

Aus der Klinik für Innere Medizin I
Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie und Rheumatologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. Stephan Stilgenbauer

**Integrierung des B-Zell-Rezeptor-Antigens Neurabin-I in ein IgG1-Antikörper-Format
zur Therapie des primären diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms des ZNS**

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

2021

vorgelegt von: Clara Léonie Moelle
geb. am: 01.10.1998 in Frankfurt am Main

Tag der Promotion: 01. September 2021

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

Berichterstatter: Prof. Dr. Stephan Stilgenbauer

Prof. Dr. Magali Madry

Inhalt

Abbildungsverzeichnis.....	4
Tabellenverzeichnis.....	5
Abkürzungsverzeichnis.....	6
1. Zusammenfassung.....	9
2. Einleitung	11
2.1 Das primäre diffus großzellige B-Zell-Lymphom des ZNS	11
2.2 Pathogenese.....	11
2.3 Klinik	15
2.4 Diagnostik.....	15
2.5 Therapie	17
2.6 Bedeutung von Neurabin-I für das PZNSL	20
2.7 Das BAR-Therapiekonzept	22
2.8 Fragestellung	23
3. Material und Methodik	24
3.1 Material.....	24
3.1.1 Laborgeräte und Computerprogramme.....	24
3.1.2 Molekularbiologie.....	25
3.1.3 Zellkultur.....	26
3.1.4 Proteinchemie und Immunologie	26
3.1.5 Kits	27
3.1.6 Lösungen und Medien	27
3.1.7 Enzyme	29
3.1.8 Primer.....	29
3.1.9 Vektoren und Plasmide	30
3.1.10 Antikörper	30
3.1.11 Zelllinien	30
3.2 Methoden der Molekularbiologie	31
3.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion.....	31
3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	32
3.2.3 Transformation	33
3.2.4 Vermehrung der transformierten Bakterien.....	33
3.2.5 Klonscreening.....	33
3.2.6 Plasmid-DNA-Isolierung	34
3.2.7 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	34
3.2.8 Sequenzierung	34
3.2.9 Restriktionsenzymverdau	34
3.2.10 DNA-Aufreinigung nach Restriktionsenzymverdau	35

3.2.11 Ligation.....	35
3.2.12 pCR [®] 2.1-TOPO-Klonierungsvektor.....	35
3.3 Methoden der Zellkultur	36
3.3.1 Kultivierung von HEK-293T-Zellen.....	36
3.3.2 Kultivierung von U-2932-Zellen.....	36
3.3.3 Kultivierung von PBMCs	36
3.3.4 Expression des gegen Neurabin-I gerichteten BZR in U-2932-Zellen	36
3.3.5 Gewinnung des in den Überstand sezernierten Proteins	37
3.3.6 Transfektion.....	37
3.3.7 Isolierung von PBMCs	38
3.3.8 Zellzahlbestimmung mithilfe der Neubauer-Zählkammer	38
3.4 Methoden der Immunologie und Proteinchemie	38
3.4.1 Konzentrierung des Überstands	38
3.4.2 Aufreinigung des Überstands	38
3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	39
3.4.4 Transfer.....	40
3.4.5 Blockung	40
3.4.6 Immundetektion.....	40
3.4.7 Chemolumineszenz	40
3.4.8 Coomassie-Gelfärbung.....	41
3.4.9 Konzentrationsbestimmung von Eluaten.....	41
3.4.10 Durchflusszytometrie	41
3.4.11 LDH-Assay	42
4. Ergebnisse	43
4.1 Klonierung des IgG1-Neurabin-I-BAR-Bodys	43
4.1.1 Amplifikation der Neurabin-I-DNA.....	45
4.1.2 Klonierung der Neurabin-I-DNA in die VH-Position des IgG1-Vektors.....	46
4.1.3 Klonierung der Neurabin-I-DNA in die VL-Position des IgG1-Vektors	47
4.1.4 Klonierung des fertigen Konstruktes in den Expressionsvektor.....	48
4.2 Expression des IgG1-Neurabin-I-BAR-Bodys.....	50
4.2.1 Transfektion.....	50
4.2.2 Aufreinigung des IgG1-Neurabin-I-BAR-Bodys.....	51
4.3 Funktionstests.....	52
4.3.1 Durchflusszytometrie	52
4.3.2 LDH-Assay	54
5. Diskussion.....	57
5.1 Das BAR-Konzept in der PZNSL-Therapie.....	57
5.2 Der BAR-Body als Mediator der Zytotoxizität	60
5.3 Das humane IgG1 als Therapieformat	62
5.4 Ausblick	64

5.4.1 Ausstehende Verifikation der Ergebnisse an PZNSL-Zelllinien	64
5.4.2 Untersuchung weiterer PZNSL-Proben auf die Zielstruktur des BAR-Bodys.....	64
5.4.3 Beschränkung des Therapiekonzepts durch die Blut-Hirn-Schranke.....	64
5.4.4 Strategien zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke	66
5.4.5 Möglichkeit der Anwendung des BAR-Bodys zur Therapie von ZNS-Lymphomen bei immunsupprimierten Patienten	67
5.4.6 Fazit	68
6. Literaturverzeichnis	69
7. Publikationen und Dank.....	81
7.1 Publikationen	81
7.2 Dank	81

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Ausschnitt aus der Proteinsequenz der Isoform 3 von Neurabin-I	43
Abbildung 2	Ausschnitt aus dem verwendeten IgG1-Vektor	44
Abbildung 3	Klonierungsschritte für die Konstruktion des IgG1-Neurabin-I-BAR-Bodys	44
Abbildung 4	PCR-Kontrolle der Amplifikation der Neurabin-I-DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese	45
Abbildung 5	PCR-Kontrolle der Integration von NRB-VH und NRB-VL in den pCR [®] 2.1-TOPO-Vektor mittels Agarose-Gelelektrophorese	46
Abbildung 6	Kontrolle des Restriktionsenzymverdaus des IgG1-Vektors und der NRB-VH-DNA mit <i>BstEII</i> und <i>MunI</i> mittels Agarose-Gelelektrophorese	46
Abbildung 7	PCR-Kontrolle der Integration von NRB-VH in den IgG1-Vektor mittels Agarose-Gelelektrophorese	47
Abbildung 8	Kontrolle des Restriktionsenzymverdaus des IgG1-NRB-VH-Vektors und der NRB-VL-DNA mit <i>SmaI</i> und <i>AgeI</i> mittels Agarose-Gelelektrophorese	47
Abbildung 9	PCR-Kontrolle der Integration von NRB-VL in den IgG1-NRB-VH-Vektor mittels Agarose-Gelelektrophorese	48
Abbildung 10	Kontrolle des Restriktionsenzymverdaus der IgG1-Sequenz mit <i>Eco47III</i> mittels Agarose-Gelelektrophorese	49
Abbildung 11	PCR-Kontrolle der Integration des IgG1-Inserts in den pSfi-Vektor mittels Agarose-Gelelektrophorese	49
Abbildung 12	Kontrolle des Restriktionsenzymverdaus des pSfi-IgG1-Vektors mit <i>BstEII</i> mittels Agarose-Gelelektrophorese	50
Abbildung 13	Nachweis des FLAG-markierten IgG1-Neurabin-I-BAR-Bodys aus transfizierten HEK-293T-Zellen vier Tage nach Transfektion mittels Western-Blots	51
Abbildung 14	Nachweis des FLAG-markierten IgG1-Neurabin-I-BAR-Bodys im aufgereinigten Eluat mit einem Coomassie-G-gefärbten SDS-Gel und mittels Western-Blots	52
Abbildung 15	Durchflusszytometrische Analyse der APC-Intensität der Zielzellen in den mit dem IgG1-Neurabin-I-BAR-Body und dem IgG1-LRPAP1-BAR-Body inkubierten Ansätzen	53
Abbildung 16	Lyse von U-2932-Zellen mit und ohne Neurabin-I-reaktiven BZR	55
Abbildung 17	Spezifische Zelllyse in U-2932-Zellen mit Neurabin-I reaktivem BZR in Abhängigkeit der Konzentration des IgG1-Neurabin-I-BAR-Bodys	56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Ergebnisse des LDH-Assays	55
-----------	---------------------------	----

Abkürzungsverzeichnis

ABC	Activated B cell like (aktivierter B-Zell-Typ)
ADCC	Antibody-dependent cellular cytotoxicity (antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität)
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARS2	Arsenite resistance protein 2
as	Antisense
AWK	Antikörper-Wirkstoff-Konjugat
aq. dest.	Aqua destillata
BAR	B cell receptor antigens for reverse targeting
BCL	B cell lymphoma
bp	Basenpaare
BTK	Bruton-Tyrosinkinase
BZR	B-Zell-Rezeptor
CARD11	Caspase recruitment domain family member 11
CAR-T-Zellen	Chimäre Antigenrezeptor-T-Zellen
CCR	CC-Motiv-Chemokinrezeptor
CD	Cluster of differentiation
CDC	Complement-dependent cytotoxicity (komplementabhängige Zytotoxizität)
CDCC	Complement-dependent cellmediated cytotoxicity (komplementabhängige zellvermittelte Zytotoxizität)
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CH	Heavy chain constant region (konstante Domäne der schweren Kette)
CL	Light chain constant region (konstante Domäne der leichten Kette)
CNS	Central nervous system
CT	Computertomographie
CXCL	CXC-Motiv-Chemokinligand
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
DLBCL	Diffuse large B cell lymphoma (diffus großzelliges B-Zell-Lymphom)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E. coli	Escherichia coli
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Fab	Fragment antigen binding (Antigen-bindendes Fragment)

Fc	Fragment crystallizable (kristallisierbares Fragment)
FCS	Fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FDG-PET	Fluordesoxyglucose-Positronen-Emissions-Tomographie
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HD-ASZT	Hoch dosierte myeloablative Chemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation
HD-MTX	Hoch dosiertes Methotrexat
HEK-Zellen	Human embryonic kidney cells (humane embryonale Nierenzellen)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
H-Kette	Heavy (schwere) Kette
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
LB	Lysogeny Broth
LDH	Lactatdehydrogenase
L-Kette	Light (leichte) Kette
LRPAP1	Low-density lipoprotein receptor-related protein-associated protein 1
MATRIX	Methotrexat, Cytarabin, Thiotepa, Rituximab
MHC	Major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MUM1	Multiple myeloma oncogene 1
MYD88	Myeloid differentiation primary response 88
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
Neurabin-I bzw. NRB	Neural tissue-specific F-actin-binding protein I
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLEQ	Asparagin, Leucin, Glutaminsäure, Glutamin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells (mononukleäre Zellen des peripheren Bluts)
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Ketten-Reaktion)
PD-L	Programmed cell death ligand
PPP1R9A	Protein phosphatase 1 regulatory subunit 9A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PZNSL	Primäres Lymphom des zentralen Nervensystems
R-CHOP	Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)

s	Sense
SAMD	Sterile α -motif domain
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SHM	Somatische Hypermutation
SOC	Super optimal broth with catabolite repression
SV40	Simian-Virus 40
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	TRIS-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNFAIP3	Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Protein 3
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
UV	Ultraviolett
VH	Heavy chain variable region (variable Domäne der schweren Kette)
VL	Light chain variable region (variable Domäne der leichten Kette)
WBRT	Whole brain radiotherapy (Ganzhirnbestrahlung)
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Zusammenfassung

Diese Arbeit stellt ein IgG1-Therapieformat vor, das die malignen B-Lymphozyten des primären diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms des zentralen Nervensystems über den Neurabin-I-reaktiven B-Zell-Rezeptor angreift. Die Ergebnisse der zugrundeliegenden Versuche zeigen, dass durch dieses Therapieformat *in vitro* maligne Zellen gezielt zerstört werden können.

Maligne B-Lymphozyten des primären diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms des zentralen Nervensystems weisen einen intakten B-Zell-Rezeptor auf und haben somatisch rekombinierte und hypermutierte Immunglobulin-Gene. Dies indiziert, dass die Zellen im Rahmen einer Keimzentrumsreaktion Kontakt mit einem Antigen hatten und fortlaufend durch das Antigen stimuliert werden. Für B-Zell-Rezeptoren des primären diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms des zentralen Nervensystems wurde das im Nervengewebe exprimierte Protein Neurabin-I als dominierendes Antigen identifiziert, auf dessen Reiz hin die Zellen proliferieren. Die Neurabin-I-reaktiven B-Zell-Rezeptoren stellen eine tumorspezifische Oberflächenstruktur der malignen Klone dar. Über diese können durch Verwendung des B-Zell-Rezeptor-Antigens Neurabin-I die Tumorzellen im Rahmen des BAR-Konzepts (B cell receptor antigens for reverse targeting) angegriffen werden.

In dem durch diese Arbeit beschriebenen Versuch wurde ein Abschnitt des Neurabin-I-Epitops anstelle der variablen Domänen der leichten und schweren Kette eines Immunglobulins in ein IgG1-Format kloniert. Das Konstrukt wird IgG1-Neurabin-I-BAR-Body genannt. Nach Klonierung, Expression in humanen Zellen und Aufreinigung wurde der BAR-Body *in vitro* getestet. Es konnte nachgewiesen werden, dass der BAR-Body spezifisch an Zielzellen bindet, die einen Neurabin-I-reaktiven B-Zell-Rezeptor auf der Oberfläche exprimieren, wodurch die Zielzellen für Effektorzellen markiert werden. So konnte eine durch Effektorzellen vermittelte Lyse der mit dem BAR-Body beladenen Tumorzellen erreicht werden.

Der Einsatz des BAR-Bodys *in vivo* ist dadurch limitiert, dass dieser vermutlich die Blut-Hirn-Schranke nicht gut überwinden kann. Es bedarf eines auf den BAR-Body angewandten Konzepts zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke, das gleichzeitig eine Interaktion des BAR-Bodys mit dem B-Zell-Rezeptor gewährleistet. Wenn ein solches Konzept gefunden wird, könnten Patienten mit dem untersuchten Therapieformat von einer höchst spezifisch auf die Tumorzellen gerichteten Behandlung profitieren, die voraussichtlich mit geringeren Nebenwirkungen einhergeht als eine Polychemotherapie.

Integration of the B Cell Receptor Antigen Neurabin-I into an IgG1 Antibody Format for the Treatment of Primary Diffuse Large B Cell Lymphoma of the CNS

This study presents an IgG1 therapy format that attacks the malignant B lymphocytes of the primary diffuse large B cell lymphoma of the central nervous system via the neurabin-I reactive B cell receptor. The *in vitro* results of the underlying experiments show that malignant cells can be destroyed specifically by means of this therapy format.

Malignant B lymphocytes of the primary diffuse large B cell lymphoma of the central nervous system have an intact B cell receptor and have rearranged immunoglobulin genes with somatic hypermutation. This indicates that the cells were in contact with an antigen during a germinal center reaction and are continuously stimulated by this antigen. For B cell receptors of primary diffuse large B cell lymphomas of the central nervous system the protein neurabin-I, which is expressed in the neural tissue, was identified as the dominant antigen, upon which the cells proliferate. Neurabin-I reactive B cell receptors represent a tumor-specific surface structure of the malignant clones. The tumor cells can be attacked via these receptors by using the B cell receptor antigen neurabin-I in an approach termed BAR (B cell receptor antigens for reverse targeting).

In the experiment described in this paper, a section of the neurabin-I epitope was cloned into an IgG1 format replacing the variable domains of the light and heavy chain of an immunoglobulin. This construct is designated IgG1-neurabin-I-BAR-body. After cloning, expression in human cells and purification, the BAR-body was tested *in vitro*. It was shown that the BAR-body specifically binds to target cells expressing a neurabin-I reactive B cell receptor on the surface, thereby labeling the target cells for effector cells. In this way, effector cell mediated lysis of the tumor cells which were loaded with the BAR-body could be achieved.

The use of the BAR-body *in vivo* is limited by the fact that the BAR-body is probably not able to cross the blood-brain barrier well. A concept applied to the BAR-body is required to overcome the blood-brain barrier, whereas such a concept at the same time must ensure interaction of the BAR-body with the B cell receptor. If such a concept could be found, patients are likely to benefit from a treatment that targets tumor cells very specifically and thus is likely to be associated with fewer side effects than polychemotherapy.

2. Einleitung

2.1 Das primäre diffus großzellige B-Zell-Lymphom des ZNS

Das primäre diffus großzellige B-Zell-Lymphom des zentralen Nervensystems (ZNS) ist ein aggressiver Hirntumor, der das Hirnparenchym, die Leptomeningen, das Rückenmark sowie die Augen befällt. Gemäß der WHO-Klassifikation von 2017 ist das primäre diffus großzellige B-Zell-Lymphom des ZNS dadurch gekennzeichnet, dass es sich ohne systemische Beteiligung exklusiv im ZNS manifestiert und nur bei immunkompetenten Patienten auftritt (Grimm und O'Malley, 2019). Primäre diffus großzellige B-Zell-Lymphome des ZNS werden gemäß der aktuellen WHO-Klassifikation als primäre ZNS-Lymphome (PZNSL) bezeichnet (Quintanilla-Martinez, 2017).

Das PZNSL ist ein seltener Tumor. Es macht 2–3 % aller Non-Hodgkin-Lymphome und circa 4 % aller primären ZNS-Tumore aus (Hoffman et al., 2006; Rubenstein et al., 2008). Männer erkranken 1,35-fach häufiger als Frauen (von Baumgarten et al., 2018). Die Erstdiagnose erfolgt am häufigsten im sechsten Lebensjahrzehnt (Schorb et al., 2019b). Die jährliche Inzidenz des PZNSL beläuft sich auf 0,48/100.000. Die Inzidenz ist in der Gruppe der über 65-Jährigen besonders hoch (Olson et al., 2002).

Beim PZNSL handelt es sich um einen hochzellulären diffus wachsenden Tumor mit einer hohen mitotischen Aktivität, der sich nur schlecht vom Hirnparenchym abgrenzen lässt. Das Wachstumsmuster ist angiozentrisch und die Tumorzellen siedeln sich perivaskulär an (Montesinos-Rongen et al., 2013; Deckert et al., 2014a). Im Tumor können trotz der immunprivilegierten Lage im ZNS Inflammationsreaktionen in Form reaktiver T-Zell-Infiltrate sowie Makrophagen nachgewiesen werden (Fraser et al., 2015). Der Tumor manifestiert sich bei 65 % der Patienten als unifokale Läsion. Am häufigsten finden sich Läsionen in den zerebralen Hemisphären sowie den Basalganglien und dem Thalamus oder dem Corpus Callosum (Küker et al., 2005). In 20 % der Fälle liegt bei einem PZNSL auch eine intraokuläre Beteiligung vor (Kalogeropoulos et al., 2019).

2.2 Pathogenese

Das systemische diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) wird von der WHO je nach Genexpressionsprofil unter anderem in den Keimzentrums-B-Zell-Typ sowie in den aktivierten

B-Zell-Typ (ABC) unterteilt (Swerdlow et al., 2016). Das PZNSL lässt sich nicht gut in dieses Muster einordnen, da die Tumorzellen Charakteristika beider Subtypen aufzeigen (Montesinos-Rongen et al., 2009). Genexpressionsanalysen zeigen, dass die Zellen des PZNSL mit B-Zellen des späten Keimzentrums eng verwandt sind. Die Expression des Keimzentrumsmarkers BCL6 ist häufig. Jedoch exprimieren die Zellen in 95 % der Fälle auch MUM1, einen Marker aktivierter B-Zellen (Montesinos-Rongen et al., 2008; Kadoch et al., 2009, Ponzoni et al., 2014).

Die Zellen exprimieren die B-Zell-Oberflächenmarker CD19, CD20, CD22 und CD79a und sind IgM- und IgD-positiv (Deckert et al., 2014a). Hinweise auf virale Auslöser des PZNSL, einschließlich des Epstein-Barr-Virus (EBV), konnten bisher nicht gefunden werden (Bashir et al., 1993; Montesinos-Rongen et al., 2001; Martini et al., 2004; Montesinos-Rongen et al., 2004a; Montesinos-Rongen et al., 2009).

B-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche einen B-Zell-Rezeptor (BZR), der spezifisch ein bestimmtes Antigen bindet. BZR sind membranständige Immunglobuline (Ig), deren Hauptaufgabe in der Erkennung fremder Antigene und der Entwicklung einer adaptiven Immunantwort liegt. Ein BZR besteht aus zwei identischen schweren Ketten (H-Ketten) und zwei identischen leichten Ketten (L-Ketten). Jede der H- und L-Ketten besitzt eine variable Domäne (VH bzw. VL), über die die Erkennung verschiedener Antigene vermittelt wird. Diese Fähigkeit wird durch zwei nacheinander ablaufende genetische Mechanismen erreicht. Zunächst erfolgt eine somatische Rekombination während der Zellreifung im Knochenmark (Gen-Rearrangement), gefolgt von einer somatischen Hypermutation (SHM) der Immunglobulin-Gene nach Antigenkontakt (Hozumi und Tonegawa, 1976; LeBien und Tedder, 2008; Thurner et al., 2020b).

Bei der Untersuchung der Immunglobulin-Gene der PZNSL-Zellen konnten sowohl somatische Rekombinationen als auch SHM mit hohen Mutationsfrequenzen nachgewiesen werden. Die Tumorzellen erfahren mittels SHM eine Selektion auf einen kompetenten BZR. Dies indiziert, dass BZR-Signale im PZNSL eine besondere Rolle spielen (Montesinos-Rongen et al., 2015). Zu einem Wechsel der Immunglobulinklasse und Expression von IgA, IgG oder IgE kommt es im PZNSL nicht (Montesinos-Rongen et al., 2005).

Der Nachweis von SHM im PZNSL spricht dafür, dass eine Keimzentrumsreaktion im Rahmen eines Antigenkontakts stattgefunden hat. Das ZNS ist ein immunprivilegiertes Raum ohne klassisches Lymphsystem. Es ist unklar, wo die B-Zelle eine solche Keimzentrumsreaktion

erfährt und maligne transformiert. Diskutiert wird unter anderem, ob die Zellen im Rahmen einer zerebralen Immunreaktion ins ZNS einwandern und dort transformieren oder ob die Keimzentrumsreaktion und Transformation extrazerebral erfolgen (Montesinos-Rongen et al., 1999; Thompsett et al., 1999; Deckert et al., 2014b).

Der Immunphänotyp des ZNS scheint ein besonderes Milieu für den Tumor zu schaffen, das für die Aggressivität und Malignität des PZNSL sowie seine selektive Manifestation im ZNS verantwortlich gemacht werden könnte. Trepel et al. konnten zeigen, dass rekombinante BZR aus PZNSL-Proben an Strukturen des ZNS binden (Deckert et al., 2014b; Trepel et al., 2014). Rekombinante Antikörper, die zu VH und VL der BZR des PZNSL identische Sequenzen besitzen, binden sowohl an physiologisch im ZNS exprimierte Proteine als auch an inflammationsbedingt vom Gewebe exprimierte Proteine wie Galectin-3. Dies zeigt, dass der BZR der Tumorzellen mit Zellen des ZNS interagiert. Für VH ist die häufige Rekombination der Gene aus der *VH4*-Familie insbesondere des Segments *IGHV4-34* auffällig. Antikörper, die aus BZR mit rekombiniertem Gensegment *IGHV4-34* gewonnen wurden, erkennen besonders viele Antigene. Die Ergebnisse lassen eine antigengetriggerte Selektion der Tumorzellen vermuten. Die Interaktion von Antigenen des ZNS mit den BZR der Tumorzellen scheint zu einem Tumorwachstum zu führen (Pels et al., 2005; Montesinos-Rongen et al., 2015).

Das für die Toleranz der Zelle gegenüber DNA-Strangbrüchen im Rahmen der SHM erforderliche Protein BCL6 wird in bis zu 60–80 % der PZNSL-Zellen in Kombination mit der Expression von MUM1 nachgewiesen. Translokationen des *BCL6* werden in bis zu 47 % der Fälle beschrieben (Deckert et al., 2014a; Deckert et al., 2014b). In manchen high-grade B-Zell-Lymphomen wird eine simultane Translokation von *BCL2*, *BCL6* und *MYC* beschrieben (Swerdlow et al., 2016). Für das PZNSL wird ebenfalls eine simultane Expression von BCL2, BCL6 und MYC beschrieben (Brunn et al., 2013). BCL2 fungiert als antiapoptotisches Protein (Hockenbery et al., 1990). Die Protoonkogene *PAX5*, *PIM1*, *c-MYC* und *RhoH/TTF* sind ebenfalls somatisch mutiert (Montesinos-Rongen et al., 2004b).

Die PZNSL-Zellen zeichnen sich durch eine hohe Proliferationsrate mit einem Ki67-Index von über 70 % aus, die unter anderem mit einer Aktivierung des NF-κB-Pathways assoziiert wird (Montesinos-Rongen et al., 2010; Deckert et al., 2014a). In den B-Lymphozyten des PZNSL können unter anderem Mutationen an *MYD88*, *CD79B* und *CARD11*, deren Genprodukte Teil des BZR-NF-κB-Pathways sind, sowie Mutationen an *TNFAIP3* nachgewiesen werden

(Grommes et al., 2017b). TNFAIP3 ist an der Regulation der Beendigung des NF- κ B-Pathways beteiligt (Compagno et al., 2009).

Unter physiologischen Bedingungen verknüpft MYD88 Signale der Toll-like-Rezeptoren und der Interleukin-1-Rezeptoren mit einer Aktivierung des NF- κ B-Pathways. Dies geschieht durch eine Komplexbildung der Interleukin-Rezeptor-aktivierten-Kinasen. Ein Austausch der Aminosäure Leucin gegen Prolin an Position 265 von *MYD88* bewirkt im DLBCL des ABC-Subtyps eine unkontrollierte Ausbildung dieser Komplexe (Ngo et al., 2011). In 55 % der Fälle liegt diese Mutation auch im PZNSL vor (Rubenstein, 2017). Als Auswirkung der Mutation von *MYD88* wird außerdem eine Veränderung des Zytokinmilieus diskutiert, die möglicherweise zu einer Suppression der körpereigenen gegen den Tumor gerichteten Immunabwehr führt (Montesinos-Rongen et al., 2011).

In murinen B-Zellen erhöhen Mutationen an *CD79B* die BZR-Anzahl auf der Zelloberfläche und hemmen ihre Internalisierung (Gazumyan et al., 2006). Ebenso konnte für ABC-DLBCL-Zellen gezeigt werden, dass bei *CD79B*-Mutationen mehr BZR auf der Oberfläche exprimiert werden. Die Mutationen scheinen die Expression des BZR auf der Membran bei chronischer BZR-Aktivierung aufrechtzuerhalten (Davis et al., 2010). Eine *CD79B*-Mutation im PZNSL wird in circa 40 % der Fälle beschrieben (Rubenstein, 2017).

