

Aus der Klinik der Inneren Medizin I

-Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie und Rheumatologie

Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg /Saar

(Kommissarische Leitung: Prof. Dr. Stilgenbauer)

**B-Zell Rezeptor-vermittelte Therapieansätze
für das Mantelzelllymphom im Fab-Format**

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

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2020

Vorgelegt von: Helene Wilhelmine Will

Geb. am: 11.07.1994 in Wetzlar

Tag der Promotion: 24.06.2020

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stephan Stilgenbauer

Prof. Dr. med. Norbert Graf

Inhaltsverzeichnis

I ZUSAMMENFASSUNG	4
1 DEUTSCH	4
2 ENGLISH	5
II EINLEITUNG.....	6
2.1 LYMPHOME	6
2.2 MANTELZELLYMPHOM (MCL).....	7
2.3 DIE ROLLE VON AUTOANTIGENEN IN DER PATHOGENESE VON B-ZELL-NEOPLASIE.....	10
2.4 ANTIKÖRPER – AUFBAU	11
2.5 ANTIKÖRPER – FUNKTION.....	13
2.6 EINSATZGEBIETE VON ANTIKÖRPERN.....	14
2.7 BARS UND MÖGLICHE THERAPEUTISCHE FORMATE	16
2.8 ZIEL DIESER ARBEIT	17
III MATERIAL	18
3.1 LABORGERÄTE	18
3.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN.....	18
3.3 PUFFER UND LÖSUNGEN.....	19
3.4 KITS	21
3.5 PRIMER.....	22
3.6 ENZYME.....	23
3.7 ANTIKÖRPER	23
3.8 VEKTOREN.....	23
3.8.1 TA-Vektor.....	24
3.8.2 pCES1-Vektor	25
3.8.3 pCES-ETA'-Vektor.....	26
3.9 BAKTERIEN	26
3.10 ZELLEN.....	26
IV METHODEN	27
4.1 AGAROSE GELELEKTROPHORESE ZUR AUFTRENNUNG VON NUKLEINSÄURE FRAGMENTEN.....	27
4.2 POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)	27
4.3 SCHNEIDEN VON DNA MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN.....	28
4.4 LIGATION	29
4.5 TRANSFORMATION	30
4.6 BAKTERIENKULTUR	30
4.7 DNA-ISOLATION.....	30
4.8 DNA AUFREINIGUNG.....	30
4.9 SEQUENZIERUNG	30
4.10 INDUKTION DER PROTEINPRODUKTION	31
4.10.1 Aufreinigung	31
4.10.2 Protein-Dialyse.....	32
4.11 POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE UND WESTERN BLOT	32
4.12 FUNKTIONALITÄTSASSAYS	34
4.12.1 Bindungsassays.....	34
4.12.2 Internalisierung	34
4.13 ZYTOTOXIZITÄTSASSAY.....	36
V ERGEBNISSE	37
5.1 EXPERIMENTELLE VORGEHENSWEISE DIESER ARBEIT	37
5.2 ETA'	39

5.3 KOLONIERUNG DER FAB-EXPRESSIONSKONSTRUKTE.....	40
5.3.1 Generierung unterschiedlicher LRPAP1-Epitopvarianten V1, V2, V3 (Schritt 1).....	40
5.3.2 Zwischenklonierung für die schwere Kette in den TA-Vektor (Schritt 2).....	41
5.3.4 Austausch der V _H -Regionen in den pCES-Vektor (Schritt 3).....	42
5.3.5 Klonierung der PCR-Produkte für die leichte Kette in den TA-Vektor.....	43
5.3.6 Austausch der V _L -Region in den pCES-Konstrukten (Schritt 4).....	44
5.4 EXPRESSION DER FAB-PRODUKTE.....	45
5.4.1 Induktion (Schritt 5).....	45
5.4.2 Westernblot.....	45
5.4.3 Bindungsassay (Schritt 6).....	46
5.4.4 Internalisierungsassay.....	47
5.5 ETA'-KOLONIERUNG (SCHRITT 7).....	48
5.6 EXPRESSION DER ETA'-KONSTRUKTE (SCHRITT 8).....	50
5.6.1 Induktion, Westernblot, Durchflusszytometrie.....	50
5.6.2 Internalisierungsassay.....	51
5.6.3 Zytotoxizitätsassay.....	52
VI DISKUSSION	54
VII ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	59
VIII LITERATURVERZEICHNIS	60
VIII PUBLIKATIONEN	65
XI DANKSAGUNG.....	66

I Zusammenfassung

1 Deutsch

Lymphome sind Neoplasien des lymphatischen Systems, die man in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome einteilen kann. In der Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome unterscheidet man des Weiteren zwischen B- und T-Zell-Neoplasien. B-Zell Lymphome bestehen aus entarteten B-Lymphozyten und haben einen heterogenen Krankheitsverlauf. Das Mantelzelllymphom gehört zu den B-Zell Non-Hodgkin-Lymphomen und macht nur etwa 6 – 9 % aller Lymphome aus. Als Ursprungszelle gilt eine periphere Antigen-naive B-Zelle aus der inneren Mantelzone eines Lymphfollikels. Die pathognomonische genetische Veränderung ist die chromosomale Translokation t(11;14), die zu einer Überexpression von Cyclin D1 führt. Die Therapie des Mantelzelllymphoms ist palliativ und stellt eine Herausforderung dar. Eine Kombination aus Chemo- und Immuntherapie stellt die Basis der Therapie dar. Durch eine Intensivierung der Induktionstherapie bei jungen, körperlich fitten Patienten kann die Prognose verbessert werden. Viele Patienten sprechen nur schlecht auf die Therapie an, weshalb die mittlere Lebenserwartung bei nur fünf Jahren liegt.

Eine B-Zelle besitzt aufgrund genetischer Rekombinationsprozesse einen für sie einzigartigen B-Zell Rezeptor, der sich in seiner variablen Region von den B-Zell Rezeptoren anderer B-Zellen unterscheidet. Aufgrund des monoklonalen Ursprungs von Mantelzelllymphom Zellen besitzen alle Lymphom Zellen eines Mantelzelllymphoms einen identischen B-Zell Rezeptor. Die natürliche Aufgabe von B-Zell Rezeptoren liegt in der Erkennung von Antigenen. Da alle malignen Zellen eines Mantelzelllymphoms identische B-Zell Rezeptoren tragen, wird durch diese immer das gleiche Antigen erkannt. LRPAP1 konnte als Antigen von etwa 45% aller Mantelzelllymphome identifiziert werden.

Das Ziel dieser Arbeit liegt in der Entwicklung eines Therapiekonzeptes für das Mantelzelllymphom, das über die Integrierung des Antigens LRPAP1 den B-Zell Rezeptor der Lymphom Zellen als Zielstruktur erkennt. Hierfür wird LRPAP1 als Fab-Konstrukt kloniert und exprimiert, das in seiner Form dem Antigen bindenden Fragment eines Antikörpers angelehnt ist. Anschließend wird dieses Konstrukt, das als BAR-body benannt wurde, auf spezifische Bindung an Mantelzelllymphom Zellen getestet. Über die Kopplung an eine Wirkkomponente (ETA – Toxin) wird weiterhin das therapeutische Potential des BAR-body evaluiert.

2 English

Lymphomas are neoplasias of the lymphatic system that can be divided into Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas. In the group of non-Hodgkin's lymphomas, a distinction is also made between B-cell and T-cell neoplasia. B-cell lymphomas consist of degenerate B-lymphocytes and have a heterogeneous course of disease. mantle cell lymphoma belongs to the B-cell non-Hodgkin's lymphomas and accounts for only about 6 - 9 % of all lymphomas. The cell of origin is a peripheral antigen-naive B-cell from the inner mantle zone of a lymph follicle. The pathognomonic genetic alteration is the chromosomal translocation t(11;14), which leads to an overexpression of cyclin D1. The therapy of mantle cell lymphoma is palliative and challenging. A combination of chemo- and immunotherapy is the basis of therapy. The prognosis can be improved by intensifying induction therapy in young, physically fit patients. Many patients respond poorly to the therapy, which is why the average life expectancy is only five years.

Due to genetic recombination processes, each B-cell possesses a B-cell receptor that is unique for it and differs in its variable region from the B-cell receptors of other B-cells. Due to the monoclonal origin of mantle cell lymphoma cells, all lymphoma cells of a mantle cell lymphoma have an identical B-cell receptor. The natural function of B-cell receptors is the recognition of antigens. Since all malignant cells of a mantle cell lymphoma carry identical B-cell receptors, they recognize the same antigen. LRPAP1 has been identified as the antigen of about 45% of all mantle cell lymphomas.

The aim of this work is to develop a therapeutic concept for mantle cell lymphoma that recognizes the B-cell receptor of lymphoma cells as a target structure by integrating the antigen LRPAP1. For this purpose, LRPAP1 is cloned and expressed as a Fab construct, which in its form is based on the antigen-binding fragment of an antibody. Subsequently, this construct, which we designated BAR-body, is tested for specific binding to mantle cell lymphoma cells. The therapeutic potential of the BAR-body is further evaluated by coupling it to a cytotoxic component (ETA - toxin).

II Einleitung

2.1 Lymphome

Lymphome sind Neoplasien des lymphatischen Systems und können benigne oder maligne Tumore sein. In der Regel, und so auch in dieser Arbeit, wird der Begriff allerdings für maligne Lymphknotenvergrößerungen verwendet. Generell sind Lymphome keine lokalisierte Erkrankung, sondern zählen zu den Systemerkrankungen. Die Einteilung erfolgt nach Zelltyp und Malignität in Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL).

Das Hodgkin-Lymphom geht von B-Lymphozyten aus und man findet in der histologischen Untersuchung von Lymphom Biopsien typische Sternberg-Reed-Zellen, bei denen es sich um mehrkernige Riesentumorzellen handelt. Bei den Hodgkin-Lymphomen findet man zwei Häufigkeitsgipfel, den ersten um das 30. Lebensjahr und den zweiten vom 50. bis 70. Lebensjahr (*PDQ® Adult Treatment Editorial Board*). Es sind mehr Männer als Frauen betroffen. Ätiologisch werden Rauchen, EBV- und HIV-Infektionen, sowie zytostatische und immunsuppressive Therapien als Risikofaktoren diskutiert. Diagnostisch relevant ist vor allem die Histologie, wo neben den oben beschriebenen Sternberg-Reed-Zellen auch einkernige Hodgkin-Zellen sichtbar sind. Hodgkin-Lymphome sind CD45 negativ, CD30 positiv und mehrheitlich (75-85%) CD15 positiv (*Dragos et al, 2019*). Die Stadieneinteilung der Hodgkin-Lymphome erfolgt nach der Ann-Arbor-Klassifikation. Symptomatisch werden die Patienten durch indolente oft vergrößerte Lymphknotenpakete, die häufig zervikal liegen (*S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Hodgkin-Lymphoms, 2019*). Die Therapie ist fast immer kurativ, wobei es verschiedene Prognosegruppen gibt. Ein großer mediastinaler oder extranodaler Lymphknotenbefall, sowie eine hohe Blutsenkungsgeschwindigkeit verschlechtern die Prognose (*S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Hodgkin-Lymphoms, 2019*).

Die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) sind ein Überbegriff für eine Vielzahl maligner Lymphome. Sie sind monoklonale Neoplasien von entweder B- (90%) oder T-Lymphozyten (10%) und tragen nicht die Merkmale eines Hodgkin-Lymphoms. Die NHL unterscheiden sich untereinander in ihrer Ursprungszelle, ihrer feingeweblichen Struktur, sowie des Krankheitsverlaufes. Die Ätiologie der meisten NHL ist unklar, wobei eine Infektion mit bestimmten Viren und eine chronische Stimulation durch mikrobielle Antigene und Autoantigene als Faktoren in der Entstehung der Lymphome diskutiert werden (*Pieper, 2013*). Generell sind Non-Hodgkin-Lymphome relativ selten (Inzidenz 19-23/100.000 p.a.) und das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 70 Jahren für Männer und bei 73 Jahren für Frauen (*Robert Koch-Institut (Hrsg.), 2017*). Die Ausbreitungsdiagnostik und die Stadieneinteilung erfolgt nach der Ann-Arbor-Klassifikation (*Edge et al, 2010*) mit Ausnahme des multiplen Myeloms (*Palumbo*

et al, 2015) und der chronisch lymphatischen Leukämie (*Binet et al, 1981*). Nach der aktuellen WHO-Klassifikation (*Swerdlow et al, 2016*) werden die NHL in verschiedene Gruppen eingeteilt, zu denen die reifen B- und T-Zell-Neoplasien gehören.

Erkrankte Patienten fallen häufig durch eine schmerzlose, persistierende oder in Größe zunehmende Lymphknotenvergrößerung auf und leiden später unter B-Symptomatik (Nachtschweiß, Fieber, Gewichtsverlust), erhöhter Infektanfälligkeit, verminderter Leistungsfähigkeit und Splenomegalie. Durch eine Verdrängung des Knochenmarks können auch Anämie, Thrombozytopenie und Leukozytopenie auftreten, was das Risiko von Blutungen und Infektionen erhöht.

Die Therapie maligner Lymphome besteht klassischerweise aus einer Kombination von Immun- und Chemotherapie.

2.2 Mantelzelllymphom (MCL)

Das Mantelzelllymphom wird zu den Non-Hodgkin-Lymphomen der B-Zell Reihe gezählt. Aufgrund der Morphologie der Mantelzelllymphomzellen als reife Lymphozyten wird es auch als zentrozytisches Lymphom bezeichnet und zu den indolenten B-Zell-Lymphomen gezählt. Da das MCL meistens einen sehr ungünstigen klinischen Verlauf nimmt, kann es aber auch den aggressiven Lymphomen zugeordnet werden. Das MCL ist ein eher seltenes Lymphom (Inzidenz 1-2/100.000 Einwohner/Jahr) mit einem medianen Erkrankungsalter von 60 Jahren (*Swerdlow et al, 2008*). Es macht etwa 5-7% aller Non-Hodgkin-Lymphome aus und tritt häufiger bei Männern als bei Frauen auf (*Dreyling et al, 2017*).

Als Ursprungszelle gilt eine periphere Antigen-naive B-Zelle aus der inneren Mantelzone eines Lymphfollikels (Prä-Keimzentrumtyp) (*Swerdlow et al, 2008*). In der molekularbiologischen Untersuchung findet man in den Tumorzellen eine Translokation t(11;14)(q13;q32), was einer Translokation des CCND1-Gens (kodiert für das Protein Cyclin D1) von Chromosom 11 in die Nähe des Immunglobulin Schwerketten (IGH) Gens auf 14 entspricht (*Tsujimoto et al, 1984*). Hierdurch gerät das CCND1 Gens unter transkriptionelle Kontrolle des IGH Gens, was die Synthese von Cyclin D1 erhöht und über eine Aktivierung des Zellzyklus zu einer gesteigerten Proliferationsrate führt (*Swerdlow et al, 2008*). Gleichzeitig wird der hemmende Effekt des Retinoblastom-1 Gens antagonisiert (*Pérez et al, 2011*). Die Zelle verliert so die Kontrolle über den Zellzyklus. Diese Translokation ist pathognomonisch für das MCL.

Für die Diagnose wird ein befallener Lymphknoten histopathologisch aufgearbeitet und immunhistochemisch analysiert. Mikroskopisch sind einheitliche Verbände von kleinen lymphoiden Zellen sichtbar, deren Kerne eingekerbt sind. In der Immunhistochemie

exprimieren Mantelzelllymphom-Zellen reife B-Zell Marker bei fehlender CD23 Expression, was eine Abgrenzung zur B-CLL erlaubt. Durch die aberrante Expression des T-Zell Markers CD5, kann das MCL von gesunden B-Lymphozyten, dem folliculären Lymphom und dem Marginalzonenlymphom differenziert werden (*Dreyling et al, 2014*).

Das Mantelzelllymphom wird des Weiteren in zwei Unterarten unterteilt. Das klassische Mantelzelllymphom besitzt unmutierte oder minimal mutierte variable Regionen der Immunglobulin Schwereketten (IGHV), exprimiert SOX11 und ist Cyclin D1-positiv (*Weisenburger et al, 1996*). Das Protein SOX11 dient im Körper als Transkriptionsregulator nach Bildung eines Proteinkomplexes mit weiteren Proteinen und kann als Biomarker für Cyclin D1-negative Mantelzelllymphome dienen (*Narurkar et al, 2016*). Typischerweise liegt bei erkrankten Patienten ein Lymphknoten oder extranodaler Befall vor. Diese Unterform des Mantelzelllymphoms ist aggressiver und mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet. Im Gegensatz dazu exprimiert das leukämische verlaufende Mantelzelllymphom eine mutierte IGHV und ist SOX11 negativ. Diese Unterform befällt eher das Knochenmark und die Milz, weshalb es zu einer Ausschwemmung von Lymphomzellen in das periphere Blut kommt. Klinisch hat diese Verlaufsform eine bessere Prognose (*Swerdlow et al, 2008*).

Typische Symptome von Patienten mit Mantelzelllymphom sind Müdigkeit, Leistungsminderung und ausgeprägte B-Symptomatik. Auch findet man oft eine Lymphadenopathie sowie Spleno- und Hepatomegalie. Bei Knochenmarkbefall (80-90% der MCL-Patienten) kommt eine Panzytopenie, mit Leukozytopenie, Thrombozytopenie und Anämie hinzu (*Dreyling et al, 2014*). Im Vergleich zu anderen indolenten NHL kommt es beim MCL relativ häufig zu einem extralymphatischen Befall (*Dreyling et al, 2014*). Gleichzeitig wird das Mantelzelllymphom selten in einem frühen Stadium (Ann Arbor I oder II) diagnostiziert (*Jo et al, 2019*).

Die Therapie des Mantelzelllymphoms stellt eine Herausforderung dar. Wichtig für die Wahl der Therapiestrategie sind neben Krankheitsstadium, auch das biologische Alter des Patienten, dessen Allgemeinzustand und das Toxizitätsprofil der geplanten Therapeutika (Abb.1).

Die Erstlinientherapie für symptomatische Patienten beinhaltet eine Kombination aus Chemotherapie und Immuntherapie. Bei Patienten unter 65 Jahren ist die Intensivierung der Induktionstherapie prognoseverbessernd. Die Intensivierung wird über die zusätzliche Gabe von hochdosiertem Ara-C (Cytarabin) mit anschließender autologer Stammzelltransplantation erreicht. Therapiestandard in Europa ist aktuell die Therapie mit R-CHOP (Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon) und R-DHAP (Rituximab, Dexamethason, Hochdosis-Ara-C, Cisplatin) im Wechsel mit anschließender Hochdosistherapie und autologer Stammzelltransplantation (ASZT) (*Dreyling et al, 2014*). Bei

älteren Patienten oder Patienten in reduziertem Allgemeinzustand wird als Therapie oft R-CHOP mit einer Rituximab-Erhaltung eingesetzt (Dreyling et al, 2014).

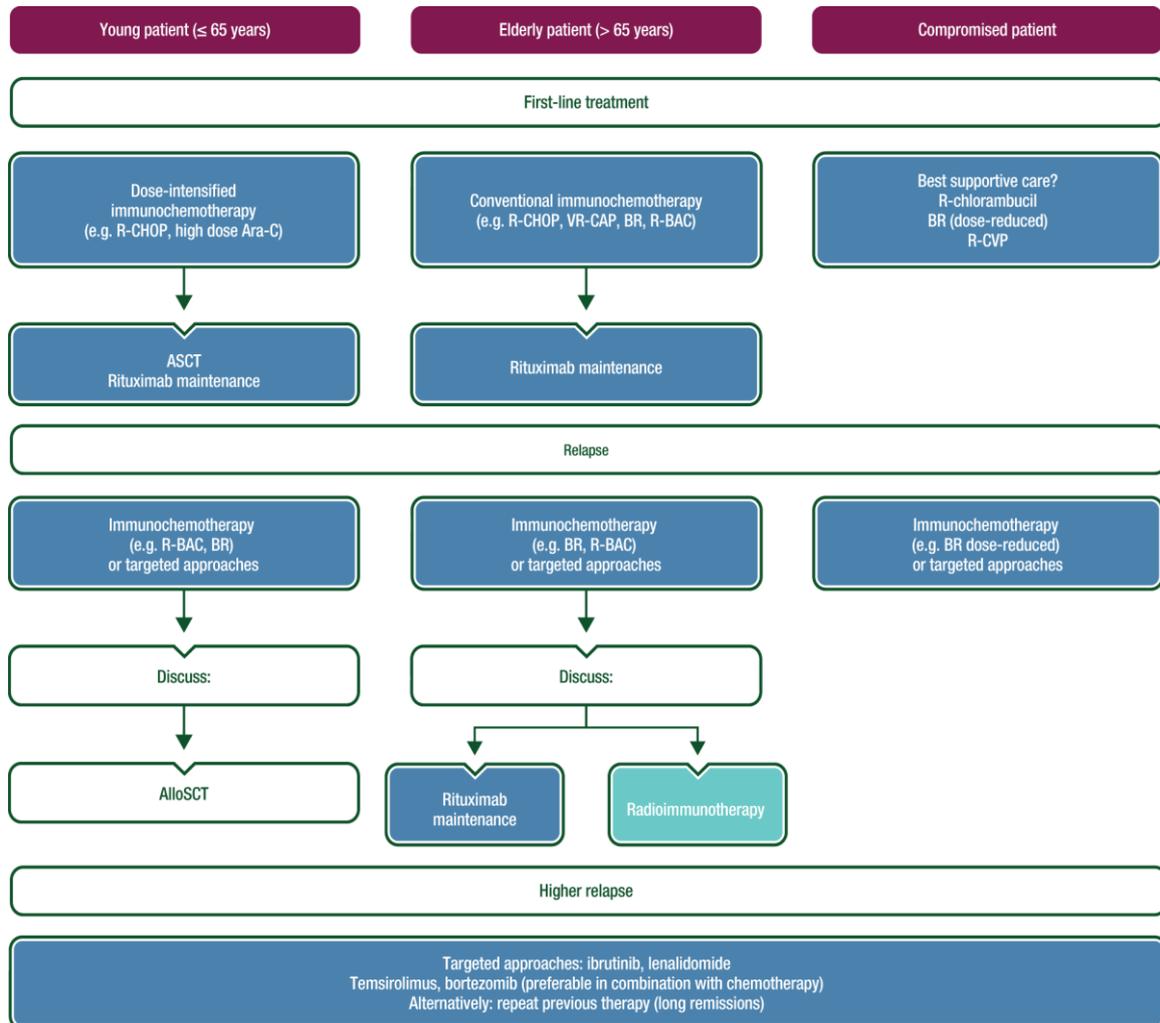


Abbildung 1: Therapieschema Mantelzellymphom: Therapeutic recommendations. AlloSCT, allogeneic stem cell transplantation; ASCT, autologous stem cell transplantation; BAC, bendamustine and cytarabine; BR, bendamustine and rituximab; Ara-C, cytarabine; CHOP, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone; CVP, cyclophosphamide, vincristine and prednisone; R, rituximab; VR-CAP, rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin and prednisone with bortezomib. (Dreyling et al, 2014)

Durch häufig aggressives Wachstum und schlechte Ansprechraten auf die Therapie ist die Prognose schlecht. Das mittlere progressionsfreie Überleben von Patienten mit neu diagnostiziertem MCL liegt bei 64 Monaten bei der Therapie mit R-CHOP (Kluin-Nelemans et al, 2019). Das Mantelzellymphom gehört innerhalb der Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome zu den Tumoren mit der schlechtesten Langzeitprognose. Als klinischer Risiko-Score wurde der MIPI (MCL International Prognostic Index) eingeführt, welcher zur Abschätzung der Prognose den Allgemeinzustand, das Patientenalter, die LDH bei Diagnosestellung und die

Leukozytenzahl berücksichtigt (*Hoster et al, 2008*). Prognostisch wichtig ist außerdem der immunhistologisch bestimmte Proliferationsmarker Ki67 (*Klapper et al, 2009*).

