetzung für das Überleben der entarteten Zellen. Small molecules, die Schlüssel-Tyrosinkinasen dieses Signalwegs inhibieren, sind entwickelt worden (Davis et al., 2010).

Ibrutinib, zum Beispiel, inhibiert die Bruton-Tyrosin-Kinase und hat sich als besonders vielversprechender neuer Wirkstoff herausgestellt (Advani et al., 2013).

Diese Beispiele stellen nur einige der vielen neuen Wirkstoffen dar, die aktuell erforscht und getestet werden. In der Zukunft wird sich die Behandlung des DLBCLs immer mehr an personalisierten Therapiestrategien orientieren.

3.2.2 BARs: B-Zell-Rezeptorantigene zum reversen Targeting von Tumoren

Die Aktivierung von B-Lymphozyten erfolgt durch die Bindung eines nativen Antigens an den B-Zell-Rezeptor (engl. BCR). Der BCR besteht aus einem membranständigen, antigenbindenden Immunglobulinmolekül (IgM, IgG, IgA, IgE oder IgD) und den zwei Transmembranproteinen CD79A und CD79B, die für die Signaltransduktion nach Antigen-Bindung an die nachgeordneten, intrazellulären Instanzen des Signalweges verantwortlich sind. Wenn Antigene an den BCR binden, wird durch diesen Multiproteinkomplex die Endozytose der rezeptorgebundenen Antigene vermittelt. Anschließend wird das Antigen in der Zelle durch Proteolyse gespalten. Die entstandenen Antigenpeptidfragmente werden in MHC-II-Moleküle eingebunden und als Peptid/MHC-II-Komplex auf der B-Zell-Oberfläche den T-Helferzellen präsentiert. Die so stimulierte T-Helferzelle stellt alle weiteren (ko-)stimulatorischen Komponenten (Zytokine, kostimulatorischen Rezeptoren bzw. Liganden), zur Induktion einer maximalen B-Zell-Reaktion bereit. In deren Verlauf proliferieren die B-Zellen umso stärker, je höher die Antigen-Affinität ihres BCR ist. Während der Expansion kommt es dann durch somatische Hypermutationen im BCR-Gen zu einer fortschreitenden Optimierung des BCR. Letztlich gewährleistet diese Strategie die Selektion maximal Antigen-affiner B-Zell-Klone. Am Ende ihrer Entwicklung erreicht die B-Zelle dann das Stadium einer Antikörperproduzierenden Plasmazelle oder einer Memory-B-Zelle, die nach erneutem Antigen-Kontakt eine unverzügliche Reaktion gegen das entsprechende Antigen induzieren kann.

Es wird schon lange angenommen, dass eine chronische Antigen-Stimulation des BCRs eine Rolle bei der Entstehung von unterschiedlichen B-Zell-Neoplasien spielt (Dameshek and Schwartz, 1959). Vor allem der ABC-DLBCL-Subtyp ist von chronisch-aktiven BCR-Signaling abhängig und die Inhibierung dieses Signalweges kann in bestimmten Patientengruppen zu einer vollständigen Remission führen (Young et al., 2015), (Davis et al., 2010).

3.2.3 Spezifische Antigene von Rezeptoren maligner B-Zellen

Um die Hypothese einer chronischen Antigen-Stimulation und deren Rolle bei der Pathogenese des DLBCLs zu untersuchen, mussten zunächst systematisch BCR-Antigene

von DLBCL-Zellen gesucht werden. Hierbei wurde nach der von Grass et al. 2011 (Grass et al., 2011) beschriebenen Methode vorgegangen. Dazu wurden aus den Genen korrespondierender Paare schwerer und leichter Immunglobulinketten, die aus der DNA von Lymphom-Biopsien isoliert und amplifiziert worden waren, rekombinante „BCRs“ in Form der entsprechenden Fabs (Antigen-bindende Fragmente) hergestellt. Alternativ wurden auch „natürliche“ Fabs durch enzymatische Abspaltung der BCRs von den DLBCL-Zellen mittels Papain gewonnen. Mit beiden Fab-Typen wurden anschließend sogenannte „Protein Screening Macroarrays“ gescreent, um Protein-Antigene zu identifizieren, an die die Fabs spezifisch binden (Thurner et al., 2020). Zwei unterschiedliche Macroarrays wurden dazu eingesetzt: eines mit einem Expressionsprofil aus humanem fötalem Hirn und eines aus aktivierten humanen Lymphozyten. Die so identifizierten DLBCL-spezifischen Antigene wurden darüber hinaus noch molekular charakterisiert. Dabei wurde v. a. die Fab(= BCR)-bindende Epitop-Region des Antigens möglichst genau bestimmt.

Die Definition und molekulare Charakterisierung der Antigene, der malignen B-Zell-Klone des DLBCL von ABC-Subtyps (→ ARS2) (Pfreundschuh et al., 2015; Thurner et al., 2020), des Mantelzell-lymphoms (→ LRPAP1) (Thurner et al., 2018a), des primären ZNS-Lymphoms (→ SAMD14 und Neurabin-1) (Thurner et al., 2018b), des folliculären Lymphoms (→ Optineurin) (Pfreundschuh et al., 2015), des nodulären Lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphoms (→ R-poc) sowie der MGUS bzw. des Multiplen Myeloms (→ SLP2, HSP90 etc.) (Grass et al., 2011; Preuss et al., 2015) in unserem Labor, erlaubt erstmals die der Pathogenese dieser Erkrankung zugrundeliegenden immunologischen Aspekte genau zu untersuchen. Darüber hinaus sind diese Antigene ideale Mittler einer neuen Form der „Targeted Therapy“ gegen Tumoren.

Wie im Kapitel 3.2 geschrieben, richtet sich die Zytotoxizität der meisten Chemotherapeutika gegen alle sich schnell teilenden Zellen. Mit der Einführung der Targeted Therapy (monoklonale Antikörper und small molecules), konnte die Zytotoxizität zum ersten Mal auf eine bestimmte Zielzellpopulation begrenzt werden. Dabei unterbinden small molecules die Proliferation der Target-Zellen durch Inhibition bestimmter Signalkaskaden, während monoklonale Antikörper ihre Wirkung nach Bindung an ihr Antigen auf der Target-Zelle entfalten.

Die Antigene maligner B-Zell-Tumoren stellen nach Kopplung an ein Effektormolekül nun gewissermaßen eine Schnittmenge dieser beiden Kategorien dar: Als Peptide sind sie nur zwischen 30 und ein paar hundert Aminosäuren lang und daher „small molecules“. Zum anderen vermitteln sie ihre Wirkung, genau wie therapeutisch eingesetzte monoklonale Antikörper, durch Antikörper/Antigen-Bindung.

Die von uns gefundenen Antigene entfalten ihre Anti-Tumorwirkung jedoch *in entgegengesetzter Richtung* zu den therapeutisch eingesetzten monoklonalen Antikörpern.

Beim bisher bekannten „forward“ Targeting sitzt das Antigen auf der Target-Zelle und der monoklonale Antikörper vermittelt die (immun-) therapeutische Wirkung. Dagegen sitzt beim „reverse“ Targeting der monoklonale BCR (= Antikörper) membranständig ausschließlich auf der malignen Target-Zelle und das Antigen kann, nach Kopplung an entsprechende Zytostatika, als Mittler einer therapeutischen Wirkung genutzt werden (**Abbildung 1**). Im Vergleich zur vorwärts gerichteten Therapie mit monoklonalen Antikörpern, bietet die rückwärts gerichtete Therapie mit BCR-spezifischen Antigenen jedoch entscheidende Vorteile. Einerseits werden BCRs mit einer sehr hohen Dichte ($1 - 2 \times 10^5$ pro Zelle) auf der Oberfläche von B-Zellen exprimiert (Yang and Reth, 2016). Dadurch sind viele Angriffsstellen gegeben und die Wahrscheinlichkeit eines therapeutischen Erfolgs ist potentiell entsprechend größer. Andererseits sind BCR-bindende Peptidepitope kleine Moleküle, die günstig hergestellt werden können und ein breites Spektrum therapeutischen Möglichkeiten bieten. Die jedoch wichtigste Eigenschaft des reversen Targetings mit BCR-spezifischen Antigenen, ist die strikt Tumor-spezifische zytotoxische Wirkung. Diese im Rahmen einer Tumorthherapie erstmals mögliche Option, verspricht eine bessere Verträglichkeit und eine deutlich niedrigere Rate an Nebenwirkungen als alle bis heute für die Klinik zugelassenen monoklonalen Antikörper. Deshalb haben wir die Antigene, die spezifisch an die BCRs maligner B-Zellen binden **BAR** genannt: **B-Zellrezeptor-Antigen** zum **Reversen Targeting**.

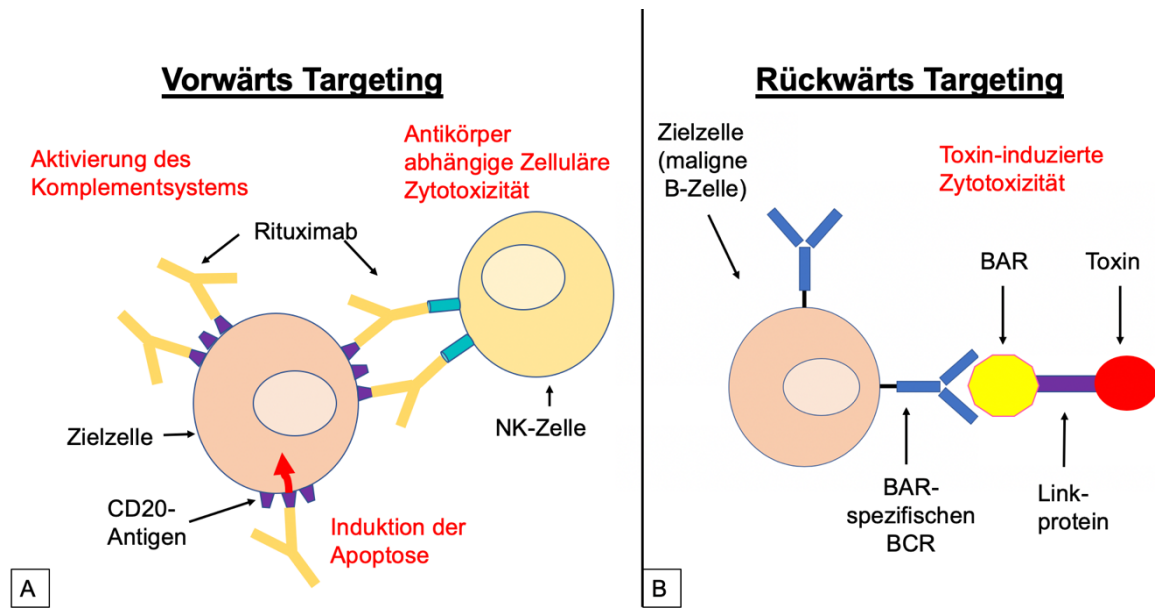


Abbildung 1: Vorwärts vs. Rückwärts-Targeting. **A:** Beim vorwärts (*forward*) Targeting dient ein Antigen als Zielstruktur eines monoklonalen Antikörpers (z.B. das CD20 Antigen ist die Zielstruktur von Rituximab). Alle Zellen, die das CD20 Antigen auf ihrer Oberfläche exprimieren werden angegriffen, d. h. auch gesunde B-Zellen. **B:** Beim Rückwärts (*reverse*) Targeting ist der B-Zell-Rezeptor als membranständiges Immunglobulinmolekül die Zielstruktur der Antigen-gebundenen zytotoxischen Substanzen. Nur die Zellen, deren BCR spezifisch das BAR (Antigen) binden, werden angegriffen (d. h. nur maligne B-Zellen). Nach diesem Prinzip wurden in unserem Labor „BARs“ von verschiedenen Antigenen entwickelt. Die BCR-bindenden Epitope aus diesen Antigenen wurden mit Hilfe eines Link-Moleküls an eine zytotoxische „Effektor“-Substanz (z. B. ein Toxin) gekoppelt. Wenn das Epitop des Antigenes an das entsprechende BCR-Paratop der entarteten B-Zelle bindet, wird das Konstrukt durch rezeptorvermittelte Endozytose internalisiert. Im Zellinneren wird daraufhin das Konstrukt proteolytisch gespalten, wodurch das Toxin freigesetzt wird und seine zytotoxische Wirkung entfalten kann (**Abbildung 2**).

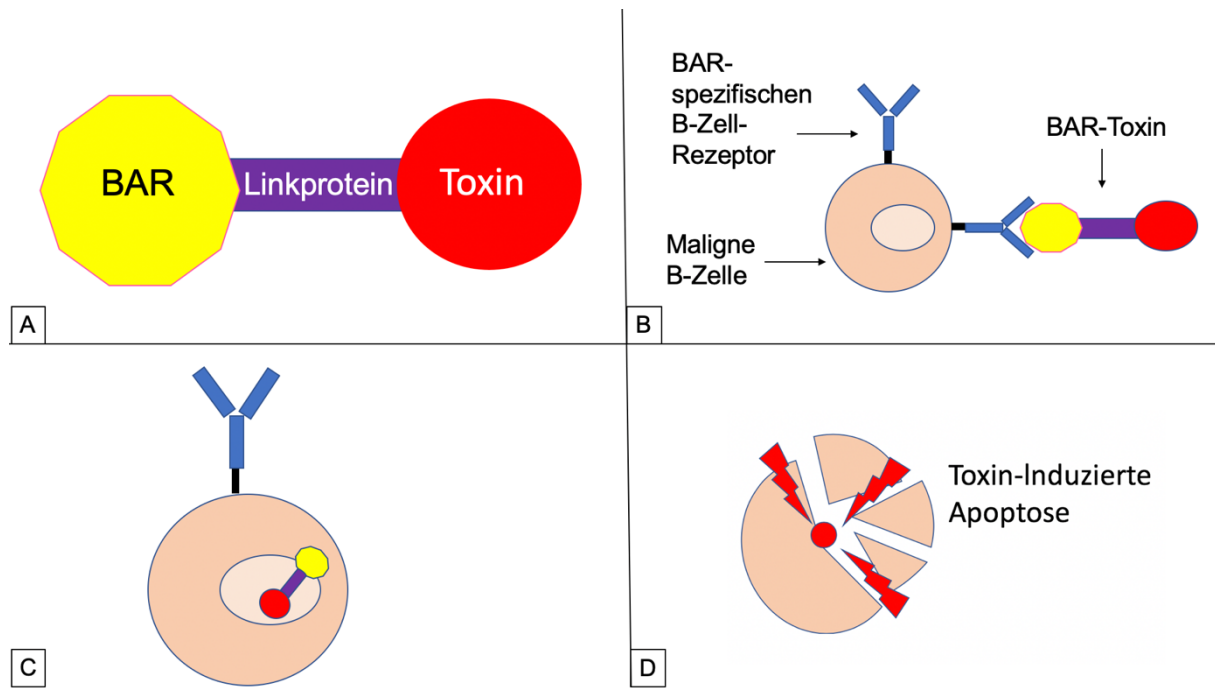


Abbildung 2: Wirkungsprinzip der BAR-Toxine. **A:** BAR-Toxine sind Konstrukte aus drei Hauptkomponenten: Dem BAR (Antigen-Epitop), einem Linker und der Effektor-Komponent (ein Toxin). Das Epitop sorgt für die Tumor-restringierte Selektivität der Therapie, da nur (maligne) Zellen, deren BCR das Antigen spezifisch bindet, angegriffen werden. Das Toxin vermittelt die zytotoxische Wirkung und der Linker koppelt beide Elemente aneinander. **B:** Der BCR der Zielzelle bindet das Antigen-Epitop des Konstrukts. **C:** Der Komplex aus BCR und BAR-Toxin wird durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle internalisiert. **D:** Das Toxin wird durch Proteolyse freigesetzt und ist nun in der Lage seine zytotoxische Wirkung in der Zelle zu entfalten.

In dieser ersten Umsetzung des BAR-Konzepts wurde als zytotoxischer Effektor das Exotoxin A von *Pseudomonas Aeruginosa* (ETA) verwendet. Dabei handelt es sich um ein wirkstarkes Toxin, welches als Bestandteil von Immuntherapeutika bereits in mehreren Studien erfolgreich eingesetzt worden ist (Barth et al., 2000; Bruell et al., 2003; Kreitman et al., 2018; Nachreiner et al., 2008). Die zytotoxische Wirkung von ETA beruht auf der Hemmung der Proteinsynthese der Zelle durch die ADP-ribosylierung des Elongationsfaktor-2 (EF-2). Als Folge steht EF-2 nicht mehr für die Proteinsynthese zur Verfügung und die Apoptose der Zelle wird eingeleitet. Um ETA im Rahmen von Immunkonjugaten einzusetzen, wird die zellbindende Domäne des Toxins durch einen unterschiedlichen Liganden (z. B einen monoklonalen Antikörper) ersetzt. Dadurch kann die Zytotoxizität des Toxins auf eine bestimmte Zellpopulation beschränkt werden (Kreitman, 2001; Nachreiner et al., 2008). In dem BAR-Konstrukt dient jedoch ein Epitop, nicht ein monoklonaler Antikörper, als zellbindende Komponente. Da ETA außerdem

ohne großen Aufwand in unserem Labor rekombinant hergestellt werden konnte, war es für den Einsatz als zytotoxische Effektor-molekül in dieser „Proof-of-Principle“ Studie besonders gut geeignet.

3.2.4 Für die Studie ausgewählte BARs

Im Rahmen der molekularen Charakterisierung der bis dato gefundenen BCR-bindenden Antigene maligner B-Zellen des ABC-DLBCLs wurde gezeigt, dass der BCR des malignen Klons von 26 % aller Patient(inn)en hypophosphoryliertes „Arsenite Resistance Protein 2“ (ARS2) spezifisch erkennt (Pfreundschuh et al., 2015; Thurner et al., 2020). Die Epitop-Region von ARS2 war in allen Fällen die gleiche (!). Deshalb kann das ARS2-Epitop für das reverse Targeting bei „ARS2-positiven“ und somit bei gut einem Viertel aller Patient(inn)en mit einem diffus großzelligen B-Zell-Lymphom vom ABC-Typ therapeutisch genutzt werden. Um die prinzipielle Umsetzbarkeit dieser neuen Therapie-Form zu prüfen, wurde im Rahmen dieser Arbeit das ARS2-BAR (ARS2-Epitop) mit Hilfe eines Linkers an das Exotoxin A von *Pseudomonas Aeurogenosa* gekoppelt und *in vitro* und *in vivo* in der Maus als ARS2-BAR-Toxin getestet.

Um die selektive Zytotoxizität der BAR-Toxine zu testen wurde ein zweites, als Negativkontrolle dienendes BAR-Toxin hergestellt. Dafür wurde entsprechend ein zweites Antigen aus unserem Repertoire ausgewählt. Das NRBI-Antigen wird von den BCRs der malignen B-Zellen von 67 % aller Patienten mit primärem ZNS-Lymphom spezifisch gebunden (Pfreundschuh et al., 2015). Selbstredend binden die ARS2-spezifischen BCRs der entsprechenden ABC-DLBCL das NRBI-Antigen nicht, wodurch das NRBI-BAR als Negativkontrolle in Tests mit ABC-DLBCL-Zellen eingesetzt werden konnte. Analog zum ARS2-BAR-Toxin wurde dazu auch das NRBI-BAR mit dem Exotoxin A von *Pseudomonas Aeurogenosa* gekoppelt (NRBI-BAR-Toxin).

3.3 Die Maus als Versuchstier

Es gibt mehrere Gründe, warum Mäuse sich historisch als Versuchstiere durchgesetzt haben. Nicht nur sind die Unterhaltskosten der Tiere relativ niedrig und ihre Fortpflanzungsfähigkeit beeindruckend, sondern Mäuse sind vor allem durch ihre phylogenetische und physiologische Ähnlichkeit zu Menschen besonders für den Einsatz in der biomedizinischen Forschung geeignet (Perlman, 2016).

Weltweit machen Mäuse 90 % der in der Forschung verwendeten Säugetiere aus (Malakoff, 2000). In Deutschland wurden im Jahre 2016 laut dem Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft 1.400.971 Versuchsmäuse für Forschungszwecke verwendet. Dies entspricht 66% aller im Jahr 2016 eingesetzten Versuchstiere (Bundesministerium für Ernährung und Wissenschaft).

Eine besondere Stelle nehmen murine Tierversuche in der pharmakologischen Forschung über neue Wirkstoffe ein. Die gute Übertragbarkeit der Ergebnisse bezüglich Dosierung und Verträglichkeit hat dazu geführt, dass in den meisten Fällen durch den Einsatz von Labormäusen eine sichere Dosis für Phase 1 Studien festgestellt werden kann (Newell et al., 1999). In der onkologischen Forschung haben murine Tumormodelle zur Identifizierung verschiedener Onkogene geführt, sowie enorm zum Verständnis vorher unbekannter pathophysiologischer Vorgänge und Signalwege beigetragen, die die Krebsentstehung begünstigen oder negativ beeinflussen können.

Schon am Anfang des 20. Jahrhunderts wurde mit speziellen Mausstämmen gearbeitet, die besonders anfällig für eine Tumorentstehung waren. Ein wichtiger Meilenstein in der Entwicklung aktueller Tumormodelle, fand im Jahr 1961 in Glasgow statt. Dort konnten aufgrund einer Spontanmutation in einem Albinomastamm thymusaplastische, unbehaarte Mäuse etabliert werden (Pantelouris, 1968). Diese Mäuse wurden fortan als Nacktmäuse bezeichnet. Da die Thymusaplasie mit einer Störung des Immunsystems einherging, wurde das Potenzial der Tiere für die Forschung der heterologen Transplantation zügig erkannt. Zehn Jahre später erfolgte zum ersten Mal die erfolgreiche Xenotransplantation eines humanen Kolonkarzinoms in eine Nacktmaus (Povlsen and Rygaard, 1971).

Die Entdeckung, dass humane Tumorzelllinien und manchmal sogar Biopsate primärer Tumoren zu progressiv wachsenden und potenziell letalen Tumoren in immundefizienten Mausstämmen führen, resultierte in der weltweiten Verbreitung von Xenograft-Tumormodellen in der Krebsforschung.

3.3.1 Die SCID/beige-Mäuse

SCID, oder „Severe Combined Immunodeficiency“, ist ein Überbegriff für eine Gruppe angeborener Erkrankungen, die mit einer Störung der zellulären Immunantwort einhergehen. Meistens handelt es sich dabei um eine Fehlfunktion oder Mangel an T-Lymphozyten, wobei je nach SCID-Form auch zusätzliche Zelllinien (z.B. B-Lymphozyten) betroffen sein können. Die Symptome, die aus der Störung der zellulären und humoralen Immunantwort resultieren, machen sich schon im Säuglingsalter bemerkbar und die Patienten leiden unter rezidivierenden opportunistischen Infektionen (vor allem der Lunge), sowie Gedeihstörungen und Entwicklungsverzögerung.

SCID ist in Menschen und Tieren beobachtet worden, wobei die SCID-Mutation in Mäusen erstmalig von Bosma et al. beschrieben wurde (Bosma et al., 1983). Durch das Fehlen reifer, funktionstüchtiger T- und B- Lymphozyten, sind homozygote SCID-Mäuse nicht in der Lage xenogene Zellen abzustößen. Dadurch sind sie besonders für die Etablierung *in vivo* Tumormodellen bestimmter menschlicher Tumorerkrankungen geeignet (Bosma et al., 1983). Die Tiere besitzen jedoch funktionsfähige Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) (Dorshkind et al., 1985), die dafür verantwortlich sein sollen, dass allogene-transplantierte hämatopoetische Zellen in SCID-Mäusen nicht überleben bzw. proliferieren können (Murphy et al., 1987).

Eine andere murine, als „beige“ bezeichnete Mutation, verursacht in Mäusen eine fehlerhafte Funktion von NK-Zellen (Roder, 1979) und zytotoxischen T-Lymphozyten (Saxena et al., 1982), sowie phänotypisch einen partiellen Albinismus. Eine dazu homologe humane Mutation des *CHS1*-Gens, führt beim Menschen zum klinischen Symptomkomplex des Chediak-Higashi-Syndroms (Spritz, 1998).

Die SCID/beige-Mauslinie vereinigt die Merkmale beider Mutationen und wurde 1990 von Croy et al. durch eine Kreuzung von CB17 SCID/SCID und C57BL/6 bg/bg Mäusen erzeugt (MacDougall et al., 1990). Die Tiere sind durch die resultierende Immunsuppression extrem infektionsanfällig, so dass sie unter speziellen Bedingungen (Specific-Pathogen-Free) gehalten werden müssen, um sie vor opportunistischen Erregern zu schützen. Aufgrund der vollständigen lymphozytären Immunsuppression eignen sich SCID/beige-Mäuse jedoch hervorragend für den Einsatz in Tierexperimenten, bei denen heterologe oder xenogene Zellen bzw. Gewebe transplantiert werden (Shibata et al., 1997; Takizawa et al., 1997).

3.3.2 Tumormodell: Subkutane Inokulation humaner Tumorzellen

Durch subkutane Implantation humaner Tumorfragmente in SCID- oder Nacktmäuse, konnten Tumormodelle für mehrere unterschiedliche Krebsarten entwickelt werden. Auch die subkutane Inokulation humaner Tumorzellen aus Zellkulturen, führt in immunsupprimierten Mäusen zur Ausbildung von Tumoren. Dies gilt für solide Tumoren, wie das Melanom

(Giovanella et al., 1972), aber auch für hämatopoetische Neoplasien, wie das Lymphom. Das Auswachsen großer Burkitt-Lymphome wurde von Ghetie et al. nach der subkutanen Inokulation von DAUDI-Zellen in die Flanken von SCID-Mäusen beobachtet (Ghetie et al., 1990). Die Wirksamkeit mehrerer neuer Wirkstoffe wurde seit dem in solchen murinen Lymphom-Modellen getestet (Donnou et al., 2012). Xenograft Tumormodelle werden in der Regel durch subkutane Inokulation von jeweils 1×10^6 bis 1×10^7 Tumorzellen etabliert (Ackler et al., 2008; Troiani et al., 2008).

3.3.3 Matrigel

Die Basalmembran ist eine besondere Verbindungsstruktur zwischen Epithel, Endothel, Glia- und Muskelzellen mit dem angrenzenden Stroma bzw. Bindegewebe. Sie besteht aus vielen unterschiedlichen Makromolekülen (hauptsächlich Kollagenfibrillen, retikulären und elastischen Fasern, sowie Glykoproteinen), die im extrazellulären Raum ein dreidimensionales Netzwerk aufbauen. Die Basalmembran stabilisiert und verankert das aufliegende Epithel/Endothel, bildet eine mechanische Diffusionsbarriere und dient außerdem als Speicherort für Wachstumsfaktoren, Chemokine und Enzyme. Bösartig entartete Zellen produzieren große Mengen an Basalmembranmatrix und bauen diese wieder ab. Einerseits wird dadurch die Intravasation bzw. hämatogene Metastasierung begünstigt, andererseits werden dadurch Wachstumsfaktoren freigesetzt, die das Tumorwachstum fördern.

Matrigel® ist eine basalmembranartige Matrix, die aus einem löslichen und sterilen Basalmembran-Protein-Extrakt besteht. Dieses Extrakt wird aus einem murinen Tumor, dem Engelbreth-Holm-Swarm-Sarkom, gewonnen (Kleinman and Martin, 2005). Matrigel fördert zudem die Zelldifferenzierung und Tumorzellproliferation. Es wird außerdem *in vitro* für die dreidimensionale Zellkultur als Wachstumsgrundlage benutzt (Benton et al., 2014). Auch im Rahmen der Xenotransplantat-Forschung wird Matrigel eingesetzt, um die Tumorformation *in vivo* nach Inokulation xenogener Tumorzellen in immundefizienten Mäusen zu unterstützen (Benton et al., 2011).

Dass Xenografte besser unter dem Einsatz von Matrigel wachsen, konnte in mehreren Studien bestätigt werden (Fridman et al., 1990; Fridman et al., 1991). Dafür muss kaltes Matrigel kurz vor der Inokulation mit den Tumorzellen vermischt werden, wobei das zu injizierende Volumen des Gemisches, je nach Injektionsort zwischen 20 und 300 μl variiert (Fridman et al., 2012).

3.4 Positronen-Emissions-Tomographie / Computertomographie

Die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) ist eine Schnittbilduntersuchung, bei der die Stoffwechselaktivität von Geweben dargestellt werden kann. Dafür werden stoffwechselaktive Substanzen (z. B. Glucose) mit Positronen-emittierenden Radionukliden wie radioaktivem Fluor (^{18}F) gekoppelt. Das auf diese Weise entstandene stoffwechselaktive Molekül (z. B. ^{18}F -FDG = Fluordesoxyglukose) wird als Tracer (aus dem englischen „Finder“ bzw. „Aufspürer“) bezeichnet, weil es „verfolgt“ werden kann. Das Radioisotop ^{68}Ga Gallium (^{68}Ga) besitzt eine sehr kurze Halbwertszeit von 68 Minuten, wodurch es als Tracer-Bestandteil im Rahmen von nuklearmedizinischen Untersuchungen hervorragend geeignet ist. Im Gegensatz zu ^{18}F Fluor kann ^{68}Ga Gallium in einem Generator produziert werden und kommt daher immer häufiger zum Einsatz (Banerjee and Pomper, 2013; Martiniova et al., 2016).

