

Aus der Klinik für Innere Medizin I
der Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Michael Pfreundschuh

**Analyse der Rituximab-induzierten Immunität gegen
DLBCL-assoziierte Antigene**

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

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2009

vorgelegt von: Vera Hammermeister
geb. am 20.06.1984
in Ottweiler

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Zusammenfassung / Summary	5
II. Einleitung	7
1. Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom DLBCL	7
1.1. Definition und Klassifikation	7
1.2. Pathogenese	8
1.3. Therapie	10
1.3.1. CHOP/CHOEP	10
1.3.2. Rituximab	11
2. Genetische Modelle zur Prognose von DLBCL	13
3. SEREX	20
III. Fragestellung	22
IV. Patienten, Material und Methoden	24
1. Patienten: Aufnahmekriterien	24
2. Material	24
2.1. Autoantigene	24
2.2. Seren	25
3. Methoden	26
3.1. RNA Extraktion aus Zellkulturen und Geweben	26
3.2. Amplifikation der Targetgene mittels RT-PCR	27
3.2.1. Herstellung von cDNA aus mRNA	27
3.2.2. Polymerasenkettenreaktion (PCR)	27
3.2.3. Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren	28
3.3. Klonierung von PCR-Produkten	28
3.3.1. TOPO Vektor	29
3.3.2. Transformation kompetenter Bakterien	29
3.3.3. Plasmid-Präparationen	29
3.3.4. TENS-Minis	30
3.3.5. Restriktionsenzymverdau von DNA-Konstrukten	30
3.3.6. DNA-Sequenzierung	31
3.3.7. Ligation von DNA-Fragmenten	33
3.3.8. Phagenverpackung	33

3.3.9. Platteneluat	34
3.3.10. Kontrolle	34
3.3.10.1. In-vivo-Excision	34
3.4. Das immunologische Screening: SEREX	36
3.4.1. Vorbereitung der Patientenseren	36
3.4.1.1. Präabsorption über Affinitätssäulen	36
3.4.1.2. Präabsorption über lytische Folien	37
3.4.2. Präparation der bakteriellen Wirtszellen	37
3.4.2.1. Vorbereitung der Bakterien für die Transfektion mit Phagen	37
3.4.3. Das Screening	37
3.4.3.1. Transfektion der Bakterien und Blotten der exprimierten Proteine	37
3.4.3.2. Waschen und Blocken der Nitrocellulosefolien	38
3.4.3.3. Inkubation mit allogenen Seren und Detektion gebundener Antikörper	38
3.4.3.4. Testauswertung	39
4. Reagenzien	39
5. Puffer und Medien	40
 V. Ergebnisse	 43
1. Untersuchtes Patientenkollektiv	43
2. Methodisches Vorgehen am Beispiel PKC- β	44
3. SEREX	51
4. Immunantworten gegen DLBCL-assoziierte Antigene	52
 VI. Diskussion und Perspektiven	 58
 VII. Literaturverzeichnis	 62
 VIII. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	 66
 IX. Publikation / Danksagung	 68
 X. Lebenslauf	 69

I. Zusammenfassung / Summary

Lymphome, Neoplasien des lymphatischen Systems, können in 2 Gruppen eingeteilt werden: Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL), wobei die NHL mit ca. 60 % die größere der beiden Gruppen bildet. Der Begriff NHL umfasst verschiedene Erkrankungen mit unterschiedlichen morphologischen, immunologischen und klinischen Kriterien, wobei das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) den häufigsten Subtyp der NHL darstellt, gefolgt vom Follikulären Lymphom.

Es gibt 2 etablierte Therapien für DLBCL: CHOP (Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin = Oncovin und Prednisolon) und CHOEP (CHOP + Etoposid). Die Erweiterung beider Therapien mit dem anti-CD20 IgG1- κ -Antikörper Rituximab erbrachte eine deutliche Verbesserung der Überlebensraten von Patienten mit DLBCL, wobei eine möglicherweise auftretende Immunmodulation nach Rituximab-Anwendung, z.B. eine Immunantwort gegen definierte Genprodukte, einen Wirkungsmechanismus darstellen könnte.

Ziel dieser Arbeit waren Analyse und Vergleich möglicher Veränderungen des Immunstatus während der Standardtherapie bzw. während einer Kombinationstherapie aus CHOP-14 und Rituximab. Dazu wurde das Antikörperrepertoire zweier Patientengruppen, die mit CHOP-14 bzw. mit CHOP-14 + Rituximab behandelt wurden, vor und zu einem festgelegten Zeitraum nach der Chemotherapie mit Hilfe einer abgewandelten Form des SEREX (Serological identification of antigens by Recombinant Expression cloning) untersucht.

Die Auswahl der zu analysierenden Genprodukte erfolgte anhand verschiedener Studien, welche mehrere Gene und Genmuster identifizieren konnten, mit deren Hilfe z.B. die Prognose von DLBCL-Patienten besser vorhergesagt werden kann. Es wurden 11 dieser Gene im Rahmen dieser Studie zur Untersuchung herangezogen.

Dabei wurde bei 3 Patienten eine von einem Rituximabzusatz unabhängige Immunantwort gegen BCL2 gefunden, wobei einer der Patienten mit 6 Zyklen CHOP-14, die anderen beiden jeweils mit 8 Zyklen CHOP-14 in Kombination mit Rituximab therapiert wurden.

Somit gelang es in dieser Studie erstmalig hochtitrige Antikörper gegen BCL2 und damit eine immunogene Wirkung von BCL2 nachzuweisen. Dies deutet darauf hin, dass eine Immuntherapie auf Basis des BCL2-Effektes als Ansatzpunkt für neue Therapien dienen könnte, um die Heilungschancen von Lymphomen weiter zu steigern.

Investigation of Rituximab-Induced Anti-Lymphoma Immunity in Diffuse Large B-Cell Lymphomas

Lymphomas, neoplasms of the lymphatic system, can be divided into two groups: Hodgkin- and non-Hodgkin-Lymphomas (NHL), the NHL being the bigger one with about 60%. The term NHL includes a diversity of diseases with different morphological, immunological and clinical criteria of which the diffuse large-B-cell-Lymphoma (DLBCL) is the most common subtype, followed by follicular lymphomas.

There are 2 established therapies for DLBCL: CHOP (cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine = oncovin and prednisone) and CHOEP (CHOP + etoposide). The addition of the anti-CD20 IgG1- κ -antibody Rituximab has lead to a significantly increased survival-rate of the patients with DLBCL, which could turn out to be a mechanism of action induced by a possible modulation of the immune system after a treatment with Rituximab, e.g. an immune response against defined gene products.

The objectives of this paper were the analysis and the comparison of possible changes of the immune status during the standard therapy and during a combinational therapy of CHOP-14 and Rituximab respectively. Therefore an examination of the antibody repertoire of two groups of patients took place; one of them was treated with CHOP-14 and the other with CHOP-14 + Rituximab. They were tested before and during a determined period in time after the chemotherapy with an altered form of SEREX (SERological identification of antigens by Recombinant EXpression cloning).

The gene products to be analyzed were selected on the basis of several studies which were able to identify various genes and gene patterns, which help, for example, to predict the prognosis of DLBCL-patients. 11 of these genes have been tested during this study.

Within this survey, 3 patients showed an immune reaction against BCL2 that was independent from an addition of Rituximab. One of the patients had been treated with 6 cycles of CHOP-14, the other two with 8 cycles of CHOP-14 and Rituximab.

Thus, this study was the first to detect high-titered antibodies against BCL2, and by doing so, proving the immunogenicity of BCL2. These results could imply that a possible immune therapy based on the BCL2-effect could be the starting point for new therapies increasing the remission rates of lymphomas.

II. Einleitung

1. Das diffus großzellige B-Zell-Lymphom DLBCL

1.1. Definition und Klassifikation

Als Lymphome bezeichnet man Neoplasien des lymphatischen Systems. Sie können in 2 Hauptgruppen unterteilt werden: Hodgkin-Lymphome (M. Hodgkin) und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL), wobei die Hodgkin-Lymphome ungefähr 40 % der Erkrankungen ausmachen. Die NHL stellen mit ca. 60% die größere der beiden Gruppen dar. Dabei wird unter dem Begriff NHL eine heterogene Gruppe maligner Erkrankungen der Lymphozyten zusammengefasst, wobei die einzelnen Lymphome nach klinischen, morphologischen, immunphänotypischen und molekulargenetischen Kriterien klassifiziert werden (s. Tabelle 1).

Tabelle 1: Klassifikation der Lymphome, Kiel Klassifikation (1988) und WHO-Klassifikation (2001)

WHO-Klassifikation	Kiel-Klassifikation
	Hodgkin-Lymphom (HD)
Klassisches Hodgkin-Lymphom	
Lymphozytenreich	
Gemischte Zellularität	
Lymphozytenarm	
Noduläre Sklerose	
Noduläres lymphozytprädominantes Hodgkin-Lymphom	Noduläres Paragranulom
	B-Zell-Neoplasien
	Vorläufer-B-Zell-Neoplasien
B-Zell-Lymphoblastenleukämie / lymphoblastisches Lymphom	B-ALL B-lymphoblastisches Lymphom
	Reife ("periphere") B-Zell-Neoplasien
Chronische lymphatische Leukämie / Kleinzelliges lymphozytisches Lymphom	B-CLL
Prolymphozyten-Leukämie	Prolymphozyten-Leukämie B-PLL
Lymphoplasmazytisches Lymphom	Lymphoplasmazytoides Immunozytom
Haarzell-Leukämie	Haarzell-Leukämie
Plasmozytom	

Extranodales Marginalzonenlymphom, MALT-Typ	Monozytoides B-Zell-Lymphom
Nodales Marginalzonenlymphom	
Splenisches Marginalzonenlymphom	
Follikuläres Lymphom	Zentroblastisch-zentrozytisches Lymphom
Grad 1	
Grad 2	
Grad 3a	
Grad 3b	
Mantelzell-Lymphom	Zentrozytisches Lymphom
Diffuses großzelliges Lymphom	
Subtyp: mediastinal (thymisch)	primär mediastinales großzelliges sklerosierendes B-Zell-Lymphom
Subtyp: intravaskuläres Lymphom	Angioendotheliotropes (intravaskuläres) Lymphom
Subtyp: Ergusslymphom	
Variante: zentroblastisch	Zentroblastisches Lymphom
Variante: immunoblastisch	Immunoblastisches Lymphom
Variante: T-Zell-reich, Histozytenreich	
Variante: anaplastisch	Großzelliges, anaplastisches B-Zell-Lymphom
Burkitt-Lymphom	Burkitt-Lymphom

T-Zell-Neoplasien

Vorläufer-T-Zell-Neoplasien

T-Zell-Lymphoblastenleukämie / Lymphoblastisches Lymphom	T-ALL T-lymphoblastisches Lymphom
--	--------------------------------------

Reife ("periphere") T- und NK-Zell-Neoplasien

T-Zell-Prolymphozyten-Leukämie	T-PLL, T-CLL
Kutane T-Zell-Lymphome	
Extranodale T-Zell-Lymphome	
T-Zell-Lymphom vom Enteropathie-Typ	
Extranodales T-/ NK-Zell-Lymphom vom nasalen Typ	
Großzelliges anaplastisches Lymphom (T-/ Null-Zell-Typ)	
Primär kutaner Typ	
Primär systemischer Typ	Großzelliges anaplastisches T-/ Null-Zell-Lymphom (Ki-1-Lymphom)
Angioimmunoblastisches T-Zell-Lymphom	T-zell-Lymphom vom AILD-Typ
Peripheres T-Zell-Lymphom, nos (nicht weiter spezifiziert)	

1.2. Pathogenese

Die Pathogenese der meisten NHL ist unklar. Diskutiert werden z.B. Virusinfektionen: bei Patienten mit T-Zell-Lymphomen in Südjapan wurden gleichzeitig HTLV1-Infektionen gefunden, Epstein-Barr-Viren bei 2 Typen des Burkitt-Lymphoms, dem HIV-assoziierten Typ und dem endemischen Typ in Afrika. Des Weiteren werden

angeborene Immundefekte wie das Wiskott-Aldrich-Syndrom sowie erworbene Immunschwächen, z.B. durch Spätkomplikation einer Therapie mit Immunsuppressiva oder Zytostatika, als Ursache angenommen. Auch Autoimmunerkrankungen wie das Sjögren-Syndrom werden diskutiert. Spätkomplikationen nach einer Bestrahlung oder eine Exposition gegenüber radioaktiven Materialien spielen bei der Lymphomentstehung ebenfalls eine Rolle.

Die NHL werden ähnlich wie die Hodgkin-Lymphome nach der Ann-Arbor-Klassifikation in 4 Stadien eingeteilt, wobei zwischen primär nodalem und primär extranodalem Befall unterschieden wird (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Ann-Arbor-Klassifikation

Stadium	Primär nodale Manifestation (70%)	Primär extranodale Manifestation (30%)
I	Befall einer Lymphknotenregion	Befall eines extralymphatischen Organs oder Gewebes (I _E)
II ₁	Befall von benachbarten Lymphknotenregionen über- oder unterhalb des Zwerchfells (II ₁) oder einer Lymphknotenregion mit lokalisertem Übergang auf ein benachbartes Organ oder Gewebe (II _E)	Befall eines extralymphatischen Organs einschließlich der regionalen Lymphknoten (II ₁) oder eines weiteren benachbarten extralymphatischen Organs (II _{1E}) ober- oder unterhalb des Zwerchfells
II ₂	Befall von zwei nicht benachbarten oder mehr als zwei benachbarten Lymphknotenregionen ober- oder unterhalb des Zwerchfells (II ₂) einschließlich eines lokalisierten Befalls eines extralymphatischen Organs oder Gewebes (II _{2E})	Befall eines extralymphatischen Organs und Lymphknotenbefall, der über die regionalen Lymphknoten hinausgeht und auch einen weiteren lokalisierten Organbefall einschließen kann (II _{2E})
III	Befall von Lymphknotenregionen ober- und unterhalb des Zwerchfells (III) einschließlich eines lokalisierten Befalls eines extralymphatischen Organs oder Gewebes (III _E) oder der Milz (III _S) oder beides (III _{SE})	Befall eines extralymphatischen Organs und Lymphknotenbefall ober- und unterhalb des Zwerchfells einschließlich eines weiteren lokalisierten extralymphatischen Organs oder Gewebes (III _E) oder der Milz (III _S) oder beides (III _{SE})
IV	Lymphknotenbefall mit diffusem oder disseminiertem Befall extralymphatischer Organe oder Gewebe	Diffuser oder disseminierter Organbefall mit oder ohne Lymphknotenbefall
Zusatz: A: ohne Allgemeinerscheinungen B: mit Fieber u./o. Nachtschweiß u./o. Gewichtsverlust (> 10% in den letzten 6 Monaten)		

(Quelle: Herold – Innere Medizin, 2006)

Bei ca. 80% aller NHL handelt es sich um B-Zell-Neoplasien, wobei das diffus großzellige B-Zell-Lymphom (DLBCL) laut einer Studie der International Lymphoma Study Group [Armitage and Weisenburger 1998] den häufigsten Subtyp der NHL darstellt, gefolgt vom Follikulären Lymphom als Zweithäufigstem (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Häufigkeit der verschiedenen Histologien unter den B-Zell-Lymphomen

Histologischer Typ	Häufigkeit in %
Diffus großzelliges Lymphom	27,3
Follikuläres Lymphom	25,6
B-CLL	23,1
Immunozytom / lymphoplasmozytoides Immunozytom	10,5
Mantelzell-Lymphom	5,3
Burkitt-Lymphom	4,4
Haarzell-Leukämie	3,8

(Quelle: Tumorregister München)

1.3. Therapie

1.3.1. CHOP/CHOEP

DLBCL wurde mehr als 25 Jahre lang standardmäßig mit einer Kombination aus Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin = Oncovin und Prednisolon (CHOP) therapiert. Das Hinzufügen von Etoposid zur CHOP-Therapie (CHOEP) erhöht die Effektivität der Chemotherapie bei jungen Patienten mit guter Prognose, so dass diese Therapieform in mehreren Ländern zur Standardtherapie für diese Patientengruppe geworden ist [Pfreundschuh et al. 2004]. Auch die Verkürzung des Behandlungsintervalls durch den Einsatz von G-CSF von 3 auf 2 Wochen (CHO(E)P14 statt CHO(E)P21) wirkt sich positiv auf die Überlebenszeit der Patienten aus. Die besten Ergebnisse werden jedoch durch eine Kombination aus einer CHOP-ähnlichen Therapie mit dem CD20-Antikörper Rituximab erzielt. Studien, die u.a. eine reine CHOP- bzw. CHOEP-Therapie mit einer Kombinationstherapie aus CHOP/CHOEP und Rituximab vergleichen, zeigen eine statistisch signifikante Zunahme z.B. des Prozentsatzes von Patienten mit einer progressionsfreien 3-Jahres-Überlebensrate von 68% (ausschließlich Chemotherapie) auf 85% (Chemotherapie und Rituximab). Auch die Gesamtüberlebensrate ließ sich von 84% (ohne Rituximab) auf 93% (mit Rituximab) steigern. Obwohl das Hinzufügen von Etoposid allein zur CHOP-Therapie zu einer deutlichen Effizienzsteigerung der Behandlung führt, ist dieser Unterschied nach Zusatz von Rituximab nicht mehr erkennbar. Dies könnte durch einen ausgleichenden Effekt von Rituximab auf die beiden Chemotherapien hervorgerufen werden. Auch die deutlich stärkeren

hämatoxischen Nebenwirkungen der CHOEP-Therapie könnten zu einem Effizienzverlust dieser Behandlungsmaßnahme führen, da sie die notwendigen Effektormechanismen des Immunsystems (z.B. Natürliche Killerzellen) verringern. Diese sind essentiell für die durch Rituximab-vermittelte Antikörper-abhängige zelluläre Toxizität. Aufgrund der geringeren schädigenden Auswirkungen von CHOP gegenüber CHOEP bei gleicher Wirkung in Kombination mit Rituximab und aufgrund einer leichteren Handhabung von CHOP könnte diese Therapie zukünftig der anderen vorzuziehen sein [Pfreundschuh et al. 2006].