In 16 % der Fälle liegt eine Mutation an *CARD11* vor, das die Antigen-BZR-induzierte NF- κ B-Aktivierung vermittelt (Montesinos-Rongen et al., 2010).

So wie für viele systemische Lymphome konnte auch für das PZNSL eine Aktivierung des mTOR-Komplex 1-Signalwegs nachgewiesen werden. Dieser führt zur Proliferation der Zellen (Nitta et al., 2016).

Für Zellen des PZNSL wurde nachgewiesen, dass es häufig zu einem Verlust der Fähigkeit kommt, HLA-I und HLA-II zu exprimieren. Dieser Verlust könnte mit einem Überlebens- und Wachstumsvorteil für die Zellen einhergehen, da sie so der durch zytotoxische T-Zellen vermittelten Immunabwehr entgehen, die auf die Präsentation von Tumorpeptiden in HLA-Komplexen angewiesen ist (Riemersma et al., 2005; Ansorge und Träger, 2014). In 70–80 % der Fälle werden Kopienverluste auf dem Chromosom 9p21.3 beschrieben, welches für den Zellzyklusregulator *CDKN2A* kodiert (Rubenstein, 2017). Chapuy et al. berichten auch von Kopienzahlvariationen und Translokationen auf 9p24.1/PD-L1/PD-L2 mit vermehrter Expression von PD-L1 und PD-L2 (Chapuy et al., 2016).

Das Endothel im Tumorgewebe exprimiert die Chemokinliganden CXCL12 und CXCL13 und kann mit den B-Lymphozyten des PZNSL interagieren, die die Chemokinrezeptoren CXCR4, CXCR5 und CCR7 sowie die Chemokinliganden CXCL12 und CXCL13 exprimieren. Es wird vermutet, dass Chemokine für die Ansammlung und Streuung der B-Zellen im ZNS ursächlich sind. Anders als bei peripheren Lymphomen wird eine Expression von CXCR4, CXCR5 und CCR7 beim PZNSL jedoch nur im Zytoplasma und nicht auf der Zelloberfläche nachgewiesen. Dies kann eine Erklärung dafür sein, dass das PZNSL nicht systemisch metastasiert (Jahnke et al., 2005a; Brunn et al., 2007). Als Grund für das angiozentrische Tumorwachstum werden hohe Konzentrationen von Interleukin-4 im Tumorgewebe und im Endothel diskutiert (Mrugala et al., 2009).

2.3 Klinik

Das PZNSL befällt das ZNS, ohne dass es zu einer systemischen Beteiligung kommt. Die Symptome sind rein neurologischer Art. Nur bei 2 % der Patienten wird eine B-Symptomatik beobachtet (Rubenstein et al., 2008).

Die Klinik des PZNSL ist höchst unspezifisch. Dies erschwert eine frühzeitige Diagnose. Je nach Manifestationsort des Tumors liegen motorische oder sensorische fokale neurologische Defizite vor. Es wird außerdem über Persönlichkeitsveränderungen, Depressionen und Verwirrtheit berichtet. Ferner kommt es zu epileptischen Anfällen oder Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen als Zeichen erhöhten Hirndrucks (Rubenstein et al., 2008; Algazi et al., 2009). In 20 % der Fälle liegt eine vitreoretinale Beteiligung vor. Diese ist zum Diagnosezeitpunkt in mehr als einem Drittel der Fälle asymptomatisch oder manifestiert sich nur mit unspezifischen Symptomen wie Visusverlust und Glaskörpertrübungen. Häufig verbirgt sich die vitreoretinale Beteiligung hinter einer fehldiagnostizierten Uveitis, die nicht mehr auf eine Therapie mit Kortikosteroiden anspricht (Ferreri und Reni, 2007; Grimm et al., 2008; Kalogeropoulos et al., 2019).

2.4 Diagnostik

Um einem Verdacht auf ein PZNSL nachzugehen, ist die kraniale Kernspintomographie mit dem Kontrastmittel Gadolinium das Mittel der Wahl. Das PZNSL zeigt ein Kontrastmittelenhancement und ist in der T1-Wichtung hypo- bis isointens und in der T2-Wichtung

iso- bis hyperintens, wobei es im Vergleich zur grauen Substanz hypointens erscheinen kann (Haldorsen et al., 2011; Wang et al., 2014). Um das PZNSL radiologisch von anderen Tumoren zu unterscheiden, kann eine FDG-PET helfen (Das et al., 2011). Da keine sichere Abgrenzung zu anderen malignen Hirntumoren mittels Bildgebung gelingen kann, muss ein PZNSL differentialdiagnostisch immer in Erwägung gezogen werden und die Diagnose muss histopathologisch abgesichert werden (von Baumgarten et al., 2018). Hierfür ist eine stereotaktische Biopsie der Goldstandard (Deckert et al., 2014a). Das Tumorgewebe reagiert auf Kortikosteroide hochsensibel mit Nekrosen und Änderungen der Tumorarchitektur. Um die Diagnose nicht zu erschweren, sollte daher die Gabe von Kortikosteroiden bis zur Diagnosestellung vermieden werden (Weller, 1999; Mrugala et al., 2009).

Sofern keine Kontraindikation vorliegt, wird eine Liquorpunktion mit zytologischer und durchflusszytometrischer Untersuchung des Liquors vorgenommen. Außerdem werden Zellzahl sowie Protein- und Glucosegehalt bestimmt und die Gen-Rearrangements der schweren Immunglobulinketten analysiert. Die Diagnose eines PZNSL mittels Liquoranalyse ist nur in wenigen Fällen möglich und auch diagnostische Marker aus dem Liquor haben bisher keinen festen Stellenwert in der klinischen Routine gefunden (Batchelor und Loeffler, 2006; von Baumgarten et al., 2018).

Um eine systemische Manifestation des zerebralen Lymphoms auszuschließen, werden CT-Aufnahmen des Thorax, Abdomens und Beckens gemacht. Falls nötig, kann eine FDG-PET hinzugezogen werden, die in dieser Fragestellung sensitiver ist (Citterio et al., 2017). Eine extrazerebrale Manifestation des PZNSL ist selten. Es gilt zu beachten, dass es in der CT und in der FDG-PET auch zu falsch positiven Ergebnissen kommen kann (Suh et al., 2019).

Ferner werden eine Punktion des Knochenmarks und bei Männern eine Sonographie der Hoden durchgeführt (Algazi et al., 2009). Da bei PZNSL-Patienten auch eine asymptomatische intraokuläre Beteiligung vorliegen kann, müssen ophthalmologische Untersuchungen erfolgen (Grimm et al., 2008). Eine Testung auf das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) sowie Bestimmungen der Leber- und Nierenwerte inklusive Hepatitis-Serologie sind obligat (Abrey et al., 2005; Rubenstein et al., 2008).

Zur Abschätzung der Prognose definierte die International Extranodal Lymphoma Study Group das Alter, den Allgemeinzustand, die LDH-Konzentration (Lactatdehydrogenase) im Serum

sowie eine Beteiligung tiefer Hirnstrukturen und den Proteingehalt im Liquor als wichtige prognostische Marker (Ferreri et al., 2003).

2.5 Therapie

Das PZNSL ist besonders aggressiv und hat ein schlechteres Outcome als ein extrazerebrales Lymphom von ähnlicher Tumorgroße und Histologie (Citterio et al., 2017). Dies wird unter anderem darauf zurückgeführt, dass die Zytostatika des zur Therapie von aggressiven systemischen Lymphomen etablierten R-CHOP-Regimes (Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon) eine schlechte Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit besitzen (Ferreri et al., 2019). Unbehandelt beträgt die mediane Lebenserwartung von Patienten mit PZNSL circa drei Monate und entspricht der Lebenserwartung von Patienten mit einem systemischen high-grade Non-Hodgkin-Lymphom (Schorb et al., 2016).

Das PZNSL ist chemo- und strahlensensibel und reagiert hochsensibel auf eine Behandlung mit Kortikosteroiden. Unter der Gabe von Kortikosteroiden zeigen PZNSL-Patienten regelmäßig eine klinische Verbesserung. Dieser Effekt hält jedoch nur kurz an (Weller, 1999; Citterio et al., 2017).

Den Grundstein der Therapie des PZNSL stellt eine systemische Chemotherapie mit hoch dosiertem Methotrexat (HD-MTX) dar. Unter HD-MTX als Monotherapie werden Ansprechraten von 40 % erzielt (Ferreri et al., 2009). Studien legen nahe, dass eine zusätzliche intrathekale MTX-Applikation der isolierten hochdosierten systemischen Gabe nicht überlegen ist (Khan et al., 2002).

Die heutigen Therapieregime beruhen auf HD-MTX-basierten Polychemotherapien (Citterio et al., 2017). HD-MTX kombiniert mit hochdosiertem Cytarabin konnte das Outcome deutlich verbessern (Ferreri et al., 2009). Auch die Kombination von HD-MTX mit weiteren Chemotherapeutika wie Ifosfamid und Thiotepa erhöht das Gesamtansprechen der Therapie bei erhöhter Toxizität aber gleichbleibender therapieassoziierter Mortalität (von Baumgarten et al., 2018). Lomustin, Procarbazin, Temozolomid sowie Vincaalkaloide erreichen kombiniert mit HD-MTX ebenfalls gute Remissionsraten bei akzeptabler Toxizität (Schorb et al., 2016). Die Kombination einer systemischen mit einer intraventrikulären Chemotherapie zeigt gute Ansprechraten, ist aber mit hohen Infektionskomplikationen verbunden (Pels et al., 2003).

Die IELSG32-Studie von Ferreri et al. untersuchte an Patienten unter 71 Jahren die Kombination des HD-MTX/Cytarabin-Schemas mit dem chimären monoklonalen CD20-Antikörper Rituximab und Thiotepa. Ein signifikant höheres Therapieansprechen und verlängertes Gesamtüberleben im medianen 30-Monats-Follow-Up mit kompletten Remissionen in 49 % der Fälle konnte durch Kombination aller vier Wirkstoffe erreicht werden. Es traten jedoch vermehrt hämatologische Nebenwirkungen auf. Die Rate an Infektionskomplikationen war nicht erhöht. Das Therapieschema wird als MATRix-Regime (Methotrexat, Cytarabin, Thiotepa, Rituximab) bezeichnet und ist mittlerweile ein international gängiges Induktionsregime (Ferreri et al., 2016; Schorb et al., 2019b).

Zu erwähnen ist jedoch, dass den guten Ergebnissen der IELSG32-Studie die Ergebnisse der HOVON 105/ALLG NHL 24-Studie gegenüberstehen, welche für die Zugabe von Rituximab zu einer HD-MTX basierten Polychemotherapie keine deutlichen Vorteile verzeichnen konnte (Bromberg et al., 2019). Der Vergleich der Ergebnisse der IELSG32-Studie und der HOVON 105-Studie legt nahe, dass Rituximab in der Kombination mit einer Polychemotherapie ein verbessertes progressionsfreies Überleben aber keine Vorteile hinsichtlich des Gesamtüberlebens erreicht (Schmitt et al., 2019).

Als Konsolidierungstherapie liegen verschiedenen Strategien vor. Dazu gehören die Ganzhirnbestrahlung (WBRT), eine hoch dosierte myeloablative Chemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation (HD-ASZT) sowie eine konventionelle Chemotherapie.

Seit den 1960er Jahren bildet die WBRT einen wesentlichen Therapiebaustein mit Ansprechraten von bis zu 90 % (Algazi et al., 2009; Ponzoni et al., 2014). Mittlerweile ist die Effektivität einer Kombination der WBRT mit einer Chemotherapie belegt, mit der mediane Überlebenszeiten von 31–90 Monaten erreicht werden. Eine konsolidierende Ganzhirnbestrahlung wird dennoch nicht mehr routinemäßig durchgeführt, da gezeigt wurde, dass diese zwar ein längeres progressionsfreies Überleben ermöglicht, das Gesamtüberleben aber nicht verlängert (Thiel et al., 2010; von Baumgarten et al., 2018). Des Weiteren ist die Therapie von gravierenden neurotoxischen Schäden begleitet. Spätfolgen der Bestrahlung sind Leukenzephalopathien mit kortikalen Atrophien. Diese manifestieren sich in kognitiven Beeinträchtigungen sowie Gangunsicherheit, Demenz, Inkontinenz und Pflegebedürftigkeit. Die neurotoxischen Folgen treten besonders bei älteren Patienten auf (Abrey et al., 1998; Wassenberg et al., 2001). Rubenstein et al. zeigten mit der CALGB 50202-Studie, dass eine konsolidierende Chemotherapie vergleichbar effektiv wie eine WBRT ist (Rubenstein et al., 2013).

Mit der HD-ASZT können besonders bei jüngeren Patienten sehr gute Therapieergebnisse mit einem Gesamtansprechen von 80–96 % und einem medianen Gesamtüberleben von 64–104 Monaten erreicht werden (von Baumgarten et al., 2018). Für ältere Patienten ist die therapieassoziierte Mortalität hoch, weshalb die Therapie häufig nicht in Frage kommt (Algazi et al., 2009). Die IELSG32-Studie (Ferreri et al., 2017) und die PRECIS-Studie (Houillier et al., 2019) belegen, dass die HD-ASZT als Konsolidierungstherapie ähnlich wirksam wie eine WBRT ist. Die Autoren verweisen auf die bei der WBRT hohen neurotoxischen Auswirkungen, die gegen die hämatotoxischen Folgen der HD-ASZT abzuwägen sind. In der MATRix/IELSG43-Studie untersucht aktuell die kooperative Studiengruppe ZNS-Lymphome am Klinikum Stuttgart an Patienten unter 66 Jahren die Wirksamkeit einer HD-ASZT im Vergleich mit einer konventionellen Chemotherapie als Konsolidierungstherapie (EudraCT: 2012-000620-17).

Ein Problem der PZNSL-Therapie stellen Rezidive dar, die bis zu 50 % der Patienten betreffen (Grommes und DeAngelis, 2017a). Bei primär auf HD-MTX-sensiblen Tumoren ist eine erneute HD-MTX-Therapie eine effektive Option (Plotkin et al., 2004). Ferner konnte gezeigt werden, dass bei mangelndem Ansprechen auf eine HD-MTX-Polychemotherapie mit einer HD-ASZT Langzeitremissionen erzielt werden können (Kasenda et al., 2017). Im Falle eines Rezidivs sprechen zwar 10–85 % der Patienten auf Therapien an, aber die mediane progressionsfreie Überlebenszeit beträgt nur circa drei Monate (von Baumgarten et al., 2018).

Therapiefortschritte, wie zum Beispiel die Etablierung des MATRix-Regimes, wurden in den letzten Jahren überwiegend für jüngere Patienten erzielt. In der Patientengruppe der älteren und morbiditen Patienten ist die Prognose schlecht und das mediane Gesamtüberleben liegt im Durchschnitt bei 19 Monaten (Kasenda et al., 2015). Der Einsatz einer WBRT ist aufgrund der therapieassoziierten Toxizität für diese Altersgruppe limitiert (Gavrilovic et al., 2006). Eine HD-MTX-basierte Chemotherapie ist bei älteren Patienten möglich, sofern nephroprotektive Maßnahmen eingeleitet werden und die Zytostatika in ihrer Konzentration an die glomeruläre Filtrationsleistung der Nieren angepasst werden. Laut Studienlage scheint bei Patienten, die über 65 Jahre alt sind, eine Kombination von HD-MTX, Rituximab und einem Alkylanz in der Induktionstherapie gut zu wirken (Jahnke et al., 2005b; Schorb et al., 2019b). Aktuell wird in der MARTA-Studie an Patienten, die über 65 Jahre alt sind, die Effektivität einer altersadaptierten Induktionstherapie mit anschließender HD-ASZT untersucht (Schorb et al., 2019a).

Bei der Therapie des PZNSL werden auch sogenannte kleine Moleküle eingesetzt, die in zelluläre Signalkaskaden eingreifen. Der BTK-Inhibitor Ibrutinib zeigt in der Monotherapie im Vergleich zum DLBCL beim PZNSL ein besseres Ansprechen und erreicht bei manchen Patienten ein langes progressionsfreies Überleben. Jedoch können insbesondere bei Kombination von Ibrutinib mit anderen Wirkstoffen vermehrt Infektionen auftreten (Mendez und Grommes, 2018). Für den Immunmodulator Lenalidomid konnte in Kombination mit Rituximab ein langes Gesamtüberleben und eine gute Verträglichkeit beobachtet werden (Illerhaus et al., 2018). Die Applikation des mTOR-Inhibitors Temsirolimus zeigt hohe Ansprechraten bei kurzem progressionsfreiem Überleben und hoher Toxizität (Korfel et al., 2016).

Grundsätzlich stellt eine chirurgische Resektion des zerebralen Lymphoms keine Standardtherapie dar, da es das Parenchym diffus und tief infiltriert und chemosensibel ist. Weller et al. zeigten jedoch, dass eine Resektion von Läsionen mit einem verlängerten progressionsfreien Überleben einhergehen kann und regen an, diese in Einzelfällen und unter Abwägung der chirurgischen Risiken und Folgen in Erwägung zu ziehen. Eine Empfehlung zur neurochirurgischen Intervention beim PZNSL bleibt zum jetzigen Zeitpunkt aber auf die stereotaktische Biopsie zu diagnostischen Zwecken beschränkt (Weller et al., 2012; Grommes und DeAngelis, 2017a).

2.6 Bedeutung von Neurabin-I für das PZNSL

Neural tissue-specific F-actin-binding protein I (Neurabin-I) und sterile α -motif domain containing protein 14 (SAMD14) sind Autoantigene der BZR der B-Lymphozyten des PZNSL. Das gemeinsame Epitop der beiden Antigene ist ihre SAM-Domäne, die bei PZNSL-Patienten posttranslational modifiziert ist und hyperglykosyliert vorliegt (Thurner et al., 2018). Im Folgenden werden die beiden Antigene Neurabin-I und SAMD14 unter dem Namen Neurabin-I zusammengefasst.

Neurabin-I ist ein spezifisches Antigen des PZNSL, welches nicht mit BZR anderer Lymphome interagiert. Der Neurabin-I-reaktive BZR des PZNSL bindet nur Neurabin-I und zeigt keine Interaktion mit untersuchten Proteinen und Pathogenen. Ein Neurabin-I-reaktiver BZR konnte in acht von zwölf (66 %) PZNSL-Proben nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass es sich bei diesem Protein um ein dominierendes Antigen des BZR des PZNSL handelt (Thurner et al., 2018).

Eine Inkubation von Zellen, die einen rekombinanten Neurabin-I-reaktiven BZR tragen, mit Neurabin-I führt zur Aktivierung des BZR-Pathways sowie zur Proliferation der Zellen *in vitro*. Die Interaktion der malignen Zellen mit dem überwiegend im ZNS exprimierten Protein Neurabin-I wird als Grund für den Tropismus des PZNSL diskutiert (Thurner et al., 2018).

Bei circa einem Drittel der PZNSL-Patienten konnten gegen Neurabin-I gerichtete Antikörper im Serum und im Liquor nachgewiesen werden. Dieser Antikörpernachweis steht im signifikanten Zusammenhang mit der Erkrankung. Ein Screening auf Antikörper gegen Neurabin-I in Kontrollgruppen, die unter anderem Patienten mit DLBCL umfassten, war negativ (Thurner et al., 2018).

Das zytoplasmatische Protein Neurabin-I wird im Nervengewebe gebildet und bindet an F-Aktin. Das für Neurabin-I codierende Gen *PPP1R9A* (Protein phosphatase 1 regulatory subunit 9A) liegt auf Chromosom 7q21.3. Die höchste Bindungsaffinität zum BZR des PZNSL besteht im Bereich der Aminosäuren 1226–1251 (Nakanishi et al., 1997; Thurner et al., 2018).

Bei PZNSL-Patienten mit Neurabin-I-reaktivem BZR besteht eine atypische Glykosylierung des Neurabin-I, welche nur in PZNSL-Patienten nachgewiesen werden kann. Bei der atypischen Glykosylierung handelt es sich um eine N-Glykosylierung der SAM-Domäne an Asparagin 1277. Unter physiologischen Bedingungen erfolgen in 97 % der Fälle N-Glykosylierungen an einer Proteinstelle, die aus Asparagin, X und Serin oder Threonin besteht, wobei X jeder Aminosäure außer Prolin entsprechen kann. Bei PZNSL-Patienten mit Neurabin-I-reaktivem BZR befindet sich die N-Glykosylierung jedoch an einer atypischen Proteinstelle, die aus den Aminosäuren Asparagin, Leucin, Glutaminsäure und Glutamin (NLEQ) besteht (Thurner et al., 2014; Thurner et al., 2018).

Für das PZNSL wird diskutiert, dass die atypische NLEQ-Glykosylierung in einem signifikanten Zusammenhang mit der Erkrankung steht (Thurner et al., 2018). Posttranslational modifizierten Autoantigenen wird auch eine Rolle bei der Entstehung von anderen B-Zell-Neoplasien zugeschrieben. Als Beispiele sind hier unter anderem hypophosphoryliertes arsenite resistance protein 2 (*ARS2*) im DLBCL und hyperphosphoryliertes Paratarg-7 bei Plasmazellerkrankungen anzuführen (Preuss et al., 2014; Thurner et al., 2020a).

Der BZR des Neurabin-I-reaktiven PZNSL interagiert sowohl mit der hyperglykosylierten Isoform von Neurabin-I als auch mit der Isoform ohne Hyperglykosylierung. Die hyperglykosylierte Isoform wird vermutlich von CD4⁺-T-Zellen erkannt, die die B-Zellen stimulieren (Thurner et al., 2018).

In Bezug auf die Entstehung autoreaktiver T-Zellen wird diskutiert, dass posttranslational modifizierte Proteine an den Selektionsprozessen im Thymus nicht beteiligt sind, da sie erst unter bestimmten Umständen im Gewebe exprimiert werden. Der Zelle sind diese dann fremd. Als Ursache für posttranslationale Modifikationen von Proteinen werden unter anderem Inflammationen oder auch weitere biochemische Veränderungen diskutiert (Doyle und Mamula, 2012). Für das PZNSL ist die Ursache nicht bekannt.

2.7 Das BAR-Therapiekonzept

Der Großteil der Non-Hodgkin-Lymphome ist durch eine monoklonale Expansion von malignen B-Zellen charakterisiert, die einen BZR, ein membranständiges Immunglobulin, exprimieren. Die BZR bilden einen tumorspezifischen Oberflächenmarker der malignen Klone (Vuist et al., 1994).

Für mehrere B-Zell-Neoplasien ist es gelungen, jeweils ein dominierendes BZR-Antigen zu ermitteln, mit dem die BZR der malignen B-Zellen interagieren (Pfreundschuh et al., 2015). Hierzu zählt Paratarg-7 bei Plasmazellerkrankungen, ARS2 beim systemischen DLBCL, LRPAP1 (Low-density lipoprotein receptor-related protein-associated protein 1) beim Mantelzelllymphom und Neurabin-I beim PZNSL (Preuss et al., 2014; Thurner et al., 2018; Thurner et al., 2019; Thurner et al., 2020a).

Durch Verwendung dieser BZR-Antigene im Rahmen des BAR-Therapiekonzepts wird ein selektiver Angriff auf maligne Zellen über ihren BZR ermöglicht. Die Abkürzung BAR steht für B cell receptor antigens for reverse targeting. Das Konzept zeichnet sich durch eine exklusive Spezifität für die malignen Klone aus. Es kann eine selektiv auf die malignen Zellen gerichtete Zytotoxizität vermitteln, ohne dass gesunde B-Lymphozyten geschädigt werden (Pfreundschuh et al., 2015).

Im Rahmen des BAR-Konzepts können die BZR-Antigene der malignen B-Zell-Neoplasien auf vielfältige Weise verwendet werden. Denkbar sind Konjugationen an Immuntoxine, Radionuklide, kleine Moleküle, bispezifische Konstrukte und eine Verwendung beim Design von chimären Antigenrezeptor-T-Zellen (CAR-T-Zellen) (Pfreundschuh et al., 2015). Für die Verwendung der an ein Immuntoxin konjugierten BZR-Antigene wurden *in vitro* bereits über die Antigene vermittelte Zytotoxizitäten nachgewiesen (Thurner et al., 2018; Thurner et al., 2019).

2.8 Fragestellung

Für maligne B-Lymphozyten aus PZNSL-Proben konnte gezeigt werden, dass diese in 66 % der Fälle einen Neurabin-I-reaktiven BZR exprimieren. Neurabin-I stellt ein geeignetes BZR-Antigen dar, mithilfe dessen im Rahmen des BAR-Konzepts die malignen Klone des PZNSL selektiv angegriffen werden können. Die Konjugation von Neurabin-I an ein Toxin wirkte *in vitro* toxisch auf Zellen mit einem Neurabin-I-reaktiven BZR (Thurner et al., 2018).

Ziel dieser Arbeit ist die Integration des BZR-Antigens Neurabin-I in ein humanes IgG1-Antikörper-Format im Sinne des BAR-Therapiekonzepts. Das Konstrukt wird als IgG1-Neurabin-I-BAR-Body bezeichnet.

Um den BAR-Body zu synthetisieren wird ein Aminosäureabschnitt von Neurabin-I in ein IgG1-Format mit konstanten Regionen integriert. Der Abschnitt umfasst das von Thurner et al. ermittelte Epitop. Es wird an die Stellen der variablen Domänen der leichten und schweren Kette des Immunglobulins kloniert. Wenn die Klonierung gelingt, wird eine humane Zelllinie mit dem Produkt transfiziert, so dass eine Expression des BAR-Bodys ermöglicht wird. Nach seiner Aufreinigung folgt eine *In-vitro*-Inkubation des BAR-Bodys mit B-Lymphozyten, die einen Neurabin-I-reaktiven BZR exprimieren. Es wird untersucht, ob der BAR-Body an seine Zielzellen bindet und sie auf diese Weise markiert. Anschließend wird getestet, ob er über seine Fc-Domäne bei Inkubation der Zielzellen mit mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMCs) eine antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität vermitteln kann.

