

Aus der Klinik für Innere Medizin I
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Kommissarischer Direktor: PD Dr. med. Lorenz Thurner

**Integrierung des B-Zell-Rezeptor-Antigens LRPAP1 in ein IgG1-Antikörper-Format zur
Therapie des Mantelzell-Lymphoms**

**Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät**

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2021

vorgelegt von: Kathrin Olesch
geb. am 30.10.1996 in Saarlouis

Meinen Eltern

Tag der mündlichen Prüfung: 18.03.2022

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael Menger

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Lorenz Thurner
Prof. Dr. med. Norbert Graf

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	1
2. EINLEITUNG	3
2.1 Lymphome	3
2.2 Das Mantelzell-Lymphom	7
2.3 Therapie des Mantelzell-Lymphoms	12
2.4 Die Bedeutung des BZR und die Möglichkeit neuer Therapieformate	15
2.5 BARs - B-cell receptor antigens for reverse targeting	16
2.6 Fragestellung	17
3. METHODIK	18
3.1 Materialien	18
3.1.1 Laborgeräte	18
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	19
3.1.3 Lösungen und Medien	20
3.1.4 Computerprogramme	22
3.1.5 Kits	22
3.1.6 Antikörper	22
3.1.7 Enzyme und Primer	23
3.1.8 Zellen und Plasmide	24

3.1.9 Chemikalien und Antibiotika	24
3.2 Methodik	26
3.2.1 Vorangegangene Arbeit	26
3.2.2 Molekularbiologische Methodik	26
3.2.2.1 DNA-Amplifizierung	26
3.2.2.1.1 PCR	26
3.2.2.1.2 Plasmid-basierte DNA-Klonierung	27
3.2.2.2 DNA-Gelelektrophorese mit Gel-Herstellung	28
3.2.2.3 Verdau	29
3.2.2.4 Ligation	29
3.2.2.5 TOPO-TA-Vektor	29
3.2.2.6 IgG1-Vektor	32
3.2.2.7 pSfi-Express-FLAG-Tag-Vektor	33
3.2.2.8 Transformation	34
3.2.2.9 Selektive Vermehrung der transformierten Bakterien	34
3.2.2.10 Plasmid-Aufreinigung	35
3.2.2.11 Funktionsweise des Photometers	35
3.2.2.12 Sequenzierung	35
3.2.2.13 DNA-Gewinnung aus Gel	35
3.2.2.14 Vorbereitung der HEK 293 T-Zellen	35
3.2.2.15 Transfektion der DNA in die HEK 293 T-Zellen	36
3.2.2.16 Protein-Gelelektrophorese und Gel-Herstellung für Western Blots	36
3.2.2.17 Western Blot	37
3.2.2.18 Resuspension der Zellen	38
3.2.2.19 Wechsel des Mediums	39
3.2.2.20 Sammeln des Überstands	39
3.2.2.21 Sterilfiltration des Überstands	39
3.2.2.22 Reinigen des Überstands	39

3.2.2.23	Coomassie-Färbung	40
3.2.2.24	Durchflusszytometrie	41
3.2.2.25	Isolierung und Aufreinigung von PBMCs	42
3.2.2.26	Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer	44
3.2.2.27	LDH-Cytotox-Release-Assay	44
4.	ERGEBNISSE	46
4.1	Überblick	46
4.2	PCR zur Klonierung der Epitop-Region	46
4.3	PCR zur Insertionskontrolle	47
4.3.1	Insertionskontrolle in den TOPO-TA-Vektor	47
4.3.2	Insertionskontrolle des Schwer- und Leichtkettengens in den IgG1 TA Vektor	48
4.3.3	Insertionskontrolle in den pSfi-Express-FLAG-Tag-Vektor	49
4.4	Restriktionsverdau zur Erzeugung von Schnittstellen	50
4.4.1	Restriktionsverdau von LRPAP1 263-350 V _H TA und IgG1 TA	51
4.4.2	Restriktionsverdau von LRPAP1 263-350 V _L TA und LRPAP1 263-350 V _H IgG1 TA	51
4.4.3	Restriktionsverdau von LRPAP1 263-350 V _H V _L IgG1 TA	52
4.5	Restriktionsverdau zur Insertionskontrolle	52
4.6	Coomassie-Färbung	53
4.7	Western Blot zum Proteinnachweis	54
4.8	Bindungsnachweis mittels Durchflusszytometrie	55
4.9	LDH-Cytotox-Release-Assay	58

5. DISKUSSION	61
5.1 Bisherige innovative Therapieansätze	61
5.1.1 Beeinflussung von Signalkaskaden	61
5.1.2 Anti-idiotypic Antibody	62
5.1.3 Peptibodies	62
5.2 BAR – B-cell receptor antigen for reverse targeting	63
5.2.1 Kopplung des Antigens an ein Toxin	64
5.2.2 Bispezifische Konstrukte	64
5.2.3 BAR-CARs	66
5.3 Integrierung des B-Zell-Rezeptor-Antigens LRPAP1 in ein IgG-Antikörperformat	67
5.3.1 Vorteile der LRPAP1 BAR-bodies	67
5.3.2 Nachteile der LRPAP1 BAR-bodies	68
5.4 Beantwortung der Fragestellung	69
6. LITERATURVERZEICHNIS	70
7. PUBLIKATIONEN/DANKSAGUNG	77

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016	6
Abbildung 2	Molekulare Pathogenese des MCL	8
Abbildung 3	Algorithmus zur Therapie des Mantelzell-Lymphoms	12
Abbildung 4	TOPO-TA-Vektor	31
Abbildung 5	TOPO-TA-Vektor mit der eingefügten V _H V _L IgG1-Sequenz	32
Abbildung 6	Schema des rekombinanten HEL-IgM-BZRs	32
Abbildung 7	Struktur eines Antikörpers der IgG-Klasse	33
Abbildung 8	pSfi-Express-FLAG-Tag-Vektor	34
Abbildung 9	Schema zum Ablauf der Durchflusszytometrie	42
Abbildung 10	Auftrennung des Blutes nach Behandlung mit einer Trennungslösung	43
Abbildung 11	Reaktionsschritte des LDH-Cytotox-Release-Assays	45
Abbildung 12	PCR zur Gewinnung der Epitop-Sequenz	47
Abbildung 13	PCR-Insertionskontrolle von LRPAP1 263-350 V _H in den TOPO-TA-Vektor	48
Abbildung 14	PCR-Insertionskontrolle von LRPAP1 263-350 V _L in den TOPO-TA-Vektor	48
Abbildung 15	PCR-Insertionskontrolle von LRPAP1 263-350 V _H TA in IgG1 TA	49
Abbildung 16	PCR-Insertionskontrolle von LRPAP1 263-350 V _L TA in LRPAP1 263-350 V _H IgG1 TA	49
Abbildung 17	PCR-Insertionskontrolle von LRPAP1 263-350 V _H V _L IgG1 in den pSfi-Express-FLAG-Tag-Vektor	50
Abbildung 18	PCR-Insertionskontrolle von LRPAP1 263-350 V _H V _L IgG1 in den pSfi-Express-FLAG-Tag-Vektor	50
Abbildung 19	PCR-Insertionskontrolle von LRPAP1 263-350 V _H V _L IgG1 in den pSfi-Express-FLAG-Tag-Vektor	50
Abbildung 20	Restriktionsverdau von LRPAP1 263-350 V _H TA und IgG1 TA	51
Abbildung 21	Restriktionsverdau von LRPAP1 263-350 V _L TA und LRPAP1 263-350 V _H IgG1 TA	51
Abbildung 22	Restriktionsverdau von LRPAP1 263-350 V _H V _L IgG1 TA	52

Abbildung 23	Kontrollverdau der korrekten Insertion von LRPAP1 263-350 V _H V _L IgG1 in den pSfi-Express-FLAG-Tag-Vektor	53
Abbildung 24	Coomassie-Proteinfärbung des Antikörpers LRPAP1 263-350 V _H V _L IgG1 pSfi-Express-FLAG-Tag	53
Abbildung 25	Western Blot zum Nachweis von LRPAP1 263-350 V _H V _L IgG1 pSfi-Express-FLAG-Tag	54
Abbildung 26	Western Blot zum Nachweis von LRPAP1 263-350 V _H V _L IgG1 pSfi-Express-FLAG-Tag	54
Abbildung 27	Gating Strategie der Durchflusszytometrie	55
Abbildung 28	Durchflusszytometrie zum Bindungsnachweis zwischen LRPAP1-IgG1 und der Maver1-Zelllinie	56
Abbildung 29	Durchflusszytometrie zum Bindungsnachweis zwischen LRPAP1-IgG1 und der Granta-519-Zelllinie	57
Abbildung 30	Durchflusszytometrie zum Bindungsnachweis zwischen LRPAP1-IgG1 und der U2932-Zelllinie	57
Abbildung 31	LDH-Cytotox-Release-Assay der Maver1-Zelllinie	59
Abbildung 32	LDH-Cytotox-Release-Assay der Granta-519-Zelllinie	59
Abbildung 33	LDH-Cytotox-Release-Assay der U2932-Zelllinie	60
Abbildung 34	Schema eines bispezifischen Konstrukts mit LRPAP1 als BZR Bindungsdomäne	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	WHO-Klassifikation der Lymphome	3
Tabelle 2	Ann-Arbor-Klassifikation	10

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
a. dest.	Destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
ASCT	Autologe Stammzelltransplantation
BAR	B-cell receptor antigen for reverse targeting
BiKE	Bispecific killer cell engager
BiTE	Bispecific T-cell engager
bp	Basenpaar
BTK	Bruton-Tyrosinkinase
BZR	B-Zell-Rezeptor
bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
CAR	Chimärer Antigen-Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
CDR3	Complementarity determining region 3
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanintriphosphat
DLBCL	Diffuse large B-cell lymphoma
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dTTP	Desoxythymintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EMZL	Extranodal marginal zone lymphoma
Fc	Fragment crystallizable
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FSC	Forward Scatter
G	Guanin
G	Beschleunigung, hier Zentrifugalbeschleunigung
g	Gramm
GALT	Gut associated lymphoid tissue
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
H	Wasserstoff

H. pylori	Helicobacter pylori
H ⁺	Positiv geladenes Wasserstoffion
HEK	Human embryonic kidney
IgG1	Immunglobulin G 1
INT	2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-Tetrazolium Chlorid
kDa	Kilodalton
L	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LRPAP1	Low-density lipoprotein receptor-related protein-associated protein 1
M	Molar
mA	Milliampere
MALT	Mucosa associated lymphoid tissue
MCL	Mantelzell-Lymphom
MIPI	Mantle Cell Lymphoma International Prognostic Index
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mTOR	Mechanistic Target of Rapamycin
NAD ⁺	Oxidierete Form des Nicotinamidadenindinukleotids
NADH+H ⁺	Reduzierte Form des Nicotinamidadenindinukleotids
NFκB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
NRB1	Neurabin-I
OS	Overall survival
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PBS	Phosphat-buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFS	Progression-free survival
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
POX	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R-CHBoP	Rituximab/Cyclophosphamid/Doxorubicin/Bortezomib/Prednison
R-CHOP	Rituximab/Cyclophosphamid/Doxorubicin/Vincristin/Prednison

R-DHAP	Dexamethason/hochdosiertes Cytarabin/Cisplatin
rpm	Rounds per minute
SAMD14	Sterile alpha motif domain containing 14
scFv	Single chain variable Fragment
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SMZL	Splenic marginal zone lymphoma
SSC	Side Scatter
T	Thymin
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
UV	Ultraviolett
V	Volt
V _H	Variable Domäne der Schwereketten
V _L	Variable Domäne der Leichtketten
WHO	World Health Organization
z. B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

1. Zusammenfassung/Summary

Das Mantelzell-Lymphom ist ein seltenes B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom. Es befällt vor allem den älteren Mann mit einer geschlechterspezifischen Prävalenz von 3:1 und einem medianen Erkrankungsalter von 60 Jahren. Dieses primär nodale Lymphom wird histologisch als indolent klassifiziert, jedoch weist es häufig einen klinisch aggressiven Verlauf auf. Pathognomonisch ist die chromosomale Translokation $t(11;14)(q13;q32)$ mit einer daraus resultierenden Überexpression von Cyclin D1. Die meisten Krankheitsfälle zeigen einen gewissen Grad an somatischer Hypermutation der Immunglobulin-Gene, welche auf einen Antigenkontakt der B-Zell-Rezeptoren hinweist und eine chronische B-Zell-Rezeptor-Stimulation in der Pathogenese des Lymphoms vermuten lässt. Die Diagnose wird bei der Mehrzahl der Patienten erst im fortgeschrittenen Stadium mit bereits bestehender extralymphatischer Organbeteiligung gestellt. Mit einer medianen Überlebenszeit von fünf Jahren hat das Mantelzell-Lymphom die schlechteste Prognose aller Non-Hodgkin-Lymphome. Das Therapiekonzept ist palliativ mit dem Anspruch einer Langzeitremission zur Verlängerung der Überlebenszeit. Bei jüngeren Patienten besteht die Therapie aus einer aggressiven, Cytarabin-haltigen Chemotherapie mit konsekutiver autologer Stammzelltransplantation. Bei älteren Patienten steht die Immunchemotherapie mit einer Rituximab-Erhaltungstherapie im Vordergrund.

Neuere Therapiekonzepte, die im Falle eines Rezidivs eingesetzt werden, sind die Substanzen Ibrutinib und Venetoclax. Diese sind zwar zunächst sehr effektiv, können aber weitere Rezidive bisher meist nicht verhindern. Auch nach dem Einsatz einer allogenen Stammzelltransplantation oder einer CAR-T-Zell-Therapie ist nur selten eine Heilung möglich. Aufgrund dieser schlechten Prognose werden dringend neue Therapieformate benötigt.

Da der B-Zell-Rezeptor aller maligne entarteten Mantelzell-Lymphomzellen identisch ist und sich von den Rezeptoren gesunder B-Lymphozyten unterscheidet, eignet er sich ideal als Zielstruktur für therapeutische Ansätze. LRPAP1 wurde als gemeinsames Autoantigen von einem beträchtlichen Teil aller MCL beschrieben.

Ziel dieser Dissertationsarbeit war es, dieses Antigen in ein IgG-Antikörperformat zu integrieren (LRPAP1 BAR-body), in welchem die Epitop-Region des Antigens die variablen Regionen ersetzt. Dadurch sollte eine gezielte Bindung an die maligne entarteten B-Lymphozyten von Mantelzell-Lymphomen über deren BZR erreicht werden. In funktionellen Experimenten konnte gezeigt werden, dass LRPAP1 BAR-bodies sowohl an Mantelzell-Lymphomzelllinien binden als auch spezifisch Lymphomzellen töten, die einen Rezeptor exprimieren, der LRPAP1-reaktiv ist.

Integration of the B-cell receptor antigen LRPAP1 into an IgG1 antibody format for the therapy of mantle cell lymphoma

Mantle cell lymphoma is a rare B-cell non-Hodgkin lymphoma. It mainly affects older men with a gender-specific prevalence of 3:1 and a median age of 60 years. This primarily nodal lymphoma is histologically classified as indolent, but often shows a clinically aggressive course. Pathognomonic is the chromosomal translocation $t(11;14)(q13;q32)$ with a resulting overexpression of cyclin D1.

Most cases of the disease show some degree of somatic hypermutation of immunoglobulin genes indicating antigen contact of B-cell receptors and suggesting that chronic B-cell receptor stimulation plays a role in the pathogenesis of mantle cell lymphoma. In the majority of patients, the diagnosis is made at an advanced stage with already existing extralymphatic organ involvement. With a median survival time of five years, mantle cell lymphoma has the worst prognosis of all non-Hodgkin lymphomas. The therapy concept is usually palliative with the aim of long-term remission to extend survival time.

For younger patients, therapy with aggressive, cytarabine-containing chemotherapy and subsequent autologous stem cell transplantation is the standard of care. Concerning older patients, immunochemotherapy with rituximab maintenance therapy is used as therapeutic regimen in most cases.

In the case of relapse ibrutinib and venetoclax are used as more recent therapeutic substances. Although these compounds are very effective, subsequent relapses are inevitable. Even after allogeneic stem cell transplantation or CAR-T-cell therapy, curing of MCL is rarely possible. Due to this poor prognosis, new therapeutic formats are urgently needed.

Because the B-cell receptor of all malignant mantle cell lymphoma cells is identical and distinct from the B-cell receptors of healthy B-lymphocytes, it is ideally suited as a target for therapeutic approaches. LRPAP1 has been described as a common autoantigen of about one third of all mantle cell lymphomas.

The aim of this dissertation was to integrate this antigen into an IgG antibody format (LRPAP1 BAR-body). The antibody should carry the epitope region of the antigen instead of its variable regions to target mantle cell lymphoma cells via their B-cell receptor. Functional experiments demonstrated that LRPAP1 BAR-bodies both bind to mantle cell lymphoma cell lines and specifically kill lymphoma cells expressing a B-cell receptor that is LRPAP1-reactive.

2. Einleitung

2.1 Lymphome

Lymphome sind klonale Neoplasien des lymphatischen Systems, bei denen es zu einer unkontrollierten Vermehrung von Lymphozyten kommt. Zu den Organen des lymphatischen Systems zählen Lymphknoten, Milz, Knochenmark und das MALT- und GALT-System. Typischer Erstmanifestationsort von Lymphomen ist der Lymphknoten, der dabei durch eine Schwellung imponiert.

Das Lymphom ist keine eigene Entität, sondern ein Sammelbegriff für diverse maligne hämatologische Erkrankungen des lymphatischen Systems.

Eine erste Unterscheidung der rund 100 verschiedenen Lymphome ist die Unterteilung in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome. Das Hodgkin-Lymphom ist ein reines B-Zell-Lymphom. Die Non-Hodgkin-Lymphome werden weiter anhand von zwei Kriterien unterteilt: Malignität und Zelltyp. Es gibt indolente (auch als niedrig-maligne, langsam proliferierend oder low-grade bezeichnet) und aggressive (hoch-maligne, schnell proliferierend, high-grade) Lymphome. Die WHO klassifiziert Lymphome weiter anhand der betroffenen Zelllinie in B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome und T-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome [80]. In der westlichen Welt machen B-Zell-Lymphome 85 % aller NHL aus [24].

WHO-Klassifikation der reifen lymphoiden, histiozytären und dendritischen Neoplasmen [80]

Mature B-cell neoplasms
Chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma
Monoclonal B-cell lymphocytosis*
B-cell prolymphocytic leukemia
Splenic marginal zone lymphoma
Hairy cell leukemia
<i>Splenic B-cell lymphoma/leukemia, unclassifiable</i>
<i>Splenic diffuse red pulp small B-cell lymphoma</i>
<i>Hairy cell leukemia-variant</i>
Lymphoplasmacytic lymphoma
Waldenström macroglobulinemia
Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgM*
μ heavy-chain disease
γ heavy-chain disease
α heavy-chain disease

Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), IgG/A*
Plasma cell myeloma
Solitary plasmacytoma of bone
Extraosseous plasmacytoma
Monoclonal immunoglobulin deposition diseases*
Extranodal marginal zone lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT lymphoma)
Nodal marginal zone lymphoma
<i>Pediatric nodal marginal zone lymphoma</i>
Follicular lymphoma
In situ follicular neoplasia*
Duodenal-type follicular lymphoma*
Pediatric-type follicular lymphoma*
<i>Large B-cell lymphoma with IRF4 rearrangement*</i>
Primary cutaneous follicle center lymphoma
Mantle cell lymphoma
Leukemic nonnodal mantle cell lymphoma
In situ mantle cell neoplasia*
Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), NOS
Germinal center B-cell type*
Activated B-cell type*
T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma
Primary DLBCL of the central nervous system (CNS)
Primary cutaneous DLBCL, leg type
EBV1 DLBCL, NOS*
<i>EBV1 mucocutaneous ulcer*</i>
DLBCL associated with chronic inflammation
Lymphomatoid granulomatosis
Primary mediastinal (thymic) large B-cell lymphoma
Intravascular large B-cell lymphoma
ALK1 large B-cell lymphoma
Plasmablastic lymphoma
Primary effusion lymphoma
<i>HHV81 DLBCL, NOS*</i>
Burkitt lymphoma
<i>Burkitt-like lymphoma with 11q aberration*</i>
High-grade B-cell lymphoma, with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements*
High-grade B-cell lymphoma, NOS*
B-cell lymphoma, unclassifiable, with features intermediate between DLBCL and classical Hodgkin lymphoma
Mature T and NK neoplasms
T-cell prolymphocytic leukemia
T-cell large granular lymphocytic leukemia

<i>Chronic lymphoproliferative disorder of NK cells</i>
Aggressive NK-cell leukemia
Systemic EBV1 T-cell lymphoma of childhood*
Hydroa vacciniforme–like lymphoproliferative disorder*
Adult T-cell leukemia/lymphoma
Extranodal NK-/T-cell lymphoma, nasal type
Enteropathy-associated T-cell lymphoma
Monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma*
<i>Indolent T-cell lymphoproliferative disorder of the GI tract*</i>
Hepatosplenic T-cell lymphoma
Subcutaneous panniculitis-like T-cell lymphoma
Mycosis fungoides
Sézary syndrome
Primary cutaneous CD301 T-cell lymphoproliferative disorders
Lymphomatoid papulosis
Primary cutaneous anaplastic large cell lymphoma
Primary cutaneous gd T-cell lymphoma
<i>Primary cutaneous CD81 aggressive epidermotropic cytotoxic T-cell lymphoma</i>
<i>Primary cutaneous acral CD81 T-cell lymphoma*</i>
<i>Primary cutaneous CD41 small/medium T-cell lymphoproliferative disorder*</i>
Peripheral T-cell lymphoma, NOS
Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
<i>Follicular T-cell lymphoma*</i>
<i>Nodal peripheral T-cell lymphoma with TFH phenotype*</i>
Anaplastic large-cell lymphoma, ALK ⁺
Anaplastic large-cell lymphoma, ALK ⁻ *
<i>Breast implant–associated anaplastic large-cell lymphoma*</i>
Hodgkin lymphoma
Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma
Classical Hodgkin lymphoma
Nodular sclerosis classical Hodgkin lymphoma
Lymphocyte-rich classical Hodgkin lymphoma
Mixed cellularity classical Hodgkin lymphoma
Lymphocyte-depleted classical Hodgkin lymphoma
Posttransplant lymphoproliferative disorders (PTLD)
Plasmacytic hyperplasia PTLD
Infectious mononucleosis PTLD
Florid follicular hyperplasia PTLD*
Polymorphic PTLD
Monomorphic PTLD (B- and T-/NK-cell types)
Classical Hodgkin lymphoma PTLD
Histiocytic and dendritic cell neoplasms
Histiocytic sarcoma

Langerhans cell histiocytosis
Langerhans cell sarcoma
Indeterminate dendritic cell tumor
Interdigitating dendritic cell sarcoma
Follicular dendritic cell sarcoma
Fibroblastic reticular cell tumor
Disseminated juvenile xanthogranuloma
Erdheim-Chester disease*

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der Lymphome

Provisorische Entitäten sind kursiv gedruckt.

* Änderungen zu der Klassifikation aus 2008

Allgemein lässt sich sagen, dass niedrigmaligne Lymphome aufgrund der niedrigeren Teilungsrate nur palliativ behandelbar sind, während hochmaligne Lymphome sich durch ein schnelles Wachstum auszeichnen, dadurch untherapiert zwar eine schlechtere Prognose als die low-grade Lymphome aufweisen, allerdings im Rahmen einer medikamentösen Behandlung zum Teil sehr gute Heilungschancen besitzen [46].

Von allen Krebserkrankungen machen Non-Hodgkin-Lymphome bei Frauen 3,7 % und bei Männern 3,8 % aus (Abb. 1). Die Prävalenz der Hodgkin-Lymphome in der Bevölkerung ist geringer und beträgt für Frauen 0,5 % und für Männer 0,6 %.

Die Zahlen beziehen sich auf die deutsche Bevölkerung für das Jahr 2016 und wurden vom Zentrum für Krebsregisterdaten des Robert-Koch-Instituts erhoben (Stand 12/2019).

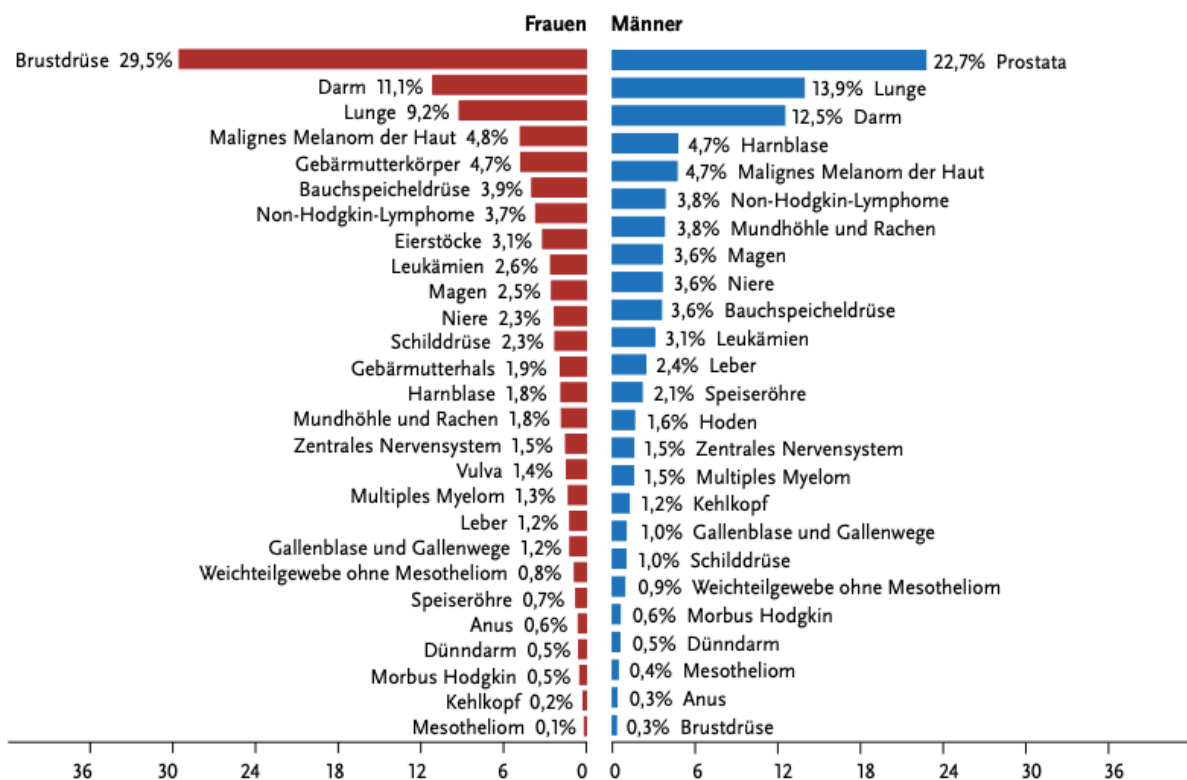


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2016 (ohne nicht-melanotischen Hautkrebs). Stand 17.12.2019. Abb. vom Zentrum für Krebsregisterdaten ZfKD [87].

2.2 Das Mantelzell-Lymphom

Definition

Das Mantelzell-Lymphom (MCL) ist ein Non-Hodgkin-Lymphom der B-Zellreihe. Es wird histologisch als indolentes, primär nodales Lymphom klassifiziert, zeichnet sich aber durch einen klinisch meist aggressiven Verlauf aus. Es besitzt daher eine Sonderstellung und wird, sofern es der Allgemeinzustand des Patienten zulässt, wie ein aggressives NHL behandelt [80].

Epidemiologie

Das MCL macht 5 bis 7 % der malignen Lymphome aus. Das mediane Erkrankungsalter beträgt 60 Jahre [31]. Zudem herrscht eine geschlechterspezifische Prävalenz und das männliche Geschlecht ist mit einem Verhältnis von 3:1 häufiger betroffen. Die Inzidenz liegt bei 1-2/100.000 [9].

Pathogenese

Der Name des Mantelzell-Lymphoms leitet sich von dem Ort der Pathogenese ab (Abb. 2), denn es ähnelt den reifen B-Lymphozyten der Mantelzone [80]. Der Ursprung liegt in naiven B-Lymphozyten des Primärfollikels oder in Lymphozyten der Mantelregion sekundärer Follikel. Zur Unterscheidung, ob ein MCL seinen Ursprung in einer prä-Keimzentrum B-Zelle oder post-Keimzentrum B-Zelle hat, hilft die Bestimmung der V_H-Gen-Mutations-Frequenz sowie ihr spezifisches Methylierungsprofil [59].

Die chromosomale Translokation t(11;14)(q13;q32) zwischen dem Immunglobulin-Schwerketten-Gen auf Chromosom 14 und dem Cyclin-D1-Gen auf Chromosom 11 ist pathognomonisch für die Erkrankung. Dadurch kommt es zu einer Überexpression von Cyclin D1 und in der Konsequenz zur Aktivierung des Zellzyklus. Eine SOX11-Expression wurde in 90 % der MCL-Fälle und in 100 % der Cyclin D1-negativen Fälle detektiert und kann dadurch als Biomarker in dieser MCL-Untergruppe zur Diagnosestellung behilflich sein. SOX11 ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Entwicklung des ZNS, dem neuralen Zellzyklus, der Geschlechtsdifferenzierung und der Skelettentwicklung beteiligt ist. Studien konnten zeigen, dass ein Fehlen der SOX11-Expression mit dem indolenten MCL und einer günstigen Prognose assoziiert ist [50].