1.3.2. Rituximab

Rituximab ist ein chimärer anti-CD20 IgG1- κ -Antikörper mit einer konstanten humanen Region (κ -Leicht- und IgG1-Schwerkette) und einer variablen, aus Mausgewebe extrahierten Region (Leicht- und Schwerkette).

CD20, ein ca. 33-37 kDa großes, nicht glykosiliertes, 297 Aminosäuren umfassendes Membran-Phosphoprotein wird im gesunden Organismus in unterschiedlicher Glykosilierung von der B-Lymphozytenreihe und von Spermien exprimiert, wobei eine konstante CD20-Expression bei der B-Zell-Differenzierung der prä-B-Vorstufen bis zu den Plasmazellen nachweisbar ist [Tedder and Engel 1994]. CD20 stellt einen Ca^{2+} -Kanal dar, welcher eine wichtige Rolle in der Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von B-Zellen spielt [Kanzaki et al. 1997].

Das Rituximab-Epitop ist größtenteils unbekannt. Vermutet wird eine diskontinuierliche Bindungsstelle an der extrazellulären Schleife von CD20 (vgl. Abbildung 1).

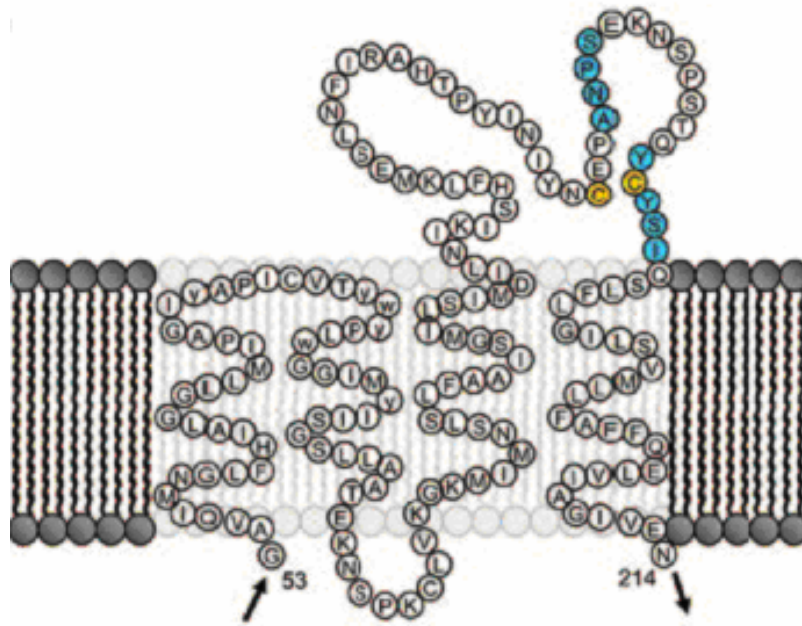


Abbildung 1: Rituximab-Epitop

Modell der transmembranen und der extrazellulären Domäne von CD20 (basierend auf Ernst et. al, [Ernst et al. 2005]) mit dem vermuteten diskontinuierlichen Epitob, blau markiert; gelb markiert: Disulfidbrücke zwischen C167 und C183) [Binder et al. 2006]

Rituximab wirkt einerseits über eine Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) und andererseits über eine Komplement-vermittelte Lyse (CDC) der B-Zelle. Weitere Angriffspunkte sind wahrscheinlich eine Hemmung des Übergangs des Zellzyklus von der G- in die S-Phase, eine Differenzierungshemmung und eine Zunahme der Phosphorylierung verschiedener zellulärer Proteine. Außerdem wurden eine Apoptose-Induktion der CD20⁺ Lymphomzellen, sowie synergistische zytotoxische Effekte bei Kombination mit einer Chemotherapie beschrieben [Hofmeister et al. 2000; Ghetie et al. 2001; Maloney 2001].

Weil die Überlegenheit von Rituximab-beinhaltenen Therapien nicht nur auf besserem Ansprechen auf die Primärtherapie, sondern auch auf geringeren Rezidivraten beruht, könnten sekundäre, durch die Rituximab Anwendung induzierte, immunologische Effekte auftreten.

2. Genetische Modelle zur Prognose von DLBCL

Es gibt 2 verschiedene Entstehungswege für DLBCL: entweder aus einem Follikulären Lymphom (FL) oder *de novo*. 25-60% der FL unterlaufen eine Transformation in ein DLBCL. Der klinische Verlauf der beiden Formen ist sehr verschieden. Die aus FL transformierten DLBCL sind häufig rapid progressiv, therapierefraktär und mit kurzer Gesamtüberlebenszeit verbunden [Levene et al. 2003]. Ein Vergleich der genetischen Expressionsmuster von transformierten DLBCL und *de novo* DLBCL mit dem genetischen Expressionsmuster von *de novo* FL ergab, dass die transformierten DLBCL den FL mehr ähnelten als die *de novo* DLBCL.

Durch cDNA-Mikroarray-Experimente konnten Alizadeh et al. DLBCL in 2 weitere Gruppen mit unterschiedlicher Prognose einteilen: eine Gruppe exprimierte ein Genmuster, das Keimzentrums-B-Lymphozyten ähnelt (germinal center B-like DLBCL, GC-B-like DLBCL), die andere exprimierte Gene, die normalerweise während der *in vitro* Aktivierung von peripheren B-Zellen induziert werden (activated B-like DLBCL). Beide Untergruppen weisen deutlich unterschiedliche Prognosen auf: Patienten mit GC-B-like DLBCL hatten eine statistisch signifikant längere Gesamtüberlebenszeit als Patienten mit activated B-like DLBCL [Alizadeh et al. 2000].

Aufbauend auf dieser Einteilung wurden mehrere Studien durchgeführt, die das Ziel hatten, verschiedene Gene oder Genmuster zu identifizieren, mit denen die Überlebenszeiten der verschiedenen DLBCL-Untergruppen noch besser vorhergesagt werden können. Dabei wurden mehrere Gene identifiziert.

Shipp et al. verglichen mittels cDNA-Mikrochip-Analysen das genetische Expressionsmuster zweier DLBCL-Untergruppen miteinander: geheilte und schwerwiegende bzw. therapierefraktäre DLBCL. Dabei zeigte sich, dass verschiedene Gene in der Gruppe der refraktären DLBCL deutlich stärker exprimiert wurden als in der anderen Gruppe. Dazu gehörten u.a. PDE4B und PKC β 2 [Shipp et al. 2002].

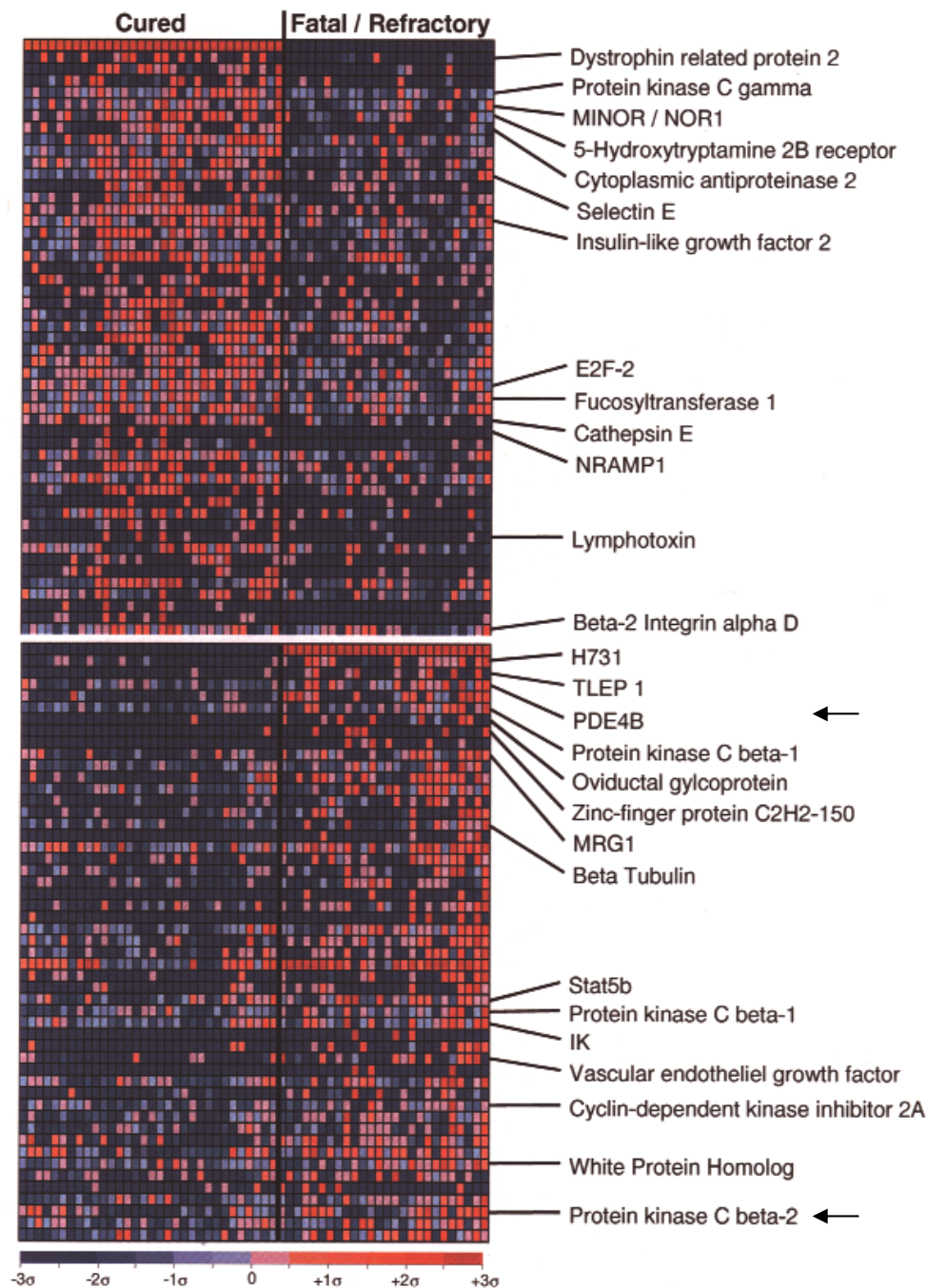


Abbildung 2: Expressionsprofile von geheilten bzw. schwerwiegenden oder therapierefraktären DLBCL; Gene, die in geheilten DLBCL verstärkt exprimiert werden, sind im oberen Bildteil abgebildet, solche die in fatalen DLBCL verstärkt exprimiert werden, sind im unteren Bildteil abgebildet; rote Farbe zeigt hohe Expression, blaue zeigt niedrige Expression an. Die Farbskala am unteren Bildrand zeigt die relative Expression in Standardabweichung vom Mittelwert. Jede Spalte stellt einen Fall dar, jede Zeile ein Gen. Die Expressionsprofile von 32 geheilten DLBCL sind auf der linken Seite, die Expressionsprofile von 26 schwerwiegenden bzw. therapierefraktären Tumoren sind auf der rechten Bildseite abgebildet. [Shipp, Ross et al. 2002]. Die Pfeile markieren in dieser Arbeit untersuchte Gene.

Ein weiteres dokumentiertes Gen ist HGAL (= human germinal center-associated lymphoma), welches hauptsächlich durch Keimzentrums-B-Lymphozyten exprimiert und spezifisch durch das Interleukin-4 (IL-4) stimuliert wird [Lossos et al. 2003]. Es ist homolog zu dem Maus-Gen M17, welches in GC-B-Lymphozyten exprimiert wird [Lim et al. 2007]. Das HGAL-kodierte Protein ist wahrscheinlich im Zytoplasma lokalisiert, da ihm sowohl eine Transmembrandomäne als auch eine Kernlokalisierungssequenz fehlen. Aufgrund des Vorhandenseins eines „immunoreceptor tyrosine-based activation motif“ (ITAM) wird angenommen, dass das HGAL-kodierte Protein eine Rolle in der Signaltransduktion der B-Lymphozyten spielt [Lossos, Alizadeh et al. 2003].

Des Weiteren wurden unter anderem BCL6 und BCL2 untersucht. Diese Gene weisen Chromosomenaberrationen auf, wie z.B. Translokationen des BCL6-Gens bei DLBCL, beispielsweise $t(3;14)(q27;q32)$ oder $t(3;22)(q27;q11)$. Die dadurch entstandenen Hybrid-Gene spielen bei der Pathogenese eine wichtige Rolle, wie z.B. auch die Translokation $t(14;18)$, welche sich relativ häufig in Follikulären Lymphomen findet. Es kommt bei solchen Mutationen häufig zu einer Überexpression der durch die neu-entstandenen Hybrid-Gene kodierten Proteine.

Translokationen im BCL2-Gen werden in 12-30% der DLBCL gefunden. In diesem Fall besteht jedoch keine statistische Signifikanz zwischen gesteigerter Proteinexpression und Auftreten einer Mutation, da es sowohl bei 52% der Lymphome mit Translokation als auch bei 37% der Lymphome ohne Translokation zur erhöhten BCL2-Expression kommt [Gascoyne et al. 1997].

Auch bei DLBCL, die aus FL entstanden sind, ist eine Änderung in der Expression verschiedener Proteine erkennbar: Gene, deren Funktion in Proliferation, Basismetabolismus und Gewebsinvasion liegt, werden heraufreguliert, während antiapoptotische Gene herabreguliert werden [Levene, Morgan et al. 2003]. So gibt es eine Reihe anderer Gene, bei denen es z.B. durch Translokation zur Überexpression ihrer Genprodukte kommt.

Anhand der Expression verschiedener Gene konnten weitere Modelle zur Prognose der Überlebenszeit von DLBCL-Patienten entwickelt werden [Zhang et al. 1999; Lossos et al. 2004].

Aus diesen Studien wurden folgende Gene ausgewählt, deren mögliche Immunogenität in dieser Arbeit untersucht wurde, weil z.B. eine Überexpression dieser Gene zu einer gesteigerten Immunantwort gegen deren Produkte führen könnte.

BCL2:

(entspricht B-cell lymphoma 2 protein)

Das BCL2-kodierte Protein ist anti-apoptotisch wirksam. [Hockenbery et al. 1991]

Bei einer Mutation von BCL2 kommt es zu einer Hypomethylierung in der Promoterregion, was eine Überexpression des Proteins zur Folge haben kann.

Untersuchungen bei Patienten mit neu aufgetretenem DLBCL zeigten, dass Translokationen des BCL2-Gens relativ häufig vorliegen, wobei sie eher in primär nodalen als in extranodalen Lymphomen vorkommen. Weiterhin wurde aufgezeigt, dass zwischen einer Translokation des BCL2-Gens und einer Überexpression von BCL2 kein statistisch signifikanter Zusammenhang besteht. Das Auftreten von Translokationen des BCL2-Gens hat weder Einfluss auf die ereignisfreie Überlebenszeit, noch auf die Gesamtüberlebenszeit. Im Gegensatz dazu hat das Ausmaß der Proteinexpression von BCL2 einen statistisch signifikanten Einfluss, sowohl auf die ereignisfreie als auch auf die Gesamtüberlebenszeit. Dabei wirken sich eine niedrige Proteinexpression positiv und eine hohe Proteinexpression negativ auf ereignisfreie und auf Gesamtüberlebenszeit aus [Kramer et al. 1998].

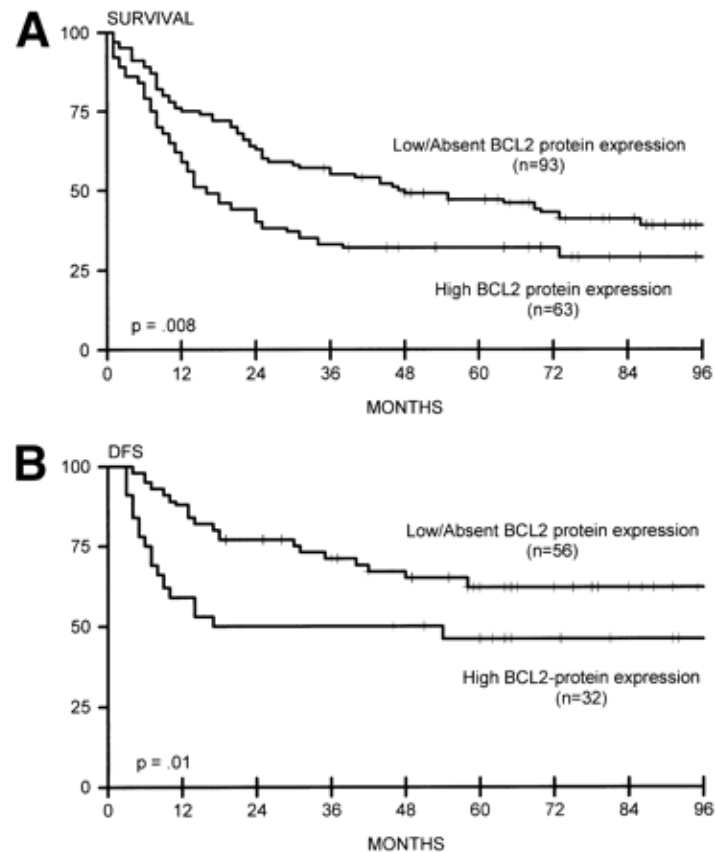


Abbildung 3: Überlebenszeiten von Lymphompatienten in Abhängigkeit von der BCL2-Proteinexpression; A: Gesamtüberlebenszeit von Lymphompatienten mit hoher BCL2-Proteinexpression (n=63) und niedriger/ausbleibender BCL2-Proteinexpression (n=93); B: Ereignisfreie Überlebenszeit von Lymphompatienten mit hoher BCL2-Proteinexpression (n=32) und niedriger/ausbleibender BCL2-Proteinexpression (n=56) [Kramer, Hermans et al. 1998]

BCL6:

Das BCL6-kodierte Protein ist ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, in diesem Fall ein sequenzspezifischer Transkriptionsrepressor. Es dient der Kontrolle der Keimzellformation und der T-Zell-abhängigen Immunantwort und der Modulation der Transkription von IL-4-Antworten von B-Zellen [Staudt et al. 1999]. Des Weiteren reprimiert es die Expression von Cyclin D2 und SCYA3 [Dunphy 2006].