2.3 Die Rolle von Autoantigenen in der Pathogenese von B-Zell-Neoplasien

Zur Entstehung von B-Zell-Neoplasien wurden verschiedene Theorien entwickelt, von denen eine besagt, dass eine chronische Antigenstimulation von B-Zellen über deren B-Zell Rezeptor zu einer gesteigerten Proliferation führt, die über eine nachfolgende Akkumulation von Mutationen in der Entstehung eines malignen Klons resultiert.

Dass B-Zell-Rezeptoren eine wichtige Rolle in der Entstehung von Lymphomen spielen, wurde bereits 1959 von Dameshek und Schwartz vermutet (*Dameshek et al, 1959*). Seitdem ist in verschiedenen Studien immer klarer geworden, dass der B-Zell-Rezeptor-Signalweg wichtig für die Pathogenese der B-Zell-Lymphome ist. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass ein Trigger für diesen Signalweg die Stimulation der B-Zell Rezeptoren durch deren spezifische Antigene ist (*Myklebust et al, 2017*). Diese Antigene können Autoantigene, das heißt körpereigene Strukturen, virale oder bakterielle Antigene sein. Beispielsweise konnte nachgewiesen werden, dass bei 90% der Patienten mit extranodalem Marginalzonenlymphom (EMZL) des Magens eine *Helicobacter pylori* Infektion vorlag (*Parsonnet et al, 1994*). Ein weiterer Hinweis darauf, dass Antigene des Bakteriums *Helicobacter pylori* in der Genese dieses speziellen EMZL eine wichtige Rolle spielen, ist, dass diese EMZL-Zellen mit *Helicobacter-pylori*-spezifischen T-Zellen stimuliert werden können (*Wotherspoon et al, 1991; Parsonnet et al, 1994*). Auch bei der Genese des follikulären Lymphoms konnte eine Antigenstimulation von B-Zell Rezeptoren festgestellt werden. Hierbei können Lektine aus dem umliegenden Gewebe an Oligosaccharide, die beim follikulären Lymphom gehäuft in der variablen Region des BZR vorkommen, binden und so die Proliferation von follikulären Lymphomzellen stimulieren (*Hollander et al, 2017*).

Dieser Theorie folgend wurde im Jose-Carreras-Center für Gen- und Immuntherapien gezielt nach B-Zell Rezeptor Antigenen gesucht, die spezifisch von B-Zell Rezeptoren maligner B-Zell Neoplasien erkannt werden. Bisher konnten für einige Entitäten maligner B-Zell Neoplasien spezifische B-Zell Rezeptor Antigene identifiziert werden. Hierzu zählen Neurabin-I, das von den B-Zell Rezeptoren von etwa 66% aller ZNS-Lymphome erkannt wird (*Thurner et al, 2018*), ARS2, das die B-Zell Rezeptoren von 26% aller diffus-großzelligen B-Zell-Lymphome (DLBCLs) vom ABC Typ bindet (*Pfreundschuh et al, 2015*), Paratarg7 (ehemals SLP2), das das antigene Ziel von 15% der Paraproteine von Plasmazellerkrankungen ist (*Preuss et al, 2011*), sowie LRPAP1, das von 45% der B-Zell Rezeptoren aller Mantelzelllymphome als Antigen erkannt wird (*Thurner et al, 2019*).

LRPAP1 ist die Abkürzung für low density lipoprotein receptor-related protein associated protein1. Dieses Protein funktioniert als Rezeptorantagonist und Chaperon der LDL-Rezeptor-Familie und ist damit Teil des Megalin-Cubilin-Endozytose-Weges (*Williams et al, 1992*). Das zugehörige Gen ist lokalisiert auf dem kurzen Arm von Chromosom 14 (p16.3). LRPAP1 ist insgesamt 357 Aminosäuren groß und hat ein Molekulargewicht von 39kDa (*Korenberg et al, 1994*). Die Epitopregion von LRPAP1, die von den B-Zell Rezeptoren von 45% aller Mantelzelllymphome erkannt wird reicht von den Aminosäuren 263 bis 317.

Durch noch unbekannte Mechanismen kommt es zu einem Verlust der Immuntoleranz der LRPAP1 spezifischen B-Zellen und zu einer chronischen Immunreaktion die gegen LRPAP1 gerichtet ist. Im Laufe der Zeit können in den aktivierten B-Zellen Mutationen akkumulieren und sich so ein maligner B-Zell Klon entwickeln. Es konnte gezeigt werden, dass diese Immunreaktion spezifisch für Mantelzelllymphome ist, da die BZRen anderer B-Zell Lymphom Entitäten keine Reaktivität gegen LRPAP1 zeigen (*Thurner et al, 2019*).

Da es sich bei Mantelzelllymphomen um eine monoklonale Erkrankung handelt, die sich aus einer mutierten Ursprungszelle entwickelt, sollten alle Lymphom Zellen eines Patienten B-Zell Rezeptoren mit gleicher Bindungsaffinität exprimieren. Der BZR stellt damit ein sehr attraktives Ziel für mögliche Therapien von Mantelzelllymphomen dar, da er hoch spezifisch für den malignen Klon ist und sich von den B-Zell-Rezeptoren gesunder B-Lymphozyten unterscheidet. Mit der Identifizierung von LRPAP1 als BZR Antigen von 45% aller Mantelzelllymphome kann diese hochspezifische BZR – Antigen Interaktion für die Entwicklung therapeutischer Formate für das MCL ausgenutzt werden.

2.4 Antikörper – Aufbau

Antikörper sind die humorale Komponente der adaptiven Immunität und werden von B-Lymphozyten nach Differenzierung zu Plasmazellen produziert. Aufgebaut ist ein Antikörper oder auch Immunglobulin aus zwei identischen Schwereketten (H-Polypeptidketten, heavy chain, 50-70kDa) und zwei identischen Leichtketten (L-Polypeptidketten, light chain, 25kDa), die eine Y-förmige Struktur (*Padlan, 1994*) bilden. Beide Ketten werden über Disulfidbrücken verbunden. Die leichte und schwere Kette besteht jeweils aus einem variablen und einem konstanten Anteil. Über den variablen Anteil wird die Bindung des Antikörpers an ein spezifisches Antigen vermittelt. Im Gegensatz dazu ist der konstante Anteil vor allem für Effektormechanismen entscheidend, wie beispielsweise die Aktivierung von Immunzellen oder Komplementfaktoren. Die Ketten liegen nicht linear vor, sondern sind in Domänen mit jeweils ungefähr 120 Aminosäuren unterteilt, die eine Beta-Faltblattstruktur aufweisen. Die leichten Ketten bestehen aus einem variablen und einem konstanten Teil, wohingegen die schweren Ketten aus einem variablen und drei bis vier konstanten Segmenten bestehen.

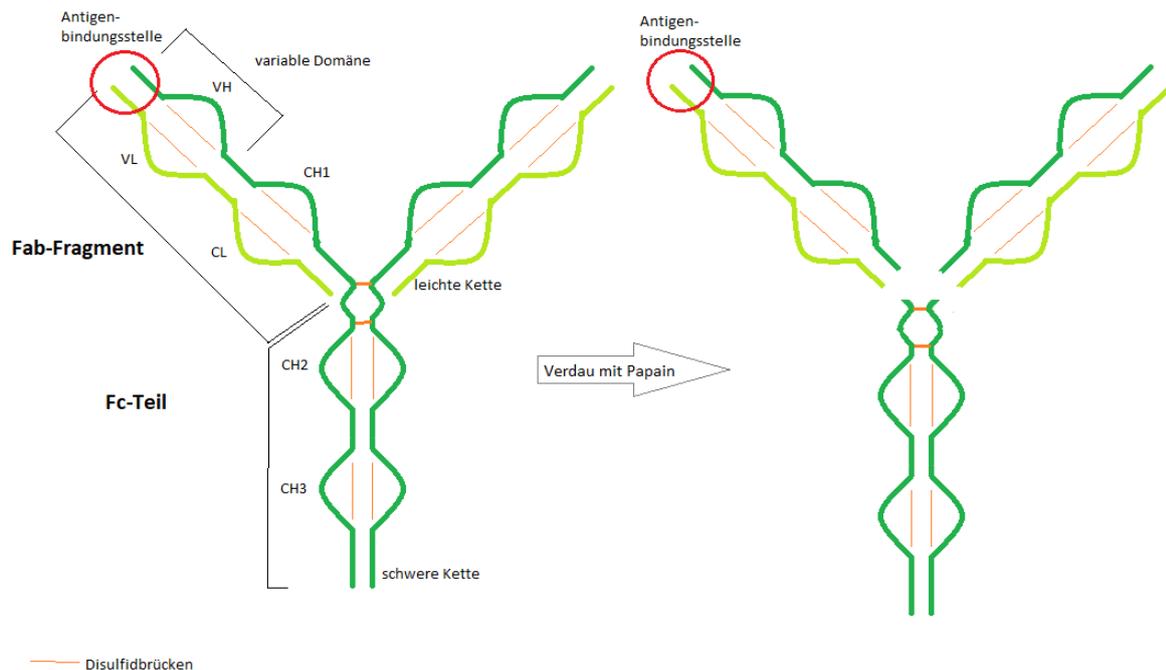


Abbildung 2: Aufbau und Struktur eines Antikörpers und Fab-Fragments

Die variable Region der Schwer- und Leichtketten ist durch genetische Rekombinationsprozesse für jeden Antikörper einzigartig und ermöglicht damit dem Immunsystem eine Vielzahl an Antigenen zu erkennen.

Zu diesen genetischen Rekombinationsprozessen zählt unter anderem das VDJ-Rearrangement. In reifenden B-Lymphozyten werden durch die Rekombination von Keimbahn Genen neue Genabschnitte hergestellt. Für den variablen Teil der Schwere Kette kodiert eine Genregion auf Chromosom 14, die aus verschiedenen Segmenten besteht. Am Anfang des Gens liegen 65 Segmente der Schwere Kette, die als variabel bezeichnet werden (VH), gefolgt von 27 Diversität Segmenten (DH) und sechs Verbindungssegmenten (JH, joining). Durch die hohe Anzahl an verschiedenen Segmenten, die alle miteinander kombiniert werden können, ergeben sich circa 10.000 verschiedene Umlagerungsmöglichkeiten. Für die Bildung eines B-Lymphozyten aus einer hämatopoetischen Stammzelle werden jeweils zufällig ein VH-, DH- und JH-Segment miteinander verknüpft. Dazwischenliegende Chromosomenabschnitte gehen dabei verloren. Die einzelnen Segmente werden durch die VDJ-Rekombinasen RAG-1 und RAG-2 geschnitten und ligiert. RAG-1 und RAG-2 verknüpfen zuerst das zufällig ausgewählte DH- mit einem JH-Segment und die daraus folgende DJ-Sequenz mit einem VH-Segment.

Weitere genetische Prozesse wie das zufällige Einfügen und Entfernen von Basenpaaren während der Rekombination sorgen für eine noch größere Vielfalt an möglichen Gensequenzen für die variable Region von Antikörpern.

Die Abschnitte der variablen Region, die am meisten von diesen Umlagerungsprozessen betroffen sind heißen CDR-Regionen (complementarity determining regions), welche besonders wichtig für die Spezifität der Antikörper sind (Lucas, 2003).

Antikörper können durch enzymatischen Verdau mit Papain in unterschiedliche Fragmente gespalten werden. Nach Papain Verdau wird ein Antikörper in drei Teile gespalten. Es entstehen zwei Antigen bindende Fragmente und ein Fragment, das aus dem Rest der konstanten Region besteht (Abb. 3). Die Antigen-bindenden Teile werden als Fabs (fragment, antigen binding) und der konstante Anteil des Antikörpers als Fc-Region (fragment, crystallizable) bezeichnet.

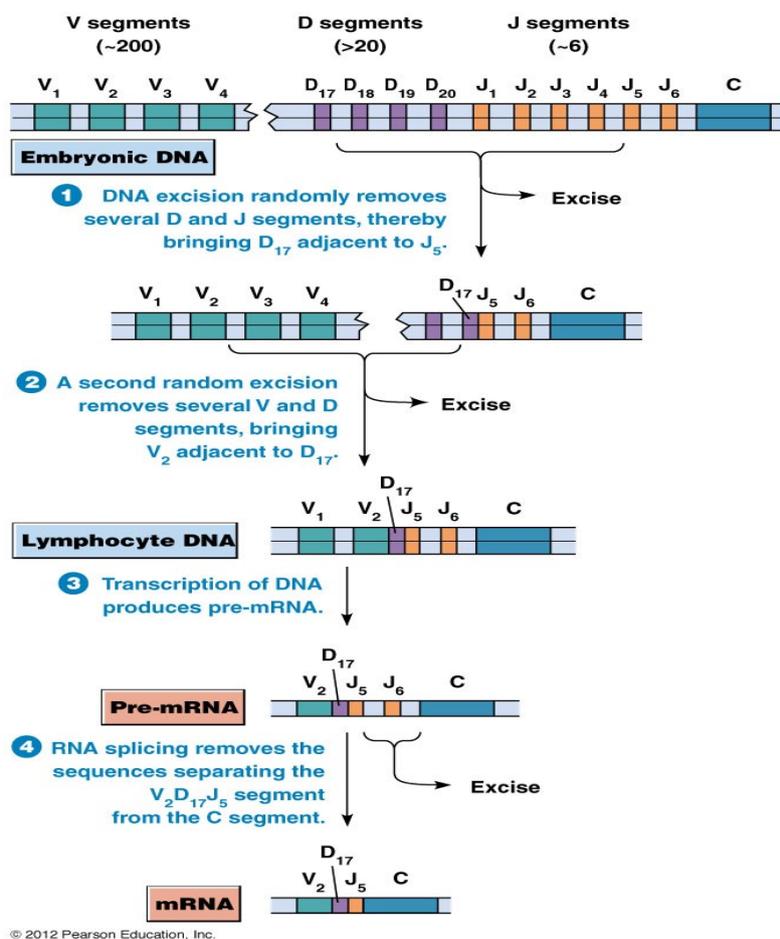


Abbildung 3 VDJ-Rekombination nach Memorial University (Memorial University, Newfoundland and Labrador's University)

2.5 Antikörper – Funktion

Im Körper liegen Antikörper nicht nur gelöst vor, sondern werden auch von reifen B-Zellen als membranständiger Rezeptor (B-Zell Rezeptor, BZR) zur Erkennung des passenden Antigens exprimiert.

Die Antigen-naive B-Zelle zirkuliert im Blut oder lymphatischen Organen, bis sie durch Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen aktiviert wird. Nach der Aktivierung präsentiert die B-Zelle

Peptide dieses Antigens in MHC-II-Komplexen auf der Zelloberfläche und wandert in die Keimzentren von Lymphknoten oder Milz. Die Antigen-präsentierenden B-Zellen werden von T-Zellen erkannt, welche mit ihrem ebenfalls Antigen spezifischen T-Zell Rezeptor an den MHC II/Antigen Komplex binden. Durch diese Bindung werden die CD4+ T-Helferzellen aktiviert. Die Interaktion zwischen der B- und der T-Helferzelle fördert die Proliferation der B-Zellen und die Differenzierung zu Plasmazellen. Diese exprimieren kein membranständiges Immunglobulin (BZR) mehr, sondern produzieren lösliche Immunglobuline (Antikörper), die über ihren variablen Teil das spezifische Antigen erkennen und neutralisieren können.

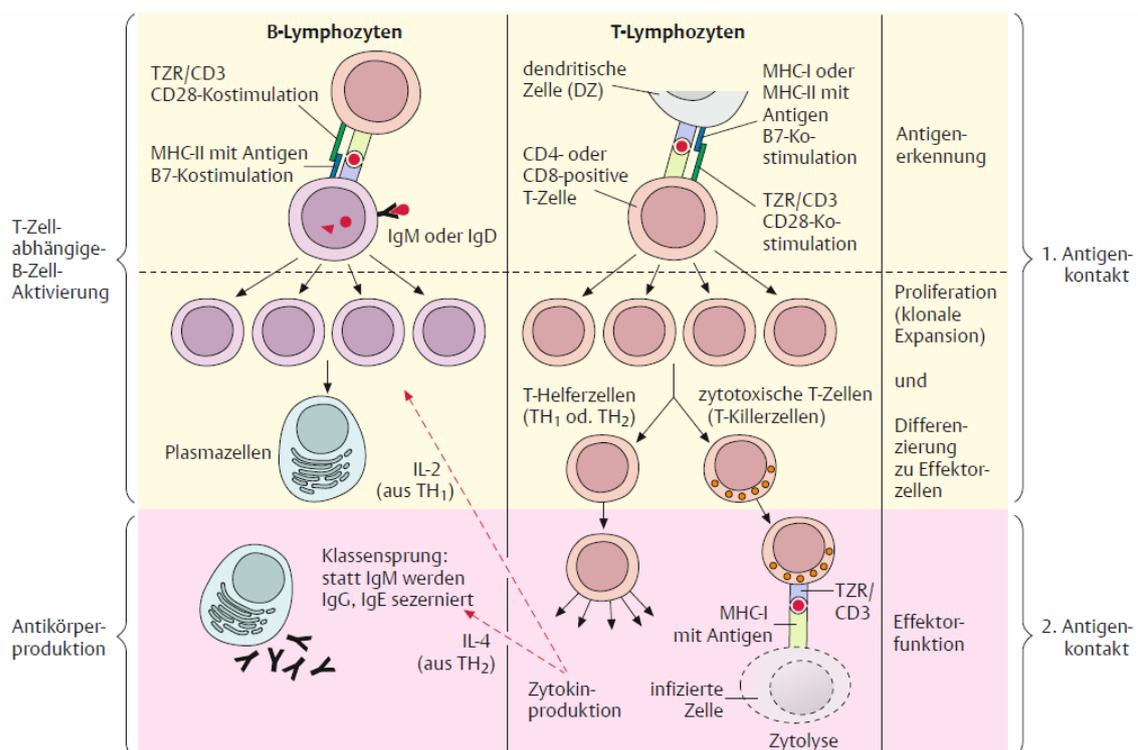


Abbildung 4 T-Zell-abhängige B-Zellaktivierung nach Duale Reihe „Physiologie“ (Duale Reihe „Physiologie“, 2.Auflage, S.213)

2.6 Einsatzgebiete von Antikörpern

Mit Hilfe der Hybridomtechnik (Köhler et al, 1975) können Antikörper, die ein gewünschtes Antigen erkennen, künstlich hergestellt werden. Hierbei werden Versuchstiere (meistens Mäuse) mit einem Antigen, gegen das ein Antikörper entwickelt werden soll, immunisiert. Anschließend werden die nach Immunisierung zahlreich vorkommenden Antigen-spezifischen B-Lymphozyten mit einer immortalisierten, Antikörper produzierenden Plasmazelllinie genetisch kombiniert. Auf diese Weise kann eine Plasmazelllinie generiert werden, die monoklonale Antikörper gegen das immunisierte Antigen produziert. So gewonnene Antikörper können für die Diagnose und Therapie einer Vielzahl von Erkrankungen eingesetzt werden.

Ein diagnostisch erfolgreich verwendeter Antikörper ist beispielsweise Arcitumomab, welcher das Antigen „Carcinoembryonales Antigen“ (CEA) erkennt, das von vielen Tumoren, vor allen Kolonkarzinomen, überexprimiert wird. Durch die Kombination mit einer Single-Photon-Emissionscomputertomographie (SPECT) ermöglicht dieser Antikörper Aussagen zu Tumorlokalisation und dem Vorhandensein von Metastasen (*Goldstein et al, 2009*).

Das größte Feld in der diagnostischen Anwendung von Antikörpern ist allerdings die Immunhistochemie. Mit verschiedenen Binde- und Färbeverfahren können bestimmte Antigene markiert und im Mikroskop sichtbar gemacht werden. In der Tumor- und insbesondere Lymphom Diagnostik können so bestimmte Entitäten voneinander differenziert werden. Beispielsweise ist CD3 ein wichtiger Marker zur Bestimmung von T-Zellen, wohingegen eine positive Färbung mit einem CD20 Antikörper für einen Zellursprung aus der B-Zell-Reihe spricht (*Washington state university, Liste cluster of differentiation*).

Die Liste therapeutisch eingesetzter Antikörper ist lang. Ein Musterbeispiel ist Rituximab, ein CD20-Antikörper, welcher bei der Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen eingesetzt wird (*Kumar et al, 2009*). Außerhalb von Tumortherapien steht mit Abciximab ein Antikörper zur Thrombozytenaggregationshemmung durch Bindung an GPIIb/IIIa zur Verfügung. (*Rote Liste Abciximab*)

Auch stehen Antikörper zur Verfügung, die Wachstumssignale von Tumoren blockieren oder die Neubildung von Blutgefäßen eines Tumors unterbinden. Bevacizumab ist beispielsweise ein Angiogenesehemmer, der spezifisch an VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) bindet (*Presta et al, 1997*) und die Gefäßneubildung hemmt. Der Antikörper ist aktuell für die Therapie von fortgeschrittenen Darm-, Lungen-, Brust-, Nieren-, Eierstock- und Gebärmutterhalstumoren zugelassen (*Fachinformation Avastin*). Da die eingesetzten Antikörper von einem produzierenden Zellklon abstammen werden sie als monoklonale Antikörper bezeichnet.

Monoklonale Antikörper sollen durch Erkennen von tumorspezifischen Antigenen im Idealfall nur die entarteten Tumorzellen angreifen und gelten daher als zielgerichtete Therapien. Allerdings sind tumorspezifische Antigene oft auch in unterschiedlicher Ausprägung auf gesunden Zellen vorhanden, weshalb auch die Therapie mit Antikörpern nicht nebenwirkungsfrei ist und Effekte auf gesunde Zellen haben kann.

Antikörper werden bereits bei vielen verschiedenen Erkrankungen eingesetzt und deren Wirksamkeit wurde in vielen Studien belegt. Die bisherigen Erfolge, zum Beispiel mit Rituximab, belegen, dass diese Form der zielgerichteten Therapie das Langzeitüberleben für Patienten verbessern kann (*Myklebust, J.H., et al., 2017*). Auch gibt es durch die bisher durchgeführten Studien eine Vielzahl an Daten zu den pharmakokinetischen Eigenschaften

von Antikörpern. So verhalten sich unterschiedliche Antikörper, die aber der gleichen Subklasse angehören, z.B. IgG1 Antikörper, pharmakokinetisch sehr ähnlich.

2.7 BARs und mögliche therapeutische Formate

Der in der Lymphom Therapie am häufigsten eingesetzte Antikörper ist Rituximab, welches an das CD20-Antigen bindet (*Reff et al, 1994*). Dieses wird sowohl von gesunden als auch malignen B-Lymphozyten exprimiert. Durch die Bindung von Rituximab an B-Lymphozyten wird eine Immunantwort über die Aktivierung von NK Zellen und dem Komplementsystem induziert, wodurch die Zelle in die Apoptose geführt wird. Gleichzeitig hat Rituximab selbst auch eine direkte zytotoxische Wirkung auf CD20-positive Zellen. Dieses klassische Therapiekonzept, bei dem Antigene von Antikörpern erkannt werden, wird im Rahmen dieser Arbeit als „forward-targeting“ bezeichnet.

Ein neues, vom Jose-Carreras-Centrum entwickeltes, Therapiekonzept verfolgt die Methode des „reverse-targeting“ bei dem ein Antigen, welches an den membranständigen Antikörper (B-Zell-Rezeptor) von B-Zell Lymphom Zellen bindet, verwendet wird. Zu diesen spezifischen Antigenen zählen unter anderen die unter 2.3 beschriebenen Autoantigene, wie LRPAP1 (Mantelzelllymphom), ARS2 (DLBCL) und Neurabin-I (primäres ZNS-Lymphom).