Nach intravenöser Applikation des Tracers sammelt sich dieser zunächst vor allem im Gewebe mit vermehrtem Metabolismus an, wie z.B. in Tumoren oder deren Metastasen. Von dort aus werden dann durch den natürlichen Zerfall des Radioisotops Positronen ausgestrahlt, die mit Elektronen zusammenprallen, die sich in der Nähe befinden. Dadurch kommt es zur sogenannten „Annihilation“ und Vernichtungsstrahlung, bei der zwei Photonen (Gammastrahlung) im 180° Winkel zueinander abgegeben werden. Diese Gammastrahlung kann dann mit Hilfe einer Gammakamera aufgefangen und sichtbar gemacht werden, wodurch die Verteilung des Radionuklids innerhalb des Organismus bestimmt werden kann. Nach diesem Prinzip können Radionuklide auch mit monoklonalen Antikörpern gekoppelt werden, welche an eine bestimmte Zielstruktur binden und diese dadurch sichtbar machen können (Immuno-PET) (Verel et al., 2005). Auf diese Weise können maligne Zellverbände mittels PET (-CT) identifiziert werden, lange bevor diese mit anderen bildgebenden Verfahren sichtbar gemacht werden können. Da die Anreicherung des Radionuklids im Gewebe jedoch nicht die genaue Lokalisation des Tracers innerhalb eines Organs gestattet, wird das PET-Verfahren heutzutage meistens mit einer Computertomographie (CT) ergänzt. Bei der Computertomographie handelt es sich um ein Schnittbildverfahren, das auf konventioneller Röntgentechnik basiert. Dabei werden die darzustellenden Strukturen mit einer rotierenden Röntgenröhre aus unterschiedlichen Richtungen abgebildet. Die Detektoren, die sich auf der gegenüberliegenden Seite der Röntgenröhre befinden, kreisen ebenfalls um den Patienten und zeichnen die ankommende Röntgenstrahlung auf. Dadurch wird die Struktur aus unterschiedlichen Richtungen durchleuchtet. Mit Hilfe eines Computers erfolgt dann die Summation und Nachverarbeitung der gemessenen Daten, sodass die dreidimensionale Darstellung des zu untersuchenden Bereichs möglich wird (Deutsche-Radiologienetz-AG). Die

Kombination beider Verfahren ermöglicht demzufolge die genaue örtliche Zuordnung von Zellen, die eine gesteigerte Stoffwechselaktivität aufweisen.

4 Ziele der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die prinzipielle Durchführbarkeit des neuen Therapiekonzepts der **B-Zellrezeptor-Antigene** zum **Reversen Targeting** von Tumoren im Rahmen einer „Proof of Principle“-Studie zu testen.

Dazu wurde zunächst *in vitro* die zytotoxische Wirksamkeit ein ARS2-BAR-Toxins gegen seine Zielzellen untersucht, wobei der Focus auf den folgenden Fragestellungen lag:

- Zeigt das ARS2-BAR-Toxin eine zytotoxische Wirkung gegen ARS2-positive Zielzelllinien?
- Werden ARS2-negative Zellen ebenfalls vom ARS2-BAR-Toxin beeinträchtigt?
- Zeigt das NRBI-BAR-Toxin als Kontroll-BAR-Toxin auch eine zytotoxische Wirkung gegenüber ABC-DLBCL-Zellen?

Im nächsten Schritt sollte ein Tumormodell in der Maus etabliert werden, um das BAR-Konzept als Targeted Therapy auch *in vivo* zu testen. Zunächst ging es darum, verschiedene ABC-DLBCL-Zelllinien mit und ohne ARS2-spezifischen BCR durch Xenotransplantation optimal zu inokulieren. Dabei standen Fragen der Kinetik des Tumorwachstums im Vordergrund:

- Nehmen alle Xenografte gleichermaßen an Volumen zu?
- Erfolgt das Tumorwachstum im Seitenvergleich (bei einem Tier) homogen?
- Erfolgt das Tumorwachstum innerhalb einer Zelllinien-Kohorte homogen?
- Wie lange dauert es, bis die Tumoren einen kritischen Tumordurchmesser von mehr als 15 mm erreichen?

Nach Optimierung der Inokulationsbedingungen sollte als nächstes die zytotoxische Wirkung des ARS2-BAR-Toxins *in vivo* untersucht und die Applikation optimiert werden:

- Ist das ARS2-BAR-Toxin auch *in vivo* in der Lage seine zytotoxische Wirkung zu entfalten? Reicht diese aus, um die Entwicklung ARS2-positiver Tumoren zu hemmen?
- Wirkt das ARS2-BAR-Toxin spezifisch oder wird das Wachstum ARS2-negativer Tumoren ebenfalls reguliert?
- Werden ARS2-positive Tumoren durch das NRBI-BAR-Toxin auch beeinflusst, oder vermittelt das Antigen definitiv eine Tumor-spezifische Zytotoxizität?

Abschließend sollte die Biodistribution und die Kinetik der BARs mittels PET-CT untersucht werden:

- Ist die Bindung des ARS2-BARs an die entsprechenden Tumorzellen in der Maus visuell erfassbar?
- Wann sind nach der Applikation die BARs am/im Tumor sichtbar?
- Wann sind nach der Applikation keine BARs mehr sichtbar?

5 Materialien und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Geräte und Instrumente

Tabelle 2: Geräte und Instrumente

Geräte	Bezugsquelle
96-Well-Mikrotiterplatte	Nunc GmbH & Co. KG (Wiesbaden, Deutschland)
Brutschrank – HERA cell 150	Thermo Electron LED GmbH (Langeselbold, Deutschland)
Diavert-Mikroskop (Zellzählung)	Leitz (Wetzlar, Deutschland)
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Kryostat Leica CM 1860	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH (Wetzlar, Germany)
Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf
Messschieber	Hoffmann GmbH Qualitätswerkzeuge (München, Deutschland)
Neubauer Haematocytometer	MT Promedt Consulting GmbH (St. Ingbert, Deutschland)
Omnican Insulinspritzen 30G	Braun (Melsungen, Deutschland)
Photometer Victor Wallac V2 1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer (Waltham, MA, USA)
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht, Deutschland)
Sicherheitswerkbank – HERA safe	Thermo Electron LED GmbH (Langeselbold, Deutschland)
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf
Vortexmischer REAX 2000	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Zellkulturflaschen	Sarstedt AG & Co.
Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, Deutschland)

5.1.2 Lösungen und Chemikalien

Tabelle 3: Lösungen und Chemikalien

Lösungen und Chemikalien	Hersteller
Aceton 100%	SAV LP GmbH (Flintsbach, Deutschland)
Entellan Neu	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Eosin	Merck KGaA
Essigsäure 99-100%	Merck Schuhardt OHG (Hohenbrunn, Deutschland)
Fetales Kälber Serum (FCS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim, Deutschland)
Growth Factor Reduced BD Matrigel Matrix®	Corning (Bedford, MA, USA)
Isopropylalkohol 100%	Otto Fishar GmbH (Saarbrücken, Deutschland)
Cytotoxicity Detection Kit PLUS (LDH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Mayers Hämalaulösung	Merck KGaA
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) nach Dulbe	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
RPMI 1640 Medium	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
Tissue Freezing Medium®	Leica Microsystems Nussloch GmbH (Nussloch, Germany)
Trypanblau-Lösung	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Xylol	Hedinger (Stuttgart, Deutschland)

5.1.3 Pharmaka und molekularbiologisch hergestellte Konstrukte

Tabelle 4: Pharmaka und Biomolekulare Konstrukte

Pharmaka und biomolekulare Konstrukte	Hersteller
ARS2	José-Carreras-Zentrum, Homburg
ARS2-BAR-Toxin	José-Carreras-Zentrum, Homburg In Zusammenarbeit mit der Universität Aachen
ARS2-Epitop-Ga ⁶⁸	Klinik für Nuklearmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes
Bepanthen®	Bayer Health Care AG (Leverkusen, Deutschland))
Exotoxin A von Pseudomonas Auriginosa (ETA)	José Carreras-Zentrum, Homburg
Narcoren® (Pentobarbital)	Merial GmbH (Halbgermoos, Deutschland)
NRBI	José Carreras-Zentrum, Homburg
NRBI-BAR-Toxin	José Carreras-Zentrum, Homburg In Zusammenarbeit mit der Universität Aachen
Rompun® (Xylazin)	Bayer Health Care AG (Leverkusen, Deutschland)
Softasept®	Braun (Melsungen, Deutschland)
Ursotamin® (Ketamin)	Serumwerk (Bernburg, Deutschland)

5.1.4 Zelllinien

Alle die im Rahmen dieser Arbeit benutzten Zelllinien, wurden aus den Zellen humaner, diffus großzelliger B-Zell-Lymphome (DLBCL) etabliert und sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Zelllinien

Zelllinie	Hersteller
HBL-1	freundlicherweise von Frau Prof. Dr. med. Sylvia Hartmann zur Verfügung gestellt. (Dr. Senckenberg Institut für Pathologie, Goethe-Universität, Frankfurt/Main, Deutschland)
OCI-Ly3	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland)
TMD-8	freundlicherweise von Frau Prof. Dr. med. Sylvia Hartmann zur Verfügung gestellt.
U-2932	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland)

5.2 Methoden

5.2.1 Zellkultur

Als Zellkultur wird die Kultivierung und Vermehrung einer bestimmten Zellpopulation außerhalb eines Organismus und unter kontrollierten Bedingungen definiert. Man bezeichnet diese Kultur als „*in vitro*“.

Prinzipiell unterscheidet man adhärent wachsende und in Suspension wachsende Zellen. Zellen, die sich aus soliden Geweben ableiten (z. B. Fibrozyten) heften sich bei der Proliferation *in vitro* an die Oberfläche des Kulturgefäßes. Die meisten Zellen aus Suspensionsgeweben (z. B. Blut) vermehren sich *in vitro* im Nährmedium genauso frei „schwimmend“ (alle Lymphozyten).

Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C, gesättigter Luftfeuchte und 5 % CO₂ kultiviert. Dem Medium wurden 20 % fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt, dass für das Zellwachstum wichtige zusätzliche Nährstoffe enthält.

Außerdem wurde das Medium mit 2 mM L-Glutamin (sensible Aminosäure), 100 Units Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Antibiose) ergänzt. Alle drei Tage wurde die Zellzahl nach Neubauer bestimmt und die Zelldichte der Suspension auf 5×10^5 Zellen/ml in frischem Medium eingestellt. Bei maximaler Expansion konnten so innerhalb von ca. zehn Tagen über $1,5 \times 10^8$ Zellen von jeder der Linien bereitgestellt werden.

5.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde nach Neubauer bestimmt. Dazu wurde eine Zählprobe (50 µl) aus der Suspensionskultur entnommen, 1:1 mit PBS verdünnt und mit dem gleichen Volumen Trypanblau versetzt. Trypanblau ermöglicht die optische Differenzierung zwischen vitalen Zellen (die diesen Farbstoff nicht aufnehmen) und geschädigten bzw. toten Zellen, die Trypanblau einlagern und im mikroskopischen Bild dadurch blau angefärbt erscheinen. Die Neubauer-Zählkammer wurde adhäsiv mit der Zählprobe beladen und die vitalen Zellen in zwei (Kompensation der Trypanblau-Verdünnung!) Groß-Quadraten à jeweils 4 x 4 Gruppenquadraten ausgezählt. Nach Neubauer errechnet sich die Zelldichte, über die in den 32 Gruppenquadraten gezählte Zellzahl multipliziert mit 10^4 pro Milliliter unter Berücksichtigung der gewählten Verdünnung.

Aus der Zelldichte konnte das Volumen der Zellsuspension berechnet werden, dass für die Gewinnung einer bestimmten Zellzahl aus der Kultur der entsprechenden Zelllinie zu entnehmen war.

5.2.3 *In vitro* Experimente: Zytotoxizitäts Assay

Der Nachweis der zytotoxischen Wirkung exogener Noxen und der Aktivität der verschiedenen zytotoxischen Zellen des Immunsystems (z. B. CD8⁺ T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen und Granulozyten) erfolgte mittels Zytotoxizitäts-Assays. Zur *in vitro* Bestimmung des zytotoxischen Potentials der BAR-Toxine wurde im Rahmen dieser Arbeit das nichtradioaktive „Cytotoxicity Detection Kit PLUS/LDH“ (Sigma-Aldrich) eingesetzt. Dabei wurde die aus den lysierten Targetzellen freigesetzte Laktatdehydrogenase (LDH) gemessen. Dieses Enzym wird in den meisten humanen Zellen natürlicherweise exprimiert. Das verschafft dieser Methode im Vergleich zu (fast allen) anderen Zytotox-Assays den entscheidenden Vorteil, dass der das Ausmaß der Zytotoxizität bestimmende Indikator nicht zuerst in die Targetzellen eingebracht werden muss. Da die meisten Zellen LDH ausreichend stark exprimieren, ist der Test auch sehr sensitiv. Dabei ist das Testprinzip sehr einfach: Die entsprechenden Targetzellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der verschiedenen BAR-Toxinen bzw. Kontrollen vier Stunden lang inkubiert. Da ein sehr geringer Teil der Targetzellen im Verlauf der vierstündigen

Inkubationszeit auch ohne Einwirkung der BAR-Toxine lysiert, wurde in einem separaten Ansatz der Anteil dieser sogenannten Spontanlyse bestimmt, indem die gleiche Anzahl an Targetellen pro Well ohne BAR-Toxine für vier Stunden inkubiert wurden. Um das zytotoxische Potential der BAR-Toxine, wie bei Zytotox-Assays üblich, relativ auf die sogenannte Maximallyse der Targetzellen zu berechnen, wurde ebenfalls eine gleiche Anzahl an Targetzellen ohne BAR-Toxine für drei Stunden und 40 Minuten inkubiert. Für die letzten 20 Minuten wurden diese Targetzellen dann durch Zugabe eines Detergens (Triton® X-100) vollständig lysiert. Das in diesem Ansatz gemessene LDH-Signal diente dann als 100%-Bezug zur Berechnung des relativen zytotoxischen Potenzials der unterschiedlichen Ansätze mit BAR-Toxinen nach der Formel:

$$\text{relative Lyse (\%)} = \frac{\text{LDHSignal mit BAR.Toxin} - \text{LDHSignal.Spontanlyse}}{\text{LDHSignal.-Maximallyse} - \text{LDHSignal.-Spontanlyse}} \times 100$$

Zum Test wurden pro Zelllinie jeweils 100 µl Zellsuspension à 4 x 10³ Zellen/Well in 36 Wells einer 96Well-Mikrotiterplatte mit runden Böden pipettiert. Zusätzlich wurden den Zellen die jeweils 50 µl der BARs und/oder Kontroll-Substanzen zugesetzt und wie oben beschrieben vier Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Ansätze zur Bestimmung der Spontan- und der Maximallyse wurden ebenfalls pro Well mit 4 x 10³ Zellen angelegt. Nach vier Stunden wurden die Platten kurz zentrifugiert (200 G, 6 min, RT) um sicherzustellen, dass sich alle verbliebenen vitalen Zellen bzw. das Debris am Boden der jeweiligen Wells befinden. Dann wurden aus jedem Well 50 µl des Überstandes abbildungsgleich dem Belegplan in eine neue 96Well-Mikrotiterplatte mit flachen Böden zur LDH-Bestimmung mittels ELISA überführt.

LDH wurde dabei durch Zugabe des Tetrazolium-Salzes Iodonitrotetrazoliumchlorid (INT) nachgewiesen, das seinerseits durch einen ebenfalls zugegebenen, NADH/H⁺-abhängigen Katalysator zum Formazan-Salz reduziert wurde (Chan et al., 2013). Im Gegensatz zu Tetrazolium absorbiert Formazan Licht in einem relativ breiten Wellenlängenspektrum zwischen 480 und 520 nm. Die LDH-Enzymaktivität konnte somit indirekt photometrisch quantifiziert werden. Katalysator und Färbelösung wurden gemäß Herstellerangaben unmittelbar vor der Verwendung zur fertigen LDH-Nachweislösung gemischt. Abschließend wurde die Lichtabsorption mit einem Mikrotiterplatten-Photometer (PerkinElmer) bei 490 nm photometrisch gemessen.

5.2.3.1 Test gegen die Targetzellen OCI-Ly3 und HBL-1

Ziel des ersten Versuchs war es herauszufinden, ob:

- das ARS2-BAR-Toxin gegen die (ARS2-positiven) Zielzellen zytotoxisch wirkt,
- das ARS2-BAR-Toxin auch ARS2-negative Zellen beeinträchtigen kann,
- das NRBI-BAR-Toxin als Kontroll-BAR-Toxin auch eine unspezifische zytotoxische Wirkung gegen ARS2-positiven Zelllinien zeigt,
- das NRBI-BAR-Toxin unspezifisch auch ARS2-negative Zellen beeinflusst.

Dazu wurden die ARS2-BAR positive Zelllinie OCI-Ly3 und die ARS2-BAR negative Kontrollzelllinie HBL-1 als Targets eingesetzt. Pipettiert wurde nach dem folgenden Schema:

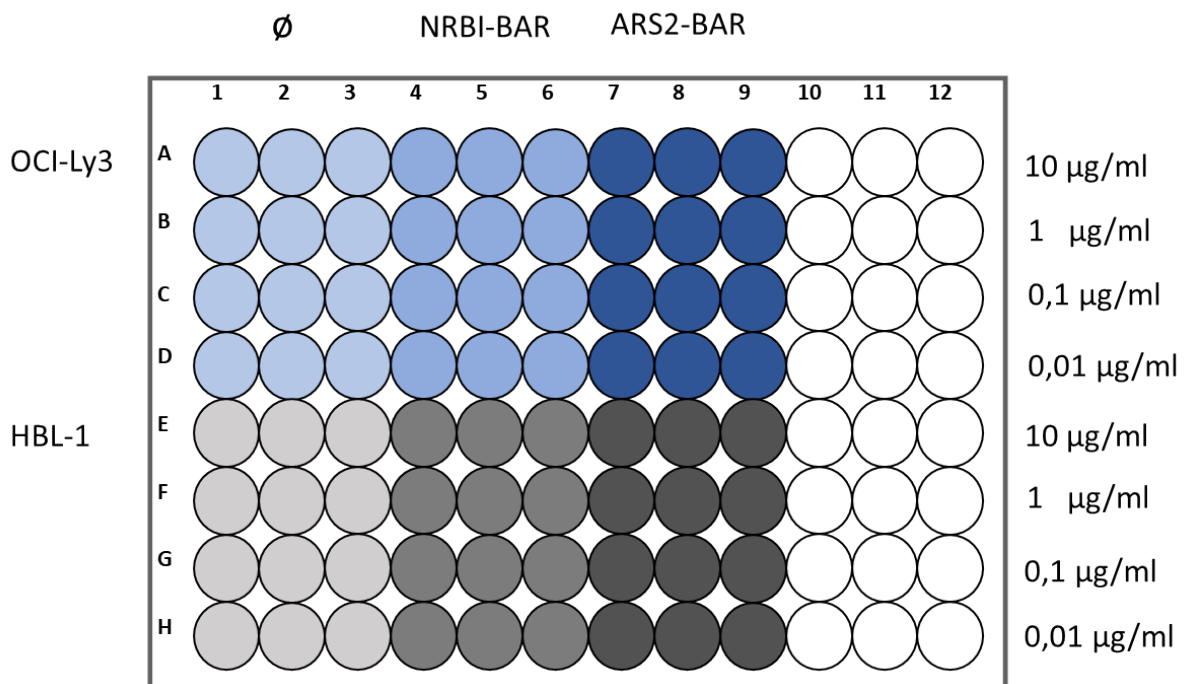


Abbildung 3: Pipettierschema des Zytotoxizitätstests gegen OCI-Ly3 und HBL-1.

Die Wells A1-9 bis D1-9 enthielten jeweils 4×10^3 Zellen der Zelllinie OCI-Ly3. In die Wells E1-9 bis H1-9 wurden jeweils 4×10^3 Zellen der Kontrollzelllinie HBL-1 pipettiert. In die Wells der Spalten 1-3 wurden keine weiteren Komponenten hinzugefügt, während in die Wells der Spalten 4-6 in abnehmender Konzentration das Kontroll NRBI-BAR-Toxin hinzugefügt wurde. Analog wurde in die Spalten 7-9 in abnehmender Konzentration ARS2-BAR-Toxin pipettiert.

Für jede Kombination wurden je drei Werte gemessen. Für die Auswertung wurde jeweils der Mittelwert berechnet.

5.2.3.2 Test gegen Targetzellen U2932 und TMD-8

Um die Ergebnisse des ersten Versuchs zu bestätigen wurden im zweiten Versuch mit U2932 eine weitere ARS2 positive Zelllinie und mit TMD-8 eine weitere ARS2 negative Kontrollzelllinie untersucht. Analog zum ersten Versuch wurden beide Zelllinien jeweils mit unterschiedlichen Konzentrationen an Toxin-gekoppeltem ARS2-BAR bzw. NRBI-BAR versetzt, um zu testen, welche Zellen durch welches BAR-Toxin angegriffen werden.

Pipettiert wurde nach dem folgenden Schema (**Abbildung 4**):

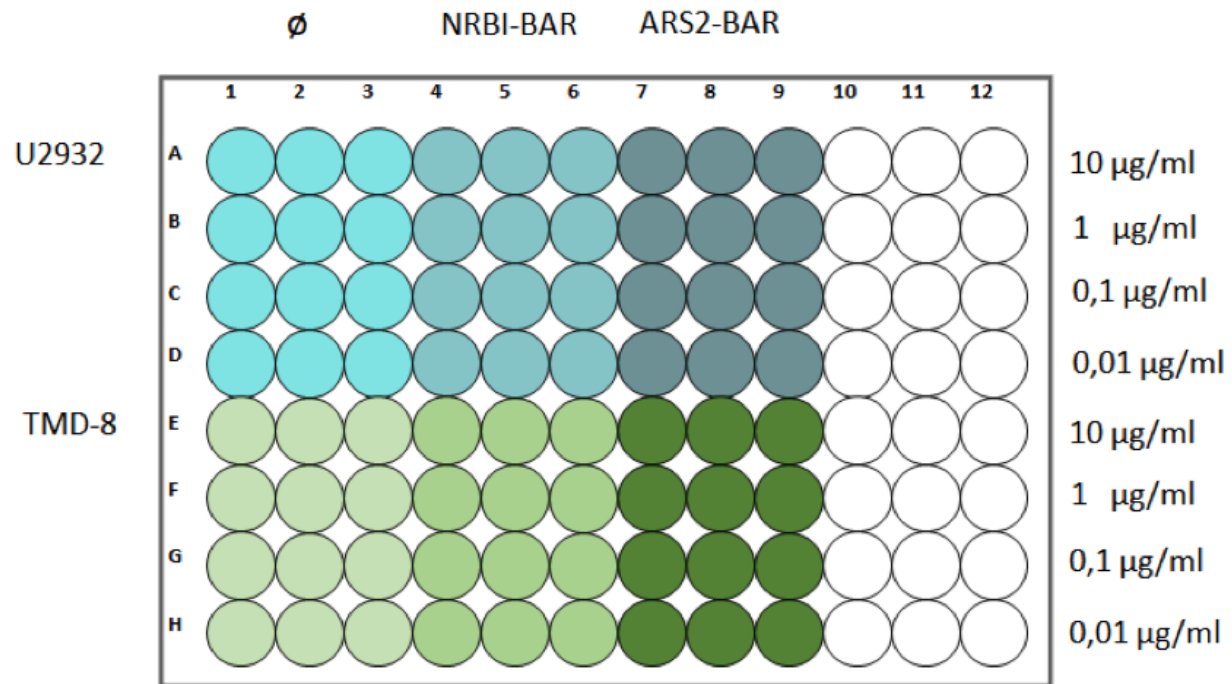


Abbildung 4: Pipettierschema des Zytotoxizitätstests gegen U2932 und TMD-8. Die Wells A1-9 bis D1-9 enthielten jeweils 4×10^3 Zellen der Zelllinie U2932. In die Wells E1-9 bis H1-9 wurden jeweils 4×10^3 Zellen der Kontrollzelllinie TMD-8 pipettiert. In die Wells der Spalten 1-3 wurde keine weitere Substanz hinzugefügt, während in die Wells der Spalten 4-6 in abnehmender Konzentration das Kontroll NRBI-BAR-Toxin hinzugefügt wurde. Analog wurde in die Spalten 7-9 in abnehmender Konzentration ARS2-BAR-Toxin pipettiert.

Wie im Vorversuch wurden für jede Kombination je drei Werte gemessen. Für die Auswertung wurde jeweils der Mittelwert berechnet.

5.2.4 Aufarbeitung von DLBCL-Zelllinien zur Applikation in SCID/beige-Mäuse

Zur Vorbereitung wurde das Trägermedium Growth Factor Reduced BD Matrigel Matrix® aufgetaut und über Nacht im Kühlschrank auf die optimale Benutzungstemperatur von $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

vortemperiert. Auch die übrigen für den Versuch benötigten Materialien wie Pipettenspitzen, PBS-Pufferlösung und Reagiergefäße wurden ebenso zwölf Stunden vor Versuchsbeginn bei 4 °C vortemperiert.

Am Tag der Inokulation in die Versuchstiere wurden alle Zellen der Expansionskultur von jeder der eingesetzten DLBCL-Linien geerntet und 10 Minuten lang bei 4 °C und mit 200 G zentrifugiert. Der Überstand wurde abgehoben und das Zellpellet in kaltem PBS resuspendiert. Von dieser Suspension wurde die Zellzahl wie beschrieben nach Neubauer bestimmt. Anschließend wurden die für die Inokulation benötigten Zellen von jeder DLBCL-Linie entnommen (die restlichen Zellen wurden erneut in Erhaltungs-Kultur genommen), mit kaltem PBS versetzt und 10 Minuten lang bei 4 °C und 200 G zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen mit 4 °C kaltem PBS auf exakt 1×10^7 Zellen pro 100 µl eingestellt. Diese Zell/PBS-Suspension wurde abschließend mit dem gleichen Volumen Matrigel versetzt (PBS/Matrigel-Verhältnis von 1:1). Somit betrug die Konzentration der applizierten DLBCL-Suspension 1×10^7 Zellen in 200 µl PBS/Matrigel-Mix. Die Suspension jeder der Linien wurde in zwei sterile 50 ml Reagiergefäße überführt und auf Eis zur Applikation ins Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie gebracht, wo alle Tierversuche durchgeführt wurden. Um eine Schädigung der Zellen bei dieser hohen Zelldichte zu vermeiden, wurde die Suspension regelmäßig und vorsichtig aufgewirbelt.

5.2.5 BARs

Für die Herstellung des BARs wurde das Epitop des BCR-Antigens ARS2 mit einem modifizierten *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A (ETA') fusioniert, dem die natürliche Zell-Bindungsdomäne fehlt und somit durch ARS2_{aa342-375} ersetzt wurde. Des Weiteren wurde N-terminal ein His₆-tag eingebaut, der nach Expression des Fusionsproteins in *E. coli* die Aufreinigung des BAR-ETA'-Produktes (ARS2-BAR-Toxin) mittels IMAC (Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie) erlaubt (Nachreiner et al., 2008). Die Reinheit und Ausbeute des Produktes wurden mittels Western Blot (qualitativ) überprüft und photometrisch quantifiziert. Analog wurde auch das als Negativkontrolle eingesetzte NRBI-BAR-Toxin bereitgestellt.

5.2.6 *In vivo* Experimente

5.2.6.1 Versuchstiere

Für die *in vivo* Experimente wurden SCID/beige-Mäuse eingesetzt. Die Tiere waren zu Versuchsbeginn acht Wochen alt und wurden in Gruppen zu je drei Mäusen in individuell belüfteten Käfigen (IVC) (Tecniplast, Buguggiate, Italien) aufgeteilt. Die Raumtemperatur

betrug 22 °C mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 %. Die Mäuse wurden in einem 12 h/12 h Tag-Nacht-Rhythmus in der Versuchstierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes gehalten. Sie hatten ad libitum Zugang zu Standardlaborfutter (SSNIFF-Spezialdiäten-GmbH, Soest, Deutschland) und Trinkwasser und wurden täglich bezüglich ihrer Aktivität, Putz- und Fressverhalten inspiziert. Die regelmäßige Kontrolle des Körpergewichts diente als quantitativ messbare Größe zur Beobachtung des Allgemeinzustands. Zur Identifizierung wurden die Tiere mittels Ohrlochung gekennzeichnet.

Alle Tierversuche wurden ordnungsgemäß nach dem Tierschutzgesetz durchgeführt und waren vom Landesamt für Gesundheit und Verbraucherschutz in Saarbrücken genehmigt.

5.2.6.2 Subkutane Inokulation der Tumorzellen

Zur Vorbereitung der Tiere auf die subkutane Inokulation der Tumorzellen wurden sie als erstes unter Narkose gesetzt. Für die Narkotisierung der Tiere wurde eine Kombination aus Ketamin (90 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (12 mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal (i. p.) appliziert. Um eine versehentliche Verletzung der inneren Organe durch das Zappeln der Tiere während der Injektion zu vermeiden, wurden die Tiere mittels Nackengriff fixiert. Zudem erfolgte die Injektion lateral der Mittellinie im unteren Quadranten parallel zur unteren Extremität in die Bauchhöhle, ebenfalls um einer Verletzung innerer Organe vorzubeugen. Eine mögliche Austrocknung der Hornhaut bei den relaxierten Tieren wurde durch Auftragen von Bepanthen® Augensalbe verhindert. Danach wurden die Mäuse sorgfältig an beiden Flanken rasiert und die Haut mit Softasept® gründlich desinfiziert.

