

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

B-Zell-Rezeptor vermittelte Therapieansätze des primären ZNS-Lymphoms

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

2019

vorgelegt von Lisa Goerens,
geboren am 01.07.1995
in Luxemburg

Tag der Promotion: 26.05.2020

Dekan: Prof. Dr. M. D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. S. Stilgenbauer
Prof. Dr. N. Graf

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Zusammenfassung | 1 |
| 1.1. Übersicht | 1 |
| 1.2. Abstract | 2 |
| 2. Einleitung | 3 |
| 2.1. Lymphome | 3 |
| 2.2. Primäre ZNS-Lymphome | 5 |
| 2.3. BARs („B-cell receptor antigens for reverse targeting“)..... | 6 |
| 2.4. Fab-Fragment | 8 |
| 2.5. Fragestellung der Arbeit..... | 11 |
| 3. Material und Methoden | 12 |
| 3.1. Material | 12 |
| 3.1.1. Laborgeräte..... | 12 |
| 3.1.2. Verbrauchsmaterialien..... | 12 |
| 3.1.2.1. Lösungen und Medien | 13 |
| 3.1.2.2. Kits | 15 |
| 3.1.3. Antikörper | 16 |
| 3.1.4. Enzyme..... | 16 |
| 3.1.5. Zellkultur..... | 16 |
| 3.1.5.1. Bakterien | 16 |
| 3.1.5.2. Zellen..... | 16 |
| 3.2. Methodik | 18 |
| 3.2.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)..... | 18 |
| 3.2.2. Agarose-Gel-Elektrophorese | 20 |
| 3.2.3. Klonierung in einen TOPO-TA-Vektor..... | 20 |
| 3.2.3.1. pCR 2.1-TOPO-Vektor (TOPO-TA-Vektor) | 20 |
| 3.2.3.2. Prinzip der Ligation in den pCR 2.1-TOPO-Vektor..... | 21 |
| 3.2.4. DNA-Isolation | 22 |
| 3.2.5. Sequenzierung | 23 |
| 3.2.6. Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen..... | 23 |
| 3.2.7. DNA-Extraktion aus Agarose-Gel | 23 |
| 3.2.8. Ligation in den pCES1-Vektor..... | 23 |
| 3.2.8.1. pCES1-Vektor | 23 |
| 3.2.8.2. Prinzip der Ligation in den pCES1-Vektor | 25 |
| 3.2.9. Transfektion in TGI E. coli-Bakterien..... | 25 |

| | | |
|-----------|--|-------------------------------------|
| 3.2.10. | Expression | 25 |
| 3.2.11. | Aufreinigung | 26 |
| 3.2.12. | Analyse der Proteinexpression | 26 |
| 3.2.13. | Herstellung einer rekombinanten Zelllinie, welche den NRBI-BZR exprimiert..... | 27 |
| 3.2.14. | Durchflusszytometrie | 28 |
| 3.2.14.1. | Prinzip der Durchflusszytometrie..... | 28 |
| 3.2.14.2. | Bindungs-Assay..... | 29 |
| 3.2.14.3. | Internalisierungs-Assay | 29 |
| 3.2.15. | Zytotoxizitäts-Assay..... | 30 |
| 4. | Ergebnisse | 32 |
| 4.1. | Umsetzung der Fragestellung in ein Konzept | 32 |
| 4.2. | Herstellung einer Lymphomzelllinie, die das ZNS-Lymphom abbildet | 32 |
| 4.3. | Aufbau der BAR-Bodies | 33 |
| 4.4. | Arbeitsschritte zur Herstellung der BAR-Bodies | 35 |
| 4.4.1. | Klonierung der DNA-Sequenz der BAR-Bodies..... | 37 |
| 4.4.1.1. | DNA-Sequenz der Schwerekette..... | 37 |
| 4.4.1.2. | DNA-Sequenz der Leichtkette | 42 |
| 4.4.1.3. | Sequenzierung | 46 |
| 4.4.2. | Produktion der BAR-Bodies..... | 48 |
| 4.4.3. | Funktionelle Testung der BAR-Bodies | 49 |
| 4.4.4. | Modifizierung des Formats der BAR-Bodies..... | 50 |
| 4.4.5. | Klonierung der modifizierten DNA-Sequenz der BAR-Bodies | 53 |
| 4.4.6. | Produktion der modifizierten BAR-Bodies | 56 |
| 4.4.7. | Funktionelle Testung der modifizierten BAR-Bodies..... | 57 |
| 4.4.7.1. | Bindungs-Assay..... | 57 |
| 4.4.7.2. | Internalisierungs-Assay | 60 |
| 4.4.7.3. | Zytotoxizitäts-Assay..... | 62 |
| 5. | Diskussion | 65 |
| 6. | Literaturverzeichnis..... | 72 |
| 7. | Abkürzungsverzeichnis | 76 |
| 8. | Abbildungsverzeichnis | 77 |
| 9. | Tabellenverzeichnis..... | 79 |
| 10. | Publikation | 80 |
| 11. | Danksagung..... | 81 |
| 12. | Lebenslauf..... | Error! Bookmark not defined. |

1. Zusammenfassung

1.1. Übersicht

Das primäre ZNS-Lymphom (PZNSL) zählt zu den hochmalignen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen vom diffus großzelligen Typ. Seit dem Ausbruch der AIDS-Epidemie in den 80er-Jahren kam es zu einer Zunahme der Inzidenz dieses Tumors, da eine starke Assoziation zwischen dem primären ZNS-Lymphom und Immunsuppression besteht. Bei immunkompetenten Patienten handelt es sich um einen seltenen Tumor des Lymphsystems, der vorwiegend ab dem 5. Lebensjahrzehnt diagnostiziert wird. Sein Auftreten im ZNS stellt eine Herausforderung für die Behandlung dar. Im Vordergrund der Therapie stehen hirngängige Chemotherapien, vor allem Methotrexat, und die Ganzhirnbestrahlung. Trotz dieser intensiven Therapien, die mit starken Nebenwirkungen behaftet sind, kommt es häufig zu Rezidiven, welche mit einer schlechten Prognose des Gesamtüberlebens einhergehen. Aus diesem Grund ist es wichtig, dass an neuen, gut wirksamen und nebenwirkungsarmen Therapieansätzen geforscht wird. Über den B-Zell-Rezeptor (BZR) erkennen B-Lymphozyten ein für sie spezifisches Antigen, wobei jeder B-Lymphozyt einen in der variablen Region etwas unterschiedlichen BZR besitzt. Da B-Zell-Lymphome von einer entarteten B-Zelle, dem malignen Klon, ausgehen, besitzt jede B-Zelle eines B-Zell-Lymphoms einen identischen BZR, der sie von allen anderen, gesunden B-Lymphozyten unterscheidet. Mit der Entdeckung von BZR-Antigenen maligner Lymphome ergibt sich ein neues, hochspezifisches Therapiekonzept, welches ausschließlich den malignen B-Zell-Klon über dessen B-Zell-Rezeptor angreift. Dieses neue Therapiekonzept wurde BARs („B-cell receptor antigens for reverse targeting“) genannt. Bei circa 67% der Patienten mit PZNSL exprimieren die Lymphomzellen einen BZR, welcher spezifisch das Antigen und BAR Neurabin I bindet. In welchem Format BARs und damit Neurabin I therapeutisch eingesetzt werden können ist unklar. BAR-Bodies integrieren BARs in ein Fab-Antikörper-Format, wobei die variablen Domänen der Schwer- und Leichtkette durch die DNA-Sequenz eines BZR-Antigens, zum Beispiel Neurabin I, ersetzt werden. Ein Neurabin-BAR-Body wurde in dieser Arbeit hergestellt und an das Pseudomonas aeruginosa Exotoxin A gekoppelt, welches nach Internalisierung über den BZR als toxische Wirkkomponente dienen soll. Das BAR-Body-Konstrukt wurde in einem pCES1-Vektor über mehrere Zwischenschritte kloniert und von TGI E. coli-Bakterien exprimiert. Die spezifische Bindung des BAR-Body an Lymphomzellen und deren Internalisierung wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Nach Änderung des Fab-Formats in eine reduzierte, nur noch die Schwerkette enthaltende Form, konnte eine spezifische Bindung und Internalisierung nachgewiesen werden. In Zytotoxizitäts-Assays konnte die spezifische Lyse einer, mit einem Neurabin-spezifischen BZR transfizierten, Lymphomzelllinie gezeigt werden. Diese Arbeit beschreibt eine erste potentielle Therapieform des primären ZNS-Lymphoms, welche ausschließlich den malignen Klon trifft, indem die spezifische BZR-Antigen-Interaktion ausgenutzt wird.

1.2. Abstract

B-cell-receptor mediated therapy strategy for primary CNS lymphoma

The primary CNS lymphoma (PCNSL) is an aggressive diffuse large B-cell-Non-Hodgkin-lymphoma. Since the AIDS-epidemic in the 80ies, the incidence of this tumor has increased due to the correlation between primary CNS lymphoma and immunosuppression. In immunocompetent patients, it is a rare tumor of the lymph system, which occurs mainly after the 5th life-decade. Its appearance in the central nervous system poses a challenge for its therapy. Chemotherapy, mostly Methotrexat, and brain radiation are the mainly used therapeutic options. However, they go along with many side effects and even after successful completion of therapy, relapses occur frequently and lead to poor overall-survival. For these reasons new and effective therapies with less side effects are needed urgently.

B-lymphocytes recognize antigens specific for them via their B-cell receptor (BCR), each B-lymphocyte having a slightly different BCR in the variable region to cover a wide variety of antigens. As B-cell lymphomas emanate from a degenerate B-cell, the malignant clone, each B-cell of a B-cell lymphoma has an identical BCR that distinguishes it from all other healthy B-lymphocytes. With the discovery of B-cell receptor antigens of malignant lymphomas results a new, highly specific therapy concept, which exclusively attacks the malignant B-cell clone via its B-cell receptor. This new therapy concept was called BARs (“B-cell receptor antigens for reverse targeting”). In about 67% of patients with primary CNS lymphoma, the lymphoma cells express a B-cell receptor on their surface that specifically binds the antigen and BAR Neurabin I. In what format BARs and thus Neurabin I can be used therapeutically is unclear.

BAR-Bodies integrate BARs into an antibody Fab-format, replacing the variable domains of the heavy and light chains with the DNA sequence of a B-cell receptor antigen. A Neurabin-BAR-Body was constructed and coupled to the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A to serve as a toxic component after internalization via the B-cell receptor of the lymphoma cell. The BAR-Body construct was cloned in a pCES1-vector through intermediate steps and expressed by TGI *E. coli* bacteria. The specific binding of the BAR-Body to lymphoma cells and their internalization was determined by flow cytometry. After changing the Fab-format to a reduced form containing only the heavy chain, specific binding and internalization could be demonstrated. Cytotoxicity assays revealed the specific lysis of a lymphoma cell line transfected with a Neurabin I specific BZR. This work describes the first potential therapy form of primary CNS lymphoma that exclusively targets the malignant clone by exploiting the specific BZR antigen interaction.

2. Einleitung

2.1. Lymphome

Als Lymphome werden Tumore des lymphatischen Systems bezeichnet. Sie können benigne, im Rahmen einer Infektion, oder maligne sein. Maligne Lymphome sind Neoplasien der Zellen des Immunsystems, die durch monoklonales und entartetes Wachstum von reifen B- oder T-Lymphozyten entstehen. Die WHO-Klassifikation unterteilt die malignen Lymphome in Hodgkin-Lymphome, reife B-Zell-Neoplasien und reife T-Zell-Neoplasien.⁵⁸

Das Hodgkin-Lymphom zählt zu den am besten therapierbaren onkologischen Erkrankungen bei Erwachsenen. Es tritt vor allem bei Jugendlichen und jungen Erwachsenen auf, kann aber auch bei älteren Menschen vorkommen. Diese Erkrankung hat bei einer stadienadaptierten Therapie eine 5-Jahres-Überlebensrate von über 90% und damit eine gute Prognose.^{22, 35}

Im Gegensatz dazu steht die heterogene Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome. Sie machen mit circa 75% den Großteil der malignen Lymphome aus (zum Vergleich: Hodgkin-Lymphome circa 25%).³⁵ Non-Hodgkin-Lymphome können in jedem Lebensalter auftreten, ihre Häufigkeit nimmt mit steigendem Lebensalter zu. Sie machen circa 5% aller malignen Tumoren im Erwachsenenalter aus. Bei jungen Erwachsenen stellen sie die fünfthäufigste Todesursache dar.³⁵ Die Ätiologie der Non-Hodgkin-Lymphome ist noch nicht definitiv geklärt. Jedoch sind bereits zahlreiche Faktoren bekannt, die die Entstehung eines Lymphoms begünstigen können, wie beispielsweise Infektionen, unter anderem mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV), exogene Noxen wie ionisierende Strahlung und toxische Substanzen oder genetische Erkrankungen durch chromosomale Translokationen.³⁵ Gemeinsam ist allen Lymphomen dieser heterogenen Gruppe, dass es zur malignen Transformation von reifen Lymphozyten kommt, welche die Fähigkeit zur weiteren Differenzierung verlieren. Durch eine Immunphänotypisierung der malignen Lymphomzellen kann eine Zuordnung zur B- oder T-Zelllinie erfolgen und somit eine Einteilung der Non-Hodgkin-Lymphome in B- und T-Zelllymphome. Die B-Zelllymphome machen dabei einen Anteil von 85 - 90% aus, die restlichen 10 - 15% entfallen auf entartete T-Lymphozyten oder Natürliche Killerzellen.⁵⁵

Leitsymptom der Non-Hodgkin-Lymphome ist die indolente Lymphknotenschwellung, begleitet von B-Symptomatik mit Gewichtsverlust, Nachtschweiß und Fieber. Weiterhin kann es zu Splenomegalie kommen, sowie zur Verdrängung des Knochenmarks mit Anämie, Thrombopenie mit Blutungsneigung und erhöhter Infektanfälligkeit. Die Non-Hodgkin-Lymphome können in indolente (niedrig maligne) und aggressive (hochmaligne) Formen unterteilt werden. Die Stadieneinteilung erfolgt nach der modifizierten Ann-Arbor-Klassifikation und ist in Tabelle 1 dargestellt.