Von weiterem Interesse ist die Überrepräsentierung der V_H 4-34 und V_H 3-21 Gene mit der Generierung von stereotypischen CDR3 Regionen, was vermuten lässt, dass eine chronische B-Zell-Rezeptor-Stimulation eine Rolle in der Pathogenese des MCL spielt [33], [19], [77]. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Erkenntnis einer Aktivierung des BZR-Signalweges und des NFκB-Signalweges in Mantelzell-Lymphomzellen [66].

Außerdem zeigte sich in einer Subpopulation von MCL-Patienten im Vergleich zu anderen B-NHL-Entitäten eine starke Antigen-induzierte BZR-Signalweg-Aktivierung [48].

Die Annahme, dass der BZR-Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des MCL hat, wird durch die Effektivität von BZR-Signalweg-Inhibitoren, z. B. den BTK- und PI3K-Inhibitoren Ibrutinib oder Idelalisib, gestützt [79], [32]. Trotz dieser Erkenntnisse existieren für das MCL bisher nur wenige Berichte über Zielantigene von MCL-BZRen, während für andere B-Zell-Lymphome schon mehrere solcher BZR-Antigene entdeckt und beschrieben wurden [68], [42], [58], [57].

In neuen Studien wird auch über die Bedeutung von Immunglobulinen als immunogene Neoantigene und Zielantigene von Lymphom-BZRen und über die Beteiligung des Virulenzfaktors Protein A des Bakteriums *Staphylococcus aureus* als Superantigen-Stimulus in der Pathogenese des MCL berichtet [10].

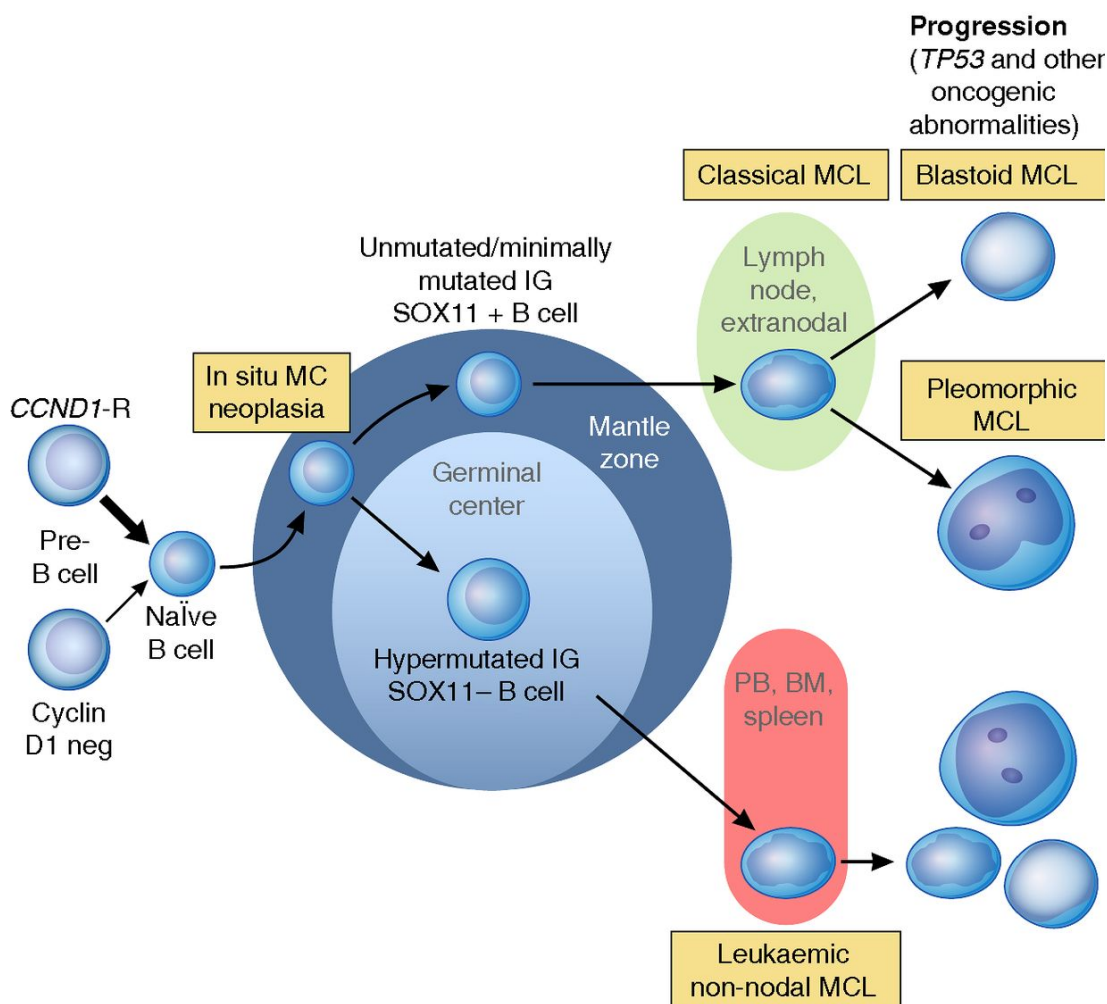


Abbildung. 2: Molekulare Pathogenese des MCL [69]; BM-bone marrow; IG-immunoglobulin; MC-mantle cell; MCL-mantle cell lymphoma; neg-negative; PB-peripheral blood.

Klinik

Lymphknotenvergrößerung, B-Symptomatik und Splenomegalie prägen die Klinik. In 80 bis 90 % der Fälle besteht eine Leber-, Milz- oder Knochenmarkinfiltration, wodurch bereits bei Diagnosestellung ein fortgeschrittenes Stadium vorliegt. In rund 25 % kommt es zur leukämischen Ausschwemmung der pathologisch veränderten B-Zellen in das periphere Blut [24]. Extranodale Manifestationen des Gastrointestinaltraktes oder des ZNS, wie sie im Rahmen der lymphomatösen Polypose oder der Meningeosis lymphomatosa auftreten, können vorkommen und sind beim MCL häufiger als bei anderen Lymphomen [9].

Bei der Mehrzahl der Patienten liegt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung schon ein Stadium IV vor [31].

Diagnostik

Die Diagnose des MCL beruht auf zwei Grundpfeilern, der histologischen Untersuchung und der Fluoreszenz In Situ Hybridisierung (FISH). Bei Befall des Knochenmarks und des peripheren Blutes kann auch die Durchflusszytometrie zu einer Diagnosestellung beitragen.

Die Histologie der MCL-Zellen ist gekennzeichnet durch einen unregelmäßigen Zellkern mit Einkerbung, dichtes Chromatin und ein schmales Zytoplasma. Liegt eine solche typische Morphologie vor, spricht man auch von ‚cleaved cells‘.

Die Knochenmarkinfiltration zeigt sich diffus mit polygonalen lymphatischen, zum Teil gefurchten Zellen. Ein Teil der Zellen kann entweder schon gleich zu Beginn oder erst im Verlauf durch einen unreiferen Charakter, was sich in einer erhöhten Zellgröße und blastoidem Aussehen äußert, hervorstechen. Die Durchführung einer FISH ist obligat zum Nachweis der pathognomonischen Translokation und dient somit der Abgrenzung von anderen Lymphom-Entitäten. Immunphänotypisch zeigt sich eine Expression reifer B-Zellmarker (CD19/CD20) und des T-Zellmarkers CD5 [24]. In Abgrenzung zur CLL, die ebenfalls CD5 positiv ist, ist das Mantelzell-Lymphom CD23, CD200 und CD43 negativ. Zur Festlegung des Therapiekonzeptes ist eine Ausbreitungsdiagnostik (Staging) notwendig. Diese beinhaltet eine Computertomografie zur Exploration der Tumorausdehnung sowie eine Knochenmarkpunktion. Zur Sicherung eines Befalls des ZNS oder des Magen-Darm-Traktes können bei klinischem Verdacht weitere diagnostische Maßnahmen wie eine Liquorpunktion oder eine Gastro- und Koloskopie notwendig sein [9].

Stadieneinteilung

Die Stadien des MCL werden nach der Ann-Arbor-Klassifikation eingeteilt [24]. Diese beinhaltet vier Stadien und unternimmt eine Unterteilung anhand des Befalls lymphatischer Organe. Ebenso Bestandteil der Klassifikation ist das Auftreten von B-Symptomen oder ein Befall extranodaler Organe. B-Symptomatik ist ein Oberbegriff für die drei Symptome Fieber

(>38° C), Nachtschweiß (in dem Maße, dass ein Wechsel der Bekleidung notwendig wird) und Gewichtsverlust von mehr als 10 % des Körpergewichts innerhalb der letzten sechs Monate [24].

Stadieneinteilung nach Ann-Arbor [24], [43]

I	Befall <u>einer</u> Lymphknotenregion (I _N) oder Vorliegen <u>eines</u> lokalisierten extranodalen Herdes (I _E)
II	Befall von ≥2 Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells (II _N) oder lokalisierter Befall von extranodalen Herden (II _E) und Befall einer oder mehrerer Lymphknotenregionen auf einer Seite des Zwerchfells (II _{N/E})
III	Befall von ≥2 Lymphknotenregionen (III _N) bzw. lokalisierter Befall extranodaler Herde und Lymphknotenbefall (III _E) auf beiden Seiten des Zwerchfells
III1	subphrenische Lokalisation, beschränkt auf Milz, zöliakale und/oder portale Lymphknoten allein oder gemeinsam
III2	subphrenische Lokalisation mit Beteiligung paraaortaler, mesenterialer, iliakaler und/oder inguinaler Lymphknoten allein oder gemeinsam
IV	disseminierter Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe mit oder ohne Befall von Lymphknoten

Tabelle 2: Ann-Arbor-Klassifikation

Legende:

- N = nodaler Befall: Lymphknoten, Milz, Thymus, Waldeyer-Rachenring, Appendix, Leber- oder Milzvergrößerung
- E = extranodaler Befall

Zur Kennzeichnung des Fehlens oder Vorliegens einer B-Symptomatik:

- A = Fehlen von B-Symptomen
- B = Vorliegen von B-Symptomen (verbunden mit einer schlechteren Prognose)

Zur Einschätzung von Risikogruppen wurde ein Risikoscore, der MCL International Prognosis Index (MIPI), eingeführt. Der MIPI ist das am häufigsten verwendete Prognosemodell und berücksichtigt die Kriterien Allgemeinzustand, Alter, LDH-Wert sowie Leukozytenzahl. Eine Modifikation des MIPI ergänzt den Ki-67-Index, welcher ein Maß der Proliferation darstellt. Für die Interpretation des Ki-67-Index gilt, dass höhere Werte mit einer gesteigerten Proliferation und einer schlechteren Prognose assoziiert sind. Was die prognostischen genomischen Veränderungen betrifft, so erwiesen sich Mutationen des TP53-Gens als ein signifikanter, unabhängiger molekularer Marker, der eine schlechte Prognose für MCL-Patienten bedeutet. NOTCH1/2-Mutationen und Mutationen des MYC-Onkogens wurden ebenfalls mit einem aggressiven klinischen Verlauf in Verbindung gebracht [85].

Die Patientengruppe mit dem geringsten Risiko, kalkuliert nach dem MIPI, hat ein medianes 5-Jahres Gesamtüberleben (OS) von 60 %, der Median für das OS der mittleren Risikogruppe liegt bei 51 Monaten und bei 29 Monaten in der Hochrisikogruppe. Bis zu 30 % der Patienten

können einen indolenten klinischen Verlauf haben, mit einer medianen Überlebenszeit von mehr als 7 bis 10 Jahren [84].

Therapie-Konzept

Das Mantelzell-Lymphom wird wegen seiner schlechten Prognose bei Diagnosestellung am häufigsten mit einer kombinierten Immunchemotherapie behandelt. Bei der Wahl des passenden Therapie-Konzepts spielt die 2016 von der Weltgesundheitsorganisation aktualisierte Klassifikation eine große Rolle. Sie beschreibt die zwei Subtypen, das klassische und das leukämische, nicht-nodale MCL, die jeweils spezifische molekulare Merkmale und klinische Verläufe aufweisen. Die Therapie von MCL-Patienten sollte wenn möglich im Rahmen von klinischen Studien erfolgen.

Die Erstlinientherapie richtet sich nach dem Alter des Patienten, dem Tumorstadium und der Tumorlast und besteht entweder aus einer alleinigen Immunchemotherapie (Patienten >65 Jahre), einer Induktionstherapie mit anschließender Hochdosis-Chemotherapie plus autologer Stammzelltransplantation (Patienten ≤65 Jahre) oder einer ‚watch & wait‘ Strategie [9], [24]. Letztere ist eine mögliche Option bei indolenten Verläufen mit niedrigem Ki-67-Index. Es wurden darunter Fälle beschrieben, die die Ersttherapie ohne negative Auswirkungen auf das Überleben hinausschieben konnten [38]. Es ist notwendig, klar zwischen den aggressiven und den indolenten MCL-Typen zu unterscheiden, um die Wahl des therapeutischen Ansatzes möglichst optimal für den jeweiligen Patienten treffen zu können [40].

Im Falle eines Rezidivs gehört die Immunchemotherapie zum Standard, deren verschiedene Schemata sich nach der Primärtherapie richten. Hierfür stehen verschiedene Medikamente zur Verfügung, die alleine oder als Kombination verabreicht werden können. Dazu gehören Chemotherapeutika, neue zielgerichtete Therapeutika und monoklonale Antikörper. Zur Konsolidierung kann abhängig von der Erstlinientherapie und dem Allgemeinzustand des Patienten eine autologe bzw. allogene Stammzelltransplantation durchgeführt werden.

2.3 Therapie des Mantelzell-Lymphoms

Eine Übersicht über den Therapie-Algorithmus zeigt Abbildung 3.

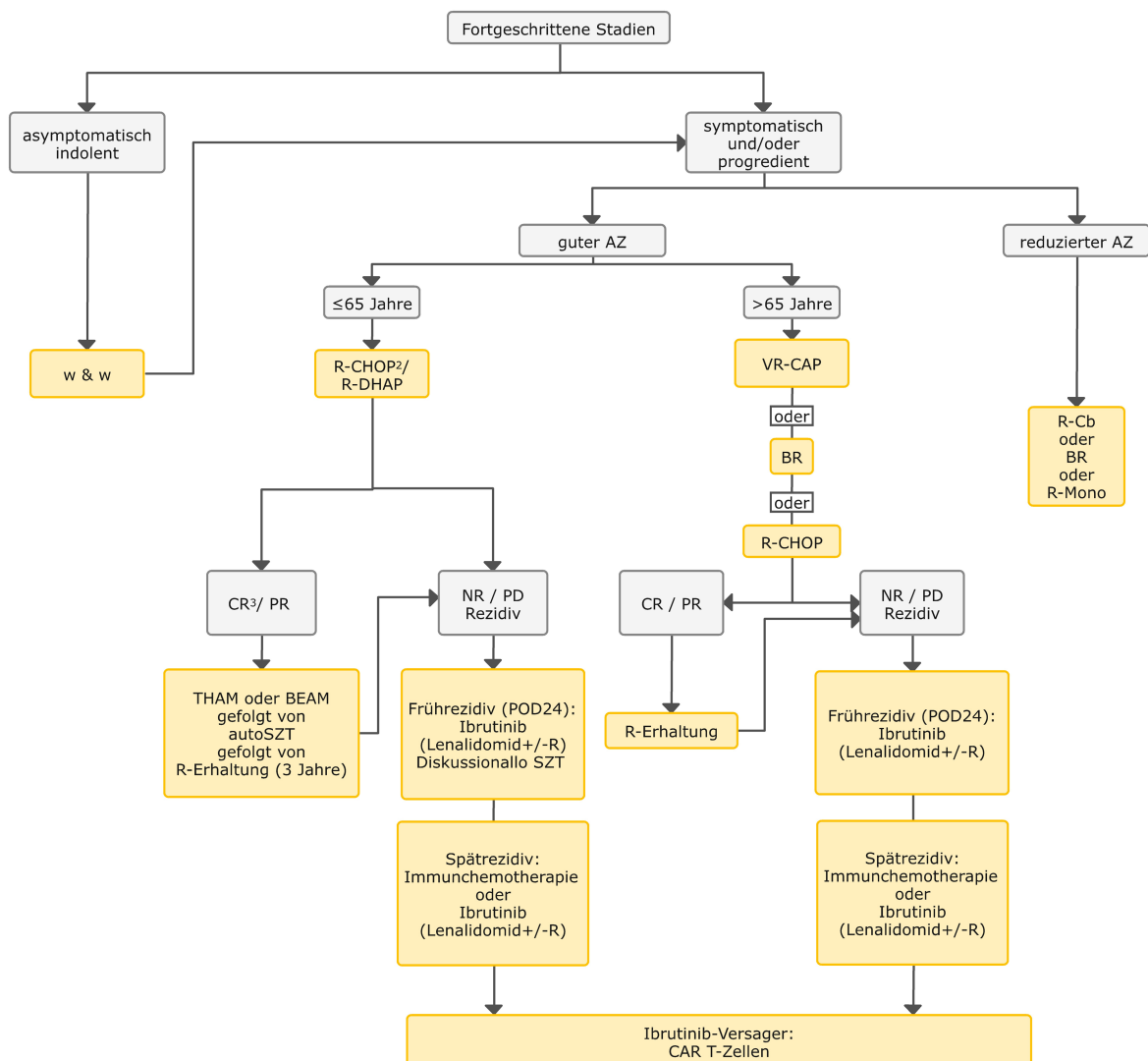


Abbildung 3: Algorithmus zur Therapie des Mantelzell-Lymphoms [53].

Legende

AZ - Allgemeinzustand, allo SZT - allogene Stammzelltransplantation, auto SZT - autologe Stammzelltransplantation, BEAM - Carmustin/Etoposid/Cytarabin/Melphalan, BR - Rituximab/Bendamustin, R-Cb - Rituximab/Chlorambucil, R-Erhaltung - Rituximab Erhaltung, R-CHOP - Rituximab/Cyclophosphamid/Doxorubicin/Vincristin/Prednison, VR-CAP - Rituximab/Cyclophosphamid/Doxorubicin/Bortezomib/Prednison, R-Mono - Rituximab Monotherapie, R-DHAP - Dexamethason/hochdosiertes Cytarabin/Cisplatin, THAM - Hochdosistherapie mit Ganzkörperbestrahlung (Total Body Irradiation)/Cytarabin/Melphalan, w&w - abwarten (watch & wait), CR - komplette Remission, NR - keine Remission (Non Response), PR - partielle Remission, POD24 - Krankheitsprogression innerhalb von 2 Jahren.

Erstlinientherapie

Für Patienten ≤ 65 Jahre ist eine Induktion plus Hochdosiskonsolidierung mit autologer Stammzelltransplantation (ASCT) die Standardtherapie. Der Patient erhält sechs alternierende Zyklen R-CHOP und R-DHAP gefolgt von einer Cytarabin-haltigen Hochdosis-Chemotherapie und ASCT. Dieses dosisintensivierte aggressive Konzept zeichnet sich aus durch ein deutlich verlängertes progressionsfreies (PFS) und Gesamt-Überleben [23].

Die Zeit bis zum Therapieversagen bei Hochdosistherapie und ASCT (9,1 Jahre mit einer 5-Jahres-Rate von 65 %) ist signifikant länger als in einer Kontrollgruppe mit R-CHOP, myeloablativer Radiochemotherapie und ASCT (3,9 Jahre mit 5-Jahres-Rate von 40 %) [23].

Die Hinzunahme von Rituximab als Erhaltungstherapie nach autologer Stammzelltransplantation führt zu einem verlängerten PFS (79 % 4-Jahres-PFS vs. 61 % in einer Kontrollgruppe ohne Rituximab nach ASCT) und OS (89 % vs. 80 % in der Kontrollgruppe) [37].

Diese Therapiestruktur muss für ältere Patienten angepasst werden, da für die meisten Patienten >65 Jahre eine autologe Stammzelltransplantation aufgrund der damit einhergehenden Toxizität nicht mehr in Frage kommt. Die Standardtherapie für diese Patientengruppe besteht aus sechs Zyklen R-CHOP (Tag 1 und Wiederholung an Tag 22). Die R-CHOP-Induktionstherapie führt zu einer Verlängerung des OS auf 6,4 Jahre im Vergleich zu 3,9 Jahre nach einer Induktion mit dem R-FC-Therapieschema bestehend aus Rituximab, Fuldarabin und Cyclophosphamid [35]. Zu beachten ist, dass bei der Mehrzahl der Patienten in den ersten drei Jahren aufgrund des aggressiven Verlaufs Rezidive auftreten. Das R-CHBoP-Protokoll mit Bortezomib anstelle von Vincristin verlängert das Gesamt-Überleben (90,7 Monate im Vergleich zu 55,7 Monaten) [61]. Auch in dieser Altersgruppe führt Rituximab im Vergleich zu Interferon- α als Erhaltungstherapie nach Chemoimmuntherapie zu einer Verlängerung des PFS (5,4 Jahre vs. 1,9 Jahre) und der Gesamtüberlebenszeit (9,8 Jahre im Gegensatz zu 7,1 Jahren) [35].

Die Behandlung richtet sich nach dem unterschiedlichen körperlichen Status der Patienten. In der fitten Patientenpopulation rechtfertigt das Streben nach Remission und Verlängerung des Überlebens den Einsatz intensiverer und toxischer Therapien. In der Gruppe der körperlich beeinträchtigten Patienten ist die Krankheitskontrolle vorrangig. Hierbei sollte ein Gleichgewicht zwischen Nutzen und Toxizität der Behandlung eingehalten werden.

Eine watch & wait Strategie kann im Einzelfall bei klinisch indolentem Verlauf in Erwägung gezogen werden. Für die Einschätzung, ob ein klinisch indolentes Lymphom vorliegt, können das Fehlen oder Vorhandensein eines nodalen Befalls oder biologischer Marker (z. B. Ki-67) herangezogen werden. Kommt es zu einem Progress, sollte eine Therapie eingeleitet werden.

In der Gruppe der älteren, gebrechlicheren Patienten ist diese Strategie generell zu erwägen. Hierdurch kann eine Überbehandlung verhindert werden [85].

Rezidiv/Refraktärität/Progress

Trotz der Verbesserung der Ansprechdauer mit den derzeit verfügbaren Therapien werden MCL-Patienten unweigerlich einen Rückfall erleiden. In diesem Falle ist, wenn die Primärtherapie schon länger als zwei Jahre zurückliegt, die erneute Immunchemotherapie die Standardtherapie. Das Schema richtet sich dann nach der Primärtherapie. Eine Reihe von gezielten Therapien sind in der Rezidiv-Therapie zugelassen und werden jetzt in Kombination mit der Erstlinien-Therapie evaluiert [40].

Bei Patienten, die kurz nach Ende der Primärtherapie innerhalb von zwei Jahren ein Frührezidiv erleiden, sollte keine erneute Chemotherapie, sondern eine Therapie mit dem BTK-Inhibitor Ibrutinib durchgeführt werden [85], [53].

Über eine allogene Stammzelltransplantation kann bei Patienten <65 Jahre im Einzelfall diskutiert werden. Im Spätrezidiv stehen eine erneute Immunchemotherapie oder eine Ibrutinib-Therapie zur Verfügung. Obwohl Ibrutinib das Therapie-Format nachhaltig verändert hat, bleibt die Prognose nach einem Rezidiv unter Ibrutinib schlecht. In diesen Fällen sollte rechtzeitig die Möglichkeit einer CAR-T-Zell-Therapie (Handelsname: Tecartus) erwogen werden [53].

Diese CAR-T-Zellen binden an CD19-exprimierende Zellen und werden über die kostimulierenden Domänen CD28 und CD3-z aktiviert. Es kommt zur Proliferation und Ausschüttung von Chemokinen, was zur Apoptose und Nekrose der CD19-tragenden Zelle führt. Eingesetzt wird Tecartus im Rezidiv oder refraktären Stadium nach zwei oder mehr systemischen Therapien, welche einen BTK-Inhibitor einschließen. In einer hierfür angesetzten Phase-II-Studie, der sogenannten ZUMA-2 Studie, wurden 74 Patienten eingeschlossen. Primärer Endpunkt der Studie war die objektive Ansprechrate ermittelt anhand der Lugano-Kriterien von 2014. Mit den ersten 60 Patienten wurde eine Analysegruppe erstellt, die vier Wochen nach Verabreichung von Tecartus bezüglich ihres Ansprechens beurteilt wurde. Hierbei zeigte sich eine objektive Ansprechrate von 93 % sowie eine vollständige Remissionsrate von 67 % [78].

Ein weiteres wichtiges Medikament ist der Bcl-2-Inhibitor Venetoclax. Das B-Cell-Lymphoma-2-Protein verhindert den Eintritt der Tumorzelle in die Apoptose und sorgt so für das ungehemmte Wachstum des malignen Zellklons. Das bisher nur in Studien erprobte Arzneimittel konnte in einer Phase-I-Studie bei 75 % der MCL-Patienten mit Rezidiv ein Erfolg versprechendes Ansprechen zeigen [6]. Eine anschließend durchgeführte Phase-II-Studie

zeigte noch bessere Ergebnisse für eine Kombinationstherapie von Venetoclax mit Ibrutinib mit einem medianen PFS von 29 Monaten [21].

Bei Mehrfach-Rezidiven oder refraktärer Erkrankung führen Ibrutinib, Lenalidomid und der mTOR-Inhibitor Temsirolimus zu einer Verlängerung der progressionsfreien Überlebenszeit [8], [76], [62], [28], [14], [79].

2.4 Die Bedeutung des BZR und die Möglichkeit neuer Therapieformate

Schon seit langer Zeit wird vermutet, dass der BZR maligner B-Lymphozyten an der Pathogenese von Lymphomen beteiligt ist [5].

Nach jetzigem Wissensstand scheint eine Antigen-induzierte chronische B-Zell-Rezeptor-Stimulation bei der Entstehung von lymphoproliferativen Erkrankungen eine entscheidende Rolle zu spielen. Diese Stimulation durch Antigene kann auf verschiedene Weisen erfolgen. Sie kann ausgelöst werden durch Pathogene in Form von Erregern wie *H. pylori* beim EZML oder dem Hepatitis-C-Virus beim SMZL [11], [5], [82], [83], [54], [30], [41], [55]. Ein weiterer Mechanismus ist die BZR-Stimulation durch Autoantigene. Für das folliculäre Lymphom wird beispielsweise eine BZR-Stimulation durch Lektine, die an Oligosaccharide der variablen Regionen des Immunglobulins binden, diskutiert. [65]. Für einen Teil der BZRen der primären ZNS-Lymphome konnte SAMD14/neurabin-I als autoantigene Zielstruktur identifiziert werden. Die Immunogenität von SAMD14/neurabin-I wird durch eine posttranslationale Hyper-N-Glykosylierung erklärt [70]. Wie und warum es zu dieser posttranslationalen Veränderung kommt, konnte bisher nicht geklärt werden. Auch für Plasmazellerkrankungen konnten weitere Antigene wie Paratarg-7 und HSP90 als autoantigene Targets von Paraproteinen gefunden werden. Wie bei SAMD14/neurabin-I scheinen auch diese Proteine ihre Immunogenität durch sekundäre Modifikationen zu erhalten. Für Paratarg-7 konnte eine Hyperphosphorylierung und für HSP90 eine Sumoylierung als verantwortliche Veränderungen identifiziert werden [18], [58].

Beim Mantelzell-Lymphom konnte LRPAP1 als autoantigene Zielstruktur von BZRen einiger MCL identifiziert werden [72]. LRPAP1 steht für low-density lipoprotein receptor-related protein-associated protein 1 und ist ein 40 kDa großes Protein, das in fast allen Geweben des Körpers exprimiert wird. Studien konnten mehrere Funktionen für LRPAP1 zeigen. Zum einen gewährleistet es als Chaperon eine korrekte Bildung von Disulfidbrücken während der Herstellung von LDL-Rezeptoren, zum anderen begleitet es den erzeugten Rezeptor durch das endoplasmatische Retikulum und das Golgi-Kompartiment und verhindert so eine vorzeitige Bindung von Ligand und Rezeptor [51]. Außerdem spielt es als Antagonist der LDL-

Rezeptor-Familie eine Rolle im Megalin/Cubilin-Endozytose-Signalweg [26]. Dieses Autoantigen ist das gemeinsame Ziel-Antigen von BZRen von einem Drittel aller MCL [72]. 8 von 21 primären MCL-Fällen exprimieren einen BZR, der eine Reaktivität gegenüber LRPAP1 aufweist [71]. Innerhalb dieser acht Fälle wurden BZRen mit mutierten und unmutierten variablen Regionen im Immunglobulin-Gen gefunden. Die BZRen von 2 von 7 etablierten MCL-Zelllinien reagieren spezifisch mit LRPAP1 [72].

In Patienten mit LRPAP1-reaktiven MCL-BZRen konnten Serum-Autoantikörper gegen LRPAP1 nachgewiesen werden, was auf eine chronische Autoimmunreaktion hindeutet. Es konnte auch gezeigt werden, dass LRPAP1-Autoantikörper-positive im Vergleich zu Autoantikörper-negativen Patienten ein besseres Outcome aufweisen. Dies verdeutlicht sich durch eine 5-Jahres Wahrscheinlichkeit für FFS (failure-free survival) von 70 % vs. 51 % und von 93 % vs. 68 % für das 5-Jahres Gesamtüberleben [73]. Der Grund für den Verlust der Selbsttoleranz gegenüber LRPAP1 in diesen MCL-Fällen ist unklar, da bisher keine posttranslationalen Modifikationen wie Sumoylierung, Hyperphosphorylierung oder Hyperglykosylierung nachgewiesen werden konnten [17].

Eine wichtige Frage, die sich hier stellt, ist, ob die Detektion erhöhter Titer von Serum-Antikörpern gegen LRPAP1 die Entwicklung eines MCL vorhersagen kann, und wenn dem so ist, mit welcher Vorhersagekraft und in welchem Zeitintervall dies möglich ist. Bisher durchgeführte Studien weisen auf eine hohe Spezifität dieser Autoantikörper hin [71]. Studien mit höheren Fallzahlen sind notwendig, um die diagnostische Aussagekraft von LRPAP1-Autoantikörpern abschätzen zu können.