BCL6 ist wie HGAL ein Marker für GC-B-like DLBCL und mit einer eher guten Prognose verbunden [Staudt, Dent et al. 1999].

Winter et al. konnten zeigen, dass sowohl ereignisfreie Überlebenszeit als auch Gesamtüberlebenszeit bei BCL6-negativen Patienten mit einer Kombinationstherapie aus CHOP und Rituximab signifikant verlängert waren gegenüber einer Therapie

ohne Rituximab. Im Gegensatz dazu waren ereignisfreie Überlebenszeit und Gesamtüberlebenszeit bei BCL6-positiven Patienten bei beiden Therapien gleich. Somit profitieren ausschließlich BCL6–negative Patienten von einer Therapie mit Rituximab [Winter et al. 2006].

CD20:

CD20 stellt einen Ca^{2+} -Kanal dar, welcher eine wichtige Rolle in der Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von B-Zellen spielt [Tedder and Engel 1994]. CD20 kommt in unterschiedlicher Glykosilierung in der B-Lymphozytenreihe vor und bildet den Angriffspunkt von Rituximab.

LM02:

Das LM02-kodierte Protein ist ein Faktor in Erythropoese und Angiogenese. Es wird in Keimzell-T-Lymphozyten exprimiert und ist das am häufigsten durch Translokation veränderte Gen bei akuter T-Zell-Leukämie in der Kindheit. Außerdem wird LM02 vermehrt in GC-B-like DLBCL (dort in 47% der untersuchten Fälle), in FL, Burkitt Lymphomen und dem lymphozytenprädominanten Hodgkin Lymphom exprimiert [Natkunam et al. 2007].

PDE4B:

PDE4B kodiert für eine cAMP-abhängige Phosphodiesterase. Eine Mutation von PDE4B führt zur Überexpression dieses Proteins bei prognostisch ungünstigen bzw. therapierefraktären DLBCL [Manning et al. 1999], [Shipp, Ross et al. 2002].

Cyclin D2

(entspricht CCND2)

Cyclin D2 stellt eine regulatorische Untereinheit von CDK4 und CDK6 dar. Eine seiner Funktionen ist die Kontrolle des Zellzyklus am G1/S Übergang, wobei eine Überexpression von Cyclin D2 die G1 Phase verkürzt [Brooks et al. 1996]. Bei B-CLL Patienten, bei Patienten mit lymphoplasmozytischem Lymphom und bei Patienten mit Mantelzelllymphom wurde eine 5- bis 10-fach gesteigerte Expression von Cyclin D2 nachgewiesen [Delmer et al. 1995]. Mikrochip-Analysen zeigten eine verstärkte Expression in activated B-like DLBCL gegenüber GC-B-like DLBCL [Alizadeh, Eisen et al. 2000].

Aktinin $\alpha 1$:

Aktinin ist ein Mikrofilament-Protein, welches die Länge von R-Aktin reguliert. Es dient außerdem der Verankerung von Aktin in der Plasmamembran [Burridge and McCullough 1980].

SCYA3:

(entspricht MIP-1 alpha bzw. CCL3)

Die Funktion des cc-Chemokins ist unbekannt, es wird jedoch hauptsächlich in der activated-B-cell-like Untergruppe von DLBCL exprimiert.

In der SCYA3-Promoterregion befindet sich eine Bindungsstelle mit hoher Affinität für BCL6. BCL6 reprimiert die Expression von SCYA3. Eine Mutation von SCYA3 führt zur Überexpression des Proteins.

PKC- $\beta 2$:

Das PKC- β -kodierte Protein beeinflusst den B-Zell-Rezeptor (BCR): bei Aktivierung des BCR in Anwesenheit von PKC- β kommt es zur gesteigerten Proliferation, bei Aktivierung des BCR bei niedriger PKC- β -Konzentration kommt es hingegen zur Apoptose der B-Zelle. Eine Mutation führt zur Überexpression des Proteins in prognostisch ungünstigen bzw. therapierefraktären DLBCL [Shipp, Ross et al. 2002].

E2IG3:

(entspricht Nucleostemin)

E2IG3 kodiert für Nucleostemin, welches ein Protein des Nucleolus darstellt und welches in Stammzellen, transformierten Zelllinien und in Tumoren exprimiert wird. Die genauen Ansatzpunkte von Nucleostemin in der Wachstumsregulation sind unbekannt. Jedoch konnte von Ma und Pederson gezeigt werden, dass eine Nucleostemin-Herabregulation die Konzentration des Tumorsuppressors p53 erhöht und in p53-positiven Zellen zu einem G1-Arrest des Zellzyklus führt. In Zellen, denen es aufgrund von genetischer Transformation an p53 mangelt, war dies nicht der Fall. Somit konnte gezeigt werden, dass Nucleostemin den G1/S-Übergang p53-abhängig kontrolliert [Ma and Pederson 2007].

HGAL:

HGAL kodiert ein 178 Aminosäuren-umfassendes Protein, welches in GC-B-like DLBCL exprimiert wird, wahrscheinlich im Zytoplasma lokalisiert ist und eine Rolle in der Signaltransduktion der B-Lymphozyten spielt. Es wird durch IL-4 induziert.

Es stellt sich die Frage, ob eine Immunantwort z.B. gegen die überexprimierten Proteine existiert und ob eine Rituximab-Behandlung diese mögliche Antwort evtl. induziert oder verstärkt.

Tabelle 4: Gene, Zusammenfassung

Gen	Funktion	Über-expression
BCL2	Anti-apoptotisch wirksam	+ (eher ABC-DLBCL)
BCL6	Sequenzspezifischer Transkriptionsrepressor	+ (eher GC-DLBCL)
CD 20	Ca ²⁺ -Kanal: Aktivierung, Differenzierung von B-Zellen	
LM02	Wirksam bei Erythropoese und Angiogenese	
PDE4B	cAMP-abhängige Phosphodiesterase	+ (prognostisch ungünstige DLBCL)
Cyclin D2	Kontrolle des Zellzyklus am G1/S Übergang	+ (eher ABC-DLBCL)
Actinin	Mikrofilament-Protein, reguliert die Länge von R-Aktin	
SCYA3	cc-Chemokin mit unbekannter Funktion	+ (?)
PKC-β	Wirkung auf den B-Zell-Rezeptor	+ (prognostisch ungünstige DLBCL)
E21G3	p53-abhängige Kontrolle des G1/S Übergangs	
HGAL	Wirksam in der Signaltransduktion der B-Lymphozyten	

3. SEREX

Durch SEREX erfolgt eine molekulare Identifizierung von Tumorantigenen anhand des Antikörperreservoirs von Tumorpatienten. Dabei werden cDNA-Expressionsbibliotheken aus Tumorbiopsiematerial über den Zwischenschritt der mRNA hergestellt. Die cDNA wird daraufhin in Bakteriophagen kloniert und in *E.coli* Bakterien exprimiert. So erhält man rekombinante Proteine, welche von Antikörpern in Patientenseren erkannt werden können. Die so erfassten Antigene können der Sequenzanalyse zugeführt werden, so dass deren molekulare Struktur aufgeklärt werden kann [Sahin et al. 1997].

Diese Methode hat gegenüber anderen wie z.B. dem Western-Blot den Vorteil, dass sie deutlich weniger zeit- und kostenintensiv ist. SEREX ist ein in-vivo-System, bei dem positive und negative Signale - im Gegensatz zum Western-Blot - gleichzeitig ausgewertet werden können. Die deutlich geringeren Hintergrundreaktionen machen

eine Auswertung zudem sehr viel leichter. Außerdem muss keine Konzentrationsoptimierung der Seren durchgeführt werden.

III. Fragestellung

In dieser Arbeit soll ein Vergleich von Immunantworten gegen DLBCL-assoziierte Antigene bei Patienten vor und nach einer Therapie angestellt werden.

Dazu wird der Immunstatus von 2 Patientengruppen an 3 verschiedenen Zeitpunkten untersucht und verglichen, wobei eine Gruppe ausschließlich mit einer Chemotherapie, eine zweite mit einer Kombination aus Chemotherapie und Rituximab behandelt wurde. Dies ermöglicht die Darstellung eventuell auftretender Rituximab-induzierter immunologischer Effekte und deren nähere Charakterisierung. Die Immunantwort wird zu Beginn der Therapie sowie 3 bzw. 6 bis 9 Monate nach Ende der Therapie analysiert.

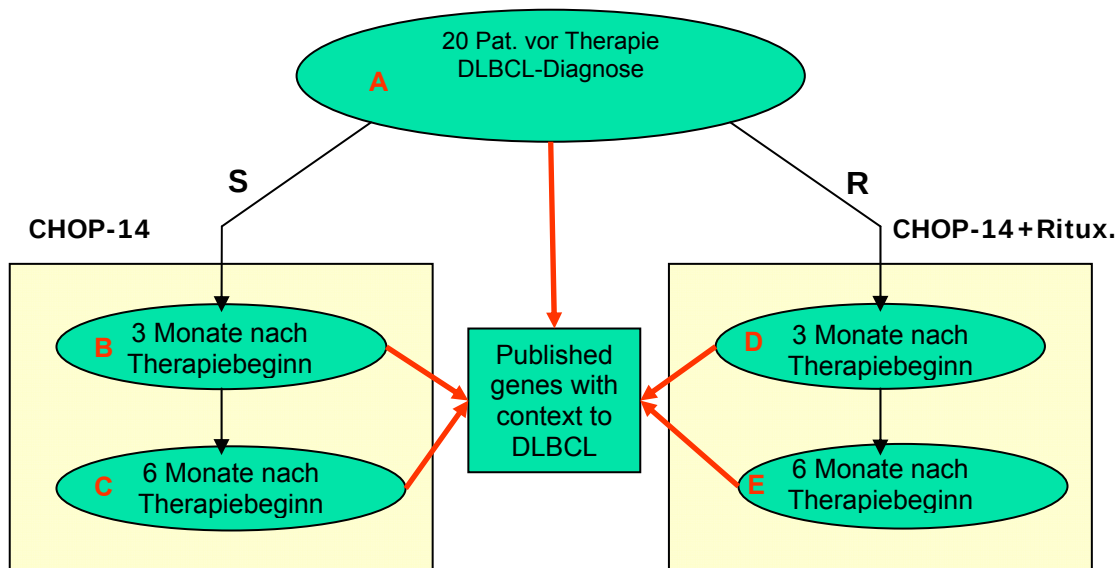


Abbildung 4: Schema zur Einteilung der Patienten in die beiden Therapiearme

Anschließende Arbeiten könnten eine Identifikation und molekulargenetische Charakterisierung von Antigenen, die bei DLBCL exprimiert werden, zum Ziel haben. Auch eine Analyse des Expressionsspektrums dieser DLBCL-Antigene und Vergleiche mit anderen Lymphomen, maligne entarteten und normalen menschlichen Geweben wären in folgenden Arbeiten möglich.

Zur Analyse einer eventuell auftretenden Rituximab-induzierten Immunantwort wird die von Pfreundschuh und Mitarbeitern etablierte SEREX-Methode (SErological identification of antigens by Recombinant EXpression cloning) herangezogen.

IV. Patienten, Material und Methoden

1. Patienten: Aufnahmekriterien

Die Auswahl der Patienten resultierte aus folgenden Ausschlusskriterien: Es wurden nur solche Patienten aus der RECOVER-Studie der Deutschen Studiengruppe Non-Hodgkin-Lymphome ausgesucht, bei denen ein Follow-up nach ungefähr 3 und nach ungefähr 6 bis 9 Monaten sichergestellt war. Des Weiteren wurde darauf geachtet, dass die Zahl der männlichen und weiblichen Patientenseren in etwa gleich war. Es wurden Seren von Patienten mit unterschiedlichen Diagnosen und unterschiedlichen Therapien gewählt: Behandlung ausschließlich mit Chemotherapie bzw. mit einer Kombination aus Chemotherapie und Rituximab. Ansonsten wurde keine weitere Vorauswahl getroffen, es wurden keine matched-pairs gebildet.

Nach der Auswahl wurden die Seren im Sinne einer Doppelblindstudie randomisiert.

2. Material

2.1. Autoantigene

Das Screening allogener Seren wurde mit folgenden in *E.coli* exprimierten Autoantigenen durchgeführt.

Tabelle 5: verwendete Gene

Gen	AccNo	Quelle	Länge des kodierenden Bereichs	sense-Primer	antisense-Primer	Annealing-temperatur
BCL2	L21667	RZPD	617	5'- GGAATTCCA TGGCGCAC GCTGGGAG A-3'	5'- GCTCGAGG CCCAGACTC ACATCACC- 3'	59°C
BCL6	BC142705	Testis-bank	2120	5'- GCAATTGGA TGGCCTCG CCGGCTGA C-3'	5'- GCTCGAGG CAGGCTTTG GGGAGCTC- 3'	61°C

CD 20	M27394 J03547	Lymphom- bank	893	5'- GCAATTGGA TGACAACAC CCAGAAATT -3'	5'- GCTCGAGA GGAGAGCT GTCATTTTC- 3'	51°C
LM02	NM_005574	Plazenta- Gewebe	476	5'- GGAATTCCA TGTCCTCG GCCATCGA A-3'	5'- GCTCGAGTA TCATCCCAT TGATCTT-3'	51°C
PDE4B	L20971	Testis- Gewebe	1694	5'- GGGAATTCA ATGAAGGA GCACGGGG GCACC-3'	5'- CTCGAGTGT ATCCACGGG GGACTTGTC -3'	59°C
Cyclin D2	AF518005	Testis- Gewebe	869	5'- GGAATTCCA TGGAGCTG CTGTGCCA C-3'	5'- GCTCGAGCA GGTCGATAT CCCGCAC-3'	58°C
Actinin, α1	NM_001102	RZPD	2678	5'- GGAATTCCA TGGACCATT ATGATTCT- 3'	5'- GCTCGAGGT CACTCTCGC CGTACAG-3'	50°C
SCYA3	BC071834	RZPD	278	5'- GGAATTCCA TGCAAGTCT CCACTGCT- 3'	5'- GCTCGAGG GCACTCAGC TCCAGGTC- 3'	54°C
PKC β2	X07109	RZPD	2021	5'- GGCAATTG CATGGCTG ACCGGCT GCGGGG-3'	5'- CTCGAGGCT CTTGACTTC GGGTTTTAA AAATTC -3'	50°C
E2IG3	AF191018	Testis- Gewebe	1649	5'- GCAATTGGA TGAAAAGG CCTAAGTTA -3'	5'- GCTCGAGCA CATAATCTG TACTGAA-3'	50°C
HGAL	AF521911	B-Zell- Lymphom- linie	536	5'- GGGAATTC GATGGGAA ATTCTCTGC TGAGA-3'	5'- CTCGAGTAA ATGGGAAAA CTGAGTC-3'	51°C

RZPD = Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung Berlin

2.2. Seren

Die Seren von gesunden Spendern wurden in Zusammenarbeit mit der Universitätsklinik Homburg, Saar gesammelt.

Die Patientenseren stammten aus der Deutschen Studiengruppe Non-Hodgkin-Lymphome.

3. Methoden

3.1. RNA-Extraktion aus Zellkulturen und Geweben

Die RNA-Extraktion wurde mit dem RNeasy-Kit von Qiagen vorgenommen. Dabei erfolgt der Zellaufschluss mit Hilfe eines denaturierenden Guanidinisothiocyanat (GITC) enthaltenden Puffers. Die RNA wird in einem nächsten Schritt an eine Silicagel-Membran gebunden und durch Zentrifugation, Waschen und Elution von den restlichen Substanzen abgetrennt.

Mit dem Messer zerkleinertes Gewebe oder 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen wurden mit 600 μ l RLT-Puffer, zu dem 10 μ l β -Mercaptoethanol pro ml Puffer hinzugefügt wurden, homogenisiert. Die Proben wurden 3 Minuten lang bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 600 μ l 70% Ethanol (RNase-frei) wurde der Ansatz durch Auf- und Abpipettieren gut vermischt. 700 μ l der Probe wurden nun auf eine RNeasy Mini Säule gegeben, welche zuvor in einem 2-ml-Eppendorfgefäß platziert wurde. (Dieser Schritt wurde 2 Mal durchgeführt, da insgesamt 1.200 μ l des Ansatzes zur Verfügung standen.) Das Gefäß wurde verschlossen und 15 Sekunden lang bei 13.000 rpm zentrifugiert, der Durchfluss wurde danach verworfen. Nach Zugabe von 700 μ l RW1-Puffer wurde erneut 15 Sekunden lang bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Überführen der Säule auf ein neues Auffanggefäß wurde die Zentrifugation nach Zugabe von 500 μ l RPE-Puffer wiederholt. Danach wurden ein weiteres Mal 500 μ l RPE-Puffer zugegeben, wobei nun 2 Minuten lang bei 13.000 rpm zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde verworfen und es wurde erneut 1 Minute lang bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die RNeasy-Säule wurde für die Elution auf ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, es wurden 50 μ l RNase-freies Wasser hinzugegeben und der Ansatz wurde 1 Minute lang bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss enthielt nun die isolierte RNA. Qualität und Konzentration der RNA lassen sich nach Auftrennung in einem MOPS-Gel durch Vergleich mit einem RNA-Standard bekannter Konzentration beurteilen.