Um sicherzustellen, dass die Tumorzellen als Einzelzellen appliziert wurden, wurde die Suspension unmittelbar vor der Applikation erneut aufgewirbelt und Luftblasen-frei in eine Spritze (Insulin Spritze Omnican 30G, Braun) aufgezogen. Jedem Tier wurden dann 200 µl PBS/Matrigel mit 1×10^7 Zellen pro Flanke subkutan inokuliert. Ab dem dritten Versuch wurde die inokulierte Zellzahl auf 5×10^6 pro Flanke reduziert (**Abbildung 5**). Für jedes Tier wurde eine frische Kanüle und Spritze verwendet.

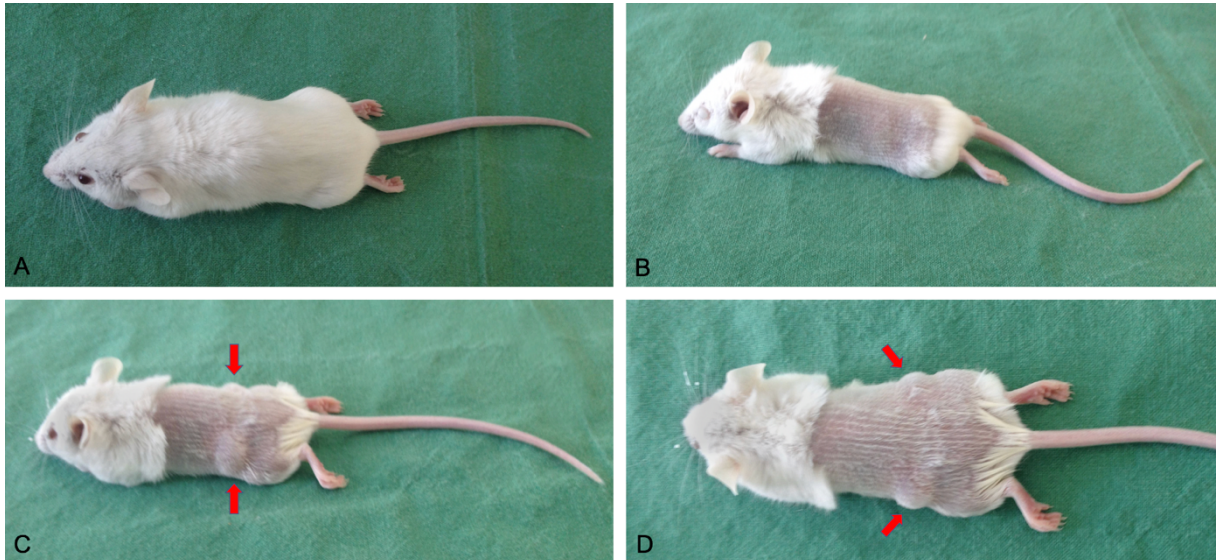


Abbildung 5: Subkutane Inokulation der Tumorzellen. **A:** Zuerst wurde die Maus unter Narkose gesetzt. **B:** Maus nach Rasur beider Flanken und Bepanthen®-Applikation in beiden Augen. **C:** Nach gründlicher Desinfektion der Haut wurden 200 µl Zellsuspension pro Flanke inokuliert. Zu sehen sind die mit roten Pfeilen markierten subkutanen Depots in lateraler (**C**), bzw. kranialer (**D**) Ansicht. **Messung des Tumolvolumens**

Die Messung der Tumoren erfolgte dreimal wöchentlich mit Hilfe eines Messschiebers. Dazu wurden der Längs- und der Breitendurchmesser des Tumors gemessen. Das Tumolvolumen (V) wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$V = \pi/6 \times a \times b^2$$

Dabei ist „a“ der längere und „b“ der kürzere der beiden Durchmesser.

5.2.6.4 Abbruchkriterien

Der Gesundheitszustand der Tiere wurde während des gesamten Versuchszeitraums täglich untersucht. Dabei wurden Tiere, die durch ein pathologisches Putz- und Fressverhalten, Apathie, Gewichtsverlust von mehr als 20 % des initialen Körpergewichts oder einen sonstigen gestörten Allgemeinzustand auffielen, vorzeitig aus dem Versuch genommen und euthanasiert. Ebenso wurde der Versuch sofort abgebrochen, wenn ein (kritischer) Tumordurchmesser von mehr als 15 mm erreicht wurde oder falls die Tumoren ulzerierende Läsionen entwickelten.

5.2.6.5 Tötung und Sektion der Versuchstiere

Am Ende Beobachtungszeit folgte die Euthanasierung der Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital. Die verabreichte Dosis betrug 200 mg pro kg Körpergewicht und wurde intraperitoneal (i. p.) appliziert. Bei der darauffolgenden Sektion der Tiere wurden die subkutan gewachsenen Tumoren chirurgisch entnommen und zur histologischen Beurteilung in drei etwa gleichgroße Teile geschnitten. Ein Teil wurde schockgefroren und in Stickstoff bei -178 °C aufbewahrt, der andere in 4 %iger Formaldehydlösung und der letzte in Paraffin eingebettet konserviert.

5.2.6.6 Histologie

Zur histologischen Auswertung wurde unmittelbar nach der Sektio das entnommene Gewebe in Stickstoff schockgefroren. Das gefrorene Gewebe wurde dann in der Gefrierkammer des Kryostats in Tissue Freezing Medium (Leica Microsystems, Wetzlar bzw. Nussloch, Germany) eingebettet und aufgeblickt. Nicht Formalin-fixiertes Kryogewebe bietet die Möglichkeit nachträglicher immunhistologischer Untersuchungen. Anschließend wurden aus den Blöckchen 10 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin nach Standardprotokoll gefärbt. Das restliche eingebettete Gewebestück wurde in Alufolie eingeschlagen und bei - 80 °C zur weiteren Verwendung gelagert.

Hämatoxylin hat die Eigenschaft saure (basophile) Strukturen (wie der Desoxyribonukleinsäure enthaltender Zellkern, oder die Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums) blau zu färben. Eosin färbt basische (eosinophile) Strukturen rot, wie z. B. die Proteine des Zellplasmas.

Die Schnitte wurden zuerst 1 min in Aceton fixiert und anschließend luftgetrocknet. Daraufhin wurden die Schnitte in Isopropanol 50% für 2 min überführt und mit Aqua destillata gespült. Anschließend erfolgte die Färbung mittels Hämatoxylin nach Mayers für 35-40 Sekunden. Dann wurden die Schnitte in Aqua destillata kurz gespült und in Leitungswasser stehend gebläut. Nach erneutem Spülen mit Aqua destillata wurden die Schnitte 1,3 min lang in 0,1%ig angesäuerte Eosin gefärbt. Folgend wurden die Schnitte zum letzten Mal mit Aqua destillata gespült und mit einer aufsteigenden Reihe Alkohole (Isopropanol 70%, Isopropanol 100%, Xylol) jeweils 2 min entwässert. Zuletzt wurden die Schnitte mit Entellan eingedeckt.

5.2.7 Etablierung des Tumormodells

Zur Etablierung des Tumormodells wurden die SCID/beige-Mäuse in vier Gruppen zu je drei Tieren aufgeteilt. Jede Gruppe wurde mit Zellen einer der vier DLBCL-Zelllinien inokuliert. Ziel war es, herauszufinden (I) ob die Tumor-Xenografte im Seitenvergleich möglichst homogen wachsen, (II) ob das Tumorstadium innerhalb einer Kohorte homogen erfolgt und wie viel

Zeit vergeht bis die Tumoren eine bestimmte (therapierbare) Größe erreichen bzw. einen kritischen Durchmesser von mehr als 15 mm aufweisen (III).

1. Die Tiere der ersten Gruppe wurden mit OCI-Ly3-Zellen (mit ARS2-spezifischem BCR) inokuliert.
2. Die Tiere der zweiten Gruppe wurden mit U2932-Zellen (mit ARS2-spezifischem BCR) inokuliert.
3. Die Tiere der dritten Gruppe wurden mit HBL-1-Zellen (ohne ARS2-spezifischem BCR) inokuliert.
4. Die Tiere der vierten Gruppe wurden mit TMD-8-Zellen (ohne ARS2-spezifischem BCR) inokuliert.

Nach der Inokulation (Tag 0) erfolgte die erste Messung des Tumolvolumens an Tag 7. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Tumoren dreimal wöchentlich bis zum Versuchsabbruch gemessen.



Abbildung 6: Zeitschema des Versuchs zur Etablierung des Tumormodells.

5.2.8 Behandlung der Tiere mit ARS2-BAR

Ziel des zweiten Versuches war es, die folgender fünf Fragen zu beantworten:

- Kann die Tumorentwicklung in Tieren, die mit ARS2-spezifischen BCR exprimierenden Zellen inokuliert wurden, durch die anschließende Behandlung mit ARS2-BAR-Toxin beeinflusst werden?
- Beeinflusst das ARS2-BAR-Toxin unspezifisch auch die Tumorentwicklung in Tieren, die mit Zellen ohne ARS2-spezifischen BCR inokuliert werden?
- Wird die Tumorentwicklung auch in Tieren beeinflusst, die mit ARS2-spezifischen BCR exprimierenden Zellen inokuliert werden, wenn diese anschließend mit dem Kontroll-Konstrukt NRBI-BAR-Toxin behandelt werden?
- Wird die Tumorentwicklung in Tieren beeinflusst, die mit Zellen ohne ARS2-spezifischen BCR inokuliert werden, und eine anschließende Behandlung mit dem Kontroll-Konstrukt NRBI-BAR-Toxin bekommen?

Die Tiere wurden wie im ersten Versuch in vier Gruppen zu je 3 Tieren aufgeteilt.

1. Die Tiere der ersten Gruppe wurden mit OCI-Ly3-Zellen (ARS2-spezifischer BCR) inokuliert und am Tag 4 und 7 durch Injektion von (jeweils) 8 µg ARS2-BAR-Toxin in die Schwanzvene (i. v.) behandelt.
2. Die Tiere der zweiten Gruppe wurden mit OCI-Ly3-Zellen inokuliert und am Tag 4 und 7 durch i. v. Injektion von (jeweils) 8 µg NRBI-BAR-Toxin behandelt.
3. Die Tiere der dritten Gruppe wurden mit HBL-1-Zellen (ohne ARS2-spezifischen BCR) inokuliert und am Tag 4 und Tag 7 durch i. v. Injektion von (jeweils) 8 µg ARS2-BAR-Toxin behandelt.
4. Die Tiere der vierten Gruppe wurden mit HBL-1-Zellen inokuliert und am Tag 4 und 7 durch i. v. Injektion von (jeweils) 8 µg NRBI-BAR-Toxin behandelt.

Alle Tiergruppen bekamen also zweimalig 8 µg (insgesamt 16 µg) des ARS2-BAR-Toxins oder des NRBI-BAR-Toxins verabreicht. Nach der Inokulation mit den Zellen der jeweiligen DLBCL-Linien am Tag 0 wurde das Tumolvolumen ab Tag 4 bis zum Versuchsabbruch dreimal wöchentlich gemessen.

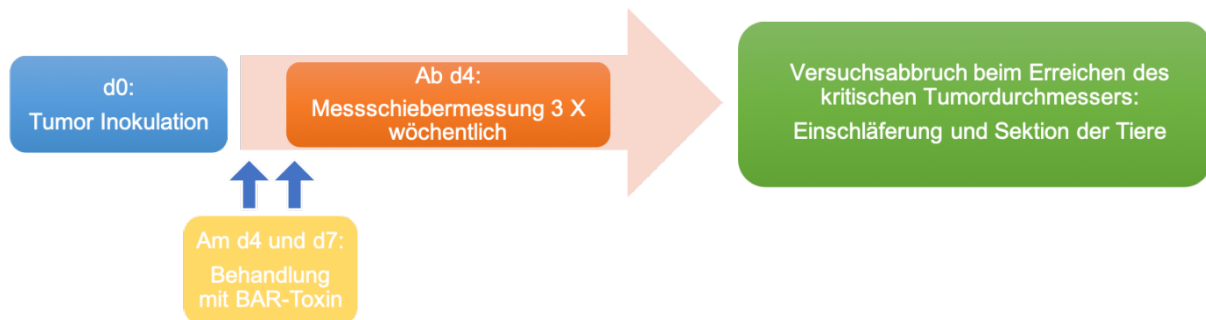


Abbildung 7: Zeitschema des ersten Versuchs zur Behandlung mit den BARs.

5.2.9 Behandlung mit einer höheren Dosis

Nachdem im zweiten Versuch kein signifikanter Einfluss der BAR-Toxine auf die Tumorentwicklung gemessen werden konnte, sollte in einem dritten Versuch ein verändertes Applikationsschema getestet werden. Dazu wurden die Toxine einmalig am Tag 6 jedoch mit der gesamten Dosis von 16 µg/ml verabreicht. Um vor dem Nachweis einer gesicherten Wirksamkeit des ARS2-BARs nicht unnötig viele Tiere einzusetzen, wurden die Mäuse nur mit OCI-Ly3 inokuliert. Als Negativkontrolle kam das NRBI-BAR-Toxin in gleicher Dosis zum Einsatz. Zudem wurde die inokulierte Zellzahl auf 5×10^6 pro Flanke (und somit halb so viele Zellen wie in den Vorversuchen) reduziert.

Es wurden zwei Gruppen zu je drei Tieren eingeteilt:

1. Die Tiere der ersten Gruppe wurden mit Zellen der Zelllinie OCI-Ly3 inokuliert und am Tag 7 mit 16 µg ARS2-BAR-Toxin behandelt.

- Die Tiere der zweiten Gruppe wurden ebenso OCI-Ly3-Zellen inokuliert und am Tag 7 mit 16 µg NRBI-BAR-Toxin behandelt.

Nach der Inokulation der Zellen am Tag 0 wurden die Tumore dreimal wöchentlich ab Tag 6 bis zum Versuchsabbruch gemessen.

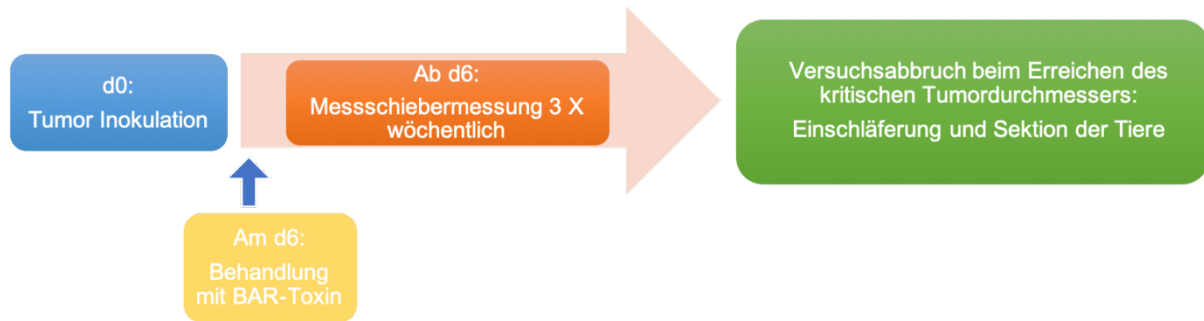


Abbildung 8: Zeitschema des zweiten Versuchs zur Behandlung mit den BARs.

5.2.10 PET/CT- Untersuchung

Ziel des vierten Versuches war es die Biodistribution und Kinetik des ARS2-BARs zu untersuchen und die Anreicherung im Tumor visuell nachzuweisen. Als Tracer wurde zunächst nur das ARS2-Peptiditop_(AS342-375) über DOTA mit dem Positronen-emittierenden Gallium-Isotop (⁶⁸Ga) gekoppelt (Halbwertszeit: 1,1 h). Appliziert wurde der Tracer in zwei Mäuse denen 16 Tage zuvor nach gehabtem Protokoll jeweils 5×10^6 OCI-Ly3-Zellen subkutan in jede Flanke inokuliert wurden.

Nach Sedierung der Maus mittels intraperitonealer (i. p.) Applikation von Ketamin (90 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (12 mg/kg Körpergewicht), erfolgte die intravenöse (i. v.) Injektion des Tracers. Gemessen wurde 10 bis 150 Minuten nach Applikation.

Durch den Einsatz eines microPET-Scanners (auch small-animal-PET Scanner genannt) hätte eine (noch) höhere Auflösung erzielt werden können (Chatziioannou, 2002; Green et al., 2001; Yao et al., 2012). MicroPET-Scanner sind spezifisch für den Einsatz in der Forschung mit Kleintieren entwickelt worden, und sind für die Auflösung kleinerer Strukturen besser kalibriert. Im Vergleich beträgt die Auflösung eines PET-CTs in der klinischen Diagnostik etwa 4-6 mm, während die Auflösung eines microPETs bei 1-2 mm liegt (Yao et al., 2012). Da uns diese Technologie jedoch nicht zu Verfügung stand, wurde die Untersuchung von Frau Dr. rer. nat. Schäfer-Schule in der Klinik für Nuklearmedizin des UKS (Direktor: Prof. Dr. med. Samer Ezziddin) durchgeführt. Die Untersuchungen fanden unter strenger Einhaltung aller notwendigen Hygienemaßnahmen statt. So war die Einbringung der Mäuse derart, dass eine

Berührung der Tiere mit dem Equipment komplett ausgeschlossen wurde. Nach den Untersuchungen erfolgte eine ausführliche Reinigung und Desinfektion des Tomographs.



Abbildung 9: Zeitschema der PET/CT-Untersuchung.

5.2.11 Statistik und Fotobearbeitung

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgten mittels Microsoft Excel. Dabei wurden zur Überprüfung der Signifikanz der Ergebnisse der F-test und der studentischen t-test benutzt. Die statistische Signifikanz wurde bei einem Wert von $p < 0,05$ festgelegt.

Die fotografische Aufnahmen (**Abbildung 5, Abbildung 13, Abbildung 24**) wurden mit dem Programm Corel Photo-Paint X 5 bearbeitet und die Abbildungen mit Microsoft Power Point angefertigt.

6 Ergebnisse

6.1 Zytotoxizitätsassay

Es wurden jeweils eine Zelllinie deren BCR das ARS2-Epitop spezifisch erkennt (OCY-Ly3 oder U2932) und als Negativkontrolle eine Zelllinie deren BCR das ARS2-Epitop nicht bindet (HBL-1 oder TMD-8) untersucht. Somit konnte sowohl die Zytotoxizität der Toxin-gekoppelten BARs als auch deren ARS2-Spezifität getestet werden.

6.1.1 Test gegen OCI-Ly3 und HBL-1

Es wurden pro Well jeweils 100 µl Zellsuspension einer Zelllinie mit einer Dichte von $4 \times 10^3/100 \mu\text{l}$ in 30 Wells einer 96Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Zellen wurden dann mit 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,1 µg/ml und 0,01 µg/ml ARS2-BAR-Toxin bzw. NRBI-BAR-Toxin als Negativkontrolle versetzt.

Die ARS2-negative Target-Zelllinie HBL-1 blieb dabei sowohl vom ARS2-BAR-Toxin, als auch vom Kontroll-BAR NRBI-Toxin unbeeinflusst.

Setzte man hingegen ARS2-positive OCI-Ly3-Targets ein, kam es deutlich und konzentrationsabhängig nach der Behandlung mit dem ARS2-BAR/ETA-Konstrukt zur Lyse dieser Targetzellen. Ab einer Konzentration von 0,01 µg/ml zeigte auch das ARS2-BAR-Toxin keine zytotoxische Wirkung mehr.

Die fehlende Zytolyse bei OCI-Ly3 unter dem NRBI-BAR/ETA-Konstrukt bestätigt ebenfalls die spezifische Zytotoxizität des ARS2-BAR-Toxins und zeigt, dass nur dieses und nicht das NRBI-BAR von den Zellen aufgenommen wurde. Somit konnte das an das NRBI-BAR gekoppelte ETA seine zytotoxische Wirkung nicht entfalten (**Abbildung 10**).

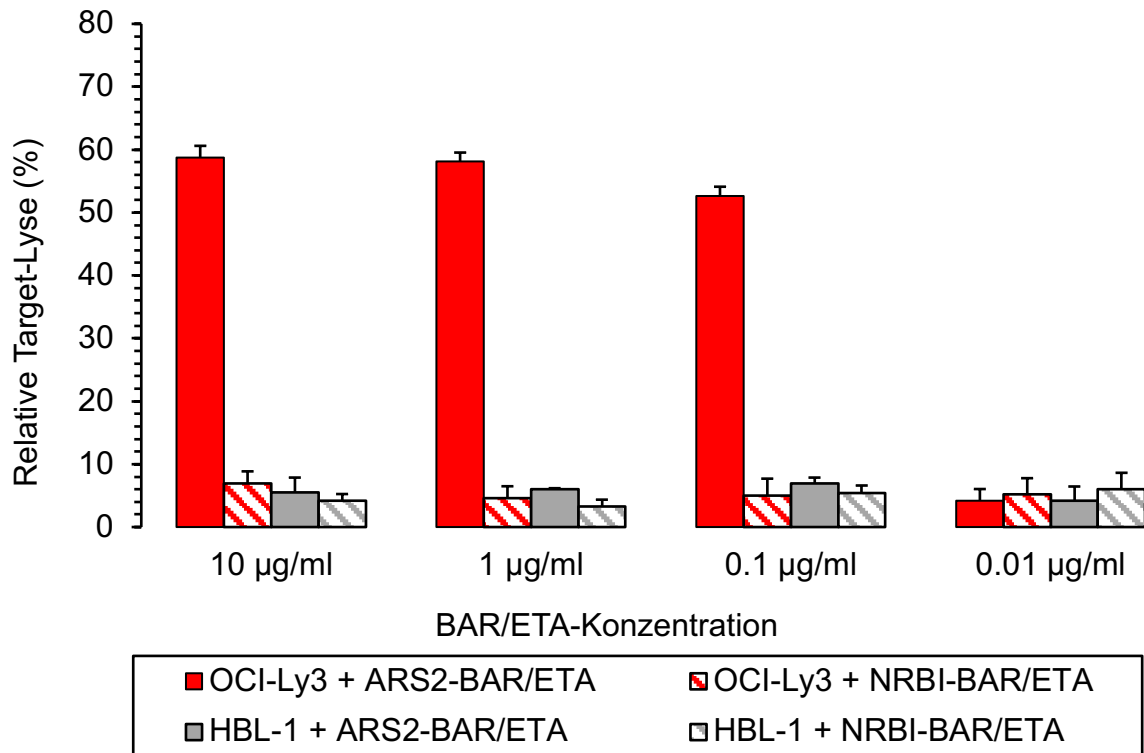


Abbildung 10: Ergebnis des Zytotoxizitätsassays gegen OCI-Ly3 und HBL-1. Dargestellt ist die Lyserate der jeweiligen Target-Zellen nach Zugabe der angegebenen BAR-Toxine (Mittelwert +/- SEM). Unabhängig von dem eingesetzten BAR-Toxin wurde die ARS2-unspezifische Linie HBL-1 nicht signifikant lysiert. Gleiches war auch bei der ARS2-spezifischen Zelllinie OCI-Ly3 zu beobachten, wenn diese mit dem NRBI-Kontroll-BAR-Toxin behandelt wurde. Die Bindung des ARS2-BAR-Toxins hingegen induzierte konzentrationsabhängig bis 0,1 µg/ml die Lyse der OCI-Ly3-Zellen.

6.1.2 Test gegen U2932 und TMD-8

Analog zum ersten Versuch wurden pro Well jeweils 100 µl Zellsuspension einer Zelllinie mit einer Dichte von $4 \times 10^3/100 \mu\text{l}$ in 30 Wells einer 96Well-Mikrotiterplatte pipettiert.

Anschließend wurden die Zellen wiederum mit 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,1 µg/ml und 0,01 µg/ml ARS2-BAR-Toxin und NRBI-BAR-Toxin als Negativkontrolle versetzt.

Wie im ersten Versuch war auch jetzt bei der ARS2-negativen Zelllinie TMD-8 keine durch das ARS2-BAR-Toxin induzierte Zytolyse zu beobachten, ebenso blieb das Kontroll-BAR NRBI-Toxin ohne Einfluss (**Abbildung 11**).

Bei der ARS2-positiven Zelllinie U2932 induzierte die Behandlung mit ARS2-BAR-Toxin hingegen eine deutliche, konzentrationsabhängige Zytolyse. Ab einer Konzentration von 0,01 µg/ml zeigte auch dieses BAR-Toxin keine zytostatische Wirkung mehr.

Das Kontroll-BAR-Toxin „NRBI“ beeinflusste das Wachstum der U2932-Zellen nicht signifikant.

Somit konnten die Ergebnisse des ersten Versuchs auch mit dieser Zelllinien/BAR-Toxin-Konstellation bestätigt werden: Nur das BAR-Toxin, dessen Antigen spezifisch von dem BCR der Zielzellen gebunden wird, wird danach auch internalisiert und kann seine zytotoxische Wirkung entfalten. Zellen, deren BCR nicht das ARS2-Epitop erkennt, werden vom ARS2-BAR-Toxin nicht beeinflusst.

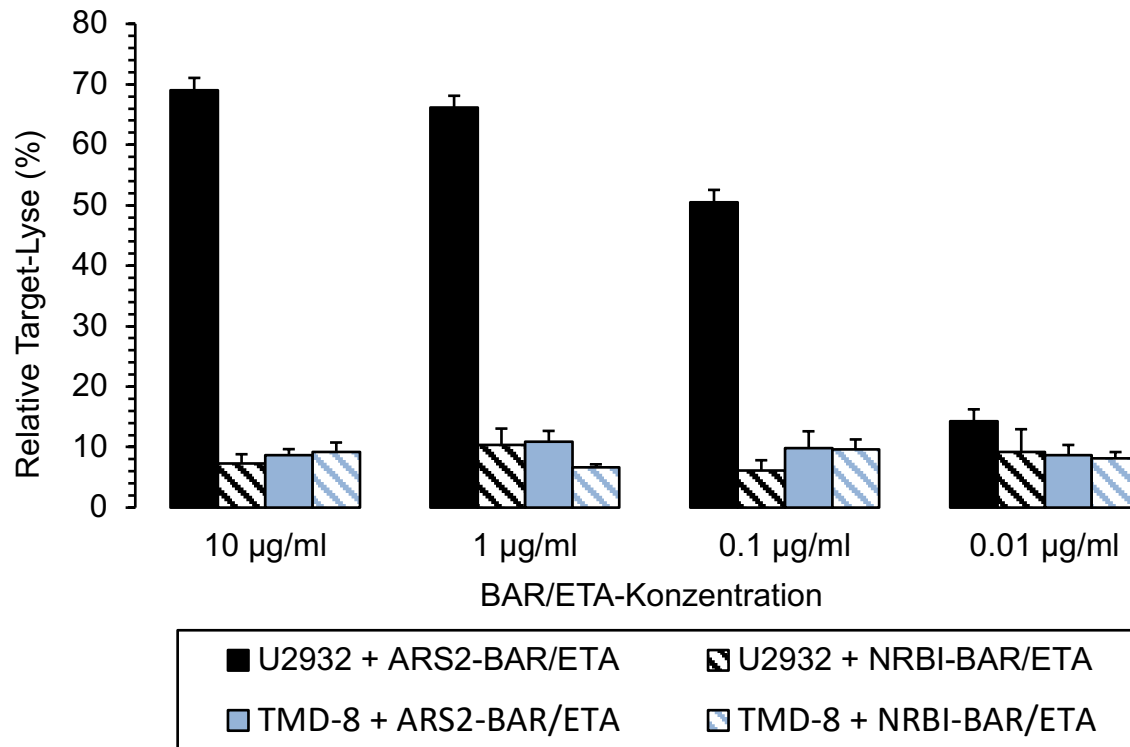


Abbildung 11: Ergebnis des Zytotoxizitätsassays gegen U2932 und TMD-8. Dargestellt ist die Lyserate der jeweiligen Target-Zellen nach Zugabe der angegebenen BAR-Toxine (Mittelwert +/- SEM). Das Wachstum der ARS2-unspezifischen Linie TMD-8 blieb dabei unabhängig von dem eingesetzten BAR-Toxin unbeeinflusst. Gleiches war auch bei der ARS2-spezifischen Zelllinie U2932 zu beobachten, wenn diese mit dem NRBI-Kontrollbar-Toxin behandelt wurde. Zytotoxisch, und dabei ebenso konzentrationsabhängig bis 0,1 µg/ml, wirkte nur das ARS2-BAR-Toxin gegen U2932.

Die Zellen beider ARS2-positiven Zelllinien wurden spezifisch nur vom ARS2-BAR-Toxin getötet. Dabei war die Lyserate der U2932-Zelllinie bei einer Konzentration des ARS2-BAR-Toxins von 10 und 0,01 µg/ml statistisch signifikant ($p = 0,04$) höher als die der OCI-Ly3 Zelllinie (**Abbildung 12**). Da jedoch, wie im Abschnitt zuvor beschrieben, die Lyse dieser beiden ARS2-positiven Linien bei 0,01 µg/ml des ARS2-BAR-Toxins im Vergleich zu den ARS2-negativen Kontrollen prinzipiell nicht mehr signifikant unterschiedlich war (siehe **Abbildung 10** und **Abbildung 11**), spielt die Tatsache, dass U2932-Zellen im Vergleich zu

OCI-Ly3 auch bei 0,01 µg/ml noch signifikant stärker lysiert wurden, keine Rolle. Bei 1 und 0,1 µg/ml war keine statistisch signifikant unterschiedliche zytolytische Sensitivität gegenüber ARS2-BAR-ETA zwischen den beiden Zelllinien festzustellen.