Table 1: Stadieneinteilung der Non-Hodgkin-Lymphome nach der Ann-Arbor-Klassifikation

| | |
|-------------|--|
| Stadium I | Befall einer Lymphknotenregion oder eines extranodalen Herdes |
| Stadium II | Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen bzw. extranodalen Herden auf einer Seite des Zwerchfells |
| Stadium III | Befall von zwei oder mehr Lymphknotenregionen bzw. extranodalen Herden auf beiden Seiten des Zwerchfells |
| Stadium IV | Disseminierter Befall eines oder mehrerer extralymphatischer Organe unabhängig vom Lymphknotenstatus |

Durch die Heterogenität der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) haben die einzelnen Formen sehr unterschiedliche Prognosen und Heilungschancen. Im Gegensatz zu den Hodgkin-Lymphomen sind Non-Hodgkin-Lymphome weniger sensibel für Chemotherapie und haben insgesamt eine schlechtere Überlebensrate. Non-Hodgkin-Lymphome mit hoher Malignität (aggressive NHL) treten meist plötzlich auf und sind rasch progredient. Unbehandelt führen sie innerhalb von Monaten zum Tode. Bei adäquater Therapie mit systemischer Polychemotherapie kann bei 70 - 80% der Patienten eine komplette Remission erreicht werden. Eine dauerhafte Heilung kann allerdings nur bei etwa der Hälfte der Patienten erzielt werden. Non-Hodgkin-Lymphome mit niedriger Malignität, anfangs indolent und langsam progredient, weisen meist einen diffusen Befall auf und sind mit konventioneller Therapie nicht heilbar. Sie können sich in aggressive Lymphome mit hoher Malignität transformieren und enden dann meist innerhalb weniger Monate tödlich. Für einen kurativen Therapieansatz bei niedrig-malignen Non-Hodgkin-Lymphomen in den Stadien I und II kann die Strahlentherapie (Großfeldbestrahlung) eingesetzt werden. In fortgeschrittenen Stadien muss auf aggressive Chemotherapie, welche mit starken Nebenwirkungen einhergeht, zurückgegriffen werden.³⁵

Bei den meisten Non-Hodgkin-Lymphomen stellt die Chemotherapie immer noch die Therapie der ersten Wahl dar. Insbesondere bei B-Zell-Lymphomen hat der Einsatz von monoklonalen Antikörpern zu einer deutlichen Verbesserung der Therapieergebnisse geführt.^{57, 59} Die Integration des CD20-Antikörpers Rituximab in die Therapie von B-Zell-Lymphomen hat zu einer deutlichen Verbesserung des Gesamtüberlebens geführt.^{15, 51} Rituximab bindet an CD20 (Pan-B-Zell-Marker) und wirkt unter anderem über zellulär induzierte Zytotoxizität (ADCC = „antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity“). Patienten mit B-Zell-Lymphomen werden mit einer Kombination aus Immun- und Chemotherapie, zum Beispiel R-CHOP (Rituximab und Kombinationschemotherapie) behandelt, was zu Heilungsraten von 60 – 70 % führt.⁴⁸

Für die zielgerichtete, personalisierte Therapie von Lymphomen stehen mittlerweile viele weitere Therapieansätze zur Verfügung, zum Beispiel Antikörper, Antikörper-Toxin-Konjugate, Zellvermittelte Therapien oder Signalweg-Inhibitoren. Die optimale Zusammensetzung und Abfolge der einzelnen Therapiebestandteile zum Erreichen der besten Therapieergebnisse ist Gegenstand aktueller Studien.³⁶

Obwohl in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte in der Therapie maligner Lymphome erzielt wurden^{20, 46, 59}, gelingt die Heilung indolenter Lymphome nur in Ausnahmefällen und viele Patienten mit aggressiven Lymphomen erleiden Rezidive.³⁴ Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Entwicklung weiterer Therapieoptionen, die im besten Fall hoch wirksam und nebenwirkungsarm sind.

2.2. Primäre ZNS-Lymphome

Beim primären ZNS-Lymphom (PZNSL) handelt es sich in über 95% um ein aggressives (hochmalignes) B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom vom diffus-großzelligen Typ. Bei Diagnosestellung ist der Tumor auf das Gehirnparenchym, die Meningen und / oder das Rückenmark begrenzt. Es wird zwischen dem primären ZNS-Lymphom bei immunkompetenten Patienten und bei Patienten mit angeborenen oder erworbenen Immundefekten unterschieden. Bei Patienten mit AIDS stellt das PZNSL den häufigsten Gehirntumor dar. Die Pathogenese beider Formen ist unterschiedlich, auch wenn die morphologischen Charakteristika ähnlich sind. Das primäre ZNS-Lymphom macht circa 2 - 3% aller primären intrakraniellen Tumoren aus. Der Häufigkeitsgipfel der Erkrankung liegt im 5. – 7. Lebensjahrzehnt. Die Bildgebung der Wahl ist die Kernspintomographie. Hier können intensiv Kontrastmittel aufnehmende Raumforderungen entdeckt werden, die uni- oder multilokulär auftreten und oft periventrikulär lokalisiert sind. Neben der klinisch-neurologischen Untersuchung und der Liquordiagnostik mit Liquorzytologie sollte eine ophthalmologische Untersuchung durchgeführt werden, da es bei circa 10% der Fälle zu einem okulären Befall mit einer Retina-, Uvea- oder Glaskörperinfiltration kommt. Zur Diagnosesicherung wird eine Gewebeprobe des Tumors entnommen.^{46, 53}

Ohne Therapie beträgt das mediane Überleben mit der Diagnose eines PZNSL lediglich ein bis zwei Monate. Durch alleinige Gabe von Kortikosteroiden kommt es in einigen Fällen zur Remission, jedoch treten Rezidive oft bereits nach wenigen Wochen auf.⁵³ Das primäre ZNS-Lymphom hat eine schlechte Prognose im Vergleich zu anderen Lymphomformen. Durch das rasche Wachstum des Tumors sollte eine zügige Einleitung der Therapie erfolgen. Hochdosiertes Methotrexat (HD-MTX), mindestens 3 g/m² KOF pro Einzeldosis, gilt als derzeit wirksamstes Chemotherapeutikum.²⁵ In der Kombination mit anderen liquorgängigen Chemotherapeutika wie hochdosiertes Cytosinarabinsid, Ifosfamid oder Thiotepa kann ein besseres Gesamtansprechen auf die Therapie erzielt werden. Als Konsolidierungstherapie folgt eine Ganzhirnbestrahlung oder eine Hochdosis-Chemotherapie mit

anschließender autologer Stammzelltransplantation.⁵³ Die gesamte Therapie geht mit starken Nebenwirkungen und Risiken einher, wie zum Beispiel Chemotherapie-induzierte Organschädigungen, Aplasie mit erhöhter Infektanfälligkeit und Blutungsgefahr sowie Radiatio-assoziierte Nebenwirkungen. Das zusätzlich erhöhte Risiko für Zweitmalignome als Spätfolgen der Therapie und das häufige Auftreten von Rezidiven verdeutlichen den Bedarf an neuen spezifischeren Therapieoptionen, die effektiv sind und mit weniger Nebenwirkungen einhergehen.

2.3. BARs („B-cell receptor antigens for reverse targeting“)

Die Hauptaufgabe eines B-Lymphozyten, der Ursprungszelle eines primären ZNS-Lymphoms, ist es Antigene über den B-Zell-Rezeptor (BZR) zu erkennen, um anschließend im Rahmen der humoralen Immunantwort Antikörper gegen das erkannte Antigen zu produzieren. Nachdem ein B-Lymphozyt ein Antigen erkannt hat, kann dieser mit Hilfe von T-Lymphozyten zu einer Plasmazelle reifen, die einen löslichen BZR (Antikörper) produziert. Dieser in großer Menge hergestellte Antikörper hilft das ursprünglich gebundene Antigen zu neutralisieren. Für jeden Menschen ist es wichtig, dass eine große Anzahl verschiedener Antigene erkannt und neutralisiert werden kann. Um dies zu gewährleisten muss es eine ebenso große Anzahl unterschiedlicher B-Lymphozyten geben, die mit Hilfe ihres BZR ein spezifisches Antigen erkennen. Die Region des BZR sowie von Antikörpern, die für die Erkennung von Antigenen verantwortlich ist, wird variable Region genannt. Auf genetischer Ebene wird diese Variabilität der B-Zell-Rezeptoren von B-Lymphozyten dadurch erreicht, dass die V-, D- und J-Gensegmente, welche für die Antigenpezifität des BZR verantwortlich sind, durch mehrere Mechanismen rekombiniert und variiert werden. Mit Hilfe eines genetischen Prozesses, der somatische Rekombination genannt wird, besitzt jeder reife B-Lymphozyt eine für ihn individuelle Kombination aus V-, (D-) und J-Gensegmenten, die für einen eigenen B-Zell-Rezeptor kodieren, mit dem ein spezifisches Antigen erkannt werden kann.

Ein Lymphom entsteht, sobald sich die DNA eines Lymphozyten verändert (Mutationen) und dies nicht durch die zelleigenen Kontrollmechanismen bemerkt und korrigiert wird. Durch unkontrollierte Zellteilung entwickelt sich ein klinisch apparentes Lymphom, dessen Einzelzellen B-Zell-Rezeptoren exprimieren, die aufgrund identischer VDJ-Rekombinationsprozesse ein gemeinsames Antigen erkennen. Der B-Zell-Rezeptor ist also identisch auf allen Lymphomzellen und unterscheidet sich von den B-Zell-Rezeptoren gesunder Lymphozyten. Somit ist der B-Zell-Rezeptor der Lymphomzellen ein ideales Angriffsziel für gerichtete Therapieansätze.^{10, 61, 62}

Über den BZR werden Signalwege, wie NF- κ B, PI3K, MAPK oder RAS, aktiviert, die essentiell für die Proliferation und das Überleben von normalen und malignen Lymphozyten sind.

Es wird angenommen, dass die chronische Stimulation eines B-Lymphozyten mit seinem spezifischen Antigen in der Entstehung von malignen B-Zell-Lymphomen eine entscheidende Rolle spielt. Dies

konnte für verschiedene Lymphomentitäten gezeigt werden.^{63,65} So kommt es beim diffus großzelligen B-Zell-Lymphom vom ABC-Typ durch chronisch aktive Stimulation des B-Zell-Rezeptors zur Aktivierung mehrerer Signalwege, wie dem des anti-apoptotisch wirkenden NF- κ B, die zur Lymphomentstehung beitragen.

Es wurden bereits mehrere unterschiedliche Versuche unternommen Therapien zu entwickeln, die sich spezifisch gegen den B-Zell-Rezeptor des malignen Klons richten:^{12,32}

- Anti-Idiotyp-Antikörper, die sich gegen die variable Region des B-Zell-Rezeptors eines Lymphoms richten.
- Impfstrategien, die eine Antwort des Immunsystems gegen den B-Zell-Rezeptor des Lymphoms hervorrufen sollen.
- Peptibodies, die mittels „phage display“ generiert wurden. Hierbei handelt es sich um synthetische patientenspezifische Idiotyp-Bindungspeptide, die an ein Fc-Fragment eines IgG-Antikörpers gekoppelt werden.⁶⁴

Diese Therapieansätze sind in der Praxis jedoch schwer einsetzbar, da die Therapeutika für jeden Patienten individuell hergestellt werden müssen, was sehr arbeitsintensiv ist.⁶³

Im José-Carreras-Zentrum des Universitätsklinikum in Homburg wird systematisch nach spezifischen Antigenen verschiedener B-Zell-Lymphome gesucht. So konnten bereits für mehrere Lymphomentitäten Antigene identifiziert werden. Bei 20% der Patienten mit diffus großzelligem B-Zell-Lymphom vom ABC-Typ wurde das Antigen ARS2 vom B-Zell-Rezeptor der entarteten Zellen als spezifisches Antigen erkannt. Beim Mantelzell-Lymphom wird in etwa 25% LRPAPI als Antigen von den Lymphomzellen über den BZR erkannt. Bei 67% der Patienten mit primärem ZNS-Lymphom konnte gezeigt werden, dass der B-Zell-Rezeptor des Lymphoms gegen Neurabin I (NRBI) gerichtet ist.^{49,61} Neurabin I ist ein an F-Actin bindendes Protein, das 1977 entdeckt wurde und überwiegend im Nervengewebe vorkommt.⁴⁴

Pfreundschuh et al.⁴⁹ konnten zeigen, dass diese Antigene gezielt eingesetzt werden können, um die Lymphomzellen anzugreifen. In diesem Fall werden die Antigene als BARs („B-cell receptor antigens for reverse targeting“) bezeichnet. Dieser für den B-Zell-Rezeptor spezifische Therapieansatz ist ausschließlich gegen den entarteten Lymphozyten gerichtet und somit hochspezifisch. Durch Kopplung des BAR an eine Wirkkomponente, wie zum Beispiel ein Toxin, können Zellen zielgerichtet in Apoptose überführt werden.

In welchem therapeutischen Format BARs optimal eingesetzt werden können ist bisher noch nicht abschließend geklärt.

2.4. Fab-Fragment

Theoretisch sind mehrere Formate vorstellbar in denen BARs zu therapeutischen Zwecken eingesetzt werden können. Zum einen könnte ein BAR an eine toxische Wirkkomponente gekoppelt werden (BAR-Toxin), zum Beispiel an das *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (ETA). Im Fall des PZNSL würde es sich hier um die Epitopregion des Antigens Neurabin I handeln, das an ETA gekoppelt wird. Der Nachteil eines solchen Konstruktes ist jedoch, dass es durch seine kleine Größe schnell vom Körper eliminiert wird und so nur wenig Zeit für die Entfaltung seiner Wirkung bleibt. Da es sich weiterhin um ein völlig neues Therapieformat handelt gibt es aktuell keine Referenzen bezüglich der Pharmakokinetik eines solchen Konstruktes.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Ausnutzung des Immunsystems des Patienten als Wirkkomponente, indem BARs an „single-chain-Fragmente“ (scFv) gekoppelt werden, die über Rekrutierung von Effektor-Zellen wirken. Dabei handelt es sich um Antikörper, die ausschließlich auf ihre variablen Regionen reduziert werden. „Single-chain-Fragmente“, die beispielsweise gegen CD3 oder CD16 gerichtet sind, können CD3-positive zytotoxische T-Killer-Zellen oder CD16-positive natürliche Killerzellen binden und diese über ein gekoppeltes BAR in Kontakt mit Lymphomzellen bringen. Ein erheblicher Nachteil dieses Formates ist ebenfalls die vermutete frühzeitige Elimination aus dem Körper aufgrund der geringen Größe des Konstrukts.⁸

Eine ebenfalls denkbare Form für den therapeutischen Einsatz der BARs ist das Antikörperformat. Antikörper spielen heutzutage in der Immuntherapie eine wichtige Rolle. Sie sind ein gut etabliertes Therapiekonzept, welches schon lange erfolgreich angewendet wird. So konnte die Prognose vieler B-Zell-Lymphome durch die zusätzliche Therapie mit dem anti-CD20-Antikörper Rituximab deutlich verbessert werden.⁴⁸ Ein Antikörper ist aufgebaut aus zwei identischen Schwer- und zwei identischen Leichtketten. Beide Ketten sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Leichtketten bestehen aus jeweils einer variablen (VL) und einer konstanten (CL) Domäne. Schwereketten haben eine variable Domäne (VH) und drei konstante Domänen (CH1, CH2, CH3). Die variablen Domänen jeweils einer Schwer- und einer Leichtkette bilden die Bindungsstelle für Antigene (Abbildung 1). Die CH2-Domäne fungiert als Bindungsstelle für das Komplementsystem und CH3 dient als Fc-Rezeptor-Bindungsstelle der Opsonierung.