3.2. Amplifikation der Targetgene mittels RT-PCR

3.2.1. Herstellung von cDNA aus mRNA

Mit dem Enzym Reverse Transkriptase lässt sich mRNA in cDNA umschreiben. Dabei dient die mRNA als Matritze, an die Primer angelagert und zu einer komplementären, einzelsträngigen DNA verlängert werden. Durch Verwendung eines polyT-Primers, der an den polyA-Schwanz der mRNAs bindet, wird dabei nur die mRNA, nicht jedoch tRNA oder rRNA aus der eingesetzten Gesamt-RNA (Extraktion: Kapitel 3.1.) in cDNA umgeschrieben. Eine Kontrolle der Integrität der synthetisierten cDNA wird mit Hilfe der PCR-Technik (Kapitel 3.2.2.) durchgeführt, indem das in den meisten Geweben konstitutiv und hoch-abundant exprimierte P53 („housekeeping gene“) aus der cDNA amplifiziert wird. Erhält man dabei in der PCR schon bei geringer Zyklenzahl eine deutliche P53-Bande im Agarosegel, so eignet sich eine solche cDNA für den weiteren Nachweis auch von weniger abundanten spezifische Transkripten.

Zur Herstellung der cDNA pipettiert man folgenden Ansatz:

Master-Mix: 4 µl 5xFirst Strand Synthesis Buffer

2 µl 100mM DTT

1 µl 10mM dNTPs

Auffüllen mit Aqua dest. auf 20 µl

Zuerst wurden 8 µl RNA mit 1 µl 50mM polyT(18)Primer (= dT18) für 5 Minuten bei 75°C inkubiert und der Ansatz wurde anschließend auf Eis gestellt. Dann wurden 10 µl des Master-Mix hinzugegeben und auf 42°C erwärmt. Es wurden 0,8 µl Reverse Transkriptase zugefügt und bei 42°C 1 Stunde lang inkubiert. Daraufhin erfolgte eine Denaturierung des Enzyms durch Erhitzen auf 70°C für 10 Minuten. Am Ende wurde die cDNA auf 4°C abgekühlt. Die so hergestellte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.2. Polymerasenkettenreaktion (PCR)

PCR-Untersuchungen wurden nach bekannten Standardprotokollen durchgeführt. Eine Etablierung der PCR auf die einzelnen Klone erfolgte dabei durch Variieren von Zyklenzahl und Annealingtemperatur. Der Prototyp des Ablaufes der PCR-Reaktion war dabei wie folgt:

1. 94°C/12 min (Taq-Polymerase aktivieren)

2. 94°C/1 min (Denaturierung)
3. 55-70°C/1 min (Annealingtemperatur abhängig vom GC-Gehalt der Primer, Annealingtemperatur und Primer s. Tabelle 5)
4. 72°C/1-2 min (Elongation; benötigte Zeit abhängig von der Länge des kodierenden Bereichs)
5. Wiederholung von Schritt 2 bis 4 für 35-40 Zyklen
6. Schritt: 72°C/9 min (Endelongation)
7. 4°C/∞

3.2.3. Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Für DNA-Gele wurde 1xTAE-Puffer mit 1-2% Agarose gekocht, nach Abkühlung auf etwa 60°C mit 0,05 % EtBr versetzt und in einen vorbereiteten Gelträger gegossen. Als Elektrophoresepuffer wurde 1xTAE-Puffer eingesetzt.

RNA-Gele wurden mit DEPC-Wasser gekocht. Vor dem Gießen wurden 10 % Formaldehyd und 10xMOPS zugesetzt, welches die Ausbildung von Sekundärstrukturen bei der einzelsträngigen RNA verhindert. Ethidiumbromid wurde dabei nicht direkt dem Gel, sondern dem entsprechenden RNA-Laufpuffer zugesetzt. Zur Elektrophorese wurden die Gele mit DNA/RNA-Proben beladen und die Nukleinsäuren bei 40-100 V in der Elektrophoresekommer aufgetrennt.

3.3. Klonierung von PCR-Produkten

Zur Herstellung von Expressionskonstrukten werden zunächst die zu analysierenden Gene oder Genfragmente mit der PCR-Technik (Kapitel 3.2.2.) amplifiziert und in TOPO-Vektoren eingebracht. Daraufhin werden die Plasmide in kompetente Bakterien transformiert. Dies und eine nachfolgende Plasmidpräparation ermöglichen schließlich die Selektion und Vermehrung der richtigen cDNA. Orientierung und Identität der einklonierten Inserts werden dabei über einen Insert-unabhängigen Restriktionsenzymverdau (3.3.5.) und durch Sequenzierung (3.3.6.) kontrolliert.

3.3.1. TOPO-Vektor

Zur Kontrolle und Sequenzierung werden die vervielfältigten, aufgereinigten und mittels Gelelektrophorese kontrollierten cDNA-Fragmente in einen TOPO-TA-Vektor eingebracht, einen unspezifischen Vektor mit T-Überhängen. In diesen kann das PCR-Produkt, welches mit A-Überhängen versehen ist, daraufhin eingefügt werden.

Dazu wurden 0,5 µl TOPO-Vektor zu 2 µl PCR-Produkt pipettiert und 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz konnte nun zur Transformation kompetenter Bakterien verwendet werden.

3.3.2. Transformation kompetenter Bakterien

E.coli Bakterien, die mit kaltem Kalziumchlorid (CaCl_2) behandelt und anschließend kurz erwärmt werden, sind in der Lage Plasmid-DNA aufzunehmen [Cohen and Chang 1973]. Auf diese Weise gelingt es, Plasmide zur Expression in prokaryontische Zellen einzuschleusen oder durch Expansion des entsprechenden Bakterienklons massiv zu vermehren. Transformierte Bakterien werden dazu auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Unter Selektion aufwachsende Kolonien werden daraufhin gepickt und bezüglich des im Plasmid enthaltenen Inserts analysiert. Dies erfolgt mittels Plasmidpräparation in Form von TENS-Minis, Restriktionsenzymverdau und Sequenzierung zur Überprüfung der Identität des Inserts.

100 µl kompetente Bakterien wurden mit 1-3 µg Ligationsansatz oder Plasmid 30 Minuten auf Eis gestellt. Nach Erwärmung bei 42°C für 90 Sekunden und direkter Abkühlung (4°C) wurden 450 µl LB-Medium hinzugegeben und 1 h bei 37°C geschüttelt. 100-300 µl des Ansatzes wurden dann auf Agarplatten mit Antibiotikum zur Selektion ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.3.3. Plasmid-Präparationen

Die verschiedenen Verfahren der Plasmid-Präparationen dienen dazu, Plasmid-DNA ohne Anteile von RNA oder chromosomaler DNA aus den Bakterien zu isolieren und

diese so für die weiteren Verfahren wie Restriktionsenzymverdau, PCR oder Sequenzierung zur Verfügung zu haben. Dabei unterscheiden sich die Präparationen in Ausbeute und Reinheit der gewonnenen Plasmid-DNA.

3.3.4. TENS-Minis

Die TENS-Mini-Präparation ist eine schnelle Methode, bei der jedoch die erhaltene Plasmid-DNA eine geringe Reinheit aufweist und deshalb für die Sequenzierung nur bedingt geeignet ist.

Eine einzelne Bakterienkolonie, die mit einem das gewünschte Insert tragenden Konstrukt transformiert wurde, wurde über Nacht in 3 ml LB-Selektionsmedium bei 37°C auf einem Schüttler kultiviert. Es wurden 1,5 ml der Kultur entnommen und 20 Sekunden lang bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 50 – 100 µl abpipettiert. Danach wurden ca. 20 µl P1-Puffer + RNase zugegeben und der Ansatz wurde mittels Vortex vermischt. Nach Zugabe von 300 µl TENS-Puffer wurde erneut ca. 5 Sekunden lang mit dem Vortex gemischt. Daraufhin wurden 150 µl 3 M NaOAc mit einem pH von 5,2 zugegeben, dann wurde erst für 5 Sekunden gevortext und anschließend 4 Minuten lang bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand, welcher die DNA enthält, wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und es wurde 1 ml 95 % Ethanol (Temperatur von -20°C) hinzugefügt. Der Ansatz wurde gemischt und 5 Minuten lang bei 13.000 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet in 1 ml 70% Ethanol (-20°C) gewaschen, indem 2 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert wurde. Ethanol wurde abgegossen und das Pellet an der Luft getrocknet und anschließend in 20 µl Aqua dest. resuspendiert.

3.3.5. Restriktionsenzymverdau von DNA-Konstrukten

Der Restriktionsenzymverdau der Konstrukte ermöglicht eine Kontrolle der Aufnahme des Inserts in den Vektor. Dazu werden Restriktionsenzyme verwendet, die jeweils nur einmal auf beiden Seiten des Inserts in der MCS des Plasmids, in die das Insert einkloniert wurde, schneiden. Man erhält so - sofern keine interne Schnittstelle im Insert vorliegt - beim Auftragen auf ein Agarosegel eine Bande, die dem Plasmid - in

diesem Fall dem TOPO-Vektor - entspricht und eine zweite, die das Insert darstellt. Über einen mitlaufenden Längenmarker ist dann eine Längenbestimmung der Fragmente möglich. Enthält das Insert interne Schnittstellen, so dass man ein, zwei oder mehrere Insertfragmente erhält, entspricht die Insertlänge der Summe der einzelnen Fragmente. Zusätzlich lässt sich über die Verwendung mehrerer Enzyme eine Kartierung des Inserts durchführen, die es später ermöglicht, optimal große Fragmente - zum Beispiel für die Herstellung einer Sonde - aus dem Insert herauszuschneiden. Als grundlegende molekularbiologische Methode findet der Restriktionsenzymverdau außerdem Anwendung bei der Klonierung von DNA-Konstrukten. Über die Verwendung verschiedener Restriktionsenzyme können beliebige DNA-Fragmente ausgeschnitten und in die entsprechend vorgeschnittenen Vektoren eingefügt werden.

Zur Durchführung eines Verdau wurde in einem geeigneten Volumen (20-50 µl) die zu verdauende Menge DNA mit dem zum Restriktionsenzym passenden Puffer angesetzt. Nach Zusatz der/des Restriktionsenzyme(s) erfolgte dann der Verdau bei 37°C für 1,5-2,5 Stunden (je nach DNA-Menge). Die optimale Funktionsfähigkeit des Restriktionsenzym wurde bei einer Konzentration von 1-2 U Enzym pro µg DNA erreicht.

Zum Verdau der TOPO-Klone wurde das Restriktionsenzym EcoRI verwendet.

Der Restriktionsenzymverdau wurde mittels Gelelektrophorese (3.2.3.) überprüft.

3.3.6. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der Klone erfolgte nach der Didesoxynukleotidmethode, die erstmals von Sanger beschrieben wurde [Sanger et al. 1977].

Diese Methode basiert darauf, dass 2',3'-Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) zwar über ihre 5'-Triphosphatgruppe in eine neue Nukleinsäurekette eingebaut werden können, eine weitere Verlängerung der Kette jedoch aufgrund des Fehlens der OH-Gruppe in 3'-Position der Desoxyribose nicht möglich ist und es so zum Kettenabbruch kommt („Stopnukleotide“). Erstellt man nun einen Reaktionsansatz aus zu sequenzierendem Template, Primer, DNA-Polymerase, ddNTPs und

Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs), kommt es bei einer geeigneten Temperatur zunächst zur Anlagerung des Primers an die komplementäre Region des Templates („Annealing“). Anschließend erfolgt durch die DNA-Polymerase ein Anbau von dNTPs am 3'-Ende des Primers mit Verlängerung der Kette; bei Einbau eines ddNTPs kommt es jedoch zum Kettenabbruch. Über das Verhältnis von ddNTPs zu dNTPs kann man die Wahrscheinlichkeit des Abbruchs einer in der Verlängerung befindlichen Kette beeinflussen. Man erhält deshalb durch exakte Einhaltung eines definierten Verhältnisses von dNTPs zu ddNTPs am Ende der Reaktion ein Gemisch aus vielen verschiedenen Oligonukleotiden, die sich in ihrer Länge jeweils um genau eine Base unterscheiden, da für jede Position dieselbe Wahrscheinlichkeit eines Kettenabbruches besteht. Durch Verwendung fluoreszenzmarkierter Primer lässt sich dann, nach Auftrennung des Reaktionsgemisches in einer hochauflösenden Gelelektrophorese, die genaue Nukleinsäuresequenz ermitteln.

Nachdem durch Sequenzierung sichergestellt wurde, dass die TOPO-Klone die gewollten Inserts enthalten, wurden diese mit Hilfe eines Restriktionsenzymverdaus (3.3.5) isoliert. Dazu wurden die Enzyme EcoRI und XhoI bzw. die kompatiblen Enzyme MnlI und Sall verwendet.

Daraufhin erfolgte eine Aufreinigung des spezifischen Restriktionsenzymverdaus mittels Gelelektrophorese (3.2.3.) Dazu wurde ein DNA and Gel Purification Kit von Amersham Biosciences verwendet. Dabei wurden die entstandenen Gen-Fragment-Banden ausgeschnitten, mit Capture Puffer vollständig bedeckt und bei 60°C aufgelöst. Nach einem kurzen Spin down wurde der Ansatz auf eine Säule gegeben und nach Ablauf einer Minute eine Minute lang bei 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von 500 µl Waschpuffer wurde nach einer Minute erneut eine Minute lang bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und es wurde TE-Puffer oder Aqua dest dazupipettiert. Nach Ablauf einer Minute wurde eine Minute lang bei 13.000 rpm zentrifugiert.

Damit waren die Gen-Fragmente bereit zur Ligation in Phagen.

3.3.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 ist in der Lage, DNA-Moleküle mit kompatiblen kohäsiven Enden miteinander zu verbinden, indem sie die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen freien 3'-Hydroxyl und 5'-Phosphat Enden der DNA katalysiert [Richardson et al. 1968]. Über Restriktionsenzyme erzeugte kompatible Enden können so miteinander verknüpft werden, so dass die gezielte Herstellung von DNA-Konstrukten möglich ist.

Zur Ligation pipettiert man folgenden Ansatz:

2 µg geschnittene Vektor-DNA
4 µg geschnittene Insert-DNA
1 µl T4 Ligase 10xPuffer
1 µl T4 DNA-Ligase
ad 10 µl H₂O

Man inkubiert 12-16 h bei 14°C und kann die Ligation dann zur Phagenverpackung (oder zur Transformation kompetenter Bakterien) verwenden.

3.3.8. Phagenverpackung

Um die Phagen-DNA-Konstrukte in Bakterien einbringen zu können, müssen sie erst in Phagenköpfe verpackt werden.

Dazu wurde 1 µl Ligationsansatz (Ligation in Phage) zu 1 Verpackungsansatz (dieser entspricht den Phagenköpfen) (~50 µl) pipettiert und 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 300 µl SM-Puffer (dieser stoppt die Reaktion und verdünnt den Ansatz) und 1-2 Tropfen Chloroform hinzugefügt (dadurch fallen überschüssige Hüllproteine aus). Vor Gebrauch wurde der Ansatz ca. 1 Minute bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Danach wurden *E.coli* Bakterien, welche die Phagen aufnehmen sollen (in diesem Fall XL1-Mg²⁺-Bakterien), mit den Phagen transfiziert. Je 600 µl dieses Ansatzes wurden nun auf LB-Platten ausplattiert.

Da die Phagenköpfe erst nach der Amplifikation stabil sind, müssen Verpackung und Ausplattieren am selben Tag stattfinden.

3.3.9. Platteneluat

Die Klone, die das richtige Insert enthielten, wurden auf einer neuen Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Durch Elution der Phagenplatten mit 7 ml SM-Puffer für 4 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler diffundierten die Phagen ins flüssige Medium, das nach Ablauf der Zeit in ein Falcon überführt wurde. Die Phagen wurden von Zelltrümmern mittels Zentrifugation bei 4000 rpm getrennt. Der Überstand wurde in ein neues Falcon überführt und mit Chloroform versetzt, um das Wachsen neuer Bakterien zu verhindern. Der Überstand stellte das Material für das folgende Screening dar.

3.3.10. Kontrolle

Vor dem Platteneluat wird eine Überprüfung des Inserts bezüglich des Leserahmens vorgenommen. Dazu werden nach der Phagenverpackung einzelne Phagenklone gepickt und mittels in-vivo-Excision in Phagemide umgewandelt.

3.3.10.1. In-Vivo-Excision

Durch die In-Vivo-Excision [Short et al. 1988] ist es möglich, den filamentären, 39 kB großen Lambda-ZAP-Express-Vektor, in den die cDNA einkloniert wurde, mit Hilfe eines Helferphagen in das nur noch 4518 bp große, zirkuläre pBK-CMV Phagemid umzuwandeln, welches dann die entsprechenden Inserts enthält. Dies geschieht durch Koinfektion eines *E.coli*-Stammes mit dem ZAP-Express-Vektor und einem Helferphagen, dessen Proteine zunächst eine im ZAP-Vektor enthaltene DNA-Sequenz erkennen (Initiator) und dort einen der beiden DNA-Stränge schneiden. Von hier erfolgt eine Replikation der DNA nach 3' bis zu einer von Helferphagenproteinen erkannten Terminationsstelle, an der die Replikation dann abbricht. Die so erhaltene DNA, die alle für das pBK-CMV-Phagemid notwendigen Sequenzen sowie die klonierten Inserts enthält, wird dann durch ein weiteres Helferphagenprotein zirkularisiert und kann mit den unter 3.3.3. geschilderten Verfahren der Plasmid-Präparationen aus den entsprechenden Bakterienstämmen gewonnen werden. Der Vorteil in der weiteren Verwendung des pBK-CMV-Phagemids liegt in der geringeren

Größe, welche sowohl die Replikation in bakteriellen Wirtszellen, als auch die verschiedenen Verfahren der Plasmid-Präparationen und die daran anschließenden Arbeitsschritte erleichtert. Außerdem ist mit ihm eine Expression von Genen sowohl im eukaryontischen, als auch im prokaryontischen System möglich.