3. Material und Methodik

3.1 Material

3.1.1 Laborgeräte und Computerprogramme

6 Well Cell Culture Plate	Merck, Darmstadt
96 Well ELISA-Platte	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Autoklav Systec V-75	Systec, Linden
BD FACSCanto	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Bio Max Röntgenfilme	Kodak, Rochester, USA
Blotting-Papier	VWR, Darmstadt
Chromas	Technelysium, South Brisbane, Australien
Datenbank Blast NCBI	National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA
Eisbereiter	Scotsman Industries, Vernon Hills, USA
Elektrophoresekammern	Bio-Rad, Feldkirchen
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg
Erlenmeyerkolben	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
FCSalyzer Programm	Sven Mostböck, Wien, Österreich
Filtropur V50 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht
Gel-Dryer	Bio-Rad, Feldkirchen
Heracell CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Immobilion-P PVDF Membran	Merck, Darmstadt
Impfeschlingen	Sarstedt, Nümbrecht
Inkubationsbad	GFL, Burgwedel
Kreisschüttler	IKA Labortechnik, Staufen
Kühlschrank	Liebherr, Bulle, Schweiz
Ligation Calculator	Düsseldorf
Mehrkanalpipette	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar
Mikrowelle	OK Imtron GmbH, Ingolstadt
MS1 Minishaker	IKA Labortechnik, Staufen
Multilabel Plate Reader Victor ² 1420	PerkinElmer, Rodgau
ND-1000 Spectrometer	Peqlab, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	Eppendorf, Hamburg
Papierfilter	Schleicher und Schuell, Düren
Pasteurpipetten	Hirschmann, Eberstadt
PCR Multiply µStrip	Sarstedt, Nümbrecht
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht

Pipetten 10 µl, 100 µl, 200 µl und 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettierhelfer Accu-Jet	Brand, Wertheim
Power Supply Model 1000/500	Bio-Rad, Feldkirchen
Präzisionswaage 440–47	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Röntgen Entwickler	Adefo Chemie, Neu Isenburg
Röntgen Fixierer	Adefo Chemie, Neu Isenburg
Servapor Dialysemembran MWCO 12000–14000	Serva, Heidelberg
Skalpellklingen	B. Braun, Melsungen
Spektrophotometer GeneQuant Pro	GE Healthcare, Solingen
Stabpipetten 5 und 10 ml	Sarstedt, Nümbrecht
TC-Flaschen T25, T75, T175	Sarstedt, Nümbrecht
Thermocycler Veriti 96 Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühler –20 °C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Tubes	Sarstedt, Nümbrecht
Ultracell 30 kDa Membran Amicon	Merck, Darmstadt
Ultratiefkühlschrank –80 °C	Fisher Scientific, Schwerte
UV-Tisch	Vilber, Eberhardzell
Wallac 1420 Programm	Perkin Elmer, Rodgau
Western-Blot Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, Feldkirchen
WinMDI 2.3	Purdue University Cytometry Laboratories, West Lafayette, USA
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht

3.1.2 Molekularbiologie

Agar	BDBiosciences, Franklin Lakes, USA
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Ratiopharm, Ulm
Bacto Tryptone	BDBiosciences, Franklin Lakes, USA
Bacto Yeast Extrakt	BDBiosciences, Franklin Lakes, USA
Desoxynukleosidtriphosphate	Roche, Mannheim
DH5α <i>E. coli</i> -Bakterien	Fermentas, Waltham, USA
DNA-Leiter 50 und 1000 Basenpaare (bp)	Fermentas, Waltham, USA
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe

Glucose	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ligasepuffer	Fermentas, Waltham, USA
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Molecular Biology Grade Water	Eppendorf, Hamburg
NaOH	Merck, Darmstadt
Orange G	Merck, Darmstadt
PCR-Puffer 10x	Applied Biosystems, Foster City, USA
Puffer 10x für Restriktionsenzymverdau	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sucrose	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Xylene Cyanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

3.1.3 Zellkultur

Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin
Dimethylsulfoxid	Merck, Darmstadt
Doxycyclin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin
G-418	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glutamin	Merck, Darmstadt
Hygromycin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumazid	Merck, Darmstadt
RPMI 1640, w/o: L-Glutamine, w: 2,0 g/L NaHCO ₃	Pan Biotec, Aidenbach
Trypanblau	Merck, Darmstadt
X-tremeGENE	Roche, Mannheim

3.1.4 Proteinchemie und Immunologie

Acrylamid Mix 30 %	Carl Roth, Karlsruhe
APS	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R 250	Serva, Heidelberg
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eisessig	Carl Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Glycerol	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Hochwald-Molkerei, Thalfang

Methanol	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Caesar Loretz, Hilden
Proteingrößenleiter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SDS	Carl Roth, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS	Carl Roth, Karlsruhe
TRIS-Hydrochlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Merck, Darmstadt

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 AX 100 Kit	Macherey Nagel, Düren
NucleoSpin Plasmid Kit	Macherey Nagel, Düren
TOPO TA Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research, Freiburg

3.1.6 Lösungen und Medien

Agarosegel	1,5–3 g Agarose 150 ml 1-fach TAE-Puffer 75 µl Ethidiumbromid
Blaumarker	0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylene Cyanol FF 40 % Sucrose 0,25 % Orange G auf 100 ml H ₂ O abwiegen
Coomassie-Stain	1 g Coomassie Brilliant Blue R 250 450 ml Methanol 450 ml H ₂ O 100 ml Essigsäure
Entfärber für Coomassie-Gel	100 ml Methanol 100 ml Eisessig 800 ml aq. dest.
Lämmli-Puffer 5x	144 g Glycin 30,34 g TRIS 10 g SDS ad 2 l aq. dest.

LB-Medium	10 g NaCl 10 g Bacto Tryptone 5 g Hefeextrakt 1 l H ₂ O autoklavieren
LB-Medium-Agarplatten	LB-Medium 15 g/l Agar autoklavieren Lagerung bei 4 °C
SDS-PAGE Sammelgel	0,68 ml H ₂ O 0,17 ml Acrylamid 30%ig 0,13 ml 1,0 M TRIS pH 6,8 0,01 ml SDS 10 % 0,01 ml APS 10 % 0,001 ml TEMED
SDS-PAGE Trenngel 10%ig	2 ml H ₂ O 1,7 ml Acrylamid 30%ig 1,3 ml 1,5 M TRIS pH 8,8 0,05 ml SDS 10 % 0,05 ml APS 10 % 0,002 ml TEMED
SDS-Puffer/Probenpuffer 5x	0,6 ml 1M TRIS pH 6,8 2,5 ml 100 % Glycerol 2 ml 10 % SDS 0,5 ml 2 % Bromphenolblau 3,9 ml H ₂ O
SOC-Medium	20 g Bacto Tryptone 5 g Yeast Extrakt 0,5 g NaCl 950 ml H ₂ O 10 ml KCl 250 mM 0,2 ml NaOH 5N pH 7 nach dem Autoklavieren: 5 ml MgCl ₂ 2 M 20 ml Glucose 1 M
TRIS-Acetate-EDTA (TAE) 50x	242 g TRIS 51,1 ml Eisesig 100 ml 0,5M EDTA pH 8 ad 1 l aq. dest.

TBS-Waschpuffer	8,78 g NaCl 6,05 g TRIS-hydrochlorid 1,4 g TRIS 1 ml Triton X-100 ad 1 l aq. dest.
Transferpuffer für Western-Blot	0,3 g TRIS 1,44 g Glycin 20 ml Methanol ad 100 ml aq. dest.
Trypanblaulösung	100 ml 0,9 % NaCl 0,5 g Trypanblau
Zellkulturmedium 10 % FCS	500 ml RPMI 1640 50 ml FCS 5 ml Glutamin 200 mM

3.1.7 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
AmpliTaq Gold Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
T4-DNA-Ligase	Fermentas, Waltham, USA
<i>Bst</i> EII	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>Mun</i> I	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>Sma</i> I	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>Age</i> I	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>Eco</i> 47III	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>Eco</i> RV	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.1.8 Primer

CH13-as	5'TGGACGCCGCTGGTCAGGG3'	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
CMV-s	5'TGGGAGTTTGTTCCTGGCACC3'	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Kappa-as	5'TCCAGATTTCAACTGCTCATC3'	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
M13 forward	5'GTTGTAAAACGACGGCCAGTG3'	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
M13 reverse	5'CAGGAAACAGCTATGACCATG3'	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NRB AA 1168 <i>Age</i> I-s	5'ACCGGTAACACATGGATTACAAA3'	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NRB AA 1168 <i>Mun</i> I-s	5'CAATTGAACACATGGATTACAAA3'	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

NRB AA 1285 BstEII-as	5'GGTGACCCCGAATTCAGATACATACTG3'	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
NRB AA 1285 SmaI-as	5'CCCGGGGAATTCAGATACATACTG3'	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

3.1.9 Vektoren und Plasmide

GFP-Plasmid	José-Carreras-Institut, Homburg
IgG1 TA	José-Carreras-Institut, Homburg
Neurabin-I-Sequenz	José-Carreras-Institut, Homburg
pCR [®] 2.1-TOPO	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pSfi-Express-FLAG-tag	José-Carreras-Institut, Homburg

3.1.10 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-LRPAP1-BAR-Body: humanes IgG1 mit einem Ausschnitt von LRPAP1 anstelle der variablen Domänen der schweren und leichten Kette	José-Carreras-Institut, Homburg
Monoclonal ANTI-FLAG M2	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

3.1.11 Zelllinien

HEK-293T	DSMZ, Braunschweig
PBMCs	Isolation aus Eigenblut
U-2932 mit rekombinantem BZR	José-Carreras-Institut, Homburg

HEK-293T-Zellen exprimieren das große T-Antigen des Simian-Virus 40 (SV40). Es ermöglicht eine episomale Amplifikation von Plasmiden, die einen Replikationsursprung des SV40 besitzen (Durocher et al., 2002).

PBMCs wurden aus Eigenblut isoliert (dazu siehe Ziffer 3.3.7).

Die U-2932-Zelllinie ist eine humane Zelllinie. Es handelt sich um B-Lymphozyten, die aus dem Aszites eines Patienten mit DLBCL isoliert wurden (Amini et al., 2002). Da keine PZNSL-Zelllinie vorlag, wurden die U-2932-Zellen mit einem rekombinanten BZR eines Patienten mit

PZNSL transfiziert. Dieser BZR ist Neurabin-I-reaktiv und wird nach Inkubation der Zellen mit Doxycyclin auf der Lymphozytenoberfläche exprimiert. Sowohl VH als auch VL des transfizierten BZR wurden aus einem Neurabin-I-reaktiven BZR eines Patienten mit PZNSL gewonnen (Thurner et al., 2018).

3.2 Methoden der Molekularbiologie

3.2.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Mit der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) können Nukleinsäurefragmente, die von bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt sind, *in vitro* vervielfältigt werden. Dabei werden einzelsträngige Oligonukleotidprimer verwendet, die sich nach Denaturierung der doppelsträngigen DNA an komplementäre DNA-Abschnitte der Stränge anlagern (Annealing). So wird der Startpunkt für eine Synthese durch die DNA-Polymerase markiert. Diese synthetisiert den neuen Strang komplementär zur Matrize. Nach der Elongation wird der Ansatz zur Vorbereitung des nächsten Zyklus wieder auf Denaturierungstemperatur erhitzt, so dass sich der nun gebildete DNA-Doppelstrang erneut auftrennt. Nach Abkühlung kann eine neue Anlagerung der Primer stattfinden und eine weitere Strangsynthese erfolgen. Da auch die neu gebildeten DNA-Stränge als Matrize für die folgenden Zyklen dienen, führt die PCR zu einer exponentiellen Zunahme der DNA-Fragmente bei zyklischer Wiederholung der Schritte (Brix et al., 2014; Siemens und Soppa, 2017).

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Klonierungen erfolgten die genannten Schritte bei

- einer Denaturierungstemperatur von 95 °C für 30 Sekunden,
- einer Annealingtemperatur von 55–60 °C für 30 Sekunden
- und einer Elongationstemperatur von 72 °C für 60 Sekunden.

Es wurde mit 33 Zyklen gearbeitet. Die PCR-Ergebnisse wurden im Agarosegel kontrolliert.

Die PCR-Ansätze umfassten folgende Bestandteile:

- 3 µl Puffer,
- 0,2 µl DNA-Polymerase (5 U/µl),
- 0,2 µl dNTPs (10 mM),
- je 1 µl Primer sense und antisense (10 mM, 1:10 verdünnt),
- zu amplifizierender DNA-Abschnitt: 1 µl DNA (1:1000 verdünnt) oder Bakterien einer auf einer Agarplatte gewachsenen Kolonie,
- 23,6–24,6 µl H₂O

3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

In der Gelelektrophorese können DNA-Fragmente ihrer Größe nach über ein elektrisches Feld aufgetrennt werden. Die Fragmente werden an der Kathode auf ein Gel aufgetragen und wandern aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode. Kleine DNA-Stränge mit kurzen Sequenzen können die Matrix des Agarosegels dabei besser passieren und wandern weiter in Richtung der Anode als große Fragmente (Königshoff und Brandenburger, 2018).

Um das Gel anzusetzen, wurden Agarose und TAE-Puffer (dazu siehe Ziffer 3.1.6) gemischt und anschließend in einer Mikrowelle für drei Minuten erhitzt, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Danach wurde die flüssige Gelmasse mit TAE-Puffer wieder auf ihr Anfangsvolumen aufgefüllt und auf einer Schüttelplatte auf circa 50 °C heruntergekühlt. Unter dem Abzug wurden 75 µl Ethidiumbromid, welches als DNA-bindender Farbstoff fungiert, hinzugegeben und das Gel wurde in einen mit einem Kamm bestückten Gelträger gegossen. Das ausgehärtete Gel wurde in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Um die Lauffronten auf dem Gel zu detektieren, wurden die Proben mit je 2 µl Blaumarker gefärbt und 10–20 µl der Probe sowie ein Längenmarker in die Taschen des Gels pipettiert. An das Gel wurde für 30 Minuten eine Spannung von 100 V angelegt. Die Lauflänge der DNA-Fragmente wurde mithilfe eines UV-Transilluminators beurteilt.

Zur Visualisierung der PCR-Produkte wurde ein zweiprozentiges Gel und Längenmarker der Größe 50 bp und für Restriktionsanalysen ein einprozentiges Gel mit einem Längenmarker der Größe 1000 bp verwendet.

3.2.3 Transformation

Das Einbringen rekombinanter DNA in Bakterienzellen wird als Transformation bezeichnet (Brix et., 2014). Der Ligationsansatz wurde zu 95 µl auf Eis aufgetauten kompetenten *E. coli* DH5α-Bakterien hinzugegeben und der Ansatz für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für 30 Sekunden folgte eine fünfminütige Inkubation auf Eis. Die Bakterien wurden dann für 60 Minuten in je 200 µl SOC-Medium bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert.

3.2.4 Vermehrung der transformierten Bakterien

Die transformierten Bakterien werden in einem Selektionsmedium angezüchtet, das ein Antibiotikum enthält, gegen das die Bakterien keine Resistenz besitzen. Mit der Transformation des Plasmids wird den Bakterien ein Resistenzgen zugeführt, das ein Wachstum im mit Antibiotikum versehenen Medium zulässt. So ist eine Selektion derjenigen Bakterien möglich, die erfolgreich transformiert werden konnten.

Die Bakterien wurden zunächst auf Agar kultiviert. Später folgten eine Selektion und Anzucht einzelner Klone im LB-Medium. Die Bakterien wurden jeweils in autoklavierten LB-Medien in Zentrifugenröhrchen und bei größeren Volumina in mit Folie abgedeckten Erlenmeyerkolben auf dem Kreisschüttler oder auf Agar bei 37 °C vermehrt. Zur Selektion der Kolonien wurden Medien und Agar mit Ampicillin (100 µg/ml, 1:1000) oder Kanamycin (25 µg/ml, 1:4000) versehen.

3.2.5 Klonscreening

Um zu überprüfen, ob Transformationen erfolgreich waren, wurde die DNA der Bakterienklone unter Verwendung geeigneter Primer amplifiziert.

Im Rahmen des Screenings nach der Transformation wurde jeweils ein Drittel des oben unter 3.2.1 angegebenen PCR-Ansatzes verwendet. Mit einer sterilen Pipettenspitze konnte eine Bakterienkolonie von der Agarplatte ausgewählt und in den vorbereiteten PCR-Ansatz überführt werden. Die Pipettenspitze wurde anschließend sicher aufbewahrt und diente nach der PCR der Weitervermehrung der getesteten Kolonie in LB-Medium.

3.2.6 Plasmid-DNA-Isolierung

Die Plasmidisolierung erfolgte aus am Vortag mit transformierten *E. coli* angeimpftem LB-Medium (3–5 ml bzw. 100 ml) mithilfe der Plasmid-DNA-Purification-Kits von Macherey-Nagel nach den Angaben des Herstellers. Es kamen das NucleoSpin-Plasmid-Kit für die Minis sowie das NucleoBond-AX-100-Kit für die Midis zum Einsatz. Die Methode beruht auf einer alkalischen Lyse der Zellen (Birnboim und Doly, 1979).

3.2.7 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Um die Konzentration der isolierten Plasmide und der aufbereiteten Inserts und Vektoren zu bestimmen, wurde ihre Absorption bei 260 nm photometrisch bestimmt. Anhand des Quotienten der Absorptionswerte von 260/280 nm konnte außerdem auf die Reinheit der isolierten Proben geschlossen werden. Dieser Quotient beläuft sich bei einer reinen DNA-Probe auf circa 1,8 (Hauk, 2013).

3.2.8 Sequenzierung

Die isolierten Plasmide wurden durch die Firma SEQ-IT in Kaiserslautern über die Primer M13 forward und reverse sequenziert.

3.2.9 Restriktionsenzymverdau

Zur Vorbereitung der Ligation müssen der Vektor und das Insert mit Restriktionsenzymen behandelt werden, so dass diese kompatible Schnittstellen erhalten. Ebenfalls dient der Restriktionsenzymverdau dazu, den korrekten Einbau des Inserts zu überprüfen.

Der Verdau erfolgte als 30 µl-Ansatz mit je 2 µg DNA, 3 µl zu den Enzymen kompatibelem Puffer, je 1 µl Enzym (10 U/µl) und X µl H₂O für eine Stunde bei 37 °C im Wasserbad. Um die Selbstligation des geschnittenen Vektors zu verhindern, wurde dem Vektor anschließend 1 µl alkalische Phosphatase (10 U/µl) hinzugefügt und der Ansatz zunächst für zehn Minuten bei 37 °C und danach für fünf Minuten bei 75 °C inkubiert.

3.2.10 DNA-Aufreinigung nach Restriktionsenzymverdau

Die mit den Restriktionsenzymen geschnittenen DNA-Fragmente wurden per Gelelektrophorese in einem 1%-igen Gel aufgetrennt. Der Ansatz des geschnittenen Inserts wurde vollständig auf das Gel aufgetragen und die entsprechende Bande mit einem sterilen Skalpell unter UV-Sicht herausgetrennt und isoliert. Zur Kontrolle des geschnittenen Vektors wurden 2 µl Vektor mit 5 µl H₂O sowie 2 µl Blaumarker auf das Gel aufgetragen.

Mit dem Zymoclean-Gel-DNA-Recovery-Kit konnten die sich im isolierten Gelstück befindliche DNA des Inserts und der geschnittene Vektor nach Herstellerangaben aufgereinigt werden. Die Anleitung wurde um eine Wiederholung des Waschschriffs erweitert, um ein noch besser gereinigtes Produkt zu erhalten.

3.2.11 Ligation

Bei einer Ligation werden die Enden des geschnittenen Inserts mit denen des nach dem Restriktionsenzymverdau geöffneten Vektors durch eine Ligase verknüpft. Dabei verestert die Ligase die Phosphatgruppe des einen DNA-Strangs mit einer Hydroxygruppe der Desoxyribose des anderen DNA-Strangs.

Die Ligationen wurden mit je 1 µl DNA-T4-Ligase (10 U/µl), 1 µl Ligasepuffer und 0,5–1 µl Vektor und X µl Insert (Insert:Vektor 3:1) und X µl H₂O als 10 µl-Ansatz für drei Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.2.12 pCR[®]2.1-TOPO-Klonierungsvektor

Taq-DNA-Polymerasen synthetisieren amplifizierte Produkte mit einem Desoxyadenosin-Überhang (Testori et al., 1994). Der für die Ligation verwendete pCR[®]2.1-TOPO-Vektor enthält einen passenden Desoxythymidin-Überhang. So können die PCR-Amplifikate effektiv und zeitsparend ligiert werden.

Die Ligation wurde mit dem TOPO-TA-Cloning-Kit durchgeführt. Zu 1 µl Insert wurde je 0,25 µl Puffer und 0,25 µl Vektor hinzugegeben und der Ligationsansatz wurde anschließend für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

3.3 Methoden der Zellkultur

Die Zellen wurden bei 37 °C unter einer Begasung mit 5 % CO₂ kultiviert. Um einer Kontamination mit Pilzsporen und Bakterien vorzubeugen, erfolgten sämtliche Arbeiten an einer Zellkulturbank in steriler Umgebung. Die Zelllinien wurden in dem oben unter 3.1.6 beschriebenen Zellkulturmedium kultiviert.

3.3.1 Kultivierung von HEK-293T-Zellen

Die HEK-293T-Zellen wurden regelmäßig unter dem Mikroskop auf ihre Konfluenz überprüft. Die Zellen wurden in einem Medium mit dem Antibiotikum G-418 (500 mg/l) kultiviert, um eine Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen zu erreichen.

Je nach Wachstumsverhalten der Zellen wurde das Medium gewechselt und aufgefangen, um aus diesem das exprimierte Protein zu isolieren. Um das Medium zu wechseln, wurden die Zellen aufgeschüttelt und das Medium mit den gelösten Zellen in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Anschließend wurden circa 10 % des Mediums mit den darin enthaltenen Zellen in eine neu mit G-418-Medium vorbereitete Zellkulturflasche übertragen und diese weiter kultiviert.

3.3.2 Kultivierung von U-2932-Zellen

Die mit einem Neurabin-I-reaktiven BZR transfizierten U-2932-Zellen wurden ebenfalls in einem Selektionsmedium kultiviert. Dieses besteht aus dem Zellkulturmedium, das um das Selektionsantibiotikum Hygromycin (250 mg/l) ergänzt wurde (Turner et al., 2018).

3.3.3 Kultivierung von PBMCs

Das Zellkulturmedium, in dem die PBMCs kultiviert wurden, hatte einen FCS-Gehalt von 1 %.

3.3.4 Expression des gegen Neurabin-I gerichteten BZR in U-2932-Zellen

Die Aktivierung der Expression des für den BZR codierenden Gens basiert auf dem Mechanismus der Tetracyclin-gesteuerten Genregulation. Dabei bindet Tetracyclin an einen reversen Tet-Transaktivator, der eine Konformationsänderung erfährt und an die Tet-Operatoren stromaufwärts der TATA-Box bindet. Dies ermöglicht die Transkription des

Zielgens. Der Mechanismus wird als Tet-on-Mechanismus bezeichnet (Gossen et al., 1995; Das et al., 2016).

Die Expression des BZR wurde durch eine Inkubation der Zellen mit dem Tetracyclin Doxycyclin der Konzentration 1 µg/ml induziert, welches am Vortag auf die Zellkultur gegeben wurde.

3.3.5 Gewinnung des in den Überstand sezernierten Proteins

Die HEK-293T-Zellen sezernieren das exprimierte Protein in den Überstand der Zellkultur, aus dem das Protein isoliert werden konnte. Im Rahmen des Mediumwechsels wurde der Überstand in Zentrifugenröhrchen isoliert, bei 2500 rpm für drei Minuten zentrifugiert und in einem Sammelgefäß (500 ml) aufgefangen. Um einer Keimbildung vorzubeugen, wurde das Sammelgefäß mit 1 ml Natriumazid versehen.

3.3.6 Transfektion

Als Transfektion wird das Einbringen von rekombinanter DNA in eine eukaryontische Zelle bezeichnet (Brix et al., 2014). Die Expression des großen T-Antigens des SV40 durch die HEK-293T-Zellen ermöglicht nach der Transfektion eine episomale Amplifikation des transfizierten Plasmids über seinen SV40-Replikationsursprung (Durocher et al., 2002). Um vorzubeugen, dass die transfizierte Zelle das Plasmid wieder abbaut und entfernt, wird mit einem Selektionsmedium gearbeitet. Dies umfasst das Antibiotikum G-418, für das die Plasmide ein Resistenzgen enthalten (siehe 3.3.1).

Um die Fremd-DNA in die Zellen einzubringen, wurde die Methode der Lipofektion gewählt. Bei dieser kommt es zur Bildung von lipophilen Komplexen zwischen DNA und synthetischen kationischen Lipiden, die anschließend mit der Lipiddoppelschicht der Zellmembran verschmelzen und die DNA ins Zellinnere überführen (Netzker, 2016).

Die Transfektion erfolgte an in 2 ml Zellkulturmedium kultivierten HEK-293T-Zellen mit einer Konfluenz von etwa 50–70 %. Zur Vorbereitung wurde 1 µg Plasmid-DNA in 100 µl reinem RPMI1640 verdünnt. Anschließend wurde der Ansatz mit 3 µl X-tremeGENE gemischt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf die Zellen gegeben.

3.3.7 Isolierung von PBMCs

PBMCs wurden aus EDTA-Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Dazu wurde das Blut auf Ficoll-Trennlösung im Verhältnis 1:1 geschichtet. Anschließend folgte für 30 Minuten eine Zentrifugation mit 400 g bei Raumtemperatur ohne Bremse. Hierbei kam es zur Auftrennung der Blutbestandteile nach ihrer Dichte. Anders als Erythrozyten sowie Granulozyten haben die PBMCs eine geringere Dichte als die Ficoll-Trennlösung. Die PBMCs setzen sich deshalb oberhalb der Trennlösung als Ring ab (Kanof et al., 1996). Sie konnten dann abpipettiert und auf 15 ml mit PBS aufgefüllt werden. Es folgten drei Waschschriffe bei 1500 rpm für vier Minuten bei 9 °C mit 15 ml PBS.

3.3.8 Zellzahlbestimmung mithilfe der Neubauer-Zählkammer

Um die Zellen in ihrer Vitalität unterscheiden zu können, wurden sie mit Trypanblau (0,5 %) (siehe Ziffer 3.1.6) im Verhältnis 1:1 gefärbt. Da der Farbstoff lediglich die Plasmamembranen der beschädigten Zellen passieren kann, färbt er nur die nicht vitalen Zellen. Die lebenden und nicht gefärbten Zellen wurden in zwei diagonal liegenden Eckquadraten in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellkonzentration wurde nach der Formel „Anzahl der Zellen x 10.000 x Verdünnungsfaktor = Anzahl der Zellen/ml“ berechnet.

3.4 Methoden der Immunologie und Proteinchemie

3.4.1 Konzentrierung des Überstands

Der Überstand mit dem exprimierten Konstrukt wurde in Vorbereitung auf die Behandlung mit dem ANTI-FLAG-M2-Affinity-Gel zunächst filtriert und anschließend über eine 30 kDa-Membran konzentriert.

3.4.2 Aufreinigung des Überstands

Das Protein aus dem Überstand wurde mit dem ANTI-FLAG-M2-Affinity-Gel isoliert. Dieses ist gegen die FLAG-Struktur des Proteins gerichtet und kann es so gezielt binden. Um 50 ml Überstand zu reinigen, wurde mit 200 µl ANTI-FLAG-M2-Affinity-Gel gearbeitet. Das Gel wurde zur Vorbereitung in 1 ml PBS-Waschpuffer gewaschen und abzentrifugiert und anschließend in den Überstand übertragen und der Überstand über Nacht bei 4 °C auf einem Rolltisch inkubiert.