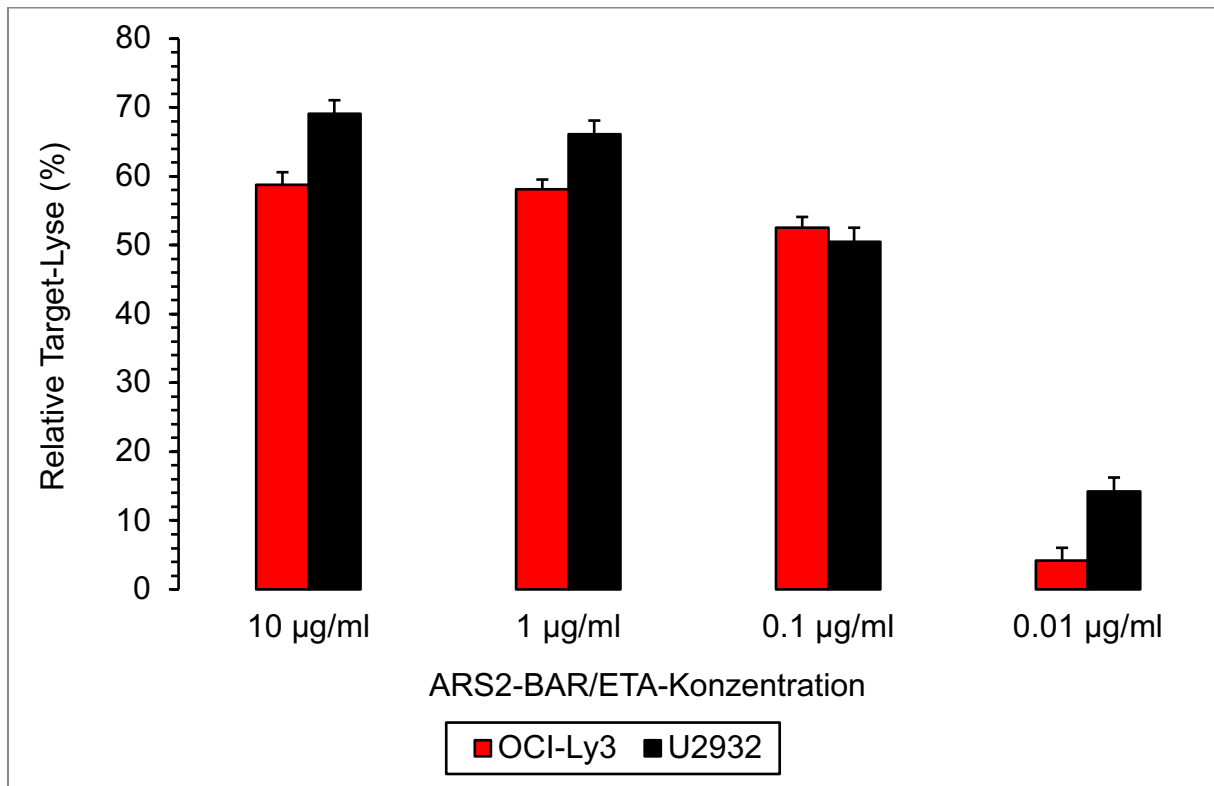


Abbildung 12: Vergleich der Sensitivität gegen das ARS2-BAR-Toxin der eingesetzten ARS2-spezifischen Zelllinien. Dargestellt ist die Lyse der beiden ARS2-positiven Target-Zelllinien OCI-Ly3 und U2932 nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen des ARS2-BAR-Toxins (Mittelwert +/- SEM). Bei einer ARS2-BAR-Toxin-Konzentration von 10 µg/ml und von 0,01 µg/ml war die Sensitivität von U2932 gegen das ARS2-BAR-Toxin im Vergleich zu OCI-Ly3 schwach signifikant ($p = 0,04$) stärker ausgeprägt, was sich in den etwas höheren Lyseraten niederschlug.

6.2 Ergebnisse des *in vivo* Tumormodells

6.2.1 Etablierung des Tumormodells

Es wurden vier Tierkohorten gebildet, die dann jeweils mit Tumorzellen einer ARS2-positiven (OCI-Ly3, U2932) oder ARS2-negativen (HBL-1, TMD-8) Zelllinie inokuliert wurden. Die Tumorzellinokulation erfolgte am Tag 0. Die Bestimmung des Tumolvolumens wurde ab Tag 7 regelmäßig durchgeführt.

Untersucht wurden die Unterschiede vom jeweiligen linken und rechten Tumor jeder Maus, die Unterschiede des Tumorwachstums von Tier zu Tier innerhalb einer Kohorte und die Unterschiede des Tumorwachstums zwischen den Tieren, die mit verschiedenen Zelllinien inokuliert wurden.

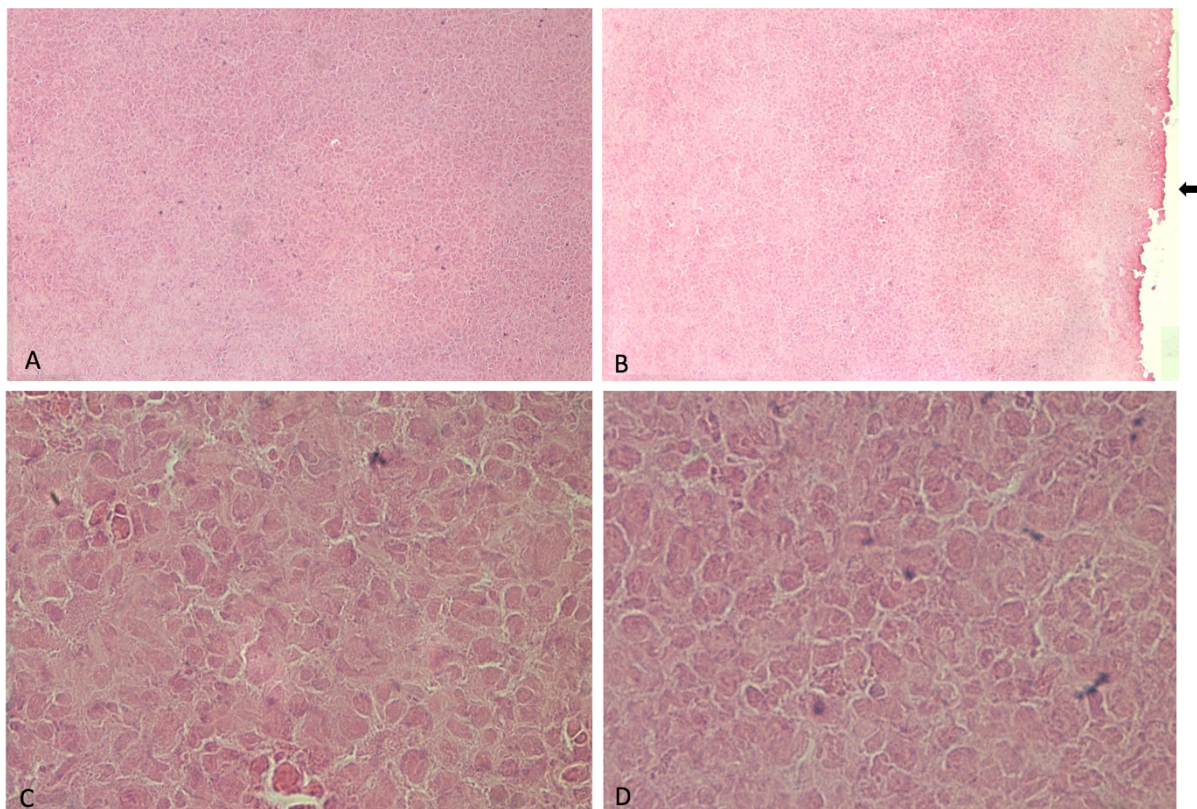


Abbildung 13: Histologische Färbung der Tumoren. Lichtmikroskopische Aufnahmen eines HE-gefärbten OCI-Ly3- (A) bzw. HBL-1- (B) Tumors in zehnfacher und hundertfacher (C, D) Vergrößerung. Auf den Bildern sind dichte, monoklonale lymphozytäre Zellverbände zu sehen. Makroskopisch wiesen die Tumoren eine Tumorkapsel auf, die im Falle des HBL-1-Präparats mit angeschnitten wurde (Pfeil).

Übergeordnet zeigte sich, dass sich in allen Tieren jeder Kohorte an der Stelle der Inokulation Tumoren entwickelten (**Abbildung 13**). Diese nahmen in allen Fällen progressiv an Größe zu, bis ein kritischer Tumordurchmesser von 15 mm erreicht wurde. Auffallend war jedoch, dass

die Tumoren aus den Zelllinien OCI-Ly3 und HBL-1 schneller an Volumen zunahmen (**Abbildung 14, Abbildung 15**), während die Tumoren beiden anderen Zelllinien (U2932 und TMD-8) langsamer anwuchsen (**Abbildung 16, Abbildung 17**). Die Parameter der Inokulation werden im Folgenden beschrieben.

6.2.1.1 Unterschied zwischen dem linken und rechten Tumor einer Maus.

Die Entwicklung des linken und rechten Tumors jeder Maus variierte in drei der vier Tierkohorten deutlich (**Abbildung 14, Abbildung 15, Abbildung 16**).

Nur in der mit TMD-8-Zellen inokulierten Kohorte zeigten zwei Mäuse eine im Seitenvergleich sehr gleichmäßige Volumenzunahme der Tumoren. Bei **Tier Nr. 2** in dieser Gruppe entwickelte sich der Tumor in der rechten Flanke so schnell, dass dieses Tier bereits nach 16 Tagen euthanasiert werden musste. Somit stellte dieses Tier einen klaren Ausreißer in der Gruppe dar und wurde deshalb nicht gewertet (**Abbildung 17**).

6.2.1.2 Anwachsen von OCI-Ly3: Vergleich zwischen beiden Flanken

Die Proliferation der Tumoren nach Inokulation dieser Zellen zeigte eine deutliche Varianz zwischen den linken und rechten Flanken der drei Tiere dieser Kohorte (**Abbildung 14**). Auffallend war hier die signifikante „Linkslastigkeit“ der Inokulation, die bei **Maus 2** bereits ab dem siebten Tag (d7) und bei **Maus 1 und 3** dann ab Tag 14 offensichtlich wurde. Die OCI-Ly3-Tumoren in den rechten Flanken zeigten dagegen in allen drei Tieren über den gesamten Beobachtungszeitraum von 18 (Maus Nr. 2) bzw. 21 Tagen nur eine gleichermaßen mäßige Proliferation. Zusammengefasst wuchsen die OCI-Ly3-Tumoren in der linken Flanke von **Maus Nr. 1 und Nr. 2** um 50 % stärker als in der rechten Seite dieser Tiere. Bei der **Maus Nr. 3** nahm das Tumolvolumen links sogar dreimal stärker als rechts zu. Somit zeigten die Tumoren der OCI-Ly3-Kohorte im Seitenvergleich eine große Variabilität des Tumolvolumens.

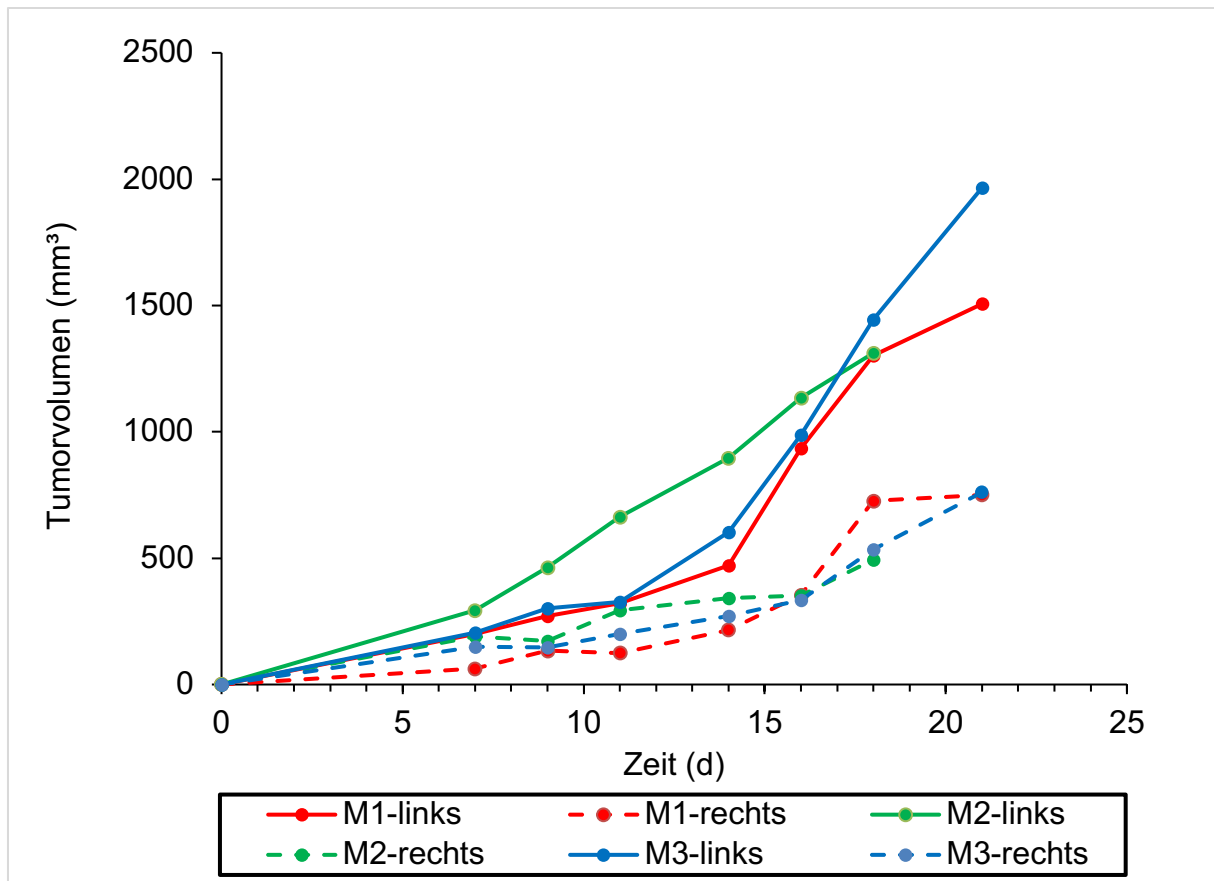


Abbildung 14: Tumorwachstumskurve der mit OCI-Ly3-Zellen inokulierten Tiere. Dargestellt ist die Entwicklung des Tumorstadiums der einzelnen Tumoren im Verlauf der Zeit. Alle drei Mäuse (M1-M3) zeigten deutliche Unterschiede zwischen dem Tumorstadium der linken und rechten Flanke.

6.2.1.3 Anwachsen von U2932: Vergleich zwischen beiden Flanken

Das Tumorstadium auch dieser ARS2^{pos.} DLBCL Zelllinie zeigte eine Links/Rechts-Diskrepanz (**Abbildung 15**). Diese war bei **Maus 1** am deutlichsten ausgeprägt, wo der Tumor in der rechten Flanke im Vergleich zur linken Seite mehr als doppelt so stark proliferierte.

Auch bei **Maus 2** nahm das Tumorstadium in beiden Flanken ab Tag 23 unterschiedlich stark zu. Allerdings war die Differenz zwischen den beiden Seiten nicht so groß wie bei **Maus Nr. 1** und in diesem Fall linksdominant.

Dagegen proliferierten die Lymphomzellen links wie rechts bei **Maus 3** über den gesamten Beobachtungszeitpunkt von 43 Tagen nahezu exakt gleichermaßen.

Somit war auch die Inokulation von U2932 in zwei/drei Mäusen von einer teilweise deutlichen Links/Rechts-Diskrepanz geprägt.

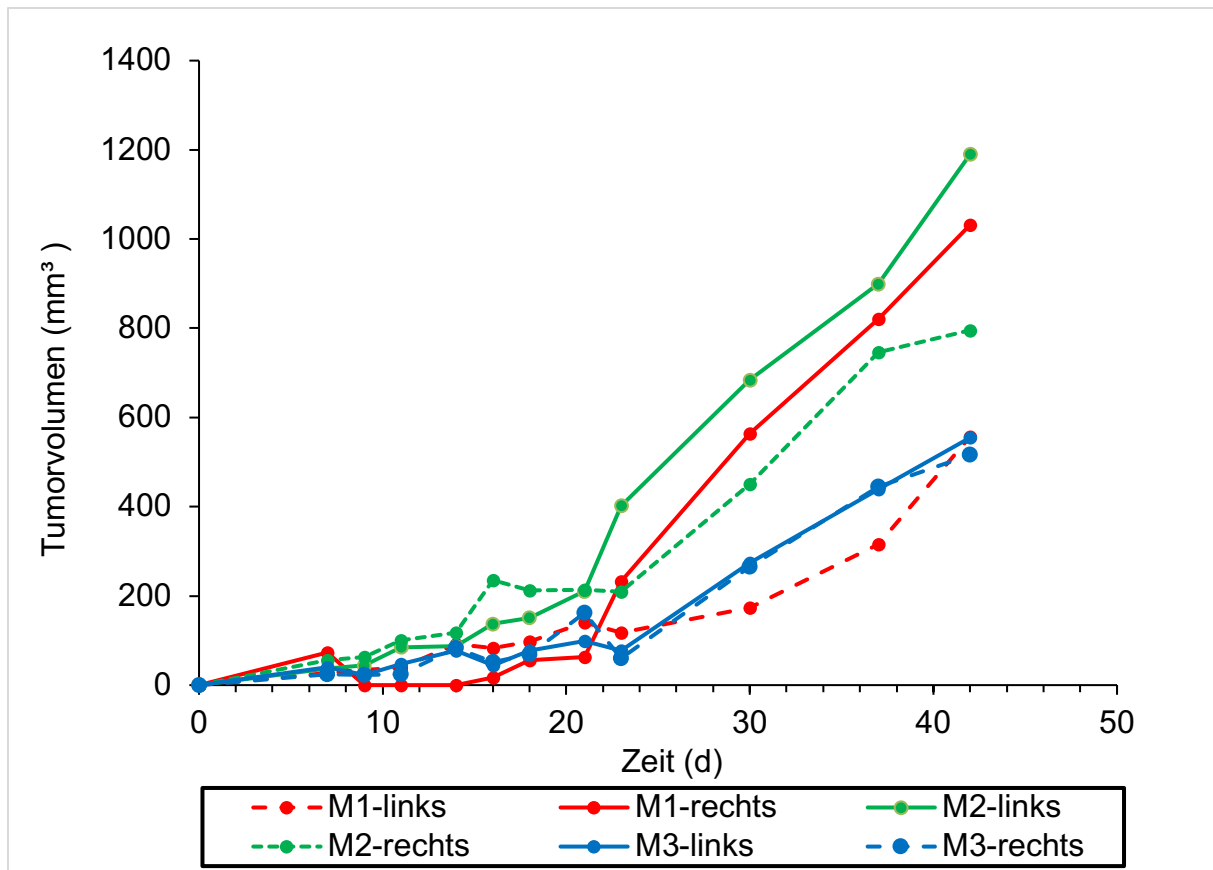


Abbildung 15: Tumorwachstumskurve der mit U2932-Zellen inokulierten Tiere. Dargestellt ist die Entwicklung des Tumorzvolumens im Verlauf der Zeit. Die Tumoren beider Seiten der dritten Maus zeigten ein fast deckungsgleiches Wachstum, während die der ersten und zweiten Maus ab Tag 23 große Unterschiede aufwiesen.

6.2.1.4 Anwachsen von HBL-1: Vergleich zwischen beiden Flanken

Die Tumorgenese dieser ARS2^{neg}-DLBCL-Variante verlief, was das Tumorzvolumen betrifft, in den ersten beiden Wochen auf beiden Seiten aller drei Tiere nahezu gleich (**Abbildung 16**). Danach begannen sich die Tumoren in den beiden Flanken von **Maus Nr. 2 und 3** unterschiedlich zu entwickeln. So betrug das Tumorzvolumen bei **Maus 3** am Tag 21 links das 1,8-fache des Tumors in der rechten Seite und induzierte bereits die Euthanasie.

Bei **Maus 2** proliferierten die Lymphomzellen links zwischen Tag 15 und 19 deutlich schneller als rechts und führten am Tag 18 zu einem zwischenzeitlich mehr als doppelt so großem Tumorzvolumen. Interessanterweise nahm das Volumen des linken Tumors bis zur nächsten Messung drei Tage später sogar leicht ab. Ab Tag 21 jedoch zeigten die Tumoren in beiden Seiten wiederum eine nahezu gleiche Proliferationsrate was dazu führte, dass am Tag 23 der linke Tumor nur noch knapp 30 % größer war als der in der rechten Flanke.

Bei **Maus 1** entwickelten sich bis zur Messung am Tag 18 nach Inokulation die Lymphome links wie rechts mit nahezu einer gleichen Kinetik. Erst in den letzten drei Beobachtungstagen nahm das Tumorumfang links um 25 % mehr zu.

Auffallend war wiederum, dass genau wie nach der Inokulation der beiden zuvor beschriebenen DLBCL-Modelle OCI-Ly3 und U2932, wenngleich auch unterschiedlich stark ausgeprägt, meistens die Lymphome in der linken Seite der jeweiligen Tiere stärker proliferierten.

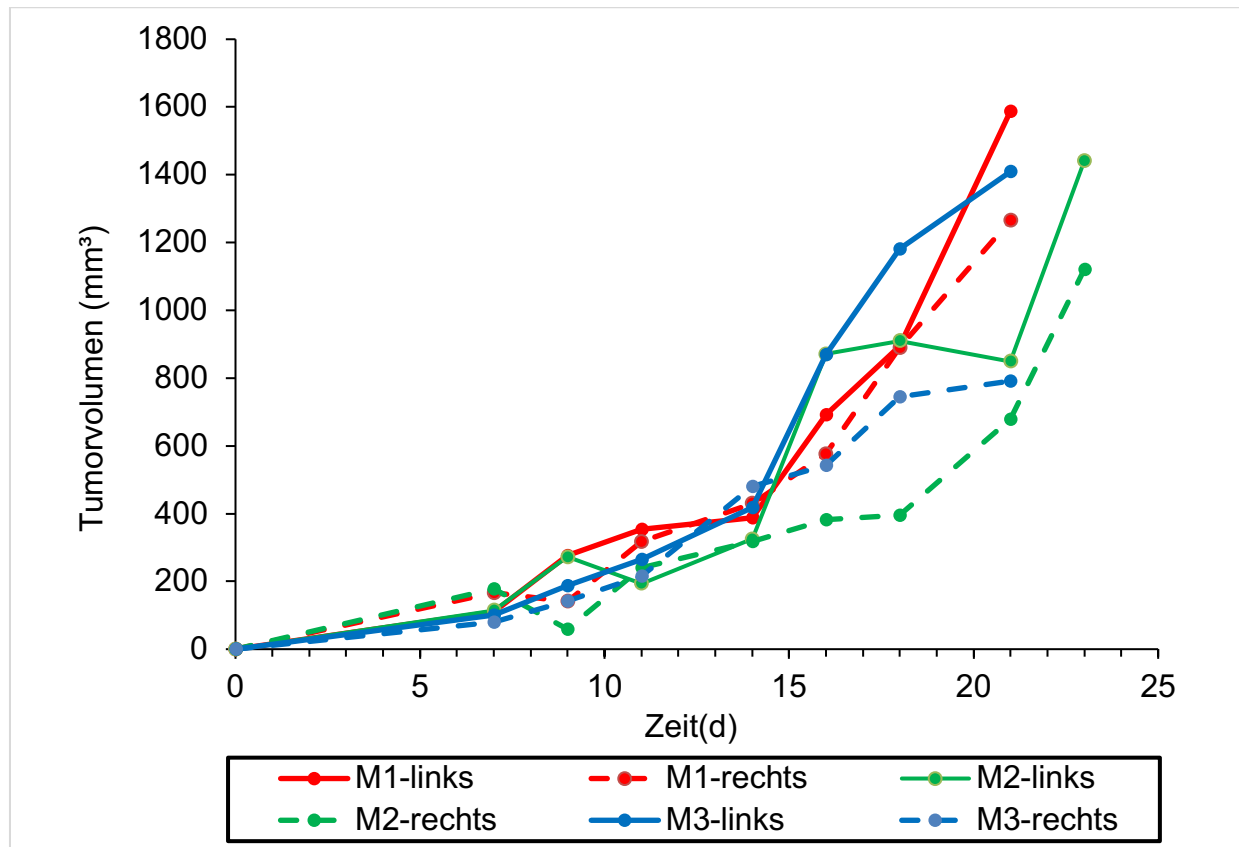


Abbildung 16: Tumorwachstumskurve der mit HBL-1-Zellen inokulierten Tiere. Dargestellt ist die Entwicklung des Tumorumfangs im Verlauf der Zeit. Die Tumoren der ersten Maus zeigten die geringste und die der dritten Maus die größte Heterogenität in ihrem Wachstum.

Genau wie OCI-Ly3 proliferierten die Zellen von HBL-1 im Mittel über beide Flanken schneller. Darum mussten die Tiere dieser beiden Inokulations-Kohorten bereits am Tag 21 bzw. 23 euthanasiert werden (**Abbildung 14, Abbildung 16**).

6.2.1.5 Anwachsen von TMD-8: Vergleich zwischen beiden Flanken

Die Lymphome in beiden Flanken von **Maus 3** zeigten im Seitenvergleich aller Maus/Lymphom-Ansätze die geringsten Unterschiede und das über den gesamten Beobachtungszeitraum von 42 Tagen (**Abbildung 17**).

Auch die Tumoren beider Seiten von **Maus 1** zeigten bis zum Tag 37 ein geradezu deckungsgleiches Wachstum. Zwischen Tag 37 und 42 wuchs dann allerdings der Tumor in der rechten Flanke schneller und hatte zum Ende der Beobachtungszeit ein um 24 % größeres Volumen im Vergleich zum Tumor in der linken Flanke.

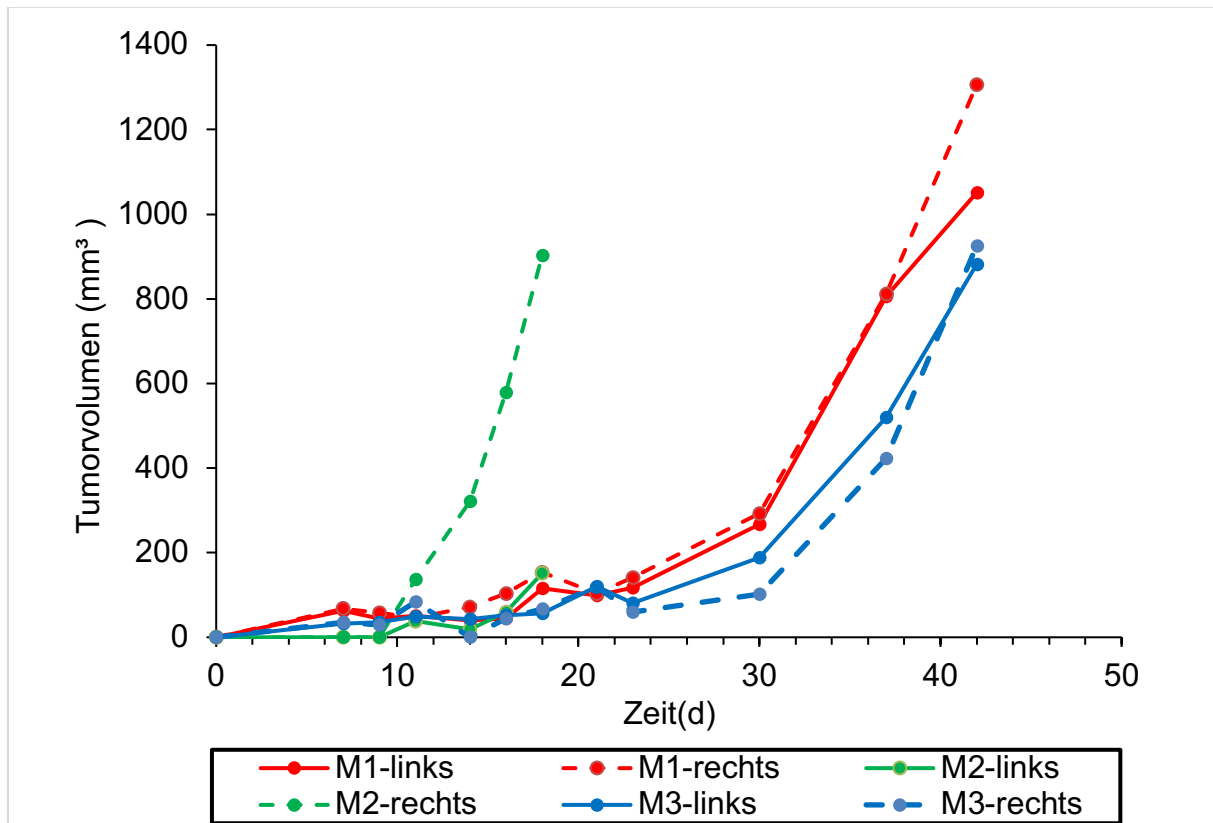


Abbildung 17: Tumorwachstumskurve der mit TMD-8-Zellen inokulierten Tiere. Dargestellt ist die Entwicklung des Tumorzvolumens im Verlauf der Zeit. Die Tumoren beider Seiten der ersten und dritten Maus zeigten ein ähnliches Wachstum. Der rechte Tumor der zweiten Maus zeigte ab Tag 7 eine überproportional schnelle Volumenzunahme und ulzerierte, so dass das Tier bereits am Tag 16 aus dem Versuch genommen werden musste.