Die Durchführung der In-Vivo-Excision erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers des verwendeten ZAP Express® cDNA Synthesis Kit (Stratagene; La Jolla; US).

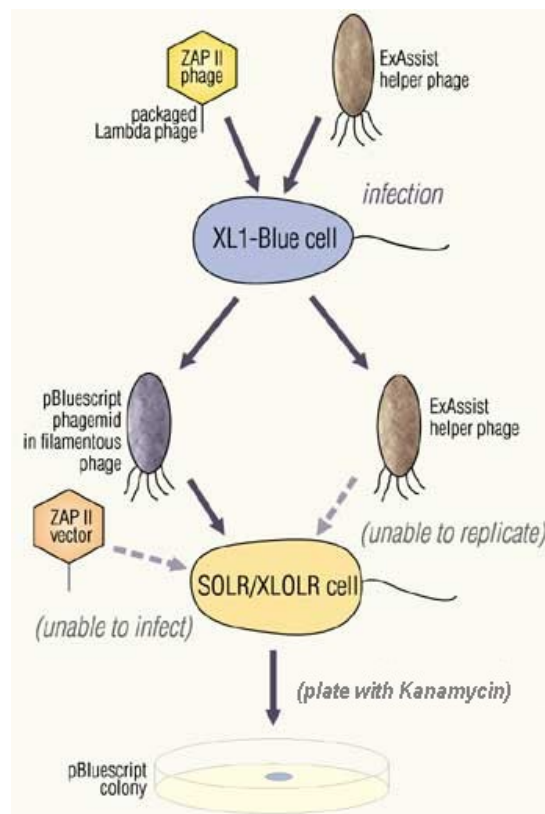


Abbildung 5: In-Vivo-Excision

Die Phagemide wurden erneut in Bakterien eingebracht, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Insert-Gene wurden erneut mittels TENS-Minis, Restriktionsenzymverdau und Gelelektrophorese aus den Phagemiden isoliert und sequenziert. Dabei wurde die Richtigkeit des Leserahmens überprüft. War dieser korrekt, konnte das Platteneluat durchgeführt werden.

3.4. Das immunologische Screening: SEREX

3.4.1. Vorbereitung der Patientenseren

Da *Escherichia coli*-Bakterien, in denen die Proteine zum Screening exprimiert werden, zu den physiologischen Bewohnern des menschlichen Gastrointestinaltraktes gehören, ist es notwendig, die in zum Screening verwendeten Seren vorhandenen Antikörper gegen *E.coli* herauszufiltern, um die Anzahl falsch positiver Klone und den Gesamthintergrund der enzymatischen Entwicklungsreaktion zu minimieren. Eine Aufreinigung der Patientenseren erfolgt deshalb durch Präabsorption der Seren gegen *E.coli*-Proteine über Affinitätssäulen und lytische Folien.

3.4.1.1. Präabsorption über Affinitätssäulen

Zur Herstellung mechanischer Säulen löst man das Pellet einer über Nacht aufgewachsenen 50 ml XL1-Blue-Kultur in 5 ml PBS und sonifiziert die Lösung zur Zerstörung der Bakterienwände 5x8 Sekunden.

Transfiziert man außerdem einen Teil der über Nacht aufgewachsenen Bakterienkultur mit nicht-rekombinanten lytischen Phagen, erhält man nach Sonifikation eine Suspension, in der nicht nur Proteine des normalen *E.coli*-Stoffwechsels enthalten sind, sondern auch *E.coli*-Stressproteine, sowie Proteine filamentärer Phagen gegen die dann eine Vorabsorption erfolgen kann (lytische Säulen).

Hierzu wurde das Pellet einer Bakterienkultur in 5 ml LB-Tetracyclin-Medium gelöst, mit 500 µl einer Phagenlösung transfiziert und nach einer Inkubation von 4 h/37°C auf einem Horizontalschüttler mit den in weiteren 5 ml LB-Tet-Medium aufgenommenen restlichen Bakterien der Kultur, inkubiert. Nach nochmaliger Inkubation (2 h/37°C) konnte diese lytische Bakterienlösung sonifiziert werden.

Mit beiden Bakterienansätzen wurden Glutardialdehyd-aktivierte Silikamatrices durch Inkubation (4 h/RT) auf einem Überkopfroter beladen. Nach Abwaschen der überschüssigen Bakteriensuspension mit 100 ml TBS wurden Säulen mit diesen Matrices bestückt.

Zur Aufreinigung wurden die Seren 1:100 in TBS verdünnt und dann jeweils 8 h über eine mechanische und eine lytische Säule geführt.

3.4.1.2. Präabsorption über lytische Folien

Zur Herstellung lytischer Folien wurden 600 µl einer XL1-Blue Arbeitslösung mit nicht-rekombinantem Lambda-ZAP II Phagen transfiziert und dieser Ansatz auf LB-Platten ausplattiert. Die in Form von lytischen Plaques exprimierten Proteine wurden dann wie unter 3.4.3.1. beschrieben auf Nitrocellulosefolie geblottet und mit 5 % Magermilch geblockt.

Über Säulen präabsorbierte Seren wurden jeweils 4 Stunden mit insgesamt 4 Nitrocellulosefolien bei 4°C inkubiert und dann für den weiteren Screeningeeinsatz mit 0,1 % Magermilch / 0,1 % Natriumacid in TBS auf eine Endkonzentration von 1:100 verdünnt.

3.4.2. Präparation der bakteriellen Wirtszellen

3.4.2.1. Vorbereitung der Bakterien für die Transfektion mit Phagen

XL1-Blue Bakterien wurden auf LB-Tet-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C aufwachsen gelassen. Mit einer der aufgewachsenen Kolonien wurde eine 50ml Kultur angeimpft (LB-Tet-Medium mit Magnesiumsulfat 2,5 ml/0,2 M und Maltose 2,5 ml/10 %). Nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (= OD (optische Dichte) von 0,5-0,6 bei $\lambda=600$ nm) wurden die Bakterien pelletiert (RT/10 min/1800 rpm), in Magnesiumsulfat 0,01 M auf eine OD von 0,5 eingestellt und für Transfektionen mit Phagen benutzt (XL1-Blue Arbeitslösung).

3.4.3. Das Screening

3.4.3.1. Transfektion der Bakterien und Blotten der exprimierten Proteine

Zur Transfektion wurden 600 µl einer XL1-Blue Arbeitslösung mit 3000 bis 4000 pfu Phagen aus der cDNA-Expressionsbank gemischt, der Transfektionsansatz bei 37°C/15 min inkubiert und dann in 5 ml flüssigem Top-Agar (50°C) auf vorgewärmte

LB-Tetracyclin-Platten unter Zugabe von IPTG (20 μ l/2 M) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, wobei 1-2 mm große lytische Plaques entstanden, welche klonal angereichert die von den Bakterien exprimierten Proteine enthielten. Durch Auflegen einer Nitrocellulosefolie und anschließende Inkubation bei 37°C/1,5 h erfolgte dann das Blotten der Proteine auf die Nitrocellulosefolie.

3.4.3.2. Waschen und Blocken der Nitrocellulosefolien

Bevor die Nitrocellulosefolien nun mit Patientenserum inkubiert werden konnten, mussten unspezifische Bindungen geblockt werden. Dazu wurden die Nitrocellulosefolien abgenommen und nach sorgfältigem Freiwaschen von Agarresten durch Abstreifen mit TBS-T für 1 h in 5%iger Milch/TBS geblockt. Auch danach erfolgte wieder sorgfältiges Abstreifen und Waschen auf einem Horizontalschüttler für 3x15 min in TBS, bevor die Folien mit Serum ausgetestet werden konnten.

3.4.3.3. Inkubation mit allogenen Seren und Detektion gebundener Antikörper

Die Nitrocellulosefolien wurden in Petrischalen ausgelegt und mit jeweils 20 ml des vorbehandelten Serums (Kapitel 3.4.1.) überschichtet. Während der über Nacht erfolgten Inkubation bei 4°C banden die im Serum vorhandenen Antikörper an die auf die Folien geblotteten rekombinanten Proteine. Eine Detektion der spezifisch gebundenen Antikörper erfolgte nach extensivem Waschen der Folien (3x15 min/TBS) mit Hilfe eines sekundären, gegen das Fc-Fragment der Serumantikörper gerichteten Antikörpers (anti-human-IgG, AP konjugiert), der für eine Stunde 1:2500fach in 0,5 % Milch /TBS verdünnt mit den Folien inkubiert wurde. Nach erneutem Waschen der Folien wurden die gebundenen Antikörperkomplexe über die an den sekundären Antikörper konjugierte alkalische Phosphatase (AP) sichtbar gemacht. Bei dieser enzymatischen Farbreaktion wandelt das Enzym die Substrate 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP) und Nitroblue-Tetrazoliumchlorid (NBT) im alkalischen Milieu in farbige Reaktionsprodukte um, die an der Stelle der Antikörperbindung präzipitieren. Dazu wurden 15 ml Substrat enthaltende alkalische Entwicklerlösung (CDS mit 10 mg/100 ml NBT und 5 mg/100 ml BCIP) auf die Folien

gegeben. Anschließend wurde unter Lichtschutz entwickelt bis gut sichtbare Reaktionen entstanden.

3.4.3.4. Testauswertung

Als primär positiv wurden solche Klone gewertet, die sich in der Intensität der Farbreaktion auf der Nitrocellulosefolie deutlich von den umliegenden Klonen unterschieden.

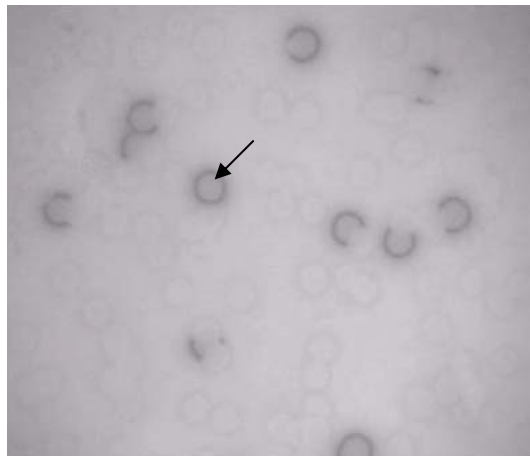


Abbildung 6: Beispiel für SEREX: Der positive Klon ergibt ein deutlich sichtbares Signal; die schwachen Signale repräsentieren Hintergrundfärbung.

4. Reagenzien

λ-ZAP-Express Phage	Stratagene, Cedar Creek, Canada
Agarose für DNA-Elektrophorese	Sigma, St. Louis
Anti-human-IgG-Fc, AP-konjugiert	Dianova, Hamburg
Bitek-Agar	Difco, Detroit
Chloroform	Merck, Darmstadt
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
DNA and Gel Purification Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
Ethanol	Merck, Darmstadt
5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP)	Biomol, Hamburg
Glutardialdehyd-aktivierte Silicamatrix	Boehringer, Mannheim

Gelatine	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Biomol, Hamburg
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt
Maltose	Sigma, St. Louis
MOPS	Sigma, St. Louis
NaN ₃	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Nitroblue-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Biomol, Hamburg
Nitrozellulosefolie	Sartorius, Göttingen
Phagenklone	RZPD, Berlin
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
Tetrazyklin	Boehringer, Mannheim
Thimerosal	Sigma-Aldrich, Diesenhofen
TOPO-Kit	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien
Trishydrochlorid (TrisHCL)	Sigma, St. Louis
Trishydroxymethylaminomethan (TrisBase)	Sigma, St. Louis
Yeast-Extract	Difco, Detroit

5. Puffer und Medien

CDS:

- 5,8 g NaCl
- 1 g MgCl₂
- 12,1 g TrisBase
- ad 1 l Aqua dest.
- pH auf 9,5 einstellen

Luria-Bertoni (LB)-Medium:

- 10 g Trypton
- 5 g Yeast-Extract

10 g NaCl
- ad 1 l Aqua dest.

LB-Agar:

10 g Trypton
5 g Yeast-Extract
10 g NaCl
15 g Agar
- ad 1 l Aqua dest.
- autoklavieren
- nach Abkühlung auf etwa 50°C und Zugabe von Tetrazyklin in Petrischalen gießen

LB-Medium:

10 g Trypton
5 g Yeast-Extract
10 g NaCl
- ad 1 l Aqua dest.
- autoklavieren

LB-Komplett:

45 ml LB-Medium autoklaviert
2,5 ml MgSO₄ 0,2 M (sterilfiltriert)
2,5 ml Maltose 10% (sterilfiltriert)
62 µl Tetrazyklin
eine Kolonie Bakterien

MOPS-10x-Stammlösung:

42,8 g MOPS
6,8 g Na-Acetat
3,7 g EDTA
- ad 1 l Aqua dest.
- einstellen auf pH 7,0

PBS-Lösung:

8 g NaCl

0,2 g KCl

1,44 g Na₂HPO₄

0,24 g KH₂PO₄

- ad 800 ml Aqua dest.

⇒ ergibt 1l Lösung, sterilisieren

SM-Phagenpuffer:

5,8 g NaCl

2 g MgSO₄-Heptahydrat

50 ml Tris 1M pH 7,5

5 ml 2% Gelatine

- ad 1 l Aqua dest.

TBS-10x-Stammlösung:

87,8 g NaCl

60,0 g TrisHCl

14,0 g TrisBase

- ad 1 l Aqua dest.

TBS-T-10x-Stammlösung:

87,8 g NaCl

60,0 g TrisHCl

14,0 g TrisBase

5 ml Tween 20

- ad 1 l Aqua dest.

Top-Agar:

500 ml LB-Medium autoklaviert

2 g Agar

2 g Agarose

V. Ergebnisse

1. Untersuchtes Patientenkollektiv

Entsprechend der Auswahlkriterien wurden insgesamt 23 Patienten der RECOVER-Studie der Deutschen Studiengruppe Non-Hodgkin-Lymphome ausgewählt. Dabei wurden 11 Patienten dem S-Arm zugeordnet, welche somit eine CHOP-Therapie erhielten, und 13 Patienten dem R-Arm. Diese erhielten eine Kombinationstherapie aus CHOP und Rituximab.

Dabei wurden beiden Therapiearmen je 2 Patienten mit Follikulärem Lymphom und 9 bzw. 11 Patienten mit DLBCL zugeteilt. Tabelle 6 zeigt die den jeweiligen Therapiearmen zugehörigen Patienten mit Diagnose und Remissionsstatus zum Zeitpunkt der letzten Untersuchung.

Tabelle 6: Patienten

	Leipzig-Nr	Remissions-status	Therapie	Diagnose
S-Arm	61	CRu	8x CHOP-14	Diffus großzellig B – centroblastisch
	89	CR	8x CHOP-14	Diffus großzellig B
	498	Pro	8x CHOP-14	Diffus großzellig B – centroblastisch
	515	CR	8x CHOP-14	Diffus großzellig B – centroblastisch
	552	CR	8x CHOP-14	Diffus großzellig B – anaplastisch-großzellig (ALC)
	803	CR, Rezidiv	8x CHOP-14	Diffus großzellig B – centroblastisch
	960	Pro	8x CHOP-14	Follikulär III° + DLBL
	100	CR	6x CHOP-14	Diffus großzellig B – centroblastisch
	569	CRu	6x CHOP-14	Follikulär III°
	1109	CR	6x CHOP-14	Diffus großzellig B – centroblastisch
	1311	CR	6x CHOP-14	Diffus großzellig B – centroblastisch
R-Arm	325	CRu, Rezidiv	8xCHOP-14 + 8x Rituximab	Diffus großzellig B
	400	CRu	8xCHOP-14 + 8x Rituximab	Follikulär III°
	982	CR	8xCHOP-14 + 8x Rituximab	Follikulär III°

	1292	CRu	8xCHOP-14 + 8x Rituximab	Kein Referenzurteil, lt. Rando Diffus großzellig B
	105	Rezidiv, Pro	6x CHOP-14 + 8x Rituximab	Diffus großzellig B – immunoblastisch
	113	Pro	6x CHOP-14 + 8x Rituximab	B-Zell-Reihe
	291	CRu	6x CHOP-14 + 8x Rituximab	Diffus großzellig B – centroblastisch
	345	CR	6x CHOP-14 + 8x Rituximab	Diffus großzellig B – anaplastisch-großzellig (ALC)
	467	CR	6x CHOP-14 + 8x Rituximab	Diffus großzellig B – centroblastisch
	600	CR	6x CHOP-14 + 8x Rituximab	Diffus großzellig B
	793	CRu	6x CHOP-14 + 8x Rituximab	Diffus großzellig B – centroblastisch
	1020	Rezidiv, Pro	6x CHOP-14 + 8x Rituximab	B-Zell-Reihe

2. Methodisches Vorgehen am Beispiel der PKC- β

Mit Hilfe der PCR-Technik ist es möglich, viele verschiedene Gewebe auf die Expression eines bestimmten Gens hin zu testen. Man schreibt dazu die mRNA eines Gewebes, die die Gesamtheit der in diesem Gewebe transkribierten Gene repräsentiert, mit Hilfe des Enzymes Reverse Transkriptase in cDNA um. Durch die Auswahl spezifischer Primer kann die Sequenz von Interesse durch PCR aus den cDNAs derjenigen Gene amplifiziert werden, die das entsprechende Transkript exprimieren.

Die PKC β -cDNA hat eine Länge von ca. 2000 bp und entstammt einer kommerziellen cDNA-Bank. Der PKC-Klon wurde als Einzelklon über das RZPD Berlin (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung Berlin) bezogen und als Template für die nachfolgende PCR-Reaktion benutzt.