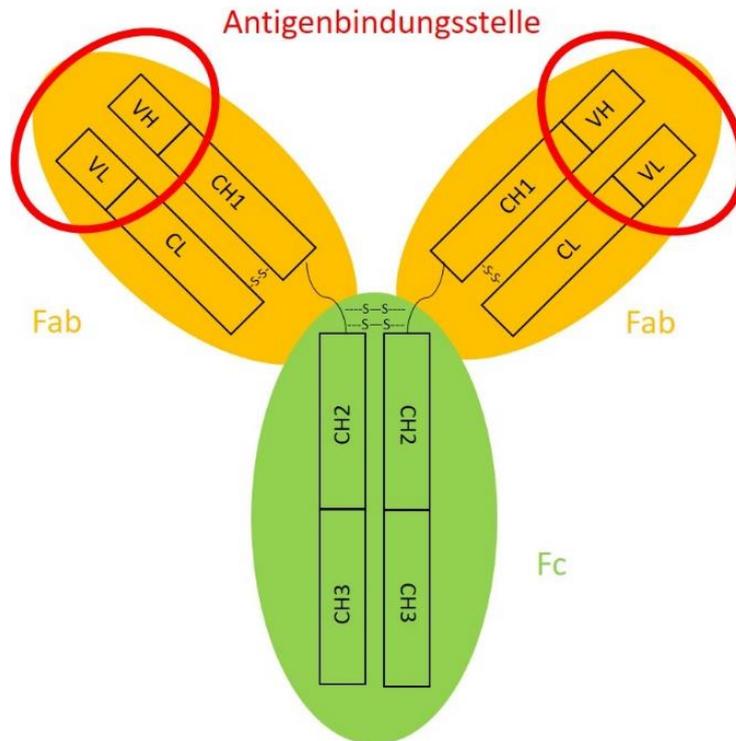


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Antikörpers.

Fab: antigenbindendes Fragment. Fc: kristallisierendes Fragment. VL: variable Domäne der Leichtkette. VH: variable Domäne der schweren Kette. CL: konstante Domäne der Leichtkette. CH1, CH2, CH3: konstante Domänen der schweren Kette. -S-S-: Disulfidbrücke.

Durch enzymatische Spaltung des Antikörpers mit dem Enzym Papain an der Gelenkregion entstehen zwei Fab-Fragmente und ein Fc-Fragment. Das Fab-Fragment (antigenbindendes Fragment) wird von der Leichtkette (VL und CL) und der schweren Kette oberhalb der Gelenkregion gebildet, also den Domänen VH und CH1 (Abbildung 2). Das Fc-Fragment besteht aus den Segmenten CH2 und CH3 der beiden schweren Ketten.

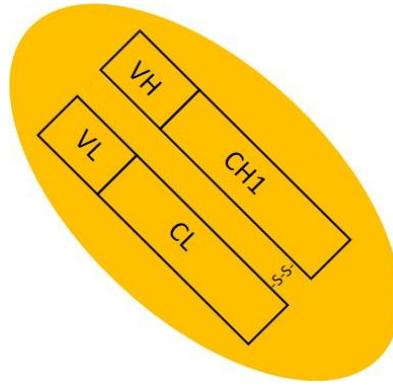


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Fab-Fragmentes.

VL: variable Domäne der Leichtkette. VH: variable Domäne der Schwereketten. CL: konstante Domäne der Leichtkette. CH1: konstante Domäne der Schwereketten. -S-S-: Disulfidbrücke.

Aufgrund der jahrelangen Erfahrung mit dem Antikörperformat scheint dieses besonders zur Erforschung eines neuen Therapiekonzeptes geeignet. In dieser Arbeit wurde es daher gewählt um das B-Zell-Rezeptor-Antigen des primären ZNS Lymphoms, Neurabin I, in ein therapeutisches Format zu integrieren. Dieses therapeutische Format, das ein BAR in ein Antikörperformat überführt, wird BAR-Body genannt. Zur Herstellung des Neurabin-BAR-Body wird zunächst ein Fab-Antikörper-Format verwendet werden.

Damit das BAR-Body an den Neurabin-reaktiven B-Zell-Rezeptor des primären ZNS-Lymphoms binden kann, muss die BZR-Bindungsstelle des BAR-Body dem Antigen Neurabin I entsprechen. Dafür wird die variable Domäne der Schwer- und der Leichtkette eines Antikörpers durch Neurabin I ersetzt (Abbildung 3). Die DNA-Sequenz von Neurabin I wird kodiert durch 4125 Nukleotide, was 1375 Aminosäuren entspricht. Die Region von Neurabin I, die die Bindung an den B-Zell-Rezeptor von etwa 67% aller primären ZNS-Lymphome vermittelt, wird als Epitop bezeichnet und wird kodiert von den Aminosäuren der Position 1204 bis 1250.⁶¹

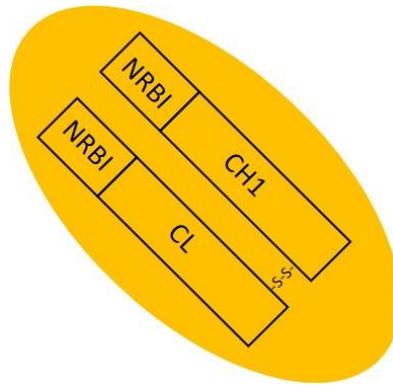


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Fab-Fragmentes mit NRBI.

*CL: konstante Domäne der Leichtkette. CH1: konstante Domäne der Schwereketten.
NRBI: Epitopregion von Neurabin I, kodiert von den Aminosäuren 1204 bis 1250.
-S-S-: Disulfidbrücke.*

2.5. Fragestellung der Arbeit

Trotz der aggressiven Therapie sind die Heilungschancen für das primäre ZNS-Lymphom gering und werden von starken Nebenwirkungen begleitet. Zusätzlich wird die Therapie erschwert durch die Tatsache, dass eingesetzte Medikamente die Blut-Hirn-Schranke überqueren müssen um an dem Tumor wirken zu können. Dies zeigt, dass neue, alternative Therapieansätze benötigt werden.

In dieser Arbeit soll daher ein Therapieformat zur Behandlung von ZNS-Lymphomen mit Hilfe des ZNS-BAR Neurabin I entwickelt werden, das sich an die Struktur eines Fab-Antikörpers anlehnt und gegen den B-Zell-Rezeptor primärer ZNS-Lymphome gerichtet ist. Die zytotoxische Wirkung soll durch die Kopplung des Konstruktes an das Pseudomonas aeruginosa Exotoxin A (ETA) erzielt werden. Das Konstrukt wird im Folgenden als „BAR-Body“ bezeichnet.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Laborgeräte

Die zur Durchführung dieser Arbeit benutzten Laborgeräte sind in Tabelle 2 aufgelistet. Es wurden nur Geräte mit relevanter Funktion berücksichtigt. Weitere Geräte wie Kühlschränke, Zentrifugen etc. wurden der Auflistung nicht hinzugefügt.

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Laborgeräte

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

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien

| Name | Firma |
|--|---|
| Ampicillin (100 µg/ml) | Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland) |
| Blotterpapier, 703 | VWR (Darmstadt, Deutschland) |
| Buffer O (orange) | Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) |
| Buffer R (red) | Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) |
| Complete Protease Inhibitor Cocktail | Roche Applied Science (Penzberg, Deutschland) |
| Desoxytrinukleotide (dNTPs) 10 nM | Roche Applied Science (Penzberg, Deutschland) |
| DNA Ladder 1 kb | Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) |
| DNA Ladder 50 bp | New England BioLabs (Frankfurt, Deutschland) |
| Doxycyclin (1 µg/ml) | Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland) |
| Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) | Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland) |

| | |
|---|--|
| Entwicklerlösung 1: LumiGLO, Reagent A (20%) | Cell signaling Technology (Frankfurt am Main, Deutschland) |
| Entwicklerlösung 2: Peroxide Reagent B (20x) | Cell signaling Technology (Frankfurt am Main, Deutschland) |
| Fetales Kälberserum (FCS) | Biowest (Darmstadt, Deutschland) |
| Imidazol 150 mM | Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland) |
| Immobilon-P Transfer Membrane, PVDF | Merck (Darmstadt, Deutschland) |
| Isopropylthiogalactosid (IPTG) | Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland) |
| Kanamycin (25 µg/ml) | Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland) |
| Page Ruler Prestained Protein Ladder | Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) |
| Page Ruler Unstained Protein Ladder | Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) |
| PCR-Puffer | Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) |
| RPMI-1640 Medium | Pan Biotech (Aidenbach, Deutschland) |
| Saponin 5% | Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland) |
| TALON Beads | Takara Bio (Saint-Germain-en-Laye, France) |
| Triton X-100 | Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland) |
| T4-DNA-Ligase Puffer | Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) |

3.1.2.1. Lösungen und Medien

Tabelle 4: Übersicht über die angesetzten Lösungen und Medien

| Lösungen und Medien | Zusammensetzung |
|----------------------------|--|
| Agarose-Gel 1% | 1,5 g Agarose auf 150 g mit TAE aufgefüllt 75 µg Ethidiumbromid |
| Agarose-Gel 2% | 3 g Agarose auf 150 g mit TAE aufgefüllt 75 µg Ethidiumbromid |
| Laemmli-Puffer (10x) | 144 g Glycin 30,34 g TRIS 10 g Natriumdodecylsulfat (SDS) ad 1 l Aqua dest. |

| | |
|-----------------------------------|--|
| LB-Medium | <p>10 g Trypton 5 g Hefe Extrakt 10 g Natriumchlorid (NaCl) ad 1 l Aqua dest. autoklavieren + 40% Glucose + Ampicillin (100 µg/ml)</p> <p>für den Agar: + 15 g Agar vor dem Autoklavieren hinzugeben</p> |
| Polyacrylamid-Trenngel 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-Sammelgel (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> |
| SDS-Page Probenpuffer (5x) | <p>0,6 ml 1,0 M TRIS (pH 6,8) 2,5 ml 100% Glycerol 2,0 ml 10% Natriumdodecylsulfat (SDS) 0,5 ml 2% Bromophenolblau 3,9 ml Aqua dest.</p> |
| SOC-Medium | <p>20 g Trypton 5 g Hefe Extrakt 5 g 10 mM Natriumchlorid (NaCl) 10 ml 250 mM Kaliumchlorid (KCl) ad 1 l Aqua dest. pH 7,0 mit NaOH einstellen autoklavieren + 5 ml 2,0 M Magnesiumchlorid (MgCl₂)</p> |

| | |
|-------------------------------|--|
| Transferpuffer (1x) | 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-buffered-saline (TBS) | 8,75 g Natriumchlorid (NaCl) 6,05 g TRIZMA Hydrochlorid 1,4 g TRIS ad 1 l Aqua dest. |
| 2xTY-Medium | 16 g Trypton 10 g Hefe Extract 5 g Natriumchlorid (NaCl) ad 1 l Aqua dest. autoklavieren + 40% Glucose + Ampicillin (100 µg/ml) für den Agar: + 15 g Agar vor dem Autoklavieren hinzugeben |

3.1.2.2. Kits

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Kits

| Name | Firma |
|---------------------------------------|--|
| Cytotoxicity Detection Kit PLUS (LDH) | Roche Applied Science (Penzberg, Deutschland) |
| High Pure DNA Isolation Kit | Roche Applied Science (Penzberg, Deutschland) |
| TOPO TA Cloning Kit | Invitrogen by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) |
| Zymoclean Gel DNA Recovery Kit | Zymo Research (Freiburg, Deutschland) |

3.1.3. Antikörper

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Antikörper

| Name | Firma |
|--|--------------------------------|
| Goat Anti-Mouse IgG (H+L) – HRP Conjugate | Bio-Rad (München, Deutschland) |
| Penta-His-Allophycocyanin-Antibody, mouse | Qiagen (Hilden, Deutschland) |
| Penta-His-Antibody, BSA-free, mouse monoclonal IgG1 | Qiagen (Hilden, Deutschland) |

3.1.4. Enzyme

Restriktionsenzyme

Die Restriktionsenzyme ApaLI, AscI, BstEII, EcoRI, HindIII, NcoI, NotI und XhoI wurden von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) erworben und haben eine Konzentration von 10 U/ μ l.

Tabelle 7: Übersicht über die weiteren verwendeten Enzyme

| Name | Firma | Konzentration |
|---------------------------------|--|---------------|
| AmpliTaQ Gold DNA Polymerase | Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland) | 5 U/ μ l |
| Fast Alkalische Phosphatase | Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) | 1 U/ μ l |
| Klenow-Fragment | Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) | 10 U/ μ l |
| T4-DNA-Ligase | Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) | 5 U/ μ l |

3.1.5. Zellkultur

3.1.5.1. Bakterien

Zur Vermehrung der Gensequenz der BAR-Bodies dienten Escherichia coli-Bakterien (E. coli) des Stammes DH5 α . Die Expression der BAR-Bodies erfolgte in Escherichia coli-Bakterien (E. coli) des Stammes TGI.

3.1.5.2. Zellen

OCI-Ly3 ist die Zelllinie eines humanen diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms (DLBCL). Sie wurde erstmals 1983 aus dem Knochenmark eines 52-jährigen Mannes mit DLBCL isoliert. Es handelte sich um ein DLBCL im Stadium IV-B nach der Ann-Arbor-Klassifikation im Rezidiv. Die Zellen sind EBV-

negativ und weisen keine t(8;14) Translokation auf, welche charakteristisch für das schnell wachsende Burkitt-Lymphom ist.¹⁶

Die in-vitro-Kultivierung der OCI-Ly3-Zellen erfolgte in RPMI-1640 mit 10% fetalem Kälberserum, Penicillin-Streptomycin (100 U/ml) und Glutamin. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Verdopplungszeit beträgt circa 24 Stunden. Die runden Zellen wachsen in einer Zellsuspensionskultur als Einzelkolonien oder in Klumpen.

3.2. Methodik

3.2.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion kann selektiv ein durch Primer auf dem Template festgelegter DNA-Abschnitt vervielfältigt werden. Für einen DNA-Doppelstrang werden 2 Primer benötigt, die jeweils am 3'-Ende verlängert werden. Dabei setzt der Sense-Primer am 5'-3'-Strang an, der Antisense-Primer am 3'-5'-Strang.

Bei der Denaturierung wird die doppelsträngige DNA auf 95°C erhitzt, wodurch die Wasserstoffbrücken zwischen den DNA-Strängen aufbrechen und Einzelstränge vorliegen. Im ersten Zyklus, in der Phase der Initialisierung, wird die erhöhte Temperatur länger aufrechterhalten, um sicher zu gehen, dass keine Doppelstränge mehr vorliegen und um die AmpliTaq Gold DNA Polymerase zu aktivieren. Während der Primerhybridisierung (bei 60°C) lagern sich die Primer an die DNA-Einzelstränge und bestimmen den Startpunkt der DNA-Synthese, indem sie den Anfang des komplementären DNA-Strangs bilden. Während der Elongation bei 72°C füllt die AmpliTaq Gold DNA Polymerase den Strang mit Nukleotiden auf, welche komplementär zur bestehenden DNA-Matrix sind. Der Beginn der AmpliTaq Gold DNA Polymerase ist am 3'-Ende des angelagerten Primers. Sie folgt anschließend dem DNA-Strang. Die Schritte von der Denaturierung bis zur Elongation wurden 33-mal wiederholt.