Aus der Reihe verlief das Wachstum der TMD-8-Tumoren bei **Maus 2** deren Tumor in der rechten Flanke ab Tag 11 weit überdurchschnittlich proliferierte und dadurch bereits nach 16 Tagen sechsmal so groß war wie der auf der linken Seite und sogar bis zu zwanzigmal größer als die anderen Tumoren. Zudem wies der Tumor ulzerierende Läsionen auf, so dass dieses Tier schon aus dem Versuch genommen werden musste. Die beiden verbliebenen Mäuse der

TMD-8-Kohorte waren somit die Tiere bei denen die Lymphome die geringsten Unterschiede im Links/Rechts-Vergleich aufwiesen.

6.2.1.6 Unterschied des Tumorwachstums von Tier zu Tier

Um die Unterschiede des Tumorwachstums von Tier zu Tier zu untersuchen, wurde die Zunahme des Tumolvolumens aus dem arithmetischen Mittel aus linkem und rechtem Tumor eines jeden Tieres berechnet. Anschließend wurden die Tumolvolumina der einzelnen Tiere einer Kohorte verglichen.

6.2.1.7 Anwachsen von OCY-Ly3: Vergleich vom Tier zu Tier

Die OCI-Ly3-Gruppe zeigte die geringsten Unterschiede des Tumorwachstums von Tier zu Tier innerhalb ihrer Kohorte (**Abbildung 18**).

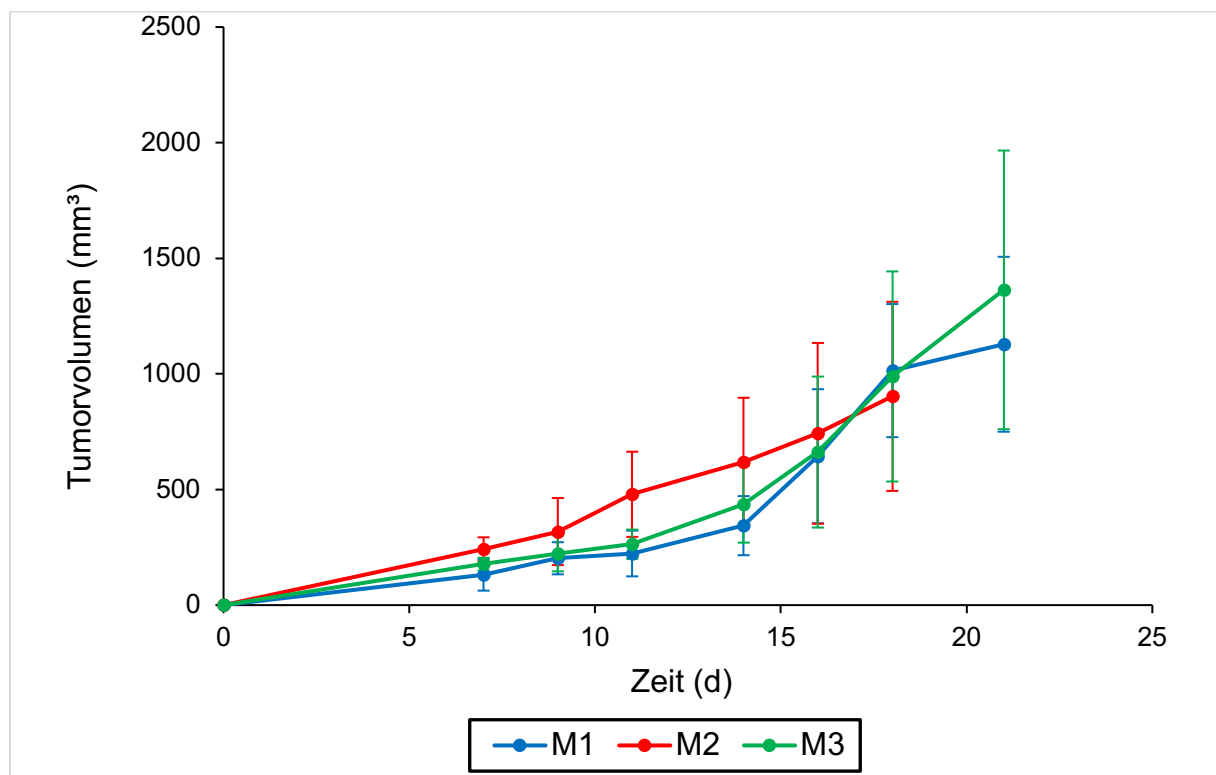


Abbildung 18: Unterschiede von Tier zu Tier in der OCI-Ly3-Kohorte. Dargestellt ist der Mittelwert der Tumolvolumina pro Maus (rechter und linker Tumor; +/- SEM). Im Besondern zeigten Maus 1 und Maus 3 ein sehr ähnliches Tumorwachstum.

Zudem wuchsen die Tumoren im Vergleich zu den anderen Zelllinien am schnellsten. **Maus 1 und 3** zeigten dabei eine sehr ähnliche Wachstumskinetik. Nach einem langsamen und konstanten Wachstum bis Tag 11, nahmen danach beide Tumoren schneller an Volumen

zu. Zwischen Tag 18 und 21 war dann bei **Maus 1** eine Abflachung der Wachstumskurve zu sehen.

Auch bei **Maus 2** blieb die Geschwindigkeit des Tumorwachstums zu Versuchsbeginn beiderseits noch gleichermaßen konstant. Trotz der Tatsache, dass bei **Maus 2** am Tag 18 der Mittelwert von linkem und rechtem Tumolvolumen noch unter den Abbruchkriterium von 1500 mm^3 lag, hatten sich die Tumoren in den beiden Flanken des Tieres so unterschiedlich schnell entwickelt (links > rechts) (**Abbildung 14**), dass die Maus bereits am Tag 18 eingeschläfert werden musste. Die beiden anderen Tiere der OCI-Ly3-Kohorte wurden drei Tage später dann ebenfalls erlöst.

6.2.1.8 Anwachsen von U2932: Vergleich von Tier zu Tier

Bis Tag 14 entwickelten sich die Volumina der Tumoren aller drei Tiere nahezu gleich (**Abbildung 19**).

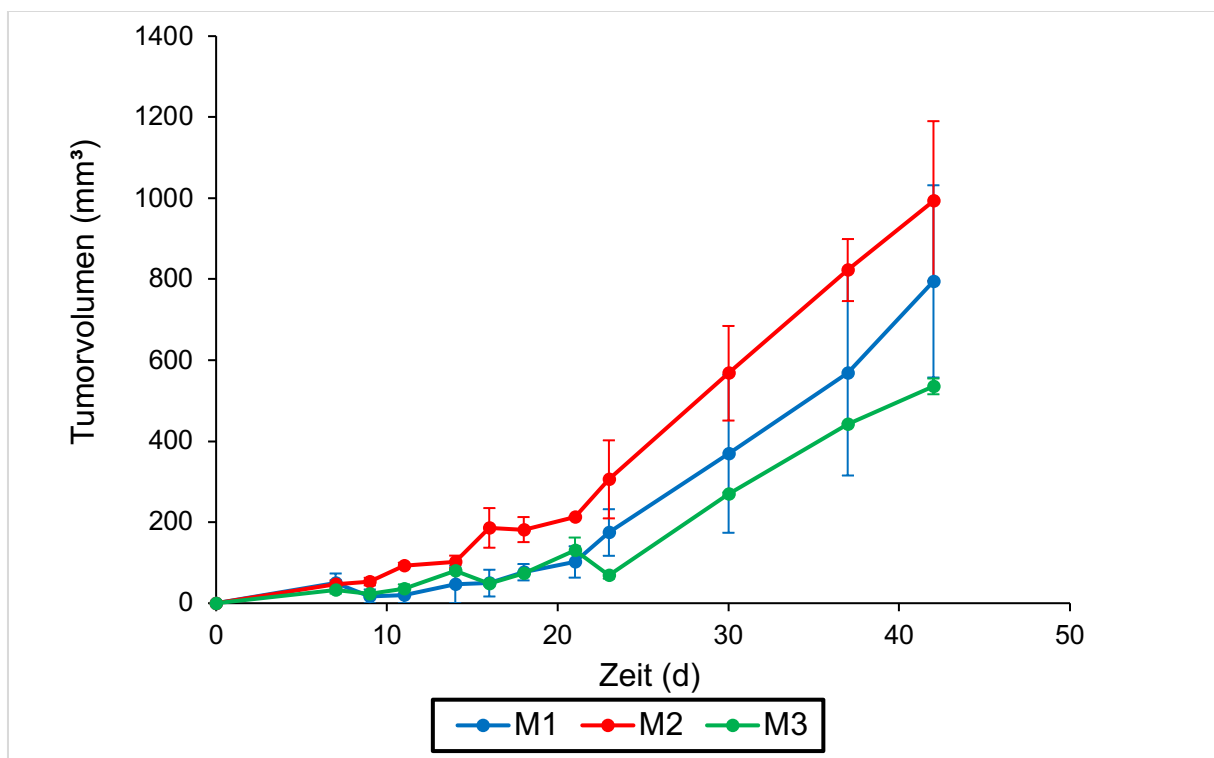


Abbildung 19: Unterschiede von Tier zu Tier in der U2932-Tierkohorte. Dargestellt ist der Mittelwert der Tumorzumina pro Maus (rechter und linker Tumor; +/- SEM). Trotz sehr ähnlicher Wachstumsraten sowohl in den ersten 14 Tagen als auch zwischen Tag 23 und 37 entwickelten sich die Volumina der Tumoren zwischen Tag 14 und 21 in dieser Kohorte von Tier zu Tier sehr unterschiedlich.

Bis zum Tag 21 nahm der Tumor in **Maus 2** dann bereits deutlicher zu als die Tumoren in den anderen beiden Tieren.

Da das Volumen des Tumors bei **Maus 3** zwischen Tag 21 und Tag 23 sogar leicht stagnierte, hatten alle drei Tiere an diesem Tag ein unterschiedliches Ausgangsvolumen von dem sich dann die U2932-DLBCLs in allen drei Tieren wiederum mit nahezu identisch hohen Wachstumsraten bis Tag 37 weiterentwickelten. Zwischen Tag 37 und 42 schwächte sich das Wachstum bei **Maus 3** etwas ab, während es bei **Maus 1** sogar noch einmal leicht zunahm. Alle Tiere der Gruppe wurden am Tag 42 eingeschläfert. Insgesamt zeigten die Tiere der U2932-Kohorte die größten Abweichungen ihres Tumolvolumens untereinander.

6.2.1.9 Anwachsen von HBL-1: Vergleich von Tier zu Tier

Die Tumoren der HBL-1-Tierkohorte zeigten im Vergleich von Tier zu Tier bis zum Tag 16 eine fast übereinstimmende Wachstumskinetik (**Abbildung 20**).

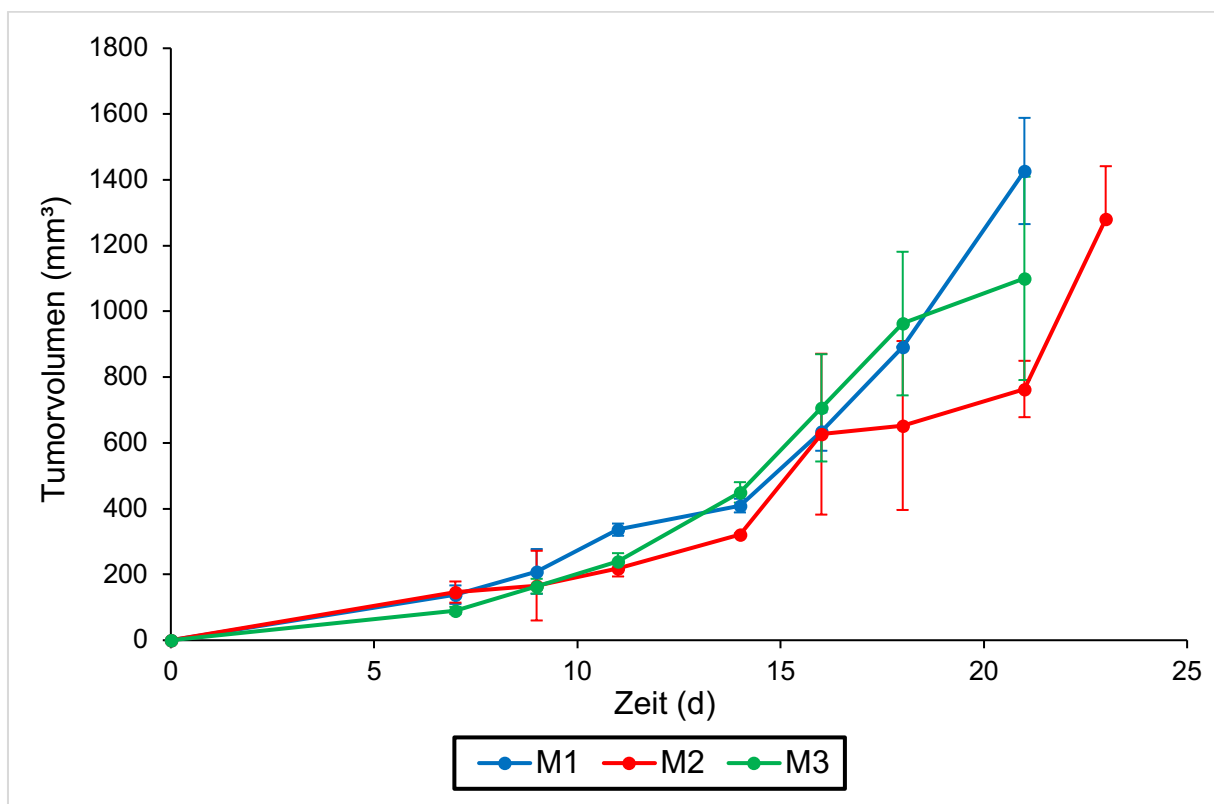


Abbildung 20: Varianz von Tier zu Tier in der HBL-1-Kohorte. Dargestellt ist der Mittelwert der Tumolvolumina pro Maus (rechter und linker Tumor; +/- SEM). Obwohl alle drei Tiere eine ähnliche Tumorstadiumskinetik bis Tag 16 aufwiesen, wurden im weiteren Verlauf unterschiedliche Tumorstadiummole erreicht.

Danach fiel die Zunahme des Gesamtvolumens des Tumors in **Maus 2** im Vergleich zu dem der beiden anderen Tiere ab, um dann an ihren letzten beiden Beobachtungstagen (d 21-23) eine maximale Proliferationsrate zu erreichen. Bei **Maus 3** flachte die Wachstumskurve ihrer

Tumoren erst am Tag 18 ab. Das wiederum hatte zur Folge, dass am letzten Tag an dem die HBL-1-Kohorte vollzählig war (Tag 21), die Gesamtvolumina der Tumoren aller drei Tiere deutlich unterschiedlich groß waren.

6.2.1.10 Anwachsen von TMD-8: Vergleich von Tier zu Tier

Die Volumina der Tumoren in **Maus 1 und Maus 3** zeigten bis Tag 16 eine fast gleiche Kinetik (**Abbildung 21**).

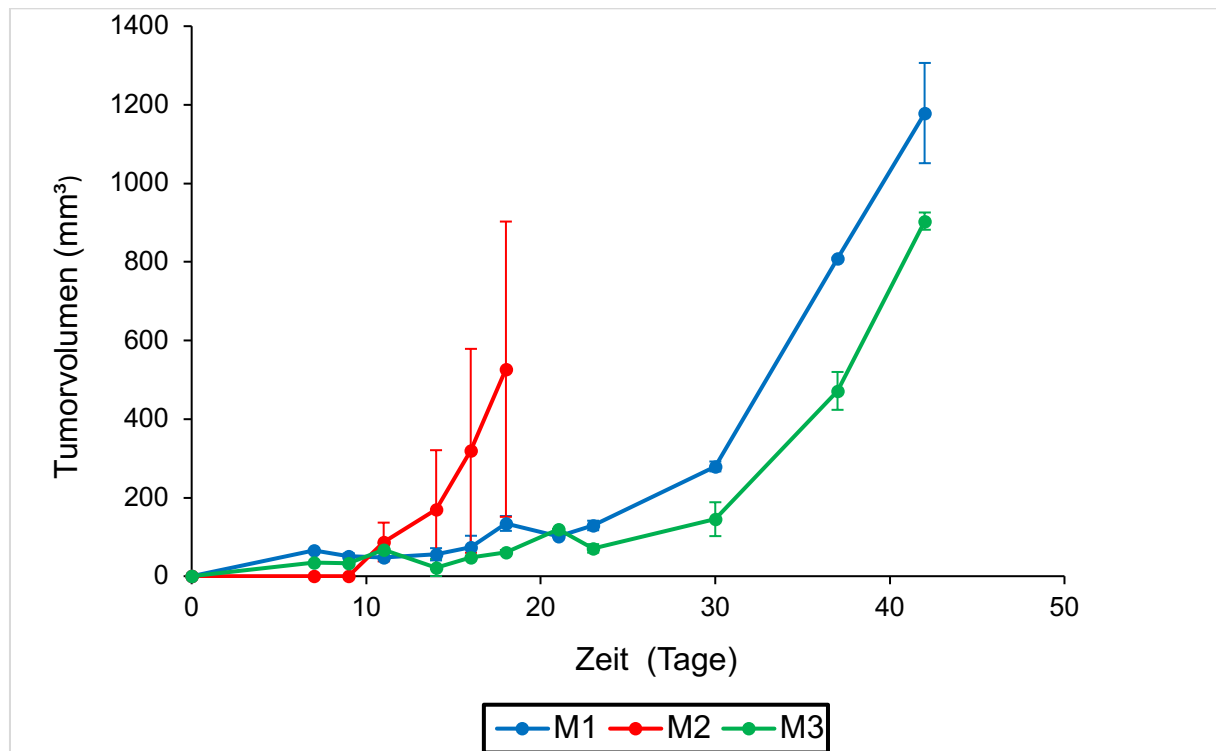


Abbildung 21: Varianz von Tier zu Tier in der TMD-8- Kohorte. Dargestellt ist der Mittelwert der Tumorvolumina pro Maus (rechter und linker Tumor; +/- SEM). Als klarer Ausreißer dieser Tiergruppe zeigte sich die zweite Maus (M2), dessen rechter Tumor überproportional schnell wuchs und ulzerierende Läsionen entwickelte. Das Tier wurde aufgrund dessen frühzeitig aus dem Versuch genommen und euthanasiert.

In den darauffolgenden zwei Tagen legte das Tumorvolumen in **Maus 1** dann deutlich mehr zu, um jedoch bis Tag 21 zu stagnieren. Dieses Hin und Her führte dazu, dass die Volumina der Tumoren in **Maus 1 und 3** an diesem Tag wieder gleich groß waren. Bis zur nächsten Messung am Tag 23 wurde jetzt wiederum der Tumor in **Maus 3** etwas kleiner. Von diesem Tag an, nahmen die Gesamtvolumina der Tumoren in beiden Mäusen dann sogar exponentiell zu, was in **Maus 1** zu einem um 25 % größeren Tumor am Abbruchtage 42 führte.

Bei **Maus 2** ergab auch das gemittelte Gesamtvolumen aufgrund des außergewöhnlich schnell wachsenden Tumors in der rechten Flanke, bereits ab Tag 11 eine exponentielle Zunahme.

Das Tier musste auch aufgrund von Ulzerationen des rechten Tumors bereits am Tag 18 aus dem Versuch genommen werden.

Somit blieben für den Tier-zu-Tier-Vergleich der TMD-8-Kohorte nur zwei Tiere übrig (1 und 3). Bei diesen folgte die Zunahme des Gesamtvolumens der Tumoren einer sehr gleichen Kinetik. Lediglich zwischen Tag 16 und 23 nach Inokulation verliefen die beiden Wachstumskurven teilweise sogar leicht antizyklisch, was letzten Endes ursächlich für das doch signifikant geringere Endvolumen des TMD-8-Lymphoms in **Maus 3** war.

6.2.1.11 Unterschiede im Anwachsen der Tumoren aus den Zelllinien

Um das unterschiedliche Tumorstadium der vier Zelllinien miteinander zu vergleichen, wurde der Mittelwert aus allen sechs Tumoren (pro Tier zwei Flanken) einer jeden Zelllinien-Kohorte gebildet (**Abbildung 22**). Danach ließen sich die vier Zelllinien aufgrund der Kinetik ihres Tumorstadiums in zwei Gruppen einteilen:

- Zelllinien mit einem schnelleren Tumorstadium: **OCI-Ly3** und **HBL-1**
- Zelllinien mit einem langsameren Tumorstadium: **U2932** und **TMD-8**

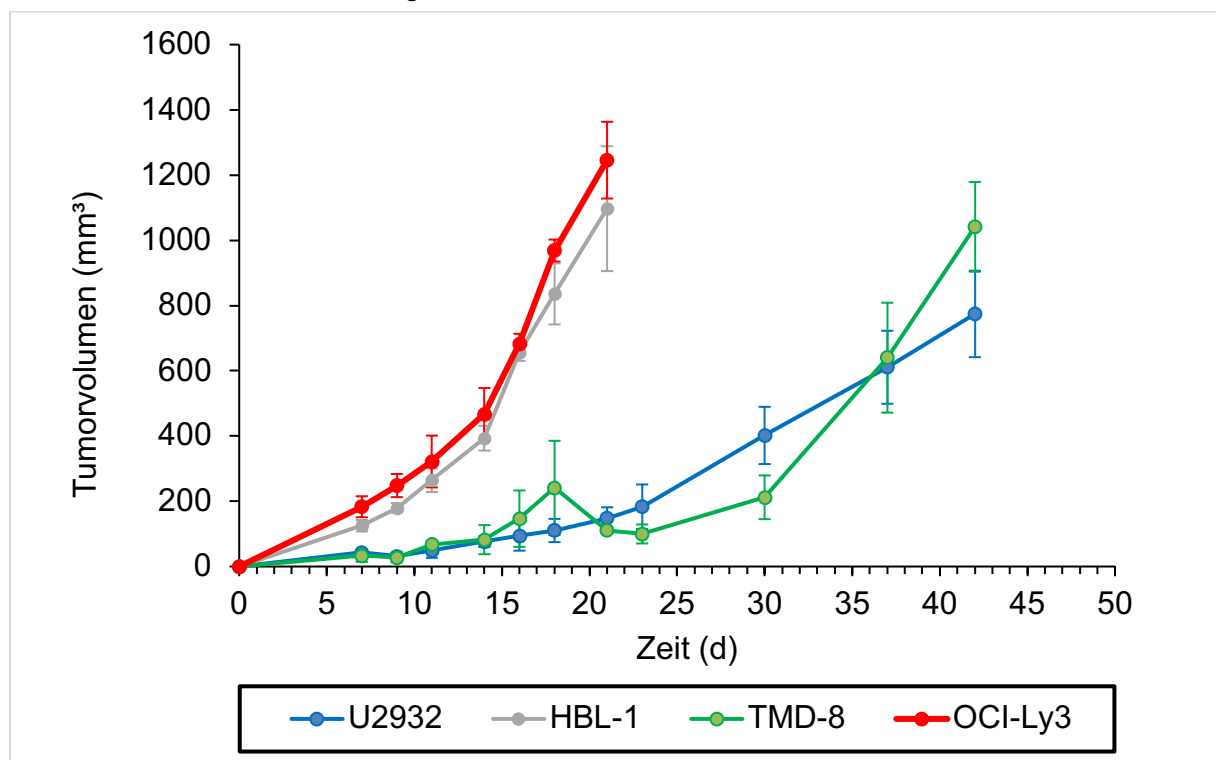


Abbildung 22: Unterschied des Tumorstadiums der vier Zelllinien. Abgebildet sind jeweils die Mittelwerte der Tumorstadiume einer Zelllinie (+/- SEM). Anhand ihrer Wachstumskinetik lassen sich zwei Gruppen unterscheiden: Zelllinien mit einem schnelleren (OCI-Ly3 und HBL-1) und mit einem langsameren (U2932 und TMD-8) Tumorstadium.

Die meisten Tiere, die mit den beiden schneller wachsenden DLBCL-Linien inokuliert wurden (OCI-Ly3, HBL-1) erreichten bereits am Tag 21 spätestens jedoch bis Tag 23 den kritischen Tumordurchmesser und mussten deshalb euthanasiert werden. Im Vergleich dazu brauchten die Tumoren der Tiere, die mit den beiden langsamer wachsenden DLBCL-Linien (TMD-8, U2932) inokuliert wurden, nahezu doppelt so lang, um das Abbruchkriterium zu erfüllen, und wurden erst am Tag 42 eingeschläfert. Zwischen den beiden schneller wachsenden Linien OCI-Ly3 und HBL-1 sowie zwischen den beiden langsamer wachsenden Linien U2932 und TMD-8 wurden untereinander keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt ($p > 0,05$). Anders zusammengefasst: zwischen beiden ARS2-positiven Zelllinien (OCI-Ly3 und U2932) bestand somit ein statistisch signifikanter Unterschied in der Geschwindigkeit des Tumorwachstums (d11: $p = 0,0144$, d21: $p = 0,034$). Analog war der Unterschied in der Zunahme des Tumolvolumens zwischen den beiden ARS2-negativen Zelllinien ebenso signifikant (d9 und d18 jeweils: $p = 0,0057$). Wie nicht anders zu erwarten, hatte die Antigen-Spezifität des jeweiligen BCR selbstredend keine Auswirkung auf das Anwachsen der vier DLBCL.

Somit standen für die nun anstehenden „Proof of Principle“-Versuche mit den BAR-Toxine zwei murine DLBCL-Modelle zur Verfügung: Eines mit aggressiver verlaufender Entwicklung der beiden Lymphome und eines mit langsamer proliferierenden Lymphomen. Beide DLBCL-Paare jeweils mit einer ARS2-positiven und einer ARS2-negativen Linie. Wie zuvor in Kapitel 6.2.1.6 beschrieben, zeigte im Vergleich von Tier zu Tier die mit OCI-Ly3-Zellen inokulierte Tierkohorte die kleinsten Unterschiede in Tumorwachstum. In der mit U2932-Zellen inokulierten Tiergruppe wurden hingegen die größten Unterschiede des Tumorwachstums beobachtet. Um ein möglichst homogenes Tumorwachstum zu erreichen, wurde die OCI-Ly3-Zelllinie für den Einsatz in den nächsten Versuchen ausgewählt. Da die ARS2-negative Zelllinie HBL-1 eine sehr ähnliche Kinetik in ihrem Tumorwachstum zeigte wie OCI-Ly3, wurde HBL-1 als Negativkontrolle ausgewählt. Der Einsatz nur zweier Zelllinien bedeutete auch, dass in den anstehenden Versuchen mit weniger Tieren gearbeitet werden konnte. Und das war in einem so frühen Versuchsstadium (Proof of Principle) auch ein wesentlicher ethischer Aspekt.

6.2.2 Erste Applikation der BAR-Toxine

Im nächsten Schritt ging es darum, zu testen, ob das ARS2-BAR-Toxin auch *in vivo* zu „seinem“ Tumor gelangt, dort nur an die ARS2-spezifischen B-Zell-Rezeptoren bindet und in der Folge das Wachstum des Tumors negativ beeinflusst. Dazu wurden nach Inokulation der beiden DLBCL-Linien OCI-Ly3 und HBL-1 auch das ARS2-BAR-Toxin und (als Negativkontrolle) das NRBI-BAR-Toxin appliziert.

Wie schon in der ersten Versuchsstaffel, wurden erneut vier Tierkohorten mit jeweils drei Mäusen gebildet. Zwei Kohorten wurden mit 1×10^7 OCI-Ly3-Zellen pro Flanke subkutan inokuliert und zwei mit gleich vielen HBL-1-Zellen. Die nach der Applikation in die Mäuse noch verbliebenen Zellen beider DLBCL-Linien, wurden unmittelbar nach dem Tierversuch nach dem bereits beschriebenen Protokoll (5.2.3) in einem Zytotoxizitätstest eingesetzt, um so deren ARS2-Spezifität und die Sensitivität des ARS2-BAR-Toxins *in vitro* zu testen. Da dieser *in vitro* Test beides bestätigte (Daten nicht gezeigt), waren die ausstehenden *in vivo* Resultate bezüglich dieser beiden Kriterien (ARS2-Spezifität und ARS2-BAR-Toxin-Sensitivität) verlässlich belastbar.

Vier Tage nach der Inokulation der Tumorzellen wurden erstmals 8 µg des jeweiligen BAR-Toxins pro Tier in die Schwanzvene verabreicht. Eine Kohorte (3 Tiere) von jeder Zelllinie bekam das ARS2-BAR-Toxin und die andere Kohorte das NRBI-BAR-Toxin. Die Applikation wurde nach dem gleichen Schema am Tag 7 wiederholt.