Dabei wurden der sense-Primer 5'-GGCAATTG**CA**TGGCTGACCCGGCTGCGGGG-3' und der Antisense-Primer 5'-CTCGAGGCTCTTGACTTCGGGTTTTAAAAATTC-3' verwendet.

Beim Übergang vom β -Galactosidase-Gen des später zur Expression der PKC verwendeten λ -ZAP-Express-Phagen auf das PKC-Insert wäre das 3-Basenpaare-umfassende Leseraster beim Einfügen des Inserts um 1 Nukleotid verschoben und somit würde kein korrektes Fusionsprotein gebildet werden. Daher musste der sense-primer angepasst werden, um einen durchgehenden, korrekten Leserahmen zu garantieren. Dazu wurde ein Nukleotid hinzugefügt, wobei besonders darauf geachtet wurde, dass kein Stopp-Codon entsteht.

#1 #2 #3 A D F A A G
5'-GGC AAT TG **C ATG** GCT GAC CCG GCT GCG GGG-3'

#1: Schnittstelle des Restriktionsenzym *MunI*

#2: eingefügtes Nukleotid zur Korrektur des Leserahmens

#3: ATG = Start-Codon der pKC- β , Met, und Beginn der pKC-Sequenz

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur selektiven Anreicherung definierter Nukleinsäuresequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen. Man nutzt dazu die Eigenschaften von DNA-Polymerasen, die einen Einzelstrang zum DNA-Doppelstrang aufpolymerisieren können, sofern ihnen ein kurzer, doppelsträngiger Bereich als Primer zur Verfügung steht. Durch Zugabe von zwei Oligonukleotidprimern (sense und antisense), die zum 5'- bzw. 3'-Ende der zu amplifizierenden Sequenz komplementär sind, und durch die Verwendung thermostabiler DNA-Polymerasen [Saiki et al. 1988] ist eine automatisierte Durchführung der PCR in programmierbaren Thermoblocken möglich. Es kommt dabei in einem dreiteiligen, in Zyklen repetitierten Reaktionsprozess aus Denaturierung der DNA-Doppelstränge, Primeranlagerung und Kettenverlängerung zur exponentiellen Vermehrung der gewünschten Sequenzen. Einhergehend mit der so erzielten hohen Sensitivität der PCR besteht jedoch eine Anfälligkeit für Kontamination mit der Konsequenz falsch positiver Ergebnisse durch das Verschleppen von DNA in den Reaktionsansatz. Zur Kontaminationsprophylaxe sind daher UV-Bestrahlung von PCR-Arbeitsplätzen, Verwendung von Pipettenspitzen mit Filtereinsatz zum Schutz vor Aerosol-Kontamination und Vermeidung der Benutzung jeglicher DNA am PCR-Arbeitsplatz geeignet [Kwok and Higuchi 1989].

Nach erfolgter Reaktion wurden eine Kontrolle der PCR sowie eine Aufreinigung des Genmaterials mittels Gelelektrophorese durchgeführt (s. Abbildung 7). Dabei wandern größenabhängig negativ geladene Nukleinsäurefragmente unterschiedlich weit im elektrischen Feld. Durch die Verwendung von Ethidiumbromid (EtBr), einer sequenzunspezifisch mit Nukleinsäuren interkalierende Substanz, die bei Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda=300$ nm) Licht der Wellenlänge 590 nm emittiert, können die Nukleinsäuren sichtbar gemacht und bezüglich Reinheit, Größe und Konzentration beurteilt werden.

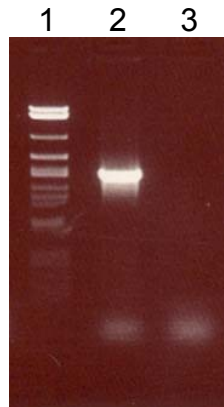


Abbildung 7: Gelelektrophorese zur PCR-Kontrolle; Spur 1: Längenmarker, Spur 2: PKC-PCR-Fragment, Spur 3: Negativkontrolle

Zur Kontrolle und Sequenzierung wurden die vervielfältigten, aufgereinigten und mittels Gelelektrophorese kontrollierten cDNA-Fragmente in einen TOPO-TA-Vektor eingebracht, in *E.coli* Bakterien transformiert und vervielfältigt. Um die PKC-enthaltenden TOPO-Plasmide nun der Sequenzierung zuzuführen, wurden sie nach Vermehrung wieder aus den *E.coli* Bakterien entfernt. Dies wurde mithilfe der Plasmid Mini Präparation (=TENS-Minis) durchgeführt (s. Abbildung 8). Nach einem Verdau mit der Restriktionsendonuclease EcoRI konnten rekombinante Klone identifiziert werden. Diese wurden durch Sequenzierung verifiziert.

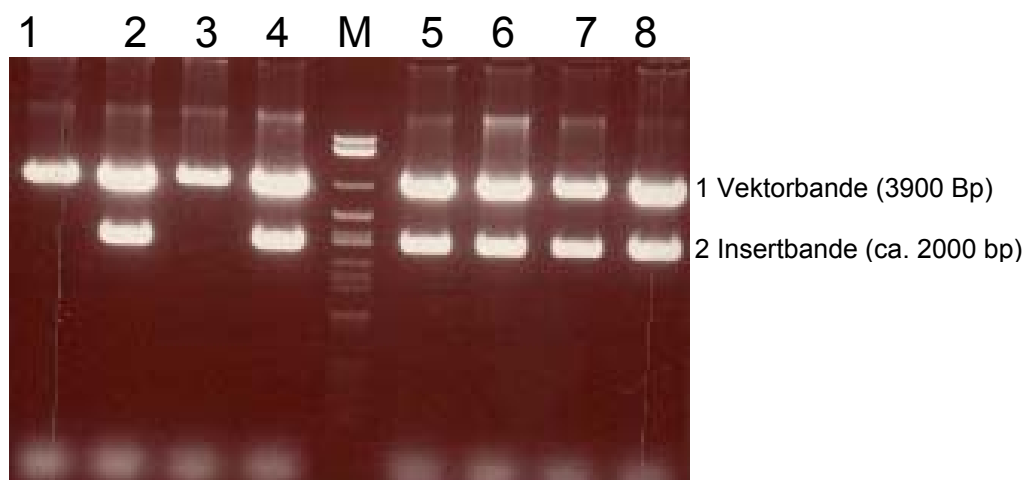


Abbildung 8: PKC-Plasmid-Präparation (TENS-Minis); Spur 2, 4, 5, 6, 7, 8: TOPO-Vektor + PKC-Bande = positive Klone, Spur 1, 3: ausschließlich TOPO-Vektor, PKC wurde hier nicht eingebaut

Nachdem die Sequenzierung ergab, dass die richtige PKC-Sequenz amplifiziert wurde, konnte PKC weiterverwendet werden.

Es wurden einige der positiven Klone (Spur 2, 4, 5 bis 8) ausgewählt und einem spezifischen Verdau zur Insertpräparation unterworfen. Dazu wurden die TOPO-Vektoren durch 2 spezifische Restriktionsenzyme (in diesem Fall MunI und XhoI) geschnitten und PKC wieder herausgetrennt, nun mit spezifischen Schnittstellen versehen. Der Ansatz wurde erneut per Gelelektrophorese aufgetrennt (s. Abbildung 9).

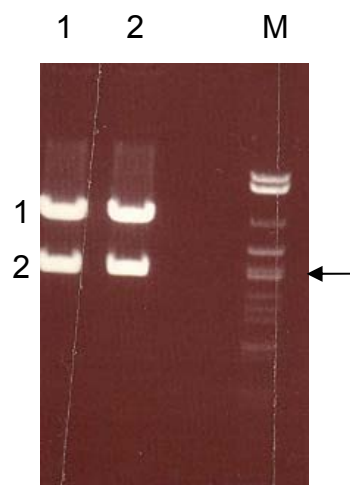


Abbildung 9: Insertpräparation: Entfernung des PKC-Fragmentes aus dem TOPO-Vektor; Bande 1: TOPO-Vektor, Bande 2: PKC-Fragment, der Pfeil markiert die 2000bp-Bande des Längenmarkers

Die PKC-Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Die Gelreinigung wurde erneut mittels Gelelektrophorese kontrolliert (s. Abbildung 10).

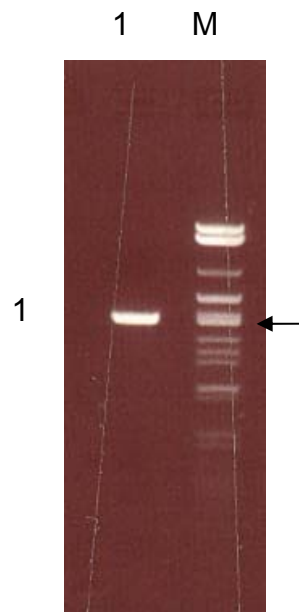


Abbildung 10: Überprüfung der Insertpräparation;
 Bande 1: aufgereinigtes PKC-Fragment, M: Längen-
 marker, der Pfeil markiert die 2000bp-Bande des
 Längenmarkers

Nun konnten die Ligation von PKC in λ -ZAP-Express-Phagen und die darauf folgende Phagen-Verpackung durchgeführt werden.

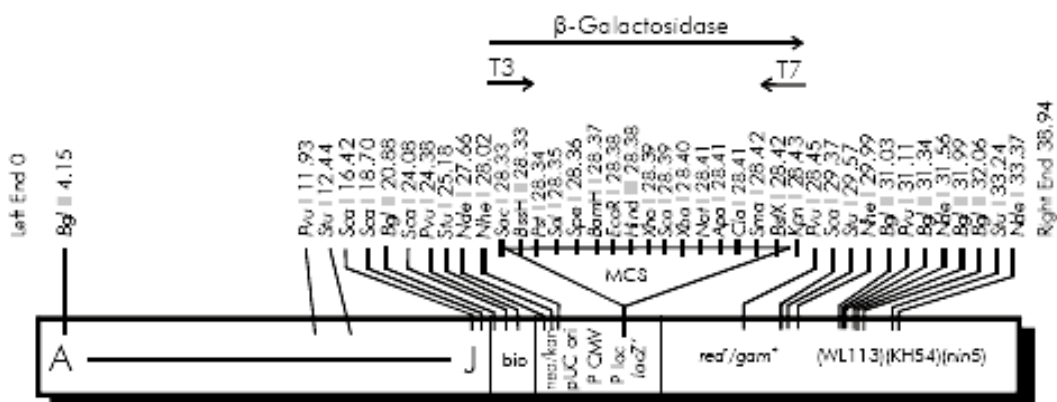


Abbildung 11: Vektorkarte des λ -ZAP-Express-Phagen

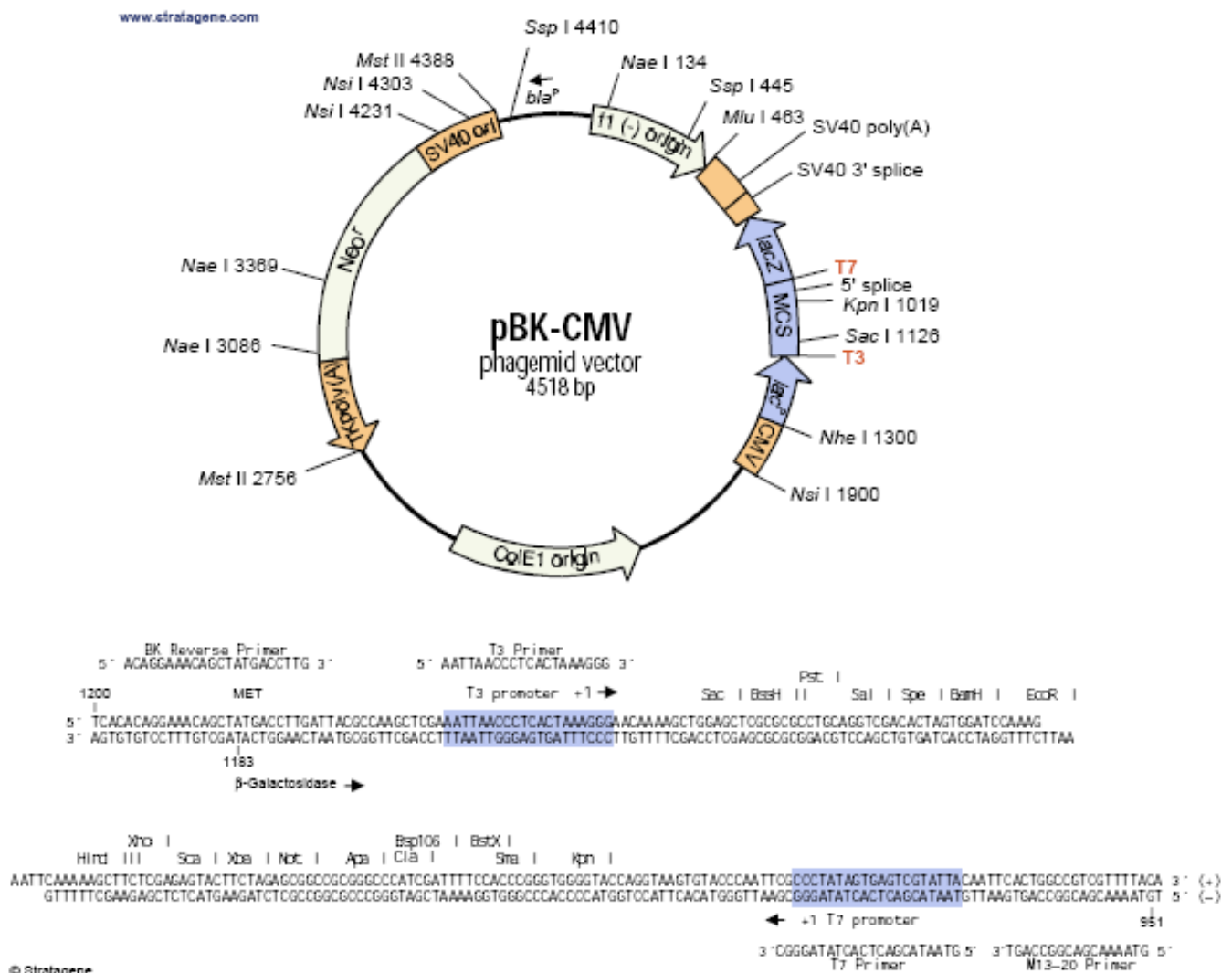


Abbildung 12: Ausschnitt aus der MCS des λ-ZAP-Express-Phagen

Danach wurden *E.coli* Bakterien mit dem Phagen transfiziert, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Es wurden unter Selektion gebildete Plaques gepickt und analysiert. Dies erfolgte mittels in-vivo-Excision (s. Abbildung 13), overnights, TENS Minis, erneutem Restriktionsenzymverbau und Sequenzierung zur Überprüfung des Inserts und des Leserahmens.

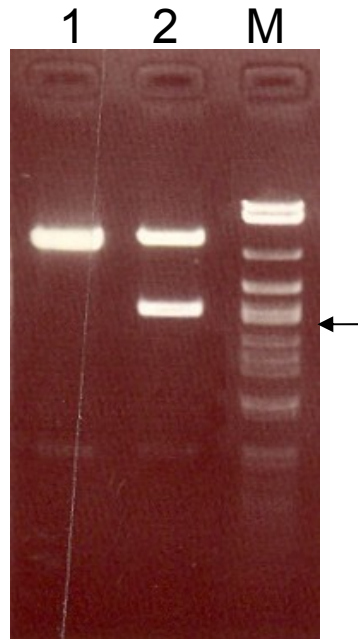


Abbildung 13: PKC-Plasmid-Präparation (TENS Minis) nach in-vivo-Excision; Spur 1: Leervektor, Spur 2: pKC-Klon, M: Längenmarker, der Pfeil markiert die 2000bp-Bande des Längenmarkers

Die Sequenzierung zeigte einen korrekten Leserahmenübergang aus der β -Galactosidase in die pKC- β und somit die Expression des gewünschten Fusionsproteins. Die entsprechenden Phagenklone konnten nach Amplifikation für das immunologische Screening verwendet werden.

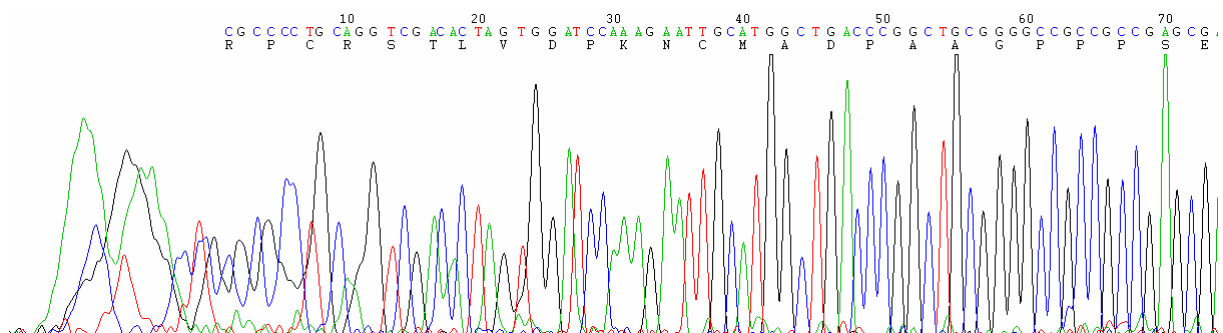


Abbildung 14: Sequenzierung des pKC-Plasmids nach in-vivo-Excision sowie die entsprechende Aminosäuresequenz.