Eine weitere sehr entscheidende Frage ist, ob der BZR des MCL als therapeutisches Ziel verwendet werden könnte, da der BZR aufgrund seiner spezifischen variablen Region, die ihn von Rezeptoren anderer B-Zell-Lymphome unterscheidet, ein ideales Therapieziel darstellt. Mögliche bereits erforschte Therapiekonzepte, die sich gegen den spezifischen BZR von B-Zell-Lymphomen richten, sind anti-idiotypische Antikörper oder Peptibodies [75]. Ein weiteres Therapiekonzept könnte das im Folgenden näher beschriebene BAR-Format sein.

2.5 BARs - B-cell receptor antigens for reverse targeting

Die physiologische Hauptaufgabe eines BZRs ist es, sein spezifisches Antigen zu binden und zu internalisieren. Auf dieser Grundlage wurde das BAR-Konzept entwickelt. Die zentrale Rolle trägt hierbei das BZR-spezifische Antigen. Die spezifische Reaktivität der Lymphom-BZRen eines beträchtlichen Anteils aller MCL gegen LRPAP1 bildet die molekulare Grundlage für

einen neuartigen therapeutischen Ansatz mit sehr hoher Spezifität. Dieser Ansatz wird als BAR (B-cell receptor antigens for reverse targeting) bezeichnet [70].

Bisher entwickelte Konzepte und Bestandteil derzeitiger Forschung sind die Konjugation eines BZR-Antigens an ein Toxin, die Integration in bispezifische Konstrukte (BiTEs) oder CAR-T-Zellen sowie die Integrierung des Antigens in ein IgG-Antikörper-Format. Letzteres ist Inhalt dieser Arbeit.

Allen vier Konzepten ist gemeinsam, dass die Oberflächen-Immunglobuline der entarteten Lymphomzellen die Epitop-Region des Antigens binden und so Therapeutika gerichtet an ihr Ziel gelenkt werden können. Bei BAR-Immuntoxinen wird die therapeutische Wirkung über die Internalisierung des an das Antigen gekoppelten Toxins vermittelt. Im Gegensatz hierzu sorgen Antikörper-basierte BAR-Konzepte (BAR-bodies) entweder als bispezifische BAR-bodies, BAR-bodies im IgG-format oder auch als CAR-T-Zellen dafür, dass körpereigene Killerzellen im Rahmen der physiologischen Immunabwehr an die Lymphom-Zielzellen rekrutiert werden und diese bekämpfen.

2.6 Fragestellung

Ziel der Promotionsarbeit ist die Herstellung eines IgG-Antikörpers, der anstatt der variablen Regionen die Epitop-Region von LRPAP1 trägt. Der Antikörper soll gezielt an die BZRen von MCL-Zellen binden und eine zytotoxische Wirkung in Form einer Zellyse entfalten. Der Vorteil dieses Therapieformats liegt in seiner absoluten Spezifität. Im Gegensatz zu den bisherigen Therapien werden nicht alle B-Lymphozyten angegriffen, sondern nur die B-Zellen, die einen B-Zell-Rezeptor exprimieren, der LRPAP1-reaktiv ist. Somit wird eine unselektive Eliminierung von B-Lymphozyten verhindert und die Funktion des humoralen Immunsystems bleibt weitestgehend erhalten.

3. Methodik

3.1 Materialien

3.1.1 Laborgeräte

Autoklav Systec V-75	Systec GmbH, Linden
Brutschrank Heracell CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Bunsenbrenner	Usbeck, Radevormwald
Durchflusszytometer BD FACSCanto™	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Eisbereiter AF 80	Scotsman Industries, Vernon Hills, USA
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Stuttgart
Kreisschüttler 3015	IKA Labortechnik, Staufen
Kühlschrank 4 °C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Magnetrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach
Mehrkanalpipette 50 µl - 250 µl	Renner GmbH, Dannstadt-Schauernheim
Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikrowelle	OK Imtron GmbH, Ingolstadt
Pipetten 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhelfer accu-jet®	Brand, Wertheim
Power Supply Model 1000/500	Bio-Rad, München
Präzisionswaage 440-47	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Schüttler KS 250 basic	IKA Labortechnik, Staufen
Spektralphotometer GeneQuant™ Pro	GE Healthcare, Solingen
Thermocycler Veriti™ 96 Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Ultratiefkühlschrank -80 °C	Fisher Scientific, Schwerte
UV-Tisch	Vilber, Eberhardzell
UV-Transilluminator High Performance	LTF Labortechnik, Wasserburg
Video Copy Processor	Mitsubishi Electric, Ratingen
Vortexmischer MS2 Minishaker	IKA Labortechnik, Staufen
Wasserbad	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

3/6/96 - Well-Platte	Merck, Darmstadt
Agarose-Gelkammer	Serva, Heidelberg
Bakterienkulturröhrchen 13 ml	Sarstedt, Nümbrecht
BioMax Light Film	Kodak, Rochester, USA
Blotting Paper	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Chemilumineszenz-Film Carestream	Kodak, Rochester, USA
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf, Hamburg
Filtermembran Ultracell 30 kDa	Merck, Darmstadt
Filtropour Vacuum Filter 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht
Glaskolben	Eppendorf, Hamburg
Immobilion-P PVDF Membran	Merck, Darmstadt
Impfschlinge	Sarstedt, Nümbrecht
Multifly-Kanüle	Sarstedt, Nümbrecht
Neubauer-Zählkammer	Eppendorf, Hamburg
Papierfilter	Schleicher und Schuell, Düren
Pasteurpipette 150 mm	Hirschmann, Eberstadt
PCR-Kette Multiply-µlStrip	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischale	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitze 0,5 µl - 20 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitze 100 µl - 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitze 2 µl - 100 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Proteingrößenleiter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Röntgen Entwickler und Fixierer	Adefo Chemie, Neu Isenburg
S-Monovette Serum	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipette 5 ml, 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Servapor Dialysemembran MWCO 12000-14000	Serva, Heidelberg
Skalpellsklingen	B. Braun, Melsungen
TC-Flaschen T25, T75, T175	Sarstedt, Nümbrecht
Western Blot-Gelkammer	Bio-Rad, München
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht

3.1.3 Lösungen und Medien

Agarose-Gel	1,5–3 g Agarose
	150 ml 1-fach TAE Puffer
	75 µl Ethidiumbromid
Blaumarker 6x	0,25 % Bromphenolblau
	0,25 % Xylene Cyanol FF
	40 % Sucrose
	0,25 % Orange G
	ad H ₂ O auf 100 ml
Coomassie-Stain	1 g Coomassie Brilliant Blue G 250
	450 ml Methanol
	450 ml H ₂ O
	100 ml Essigsäure
Entfärber für großes Coomassie-Gel	100 ml Methanol
	100 ml Eisessig
	800 ml a. dest.
LB-Medium	10 g NaCl
	10 g Trypton
	5 g Hefeextrakt
	1 L H ₂ O
	Autoklavieren
	Ampicillin 1:1000 oder Canamycin 1:4000
LB-Medium Agarplatten	LB-Medium
	15 g/L Agar
	Autoklavieren
	Ampicillin 1:1000 oder Canamycin 1:4000
	Lagerung bei 4 °C
Lämmli-Puffer 5x	144 g Glycin
	30,34 g TRIS
	10 g SDS
	ad 2 L a. dest.
SOC	20 g Tryptone
	5 g Yeast Extrakt
	0,5 g NaCl
	950 ml H ₂ O

	10 ml 250 mM KCl
	0,2 ml 5 N NaOH (pH7)
	Nach dem Autoklavieren:
	5 ml 2 M MgCl ₂
	10 ml 40 % Glucose
SDS-Puffer 5x	0,6 ml 1 M TRIS pH 6,8
	2,5 ml 100 % Glycerol
	2 ml 10 % SDS
	0,5 ml 2 % Bromphenolblau
	3,9 ml H ₂ O
TAE 1/10 EDTA 1x	0,04 M Trisacetat
	0,0001 M EDTA
TAE 50x	242 g TRIS
	57,1 ml Eisessig
	100 ml 0,5 M EDTA (pH 8)
	1 L a. dest.
TBS	8,78 g NaCl
	6,05 g TRISZMA Hydrochlorid
	1,4 g TRIS
	1 ml Triton X-100
	ad 1 L a. dest.
Transferpuffer für Western Blot	0,3 g TRIS
	1,44 g Glycin
	20 ml Methanol
	100 ml a. dest.
Trypanblau	0,5 g Trypanblau
	100 ml 0,9 % NaCl
Western-Blot	Trenngel (10 %):
	4 ml H ₂ O
	-> 3,3 ml 30 % Acrylamid Mix
	2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)
	0,1 ml 10 % SDS
	0,1 ml 10 % APS
	0,004 ml TEMED

	STACK-Sammelgel:
	1,4 ml H ₂ O
	0,33 ml Acrylamid Mix
	0,25 ml 1,0 M Tris (pH 6,8)
	0,02 ml 10 % SDS
	0,02 ml 10 % APS (Radikalstarter)
	0,002 ml TEMED (Katalysator)

3.1.4 Computerprogramme

Chromas	Technelysium, South Brisbane, Australien
Datenbank Blast NCBI	National Center for Biotechnological Information, Bethesda, USA
Ligation Calculator	Düsseldorf
Multilabel Plate Reader Victor ² 1420	PerkinElmer, Rodgau
Wallac 1420 Manager	PerkinElmer, Rodgau
WinMDI 2.3	Purdue University Cytometry Laboratories, West Lafayette, USA

3.1.5 Kits

Cytotoxicity Detection Kit ^{PLUS} (LDH)	Roche, Mannheim
Entwicklerkit Western Blot, 20X LumiGLO [®] Reagent and 20X Peroxide	Cell Signaling Technology, Frankfurt
NucleoBond TM AX 100 Kit	Machery Nagel, Düren
NucleoSpin [®] Plasmid Kit	Machery Nagel, Düren
TOPO [®] TA Cloning [®] Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zymoclean TM Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research, Freiburg

3.1.6 Antikörper

ANTI FLAG [®] M2 Affinity Gel	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Anti-IgG1-APC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP conjugate	Bio-Rad, Feldkirchen
IgG1 NRB1-BAR-Body: humanes IgG1 mit einem Ausschnitt von NRB1 anstelle der variablen Domänen der schweren und leichten Kette	José Carreras Center, Homburg

Monoclonal ANTI-FLAG-M2	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
-------------------------	-------------------------------

3.1.7 Enzyme und Primer

<i>Agel</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>Agel-s</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Alkalische Phosphatase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
AmpliTaq Gold™ DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>BstEII</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>BstEII-as</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CH1 3'	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CMV-s	MWG Biotech Ag, Ebersberg
<i>Eco47III</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>EcoRV</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>kappa-as</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
M 13 Forward	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
M 13 Reverse	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>MunI</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>MunI-s</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
<i>SacI</i>	Fermentas, Vilnius
<i>SmaI</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>SmaI-as</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
T4-DNA-Ligase	Fermentas, Vilnius

<u>Primer</u>	<u>Sequenz</u>
CH1 3'	5'TGGACGCCGCTGGTCAGGGC3'
CMV-s	5'TGGGAGTTTGTTTTGGCACC3'
Kappa-as	5'GTAAAACGACGGCCAG3'
LRPAP1 AA263 <i>Agel-s</i>	5'ACCGGTCTGGCGCAGTCCGCCAA3'
LRPAP1 AA263 <i>MunI-s</i>	5'CAATTGCTGGCGCAGTCCGCCAA3'
LRPAP1 AA350 <i>BstEII-as</i>	5'GGTACCGGAGATCCTGCCGGACAG3'
LRPAP1 AA350 <i>SmaI-as</i>	5'CCCGGGGAGATCCTGCCGGACAG3'
M 13 Forward	5'GTTGTAAAACGACGGCCAGT3'
M13 Reverse	5'CAGGAAACAGCTATGACCATG3'

3.1.8 Zellen und Plasmide

E. coli K12 DH5 α	José Carreras Center, Homburg
GFP-Plasmid	José Carreras Center, Homburg
Granta-519-Zelllinie	DSZM, Braunschweig
HEK 293 T-Zellen	DSZM, Braunschweig
IgG1 TA	José Carreras Center, Homburg
Maver-1-Zelllinie	DSZM, Braunschweig
pCR [®] 2.1-TOPO [®] -Vektor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pSfi-Express-FLAG-Tag	José Carreras Center, Homburg
U2932 mit rekombinantem BZR	José Carreras Center, Homburg

3.1.9 Chemikalien und Antibiotika

Agar	BDBiosciences, Franklin Lakes, USA
0,5 M EDTA pH 8	Merck, Darmstadt
1 M TRIS pH 6,8	Carl Roth, Karlsruhe
1 M Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Acrylamid Mix 30 %	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm
APS	Merck, Darmstadt
Biocoll [®] Separating Solution	Biochrom AG, Berlin
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Canamycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Coomassie Brilliant Blue G 250	Serva, Heidelberg
Desoxynukleosidtriphosphate	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
DNA-Marker 50 bp und 1000 bp	Fermentas, Waltham, USA
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eisessig	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin
G418	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glucose	Merck, Darmstadt
Glutamin	Merck, Darmstadt

Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
KCl	Merck, Darmstadt
Ligasepuffer	Fermentas, Waltham, USA
Magermilchpulver	Hochwald-Molkerei, Thalfang
Methanol	Merck, Darmstadt
MgCl ₂	Merck, Darmstadt
Molecular Biology Grade Water	Eppendorf, Hamburg
NaCl	Caesar Loretz, Hilden
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Orange G	Merck, Darmstadt
PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PCR-Puffer 10x	Applied Biosystems, Foster City, USA
Puffer für Restriktionsenzymverdau	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RPMI 1640, w/o: L-Glutamine, w: 2.0 g/L NaHCO ₃	Pan Biotech, Aidenbach
SDS	Carl Roth, Karlsruhe
Sucrose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS	Carl Roth, Karlsruhe
Trisacetat	Carl Roth, Karlsruhe
TRISZMA Hydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X 100	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Trypton	BDBiosciences, Franklin Lakes, USA
X-tremeGENE™	Roche, Mannheim
Xylene cyanol FF	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Yeast Extract	BDBiosciences, Franklin Lakes, USA

3.2 Methodik

3.2.1 Vorangegangene Arbeit

Entdeckung des Antigens LRPAP1 als B-Zell-Rezeptor-Antigen von rund einem Drittel aller Mantelzell-Lymphome durch das José Carreras Center für Immun- und Gentherapie des Universitätsklinikum des Saarlandes [72]. Der Klon hierfür wurde mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.2.2 Molekularbiologische Methodik

3.2.2.1 DNA-Amplifizierung

Zur Vervielfältigung von DNA wurde das Verfahren der Polymerasekettenreaktion, PCR, durchgeführt. Eine weitere Möglichkeit der Amplifizierung ist die Plasmid-basierte Vervielfältigung der DNA in Bakterien.

3.2.2.1.1 PCR

Das Anwendungsgebiet der PCR beschränkt sich nicht nur auf die Amplifikation von DNA-Sequenzen, sondern dient auch als Verfahren der Insertionskontrolle von Genabschnitten in Vektoren.

Für die Vervielfältigung werden als Ausgangsmaterial das zu amplifizierende Nukleinsäurefragment, zwei Primer, eine thermostabile DNA-Polymerase, die Desoxyribonukleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP, Magnesium-Ionen, eine Pufferlösung zur pH-Stabilisierung und ein Thermocycler benötigt. Eine Voraussetzung dieser *in-vitro* Methode ist die Kenntnis der flankierenden Nukleotidsequenzen des zu vervielfältigenden DNA-Abschnittes. Komplementär zu diesen Sequenzen werden Oligonukleotide synthetisiert, die sich nach erfolgter Trennung des Doppelstrangs an die Ursprungssequenz des jeweiligen Einzelstranges anlagern und damit Anfang und Endpunkt des zu amplifizierenden Bereiches definieren.

Die PCR umfasst die drei Phasen Denaturierung, Annealing und Polymerasereaktion, die in mehreren Zyklen wiederholt werden.

Bevor die DNA für die Amplifikation abgelesen werden kann, muss sie denaturiert werden. Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen A und T bzw. C und G durch Temperaturerhöhung auf 90 °C gespalten, wodurch zwei Einzelstränge

entstehen. Durch den Einsatz der aus dem in heißen Quellen lebenden Bakterium *Thermus aquaticus* (taq) gewonnenen thermostabilen Polymerase kann die Denaturierung ablaufen ohne einen Funktionsverlust des Enzyms zu befürchten.

Für die sich nun anschließende Hybridisierung kühlt der Thermocycler die Temperatur auf 50 bis 60 °C ab und die zwei aus 15 bis 25 Basen bestehenden einzelsträngigen Nukleotid-Primer können sich an dem zu ihrer Sequenz komplementären 3'-Ende der DNA anlagern. Annealing bedeutet sinngemäß ‚Bindung der Oligonukleotidprimer‘. Diese Primer dienen der Polymerase als Anfangsstück, um weitere Nukleotidtriphosphate anzuknüpfen. Nach Anlagerung der Primer startet die Polymerase von dort bis zum 3'-Ende des jeweiligen Einzelstranges. In dieser letzten Phase, der Polymerasereaktion, werden die beiden Einzelstränge mithilfe des Enzyms und den vier Desoxyribonukleotidtriphosphaten dATP, dCTP, dGTP, dTTP zu Doppelsträngen vervollständigt. Dieser Reaktionszyklus wiederholt sich in den drei Schritten Denaturierung, Annealing und Polymerasereaktion. Im Zuge der Arbeit erfolgte die PCR mit einer Zykluszahl von 30 bzw. 33. Bei einer Dauer von fünf Minuten pro Zyklus ist die Polymerasekettenreaktion nach 2,5 Stunden abgeschlossen.

Durch die Wiederholung der drei Reaktionen ergibt sich daraus eine exponentielle Zunahme der DNA-Fragmente. Nach 30 bzw. 33 Durchläufen wird das DNA-Molekül 2^{30} oder 2^{33} Mal amplifiziert.

Der Grundansatz à 30 µl setzt sich zusammen aus:

3 µl Puffer

0,2 µl Taq-Polymerase

0,2 µl dNTP

1 µl Primer I

1 µl Primer II

1 µl DNA

23,6 µl a. dest.

Je nach gewünschter Menge an Proben wurden im Zuge der Arbeit ein drei-, vier- und siebenfacher Ansatz benutzt [47], [22].

3.2.2.1.2 Plasmid-basierte DNA-Klonierung

Eine DNA-Sequenz wird mithilfe eines Restriktionsenzym ausge schnitten und in einen Vektor überführt. In dieser Form kann das Gen in Wirtszellen transformiert werden, wo es selektiert und beliebig vermehrt werden kann. Durch den Besitz eines für eine Antibiotikum-Resistenz kodierenden Gens ist eine Isolation der Rekombinanten möglich.

3.2.2.2 DNA-Gelelektrophorese mit Gel-Herstellung

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Charakterisierung, Auftrennung und Verfügbarmachung von DNA-Fragmenten.

Die Elektrophorese in einer festen Gelmatrix ermöglicht eine Unterscheidung von Nukleinsäuren anhand ihrer Größe. Durch die negative Ladung der Nukleinsäuren kann nach Anlegen einer elektrischen Spannung eine Auftrennung aufgrund unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten erreicht werden. Dabei wandern die Nukleinsäuren von der Kathode zur Anode. Die elektrische Mobilität zeigt sich umgekehrt proportional zur Größe des DNA-Fragments, lange Nukleinsäuremoleküle wandern deutlich langsamer durch das Gel in Richtung Anode als kurze Fragmente. Moleküle gleicher Größe sammeln sich in Banden und werden nach Abschluss der Elektrophorese sichtbar gemacht.

Im Zuge dieser Arbeit wurden 1 oder 2%ige Agarose-Gele verwendet. Diese prozentuale Zusammensetzung richtet sich nach der Größe der DNA-Fragmente, denn je geringer die Prozentzahl, desto größer sind die Poren im Maschenwerk und dadurch geeigneter für lange Fragmente. Kurze Fragmente benötigen dagegen ein hochprozentiges Gel.

Zur Visualisierung der Banden wurde der aromatische Farbstoff Ethidiumbromid zu dem Gel in einer Konzentration von 0,05 % hinzugegeben. Die räumliche Anordnung des Kations ermöglicht es ihm, sich in die DNA-Helix zu interkalieren. Der Farbstoff fluoresziert nach Anregung mit UV-Licht und emittiert Licht in einer Wellenlänge von 590 nm. Dank seiner zur DNA entgegengesetzten Wanderungsrichtung kann bereits während der Elektrophorese eine Färbung der Nukleinsäuren erzielt werden, was eine zeitliche Verfolgung der Auftrennung ermöglicht.

Zur Herstellung des Gels wird Agarose in TAE-Puffer erwärmt, bis eine klare Lösung entsteht. Nach Abkühlung und Zugabe von Ethidiumbromid wird das Gel in einen Gelträger gegossen. Ein in den Träger eingesetzter Kamm erzeugt die für das spätere Auftragen der Proben benötigten Aussparungen. Der Gelträger mit dem darin fest gewordenen Gel wird in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und mit TAE-Puffer überschichtet. Der Puffer gewährleistet den Stromfluss und dient zum Schutz des Gels vor Austrocknung und Überhitzung.

Die PCR-Produkte werden mit Blaumarker versetzt und nach Entfernen des Kamms mit einer Referenzprobe in je eine Tasche des Gels pipettiert.

Der Größenmarker ist ein Standardgemisch aus Nukleinsäurefragmenten mit bekannter Größe, was eine Längenabschätzung der zu trennenden DNA-Proben ermöglicht.

Die Elektrophorese erfolgt bei 80 V für 30 bis 45 Minuten.

3.2.2.3 Verdau

Das Verdau-Verfahren besitzt zwei Anwendungsgebiete. Um die DNA in das Vektorkonstrukt einzubauen, müssen sie zueinander komplementäre Schnittstellen besitzen. Dies gelingt mit einem Restriktionsverdau. Mithilfe von Restriktionsenzymen werden DNA und Vektor nach Erkennen bestimmter Sequenzen geschnitten, wobei die Schnittenden glatt (blunt) oder überlappend (sticky) sind. Dieser Vorgang ist ein wichtiges Werkzeug der Molekularbiologie und Voraussetzung für eine Ligation.

Des Weiteren dient der Verdau der Kontrolle einer erfolgreichen Insertion. Durch das Schneiden des Plasmids mit eingebautem Insert und anschließender PCR und Agarose-Gelelektrophorese kann anhand der Fragmentlänge detektiert werden, ob das Insert in korrekter Orientierung eingebaut wurde.

Ein Verdau wird stets nach folgendem 30 µl-Ansatz durchgeführt:

3 µl Puffer

1 µl Enzym I

1 µl Enzym II

2 µg DNA (Menge in µl richtet sich nach der Konzentration der DNA)

Der Rest wird mit destilliertem Wasser auf 30 µl aufgefüllt.

3.2.2.4 Ligation

Unter Ligation versteht man das Klonieren von DNA in einen Vektor. Im Zuge der Arbeit wurde die Ligation in drei verschiedene Vektoren durchgeführt.

Zu Beginn erfolgte die Ligation in den TOPO-TA-Vektor. Dann wurde in den IgG1-Vektor zwischenkloniert, bevor am Ende der Arbeit in den pSfi-Express-FLAG-Tag-Vektor ligiert wurde.

Für die Ligation in den IgG1-Vektor und den pSfi-Express-FLAG-Tag-Vektor muss als Vorbereitung ein Restriktionsverdau erfolgen. In der Ligation selbst werden die kompatiblen Enden von Vektor und Insert über ihre sticky ends unter Zunahme eines Ligase-Puffers und der T4-DNA-Ligase wieder miteinander verknüpft.

3.2.2.5 TOPO-TA-Vektor

Um mit der amplifizierten DNA weitere molekularbiologische Arbeitsschritte durchzuführen, wird die DNA in den TOPO-TA-Vektor (Abb. 4) zwischenkloniert. Durch die Template-unabhängige Transferaseeigenaktivität der DNA-taq-Polymerase werden am 3'-Ende des

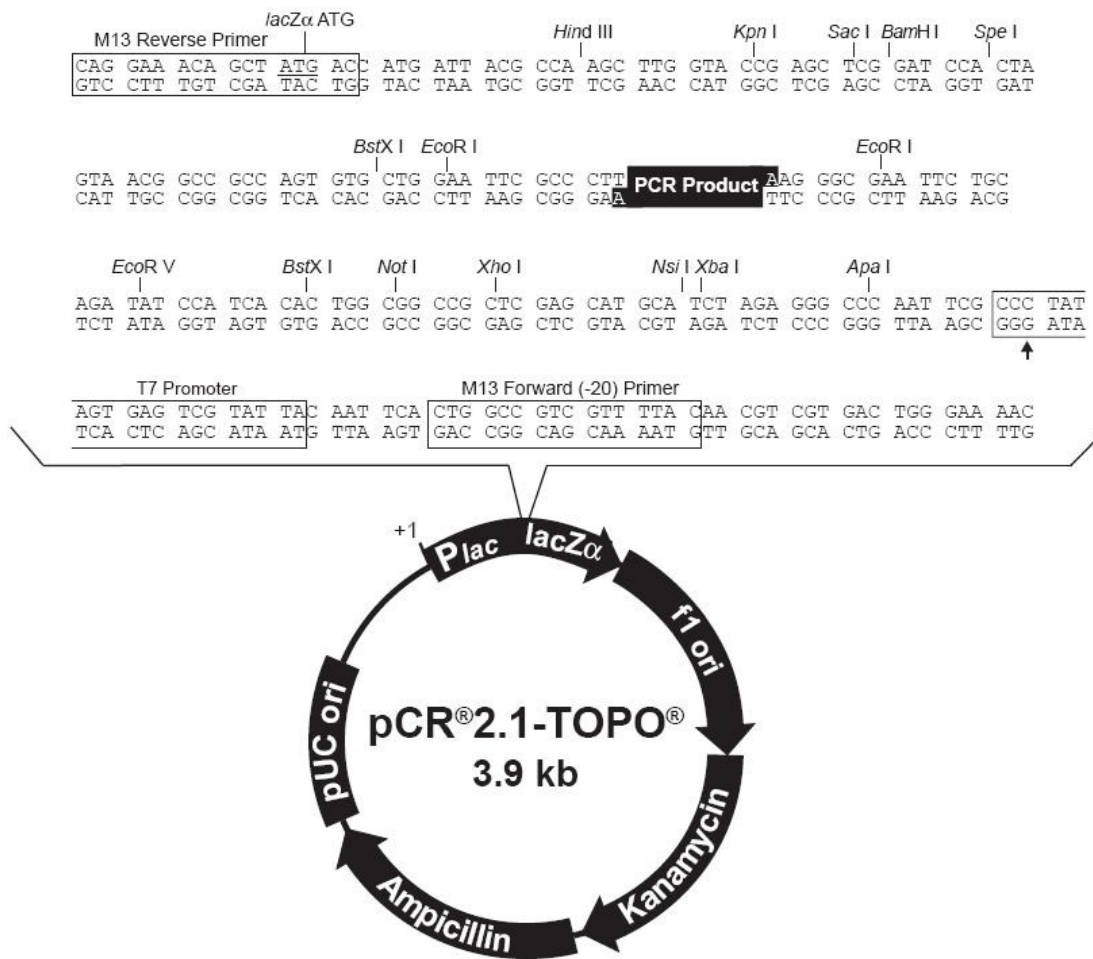
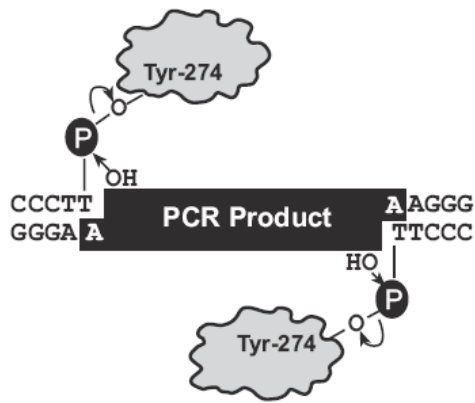
PCR-Produktes Desoxyadenosine angehängt. Der TOPO-TA-Vektor besitzt terminal Desoxythymidinüberhänge, sodass die Ligation ohne vorherigen Restriktionsenzymverdau unter Hinzunahme von 0,25 µl Ligationspuffer ablaufen kann. An den Vektor ist kovalent die vom Vaccinia Virus stammende Topoisomerase I gebunden. Diese bindet an die DNA und spaltet das Phosphodiesterase-Rückgrat nach einer 5'-CCCTT-Sequenz. Die dabei frei werdende Energie wird in der Bildung einer kovalenten Bindung zwischen dem 3'-Phosphatende des gespaltenen Stranges und einem Tyrosylrest (Tyr 274) der Topoisomerase I gespeichert. Diese Bindung wird sofort von der 5'-Hydroxylgruppe des ursprünglich gespaltenen Stranges angegriffen. Die Reaktion wird somit umgekehrt und die Topoisomerase ist wieder frei. Nach fünf Minuten ist die Ligation erfolgreich abgeschlossen [63], [74].

Mithilfe dieses Vektors wurden die Epitop-Sequenzen von LRPAP1 als zukünftige variable Regionen der Leicht- und Schwereketten und das IgG1-Template zusammengeführt und zum Schluss in den Expressionsvektor überführt.