Wie bereits in der ersten Versuchsstaffel wurde die Entwicklung der Tumorumfänge ab Tag 4 dreimal wöchentlich mittels Messschiebermessung bestimmt. Getestet wurde, ob die Tumoren der ARS2-spezifischen Tierkohorte (OCI-Ly3), die mit ARS2-BAR-Toxin behandelt wurde, signifikant langsamer wachsen, als die Tumoren in den Tieren der drei Kontroll-Kohorten: OCI-Ly3/NRBI-BAR-Toxin, HBL-1/ ARS2-BAR-Toxin und HBL-1/NRBI-BAR-Toxin.

Bis Tag 7 erfolgte das Tumorwachstum in allen vier Tierkohorten langsam und homogen. Zwischen Tag 7 und Tag 10 nahmen die Tumoren beider OCI-Ly3 Tiergruppen schneller und ab Tag 10 nahezu exponentiell an Volumen zu. Die Kinetik des Tumorwachstums in der mit ARS2-BAR-Toxin behandelten Gruppe und in der Kontrollgruppe (NRBI-BAR-Toxin) blieb durchgehend ähnlich, sodass kein statistisch signifikanter Unterschied des Tumorumfanges in beiden Kohorten beobachtet wurde ($p > 0,05$) (**Abbildung 23**).

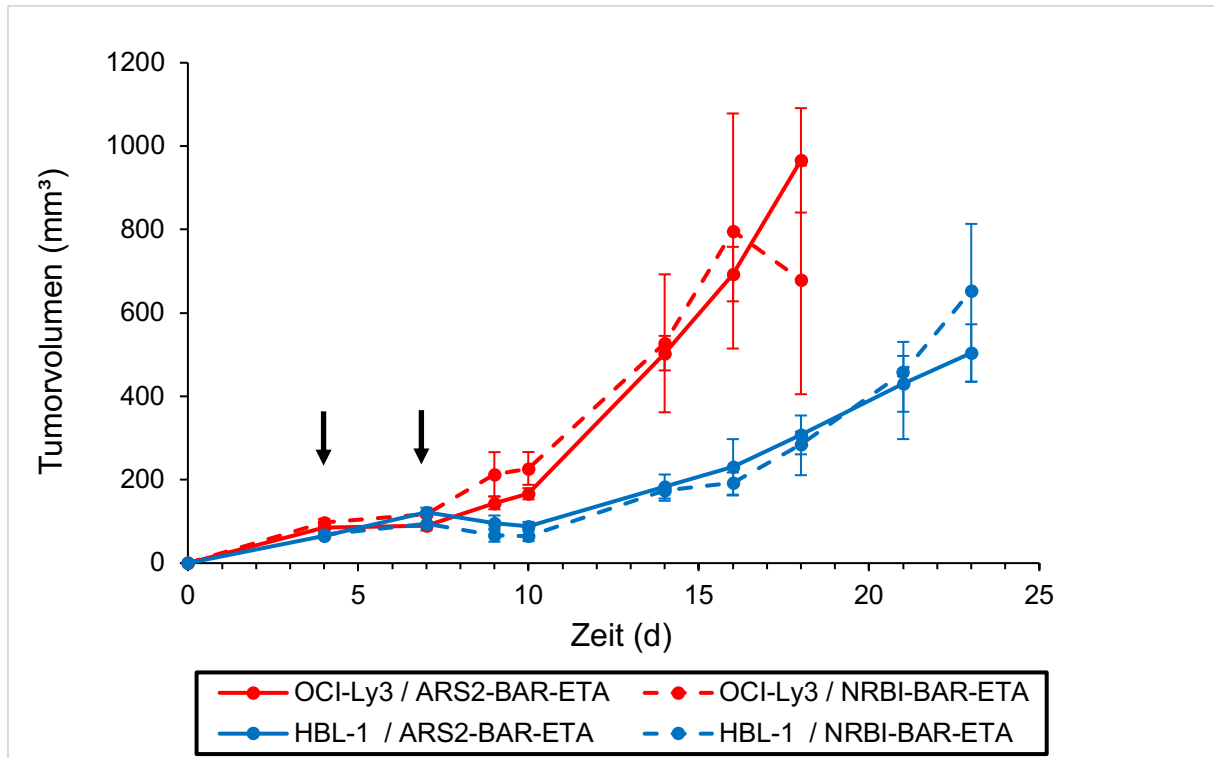


Abbildung 23: Wachstumskurve der mit ARS2-BAR-Toxin oder NRBI-BAR-Toxin behandelten Tiergruppen. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Tumorumfängen der unterschiedlichen Tiergruppen (+/- SEM). Die schwarzen Pfeile markieren die Tage (d4 und d7), an denen die BAR-Toxin-Applikation (jeweils 8 µg i. v.) erfolgte. Die Tumoren der mit OCI-Ly3-Zellen inokulierten Tierkohorten nahmen deutlich schneller an Volumen zu, als die Tumoren der mit HBL-1-Zellen inokulierten Tiergruppen. Bei den mit OCI-Ly3 inokulierten Tieren konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der mit ARS2-BAR-Toxin behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe (NRBI-BAR-Toxin) festgestellt werden (d4-d18: $p > 0,05$).

Die vermeintliche Tumorverkleinerung der Kontrollgruppe zwischen Tag 16 und 18 ist darauf zurückzuführen, dass die Maus mit den größten Tumoren der Kohorte (M2) bereits am Tag 16 den kritischen Tumordurchmesser erreichte und euthanasiert wurde. Die Tumoren der verbliebenen Tiere wuchsen weiter, das arithmetische Mittel des Tumorumfanges wurde deshalb jedoch kleiner. Im Gegensatz dazu nahm das Tumorumfang beider HBL-1-Tiergruppen zwischen Tag 7 und Tag 10 zunächst ab. Die Tumoren zeigten ab Tag 10 dann wieder eine stetige Zunahme des Tumorumfanges, erreichten jedoch nicht die Tumorumfänge der mit OCI-Ly3-Zellen inokulierten Tiere. Die Tiere beider HBL-1-Kohorten wurden erst am Tag 23 euthanasiert.

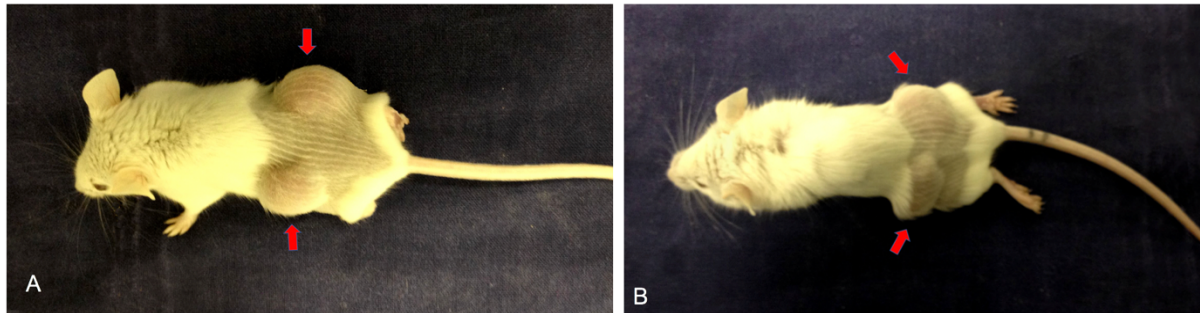


Abbildung 24: Zwei mit OCI-Ly3-Zellen inokulierte Mäuse am Tag des Versuchsabbruchs. **A:** Die Abbildung zeigt eine mit ARS2-BAR-Toxin behandelte Maus am Tag des Versuchsabbruchs. Beide Flanken des Tieres zeigten große subkutane Tumoren (Pfeile). **B:** Die Abbildung zeigt eine mit NRBI-BAR-Toxin behandelte Maus am Tag des Versuchsabbruchs. An beiden Flanken dieser Maus waren ebenfalls große subkutane Tumoren zu sehen (Pfeile). Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied der Tumorumfänge beider Tiere.

Obwohl dasselbe Applikationsprotokoll wie im Vorversuch verwendet wurde, wuchsen die OCI-Ly3-Tumoren jetzt deutlich schneller als im Vorversuch und die Tiere mussten bereits am Tag 18 statt Tag 21 eingeschläfert werden. Das ARS2-BAR-Toxin zeigte bei dem aktuellen Applikationsprotokoll nicht die erwartete Auswirkung auf das Tumorstadium seiner Zielzellen. Auch im Vergleich zu den mit HBL-1 Zellen inokulierten Tieren (**Abbildung 22** vs. **Abbildung 23**), nahmen die Tumoren der mit OCI-Ly3 inokulierten Mäuse schneller an Volumen zu.

Als mögliche Erklärung für das Ausbleiben einer Wirkung des ARS2-BAR-Toxins kamen sowohl der Zeitpunkt der Applikation als auch die verabreichte Dosis in Frage. Durch das nicht vorzusehende starke Tumorstadium im Vergleich zum Vorversuch, war das verwendete Applikationsprotokoll für die BAR-Toxine suboptimal gewählt und somit die applizierte Dosis entweder zu niedrig oder der Applikationszeitpunkt zu spät. Deshalb wurden für die nächste Versuchsreihe unterschiedliche Möglichkeiten diskutiert, um das Applikationsprotokoll zu optimieren. Letztendlich wurde entschieden, die Gesamtdosis auf 16 µg in einer einzelnen Applikation zu konzentrieren. Diese sollte am Tag 6 nach Tumorzellinokulation erfolgen. Zudem wurde die zu inokulierende Zellzahl auf 5×10^6 reduziert und somit nur halb so viele Zellen wie in den Vorversuchen. Da die zytotoxische Wirkung des ARS2-BAR-Toxins *in vivo* zu diesem Zeitpunkt noch nicht hatte gezeigt werden können, wurde auf die Inokulation der Kontrollzelllinie vorerst verzichtet, um nicht unnötig Versuchstiere einzusetzen. Somit wurden für die nächste Versuchsreihe nur zwei Tierkohorten zu je drei Mäusen gebildet, die alle mit

OCI-Ly3-Zellen inokuliert wurden und anschließend entweder das ARS2-BAR-Toxin oder das Kontroll-BAR-Toxin (NRBI) verabreicht bekamen.

6.3 Zweite Applikation der BAR-Toxine

Im nächsten Schritt sollte mit einem optimierten Applikationsprotokoll dann der noch immer ausstehende Nachweis einer Lymphom-inhibierenden Wirkung Lymphom-spezifischer BAR-Toxine *in vivo* erbracht werden. Dabei wurden pro Tier anstatt der zweimaligen Applikation von 8 µg an Tag 4 und Tag 7 jetzt einmalig 16 µg des jeweiligen BARs an Tag 6 verabreicht. Dazu wurden zwei Tierkohorten mit jeweils drei Mäusen gebildet. Beiden Tiergruppen wurden in dieser Versuchsstaffel 5×10^6 OCI-Ly3-Zellen pro Flanke, und somit nur halb so viele Zellen wie in den vorherigen Versuchen, subkutan inokuliert (d0).

Am Tag 6 bekam eine Kohorte 16 µg ARS2-BAR-Toxin und die andere als Negativkontrolle 16 µg NRBI-BAR-Toxin über die Schwanzvene verabreicht. Die Entwicklung der Tumervolumina wurde wie in den Vorversuchen mittels Messschiebermessung ab Tag 6 bestimmt. Die Messungen wurden bis Tag 9 täglich und danach jeden zweiten Tag durchgeführt.

Die Mäuse der mit ARS2-BAR-Toxin behandelten Kohorte zeigten im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe bereits ab Tag 7 ein statistisch relevant langsames Tumorwachstum (d7: $p = 0,014$). Zwei Tiere der NBRI-Kontrollgruppe (M2, M3) erreichten bereits am Tag 16 den kritischen Durchmesser und mussten euthanasiert werden. Alle anderen Tiere wurden am Tag 19 eingeschläfert.

Aus dem Ergebnis dieser Behandlungsrunde ließ sich erstmals ableiten, dass mit einer höheren Dosis des ARS2-BAR-Toxins und eine anfänglich niedrigere Tumorzellzahl das Tumervolumen beeinflusst werden konnte. Allerdings konnte das Tumorwachstum im Vergleich zu der Kontrollgruppe nur partiell und vorübergehend gehemmt werden, weil vermutlich immer noch ein großer Rest des Tumors in den Tieren verblieb. Vor allem konnte jedoch mit diesem Ansatz erstmals die Wirksamkeit eines BAR-Toxins *in vivo* demonstriert werden. Zusammenfassend bestätigte sich also prinzipiell die Eignung von BAR-Toxinen als strikt Tumor-restringiertes Therapiekonzept. Somit war mit dieser Arbeit der „Proof of Principle“ dieses neuen Therapiekonzepts erbracht.

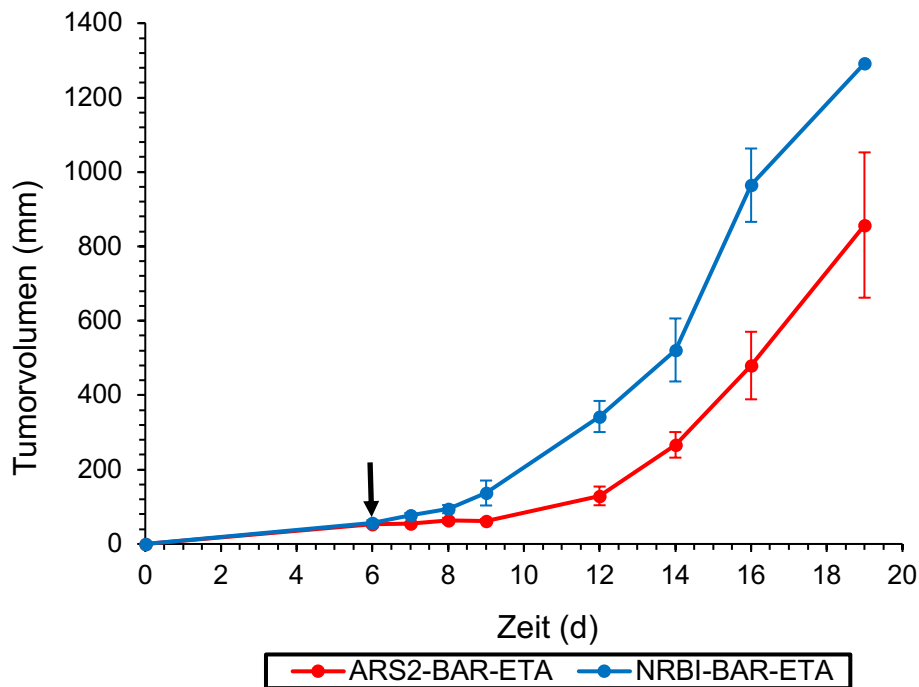


Abbildung 25: Volumina der OCI-LY3-Tumoren der mit ARS2-BAR-Toxin oder NRBI-BAR-Toxin behandelten Mäusen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Tumorzvolumina beider Tierkohorten (+/- SEM). Der Pfeil markiert den Tag (d6) an dem die BAR-Toxin-Applikation (jeweils 16 µg i. v.) erfolgte. Ab Tag 7 wuchsen die Tumoren der mit ARS2-BAR-Toxin behandelten Kohorte statistisch signifikant langsamer. Trotz des exponentiellen Anstiegs des Tumorwachstums in beiden Gruppen ab Tag 12, blieb das Volumen der Tumoren der mit ARS2-BAR-Toxin behandelten Tiere bis zum Ende der Beobachtung statistisch signifikant kleiner, als das Tumorzvolumen der Tiere der Kontroll-Kohorte. Folgende p-Werte (f und t-Test) ergaben sich dabei: d6 = 0,620; d7 = 0,014; d8 = 0,025; d9 = 0,031; d12 = 0,0001; d14 = 0,005; d16 = 0,002. Da nur ein Tier der Kontrollgruppe bis Tag 19 überlebte, wurde für diesen Tag kein t-test durchgeführt.

6.3.1 PET-CT- Untersuchung

Zum visuellen Nachweis der Anreicherung des ARS2-BAR-Toxins in den Tumoren, sowie um erste Erkenntnisse bezüglich der Biodistribution und der Kinetik des ARS2-BAR-Toxins zu gewinnen, wurde als nächstes eine PET-CT-Untersuchung durchgeführt. Nachdem die Wirksamkeit des ARS2-BAR-Toxins prinzipiell hatte gezeigt werden können (Kapitel 6.3), wurde bei dem jetzt anstehenden Versuch nur noch das ARS2-BAR eingesetzt und auf NRBI-BAR-Toxin als Kontroll-BAR verzichtet. Wiederum, um Tiere nicht unnötig einzusetzen, aber auch, um die nicht unerheblichen Kosten für die Synthese eines zweiten BAR-Radionuklids zu sparen. Dazu wurde das ARS2-Peptidepitop_(AS342-375), das für die eigentliche ARS2-Bindung an die ARS2-spezifischen B-Zellrezeptoren auf OCI-Ly3- bzw. U2932-Zellen verantwortlich ist, mit dem Radionuklid Gallium⁶⁸ gekoppelt und als Tracer eingesetzt. Nach Sedierung der Tiere

erfolgte die Applikation des Tracers über die Schwanzvene. Die Aktivität (Anreicherung) wurde 10 bis 150 min nach Applikation gemessen. Nach 10 min konnte in den beiden Tieren die stärkste Anreicherung des Tracers über den Nieren und im weiteren Verlauf vor allem in der Blase registriert werden (**Abbildung 26**). Zudem zeigte sich im Zeit/Aktivitäts-Diagramm bereits sehr früh eine hohe Impulszahl über dem Blutpool des Herzens, die sich im Verlauf der Zeit wieder reduzierte. Im Vergleich dazu verhielt sich die gemessene Impulszahl über den Nieren und der Blase antizyklisch. Mit zunehmender Zeit stieg die Impulszahl über diesen beiden Organen an (**Abbildung 27**). Dies sprach eindeutig dafür, dass das Konstrukt sehr schnell renal eliminiert wurde. Im PET-CT konnte im Tumorbereich beider Mäuse keine eindeutige Anreicherung des Tracers dargestellt werden (**Abbildung 26**).

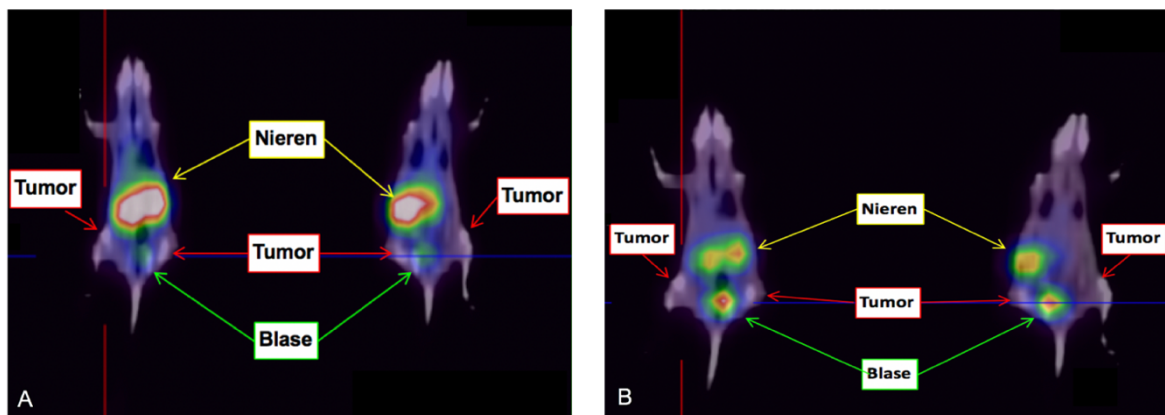


Abbildung 26: Ergebnisse der PET-CT Untersuchung: **A:** PET-CT-Aufnahme der Frontalebene 10 min nach ARS2-BAR-Ga⁶⁸ Applikation. Die „hellen“ Areale (weiß, rot, gelb, grün und blau) zeigen die Stellen wo sich der Tracer ansammelte. Zu diesem Zeitpunkt war eine Anreicherung des Tracers vor allem in den Nieren und etwas schwächer in der Blase zu sehen. Im Bereich der Tumoren konnte keine eindeutige Tracer-Aktivität gemessen werden. Um auch die Blase zu diesem frühen Zeitpunkt bereits darzustellen, wurden die Nieren etwas übersteuert. **B:** Frontalebene als Summenbild der Phase 10-70 min nach Applikation des Tracers. Es konnte weiterhin eine Anreicherung in den Nieren festgestellt werden, wobei die höchste Aktivität in der Blase gemessen wurde. Auch hier konnte im Bereich der Tumoren keine Tracer-Aktivität festgestellt werden. Dabei indiziert Weiß bis Rot die höchste, Gelb eine hohe, Grün eine mittlere und Blau eine niedrigere Aktivität/Anreicherung.

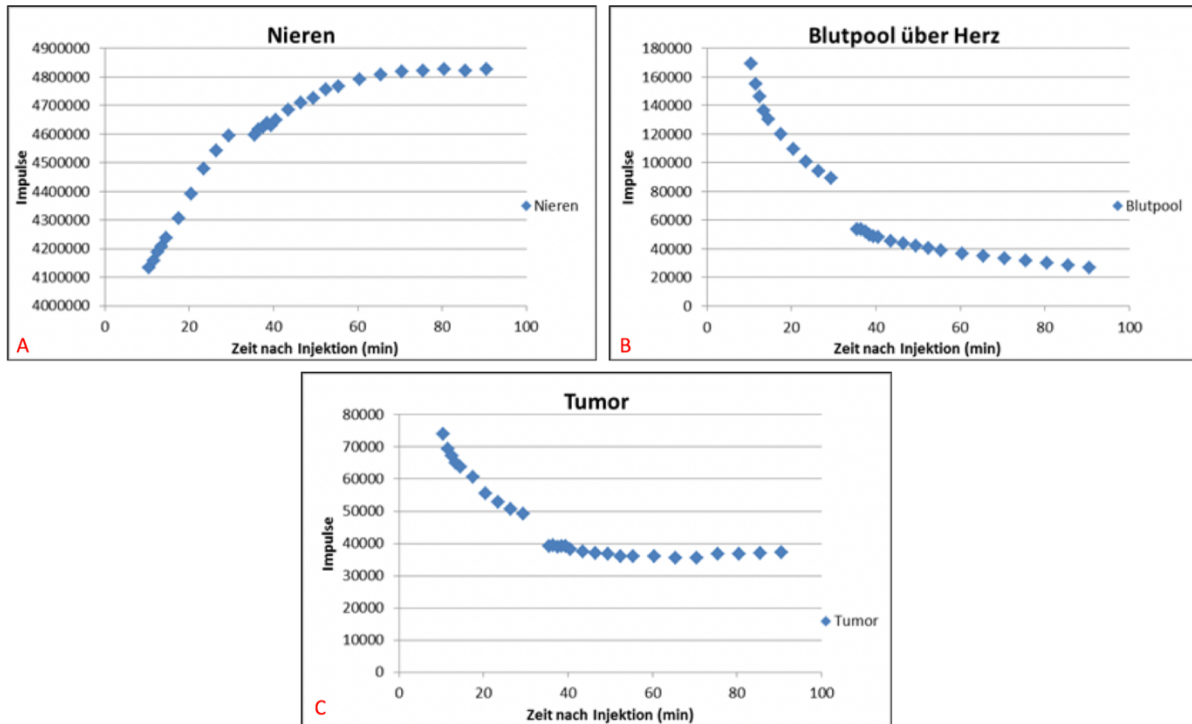


Abbildung 27: Zeit/Aktivitäts-Diagramme der Nieren, des Blutpools über dem Herz und der Tumoren. Die Diagramme stellen die Menge der gemessenen Impulse (Aktivität) gegen die Zeit dar. **A:** Das Diagramm zeigt, dass die gemessenen Impulse in den Nieren über die Zeit stiegen. **B:** Antiproportional dazu verminderte sich die Aktivität im Blutpool über dem Herz. **C:** Anfänglich (nach 10-20 Minuten) wurden auch Impulse im Bereich der Tumoren festgestellt, die sich im Laufe der Zeit dann wieder verringerten. Man beachte die unterschiedliche Größenordnung der y-Achsen (Impulse) von A, B bzw. C.

Im Zeit/Aktivitätsdiagramm der Lymphome wurden nach etwa 10 Minuten zwar ca. 75.000 Impulse gemessen. Die Impulszahl nahm aber innerhalb kurzer Zeit stark ab und näherte sich ab der vierzigsten Minute der Impulszahl des „leeren“ Blutpools (40.000 Impulse) an. Vor allem im Vergleich zum renalen Ausscheidungsweg verblieb die Impulszahl auf einem sehr niedrigen Niveau. Somit ergab auch die Zeit/Aktivitäts-Analyse keinen definitiven Nachweis einer signifikanten Bindung des ARS2-BARs an bzw. in den Tumoren (**Abbildung 27**). Die PET-CT-Untersuchung erlaubte eine gute visuelle Darstellung der Biodistribution und der Pharmakokinetik des ARS2-BARs. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit lassen sich diese PET-CT-Resultate nahezu uneingeschränkt auch auf das ARS2-BAR-Toxin übertragen. Aus dem Nachweis einer sehr schnellen renalen Ausscheidung konnten wichtige Schlüsse zur Optimierung der BAR-Toxine gezogen werden.

7 Diskussion

7.1 Einordnung der Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war, die prinzipielle Durchführbarkeit des neuen Therapiekonzepts der B-Zell-Rezeptor-Antigene zum Reversen Targeting von Tumoren im Rahmen einer „Proof-of-Principle“-Studie zu testen. Die im Rahmen dieser Arbeit erzielten *in vitro* Ergebnisse demonstrieren eindrucksvoll die selektive zytotoxische Wirkung von BAR-Toxinen gegen Lymphome der entsprechenden Antigen-Spezifität. Darüber hinaus wurde ebenso gezeigt, dass BAR-Toxine auch *in vivo* selektiv das Wachstum von Lymphomen verlangsamen können, wodurch der „Proof-of-Principle“ bestätigt wurde.

7.1.1 Mögliche Einflüsse der eingesetzten Methoden

7.1.1.1 Möglicher Einfluss der eingesetzten Zelllinien

Die Auswahl der eingesetzten Zelllinien war zum einen durch die untersuchte Tumorentität (diffus großzelliges B-Zell-Lymphom – DLBCL) und durch das eingesetzte BAR (ARS2) vorgegeben. Demnach wurden zwei DLBCL-Linien mit einem ARS2-spezifischen BCR und zwei DLBCL-Linien mit einem BCR anderer Spezifität benötigt. Aus dem Screening der im Labor vorliegenden DLBCL-Linien auf ARS2-Bindung gingen die Linien OCI-Ly-3 und U2932, als die einzigen ARS2-spezifischen hervor. Als ARS2-negative DLBCL-Linien wurden HLB-1 und TMD-8 ausgewählt. In Kultur zeigten alle vier Linien nahezu die gleichen Verdopplungszeiten. Auch die Expression des BCR auf der Zelloberfläche war bei allen vier Linien vergleichbar stark. Ebenso die Expression des CD20-Korezeptors, auch sie war auf den vier Linien vergleichbar stark. Lediglich der CD19-Korezeptor wurde auf der ARS2⁺ Linie OCI-Ly3 schwächer exprimiert. Aufgrund der sehr ähnlichen Eigenschaften konnte ein einseitiger Einfluss einer der DLBCL-Linien auf die Testergebnisse ausgeschlossen werden.

7.1.2 Möglicher Einfluss der eingesetzten *in vitro* Nachweismethode der Zytolyse

Wir entschieden uns für den Einsatz eines quantitativen LDH Nachweistests als Surrogatparameter für die Zahl lysierter Tumorzellen, da dieser bei gleicher Sensitivität und

Spezifität deutlich einfacher und sicherer in der Handhabung ist, als ein radioaktiver Nachweistest über freigesetzte Chrom-Isotope (Korzeniewski and Callewaert, 1983).

Der LDH-Nachweis im Zellkulturüberstand hatte zur Folge, dass mit diesem Zytotoxizitätsnachweis lediglich Zellnekrosen direkt nachgewiesen werden können. Bei der Apoptose kommt es jedoch nicht zu einer direkten Freisetzung intrazellulärer Enzyme wie LDH. Stattdessen werden diese zunächst in kleine Granula bzw. Vesikel abgeschnürt. Diese werden dann nach Internalisierung durch Phagozyten abgebaut (Reed, 2000). Diese wiederum werden im Rahmen einer sogenannten Sekundärnekrose ebenfalls freigesetzt und sind somit danach auch im Zellkultur-Überstand nachzuweisen (Silva, 2010). Da das an die BARs gekoppelte ETA in den betroffenen Zellen Apoptose induziert, war es möglich das zytotoxische Potential der BAR-Toxine *in vitro* durch Messung der LDH-Freisetzung zu messen.

Darüber hinaus erfolgten alle Assays den aktuellen Protokollen unter Einbeziehung aller gängiger Kontrollen. Von daher waren einseitig die Resultate beeinflussende Auswirkungen des Protokolls ausgeschlossen.