Tabelle 8: Konditionen der Polymerase-Kettenreaktion

| Phase | Temperatur | Dauer | Wiederholung |
|----------------------------------|------------|----------|--------------|
| 1. Initialisierung | 95°C | 7:00 min | 1x |
| 2. Denaturierung | 95°C | 0:30 min | } 33x |
| 3. Annealing (Hybridisierung) | 60°C | 1:00 min | |
| 4. Elongation (DNA-Synthese) | 72°C | 1:00 min | |

Für einen 30 µl Ansatz wurden 3 µl PCR-Puffer, jeweils 0,1 µl Sense- und 0,1 µl Antisense-Primer (10 µM), 0,2 µl Desoxyribonukleosidtriphosphate (10 nM), 0,2 µl AmpliTaq Gold DNA Polymerase (5 U/µl), DNA-Template und Aqua dest. benötigt.

Bei einer Kolonien-PCR wird die Bakterien-DNA mit einer sterilen Pipettenspitze von einer Einzelkolonie von einer Agarplatte aufgenommen und mittels Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt.

Die Primer, welche während der Arbeit für die Polymerase-Kettenreaktion verwendet wurden, sind in Tabelle 9 (Neurabin I-Primer) und in Tabelle 10 (weitere verwendete Primer) aufgeführt.

Tabelle 9: Neurabin I-Primer

| BAR-Body | Kette | Name | Sequenz (5'-3') |
|-----------------|--------------|-----------------------|-------------------------------------|
| A | Schwerkette | NRBI AA1204-NcoI-s | CCA TGG CCA ATT TTA CCT TCA ATG AT |
| | | NRBI AA1324-BstEII-as | GGT GAC CAT TTC CTT GAG TTT CTT |
| | Leichtkette | NRBI AA1204-ApaLI-s | GTG CAC AGA ATT TTA CCT TCA ATG AT |
| | | NRBI AA1324-XhoI-as | CTC GAG CAT TTC CTT GAG TTT CTT |
| B | Schwerkette | NRBI AA1168-NcoI-s | CCA TGG CCA ACA CAT GGA TTA CAA AA |
| | | NRBI AA1285-BstEII-as | GGT GAC CCC GAA TTC AGA TAC ATA CTG |
| | Leichtkette | NRBI AA1168-ApaLI-s | GTG CAC AGA ACA CAT GGA TTA CAA AA |
| | | NRBI AA1285 XhoI-as | CTC GAG GAA TTC AGA TAC ATA CTG |
| C | Schwerkette | NRBI AA1131-NcoI-s | CCA TGG CCA ATG ACA GCC GGA AAG GA |
| | | NRBI AA1250-BstEII-as | GGT GAC CCC AGA CTG TCC ATC ATC AAG |
| | Leichtkette | NRBI AA1131 ApaLI-s | GTG CAC AGA ATG ACA GCC GGA AAG GA |
| | | NRBI AA1250-XhoI-as | CTC GAG AGA CTG TCC ATC ATC AAG |

Die in Tabelle 9 aufgeführten Primer zur Amplifikation der DNA-Sequenz der BAR-Bodies wurden von Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland) hergestellt und mit einer Konzentration von 10 μ M angewendet.

Tabelle 10: Übersicht über die weiteren verwendeten Primer

| Name | Sequenz (5'-3') |
|------------------------|-----------------------------|
| CH1 3' | TGG ACG CCG CTG GTC AGG GC |
| kappa-antisense Primer | TCC AGA TTT CAA CTG CTC GTC |
| M13 forward Primer | GTA AAA CGA CGG CCA GT |
| M13 reverse Primer | CAG GAA ACA GCT ATG AC |

Die in Tabelle 10 aufgeführten Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland) erworben. Sie wurden in einer 1:10 Verdünnung mit einer Konzentration von 10 μ M angewendet.

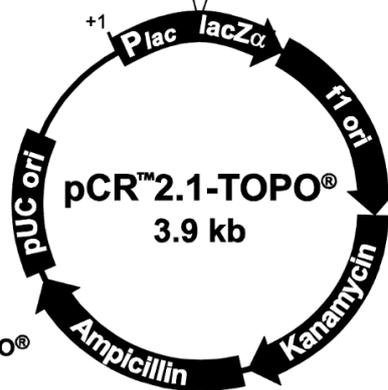
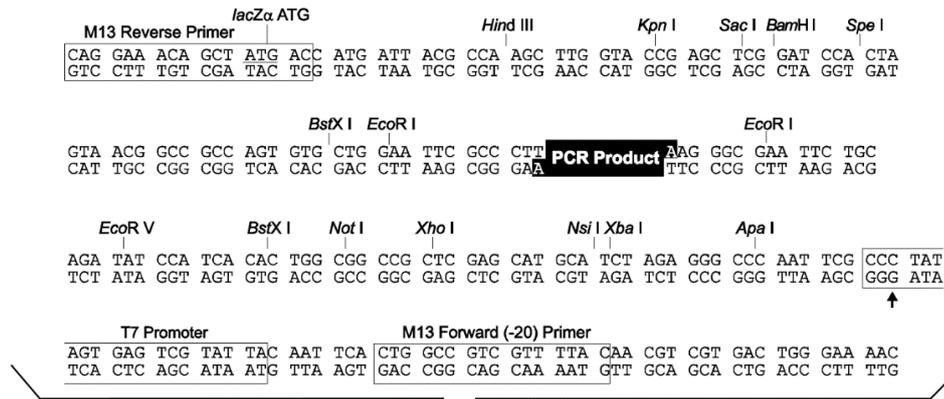
3.2.2. Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese ermöglicht die Auftrennung einzelner DNA-Fragmente nach ihrer Größe, welche mit Hilfe eines DNA-Längenmarkers abgelesen werden kann. Durch die Zugabe von 75 µl Ethidiumbromid können die Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die hergestellten Gele wurden nach dem Aushärten in eine mit TAE-gefüllte Kammer gelegt und mit den Proben beladen. Es wurde eine Gleichspannung von 100 V für circa 30 min angelegt. Die benutzten Längenmarker sind der DNA Ladder 1 kb der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) und der DNA Ladder 50 bp der Firma New England BioLabs (Frankfurt, Deutschland).

3.2.3. Klonierung in einen TOPO-TA-Vektor

3.2.3.1. pCR 2.1-TOPO-Vektor (TOPO-TA-Vektor)

Der pCR 2.1-TOPO-Vektor ist ein linearer 3,9 kb langer TOPO-TA-Vektor, der in dieser Arbeit als Übergangsvektor diente. Der TOPO-TA-Vektor besitzt an beiden Enden 3'-Desoxythymidin-Überhänge, an denen kovalent das Enzym Topoisomerase I gebunden ist. Die Sequenzierung des Inserts kann mit Hilfe der Primer M13 Reverse und M13 Forward erfolgen. Der Vektor besitzt Ampicillin- und Kanamycin-Resistenzgene. In dieser Arbeit fand die Selektion der Bakterien auf LB-Ampicillin-Agarplatten statt. Der pCR 2.1-TOPO-Vektor ist erhältlich bei „invitrogen by life technologies“ von Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland).



**Comments for pCR[®]2.1-TOPO[®]
3931 nucleotides**

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

Abbildung 4: Vektorkarte des pCR 2.1-TOPO-Vektors.²⁷

3.2.3.2. Prinzip der Ligation in den pCR 2.1-TOPO-Vektor

Die TA-Klonierung ermöglicht die Klonierung eines PCR-Produktes in einen TOPO-TA-Vektor ohne den Gebrauch von Restriktionsendonukleasen. Durch die AmpliTaq Gold DNA Polymerase erhält ein PCR-Produkt 3'-Desoxyadenosin-Überhänge. Der verwendete TOPO-TA-Vektor, ein pCR 2.1.-TOPO-Vektor (invitrogen by life technologies), besitzt dazu komplementäre 3'-Desoxythymidin-Überhänge, wodurch das PCR-Produkt ohne Zwischenschritte in den Vektor kloniert werden kann. Die Topoisomerase I aus dem pCR 2.1-TOPO-Vektor bindet an doppelsträngige DNA und spaltet das Phosphodiester-Rückgrat nach der Sequenz 5'-CCCTT. Durch die Energie der Spaltung kann eine kovalente Bindung zwischen dem Phosphat am 5'-Ende des gespaltenen Stranges und dem Tyrosinrest (Tyr-274) der Topoisomerase I entstehen. Der entstandene 3'-Desoxythymidin-Überhang am Vektor kann dadurch eine kovalente Bindung mit dem 3'-Desoxyadenosin-Überhang des Inserts eingehen.

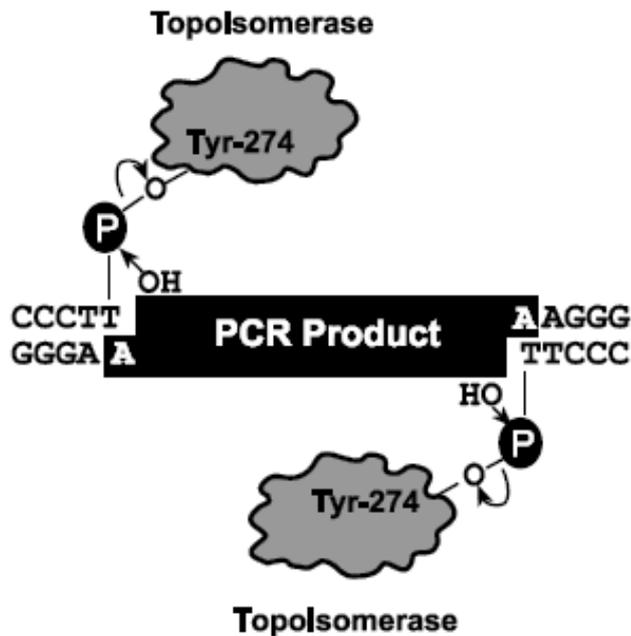


Abbildung 5: Prinzip der TOPO-TA-Klonierung.²⁷

Das Plasmid des pCR 2.1.-TOPO-Vektors ist linearisiert mit einem 3'-Thymidin-Überhang. Durch die AmpliTaq Gold DNA Polymerase besitzt das PCR-Produkt ein Desoxyadenosin am 3'-Ende. Die Topoisomerase I kann das 5'-CCCTT spalten. Durch die entstandene Energie bildet sich eine kovalente Bindung zwischen dem 3' Phosphat (P) des gespaltenen Stranges und dem Tyrosin-Rest (Tyr-274) der Topoisomerase I. Diese Bindung kann durch das 5'Hydroxyl (OH) des gespaltenen Stranges rückgängig gemacht werden und die Topoisomerase I wird wieder freigesetzt.

Für die Klonierung wurde das PCR-Produkt mit dem TOPO-TA-Vektor (25 ng/μl) für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das gewünschte PCR-Produkt wurde hierbei in den linearisierten TOPO-TA-Vektor integriert. Kompetente DH5α E. coli-Bakterien wurden mit diesem Ansatz transfiziert, indem das Reaktionsprodukt für 30 min auf Eis, für 1 min im Wasserbad bei 42°C und für 5 min auf Eis mit den Bakterien inkubiert wurde. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.4. DNA-Isolation

Mit dem „High Pure DNA Isolation Kit“ (Roche Applied Science) wurde die Plasmid-DNA nach den Anweisungen des Herstellerprotokolls isoliert.

In der Photometrie wurde die Konzentration der isolierten DNA über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (A260) und von 280 nm (A280) gemessen, sowie deren Verhältnis (A260 / A280) bestimmt. Die Kalibrierung erfolgte mit Aqua dest.

3.2.5. Sequenzierung

Die Sequenzierung der Proben wurde kommerziell von SEQ-IT GmbH & Co. KG (Kaiserslautern, Deutschland) nach der Sanger-Methode durchgeführt.

Die Auswertung der Sequenzierung erfolgte über die Software „Chromas, Version 2.2“ von Technelysium Pty Ltd.

3.2.6. Verdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die bestimmte Gensequenzen erkennen und schneiden können. Um das Insert aus dem TOPO-TA-Vektor zu isolieren, wurden für die Schwereketten die Enzyme NcoI und BstEII (Fermentas) und für die Leichtketten die Enzyme ApaLI und XhoI (Fermentas) verwendet. Die Restriktionsendonukleasen können nur an spezifische Sequenzen binden. Diese wurden mit der ersten Polymerase-Kettenreaktion durch die Primer in die Gensequenz der BAR-Bodies eingebaut. Der benutzte Puffer wurde so gewählt, dass er bei allen vier Enzymen eine Aktivität von nahezu 100% aufwies. 2 µg der DNA wurden mit je 10 U der Restriktionsenzyme und 3 µl des Fermentas Puffers und Aqua dest. in einem 30 µl Ansatz für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

3.2.7. DNA-Extraktion aus Agarose-Gel

Die DNA wurde aus einem 1%-Agarose-Gel mit Hilfe des „Zymoclean Gel DNA Recovery Kit“ (Zymo Research) extrahiert und aufgereinigt.

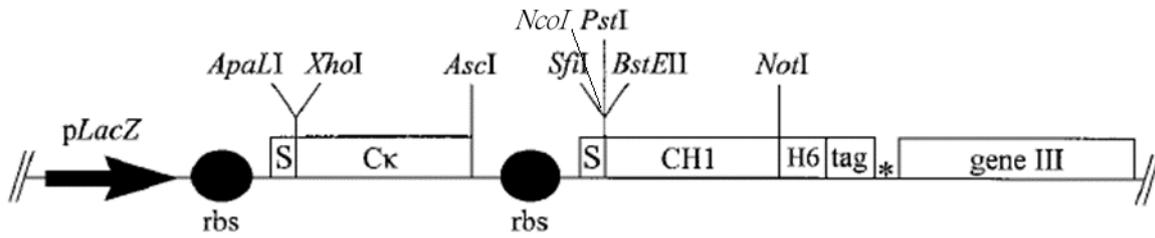
Die Bestimmung der Konzentration der isolierten DNA erfolgte wie im Abschnitt zur DNA-Isolation (siehe 3.2.4) beschrieben.

3.2.8. Ligation in den pCES1-Vektor

3.2.8.1. pCES1-Vektor

Der pCES1-Vektor diente als finaler Vektor zur Herstellung der BAR-Bodies. Es handelt sich um einen zirkulären Vektor mit einer Länge von 6,4 kb. Dieser ist nicht kommerziell erhältlich, sondern wurde von Hoogenboom et al.²⁶ hergestellt und dem José-Carreras-Zentrum in Homburg freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Ursprünglich wurde der pCES1-Vektor konstruiert, um eine Phagenbank für Fab-Fragmente zu produzieren.^{14,26} In dieser Arbeit wurde er jedoch ausschließlich zur Produktion der BAR-Bodies verwendet.