Der BZR der Lymphomzellen ist durch den Ursprung aus einer einzigen entarteten Zelle bei allen Tumorzellen identisch, unterscheidet sich aber von den BZRen auf gesunden Zellen. Durch dieses neue Therapiekonzept des „reverse targeting“ ist es möglich, ausschließlich maligne Zellen zu entdecken und zu zerstören. Die Antigene, die für das reverse-targeting verwendet werden, haben vom Jose-Carreras-Centrum den Namen „BARs“ bekommen, was für **B**-cell receptor antigen for reverse targeting steht (*Pfreundschuh et al, 2015*).

Auf welche Weise und in welchem Format das Mantelzelllymphom BAR LRPAP1 am besten zur Therapie dieser Erkrankung eingesetzt werden kann ist unklar. Da das oben beschriebene Antikörper Format pharmakokinetisch bereits ausführlich beschrieben ist, erscheint es sinnvoll ein ähnliches Format auch für ein BAR Therapieformat zu nutzen. Eine weitere erfolgreich eingesetzte Therapiestrategie besteht in der Kopplung von Antikörpern an Toxine (Immuntoxine). Nach Internalisierung des Immuntoxins wird die Wirkstoffkomponente freigesetzt und kann zytotoxisch wirken. Ein Beispiel für ein zu verwendendes Toxin ist das Pseudomonas Exotoxin A (ETA), das in der Zelle an den Elongationsfaktor 2a bindet und so die Proteinsynthese hemmt, was zum Zelltod führt (*Hwang et al, 1987*).

Eine Strategie zur therapeutischen Nutzbarmachung von BARs könnte also in deren Integration in Immuntoxine liegen.

2.8 Ziel dieser Arbeit

Das Mantelzelllymphom gehört zu den NHL mit der schlechtesten Langzeitprognose und die bisherigen Therapieoptionen erzielen keine Langzeitremission.

Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, ein BAR-body im Fab-Format mit dem Antigen LRPAP1 als variable Region zu entwickeln, welches als neue gezielte Therapiemöglichkeit für das Mantelzelllymphom eingesetzt werden kann. Um das ursprüngliche Fab Format in seiner Konformation zu erhalten, musste das LRPAP1 Epitop in seiner Größe der zu ersetzenden variablen Region angepasst werden. Hierfür wird auf drei unterschiedliche Weisen (N-terminal verlängert, C-terminal verlängert, N- und C-terminal verlängert) die LRPAP1 Epitopregion der Größe einer variablen Region angepasst. Das LRPAP1 BAR-body soll im Fab-Format hergestellt, an das Pseudomonas Exotoxin A (ETA´) gekoppelt und auf seine Bindung an und Wirkung gegen MCL Zellen getestet werden.

III Material

Die nachfolgenden Experimente sind durch die Ärztekammer des Saarlandes geprüft und genehmigt worden (Ethikantrag #147/17).

3.1 Laborgeräte

Die in der Durchführung dieser Arbeit benutzten Laborgeräte sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet. Dabei wurden nur die Geräte mit relevanter Funktion für die Arbeit berücksichtigt. Weitere Geräte wie Kühlschränke, Zentrifugen etc. wurden der Auflistung nicht hinzugefügt.

Gerät	Firma
Agarose-Gelkammer	Bio-Rad (München, Germany)
BD FACS Canto™ Flow Cytometer	BD Biosciences (Heidelberg, Germany)
Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems	Bio-Rad (München, Germany)
Neubauer-Zählkammer	Eppendorf (Hamburg, Germany)
Nano-Drop Spectrophotometer	Peqlab Biotechnologie (Erlangen, Germany)
Photometer Gene Quant pro	Amersham plc (Little Chalfont, UK)
Trans-Blot SD, semi-dry transfer cell	Bio-Rad (München, Germany)
Wallac Victor ² , 1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer (Rodgau, Germany)
Western-Blot-Gelkammer	Bio-Rad (München, Germany)
Veriti, 96 Well Thermal Cycler	Applied Biosystems (California, USA)

Table 1: verwendete Laborgeräte

3.2 Verbrauchsmaterialien

Name	Firma
Amersham Hyperfilm ECL, high performance chemiluminescence film	GE Healthcare (Little Chalfont, UK)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck (Darmstadt, Germany)
Blotterpapier, 703	VWR (Pennsylvania, USA)
Buffer O (orange)	Fermentas (Massachusetts, USA)
Buffer R (red)	Fermentas (Massachusetts, USA)
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche Applied Science (Penzberg, Germany)
Desoxytrinukleotide (dNTPs)	Roche Applied Science (Penzberg, Germany)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich (Hamburg, Germany)
Entwicklerlösung 1: LumiGLO®, Reagent A (20%)	Cell signaling Technology (Frankfurt am Main, Germany)
Entwicklerlösung 2: Peroxide Reagent B (20x)	Cell signaling Technology (Frankfurt am Main, Germany)
Immobilon-P Transfer Membranes, PVDF	Merck (Darmstadt, Germany)
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Sigma Aldrich (Hamburg, Germany)
Kanamycin (25 µg/ml)	Sigma Aldrich (Hamburg, Germany)
PCR-Puffer	Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA)
RPMI-1640 Medium	Pan Biotech (Aidenbach, Germany)
Saponin 5%	Sigma Aldrich (Hamburg, Germany)
TALON beads	Takara Bio (Saint-Germain-en-Laye, France)
Triton X-100	Sigma Aldrich (Hamburg, Germany)
T4-DNA-Ligase Buffer	Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA)

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

3.3 Puffer und Lösungen

Agarose-Gel 1% und 2%	Bestehend aus: Agarose, TAE, Ethidiumbromid
Ampicillin-Agarplatten (für 1000ml)	16 g Tryptone 10 g Hefe Extrakt 5g Natriumchlorid (NaCl) 15 g Agar 975 ml Aqua dest. 23 ml Glucose 40% 1 ml Ampicillin (100 µg/ml)
Laemmli-Puffer (10x für 1000ml Stocklösung)	144 g Glycin 30,34 g TRIS 10 g Natriumdodecylsulfat (SDS) ad 1 l Aqua dest.

Lysogeny broth-Medium (LB-Medium) (1000ml)	<p>10 g Tryptone 5 g Hefe Extrakt 10 g Natriumchlorid (NaCl) ad 1 l Aqua dest. pH 7,0 mit NaOH einstellen autoklavieren + Kanamycin (25 µg/ml)</p>
Lysepuffer PBS (pH8) (1000 ml)	<p>8 g NaCl 0,2 g KCl 1,14 g NaH₂PO₄ 0,24 g KH₂PO₄ ad 800 ml Aqua dest.</p>
Polyacrylamid-Gel 12% (5 ml)	<p>1,7 ml Aqua dest. 2,0 ml 30% Acrylamide mix 1,3 ml 1,5 M TRIS (pH 8,8) 50 µl 10% Natriumdodecylsulfat (SDS) 50 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS) 2 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED)</p>
Polyacrylamid-Gel Stack (1 ml)	<p>680 µl Aqua dest. 170 µl 30% Acrylamide mix 130 µl 1,0 M TRIS (pH 6,8) 10 µl 10% Natriumdodecylsulfat (SDS) 10 µl 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS) 1 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED)</p>
Probenpuffer (10ml)	<p>0,6 ml TRIS 1M pH 6,8 2,5 ml Glycerol 100% 2 ml 10% Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,5 ml Bromophenolblau 2% 3,9 ml Aqua dest.</p>
SOC-Medium (1000ml)	<p>20 g Tryptone 5 g Hefe Extrakt 5 g 10 mM Natriumchlorid (NaCl) 10 ml 250 mM Kaliumchlorid (KCl) pH 7,0 mit NaOH einstellen ad 1 l Aqua dest. autoklavieren + 5 ml 2M Magnesiumchlorid (MgCl₂)</p>

Transferpuffer 1x (120ml)	0,3 g TRIS 1,44 g Glycin 20 ml Methanol ad 100 ml Aqua dest.
TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	242 g TRIS 57,1 ml Essigsäure (CH ₃ COOH) 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
TRIS-Buffer-Saline (TBS) (1000ml)	8,75 g Natriumchlorid (NaCl) 6,05 g TRIZMA Hydrochlorid 1,4 g TRIS 1 l Aqua dest.
2xTY-Ampicillin-Agarplatten	16 g Tryptone 10 g Hefe Extrakt 5 g Natriumchlorid (NaCl) ad 1 l Aqua dest. autoklavieren + 20 ml Glucose 40% + 1 ml Ampicillin (100 µg/ml)
2xTY-Medium	16 g Tryptone 10 g Hefe Extract 5 g Natriumchlorid (NaCl) ad 1 l Aqua dest. 2% Glucose + Ampicillin (100 µg/ml)

Tabelle 3: Puffer und Lösungen

3.4 Kits

Cytotoxicity Detection Kit ^{PLUS} (LDH)	Roche Applied Science (Penzberg, Germany)
ECL-Kit	Bio-Rad Laboratories (Hercules, California, U.S.A.)
High Pure Isolation Kit	Roche Applied Science (Penzberg, Germany)
Plasmid DNA Purification	Macherey-Nagel (Düren, Germany)
TOPO TA Cloning Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research (California, USA)

Tabelle 4: verwendete Kits

3.5 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von Sigma-Aldrich (Missouri, USA) hergestellt, in lyophilisierter Form versendet und in Aqua dest. aufgelöst, sodass sie in einer Konzentration von 10 mM vorlagen.

	Name	Sequenz (5'-3')
schwere Kette	LRPAP1 AA263 NcoI-s	CCATGGCCCTGGCGCACTCCGCCA AC
	LRPAP1 AA230-NcoI-s	CCATGGCCATCAACCAGGGCCTGG AC
	LRPAP1 AA198-NcoI-s	CCATGGCCGAAATCCACGAGAACGT C
	LRPAP1 AA350 BstE2-as	GGTGACCCCGGAGATCCTGCCGGA CAC
	LRPAP1 AA317-BstE2-as	GGTGACCACACGCTCGCCGTCGCC
leichte Kette	LRPAP1 AA263-ApaI1-s	GTGCACAGCTGGCGCAGTCCGCCA AC
	LRPAP1 AA230-ApaI1-s	GTGCACAGATCAACCAGGGCCTGG AG
	LRPAP1 AA198-ApaI1-s	GTCCACAGGAAATCCACGAGAACGT C
	LRPAP1 AA350-Xho1-as	CTCCAGGGAGATCCTGCCCGACAG
	LRPAP1 AA317-Xho1-as	CTCGAGCACACGCTCGCCGTCGCC
Kontrolle pCES-ETA'- Klonierung	3'Anti-Sense KDEL mut.	GCGAATTCAAGCTTCTAGGCTTGGC CAGTGGCATCCTCCTCATCTTC
Kontrolle pCES- Klonierung schwere Kette	CH1 3'	TGGACGCCGCTGGTCAGGGC
Kontrolle pCES-ETA'- Klonierung	CH1 5'	CGGGACTGGTCGCCGCAGGT
Identifizierung rekombinanter Klone im TA-Vektor	M13 forward primer	GTTTTCCCAGTCACGAC
Identifizierung rekombinanter Klone im TA-Vektor	M13 reverse primer	CAGGAAACAGCTATGAC

Kontrolle Klonierung Kette	pCES- leichte	kappa-antisense-Primer	TCCAGATTTCAACTGCTCGTC
----------------------------------	------------------	------------------------	-----------------------

Tabelle 5: Primer

3.6 Enzyme

Die folgenden für diese Arbeit verwendeten Enzyme wurden über Fermentas (Massachusetts, USA) bezogen und haben eine Konzentration von 10 U/μl: NcoI, BstEII, ApaL1, Xho1, Not1, EcoR1, T4-Ligase, FastAP.

Die AmpliTaq Gold DNA Polymerase wurde von Thermo Fischer Scientific (Massachusetts, USA) erworben.

3.7 Antikörper

Name	Firma	Wirkweise	Verdünnung
Anti-His-Antikörper Allophycocyalin (APC)	Bio-Rad Laboratories (California, USA)	Bindet an His-Tag Allophycocylain fluoresziert bei der Analyse im FACSCanto	1:2000
Penta-His Antibody, BSA-free, mouse monoclonal IgG1	Qiagen (Hilden, Germany)		
Goat Anti-Mouse IgG (H+L) HRP Conjugate	Bio-Rad Laboratories (California, USA)	HRP oxidiert bei Kontakt mit Luminol	1:3000

Tabelle 6: Antikörper

3.8 Vektoren

Vektoren sind Transportmoleküle, die für die Übertragung von Nukleinsäuren in Fremdorganismen genutzt werden. Es können Klonierungsvektoren von Expressionsvektoren unterschieden werden. Klonierungsvektoren werden unter anderem für die Vervielfältigung von DNA Fragmenten genutzt, Expressionsvektoren werden für die Herstellung von Proteinen aus zuvor eingeführter DNA verwendet. Die eingeführte DNA wird als Insert bezeichnet.

Name	Firma	Anwendung
TOPO® TA Cloning® Vektor	Invitrogen (Carlsbad, USA)	Klonierungsvektor
pCES1-Vektor	Hoogenboom (<i>Hoogenboom et al, 1991</i>)	Expressionsvektor

Tabelle 7: Vektoren

3.8.1 TA-Vektor

Der pCR 2.1-Vektor ist ein TA-Vektor und wurde in dieser Arbeit als Vektor zur Vervielfältigung von DNA Fragmenten eingesetzt. In dem Vektor sind Resistenzgene gegen Ampicillin und Kanamycin enthalten, was die Selektion auf LB-Ampicillin-Agarplatten ermöglicht. Die Insertionsstelle des pCR 2.1-Vektor endet an beiden DNA-Strängen mit einem 3' Deoxythymidin (T), was die Ligation von PCR Produkten, die mit Taq Polymerase amplifiziert wurden und daher ein 5' Deoxyadenosin aufweisen, erlaubt. Für weitere Klonierungsschritte enthält der Vektor mehrere Schnittstellen für Restriktionsenzyme. Um eine möglichst einfache und schnelle Ligation zu ermöglichen, enthält der TOPO® TA Cloning® Vektor an den T-Überhängen das Enzym Topoisomerase, das die Integrierung des PCR Produkts in den Vektor katalysiert (siehe Abb. 6).

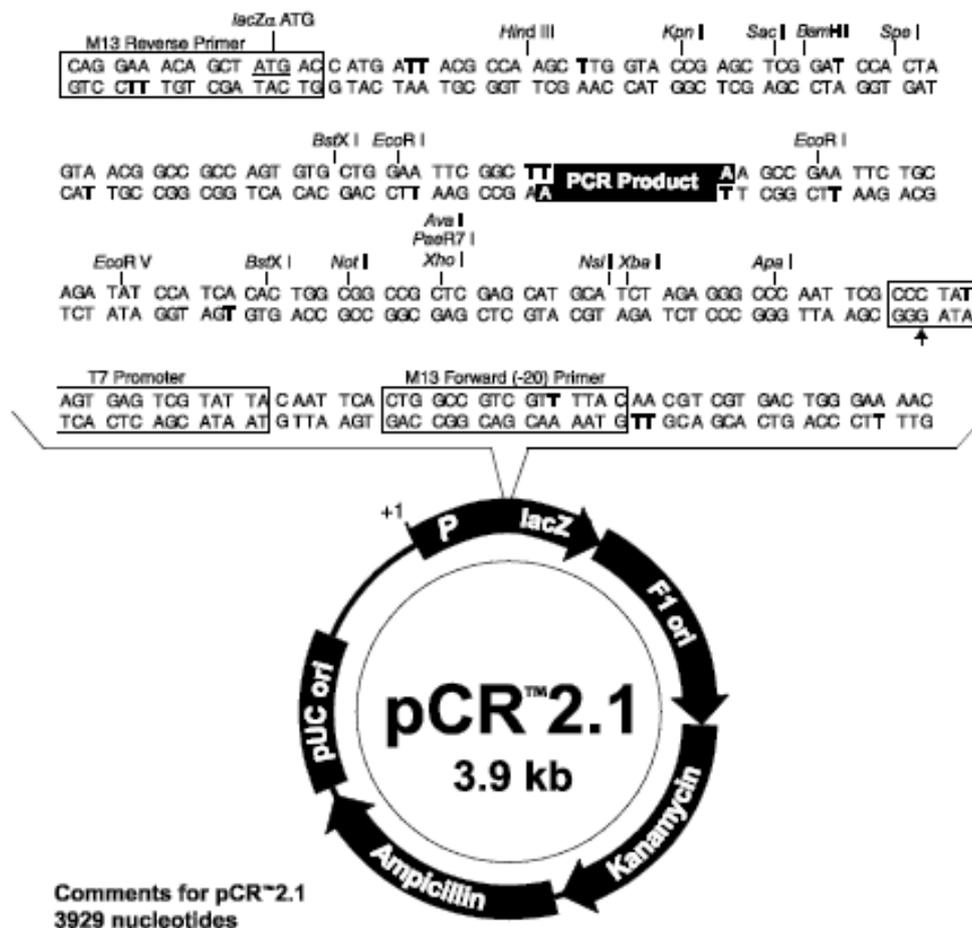


Abbildung 5: TA-Vektor (TOPO® TA Cloning® Kit)

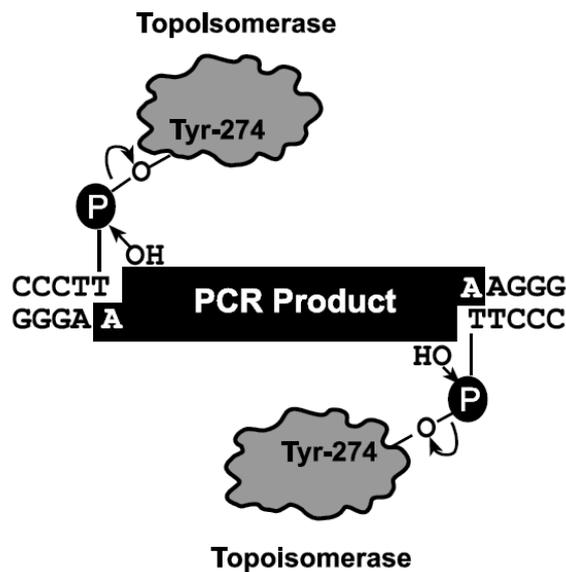


Abbildung 6: TA-Vektor 2 (TOPO® TA Cloning® Kit)

3.8.2 pCES1-Vektor

Als Expressionsvektor wurde der pCES1-Vektor verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Phagemid Vektor von 6,4 kb Länge, der von Hoogenboom et al (*Hoogenboom et al, 1991*) hergestellt und dem Jose-Carreras-Zentrum in Homburg zur Verfügung gestellt wurde.

Der pCES1-Vektor erlaubt die Produktion von Antigen-bindenden Antikörper Fragmenten (Fabs). Der ursprüngliche Verwendungszweck lag in der Präsentation von Fabs auf der Oberfläche von Phagen, weshalb in dem Vektor das Bakteriophagen Gen III (gIII), das für ein Oberflächenprotein von Phagen kodiert, enthalten ist (siehe Abb. 7). Dadurch, dass ein Amber Stopcodon (amber) vor der gIII Sequenz integriert ist, wird das Phagenprotein nicht exprimiert, wenn Bakterien zur Proteinexpression verwendet werden, die dieses Stopcodon auch als solches erkennen (non-suppressor E. coli Stamm). Die vor dem Stopcodon liegenden Sequenzen können jedoch abgelesen und als lösliche Fabs exprimiert werden. Abbildung 7 zeigt eine Skizze des pCES1 Vektors. Die Polylinkerregion umfasst zwei Signalsequenzen (S), die konstante Domäne der leichten Immunglobulin Kette (C_k), Ribosomenbindungsstellen (rbs), die konstante γ 1 Domäne der schweren Immunglobulin Kette (CH₁), ein Hexahistidin-Tag (H6) und eine von c-myc abgeleitete Sequenz (tag). Gene beliebiger variabler Domänen können als ApaLI-XhoI-Fragmente (VL) und NcoI-BstEII-Fragmente (VH) in den pCES1-Vektor kloniert werden. Die Expression des bicistronischen Operons wird durch den LacZ-Promotor (pLacZ) gesteuert (*Hoogenboom et al, 1991*).

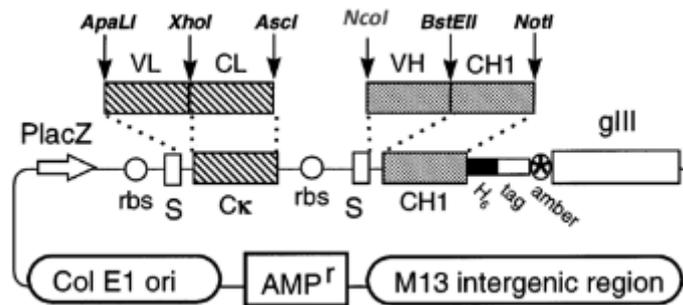


Abbildung 7: pCES1-Vektor (Hoogenboom et al, 1998)

3.8.3. pCES-ETA'-Vektor

Der pCES-ETA'-Vektor (Laborbezeichnung: -VK ETA PCES) entspricht weitgehend dem Aufbau des pCES1 Vektors, enthält aber zusätzlich die DNA Sequenz für ETA', eine verkürzte, hochwirksame Form des Pseudomonas Exotoxins als Wirkkomponente. Die für ETA' kodierende DNA, versehen mit den Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen NotI (5') und EcoRI (3'), wurde durch die Firma Gencust (Boynes, France) synthetisiert und anschließend von unserem Labor in den pCES1-Vektor „in frame“ an das Ende der schweren Kette (CH1) kloniert.

3.9 Bakterien

Kompetente DH5α-Bakterien (Escherichia coli Stamm, E. coli) wurden für Klonierungs- und Subklonierungsschritte verwendet. Die Proteinexpression erfolgte in TG1 E. coli-Bakterien (non-suppressor E. coli Stamm).

3.10 Zellen

Für diese Arbeit wurden Zellen der Zelllinie MAVER1 und Granta519 verwendet. Beides sind Mantelzelllymphom Zelllinien. Zellen der MAVER1 Zelllinie wurden aus dem peripheren Blut eines 77 jährigen Patienten mit leukämischem Mantelzelllymphom generiert, enthalten die Translokation t(11;14) und exprimieren einen BZR mit Reaktivität gegen LRPAP1 (Zamo et al, 2006).

Zellen der Zelllinie Granta519 stammen von einer Patientin mit leukämischem Mantelzelllymphom, sind EBV positiv und exprimieren einen BZR, der nicht LRPAP1 bindet (Rudolph et al, 2004).

IV Methoden

4.1 Agarose Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäure Fragmenten

Die Agarose Gelelektrophorese nutzt die negative Ladung von Nukleinsäuren (DNA und RNA) zur Größenbestimmung von Nukleinsäurefragmenten. Hierfür werden die zu messenden Nukleinsäure Fragmente in einem Agarose-Gel, an das ein elektrisches Feld angelegt ist, aufgetrennt. Die negativ geladenen Nukleinsäuren bewegen sich in dem elektrischen Feld durch das leitende Gel dem Pluspol entgegen, was je nach Größe der Nukleinsäuren mit unterschiedlicher Geschwindigkeit geschieht. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid (auch Ethidium) bindet durch Interkalation zwischen die Basen der Nukleinsäuren wodurch dessen Fluoreszenz im Vergleich zu nicht gebundenem Ethidiumbromid stark erhöht wird. Nach Anregung mit ultraviolettem Licht können DNA Banden durch das fluoreszierende Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden, die hell leuchtend vor dem Hintergrund des restlichen Gels erscheinen. Mit Hilfe dieses Verfahrens kann die Größe von Nukleinsäure Fragmenten bestimmt werden, was eine Kontrolle der zuvor durchgeführten Klonierungsschritte erlaubt.

Für diese Arbeit wurden folgende Agarosegele verwendet:

- 1%-Gel: 1,5 g Agarose werden in 150 ml kochendem TAE aufgelöst. Nach dem Abkühlen werden 75 µl Ethidiumbromid hinzugegeben.
- 2%-Gel: 3 g Agarose werden in 150 ml kochendem TAE aufgelöst. Nach dem Abkühlen werden 75 µl Ethidiumbromid hinzugefügt.