Der Überstand wurde für zehn Minuten bei 2500 rpm zentrifugiert und das abzentrifugierte Gel in ein neues Gefäß überführt und für weitere drei Minuten bei 1800 rpm zentrifugiert. Es folgten drei Waschschriffe mit jeweils 1 ml PBS bei 10.000 rpm für 30 Sekunden. Die Lösung des FLAG-Proteins von der Gelmatrix erfolgte durch Hinzugabe von 250 µl Glycin (pH 3), gefolgt von einem zweiminütigen Warteschritt, währenddessen sich die Anti-FLAG-Strukturen des Gels wieder von den FLAG-Strukturen des Proteins lösen. Das Gel wurde bei 10.000 rpm für 30 Sekunden abzentrifugiert und der Überstand mit dem isolierten Protein mit 25 µl Na₂HPO₄ versehen. Um den nicht physiologischen sauren pH-Wert zu puffern, folgte über Nacht eine Dialyse über eine in den Deckel des Eppendorfgefäßes eingespannte Dialysemembran mit PBS.

3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekülmasse. Durch Verwendung von SDS wird die natürliche Ladung der Proteine überdeckt, indem SDS an die Proteine in einem zu ihrer Molekülmasse proportionalen Verhältnis bindet und ihnen eine negative Ladung verleiht. Die Proteine werden anschließend auf ein Gel aufgetragen und wandern in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode. Dabei wirkt das Polyacrylamidgel wie ein Maschennetz, so dass kleinere Proteine im elektrischen Feld weniger stark zurückgehalten werden und weiter wandern als größere (Kalbitzer, 2014).

Das Gel enthielt einen Trenn- und einen Sammelanteil, die sich in ihren pH-Werten unterschieden. Zuerst wurde das Trenngel zubereitet und in die Apparatur gegossen. Anschließend diente destilliertes Wasser dazu, die Kante des Trenngels gerade aushärten zu lassen. Nach Aushärtung des Trenngels wurde das Wasser entfernt und das angesetzte Sammelgel auf das polymerisierte Trenngel gegossen. Zur Ausbildung der Geltaschen wurde ein Kamm in das Sammelgel eingebracht.

Die Proben für die Elektrophorese wurden mit SDS-Probenpuffer gefärbt (Proteinproben aus dem Überstand mit 1-fach Puffer, Eluate mit 2-fach Puffer und Zellpellets mit je 150 µl 5-fach Puffer). Anschließend wurden die Proben und ein Protein-Größenmarker in die Geltaschen pipettiert. Das Gel wurde in einer mit Lämmli-Puffer gefüllten Kammer eingespannt. Die Gel-Laufzeit betrug etwa 40 Minuten bei 200 V.

3.4.4 Transfer

Um die Proteine in einer Folgereaktion nachweisen zu können, müssen diese durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Trägermembran übertragen werden.

Die Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) wurde zunächst für fünf Minuten in 100%igem Methanol und anschließend für zehn Minuten in Transferpuffer mit 20 % Methanol vorbehandelt. Die Blotting-Filterpapiere wurden ebenfalls vor Benutzung mit 20 % Methanol enthaltendem Transferpuffer behandelt. Die Schichtung für den Blot beinhaltete je drei Blotting-Filterpapiere zu beiden Polen hin und dazwischen die vorbehandelte PVDF-Membran sowie das Gel. Mit einem Glasstab konnten durch Überrollen Luftblasen entfernt werden. Der Transfer auf die Membran erfolgte bei 480 mA und 24 V für 30–45 Minuten.

3.4.5 Blockung

Um freie Proteinbindungsstellen zu blockieren, wurde die PVDF-Membran in 50 ml TBS und 5 g Milchpulver bei 4 °C über Nacht auf dem Schüttler mit anschließendem Waschschrift in reinem TBS für zwei Minuten vorbehandelt.

3.4.6 Immundetektion

Die PVDF-Membran mit den übertragenen und blockierten Proteinen wurde für 45 Minuten leicht schüttelnd mit Monoclonal-ANTI-FLAG-M2 behandelt (1:2500 in 15 ml TBS-Waschpuffer). Es folgten fünf Waschschriffe von je zwei Minuten in TBS-Waschpuffer auf dem Schüttler. Anschließend wurde die Membran mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten peroxidasemarkierten Sekundärantikörper (1:3000 in 15 ml TBS-Waschpuffer) schüttelnd für 45 Minuten behandelt und fünfmal für je zwei Minuten in TBS-Waschpuffer gewaschen.

3.4.7 Chemolumineszenz

Der peroxidasemarkierte Sekundärantikörper wurde mithilfe des Kits von Cell Signaling Technology nachgewiesen. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase katalysiert die Chemolumineszenzreaktion von Luminol. Dabei wird Luminol in ein angeregtes Dianion umgewandelt, welches in einem energiereichen Triplett-Zustand vorliegt und anschließend auf ein niedrigeres Energieniveau fällt. Es kommt zur Emission von Licht, das mit einem Röntgenfilm nachgewiesen werden kann (Giussani et al., 2019).

Die Substrate wurden im Verhältnis 1:20 mit 2 ml H₂O angesetzt. Anschließend wurde der Ansatz auf die zwischen zwei Folien liegende PVDF-Membran gegeben und in einer Filmkassette für eine Minute inkubiert.

Die Proteinbanden wurden durch Auflegen eines Röntgenfilms in einer Dunkelkammer für circa 30 Sekunden bis fünf Minuten nachgewiesen. Anschließend wurde der Film entwickelt, gewässert und fixiert.

3.4.8 Coomassie-Gelfärbung

Die Färbung nach Coomassie ist eine unspezifische Nachweismethode von Proteinen auf einem SDS-Gel. Der Coomassie-Brilliant-Blau R-250-Farbstoff lagert sich an die Seitenketten von Proteinen an und färbt diese.

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurde das Gel für 30 Minuten in einer Petrischale mit Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend über Nacht in Coomassie-Entfärbelösung entfärbt und getrocknet.

3.4.9 Konzentrationsbestimmung von Eluaten

Die Konzentration des Proteins im Eluat wurde mit dem Spektralphotometer bei 280 nm bestimmt.

3.4.10 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen mit Laserlicht bestrahlt. Über die Analyse von Streu- und Fluoreszenzverhalten kann so auf Eigenschaften sowie Oberflächenmerkmale der Zellen geschlossen werden (McKinnon, 2018).

5×10^6 Zielzellen wurden mit einem FLAG-markierten IgG1-BAR-Body der Konzentration 10 µg/ml für 30 Minuten inkubiert und anschließend gefärbt. Hierzu wurden die Zellen mit einem Sekundärantikörper (Anti-FLAG, Konzentration 1:500 in PBS) und einem Tertiärantikörper (Anti-IgG1-APC, Konzentration 1:10 in PBS), der an einen Farbstoff gekoppelt ist, behandelt. Mittels Durchflusszytometrie konnte die Intensität des Farbstoffs in den Assays ermittelt werden und eine Aussage darüber getroffen werden, wie gut der BAR-Body an die Zielzellen gebunden hatte.

Die BAR-Bodys und Antikörper wurden als 50 µl-Ansätze im Abstand von 30 Minuten auf die auf Eis inkubierten Zielzellen pipettiert. Dazwischen erfolgten jeweils Waschschriffe von drei Minuten in 600 µl PBS bei 1800 rpm. Die Analyse erfolgte in 600 µl PBS.

3.4.11 LDH-Assay

Lactatdehydrogenase (LDH) ist ein zytoplasmatisches Enzym, welches ubiquitär in allen Zellen vorkommt. Bei Zellmembranschädigung in einer Zellkultur tritt es in das Medium über. Die Ermittlung der LDH-Konzentration im Zellmedium dient als quantitativer Marker für Zytotoxizität und Zelltod im Assay. Dabei wird LDH durch die Reduktion von NAD⁺ zu NADH+H⁺ nachgewiesen. Das NADH+H⁺ dient als Reduktionsmittel bei der Bildung von Formazan, welches ein Absorptionsmaximum bei 492 nm hat. Die Absorptionswerte der einzelnen Assays werden photometrisch erfasst. Sie sind proportional zu den LDH-Konzentrationen (Decker und Lohmann-Matthes, 1988).

Die Assays enthielten sowohl Zielzellen als auch PBMCs und wurden mit BAR-Bodys oder reinem RPMI als Hintergrundkontrolle inkubiert. Die LDH-Assays wurden mit dem Cytotoxicity-Detection-Kit^{PLUS} von Roche nach Herstellerangaben durchgeführt.

Zur Vorbereitung wurden Zielzellen und PBMCs jeweils dreimal in reinem RPMI bei 1500 rpm für drei Minuten gewaschen. Die Ansätze enthielten alle circa 5×10^3 Zielzellen und circa 5×10^4 Effektorzellen. Die BAR-Bodys wurden in reinem RPMI auf 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml und 1,25 µg/ml verdünnt. Außerdem wurden die minimale Lyse in einem Assay ohne BAR-Body mit 5 µl reinem RPMI pro Ansatz sowie die maximale Lyse durch Hinzugabe von 5 µl zytotoxisch wirkendem Triton X-100 pro Ansatz bestimmt.

Die Assays wurden für drei Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Es folgte die enzymatische LDH-Detektion. Die bei 490 nm gemessenen Absorptionswerte sind als Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit Standardabweichung angegeben. Anschließend wurde die spezifische Lyse in Prozent nach der Formel $\frac{\text{ermittelter Absorptionswert} - \text{minimale Lyse}}{\text{maximale Lyse} - \text{minimale Lyse}} \times 100$ berechnet.

4. Ergebnisse

4.1 Klonierung des IgG1-Neurabin-I-BAR-Bodys

Die variablen Domänen eines physiologischen Immunglobulins umfassen jeweils 110 Aminosäuren (Ansorge und Täger, 2014). An die Positionen von VH und VL des IgG1-BAR-Bodys wurde deshalb mit den Aminosäuren 1168–1285 von Neurabin-I ein ähnlich langer Abschnitt integriert. Der als VH und VL klonierte Neurabin-I-Abschnitt beinhaltet die Aminosäuresequenz 1126–1251, welche die höchste Bindungsaffinität zum Neurabin-I-reaktiven BZR des PZNSL hat und das Epitop ist (*Abbildung 1*). Die Sequenz befindet sich dabei in der Mitte der variablen Region des Immunglobulins und wird von beiden Seiten durch weitere Aminosäuren von Neurabin-I umschlossen. Arbeiten, bei denen das Epitop von Neurabin-I in ein Fab-Format bestehend aus CH1 und einem Ausschnitt aus Neurabin-I als VH kloniert wurde, zeigen, dass der BZR das Epitop so am besten bindet (Bewarder et al., 2020).

960	970	980	990	1000
HITKLLPPKG	LRTSSPESDS	GVPLTPVDS	NVPFSSDHIA	EFQEEPLDPE
1010	1020	1030	1040	1050
MGPLSSMWGD	TSLFSTSKSD	HDVEESPCHH	QTTNKKILRE	KDDAKDPKSL
1060	1070	1080	1090	1100
RASSSLAVQG	GKIKRKFVDL	GAPLRNNSK	GKKWKEKEKE	ASRFSAGSRI
1110	1120	1130	1140	1150
FRGRLNWTP	KPCSTAQTST	RSPCMPFSWF	NDSRKGYSYF	RNLPAPTSSL
1160	1170	1180	1190	1200
QPSPETLISD	KKGSKVEN	ITKANKRNP	PSSSIFGRH	SQLMSVWVWIQ
1210	1220	1230	1240	1250
ETNFTFNDD	FSPSTSSAD	LSGLGAEPKT	PGLSQSLALS	SDEILDDGQS
1260	1270	1280	1290	1300
PKHSQCQIRA	VQEWVQQVS	HWLMSLNLEQ	YVSESAQNI	TGEQLQLDG
1310	1320	1330	1340	1350
NKLGALGMTA	SQDRAVKKK	LKEMKMSLEK	ARKAQEKMEK	QREKLRKKEQ
1360	1370			
EQMQRKSKKT	EKMTSTTAEG	AGEQ		

Abbildung 1: Ausschnitt aus der Proteinsequenz der Isoform 3 von Neurabin-I. Hervorgehoben ist die Aminosäuresequenz 1168–1285, die in den IgG1-Vektor kloniert wurde (aus www.uniprot.org, primary accession number: Q9ULJ8-3).

Um den BAR-Body zu klonieren, wurde auf einen IgG1-Vektor aus dem Labor zurückgegriffen. Dieser enthält die konstanten Domänen der schweren Kette CH1, CH2 und CH3 sowie der leichten Kette CL des IgG1. Der Vektor verfügt über eine Furin-2A-Schnittstelle, die eine Zusammenlagerung der Immunglobulinketten im Rahmen der Translation ermöglicht (*Abbildung 2*). Der Vektor enthält ein Ampicillin-Resistenzgen.



Abbildung 2: Ausschnitt aus dem verwendeten IgG1-Vektor. Der schweren und leichten Kette sind Signalpeptide vorangestellt.

Die einzelnen Klonierungsschritte der VH und VL wurden separat für VH über die Schnittstellen MunI und BstEII und für VL über die Schnittstellen AgeI und SmaI vorgenommen. VH und VL wurden nacheinander in den IgG1-Vektor integriert (*Abbildung 3*). Der IgG1-Vektor ist ein TA-Vektor und wurde anschließend in einen Expressionsvektor integriert.

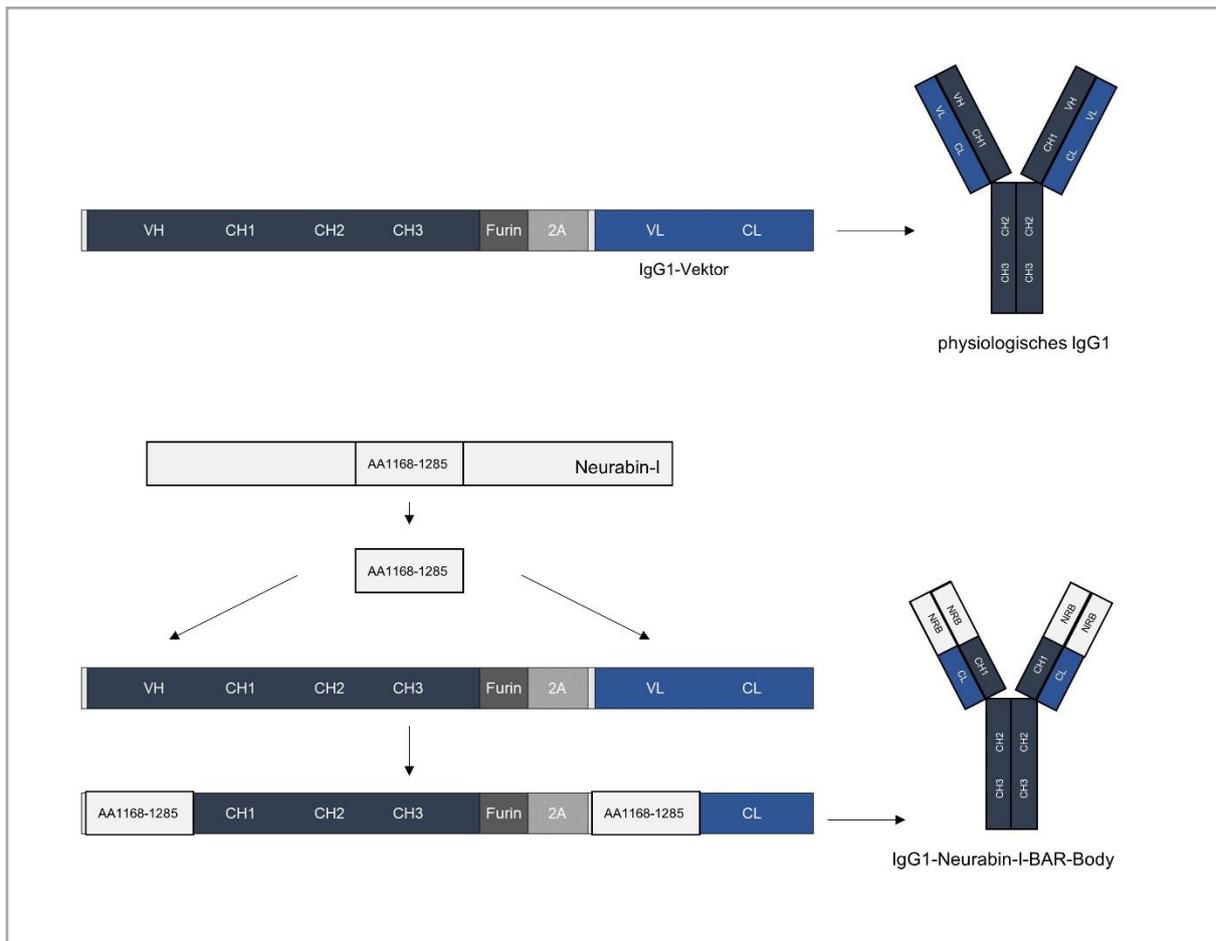


Abbildung 3: Klonierungsschritte für die Konstruktion des IgG1-Neurabin-I-BAR-Bodys. Die Integration der Aminosäuren AA1168–1285 aus Neurabin-I (weiß) in den IgG1-Vektor erfolgte nacheinander. Die Abbildung zeigt oben das physiologische IgG1 ohne klonierte Regionen und unten den BAR-Body mit klonierten Sequenzen anstelle der variablen Regionen.

4.1.1 Amplifikation der Neurabin-I-DNA

Zur Vorbereitung der Klonierung in den IgG1-Vektor erfolgte die Amplifikation der Neurabin-I-DNA per PCR. Dadurch wurde erreicht, dass die Neurabin-I-Sequenz von charakteristischen Schnittstellen flankiert wird, die für die Klonierung in die VH- und VL-Region des IgG1-Vektors erforderlich sind. Die Amplifikation der Neurabin-I-Sequenz, die in die VH-Region integriert wurde, erfolgte mit den Primern Mun1-s und BstEII-as. Die Amplifikation der Neurabin-I-Sequenz, die in die VL-Region integriert wurde, erfolgte mit den Primern Agel-s und Smal-as. Die aus dieser PCR hervorgegangenen Produkte werden im Folgenden als NRB-VH und NRB-VL bezeichnet.

Die Länge der amplifizierten DNA-Sequenz belief sich auf 117 Aminosäuren. Dies entspricht 351 Basenpaaren (bp). Sowohl für NRB-VH als auch für NRB-VL konnten Banden dieser Länge nach der PCR mittels Agarose-Gelelektrophorese dargestellt werden (*Abbildung 4*).

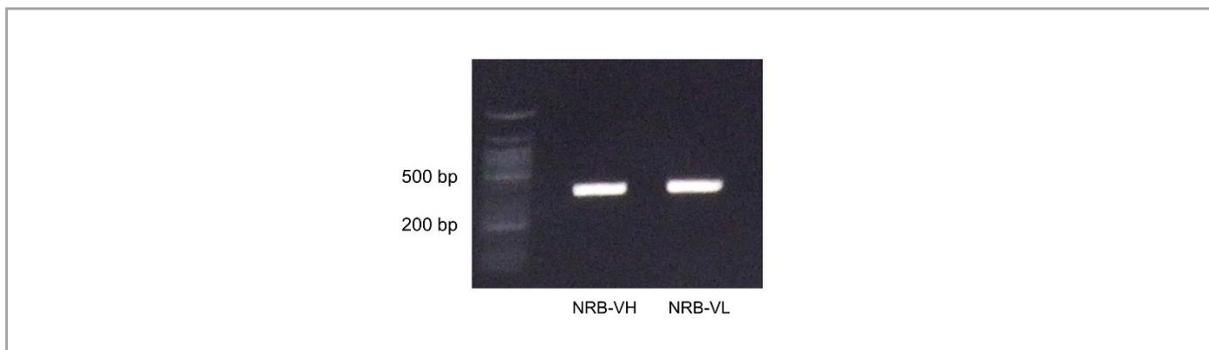


Abbildung 4: PCR-Kontrolle der Amplifikation der Neurabin-I-DNA mittels Agarose-Gel-elektrophorese. Für die Integration in VH erfolgte die Amplifikation der Neurabin-I-DNA mit den Primern Mun1-s und BstEII-as; das Produkt wird als NRB-VH bezeichnet (links). Für die Integration in VL erfolgte die Amplifikation mit den Primern Agel-s und Smal-as; das Produkt wird als NRB-VL bezeichnet (rechts).

Die mit den Schnittstellen für die Integration in VH und VL amplifizierten DNA-Sequenzen NRB-VH und NRB-VL wurden in den pCR[®]2.1-TOPO-Vektor ligiert, kompetente *E. coli* DH5 α -Bakterien mit dem Plasmid transformiert und über Nacht inkubiert. Mittels PCR mit den Primern M13 forward und reverse wurden einzelne Kolonien auf eine erfolgreiche Transformation untersucht (*Abbildung 5*). Klon NRB-VH #2 und NRB-VL #6 wurden in LB-Medium mit Ampicillin weiter kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde isoliert und sequenziert.

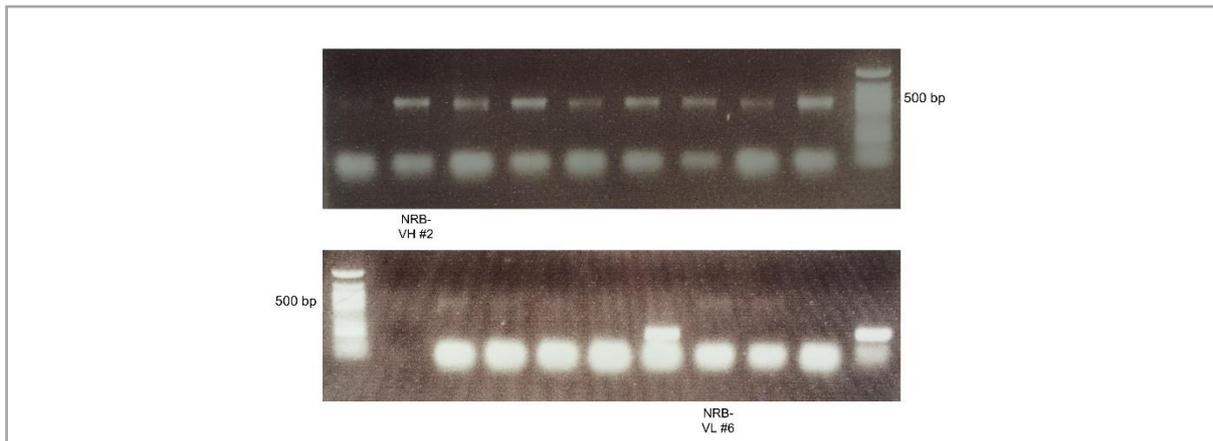


Abbildung 5: PCR-Kontrolle der Integration von NRB-VH (oben) und NRB-VL (unten) in den pCR[®]2.1-TOPO-Vektor mittels Agarose-Gelelektrophorese

4.1.2 Klonierung der Neurabin-I-DNA in die VH-Position des IgG1-Vektors

Zunächst wurde NRB-VH in den IgG1-Vektor kloniert. Der Restriktionsenzymverdau des IgG1-Vektors sowie des aufgereinigten NRB-VH-Plasmids erfolgte mit den Restriktionsendonukleasen *BstEII* und *MunI* (Abbildung 6).

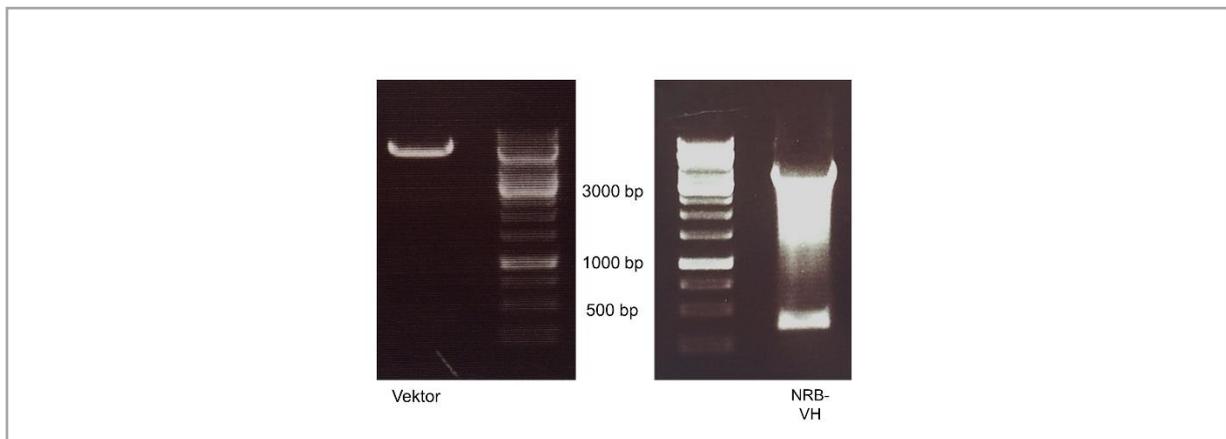


Abbildung 6: Kontrolle des Restriktionsenzymverdaus des IgG1-Vektors und der NRB-VH-DNA mit *BstEII* und *MunI* mittels Agarose-Gelelektrophorese

Anschließend erfolgte die Ligation, die Transformation kompetenter *E. coli* DH5 α -Bakterien mit dem gebildeten Plasmid und die Anzucht der Bakterien auf Agar mit Ampicillin. Mittels PCR-Analyse einzelner Bakterienkolonien mit den Primern *MunI*-s und *CH13*-as wurde die korrekte Transformation der Plasmide überprüft (Abbildung 7). Der Bakterienklon IgG1-NRB-VH #2 wurde weiter inkubiert und die Plasmid-DNA wurde isoliert und sequenziert.



Abbildung 7: PCR-Kontrolle der Integration von NRB-VH in den IgG1-Vektor mittels Agarose-Gelelektrophorese

4.1.3 Klonierung der Neurabin-I-DNA in die VL-Position des IgG1-Vektors

Um NRB-VL in den IgG1-Vektor zu klonieren, der nun NRB-VH enthielt, wurden der Vektor und die amplifizierte NRB-VL-DNA (siehe oben Ziffer 4.1.1) mit den Restriktionsendonukleasen *Sma*I und *Age*I geschnitten und anschließend ligiert (*Abbildung 8*).