A



B

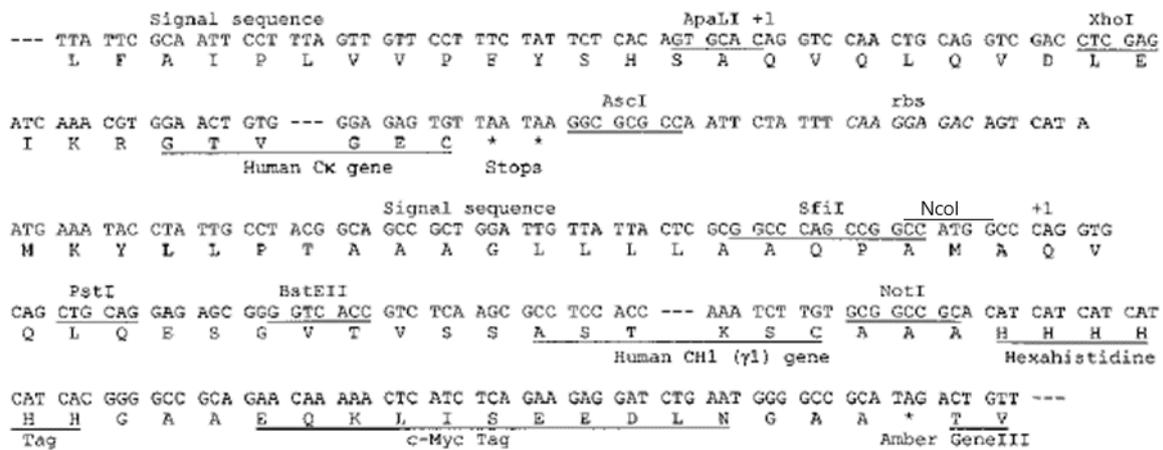


Abbildung 6: Vektorkarte des pCES1-Vektors.¹⁴

Schematische Darstellung des pCES1-Vektors (A) und Vektorkarte (B).

Der pCES1-Vektor kodiert für die konstante Domäne der Leichtkette (CL) und für einen Teil der konstanten Domäne der Schwereketten (CH1). Beide Ketten werden unabhängig voneinander exprimiert. Erst in der E. coli-Zelle werden beide Ketten zum BAR-Body im Fab-Format zusammengeführt. Die Schwerekette ist an das Mantelprotein gIII gekoppelt. Vor den beiden konstanten Regionen enthält der pCES1-Vektor Schnittstellen, die das Einfügen einer beliebigen variablen Regionen (VH und VL) ermöglichen. Diese wurden benutzt um die Gensequenz des Neurabin I in den pCES1-Vektor zu klonieren. Die Schnittstellen der VL-Domäne werden vorgegeben durch ApaLI und XhoI und die Schnittstellen der VH-Domäne durch NcoI und BstEII. Der Vektor enthält ein His-Tag und ein c-myc-abgeleitetes Tag, die zur Reinigung und zum Nachweis benutzt werden können. Der Vektor besitzt ein Ampicillin-Resistenzgen, welches die Selektion der mit dem Vektor transformierten Bakterien auf 2xTY-Ampicillin-Agarplatten ermöglicht.

3.2.8.2. Prinzip der Ligation in den pCES1-Vektor

Für die Ligation wird eine T4-DNA-Ligase benötigt, die die Inserts (zuvor aus dem TA-Vektor mittels Restriktionsenzymen herausgeschnittene DNA-Fragmente) mit dem pCES1-Vektor von Hoogenboom et al., welcher mit den gleichen Restriktionsenzymen wie die Inserts linearisiert wurde, verknüpft. In einem 10 µl Ansatz wurde der pCES1-Vektor mit dem Template, 5 U T4-DNA-Ligase, 1 µl T4-DNA-Ligase-Puffer sowie Aqua dest. über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.9. Transfektion in TGI E. coli-Bakterien

TGI E. coli-Bakterien wurden mit dem pCES1-Vektor transformiert, indem 60 µl der Bakterien mit dem Vektor für 30 min auf Eis, für 1 min im Wasserbad bei 42°C und für 5 min auf Eis inkubiert wurden. Zu den Bakterien wurden 200 µl Soc-Medium hinzugefügt um die hohe Mutationstendenz der Bakterien zu unterdrücken. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C wurden die Bakterien auf 2xTY-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen.

3.2.10. Expression

Von der 2xTY-Ampicillin-Agarplatte aufgenommene Einzelkolonien wurden in einem Nährmedium bestehend aus 50 ml 2xTY-Agar, 500 µl 40% Glucose und 50 µl Ampicillin (100 µg/ml) über Nacht bei 37°C inkubiert. 500 µl der Kultur wurden mit 50 ml des Nährmediums verdünnt und für zwei Stunden bei 37°C wachsen gelassen, bis im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD600) eine Zelldichte von 0,6 bis 0,8 gemessen werden konnte. Der Referenzwert wurde mit 2xTY-Medium eingestellt.

50 ml der Kultur wurden mit 50 µl 2 mM Isopropylthiogalactosid (IPTG) für vier Stunden bei 30°C inkubiert und anschließend bei 4000 rpm für 15 min zentrifugiert. Die Bakterien, die als Pellet vorlagen, wurden bei – 20°C eingefroren.

Durch die Zugabe von Isopropylthiogalactosid zu den TGI E. coli-Bakterien wurde die Genexpression des LacZ-Operons aktiviert. Isopropylthiogalactosid dient als Induktor des LacZ-Operons, welches vom pCES1-Vektor exprimiert wird. Die Funktion des LacZ-Repressors besteht in der negativen Regulation des LacZ-Operons. Durch die Bindung von Isopropylthiogalactosid an den LacZ-Repressor wird diese Funktion inhibiert was die Protein-Produktion (BAR-Bodies) in den Bakterien startet.

3.2.11. Aufreinigung

Die Bakterien wurden mit 1 ml Lysepuffer, bestehend aus PBS (pH 8) und Proteaseinhibitoren, für 30 min auf Eis inkubiert und für 30 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert.

Über ein His-Tag, bestehend aus sechs Histidin-Aminosäuren, die im pCES1-Vektor an die CH1-Domäne der Schwerekette angehängt sind, kann nach der BAR-Body-Expression die Aufreinigung und Detektion erfolgen. TALON ist ein immobilisiertes Metall-affines Chromatographie-Harz und ein vierzähliger Chelator, der mit Kobalt geladen ist (IMAC: immobilized metal affinity chromatography). TALON bindet mit hoher Affinität an die His-Tags und bildet ein Chelatkomplex mit dem Kobalt. Dies erlaubt eine einfache Isolierung der BAR-Bodies ¹¹

Das Lysat wurde mit jeweils 50 µl TALON Beads für 30 min bei 4°C auf einer Drehplatte inkubiert. Die beladenen TALON Beads wurden eine Minute bei 13000 rpm zentrifugiert und das Bead-Pellet dreimal mit PBS gewaschen, wodurch alle ungebundenen Proteine entfernt werden konnten. Das gebundene Protein wurde mit 200 µl 150 mM Imidazol für 5 min bei Raumtemperatur im Überkopfdreher eluiert. Nach einminütiger Zentrifugation bei 13000 rpm befand sich das Eluat im Überstand.

Da das Imidazol schädlich auf die B-Lymphozyten wirkt, wurde es durch einen Dialysierungsschritt in PBS wieder entfernt. Ausgenommen von diesem Schritt wurden jeweils 10 µl der Probe, die für die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und den darauffolgenden Westernblot benötigt wurden.

3.2.12. Analyse der Proteinexpression

SDS-Page ist die Abkürzung für „sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis“. Diese Form der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese, erstmals 1970 durch Ulrich K. Laemmli beschrieben, ermöglicht die Auftrennung der Proteine nach ihrer Molekülmasse.³³ In dieser Arbeit wurde ein 12% Polyacrylamid-Gel benutzt, dem Natriumdodecylsulfat (SDS) zugesetzt wurde. Die Kammer der Gelelektrophorese wurde mit Laemmlipuffer gefüllt. Zu den 10 µl des Proteins wurden 10 µl 5x Probenpuffer hinzugegeben und davon jeweils 10 µl im Gel geladen. Durch den Gleichstrom von 200 V für circa 40 min wandern die negativ geladenen Proteine zur Anode. Die Größe der Proben wird mit den Längenmarkern PageRuler Prestained Protein Ladder oder PageRuler Unstained Protein Ladder (Fermentas) bestimmt.

Der Westernblot ist ein Verfahren, bei dem ein Transfer der im Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine auf die Immobilon-P-Membran stattfindet.⁵² Die Membran wird mit 100% Methanol und dem Transferpuffer, bestehend aus 10ml 20% Methanol, 5ml 10x Transferpuffer und 35ml Aqua dest. vorbehandelt. Das Polyacrylamid-Gel wird auf die Membran zwischen zwei Filterpapiere und die

Elektroden des Blots gelegt. Bei einer Spannung von maximal 25 V und einer Stromstärke von 450 mA wurden die Proteine für 40 min auf die Membran transferiert.

Unspezifische Bindungen auf der Membran wurden durch Inkubation mit 10% Magermilch und TRIS-buffered-saline (TBS) abgeblockt. Die Membran wurde für 45 Minuten mit einem murinen Anti-His-Antikörper inkubiert, der an die His-Tags der BAR-Bodies bindet. Der überflüssige Antikörper wurde durch dreifaches Waschen mit Triton-X entfernt. Der Horseradish Peroxidase-konjugierte Anti-Maus-Antikörper wurde für 45 min auf die Membran gegeben, gefolgt von einem dreifachen Waschschrift mit Triton-X. Dieser sekundäre Antikörper bindet spezifisch an den primären Antikörper. Die Detektion erfolgte mittels Chemilumineszenz. Dafür wurde die Membran mit 2 ml Aqua dest., 3 µl Entwicklerlösung 1 und 3 µl Entwicklerlösung 2 inkubiert. In der Dunkelkammer wurde die Membran auf einen Röntgen-Film (Amersham Hyperfilm ECL von GE Healthcare) gelegt. Das in der Entwicklerlösung enthaltene Wasserstoffperoxid wird durch die Horseradish Peroxidase reduziert, wodurch kurzweiliges Licht emittiert wird, welches den lichtsensiblen Röntgenfilm schwärzt. Die so entstehenden Banden entsprechen den Proteinbanden aus der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese.

3.2.13. Herstellung einer rekombinanten Zelllinie, welche den NRBI-BZR exprimiert

Zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit gab es keine kommerziell erhältliche Zelllinie des primären ZNS-Lymphoms um das hergestellte Neurabin-BAR-Body in vitro zu testen. Aus diesem Grund wurde auf die Zelllinie OCI-Ly3 des diffus großzelligen B-Zelllymphoms (DLBCL) vom ABC-Typ, welche dem José-Carreras-Zentrum in Homburg vorliegt, zurückgegriffen und die Zellen dieser Zelllinie mit einem Neurabin-reaktiven B-Zell-Rezeptor transfiziert. Da es sich bei primären ZNS-Lymphomen in 95% der Fälle histologisch um diffus großzellige B-Zell-Lymphome (DLBCL) handelt, simuliert eine DLBCL-Zelllinie, die mit einem ZNS-Lymphom-BZR transfiziert wird, das PZNSL am ehesten. Der transfizierte Vektor enthält die variable Region der Schwereketten (VH), die konstanten Regionen der Schwereketten (CH1-CH4) und die variable (VL) und konstante Region der Leichtketten (CL) eines B-Zell-Rezeptors eines Patienten mit Neurabin-reaktivem primären ZNS-Lymphom. Die OCI-Ly3-Zellen wurden dreimal mit RPMI-1640 gewaschen bei einer Zelldichte von 2×10^7 /ml. 2×10^6 Zellen, was 100 µl entspricht, wurden auf Eis mit 5 µg Plasmid-DNA transfiziert. Hierfür wurde die Methode der Elektroporation gewählt. Bei dieser wird mit Hilfe des „Gene Pulser Xcell Electroporation Systems“ (Bio-Rad) ein elektrisches Feld von 140 V und 30 ms Pulsdauer erzeugt, das auf die Zellsuspension in einer 0,2 cm Küvette einwirkt. Die Zellen wurden auf Eis in RPMI-1640 Medium mit 10% fetalem Kälberserum, Penicillin-Streptomycin (100 U/ml) und Glutamin kultiviert. Die transfizierten Zellen, also die Zellen mit einem B-Zell-Rezeptor, der gegen NRBI gerichtet ist, enthalten ein Neomycin-Phosphotransferase-Resistenzgen und können daher mit Hygromycin (250 µg/ml) selektioniert werden. Die erfolgreiche Transfektion wurde kontrolliert durch eine PCR der variablen

Gen-Region der transfizierten Zelllinien, durch einen Westernblot mit Nachweis von FLAG-markierten rekombinanten B-Zell-Rezeptoren und der B-Zell-Rezeptor-Oberflächenfärbung mit Neurabin I in der Durchflusszytometrie.⁶¹ Die Herstellung der transfizierten Zelllinie erfolgte im José-Carreras-Labor in Homburg und ist nicht Teil dieser Arbeit. Die transfizierten Zellen, im Folgenden als OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen bezeichnet, wurden für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Zur Kontrolle der Expression des Neurabin-reaktiven B-Zell-Rezeptors wird bei einer Hälfte der Zellen die Proteinexpression des NRBI-B-Zell-Rezeptors an der Zelloberfläche angeschaltet, wofür diese mit Doxycyclin (1 µg/ml) inkubiert werden. Bei der zweiten Hälfte wird die Proteinexpression des NRBI-B-Zell-Rezeptors nicht aktiviert, so dass diese Zellen keinen gegen Neurabin-gerichteten BZR auf ihrer Oberfläche präsentieren.

3.2.14. Durchflusszytometrie

3.2.14.1. Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Messverfahren bei dem Zellen einzeln mit Hilfe von Laserstrahlen auf verschiedene Eigenschaften wie Größe und Gehalt an Zellorganellen untersucht werden. Bei der Passage der Zelle an dem Laserstrahl der Durchflusszytometrie entsteht Streulicht, dessen Intensität mit den Eigenschaften der Zelle korreliert. Das Vorwärtsstreulicht (FSC: forward scatter), welches ein Maß für die Beugung des Lichts bei flachem Winkel ist, ist abhängig von der Größe der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (SSC: side scatter) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel und hängt vor allem von der Granularität der Zelle ab. Weiterhin können Zellen vor der Analyse mit Antikörpern gefärbt werden, die an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Je nachdem welche Farbe der Detektor auf der Zelle erkennt, exprimiert diese Zelle ein bestimmtes Antigen gegen das der Fluoreszenz-markierte Antikörper gebunden hat oder nicht.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchungen wird der B-Zell-Rezeptor von Lymphomzellen entweder auf der Zelloberfläche oder nach der Internalisierung mit den hergestellten BAR-Bodies gefärbt. Da die verwendeten BAR-Bodies einen His-Tag enthalten gelingt der Nachweis der Bindung oder Internalisierung über Anti-His-Antikörper, die entweder direkt an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind oder über einen tertiären Antikörper.

Die Auswertung der Durchflusszytometrie erfolgte mit der „WinMDI Software“ (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry).