7.1.3 *In vivo* Tests der BARs im Mausmodell

Als Mausmodell wurden SCID/beige-Mäuse gewählt. Diesen Mäusen fehlen alle Arten von Lymphozyten. Dadurch war das Auswachsen xenogener Tumoren nach geeigneter Applikation gewährleistet. Zudem waren Einflüsse seitens dieser Komponenten des Immunsystems der Mäuse, die sonst maßgeblich an der Tumorkontrolle beteiligt sind, weitestgehend ausgeschlossen. Das heißt, dass das Wachstum der Tumoren in solchen Mäusen überwiegend von den zu testenden Substanzen, in dieser Studie, also von den BAR-Toxinen, beeinflusst wurde.

Dadurch, dass alle Tierversuche unter Aufsicht und Anleitung zweier erfahrener (Tier-)Ärzte im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes durchgeführt wurden, war prinzipiell der artgerechte Umgang mit den Tieren unter Einhaltung der durch den Tierschutz vorgegebenen Richtlinien gewährleistet. Die Applikationen der Zellen und BAR-Toxinen in die Schwanzvenen der Tiere wurden von den beiden (Tier-)Ärzten selbst vorgenommen. Von daher waren methodische Fehler bei den für die Ergebnisse wichtigen Applikationen ebenfalls minimiert.

Das für die Tumorinokulation verwendete Protokoll war zuvor schon in verschiedenen Studien erfolgreich zur Anwendung gekommen, bei denen auch humane B-Zell-Lymphom-Linien subkutan inokuliert wurden (Deng et al., 2015) (Ceribelli et al., 2014). Im Rahmen der Arbeit wurde die Zahl der inokulierten Tumorzellen jedoch halbiert. Auch dieses Inokulationsprotokoll

mit reduzierter Zellzahl war in Studien bereits erfolgreich angewandt worden (Ackler et al., 2008). Einflüsse von Seiten des Wirtsorganismus auf das Wachstum der Xenotransplantate sind jedoch immer vorhanden. Sie schwankten von Tier zu Tier und betrafen alle DLBCL-Linien im Verlauf ihrer Tumorgenese, d. h. sowohl die ARS2-spezifischen als auch die Kontrollen. Trotz der Tatsache, dass die aus *in vivo* Untersuchungen resultierenden Erkenntnisse immer mit einer gewissen Streuung behaftet sind, konnte ein systemischer Einfluss unseres *in vivo* Modells, der die Untersuchungen einseitig beeinflusst hätte, auch hier ausgeschlossen werden. Gleiches galt auch für die Wirkung der BAR-Toxine.

7.1.4 Beurteilung des Tumorwachstums

Die Effektivität der getesteten antitumoralen Substanzen wird in Xenograft-Modellen oft durch die Verzögerung des Tumorwachstums der behandelten Tiere im Vergleich zu den Tumoren der Tiere der jeweiligen Kontrollgruppe(n) ermittelt (Troiani et al., 2008). Um die Volumina der Tumoren zu bestimmen, wurden in dieser Arbeit der Längs- und Breitendurchmesser jedes Tumors mit Hilfe eines Messschiebers gemessen und daraus dann das Volumen berechnet. Diese Methode stellt eine einfache, schnelle, nicht invasive und kostengünstige Art dar, die Volumina von Xenotransplantaten zu bestimmen (Ayers et al., 2010; Tomayko and Reynolds, 1989) und wird aktuell immer noch weitestgehend in der Xenograft-Untersuchung eingesetzt (Kim et al., 2018; Lee et al., 2018; Li et al., 2018). Auch wenn neuste sonographische Techniken eine noch präzisere Vermessung von Xenotransplantaten gestatten, steht der daraus resultierende Mehrwert in keiner Relation zu dem damit verbundenen höheren Zeit- und technischen Aufwand, v. a. in Anbetracht der Tatsache, dass es in dieser Studie zunächst nur um den Nachweis der prinzipiellen Anwendbarkeit von BAR-Toxinen ging. Eventuelle methodische Unzulänglichkeiten würden sich auf alle Tumoren (ARS2+, ARS2- und egal wie behandelt) gleichermaßen nicht gerichtet auswirken.

7.2 Nachweis und Charakterisierung der Wirkung des ARS2-BAR *in vitro*

7.2.1 *In vitro* Versuche

Die Ergebnisse der *in vitro* Versuche zeigten die selektive, konzentrationsabhängige Zytotoxizität des ARS2-BAR-Toxins gegenüber den Zellen, deren BCR die entsprechende Antigenpezifität aufweisen. Die Zellen beider Zelllinien, deren BCR das ARS2-Antigen spezifisch binden kann (OCI-Ly3 und U2932), wurden vom ARS2-BAR-Toxin mit großer

Effektivität getötet. So wurde bereits ab einer Konzentration von 0,1 µg/ml ARS2-BAR-Toxin eine relative Lyserate von $52,59 \pm 2,63$ % in der OCI-Ly3- und $50,46 \pm 3,61$ % in der U2932-Zelllinie beobachtet. Bei einer Konzentration von 1 µg/ml konnte die relative Lyserate jeweils auf $58,12 \pm 2,46$ % bzw. $66,16 \pm 3,38$ % gesteigert werden und die maximale Wirkung wurde bei der höchsten Dosierung von 10 µg/ml mit einer Lyserate von jeweils $58,78 \pm 3,17$ % und $69,09 \pm 3,47$ % festgestellt. Erst ab einer minimalen Konzentration von 0,01 µg/ml war bei beiden ARS2-positiven Zelllinien keine zytotoxische Wirkung mehr zu sehen. Die ausgeprägte Effizienz des ARS2-BAR-Toxins wird beim Vergleich mit dem klassischen Vertreter der monoklonalen Antikörper, Rituximab, umso deutlicher. Neumann et al. untersuchten die Antikörper-Vermittelte-Zelluläre-Zytotoxizität von Rituximab *in vitro*, in dem sie Zellen der CD20-positiven DAUDI-Zelllinie zusammen mit NK-Zellen (als „Effektoren“) und unterschiedlicher Konzentrationen von Rituximab aussetzten. Hierbei ließ sich bei einer Rituximab-Konzentration von 0,1 µg/ml eine relative Lyserate < 48 % und bei 1 µg/ml < 54 % beobachten (Neumann et al., 2018). Somit scheint das ARS2-BAR-Toxin im Vergleich zu Rituximab eine höhere zytotoxische Effizienz gegenüber den jeweiligen Targetzellen aufzuweisen. Während Rituximab alle Zellen, die das CD20-Antigen auf ihrer Oberfläche exprimieren und somit auch gesunde Leukozyten angreift, liegt der entscheidende Vorteil der BAR-Toxine darin, dass die zytotoxische Wirkung des ARS2-BAR-Toxins ausschließlich gegen entartete Zellen gerichtet ist. Dies beruht auf der Selektivität der BARs, die spezifisch an den BCR von entarteten Zellen binden, während gesunde B-Zellen verschont bleiben. So zeigte, wie erwartet, das als negativ Kontrolle eingesetzte NRBI-BAR-Toxin keinen Einfluss auf die Zellen aller vier Zelllinien. Dies bestätigt, dass das ETA-Toxin erst dann seine zytotoxische Wirkung entfaltet, nachdem es von den Zielzellen aufgenommen wurde. Die rezeptorvermittelte Endozytose wird ihrerseits erst dann eingeleitet, wenn der BCR der Zellen das BAR-Epitop bindet. Da keiner der Zellen einen für NRBI-BAR spezifischen BCR aufwies, wurden sie nicht vom NRBI-BAR-Toxin angegriffen. Entsprechend wurden auch die Zellen der Kontroll-Zelllinien (HBL-1, TMD-8), deren BCR das ARS2-Antigen nicht binden kann, von dem ARS2-BAR-Toxin nicht beeinflusst. Diese einmalige Spezifität könnte mit einer drastischen Verringerung unerwünschter Nebenwirkungen im Vergleich zu den bisher bekannten therapeutischen Methoden im klinischen Setting einhergehen.

7.2.2 *In vivo* Versuche

7.2.2.1 Inokulation der DLBCL-Linien

Nach subkutaner Inokulation von jeweils 1×10^7 Zellen einer ARS2-positiven (OCI-Ly3, U2932) oder ARS2-negativen (HBL-1, TMD-8) Zelllinie pro Flanke in SCID/beige-Mäuse, kam es bei den Tieren aller vier Tierkohorten zur Entwicklung von großen, subkutanen Lymphomen (**Abbildung 22**). In der zweiten Versuchsreihe wurde das in der ersten Runde zielführende Inokulationsprotokoll verwendet, wobei dieses Mal nur die schnellwachsenden Zelllinien OCI-Ly3 und HBL-1 eingesetzt wurden. Analog zum ersten Versuch kam es bei den Tieren aller vier Tierkohorten (jeweils zwei Tierkohorten pro Zelllinie) zur Entwicklung subkutaner Tumoren (**Abbildung 23, Abbildung 24**). In der dritten Versuchsreihe wurden nur zwei Tierkohorten mit Zellen der OCI-Ly3-Zelllinie inokuliert. Die Inokulationszellzahl wurde auf 5×10^6 Zellen pro Flanke, und somit auf halb so viele Zellen reduziert. Nichtsdestotrotz kam es auch jetzt bei allen Tieren beider Kohorten zur Entwicklung von makroskopisch sichtbaren subkutanen Lymphomen (**Abbildung 25**).

Die erfolgreiche Inokulation und die *in vivo* Proliferation der Lymphomzellen wurden *post-mortem* durch die histologische Untersuchung der Tumorgewebsschnitte nachgewiesen. Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden dichte, undifferenzierte lymphozytäre Zellverbände gesehen, deren histologische Merkmale mit denen der inokulierten NHL Zelllinien übereinstimmen (**Abbildung 13**). Eine weitergehende histologische Charakterisierung der Zellen wäre durch eine immunhistochemische Färbung der Präparate mit für reife B-Zellen spezifischen Markern (z. B. CD20 oder CD79a) möglich. Darauf wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit verzichtet. Zusammenfassend kam es bei allen SCID/beige-Mäusen, die im Rahmen dieser Arbeit nach o. g. Protokoll mit DLBCL-Zellen subkutan inokuliert wurden, zur Entstehung großer, subkutaner Tumoren.

7.2.2.2 Untersuchung der Wirksamkeit der BARs

Um die Wirksamkeit der BARs *in vivo* zu untersuchen, erfolgte am Tag 4 und am Tag 7 nach der subkutanen Inokulation mit ARS2-positiven OCI-Ly3 bzw. ARS2-negativen HBL-1 Zellen in SCID/beige-Mäuse die intravenöse Applikation von jeweils $8 \mu\text{g}$ ARS2-BAR-Toxin. Zur negativ Kontrolle erhielten zwei analoge Tierkohorten das NRBI-BAR-Toxin nach demselben Applikationsschema. Hierbei konnte kein statistisch signifikanter Unterschied des Tumorwachstums zwischen den mit ARS2-BAR-Toxin und den mit NRBI-BAR-Toxin behandelten Tierkohorten festgestellt werden (**Abbildung 23**).

Nach dem ersten, leider erfolglosen Behandlungsversuch wurde entschieden im nachfolgenden Versuch die zur Inokulation eingesetzte Zellzahl pro Flanke von 1×10^7 auf

5×10^6 zu reduzieren. Anschließend erfolgte am Tag 6 die einmalige intravenöse Verabreichung von 16 μg ARS2-BAR-Toxin bzw. als negative Kontrolle NRBI-BAR-Toxin. Die Kombination dieser beiden Maßnahmen (Inokulation von weniger Zellen und Konzentrierung des ARS2-BAR-Toxins auf eine einzelne, höhere Dosis), führte zu einem statistisch signifikanten langsameren Tumorwachstum in der mit ARS2-BAR-Toxin behandelten Tierkohorte im Vergleich zu der mit NRBI-BAR-Toxin behandelten Tierkohorte. Bereits am ersten Tag nach Applikation der BAR-Toxine (d7) war ein statistisch signifikanter Unterschied der Tumorumfänge beider Tiergruppen zu sehen ($p = 0,014$), wobei die Tumore der mit ARS2-BAR-Toxin behandelten Tiere kleiner als die der Kontrollgruppe blieben. Diese Inhibition des Tumorwachstums in der mit ARS2-BAR-Toxin behandelten Tierkohorte, war im weiteren zeitlichen Verlauf signifikant nachweisbar und war am Tag 12 am deutlichsten ausgeprägt (**Abbildung 25**). Obwohl die Geschwindigkeit des Tumorwachstums in der Behandlungsgruppe signifikant langsamer war als die der Kontrollgruppe, konnte das Tumorwachstum über einen längeren Zeitraum nicht weiter verlangsamt oder sogar gänzlich kontrolliert werden. Ab Tag 10 kam es zu einer erneuten Volumenzunahme der Tumoren in der ARS2-Kohorte und ab Tag 14 zeigte die Tumorwachstumskurve wieder einen exponentiellen Verlauf. Die Tumore der Behandlungskohorte wiesen jedoch bis zum Versuchsabbruch immer ein kleineres Volumen als die der Kontrollgruppe auf. Somit wurde erstmals die Wirksamkeit der BAR-Toxine auch *in vivo* gezeigt. Dadurch war auch der „Proof of Principle“ einer Tumor-restringierten antitumoralen Therapie mit BAR-Toxinen erbracht. Dass es, im Vergleich zum vorangegangenen Protokoll, erst im zweiten Behandlungsversuch zu einer signifikanten Inhibition des Tumorwachstums kam, kann dadurch erklärt werden, dass nur noch halb so viele Zellen pro Flanke inokuliert wurden. Somit waren zum Zeitpunkt der Behandlung mit dem ARS2-BAR-Toxin deutlich weniger Tumorzellen vorhanden, was das allgemeine Ansprechen der Therapie begünstigt haben kann. Selbst die potentesten Chemotherapeutika können, auch in Kombination mit einer Antikörpertherapie, ab einer bestimmten Tumormasse eine Progression der malignen Erkrankung nicht mehr verhindern. Möglicherweise hätte eine wiederholte Gabe einer höheren Dosis von ARS2-BAR-Toxin noch bessere Ergebnisse erzielt. Leider standen die jeweiligen BARs in der dazu nötigen Menge zur Zeit der Versuche noch nicht zur Verfügung. Somit sind weiterführende Versuche nötig, um den Einfluss unterschiedlicher Dosierungen und Applikationsfrequenzen des ARS2-BAR-Toxins auf das Tumorwachstum zu untersuchen. Durch die Verwendung von unterschiedlich hohen Dosierungen könnten außerdem Informationen bezüglich der Verträglichkeit des ARS2-BAR-Toxins gewonnen werden.

Nachdem ein erfolgreiches Inokulations- und Tumorwachstumsmodell für alle vier Zelllinien etabliert werden konnte, wurden wie gerade beschrieben, im ersten Behandlungsversuch nur die beiden Zelllinien OCI-Ly3 und HBL-1 eingesetzt. Die Entscheidung alle nachkommenden *in vivo* Versuche mit OCI-Ly3-Zellen als ARS2-spezifischer Zelllinie durchzuführen, erfolgte aus dem Grund, dass in der OCI-Ly3-Tierkohorte die kleinsten Unterschiede des Tumorwachstums innerhalb einer Tiergruppe beobachtet wurden. Die ARS2-Negative HBL-1 Zelllinie war durch ihre ähnliche Tumorwachstumskinetik als Kontroll-Zelllinie gut geeignet. Durch den Verzicht auf die zwei anderen, langsam wachsenden Zelllinien konnte auch der Einsatz zu vieler Versuchstiere gemäß dem 3-R-Prinzip vermieden werden, solange die zytotoxische Wirkung des ARS2-BAR-Toxins *in vivo* noch nicht bestätigt worden war. Das 3-R-Prinzip wurde von Russel und Burch 1959 entworfen mit dem Ziel das Leiden von den in der medizinischen Forschung eingesetzten Tieren zu minimieren und gleichzeitig die Qualität der wissenschaftlichen Studien zu steigern (Russell, 1959, reprinted 1992). Die 3 „R“ stehen für Replacement (Ersetzen), Reduction (Reduzieren) und Refinement (Belastung vermindern). Dadurch sollen sofern möglich Tierversuche durch andere, qualitativ äquivalente Methoden ersetzt werden. Ist dies nicht möglich, dann soll die Anzahl der verwendeten Tiere auf das notwendige Minimum beschränkt werden.

Im Nachhinein betrachtet, wäre die Verwendung der eher langsam wachsenden DLBCL-Linien, U2932 als ARS2-sensitive und TMD-8 als ARS2-unspezifische Kontrolle, sicher besser gewesen, um die antitumorale Wirkung des ARS2-BARs zu untersuchen. Durch die niedrigere Teilungsrates der Tumorzellen wäre ein besseres Ansprechen auf die ARS2-BAR-Toxin-Behandlung mehr als wahrscheinlich gewesen. Ab dem zweiten Behandlungsversuch standen zudem die ARS2- und NRBI-BAR-Toxine nur noch in stark limitierten Mengen zu Verfügung. Darum verzichteten wir in den folgenden Behandlungsversuchen auf die nicht ARS2-spezifische Zelllinie HBL-1 als Negativkontrolle. Das NRBI-BAR-Toxin als *Effektor*-Negativ-Kontrolle kam selbstverständlich weiterhin zum Einsatz. Trotz des somit vertretbaren Verzichts auf das komplette Spektrum möglicher Kontroll-Ansätze, konnte die statistisch signifikante Kontrolle des Tumorwachstums nach Applikation des ARS2-BAR-Toxins erstmals *in vivo* prinzipiell gezeigt werden. Allerdings müssen in den zukünftig noch notwendigen Untersuchungen weitere Kontrollen, auch solche mit ARS2-unspezifischen Target-Linien, getestet werden.

7.2.3 PET-Versuche

Die Kopplung von Positron-emittierenden Radionukliden an monoklonale Antikörper ermöglicht eine bildliche Darstellung von Tumoren, welche die hohe Auflösung eines PET-CTs mit der Spezifität und Selektivität eines monoklonalen Antikörpers kombiniert (Verel et al., 2005). Nach demselben Prinzip wurde im vierten Versuch das ARS2-Peptid epitop, als BAR-Äquivalent, an das Radioisotop Gallium (^{68}Ga) gekoppelt und als Tracer in einer PET-CT Untersuchung eingesetzt, um die räumliche wie zeitliche Verteilung (Pharmakokinetik) des ARS2-Epitops an den Tumoren der Versuchstiere zu untersuchen. Dieser Versuch wurde mit einem Computertomographen der Klinik für Nuklearmedizin zur Untersuchung von Menschen durchgeführt. Die Methode betreffend muss kritisch angemerkt werden, dass der zur Bildgebung verwendete PET-CT wie bereits zuvor beschrieben (Kapitel 5.2.10) zum Scannen von Kleintieren nicht optimal geeignet war. Aufgrund des in Bezug auf die Kleintierdimensionen suboptimalen Auflösungsvermögens, ist nicht auszuschließen, dass dadurch womöglich die Situation am inokulierten Lymphom nicht ausreichend detailliert erfasst wurde.

Bei der Messung der Aktivität wurde die stärkste Anreicherung des Tracers 10 Minuten nach Applikation über die Niere und im weiteren Verlauf vor allem in der Blase registriert. Konkordant dazu, wurde früh eine hohe Impulszahl über dem Blutpool des Herzens gemessen, die im Laufe der Zeit immer schwächer wurde, während gleichzeitig die Anzahl an über der Niere gemessenen Impulse anstieg (**Abbildung 27**). Dies spricht dafür, dass der ARS2-Epitop(AS342-375)- ^{68}Ga -Tracer sehr schnell renal eliminiert wurde. Im PET-CT konnte somit keine eindeutige Anreicherung des Tracers im Bereich der Tumoren dargestellt werden. Höchstwahrscheinlich war die niedermolekulare Größe des von uns eingesetzten Peptid-Tracers für dessen überschnelle renale Elimination verantwortlich. Niedermolekulare Proteine werden ungehindert durch die Niere filtriert, sodass ihre Plasma-Halbwertszeit oft nur wenige Minuten beträgt und somit die therapeutische Wirkung entsprechend minimiert wird bzw. sogar ausbleibt (Schlapschy et al., 2007). Große Proteine, deren Molmasse mehr als etwa 70 kDa beträgt, wie z. B. humanes Serum Albumin (HSA), werden hingegen zurückgehalten. Negativ geladene Moleküle werden außerdem langsamer als positiv geladene Moleküle eliminiert (Caliceti and Veronese, 2003). Die entscheidende Schlussfolgerung aus diesem wichtigen Experiment ist die, dass zukünftig das ARS2-Epitop, das in das BAR eingebaut wird, deutlich vergrößert/verlängert werden muss. Wie groß bzw. lang, muss experimentell bestimmt werden, da es einen Kompromiss zwischen Wirkung und Kosten zu finden gilt. Je größer bzw. länger das eingesetzte Antigenfragment ist, umso geringer die renale Clearance und somit umso länger die Kreislauf-Verweildauer. Dadurch erhöht sich entsprechend auch das Interaktionspotential der BAR-Toxine mit dem Tumor. Die Herstellung

des ganzen ARS2-Antigens ist jedoch aufwendiger und die Synthesekosten entsprechend deutlich teurer, als die Herstellung des ARS2-Peptidepitops. Inzwischen sind zahlreiche Methoden entwickelt worden, um die renale Clearance von niedermolekularen Therapeutika zu verringern. Eine Methode hierbei ist die Kopplung dieser Therapeutika an größere Proteine, wie z. B. dem Fc-Teil von Immunglobulinen. Ein auf dieser Weise gebildetes Fusionsprotein ist Etanercept (Enbrel®), das aus der Kombination des Tumornekrosefaktor-Rezeptors und dem Fc-Teil eines humanen IgG-Immunglobulins besteht und in der Therapie der rheumatoiden Arthritis sowie der Psoriasis eingesetzt wird (Goldenberg, 1999). Die Pharmakokinetik kann auch durch die Kopplung an HSA deutlich verbessert werden, wie im Fall von Albuferon, einem Fusionsprotein aus Interferon- α und HSA (Osborn et al., 2002). Eine andere Alternative die Pharmakokinetik eines Proteins bzw. Oligopeptids zu beeinflussen, bietet die Konjugation an biologisch inaktive chemische Polymere wie Polyethylenglykol (PEG), um durch die resultierende Zunahme der Größe und des Molekulargewichts die glomeruläre Filtration zu verhindern oder zumindest deutlich zu verlangsamen (Caliceti and Veronese, 2003). Diese, als Pegylation bezeichnete Methode, kann die Halbwertszeit eines eigentlichen Wirkstoffes (z. B. des BAR-Toxins) drastisch steigern. Bereits mehrere Medikamente sind mit dieser Technik entwickelt worden. Die wichtigsten Vertreter sind sicherlich die pegylierte Interferone (Harris et al., 2001; Luxon et al., 2002), die inzwischen zur Basistherapie der chronischen Hepatitis C gehören. Die Pegylation eines Proteins/Oligopeptids ist allerdings ein komplexes und teures Verfahren und die *in vitro* Nachverarbeitung des pegylierten Proteins ist unerlässlich (Schlapschy et al., 2007). Aus diesem Grund werden aktuell unterschiedliche biologische homopolymere aus Aminosäuren erforscht, um als PEG-Alternativen zu agieren. Dazu zählen Homo-Amino-Acid-Polymers (HAPs) (Schlapschy et al., 2007), PAS (Pro-Ala-Ser) (Schlapschy et al., 2013) und XTEN (Schellenberger et al., 2009).

7.3 Therapeutische Optionen für BARs

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Lymphom-spezifische B-Zellrezeptor-Antigene als Immunkonjugate prinzipiell geeignet sind, selektiv nur solche B-Zellen zu töten, deren B-Zellrezeptor dieses Antigen spezifisch bindet. Mit solchen Antigenen stünde somit erstmals überhaupt eine therapeutische Option zur Verfügung, ausschließlich die jeweiligen Lymphomzellen anzugreifen.

Immunkonjugate bestehen aus einer Zellbindenden-Komponente (z. B. monoklonaler Antikörper), einem zytostatischen Effektormolekül und einem Link-Molekül, welches beide Bestandteile miteinander verbindet und für den sicheren Transport des Effektormoleküls zur Zielzelle sorgt (Smaglo et al., 2014). BARs können nach diesem Prinzip als Zellbindende-Komponente mit einem Effektormolekül kombiniert werden, um als Therapeutika eingesetzt zu werden. Im Rahmen dieser „Proof of Principle“ Studie wurde ein bakterielles Toxin als Zytostatikum verwendet (3.2.2, 5.2.5, **Abbildung 28 A**).

Das Exotoxin A von *Pseudomonas Aeruginosa* (ETA) wurde hierfür ausgewählt, weil es in unserem Labor rekombinant hergestellt werden konnte und bereits erfolgreich in Rahmen von Immunkonjugaten, wie z. B. Moxetumomab pasudotox, eingesetzt wurde. Dabei handelt es sich um ein Medikament, bei dem ETA mit einem monoklonalen anti-CD22-Antikörper gekoppelt ist. Moxetumomab pasudotox hat gute Ergebnisse in Studien gezeigt und ist seit September 2018 in den USA zur Behandlung der Haarzell-Leukämie zugelassen (Kreitman et al., 2018; U.S. Food & Drug Administration). Ein weiteres Beispiel ist das Anti-Mesothelin-Immunotoxin SS1P, das aus einem murinen anti-Mesothelin-Antikörperfragment und ETA zusammengesetzt wird und gute Ergebnisse in Phase 1-Studien bei der Therapie des Mesothelioms gezeigt hat (Hassan et al., 2014). Auch organische Verbindungen können als zytostatische Komponente in dann Chemoimmunkonjugat genannte Therapeutika eingebunden werden. Das synthetische Zytostatikum Monomethyl Auristatin E z. B. wird in Immunkonjugaten erfolgreich als Effektormolekül benutzt und weitere solcher Chemoimmunkonjugate sind aktueller Bestandteil der Forschung (Doronina et al., 2003; Oflazoglu et al., 2008; Pro et al., 2012). Auch Calicheamicin-Derivate sind mit monoklonalen Antikörpern gekoppelt worden, um die Immunkonjugate Gentuzumab Ozogamicin (Anti-CD33) und Inotuzumab Ozogamicin (Anti-CD22) herzustellen. Die Wirksamkeit beider Substanzen in der Behandlung der Akuten Myeloischen Leukämie (Gentuzumab Ozogamicin) bzw. des NHLs (Inotuzumab Ozogamicin) ist in klinischen Studien bestätigt worden (Godwin et al., 2017; Ricart, 2011).

Die Kombination aus einem monoklonalem Antikörper mit einem Radionuklid wird als Radioimmunkonjugat bezeichnet. Diese werden sowohl für diagnostische (wie z. B. beim Immuno-PET) als auch therapeutische Zwecke zur Behandlung maligner Erkrankungen eingesetzt. So z. B. wird das Radioimmunkonjugat ^{131}I -Rituximab, bestehend aus dem anti-CD20-Antikörper Rituximab und dem Radioisotop ^{131}I in der Behandlung von NHL eingesetzt (Calais and Turner, 2012; Leahy and Turner, 2011). Ein weiteres Beispiel eines therapeutisch erfolgreich eingesetzten Radioimmunkonjugats ist ^{131}I -Trastuzumab, ein ebenfalls mit ^{131}I radioionisierter Antikörper, der sich gegen den human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2) richtet und in der Therapie des metastasierten, HER2-positiven Mamma-Carzinoms verwendet wird (Kameswaran et al., 2017). Nach Bindung des Antikörpers an eine das entsprechende Antigen tragende Targetzelle, wird diese durch die Strahlung direkt getötet. Hierbei kommt es jedoch auch zur Beschädigung benachbarter bösartiger aber auch gutartiger Zellen, durch das sogenannte „crossfire“ der ionisierenden Strahlung (Rizzieri, 2016). Dieses „crossfire“ gegen gesundes Nachbargewebe ist auch der Grund, warum therapeutische Radioimmunkonjugate, also mit stark strahlenden Radionukliden, nur sehr restringiert eingesetzt werden. Und genau deshalb würden Radioimmunkonjugate mit einem BAR therapeutisch keinen Sinn machen, da sie den entscheidenden Vorteil des BARs, die 100%ige Tumorspezifität, „crossfire“-bedingt zunichtemachen würden.