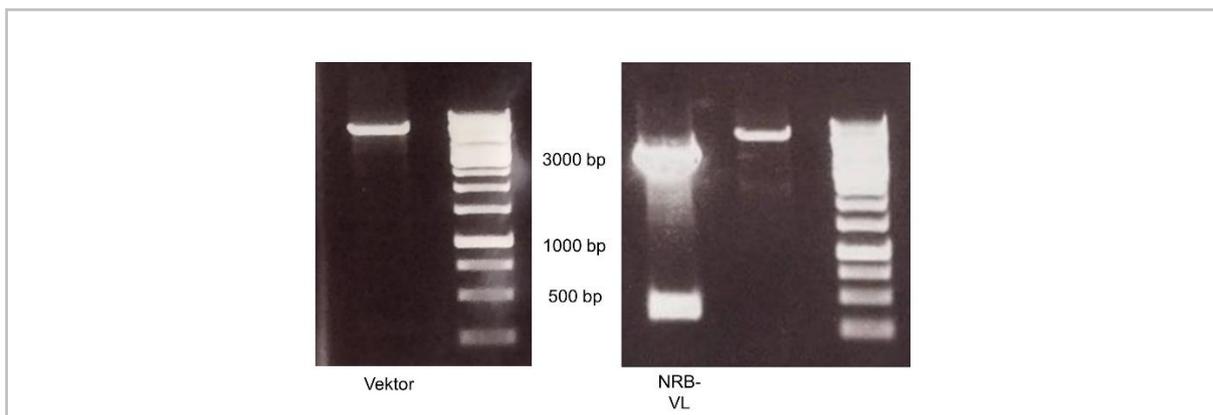


Abbildung 8: Kontrolle des Restriktionsenzymverdaus des IgG1-NRB-VH-Vektors und der NRB-VL-DNA mit *Sma*I und *Age*I mittels Agarose-Gelelektrophorese

Kompetente *E. coli* DH5 α -Bakterien wurden mit dem Ligationsprodukt transformiert und über Nacht auf Agarplatten mit Ampicillin inkubiert. Eine PCR mit den Primern Kappa-as und *Age*I-s diente der Kontrolle auf eine erfolgreiche Transformation (*Abbildung 9*). Es folgten die Anzuchtung des Klons IgG1-NRB-VH-NRB-VL #7, die Plasmidaufreinigung und die Sequenzierung der Plasmid-DNA.

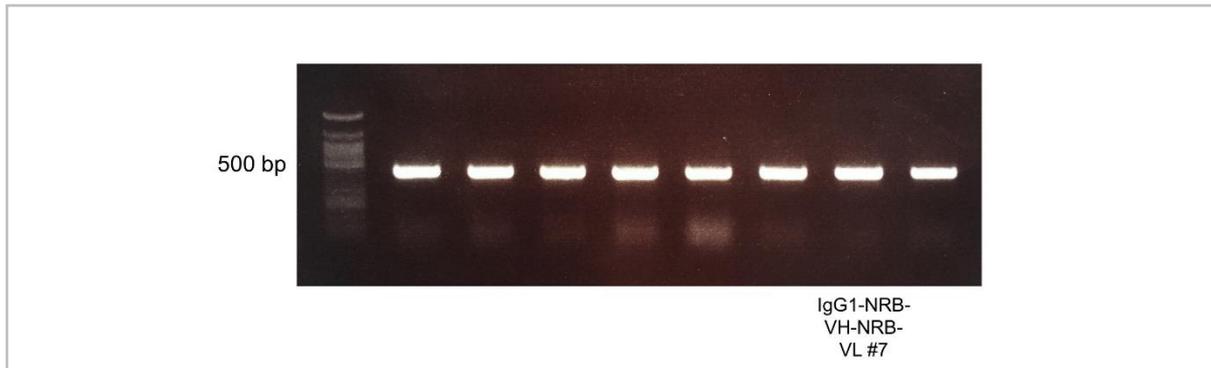


Abbildung 9: PCR-Kontrolle der Integration von NRB-VL in den IgG1-NRB-VH-Vektor mittels Agarose-Gelelektrophorese

4.1.4 Klonierung des fertigen Konstruktes in den Expressionsvektor

Um den BAR-Body von einer Zelllinie exprimieren zu lassen, musste die in einem TA-Vektor vorliegende, mit NRB-VH und NRB-VL klonierte IgG1-Sequenz, in einen Expressionsvektor (pSfi-Express-FLAG-tag) kloniert werden.

Der pSfi-Express-FLAG-tag-Vektor wurde durch Austausch des eGFP gegen eine FLAG-Sequenz aus einem pEGFP-C1-Vektor gewonnen (Bewarder et al., 2020). Diese FLAG-Sequenz liegt neben dem Insert und wird ebenfalls exprimiert. Der IgG1-BAR-Body erhält so ein FLAG-Tag, welches in der anschließenden Aufbereitung und Testung über eine Anti-FLAG-Struktur gebunden und detektiert werden kann. Der Vektor verfügt über ein Kanamycin-Resistenzgen.

Die mit NRB-VH und NRB-VL klonierte IgG1-Sequenz wurde mit *Eco47III* geschnitten (Abbildung 10). Ein mit *EcoRV* geschnittener pSfi-Express-FLAG-tag-Vektor lag dem Labor bereits vor.

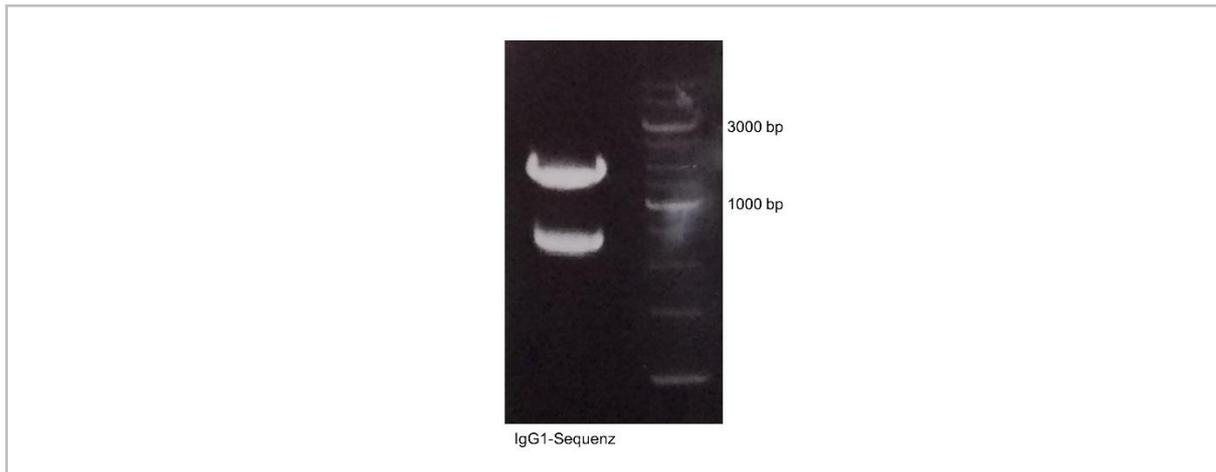


Abbildung 10: Kontrolle des Restriktionsenzymverdaus der IgG1-Sequenz mit Eco47III mittels Agarose-Gelelektrophorese

Nach dem Restriktionsenzymverdau wurden die IgG1-Sequenz und der Vektor ligiert, kompetente *E. coli* DH5 α -Bakterien mit dem Plasmid transformiert und auf Agar mit Kanamycin inkubiert. Per Kloncreening (Abbildung 11) mit den Primern CMV-s und CH13-as konnten dann korrekt transformierte Klone ausgewählt werden. Klon #30 und #31 sowie #33–35 wurden weiter inkubiert.

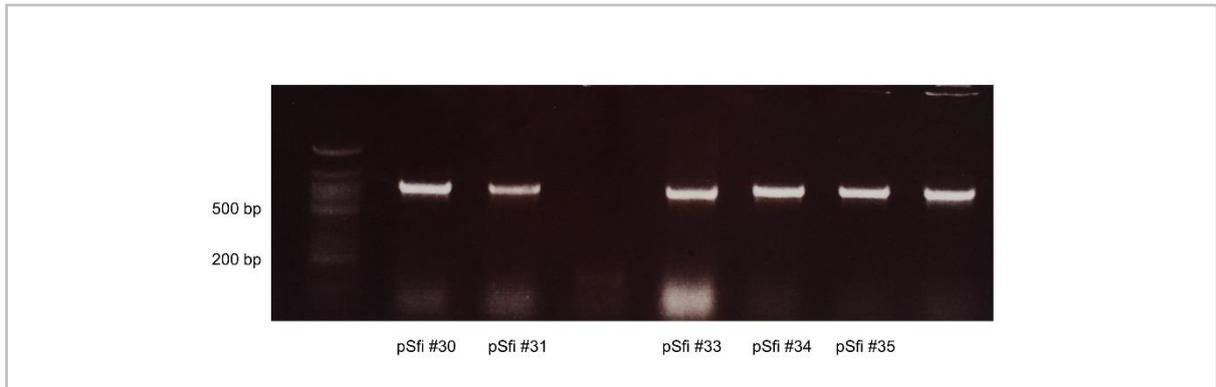


Abbildung 11: PCR-Kontrolle der Integration des IgG1-Inserts in den pSfi-Vektor mittels Agarose-Gelelektrophorese

Bei beiden verwendeten Restriktionsenzymen handelt es sich um gerade schneidende Enzyme, die gerade Enden produzieren. Das Insert kann folglich bei der Ligation sowohl in richtiger als auch falscher Orientierung in den Vektor integriert werden. Eine Restriktionsenzymanalyse des klonierten pSfi-IgG1-Vektors mit *Bst*EII konnte nach dem Kloncreening nachweisen, dass das Insert in der richtigen Orientierung integriert war. Für alle angezüchteten Klone konnte eine korrekte Integration nachgewiesen werden (Abbildung 12).

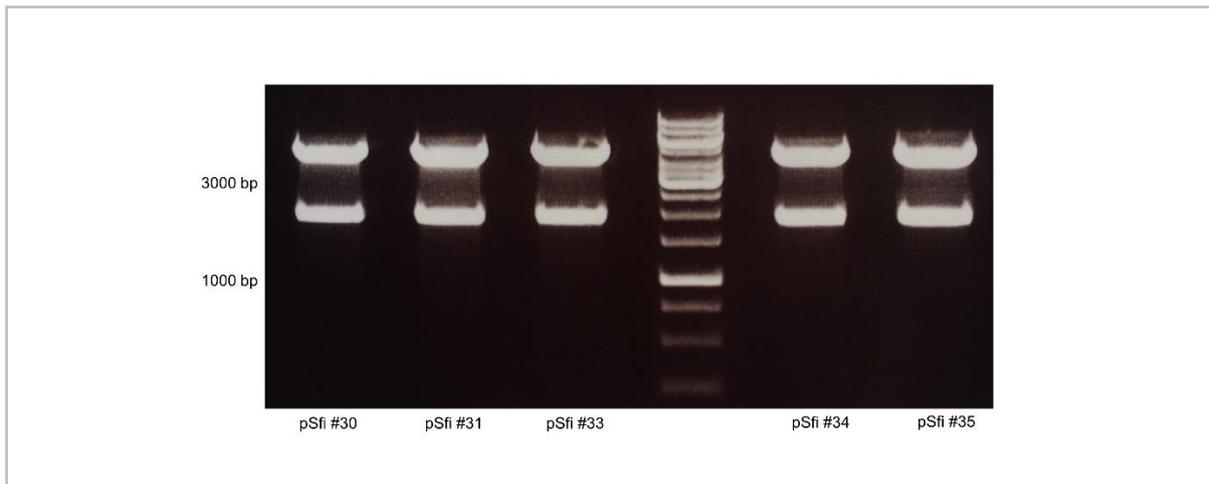


Abbildung 12: Kontrolle des Restriktionsenzymverdaus des pSfi-IgG1-Vektors mit BstEII mittels Agarose-Gelelektrophorese

4.2 Expression des IgG1-Neurabin-I-BAR-Bodys

4.2.1 Transfektion

Zur Expression des BAR-Bodys wurden fünf HEK-293T-Zellkulturen mit den fünf in 4.1 hergestellten Plasmiden #30, #31 und #33–35 transfiziert. Zur Kontrolle der Transfektion dienten Zellen aus derselben Kultur, die zeitgleich mit einem GFP-Plasmid (grün fluoreszierendes Protein) transfiziert wurden. Nach vier Tagen konnte in diesen Zellen unter einem UV-Mikroskop eine Fluoreszenz beobachtet werden, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die Zellen das Plasmid aufgenommen hatten und das GFP exprimierten.

Mittels Western-Blots wurde der IgG1-Antikörper vier Tage nach der Transfektion im Überstand sowie in den Zellpellets der fünf Transfektionsansätze nachgewiesen. Der BAR-Body wurde durch sein FLAG-Tag auf der PVDF-Membran mit einem monoklonalen Anti-FLAG-Antikörper detektiert. Dieser Primärantikörper konnte per Sekundärantikörper und Chemolumineszenz auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden (*Abbildung 13*).

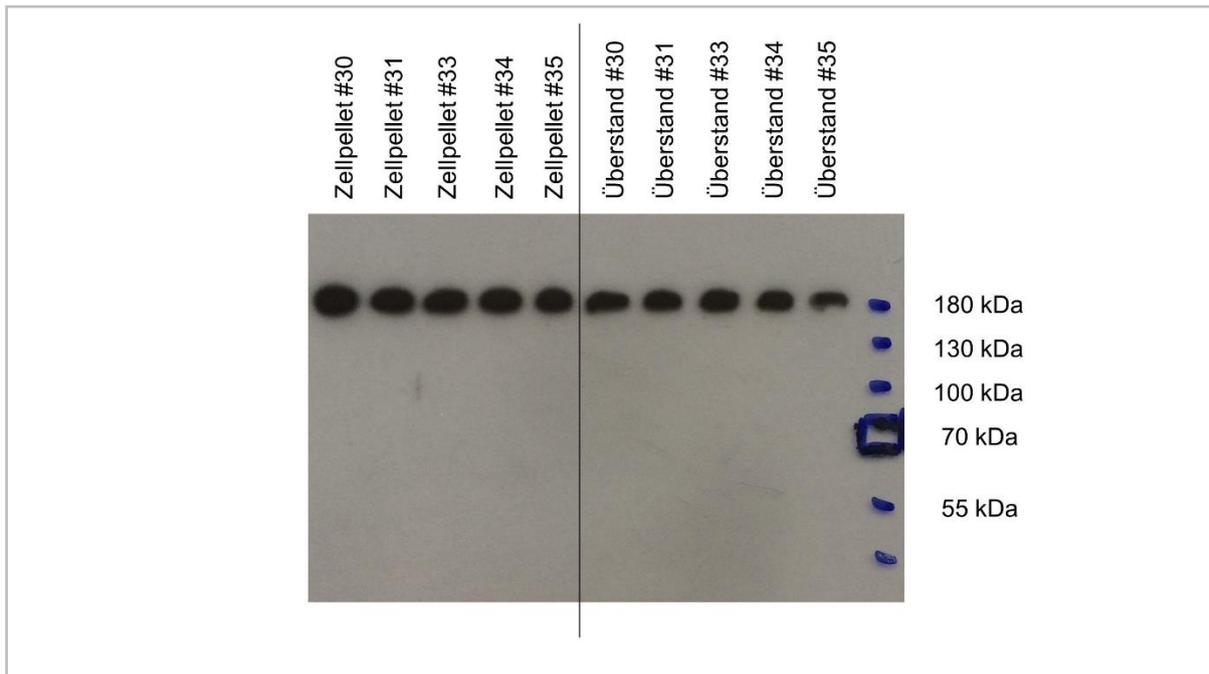


Abbildung 13: Nachweis des FLAG-markierten IgG1-Neurabin-I-BAR-Bodys aus transfizierten HEK-293T-Zellen vier Tage nach Transfektion mittels Western-Blots. Der BAR-Body wurde sowohl in Zellpellets (links) als auch in Überständen (rechts) nachgewiesen.

4.2.2 Aufreinigung des IgG1-Neurabin-I-BAR-Bodys

Nachdem der BAR-Body gemäß der unter 3.4.1 und 3.4.2 beschriebenen Methode aus dem Zellkulturüberstand isoliert und aufgereinigt war, betrug seine Konzentration im Eluat 449 µg/ml. Das Eluat wurde mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt. Ein Teil des SDS-Gels wurde mit Coomassie angefärbt und ein anderer Teil für einen Western-Blot weiterverwendet.

Für einen IgG-Antikörper wird eine Molekularmasse von 150 kDa beschrieben (Ansorge und Täger, 2014). Dem entsprach das Ergebnis der Coomassie-G-Färbung, die zeigte, dass das im Eluat aufgereinigte Protein eine Größe von 130 bis 180 kDa hatte (*Abbildung 14*). Der Western-Blot bestätigte zudem, dass das aufgereinigte Konstrukt eine FLAG-Struktur besaß und es sich also um den aufgereinigten BAR-Body handelte.

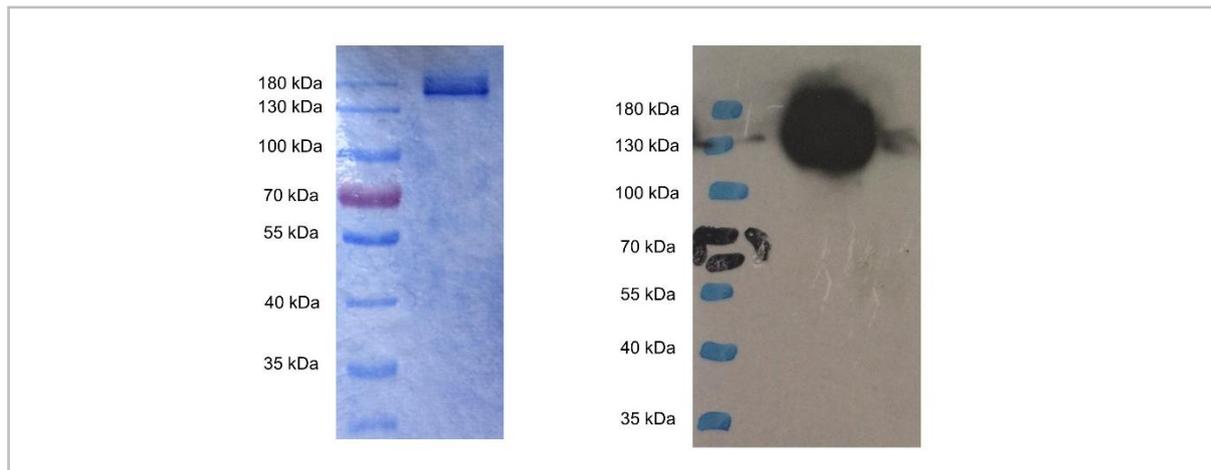


Abbildung 14: Nachweis des FLAG-markierten IgG1-Neurabin-I-BAR-Bodys im aufgereinigten Eluat mit einem Coomassie-G-gefärbten SDS-Gel (links) und mittels Western-Blots (rechts)

4.3 Funktionstests

4.3.1 Durchflusszytometrie

Der IgG1-Neurabin-I-BAR-Body wurde mit zwei Zellkulturen der U-2932-Zelllinie inkubiert, die sich in der Induktion der Transkription des Gens für den Neurabin-I-reaktiven BZR unterscheiden. In einer der Kulturen wurde die BZR-Expression auf der Zelloberfläche am Vortag durch eine Inkubation mit Doxycyclin induziert.

Die U-2932-Zielzellen beider Zellkulturen wurden nach der Beschreibung in Ziffer 3.4.10 mit dem IgG1-Neurabin-I-BAR-Body inkubiert. Danach folgte eine Behandlung mit einem monoklonalen Anti-FLAG-Antikörper und einem Anti-IgG1-APC-Antikörper. In der Durchflusszytometrie diente die Detektion APC-gefärbter Zielzellen als Nachweis dafür, dass diese den BAR-Body gebunden haben. Bei jedem der sechs gemessenen Ereignisse wurden 1×10^4 Zellen analysiert (Abbildung 15).

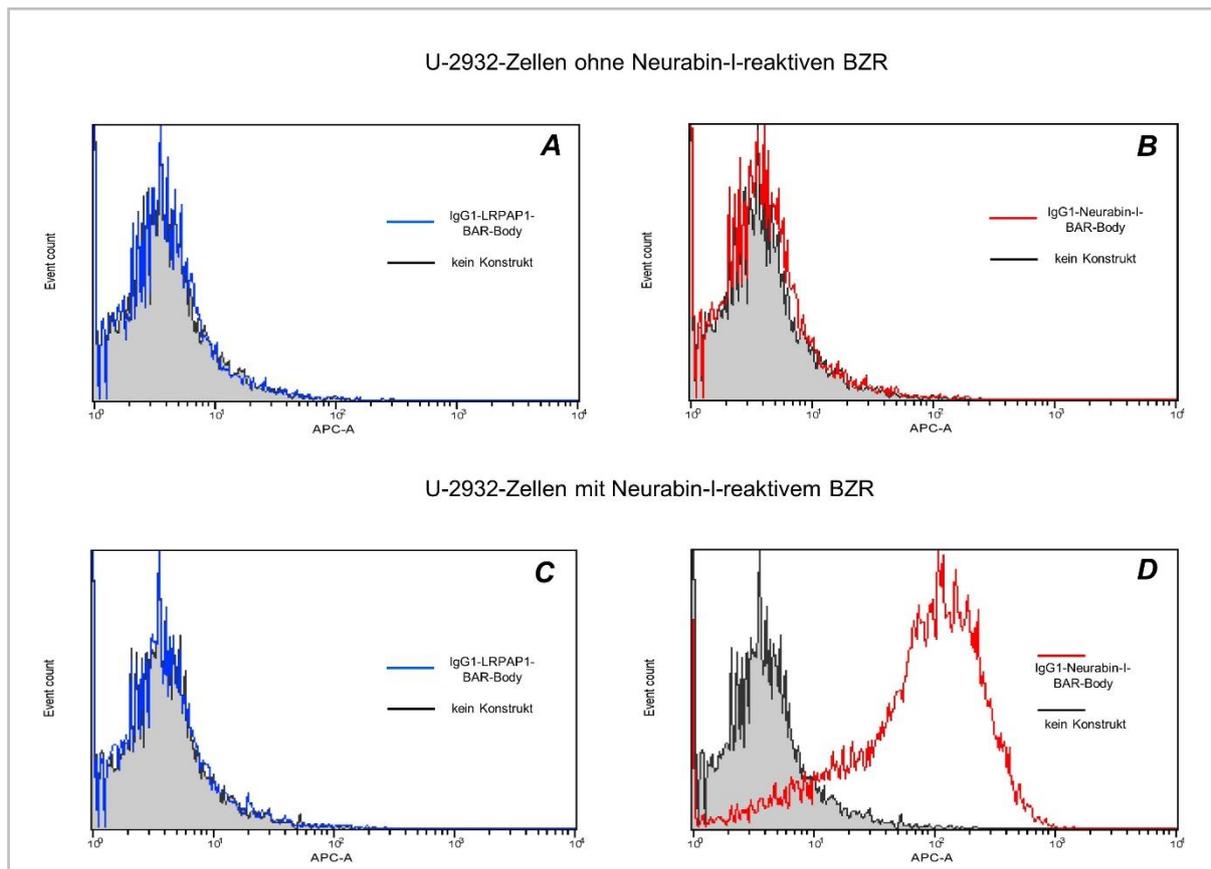


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse der APC-Intensität der Zielzellen in den mit dem IgG1-Neurabin-I-BAR-Body (B und D) und dem IgG1-LRPAP1-BAR-Body (A und C) inkubierten Ansätzen. A und B zeigen die Ergebnisse der U-2932-Zellen, die keinen Neurabin-I-reaktiven BZR exprimieren. C und D zeigen die Ergebnisse der U-2932-Zellen, die einen Neurabin-I-reaktiven BZR exprimieren.

In der Zellkultur, in der die Zellen einen Neurabin-I-reaktiven BZR exprimieren und mit dem IgG1-Neurabin-I-BAR-Body behandelt wurden, zeigte sich eine Zunahme der APC-Intensität (Abbildung 15, rote Kurve in D). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen den BAR-Body gebunden haben. In der Kultur, in der die Zellen keinen Neurabin-I-reaktiven BZR exprimieren, ist keine Zunahme der APC-Intensität bei Inkubation der Zellen mit dem BAR-Body zu erkennen (Abbildung 15, rote Kurve in B). Es konnte gezeigt werden, dass der IgG1-Neurabin-I-BAR-Body nur an Zellen der mit Doxycyclin vorbehandelten Kultur bindet und diese Bindung selektiv über den Neurabin-I-reaktiven BZR erfolgt.

Zur Kontrolle wurden die beiden Zellkulturen zusätzlich mit dem IgG1-LRPAP1-BAR-Body inkubiert, dessen variable Region einen Teil des Proteins LRPAP1 enthält. Der Kontroll-BAR-Body führte in keiner der beiden Zellkulturen zu einem Anstieg der APC-Intensität (Abbildung 15, blaue Kurven in A und C). Dies zeigte, dass die einen Neurabin-I-reaktiven BZR

tragenden Zielzellen keine Bindungen mit anderen BAR-Bodys eingehen, sondern nur spezifisch den mit dem BZR kompatiblen IgG1-Neurabin-I-BAR-Body binden.

4.3.2 LDH-Assay

Mittels LDH-Assays wurde untersucht, ob der IgG1-Neurabin-I-BAR-Body bei Inkubation der Zielzellen mit PBMCs Zytotoxizität vermittelt. LDH diente dabei als quantitativer Marker, um einen mit dem Zelltod einhergehenden Verlust der Zellmembranintegrität zu erfassen. Die freigesetzte LDH in den einzelnen Assays wurde nach einer dreistündigen Inkubation bei 37 °C photometrisch bestimmt.

Analog zum Versuchsaufbau der Durchflusszytometrie wurden sowohl zur Expression eines Neurabin-I-reaktiven BZR aktivierte als auch inaktivierte U-2932-Zellen mit PBMCs inkubiert. Alle Assays enthielten sowohl Zielzellen als auch PBMCs im Verhältnis 1:10. Die Zellen wurden entweder mit dem IgG1-Neurabin-I-BAR-Body oder dem Kontroll-BAR-Body (IgG1-LRPAP1-BAR-Body) verschiedener Konzentrationen inkubiert. Zur Hintergrundkontrolle wurden zusätzlich Zielzellen und PBMCs in reinem RPMI ohne BAR-Body inkubiert. *Tabelle 1* und *Abbildung 16* zeigen die jeweils ermittelten Absorptionswerte sowie die Werte der minimalen und der maximalen Lyse.