3.2.14.2. Bindungs-Assay

Der Bindungs-Assay dient zum Nachweis der Bindung des Konstruktes an den B-Zell-Rezeptor der Zellen. Dafür wurden jeweils 5 µg der BAR-Bodies mit den Zellen ohne Fixierung für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen mit 5 µl Anti-His-Antikörper gekoppelt an das Fluorochrom Allophycocyanin für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert, mit PBS gewaschen und im „BD FACS Canto Flow Cytometer“ gemessen. Allophycocyanin (APC) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der bei der durchflusszytometrischen Untersuchung durch einen Helium-Neon-Laser bei einer Wellenlänge von 632 nm angeregt wird und darauf Licht mit einer Wellenlänge von 680 nm emittiert.⁵

Pro Probe wurden 5000 OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen (OCI-Ly3-Zellen, die mit einem Neurabin I-spezifischen BZR transfiziert sind) analysiert. Damit diese rekombinante Zelllinie den NRBI-BZR an der Oberfläche präsentiert, musste zuerst die Proteinexpression des B-Zell-Rezeptors aktiviert werden (Tet-on). Dafür wurde bei der Hälfte der Zellen die Expression des B-Zell-Rezeptors durch Doxycyclin (1 µg/ml) angeschaltet. Die zweite Hälfte der OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen präsentierte keinen NRBI-BZR auf der Oberfläche, da dieser nicht aktiviert wurde. Diese Zellen dienten als Negativkontrolle.

Als weitere Negativkontrolle wurden Zellen mit dem Antigen MAZ, gebunden an das modifizierte Pseudomonas aeruginosa Exotoxin A (ETA'), inkubiert, welches nicht an den BZR der transfizierten OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen binden sollte. MAZ steht für „myc-assoziiertes Zinkfinger-Protein“ und ist ein Antigen, das unter anderem bei Hodgkin-Lymphomen eine Rolle spielt, jedoch nicht bei der Pathogenese des primären ZNS-Lymphoms.³

Als Positivkontrolle diente die lineare Epitopsequenz des Antigens Neurabin I, ebenfalls an ETA' gekoppelt (BAR-Toxin). Die Positiv- und die Negativkontrolle wurden im José-Carreras-Zentrum in Homburg hergestellt und werden im Folgenden als NRBI-ETA' respektive MAZ-ETA' bezeichnet.

3.2.14.3. Internalisierungs-Assay

Im Rahmen des Internalisierungs-Assays wurde überprüft, ob das BAR-Body durch Bindung an den B-Zell-Rezeptor internalisiert wird. Für die Intrazellulärfärbung müssen die Zellen fixiert werden. Dadurch kann jedoch der Anti-His-Antikörper nicht mehr an die BAR-Bodies auf der Oberfläche der Zellmembranen binden. Somit können nach der Fixation die BAR-Bodies auf der Oberfläche nicht mehr nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurde der Inkubationsansatz in zwei Ansätze geteilt. Im ersten Ansatz wurde eine Oberflächenfärbung ohne Fixierung durchgeführt, im zweiten Ansatz eine Intrazellulärfärbung nach vorangegangener Fixierung der OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen. Bei beiden Ansätzen wurden die in PBS gewaschenen OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen mit den BAR-Bodies für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut mit PBS gewaschen.

Die Proben für den intrazellulären Nachweis wurden für 30 min im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, sodass das BAR-Body von den Lymphomzellen internalisiert werden konnte. Anschließend wurden die Zellen mit 500 µl 2% Paraformaldehyd für 15 Minuten auf Eis fixiert, mit PBS gewaschen und mit 800 µl 0,5% Saponin permeabilisiert. Die Behandlung mit Paraformaldehyd verhindert neue Bindungen zwischen B-Zell-Rezeptor und BAR-Body ab dem Zeitpunkt der Fixierung. Durch das Saponin werden die Ionenkanäle der Zelle geöffnet. Durch die Inkubation der Probe mit 800 µl 0,1% Saponin und 5 µl Anti-His-Antikörper für 30 Minuten auf Eis kann der Anti-His-Antikörper ins Innere der Zelle gelangen, da die Ionenkanäle durch das vorhandene Saponin geöffnet bleiben. Nach einem Waschschrift mit PBS und 0,1% Saponin kann die Messung im „BD FACS Canto Flow Cytometer“ stattfinden.

Die Proben für die Oberflächenfärbung wurden auf Eis gelagert, um eine Internalisierung zu verhindern. Anschließend wurden sie mit 5 µl des Anti-His-Antikörpers gekoppelt an Allophycocyanin für 30 min auf Eis inkubiert, mit PBS gewaschen und im „BD FACS Canto Flow Cytometer“ gemessen.

3.2.15. Zytotoxizitäts-Assay

Die in-vitro-Kultivierung der OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen erfolgte in RPMI-1640 dem 10% fetales Kälberserum, Penicillin-Streptomycin (100 U/ml) und Glutamin zugegeben wurde. In einem ersten Waschschrift mit RPMI-1640 wurde das fetale Kälberserum aus den Zellen gewaschen, da dieses erhöhte LDH-Werte aufweisen kann und so die unspezifische Hintergrund-Reaktion verstärken könnte.

In der Neubauer Zählkammer wurden die Zellen, nach Färbung mit Trypanblau (1:10), unter dem Mikroskop ausgezählt, wodurch die Zellzahl pro ml errechnet werden konnte. Entsprechend der Konzentration wurden 5000 Zellen pro Well in eine 96-Well-Platte gegeben. Das Volumen pro Well betrug 100 µl, welches sich aus 50 µl Zellen und 50 µl BAR-Bodies, beides gelöst in Zellmedium, zusammensetzte. Bei der Hälfte der Zellen wurde die Expression des NRBI-BZR auf der Zelloberfläche durch Zugabe von Doxycyclin (1 µg/ml) angeschaltet. Für jede Zelllinie wurden drei Ansätze vorbereitet. Die ersten drei Ansätze wurden ausschließlich mit dem Zellmedium RPMI-1640 inkubiert, die zweiten mit der Negativkontrolle MAZ-ETA' in den Konzentrationen 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml und 1,25 µg/ml und die dritten Ansätze mit dem Neurabin-BAR-Body in den Konzentrationen 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml und 1,25 µg/ml. Die Minimallyse wurde bestimmt indem lediglich Zellmedium RPMI-1640 zu den Lymphomzellen zugegeben wurde, während die Maximallyse durch Zugabe von RPMI-1640 und 0,5%-Triton-X bestimmt wurde. Die 96-Well-Platte wurde bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Tabelle 11: Aufbau der 96-Well-Platte

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------|-----------|---|---|------------|---|---|------------|---|---|-------------|----|----|
| A | RPMI-1640 | | | 10 µg/ml | | | 10 µg/ml | | | Minimallyse | | |
| B | RPMI-1640 | | | 5 µg/ml | | | 5 µg/ml | | | Maximallyse | | |
| C | RPMI-1640 | | | 2,50 µg/ml | | | 2,50 µg/ml | | | | | |
| D | RPMI-1640 | | | 1,25 µg/ml | | | 1,25 µg/ml | | | | | |
| E | RPMI-1640 | | | 10 µg/ml | | | 10 µg/ml | | | Minimallyse | | |
| F | RPMI-1640 | | | 5 µg/ml | | | 5 µg/ml | | | Maximallyse | | |
| G | RPMI-1640 | | | 2,50 µg/ml | | | 2,50 µg/ml | | | | | |
| H | RPMI-1640 | | | 1,25 µg/ml | | | 1,25 µg/ml | | | | | |

A – D: OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen mit angeschalteter Proteinexpression des B-Zell-Rezeptors.

E – H: OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen ohne angeschaltete Proteinexpression des B-Zell-Rezeptors.

1 – 3: Inkubation der Zellen nur mit dem Zellmedium RPMI-1640.

4 – 6: Inkubation der Zellen mit dem Zellmedium RPMI-1640 und der Negativkontrolle MAZ-ETA'.

7 – 9: Inkubation der Zellen mit dem Zellmedium RPMI-1640 und dem BAR-Body.

Bei der Schädigung von Zellen wird das Enzym Lactatdehydrogenase (LDH) aus dem Zytosol freigesetzt. Dieses wird zur Bestimmung der Zelllyse mit dem „Cytotoxicity Detection Kit PLUS (LDH)“ (Roche Applied Science) gemessen. Gemäß dem Herstellerprotokoll wurden die Zellen für 10 min mit der Färbe-Lösung inkubiert und die Reaktion anschließend mit der Stopp-Lösung angehalten. Die Messung erfolgte im „Wallac Victor 2, 1420 Multilabel Counter“ (Perkin Elmer). Nach der Berechnung der Mittelwerte der Dreierproben, konnte die spezifische Lyse mit Hilfe der folgenden Formel berechnet werden.

$$\text{spezifische Lyse [\%]} = \frac{\text{Messwert der Probe} - \text{Wert der Minimallyse}}{\text{Wert der Maximallyse} - \text{Wert der Minimallyse}} \times 100$$

4. Ergebnisse

4.1. Umsetzung der Fragestellung in ein Konzept

BAR-Bodies wirken über das von Pfreundschuh et al. entwickelte Prinzip des „reverse targeting“.⁴⁹ Im Gegensatz zur Antikörper-Therapie, bei der ein Antikörper Antigene zum Beispiel auf Krebszellen erkennt, bindet nach dem BAR-Prinzip (BAR: B-cell receptor antigen for reverse targeting) das Antigen einen Antikörper, das heißt den B-Zell-Rezeptor, welcher sich als Antigenrezeptor auf der Oberfläche von Lymphomzellen befindet. In der vorliegenden Arbeit wurde das ZNS-Lymphom-spezifische Antigen Neurabin I (NRBI) verwendet, welches die variablen Regionen eines Fab-Antikörper-Konstruktes ersetzen soll, um spezifisch den B-Zell-Rezeptor (BZR) von ZNS-Lymphomen zu erkennen. Durch die Bindung des Antigens an seinen spezifischen ZNS-Lymphom-BZR kann das Antigen oder antigenenthaltende Konstrukte (BAR-Bodies) die Lymphomzelle markieren.

Um einen zytotoxischen Effekt auf Lymphomzellen aus zu üben, bedarf es einer Wirkkomponente, die über BZR-Antigen-Interaktion an die Lymphomzelle herangeführt wird. Hierfür eignet sich das modifizierte Exotoxin A von *Pseudomonas aeruginosa* (ETA'), das an das Neurabin I-BAR-Body gekoppelt wird. *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (ETA) gilt als eines der potentesten Toxine in der Immuntherapie. Die katalytische Einheit des ETA führt zur ADP-Ribosylierung des menschlichen Elongations-Faktor-2 (EF-2). Durch die dadurch erfolgte Hemmung der Proteinsynthese wird die Apoptose der Zelle eingeleitet. Bei der modifizierten Form des Toxins (ETA') handelt es sich um eine verkürzte und in der Aminosäuresequenz veränderte Version des Toxins.⁴²

Das so konstruierte BAR-Body ist also ausschließlich gegen die Zellen des primären ZNS-Lymphoms gerichtet und sollte nach Bindung an den B-Zell-Rezeptor der Lymphomzellen zusammen mit ETA' internalisiert werden. Erst im Inneren der Zelle entwickelt ETA' seine Funktion als Toxin und führt zur Lyse der Lymphomzelle. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Klonierung, Expression, Aufreinigung und funktionellen Testung des an ETA' gekoppelten Neurabin I-BAR-Body dargestellt.

4.2. Herstellung einer Lymphomzelllinie, die das ZNS-Lymphom abbildet

Damit das BAR-Body als neue Therapiemöglichkeit des primären ZNS-Lymphoms getestet werden kann, muss zunächst als Voraussetzung die spezifische Bindung des Konstruktes an die B-Zellen des Lymphoms nachgewiesen werden und anschließend dessen Möglichkeit zur spezifischen Lyse der Lymphomzellen gezeigt werden. Da zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit keine Zelllinie des primären ZNS-Lymphoms verfügbar war, wurde auf eine Zelllinie des diffus großzelligen B-Zell-Lymphoms vom ABC-Typ zurückgegriffen (OCI-Ly3-Zelllinie) und diese modifiziert. Der B-Zell-Rezeptor dieser Lymphomzelllinie zeigt eine spezifische Bindung an das Antigen ARS2 (Arsenite Resistance Protein 2). Bei circa 67% der Patienten mit einem PZNSL zeigt der B-Zell-Rezeptor der

Lymphomzellen eine Bindung an das Antigen Neurabin I.⁴⁹ Zur Testung des ZNS-Lymphom-spezifischen Neurabin I-BAR-Body wurde deshalb aus der histologischen Probe eines Patienten mit primärem ZNS-Lymphom im José-Carreras-Zentrum in Homburg dessen B-Zell-Rezeptor, welcher spezifisch an das Antigen Neurabin I bindet, kloniert und die DLBCL-Zelllinie OCI-Ly3 mit diesem B-Zell-Rezeptor transfiziert. Durch die Klonierung dieses B-Zell-Rezeptors in die OCI-Ly3-Zellen konnte eine rekombinante Zelllinie hergestellt werden, die neben dem natürlichen BZR auch den Neurabin-reaktiven B-Zell-Rezeptor eines ZNS-Lymphoms exprimiert. Mit Hilfe dieser rekombinanten Zelllinie (OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen) kann die spezifische Bindung des BAR-Body getestet werden. Diese modifizierte Zelllinie wurde freundlicherweise vom José-Carreras-Zentrum in Homburg zur Verfügung gestellt. Die Herstellung der transfizierten Zelllinie ist nicht Teil dieser Arbeit.

4.3. Aufbau der BAR-Bodies

Das in der Einleitung beschriebene Fab-Format (Abschnitt 2.4) besteht aus der variablen Region der Schwer- und Leichtkette eines Antikörpers sowie aus jeweils einer konstanten Region der schweren und leichten Kette. Zur Konstruktion der BAR-Bodies sollen die variablen Regionen gegen das BAR Neurabin I ausgetauscht werden um eine neue BAR-Region zu bilden. Da die variablen Regionen der schweren und leichten Antikörperketten größer als das Neurabin-Epitop sind, wurden die an die Epitopregion angrenzenden Aminosäuresequenzen auf unterschiedliche Weise in das Konstrukt integriert. So wurden drei BAR-Bodies, die sich lediglich im Aufbau der variablen Domänen, also der BAR-Region, unterscheiden, im Fab-Format hergestellt, wobei die BAR-Region aus der Epitopregion und den angrenzenden Aminosäuresequenzen besteht.

Neurabin I ist 1375 Aminosäuren lang. Die Region des Epitops wird gebildet von den Aminosäuren 1204 bis 1250, was 47 Aminosäuren entspricht.⁶¹ Bei dem ersten BAR-Body (A) befindet sich das Epitop am Anfang der BAR-Region. Die gesamte BAR-Region dieses Konstruktes wird gebildet von den Aminosäuren 1204 bis 1324. Bei dem zweiten BAR-Body (B) liegt das Epitop mittig. Die Aminosäuren 1168 bis 1285 bilden die BAR-Region. Das dritte BAR-Body (C) enthält das Epitop endständig, wobei die gesamte BAR-Region die Aminosäuren 1131 bis 1250 enthält. Bei allen drei BAR-Bodies besteht die Gensequenz der BAR-Region jeweils aus circa 120 Aminosäuren, also 360 Basenpaaren, was in etwa der Länge einer regulären variablen Region eines Antikörpers entspricht. Die drei BAR-Bodies wurden zeitgleich hergestellt und auf Funktionalität getestet. Abbildung 7 dient der Verdeutlichung der unterschiedlichen Aminosäure-Sequenzen der BAR-Region der BAR-Bodies. Abbildung 8 zeigt den Aufbau der drei BAR-Bodies mit den unterschiedlichen Positionen des Neurabin-Epitops.