Zunächst wurde die Epitop-Sequenz für V_H in den TA-Vektor kloniert, von nun ab als V_H TA bezeichnet. Anschließend wurden V_H TA und IgG1 TA (s. Kapitel 3.2.2.6 ‚IgG1-Vektor‘) nach einem Verdau zur Erzeugung passender Schnittstellen ligiert. Danach wurde die Epitop-Sequenz für V_L in den V_H IgG1 TA Klon inseriert (Abb. 5).

Das Ersetzen der Schwer- und Leichtkettengensequenz der variablen Regionen hat das Ziel, dass der produzierte Antikörper dort die Epitop-Region von LRPAP1 präsentiert und somit an die Rezeptoren der entarteten B-Lymphozyten bindet.

Das V_H V_L IgG1 TA-Konstrukt wurde zum Abschluss der Klonierungsschritte in den Expressionsvektor pSfi-Express-FLAG-Tag-Vektor überführt (s. Kapitel 3.2.2.7 ‚pSfi-Express-FLAG-Tag-Vektor‘).



Comments for pCR[®]2.1-TOPO[®]

3931 nucleotides

- LacZα fragment: bases 1-547
- M13 reverse priming site: bases 205-221
- Multiple cloning site: bases 234-357
- T7 promoter/priming site: bases 364-383
- M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
- f1 origin: bases 548-985
- Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
- Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
- pUC origin: bases 3136-3809

Abbildung 4: TOPO-TA-Vektor [74].

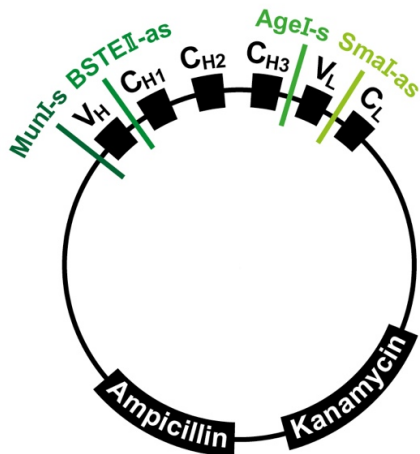


Abbildung 5: TOPO-TA-Vektor mit der eingefügten $V_H V_L$ IgG₁-Sequenz.

3.2.2.6 IgG₁-Vektor

Die IgG₁-Gensequenz wurde vom José Carreras Center für Immun- und Gentherapie des Universitätsklinikums des Saarland selbst konstruiert und mir, bereits im TOPO-TA-Vektor integriert, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Er besitzt Schnittstellen sowohl für das Schwer- als auch das Leichtkettengen, deren variable Regionen durch die Epitop-Sequenz von LRPAP1 ersetzt werden sollten.

Der IgG-Vektor besteht aus zwei identischen schweren sowie zwei identischen leichten Ketten und einer Furin + 2A-Sequenz (Abb. 6) [12]. Eine schwere Kette setzt sich zusammen aus drei konstanten Regionen $C_{H1} - C_{H3}$ und einer variablen Region V_H , eine leichte Kette setzt sich zusammen aus einer konstanten Region C_L und einer variablen Region V_L (Abb. 7). V_H und V_L wurden durch eine Sequenz des Proteins LRPAP1 ähnlicher Länge (AA263-350) ersetzt, die das MCL-reaktive Epitop (AA264-318) enthält.

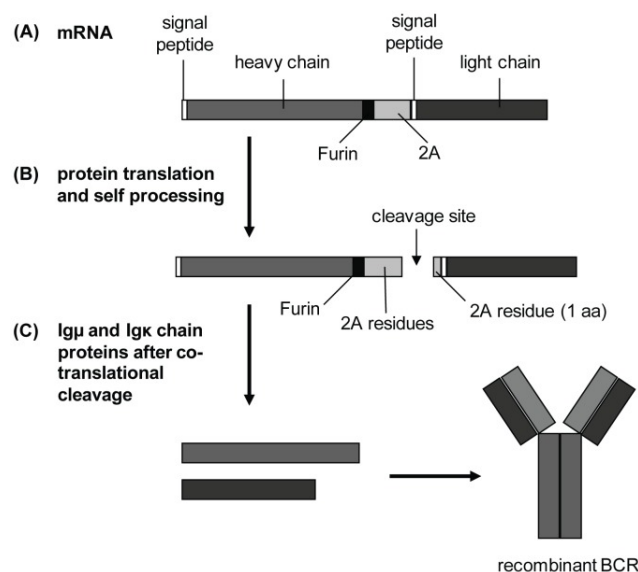


Abbildung 6: Schema des rekombinanten HEL-IgM-BZRs [12].

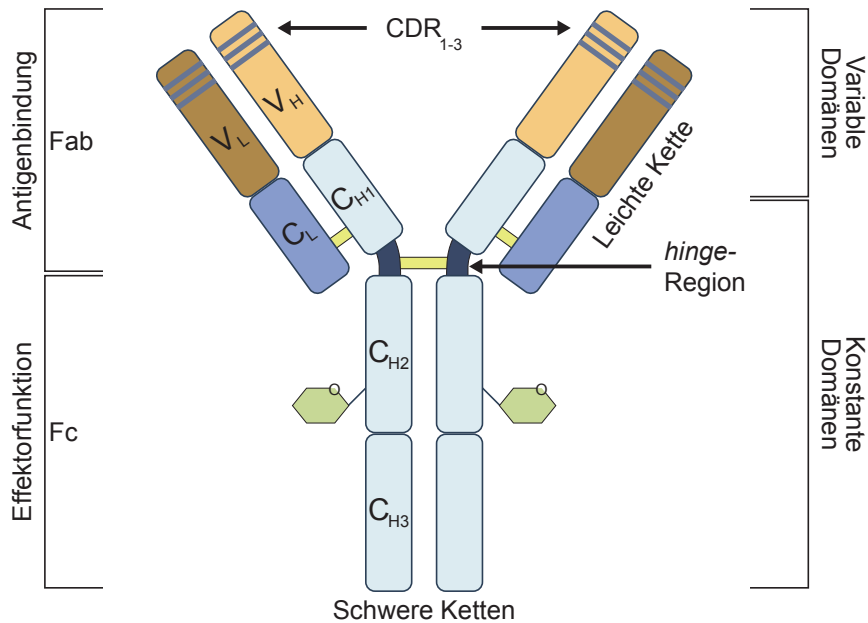


Abbildung 7: Struktur eines Antikörpers der IgG-Klasse [22].

Ablauf der Ligation in den IgG1-Vektor

Insert und Vektor müssen im Verhältnis 3:1 vorliegen, sodass sich danach die Insertmenge je nach Konzentration berechnen lässt. Mithilfe des Programms Ligation Calculator wurde dieses Verhältnis kalkuliert. Die Ligation ist innerhalb von drei Stunden abgeschlossen. Das Programm ist online verfügbar und unter folgendem Link abrufbar:

http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html

3.2.2.7 pSfi-Express-FLAG-Tag-Vektor

Dieser Vektor (Abb. 8) ist ein Expressionsvektor und wird zur Herstellung des LRPAP1-IgG1-Produkts durch HEK-Zellen genutzt. Das Flag-Peptid befindet sich an der Oberfläche des exprimierten Moleküls, sodass dieses leicht von einem Anti-Flag-Antikörper detektiert werden kann. Dies wird beim Western Blot und der Aufreinigung ausgenutzt. Des Weiteren besitzt das Flag-Peptid eine kleine Größe, wodurch es unwahrscheinlich ist, dass es andere Epitope oder Domänen verdeckt oder Funktionen, die Sekretion oder den Transport des Antikörper-Moleküls verändert.

Bei der Insertion von LRPAP1 263-350 $V_H V_L$ IgG1 TA in diesen Vektor wurde der TA-Vektor entfernt.

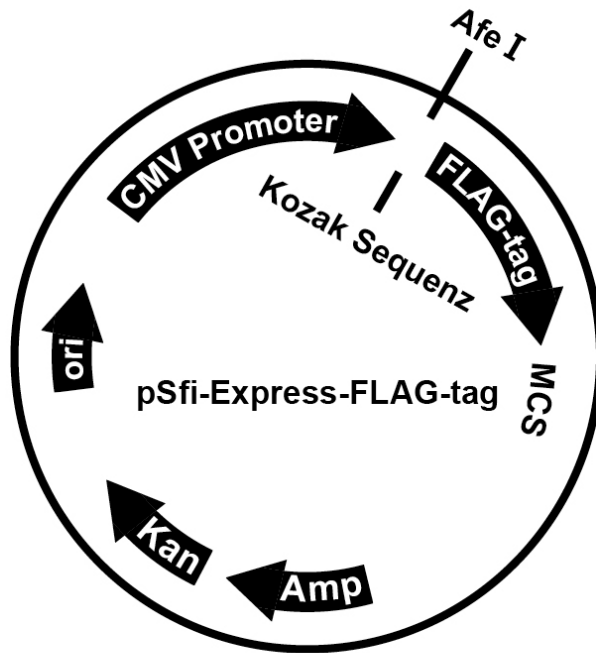


Abbildung 8: pSfi-Express-FLAG-Tag-Vektor. Amp-Ampicillin; MCS-Multiple Cloning Site; ori-origin of replication.

3.2.2.8 Transformation

Bei der Transformation wird ein Vektor in ein Bakterium aufgenommen. Zum Einsatz kam der apathogene *E. coli* Bakterienstamm K12 DH5 α . Zu 1,5 μ l Ligationsprodukt werden 95 μ l der Bakterienlösung gegeben und für 30 Minuten auf Eis zur Reaktion gekühlt. Dann folgt für 30 Sekunden ein Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad und danach wieder eine Abkühlung für fünf Minuten auf Eis. Zum Schluss werden zu der Probe 200 μ l SOC-Medium hinzu pipettiert. Das Ganze wird in ein Bakterienkulturröhrchen überführt und für eine Stunde schüttelnd bei 37 °C inkubiert.

3.2.2.9 Selektive Vermehrung der transformierten Bakterien

Nach der Transformation wurden die Bakterien auf einer Ampicillin- oder Canamycin-haltigen Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Auf dem Plasmid befindet sich ein Resistenzgen gegen je eines dieser Antibiotika, sodass die Bakterien erst nach Aufnahme des Plasmids auf dem Agar wachsen können. Diese Selektion gewährleistet eine Vermehrung nur der Bakterien mit erfolgreicher Transformation.

3.2.2.10 Plasmid-Aufreinigung

Zur Plasmid-Gewinnung wurde das NucleoSpin Plasmid Kit von Machery-Nagel verwendet und entsprechend dem beiliegenden Protokoll durchgeführt.

3.2.2.11 Funktionsweise des Photometers

Zur Bestimmung der Konzentration der DNA und des aufgereinigten Antikörpers wurde ein Photometer verwendet. Zur Messung der Konzentration der DNA wurden nach der Kalibrierung des Geräts mit 2 µl a. dest. 2 µl der Probe aufgetragen. Die Adsorption wurde bei der Wellenlänge 260 nm gemessen. Eine weitere Messung erfolgte bei 280 nm, da der Quotient dieser beiden Wellenlängen (260/280) eine Abschätzung der Reinheit ermöglicht.

Bei der Bestimmung der Konzentration des LRPAP1-Proteins wurde das Gerät zunächst mit 100 µl PBS kalibriert, anschließend erfolgte die Messung der 100 µl Probe bei einer Wellenlänge von 280 nm.

3.2.2.12 Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde eine 4 µl DNA-Probe in das SEQ-IT GmbH&Co.KG Labor in Kaiserslautern geschickt. Die Auswertung erfolgte laborintern mit dem Computerprogramm Chromas.

3.2.2.13 DNA-Gewinnung aus Gel

Hierfür wurde das Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit von Zymo Research verwendet und nach dem beiliegenden Protokoll durchgeführt.

3.2.2.14 Vorbereitung der HEK 293 T-Zellen

HEK 293 T-Zellen sind menschliche embryonale Zellen, die dank komplikationsarmer Kultur und Transfektion ein beliebtes Werkzeug zur Expression von Proteinen sind.

Die Zellen wurden in RPMI-Medium aufgetaut und anschließend in einer Dichte von maximal 1×10^6 Zellen pro Well einer Zellkulturplatte ausgesät. Zum Ernten der Zellen wurden sie in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und für drei Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Für sechs Ansätze wurden in jede Kavität einer 6-Well-Kulturplatte 2 ml des RPMI-Nährmediums gegeben und 100 µl der Zellen aus dem Pellet überführt. Die Kultur wurde für mehrere Tage bei 37 °C inkubiert.

3.2.2.15 Transfektion der DNA in die HEK 293 T-Zellen

Transfektion bedeutet das Übertragen der DNA in Zellen. In jedes Well der 6-Well-Platte mit den vorbereiteten HEK 293 T-Zellen wurden 100 µl RPMI-Nährmedium und 3 µl Extreme Gene Reagenz hinzugefügt. Die Reaktionszeit beträgt 10 bis 15 Minuten. Anschließend wurden zu fünf Ansätzen je 1 µg DNA gegeben und nach vorsichtigem Schwenken bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Daraus ergaben sich sechs Zell-Ansätze.

Zur Überprüfung, ob die Zellen in der Lage sind DNA aufzunehmen, wurden in den 6. Zell-Ansatz 2 µl GFP gegeben. Wird die GFP-Vektor-DNA von den Zellen aufgenommen, wird das fluoreszierende Protein produziert und leuchtet grün nach optischer Anregung unter einem Fluoreszenzmikroskop.

3.2.2.16 Protein-Gelelektrophorese und Gel-Herstellung für Western Blots

Zur Vorbereitung eines Western Blots wird eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülmasse durchgeführt. Das verwendete 10%ige SDS-Page-Gel ist ein aus einem Trenn- und Sammelgel zusammengesetztes Polyacrylamidgel.

Die prozentuale Zusammensetzung der Gele richtet sich nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente. Je höher die Prozentzahl, desto kleiner sind die Poren in der Gelmatrix. Kurze Fragmente benötigen demnach ein hochprozentiges Gel, für lange Fragmente sind niedrigprozentige Gele geeignet.

SDS ist ein negativ geladenes Detergens und verursacht eine Denaturierung der Proteine. Pro Peptidbindung kann sich mindestens ein SDS-Molekül anlagern. Somit bestimmen die negativen Ladungen des SDS in ihrer hohen Anzahl im Wesentlichen die Gesamtladung der entstehenden SDS-Protein-Komplexe. Diese wandern im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode, die Geschwindigkeit hängt hierbei von ihrer Größe ab und ist in etwa proportional zu ihrer Masse.

Zur Herstellung des SDS-Page-Gels wird zunächst das Trenngel zwischen zwei Glasplatten mit Spacer gegeben. Die Auftrennung erfolgt vertikal. Wenn das Trenngel ausgehärtet ist, wird das Sammelgel als oberste Schicht hinzugefügt. Zur Erzeugung von Geltaschen wird ein Kamm eingesetzt. Die Gelkammer wird mit dem Gel in eine Elektrophoresekammer eingesetzt und mit Lämmli-Puffer überschichtet.

Nach vollständigem Aushärten und Entfernen des Kamms werden in die erste Tasche ein Größenmarker und in die weiteren Taschen die Proben pipettiert. Diese Referenzprobe enthält Proteine mit bekannter Molekülmasse, was eine Größenabschätzung der Proben ermöglicht. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung von 200 V für 40 Minuten werden die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt.

Nun erfolgt mit dem Gel entweder ein Western Blot oder eine Färbung mit Coomassie-Blau zur Markierung der Banden.

3.2.2.17 Western Blot

Der Western Blot ist ein Standardverfahren zum Nachweis von Proteinen. Die Vorteile ergeben sich aus seiner einfachen Herstellung und der hohen Empfindlichkeit und Spezifität durch die Verwendung von Antikörpern.

Der Nachweis des Proteins erfolgt durch zwei spezifische Antikörper. Hierbei wird die Flag-Region des Protein-Antikörper-Konstruktes genutzt, an die ein erster Antikörper bindet. An diesen Antikörper bindet ein weiterer Antikörper, der Anti-Maus-Peroxidase-Antikörper. Mittels enzymatischer Reaktion durch die Peroxidase kann das Protein so detektiert werden.

Zur Vorbereitung des Blots wird eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe durchgeführt. Verwendet wurde stets ein 10%iges SDS-Page-Gel.

Im nächsten Schritt, dem eigentlichen Blot, werden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Transmembran übertragen. Die Membran besteht aus PVDF, Polyvinylidenfluorid, im Gegensatz zu der sonst herkömmlich verwendeten Nitrocellulose. Der Vorteil von PVDF liegt in der höheren Stabilität, der Wiederverwendbarkeit und der kürzeren Detektionszeit ohne Spezifitäts- und Sensitivitätsverluste [25].

Zunächst muss die Membran vorbereitet werden, indem sie in Methanol eingelegt wird, bis sie sich vollgesogen hat. Anschließend wird der Transferpuffer hinzugegeben. Dies ermöglicht, dass die Membran überhaupt in der Lage ist, sich mit dem Transferpuffer zu verbinden und die Proteine aufzunehmen. Auf die so präparierte Membran wird das Gel gelegt, zusammen sind sie von jeweils drei Filterpapieren in der Größe der Membran und des Gels, die mit der gleichen Methanol-Transferpuffer-Mischung vorbehandelt wurden, umgeben.

Der Elektroblot (= Abklatsch) erfolgt nun bei 24 V und 480 mA für eine Dauer von 30 bis 40 Minuten. Durch Erzeugung eines elektrischen Feldes werden die Proteine von dem Gel auf die Membran übertragen, das Muster der Auftrennung durch die Elektrophorese bleibt dabei

erhalten. Danach wird eine Blockierung freier Proteinbindungsstellen der nicht nachzuweisenden Proteine auf der Membran mit einer 10%igen Magermilchpulverflüssigkeit bei 4 °C über Nacht auf dem Schüttler durchgeführt. Dies verhindert eine unspezifische Bindung von Antikörpern.

Am nächsten Tag erfolgt das Entfernen der Milchpulverflüssigkeit und das mehrmalige Waschen der Membran mit dem PBS-Waschpuffer. Ein vollständiges Entfernen von SDS ist notwendig, da dieses eine korrekte Faltung der Proteine unterdrückt und dadurch eine Bindung des Antikörpers behindert. Nun erfolgt die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper. Dieser bindet an die Flag-Region des nachzuweisenden Antikörper-Konstruktes. Die Membran wird hierfür in Waschpuffer gelegt, zu dem im Verhältnis 1:2500 der Anti-Flag-Antikörper hinzugegeben wird.

Die Inkubation benötigt 45 Minuten auf dem Schüttler.

Nach Ablauf der Zeit wird das Antikörper-Waschpuffer-Gemisch entfernt und die Membran mehrmals mit Waschpuffer gewaschen. Hierbei wird der unspezifische, nicht fest gebundene Antikörper beseitigt.

Im nächsten Schritt wird ein weiterer Antikörper hinzugegeben. Dieser bindet an den Fc-Teil des primären Antikörpers. An diesen sekundären Antikörper, den Goat Anti-Mouse IgG, ist eine Peroxidase gekoppelt. Der besondere Nutzen dieses sekundären Antikörpers liegt darin, dass mehrere davon an den primären Antikörper binden können, was zu einer Signalverstärkung führt. Für die Inkubation wird die Membran wieder in Waschpuffer mit dem zweiten Antikörper im Verhältnis von 1:3000 für 45 Minuten auf dem Schüttler behandelt.

Anschließend wird die Membran erneut unter Schwenken mehrmals mit TBS-Puffer gewaschen. Zum Nachweis der Banden wird das Entwicklerkit Western Blot von Cell Signaling Technology verwendet. Die hierdurch herbeigeführte enzymatische Reaktion der Peroxidase erzeugt eine Chemilumineszenz, die auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht wird [22].

3.2.2.18 Resuspension der Zellen

Beim Vorgang der Resuspension wird der ausgewählte Klon in ein größeres Gefäß überführt. Eine bestimmte Menge des mit dem Antibiotikum G418 versetzten RPMI-Mediums wird in eine Kulturflasche gefüllt. Die Menge richtet sich nach der Größe der Flasche. Im Laufe der Arbeit wurden drei verschieden große Kulturflaschen verwendet. In die kleinste Kulturflasche (40ml) werden 5 ml Medium, in die mittlere (160ml) 15 ml Medium und in die größte Flasche (400ml) werden 50 ml Medium gegeben.

Um die Zellen von der Kulturplatte in eine Flasche zu überführen, werden sie durch mehrmaliges Spülen vom Boden der Kulturplatte gelöst und das Medium mit den darin enthaltenen Zellen wird in die Flasche umgefüllt.

Für einen Wechsel in eine größere Flasche wird diese zum Lösen der Zellen vom Boden gegen die Hand geklopft. Der Inhalt wird in die bereits mit frischem RPMI-Medium versetzte Flasche überführt. Die Flasche wird dann bei 37 °C aufbewahrt. Wenn der Boden zu über 50 % mit Zellen bedeckt ist, erfolgt eine Expansion in die nächstgrößere Kulturflasche.

3.2.2.19 Wechsel des Mediums

Ein Wechsel des Mediums erfolgt, wenn noch nicht genügend Zellen für eine Resuspension gewachsen sind und die vorhandenen Zellen neue Nährstoffe benötigen. Nach vorsichtigem Abkippen des alten Mediums mit den toten Zellen wird die Kulturflasche mit derselben Menge an RPMI-Medium aufgefüllt und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

3.2.2.20 Sammeln des Überstands

Der Inhalt der Kulturflasche, bestehend aus lebenden und toten Zellen sowie RPMI-Medium, wird in Zentrifugenröhrchen überführt. Davon werden 5 ml und zusätzlich 50 ml frisches RPMI-Medium zur Fortführung der Kultur in eine neue Kulturflasche gegeben und weiter bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Röhrchen für drei Minuten bei 2500 rpm zentrifugiert. Der Überstand aus den Tubes wird dann in ein Sammelgefäß gegeben und bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.2.21 Sterilfiltration des Überstands

Unter Sterilfiltration versteht man das Konzentrieren des Überstands. Durchgeführt wird dies mit dem Filtropour Vacuum Filter mit einer Filtergröße von 2 µm. Die filtrierte Menge wird anschließend durch Einsatz einer neuen Membran mit einer Filtergröße von 30 kDa erneut gefiltert, der durchfließende Überstand wird im Anschluss verworfen. Der gewonnene Antikörper wird bis zur Verwendung bei -20 °C tiefgefroren.

3.2.2.22 Reinigen des Überstands

Voraussetzung ist die unter Kapitel 3.2.2.21 beschriebene Konzentrierung des Überstands. Für die Reinigung des Überstands werden 250 µl eines Matrixgemisches mit einem die Flag-Region erkennenden Antikörper in ein Eppendorf-Gefäß gegeben. Dann wird 1 ml PBS

zugegeben mit sich anschließender Zentrifugation für 30 Sekunden bei 10.000 rpm und Entfernen des Überstands. Dieser Waschschrift wird insgesamt drei Mal durchgeführt. Nachdem der Überstand zum letzten Mal abgekippt wurde, wird der Inhalt des Eppendorf-Gefäßes zum konzentrierten Überstand gegeben. Das Tube wird über Nacht auf einer Rollplatte bei 4 °C aufbewahrt.

Am nächsten Tag wird das Tube von der Rollplatte genommen und fünf Minuten bei 2500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Pellet in ein 15 ml Tube überführt. In dieses Pellet erfolgt eine Zugabe von 10 ml PBS und Zentrifugation für fünf Minuten bei 2500 rpm. Nach Abkippen des Überstands wird dieser Reinigungsschritt noch zwei Mal durchgeführt. Das Pellet wird in ein Eppendorf-Gefäß überführt und einem drei Mal durchgeführten Waschvorgang unterzogen. Die Reinigung erfolgt mit 1 ml PBS und 30-sekündiger Zentrifugation bei 10.000 rpm. Das aufgereinigte Pellet setzt sich zusammen aus dem Anti-Flag-Antikörper und dem gebundenen LRPAP1-Protein. Durch die Zugabe von 250 µl Glycin wird der pH auf 3 gesenkt und die Bindung wird gelöst. Die hierfür benötigte Reaktionszeit beträgt zwei bis drei Minuten. In der Zwischenzeit werden in ein zweites Eppendorf-Gefäß 25 µl von dem Elutionspuffer Natrium-Hydrogenphosphat gegeben, Glycin und Puffer sollen in einem Verhältnis von 1:10 stehen.

Der Elutionspuffer sorgt für eine Anhebung des pH auf 7. Anschließend wird ein Loch in den Deckel des zweiten Eppendorf-Gefäßes gebohrt und eine Dialysemembran zwischen Deckel und Gefäß eingespannt. Das Eppendorf-Gefäß wird kopfüber in ein großes Gefäß, das PBS enthält, hineingelegt. Das Glycin wird auf diese Weise herausgewaschen und man erhält den aufgereinigten Antikörper. Der Ablauf erfolgt über Nacht bei 4 °C.

Am nächsten Tag wird das Eppendorf-Gefäß aus dem Gefäß herausgenommen und der Inhalt wird in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und bei -20 °C tiefgefroren.

3.2.2.23 Coomassie-Färbung

Coomassie-Blau ist ein Farbstoff zum Anfärben von Proteinen. Eine Färbung mit diesem Farbstoff zeigt den Grad der Reinheit des aufgereinigten Konzentrats. Es dient der Kontrolle, ob die Aufreinigung erfolgreich war oder ob noch andere Proteine wie Zellreste und -organellen in dem Konzentrat enthalten sind.

Zur Vorbereitung der Färbung wird eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit einem 10%igen SDS-Page-Gel zur Auftrennung der Proteine durchgeführt. Die Elektrophorese läuft bei 200 V ab und benötigt 40 Minuten.

Das Gel wird in eine Petrischale, die circa 50 ml Coomassie-Farbstoff enthält, hineingelegt. Zu beachten gilt, dass das Gel von dem Farbstoff bedeckt sein muss. Für eine ausreichende Markierung der Proteinbanden benötigt die Farbreaktion 30 Minuten. Nach Wegkippen der Farbe wird eine Entfärber-Lösung hinzugegeben. Die Entfärbung läuft über Nacht auf dem Schüttler unter leichtem Schwenken ab.

Am nächsten Tag wird die Entfärber-Lösung entfernt und das Gel auf einem festeren Stück Papier auf eine Trockenmaschine gelegt und durch die Erzeugung von Vakuum und Hitze auf das Papier gepresst.

3.2.2.24 Durchflusszytometrie

Mithilfe der Durchflusszytometrie können Einzelzellen in Suspension auf der Grundlage von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften analysiert werden.

Aufgrund einer hohen Analysegeschwindigkeit und Empfindlichkeit sowie einer objektiven Quantifizierung ist die Durchflusszytometrie ein wichtiges diagnostisches Hilfsmittel. Das Vorliegen der zu untersuchenden Probe als Einzelzellsuspension wird vorausgesetzt. Durch das Messen der Streulicht- und Fluoreszenzparameter werden Rückschlüsse auf Zellgranularität und -größe ermöglicht. Unter Lichtstreuung ist der Richtungswechsel des Lichts durch die Zelle zu verstehen, wenn diese mit Licht einer bestimmten Wellenlänge bestrahlt wird. Die Wellenlänge wird durch die Interaktion nicht verändert. Zellgröße, Struktur der Zellmembran und intrazelluläre Bestandteile nehmen Einfluss auf die Lichtstreuung. Als Streulichtparameter unterscheidet man das Vorwärtstreulicht (FSC), das Aufschluss über die Zellgröße gibt, von dem Seitenstreulicht (SSC), welches Informationen über die Zellgranularität und -komplexität liefert. Als Fluoreszenz bezeichnet man die Emission von Licht, nachdem ein Partikel mit Licht angeregt wurde. Die Energie des emittierten Lichts ist dabei niedriger als die des anregenden Lichts. Bei der Absorption der Lichtenergie in einem für den Partikel bestimmten Wellenlängenbereich, dem Absorptionsspektrum, werden die Elektronen auf ein höheres Energieniveau angehoben. Beim Zurückfallen auf das Energiegrundniveau wird Energie in Form von Fluoreszenz frei. Mit Hilfe dieser Fluoreszenzparameter können Subpopulationen sowie deren Zellstrukturen und Funktionen dargestellt werden.

Bei dem Verfahren werden zunächst die einzelnen Zellen aus dem Probenröhrchen durch einen Flüssigkeitsstrahl angesaugt. Dann wird jede fluoreszenzmarkierte Zelle mit einem Laser beschossen und das von ihr emittierte Licht mithilfe von Photovervielfältigerröhren am Analysepunkt in elektronische Signale umgewandelt und gespeichert (Abb. 9). Filter gewährleisten eine Spezifität eines jeden Detektors für einen bestimmten

Wellenlängenbereich. Die Impulshöhen, -flächen und -weiten werden detektiert, anschließend digitalisiert und die Messdaten mit Hilfe eines Computerprogramms für die Korrelation und quantitative Auswertung zugänglich gemacht.

Durchflusszytometrische Versuche wurden an dem BD FACSCanto™ Durchflusszytometer durchgeführt. Die sekundären Anti-Flag-Antikörper zum Nachweis des BAR-body sind an APC (Allophycocyanin) gekoppelt. Über den roten Laser des Canto erfolgte eine Anregung von APC, sodass im Anschluss emittiertes Licht (660 nm) von Zellen gemessen werden, die LRPAP1 BAR-body gebunden haben. Für eine Messung wurden 5000 Zellen analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem Programm Facs Overlay FCSalyzer 09.16- α [27].