Tabelle 1. Ergebnisse des LDH-Assays

BZR-Expression	[µg/ml]	reines RPMI	IgG1-LRPAP1	IgG1-NRB	minimale Lyse	maximale Lyse
BZR-Expression	10	0,581 ± 0,02	0,597 ± 0,02	1,843 ± 0,06	0,587 ± 0,01	2,759 ± 0,02
	5	0,584 ± 0,03	0,601 ± 0,02	1,013 ± 0,04		
	2,5	0,582 ± 0,04	0,573 ± 0,03	0,821 ± 0,02		
	1,25	0,577 ± 0,03	0,567 ± 0,02	0,684 ± 0,01		
Keine BZR-Expression						
	10	0,565 ± 0,03	0,569 ± 0,01	0,553 ± 0,05	0,592 ± 0,02	2,775 ± 0,07
	5	0,570 ± 0,04	0,599 ± 0,03	0,576 ± 0,08		
	2,5	0,588 ± 0,03	0,603 ± 0,02	0,567 ± 0,07		
	1,25	0,585 ± 0,04	0,599 ± 0,03	0,566 ± 0,05		

Dargestellt sind die Absorptionswerte bei 490 nm in Abhängigkeit der inkubierten BAR-Bodys verschiedener Konzentrationen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte einer Dreifachbestimmung. Oben: die Ergebnisse der Ansätze, in denen zuvor mittels Doxycyclin die Expression eines Neurabin-I-reaktiven BZR in den U-2932-Zellen induziert worden ist. Unten: die Ergebnisse der Ansätze, in denen die Expression eines Neurabin-I-reaktiven BZR in den U2932-Zellen nicht induziert ist. Für beide Ansätze wurde eine minimale und maximale Lyse erfasst.

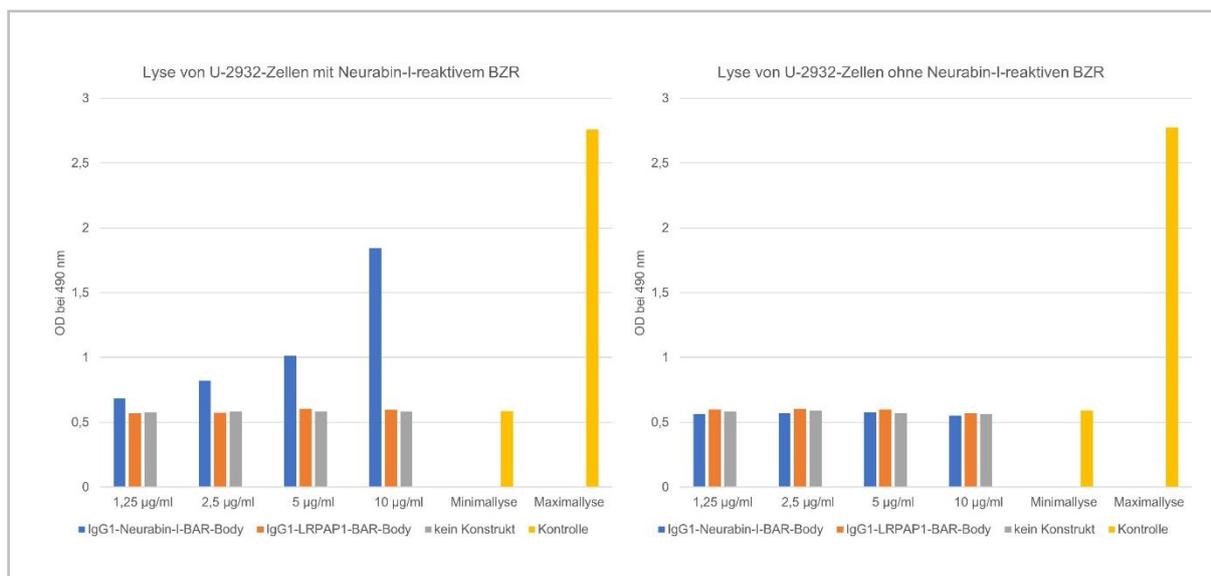


Abbildung 16: Lyse von U-2932-Zellen mit und ohne Neurabin-I-reaktiven BZR. Dargestellt sind die Absorptionswerte (OD) bei 490 nm des LDH-Release-Assays mit U-2932-Zellen, die einen Neurabin-I-reaktiven BZR exprimieren (links) und mit U-2932-Zellen, die keinen Neurabin-I-reaktiven BZR exprimieren (rechts). Alle Assays enthielten U-2932-Zellen und PBMCs und wurden mit dem IgG1-Neurabin-I-BAR-Body der Konzentrationen 1,25–10 µg/ml und dem Kontrollantikörper IgG1-LRPAP1-BAR-Body inkubiert.

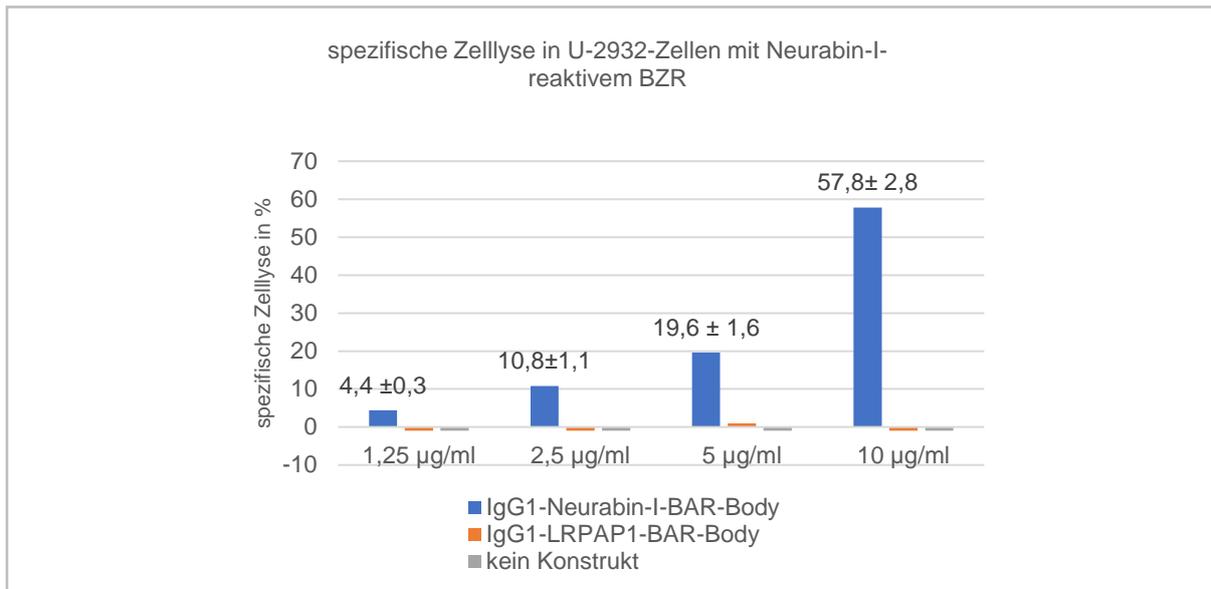


Abbildung 17: Spezifische Zelllyse in U-2932-Zellen mit Neurabin-I reaktivem BZR in Abhängigkeit der Konzentration des IgG1-Neurabin-I-BAR-Bodys. Die spezifische Zelllyse ist konzentrationsabhängig und reicht von 4 % bei einer Konzentration von 1,25 mg/ml bis zu 58 % bei einer Konzentration von 10 µg/ml.

Wie die Ergebnisse der Durchflusszytometrie gezeigt hatten, bindet der IgG1-Neurabin-I-BAR-Body spezifisch an Zielzellen, die einen Neurabin-I-reaktiven BZR exprimieren. Die in *Abbildung 16 und 17* dargestellten Ergebnisse zeigen, dass der BAR-Body *in vitro* nach Bindung an die Zielzellen eine von PBMCs ausgehende Zelllyse vermitteln kann. Diese Lyse ist konzentrationsabhängig. Bei einer Konzentrierung des BAR-Bodys auf 10 µg/ml konnte nach einer dreistündigen Inkubation mit PBMCs eine spezifische Zelllyse von 58 % gemessen werden (*Abbildung 17*).

In Assays, in denen die Zielzellen keinen BZR exprimierten oder in denen reines RPMI ohne BAR-Body inkubiert wurde, ließ sich kein zytotoxischer Effekt beobachten. Auch nach der Inkubation mit dem Kontroll-BAR-Body zeigte sich keine vermehrte Zelllyse (*Abbildung 16 und 17*). Dies bestätigte die Spezifität des konstruierten IgG1-Neurabin-I-BAR-Bodys für seine Zielzellen und zeigt, dass hierdurch eine selektive Zytotoxizität gegen diejenigen Zellen gerichtet werden kann, die den BAR-Body gebunden haben.

5. Diskussion

5.1 Das BAR-Konzept in der PZNSL-Therapie

In Deutschland gilt das MATRix-Protokoll als Behandlungsstandard für jüngere Patienten mit einer PZNSL-Erkrankung. Es umfasst die Gabe von hochdosiertem Methotrexat, Cytarabin und Thiotepa in Kombination mit dem monoklonalen CD20-Antikörper Rituximab (Schorb et al., 2019b). Mit diesem Therapieregime konnten im Rahmen der IELSG32-Studie gute Überlebenszeiten für Patienten erzielt werden. Die Ergebnisse zeigen aber auch, dass die Kombination aller Zytostatika des MATRix-Protokolls zu vermehrt hämatologischen Nebenwirkungen führt (Ferreri et al., 2016). Grund für die therapieassoziierten Nebenwirkungen der Zytostatika ist die unspezifisch gerichtete zytotoxische Wirkung, die alle proliferierenden Zellen angreift. Daher werden neben den neoplastischen Zellen auch gesunde Zellen zerstört.

Inhalt der onkologischen Forschung ist die Entwicklung einer Targeted Therapy. Dabei handelt es sich um Therapieformate, die gegen molekulare Zielstrukturen der Zellen gerichtet sind. Diese ergänzen oder ersetzen mittlerweile häufig die konventionelle Chemotherapie (Jochims et al., 2006). Auch diese Therapie ist jedoch durch eine nicht spezifisch auf die Tumorzelle vermittelte Zytotoxizität limitiert, da häufig keine Differenzierung zwischen gesunden und malignen Zellen gelingt (Peters und Brown, 2015). In Studien zum PZNSL wird unter anderem Rituximab, Ibrutinib und Temsirolimus eingesetzt.

Rituximab ist gegen das Antigen CD20 gerichtet. Dieses wird auf Prä-B-Zellen sowie reifen B-Zellen exprimiert und findet sich sowohl auf normalen B-Lymphozyten als auch auf malignen B-Lymphozyten (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, 2018). Nach Bindung von Rituximab an CD20 vermittelt der Antikörper verschiedene zytotoxische Mechanismen (dazu näher unter 5.2). Die Zytotoxizität richtet sich gegen den gesamten CD20-positiven B-Zell-Bestand des Patienten. Dabei findet keine Differenzierung zwischen maligner und gesunder Zelle statt, so dass immunologische und hämatologische Nebenwirkungen die Folge sind. Daher geht der Einsatz von Rituximab bei circa 30–55 % der Patienten mit einem Non-Hodgkin-Lymphom mit Infektionen (unter anderem Herpes Zoster, Zytomegalie- und Candidainfektionen sowie Reaktivierung einer Hepatitis-B-Infektion) und mit Leukenzephalopathien einher (Torchia et al., 2016; Salles et al., 2017). Ferner warnt die Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft vor schweren Immundefekten mit Hypogammaglobulinämie und protrahierter Depletion der B-Lymphozyten nach Behandlung mit Rituximab (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft, 2018). Besonders bei simultaner Gabe

mit weiteren Chemotherapeutika treten Leukopenien, Neutropenien und Panzytopenien auf (Salles et al., 2017).

Für die in der PZNSL-Therapie untersuchten Therapeutika Ibrutinib und Temsirolimus werden hohe therapieassoziierte Mortalitätsraten beschrieben, die unter anderem auf schwere Aspergillosen bei Ibrutinibgabe und auf Pneumonien unter der Anwendung von Temsirolimus zurückzuführen sind (Rubenstein, 2017).

Im Gegensatz zu den oben vorgestellten Therapeutika zeichnet sich das BAR-Konzept durch eine besonders hohe Spezifität für die malignen B-Zell-Klone aus. Diese wird durch die Verwendung der BZR-Antigene als therapeutische Zielstruktur erreicht. Für das PZNSL konnten in acht von zwölf Fällen die SAM-Domäne von Neurabin-I und SAMD14 als Antigene der BZR der malignen Zellen gefunden werden (Turner et al., 2018). Da das PZNSL eine klonale Erkrankung ist, exprimieren die malignen Klone den gleichen Neurabin-I-reaktiven BZR. Die Expression ist für die Zellen des PZNSL charakteristisch und besteht nicht in anderen Neoplasien. Durch Integration des Antigens Neurabin-I in ein Therapieformat, welches die PZNSL-Zellen über ihren Neurabin-I reaktiven BZR angreift, kann die Zytotoxizität selektiv auf die malignen Zellen gerichtet werden.

Die in dieser Arbeit untersuchte Fragestellung konnte erfolgreich beantwortet werden. Es ist in dem vorgestellten Forschungsprojekt gelungen, das BZR-Antigen Neurabin-I in ein IgG1-Format zu integrieren und zu exprimieren. Der IgG1-Neurabin-I-BAR-Body enthält Neurabin-I anstelle der variablen Domänen der schweren und leichten Kette des Immunglobulins. *In vitro* bindet dieser BAR-Body an B-Zellen, die einen Neurabin-I-reaktiven BZR exprimieren. Mittels LDH-Release-Assay konnte eine spezifische und durch den gebundenen BAR-Body vermittelte Zytotoxizität bei Inkubation der Zielzellen mit Effektorzellen nachgewiesen werden.

Bei einer Konzentrierung des BAR-Bodys auf 10 µg/ml konnte nach einer dreistündigen Inkubation mit Effektorzellen eine spezifische Zellyse von 58 % erreicht werden. Es wurde nicht untersucht, ob sich dieser Wert zum Beispiel durch eine längere Dauer der Inkubation oder ein anderes Verhältnis von Ziel- und Effektorzellen weiter verbessern lässt. Allerdings können bei solchen Überlegungen auch einige fixe Parameter eine Rolle spielen. Zu denken ist zum Beispiel an die Affinitätskonstante des BAR-Bodys zum BZR, die über Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie ermittelt werden könnte. Dies ist im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgt.

Für das PZNSL zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass ein selektiver Angriff auf maligne Klone mit dem BAR-Body über den für sie spezifischen BZR *in vitro* möglich ist, so dass das BAR-Konzept im IgG1-Format mit Neurabin-I erfolgsversprechend ist. Aufgrund der selektiv vermittelten Zytotoxizität besteht die Hoffnung, dass der Therapieansatz bei Anwendung am Patienten mit weniger therapieassoziierten Nebenwirkungen einhergeht, da nur die malignen Klone und keine anderen B-Zellen zerstört werden.

Ein weiterer Vorteil des BAR-Konzepts liegt darin, dass es bei einer Vielzahl von Patienten angewendet werden kann. So zeigt zum Beispiel die Immuntherapie mit CAR-T-Zellen zwar sehr gute Therapieerfolge, erfordert aber für jeden Patienten die Aufbereitung patienteneigener T-Zellen und ihre *Ex-vivo*-Ausstattung mit chimären Antigenrezeptoren (Buchholz et al., 2018). Auch Therapiekonzepte mit Antiidiotyp-Strukturen beinhalten ein für jeden Patienten individuelles Design (Vuist et al., 1994; Torchia et al., 2016). Für den BAR-Body gilt dies nicht, obwohl er ebenfalls höchst spezifisch an der Zielstruktur wirkt. Er kann bei mehreren Patienten eingesetzt werden, da seine Zielstruktur, der Neurabin-I-reaktive BZR, in 66 % der PZNSL-Proben nachgewiesen werden konnte (Turner et al., 2018).

Im Rahmen des BAR-Konzepts kann Neurabin-I auch an ein Immuntoxin gebunden werden, um Tumorzellen erfolgreich zu lysieren (Turner et al., 2018). Vorteil des mit der vorliegenden Arbeit untersuchten Therapieansatzes ist, dass auf eine externe Gabe einer zytotoxischen Substanz verzichtet werden kann.

Es muss allerdings diskutiert werden, ob die Grundidee, die Zelle über den BZR anzugreifen, das BAR-Konzept gleichzeitig anfällig für Resistenzmechanismen macht. Die Immunglobulin-Gene der PZNSL-Zellen sind sowohl somatisch rekombiniert als auch somatisch hypermutiert. Darüber hinaus lässt sich eine fortlaufende somatische Hypermutation mit intraklonaler Heterogenität nachweisen (Thompsett et al., 1999; Montesinos-Rongen et al., 2015). Die genetische Variabilität der malignen B-Zellen könnte leicht zu Mutationen des BZR führen. Dann wäre die Bindung des BAR-Bodys an den BZR beeinflusst oder die therapeutische Zielstruktur des BAR-Bodys ginge ganz verloren.

5.2 Der BAR-Body als Mediator der Zytotoxizität

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der BAR-Body Zielzellen mithilfe von Effektorzellen gezielt zerstören kann. Im Folgenden sollen diese Vorgänge und weitere vom BZR als Target des BAR-Bodys ausgehende Prozesse beleuchtet und diskutiert werden.

Effektormechanismen des Immunsystems

Zytotoxische Effekte von monoklonalen Antikörpern werden über Effektormechanismen des Immunsystems erzielt, die über den Fc-Teil der Immunglobuline vermittelt werden (Vuist et al., 1994). Trotz unterschiedlicher Zielstrukturen der monoklonalen Antikörper wird die Zytotoxizität durch dieselben Mechanismen vermittelt (González-González et al., 2019). Diese umfassen unter anderem eine antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC), eine komplementabhängige Zytotoxizität (CDC) sowie eine komplementabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (CDCC) (Peters und Brown, 2015).

Bei *In-vitro*-Inkubation des BAR-Bodys mit Zielzellen und Effektorzellen kommt es zum ADCC-Mechanismus. Dieser wird durch natürliche Killerzellen, Granulozyten und Monozyten vermittelt, die über ihre Fc γ -Rezeptoren mit dem Fc-Teil des BAR-Bodys interagieren und die mit dem BAR-Body beladenen Zielzellen lysieren (Salles et al., 2017). Da die Zielzellen im Rahmen dieser Arbeit lediglich mit aus Vollblut isolierten PBMCs inkubiert wurden und das Serum inklusive Komplementfaktoren verworfen wurde, liefern die Ergebnisse keine Aussage darüber, ob der BAR-Body ebenfalls eine CDC oder CDCC vermittelt.

Für den Fc γ -Rezeptor IIIa ist ein Polymorphismus bekannt, der bei manchen Patienten zu einer Rituximab-Resistenz führt (Bonavida, 2014). Eine ADCC ist bei diesen Patienten nur eingeschränkt möglich und würde auch eine Therapie mit dem BAR-Body limitieren.

Proliferative Signalkaskaden

Nach Bindung an den BZR wird für das Antigen Neurabin-I eine proliferative Signalkaskade beschrieben (Turner et al., 2018). Daher ist es denkbar, dass der BAR-Body im Rahmen eines therapeutischen Einsatzes ebenfalls einen proliferativen Effekt auf die malignen Klone ausübt und sie nicht wie gewünscht zerstört. Anders als bei Turner et al. umfasst der BAR-Body jedoch nicht nur das proliferativ stimulierende Antigen, sondern zusätzlich die schweren Regionen eines IgG1. So werden die malignen Klone durch die Fc-Teile des IgG1

für Effektorzellen markiert und können gezielt zerstört werden. Dies zeigen die Ergebnisse des LDH-Assays dieser Arbeit. Ob die proliferationsstimulierenden oder die zytotoxischen Effekte eines BAR-Bodys überwiegen, muss in weiteren Proliferationsassays untersucht werden.

BZR-Apoptoseprogramme

Neben Überlebens- und Aktivierungssignalen werden über den BZR auch Apoptoseprogramme initiiert. Diese dienen der Elimination von autoreaktiven B-Zellen. Der Einsatz von monoklonalen Antiidiotypen-Antikörpern hat gezeigt, dass sich diese Apoptoseprogramme auch therapeutisch nutzen lassen und so eine Tumorregression von Non-Hodgkin-Lymphomen erzielt werden kann (Vuist et al., 1994; Tsubata, 2001; Carter et al., 2016). Die Inkubation der Zielzellen mit monoklonalen Antiidiotyp-Strukturen induziert BZR-Signalkaskaden, die zu einem aktivierungsinduzierten Zelltod führen (Torchia et al., 2016).

Es ist daher denkbar, dass auch der BAR-Body einen BZR-induzierten Zelltod der malignen Klone auslösen könnte. Sollten sich diese Überlegung bestätigen, könnte davon ausgegangen werden, dass der BAR-Body bei seinem therapeutischen Einsatz die Tumorzellen nicht mehr nur für Effektorzellen zur Lyse markiert, sondern auch direkte BZR-vermittelte Zelltodprogramme initiiert.

Internalisierung des BAR-Body-BZR-Komplexes

Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (AWK) sind monoklonale Antikörper, die an Toxine konjugiert sind. Sie werden nach Bindung an ihre Zielstruktur per Rezeptor vermittelter Endozytose internalisiert und schädigen die Zellen. Obwohl die CD20-Struktur als nicht internalisierend gilt, konnte sogar für den chimären monoklonalen CD20-Antikörper Rituximab je nach konjugiertem Toxin eine Internalisierung nachgewiesen werden (Peters und Brown, 2015). Das Therapieformat der AWK zeigt, dass es bei Bindung von monoklonalen Antikörpern an zelluläre Oberflächenstrukturen zur Internalisierung der Antikörper kommt. Dies könnte auch auf den BAR-Body zutreffen.

Auch zwei weitere Aspekte könnten für eine Internalisierung des IgG1-Neurabin-I-BAR-Bodys sprechen. Zum einen handelt es sich bei seiner Zielstruktur, dem BZR, um eine besondere Zielstruktur, die die physiologische Aufgabe einer Antigeninternalisierung mit Prozessierung und Präsentation auf MHCII hat (Courtney et al., 2014). Zum anderen konnte eine

Internalisierung eines an das Neurabin-I-Epitop konjugierten Immuntoxins nachgewiesen werden (Thurner et al., 2018).

Sofern diese Hypothese bestätigt werden kann und eine Internalisierung des BAR-Bodys nachgewiesen wird, müsste untersucht werden, welche Auswirkungen dies auf die vom BAR-Body vermittelte Zytotoxizität hat. Für Rituximab wird beispielsweise die Internalisierung des Antikörpers als Resistenzmechanismus, im Rahmen dessen die Markierung der Zelle für zytotoxische Effektormechanismen verloren geht, diskutiert (Salles et al., 2017). Es ist unklar, ob dieser Effekt angesichts der Vielzahl der auf der Lymphozytenoberfläche exprimierten BZR, die als mögliche Zielstrukturen bestehen, eine Relevanz hat. Sofern die B-Zelle den BAR-Body nicht nur internalisiert, sondern auch prozessiert und auf MHCII präsentiert, müsste untersucht werden, inwiefern das Immunsystem auf die präsentierten Fragmente des BAR-Bodys reagiert.

Diese Arbeit zeigt, dass PZNSL-Zellen, die einen Neurabin-I-reaktiven BZR exprimieren, *in vitro* mit dem hergestellten BAR-Body markiert und per ADCC lysiert werden können. Weitere Untersuchungen bleiben nötig, um abschließend zu klären, ob bei der Lyse der mit dem BAR-Body beladenen Zellen weitere zytotoxische Mechanismen eingreifen, inwiefern der BAR-Body über den BZR direkte Apoptoseprogramme initiiert und an proliferativen Kaskaden beteiligt ist und ob der BAR-Body internalisiert wird.

5.3 Das humane IgG1 als Therapieformat

Im Rahmen des BAR-Konzepts sind Konjugation der BZR-Antigene in verschiedene Formate denkbar (Pfreundschuh et al., 2015). In dieser Arbeit erfolgte die Integration des BZR-Antigens Neurabin-I in ein humanes IgG1-Format. Im Folgenden werden Vor- und Nachteile des IgG1-Formats diskutiert.

Die Molekularmasse eines IgG-Proteins beträgt 150 kDa (Ansorge und Träger, 2014). Aufgrund dieser großen Molekularmasse haben monoklonale IgG-Antikörper eine lange Halbwertszeit und werden nicht renal ausgeschieden (Wang et al., 2008). Ferner schützen Bindungen des Fc-Teils des Antikörpers an neonatale Fc-Rezeptoren vor dem Abbau (Roopenian und Akilesh, 2007). Dies führt zu lang im therapeutischen Bereich anhaltenden Antikörperspiegeln.

Die Größe des Immunglobulins kann jedoch eine effiziente Tumorpenetration limitieren (Lucas et al., 2019). Dieses Problem stellt sich insbesondere bei Zielstrukturen im ZNS, die die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke erfordern (siehe dazu 5.4.3). Darüber hinaus bergen die langen Halbwertszeiten von monoklonalen Antikörpern Risiken von Toxizität und ungewollten Wechselwirkungen mit molekularen Strukturen (Lucas et al., 2019). Außerdem muss mit einer vom Fc-Teil ausgehenden Aktivierung des Immunsystems gerechnet werden (Kholodenko et al., 2019). Beim Einsatz monoklonaler chimärer Antikörper kann es ferner zur Bildung humaner antichimärer Antikörper kommen (Salles et al., 2017). Bei der Verwendung monoklonaler humaner Antikörperformate ist dies nicht zu erwarten.

Bei Patienten mit einem Neurabin-I-reaktiven BZR können sowohl im Serum als auch im Liquor Autoantikörper gegen Neurabin-I nachgewiesen werden (Thurner et al., 2018). Ob von diesen eine prognostische Bedeutung für das PZNSL ausgeht, ist nicht geklärt. Jedoch sind eine Interaktion und Komplexbildung der Autoantikörper mit dem im Rahmen der Therapie verabreichten BAR-Body wahrscheinlich. In weiteren Untersuchungen wäre zu klären, inwiefern diese Komplexe zur Akkumulation in Gewebe oder Gefäßen neigen und Immunprozesse oder Toxizität initiieren. Ferner muss untersucht werden, ob die Autoantikörper die verabreichten BAR-Bodys eventuell abfangen, bevor diese die BZR der malignen Zellen erreichen.

Für monoklonale Antikörper wird eine Elimination direkt an der Zielzelle oder über Organe mit großem mononukleären Phagozytensystem wie die Leber, die Lunge oder die Milz beschrieben (Lucas et al., 2019). Konsequenzen einer Verteilung des BAR-Bodys in diesen Organen müssen ebenfalls in pharmakokinetischen Studien analysiert werden.

Für den IgG1-Isotypen wird eine starke ADCC und CDC beschrieben (Yu und Liu, 2019). Diese Effektormechanismen sind bei einer Therapie mit BAR-Bodys gewünscht.