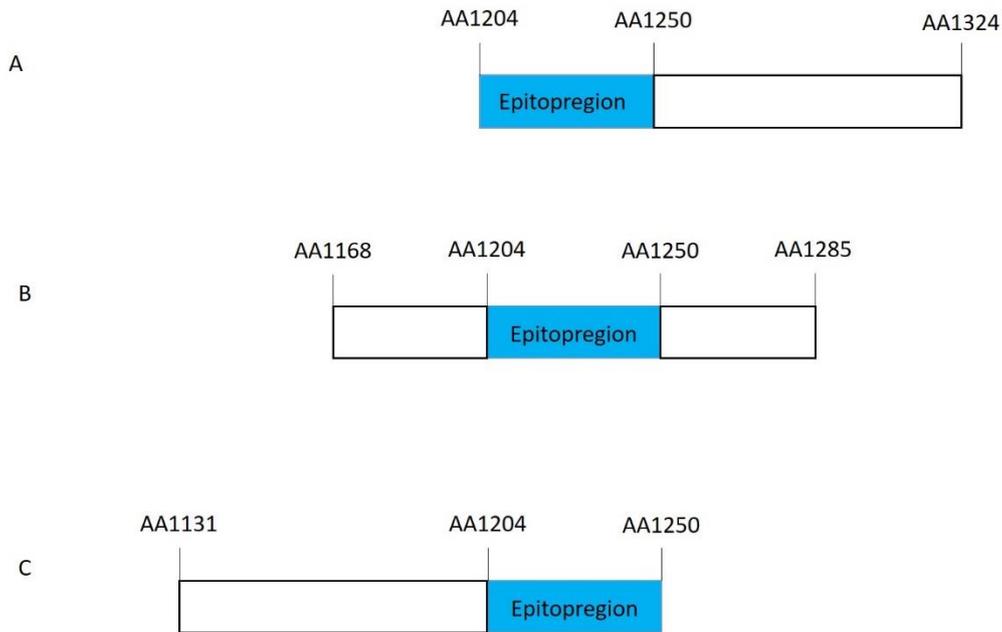


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Aminosäure-Sequenz der BAR-Region mit der BZR-bindenden Epitopregion von Neurabin I (blau) der drei BAR-Bodies A, B und C.

Darstellung der BAR-Region des Neurabin I-BAR-Body. Die BAR-Region wird gebildet von der Epitopregion (blau, Aminosäuren 1204 bis 1250) sowie den angrenzenden, dargestellten Aminosäuresequenzen (nicht gefärbt). Die BAR-Region der BAR-Bodies wurde auf 120 Aminosäuren erweitert (die BZR-bindende Epitopregion von Neurabin I besteht nur aus 47 Aminosäuren), um die Länge einer natürlichen variablen Region nach zu ahmen (circa 120 Aminosäuren). BAR-Body A: Epitopregion vorne; BAR-Body B: Epitopregion mittig; BAR-Body C: Epitopregion hinten.

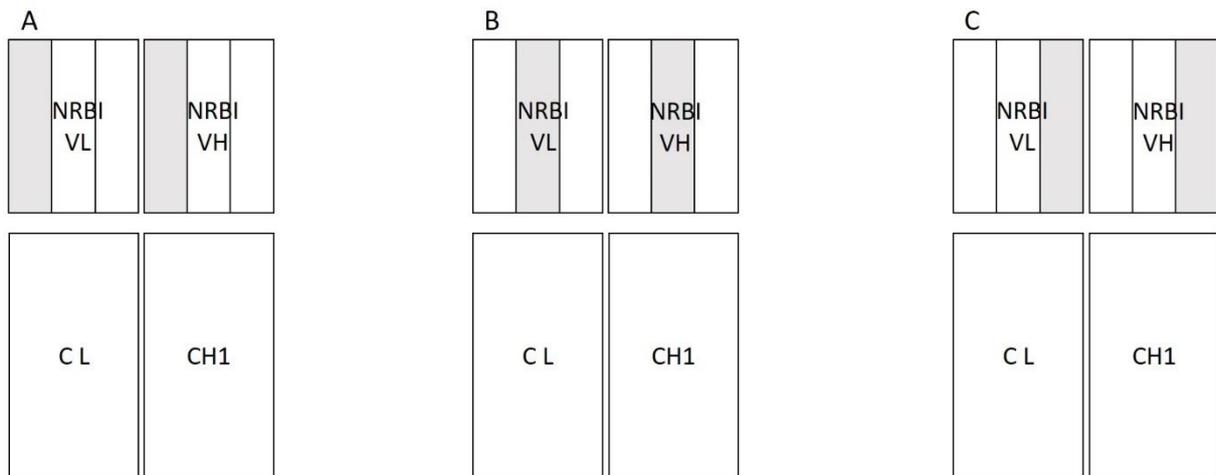


Abbildung 8: Schematische Darstellung der BAR-Bodies im Fab-Format mit Darstellung der Position der Epitopregion von NRBI.

Die BAR-Bodies im Antikörperformat bestehen aus einer Schwer- und einer Leichtkette. Die variable Region der Schwer- (VH) sowie der Leichtkette (VL) wurde durch die Epitopregion von Neurabin I (NRBI) sowie der angrenzenden Aminosäuresequenz (siehe Abbildung 7) ersetzt. Die Epitopregion des NRBI (Aminosäuren 1204 bis 1250) ist als grau hinterlegte Fläche dargestellt. BAR-Body A: Epitopregion vorne; BAR-Body B: Epitopregion mittig; BAR-Body C: Epitopregion hinten.

4.4. Arbeitsschritte zur Herstellung der BAR-Bodies

Die BAR-Bodies im Fab-Format wurden stufenweise in aufeinanderfolgenden Arbeitsschritten hergestellt. Die einzelnen Arbeitsschritte sind in Abbildung 9 dargestellt. Die Erläuterung und die Ergebnisse sind in dem nachfolgenden Text (Abschnitte 4.4.1, 4.4.2 und 4.4.3) aufgeführt.

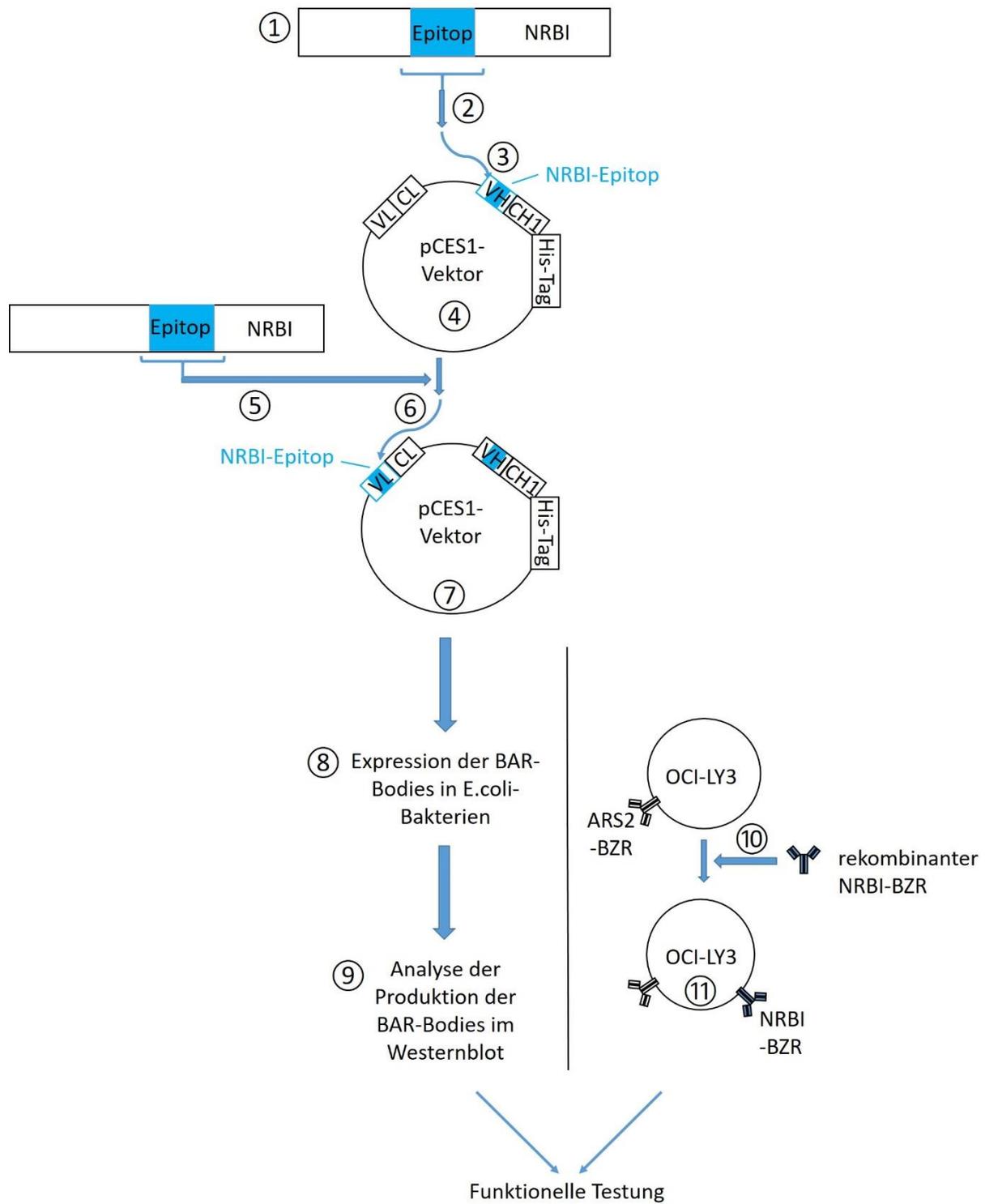


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Herstellung der BAR-Bodies.

①: NRBI-Klon mit Epitopregion (AA1204-1250).

② + ⑤: BAR-Region des BAR-Body, bestehend aus der Epitopregion und angrenzender Aminosäuresequenz (entsprechend Abbildung 7).

③ - ④: Klonierung der BAR-Region in den variablen Teil der Schwereketten (VH) eines pCES1-Vektors, der die DNA-Kassette zur Herstellung von Antikörpern im Fab-Format enthält.

⑥ - ⑦: Klonierung der BAR-Region in den variablen Teil der Leichtkette (VL) eines pCES1-Vektors, der die DNA-Kassette zur Herstellung von Antikörpern im Fab-Format enthält.

⑧ - ⑨: Expression der BAR-Bodies in TGI *E. coli*-Bakterien und Nachweis im Western Blot.

⑩ - ⑪: Klonierung des ZNS-Lymphom-BZR mit NRBI-Reaktivität in die DLBCL-Zelllinie OCI-Ly3 zur Herstellung der rekombinanten Zelllinie OCI-Ly3-recNRBI-BZR.

4.4.1. Klonierung der DNA-Sequenz der BAR-Bodies

4.4.1.1. DNA-Sequenz der Schwereketten

Zur Herstellung der Gensequenz der BAR-Bodies wurden die in Tabelle 9 aufgeführten NRBI-Primer verwendet. Als Template diente ein im Labor vorhandener Klon, der die DNA-Sequenz der Neurabin-Aminosäuren 1041 – 1375 enthält (Abbildung 9, Konstrukt ①).

In einem ersten Schritt wurden die drei unterschiedlichen NRBI-Bereiche (A, B, C in Abbildung 7) mit den NRBI-Schwerkettenprimern (siehe Tabelle 9) amplifiziert. Diese Polymerase-Kettenreaktionen (PCRs) fügten die zur Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen für die Restriktionsenzyme NcoI und BstEII ein. In der Agarose-Gelelektrophorese wurde die Größe des Fragments kontrolliert, welche etwa 360 bp beträgt und somit der errechneten Größe der BAR-Region von circa 120 Aminosäuren entspricht.

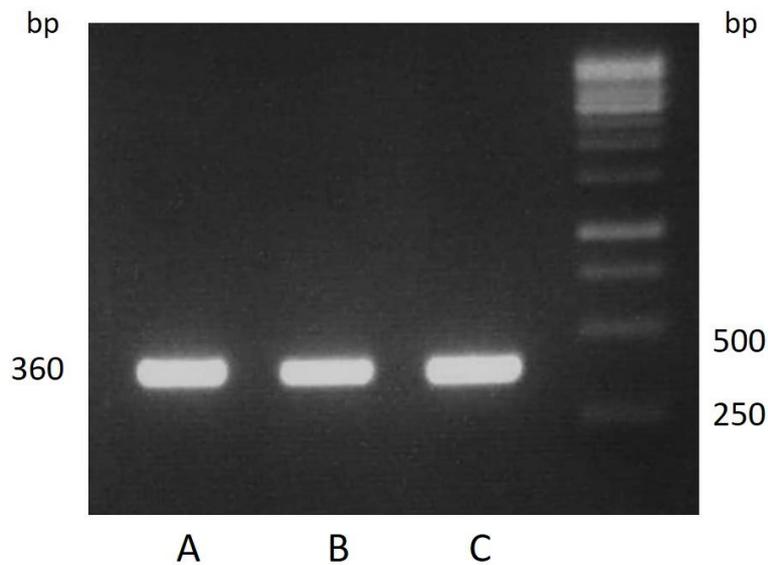


Abbildung 10: Agarose-Gel-Elektrophorese nach der PCR auf den NRBI-Klon mit den Schwerkettenprimern.

2% Agarose-Gel. Ethydiumbromid-Färbung. Abbildung der NRBI-BAR-Region (NRBI-Epitop + angrenzende Region) der BAR-Bodies Typ A, B und C (siehe Abbildung 7), die den variablen Teil der Schwereketten (VH) des Fab-Fragments ersetzen soll. Als Template diente der NRBI-Klon der Aminosäuren 1041 bis 1375.

Die amplifizierten Gensequenzen wurden in den TOPO-TA-Vektor kloniert, welcher als Übergangsvektor diente. Kompetente DH5 α E. coli-Bakterien wurden mit dem Vektor transformiert und auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert.

Für die Kontrolle der korrekten Klonierung wurden pro LB-Ampicillin-Agarplatte jeweils sechs Einzelkolonien mittels Kolonien-PCR mit den vektorspezifischen Primern M13 forward und M13 reverse amplifiziert. Die Agarose-Gelelektrophorese (Abbildung 11) zeigte, dass die meisten der untersuchten Bakterien die neuen Klone enthielten. Die Bande befand sich bei circa 600 bp, was dem erwarteten Wert von 360 bp für das NRBI-Epitop mit angrenzender Region (BAR-Region) sowie circa 200 bp zwischen dem M13 reverse und dem M13 forward Primer entsprach. Die Proben 2 und 6 des BAR-Body B zeigten keine Bande bei 600 bp und wurden für die weitere Arbeit nicht mehr berücksichtigt.