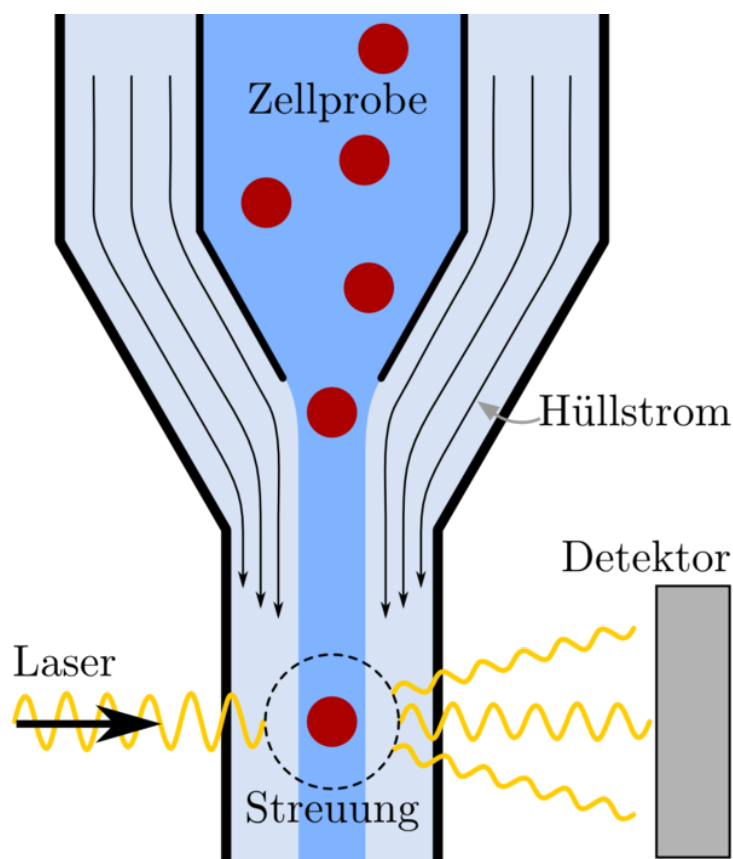


Abbildung 9: Schema zum Ablauf der Durchflusszytometrie [56].

3.2.2.25 Isolierung und Aufreinigung von PBMCs

Unter dem Begriff PBMC ‚Peripheral Blood Mononuclear Cell‘ werden Zellen mit einem runden Zellkern wie Monozyten, Lymphozyten und Makrophagen zusammengefasst. PBMCs sind notwendig für den LDH-Cytotox-Release-Assay (s. Kapitel 3.2.2.28).

Zur Gewinnung dieser Zellen werden zwei EDTA-Röhrchen Eigenblut abgenommen. In zwei Zentrifugenröhrchen werden jeweils 5 ml einer Ficollösung pipettiert. Mithilfe dieser Lösung

gelingt eine physikalische Trennung auf der Grundlage unterschiedlicher physikalischer Eigenschaften wie Größe und Gewicht, wodurch Zellen isoliert werden können. Dieses Substrat ist ein Polymer aus Sucrose mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 400 kDa und einer Dichte von 1,077 g/ml. Zu den Zentrifugenröhrchen wird Blut im Verhältnis 1:1 langsam und vorsichtig durch Schräghalten des Tubes aufgeschichtet. Nach kurzer Zeit setzen sich die Erythrozyten am Boden des Röhrchens ab. Anschließend werden die Tubes bei Raumtemperatur für 30 Minuten bei 400 G zentrifugiert. Nach Ablauf der Zentrifugation liegt eine Schichtung des Inhalts nach folgendem Schema von oben nach unten vor (Abb. 10):

- Plasma
- Ring aus den PBMCs
- Trennlösung
- Granulozyten
- Erythrozyten

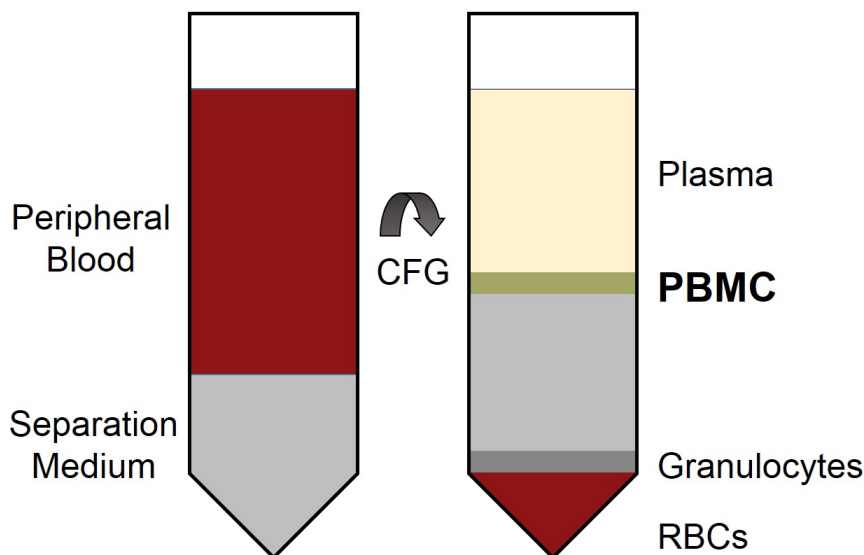


Abbildung 10: Auftrennung des Blutes nach Behandlung mit einer Trennlösung [15]. CFG-Zentrifugation; RBCs-Red Blood Cells.

Der Ring aus PBMCs wird aus beiden Tubes abpipettiert und zusammen in ein 15 ml Falcon überführt, welches mit PBS auf 15 ml aufgefüllt wird. Anschließend werden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen. Hierfür werden sie bei jedem Waschvorgang bei 1500 rpm für vier Minuten bei 9 °C zentrifugiert und der Überstand wird entfernt.

In ein Well einer Zellkulturplatte werden 2 ml RPMI-Medium, 1%iges fetales Kälberserum und die PBMCs gegeben und bei 37 °C kultiviert.

3.2.2.26 Zellzahlbestimmung in der Neubauer-Zählkammer

Die Zählung der Zellen erfolgt in der Neubauer-Kammer. 100 µl Zell-Suspension werden 1:1 mit 100 µl Trypanblau versetzt und bei zehnfacher Vergrößerung ausgezählt. Der Farbstoff färbt rasch die toten Zellen, wohingegen die lebenden Zellen die Farbe erst nach wenigen Minuten aufnehmen. Mithilfe dieser Unterscheidung können die lebenden Zellen ausgezählt werden. Die Zählung erfolgt in zwei Quadranten. Zur Berechnung der Zellzahl pro Milliliter wird folgende Formel verwendet:

$$N \times V \times 10^4$$

N= Zahl der gezählten Zellen in zwei Quadranten

V= Verdünnungsfaktor 10

Der Faktor 10 für die Verdünnung ergibt sich daraus, dass zu 10 µl Zellsuspension 90 µl PBS gegeben werden.

3.2.2.27 LDH-Cytotox-Release-Assay

Das LDH-Cytotox-Release-Assay ist ein präzises, schnelles und einfaches kolorimetrisches Verfahren zur Quantifizierung der Zytotoxizität durch das Messen der LDH-Aktivität von beschädigten Zellen.

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein stabiles zytoplasmatisches Enzym, welches in allen Zellen vorhanden ist. Es wird rasch in den Zellkulturüberstand freigesetzt, wenn die Plasmamembran beschädigt wird. Verwendet wurde das Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH) von Roche. Der zellfreie Kultur-Überstand wird gesammelt und mit dem Reaktionsmix inkubiert. Die LDH-Aktivität wird in einem enzymatischen Test bestimmt (Abb. 11). Im ersten Schritt wird NAD⁺ durch die LDH-katalysierte Konversion von Laktat zu Pyruvat zu NADH/H⁺ reduziert. Im zweiten Schritt transferiert der Katalysator Diaphorase H/H⁺ von NADH/H⁺ zu dem Tetrazoliumsalz INT, welches dabei zu Formazan reduziert wird.

Ein Anstieg der Menge von toten oder Plasmamembran-beschädigten Zellen resultiert in einem Anstieg der LDH-Aktivität im Kultur-Überstand. Dieser Anstieg der Enzymaktivität korreliert direkt mit der Menge an gebildetem Formazan während einer zeitlich limitierten Periode. Die Intensität des Farbumschlags von gelb zu rot ist proportional zu der Anzahl an lysierten Zellen [4].

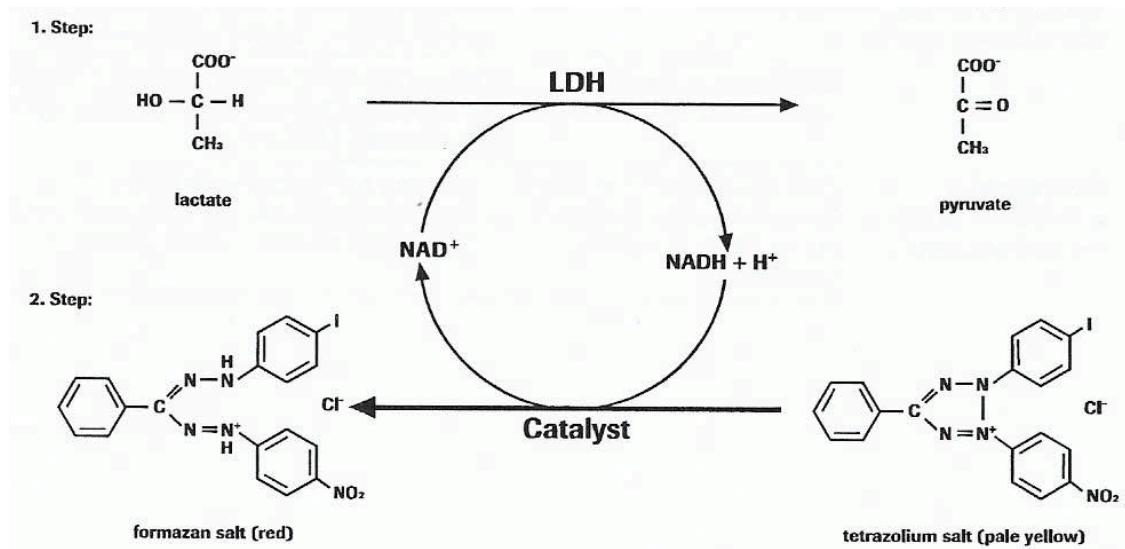


Abbildung 11: Reaktionsschritte des LDH-Cytotox-Release-Assays [4].

Die Messung des LDH-Ausstoßes erfolgt mittels Spektrometrie, zur Quantifizierung wurde das Programm Wallac 1420 Manager benutzt.

Zur Berechnung der Toxizität wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Cytotoxicity (\%)} = \frac{\text{exp. value} - \text{low control}}{\text{high control} - \text{low control}} \times 100$$

4. Ergebnisse

4.1 Überblick

Die zu Beginn durchgeführten Klonierungsschritte liefen nach folgendem Schema ab. Die DNA des LRPAP1 Epitops in der entsprechenden Länge des Schwer- und Leichtkettengens wurde in einen Vektor ligiert, der im nächsten Schritt in einen apathogenen E. coli-Bakterienstamm transformiert wurde. Anschließend wurde eine Plattierung auf eine Antibiotikum-haltige Agar-Platte zur Selektion und Erzeugung von klonalen Kolonien durchgeführt. Es folgte eine PCR zur Insertionskontrolle. Mithilfe einer Agarose-Gelelektrophorese wurden die Plasmide mit erfolgreicher Ligation von leeren Plasmiden unterschieden. Nach Vermehrung der Klone, bei denen die Ligation erfolgreich war, wurde eine Plasmid-Aufreinigung durchgeführt und mittels Photometer die DNA-Konzentration bestimmt.

Wie im dritten Kapitel beschrieben, mussten für die Ligation in den TOPO-TA-Vektor keine weiteren Vorbereitungen getroffen werden, für eine Ligation in alle anderen Vektoren musste jedoch ein Restriktionsverdau zur Erzeugung komplementärer Schnittstellen durch den Einsatz von Restriktionsenzymen erfolgen.

In den darauffolgenden Schritten war es das Ziel, eine Produktion des BAR-body zu erreichen. Nach der Transfektion des fertigen Produktionsvektors in HEK 293 T-Zellen wurde ein Western Blot als Erfolgskontrolle zum Produktionsnachweis durchgeführt. Die weiteren Schritte dienten der Expansion und Selektionierung der Zellen. Nach einer Aufreinigung des gesammelten Überstands wurde ein weiterer Western Blot und eine Coomassie-Färbung zur erneuten Kontrolle einer erfolgreichen Expression des Antikörpers durchgeführt. Eine Durchflusszytometrie gab Aufschluss über die Bindungsspezifität des Antikörpers zu seiner Zielzelle. Zum Abschluss wurde die Wirkung auf MCL-Zelllinien mithilfe eines LDH-Cytotox-Release-Assays ermittelt.

4.2 PCR zur Klonierung der Epitop-Region

Ein die DNA-Sequenz von LRPAP1 enthaltender Vektor wurde mir freundlicherweise vom José Carreras Center für Immun- und Gentherapie zur Verfügung gestellt. Dieser wurde initial als Vorlage genutzt, um die BZR-bindende Epitop-Region von LRPAP1 zu klonieren. Die hierfür notwendige PCR wurde mit den Primern MunI-s und BSTEII-as für V_H und Agel-s sowie

Smal-as für V_L durchgeführt. Die anschließend erfolgte Agarose-Gelelektrophorese zeigt die Banden für V_H und V_L bei der zu erwartenden Größe von 261 bp (Abb. 12). Die Bezeichnung V_H und V_L für die Epitop-Sequenz beruht auf der geplanten Insertion an die Stelle der variablen Regionen der Schwer- und Leichtkette (V_H und V_L) eines IgG-Antikörpers. Die variablen Regionen wurden durch eine Sequenz des Proteins LRPAP1, bestehend aus 87 Aminosäuren, ersetzt.

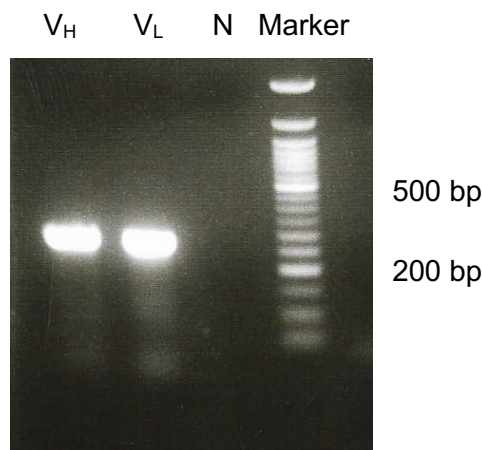


Abbildung 12: PCR zur Gewinnung der Epitop-Sequenz. Die Gelelektrophorese zeigt die erfolgreiche PCR mit 30 Zyklen bei 55 °C für das Schwer- und Leichtkettengen. Verwendet wurde ein 2%iges Agarose-Gel mit 50 bp DNA-Marker. N-Negativprobe.

4.3 PCR zur Insertionskontrolle

Durch PCR-Kontrollen konnte bestätigt werden, dass die Schwer- und Leichtkettengene korrekt in die Vektoren ligiert wurden. Für die Kontroll-PCRs wurden spezifische Primer verwendet, die zu PCR-Fragmenten unterschiedlicher Länge führten, je nachdem welche Inserts in ihrem jeweiligen Vektor nachgewiesen werden sollten.

4.3.1 Insertionskontrolle in den TOPO-TA-Vektor

Mittels PCR konnte die Insertion des Schwer- und Leichtkettengens in den TOPO-TA-Vektor nachgewiesen werden. Die Proben 1 bis 9 zeigen die Insertion der LRPAP1 Epitop-Sequenz, die die variable Region der Schwerekette ersetzen soll (Abb. 13); die Proben 10 bis 18 die Insertion der LRPAP1 Epitop-Sequenz mit den passenden Schnittstellen für eine Insertion an die Stelle der variablen Region der Leichtkette (Abb. 14).

Hierfür wurden die Primer M 13 rev und M 13 for verwendet. Für die Klone 2, 3, 5, 6, 13, 14, 15 und 17 konnte mit dem Nachweis einer DNA-Bande von etwa 400 bp im Agarose-Gel eine erfolgreiche Integrierung der LRPAP1 Epitop-Sequenzen in den TOPO-TA-Vektor nachgewiesen werden (Abb. 13 und 14).

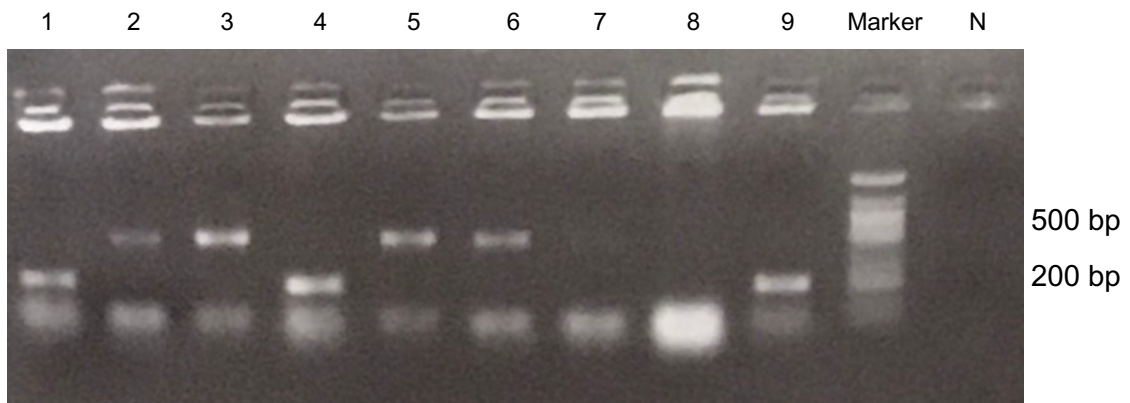


Abbildung 13: PCR-Insertionskontrolle von LRPAP1 263-350 V_H in den TOPO-TA-Vektor. Die PCR lief in 33 Zyklen bei 60 °C ab und zeigt die erfolgreiche Insertion für die Klone # 2, 3, 5, 6, und 7. Verwendet wurde ein 2%iges Agarose-Gel mit 50 bp DNA-Marker. N-Negativprobe.

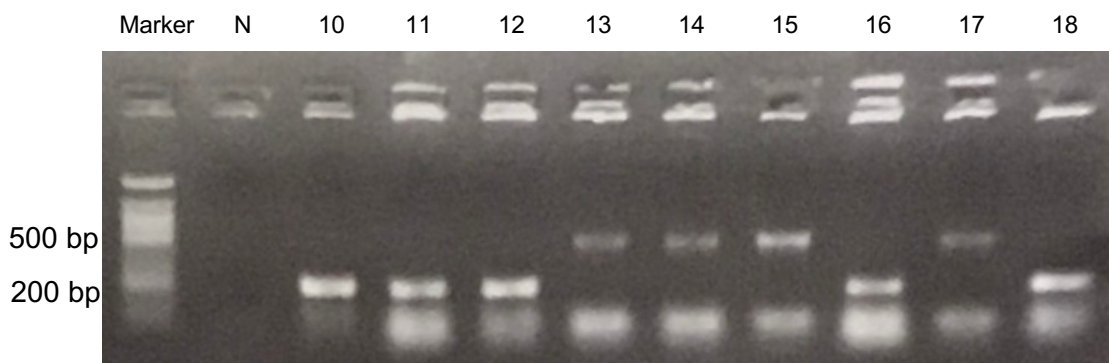


Abbildung 14: PCR-Insertionskontrolle von LRPAP1 263-350 V_L in den TOPO-TA-Vektor. Die PCR lief in 33 Zyklen ab und zeigt die erfolgreiche Insertion für die Klone # 13, 14, 15 und 17. Durchführung der Elektrophorese mit einem 2%igen Agarose-Gel mit 50 bp DNA-Marker. N-Negativprobe.

4.3.2 Insertionskontrolle des Schwer- und Leichtkettengens in den IgG1 TA Vektor

Nach erfolgreicher Amplifikation der LRPAP1 Epitop-Region mit Anfügen der passenden Schnittstellen erfolgte die Ligation in einen TA-Vektor mit schon eingefügter IgG1-Sequenz. Hierfür konnte eine erfolgreiche Insertion sowohl für das Schwer- als auch das Leichtkettengens nachgewiesen werden. Die erfolgreiche Ligation des LRPAP1 Epitops an die Stelle der variablen Region der Schwereketten konnte für die Klone 1 bis 8 durch den Nachweis eines PCR-Fragments von 400 bp Länge gezeigt werden (Abb. 15). Die anschließende erfolgreiche Integration des zweiten LRPAP1 Epitops an die Stelle der variablen Region der Leichtkette konnte ebenfalls durch Banden bei gleicher Länge für die Klone 1, 2, 3, 4, 6 und 8 bewiesen werden (Abb. 16).

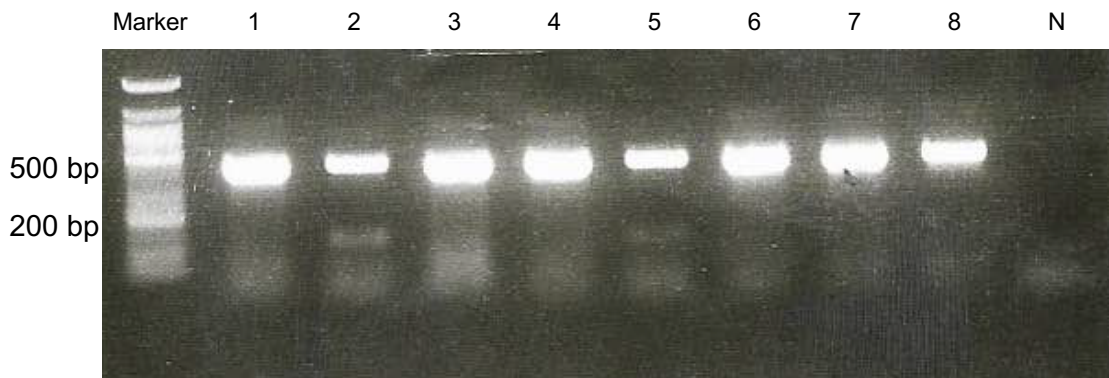


Abbildung 15: PCR-Insertionskontrolle von LRPAP1 263-350 V_H TA in IgG1 TA. Durchführung der PCR mit 33 Zyklen bei 55 °C mit den Primern Mun1-s und CH1 3'. Erfolgreiche Insertion für alle Klone. Für die Gelelektrophorese wurde ein 2%iges Agarose-Gel mit einem 50 bp DNA-Marker benutzt. N-Negativprobe.

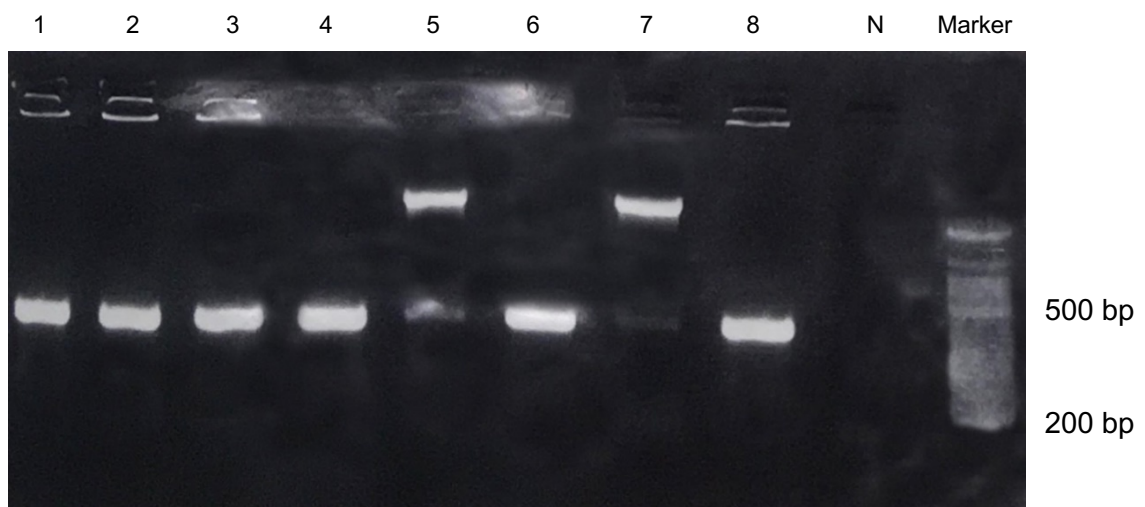


Abbildung 16: PCR-Insertionskontrolle von LRPAP1 263-350 V_L TA in LRPAP1 263-350 V_H IgG1 TA. Durchführung der PCR mit 33 Zyklen mit den Primern Agel-s und kappa-as. Erfolgreiche Insertion für die Klone # 1, 2, 3, 4, 6, und 8. Die Auftrennung erfolgte mit einem 2%igen Agarose-Gel mit einem 50 bp DNA-Marker. N-Negativprobe.

4.3.3 Insertionskontrolle in den pSfi-Express-FLAG-Tag-Vektor

Nach der Erzeugung passender Schnittstellen wurde eine Ligation von LRPAP1 263-350 V_H V_L IgG1 in den pSfi-Express-FLAG-Tag-Vektor durchgeführt. Bei diesem Vorgang wurde der TOPO-TA-Vektor entfernt. Durch Nachweis eines PCR-Fragments mit einer Länge von 400 bp in einer Agarose-Gelelektrophorese konnte die erfolgreiche Ligation für die Klone 1 und 4 (Abb. 17 und 18) sowie 10, 12 und 14 (Abb. 17 und 19) gezeigt werden. Verwendet wurden hierfür die Primer CH1 3' und CMV-s.

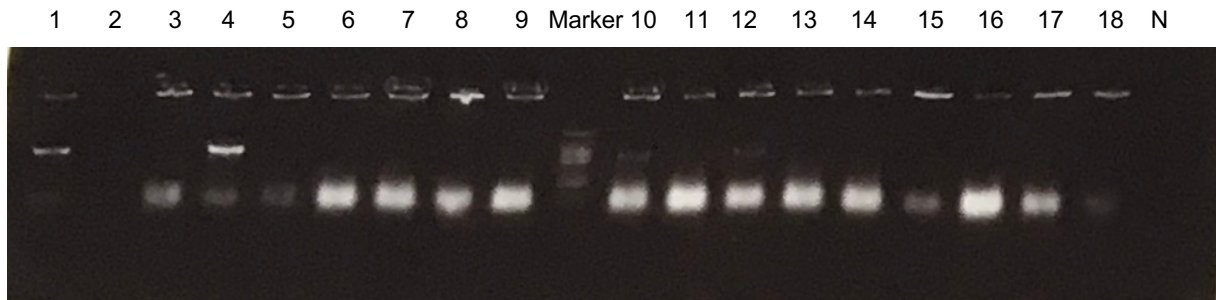


Abbildung 17: PCR-Insertionskontrolle von LRPAP1 263-350 V_H V_L IgG1 in den pSfi-Express-FLAG-Tag-Vektor. Durchführung der PCR mit 33 Zyklen bei 60 °C mit den Primern CH1 3' und CMV-s. Erfolgreiche Insertion für die Klone # 1, 4, 10, 12, 14. Durchführung der Gelelektrophorese mit einem 2%igen Agarose-Gel. N-Negativprobe.

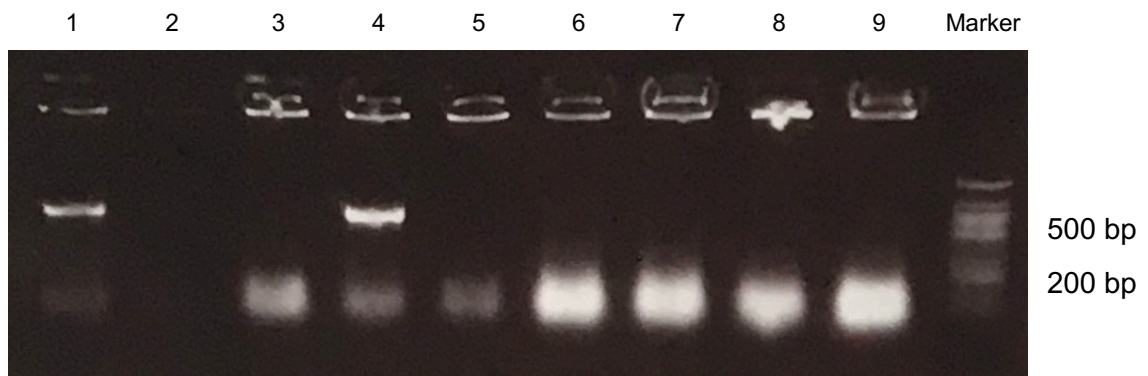


Abbildung 18: PCR-Insertionskontrolle von LRPAP1 263-350 V_H V_L IgG1 in den pSfi-Express-FLAG-Tag-Vektor. Ausschnitt der Proben 1 bis 9. In der letzten Geltasche wurde der 50 bp DNA-Marker aufgetragen.

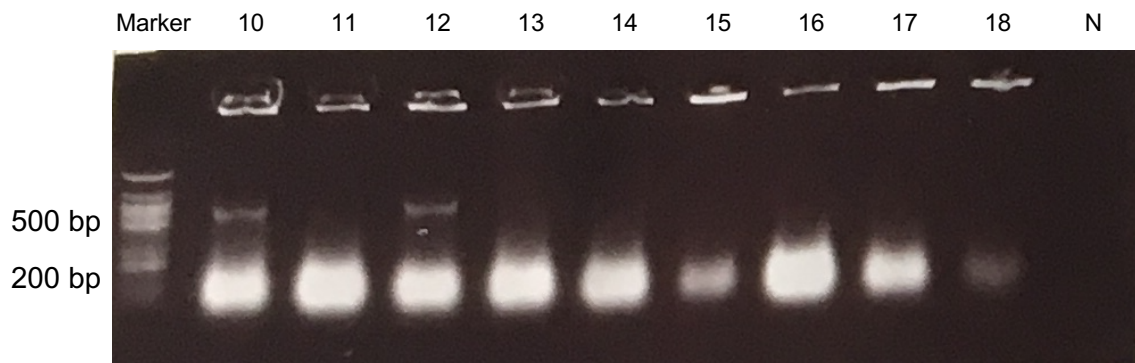


Abbildung 19: PCR-Insertionskontrolle von LRPAP1 263-350 V_H V_L IgG1 in den pSfi-Express-FLAG-Tag-Vektor. Ausschnitt der Proben 10 bis 18. In der ersten Geltasche ist der aufgetragene 50 bp DNA-Marker zu erkennen, die letzte Geltasche zeigt die Negativprobe (N).