Peters und Brown schlagen vor, bei der Wahl eines für die AWK-Therapie geeigneten Antikörpers bestimmte Anforderungen zu stellen. Diese umfassen eine geringe Reaktivität mit gesundem Gewebe, eine hohe Affinität zur Zielstruktur, eine geringe Immunogenität sowie eine lange Halbwertszeit (Peters und Brown, 2015). Nach diesen Parametern sollte auch der konstruierte BAR-Body beurteilt werden. Einige dieser Parameter müssen noch weiter untersucht werden, andere konnten bereits im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen geklärt werden. So belegen die Ergebnisse dieser Arbeit eine hohe Spezifität zur Zielstruktur und lassen also eine geringe Reaktivität mit gesundem Gewebe erwarten. Auch ermöglicht die

Klonierung in ein IgG-Format lange Halbwertszeiten. Der Umfang der Immunogenität ist, wie erörtert, nicht geklärt. Jedenfalls entfällt aber aufgrund der Wahl eines humanen IgG-Formats die Bildung eines humanen antichimären Antikörpers.

5.4 Ausblick

5.4.1 Ausstehende Verifikation der Ergebnisse an PZNSL-Zelllinien

Es gibt bislang keine EBV-negative PZNSL-Zelllinie, die als Testzelllinie für den BAR-Body hätte verwendet werden können (Thurner et al., 2018). Die in dieser Arbeit vorgestellten Tests wurden daher stattdessen an einer DLBCL-Zelllinie (U-2932-Zelllinie) durchgeführt, die mit einem Neurabin-I-reaktiven BZR eines Patienten transfiziert wurde. Die verwendeten U-2932-Zellen sind biologisch eng mit PZNSL-Zellen verwandt (Thurner et al., 2018). Dennoch ist es für die Weiterentwicklung des BAR-Konzepts mit Neurabin-I im IgG1-Format sinnvoll, die hier erzielten Ergebnisse an PZNSL-Zelllinien zu überprüfen, wenn diese verfügbar werden.

5.4.2 Untersuchung weiterer PZNSL-Proben auf die Zielstruktur des BAR-Bodys

Nach aktuellem Stand exprimieren 66 % der PZNSL einen Neurabin-I-reaktiven BZR. Dieser Prozentwert ergibt sich aus den Analysen von zwölf PZNSL-Proben, in denen in acht Fällen ein Neurabin-I-reaktiver BZR nachgewiesen wurde (Thurner et al., 2018). Auf diese Ergebnisse stützt sich die Hypothese, dass 66 % der PZNSL-Patienten für eine Therapie mit dem BAR-Body in Frage kämen. Die untersuchte Patientengruppe ist mit zwölf Patienten jedoch recht klein. Daher sollten weitere PZNSL-Proben gewonnen werden und auf den Neurabin-I-reaktiven BZR untersucht werden, um noch bessere Aussagen darüber treffen zu können, bei wieviel Prozent der Erkrankten ein Einsatz des BAR-Bodys erfolgen kann.

5.4.3 Beschränkung des Therapiekonzepts durch die Blut-Hirn-Schranke

Der Einsatz von Antikörpern in der PZNSL-Therapie ist dadurch limitiert, dass diese die Blut-Hirn-Schranke aufgrund ihrer Molekülgröße nicht gut überwinden können. Ein systemisch verabreichter BAR-Body würde daher im ZNS des Patienten wahrscheinlich nur geringe

Konzentrationen erreichen, die für einen Therapieeffekt eventuell nicht ausreichen. Bei systemischer Therapie mit Rituximab (375 mg/m²) liegen beispielsweise die Liquorspiegel bei 0,1 % der Serumspiegel (Batchelor et al., 2011). Im Rahmen der HOVON 105/ALLG NHL 24-Studie (Bromberg et al., 2019) konnten für eine zusätzliche Gabe von Rituximab zu einer HD-MTX-basierten Polychemotherapie bei PZNSL-Patienten keine deutlichen Vorteile belegt werden.

Obwohl nur sehr geringe Liquorspiegel erreicht werden, stellt die Rituximab-Therapie nach dem MATRix-Protokoll derzeit dennoch den Behandlungsstandard für PZNSL-Patienten dar. Die Therapieerfolge von Rituximab werden mit langen Halbwertszeiten, einer hohen Affinität zu den malignen B-Zellen und einer hohen Akkumulation um die Tumorzellen erklärt (Batchelor et al., 2011; Doolittle et al., 2014).

Die gute Wirkung von Rituximab könnte auch auf der in zerebralen Tumoren veränderten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke beruhen. Hinweise auf eine verbesserte Schrankenpermeabilität im Tumorgewebe sind veränderte Tight Junctions, ein vergrößerter perivaskulärer Raum sowie vermehrte Pinozytosevakuolen. Eine veränderte Blut-Hirn-Schranke im Tumorgewebe wird auch als Blut-Tumor-Schranke bezeichnet und kann als Erklärung für das Ansprechen einiger zerebraler Tumore auf systemisch verabreichte Chemotherapeutika dienen (Deeken und Löscher, 2007). Für das PZNSL gilt, dass bei 70 % der PZNSL-Patienten die Blut-Hirn-Schranke nicht intakt ist (Waldera-Lupa et al., 2017). Auch konnte an im Rahmen der Angiogenese neu gebildeten Gefäßen des PZNSL keine physiologische Blut-Hirn-Schranke nachgewiesen werden (Takeuchi et al., 2007).

Diese Beobachtungen der veränderten Architektur der Blut-Hirn-Schranke im PZNSL lassen vermuten, dass es dem BAR-Body möglich sein könnte, die Blut-Hirn-Schranke besser als erwartet zu überwinden. Ein *In-vivo*-PZNSL-Tiermodell wird zeigen müssen, inwiefern diese Vermutung zutrifft und der systemisch verabreichte BAR-Body im Liquor von Versuchstieren mit PZNSL nachweisbar ist.

Xenograftmodelle als *In-vivo*-Tumormodelle sind jedoch dadurch limitiert, dass diese ein verändertes Tumorwachstum aufzeigen, da sie nicht alle Tumorstadien eines humanen Organismus durchlaufen und schneller proliferieren (Lucas et al., 2019). Dies könnte auch die Ausbildung einer für das PZNSL charakteristischen und in Teilen durchlässigeren Blut-Hirn-Schranke im Xenograftmodell beeinflussen. Unter der Annahme, dass sich die Blut-Hirn-Schranke des Tumorgewebes im Modellorganismus nicht in gleicher Weise ausbildet wie bei Menschen, wäre es sogar denkbar, dass der BAR-Body das PZNSL bei Patienten besser

erreicht als in einem Modellorganismus. Die Frage, wie gut der BAR-Body die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, wird sich endgültig nur mit großen klinischen Studien beantworten lassen.

5.4.4 Strategien zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke

Auch wenn spekuliert werden kann, dass die Blut-Hirn-Schranke im Menschen besser überwunden werden kann als im Tiermodell, bedarf es Strategien, um die Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit des konstruierten BAR-Bodys im Menschen zu verbessern, damit eine ausreichende zytotoxische Konzentration im PZNSL gewährleistet werden kann. Um Pharmaka ins ZNS zu bringen, gibt es verschiedene Strategien.

Zum einen können sie direkt intrathekal verabreicht werden. In der PZNSL-Therapie ist dies aktuell nicht vorgesehen, da der Nutzen einer intrathekalen Applikation von Zytostatika nicht klar zu erkennen ist und eine solche Therapie Infektionsrisiken birgt (Pels et al., 2003; Citterio et al., 2017). Die intrathekale Applikation des BAR-Bodys wird unter Abwägung der Infektionsrisiken untersucht werden müssen.

Zum anderen gibt es pharmakologische Ansätze, systemisch verabreichte Pharmaka ins ZNS zu bringen. Dabei wird zwischen einer Öffnung und einer Überwindung der Blut-Hirn-Schranke unterschieden.

Konzepte zur Öffnung der Blut-Hirn-Schranke umfassen zum Beispiel die intraarterielle Gabe von hyperosmotischer Mannitollösung. Diese lässt die Endothelzellen temporär schrumpfen und öffnet Tight Junctions. Dadurch steigt die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke innerhalb von 15 Minuten auf ein Maximum an, so dass auch große Moleküle wie Antikörper die Blut-Hirn-Schranke passieren können (Jahnke et al., 2006; Doolittle et al., 2014). Eine bessere Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit für Antikörper könnte auch durch Bestrahlung erreicht werden (Lampson, 2011). Darüber hinaus ist im Tiermodell eine Öffnung der Blut-Hirn-Schranke für IgG durch therapeutischen Ultraschall mit Mikrobubbles gelungen (Janowicz et al., 2019). Ferner konnten bei PZNSL-Patienten gute Therapieerfolge durch die Kombination von an ein CNGRCG-Peptid gekoppeltem Tumornekrosefaktor- α , der die Endothelpermeabilität erhöht und einer R-CHOP-Chemotherapie erzielt werden (Ferreri et al., 2019).

Konzepte zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke beinhalten meist eine Konjugation der monoklonalen Antikörper an molekulare Strukturen, die mit endothelialen Transportsystemen interagieren. Diese transportieren ihre Substrate per rezeptorvermittelter Transzytose in die Endothelzelle. Vielversprechende Erfolge werden beispielsweise durch eine Integration monoklonaler Antikörper in ein bispezifisches Format oder in Kapseln aus Cholin- und Acetylcholinanaloga erzielt (Bates und Power, 2019; Wu et al., 2019). Auch die Konjugation an liposomale Partikel zeigt gute Ergebnisse bei der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und gleichzeitiger Erhaltung der Zytotoxizität des Antikörpers Rituximab *in vitro* (Saesoo et al., 2018).

Die grundsätzlichen Vor- und Nachteile der Strategieansätze müssen auch bei der Fortführung des BAR-Konzepts mit Neurabin-I im humanen IgG1-Format berücksichtigt werden. Die Öffnung der Blut-Hirn-Schranke mittels Osmose oder Bestrahlung wurde zwar bereits bei PZNSL-Patienten erfolgreich durchgeführt, birgt aber Risiken in Form zerebraler Krampfanfälle, Infektionen und Ischämien sowie hoher Neurotoxizität (Jahnke et al., 2006). Eine pharmakologische Überwindung der Blut-Hirn-Schranke scheint risikoärmer. Die Modulation des BAR-Bodys darf jedoch nicht seine Interaktion mit den Zielzellen beeinträchtigen. Es wird abzuwägen sein, mit welchen Strategieansätzen die Blut-Hirn-Schranke so überwunden werden kann, dass der BAR-Body weiterhin zuverlässig an seine Zielstruktur, den BZR, bindet und auch in der Lage ist, einen zytotoxischen Effekt zu vermitteln. Hohe zerebrale Konzentrationen des BAR-Bodys sind nutzlos, wenn dieser nach seiner Modulation keine Effektorzellen mehr aktivieren kann.

5.4.5 Möglichkeit der Anwendung des BAR-Bodys zur Therapie von ZNS-Lymphomen bei immunsupprimierten Patienten

Immunsuppression, insbesondere eine HIV-Infektion, stellt ein großes Risiko für die Entstehung eines ZNS-Lymphoms dar (Fraser et al., 2015). Anders als bei immunkompetenten Patienten liegt bei dieser Patientengruppe eine Assoziation mit einer EBV-Infektion vor, die für eine andere Pathophysiologie des ZNS-Lymphoms ursächlich ist (Antinori et al., 1999; Deckert et al., 2014b). Der BZR und seine Signalwege spielen bei EBV-assoziierten B-Zell-Lymphomen vermutlich eine geringere Rolle (Turner et al., 2020b). Es ist nicht klar, ob klonale B-Zellen des ZNS-Lymphoms beim immunsupprimierten Patienten überhaupt einen Neurabin-I-reaktiven BZR exprimieren und ob ein therapeutischer Einsatz des BAR-Bodys Wirkung zeigen würden. Zur Beantwortung dieser Frage wäre es auch interessant zu untersuchen, inwiefern ZNS-Lymphom-Patienten mit Immunsuppression, wie zum Beispiel

HIV-Patienten, das atypisch glykosylierte Neurabin-I und einen Neurabin-I-reaktiven BZR exprimieren.

5.4.6 Fazit

PZNSL-Patienten haben derzeit eine schlechte Therapieprognose. Mit dem vorgestellten Therapiekonzept lassen sich *in vitro* sehr vielversprechende Ergebnisse erzielen. Für die Anwendung des Konzepts *in vivo* dürfte die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke die größte Hürde darstellen. Wenn es aber gelingt, das Therapiekonzept so weiter zu entwickeln, dass es an PZNSL-Patienten angewendet werden kann, werden diese von einer Therapie profitieren können, die höchstspezifisch auf die Tumorzellen gerichtet ist und dadurch voraussichtlich erheblich geringere Nebenwirkungen hat als eine Polychemotherapie.

6. Literaturverzeichnis

1. Abrey LE, DeAngelis LM, Yahalom J (1998) Long-term survival in primary CNS lymphoma. *JCO* 16:859–863
2. Abrey LE, Batchelor TT, Ferreri AJM, Gospodarowicz M, Pulczynski EJ, Zucca E, Smith JR, Korfel A, Soussain C, DeAngelis LM, Neuwelt EA, O'Neill BP, Thiel E, Shenkier T, Graus F, van den Bent M, Seymour JF, Poortmans P, Armitage JO, Cavalli F (2005) Report of an International Workshop to Standardize Baseline Evaluation and Response Criteria for Primary CNS Lymphoma. *JCO* 23:5034–5043
3. Algazi AP, Kadoch C, Rubenstein JL (2009) Biology and treatment of primary central nervous system lymphoma. *Neurotherapeutics* 6:587–597
4. Amini R-M, Berglund M, Rosenquist R, Heideman A von, Lagercrantz S, Thunberg U, Bergh J, Sundström C, Glimelius B, Enblad G (2002) A Novel B-cell Line (U-2932) Established from a Patient with Diffuse Large B-cell Lymphoma Following Hodgkin Lymphoma. *Leukemia & Lymphoma* 43:2179–2189
5. Ansorge S, Täger M (2014) Immunologie. In: Heinrich PC, Mueller M, Graeve L (eds) Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. Springer-Verlag, Berlin, pp 907–915
6. Antinori A, De Rossi G, Ammassari A, Cingolani A, Murri R, Di Giuda D, De Luca A, Pierconti F, Tartaglione T, Scerrati M, Larocca LM, Ortona L (1999) Value of Combined Approach With Thallium-201 Single-Photon Emission Computed Tomography and Epstein-Barr Virus DNA Polymerase Chain Reaction in CSF for the Diagnosis of AIDS-Related Primary CNS Lymphoma. *JCO* 17:554–554
7. Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (2018) Schwere Immundefekte nach Behandlung mit Rituximab („Aus der UAW-Datenbank“). *Deutsches Ärzteblatt* 115:A 2313-2314
8. Bashir R, Luka J, Cheloha K, Chamberlain M, Hochberg F (1993) Expression of Epstein-Barr virus proteins in primary CNS lymphoma in AIDS patients. *Neurology* 43:2358–2362
9. Batchelor T, Loeffler JS (2006) Primary CNS Lymphoma. *JCO* 24:1281–1288
10. Batchelor TT, Grossman SA, Mikkelsen T, Ye X, Desideri S, Lesser GJ (2011) Rituximab monotherapy for patients with recurrent primary CNS lymphoma. *Neurology* 76:929–930
11. Bates A, Power CA (2019) David vs. Goliath: The Structure, Function, and Clinical Prospects of Antibody Fragments. *Antibodies (Basel)* 8:28
12. Bewarder M, Kiefer M, Moelle C, Goerens L, Stilgenbauer S, Christofyllakis K, Kaddu-Mulindwa D, Fadle N, Regitz E, Neumann F, Hoth M, Preuss K-D, Pfreundschuh M, Thurner L (2020) Integration of the B-Cell Receptor Antigen Neurabin-I/SAMD14 Into an Antibody Format as New Therapeutic Approach for the Treatment of Primary CNS Lymphoma. *Front Oncol* 10:580364
13. Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513–1523

14. Bonavida B (2014) Postulated Mechanisms of Resistance of B-NHL to Rituximab Treatment Regimens: Strategies to Overcome Resistance. *Seminars in oncology* 41:667
15. Brix J, Heinrich PC, Koch HG, Löffler G (2014) Gentechnik. In: Heinrich PC, Mueller M, Graeve L (eds) *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag, Berlin, pp 660–667
16. Bromberg JEC, Issa S, Bakunina K, Minnema MC, Seute T, Durian M, Cull G, Schouten HC, Stevens WBC, Zijlstra JM, Baars JW, Nijland M, Mason KD, Beeker A, van den Bent MJ, Beijert M, Gonzales M, de Jong D, Doorduijn JK (2019) Rituximab in patients with primary CNS lymphoma (HOVON 105/ALLG NHL 24): a randomised, open-label, phase 3 intergroup study. *The Lancet Oncology* 20:216–228
17. Brunn A, Montesinos-Rongen M, Strack A, Reifenberger G, Mawrin C, Schaller C, Deckert M (2007) Expression pattern and cellular sources of chemokines in primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathol* 114:271–276
18. Brunn A, Nagel I, Montesinos-Rongen M, Klapper W, Vater I, Paulus W, Hans V, Blümcke I, Weis J, Siebert R, Deckert M (2013) Frequent triple-hit expression of MYC, BCL2, and BCL6 in primary lymphoma of the central nervous system and absence of a favorable MYC^{low}BCL2^{low} subgroup may underlie the inferior prognosis as compared to systemic diffuse large B cell lymphomas. *Acta Neuropathol* 126:603–605
19. Buchholz C, J Hartmann, M Schüßler-Lenz, B Keller-Stanislawski (2018) CAR-T-Zell-Therapie: Aussichten und Risiken. *Perspektiven der Onkologie, Deutsches Ärzteblatt* 1:38–40
20. Carter MJ, Cox KL, Blakemore SJ, Bogdanov YD, Happo L, Scott CL, Strasser A, Packham GK, Cragg MS (2016) BCR-signaling-induced cell death demonstrates dependency on multiple BH3-only proteins in a murine model of B-cell lymphoma. *Cell Death and Differentiation* 23:303
21. Chapuy B, Roemer MGM, Stewart C, Tan Y, Abo RP, Zhang L, Dunford AJ, Meredith DM, Thorner AR, Jordanova ES, Liu G, Feuerhake F, Ducar MD, Illerhaus G, Gusenleitner D, Linden EA, Sun HH, Homer H, Aono M, Pinkus GS, Ligon AH, Ligon KL, Ferry JA, Freeman GJ, van Hummelen P, Golub TR, Getz G, Rodig SJ, de Jong D, Monti S, Shipp MA (2016) Targetable genetic features of primary testicular and primary central nervous system lymphomas. *Blood* 127:869–881
22. Citterio G, Reni M, Gatta G, Ferreri AJM (2017) Primary central nervous system lymphoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 113:97–110
23. Compagno M, Lim WK, Grunn A, Nandula SV, Brahmachary M, Shen Q, Bertoni F, Ponzoni M, Scandurra M, Califano A, Bhagat G, Chadburn A, Dalla-Favera R, Pasqualucci L (2009) Mutations of multiple genes cause deregulation of NF- κ B in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* 459:717–721
24. Courtney AH, Bennett NR, Zwick DB, Hudon J, Kiessling LL (2014) Synthetic Antigens Reveal Dynamics of BCR Endocytosis During Inhibitory Signaling. *ACS Chem Biol* 9:202–210
25. Das AT, Tenenbaum L, Berkhout B (2016) Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. *Curr Gene Ther* 16:156–167

26. Das K, Mittal BR, Vasistha RK, Singh P, Mathuriya SN (2011) Role of 18F-fluorodeoxyglucose Positron Emission Tomography scan in differentiating enhancing brain tumors. *Indian J Nucl Med* 26:171–176
27. Davis RE, Ngo VN, Lenz G, Tolar P, Young R, Romesser PB, Kohlhammer H, Lamy L, Zhao H, Yang Y, Xu W, Shaffer AL, Wright G, Xiao W, Powell J, Jiang J, Thomas CJ, Rosenwald A, Ott G, Muller-Hermelink HK, Gascoyne RD, Connors JM, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Braziel RM, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Chan WC, Pierce SK, Staudt LM (2010) Chronic Active B Cell Receptor Signaling in Diffuse Large B Cell Lymphoma. *Nature* 463:88–92
28. Decker T, Lohmann-Matthes M-L (1988) A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods* 115:61–69
29. Deckert M, Brunn A, Montesinos-Rongen M, Terreni MR, Ponzoni M (2014a) Primary lymphoma of the central nervous system—a diagnostic challenge. *Hematological Oncology* 32:57–67
30. Deckert M, Montesinos-Rongen M, Brunn A, Siebert R (2014b) Systems biology of primary CNS lymphoma: from genetic aberrations to modeling in mice. *Acta Neuropathol* 127:175–188
31. Deeken JF, Löscher W (2007) The Blood-Brain Barrier and Cancer: Transporters, Treatment, and Trojan Horses. *Clin Cancer Res* 13:1663–1674
32. Doolittle ND, Muldoon LL, Culp AY, Neuwelt EA (2014) Delivery of Chemotherapeutics Across the Blood–Brain Barrier: Challenges and Advances. *Adv Pharmacol* 71:203–243
33. Doyle HA, Mamula MJ (2012) Autoantigenesis: The evolution of protein modifications in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* 24:112–118
34. Durocher Y, Perret S, Kamen A (2002) High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res* 30:e9
35. Ferreri AJM, Blay J-Y, Reni M, Pasini F, Spina M, Ambrosetti A, Calderoni A, Rossi A, Vavassori V, Conconi A, Devizzi L, Berger F, Ponzoni M, Borisch B, Tinguely M, Cerati M, Milani M, Orvieto E, Sanchez J, Chevreau C, Dell’Oro S, Zucca E, Cavalli F (2003) Prognostic scoring system for primary CNS lymphomas: the International Extranodal Lymphoma Study Group experience. *J Clin Oncol* 21:266–272
36. Ferreri AJM, Reni M (2007) Primary central nervous system lymphoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 63:257–268
37. Ferreri AJM, Reni M, Foppoli M, Martelli M, Pangalis GA, Frezzato M, Cabras MG, Fabbri A, Corazzelli G, Ilariucci F, Rossi G, Soffietti R, Stelitano C, Vallisa D, Zaja F, Zoppegno L, Aondio GM, Avvisati G, Balzarotti M, Brandes AA, Fajardo J, Gomez H, Guarini A, Pinotti G, Rigacci L, Uhlmann C, Picozzi P, Vezzulli P, Ponzoni M, Zucca E, Caligaris-Cappio F, Cavalli F (2009) High-dose cytarabine plus high-dose methotrexate versus high-dose methotrexate alone in patients with primary CNS lymphoma: a randomised phase 2 trial. *The Lancet* 374:1512–1520

38. Ferreri AJM, Cwynarski K, Pulczynski E, Ponzoni M, Deckert M, Politi LS, Torri V, Fox CP, Rosée PL, Schorb E, Ambrosetti A, Roth A, Hemmaway C, Ferrari A, Linton KM, Rudà R, Binder M, Pukrop T, Balzarotti M, Fabbri A, Johnson P, Gørløv JS, Hess G, Panse J, Pisani F, Tucci A, Stilgenbauer S, Hertenstein B, Keller U, Krause SW, Levis A, Schmoll HJ, Cavalli F, Finke J, Reni M, Zucca E, Illerhaus G (2016) Chemoimmunotherapy with methotrexate, cytarabine, thiotepa, and rituximab (MATRix regimen) in patients with primary CNS lymphoma: results of the first randomisation of the International Extranodal Lymphoma Study Group-32 (IELSG32) phase 2 trial. *The Lancet Haematology* 3:e217–e227
39. Ferreri AJM, Cwynarski K, Pulczynski E, Fox CP, Schorb E, La Rosée P, Binder M, Fabbri A, Torri V, Minacapelli E, Falautano M, Ilariucci F, Ambrosetti A, Roth A, Hemmaway C, Johnson P, Linton KM, Pukrop T, Sønderskov Gørløv J, Balzarotti M, Hess G, Keller U, Stilgenbauer S, Panse J, Tucci A, Orsucci L, Pisani F, Levis A, Krause SW, Schmoll HJ, Hertenstein B, Rummel M, Smith J, Pfreundschuh M, Cabras G, Angrilli F, Ponzoni M, Deckert M, Politi LS, Finke J, Reni M, Cavalli F, Zucca E, Illerhaus G (2017) Whole-brain radiotherapy or autologous stem-cell transplantation as consolidation strategies after high-dose methotrexate-based chemoimmunotherapy in patients with primary CNS lymphoma: results of the second randomisation of the International Extranodal Lymphoma Study Group-32 phase 2 trial. *The Lancet Haematology* 4:e510–e523
40. Ferreri AJM, Calimeri T, Conte GM, Cattaneo D, Fallanca F, Ponzoni M, Scarano E, Curnis F, Nonis A, Lopedote P, Citterio G, Politi LS, Foppoli M, Girlanda S, Sassone M, Perrone S, Cecchetti C, Ciceri F, Bordignon C, Corti A, Anzalone N (2019) R-CHOP preceded by blood-brain barrier permeabilization with engineered tumor necrosis factor- α in primary CNS lymphoma. *Blood* 134:252–262
41. Fraser E, Gruenberg K, Rubenstein JL (2015) New approaches in primary central nervous system lymphoma. *Chin Clin Oncol* 4:11
42. Gavrilovic IT, Hormigo A, Yahalom J, DeAngelis LM, Abrey LE (2006) Long-term follow-up of high-dose methotrexate-based therapy with and without whole brain irradiation for newly diagnosed primary CNS lymphoma. *J Clin Oncol* 24:4570–4574
43. Gazumyan A, Reichlin A, Nussenzweig MC (2006) Ig β tyrosine residues contribute to the control of B cell receptor signaling by regulating receptor internalization. *J Exp Med* 203:1785–1794
44. Giussani A, Farahani P, Martínez-Muñoz D, Lundberg M, Lindh R, Roca-Sanjuán D (2019) Molecular Basis of the Chemiluminescence Mechanism of Luminol. *Chemistry – A European Journal* 25:5202–5213
45. González-González E, Camacho-Sandoval R, Jiménez-Urbe A, Montes-Luna A, Cortés-Paniagua I, Sánchez-Morales J, Muñoz-García L, Tenorio-Calvo AV, López-Morales CA, Velasco-Velázquez MA, Pavón L, Pérez-Tapia SM, Medina-Rivero E (2019) Validation of an ADCC assay using human primary natural killer cells to evaluate biotherapeutic products bearing an Fc region. *Journal of Immunological Methods* 464:87–94
46. Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujardt H (1995) Transcriptional Activation by Tetracyclines in Mammalian Cells. *Science* 268:5
47. Grimm KE, O'Malley DP (2019) Aggressive B cell lymphomas in the 2017 revised WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. *Annals of Diagnostic Pathology* 38:6–10