Als Elektrophorese Puffer wird 1x angesetzter TAE-Puffer verwendet. 10 µl der Nukleinsäure Proben werden mit 1-2 µl Färbelösung inkubiert und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Nukleinsäuren werden bei einer angelegten Spannung von 100 V für ca. 30 min in der Elektrophorese Kammer aufgetrennt und zur Dokumentation fotografiert.

4.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ermöglicht die gezielte Amplifikation von DNA-Fragmenten bis zu einer maximalen Größe von etwa 20kb. Der zu amplifizierende DNA Bereich wird durch zwei Primer definiert. Dies sind kurze DNA Fragmente, die komplementär an die nach Denaturierung einzelsträngige DNA binden. Von den Primern ausgehend verlängert die DNA-Polymerase die DNA in 5' - 3' Richtung. Die Vervielfältigung der doppelsträngigen DNA verläuft exponentiell und wird in einem Thermocycler durchgeführt. Der Thermocycler erhitzt und kühlt in mehreren Zyklen auf die jeweils gewünschte Temperatur und verhindert durch einen beheizbaren Deckel mögliche Verdunstung (*Rassow, 2006*).

Ein PCR Zyklus besteht aus Denaturierung, Primer Hybridisierung (Annealing) und Strangverlängerung (Elongation).

Für diese Arbeit wurde die Amplifikation von DNA Fragmenten in einem Veriti, 96 Well Thermal Cycler von Applied Biosystems mit folgenden programmierbaren Arbeitsschritten durchgeführt:

- Denaturierung bei 95°C für 7 min: Initiale DNA-Denaturierung und Aktivierung der Taq-Polymerase.
- Denaturierung bei 95°C für 30sec: Durch die hohe Temperatur werden die Wasserstoffbrücken zwischen den DNA-Strängen aufgebrochen und es liegen DNA-Einzelstränge vor.
- Annealing bei 60°C für 1 min: In diesem Schritt lagern sich die Primer an die komplementären DNA-Einzelstränge und bestimmen somit den Startpunkt der Synthese.
- Elongation 72°C: Hierbei verlängert die AmpliTaq Gold DNA Polymerase durch Einbau von freien Nukleotiden den neuen komplementären DNA-Strang. Die Elongationszeit ist abhängig von der Größe des PCR-Produktes. Sie beträgt in der Regel eine Minute pro 1000 Basenpaare.
- Die letzten drei Schritte werden für insgesamt 33 Zyklen wiederholt.

Für einen einzelnen PCR Ansatz werden folgende Komponenten und Mengen verwendet:

- 0,4 µl dNTP's (10mM)
- 3 µl PCR – Puffer
- 0,4 µl AmpliTaq Gold DNA Polymerase (5 U/µl)
- 0,1 µl Primer 1 sense (10mM)
- 0,1 µl Primer 2 antisense (10mM)
- DNA:
 - o 1 µl DNA (Konzentration nicht bestimmt)
 - o DNA von Bakterien Kolonien (Colony-PCR): Hierfür wurde von einzelnen Kolonien Material über eine Pipettenspitze dem Ansatz hinzugefügt
- Aqua dest. bis zu einem Gesamtvolumen von 30 µl.

4.3 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

DNA kann durch Restriktionsenzyme an Stellen mit einer bestimmten Sequenz geschnitten werden. Verschiedene Restriktionsendonukleasen erkennen für sie spezifische Basensequenzen, meist Palindrome, in der DNA-Doppelhelix, die von diesen durch Hydrolyse von Phosphodiesterbindungen durchtrennt werden. Dadurch entstehen Restriktionsfragmente. Je nach Enzym können „sticky ends“ (einzelsträngig überhängende Basen an 3'- oder 5'-Enden) oder „blunt ends“ (glatt durchtrennter DNA Doppelstrang ohne überhängende Enden) entstehen.

Für die Klonierungen wird der Vektor mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geöffnet und das jeweilige neue DNA-Fragment integriert. Durch die Wahl zweier verschiedener Restriktionsendonukleasen kann die Orientierung der einzufügenden DNA, beispielsweise von PCR-Fragmenten, gesteuert werden.

Für einen Restriktionsverdau (30µl Ansatz) werden folgende Komponenten und Mengen verwendet:

- 10-25µl DNA (abgängig von Probenkonzentration)
- 3 µl 10x Buffer, passend zum Restriktionsenzym laut Fermentas (Massachusetts, USA)
- Aqua dest. bis zu einem Volumen von 28µl
- Je 1 µl beider Restriktionsenzyme
- Inkubation für eine Stunde bei 37°C

Nach 50 Minuten im Brutraum wird mit 1µl Alkalische Phosphatase (fast AP) der Vektor 10 Minuten bei 37°C dephosphoryliert, um bei nachfolgenden Ligationen eine Rezirkulation des Vektors zu verhindern. Durch einen Hitzeschritt (20 Minuten bei 80°C oder Einfrieren über Nacht) wird die Enzymaktivität gestoppt. Im Anschluss wird der präparierte Vektor über ein Agarosegel aufgereinigt.

4.4 Ligation

Mit der Ligation kann ein DNA Fragment in ein zuvor mit Restriktionsenzymen geschnittenen Vektor eingefügt werden. Die im Verdau durch Restriktionsendonukleasen entstandenen Enden der DNA-Fragmente und des Vektors lagern sich über Wasserstoffbrückenbindungen zusammen. Die T4-Ligase katalysiert an diesen Stellen die Bildung von Phosphodiesterbindungen und verbindet Insert und Vektor kovalent.

Für diese Arbeit wurde folgender Ligationsansatz verwendet und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert:

- 1 µl Vektor (50ng)
- 2 µl Insert (Verhältnis 1:3 zu Vektor; Mengenerrechnung über www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_input.html)
- 1 µl T4-Ligase-Puffer
- 1 µl T4-Ligase
- 5 µl Aqua dest.
- Inkubation für eine Stunde bei 37°C

4.5 Transformation

Als Transformation wird die Aufnahme eines Vektors durch kompetente Bakterienzellen bezeichnet. Kompetent bedeutet in diesem Zusammenhang die Eigenschaft des Bakteriums, fremde DNA aufnehmen zu können.

Für die Arbeiten mit dem TA-Vektor wurde dieser in kompetente E.-coli-Bakterien des Stammes DH5alpha transfiziert. Der pCES1-Vektor wurde in E.-coli-Bakterien des TG1-Stammes überführt. Die Transformation erfolgte unter den nachstehenden Bedingungen:

Der 10 µl Ansatz aus der Ligation wurde für die Transformation mit 100 µl Bakterien gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Minute im Wasserbad bei 42 °C wurde der Ansatz für fünf Minuten auf Eis inkubiert. Nach Ausplattieren auf LB-Ampicillin-Agarplatten (E.coli-Bakterien DH5alpha) oder 2TY-Platten (E.coli-Bakterien TG1) inkubierte die Platte bei 37 °C über Nacht.

4.6 Bakterienkultur

Zum Animpfen der Bakterienkultur wurde eine Kolonie mit einer Impföse von der Platte in eine Flüssigkultur (Antibiotikaversetztes Medium) überführt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert.

4.7 DNA-Isolation

Die Isolation der DNA aus Bakterien erfolgte entweder mit dem „High Pure Isolation Kits“ (Roche Applied Science) oder mit dem „Plasmid DNA Purification Kit“ (Macherey-Nagel) nach dem Protokoll der Hersteller.

Gemessen wurde die Konzentration der isolierten DNA über die Absorption bei 260nm mittels Photometrie, wobei $1OD_{260} = 50\mu\text{g DNA/ml}$ entspricht. Der Quotient $260/280\text{nm}$ ist ein Maß für die Reinheit der DNA und sollte bei 1,8 liegen.

4.8 DNA Aufreinigung

Um aus dem 1% Agarosegel die DNA-Bande zu isolieren, erfolgte die Aufreinigung und Extraktion nach Anleitung des Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Firma Zymo Research).

Wie unter „4.7 DNA-Isolation“ beschrieben, wurden die Proben nach Aufreinigung im Photometer auf ihre DNA-Konzentration untersucht.

4.9 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden von SEQ-IT GmbH&Co.KG (Kaiserslautern) kommerziell nach der Sanger Methode sequenziert und mit der Software „Chromas“ Version 2.2 (Technelysium Pty. Ltd.) ausgewertet.

4.10 Induktion der Proteinproduktion

Eine 2ml Vorkultur wird mit einer Einzelkolonie des gewünschten Klones angeimpft und über Nacht wachsen gelassen. Die 50ml Hauptkultur (2xTY-Medium, 500 µl 40 % Glucose, 50 µl Ampicillin (100 µg/ml)) wird 1:100 aus der Vorkultur angeimpft und bis zu einer Zelldichte OD_{600} 0,6-0,8 wachsen gelassen, bevor mit 4µl IPTG (Isopropylthiogalactosid, 2mM) die Proteinexpression induziert wird. Die weitere Inkubation erfolgt für vier Stunden bei 30°C. Hiernach wird die Kultur in 2 ml-Eppendorf Gefäße umgefüllt und bei 13000rpm für eine Minute zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bis zum nächsten Arbeitsschritt bei -20°C eingefroren.

IPTG bewirkt, dass das bicistronische Operon in dem pCES1 Vektor, welches die Sequenz für ein Fab Fragment enthält, abgelesen wird und lösliche Fabs produziert werden. Dies geschieht durch Bindung von IPTG an den Lac Repressor. Dies aktiviert den LacZ-Promotor, wodurch die Proteinexpression startet.

4.10.1 Aufreinigung

Zur Gewinnung des Expressionsproduktes aus einem nach Zentrifugation einer Bakterienkultur entstandenen Pellet wird dieses in 1 ml Lysepuffer PBS (pH8) mit Protease Inhibitoren aufgenommen und gelöst. Danach wird die Probe für eine Stunde auf Eis inkubiert und für 30 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Die Expression im pCES1-Vektor führt zu einem His₆-Fusionsprotein. Der His-Tag kann daher zur Aufreinigung und zum Proteinnachweis verwendet werden. TALON bindet mit hoher Affinität an ein His-Tag, wobei das im TALON enthaltene Kobalt mit dem His-Tag einen Chelatkomplex bildet und so eine einfache Bindung ermöglicht.

Der Überstand wird mit 50 µl TALON Beads, an welche der His-Tag bindet, gemischt. Das Gemisch wurde bei 4 °C auf einer Drehplatte für 30 min kontinuierlich durchmischt, anschließend für eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Beads wurden drei Mal mit PBS gewaschen.

Auf das nun gewaschene Pellet werden 200µl Imidazol (150mM) als Elutionspuffer gegeben und nach kurzem Mischen für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für eine Minute bei 13000rpm zentrifugiert, wodurch die reinen Proteine in das Eluat gelangen.

4.10.2 Protein-Dialyse

Die Umpufferung des Eluats erfolgte durch Dialyse gegen PBS unter Verwendung einer Membran, die nur für Proteine mit einem Molekulargewicht unter 14kDa durchlässig ist (Serva). Die Endkonzentration des Proteins wurde photometrisch bestimmt.

4.11 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Zur Analyse der Proteinexpression wurde die SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (*Laemmli, 1970*) durchgeführt. SDS-Page ist die Abkürzung für „sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“ (deutsch: Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese), welche es ermöglicht, Proteine nach ihrer Molekülgröße aufzutrennen. In einem anliegenden elektrischen Feld werden die geladenen Teilchen entsprechend ihrer Ladung vom Pol entgegengesetzter Ladung angezogen. Bei der SDS-Page ist die Eigenladung der Proteine irrelevant, da Natriumdodecylsulfat konstant an Aminosäuren bindet und diese so mehrfach negativ lädt. Die Laufgeschwindigkeit ist indirekt proportional zum Molekulargewicht.

Für diese Arbeit wurde 2,5 %iges Polyacrylamidgel als Sammelgel und 12 %iges Polyacrylamidgel als Trenngel genutzt. Durch die Verwendung dieser Zwei-Phasen-Gele kommt es zu einer Konzentrierung und Ausrichtung aller SDS-Polypeptidkomplexe in dem oberen Gelabschnitt (Sammelgel) und zur Auftrennung in dem unteren Gelabschnitt. Zur Vorbereitung werden jeweils 5 µl Probe mit 5 µl Probenpuffer/Farbmarker gemischt und in die Taschen des Gels gegeben. Als Molekulargewichtsmarker wird der Proteinmarker PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) in eine einzelne Tasche geladen. Für 40 min wird eine Spannung von 200 V angelegt, wodurch die negativ geladenen Proteine im Laemmli-Puffer zur Anode wandern und nach ihrer Molekülmasse aufgetrennt werden.

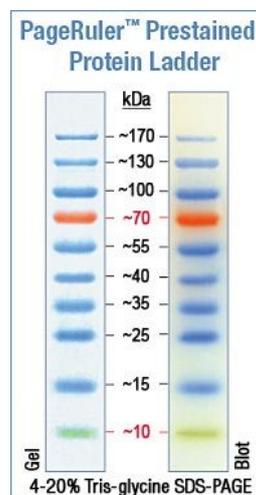


Abbildung 8: Proteinmarker (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific)

Für das Semi-dry-Blotting wird folgender Aufbau verwendet:

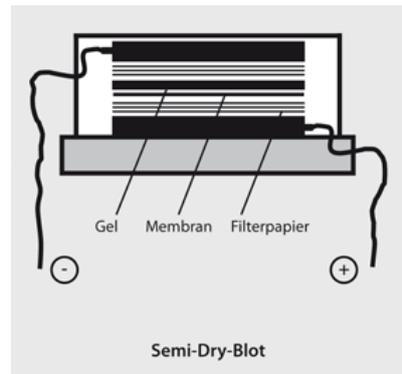


Abbildung 9: Aufbau Westernblot (Luttmann et al, 2014)

Die Filterpapiere und die Membran werden mit Transferpuffer getränkt. Anschließend liegt für 30 Minuten eine Spannung von 23V bei einer Stromstärke von 450mA an. Durch diese Methode werden die in dem Gel aufgetrennten Proteine auf die Membran im Semi-Dry-Verfahren übertragen. Die Proteine binden über hydrophobe Wechselwirkungen bei niedriger Ionenstärke an die Membran, wobei die funktionelle Reaktivität und auch Immunreaktivität weitestgehend erhalten bleiben. Es entsteht eine Kopie des Gels auf der Membran durch Immobilisation der Proteine. Daher können die Proteine mit spezifischen Antikörpern identifiziert werden.

Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wird diese nach dem Trennen des Transferstapels mit 10 %iger Magermilch (5 g Milchpulver + TBS-Tx100) über Nacht unter Schütteln inkubiert.

Die Detektion der auf die Membran geblotteten Proteine erfolgt über Anti-His-AK (murin, Verdünnung 1:2000). Die Membran wird für 45 Minuten bei Raumtemperatur unter ständiger Bewegung mit Anti-His-Antikörper inkubiert. Als sekundärer Antikörper wurde ein Anti-Maus-HRP-Antikörper (Verdünnung 1:3000) verwendet, der ebenfalls für 45 min mit der Membran bei Raumtemperatur inkubiert wurde, gefolgt von einem erneuten Waschschrift mit TBS-Tx.

Die Entwicklung der Membran erfolgt mit dem ECL-Kit nach Angaben des Herstellers.

Durch die Konjugation von HRP (Meerrettichperoxidase, horseradish-peroxidase) an den sekundären Antikörper kommt es bei Entwicklung mit Luminol enthaltender Entwicklungslösung zur Oxidation, wodurch es zur Emission von Licht kommt, welches einen Röntgenfilm belichtet. Proteinbanden mit gebundenen Antikörpern erscheinen daher schwarz.

4.12 Funktionalitätsassays

Prinzip Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie können Zellpopulationen auf Einzelzellebene untersucht werden. Dafür werden die Zellen in Lösung durch eine Mikrokanal Küvette geleitet, wo sie einen Laserstrahl passieren. Dabei entsteht Streulicht, welches mit den Eigenschaften der Zelle wie Größe und Granularität korreliert. Weiterhin können Zellen mit Antikörpern über gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe gefärbt werden. Für diese Arbeit wurden Antikörper verwendet, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Allophycocyanin verbunden sind. Zur Detektion der Fluoreszenz wurde ein Helium Neon-Laser verwendet, der Allophycocyanin bei einer Wellenlänge von 650nm anregt und Fluoreszenzlicht von 668nm entstehen lässt.

Die Messung erfolgte mit dem FACSCanto (Becton Dickinson, Heidelberg). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der BD FACSDiva-Software (Becton Dickinson, Heidelberg) und der WinMDI Software (Windows multiple document interface for flow cytometry).

4.12.1 Bindungsassays

Um die spezifische Bindung der hergestellten Fab Fragmente auf die Mantelzelllymphom Zellen zu zeigen, wurden die produzierten Fab BAR-bodies mit Zellen verschiedener Zelllinien inkubiert und mittels Durchflusszytometrie auf Bindung untersucht.

Für diese Arbeit wurden die hergestellten Fab Konstrukte mit Zellen der Linien Maver1 (Positiv-Zelllinie) und Granta519 (Negativ-Zelllinie) vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde mehrfach mit PBS gewaschen und der Überstand jeweils verworfen.

Das Zellpellet wurde mit 5 µl Anti-His-AK APC versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneutem mehrmaligem Waschen, wurden 400 µl PBS hinzugegeben. Die Proben wurden anschließend im FACSCanto analysiert.

4.12.2 Internalisierung

Mit dem Internalisierungsassay wird überprüft, ob die hergestellten Fab Fragmente von den Zielzellen aufgenommen werden. Als Zielzellen wurden erneut die MAVER1-Zelllinie (Positiv-Zelllinie) und die Granta519-Zelllinie (Negativ-Zelllinie) verwendet.

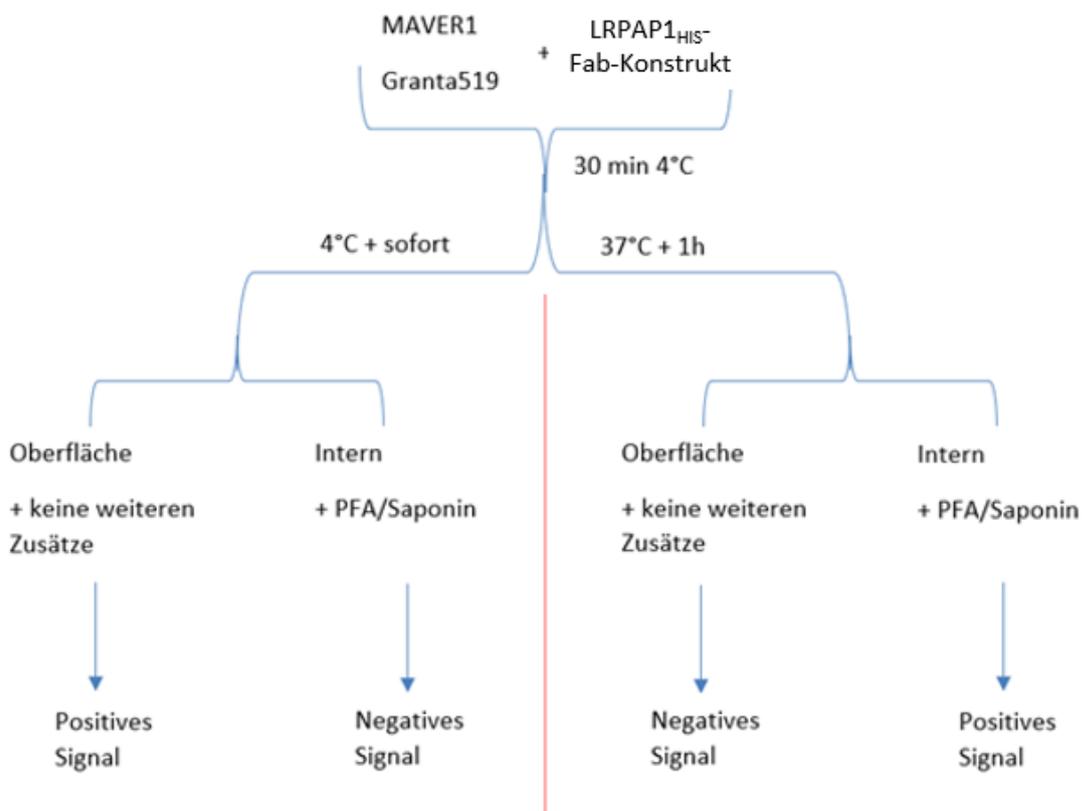


Abbildung 10 Versuchsschema zum Nachweis einer Internalisierung: Die linke Bildseite zeigt die Oberflächenfärbung der Zelllinien mit dem LRPAP1-Fab-Konstrukt. Auf der rechten Seite ist das Färbeschema für das Internalisierungsschema zu sehen. Weitere Erläuterung siehe Text

Die Zellen der Mantelzelllymphom Zelllinien wurden mit den Fab-Konstrukten inkubiert. Im linken Teil von Abbildung 11 ist die Oberflächenfärbung zu sehen. Durch das Lagern der Proben bei 4°C und dem sofortigen weiterbearbeiten wird eine Internalisierung verhindert, weshalb es ein negatives Signal nach Intrazellulärfärbung, aber ein positives Signal nach Oberflächenfärbung gibt.

Auf der rechten Seite von Abbildung 11 ist die Intrazellulärfärbung gezeigt. Die mit LRPAP1 BAR-body inkubierten Proben wurden für 30 Minuten auf Eis und für eine Stunde bei 37°C gelagert. Durch diesen Schritt kommt es zur Aufnahme der LRPAP-Produkte in die Zellen der Mantelzelllymphom Zelllinie mit LRPAP1 reaktivem BZR. Nach der Hinzugabe von 100µl PFA (2%) sowie der Permeabilisierung mit 100µl Saponin (0,5%) wurden alle Proben mit je 5µl Anti-His-APC-Antikörper gefärbt. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte für alle Proben im BD FACSCanto™ Flow Cytometer.

4.13 Zytotoxizitätsassay

Um zu prüfen, ob die Fab-ETA´ BAR-bodies zytotoxisch auf Zellen mit LRPAP1 reaktivem BZR (MAVER1) wirken, wurden LDH release assays durchgeführt.

Zunächst wurden die MCL-Zelllinien aus dem FCS-Medium in FCS-freies RPMI 1640 Medium überführt. FCS beinhaltet LDH, was die Messung der intrazellulären LDH Freisetzung als Zytotoxizitätsnachweis verfälschen würde. Für den Wechsel des Mediums wurden die Zellen für drei Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und wieder in RPMI aufgenommen. Dieser Schritt wurde drei Mal wiederholt. Danach wurde die Zelldichte in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und eine Zelldichte von 5000 Zellen/Well eingestellt.

Die LRPAP1 enthaltenen Fab-ETA´ BAR-bodies wurden für eine Titrationsreihe mit RPMI-Medium auf unterschiedliche Konzentrationen verdünnt (10µg/ml bis 0,01µg/ml). Das Zielvolumen betrug 100 µl pro Well.

Die Auswertung erfolgte analog dem Protokoll des Cytotoxicity detection kit Plus (Roche Applied Science, Penzberg, Germany).

Um die spezifische Lyse der Zellen zu berechnen, wurde die vom Hersteller vorgegebene Formel verwendet:

$$\text{spezifische Lyse} = \frac{\text{gemessener Wert} - \text{Minimallyse}}{\text{Maximallyse} - \text{Minimallyse}} * 100 \text{ [\%]}$$

V Ergebnisse

5.1 Experimentelle Vorgehensweise dieser Arbeit

Zu den Vorüberlegungen dieser Arbeit zählten unter anderem der Aufbau und die gewünschten Funktionen der Fab-Konstrukte. Ein Antikörper Fab-Fragment besteht aus zwei Antigenbindungsstellen, welche durch die variablen Regionen der leichten (VL) und schweren Kette (VH) vorgegeben werden. Diese variablen Regionen sollen für diese Arbeit durch die LRPAP1-Epitopregion ersetzt werden. Voraussetzung ist, dass das entstandene Fab-Konstrukt noch immer in der Lage ist, spezifisch an den B-Zell-Rezeptor der Mantelzelllymphomzellen zu binden und von diesen internalisiert zu werden. Innerhalb der Zelle soll eine eingebrachte Wirkkomponente (beispielsweise ein Toxin) aktiviert werden und die Zielzelle in Apoptose führen.