4.4 Restriktionsverdau zur Erzeugung von Schnittstellen

Dieses Verfahren ist eine wichtige Methode im Zuge einer Klonierung. Um eine Ligation zwischen Vektor und DNA durchführen zu können, müssen sie zueinander komplementäre Schnittstellen besitzen. Mit dem Restriktionsverdau werden Gensequenz und Vektor mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten, wobei sogenannte sticky ends entstehen. Durch

das Verwenden gleicher Enzyme sind die sticky ends zueinander komplementär und die Ligation kann ablaufen.

Der Restriktionsverdau benötigt eine Inkubationszeit von einer Stunde bei 37 °C und wurde stets nach einem 30 µl-Ansatz durchgeführt. Die Kontrolle von korrekt erzeugten Schnittstellen erfolgte anhand der Fragmentlänge in einer anschließend durchgeführten Gelelektrophorese. Bei korrektem Restriktionsverdau beträgt die Fragmentlänge für das V_H und V_L-Insert jeweils 400 bp, für den IgG1 TA Vektor annähernd 6000 bp.

Bei allen unten unter 4.4.1 bis 4.4.3 aufgeführten Schritten (Abb. 20 bis 22) ist der Restriktionsverdau gelungen.

4.4.1 Restriktionsverdau von LRPAP1 263-350 V_H TA und IgG1 TA

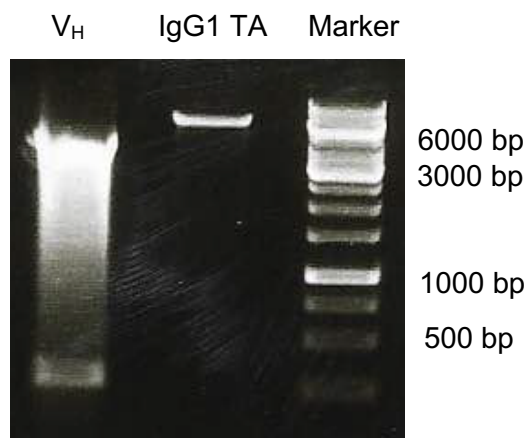


Abbildung 20: Restriktionsverdau von LRPAP1 263-350 V_H TA und IgG1 TA. Durchgeführt wurde der Verdau mit den Enzymen MunI und BstEII. Die Gelelektrophorese erfolgte in einem 1%igen Agarose-Gel mit einem 1 kbp DNA-Marker.

4.4.2 Restriktionsverdau von LRPAP1 263-350 V_L TA und LRPAP1 263-350 V_H IgG1 TA

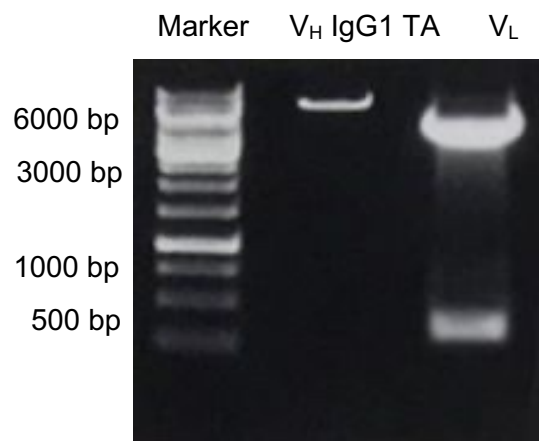


Abbildung 21: Restriktionsverdau von LRPAP1 263-350 V_L TA und LRPAP1 263-350 V_H IgG1 TA. Verwendet wurden die Restriktionsenzyme AgeI und SmaI. Ablauf der Gelelektrophorese in einem 1%igen Agarose-Gel mit einem 1 kbp DNA-Marker.

4.4.3 Restriktionsverdau von LRPAP1 263-350 V_H V_L IgG1 TA

Der Verdau erfolgte hier nur mit dem V_H V_L IgG1 TA-Insert. Der pSfi-Express-FLAG-Tag-Vektor wurde mir vom José Carreras Center für Immun- und Gentherapie bereits bearbeitet zur Verfügung gestellt. Er wurde mit dem Enzym EcoRV geschnitten, EcoRV und Eco47III sind jeweils Blunt Enzyme.

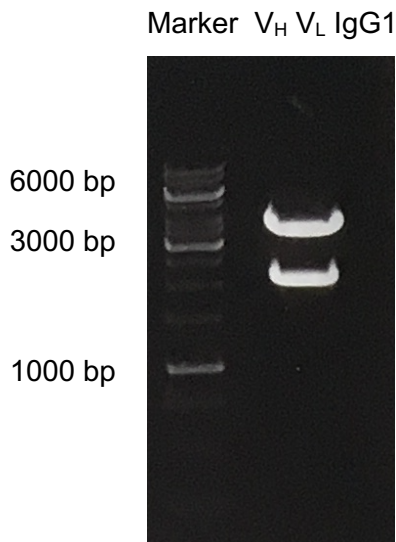


Abbildung 22: Restriktionsverdau von LRPAP1 263-350 V_H V_L IgG1 TA. Hierbei kam das Enzym Eco47III zum Einsatz. Für die Gelelektrophorese wurde ein 1%iges Agarose-Gel mit einem 1 kbp DNA-Marker verwendet.

4.5 Restriktionsverdau zur Insertionskontrolle

Durch das Schneiden des Plasmids mit eingebautem Insert und anschließender PCR und Agarose-Gelelektrophorese kann anhand der Fragmentlänge detektiert werden, ob das Insert in korrekter Orientierung eingebaut wurde. Hierfür wurde vor den Expressionsversuchen ein Kontrollverdau mit den Klonen 1, 4, 10, 12 und 14 (Abb. 23) zum Abschluss der zahlreichen Klonierungsschritten nach folgendem 120 µl-Ansatz durchgeführt:

12 µl Puffer

1,8 µl BSTEII

12 µl DNA

94,6 µl a. dest.

Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C erfolgte eine Agarose-Gelelektrophorese bei 100 V für 30 Min.

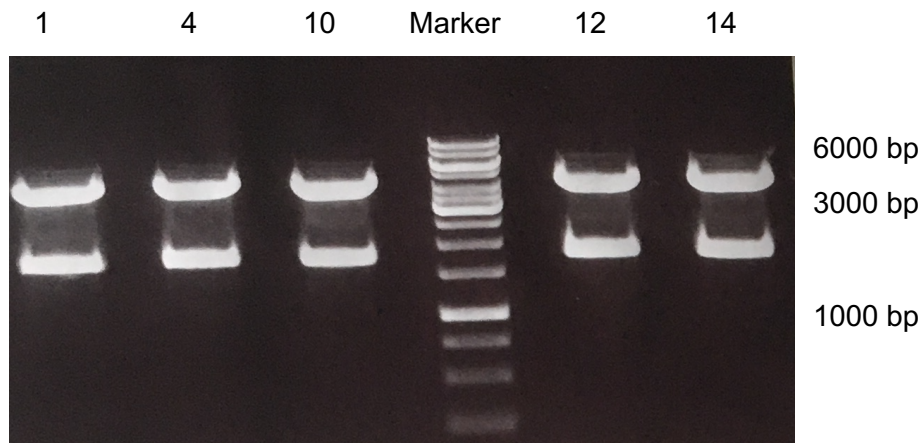


Abbildung 23: Kontrollverdau der korrekten Insertion von LRPAP1 263-350 V_H V_L IgG1 in den pSfi-Express-FLAG-Tag-Vektor. Durchführung des Verdau mit den Klonen # 1, 4, 10, 12 und 14. Die Gelelektrophorese wurde mit einem 1%igen Agarose-Gel mit einem 1 kbp DNA-Marker durchgeführt.

Bei richtiger Insertion schneidet das Enzym BstEII den Vektor nur zwei Mal nach Erkennen der 5'-G/GTNACC-3'-Sequenz. Die Fragmentlänge beträgt dann ungefähr 1400 bp. Die Gelelektrophorese zeigte für alle fünf Klone eine Bande bei entsprechender Größe. Der IgG1-Vektor mit den insertierten Genen für die Schwer- und Leichtkette wurde demnach korrekt in den pSfi-Express-FLAG-Tag-Vektor eingebaut. Bei nicht korrektem Einbau würde das Enzym den Vektoren drei Mal schneiden mit einem zusätzlichen kleineren Fragment von 400 bp.

4.6 Coomassie-Färbung

Mithilfe der Coomassie-Färbung soll die Reinheit des aufgereinigten Überstands nachgewiesen werden. Die Bande bei 150 kDa entspricht der Molekularmasse des Antikörpers (Abb. 24). Die Tatsache des Vorliegens einer einzigen aussagekräftigen Band beweist die Reinheit des Antikörpers. Die Banden bei 60 und 70 kDa sind zu vernachlässigen.

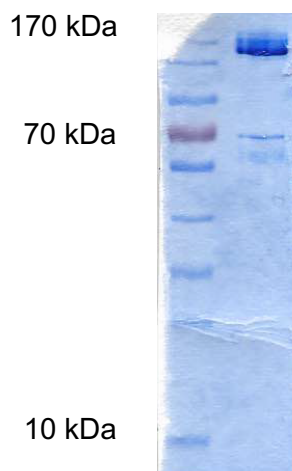


Abbildung 24: Coomassie-Proteinfärbung des Antikörpers LRPAP1 263-350 V_H V_L IgG1 pSfi-Express-FLAG-Tag. Es handelt sich um ein 10%iges SDS-Page-Gel. Links wurde der Größenmarker aufgetragen, rechts die Antikörperprobe. Die Bande kommt bei der zu erwartenden Molekularmasse von 150 kDa zu liegen.

4.7 Western Blot zum Proteinnachweis

Mit dem Western Blot kann die Expression des im Überstand befindlichen Antikörpers durch transfizierte HEK-Zellen gezeigt werden (Abb. 25 und 26).

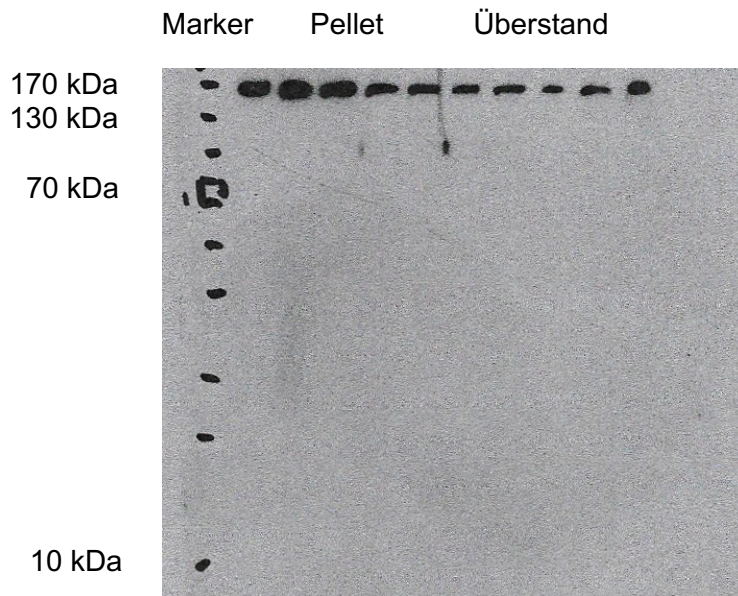


Abbildung 25: Western Blot zum Nachweis von LRPAP1 263-350 V_H V_L IgG1 pSfi-Express-FLAG-Tag. In der linken Spalte wurde der Marker aufgetragen, die Markierung befindet sich bei 70 kDa. Die Proben 1 bis 5 wurden aus dem Pellet gewonnen, 6 bis 10 aus dem Überstand. Die Banden bei in etwa 150 kDa entsprechen der Molekülmasse. Verwendet wurde ein 10%iges SDS-Page-Gel. Durchführung des Western Blots vier Tage nach der Transfektion zur Erfolgskontrolle.

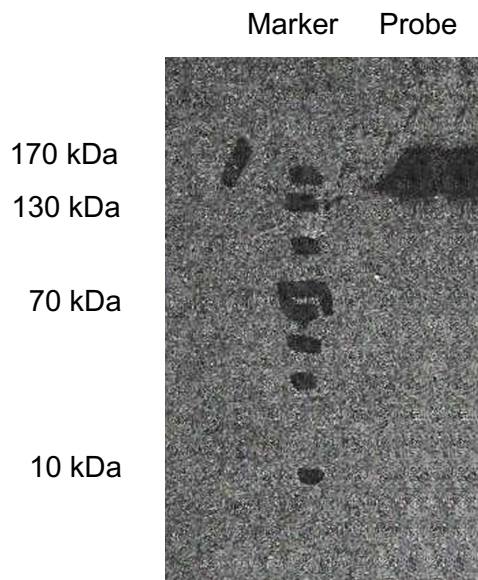


Abbildung 26: Western Blot zum Nachweis von LRPAP1 263-350 V_H V_L IgG1 pSfi-Express-FLAG-Tag. Die Markierung des Markers in der linken Spalte liegt bei 70 kDa. Die Bande der Probe entspricht der Molekülmasse, sodass der Western Blot positiv ausfällt. Hierbei handelt es sich um ein 10%iges SDS-Page-Gel. Der Test wurde durchgeführt, um den Antikörper im Überstand nach wochenlangem Sammeln nachzuweisen. Die Bande der Probe liegt bei der zu erwartenden Molekulargröße von 150 kDa.

4.8 Bindungsnachweis mittels Durchflusszytometrie

Zum Nachweis der Bindung zwischen BAR-body und BZR wird die Durchflusszytometrie verwendet. Die bisherigen Experimente konnten zeigen, dass der BAR-body produziert wurde. Nun erfolgen funktionelle Assays mit Überprüfung der Bindungsfähigkeit des BAR-body an den B-Zell-Rezeptor der MCL-Zelle.

Für die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden die Maver1-, Granta-519- und U2932-Zelllinien verwendet.

Die Maver1-Zellen sind eine LRPAP1-positive MCL-Zelllinie, d.h. Zellen dieser Linie exprimieren einen BZR mit Reaktivität gegen LRPAP1. An diese Zellen sollte demnach eine Bindung des LRPAP1 BAR-body erfolgen.

Granta-519-Zellen sind eine LRPAP1-negative MCL-Zelllinie, demnach sollte keine Bindung stattfinden, sodass die Spezifität von LRPAP1 bestätigt wird.

Die U2932-Zellen sind eine etablierte B-Zelllinie des diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms und stellen die Negativkontrolle dar.

Für die Analyse wurde eine Event-Zahl von 5000 gewählt, d.h. die Untersuchung endete automatisch nach Messung von 5000 Events. Detektiert wurde über den Fluoreszenzfarbstoff APC.

Zur weiteren Analyse wurde ein Gate um lebende Lymphozyten gesetzt (Abb. 27, Dotplot). Bei Ereignissen, die außerhalb des Gates liegen, handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um nicht lebende Zellen oder Zelldetritus.

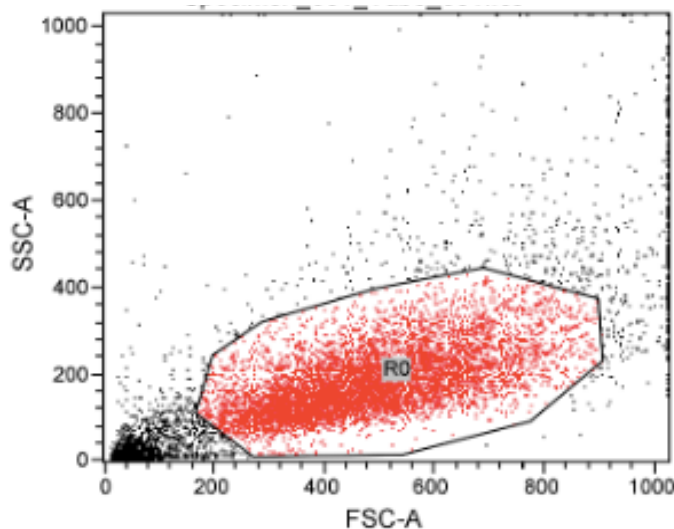


Abbildung 27: Gating Strategie der Durchflusszytometrie. Auf der Abszisse ist die Zellgröße (FSC) wiedergegeben, die Ordinate zeigt die Zellgranularität und -komplexität (SSC). Gegated wurden lebende Lymphozyten.

Legende zu den Histogrammen

Auf der Abszisse wird die APC-Detektion aufgetragen, die Ordinate zeigt die Anzahl der Zellen. Der schwarze Graph zeigt in jedem Diagramm die Eigenfluoreszenz der jeweiligen Zelllinie. Zu dieser Probe wurde kein Antikörper gegeben und es wurde lediglich PBS in der Vorbereitungsphase hinzugefügt. Der rote Graph repräsentiert die Bindungsaffinität des LRPAP1 BAR-body zur jeweiligen Zelllinie.

Maver1-Zellen

Der schwarze Graph zeigt die Eigenfluoreszenz, da zu diesem Ansatz kein Antikörper hinzugegeben wurde. Der rote Graph ist auf der x-Achse deutlich verschoben was anzeigt, dass die Maver1-Zellen mit APC markiert sind. Damit wird indirekt eine Bindung des Flag-markierten LRPAP1 BAR-body nachgewiesen (Abb. 28).

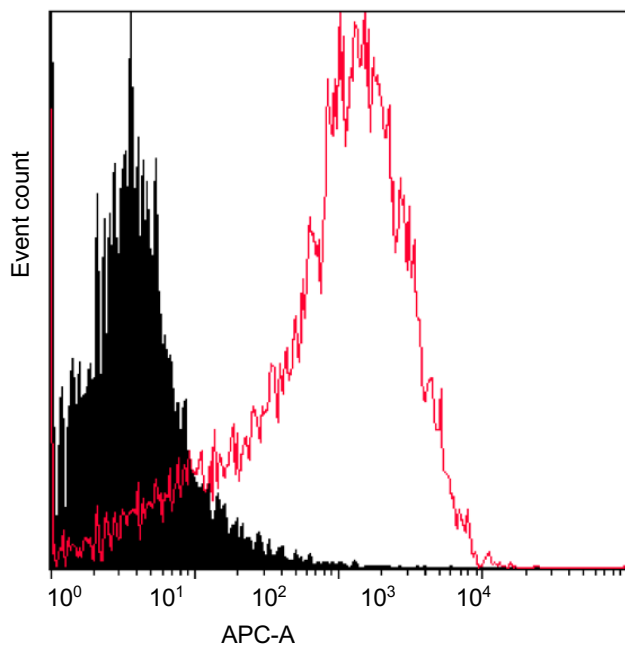


Abbildung 28: Durchflusszytometrie zum Bindungsnachweis zwischen LRPAP1-IgG1 und der Maver1-Zelllinie. x-Achse: APC-A, y-Achse: Event count. Schwarz: keine Antikörper-Zugabe, rot: LRPAP1-IgG-Zugabe.

Granta-519-Zellen

Die Graphen in diesem Diagramm zeigen nahezu den identischen Verlauf und präsentieren die Eigenfluoreszenz. Dies bedeutet, dass keine Bindung zwischen den Zellen und dem BAR-body erfolgte (Abb. 29).

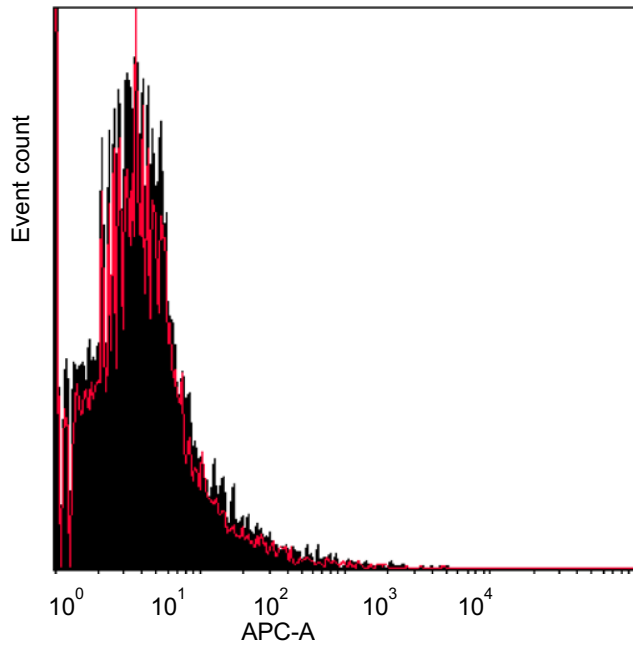


Abbildung 29: Durchflusszytometrie zum Bindungsnachweis zwischen LRPAP1-IgG1 und der Granta-519-Zelllinie. x-Achse: APC-A, y-Achse: Event count. Schwarz: keine Antikörper-Zugabe, rot: LRPAP1-IgG-Zugabe.

U2932-Zellen

Die Graphen zeigen auch nach Zugabe des Antikörpers lediglich die Eigenfluoreszenz der Zellen. Es hat demnach keine Bindung des LRPAP1 BAR-body an die Zellen der DLBCL-Zelllinie stattgefunden (Abb. 30).

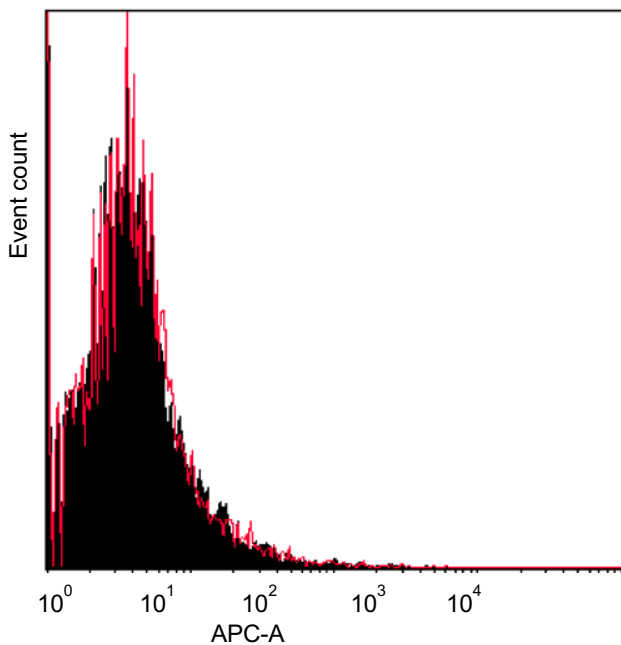


Abbildung 30: Durchflusszytometrie zum Bindungsnachweis zwischen LRPAP1-IgG1 und der U2932-Zelllinie. x-Achse: APC-A, y-Achse: Event count. Schwarz: keine Antikörper-Zugabe, rot: LRPAP1-IgG-Zugabe.

4.9 LDH-Cytotox-Release-Assay

Für den Nachweis des zytotoxischen Potentials der LRPAP1 BAR-bodies wurde ein LDH-Cytotox-Release-Assay durchgeführt. Mithilfe dieses Assays kann die Toxizität des LRPAP1 BAR-body anhand des von angegriffenen Zellen ausgestoßenen LDHs quantifiziert werden. Hierfür werden PBMCs benötigt, die die BAR-body-markierten Zellen angreifen. Diese wurden wie unter Kapitel 3.2.2.25 beschrieben aus Eigenblut gewonnen. Nach Zählung in der Neubauer-Zählkammer ergaben sich 8×10^5 Zellen pro ml.

Es wurden folgende Zelllinien verwendet:

- Target-Zellen: Positiv-Linie: Maver1
Negativ-Linie: Granta-519, U2932
- Effektor-Zellen: PBMCs

Der Versuch wurde in einer 96-Well-Zellkulturplatte vorgenommen. In jedem Well befanden sich 50.000 Effektor-Zellen und 5.000 Target-Zellen. Die Ausgangskonzentration der beiden Antikörper betrug 10 µg/ml, die absteigend um den Faktor 0,5 verdünnt wurde (Abb. 31 bis 33).

Für die Maver1-Zellen wurde ein LDH-Ausstoß aufgrund der in Kapitel 4.7 beschriebenen durchflusszytometrisch nachgewiesenen, BZR-vermittelten Bindung zu dem LRPAP1 BAR-body erwartet. Die beiden LRPAP1 nicht-reaktiven Zelllinien Granta-519 und U2932 dienen als Negativkontrollen, ebenso wie ein BAR-body, dem anstelle von LRPAP1 ein irrelevantes Antigen integriert wurde. Hierbei handelte es sich um SAMD14/neurabin-I, welches ein autoantigenes Ziel der BZRen eines Teils von ZNS-Lymphomen darstellt.

Für alle drei Zelllinien wurde eine Minimal- und Maximallyse bestimmt. Dies erfolgte in beiden Fällen ohne Antikörperzugabe.

Minimallyse: Zelllinie + PBMCs + 5 µl RPMI

Maximallyse: Zelllinie + PBMCs + 5 µl Triton X

Gemessen wurde die LDH-Aktivität für die BAR-body Konzentrationen 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml und 1,25 µg/ml.

Maver1-Zellen:

Für den LRPAP1 BAR-body konnte nach Inkubation mit Maver1-Zellen und PBMCs eine spezifische Lyse nachgewiesen werden, die bei 10/µg/ml etwa 40% erreicht. In den Ansätzen

ohne BAR-body oder mit einem BAR-body, der nicht LRPAP1 enthält, konnte kein LDH-Release gemessen werden (Abb. 31).

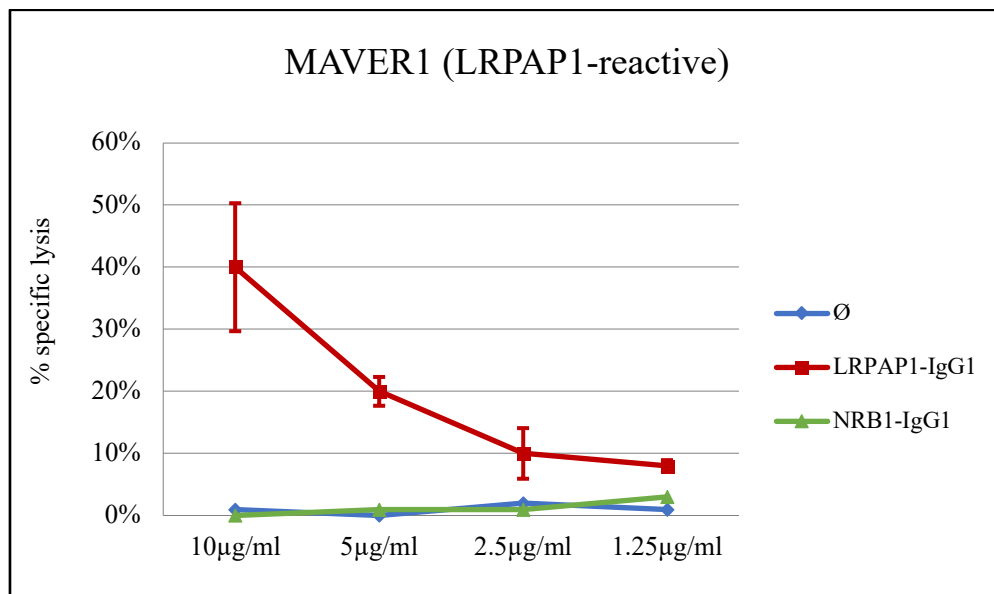


Abbildung 31: LDH-Cytotox-Release-Assay der Maver1-Zelllinie. X-Achse: absteigend die Konzentration der Antikörper in µg/ml. Y-Achse: LDH-Ausstoß in Prozent. Blau: keine Antikörper-Zugabe. Rot: Zugabe von LRPAP1-IgG1. Grün: Zugabe von NRB1-IgG1.

Granta-519-Zellen:

Diese Zelllinie ist ebenfalls eine MCL-Zelllinie, exprimiert aber einen B-Zell-Rezeptor, der nicht LRPAP1-reaktiv ist. Wie zu erwarten, löste der LRPAP1 BAR-body keine Lyse in Granta-519-Zellen aus (Abb. 32).

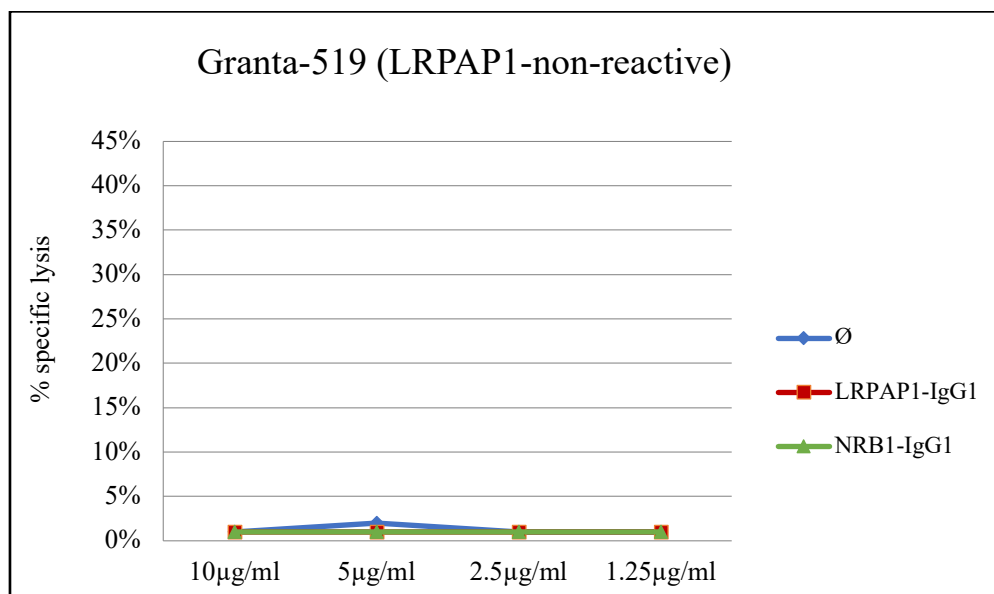


Abbildung 32: LDH-Cytotox-Release-Assay der Granta-519-Zelllinie. X-Achse: absteigend die Konzentration der Antikörper in µg/ml. Y-Achse: LDH-Ausstoß in Prozent. Blau: keine Antikörper-Zugabe. Rot: Zugabe von LRPAP1-IgG1. Grün: Zugabe von NRB1-IgG1.