48. Grimm SA, McCannel CA, Omuro AMP, Ferreri AJM, Blay J-Y, Neuwelt EA, Siegal T, Batchelor T, Jahnke K, Shenkier TN, Hall AJ, Graus F, Herrlinger U, Schiff D, Raizer J, Rubenstein J, Laperriere N, Thiel E, Doolittle N, Iwamoto FM, Abrey LE (2008) Primary CNS lymphoma with intraocular involvement. *Neurology* 71:1355–1360
49. Grommes C, DeAngelis LM (2017a) Primary CNS Lymphoma. *J Clin Oncol* 35:2410–2418
50. Grommes C, Pastore A, Palaskas N, Tang SS, Campos C, Schartz D, Codega P, Nichol D, Clark O, Hsieh W-Y, Rohle D, Rosenblum M, Viale A, Tabar VS, Brennan CW, Gavrilovic IT, Kaley TJ, Nolan CP, Omuro A, Pentsova E, Thomas AA, Tsyvkin E, Noy A, Palomba ML, Hamlin P, Sauter CS, Moskowitz CH, Wolfe J, Dogan A, Won M, Glass J, Peak S, Lallana EC, Hatzoglou V, Reiner AS, Gutin PH, Huse JT, Panageas KS, Graeber TG, Schultz N, DeAngelis LM, Mellinghoff IK (2017b) Ibrutinib Unmasks Critical Role of Bruton Tyrosine Kinase in Primary CNS Lymphoma. *Cancer Discov* 7:1018–1029
51. Haldorsen IS, Espeland A, Larsson E-M (2011) Central Nervous System Lymphoma: Characteristic Findings on Traditional and Advanced Imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 32:984–992
52. Hauk A (2013) Quantifizierung von DNA durch Absorptionsmessung. *Biologie in unserer Zeit* 43:278–278
53. Hockenbery D, Nuñez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ (1990) Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature* 348:334–336
54. Hoffman S, Propp JM, McCarthy BJ (2006) Temporal trends in incidence of primary brain tumors in the United States, 1985–1999. *Neuro-oncol* 8:27–37
55. Houillier C, Taillandier L, Dureau S, Lamy T, Laadhari M, Chinot O, Moluçon-Chabrot C, Soubeyran P, Gressin R, Choquet S, Damaj G, Thyss A, Abraham J, Delwail V, Gyan E, Sanhes L, Cornillon J, Garidi R, Delmer A, Tanguy M-L, Al Jijakli A, Morel P, Bourquard P, Moles M-P, Chauchet A, Gastinne T, Constans J-M, Langer A, Martin A, Moisson P, Lacomblez L, Martin-Duverneuil N, Delgadillo D, Turbiez I, Feuvret L, Cassoux N, Touitou V, Ricard D, Hoang-Xuan K, Soussain C, Intergroupe GOELAMS–ANOCEF and the LOC Network for CNS Lymphoma (2019) Radiotherapy or Autologous Stem-Cell Transplantation for Primary CNS Lymphoma in Patients 60 Years of Age and Younger: Results of the Intergroup ANOCEF-GOELAMS Randomized Phase II PRECIS Study. *J Clin Oncol* 37:823–833
56. Hozumi N, Tonegawa S (1976) Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:3628–3632
57. Illerhaus G, Schorb E, Kasenda B (2018) Novel agents for primary central nervous system lymphoma: evidence and perspectives. *Blood* 132:681–688
58. Jahnke K, Coupland SE, Na I-K, Loddenkemper C, Keilholz U, Korfel A, Stein H, Thiel E, Scheibenbogen C (2005a) Expression of the chemokine receptors CXCR4, CXCR5, and CCR7 in primary central nervous system lymphoma. *Blood* 106:384–385
59. Jahnke K, Korfel A, Martus P, Weller M, Herrlinger U, Schmittl A, Fischer L, Thiel E (2005b) High-dose methotrexate toxicity in elderly patients with primary central nervous system lymphoma. *Annals of Oncology* 16:445–449

60. Jahnke K, Doolittle ND, Muldoon LL, Neuwelt EA (2006) Implications of the blood–brain barrier in primary central nervous system lymphoma. *Neurosurgical Focus* 21:1–11
61. Janowicz PW, Leinenga G, Götz J, Nisbet RM (2019) Ultrasound-mediated blood–brain barrier opening enhances delivery of therapeutically relevant formats of a tau-specific antibody. *Sci Rep* 9:9255
62. Jochims C, Mazitschek U, Jäger D, Goldschmidt H (2006) Zielgerichtete Therapie bei soliden Tumoren und in der Hämatookologie. *Internist* 47:633–641
63. Kadoch C, Dinca EB, Voicu R, Chen L, Nguyen D, Parikh S, Karrim J, Shuman MA, Lowell CA, Treseler PA, James CD, Rubenstein JL (2009) Pathologic Correlates of Primary Central Nervous System Lymphoma Defined in an Orthotopic Xenograft Model. *Clin Cancer Res* 15:1989–1997
64. Kalbitzer HR (2014) Proteine – Analytische Untersuchungsmethoden, Synthese und Isolierung. In: Heinrich PC, Mueller M, Graeve L (eds) *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer-Verlag, Berlin, pp 89–90
65. Kalogeropoulos D, Vartholomatos G, Mitra A, Elaraoud I, Ch'ng SW, Zikou A, Papoudou-Bai A, Moschos MM, Kanavaros P, Kalogeropoulos C (2019) Primary vitreoretinal lymphoma. *Saudi Journal of Ophthalmology* 33:66–80
66. Kanof ME, Smith PD, Zola H (1996) Isolation of Whole Mononuclear Cells from Peripheral Blood and Cord Blood. *Current Protocols in Immunology* 19:7.1.1-7.1.7
67. Kasenda B, Ferreri AJM, Marturano E, Forst D, Bromberg J, Ghesquieres H, Ferlay C, Blay JY, Hoang-Xuan K, Pulczynski EJ, Fosså A, Okoshi Y, Chiba S, Fritsch K, Omuro A, O'Neill BP, Bairey O, Schandelmaier S, Gloy V, Bhatnagar N, Haug S, Rahner S, Batchelor TT, Illerhaus G, Briel M (2015) First-line treatment and outcome of elderly patients with primary central nervous system lymphoma (PCNSL)—a systematic review and individual patient data meta-analysis. *Ann Oncol* 26:1305–1313
68. Kasenda B, Ihorst G, Schroers R, Korfel A, Schmidt-Wolf I, Egerer G, Baumgarten L von, Röth A, Bloehdorn J, Möhle R, Binder M, Keller U, Lamprecht M, Pfreundschuh M, Valk E, Fricker H, Schorb E, Fritsch K, Finke J, Illerhaus G (2017) High-dose chemotherapy with autologous haematopoietic stem cell support for relapsed or refractory primary CNS lymphoma: a prospective multicentre trial by the German Cooperative PCNSL study group. *Leukemia* 31:2623–2629
69. Khan RB, Shi W, Thaler HT, DeAngelis LM, Abrey LE (2002) Is intrathecal methotrexate necessary in the treatment of primary CNS lymphoma? *J Neurooncol* 58:175–178
70. Kholodenko RV, Kalinovskiy DV, Doronin II, Kholodenko EDP and IV, Kholodenko I (2019) Antibody Fragments as Potential Biopharmaceuticals for Cancer Therapy: Success and Limitations. *Current Medicinal Chemistry* 26:396–426
71. Königshoff M, Brandenburger T (2018) Die Agarosegelelektrophorese. In: Königshoff M, Brandenburger T (eds) *Kurzlehrbuch Biochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, doi:10.1055/b-006-149433

72. Korfel A, Schlegel U, Herrlinger U, Dreyling M, Schmidt C, Baumgarten L von, Pezzutto A, Grobosch T, Kebir S, Thiel E, Martus P, Kiewe P (2016) Phase II Trial of Temsirolimus for Relapsed/Refractory Primary CNS Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* 34:1757–1763
73. Küker W, Nägele T, Korfel A, Heckl S, Thiel E, Bamberg M, Weller M, Herrlinger U (2005) Primary central nervous system lymphomas (PCNSL): MRI features at presentation in 100 patients. *J Neurooncol* 72:169–177
74. Lampson LA (2011) Monoclonal antibodies in neuro-oncology. *MAbs* 3:153–160
75. LeBien TW, Tedder TF (2008) B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112:1570–1580
76. Lucas AT, Robinson R, Schorzman AN, Piscitelli JA, Razo JF, Zamboni WC (2019) Pharmacologic Considerations in the Disposition of Antibodies and Antibody-Drug Conjugates in Preclinical Models and in Patients. *Antibodies (Basel)* 8:3
77. Martini F, Dolcetti R, Ferreri AJM, Ponzoni M, Fumagalli L, Reni M, Terreni MR, Mariuzzi L, Tognò M (2004) No Association between Polyomaviruses and Primary Central Nervous System Lymphomas of HIV-Seronegative and HIV-Positive Patients | *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:1819–1820
78. McKinnon KM (2018) Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol* 120:5.1.1-5.1.11
79. Mendez JS, Grommes C (2018) Treatment of Primary Central Nervous System Lymphoma: From Chemotherapy to Small Molecules. *American Society of Clinical Oncology Educational Book* 38:604–615
80. Montesinos-Rongen M, Küppers R, Schlüter D, Spieker T, Van Roost D, Schaller C, Reifenberger G, Wiestler OD, Deckert-Schlüter M (1999) Primary Central Nervous System Lymphomas Are Derived from Germinal-Center B Cells and Show a Preferential Usage of the V4–34 Gene Segment. *Am J Pathol* 155:2077–2086
81. Montesinos-Rongen M, Hans VH, Eis-Hübinger AM, Prinz M, Schaller C, Van Roost D, Aguzzi A, Wiestler OD, Deckert M (2001) Human herpes virus-8 is not associated with primary central nervous system lymphoma in HIV-negative patients. *Acta Neuropathol* 102:489–495
82. Montesinos-Rongen M, Besleaga R, Heinsohn S, Siebert R, Kabisch H, Wiestler OD, Deckert M (2004a) Absence of simian virus 40 DNA sequences in primary central nervous system lymphoma in HIV-negative patients. *Virchows Arch* 444:436–438
83. Montesinos-Rongen M, Van Roost D, Schaller C, Wiestler OD, Deckert M (2004b) Primary diffuse large B-cell lymphomas of the central nervous system are targeted by aberrant somatic hypermutation. *Blood* 103:1869–1875
84. Montesinos-Rongen M, Schmitz R, Courts C, Stenzel W, Bechtel D, Niedobitek G, Blümcke I, Reifenberger G, von Deimling A, Jungnickel B, Wiestler OD, Küppers R, Deckert M (2005) Absence of Immunoglobulin Class Switch in Primary Lymphomas of the Central Nervous System. *The American Journal of Pathology* 166:1773–1779

85. Montesinos-Rongen M, Brunn A, Bentink S, Basso K, Lim W, Klapper W, Schaller C, Reifenberger G, Rubenstein J, Wiestler O, Spang R, Dalla-Favera R, Siebert R, Deckert M (2008) Gene expression profiling suggests primary central nervous system lymphomas to be derived from a late germinal center B cell. *Leukemia* 22:400–405
86. Montesinos-Rongen M, Siebert R, Deckert M (2009) Primary lymphoma of the central nervous system: just DLBCL or not? *Blood* 113:7–10
87. Montesinos-Rongen M, Schmitz R, Brunn A, Gesk S, Richter J, Hong K, Wiestler OD, Siebert R, Küppers R, Deckert M (2010) Mutations of CARD11 but not TNFAIP3 may activate the NF- κ B pathway in primary CNS lymphoma. *Acta Neuropathol* 120:529–535
88. Montesinos-Rongen M, Godlewska E, Brunn A, Wiestler OD, Siebert R, Deckert M (2011) Activating L265P mutations of the MYD88 gene are common in primary central nervous system lymphoma. *Acta Neuropathol* 122:791–792
89. Montesinos-Rongen M, Sánchez-Ruiz M, Brunn A, Hong K, Bens S, Perales SR, Cigudosa JC, Siebert R, Deckert M (2013) Mechanisms of Intracerebral Lymphoma Growth Delineated in a Syngeneic Mouse Model of Central Nervous System Lymphoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 72:325–336
90. Montesinos-Rongen M, Purschke FG, Brunn A, May C, Nordhoff E, Marcus K, Deckert M (2015) Primary Central Nervous System (CNS) Lymphoma B Cell Receptors Recognize CNS Proteins. *J Immunol* 195:1312–1319
91. Mrugala MM, Rubenstein JL, Ponzoni M, Batchelor TT (2009) Insights Into the Biology of Primary Central Nervous System Lymphoma. *Curr Oncol Rep* 11:73–80
92. Nakanishi H, Obaishi H, Satoh A, Wada M, Mandai K, Satoh K, Nishioka H, Matsuura Y, Mizoguchi A, Takai Y (1997) Neurabin: A Novel Neural Tissue-specific Actin Filament-binding Protein Involved in Neurite Formation. *J Cell Biol* 139:951–961
93. Netzker R (2016) DNA-Transfer in Eukaryonten: Transfektion. In: Rassow J, Hauser K, Deutzmann R, Netzker R (eds) *Duale Reihe Biochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, doi:10.1055/b-003-129341
94. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, Jhavar S, Xiao W, Lim K-H, Kohlhammer H, Xu W, Yang Y, Zhao H, Shaffer AL, Romesser P, Wright G, Powell J, Rosenwald A, Muller-Hermelink HK, Ott G, Gascoyne RD, Connors JM, Rimsza LM, Campo E, Jaffe ES, Delabie J, Smeland EB, Fisher RI, Braziel RM, Tubbs RR, Cook JR, Weisenburger DD, Chan WC, Staudt LM (2011) Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature* 470:115–119
95. Nitta N, Nakasu S, Shima A, Nozaki K (2016) mTORC1 signaling in primary central nervous system lymphoma. *Surg Neurol Int* 7:S475–S480
96. Olson JE, Janney CA, Rao RD, Cerhan JR, Kurtin PJ, Schiff D, Kaplan RS, O'Neill BP (2002) The continuing increase in the incidence of primary central nervous system non-Hodgkin lymphoma. *Cancer* 95:1504–1510

97. Pels H, Schmidt-Wolf IGH, Glasmacher A, Schulz H, Engert A, Diehl V, Zellner A, Schackert G, Reichmann H, Kroschinsky F, Vogt-Schaden M, Egerer G, Bode U, Schaller C, Deckert M, Fimmers R, Helmstaedter C, Atasoy A, Klockgether T, Schlegel U (2003) Primary Central Nervous System Lymphoma: Results of a Pilot and Phase II Study of Systemic and Intraventricular Chemotherapy With Deferred Radiotherapy. *Journal of Clinical Oncology* 21:4489–4495
98. Pels H, Montesinos-Rongen M, Schaller C, Schlegel U, Schmidt-Wolf IGH, Wiestler OD, Deckert M (2005) VH gene analysis of primary CNS lymphomas. *Journal of the Neurological Sciences* 228:143–147
99. Peters C, Brown S (2015) Antibody–drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. *Bioscience Reports* 35:e00225
100. Pfreundschuh M, Thurner L, Barth S, Pickert D, Fadle N, Kemele M, Regitz E, Neumann F, Nachreiner T, Preuss K-D (2015) BARs (B -cell receptor antigens for reverse targeting): A Novel and Ultimately Specific Treatment Concept for B-Cell Neoplasms. *Blood* 126:3995–3995
101. Plotkin SR, Betensky RA, Hochberg FH, Grossman SA, Lesser GJ, Nabors LB, Chon B, Batchelor TT (2004) Treatment of Relapsed Central Nervous System Lymphoma with High-Dose Methotrexate. *Clin Cancer Res* 10:5643–5646
102. Ponzoni M, Issa S, Batchelor TT, Rubenstein JL (2014) Beyond high-dose methotrexate and brain radiotherapy: novel targets and agents for primary CNS lymphoma. *Ann Oncol* 25:316–322
103. Preuss K-D, Fadle N, Regitz E, Held G, Pfreundschuh M (2014) Inactivation of protein-phosphatase 2A causing hyperphosphorylation of autoantigenic paraprotein targets in MGUS/MM is due to an exchange of its regulatory subunits. *International Journal of Cancer* 135:2046–2053
104. Quintanilla-Martinez L (2017) The 2016 updated WHO classification of lymphoid neoplasias. *Hematological Oncology* 35:37–45
105. Riemersma SA, Oudejans JJ, Vonk MJ, Dreef EJ, Prins FA, Jansen PM, Vermeer MH, Blok P, Kibbelaar RE, Muris JJ, Schuurin EM, Kluin PM (2005) High numbers of tumour-infiltrating activated cytotoxic T lymphocytes, and frequent loss of HLA class I and II expression, are features of aggressive B cell lymphomas of the brain and testis. *The Journal of Pathology* 206:328–336
106. Roopenian DC, Akilesh S (2007) FcRn: the neonatal Fc receptor comes of age. *Nat Rev Immunol* 7:715–725
107. Rubenstein J, Ferreri AJM, Pittaluga S (2008) Primary lymphoma of the central nervous system: epidemiology, pathology and current approaches to diagnosis, prognosis and treatment. *Leuk Lymphoma* 49:43–51
108. Rubenstein JL, Hsi ED, Johnson JL, Jung S-H, Nakashima MO, Grant B, Cheson BD, Kaplan LD (2013) Intensive Chemotherapy and Immunotherapy in Patients With Newly Diagnosed Primary CNS Lymphoma: CALGB 50202 (Alliance 50202). *J Clin Oncol* 31:3061–3068
109. Rubenstein JL (2017) Biology of CNS lymphoma and the potential of novel agents. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2017:556–564

110. Saesoo S, Sathornsumetee S, Anekwiang P, Treetidnipa C, Thuwajit P, Bunthot S, Maneepprakorn W, Maurizi L, Hofmann H, Rungsardthong RU, Saengkrit N (2018) Characterization of liposome-containing SPIONs conjugated with anti-CD20 developed as a novel theranostic agent for central nervous system lymphoma. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 161:497–507
111. Salles G, Barrett M, Foà R, Maurer J, O'Brien S, Valente N, Wenger M, Maloney DG (2017) Rituximab in B-Cell Hematologic Malignancies: A Review of 20 Years of Clinical Experience. *Adv Ther* 34:2232–2273
112. Schmitt AM, Herbrand AK, Fox CP, Bakunina K, Bromberg JEC, Cwynarski K, Doorduyn JK, Ferreri AJM, Illerhaus G, Issa S, Schorb E, Zucca E, Hemkens LG, Schandelmaier S, Kasenda B (2019) Rituximab in primary central nervous system lymphoma—A systematic review and meta-analysis. *Hematological Oncology* 37:548–557
113. Schorb E, Finke J, Ferreri AJM, Ihorst G, Mikesch K, Kasenda B, Fritsch K, Fricker H, Burger E, Grishina O, Valk E, Zucca E, Illerhaus G (2016) High-dose chemotherapy and autologous stem cell transplant compared with conventional chemotherapy for consolidation in newly diagnosed primary CNS lymphoma--a randomized phase III trial (MATRix). *BMC Cancer* 16:282
114. Schorb E, Finke J, Ihorst G, Kasenda B, Fricker H, Illerhaus G (2019a) Age-adjusted high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplant in elderly and fit primary CNS lymphoma patients. *BMC Cancer* 19:287
115. Schorb E, Illerhaus G, Finke J (2019b) Aktuelle Therapiestandards primärer ZNS-Lymphome. *Dtsch med Wochenschr* 144:161–164
116. Siemens J, Soppa J (2017) Polymerasekettenreaktion. In: Munk H (ed) *Taschenlehrbuch Biologie: Genetik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, doi:10.1055/b-005-143647
117. Suh CH, Kim HS, Park JE, Jung SC, Choi CG, Kim SJ (2019) Primary Central Nervous System Lymphoma: Diagnostic Yield of Whole-Body CT and FDG PET/CT for Initial Systemic Imaging. *Radiology* 292:440–446
118. 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
119. Takeuchi H, Matsuda K, Kitai R, Sato K, Kubota T (2007) Angiogenesis in primary central nervous system lymphoma (PCNSL). *J Neurooncol* 84:141–145
120. Testori A, Listowsky I, Sollitti P (1994) Direct cloning of unmodified PCR products by exploiting an engineered restriction site. *Gene* 143:151–152

121. Thiel E, Korfel A, Martus P, Kanz L, Griesinger F, Rauch M, Röth A, Hertenstein B, von Toll T, Hundsberger T, Mergenthaler H-G, Leithäuser M, Birnbaum T, Fischer L, Jahnke K, Herrlinger U, Plasswilm L, Nägele T, Pietsch T, Bamberg M, Weller M (2010) High-dose methotrexate with or without whole brain radiotherapy for primary CNS lymphoma (G-PCNSL-SG-1): a phase 3, randomised, non-inferiority trial. *The Lancet Oncology* 11:1036–1047
122. Thompson AR, Ellison DW, Stevenson FK, Zhu D (1999) VH Gene Sequences From Primary Central Nervous System Lymphomas Indicate Derivation From Highly Mutated Germinal Center B Cells With Ongoing Mutational Activity. *Blood* 94:1738–1746
123. Thurner L, Kemele M, Fadle N, Regitz E, Roth P, Weller M, Szczepanowski M, Klapper W, Monoranu C-M, Rosenwald A, Buslei R, Bohle RM, Kim Y-J, Preuss K-D, Pfreundschuh M (2014) Postranslationally Modified Proteins in the Central Nervous System (CNS) Are the Dominant Antigenic Target/Stimulus of the B-Cell Receptor (BCR) in Primary CNS Lymphomas (PCNSL) Providing Strong Evidence for the Role of Chronic Autoantigenic Stimulation As an Early Step in the Pathogenesis of Aggressive B-Cell Lymphomas. *Blood* 124:142–142
124. 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
125. Thurner L, Hartmann S, Fadle N, Kemele M, Bock T, Bewarder M, Regitz E, Neumann F, Nimmegern A, Müller L von, 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
126. Thurner L, Hartmann S, Bewarder M, Fadle N, Regitz E, Schormann C, Quiroga N, Kemele M, Klapper W, Rosenwald A, Trümper L, Bohle RM, Nimmegern A, Körbel C, Lascke MW, Menger MD, Barth S, Kubuschok B, Mottok A, Kaddu-Mulindwa D, Hansmann M-L, Poeschel V, Held G, Murawski N, Stilgenbauer S, Neumann F, Preuss K-D, Pfreundschuh M (2020a) Identification of the atypically modified autoantigen Ars2 as the target of B-cell receptors from activated B cell-type diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* 105:xxx
127. Thurner L, Hartmann S, Neumann F, Hoth M, Stilgenbauer S, Küppers R, Preuss K-D, Bewarder M (2020b) Role of Specific B-Cell Receptor Antigens in Lymphomagenesis. *Front Oncol* 10:604685
128. Torchia J, Weiskopf K, Levy R (2016) Targeting lymphoma with precision using semisynthetic anti-idiotypic peptibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:5376–5381
129. Trepel M, Müller F, Illerhaus G, Glatzel M, Binder M, Spies E (2014) B-Cell Receptors of Primary Central Nervous System Lymphoma Recognize Antigens in the Brain. *Blood* 124:3003–3003
130. Tsubata T (2001) Molecular Mechanisms for Apoptosis Induced by Signaling Through the B Cell Antigen Receptor. *International Reviews of Immunology* 20:791–803

131. von Baumgarten L, Illerhaus G, Korfel A, Schlegel U, Deckert M, Dreyling M (2018) The diagnosis and treatment of primary CNS lymphoma—an interdisciplinary challenge. *Deutsches Aertzblatt Online* 115:419–426
132. Vuist WMJ, Levy R, Maloney DG (1994) Lymphoma regression induced by monoclonal anti-idiotypic antibodies correlates with their ability to induce Ig signal transduction and is not prevented by tumor expression of high levels of bcl-2 protein. *Blood* 83:899–906
133. Waldera-Lupa DM, Etemad-Parishanzadeh O, Brocksieper M, Kirchgaessler N, Seidel S, Kowalski T, Montesinos-Rongen M, Deckert M, Schlegel U, Stühler K (2017) Proteomic changes in cerebrospinal fluid from primary central nervous system lymphoma patients are associated with protein ectodomain shedding. *Oncotarget* 8:110118–110132
134. Wang C-C, Carnevale J, Rubenstein JL (2014) Progress in Central Nervous System Lymphomas. *Br J Haematol* 166:311–325
135. Wang W, Wang EQ, Balthasar JP (2008) Monoclonal Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 84:548–558
136. Wassenberg MWM, Bromberg JEC, Witkamp ThD, Terhaard CHJ, Taphoorn MJB (2001) White Matter Lesions and Encephalopathy in Patients Treated For Primary Central Nervous System Lymphoma. *J Neurooncol* 52:73–80
137. Weller M (1999) Glucocorticoid Treatment of Primary CNS Lymphoma. *J Neurooncol* 43:237–239
138. Weller M, Martus P, Roth P, Thiel E, Korfel A (2012) Surgery for primary CNS lymphoma? Challenging a paradigm. *Neuro Oncol* 14:1481–1484
139. Wu D, Qin M, Xu D, Wang L, Liu C, Ren J, Zhou G, Chen C, Yang F, Li Y, Zhao Y, Huang R, Pourtaheri S, Kang C, Kamata M, Chen ISY, He Z, Wen J, Chen W, Lu Y (2019) A Bioinspired Platform for Effective Delivery of Protein Therapeutics to the Central Nervous System. *Advanced Materials* 31:1807557
140. Yu B, Liu D (2019) Antibody-drug conjugates in clinical trials for lymphoid malignancies and multiple myeloma. *J Hematol Oncol* 12:94

7. Publikationen und Dank

7.1 Publikationen

Bewarder M, Kiefer M, Moelle C, Goerens L, Stilgenbauer S, Christofyllakis K, Kaddu-Mulindwa D, Fadle N, Regitz E, Neumann F, Hoth M, Preuss K-D, Pfreundschuh M, Thurner L (2020) Integration of the B-Cell Receptor Antigen Neurabin-I/SAMD14 Into an Antibody Format as New Therapeutic Approach for the Treatment of Primary CNS Lymphoma. Front Oncol 10:580364

7.2 Dank

Ich danke Herrn Prof. Dr. Stephan Stilgenbauer, Direktor der Klinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit an seiner Klinik zu verfassen.

Ich möchte Herrn Dr. Moritz Bewarder, Oberarzt an der Klinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums des Saarlandes, für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit danken. Er stand mir stets geduldig für Fragen zur Verfügung und hat mich mit großer Begeisterung bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt.

Ein großer Dank gebührt dem gesamten Team des José-Carreras-Instituts in Homburg für die herzliche Aufnahme. Besonderer Dank gilt Frau Evi Regitz und Frau Natalie Fadle, die mich beide in die Methoden der Molekularbiologie und Proteinchemie eingearbeitet haben und mir im Labor stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Ich danke meiner Familie, insbesondere meinen Großeltern, für ihre Unterstützung.