Eine weitere Alternative stellt der Einsatz von BARs kombiniert mit zytotoxischen T-Zellen dar, die einen chimären Antigen-Rezeptor tragen, sogenannte CAR-T-Zellen. CARs sind hybride Rezeptoren, die durch rekombinante Fusion (1a) eines „single-chain variable fragment“ (scFv) oder (1b) eines Antigen-bindenden-Fragments (Fab) eines monoklonalen Antikörpers definierter Spezifität, mit (2) einer Brücken-Domäne (meist aus dem CD8-Rezeptormolekül), (3) der Signaling-Domäne eines T-Zell-Rezeptors (TCR) und (4) unterschiedlicher costimulatorischer Rezeptordomänen synthetisiert werden (Davila et al., 2012). CARs können somit im Gegensatz zum TCR unabhängig von der Antigenpräsentation über MHC-Moleküle direkt ihr Target-Antigen erkennen. Da außerdem sämtliche zur Induktion einer maximalen T-Zell-Antwort notwendigen Signalmoleküle in Serie hintereinander geschaltet sind, genügt die „einfache“ Bindung des entsprechenden Antigens auf der Oberfläche der Zielzelle an den CAR, um bei einer so aktivierten T-Zelle alle Effektorfunktionen gleichzeitig maximal abzurufen: Killing, Zytokin-Ausschüttung und Proliferation (Sadelain et al., 2013). Somit kombinieren CAR-T-Zellen die freie Antigenbindung von B-Zellen mit dem hohen zytotoxischen Potential solcher T-Zellen. Auf diese Weise kann also die Zytotoxizität der T-Zellen neu ausgerichtet werden. Mehrere Studien haben die Wirksamkeit der CAR-T-Zell-Therapie gegen CD19 gerichteter CAR-T-Zellen bei der Behandlung unterschiedlicher CD19⁺

B-Zell-Neoplasien, wie dem NHL, der Akuten Lymphoblastischen Leukämie und der Chronischen Lymphatischen Leukämie, bestätigt. Aktuell laufen mehrere Studien mit CAR-T-Zellen mit unterschiedlichen Ziel-Antigenen, wie z. B. CD20, CD22, CD33, CD138 und CD123 (Almasbak et al., 2016; Miliotou and Papadopoulou, 2018). Kymriah® ist das erste Medikament dieser Art, das in den USA (2017) und Europa (2018) zugelassen wurde und zur Behandlung der Akuten Lymphoblastischen Leukämie und des refraktären DLBCLs eingesetzt wird (European Medicines Agency; Liu et al., 2017).

Der Austausch des scFv/Fab-Teils im „klassischen“ CAR gegen ein BAR ermöglicht somit eine neue Variante von CAR-Ts die spezifisch nur den BCR der entarteten Zellen binden. Folglich entfalten solche CAR-T-Zellen ihre starkes zytotoxisches Potential ausschließlich gegen die malignen B-Zellen. Gesunde B-Zellen hingegen blieben verschont (**Abbildung 28 B**).

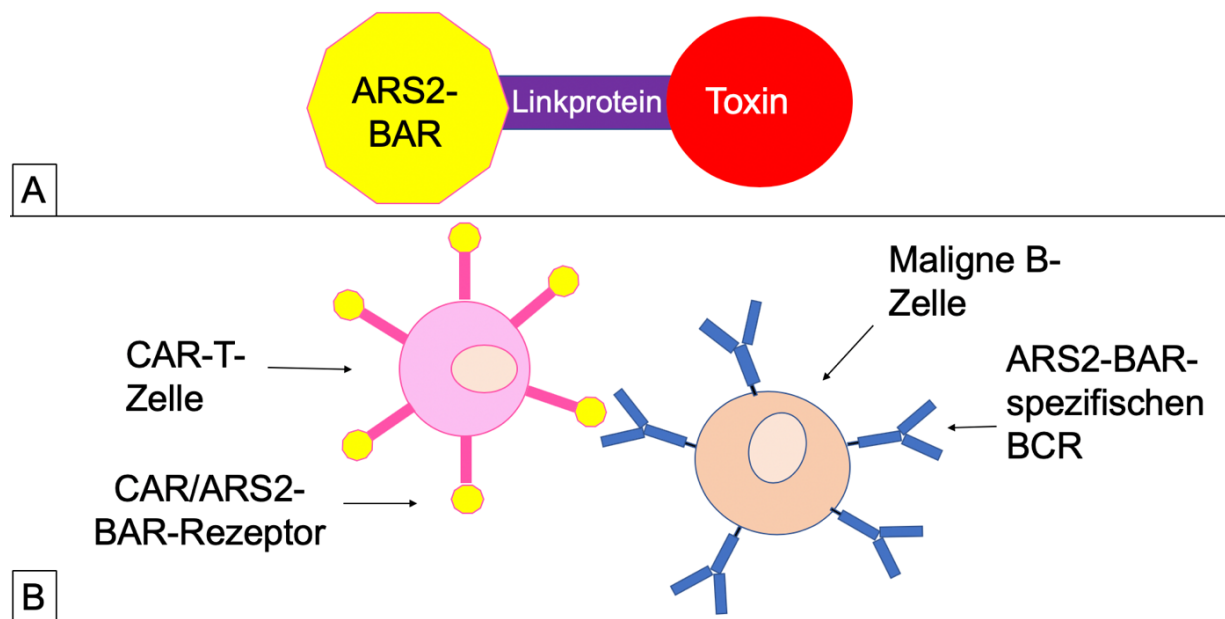


Abbildung 28: Alternative Gestaltungsmöglichkeiten der BARs zum therapeutischen Einsatz. A: Einsatz der BARs als Chemoimmunkonjugate durch Kopplung an ein Zytostatikum oder „small molecule drug“ (z. B. Calicheamicin). **B:** Einsatz der BARs im Rahmen der CAR-T-Zelltherapie. Durch die gentechnische Herstellung eines chimären Rezeptors aus dem TCR einer T-Zelle und einem BAR, würden T-Zellen entstehen, deren CARs spezifisch den BCR der entarteten Zellen erkennen könnten. Dadurch würde die Zytotoxizität der T-Zellen spezifisch gegen die neoplastisch veränderten Zellen neu ausgerichtet werden.

7.4 Schlussfolgerung

Mit der signifikanten temporären Verlangsamung des Wachstums eines ARS2-spezifischen DLBCLs in der Maus nach Applikation des ARS2/ETA-Immunkonjugats war der „Proof-of-Principle“ der BARs als neues Therapiekonzept erbracht. Somit steht erstmals eine ausschließlich gegen den Tumor gerichtete Therapie zur Verfügung. Die Vielfalt der Gestaltungsmöglichkeiten kombiniert mit der stetig wachsenden Anzahl neuidentifizierter BARs bietet ein hohes Potential, diese neue Form zielgerichteter Therapie weiterzuentwickeln.

8 Literaturverzeichnis

1. Ackler, S., Xiao, Y., Mitten, M.J., Foster, K., Oleksijew, A., Refici, M., Schlessinger, S., Wang, B., Chemburkar, S.R., Bauch, J., et al. (2008). ABT-263 and rapamycin act cooperatively to kill lymphoma cells in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* 7, 3265-3274.
2. Advani, R.H., Buggy, J.J., Sharman, J.P., Smith, S.M., Boyd, T.E., Grant, B., Kolibaba, K.S., Furman, R.R., Rodriguez, S., Chang, B.Y., et al. (2013). Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J Clin Oncol* 31, 88-94.
3. Almasbak, H., Aarvak, T., and Vemuri, M.C. (2016). CAR T Cell Therapy: A Game Changer in Cancer Treatment. *J Immunol Res* 2016, 5474602.
4. Ayers, G.D., McKinley, E.T., Zhao, P., Fritz, J.M., Metry, R.E., Deal, B.C., Adlerz, K.M., Coffey, R.J., and Manning, H.C. (2010). Volume of preclinical xenograft tumors is more accurately assessed by ultrasound imaging than manual caliper measurements. *J Ultrasound Med* 29, 891-901.
5. Banerjee, S.R., and Pomper, M.G. (2013). Clinical applications of Gallium-68. *Appl Radiat Isot* 76, 2-13.
6. Barth, S., Huhn, M., Matthey, B., Tawadros, S., Schnell, R., Schinkothe, T., Diehl, V., and Engert, A. (2000). Ki-4(scFv)-ETA', a new recombinant anti-CD30 immunotoxin with highly specific cytotoxic activity against disseminated Hodgkin tumors in SCID mice. *Blood* 95, 3909-3914.
7. Baudino, T.A. (2015). Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. *Curr Drug Discov Technol* 12, 3-20.
8. Ben Abdelwahed, R., Donnou, S., Ouakrim, H., Crozet, L., Cosette, J., Jacquet, A., Tourais, I., Fournes, B., Gillard Bocquet, M., Miloudi, A., et al. (2013). Preclinical study of Ublituximab, a Glycoengineered anti-human CD20 antibody, in murine models of primary cerebral and intraocular B-cell lymphomas. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54, 3657-3665.
9. Benton, G., Arnaoutova, I., George, J., Kleinman, H.K., and Koblinski, J. (2014). Matrigel: from discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv Drug Deliv Rev* 79-80, 3-18.
10. Benton, G., Kleinman, H.K., George, J., and Arnaoutova, I. (2011). Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells. *Int J Cancer* 128, 1751-1757.
11. Bosma, G.C., Custer, R.P., and Bosma, M.J. (1983). A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301, 527-530.
12. Bruell, D., Stocker, M., Huhn, M., Redding, N., Kupper, M., Schumacher, P., Paetz, A., Bruns, C.J., Haisma, H.J., Fischer, R., et al. (2003). The recombinant anti-EGF receptor immunotoxin 425(scFv)-ETA' suppresses growth of a highly metastatic pancreatic carcinoma cell line. *Int J Oncol* 23, 1179-1186.
13. Bundesministerium für Ernährung und Wissenschaft. Tierschutz in der Forschung (https://www.bmel.de/DE/Tier/Tierschutz/_texte/TierschutzTierforschung.html?nn=310198¬First=false&docId=10323474).
14. Calais, P.J., and Turner, J.H. (2012). Standard Operating Procedure for Prospective Individualised Dosimetry for ([¹³¹I]-rituximab Radioimmunotherapy of Non-Hodgkin's Lymphoma. *World J Nucl Med* 11, 110-116.

15. Ceribelli, M., Kelly, P.N., Shaffer, A.L., Wright, G.W., Xiao, W., Yang, Y., Mathews Griner, L.A., Guha, R., Shinn, P., Keller, J.M., et al. (2014). Blockade of oncogenic I κ B kinase activity in diffuse large B-cell lymphoma by bromodomain and extraterminal domain protein inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 11365-11370.
16. Chan, F.K., Moriwaki, K., and De Rosa, M.J. (2013). Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. *Methods Mol Biol* 979, 65-70.
17. Chatziioannou, A.F. (2002). Molecular imaging of small animals with dedicated PET tomographs. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 29, 98-114.
18. Dameshek, W., and Schwartz, R.S. (1959). Leukemia and auto-immunization- some possible relationships. *Blood* 14, 1151-1158.
19. Davila, M.L., Brentjens, R., Wang, X., Riviere, I., and Sadelain, M. (2012). How do CARs work?: Early insights from recent clinical studies targeting CD19. *Oncoimmunology* 1, 1577-1583.
20. Davis, R.E., Ngo, V.N., Lenz, G., Tolar, P., Young, R.M., Romesser, P.B., Kohlhammer, H., Lamy, L., Zhao, H., Yang, Y., et al. (2010). Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 463, 88-92.
21. Deng, C., Lipstein, M., Rodriguez, R., Serrano, X.O., McIntosh, C., Tsai, W.Y., Wasmuth, A.S., Jaken, S., and O'Connor, O.A. (2015). The novel IKK2 inhibitor LY2409881 potentially synergizes with histone deacetylase inhibitors in preclinical models of lymphoma through the downregulation of NF- κ B. *Clin Cancer Res* 21, 134-145.
22. Deutsche-Radiologienetz-AG. Computertomographie (<https://www.radiologie.de/untersuchungsmethoden-im-uberblick/computertomographie-ct/>).
23. Donnou, S., Galand, C., Touitou, V., Sautes-Fridman, C., Fabry, Z., and Fisson, S. (2012). Murine models of B-cell lymphomas: promising tools for designing cancer therapies. *Adv Hematol* 2012, 701704.
24. Doronina, S.O., Toki, B.E., Torgov, M.Y., Mendelsohn, B.A., Cerveny, C.G., Chace, D.F., DeBlanc, R.L., Gearing, R.P., Bovee, T.D., Siegall, C.B., et al. (2003). Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. *Nat Biotechnol* 21, 778-784.
25. Dorshkind, K., Pollack, S.B., Bosma, M.J., and Phillips, R.A. (1985). Natural killer (NK) cells are present in mice with severe combined immunodeficiency (scid). *J Immunol* 134, 3798-3801.
26. Dunleavy, K., Pittaluga, S., Czuczman, M.S., Dave, S.S., Wright, G., Grant, N., Shovlin, M., Jaffe, E.S., Janik, J.E., Staudt, L.M., et al. (2009). Differential efficacy of bortezomib plus chemotherapy within molecular subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 113, 6069-6076.
27. European Medicines Agency. Kymriah (<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kymriah/>).
28. Fridman, R., Benton, G., Aranoutova, I., Kleinman, H.K., and Bonfil, R.D. (2012). Increased initiation and growth of tumor cell lines, cancer stem cells and biopsy material in mice using basement membrane matrix protein (Cultrex or Matrigel) co-injection. *Nat Protoc* 7, 1138-1144.
29. Fridman, R., Giaccone, G., Kanemoto, T., Martin, G.R., Gazdar, A.F., and Mulshine, J.L. (1990). Reconstituted basement membrane (matrigel) and laminin can enhance the tumorigenicity and the drug resistance of small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6698-6702.

30. Fridman, R., Kibbey, M.C., Royce, L.S., Zain, M., Sweeney, M., Jicha, D.L., Yannelli, J.R., Martin, G.R., and Kleinman, H.K. (1991). Enhanced tumor growth of both primary and established human and murine tumor cells in athymic mice after coinjection with Matrigel. *J Natl Cancer Inst* 83, 769-774.
31. Ghetie, M.A., Richardson, J., Tucker, T., Jones, D., Uhr, J.W., and Vitetta, E.S. (1990). Disseminated or localized growth of a human B-cell tumor (Daudi) in SCID mice. *Int J Cancer* 45, 481-485.
32. Giovanella, B.C., Yim, S.O., Stehlin, J.S., and Williams, L.J., Jr. (1972). Development of invasive tumors in the "nude" mouse after injection of cultured human melanoma cells. *J Natl Cancer Inst* 48, 1531-1533.
33. Godwin, C.D., Gale, R.P., and Walter, R.B. (2017). Gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 31, 1855-1868.
34. Grass, S., Preuss, K.D., Thome, S., Weisenburger, D.D., Witt, V., Lynch, J., Zettl, F., Trumper, L., Fadle, N., Regitz, E., et al. (2011). Paraproteins of familial MGUS/multiple myeloma target family-typical antigens: hyperphosphorylation of autoantigens is a consistent finding in familial and sporadic MGUS/MM. *Blood* 118, 635-637.
35. Green, M.V., Seidel, J., Vaquero, J.J., Jagoda, E., Lee, I., and Eckelman, W.C. (2001). High resolution PET, SPECT and projection imaging in small animals. *Comput Med Imaging Graph* 25, 79-86.
36. Hassan, R., Sharon, E., Thomas, A., Zhang, J., Ling, A., Miettinen, M., Kreitman, R.J., Steinberg, S.M., Hollevoet, K., and Pastan, I. (2014). Phase 1 study of the antimesothelin immunotoxin SS1P in combination with pemetrexed and cisplatin for front-line therapy of pleural mesothelioma and correlation of tumor response with serum mesothelin, megakaryocyte potentiating factor, and cancer antigen 125. *Cancer* 120, 3311-3319.
37. International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors, P. (1993). A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 329, 987-994.
38. Joo, W.D., Visintin, I., and Mor, G. (2013). Targeted cancer therapy--are the days of systemic chemotherapy numbered? *Maturitas* 76, 308-314.
39. Kameswaran, M., Gota, V., Ambade, R., Gupta, S., and Dash, A. (2017). Preparation and preclinical evaluation of (131) I-trastuzumab for breast cancer. *Journal of labelled compounds & radiopharmaceuticals* 60, 12-19.
40. Kim, J.H., Lee, M.J., Yu, G.R., Kim, S.W., Jang, K.Y., Yu, H.C., Cho, B.H., and Kim, D.G. (2018). Alterations in the p53-SOCS2 axis contribute to tumor growth in colon cancer. *Exp Mol Med* 50, 3.
41. Kleinman, H.K., and Martin, G.R. (2005). Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol* 15, 378-386.
42. Korzeniewski, C., and Callewaert, D.M. (1983). An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods* 64, 313-320.
43. Kreitman, R.J. (2001). Chimeric fusion proteins--Pseudomonas exotoxin-based. *Curr Opin Investig Drugs* 2, 1282-1293.
44. Kreitman, R.J., Dearden, C., Zinzani, P.L., Delgado, J., Karlin, L., Robak, T., Gladstone, D.E., le Coutre, P., Dietrich, S., Gotic, M., et al. (2018). Moxetumomab pasudotox in relapsed/refractory hairy cell leukemia. *Leukemia* 32, 1768-1777.
45. Leahy, M.F., and Turner, J.H. (2011). Radioimmunotherapy of relapsed indolent non-Hodgkin lymphoma with 131I-rituximab in routine clinical practice: 10-year single-institution experience of 142 consecutive patients. *Blood* 117, 45-52.
46. Lee, N.P., Chan, C.M., Tung, L.N., Wang, H.K., and Law, S. (2018). Tumor xenograft animal models for esophageal squamous cell carcinoma. *J Biomed Sci* 25, 66.

47. Li, J., Zhou, T., Liu, L., Ju, Y.C., Chen, Y.T., Tan, Z.R., and Wang, J. (2018). The regulatory role of Annexin 3 in a nude mouse bearing a subcutaneous xenograft of MDA-MB-231 human breast carcinoma. *Pathol Res Pract* 214, 1719-1725.
48. Liu, Y., Chen, X., Han, W., and Zhang, Y. (2017). Tisagenlecleucel, an approved anti-CD19 chimeric antigen receptor T-cell therapy for the treatment of leukemia. *Drugs Today (Barc)* 53, 597-608.
49. MacDougall, J.R., Croy, B.A., Chapeau, C., and Clark, D.A. (1990). Demonstration of a splenic cytotoxic effector cell in mice of genotype SCID/SCID.BG/BG. *Cell Immunol* 130, 106-117.
50. Malakoff, D. (2000). The rise of the mouse, biomedicine's model mammal. *Science* 288, 248-253.
51. Martiniova, L., Palatis, L., Etchebehere, E., and Ravizzini, G. (2016). Gallium-68 in Medical Imaging. *Curr Radiopharm* 9, 187-207.
52. Miliotou, A.N., and Papadopoulou, L.C. (2018). CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. *Curr Pharm Biotechnol* 19, 5-18.
53. Murphy, W.J., Kumar, V., and Bennett, M. (1987). Rejection of bone marrow allografts by mice with severe combined immune deficiency (SCID). Evidence that natural killer cells can mediate the specificity of marrow graft rejection. *J Exp Med* 165, 1212-1217.
54. Nachreiner, T., Kampmeier, F., Thepen, T., Fischer, R., Barth, S., and Stocker, M. (2008). Depletion of autoreactive B-lymphocytes by a recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein-based immunotoxin. *J Neuroimmunol* 195, 28-35.
55. Neumann, F., Acker, F., Schormann, C., Pfreundschuh, M., and Bittenbring, J.T. (2018). Determination of optimum vitamin D3 levels for NK cell-mediated rituximab- and obinutuzumab-dependent cellular cytotoxicity. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 67, 1709-1718.
56. Newell, D.R., Burtles, S.S., Fox, B.W., Jodrell, D.I., and Connors, T.A. (1999). Evaluation of rodent-only toxicology for early clinical trials with novel cancer therapeutics. *Br J Cancer* 81, 760-768.
57. Nowakowski, G.S., and Czuczman, M.S. (2015). ABC, GCB, and Double-Hit Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Does Subtype Make a Difference in Therapy Selection? *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, e449-457.
58. Oflazoglu, E., Kissler, K.M., Sievers, E.L., Grewal, I.S., and Gerber, H.P. (2008). Combination of the anti-CD30-auristatin-E antibody-drug conjugate (SGN-35) with chemotherapy improves antitumour activity in Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 142, 69-73.
59. Pantelouris, E.M. (1968). Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* 217, 370-371.
60. Perlman, R.L. (2016). Mouse models of human disease: An evolutionary perspective. *Evol Med Public Health* 2016, 170-176.
61. Pfreundschuh, M. (2012). Growing importance of MYC/BCL2 immunohistochemistry in diffuse large B-cell lymphomas. *J Clin Oncol* 30, 3433-3435.
62. Pfreundschuh, M. (2016). [Current therapeutic strategies for diffuse large Bcell lymphoma]. *Internist (Berl)* 57, 214-221.
63. Pfreundschuh, M., Thurner, L., Barth, S., Pickert, D., Fadle, N., Kemele, M., Regitz, E., Neumann, F., Nachreiner, T., and Preuss, K. (2015). BARs (B -cell receptor antigens for reverse targeting): A Novel and Ultimately Specific Treatment Concept for B-Cell Neoplasms. *Blood* 126, 3995.

64. Povlsen, C.O., and Rygaard, J. (1971). Heterotransplantation of human adenocarcinomas of the colon and rectum to the mouse mutant Nude. A study of nine consecutive transplantations. *Acta Pathol Microbiol Scand A* 79, 159-169.
65. Preuss, K.D., Pfreundschuh, M., Weigert, M., Fadle, N., Regitz, E., and Kubuschok, B. (2015). Sumoylated HSP90 is a dominantly inherited plasma cell dyscrasias risk factor. *J Clin Invest* 125, 316-323.
66. Pro, B., Advani, R., Brice, P., Bartlett, N.L., Rosenblatt, J.D., Illidge, T., Matous, J., Ramchandren, R., Fanale, M., Connors, J.M., et al. (2012). Brentuximab vedotin (SGN-35) in patients with relapsed or refractory systemic anaplastic large-cell lymphoma: results of a phase II study. *J Clin Oncol* 30, 2190-2196.
67. Reed, J.C. (2000). Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 157, 1415-1430.
68. Ricart, A.D. (2011). Antibody-drug conjugates of calicheamicin derivative: gemtuzumab ozogamicin and inotuzumab ozogamicin. *Clin Cancer Res* 17, 6417-6427.
69. Rizzieri, D. (2016). Zevalin((R)) (ibrutinomab tiuxetan): After more than a decade of treatment experience, what have we learned? *Crit Rev Oncol Hematol* 105, 5-17.
70. Roder, J.C. (1979). The beige mutation in the mouse. I. A stem cell predetermined impairment in natural killer cell function. *J Immunol* 123, 2168-2173.
71. Roschewski, M., Dunleavy, K., and Wilson, W.H. (2012). Diffuse large B cell lymphoma: molecular targeted therapy. *Int J Hematol* 96, 552-561.
72. Russell, W.M.S., Burch, R.L., (1959, reprinted 1992). *The Principles of Humane Experimental Technique*.
73. Sadelain, M., Brentjens, R., and Riviere, I. (2013). The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov* 3, 388-398.
74. Saxena, R.K., Saxena, Q.B., and Adler, W.H. (1982). Defective T-cell response in beige mutant mice. *Nature* 295, 240-241.
75. Shibata, S., Asano, T., Ogura, A., Hashimoto, N., Hayakawa, J., Uetsuka, K., Nakayama, H., and Doi, K. (1997). SCID-bg mice as xenograft recipients. *Lab Anim* 31, 163-168.
76. Silva, M.T. (2010). Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Lett* 584, 4491-4499.
77. Smaglo, B.G., Aldeghaither, D., and Weiner, L.M. (2014). The development of immunoconjugates for targeted cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 11, 637-648.
78. Spritz, R.A. (1998). Genetic defects in Chediak-Higashi syndrome and the beige mouse. *J Clin Immunol* 18, 97-105.
79. Swerdlow, S.H., Campo, E., Pileri, S.A., Harris, N.L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G.A., Zelenetz, A.D., et al. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127, 2375-2390.
80. Takizawa, Y., Saida, T., Tokuda, Y., Dohi, S., Wang, Y.L., Urano, K., Hioki, K., and Ueyama, Y. (1997). New immunodeficient (nude-scid, beige-scid) mice as excellent recipients of human skin grafts containing intraepidermal neoplasms. *Arch Dermatol Res* 289, 213-218.
81. Thurner, L., Hartmann, S., Bewarder, M., Fadle, N., Regitz, E., Schormann, C., Quiroga, N., Kemele, M., Klapper, W., Rosenwald, A., et al. (2020). Identification of the atypically modified autoantigen *Ars2* as the target of B-cell receptors from activated B cell-type diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica*.
82. Thurner, L., Hartmann, S., Fadle, N., Kemele, M., Bock, T., Bewarder, M., Regitz, E., Neumann, F., Nimmesgern, A., von Muller, L., et al. (2018a). *LRPAP1* is a frequent

- proliferation-inducing antigen of BCRs of mantle cell lymphomas and can be used for specific therapeutic targeting. Leukemia.
83. Thurner, L., Preuss, K.D., Bewarder, M., Kemele, M., Fadle, N., Regitz, E., Altmeyer, S., Schormann, C., Poeschel, V., Ziepert, M., et al. (2018b). Hyper N-glycosylated SAMD14 and neurabin-I as driver CNS autoantigens of PCNSL. *Blood*.
 84. Tomayko, M.M., and Reynolds, C.P. (1989). Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 24, 148-154.
 85. Troiani, T., Schettino, C., Martinelli, E., Morgillo, F., Tortora, G., and Ciardiello, F. (2008). The use of xenograft models for the selection of cancer treatments with the EGFR as an example. *Crit Rev Oncol Hematol* 65, 200-211.
 86. U.S. Food & Drug Administration. FDA Approved Drug Products (<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&AppliNo=020229>).
 87. Verel, I., Visser, G.W., and van Dongen, G.A. (2005). The promise of immuno-PET in radioimmunotherapy. *J Nucl Med* 46 Suppl 1, 164S-171S.
 88. Weiner, G.J. (2010). Rituximab: mechanism of action. *Semin Hematol* 47, 115-123.
 89. Yang, J., and Reth, M. (2016). Receptor Dissociation and B-Cell Activation. *Curr Top Microbiol Immunol* 393, 27-43.
 90. Yang, Y., Shaffer, A.L., 3rd, Emre, N.C., Ceribelli, M., Zhang, M., Wright, G., Xiao, W., Powell, J., Platig, J., Kohlhammer, H., et al. (2012). Exploiting synthetic lethality for the therapy of ABC diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 21, 723-737.
 91. Yao, R., Lecomte, R., and Crawford, E.S. (2012). Small-animal PET: what is it, and why do we need it? *J Nucl Med Technol* 40, 157-165.
 92. Young, R.M., Wu, T., Schmitz, R., Dawood, M., Xiao, W., Phelan, J.D., Xu, W., Menard, L., Meffre, E., Chan, W.C., et al. (2015). Survival of human lymphoma cells requires B-cell receptor engagement by self-antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, 13447-13454.

9 Publikationen

Identification Of The Atypically Modified Autoantigen Ars2 As The Target Of B-Cell Receptors From Activated B Cell–Type Diffuse Large B-Cell Lymphoma.

Lorenz Thurner, Sylvia Hartmann, Moritz Bewarder, Natalie Fadle, Evi Regitz, Claudia Schor mann, Natalia Quiroga, Maria Kemele, Wolfram Klapper, Andreas Rosenwald, Lorenz Trümp er, Rainer Maria Bohle, Anna Nimmesgern, Christina Körbel, Matthias W. Lascke, Michael D. Menger, Stefan Barth, Boris Kubuschok, Anja Mottok, Dominic Kaddu-Mulindwa, Martin- Leo Hansmann, Viola Pöschel, Gerhard Held, Niels Murawski, Stephan Stilgenbauer, Frank Neumann, Klaus-Dieter Preuss, Michael Pfreundschuh.

Haematologica. 2020 Jul 16;haematol.2019.241653. DOI: 10.3324/haematol.2019.241653.

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die die Entstehung dieser Arbeit ermöglicht haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Pfreundschuh für die Überlassung des spannenden Themas, die Chance mit seinem großartigen Team zu arbeiten und das in mich gesetzte Vertrauen.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater und Betreuer, Priv. -Doz. Frank Neumann, für die Übernahme meiner Arbeit, exzellente und engmaschige Betreuung, jederzeitige Beratung und umfangreiche Korrekturlesungen. Ebenso für seine endlose Geduld und die stets angenehme Zusammenarbeit im Zelllabor.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Michael D. Menger und Dr. med. Matthias Laschke für die unkomplizierte Kooperation und das großzügige Bereitstellen der Räumlichkeiten des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes. An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Betreuerin, Frau Dr. med. vet. Christina Körbel, für die freundliche Anleitung und Beihilfe während den Tierversuchen bedanken. Ohne Ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht entstanden.

Weiterhin möchte ich mich ganz besonders bei Claudia Schormann für die Anfertigung und Färbung der histologischen Schnitte sowie stetige Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima bei der Kultivierung der Zellen bedanken. Es war mir eine Freude, mit dir zu arbeiten.

Ich möchte mich auch bei allen Mitarbeitern des José-Carreras-Zentrums in Homburg, Saar bedanken. Dabei gilt ein ganz besonderen Dank Herrn Dr. Dieter Preuß, auf dessen Forschung der Inhalt dieser Arbeit basiert. Ein großer Dank geht auch an Natalie Fadle für die gründliche Einarbeitung in die experimentellen Techniken der Zytotoxizitätassays.

Gracias especiales a mi Familia *Petit*. A mis papás por haberme respaldado siempre y ser ejemplos constantes de fuerza, determinación, disciplina y resiliencia. Y a mis hermanas Daniela y Valentina por el apoyo incondicional y los muy valorados consejos.

Mein Dank gilt auch meiner "deutschen Familie" in Homburg für die gegenseitige Unterstützung, Ermutigung und Bestärkung. Die Besten.

Last but not least möchte ich mich bei meinem Freund Alexander Niermann bedanken, für die unzählige Hilfsstellungen und stetige Unterstützung, aber vor allem für das an mich glauben bedanken.