U2932-Zellen:

Auch nach Inkubation von U2932-Zellen mit dem LRPAP1 BAR-body zeigte sich keinerlei lytische Aktivität (Abb. 33).

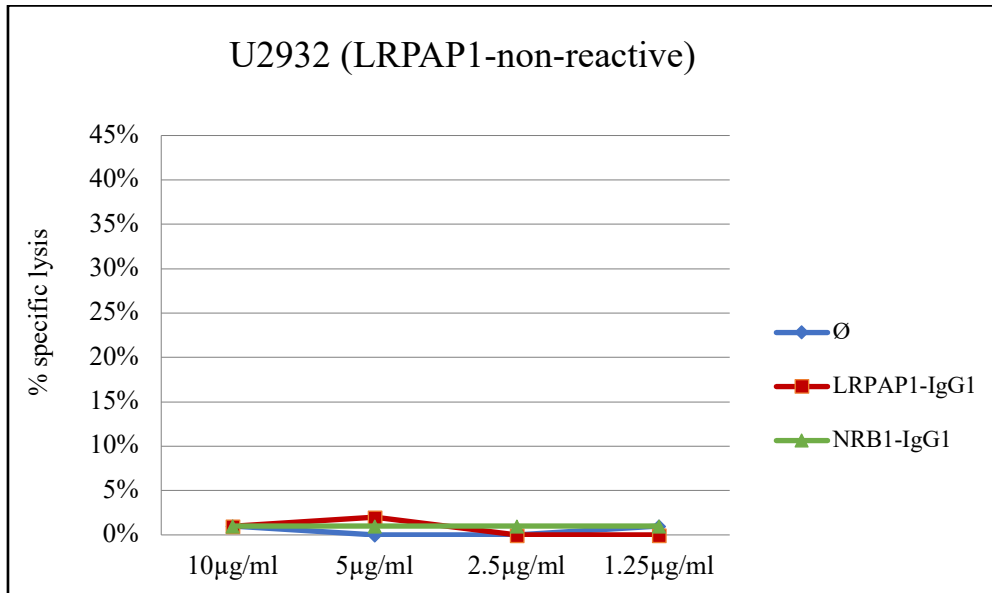


Abbildung 33: LDH-Cytotox-Release-Assay der U2932-Zelllinie. X-Achse: absteigend die Konzentration der Antikörper in µg/ml. Y-Achse: LDH-Ausstoß in Prozent. Blau: keine Antikörper-Zugabe. Rot: Zugabe von LRPAP1-IgG1. Grün: Zugabe von NRB1-IgG1.

5. Diskussion

Die Standardtherapie des Mantelzell-Lymphoms gestaltet sich intensiv und besteht initial aus einer Kombinationschemotherapie mit anschließender Stammzelltransplantation. Dennoch erleiden die meisten Patienten im weiteren Verlauf ein Rezidiv [85]. Im Falle eines Rezidivs ist die Prognose schlecht. Je nach Dauer der ersten Remission kann erneut eine Chemotherapie durchgeführt werden oder es sollte sich eine zielgerichtete Therapie, z. B. mit einem Bruton-Tyrosinkinase-Inhibitor anschließen. Im erneuten Rezidiv stehen dann CAR-T-Zellen und die allogene Stammzelltransplantation als mögliche Therapieoptionen zur Verfügung [53].

Die Therapieformate, die zur Zeit auf dem Markt sind, differenzieren nicht zwischen dem malignen B-Zell-Klon und gesunden B-Lymphozyten. Das bedeutet, dass sowohl die gesunden als auch die pathologischen B-Zellen angegriffen und abgetötet werden. Dies hat eine dauerhafte B-Zell-Depletion mit Beeinträchtigung der humoralen Immunantwort zur Folge.

Daher werden dringend neue Therapieformate benötigt, die die therapie-bedingten Nebenwirkungen wie die Immunsuppression unter der aktuellen Standardtherapie minimieren.

Der BZR ist ein sehr attraktives Therapieziel, weil er einzigartig für den malignen Klon ist und sich von den BZRs aller anderen B-Lymphozyten unterscheidet. Eine gezielte Therapie, wie sie für die Bekämpfung eines Lymphoms gefragt ist, könnte hierüber gelingen. Schon lange wird versucht eine Therapie zu entwickeln, die die Einzigartigkeit des BZRs als Zielstruktur ausnutzt.

5.1 Bisherige innovative Therapieansätze

5.1.1 Beeinflussung von Signalkaskaden

Der Signalweg des BZRs kann über eine Hemmung einer Reihe für ihn wichtiger Enzyme, wie die Bruton-Tyrosinkinase (BTK), die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) oder die mTOR-Kinase beeinflusst werden. Dadurch kann die Proliferation und das Überleben von B-Lymphozyten entschieden behindert werden.

Die BTK übernimmt wichtige Funktionen in der Signalübertragung, Differenzierung, Entwicklung und Überleben der B-Zelle. Ibrutinib ist ein Hemmstoff dieses Enzyms und zeigte in einer multizentrischen, randomisierten Studie im Vergleich zu dem mTOR-Kinase-Inhibitor

Temsirolimus (s.u.) eine Verlängerung sowohl des PFS (15,6 Monate vs. 6,2 Monate) als auch des OS (30,3 Monate vs. 23,5 Monate) und eine Senkung der Nebenwirkungen für Patienten mit rezidiviertem oder refraktärem Mantelzell-Lymphom (bei 68 % der Patienten mit Ibrutinib vs. 87 % der Patienten unter Temsirolimus-Therapie) [64], [8], [79].

Die PI3K spielt eine zentrale Rolle im Zellstoffwechsel und der Steuerung der Translation. Bei zahlreichen Malignomen wurde eine erhöhte PI3K-Aktivität entdeckt und als Bestandteil der Krebsentstehung identifiziert. Eine Hemmung dieser Kinase gelingt durch Idelalisib. Die mTOR-Kinase nimmt Einfluss auf die Prozesse der Proliferation, Differenzierung und Vermehrung der Zelle und wird durch den Wirkstoff Temsirolimus inhibiert.

5.1.2 Anti-idiotyp Antibody

Anti-Idiotypen sind Antikörper, die gegen die variable Region der Oberflächen-Immunglobuline, den Idiotypen, von B-Zell-Lymphomen und lymphatischen Leukämien gerichtet sind. Diese idiotypischen Determinanten stellen monoklonale tumorspezifische Antigene dar und sind für jeden Tumor einzigartig [29].

Die Anti-Idiotyp-Antikörper wurden bei Lymphom-Patienten entweder durch Impfung mit dem aus Lymphomzellen gewonnenen BZR oder durch Immunisierung von Tieren mit Lymphom-BZRen und Gewinnung von Anti-Idiotyp-Antikörpern aus den Seren der immunisierten Tiere erzeugt [29], [20], [44], [45]. Sie sollen eine Immunantwort gegen die Lymphomzellen mit dem jeweiligen BZR auslösen [36], [39].

Ein großer Nachteil dieses Formats ist die oben beschriebene Einzigartigkeit der Idiotypen, was dazu führt, dass dieses Therapiekonzept nicht interindividuell genutzt werden kann. Für jeden Patienten muss ein eigener Antikörper hergestellt werden, der zu der variablen Region des BZRs kompatibel ist. Dies ist zeitaufwendig, teuer und nicht praktikabel [75], [72]. Außerdem zeigte sich in Versuchen mit einem CLL-Patienten zwar eine deutliche Senkung der weißen Blutkörperchen, doch aufgrund eines schnellen Verbrauchs des Antikörpers stiegen die Werte wieder rasch auf bis zu 85 % des Ausgangswertes an [20].

5.1.3 Peptibodies

Ein weiterer Ansatz, um die BZRen eines malignen B-Zell-Klons zu erreichen, sind "peptibodies". Darunter versteht man Konstrukte, die sich aus zwei Teilen zusammensetzen, einem biologisch aktiven Peptid und einer Fc-Region. Zur Verlängerung der Halbwertszeit und Vermittlung der pharmakodynamischen Wirkung wird das Peptid daher an eine menschliche

Fc-Domäne gebunden [67]. Über den Fc-Teil sollen NK-Zellen rekrutiert und das Komplementsystem aktiviert werden.

Durch die chemische Verknüpfung kurzer, synthetischer, patientenspezifischer Idiotyp-bindender Peptide mit einer patienteninvarianten IgG Fc-Domäne konnte ein modulares, antikörperähnliches Molekül geschaffen werden. Diese halbsynthetischen Peptidkörper töten Lymphomzellen direkt ab, indem sie eine Makrophagen-gesteuerte Phagozytose induzieren. In Mausmodellen konnte so die Therapie und Heilung von Lymphomen simuliert werden [75]. Das Hauptproblem dieses Ansatzes ist seine Praktikabilität, da Peptibodies, wie auch Anti-Idiotyp-Antikörper, gegen einen einzigartigen BZR eines bestimmten malignen B-Zell-Klons gerichtet sind, was für jeden einzelnen Patienten ein spezifisches Reagenz erfordert. Hier zeigt sich lediglich ein Vorteil gegenüber den Anti-Idiotypen, da nicht der ganze Antikörper neu synthetisiert werden muss, sondern nur das zur variablen Region des BZR passende Peptid gesucht und an die Fc-Domäne gebunden werden muss.

5.2 BAR – B-cell receptor antigen for reverse targeting

Wie in Kapitel 2.4 ‚Die Bedeutung des BZR und die Möglichkeit neuer Therapieformate‘ erläutert, wird vermutet, dass eine chronische Stimulation des BZR eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Lymphomen spielt [86], [49]. Über die letzten Jahre konnten Autoantigene als stimulierende Liganden des BZR und seines Signalweges bei verschiedenen Lymphomtypen identifiziert werden [16], [17], [18].

Mithilfe dieser Antigene wurde das vielversprechende Konzept der BARs, B-cell receptor antigen for reverse targeting, für eine gezielte Therapie von B-Zell-Lymphomen entwickelt.

Dieses Format zeichnet sich dadurch aus, dass es die Spezifität des BZR zu seinem Antigen ausnutzt und dadurch hochspezifische Therapiemöglichkeiten eröffnet. Diesen Möglichkeiten ist die Endstrecke der Eradikation des malignen Klons der B-Lymphozyten mit einer spezifischen BZR-Reaktivität gemeinsam. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass diese B-Zell-Rezeptor-Antigene *in-vitro* zur Bekämpfung von Lymphomzellen verwendet werden können [72], [70].

Ein weiteres besonderes Merkmal dieses Konzeptes ist, dass diese Form des BZR-Targetings von einem Großteil der Patienten einer Lymphom-Entität erkannt wird. Die gleichen Konstrukte können im Gegensatz zu dem Konzept der anti-idiotypischen Antikörper an verschiedenen Patienten genutzt werden. Die zeitaufwendige Herstellung eines jeden Konstrukts für jeden

einzelnen Patienten entfällt demnach. Durch das breite Anwendungsgebiet könnten viele Menschen von diesem Therapiekonzept profitieren.

Im Vergleich zu den Peptibodies entfällt die Suche nach einem zur variablen Region des B-Zell-Rezeptors komplementären Peptid.

Wie in Kapitel 2.5 ‚BARs - B-cell receptor antigens for reverse targeting‘ erwähnt, stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung, die BARs in Therapiekonzepte zu überführen, welche in den folgenden Kapiteln beschrieben und miteinander verglichen werden.

5.2.1 Kopplung des Antigens an ein Toxin

Eine erste Möglichkeit B-Zell-Rezeptor-Antigene in ein Therapieformat zu integrieren, ist die Kopplung des Antigens mit einem Toxin. Die Oberflächen-Immunglobuline binden das für sie spezifische Epitop ihres Antigens und die Antigen-Toxin-Konstrukte werden internalisiert. Das im Zellinneren freigesetzte Toxin löst in den Lymphomzellen die Einleitung der Apoptose aus. Bereits im Vorfeld dieser Arbeit wurden derartige Versuche durchgeführt, in denen LRPAP1 mit dem Pseudomonas aeruginosa Exotoxin A konjugiert wurde. Nach Internalisierung in MCL-Zellen mit LRPAP1-sensitivem BZR, konnte beobachtet werden, dass diese in Apoptose übergingen. MCL-Zellen mit einem BZR, der nicht LRPAP1-reaktiv ist, waren hiervon nicht betroffen. Dies zeigt, dass die Toxizität von LRPAP1-ETA' auf den malignen Klon beschränkt ist. Welches Toxin als Vermittler der Toxizität am besten geeignet ist, ist noch nicht abschließend geklärt. Andere Toxinkonjugate, wie Monomethyl-Auristatin E, die durch enzymatisch spaltbare Dipeptide verbunden sind, haben sich für die Verwendung beim Menschen als überlegen erwiesen [7], [52].

5.2.2 Bispezifische Konstrukte

Ein weiteres Therapiekonzept ist die Konjugation von LRPAP1 an Antikörperfragmente, die T- oder NK-Zellen als Effektor-Zellen zu bispezifischen Konstrukten rekrutieren.

Das Konzept der bispezifischen Konstrukte ist eine Weiterentwicklung bispezifischer monoklonaler Antikörper (Bi-Mab). Sie besitzen zwei unterschiedliche Bindungsstellen, eine für die Tumorzellen und eine für Effektor-Zellen. Ein bispezifischer Antikörper besteht aus zwei rekombinanten scFv-Einzelkettenfragmenten, die somit gleichzeitig an zwei Strukturen binden können. Bindet er an die T-Lymphozyten, spricht man von BiTEs, den bispecific T-cell engagers, geht er eine Bindung zu den natürlichen Killerzellen ein, nennt sich das Format BiKEs, bispecific killer cell engagers.

Die Bindung an T-Lymphozyten wird meist über das Oberflächenantigen CD3 vermittelt, das einen Ko-Rezeptor des T-Zell Rezeptors darstellt. Bispezifische Konstrukte, die NK-Zellen als Effektor-Zellen nutzen, binden gewöhnlich an den Fc-Rezeptor CD16. Der zweite scFv-Arm wird so konstruiert, dass er an ein bekanntes CD-Molekül der Zielzelle bindet. Im Falle von Lymphomen handelt es sich hierbei in der Regel um CD19. Somit sind Lymphomzelle und immunologische Effektor-Zelle miteinander verbunden und die T- oder NK-Zelle werden zur Bekämpfung der entarteten Zelle aktiviert [2].

BiTEs zeichnen sich durch eine Reihe von Eigenschaften aus, unter anderem durch eine außergewöhnliche Potenz und Wirksamkeit gegen Zielzellen bei niedriger T-Zellzahl ohne die Notwendigkeit einer T-Zell-Ko-Stimulation, was so bisher für keine andere Art von bispezifischen Antikörperkonstrukten berichtet wurde [81].

Jedoch werden die BiTEs aufgrund ihrer kleinen Molekülgröße zügig aus dem Kreislauf eliminiert und besitzen somit nur eine Halbwertszeit von 1,25 Stunden [34].

Mit der Entdeckung von BARs wird untersucht, ob diese auch den B-Zell-bindenden Antikörper (z. B. CD19) in T-Zell-interagierenden bispezifischen Konstrukten ersetzen können. Hierfür wurden Anti-CD3-BAR-Konstrukte entworfen, die aus einem rekombinanten Einzelkettenfragment gegen CD3 und einem BAR-Protein, wie z. B. LRPAP1, bestehen.

Der Anti-CD3-scFv-Arm sollte an den T-Zell-Ko-Rezeptor CD3 binden und T-Killerzellen aktivieren, während für LRPAP1 eine Bindung an MCL-Zellen mit LRPAP1 spezifischem BZR erwartet wird (Abb. 34). T-Lymphozyten könnten so gezielt gegen LRPAP1-reaktive Lymphomzellen gerichtet und aktiviert werden, während gesunde B-Lymphozyten geschont werden könnten [72].

Wird der anti-CD3-scFv-Arm gegen ein anti-CD16-Einzelstrangfragment ausgetauscht, würden NK-Zellen als Effektoren rekrutiert werden.

Aufgrund ihrer hohen Spezifität sollten diese bispezifischen BAR-Konstrukte weniger toxisch sein als die derzeit verfügbaren bispezifischen Anti-CD19xCD3-T-Zell-Antikörper, da nicht mit einer kompletten B-Zell-Depletion als Nebenwirkung zu rechnen ist [1], [72].

Bispecific LRPAP1 constructs

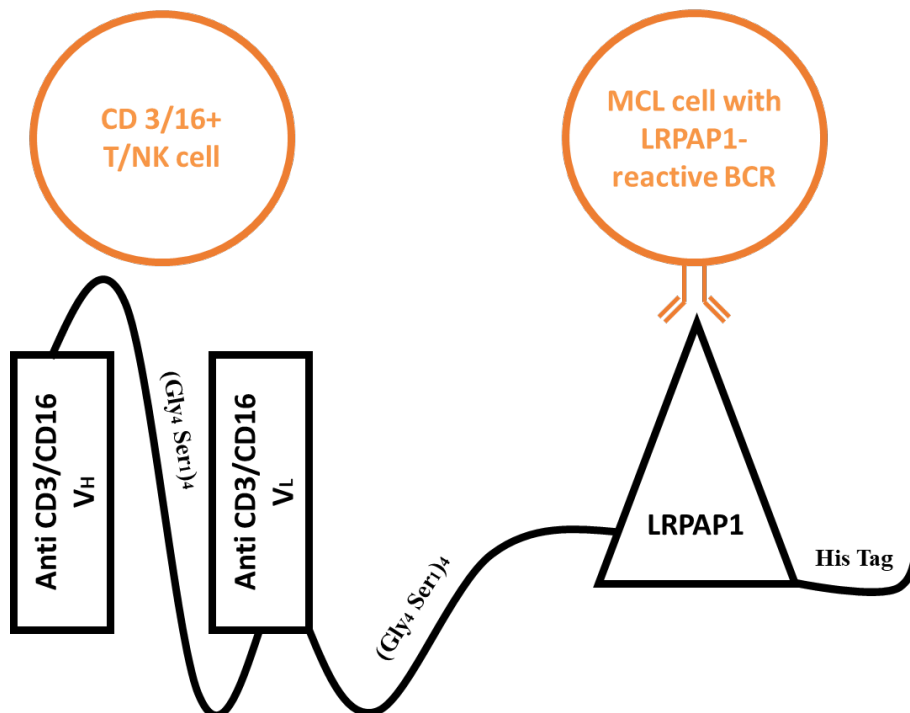


Abbildung 34: Schema eines bispezifischen Konstrukts mit LRPAP1 als BZR Bindungsdomäne [1].

5.2.3 BAR-CARs

Eine andere Möglichkeit der Integration von BARs in ein Therapieformat ist die Verwendung von BAR-CARs.

CAR-T-Zellen oder CAR-NK-Zellen sind gentechnisch veränderte Zellen, die einen chimären Antigen-Rezeptor (CAR) auf ihrer Oberfläche exprimieren. Dieser Rezeptor kann sich gegen beliebige Zielstrukturen richten. Die aktuell am häufigsten eingesetzten CAR-T-Zellen richten sich gegen das B-Zell-Antigen CD19 zur Behandlung von rezidierten B-Zell-Lymphomen [60]. Aus Patientenblut gewonnene T- oder NK-Zellen werden ex-vivo mittels gentechnologischer Verfahren mit einer Gensequenz ausgestattet, die die Erbinformation für den CAR trägt. Dadurch kann die genetische Information bei jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben werden. Nach Expansion der Zellen und Konditionierung des Patienten mittels Chemotherapie zur Reduktion der Lymphomzellen werden die modifizierten T- oder NK-Zellen dem Patienten zurückgegeben. Nach einer Bindung zwischen CAR und CD19-Molekül wird der T-Lymphozyt, der den CAR trägt, aktiviert und bekämpft sowohl maligne als auch benigne B-Zellen [3].

Dieses Konzept könnte theoretisch weiterentwickelt werden, um BARs als Bindungsdomäne in CAR-T-Zellen einzusetzen. Die T- oder NK-Zellen würden anstelle eines Antikörperfragments, das an ein CD-Molekül bindet, BARs als Bindungsdomäne ihres CARs verwenden. Mit LRPAP1 als extrazellulärer Targeting-Einheit würden zytotoxische Effektor-Zellen an die LRPAP1-reaktiven Lymphomzellen rekrutiert und aktiviert. Auf diese Weise könnten gesunde B-Lymphozyten geschont werden, was eine langanhaltende Immunsuppression verhindern könnte. Auch wäre eine spezifischere CAR-T-Zelle interessant, um die teils schweren Nebenwirkungen wie das Zytokin-Freisetzungssyndrom oder die ZNS-Toxizität zu reduzieren [72], [3].

5.3 Integrierung des B-Zell-Rezeptor-Antigens LRPAP1 in ein IgG-Antikörperformat

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurde LRPAP1 in ein Volllänge-Immunglobulin G (IgG) Antikörper-Therapieformat integriert. Als Vorlage diente ein IgG-Antikörper, dessen variable Region der Leicht- und Schwereketten durch die Epitop-Region des Autoantigens LRPAP1 mittels gentechnologischer Verfahren ausgetauscht wurde. LRPAP1 besitzt 358 Aminosäuren mit 1074 Nukleotiden. Die BZR-bindende Epitop-Region befindet sich in dem Aminosäureabschnitt AA 264-318 [72].

Die so klonierten LRPAP1 BAR-Produkte wurden von uns, in Anlehnung an das englische Wort für Antikörper, LRPAP1 BAR-bodies genannt.

Durch die Bindung des BAR-body an Mantelzell-Lymphomzellen mit LRPAP1-reaktiven B-Zell-Rezeptoren, wird eine antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität hervorgerufen. An seinen freien Fc-Teil können Fc γ -Rezeptor-tragende NK-Zellen binden, wodurch zytotoxische Mediatoren ausgeschüttet werden, was zur Lyse der Antikörper-markierten Target-Zelle führt [22].

Bis auf die oben angesprochenen BAR-CAR-Konzepte, die nur theoretisch erörtert wurden, konnten BARs bereits in verschiedene Therapieformate integriert werden. Hierzu zählen BAR-Immuntoxine, bispezifische BAR-bodies und BAR-bodies im IgG-Format. Welches dieser Formate am besten für die weitere Entwicklung und den Einsatz im Menschen geeignet ist, bleibt noch zu klären.

5.3.1 Vorteile der LRPAP1 BAR-bodies

Das IgG-Antikörper-Format ist ein seit 25 Jahren therapeutisch und diagnostisch benutztes und etabliertes Format, mit dem bereits zahlreiche Erfahrungen gesammelt werden konnten. Da es den natürlich im Menschen vorkommenden IgG-Antikörpern ähnelt, zeigt es ein

pharmakokinetisch und -dynamisch ähnliches Verhalten. Das Risiko unerwarteter und unerwünschter Wirkungen auf den Organismus, das zu Beginn einer jeden neuen Therapie besteht, könnte demnach geringer sein als bei Verwendung neuer Formate wie Immuntoxine und bispezifische Konstrukte.

Der herausragende Vorteil, der allen BAR-Therapieansätzen gemeinsam ist, ist die Tatsache, dass nicht alle B-Lymphozyten angegriffen werden, wie es bei den bisher verfügbaren Lymphom-Therapien und insbesondere den Antikörper-Therapien der Fall ist. Dadurch könnte die große Gefahr opportunistischer und lebenslimitierender Infektionen vermindert werden.

Ein weiterer Vorteil von Immuntherapien im Allgemeinen ist, dass deren zytotoxische Wirkung unabhängig von der Phase des Zellzyklus ist. Dies steht im Gegensatz zur klassischen Chemotherapie, die nur auf proliferierende Zellen wirkt [13]. Auch könnte durch die zusätzliche Gabe von Immuntherapeutika, wie den BAR-bodies, die Dosis der Chemotherapeutika reduziert werden, was zu einer Abschwächung deren möglichen Nebenwirkungen führen könnte.

Die im Zuge dieser Arbeit hergestellten LRPAP1 BAR-bodies wurden von eukaryotischen HEK293 T-Zellen produziert. Durch diese eukaryotische Herstellung ist die Therapie potentiell im Menschen anwendbar.

Bei der prokaryotischen Herstellung von Proteinen besteht der Nachteil, dass das Protein in einer Form vorliegt, welche eine Anwendung im Menschen nicht erlaubt. Gründe hierfür können eine unkorrekte Faltung, das Fehlen von posttranslationalen Modifikationen oder das Vorhandensein von bakteriellen Strukturen sein, die eine erfolgreiche Wirkung im Menschen verhindern.

Das LRPAP1 BAR-Therapiekonzept zeigt Ähnlichkeiten zu den Konzepten der anti-idiotypischen Antikörper und der Peptibodies. Während diese jedoch für jeden Patienten individuell entworfen werden müssen, können LRPAP1 BAR-Konstrukte aufgrund des hohen Anteils von MCL-BZRen mit Spezifität für LRPAP1 für eine bedeutende Zahl der MCL-Patienten verwendet werden [75].

5.3.2 Nachteile der LRPAP1 BAR-bodies

Neben den vielen Vorteilen sind auch die möglichen Nachteile von LRPAP1 BAR-bodies im IgG-Format zu diskutieren.

Da bisher nur *in-vitro* Daten vorliegen, können zunächst nur theoretische Überlegungen über die Pharmakokinetik von BAR-bodies angestellt werden.

Dank der Ähnlichkeit zu natürlichen Immunglobulinen und der jahrelangen Erfahrung im therapeutischen und diagnostischen Bereich mit den ähnlich aufgebauten monoklonalen Antikörpern erwarten wir vorhersehbare, den IgG-Antikörpern vergleichbare, pharmakokinetische Eigenschaften.

Noch ungeklärt sind die biochemischen Funktionen von LRPAP1. Das gesamte Bindungspotential von LRPAP1 muss erforscht werden, bevor das LRPAP1 BAR-body Konstrukt im Menschen angewandt werden kann. So müssen u.a. zunächst Kreuzreaktivitäten mit anderen LRPAP1-Rezeptoren mit unerwünschten toxischen Reaktionen ausgeschlossen werden.

Wenn LRPAP1 an Rezeptoren mit essentiellen Funktionen bindet, kann der Antikörper nicht verabreicht werden, da die Gefahr besteht, dass gesundes Gewebe getötet oder wichtige Signalwege im Körper gehemmt werden. Außerdem kann ein ständiges Angebot von LRPAP1 dazu führen, dass eine ununterbrochene Stimulation seiner Rezeptoren stattfindet, was zu unerwünschten, nicht absehbaren Konsequenzen führen könnte.

5.4 Beantwortung der Fragestellung

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass nicht nur die Herstellung von LRPAP1 BAR-bodies gelungen ist, sondern auch in funktionellen Tests deren Bindungsfähigkeit und Lysekapazität nachgewiesen wurde.

Mittels Durchflusszytometrie konnte nachgewiesen werden, dass eine spezifische Bindung ausschließlich zwischen LRPAP1 BAR-body und LRPAP1-reaktiver MCL-Zelle stattfindet. Wie mittels LDH-Cytotox-Release-Assays gezeigt werden konnte, üben LRPAP1 BAR-bodies eine zytotoxische Wirkung auf MCL-Zellen, die einen LRPAP1-reaktiven BZR exprimieren, aus. Zu anderen Zellen erfolgte keine Bindung und demzufolge wurde keine zytotoxische Reaktion in diesen Zellen hervorgerufen. Übertragen auf eine Anwendung im Menschen könnte dies bedeuten, dass LRPAP1 BAR-bodies eine mögliche neue Therapieoption für einen großen Anteil von Patienten mit Mantelzell-Lymphom darstellen.