Problematisch ist in diesem Fall, dass die BZR-bindende Epitopregion von LRPAP1 nur aus ca. 50 Aminosäuren besteht, wohingegen die VH- bzw. VL-Regionen ungefähr 120 Aminosäuren enthalten. Um die - für die Bindung wichtige - 3D-Struktur des Fabs zu erhalten, wurde die Länge der variablen Regionen beibehalten und die LRPAP1 Epitopregion in der Länge angepasst. Dazu wurden drei verschiedene Varianten geplant, die jeweils das LRPAP1-Epitop und zusätzlich dem Epitop angrenzende LRPAP1 Proteinanteile enthalten. In Variante 1 steht das Epitop am Anfang der LRPAP1-Teilsequenz, in Variante 2 mittig und in Variante 3 endständig.

Diese Überlegungen wurden durch den in Abbildung 11 gezeigten experimentellen Ablauf umgesetzt.

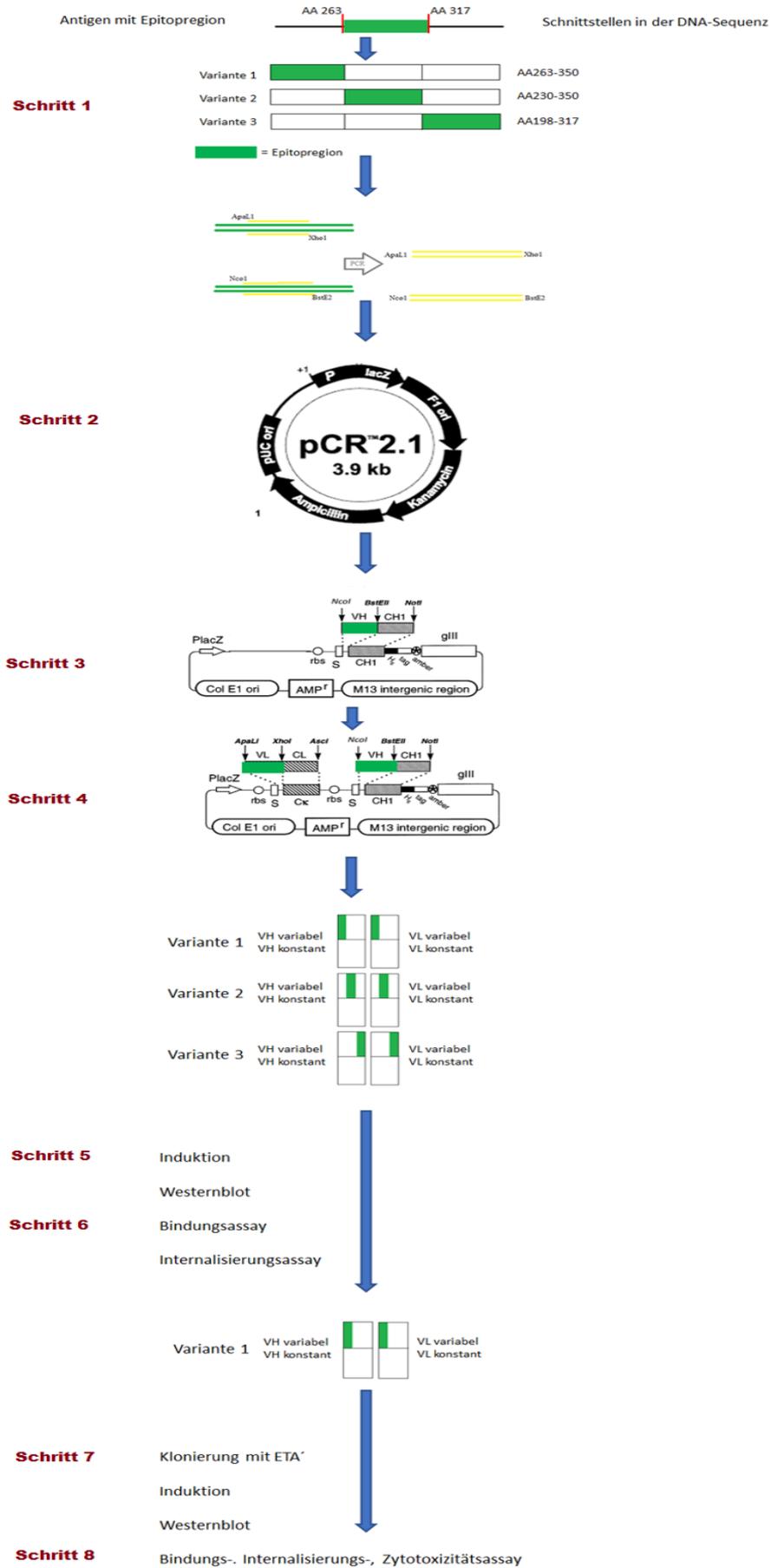


Abbildung 11 Übersicht über die Arbeitsschritte dieser Arbeit: Fließschema der Arbeitsschritte für diese Arbeit. Schritt 1 = Vorbereitung der LRPAP1-Regionen, Schritt 2 = Klonierung in den Übergangsvektor TOPO-TA, Schritt 3 = Klonierung in den Expressionsvektor pCES und Ersetzen der VH-Region durch die LRPAP1-Epitopregion, Schritt 4 = Ersetzen der VL-Region durch die LRPAP1-Epitopregion, Schritt 5: Expression des pCES-Klons, Schritt 6: Testung auf Bindung und Internalisierung, Schritt 7: Klonierung mit dem Toxin ETA', Schritt 8: Testung auf Bindung, Internalisierung und biologische Wirkung.

Die drei verschiedenen LRPAP1-Regionen wurden mittels spezifischer Primer amplifiziert (Schritt 1) und in den TOPO-TA-Vektor als Übergangsvektor kloniert (Schritt 2). Anschließend wurde das Insert mit der LRPAP1-Region in den pCES-Vektor umkloniert. Dabei wurde die VH-Region des Fabs in der ersten Position durch die LRPAP1-Epitopregion ersetzt (Schritt 3). Dies erfolgte für alle drei Varianten. Nach Verifizierung mit Sequenzierung des klonierten Produktes wurde analog die VL-Region ausgetauscht (Schritt 4). Der so erhaltene pCES-Klon wurde exprimiert (Schritt 5), das Produkt aufgereinigt und auf Bindung an und Internalisierung in Mantelzelllymphomzellen getestet (Schritt 6). In die an LRPAP1 reaktive BZRen bindende Varianten wurde als toxische Komponente ETA' kloniert (Schritt 7); die neuen Varianten wurden im Anschluss wieder auf Bindung, Internalisierung und auf ihre biologische Wirkung getestet (Schritt 8).

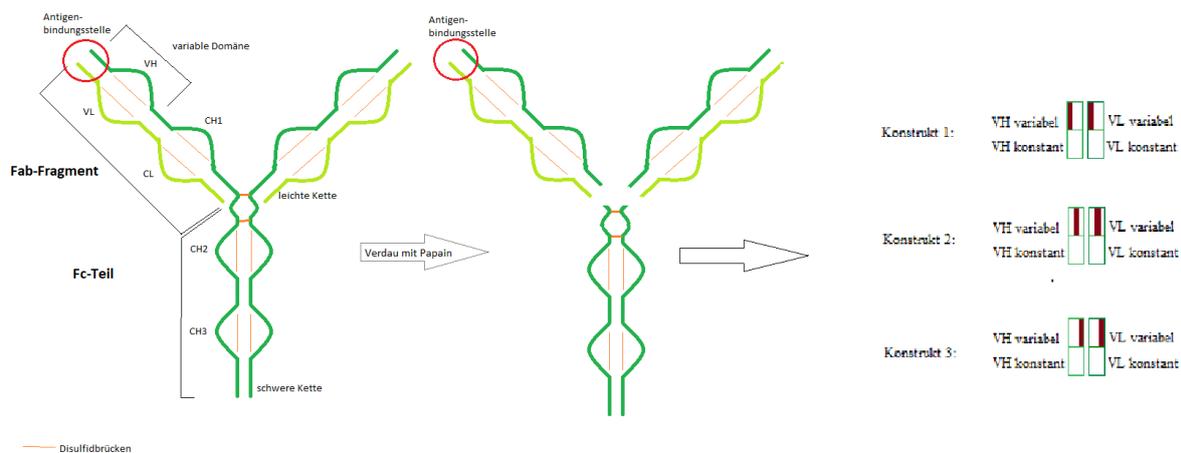


Abbildung 12: Abbildung der Epitoplage im Fab: Für die verschiedenen Konstrukte wird eine unterschiedliche Epitoplage in der BAR-Epitopregion gewählt. Konstrukt 1 = N-terminale LRPAP1-Epitoplage, Konstrukt 2 = mittige LRPAP1-Epitoplage, Konstrukt 3 = C-terminale LRPAP1-Epitoplage im BAR-Body

Die gewählte BAR-body Fab-Struktur besteht aus dem konstanten Anteil der leichten (CL1) und schweren Kette (CH1), sowie den variablen Anteilen beider Ketten, die durch die Epitop Region von LRPAP1 ersetzt wurden. Farblich sind in Abbildung 12 die verschiedenen Epitoplagen gekennzeichnet.

5.2 ETA'

ETA ist ein Toxin des Bakteriums *Pseudomonas aeruginosa* und ist die Kurzform für Exotoxin A. Die toxische Wirkung von ETA beruht - nach Internalisierung - auf der Inaktivierung des Elongationsfaktors EF2 und stoppt so die Proteinbiosynthese und führt zum Zelltod der

Zielzelle (Hwang et al, 1987). Es besteht aus drei verschiedenen Domänen, wobei für diese Arbeit eine verkürzte Form (ETA') aus nur zwei Domänen verwendet wurde. Die dritte Domäne, die Zellbindungsdomäne des Toxins, fehlt. Diese Bindungsdomäne wird in dieser Arbeit durch das LRPAP-Epitop ersetzt. Das Toxin ist verhältnismäßig einfach herstellbar, hat eine hohe Toxizität und gleichzeitig wenige Nebenwirkungen und wird daher oft im Labor für diese Art der Experimente verwendet.

5.3 Klonierung der Fab-Expressionskonstrukte

5.3.1 Generierung unterschiedlicher LRPAP1-Epitopvarianten V1, V2, V3 (Schritt 1)

Dieser Schritt dient dazu, die in den Vorüberlegungen erwähnten drei Varianten V1, V2 und V3 mit unterschiedlicher Epitoplage zu generieren. Als Ausgangsmaterial steht ein kommerzieller LRPAP1-Klon (Biosource) zur Verfügung.

Um die Epitopregion von LRPAP1 an bestimmten Stellen aus dem LRPAP1 Klon abzulesen und zu vervielfältigen, wurden folgende Primer in den Ansätzen kombiniert:

Variante	BAR-Region der schweren Kette	BAR-Region der leichten Kette
1	A: 263-NcoI-s+350-BstE2-as	D: 263-ApaL1-s+ 350-Xho1-as
2	B: 230-NcoI-s+350BstE2-as	E: 230-ApaL1-s + 350-Xho1-as
3	C: 198-NcoI-s+317-BstE2-as	F: 198-ApaL1-s + 317-Xho1-as

Tabelle 8: Primerkombinationen für die Varianten 1-3

Bei der Variante 1 befindet sich das Epitop aa263-317 am N-terminalen Ende der Epitopregion (aa263-350), in Variante 2 mittig (aa230-350) und in Variante 3 am C-terminalen Ende (aa198-317). Die Zahlen geben die LRPAP1 Aminosäure an, an der die sense und antisense Primer beginnen. Für die spätere Klonierung in die schwere Kette wurden den Primern die Restriktionsschnittstellen NcoI und BstE2 angefügt. Entsprechend wurden für die Klonierung in die leichte Kette die Schnittstellen ApaL1 und Xho1 eingefügt.

Abbildung 13 zeigt das Ergebnis der PCRs.

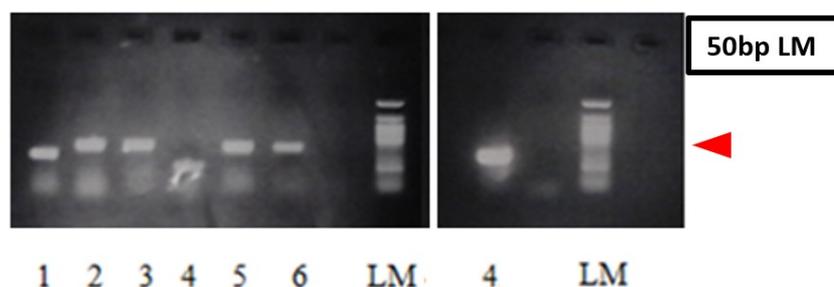


Abbildung 13: Gelelektrophorese der Primer: Analyse der PCR-Reaktionen zur Generierung der Epitopregionen. Analyse der PCR-Reaktionen zur Generierung der Epitopregionen; Die sichtbaren Banden bei ca. 500bp entsprechen den gewünschten

Produkten. Die ausgefallene Reaktion für Variante 4 wurde im rechten Teilbild wiederholt. Die Zahlen 1-6 kennzeichnen die eingesetzten Primerkombinationen; LM: 50bp- Marker. 2% Agarosegel

5.3.2 Zwischenklonierung für die schwere Kette in den TA-Vektor (Schritt 2)

Die Klonierung erfolgte wie im Methodenteil beschrieben. Die Transformation erfolgte in E.coli-Bakterien des DH5alpha -Stammes.

Benutzt wurden für die Variante 1 die Primer A, für Variante 2 die Primer B und für Variante 3 die Primer C aus Tabelle 1. Zur Identifizierung der rekombinanten Klone wurde eine Colony-PCR mit den Primern M13forward und M13reverse durchgeführt und in einer Gelelektrophorese kontrolliert. Die Primer wurden so gewählt, dass sie die Klonierungsstellen umfassen und somit eine Unterscheidung zwischen Klon und Leervektor ermöglichen.

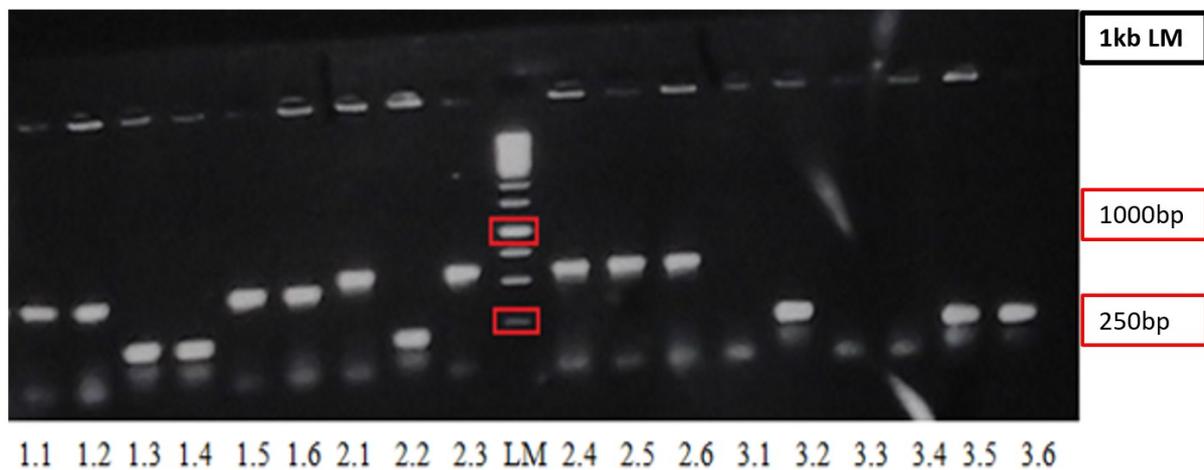


Abbildung 14: Gelelektrophorese TA-Klonierung der schweren Kette: Die erfolgreiche Klonierung sieht man durch die Banden bei ca. 750bp, leere Vektoren ergeben eine Bande bei 250bp. Im zweiprozentigen Agarosegel erkennt man die Proben der Variante 1, Variante 2 und Variante 3 mit den jeweiligen Teilproben (Schreibweise x.y = x= Variante 1-3, y = Klon) Bei den Proben 1.1, 1.2, 1.5, 1.6, 2.1, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 3.2, 3.5 und 3.6. ist die erfolgreiche Klonierung durch Banden bei ungefähr 750bp sichtbar; LM: 1kb-Marker

Zur weiteren Verwendung wurden die Klone 1.1 (Variante 1), 2.1 (Variante 2), 3.1, 3.3, 3.4 (Variante 3) ausgewählt. Diese wurden mittels neuer Overnight-Kultur gefolgt von DNA-Präparation vermehrt.

Aus 2µg der jeweiligen TA-Klone wurden durch Restriktionsverdau mit NcoI und BstE2 das Insert herausgeschnitten mittels Gelelektrophorese und Elution isoliert (Abb. 15) und überprüft.

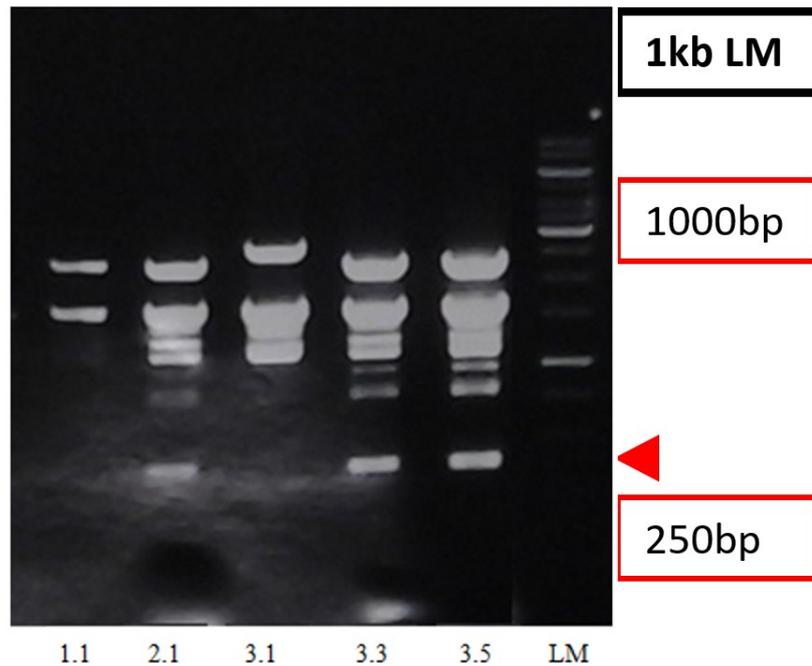


Abbildung 15: Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus aus TA-Klonen der schweren Kette: gezeigt ist der Restriktionsverdaus der Proben 1.1, 2.1, 3.1, 3.3 und 3.5. Den erfolgreichen Verdaus sieht man bei Banden bei ca. 350bp. Im 1%-Agarosegel erkennt man den erfolgreichen Verdaus bei den Proben 2.1, 3.3 und 3.5. Probe 1.1 wurde erneut aufgearbeitet und wiederholt (hier nicht gezeigt). LM: 1kp-Marker

Nach der Auftrennung in der Agarosegelelektrophorese wurde die DNA aller Proben nach Protokoll extrahiert und im Photometer vermessen. Die so erhaltenen DNA-Fragmente wurden im nächsten Schritt in den pCES-Vektor inkloniert.

5.3.4 Austausch der V_H -Regionen in den pCES-Vektor (Schritt 3)

In die Konstrukte eins bis drei wurden durch die gewählten PCR-Primer die Restriktionschnittstellen NcoII und BstE2 eingeführt, was die Klonierung in den Schwerekettenanteil des pCES-Vektors ermöglicht.

Die Klonierung in den pCES1-Vektor erfolgte nach den Schritten wie im Methodenteil (s. 4.4) beschrieben. Die Transformation erfolgte in TGI-Bakterien. Im Anschluss wuchsen die Proben auf Ampicillin-Agar-Platten.

Um zu kontrollieren, ob das Insert in den Vektor inseriert wurde, erfolgte eine Colony-PCR der gewachsenen Kolonien nach dem allgemeinen Ansatz. Als Primer wurden CH1 3', sowie LRPAP 263s verwendet.

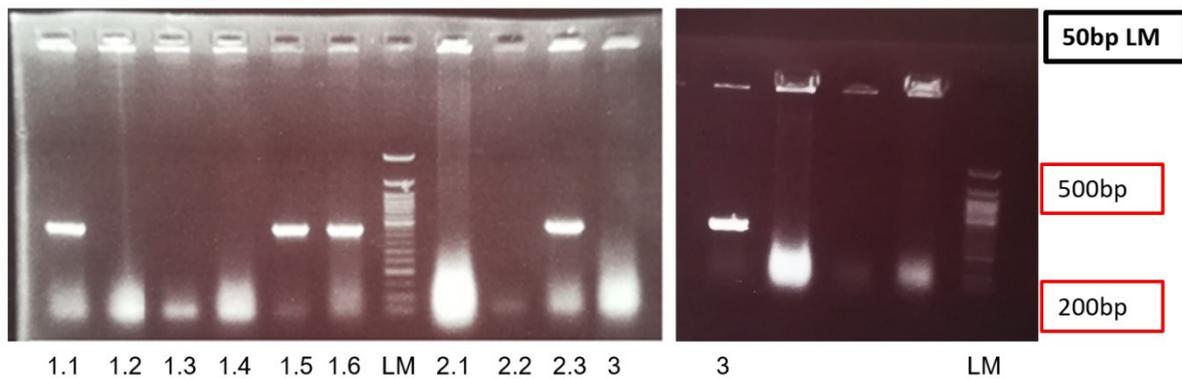


Abbildung 16: Gelelektrophorese pCES1-Klonierung schwere Kette: 2%-Agarosegelelektrophorese von Klonen in pCES. Gezeigt sind mehrere Klone der Varianten. Erfolgreiche Klonierungen sind mit Banden bei ca. 400 bp zu identifizieren. Im linken Bildanteil sind die Proben 1.1, 1.5, 1.6 und 2.3 positiv. Probe 3 wurde im rechten Bildanteil wiederholt. LM: 50bp-Marker

Zur weiteren Bearbeitung ausgewählt wurden die Klone 1.1, 1.5, und 2.3. Diese wurden erneut vermehrt, aufgearbeitet und durch DNA-Sequenzierung in ihrer Richtigkeit bestätigt.

Bei diesen Klonen wurde in den vorherigen Schritten im variablen Anteil der schweren Kette die Epitopregion von LRPAP1 eingeführt. Um ein komplettes Fab zu erhalten, musste im Anschluss auch die variable Region der leichten Kette analog modifiziert werden.

5.3.5 Klonierung der PCR-Produkte für die leichte Kette in den TA-Vektor

Die Vorgehensweise bei dieser TA-Klonierung der PCR-Produkte ist analog der Klonierung in die schwere Kette (Schritt 3). Die Klonierung der PCR-Produkte D-F erfolgte mit den Primern D für Variante 1, Primern E für Variante 2 und Primern F für Variante 3 erfolgte ebenfalls in den TA-Vektor. Positive Klone wurden mittels Colony-PCR mit den Primern M13forward und M13reverse identifiziert.