3. SEREX

Die von Pfreundschuh und Mitarbeitern etablierte Methode des SEREX (Serological identification of antigens by Recombinant Expression cloning) [Sahin, Tureci et al. 1997] stellt eine serologische Methode dar, Tumorantigene allein aufgrund ihrer Immunogenität und der dadurch hervorgerufenen autologen humoralen Immunantwort molekular zu identifizieren. Dabei wird aus frischem Tumorbiosiematerial eine cDNA-Bibliothek hergestellt und direktional in einen λ -Phagen-Expressionsvektor kloniert. Durch lytische Transfektion von *Escherichia coli* mit den rekombinanten Phagen entstehen rekombinante Proteine in lytischen Plaques, die dann auf Nitrocellulose geblottet und anschließend mit verdünntem Patientenserum inkubiert werden. Klone, die mit IgG-Antikörpern der Patienten reagieren, können mit einem Enzym-konjugierten sekundären Antikörper gegen humanes IgG schließlich detektiert, durch weitere Subklonierungen isoliert und nach Überführung in die Plasmidform molekularbiologisch charakterisiert werden.

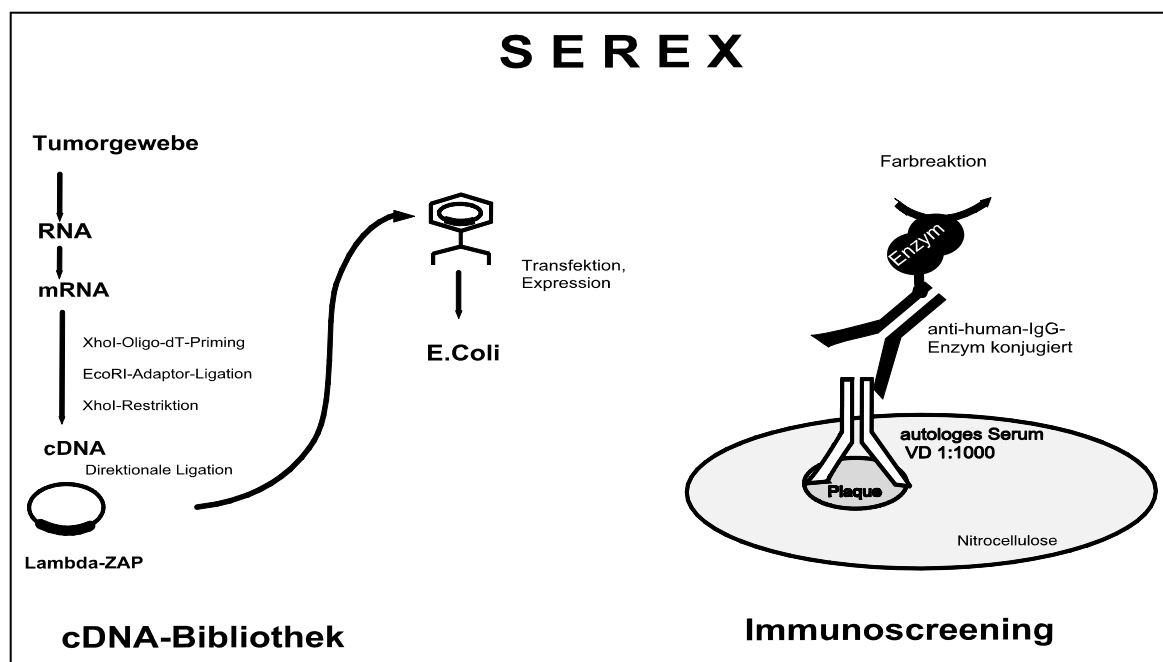


Abbildung 15: Schema der SEREX-Methode

Es wurden XL1-Blue Mg^{2+} -Bakterien mit rekombinanten Phagen transformiert, zusammen mit IPTG, einem Induktor für das Lactose-Operon von *E.coli* Bakterien, ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. (IPTG aktiviert dabei das Operon und

damit die Translation des Gens, wird jedoch im Gegensatz zu Lactose nicht abgebaut, so dass die IPTG-Konzentration gleich und das Gen aktiv bleibt.) Dabei entstanden lytische Plaques, welche die von den Bakterien exprimierten Proteine enthielten. Diese wurden durch Auflegen einer Nitrocellulosefolie und anschließenden Inkubation bei 37°C für 3 Stunden geblottet.

Nach Waschen und Blocken der Folien mit Milch/TBS zur Blockierung unspezifischer Bindungen wurden die Filter über Nacht bei 4°C mit den Patientenseren inkubiert.

Die Detektion der eventuell vorhandenen, spezifisch gebundenen Antikörper erfolgte nach Entfernung der Seren und erneutem Waschen mit Hilfe eines sekundären Antikörpers (anti-human-IgG, Alkalische Phosphatase-konjugiert), der gegen das Fc-Fragment der Serumantikörper gerichtet ist. Nach erneutem Waschen der Folien wurden eventuell gebundene Antikörperkomplexe über die an den sekundären Antikörper konjugierte Alkalischen Phosphatase (AP) sichtbar gemacht, indem das Enzym in einer enzymatischen Farbreaktion die Substrate 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP) und Nitroblue-Tetrazoliumchlorid (NBT) im alkalischen Milieu in farbige Reaktionsprodukte umwandelt, die an der Stelle der Antikörperbindung präzipitieren.

4. Immunantworten gegen DLBCL-assoziierte Antigene

Bei der Untersuchung der ausgewählten Genprodukte hinsichtlich Antikörperbildung wurde nur bei 3 Patienten eine Immunreaktion beobachtet (s. Abbildung 16).



Abbildung 16: Positive Klone

Diese Patienten sind in Tabelle 7 gelb unterlegt. 1 Patient wurde mit 6 Zyklen CHOP-14 therapiert, die anderen beiden Patienten jeweils mit 8 Zyklen CHOP-14 in Kombination mit 8x Rituximab.

Tabelle 7a: Patienten mit Antikörperbildung, Behandlung ausschließlich mit Chemotherapie

Leipzig-Nr	IPI	Staging	Remissions-status	Gesamt-ÜZ	Ereignis-freie ÜZ	Therapie	Diagnose	Bcl2- IHC
61	0	II NE	CRu	4y 10m; +	4y 10m	8x CHOP-14	Diffus großzellig B – centroblastisch	+
89	0	II NE	CR	5y 7m; +	5y 7m	8x CHOP-14	Diffus großzellig B	+
498	0	III NE	CR	4y 3m; +	4y 3m	8x CHOP-14	Diffus großzellig B – centroblastisch	n.d.
515	1	IV NE	CR	4y 5m; +	4y 5m	8x CHOP-14	Diffus großzellig B – centroblastisch	+ (partiell)
552	0	I N	CR	4y 4m; +	4y 4m	8x CHOP-14	Diffus großzellig B - anaplastisch-großzellig (ALC)	+
803	0	III N	CR, Rezidiv	4y; +	1y	8x CHOP-14	Diffus großzellig B – centroblastisch	+
960	2	III NE	Pro	1y 1m; #	-	8x CHOP-14	Follikulär III + DLBL	n.d.
100	2	III N	CR	5y 9m; +	5y 9m	6x CHOP-14	Diffus großzellig B – centroblastisch	neg.
569	0	III N	CRu	4y 2m; +	4y 2m	6x CHOP-14	Follikulär IIIa	+
1109	2	II E	CR	3y 8m; +	3y 8m	6x CHOP-14	Diffus großzellig B – centroblastisch	n.d.
1311	0	II N	CR	2y 2m; +	2y 2m	6x CHOP-14	Diffus großzellig B – centroblastisch	+

ÜZ: Überlebenszeit #: verstorben +: unverändert

Tabelle 7b: Patienten mit Antikörperbildung, Behandlung mit einer Kombination aus Chemotherapie und Rituximab

Leipzig-Nr	IPI	Staging	Remissions-status	Gesamt-ÜZ	Ereignis-freie ÜZ	Therapie	Diagnose	Bcl2- IHC
325	1	I N	CRu, Rezidiv	3y 1m; +	1y 5m	8xCHOP-14 + 8x Rituximab	Diffus großzellig B	+
400	0	III N	CRu	3y 8m; +	3y 8m	8xCHOP-14 + 8x Rituximab	Follikulär IIIb	+
982	2	I N	CR	2y 1m; +	2y 1m	8xCHOP-14 + 8x Rituximab	Follikulär IIIa	+
1292	2	IV NE	CRu	1y 8m; +	1y 8m	8xCHOP-14 + 8x Rituximab	kein Referenzurteil, lt. Rando Diffus großzellig B	n.d.
105	1	IV NE	Rezidiv, Pro	2y 2m; #	1y 9m	6x CHOP-14 + 8x Rituximab	Diffus großzellig B – immunoblastisch	+ (partiell)
113	2	I E	Pro	8m; #	-	6x CHOP-14 + 8x Rituximab	B-Zell-Reihe	+
291	0	I N	CRu	5y 2m; +	5y 2m	6x CHOP-14 + 8x Rituximab	Diffus großzellig B – centroblastisch	+
345	0	I N	CR	4y 5m; +	4y 5m	6x CHOP-14 + 8x Rituximab	Diffus großzellig B – anaplastisch-großzellig (ALC)	+
467	0	I N	CR	3y 9m; +	3y 9m	6x CHOP-14 + 8x Rituximab	Diffus großzellig B – centroblastisch	+
600	0	I E	CR	3y 11m; +	3y 11m	6x CHOP-14 + 8x Rituximab	Diffus großzellig B	neg.
793	1	III N	CRu	3y 7m; +	3y 7m	6x CHOP-14 + 8x Rituximab	Diffus großzellig B – centroblastisch	neg.
1020	1	II NE	Rezidiv, Pro	2y 4m; #	2y 1m	6x CHOP-14 + 8x Rituximab	B-Zell-Reihe	+

ÜZ: Überlebenszeit #: verstorben +: unverändert

Die Antikörper waren bei den immunreaktiven Patienten in allen 3 Proben, also zu Beginn der Therapie, nach ungefähr 3 Monaten sowie nach ungefähr 6 bis 9 Monaten nachweisbar. In diesem Fall ist also von einer therapieunabhängigen Antikörperbildung auszugehen. Auch die Antikörpertiter blieben unverändert:

Patient Nr. 569: $1:10^3$

Patient Nr. 982: $1:10^3$

Patient Nr. 1292: $1:10^5$

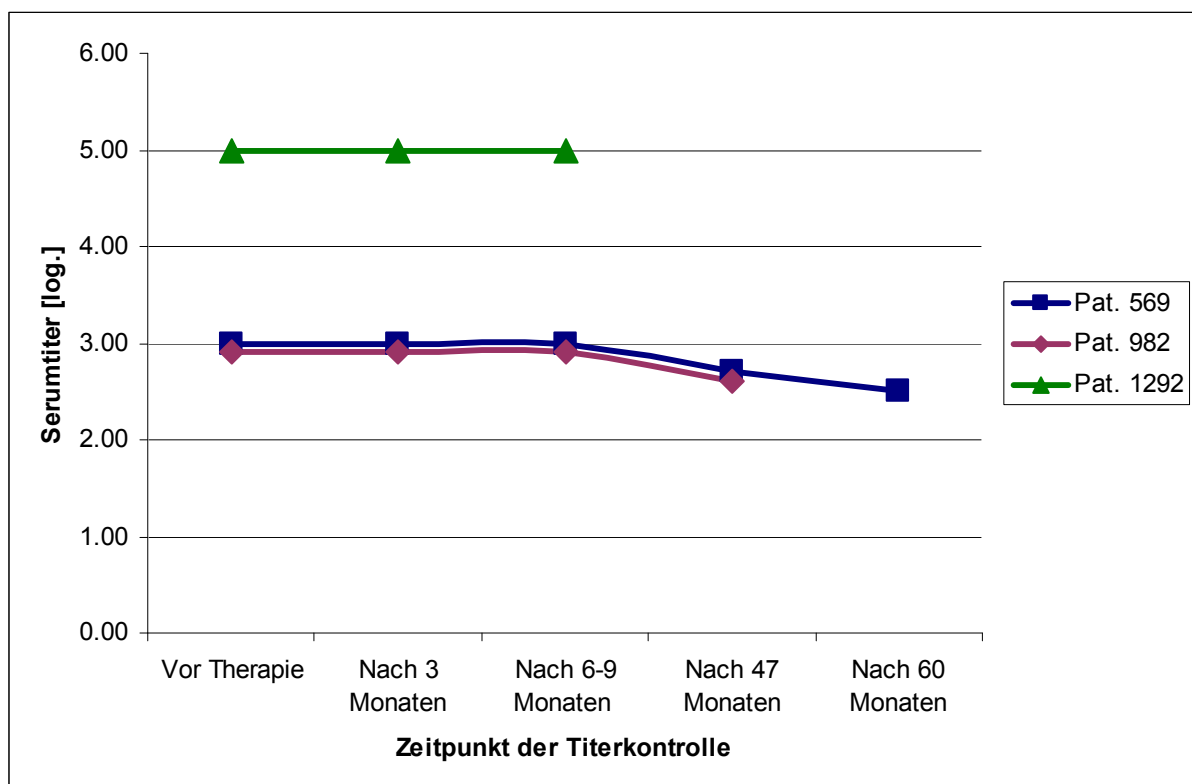


Abbildung 17: Graphische Darstellung der Titerverläufe

Folgeuntersuchungen ergaben leicht abfallende Antikörpertiter bei 2 von 3 Patienten, vom dritten Patienten konnte kein weiteres Material erhalten werden.

Bei 2 dieser 3 Patienten konnte durch IHC des Tumors BCL2-Protein nachgewiesen werden; der Tumor des dritten Patienten wurde in dieser Hinsicht nicht untersucht. Umgekehrt ist aber ebenfalls festzuhalten, dass nicht jeder in der IHC BCL2-positive Tumor eine Immunantwort gegen BCL2 hervorruft.

Die Antikörperbildung erfolgt ausschließlich gegen das durch BCL2 kodierte Protein; es wurden keine Antikörper gegen die anderen elf Gene nachgewiesen.

Die Diagnosen der 23 Patienten teilen sich wie folgt auf: 19x DLBCL, 4x Follikuläres Lymphom. Von den 4 Patienten mit Follikulärem Lymphom III° war bei zweien eine Antikörperbildung erkennbar, von den 19 Patienten mit DLBCL bei einem. Zur Überprüfung der statistischen Relevanz dieses Befundes hinsichtlich Follikulärem Lymphom wurden weitere Untersuchungen ausschließlich mit Patienten mit der Diagnose Follikuläres Lymphom durchgeführt. Dabei wurden nur bei einem von 20 Patienten Antikörper gegen BCL2 gefunden, so dass nicht von einem statistisch relevanten Bezug zwischen BCL2-Immunantwort und DLBCL bzw. Follikulärem Lymphom III° ausgegangen werden kann.

Die Untersuchung der Seren von 20 gesunden Spendern zeigte keine positive Immunantwort gegen das BCL2-Protein.

VI. Diskussion und Perspektiven

Die Auswahl der in dieser Arbeit verwendeten Gene beruht auf Vordaten anderer Studien, welche mit Hilfe von cDNA-Mikroarray-Analysen ermittelt wurden. Die dadurch erzielten Hybridisierungsergebnisse stellen sowohl Effekte innerhalb des kodierenden Bereichs als auch solche im nicht-translatierten Genbereich dar. Allerdings erlaubt diese Untersuchungsmethode keine Aussage über eine Änderung der Proteinexpression oder über eine mögliche immunogene Wirkung der Genprodukte. Für eine immunologische Charakterisierung bietet die SEREX-Methode als besonders effizientes Analyseverfahren gute Möglichkeiten größere Patientenkollektive zu screenen und damit als Grundlage weiterer Untersuchungen zu dienen.

In dieser Arbeit wurden insgesamt 11 - in den Vordaten auffällige - Gene für die SEREX-Analyse ausgesucht und hinsichtlich ihrer Immunogenität bei NHL-Patienten im Zusammenhang mit der durchgeführten Therapie analysiert.

Es wurde nur bei 3 Patienten eine Antikörperbildung gegen die untersuchten Genprodukte detektiert; diese war ausschließlich gegen das durch BCL2-kodierte Protein gerichtet. Es wurde keine Antikörperbildung gegen die Produkte der anderen 10 Gene detektiert.

Trotz positiver oder partiell positiver BCL2-Immunhistochemie bei 16 der Patienten fand nur bei 3 eine Antikörperbildung statt. Es besteht also kein direkter Zusammenhang zwischen BCL2-Expriemierung und Auftreten von Antikörpern.

Es ist nicht bekannt, ob bei den 3 Patienten mit positiver Immunreaktion auf BCL2 eine Mutation des BCL2-Gens vorliegt. Es wäre möglich, dass ein Zusammenhang zwischen Auftreten einer Mutation und Antikörperbildung oder auch zwischen fehlender Mutation und Antikörperbildung besteht.

Die beobachteten BCL2-Antikörpertiter sind zu jeden Zeitpunkt unverändert: sowohl vor Beginn der Therapie als auch 3 bzw. 6 bis 9 Monate nach Ende der Therapie. Es handelt sich hierbei offensichtlich um eine Immunantwort, die vom Rituximab-Zusatz zur Therapie unabhängig war. Da bereits gezeigt werden konnte, dass gesunde Spender höchstwahrscheinlich keine Antikörper gegen das BCL2-Protein ausbilden, handelt es sich hierbei jedoch um eine tumorgetriggerte Immunantwort.

Pulford et al. wiesen mittels Immunpräzipitation BCL2-Antikörper im Serum mit einem Titer von maximal 1:100 bei Patienten mit Follikulärem Lymphom nach. Außerdem zeigte eine Kontrollgruppe bestehend aus Patienten mit anderen, nicht weiter spezifizierten Karzinomen ebenfalls eine, wenn auch deutlich geringer ausgeprägte, Immunantwort gegen BCL2, wobei die gesunden Kontrollseren keine BCL2-Antikörper aufwiesen [Pulford et al. 2002]. Es stellt sich die Frage, inwiefern auch andere Tumorentitäten bezüglich BCL2 immunogen sein könnten. Allerdings ist die von Pulford angewandte Methode der Immunpräzipitation sehr artefaktanfällig. Auch die Spezifität der Antikörper bei solch niedrigen Titern ist fraglich. Demzufolge ist ein Vergleich mit den Daten, die in der vorliegenden Arbeit erhoben wurden, nur eingeschränkt möglich.