6. Literaturverzeichnis

1. Bewarder M, Kiefer M, Will H, Olesch K, Moelle C, Stilgenbauer S, Christofyllakis K, Kaddu-Mulindwa D, Bittenbring JT, Fadle N, Regitz E, Kaschek L, Hoth M, Neumann F, Preuss K-D, Pfreunds Schuh M, Thurner L (2021) The B-cell Receptor Autoantigen LRPAP1 Can Replace Variable Antibody Regions to Target Mantle Cell Lymphoma Cells. *HemaSphere* 5:e620
2. Brinkmann U, Kontermann RE (2017) The making of bispecific antibodies. *mAbs* 9:182–212
3. Chen Y, Sun J, Liu H, Yin G, Xie Q (2019) Immunotherapy Deriving from CAR-T Cell Treatment in Autoimmune Diseases. *J Immunol Res* 2019:1–9
4. Cytotoxicity Detection Kit^{PLUS} (LDH) <https://labettor.com/uploads/products/protocols/469.pdf>. Abgerufen Am 8.8.2021, 15:30:
5. Dameshek W, Schwartz RS (1959) Editorial: Leukemia and Auto-immunization—Some Possible Relationships. *Blood* 14:1151–1158
6. Davids MS, Roberts AW, Seymour JF, Pagel JM, Kahl BS, Wierda WG, Puvvada S, Kipps TJ, Anderson MA, Salem AH, Dunbar M, Zhu M, Peale F, Ross JA, Gressick L, Desai M, Kim SY, Verdugo M, Humerickhouse RA, Gordon GB, Gerecitano JF (2017) Phase I First-in-Human Study of Venetoclax in Patients With Relapsed or Refractory Non-Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol* 35:826–833
7. Doronina SO, Toki BE, Torgov MY, Mendelsohn BA, Cerveny CG, Chace DF, DeBlanc RL, Gearing RP, Bovee TD, Siegall CB, Francisco JA, Wahl AF, Meyer DL, Senter PD (2003) Development of potent monoclonal antibody auristatin conjugates for cancer therapy. *Nat Biotechnol* 21:778–784
8. Dreyling M, Jurczak W, Jerkeman M, Silva RS, Rusconi C, Trneny M, Offner F, Caballero D, Joao C, Witzens-Harig M, Hess G, Bence-Bruckler I, Cho S-G, Bothos J, Goldberg JD, Enny C, Traina S, Balasubramanian S, Bandyopadhyay N, Sun S, Vermeulen J, Rizo A, Rule S (2016) Ibrutinib versus temsirolimus in patients with relapsed or refractory mantle-cell lymphoma: an international, randomised, open-label, phase 3 study. *The Lancet* 387:770–778
9. Dreyling M, Campo E, Hermine O, Jerkeman M, Le Gouill S, Rule S, Shpilberg O, Walewski J, Ladetto M (2017) Newly diagnosed and relapsed mantle cell lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 28:iv62–iv71
10. Fichtner M, Spies E, Seismann H, Riecken K, Engels N, Gosch B, Dierlamm J, Gerull H, Nollau P, Klapper W, Dreyling M, Binder M, Trepel M (2016) Complementarity determining region-independent recognition of a superantigen by B-cell antigen receptors of mantle cell lymphoma. *Haematologica* 101:e378–e381
11. Forstpointner R, Unterhalt M, Dreyling M, Bock H-P, Repp R, Wandt H, Pott C, Seymour JF, Metzner B, Hanel A, Lehmann T, Hartmann F, Einsele H, Hiddemann W (2006) Maintenance therapy with rituximab leads to a significant prolongation of response duration after salvage therapy with a combination of rituximab, fludarabine, cyclophosphamide, and mitoxantrone (R-FCM) in patients with recurring and refractory follicular and mantle cell lymphomas: results of a prospective randomized study of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *Blood* 108:4003–4008
12. Freitag J, Heink S, Roth E, Wittmann J, Jäck H-M, Kamradt T (2014) Towards the Generation of B-Cell Receptor Retrogenic Mice. *PLoS ONE* 9:e109199
13. Geisslinger G, Menzel S, Gudermann T, Hinz B, Ruth P, Mutschler E (2020) Mutschler Arzneimittelwirkungen: Pharmakologie - Klinische Pharmakologie - Toxikologie. 11., völlig neu bearbeitete Auflage edition. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart

14. Goy A, Sinha R, Williams ME, Kalayoglu Besisik S, Drach J, Ramchandren R, Zhang L, Cicero S, Fu T, Witzig TE (2013) Single-Agent Lenalidomide in Patients With Mantle-Cell Lymphoma Who Relapsed or Progressed After or Were Refractory to Bortezomib: Phase II MCL-001 (EMERGE) Study. *J Clin Oncol* 31:3688–3695
15. Grafische Darstellung der PBMCs <https://www.cellapplications.com/human-peripheral-blood-mononuclear-cells-pbmc-mnc-pb>. Abgerufen Am 8.8.2021, 15:23:
16. Grass S, Preuss K-D, Ahlgrimm M, Fadle N, Regitz E, Pfoehler C, Murawski N, Pfreundschuh M (2009) Association of a dominantly inherited hyperphosphorylated paraprotein target with sporadic and familial multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: a case–control study. *Lancet Oncol* 10:950–956
17. Grass S, Preuss K-D, Pfreundschuh M (2010) Autosomal-dominant inheritance of hyperphosphorylated paratarg-7. *Lancet Oncol* 11:12
18. Grass S, Preuss K-D, Wikowicz A, Terpos E, Ziepert M, Nikolaus D, Yang Y, Fadle N, Regitz E, Dimopoulos MA, Treon SP, Hunter ZR, Pfreundschuh M (2011) Hyperphosphorylated paratarg-7: a new molecularly defined risk factor for monoclonal gammopathy of undetermined significance of the IgM type and Waldenström macroglobulinemia. *Blood* 117:2918–2923
19. Hadzidimitriou A, Agathangelidis A, Darzentas N, Murray F, Delfau-Larue M-H, Pedersen LB, Lopez AN, Dagklis A, Rombout P, Beldjord K, Kolstad A, Dreyling MH, Anagnostopoulos A, Tsaftaris A, Mavragani-Tsipidou P, Rosenwald A, Ponzoni M, Groenen P, Ghia P, Sander B, Papadaki T, Campo E, Geisler C, Rosenquist R, Davi F, Pott C, Stamatopoulos K (2011) Is there a role for antigen selection in mantle cell lymphoma? Immunogenetic support from a series of 807 cases. *Blood* 118:3088–3095
20. Hamblin TJ, Abdul-Ahad AK, Gordon J, Stevenson FK, Stevenson GT (1980) Preliminary experience in treating lymphocytic leukaemia with antibody to immunoglobulin idiotypes on the cell surfaces. *Br J Cancer* 42:495–502
21. Handunnetti SM, Anderson MA, Burbury K, Hicks RJ, Birbirs B, Bressel M, Di Iulio J, Westerman DA, Lade S, Agarwal R, Dawson MA, Dawson S-J, Koldej R, Ritchie D, Seymour JF, Roberts AW, Tam CS (2019) Three Year Update of the Phase II ABT-199 (Venetoclax) and Ibrutinib in Mantle Cell Lymphoma (AIM) Study. *Blood* 134:756–756
22. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Löffler G, Petrides PE, Herausgeber (2014) Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9., vollständig überarbeitete Auflage edition. Springer, Berlin Heidelberg
23. Hermine O, Hoster E, Walewski J, Bosly A, Stilgenbauer S, Thieblemont C, Szymczyk M, Bouabdallah R, Kneba M, Hallek M, Salles G, Feugier P, Ribrag V, Birkmann J, Forstpointner R, Haioun C, Hänel M, Casasnovas RO, Finke J, Peter N, Bouabdallah K, Sebban C, Fischer T, Dührsen U, Metzner B, Maschmeyer G, Kanz L, Schmidt C, Delarue R, Brousse N, Klapper W, Macintyre E, Delfau-Larue M-H, Pott C, Hiddemann W, Unterhalt M, Dreyling M (2016) Addition of high-dose cytarabine to immunochemotherapy before autologous stem-cell transplantation in patients aged 65 years or younger with mantle cell lymphoma (MCL Younger): a randomised, open-label, phase 3 trial of the European Mantle Cell Lymphoma Network. *The Lancet* 388:565–575
24. Herold G (2018) Innere Medizin 2019: eine vorlesungsorientierte Darstellung: unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung: mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Herold, Gerd, Köln
25. Herstellerangaben zur Immobilon-P Membran von Merck https://www.merckmillipore.com/DE/de/product/Immobilon-P-PVDF-Membrane,MM_NF-IPVH00010#overview. Abgerufen Am 8.8.2021, 14:58:
26. Herz J, Goldstein JL, Strickland DK, Ho YK, Brown MS (1991) 39-kDa protein modulates binding of ligands to low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor. *J Biol Chem* 266:21232–21238

27. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M, Herzenberg LA (2002) The History and Future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and Flow Cytometry: A View from Stanford. *Clin Chem* 48:1819–1827
28. Hess G, Herbrecht R, Romaguera J, Verhoef G, Crump M, Gisselbrecht C, Laurell A, Offner F, Strahs A, Berkenblit A, Hanushevsky O, Clancy J, Hewes B, Moore L, Coiffier B (2009) Phase III Study to Evaluate Temsirolimus Compared With Investigator's Choice Therapy for the Treatment of Relapsed or Refractory Mantle Cell Lymphoma. *J Clin Oncol* 27:3822–3829
29. Hough DW, Eady RP, Hamblin TJ, Stevenson FK, Stevenson GT (1976) Anti-idiotypic sera raised against surface immunoglobulin of human neoplastic lymphocytes. *J Exp Med* 144:960–969
30. Hussell T, Isaacson PG, Spencer J, Crabtree JE (1993) The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to *Helicobacter pylori*. *The Lancet* 342:571–574
31. Inamdar AA, Goy A, Ayoub NM, Attia C, Oton L, Taruvai V, Costales M, Lin Y-T, Pecora A, Suh KS (2016) Mantle cell lymphoma in the era of precision medicine—diagnosis, biomarkers and therapeutic agents. *Oncotarget* 7:48692–48731
32. Kahl BS, Spurgeon SE, Furman RR, Flinn IW, Coutre SE, Brown JR, Benson DM, Byrd JC, Peterman S, Cho Y, Yu A, Godfrey WR, Wagner-Johnston ND (2014) A phase 1 study of the PI3K δ inhibitor idelalisib in patients with relapsed/refractory mantle cell lymphoma (MCL). *Blood* 123:3398–3405
33. Kienle D, Kröber A, Katzenberger T, Ott G, Leupolt E, Barth TFE, Möller P, Benner A, Habermann A, Müller-Hermelink HK, Bentz M, Lichter P, Döhner H, Stilgenbauer S (2003) VH mutation status and VDJ rearrangement structure in mantle cell lymphoma: correlation with genomic aberrations, clinical characteristics, and outcome. *Blood* 102:3003–3009
34. Klinger M, Brandl C, Zugmaier G, Hijazi Y, Bargou RC, Topp MS, Gökbuget N, Neumann S, Goebeler M, Viardot A, Stelljes M, Brüggemann M, Hoelzer D, Degenhard E, Nagorsen D, Baeuerle PA, Wolf A, Kufer P (2012) Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab. *Blood* 119:6226–6233
35. Kluin-Nelemans HC, Hoster E, Hermine O, Walewski J, Trneny M, Geisler CH, Stilgenbauer S, Thieblemont C, Vehling-Kaiser U, Doorduijn JK, Coiffier B, Forstpointner R, Tilly H, Kanz L, Feugier P, Szymczyk M, Hallek M, Kremers S, Lepeu G, Sanhes L, Zijlstra JM, Bouabdallah R, Lugtenburg PJ, Macro M, Pfreundschuh M, Procházka V, Di Raimondo F, Ribrag V, Uppenkamp M, André M, Klapper W, Hiddemann W, Unterhalt M, Dreyling MH (2012) Treatment of Older Patients with Mantle-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 367:520–531
36. Kwak LW, Campbell MJ, Czerwinski DK, Hart S, Miller RA, Levy R (1992) Induction of Immune Responses in Patients with B-Cell Lymphoma against the Surface-Immunoglobulin Idiotype Expressed by Their Tumors. *N Engl J Med* 327:1209–1215
37. Le Gouill S, Thieblemont C, Oberic L, Moreau A, Bouabdallah K, Dartigeas C, Damaj G, Gastinne T, Ribrag V, Feugier P, Casasnovas O, Zerazhi H, Haioun C, Maisonneuve H, Houot R, Jardin F, Van Den Neste E, Tournilhac O, Le Dû K, Morschhauser F, Cartron G, Fornecker L-M, Canioni D, Callanan M, Béné MC, Salles G, Tilly H, Lamy T, Gressin R, Hermine O (2017) Rituximab after Autologous Stem-Cell Transplantation in Mantle-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 377:1250–1260
38. Lee C, Martin P (2020) Watch and Wait in Mantle Cell Lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 34:837–847
39. Levy R, Ganjoo KN, Leonard JP, Vose JM, Flinn IW, Ambinder RF, Connors JM, Berinstein NL, Belch AR, Bartlett NL, Nichols C, Emmanouilides CE, Timmerman JM,

- Gregory SA, Link BK, Inwards DJ, Freedman AS, Matous JV, Robertson MJ, Kunkel LA, Ingolia DE, Gentles AJ, Liu CL, Tibshirani R, Alizadeh AA, Denney DW (2014) Active Idiotype Vaccination Versus Control Immunotherapy for Follicular Lymphoma. *J Clin Oncol* 32:1797–1803
40. Maddocks K (2018) Update on mantle cell lymphoma. *Blood* 132:1647–1656
41. Marcucci F, Mele A (2011) Hepatitis viruses and non-Hodgkin lymphoma: epidemiology, mechanisms of tumorigenesis, and therapeutic opportunities. *Blood* 117:1792–1798
42. Martin T, Weber JC, Levallois H, Labouret N, Soley A, Koenig S, Korganow AS, Pasquali JL (2000) Salivary gland lymphomas in patients with Sjögren’s syndrome may frequently develop from rheumatoid factor B cells. *Arthritis Rheum* 43:908–916
43. Matzdorff A, Fritze D (2008) Krebskrankheiten. Steinkopff, Darmstadt. URL: http://link.springer.com/10.1007/978-3-7985-1564-2_26
44. Meeker TC, Lowder J, Maloney DG, Miller RA, Thielemans K, Warnke R, Levy R (1985) A clinical trial of anti-idiotypic therapy for B cell malignancy. *Blood* 65:1349–1363
45. Miller RA, Maloney DG, Warnke R, Levy R (1982) Treatment of B-Cell Lymphoma with Monoclonal Anti-Idiotypic Antibody. *N Engl J Med* 306:517–522
46. Mugnaini EN, Ghosh N (2016) Lymphoma. *Prim Care Clin Off Pract* 43:661–675
47. Mullis KB, Faloona FA (1987) [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Elsevier URL: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0076687987550236>
48. Myklebust JH, Brody J, Kohrt HE, Kolstad A, Czerwinski DK, Wälchli S, Green MR, Trøen G, Liestøl K, Beiske K, Houot R, Delabie J, Alizadeh AA, Irish JM, Levy R (2017) Distinct patterns of B-cell receptor signaling in non-Hodgkin lymphomas identified by single-cell profiling. *Blood* 129:759–770
49. Myklebust JH, Brody J, Kohrt HE, Kolstad A, Czerwinski DK, Wälchli S, Green MR, Trøen G, Liestøl K, Beiske K, Houot R, Delabie J, Alizadeh AA, Irish JM, Levy R (2017) Distinct patterns of B-cell receptor signaling in non-Hodgkin lymphomas identified by single-cell profiling. *Blood* 129:759–770
50. Narurkar R, Alkayem M, Liu D (2016) SOX11 is a biomarker for cyclin D1-negative mantle cell lymphoma. *Biomark Res* 4:6
51. Neuhaus H, Gaul F, Hollemann T (2018) *lrpap1* as a specific marker of proximal pronephric kidney tubuli in *Xenopus laevis* embryos. *Int J Dev Biol* 62:319–324
52. Oflazoglu E, Kissler KM, Sievers EL, Grewal IS, 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
53. Onkopedia, Leitlinien des Mantelzell-Lymphoms <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/mantelzell-lymphom/@@guideline/html/index.html>. Abgerufen Am 8.8.2021, 13:56:
54. Parsonnet J, Hansen S, Rodriguez L, Gelb AB, Warnke RA, Jellum E, Orentreich N, Vogelman JH, Friedman GD (1994) *Helicobacter pylori* Infection and Gastric Lymphoma. *N Engl J Med* 330:1267–1271
55. Peveling-Oberhag J, Arcaini L, Hansmann M-L, Zeuzem S (2013) Hepatitis C-associated B-cell non-Hodgkin lymphomas. Epidemiology, molecular signature and clinical management. *J Hepatol* 59:169–177
56. Physikalisch-Technische Bundesanstalt - Streuprobleme in der Durchflusszytometrie <https://www.ptb.de/cms/de/ptb/fachabteilungen/abt8/fb-84/ag-841/flowzytometrie-841.html>. Abgerufen Am 8.8.2021, 15:06:
57. Preuss K-D, Pfreundschuh M, Ahlgrimm M, Fadle N, Regitz E, Murawski N, Grass S (2009) A frequent target of paraproteins in the sera of patients with multiple myeloma and MGUS. *Int J Cancer* 125:656–661

58. Preuss K-D, Pfreunds Schuh M, Fadle N, Regitz E, Kubuschok B (2015) Sumoylated HSP90 is a dominantly inherited plasma cell dyscrasias risk factor. *J Clin Invest* 125:316–323
59. Queirós AC, Beekman R, Vilarrasa-Blasi R, Duran-Ferrer M, Clot G, Merkel A, Raineri E, Russiñol N, Castellano G, Beà S, Navarro A, Kulis M, Verdaguer-Dot N, Jares P, Enjuanes A, Calasanz MJ, Bergmann A, Vater I, Salaverría I, van de Werken HJG, Wilson WH, Datta A, Flicek P, Royo R, Martens J, Giné E, Lopez-Guillermo A, Stunnenberg HG, Klapper W, Pott C, Heath S, Gut IG, Siebert R, Campo E, Martín-Subero JI (2016) Decoding the DNA Methylome of Mantle Cell Lymphoma in the Light of the Entire B Cell Lineage. *Cancer Cell* 30:806–821
60. Riaz IB, Zahid U, Kamal MU, Husnain M, McBride A, Hua A, Hamadani AA, George L, Zeeshan A, Sipra Q-AR, Raina A, Rahman B, Puvvada S, Anwer F (2017) Anti-CD 19 and anti-CD 20 CAR-modified T cells for B-cell malignancies: a systematic review and meta-analysis. *Immunotherapy* 9:979–993
61. Robak T, Jin J, Pylypenko H, Verhoef G, Siritanaratkul N, Drach J, Raderer M, Mayer J, Pereira J, Tumyan G, Okamoto R, Nakahara S, Hu P, Appiani C, Nemat S, Cavalli F, Van Hoof A, Sheliga A, Teixeira A, Tomita A, Rocafiguera AO, Suvorov A, Kuzmin A, Khojasteh A, Mezlini A, Golenkov A, Bosly A, Belch A, Van De Velde A, Illes Á, Mukhopadhyay A, Meddeb B, De Prijck B, Garichochea B, Undar B, Gabarrón C, Cao C, Souza C, Farber C, Won Suh C, Burcoveanu CI, Cebotaru CL, Truica C-L, Maruyama D, Belada D, Ben Yehuda D, Udovitsa D, Dolores, Morra E, Späth-Schwalbe E, Gonzalez-Barca E, Osmanov E, Capote FJ, Offner F, Cardenas G, Heß G, Manikhas G, Babu G, Rekhman G, Rossi G, Marques H, Bumbea H, Wang H, Huang H, Choi I, Bulavina I, Lysenko I, Avivi I, Kryachok I, Zaucha JM, Novak J, Díaz J, Demeter J, Alexeeva J, Zhu J, Vilchevskaya K, Ishizawa K, Mauricio K, Tobinai K, Ando K, Abdulkadryrov K, Shih L-Y, Kuzina L, Gumus M, De Wit M, Capra M, Marques M, Golubeva M, Ojeda-Urbe M, Kyselyova M, Taniwaki M, Federico M, Crump M, Baccarani M, Ogura M, Egyed M, Udvardy M, Kurosawa M, Uike N, Khuageva N, Shpilberg O, Gladkov O, Samoiloa O, Serduk O, Santi P, Zachee P, Kaplan P, Stoia R, Gressin R, Arranz R, Greil R, Grosicki S, Cancelado S, Nair S, Le Gouill S, Van Steenweghen S, Yoon S-S, Chuncharune S, Scheider T, Shimoyama T, Liu T, Kinoshita T, Uchida T, Bunworasate U, Vitolo U, Pavlov V, Phooskooor VR, Lima V, Merkulov V, Nawarawong W, Hong X, Ke X, Terui Y, Tee Goh Y, Maeda Y, Shi Y, Dunaev Y, Lorie Y, Wang Z, Shen Z, Borbenyi Z, Gasztonyi Z, Masliak Z (2018) Frontline bortezomib, rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone (VR-CAP) versus rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (R-CHOP) in transplantation-ineligible patients with newly diagnosed mantle cell lymphoma: final overall survival results of a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet Oncol* 19:1449–1458
62. Ruan J, Martin P, Shah B, Schuster SJ, Smith SM, Furman RR, Christos P, Rodriguez A, Svoboda J, Lewis J, Katz O, Coleman M, Leonard JP (2015) Lenalidomide plus Rituximab as Initial Treatment for Mantle-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 373:1835–1844
63. Rückels MF (2000) Entwicklung und Applikation neuartiger Verfahren zur differentiellen Genexpressionsanalyse: DASH und NewRACE. Utz, München
64. Rule S, Jurczak W, Jerkeman M, Rusconi C, Trneny M, Offner F, Caballero D, Joao C, Witzens-Harig M, Hess G, Bence-Bruckler I, Cho S-G, Thieblemont C, Zhou W, Henninger T, Goldberg J, Vermeulen J, Dreyling M (2018) Ibrutinib versus temsirolimus: 3-year follow-up of patients with previously treated mantle cell lymphoma from the phase 3, international, randomized, open-label RAY study. *Leukemia* 32:1799–1803
65. Saadoun D, Suarez F, Lefrere F, Valensi F, Mariette X, Aouba A, Besson C, Varet B, Troussard X, Cacoub P, Hermine O (2005) Splenic lymphoma with villous lymphocytes, associated with type II cryoglobulinemia and HCV infection: a new entity? *Blood* 105:74–76
66. Saba NS, Liu D, Herman SEM, Underbayev C, Tian X, Behrend D, Weniger MA, Skarzynski M, Gyamfi J, Fontan L, Melnick A, Grant C, Roschewski M, Navarro A, Beà S,

- Pittaluga S, Dunleavy K, Wilson WH, Wiestner A (2016) Pathogenic role of B-cell receptor signaling and canonical NF- κ B activation in mantle cell lymphoma. *Blood* 128:82–92
67. Shimamoto G, Gegg C, Boone T, Queva C (2012) Peptibodies: A flexible alternative format to antibodies. *mAbs* 4:586–591
68. Stevenson FK, North GJS, Hamblin TJ, Glennie MJ (1989) Identification of normal B-cell counterparts of neoplastic cells which secrete cold agglutinins of anti-I and anti-i specificity. *Br J Haematol* 72:9–15
69. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES (2016) The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127:2375–2390
70. Thurner L, Preuss K-D, Bewarder M, Kemele M, Fadle N, Regitz E, Altmeyer S, Schormann C, Poeschel V, Ziepert M, Walter S, Roth P, Weller M, Szczepanowski M, Klapper W, Monoranu C, Rosenwald A, Möller P, Hartmann S, Hansmann M-L, Mackensen A, Schäfer H, Schorb E, Illerhaus G, Buslei R, Bohle RM, Stilgenbauer S, Kim Y-J, Pfreundschuh M (2018) Hyper-N-glycosylated SAMD14 and neurabin-I as driver autoantigens of primary central nervous system lymphoma. *Blood* 132:2744–2753
71. Thurner L, Hartmann S, Preuss K-D, Bewarder M (2018) The riddle of lymphoma BCR-antigenes. *Oncotarget* 9:35805–35806
72. Thurner L, Hartmann S, Fadle N, Kemele M, Bock T, Bewarder M, Regitz E, Neumann F, Nimmegern A, von Müller L, Pott C, Kim Y-J, Bohle RM, Wasik M, Schuster SJ, Hansmann M-L, Preuss K-D, Pfreundschuh M (2019) LRPAP1 is a frequent proliferation-inducing antigen of BCRs of mantle cell lymphomas and can be used for specific therapeutic targeting. *Leukemia* 33:148–158
73. Thurner L, Fadle N, Bittenbring JT, Regitz E, Schuck R, Cetin O, Stuhr A, Rixecker T, Murawski NM, Poeschel V, Kaddu-Mulindwa D, Preuss KD, Stilgenbauer S, Hermine O, Kluin-Nelemans JC, Hartmann S, Dreyling M, Pott C, Bewarder M, Hoster E (2021) *LRPAP1-autoantibodies in mantle cell lymphoma are associated with superior outcome*. *Blood* blood.2020008835
74. TOPO® TA Cloning® Kit
http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/topota_man.pdf. Abgerufen Am 8.8.2021, 14:52:
75. Torchia J, Weiskopf K, Levy R (2016) Targeting lymphoma with precision using semisynthetic anti-idiotypic peptibodies. *Proc Natl Acad Sci* 113:5376–5381
76. Trněný M, Lamy T, Walewski J, Belada D, Mayer J, Radford J, Jurczak W, Morschhauser F, Alexeeva J, Rule S, Afanasyev B, Kaplanov K, Thyss A, Kuzmin A, Voloshin S, Kuliczowski K, Giza A, Milpied N, Stelitano C, Marks R, Trümper L, Biyukov T, Patturajan M, Bravo M-LC, Arcaini L (2016) Lenalidomide versus investigator's choice in relapsed or refractory mantle cell lymphoma (MCL-002; SPRINT): a phase 2, randomised, multicentre trial. *Lancet Oncol* 17:319–331
77. Walsh SH (2003) Mutated VH genes and preferential VH3-21 use define new subsets of mantle cell lymphoma. *Blood* 101:4047–4054
78. Wang M, Munoz J, Goy A, Locke FL, Jacobson CA, Hill BT, Timmerman JM, Holmes H, Jaglowski S, Flinn IW, McSweeney PA, Miklos DB, Pagel JM, Kersten M-J, Milpied N, Fung H, Topp MS, Houot R, Beitinjaneh A, Peng W, Zheng L, Rossi JM, Jain RK, Rao AV, Reagan PM (2020) KTE-X19 CAR T-Cell Therapy in Relapsed or Refractory Mantle-Cell Lymphoma. *N Engl J Med* 382:1331–1342
79. Wang ML, Rule S, Martin P, Goy A, Auer R, Kahl BS, Jurczak W, Advani RH, Romaguera JE, Williams ME, Barrientos JC, Chmielowska E, Radford J, Stilgenbauer S, Dreyling M, Jędrzejczak WW, Johnson P, Spurgeon SE, Li L, Zhang L, Newberry K, Ou Z, Cheng N, Fang B, McGreivy J, Clow F, Buggy JJ, Chang BY, Beaupre DM, Kunkel LA, Blum KA (2013) Targeting BTK with Ibrutinib in Relapsed or Refractory Mantle-Cell

Lymphoma. *N Engl J Med* 369:507–516

80. Weltgesundheitsorganisation (2017) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Revised 4th edition edition. International Agency for Research on Cancer, Lyon
81. Wolf E, Hofmeister R, Kufer P, Schlereth B, Baeuerle PA (2005) BiTEs: bispecific antibody constructs with unique anti-tumor activity. *Drug Discov Today* 10:1237–1244
82. Wotherspoon A (1991) Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *The Lancet* 338:1175–1176
83. Wotherspoon Andrew C, Doglioni C, de Boni M, Spencer J, Isaacson Peter G, Harris AW, Misiewicz JJ (1994) Antibiotic treatment for low-grade gastric MALT lymphoma. *The Lancet* 343:1503
84. Ye H, Desai A, Zeng D, Nomie K, Romaguera J, Ahmed M, Wang ML (2017) Smoldering mantle cell lymphoma. *J Exp Clin Cancer Res* 36:185
85. Ye H, Desai A, Zeng D, Romaguera J, Wang ML (2018) Frontline Treatment for Older Patients with Mantle Cell Lymphoma. *The Oncologist* 23:1337–1348
86. Young RM, Staudt LM (2013) Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nat Rev Drug Discov* 12:229–243
87. Zetrum für Krebsregisterdaten - Krebsverteilung in Deutschland 2016
https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/krebsarten_inhalt.html. Abgerufen Am 8.8.2021, 14:40:

7. Publikationen/Danksagung

Publikationen

Hemasphere 2021: Moritz Bewarder, Maximilian Kiefer, Helene Will, Kathrin Olesch, Clara Moelle, Stephan Stilgenbauer, Konstantinos Christofyllakis, Dominic Kaddu-Mulindwa, Joerg Thomas Bittenbring, Natalie Fadle, Evi Regitz, Lea Kaschek, Markus Hoth, Frank Neumann, Klaus-Dieter Preuss, Michael Pfreundschuh † and Lorenz Thurner. The B-cell Receptor Auto-antigen LRPAP1 can Replace Variable Antibody Regions to target Mantle Cell Lymphoma Cells

Danksagung

Mein Dank gilt Dr. med. Lorenz Thurner, kommissarischer Chefarzt der Klinik für Innere Medizin I der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar für die Ermöglichung dieser Dissertationsarbeit.

Des Weiteren möchte ich allen Mitarbeitern des José Carreras Centers für Immun- und Gentherapie in Homburg danken, im Besonderen Evi Regitz und Natalie Fadle für ihre Erklärungen und Bemühungen mir die Arbeit im Labor näher zu bringen. Sie waren bei Problemen stets ansprechbar und hilfsbereit.

Auch bei meinem Betreuer Dr. med. Moritz Bewarder, Oberarzt der Klinik für Innere Medizin I der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar möchte ich mich nicht nur für die Vergabe dieser Forschungsarbeit bedanken, sondern auch für seine Bemühungen und seine Unterstützung.

Einen besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums aussprechen. Meiner Mutter gebührt herzlichster Dank für jegliche Unterstützung während der Schulzeit, des Studiums aber auch in der Zeit der Verfassung dieser Dissertationsarbeit. Ohne sie wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin.

Ein weiteres großes Dankeschön gebührt meiner sehr guten Freundin Sara Gabriel. Sie hat mich stets aufs Neue motiviert und war eine unglaublich wertvolle Unterstützung durch ihre große Leidenschaft und Talent des Lektorierens.

Danken möchte ich auch meiner sehr guten Freundin Catharina Weichert ohne deren Hilfe unter anderem beim Erstellen von Graphiken ich immer noch vor dem Programm Paint sitzen würde mit dem ständigen Wechsel zwischen der Mal- und Radierfunktion.