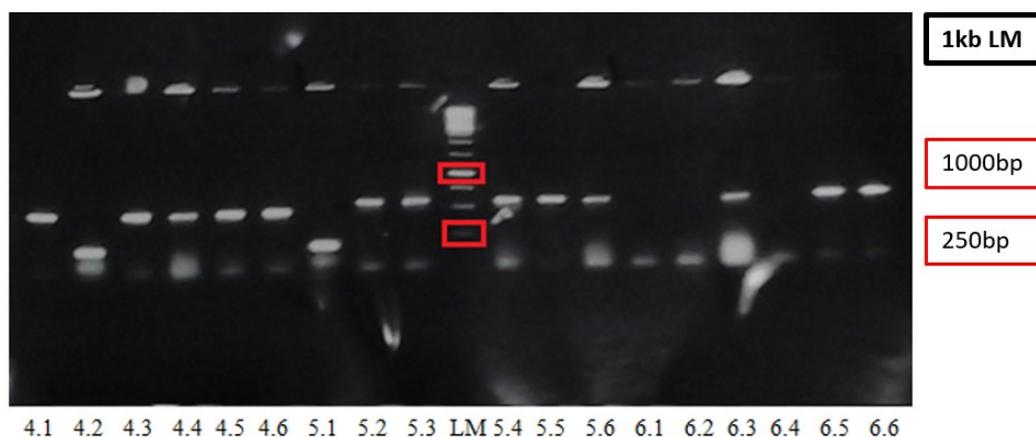


Abbildung 17: Gelelektrophorese TA-Klonierung leichte Kette: Im 2%-Agarosegel sind die Banden für eine erfolgreiche Klonierung bei ca. 750bp zu finden. Der Leervektor besteht aus ca. 250bp. Für jede Klonierung wurden hier mehrere Kolonien durch Colony-PCR überprüft. Die korrekte Klonierung ist bei den Proben 4.1, 4.3, 4.4, 5.4, 4.6, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 6.3, 6.5 und 6.6. LM: 1kb-Marker

Die Klone 4.1, 5.2 und 6.5 wurden zur weiteren Verwendung ausgewählt. Nach der Isolation nach dem bereits beschriebenen Ablauf (s. 4.4) erfolgte ein Restriktionsverdau mit den Enzymen ApaL1 und Xho1. Durch die verwendeten Enzyme erlangen die Proben die korrekten DNA Überhänge, um in den pCES1-Vektor eingefügt zu werden.

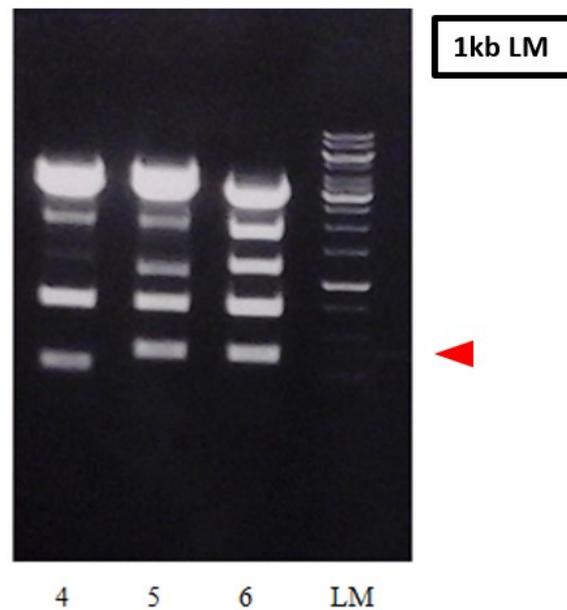


Abbildung 18: Gelelektrophorese des Restriktionsverdau aus TA-Konstrukten der leichten Kette: im 1%-Agarosegel erscheinen die korrekten Banden aus dem Restriktionsverdau bei ca. 400bp. Den erfolgreichen Verdau sieht man bei den Proben 4,5 und 6. LM 1kb-Marker.

Nach der Auftrennung in der Agarosegelelektrophorese und nachfolgender Aufreinigung wurde die DNA aller Proben nach Protokoll extrahiert und im Photometer vermessen. Die so erhaltene DNA wurde im nächsten Schritt in den pCES-Vektor kloniert.

5.3.6 Austausch der V_L -Region in den pCES-Konstrukten (Schritt 4)

Für die pCES-Klonierung der leichten Kette wurde das pCES-Konstrukt aus Schritt drei in Abbildung 16 im Bereich der leichten Kette mit den Restriktionsenzymen ApaL1 und XhoI geöffnet, dephosphoryliert und aufgereinigt. Anschließend wurden die im vorherigen Schritt erhaltenen DNA-Fragmente dort eingefügt.

Die Ligation erfolgte wie unter 4.4 beschrieben und die Transformation in TGI-Bakterien nach Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht.

Mit den nun vorhandenen Kolonien wurde eine Colony-PCR durchgeführt, wobei hier die Primer M13reverse und Kappa-Antisense verwendet wurden. Abbildung 20 zeigt das zugehörige Agarosegel.

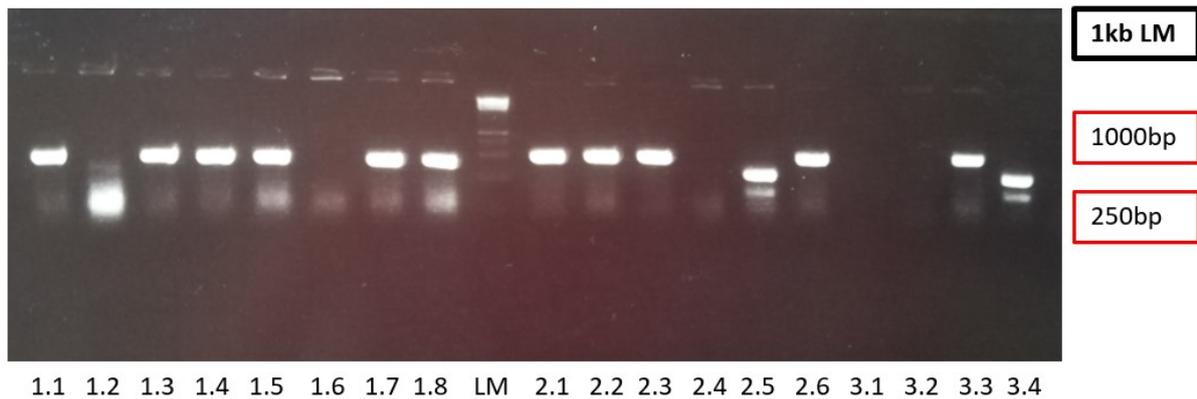


Abbildung 19: Gelelektrophorese pCES-Klonierung leichte und schwere Kette: Die Analyse der Gelelektrophorese im 2%-Agarosegel lässt korrekt klonierte Banden bei ca. 1000bp erkennen. Zu sehen sind für jedes Konstrukt mehrere Klone. Die gewünschte und damit positive Bande bei ca. 1000bp ist bei den Proben 1.1, 1.3, 1.4, 1.5, 1.7, 1.8, sowie 2.1, 2.2, 2.3, 2.6 und 3.2 zu erkennen. LM: 1kb-Marker

Ausgewählt wurden die Klone 1.3, 2.3 und 3.2, bei denen sowohl V_H als auch V_L von LRPAP1 ersetzt wurden. Alle Teilbereiche enthalten das Epitop und unterscheiden sich nur durch die Lage des Epitops im Teilbereich. Die Richtigkeit der Klonierungen konnte durch DNA-Sequenzierung bestätigt werden und es folgte die Expression der Fab-Produkte.

5.4 Expression der Fab-Produkte

5.4.1 Induktion (Schritt 5)

Der gewählte pCES-Vektor ermöglicht durch Induktion mit IPTG die Expression der klonierten Fab BAR-bodies.

Dazu wurde die Expressionskultur (2xTY, 40% Glukose, Ampicillin) 1:100 mit einer Vorkultur des jeweiligen Klones angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,6-0,8 wachsen gelassen. Nach dem Hinzufügen von IPTG (Endkonzentration 2mM) wurde die Kultur weitere vier Stunden kultiviert, bevor sie abzentrifugiert und aufgearbeitet wurde.

Die Lyse der abzentrifugierten Bakterien erfolgte – wie im Methodenteil beschrieben- mittels Lysepuffer versetzt mit Proteaseinhibitoren.

Im Anschluss daran wurden die Fabs, welche His-getagt vorliegen, mittels Metallchelatchromatographie im Batch-Verfahren aufgereinigt. Dafür wurden Talonbeats hinzugegeben, wenige Minuten unter Bewegung inkubiert und mehrmals gewaschen. Durch Hinzugabe von Imidazol (150mM) wurden die Fabs von den Beads eluiert und anschließend gegen PBS dialysiert.

5.4.2 Westernblot

Mit einer Western Blot-Analyse können Produkte durch geeignete Antikörper nachgewiesen werden. Dazu werden die Proteine in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels

Semi-Dry-Verfahren auf eine Membran überführt. Im Anschluss folgen eine Inkubation und Detektion mit geeigneten Antikörpern.

In dieser Arbeit dient der Western Blot der Überprüfung der rekombinant hergestellten His-getagten Fab BAR-bodies. Die Detektion erfolgt mit Maus-anti-His-Antikörpern, mit anti-Maus-Antikörper-HRP und Inkubation mit einer ECL-Substrat-Lösung. Dabei führt die Reaktion mit HRP zu einer Luminiszenz, welche durch einen Röntgenfilm sichtbar gemacht wird.

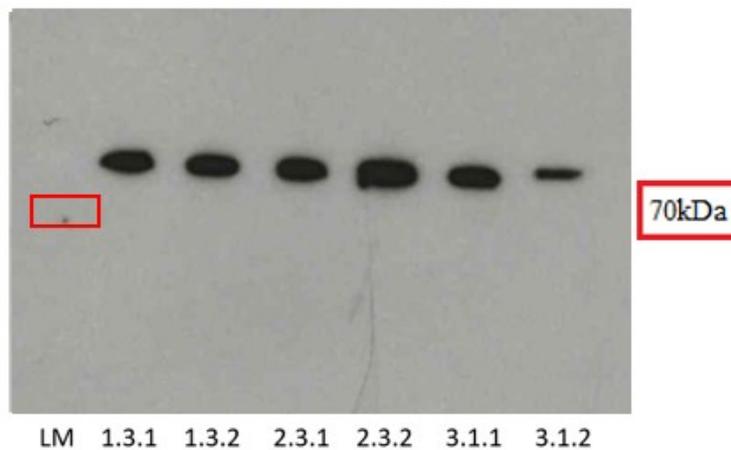


Abbildung 20: Westernblot der Fab-Konstrukte: Zu sehen sind die Proben 1.3.1, 1.3.2, 2.3.1, 2.3.2, 3.1.1, 3.1.2. Positive Proben haben eine Größe von ca. 80-90 kDa. Die Proben sind alle positiv. LM: PageRuler Prestained Protein Ladder

Der Westernblot zeigt, dass alle ausgewählten pCES-Klone nach Induktion die jeweiligen Fab-Konstrukte exprimieren. Die Überprüfung auf Funktionalität erfolgt in den nächsten Schritten.

5.4.3 Bindungsassay (Schritt 6)

Nach der Bestimmung der Konzentrationen der Proben aus der Dialyse im Photometer bei 280nm (gegen PBS), wurden jeweils 10µg der Proben mit den Zellen der MAVER1- und Granta519-Zelllinie inkubiert.

Im Anschluss wurden die Proben wie unter 4.11.1 beschrieben weiterbearbeitet.

Um die BAR-body Bindung an Zellen in der Durchflusszytometrie detektieren zu können, wurde Anti-His-APC als Antikörper verwendet, welcher in einer Verdünnung von 1:2000 eingesetzt wurde. Im Anschluss konnten die Proben im FACS Canto analysiert und vermessen werden.

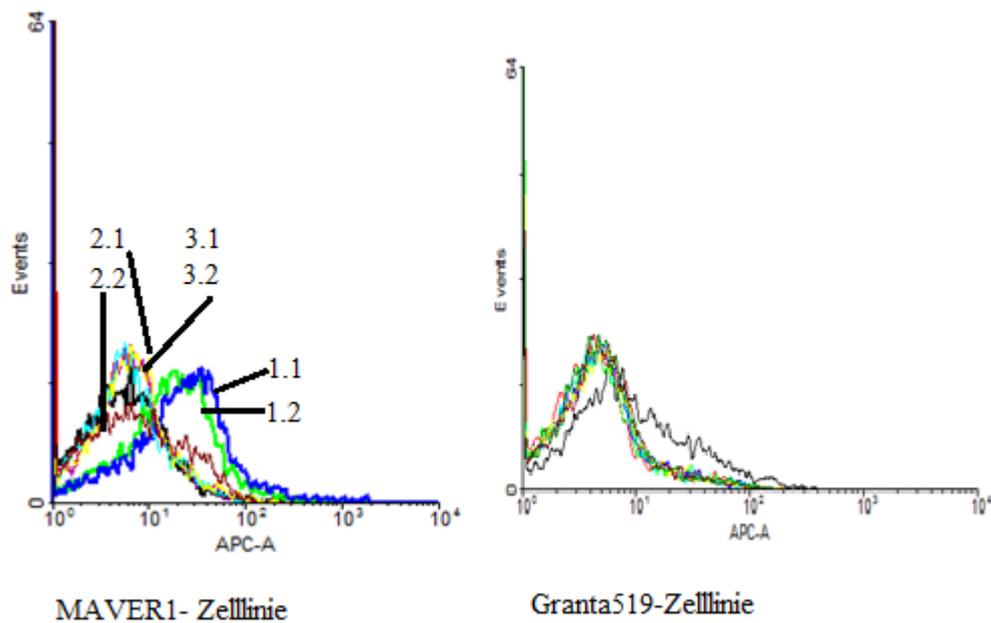


Abbildung 21: Bindungsassay FACS-Analyse: Analyse der Durchflusszytometrie im FACSCanto. Links die Bindungskurven der Positivkontrolle (MAVER1) und rechts die Bindungskurven der Negativkontrolle (Granta519). Bindende Proben zeigen einen Shift der Kurven nach rechts im Vergleich zur Leerprobe (schwarz). Dieser Shift ist für die Proben 1.1 und 1.2 bei der Positivkontrolle sichtbar. In der Negativkontrolle binden keine Fab-Konstrukte an die Zellen.

Die Proben der Variante 1 (1.1, 1.2) zeigen ein anderes Bindungsverhalten an die Mantelzelllymphomzellen als die Proben der Varianten 2 und 3. Es zeigt sich, dass es tatsächlich Unterschiede im Bindungsverhalten zwischen den Fab-Konstrukten mit unterschiedlichen Epitoplagen gibt.

Eine Möglichkeit, warum nur Variante 1 bindet, ist die unterschiedliche 3D-Konfiguration der Epitopregion. Durch die Faltung scheinen bestimmte Epitopregionen für das Antigen besser „erreichbar“ zu sein und können so binden.

5.4.4 Internalisierungsassay

In dem Internalisierungsassay wurde überprüft, ob die Expressionsprodukte der Fab Konstrukte spezifisch von den Zellen der Mantelzelllymphomzelllinie MAVER1 aufgenommen werden. Hierfür wurde wie im Methodenteil beschrieben vorgegangen.

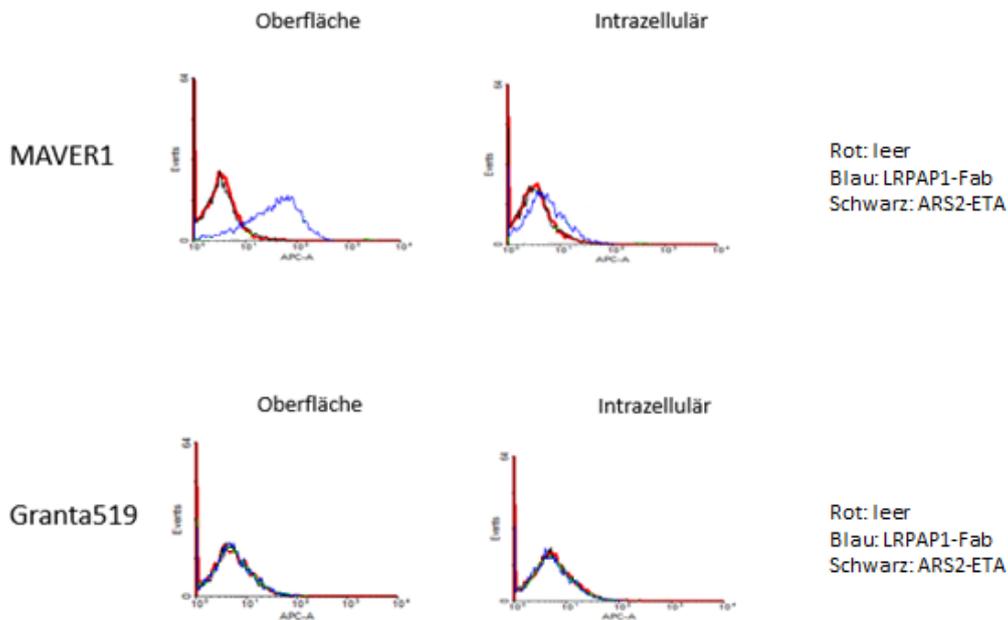


Abbildung 22: Internalisierungsassay der Fab-Konstrukte: Analyse der Internalisierung im FACSCanto. Positive, von den Zellen aufgenommene Proben zeigen einen Rechtsshift der Kurven im Vergleich zur Leerprobe (rot). Keine der Proben wurde von den Zellen aufgenommen. Zusätzlich ist erneut die Oberflächenfärbung gezeigt. Hier bindet das LRPAP-Konstrukt (blaue Kurve). Als Negativkontrolle wurde jeweils ein Konstrukt mit ARS2 statt LRPAP verwendet, welches aus dem Jose-Carreras-Center stammt.

Die abgebildeten Messkurven zeigen deutlich, dass die Konstrukte mit LRPAP1 zwar an die Mantelzelllymphomzellen binden, allerdings keinen Shift bei der Intrazellulärfärbung aufweisen (blaue Kurve).

Im Internalisierungsassay mit dem Antikörper Anti-His-APC und den Zellen der Zelllinie MAVER1 und Granta519 wurde sichtbar, dass keines der Konstrukte internalisiert wurde. Möglicherweise ist der Aufbau aus leichter und schwerer Kette in Kombination zu groß, um von der Lymphomzelle aufgenommen zu werden. Dieses Problem trat auch bei ähnlichen Arbeiten im Jose-Carreras-Zentrums auf. Anscheinend ist ein BAR in Fab-Struktur nicht geeignet, um die erhoffte Funktion (Internalisierung gefolgt von biologischer Wirkung) zu erfüllen. Daher wurde die Struktur eines Fab-Fragments in den nächsten Schritten eingetauscht gegen die Struktur der alleinigen schweren Kette, bestehend aus variablem LRPAP1 BAR Anteil und der CH1-Region, an die ein Toxin angehängt wurde.

5.5 ETA'-Klonierung (Schritt 7)

Nachdem nachgewiesen wurde, dass Konstrukt 1, mit der Epitopregion am Anfang der Aminosäurekette, an die Tumorzellen (MAVER1) bindet, konnte im nächsten Schritt als Toxin ETA' in das modifizierte LRPAP1 BAR-body eingeführt werden.

Für die weiteren Arbeitsschritte wurde die Probe LRPAP 1 TA verwendet. Diese Probe war im vorherigen Verlauf der Arbeit als Ausgangsprobe für die Klonierung der variablen Region in

die schwere Kette des pCES-Vektors verwendet worden und ist ein Konstrukt mit der Epitopregion von LRPAP1 am Anfang (Variante 1A).

Zur Präparation des Inserts erfolgte ein Restriktionsverdau mit BstE2 und NcoI und im Anschluss die DNA-Extraktion nach Protokoll.

Als Vektor wurde der im Kapitel 3.8.3 beschriebene Vektor pCES-ETA' verwendet. Dieser wurde in einem Restriktionsverdau mit NcoI und BstE2 geöffnet und dephosphoryliert. Nach Klonierung des Inserts V1A in die V_H des pCES-Vektors erfolgte die Transformation in E.coli-Bakterien vom TGI-Stamm.

Zur Kontrolle der Klonierung wurde eine Colony-PCR mit den Primern 3' Anti-Sense KDEL mut. und CH1 neu 5' durchgeführt.

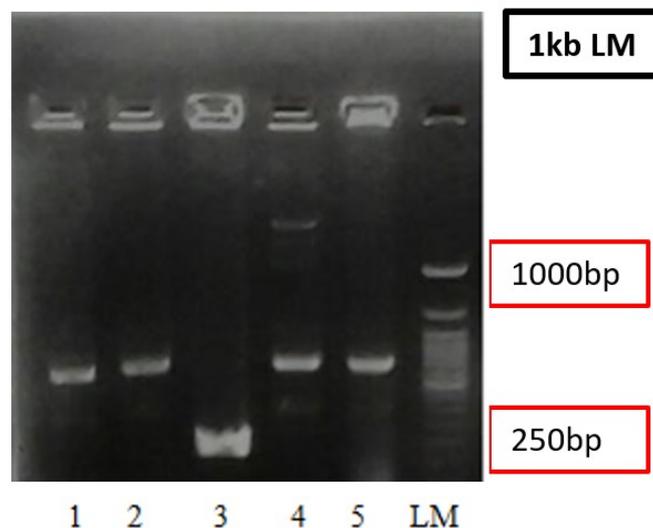


Abbildung 23: Gelelektrophorese Colony-PCR der Klonierung mit ETA'. Im 2%-Agarosegel erscheinen positive Banden bei ca. 700bp. Der Leervektor ist ungefähr 250bp groß. Zu sehen sind die Proben 1,2,3,4 und 5, wobei Probe 3 keine Bande bei 700bp besitzt. LM: 1kb-Marker

Zur weiteren Verarbeitung wurden die Kolonien 1,2 und 5 ausgewählt. Sie wurden als Overnight-Kulturen mit 2xTY und Ampicillin angesetzt. Nach Isolation und Bestimmung der Konzentration im Photometer, wurden die Proben 2 und 5 auf 2TY-Platten ausgestrichen und in einer Sanger-Sequenzierung kontrolliert.

Damit waren die Klonierungsschritte mit ETA' abgeschlossen und die Proben konnten in den Funktionalitätsassays analysiert werden.

5.6 Expression der ETA'-Konstrukte (Schritt 8)

5.6.1 Induktion, Westernblot, Durchflusszytometrie

Die nächsten Schritte wurden wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt.

Die Kontrolle der linearen Epitop-ETA'-Expressionsprodukte wurde in einem Western Blot detektiert.

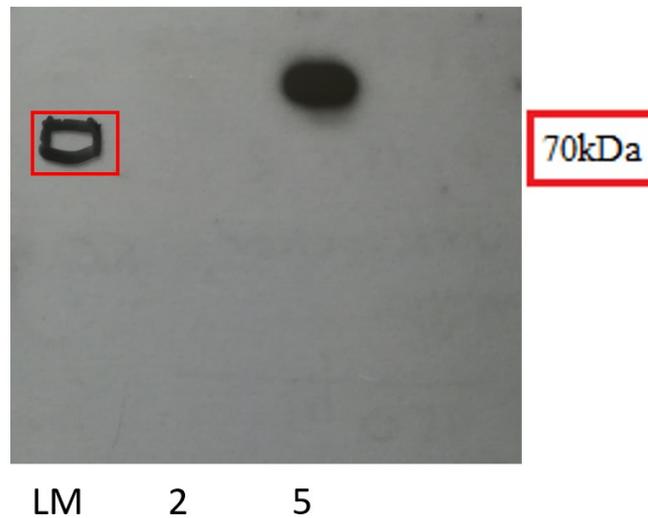


Abbildung 24: Westernblot mit ETA'-Konstrukten: Das gewünschte Protein hat eine Länge von ca. 100kDa. Zu sehen ist der Western Blot der Proben 2 und 5. Probe 5 ist durch die Bande bei ca. 100kDa positiv. LM: PageRuler Prestained Protein Ladder.

Da in Probe 2 kein Expressionsprodukt nachweisbar war, wurde nur mit der Probe 5 weitergearbeitet.