Andersen et al. konnten zudem spontane T-Zell-Aktivitäten zytotoxischer T-Zellen gegen BCL2-Epitope bei Patienten mit unterschiedlichen Tumorleiden, z.B. Pankreas-CA, Mamma-CA, AML und CLL, nachweisen. Diese T-Zell-Antworten wurden ausschließlich bei Patienten, die zuvor mit einer Chemotherapie behandelt wurden, detektiert. Weder Patienten, die eine antihormonelle Therapie erhielten, noch Patienten mit einem Tumorleiden vor Therapiebeginn, zeigten eine T-Zell-Immunantwort gegen BCL2-Epitope [Andersen et al. 2005].

Es wird also deutlich, dass die von Andersen et al. nachgewiesene T-Zell-Reaktion therapieabhängig nach Chemotherapie auftreten, wohingegen die in dieser Arbeit detektierte B-Zell-Antwort mit Antikörperbildung schon vor Therapiebeginn auftrat. Die Ursache für die T-Zell-Antwort könnte in einer durch eine Chemotherapie induzierten Steigerung der BCL2-Expression bzw. auch in einer Induktion oder

Verstärkung einer Immunantwort liegen. Da die Antikörper jedoch vor Therapiebeginn bereits vorhanden waren und die Titerverläufe unter Therapie gleich blieben, hat dieser Effekt wahrscheinlich keine Auswirkungen auf die B-Zell-Antwort.

Eine auf dem BCL2-Effekt basierende Immuntherapie zusätzlich zu einer Chemotherapie könnte einen synergistischen Effekt und damit eine Verbesserung des Ansprechens auf die Therapie bewirken.

Bisher ist die BCL2-induzierte Antwort zytotoxischer T-Zellen verglichen mit einer anti-viralen Immunantwort deutlich geringer und könnte zu wenig ausgeprägt sein um eine klinisch bedeutsame Immunreaktion auszulösen. Es wäre jedoch möglich, die autoreaktive Immunantwort mit Hilfe einer Vakzine zu steigern.

Die in dieser Arbeit detektierten Antikörper könnten – nach Extraktion – dazu dienen eine Immunreaktion direkt zu verstärken. Es wäre z.B. denkbar, dass eine Gabe von extrahierten und aufgereinigten Antikörpern bei einer bestimmten Patientengruppe mit hoher Tumorlast eine Unterstützung der Standardtherapie darstellen könnte. Die Definition der B-Zell- sowie der T-Zell-Epitope ist außerdem Voraussetzung für eine polyvalente Anti-BCL2-Vakzine.

Es stellt sich ferner die Frage, in wie weit die vorhandenen Antikörper die Prognose der Patienten beeinflussen. Da alle 3 Patienten sich bisher im Zustand der Komplettremission befinden, ist ein positiver Effekt denkbar. Aufgrund der Tatsache, dass das untersuchte Zeitintervall jedoch relativ kurz ist, ist eine sichere Aussage derzeit schlecht möglich. Es müsste eine weitere Titer- und Verlaufskontrolle der Patienten stattfinden.

Der Titerverlauf könnte Aufschluss über den Krankheitsverlauf geben. So könnte ein erneuter Anstieg eines Titers nach einer längeren gleichbleibenden Phase – ähnlich wie bei Tumormarkern – ein früher Indikator für ein noch subklinisches Rezidiv sein. Damit könnte eine BCL2-Antikörperbestimmung sowohl einen prognostischen Aussagewert besitzen als auch in der Verlaufskontrolle von Patienten eine Rolle spielen.

Aufgrund der Tatsache, dass eine Antikörperbildung bei BCL2 nachgewiesen werden konnte, ist es durchaus möglich, dass auch gegen andere Genprodukte Antikörper gebildet werden. Dazu müsste das beobachtete Gen- und/oder Patientenkollektiv allerdings deutlich ausgeweitet oder in einer folgenden Studie anders definiert werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass es in dieser Studie erstmalig gelang, eine hochtitrige Antikörperbildung gegen BCL2 nachzuweisen und dies bei mehr als 10% der untersuchten Patienten. Wenn auch kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen angewandter Therapie und Änderung des Immunstatus festgestellt werden konnte, so konnte doch zum ersten Mal ein immunogener Effekt des anti-apoptotisch-wirksamen BCL2 auf B-Zellen und damit eine Funktion als tumorassoziiertes Antigen nachgewiesen werden. Es konnte von Andersen et al. bereits gezeigt werden, dass BCL2 auch zelluläre Immunantworten induziert. Der Nachweis der Immunogenität von BCL2 bei Patienten mit BCL2-positiven Lymphomen deutet darauf hin, dass eine Immuntherapie (Vakzine) basierend auf dem BCL2-Effekt bei den entsprechenden Patienten sinnvoll sein könnte. Damit könnte eine bessere Prognose erzielt, die Entstehung von Lymphomen verzögert oder eventuell sogar verhindert werden.

Grundsätzlich zeigt eine positive Antikörperantwort eine immunologische Reaktion des Patienten auf seine Erkrankung. Es besteht die Möglichkeit, dass die Antikörperbildung bereits vor dem Auftreten von Symptomen der Erkrankung in Erscheinung tritt, so dass damit eine bessere Chance der Früherkennung durch serologische Untersuchungen gegeben sein könnte. Außerdem kann eine solche Immunreaktion als Ansatz für neue Therapien (wie z.B. die Möglichkeit einer Immuntherapie unter Ausnutzung des BCL2-Effektes) oder aber auch für neue diagnostische Maßnahmen dienen, sowie zu besserem Verständnis von Pathogenese, Krankheitsverlauf und Prognose von Lymphomen beitragen. Weiterführende Untersuchungen in diesem Bereich werden diese Entwicklung fördern und die Heilungschancen von Lymphom-Patienten optimieren.

VII. Literaturverzeichnis

1. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J, Jr., Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*: 503-11
2. Andersen MH, Svane IM, Kvistborg P, Nielsen OJ, Balslev E, Reker S, Becker JC, Straten PT (2005) Immunogenicity of Bcl-2 in patients with cancer. *Blood*: 728-34
3. Armitage JO, Weisenburger DD (1998) New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol*: 2780-95
4. Binder M, Otto F, Mertelsmann R, Veelken H, Trepel M (2006) The epitope recognized by rituximab. *Blood*: 1975-8
5. Brooks AR, Shiffman D, Chan CS, Brooks EE, Milner PG (1996) Functional analysis of the human cyclin D2 and cyclin D3 promoters. *J Biol Chem*: 9090-9
6. BurrIDGE K, McCullough L (1980) The association of alpha-actinin with the plasma membrane. *J Supramol Struct*: 53-65
7. Cohen SN, Chang AC (1973) Recircularization and autonomous replication of a sheared R-factor DNA segment in *Escherichia coli* transformants. *Proc Natl Acad Sci U S A*: 1293-7
8. Delmer A, Ajchenbaum-Cymbalista F, Tang R, Ramond S, Faussat AM, Marie JP, Zittoun R (1995) Overexpression of cyclin D2 in chronic B-cell malignancies. *Blood*: 2870-6
9. Dunphy CH (2006) Gene expression profiling data in lymphoma and leukemia: review of the literature and extrapolation of pertinent clinical applications. *Arch Pathol Lab Med*: 483-520
10. Gascoyne RD, Adomat SA, Krajewski S, Krajewska M, Horsman DE, Tolcher AW, O'Reilly SE, Hoskins P, Coldman AJ, Reed JC, Connors JM (1997) Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*: 244-51
11. Ghetie MA, Bright H, Vitetta ES (2001) Homodimers but not monomers of Rituxan (chimeric anti-CD20) induce apoptosis in human B-lymphoma cells and synergize with a chemotherapeutic agent and an immunotoxin. *Blood*: 1392-8

12. Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ (1991) BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*: 6961-5
13. Hofmeister JK, Cooney D, Coggeshall KM (2000) Clustered CD20 induced apoptosis: src-family kinase, the proximal regulator of tyrosine phosphorylation, calcium influx, and caspase 3-dependent apoptosis. *Blood Cells Mol Dis*: 133-43
14. Kanzaki M, Lindorfer MA, Garrison JC, Kojima I (1997) Activation of the calcium-permeable cation channel CD20 by alpha subunits of the Gi protein. *J Biol Chem*: 14733-9
15. Kramer MH, Hermans J, Wijburg E, Philippo K, Geelen E, van Krieken JH, de Jong D, Maartense E, Schuurung E, Kluin PM (1998) Clinical relevance of BCL2, BCL6, and MYC rearrangements in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*: 3152-62
16. Kwok S, Higuchi R (1989) Avoiding false positives with PCR. *Nature*: 237-8
17. Levene AP, Morgan GJ, Davies FE (2003) The use of genetic microarray analysis to classify and predict prognosis in haematological malignancies. *Clin Lab Haematol*: 209-20
18. Lim MK, Kawamura T, Ohsawa Y, Ohtsubo M, Asakawa S, Takayanagi A, Shimizu N (2007) Parkin interacts with LIM Kinase 1 and reduces its cofilin-phosphorylation activity via ubiquitination. *Exp Cell Res*
19. Lossos IS, Alizadeh AA, Rajapaksa R, Tibshirani R, Levy R (2003) HGAL is a novel interleukin-4-inducible gene that strongly predicts survival in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*: 433-40
20. Lossos IS, Czerwinski DK, Alizadeh AA, Wechser MA, Tibshirani R, Botstein D, Levy R (2004) Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med*: 1828-37
21. Ma H, Pederson T (2007) Depletion of the nucleolar protein nucleostemin causes G1 cell cycle arrest via the p53 pathway. *Mol Biol Cell*: 2630-5
22. Maloney DG (2001) Mechanism of action of rituximab. *Anticancer Drugs*: S1-4
23. Manning CD, Burman M, Christensen SB, Cieslinski LB, Essayan DM, Grous M, Torphy TJ, Barnette MS (1999) Suppression of human inflammatory cell function by subtype-selective PDE4 inhibitors correlates with inhibition of PDE4A and PDE4B. *Br J Pharmacol*: 1393-8
24. Natkunam Y, Zhao S, Mason DY, Chen J, Taidi B, Jones M, Hammer AS, Hamilton Dutoit S, Lossos IS, Levy R (2007) The oncoprotein LMO2 is expressed in normal germinal-center B cells and in human B-cell lymphomas. *Blood*: 1636-42

25. Pfreundschuh M, Trumper L, Kloess M, Schmits R, Feller AC, Rudolph C, Reiser M, Hossfeld DK, Metzner B, Hasenclever D, Schmitz N, Glass B, Rube C, Loeffler M (2004) Two-weekly or 3-weekly CHOP chemotherapy with or without etoposide for the treatment of young patients with good-prognosis (normal LDH) aggressive lymphomas: results of the NHL-B1 trial of the DSHNHL. *Blood*: 626-33
26. Pfreundschuh M, Trumper L, Osterborg A, Pettengell R, Trneny M, Imrie K, Ma D, Gill D, Walewski J, Zinzani PL, Stahel R, Kvaloy S, Shpilberg O, Jaeger U, Hansen M, Lehtinen T, Lopez-Guillermo A, Corrado C, Scheliga A, Milpied N, Mendila M, Rashford M, Kuhnt E, Loeffler M (2006) CHOP-like chemotherapy plus rituximab versus CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large-B-cell lymphoma: a randomised controlled trial by the MabThera International Trial (MINT) Group. *Lancet Oncol*: 379-91
27. Pulford K, Robertson H, Banham AH, Hatton CS, Mason DY (2002) Immunochemical studies of antigenic lymphoma-associated proteins. *Br J Haematol*: 135-41
28. Richardson CC, Masamune Y, Live TR, Jacquemin-Sablon A, Weiss B, Fareed GC (1968) Studies on the joining of DNA by polynucleotide ligase of phage T4. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*: 151-64
29. Sahin U, Tureci O, Pfreundschuh M (1997) Serological identification of human tumor antigens. *Curr Opin Immunol*: 709-16
30. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*: 487-91
31. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*: 5463-7
32. Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, Weng AP, Kutok JL, Aguiar RC, Gaasenbeek M, Angelo M, Reich M, Pinkus GS, Ray TS, Koval MA, Last KW, Norton A, Lister TA, Mesirov J, Neuberg DS, Lander ES, Aster JC, Golub TR (2002) Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med*: 68-74
33. Short JM, Fernandez JM, Sorge JA, Huse WD (1988) Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res*: 7583-600
34. Staudt LM, Dent AL, Shaffer AL, Yu X (1999) Regulation of lymphocyte cell fate decisions and lymphomagenesis by BCL-6. *Int Rev Immunol*: 381-403
35. Tedder TF, Engel P (1994) CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. *Immunol Today*: 450-4

36. Winter JN, Weller EA, Horning SJ, Krajewska M, Variakojis D, Habermann TM, Fisher RI, Kurtin PJ, Macon WR, Chhanabhai M, Felgar RE, Hsi ED, Medeiros LJ, Weick JK, Reed JC, Gascoyne RD (2006) Prognostic significance of Bcl-6 protein expression in DLBCL treated with CHOP or R-CHOP: a prospective correlative study. *Blood*: 4207-13
37. Zhang A, Ohshima K, Sato K, Kanda M, Suzumiya J, Shimazaki K, Kawasaki C, Kikuchi M (1999) Prognostic clinicopathologic factors, including immunologic expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Pathol Int*: 1043-52

VIII. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Klassifikation der Lymphome
Tabelle 2:	Ann-Arbor-Klassifikation
Tabelle 3:	Häufigkeit der verschiedenen Histologien unter den B-Zell-Lymphomen
Tabelle 4:	Gene, Zusammenfassung
Tabelle 5:	verwendete Gene
Tabelle 6:	Patienten
Tabelle 7a:	Patienten mit Antikörperbildung, Behandlung mit Chemotherapie
Tabelle 7b:	Patienten mit Antikörperbildung, Behandlung mit Kombination aus Chemotherapie und Rituximab

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Rituximab-Epitop
Abbildung 2:	Expressionsprofile von geheilten bzw. schwerwiegenden oder therapierefraktären DLBCL
Abbildung 3:	Überlebenszeiten von Lymphompatienten in Abhängigkeit von der BCL2-Proteinexpression
Abbildung 4:	Schema zur Einteilung der Patienten in die beiden Therapiearme

Abbildung 5:	In-Vivo-Excision
Abbildung 6:	Beispiel für SEREX
Abbildung 7:	Gelelektrophorese zur PCR-Kontrolle
Abbildung 8:	PKC-Plasmid-Präparation (TENS-Minis)
Abbildung 9:	Insertpräparation: Entfernung des PKC-Fragmentes aus dem TOPO-Vektor
Abbildung 10:	Überprüfung der Insertpräparation
Abbildung 11:	Vektorkarte des λ -ZAP-Express-Phagen
Abbildung 12:	Ausschnitt aus der MCS des λ -ZAP-Express-Phagen
Abbildung 13:	PKC-Plasmid-Präparation (TENS Minis) nach in-vivo-Excision
Abbildung 14:	Sequenzierung des pKC-Plasmids nach in-vivo-Excision sowie die entsprechende Aminosäuresequenz.
Abbildung 15:	Schema der SEREX-Methode
Abbildung 16:	Positive Klone
Abbildung 17:	Graphische Darstellung der Titerverläufe

IX. Publikation / Danksagung

Teile dieser Dissertation wurden als Teil des Papers „Spontaneous high-titered IgG antibody responses against BCL-2 in patients with aggressive lymphomas“ im Journal of Cancer Research and Clinical Oncology publiziert.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. M. Pfreundschuh, in dessen Labor die Arbeit angefertigt wurde, für das Überlassen des Themas und des Arbeitsplatzes.

Ferner danke ich besonders Herrn Dr. Klaus-Dieter Preuß für die vielfältige Unterstützung in wissenschaftlichen Fragen, für die wertvollen Anregungen sowie die engagierte Betreuung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ebenso danke ich Maria Kemele und Evi Regitz für die freundschaftliche und hilfreiche Zusammenarbeit, sowie allen Labormitarbeitern der Abteilung Innere Medizin I für eine angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ganz besonders danke ich auch meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich jederzeit unterstützten.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei Tobias Maurer für seine Unterstützung im informatisch-technischen Bereich und bei Stefan Huwig für seine Übersetzungshilfe.

X. Lebenslauf

Name: Vera Hammermeister

Geburtsdatum: 20.06.1984
Geburtsort: Ottweiler

Adresse: Graulheck 41
66578 Schiffweiler

Eltern: Vater: Wolfgang Hammermeister
Mutter: Irmgard Hammermeister, geb. Schmidt

Schule: Grundschule Schiffweiler
September 1990 – Juli 1994

Gymnasium am Steinwald Neunkirchen
August 1994 – Juni 2003
Abitur: Juni 2003

Universität: Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes
Homburg/Saar
Beginn: Oktober 2003

Famulaturen: 01.03.06 – 31.03.06: Städtisches Krankenhaus Neunkirchen,
Gynäkologie
01.03.07 – 31.03.07: Städtisches Krankenhaus Neunkirchen,
gynäkologische Ambulanz
03.09.07 – 02.10.07: Universitätsklinikum Homburg/Saar, Institut für
Pathologie
18.02.08 – 25.03.08: Chirurgisch – Unfallchirurgisch – Orthopädische
Praxis, Böblingen

Praktisches Jahr: 25.08.2008 – 26.07.2009: Klinikum Saarbrücken
Wahlfach: Gynäkologie

Staatsprüfungen: 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: August 2005
2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung: voraussichtlich Oktober 2009