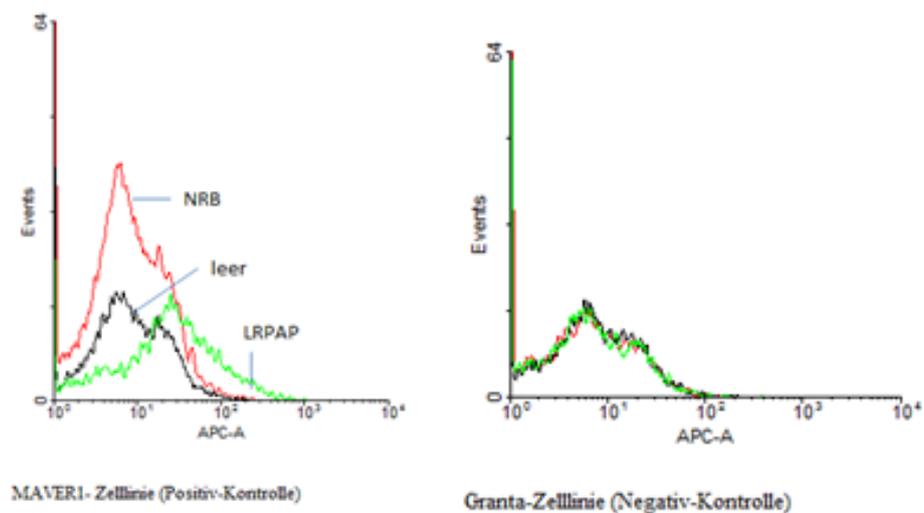


Abbildung 25: Bindungsassay FACS-Analyse ETA'-Konstrukt: Analyse der Durchflusszytometrie im FACSCanto. Links die Bindungskurven der Positivkontrolle (MAVER1) und rechts die Bindungskurven der Negativkontrolle (Granta519). Bindende Proben zeigen einen Shift der Kurven nach rechts im Vergleich zur Leerprobe (schwarz). Dieser Shift ist für die das LRPAP-Konstrukt (grün) bei der Positivkontrolle sichtbar. In der Negativkontrolle findet keine Bindung an die Zellen statt. Als Negativprobe wurde ein Neurabin- (NRB) Konstrukt aus dem Jose-Carreras-Center verwendet.

Das lineare Konstrukt mit ETA´ bindet an dem Assay spezifisch an die Mantelzelllymphomzellen, wohingegen die Negativkontrolle mit Neurabin nicht bindet. Keines der Konstrukte bindet an die Negativprobe Granta519. Nach der Bindungskontrolle wurde im Anschluss auf Internalisierung geprüft.

5.6.2 Internalisierungsassay

Für die Internalisierung wurden die Proben nach dem unter 4.12.2 beschriebenen Schema bearbeitet und mit dem FACSCanto analysiert.

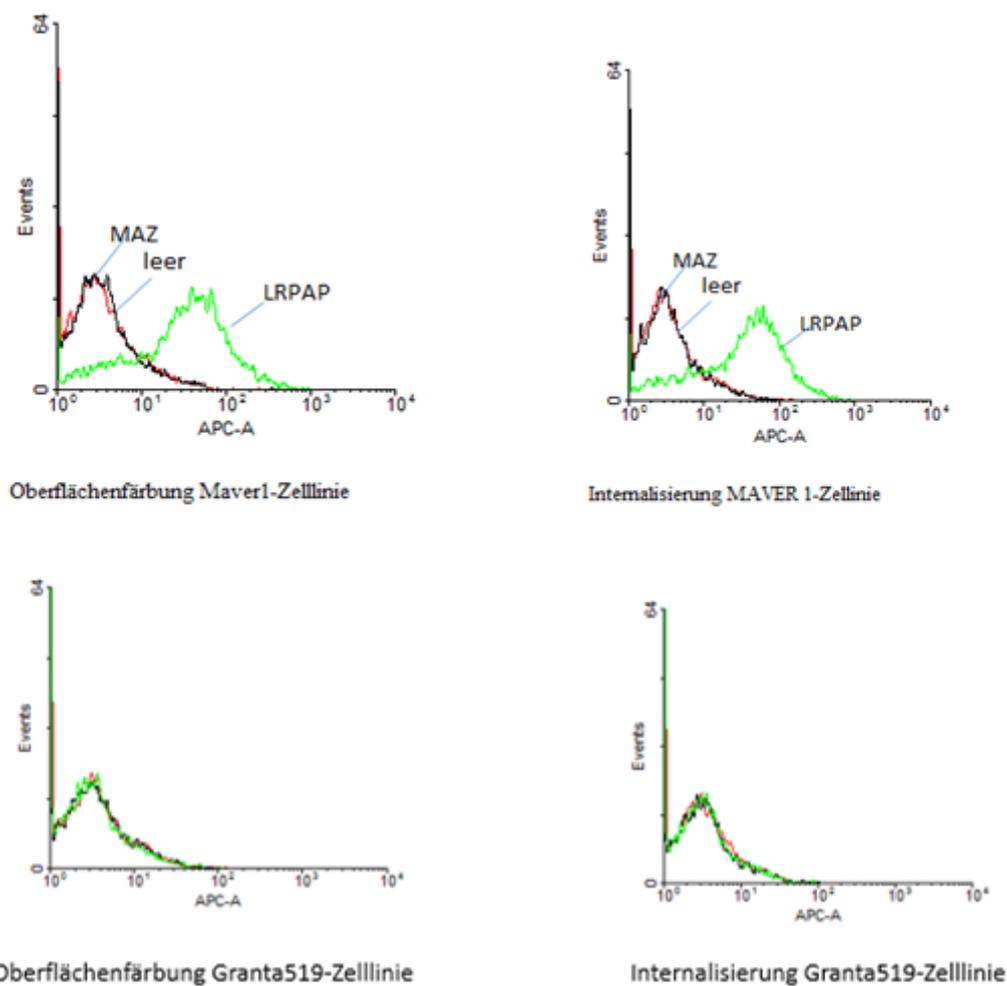


Abbildung 26: Oberflächenfärbung und Internalisierung: Analyse der Internalisierung im FACSCanto. Positive, von den Zellen aufgenommene Proben zeigen einen Rechtsshift der Kurven im Vergleich zur Leerprobe (schwarz). Die Kurve der LRPAP-Probe (grün) wird aufgenommen, was der deutliche Rechtsshift bezeugt. Zusätzlich ist erneut die Oberflächenfärbung gezeigt. Hier bindet das LRPAP-Konstrukt (grün). Als Negativkontrolle wurde jeweils ein Konstrukt mit MAZ statt LRPAP verwendet, welches aus dem Jose-Carreras-Center stammt. In der Negativzelllinie (Granta519) überlagern sich die Kurven der Leerprobe und der Konstrukte (= keine Bindung, keine Internalisierung).

Das lineare Konstrukt mit ETA´ bindet spezifisch an Maver1-Zellen und wird von diesen auch internalisiert.

Im Internalisierungsassay konnte daher bewiesen werden, dass die Probe 5, bestehend aus der LRPAP-Epitopregion in VH und ETA´ als Toxin, an die Lymphomzellen der MAVER1-Zelllinie bindet und von ihnen internalisiert wird. Dies passiert nicht bei den Zellen der Granta519-Zelllinie.

5.6.3 Zytotoxizitätsassay

In den vorherigen Arbeitsschritten wurde gezeigt, dass das lineare ETA´-Konstrukt von den Maver1-Zellen (Positivprobe) nach Bindung aufgenommen wird. Um die biologische Wirkung des Konstruktes zu prüfen, erfolgte ein Zytotoxizitätsassay.

Auf diesem Assay wird die Zelllyse in Abhängigkeit von der Konzentration der eingesetzten ETA´-Konstrukte bestimmt. Das ETA´-Konstrukt wurde im Konzentrationsbereich 10µg/ml bis 0,01µg/ml eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde NRB1 verwendet.

Es erfolgte eine Inkubation der Platte für 12 h im Brutschrank bei 37°C. Am nächsten Tag wurde nach dem Protokoll des Cytotoxicity detection kit Plus (LDH) fortgefahren und die Ergebnisse mit Techan-I-Control ausgewertet.

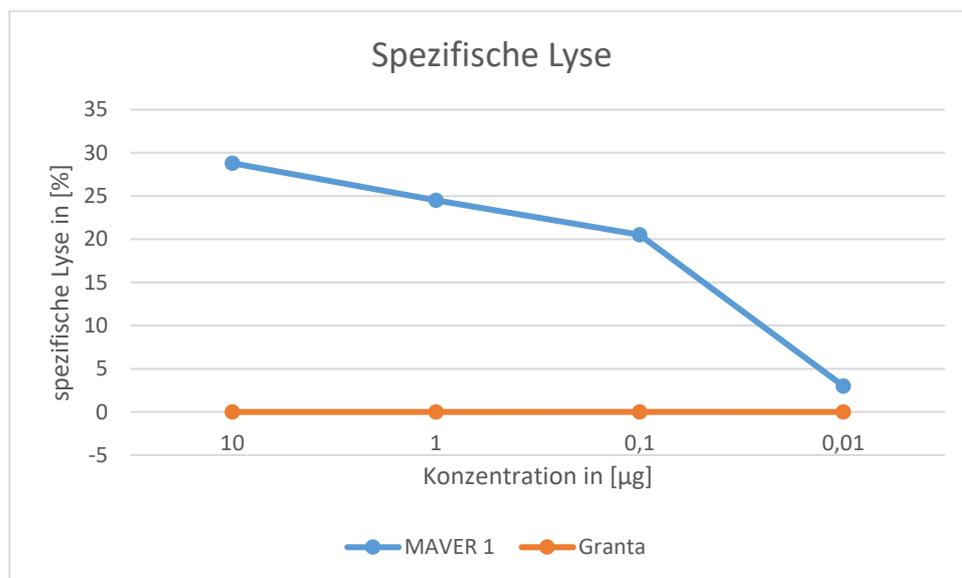


Abbildung 27: spezifische Lyse MAVER1- und Granta519-Zelllinie: Die blaue Kurve entspricht der MAVER1-Zelllinie (Positiv), die orange Kurve der Granta-Zelllinie (Negativ). Es ist deutlich sichtbar, dass bei höherer Konzentration die Lyse der Zellen bei fast 30% liegt. Im Gegensatz dazu, erfolgt bei der Negativkontrolle keine LDH-Detektion und damit keine Zelllyse.

Durch die Ergebnisse des Zytotoxizitätsassays konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Konzentration mehr Zellen durch ETA´ zerstört werden. Das vorliegende Konstrukt 5 (Variante 1 der Klonierung: VH1 + ETA´) bindet demnach nicht nur an Lymphomzellen des Mantelzelllymphoms, sondern wird auch internalisiert und die biologische Wirkung des Konstruktes, die Toxinwirkung von ETA´, setzt ein.

In dieser Arbeit konnte daher gezeigt werden, dass das beschriebene Fab Konstrukt, bestehend aus leichter und schwerer Kette, nicht von den Mantelzelllymphomzellen

internalisiert wird, obwohl es an diese bindet. Mit einem kleineren Konstrukt, welches linearisiert ist und nur aus der schweren Kette gekoppelt an ein Toxin (ETA´) besteht, war die Internalisierung hingegen möglich. Des Weiteren konnte auch gezeigt werden, dass dieses kleinere Konstrukt die Mantelzelllymphomzellen spezifisch abtötet. Auf mögliche Gründe für diesen Unterschied wird im Folgenden eingegangen.

VI Diskussion

In der Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome gehört das Mantelzelllymphom zu den schwer therapierbaren Tumoren. Das Mantelzelllymphom hat eine hohe Rezidivrate und ein niedriges 10-Jahres-Überleben. Die Therapieleitlinien sehen je nach Risikoprofil eine Kombination aus Chemotherapie und Immuntherapie vor. Der Standard in Europa ist derzeit eine Therapie nach dem R-CHOP- (Rituximab, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin, Prednisolon) und R-DHAP-Schema (Rituximab, Dexamethason, Hochdosis-Ara-C, Cisplatin) (*Dreyling et al, 2014*). Im Anschluss erfolgt in der Regel eine Hochdosis Chemotherapie, sowie eine autologe Stammzelltransplantation (*Dreyling et al, 2014*). Mit diesen Behandlungsmöglichkeiten liegt das mittlere progressionsfreie Überleben bei 64 Monaten (*Kluin-Nelemans et al, 2019*).

Zu den Nachteilen der aktuellen Therapieformen zählen vor allem die bekannten unerwünschten Nebenwirkungen durch die ungerichtete Wirkungsweise der eingesetzten Chemotherapeutika. Hierzu zählen beispielsweise eine hämorrhagische Zystitis bei der Therapie mit Cyclophosphamid, Übelkeit, Erbrechen, Alopezie und Kardiotoxizität bei dem Einsatz von Doxorubicin und eine Polyneuropathie bei der Therapie mit Vincristin. Aus diesem Grund ist die zielgerichtete und individualisierte Therapie in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der Forschung gerückt. Hierzu zählen in der Behandlung von B-Zell Lymphomen Ibrutinib und Idelalisib, die spezifisch an Enzyme des B-Zell Rezeptor Signalweges angreifen (*National Cancer Institute (NIH) Ibrutinib und Idelalisib, 2019*). Auch Antikörper wie Obinutuzumab (*National Cancer Institute (NIH) Obinutuzumab, 2019*) und Rituximab (*Braendstrup et al, 2005*) oder auch Antikörper-Toxin Konjugate wie Inotuzumab (*National Cancer Institute (NIH) Inotuzumab, 2019*) und Polatuzumab (*National Cancer Institute (NIH) Polatuzumab, 2019*) sind in der klinischen Anwendung oder befinden sich in klinischer Testung.

Auch wenn dieser Therapieansatz deutlich zielgerichteter ist, als herkömmliche Chemotherapien, gibt es doch immer noch einige Nachteile dieser neuen Therapien. Obwohl nicht mehr ungerichtet alle proliferierenden Zellen angegriffen werden und sich die Therapie zunehmend gezielt gegen einzelne Zellfraktionen wie die B-Zellen richtet, können die genannten Therapeutika nicht zwischen gesunden und malignen B-Zellen unterscheiden. Weiterhin kommt es trotz des Einsatzes dieser neuen Substanzen in den wenigsten Fällen zu einer Heilung der Lymphome, sodass weiterhin ein großer Bedarf an neuen, wirkungsvollen und im besten Fall hoch selektiven Therapieoptionen besteht. Die durch die Arbeitsgruppen um Prof. Dr. Pfreundschuh (*Thurner et al, 2018*) identifizierten B-Zell Rezeptor Antigene haben ein großes Potential als äußerst spezifische Therapie von B-Zell Lymphomen eingesetzt zu werden. B-Zell Rezeptoren sind membranständige Immunglobuline (Antikörper) und erkennen ein spezifisches Antigen. Da es sich bei Lymphomen um klonale Erkrankungen handelt, besitzt jede Zelle eines Lymphoms einen identischen B-Zell Rezeptor, der dasselbe Antigen erkennt.

Diese Antigene wurden als BARs (B-Zell Rezeptor Antigene für rückwärtsgerichtete Therapien) bezeichnet (*Thurner et al, 2018 (Blood), Thurner et al, 2019 (Leukemia)*). Im Falle des Mantelzelllymphoms konnte das B-Zell Rezeptor Antigen LRPAP1 (low density lipoprotein receptor-related protein associated protein1) als Zielstruktur von etwa 35% aller Mantelzelllymphome identifiziert werden. Es ist das erste Antigen, welches als Zielantigen des B-Zell Rezeptors von Mantelzelllymphomen identifiziert wurde. LRPAP1, auch bekannt als A2RAP oder RAP, ist ein Protein, dessen Gen sich auf Chromosom 4p16.3 befindet und aus 357 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 39 kDa besteht. Es fungiert als Rezeptorantagonist und Chaperon für die LDL-Rezeptorfamilie und nimmt somit am Megalin/Cubilin-Endozytoseweg teil. Als Epitopregion der BZR Bindung konnten die Aminosäuren 264–318 identifiziert werden. Die Häufigkeit mit der LRPAP1 als spezifisches BZR-Ziel Antigen von Mantelzelllymphomen gefunden wird, lag in der Arbeit von Thurner et al. (*Thurner et al, 2018*) bei 8/21 Patienten mit MCL und bei 2/7 der untersuchten MCL-Zelllinien. Die Vermutung liegt nahe, dass LRPAP1 eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Mantelzelllymphomen spielt. Diese Hypothese wird unterstützt durch den Nachweis von hochtitrigen LRPAP1-Serum-Antikörpern bei 8/28 MCL Patienten, die bei gesunden Kontrollen nicht vorkommen. Als Mechanismus wird angenommen, dass es durch eine chronische Immunreaktion gegen LRPAP1 zu einer dauerhaften Stimulierung von B-Zellen kommt, die letztendlich zu einer malignen Transformation von LRPAP1-reaktiven B-Zellen führt. Die Ursache der Immunogenität von LRPAP1 bleibt dabei ungeklärt, da sich das LRPAP1 bei Patienten mit MCL genetisch nicht von LRPAP1 bei gesunden Kontrollen unterscheidet. Man kann spekulieren, ob es durch bisher nicht identifizierte posttranslationale Veränderungen zur Auslösung der Immunogenität kommt.

Auch wenn die exakte Rolle von BARs in der Pathogenese von B-Zell Lymphomen unklar bleibt, können sie doch als Mittel genutzt werden, um hochspezifisch maligne B-Zellen anzugreifen, indem sie an deren B-Zell Rezeptoren binden. Normale B-Zellen wären im Gegensatz zu konventionellen Immuntherapien nicht betroffen und die unter Therapien wie Blinatumomab, Inotuzumab, Obinutuzumab, Polatuzumab, Rituximab oder auch CAR T-Zellen obligate mehrmonatige B-Zell Aplasie könnte vermieden werden (*Maude et al, 2014*).

In dieser Arbeit wurde an einer möglichen neuen Therapiestrategie gearbeitet, die das B-Zell Rezeptor Antigen von 45% aller Mantelzelllymphome, LRPAP1, in ein Antikörper-Toxin Konjugat integriert. Bereits durch Thurner et al. konnte gezeigt werden, dass bestimmte Konstrukte das Potential besitzen Mantelzelllymphom-Zelllinien mit B-Zell-Rezeptoren mit Reaktivität gegen LRPAP1 spezifisch zu töten. Diese Konstrukte bestehen aus dem Antigen LRPAP1 und einem angehängten ETA Toxin. Wird dieses Konstrukt gegen andere B-Zell Lymphom Zelllinien eingesetzt hat es keinen Effekt. Auch Mantelzelllymphom Zelllinien, die

keine Reaktivität gegen LRPAP1 haben, d.h. einen BZR mit anderer Spezifität exprimieren, werden von diesem Konstrukt nicht angegriffen. Dies unterstreicht die höchste Spezifität des BAR-inkorporierenden Therapieansatzes (Thurner et al, 2019).

Im Sinne einer translationalen Entwicklung hin zu einem Therapieformat, das beim Menschen im klinischen Alltag eingesetzt werden kann, bestand ein Ziel dieser Arbeit darin einen Therapieansatz zu entwickeln, der das BAR LRPAP1 in ein Format integriert, welches bereits durch jahrelange Anwendung als sicher und effektiv etabliert ist. Hierfür wurde das seit mehreren Jahrzehnten erfolgreich verwendete Antikörperformat gewählt. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag daher in der Entwicklung eines Fab Antikörpers, der anstelle einer variablen Region das Antigen LRPAP1 enthält, um an den B-Zell-Rezeptor von Mantelzelllymphomen zu binden. Ein weiteres Bestreben lag daher in der Bestimmung des therapeutischen Potentials dieses Fab Konstruktes. Die Herstellung eines vollständigen Antikörpers ist nicht mehr Teil dieser Arbeit. Als Name für diese Antikörper ähnlichen Konstrukte wurde in Anlehnung an „antibody“ der Begriff „BAR-Body“ gewählt.

Die Entwicklung der Bar-Bodys ist im Jose-Carreras-Centrum inzwischen ein gut validiertes Verfahren. Die Arbeitsschritte sind bereits aus anderen Versuchsaufbauten bekannt. So laufen die Klonierungen nach einem bestimmten Ablauf und auch die Aufreinigungen von DNA und Protein sind mithilfe von Kits einheitlich und vergleichbar. Es ist daher auch durch die Sequenzierungen der DNA-Proben bewiesen, dass die verwendeten Konstrukte tatsächlich die gewünschten DNA-Sequenzen enthalten und Verunreinigungen minimiert werden konnten. Die verwendeten Versuche sind daher effektiv und genau.

Da LRPAP1 mit 357 Aminosäuren deutlich größer als die variable Region einer Schwer- oder Leichtkette (etwa 110 Aminosäuren) ist, bestand der erste Teil der Arbeit in der Bestimmung des LRPAP1 Teils, der in den FAB BAR-Body integriert werden sollte. Die Epitopregion, die entscheidend für die Bindung an den BZR von Mantelzelllymphomen ist und damit essentieller Bestandteil des LRPAP1 FAB BAR-Body sein sollte, ist 54 Aminosäuren groß. Es wurden insgesamt 3 Varianten des FAB BAR-Body hergestellt. Bei allen drei Varianten wurde die variable Region eines FAB Antikörpers gegen 110 Aminosäuren von LRPAP1 ausgetauscht. Alle drei Varianten enthalten die 54 Aminosäuren der BZR bindenden LRPAP1 Epitopregion. Nach Klonierung, Expression, Aufreinigung und funktioneller Testung zeigte als einziges Konstrukt Variante 1, bei der die 54 Aminosäuren lange Epitopregion N-terminal integriert ist, eine Bindung an Mantelzelllymphomzellen mit LRPAP1 reaktivem B-Zellrezeptor. Warum die Varianten 2 und 3, bei denen das LRPAP1 Epitop mittig oder C-terminal in die BZR bindende Region integriert wurde, keine Bindung auf LRPAP1 reaktiven MCL Zellen zeigten ist unklar. Möglich ist, dass es durch Konformationsänderungen in diesen Varianten zu einem Verlust der Affinität an den B-Zell Rezeptor kommt. Hierbei scheinen neben der CDR3-Region weitere

CDR-Regionen wichtig zu sein (*Vargas et al, 1995*). Ausschlaggebend ist auch eine bestimmte Konformation der Antigenbindungsstelle, um ein möglichst ideales Bindungsverhalten zu erhalten.

Da ein LRPAP1 FAB BAR-Body mit hoch spezifischen Bindungseigenschaften gegen MCL Zellen mit LRPAP1 reaktivem BZR hergestellt werden konnte, wurde die Ursache der fehlenden Bindung der anderen Varianten nicht weiter untersucht.

In einem nächsten Schritt sollte das therapeutische Potential dieses FAB BAR-Bodys getestet werden. Hierfür wurde das zuvor klonierte Konstrukt um das Pseudomonas Exotoxin A (ETA) erweitert. Die Wirkung von ETA´ entfaltet sich nach intrazellulärer Aufnahme durch die Inhibierung der Translation. In Internalisierungsassays konnte die selektive Aufnahme des BAR-Body-ETA Konstrukts in MCL Zellen mit passendem BZR gezeigt werden und LDH release assays zeigten die zytotoxische Wirkung des LRPAP1 BAR-Body im FAB Format. Beide Versuche ließen sich mehrfach mit ähnlichen Ergebnissen reproduzieren.

Es ist also gelungen, LRPAP1 in ein Antikörper-ähnliches FAB Format zu integrieren und dessen spezifische Bindung an, Internalisierung in und Zytolyse von Mantelzelllymphomzellen zu beweisen. Damit ist die Grundlage für die weitere Entwicklung von LRPAP1 enthaltenden BAR-Bodies geschaffen.

Für die weitere Entwicklung und Translation ist zu beachten, dass das hier beschriebene Konstrukt bakteriell hergestellt wurde und damit aufgrund seiner Immunogenität weniger für eine weitere in vivo Testung geeignet ist. Es sollte also versucht werden die BAR-Bodies, die für die Weiterentwicklung vorgesehen sind, von eukaryotischen Zellsystemen produzieren zu lassen. Dies ist wichtig, um bakterielle posttranslationale Modifizierungen, die im Menschen starke Immunreaktionen hervorrufen können, zu vermeiden.

In welches Therapieformat BARs und damit LRPAP1 integriert werden sollten, um eine möglichst effektive, nebenwirkungsarme, kostengünstige und leicht anzuwendende neue Therapieoption für B-Zell Neoplasien wie das Mantelzelllymphom darzustellen, bleibt unklar. Hier sind viele verschiedene Möglichkeiten denkbar.

Zum einen könnte das bereits von Thurner et al. (*Thurner et al, 2019*) beschriebene BAR-Toxin Format verwendet werden. Im Gegensatz zu dem hier beschriebenen Konstrukt wurde bei diesem Immuntoxin das LRPAP1 Epitop direkt an das Pseudomonas Exotoxin ETA gekoppelt. Auch dieses Konstrukt wurde zunächst noch prokaryotisch hergestellt und ist deutlich kleiner als das hier beschriebene LRPAP1 BAR-Body im FAB Format. Die geringe Größe dieses BAR Immuntoxins hätte zum Vorteil, dass es auch bei sehr großen Tumoren gute Gewebegängigkeit besäße. Ein Nachteil könnte allerdings in der schnelleren Ausscheidung

über die Nieren liegen, die zumindest teilweise größenabhängig erfolgt. Da das Konstrukt mit circa 100kDa aber größer als Harnstoff (60Da) ist, sollte keine schnellere Ausscheidung über die Nieren erfolgen.

Das hier beschriebene BAR-Body Format stellt auch eine vielversprechende Option für therapeutische BAR Formate dar. Neben dem beschriebenen FAB Format könnten LRPAP1 und andere BARs auch komplett in IgG Antikörper integriert werden. Diese könnten für sich oder auch konjugiert an Toxine therapeutische Anwendungen finden. Der Vorteil dieser Konstrukte läge in der langjährigen Erfahrung, die mit dem Antikörperformat in der klinischen Entwicklung und Anwendung gemacht wurden. Pharmakokinetische Eigenschaften von IgG BAR-Bodies sollten denen von klassischen Antikörpern wie Rituximab ähneln und man könnte in der weiteren translationalen Entwicklung von diesen Erfahrungen profitieren.

Bewarder et al. konnten BARs in ein bispezifisches Format integrieren, indem die BARs LRPAP1 und ARS2 an ein single-chain Fragment gekoppelt wurden, welches T-Killer Zellen bindet (*Bewarder et al, 2017*). Aus den Erfahrungen mit dem bispezifischen Antikörper Blinatumomab ist bekannt, dass aufgrund der geringen Größe von bispezifischen Konstrukten, diese als Dauerinfusion verabreicht werden müssen. Allerdings zeigen sie aber auch in rezidierten Lymphomen und Leukämien noch eine außerordentliche Wirksamkeit.

Schließlich ist es sogar denkbar BARs als Bindungsdomäne von CAR T-Zellen anstelle von „single-chain“ Fragmenten, die gegen bestimmte Antigene gerichtet sind, einzusetzen.

Welche dieser vielen Möglichkeiten nun das beste Format ist, um BARs zu integrieren muss durch zahlreiche und ausgiebige weitere Studien ermittelt werden.

Schlussfolgerung

Zusammenfassend können die Versuche als Erfolg gewertet werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die in den in-vitro Versuchen verwendeten LRPAP1 BAR-bodies im Fab-Format spezifisch an Mantelzelllymphomzellen mit LRPAP1-reaktivem BZR binden und von diesen internalisiert werden. Durch das selektive Abtöten der Tumorzellen nach Kopplung an eine Wirkkomponente (ETA´ Toxin), ist des Weiteren mit Hilfe von LDH-release assays bewiesen, dass nur die Zellen angegriffen werden, die auch einen LRPAP1-reaktiven BZR exprimieren, und damit dem potentiellen malignen Klon entsprechen. Dieser Bar-Body ist daher möglicherweise eine neue, alternative Therapiemodalität für das Mantelzelllymphom. Um die Möglichkeiten einer Translation dieser in-vitro Experimente in die klinische Anwendung weiter zu evaluieren, sollten in einem nächsten Schritt prä-klinische in-vivo Versuche, d.h. Mausexperimente, durchgeführt werden.

VII Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Therapieschema Mantelzelllymphom.....	9
Abbildung 2: Aufbau und Struktur eines Antikörpers und Fab-Fragments	12
Abbildung 3 VDJ-Rekombination nach Memorial University.....	13
Abbildung 4 T-Zell-abhängige B-Zellaktivierung nach Duale Reihe „Physiologie“	14
Abbildung 6: TA-Vektor	24
Abbildung 7: TA-Vektor 2	25
Abbildung 8: pCES1-Vektor	26
Abbildung 9: Proteinmarker	32
Abbildung 10: Aufbau Westernblot	33
Abbildung 11 Versuchsschema zum Nachweis einer Internalisierungt.....	35
Abbildung 12 Übersicht über die Arbeitsschritte dieser Arbeit.....	39
Abbildung 13: Abbildung der Epitoplage im Fab	39
Abbildung 14: Gelelektrophorese der Primer: Analyse der PCR-Reaktionen zur Generierung der Epitopregionen	40
Abbildung 15: Gelelektrophorese TA-Klonierung der schweren Kette.....	41
Abbildung 16: Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus aus TA-Klonen der schweren Kette.....	42
Abbildung 17: Gelelektrophorese pCES1-Klonierung schwere Kette	43
Abbildung 18: Gelelektrophorese TA-Klonierung leichte Kette.....	43
Abbildung 19: Gelelektrophorese des Restriktionsverdaues aus TA-Konstrukten der leichten Kette	44
Abbildung 20: Gelelektrophorese pCES-Klonierung leichte und schwere Kette	45
Abbildung 21: Westernblot der Fab-Konstrukte	46
Abbildung 22: Bindungsassay FACS-Analyse	47
Abbildung 23: Internalisierungsassay der Fab-Konstrukte.	48
Abbildung 24: Gelelektrophorese Colony-PCR der Klonierung mit ETA´	49
Abbildung 25: Westernblot mit ETA´- Konstrukten.....	50
Abbildung 26: Bindungsassay FACS-Analyse ETA´-Konstrukt	50
Abbildung 27: Oberflächenfärbung und Internalisierung.	51
Abbildung 28: spezifische Lyse MAVER1- und Granta519-Zelllinie	52

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Laborgeräte	18
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien.....	19
Tabelle 3: Puffer und Lösungen	21
Tabelle 4: verwendete Kits.....	21
Tabelle 5: Primer	23
Tabelle 6: Antikörper.....	23
Tabelle 7: Vektoren	23
Tabelle 8: Primerkombinationen für die Varianten 1-3	40

VIII Literaturverzeichnis

- 1 Behrends J**, Bischofberger J, Deutzmann R et al. (2012): Duale Reihe Physiologie 2.Auflage, Abb 7.13, S.213, Hrsg. 2. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2012. doi:10.1055/b-002-23567
- 2 Bewarder M**, Thurner L, Fadle N, Kemele M, Regitz E, Preuss KD, Pfreundschuh M (2017): B-cell receptor antigens as the targeting moiety for bispecific constructs – a novel treatment approach for B-cell lymphomas, Abstract ASH 2017
- 3 Binet JL**, Auquier A, Dighiero G et al. (1981): A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 48:198-204, 1981. [PMID:7237385](#)
- 4 Braendstrup, P.** et al. (2005): Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adult refractory idiopathic thrombocytopenic purpura. In: *Am. J. Hematol.* Bd. 78, S. 275–280. PMID 15795920
- 5 Dameshek, W.**, R.S. Schwartz (1959): *Leukemia and auto-immunization- some possible relationships*. *Blood*, 1959. **14**: p. 1151-8.
- 6 Dragos CI** (2011, revised 2019) Lymphoma and plasma cell neoplasms- Hodgkin lymphoma Classic Hodgkin – general , Copyright: 2002-2017, PathologyOutlines.com, Inc., PubMed Search: Classic Hodgkin [title]
- 7 Dreyling M** (2014): *Mantle Cell Lymphoma: Biology, Clinical Presentation, and Therapeutic Approaches. American Society of Clinical Oncology Educational Book*, Band 34, S. 191–198, doi:10.14694/edbook_am.2014.34.191
- 8 Dreyling M**, Geisler C, Hermine O et al. (2014): ESMO Guidelines Working Group. Newly diagnosed and relapsed mantle cell lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 25 Suppl 3:iii83-iii92, 2014. DOI:10.1093/annonc/mdu264
- 9 Dreyling M**, E. Campo, O. Hermine, M. Jerkeman, S. Le Gouill, S. Rule, O. Shpilberg, J. Walewski and M. Ladetto (2017): Newly Diagnosed and Relapsed Mantle Cell Lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* (2017) 28 (suppl 4): iv62–iv71
- 10 Edge SB**, Byrd DR, Compton CC, et al., eds, (2010): *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer
- 11 Fachinformation Avastin** (Roche), Stand September 2019
- 12 Goldstein MJ** , M.D., Mitchell EP , F.A.C.P., M.D. (2009): Carcinoembryonic Antigen in the Staging and Follow-up of Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Investigation* 23(4):338-51 · Published online: 11 Jun 2009,
- 13 Hollander, N.**, Haimovich, J (2017): Altered N-Linked Glycosylation in Follicular Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukemia: Involvement in Pathogenesis and Potential Therapeutic Targeting. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 912.
- 14 Hoogenboom HR**, Griffiths A, Johnson K, Chiswell D, Hudson D, Winter G (1991): Multi, subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying, antibody (Fab) heavy and light chains. *Nucleic Acids Res* 19:4133-4137
- 15 Hoogenboom HR**, de Bruïne AP, Hufton SE, Hoet RM, Arends JW, Roovers RC (1998): Antibody phage display technology and its applications, *Immunotechnology* Volume 4, Issue 1, June 1998, Pages 1-20, [https://doi.org/10.1016/S1380-2933\(98\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1380-2933(98)00007-4)

- 16 Hoster E**, Dreyling M, Klapper W, Gisselbrecht C, van Hoof A, Hanneke C, Kluin-Nelemans HC, Pfreundschuh M, Reiser M, Metzner B, Einsele H, Peter N, Jung W, Wörmann B, Ludwig WD, Dührsen U, Eimermacher H, Wandt H, Hasford J, Hiddemann W, Unterhalt M (2007): A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood* 2008 111:558-565; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06->
- 17 Hwang J**, Fitzgerald DJ, Adhya S, Pastan I. (1987): Functional domains of Pseudomonas exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in E. coli. *Cell*. 1987 Jan 16;48(1):129-36.
- 18 Jo JC**, Kim SJ, Lee HS, Eom HS, Lee SI, Park Y, Lee JO, Lee Y, Yhim HY, Yang DH, Byun JM, Kang HJ, Kim HJ, Shin HJ, Yoo KH, Suh C; and Consortium for Improving Survival of Lymphoma (CISL) (2019): Clinical features and treatment outcomes of limited-stage mantle cell lymphoma: Consortium for Improving Survival of Lymphoma report; *Ann Hematol*. 2019 Dec 18. doi: 10.1007/s00277-019-03803-x.
- 19 Klapper W**, Hoster E, Determann O, Oschlies I, van der Laak J, Berger F, Bernd HW, Cabeçadas J, Campo E, Cogliatti S, Hansmann ML, Kluin PM, Kodet R, Krivolapov YA, Lodenkemper C, Stein H, Möller P, Barth TEF, Müller-Hermelink K, Rosenwald A, Ott G, Pileri S, Ralfkiaer E, van Krieken G, Wacker H, Unterhalt M, Hiddemann W, Dreyling M (2009): Ki-67 as a prognostic marker in mantle cell lymphoma—consensus guidelines of the pathology panel of the European MCL Network. *J Hematop*. 2009 Jul; 2(2): 103–111.
- 20 Kluin-Nelemans HC**, Hoster E, Hermine O, Walewski J, Geisler CH, Trneny M, Stilgenbauer S, Kaiser F, Doorduijn JK, Salles G, Szymczyk M, Tilly H, Kanz L, Schmidt C, Feugier P, Thieblemont C, Zijlstra JM, Ribrag V, Klapper W, Pott C, Unterhalt M, Dreyling MH (2019): Treatment of Older Patients With Mantle Cell Lymphoma (MCL): Long-Term Follow-Up of the Randomized European MCL Elderly Trial. *J Clin Oncol*. 2019 Dec 5;JCO1901294. doi: 10.1200/JCO.19.01294. [Epub ahead of print], PMID:31804876
- 21 Köhler G**, Milstein C (2005): Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 1975, 256 (5517): 495–497. *J Immunol* March 1, 2005, 174 (5) 2453-2455;
- 22 Korenberg JR**, Argraves KM, Chen XN, Tran H, Strickland DK, Argraves WS. (1994): Chromosomal Localization of Human Genes for the LDL Receptor Family Member Glycoprotein 330 (LRP2) and Its Associated Protein RAP (LRPAP1). *Genomics*. 1994; 22:88-93
- 23 Kumar S**, Masood N, Adil SN (2009): Old disease, new targets. Part-II, haematological malignancies. *J Pak Med Assoc*. 2009 Aug;59(8):555-61
- 24 Laemmli UK** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. Bd. 227, 1970, S. 680–685, doi:10.1038/227680a0, PMID 5432063.
- 25 Lucas AH** (2003): Immunoglobulin Gene Construction: Human, , First published: 28 May 2003, <https://doi.org/10.1038/npg.els.0001172>
- 26 Luttmann W.**, Bratke K., Küpper M., Myrtek D. (2014) Western-Blot. In: *Der Experimentator: Immunologie*. Experimentator. Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg
- 27 Maude SL**, Frey N, Shaw PA, Aplenc R, Barrett DM, Bunin NJ, Chew A, Gonzalez VE, Zheng Z, Lacey SF, Mahnke YD, Melenhorst JJ, Rheingold SR, Shen A, Teachey DT, Levine BL, June CH, Porter DL, Grupp SA (2014): Chimeric Antigen Receptor T Cells for Sustained Remissions in Leukemia. *N Engl J Med*. 2014 Oct 16; 371(16): 1507–1517., doi:10.1056/NEJMoa1407222

- 28 Memorial University** (Newfoundland and Labrador's University)
http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-23/23_12.jpg (abgerufen am 09.02.2019, 10:42 Uhr)
- 29 Myklebust, J.H.**, et al. (2017): *Distinct patterns of B-cell receptor signaling in non-Hodgkin lymphomas identified by single-cell profiling*. *Blood*, 2017. **129**(6): p. 759-770
- 30 Narurkar R**, Alkayem M, DeLong Liu D(2016): SOX11 is a biomarker for cyclin D1-negative mantle cell lymphoma, *Biomark Res.* 2016; 4: 6. doi: 10.1186/s40364-016-0060-9,
- 31 National Cancer Institute (NIH)** Ibrutinib
https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=ncit&code=C81934, abgerufen am 31.10.2019, 09:21 Uhr),
- 32 National Cancer Institute (NIH)** Idelalisib
 (:https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=ncit&code=C78825, abgerufen am 31.10.2019, 09:22 Uhr)
- 33 National Cancer Institute (NIH)** Inotuzumab:
https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=ncit&code=C71542, abgerufen am 31.10.2019, 09:25 Uhr)
- 34 National Cancer Institute (NIH)** Obinutuzumab
https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=ncit&code=C70741 (abgerufen am 31.10.2019, 09:24 Uhr)
- 35 National Cancer Institute (NIH)** Polatuzumab
 (https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=ncit&code=C104153, abgerufen am 31.10.2019, 09:25 Uhr)
- 36 Padlan E**: *Anatomy of the antibody molecule*. In: *Mol. Immunol.* 31, Nr. 3, Februar 1994, S. 169–217. doi:10.1016/0161-5890(94)90001-9. PMID 8114766.
- 37 PageRuler Prestained Protein Ladder** Pub. No. MAN0011772 Rev. Date 19 June 2019 (Rev. C.00) Produktinformation Thermo Scientific
- 38 Palumbo A**, Avet-Loiseau H, Oliva S et al. (2015): Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol* 33:2863-2869, 2015. DOI:10.1200/JCO.2015.61.2267
- 39 Parsonnet, J.**, et al. (1994): *Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma*. *N Engl J Med*, 1994. **330**(18): p. 1267-71
- 40 PDQ® Adult Treatment Editorial Board**. PDQ Adult Hodgkin Lymphoma Treatment. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Updated <25.10.2019>. Available at: <https://www.cancer.gov/types/lymphoma/patient/adult-hodgkin-treatment-pdq>. Accessed <MM/DD/YYYY>. [PMID: 26389245]
- 41 Pe´rez-Gala´n P**, Dreyling M, Wiestner A (2011): Mantle cell lymphoma: biology, pathogenesis, and the molecular basis of treatment in the genomic era. *Blood* 2011 117:26-38; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-189977>
- 42 Pfreundschuh M, MD**, Thurner L, Barth S, Pickert D, Fadle N, Kemele M, Regitz E, Neumann F, Nachreiner T, Preuss KD (2015): BARs (B -cell receptor antigens for reverse targeting): A Novel and Ultimately Specific Treatment Concept for B-Cell Neoplasms. *Blood* (2015) 126 (23): 3995., <https://doi.org/10.1182/blood.V126.23.3995.3995>

43 Pieper, W. (2013): Innere Medizin; Springer-Verlag Berlin Heidelberg, DOI 10.1007/978-3-642-33108-4, S. 670ff

44 Presta, L.G., et al. (1997): Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res*, 1997. 57(20): p. 4593-9.

45 Preuss KD, Pfreunds Schuh M, Fadle N, Regitz E, Raudies S, Murwaski N, Ahlgrimm M, Bittenbring J, Klotz M, Schäfer KH, Held G, Neumann F, Grass S (2011): Hyperphosphorylation of autoantigenic targets of paraproteins is due to inactivation of PP2A. *Blood* 118(12):3340-6 · July 2011,

46 Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (2006): Duale Reihe - Biochemie (ISBN 3-13-125351-7) © 2006 Georg Thieme Verlag KG Stuttgart, S.492, Kap. 13.3.1

47 Reff ME, Camer K, Chambers KS, et al. (1994): Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 1994; 83:435–445

48 Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.) (2017): Krebs in Deutschland für 2013/2014. 11. Ausgabe Berlin 2017

49 Rote Liste Abciximab, <https://www.rote-liste.de/suche/stoff/990003/Abciximab> (abgerufen am 31.10.2019)

50 S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Hodgkin Lymphoms bei erwachsenen Patienten Version 2.1 – April 2019 AWMF-Registernummer: 018/029

51 Rudolph C, Steinemann D, von Neuhoff N, Gadzickia D, Rippergera T, Drexler HG, Mrasek K, Liehr T, Claussen U, Emuraa M, Schrock E, Schlegelberger B (2004): Molecular cytogenetic characterization of the mantle cell lymphoma cell line GRANTA-519. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, Volume 153, Issue 2, September 2004, Pages 144-150, <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2004.01.006>

52 Swerdlow S, Campo E, Harris N, et al., eds. (2008): WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: World Health Organization; 2008

53 Swerdlow S, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES (2016): The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 2016 127:2375-2390; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2016-01-643569>

54 Thurner L, Preuss KD, Bewarder M, Kemele M, Fadle N, Regitz E, Altmeyer S, Schormann C, Poeschel V, Ziepert M, Walter S, Roth P, Weller M, Szczepanowski M, Klapper W, Monoranu C, Rosenwald A, Möller P, Hartmann S, Hansmann ML, Mackensen A, Schäfer H, Schorb E, Illerhaus G, Buslei R, Bohle RM, Stilgenbauer S, Kim YL, Pfreunds Schuh M (2018): Hyper-N-glycosylated SAMD14 and neurabin-I as driver autoantigens of primary central nervous system lymphoma. *Blood* (2018) 132 (26): 2744-2753. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-03-836932>

55 Thurner L, Hartmann S, Preuss KD, Bewarder M (2018): The riddle of lymphoma BCR-antigenes. *Oncotarget*. 2018 Nov 9;9(88):35805-35806. doi: 10.18632/oncotarget.26318.

56 Thurner L, Hartmann S, Fadle N, Kemele M, Bock T, Bewarder M, Regitz E, Neumann F, Nimmegern A, von Müller L, Pott C, Kim YL, Bohle RM, Wasik M, Schuster SJ, Hansmann ML, Preuss KD, Pfreunds Schuh M (2019): LRPAP1 is a frequent proliferation-

inducing antigen of BCRs of mantle cell lymphomas and can be used for specific therapeutic targeting, , Leukemia 33,pages148–158 (2019)

57 TOPO® TA Cloning® Kit Five-minute cloning of Taq polymerase-amplified PCR products, Catalog numbers (pCR™2.1-TOPO® vector) K4500-01, K4500-40, K4500-J10, K4510-20, K4520-01, K4520-40, K4550-01, K4550-40, K4560-01, K4560-40, K4500-02, K4510-22, 450641, Document Part Number 250184 Publication Number MAN0000047 Revision A.0

58 Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, Nowell PC, Croce CM. (1984): Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. Science. 1984 Nov 30;226(4678):1097-9

59 Vargas-Madrado E, Lara-Ochao F, Almagro JC (1995): Canonical structure repertoire of the antigen-binding site of immunoglobulins suggests strong geometrical restrictions associated to the mechanism of immune recognition. J Mol Biol 254:497-504

60 Washington State University <https://apps.vetmed.wsu.edu/tkp/Search.aspx>, Liste aller Cluster of Differentiation, Seite der, abgerufen am 05.11.2019, 11:35 Uhr

61 Weisenburger, D.D., Armitage, J.O. (1996). Mantle cell lymphoma - An entity comes of age. *Blood*, 87(11), 4483-4494.

62 Williams SE, Ashcom JD, Argraves WS, Strickland DK. (1992): A novel mechanism for controlling the activity of alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein. Multiple regulatory sites for 39-kDa receptor-associated protein. J Biol Chem 1992; 267: 9035-9040

63 Wotherspoon, A.C., et al. (1991): *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. Lancet, 1991. **338**(8776): p. 1175-6.

64 Zamo A, et al. (2006): Establishment of the Maver-1 cell line, a model for leukemic and aggressive mantle cell lymphoma. Haematologica: 91(1):40-47, 2006. Pubmed: 164343698/6

VIII Publikationen

XI Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die mich auf unterschiedliche Weise bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Michael Pfreundschuh für die Überlassung dieses Themas und die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit im Jose-Carreras-Center der Inneren Medizin I an der Uniklinik des Saarlandes zu erstellen.

Herzlichen bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Stephan Stilgenbauer für die Übernahme meiner Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinem Betreuer, Herrn Dr. Moritz Bewarder bedanken. Mit seinen Ratschlägen und seiner Unterstützung während meiner Arbeit im Labor sowie beim eigentlichen Schreiben trug er entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Herrn Dr. Klaus-Dieter Preuss hatte immer ein offenes Ohr für mich und meine Fragen und konnte mit seiner offenen Art alle organisatorischen Probleme und Schreibschwierigkeiten aus der Welt schaffen.

Frau Evi Regitz und Frau Natalie Fadle haben mir während meiner praktischen Arbeit im Labor stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden und alle Fragen und Probleme mit mir zusammen gelöst. Ihre Erklärungen und das Heranführen an die wissenschaftliche Arbeit im Labor waren ungemein hilfreich. Hierfür bin ich ihnen sehr dankbar.

Bei allen weiteren Mitarbeitenden des Jose-Carreras-Centers möchte ich mich bedanken für das sehr gute Arbeitsklima und die Offenheit für meine Fragen, die ich jederzeit stellen konnte. Ich konnte jederzeit Fragen und Probleme ansprechen und danke daher auch für die sehr gute Zusammenarbeit.

Der besondere Dank gilt meinen Eltern, Caroline und Jürgen Will, die mir im Studium und auch während der Arbeit immer zur Seite gestanden, motiviert und auch mit all ihrer Kraft unterstützt haben. Ich möchte mich auch bei meinem Freund und meiner Schwester herzlich bedanken für die Geduld und das Verständnis für mein Studium und diese Arbeit. Sie haben ihr Möglichstes getan, um meine Motivation und meinen Ehrgeiz hoch zu halten.