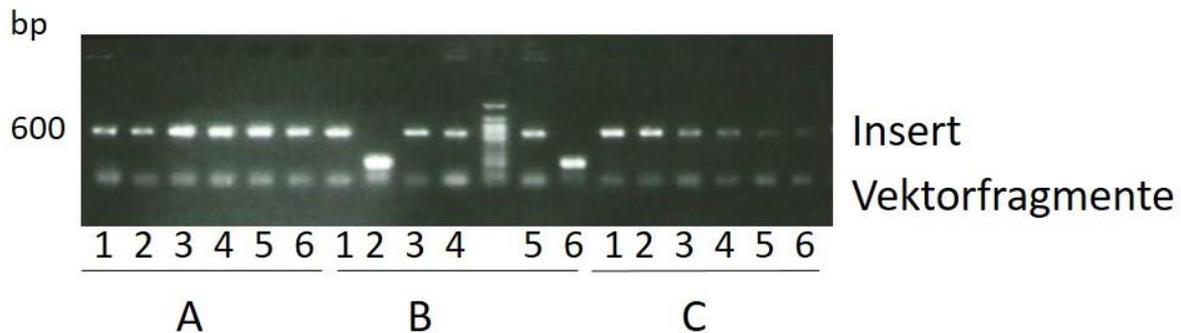


Abbildung 11: Agarose-Gel-Elektrophorese zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung der BAR-Region in den TOPO-TA-Vektor mittels Kolonien-PCR mit den Primern M13 forward und M13 reverse.

2% Agarose-Gel. Ethydiumbromid-Färbung. Darstellung der BAR-Region (NRBI-Epitop + angrenzende Region) der BAR-Bodies Typ A, B und C (siehe Abbildung 7) mit jeweils 6 Klonen. Die Klon 2 und 6 des BAR-Body B wiesen keine DNA-Bande bei 600 bp auf und wurden deshalb für die weitere Arbeit nicht berücksichtigt.

Nach der erfolgreichen Klonierung wurde von Klon 1 des Konstruktes A, von Klon 4 des Konstruktes B und von Klon 1 des Konstruktes C die DNA mit dem „High Pure DNA Isolation Kit“ (Roche Applied Science) isoliert und deren Konzentration gemessen.

Mithilfe der Restriktionsendonukleasen NcoI und BstEII konnte die gewünschte Gensequenz für die BAR-Bodies aus dem TOPO-TA-Vektor herausgeschnitten werden (Abbildung 9, Schritt ②). Eine Erfolgskontrolle wurde mittels Agarose-Gel-Elektrophorese durchgeführt (Abbildung 12). Für die weiteren Schritte wurde das Fragment bei circa 360 bp verwendet, welches zur Extraktion der DNA aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten wurde.

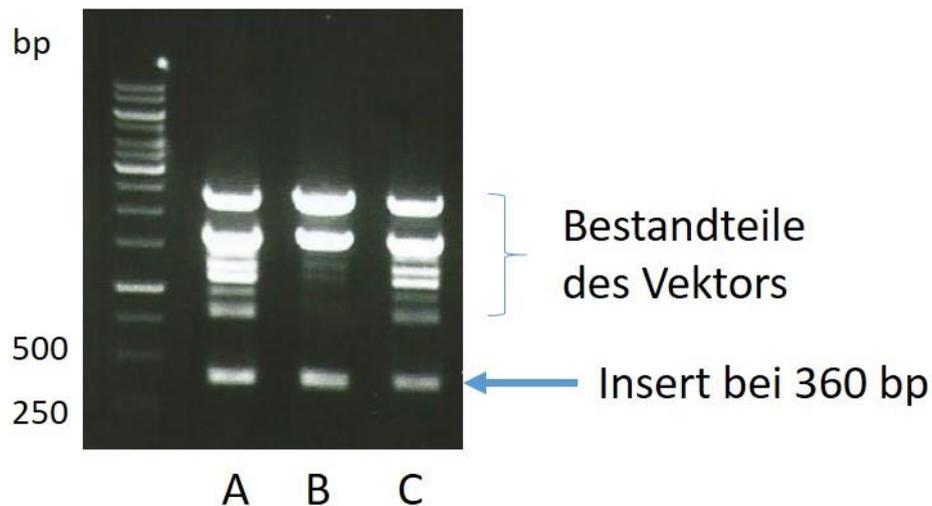


Abbildung 12: Agarose-Gel-Elektrophorese zur Isolierung der BAR-Region der BAR-Bodies A, B und C zur Klonierung in die Schwerkette mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *BstEII*.

*1% Agarose-Gel. Ethydiumbromid-Färbung. Bei 360 bp Darstellung der DNA-Fragmente der BAR-Region (NRBI-Epitop + angrenzende Region) der BAR-Bodies Typ A, B und C (siehe Abbildung 7) nach Restriktionsschnitt mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *BstEII*.*

Im nachfolgenden Schritt (Abbildung 9, Schritt ③) wurden 4,2 ng der isolierten DNA in die variable Region der Schwerketten des pCES1-Vektor (28,5 ng) kloniert. TGI E. coli-Bakterien wurden mit dem Konstrukt transformiert und auf 2xTy-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert. Zur Erfolgskontrolle der Klonierung in den pCES1-Vektor wurde eine Kolonien-PCR mit den Primern CH1 3' und NRBI AA1204-ApaLI-s durchgeführt (Abbildung 14). Durch die Variation der Epitop-anliegenden Region befand sich die Bindungsstelle des NRBI-Primers an unterschiedlichen Positionen der BAR-Bodies A, B und C, so dass die PCR-Produkte der drei BAR-Bodies in der Agarose-Gel-Elektrophorese nicht die gleiche Länge aufwiesen (Abbildung 13). Das PCR-Produkt von BAR-Body A hatte eine Länge von circa 500 bp, das von BAR-Body B wies eine Länge von circa 400 bp auf und das von BAR-Body C war circa 300 bp lang.

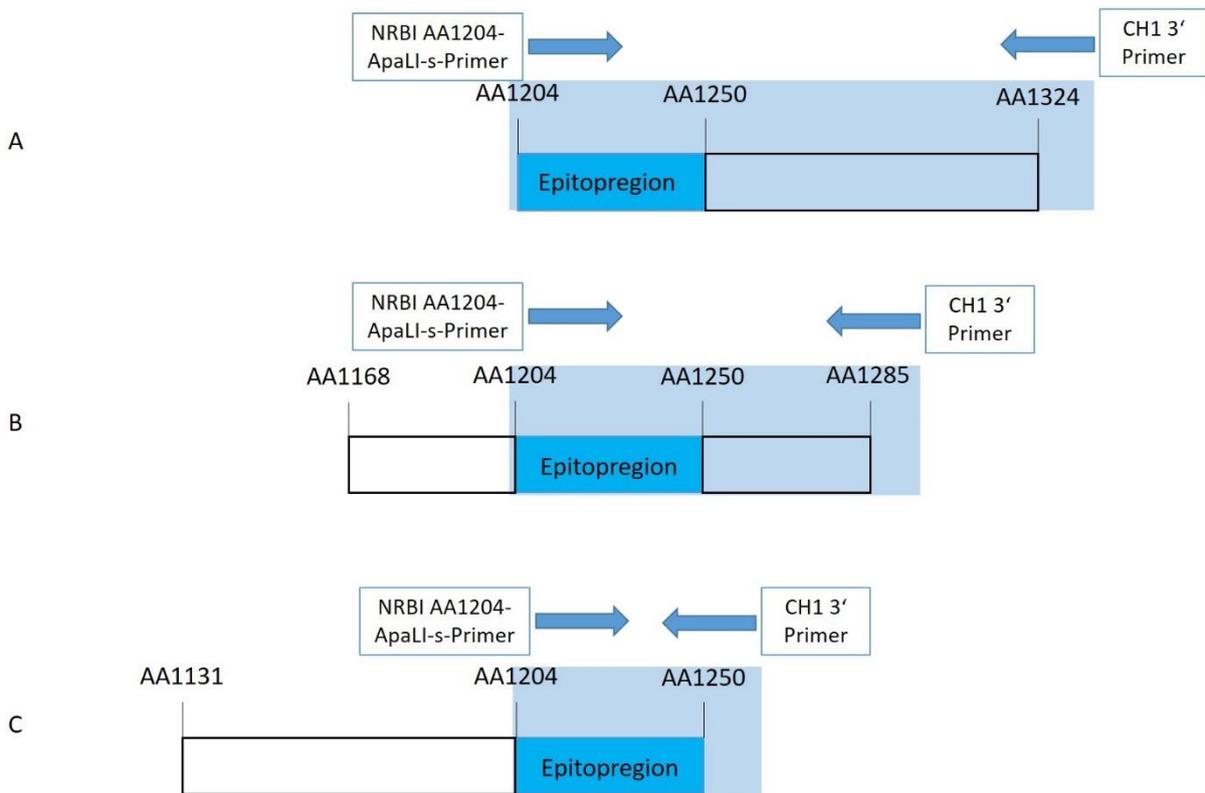


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Bindung der Primer NRBI AA1204-ApaLI-s und CH1 3' an die BAR-Region der BAR-Bodies A, B und C.

Dargestellt sind die drei BAR-Bodies Typ A, B und C (siehe Abbildung 7) mit den unterschiedlichen BAR-Regionen (NRBI-Epitop + angrenzende Region), den angrenzenden Aminosäuresequenzen, sowie die Bindungsstellen der Primer NRBI AA1204-ApaLI-s und CH1 3'. Die von den Pfeilen eingefasste Region stellt die amplifizierte Sequenz in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit den Primern NRBI AA1204-ApaLI-s und CH1 3' dar.

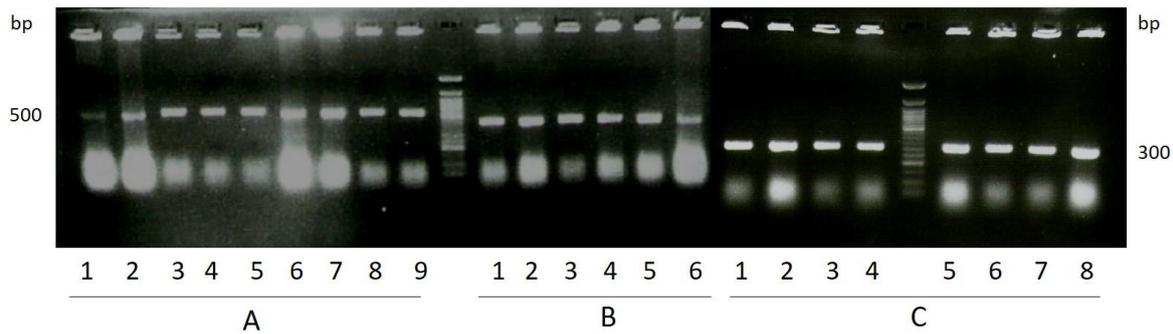


Abbildung 14: Agarose-Gel-Elektrophorese zur Kontrolle der erfolgreichen Klonierung der BAR-Region der BAR-Bodies A, B und C in die Schwereketten des pCES1-Vektors mittels Kolonien-PCR mit den Primern CH1 3' und NRBI AA1204-ApaLI-s.

2% Agarose-Gel. Ethydiumbromid-Färbung. Darstellung der BAR-Region (NRBI-Epitop + angrenzende Region) der Klone 1 - 9 des BAR-Body A, der Klone 1 - 6 des BAR-Body B und der Klone 1 - 8 des BAR-Body C. Die BAR-Bodies entsprechen den Konstrukten ④ in Abbildung 9.

Nach diesem Schritt lag die fertige Gensequenz der Schwereketten mit BAR-Region (NRBI-Epitop und angrenzende Region) entsprechend der Abbildung 7) im pCES1-Vektor vor (Abbildung 9, Konstrukt ④).

4.4.1.2. DNA-Sequenz der Leichtkette

Analog zu den zuvor beschriebenen Schritten wurde die Leichtkette vorbereitet, indem die spezifische Gensequenz des Neurabin I (Abbildung 9, Konstrukt ①) mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit den Leichtkettenprimern (siehe Tabelle 9) amplifiziert wurde. Als Template diente der NRBI-Klon der Aminosäuren 1041 bis 1375. Die Größe der spezifischen NRBI-Gensequenz wurde in der Agarose-Gel-Elektrophorese kontrolliert und betrug, wie erwartet, etwa 360 bp (Abbildung 15).

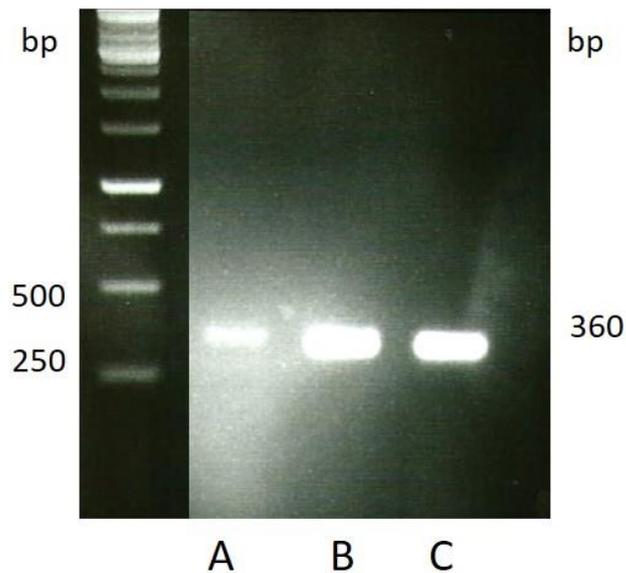


Abbildung 15: Agarose-Gel-Elektrophorese nach PCR auf NRBI-Klon mit den Leichtkettenprimern.

2% Agarose-Gel. Ethydiumbromid-Färbung. Darstellung der DNA-Fragmente der BAR-Region (NRBI-Epitop + angrenzende Region) der BAR-Bodies Typ A, B und C (siehe Abbildung 7), die den variablen Teil der Leichtkette (VL) des Fab-Antikörpers ersetzen soll. Als Template diente der NRBI-Klon der Aminosäuren 1041 bis 1375.

Die BAR-Region, die die variable Region der Leichtkette ersetzen soll, wurde analog zur Schwereketten in den TOPO-TA-Vektor kloniert, DH5 α E. coli-Bakterien mit dem Vektor transformiert und auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert. Die DNA der gewachsenen Einzelkolonien wurde in einer Kolonien-PCR mit den Primern M13 forward und M13 reverse zur Kontrolle dieses Klonierungsschrittes amplifiziert. Die Agarose-Gel-Elektrophorese zeigte ein Genfragment bei circa 600 bp, was bestätigte, dass die TA-Klonierung der Neurabin I-BAR-Region erfolgreich war (Abbildung 16).

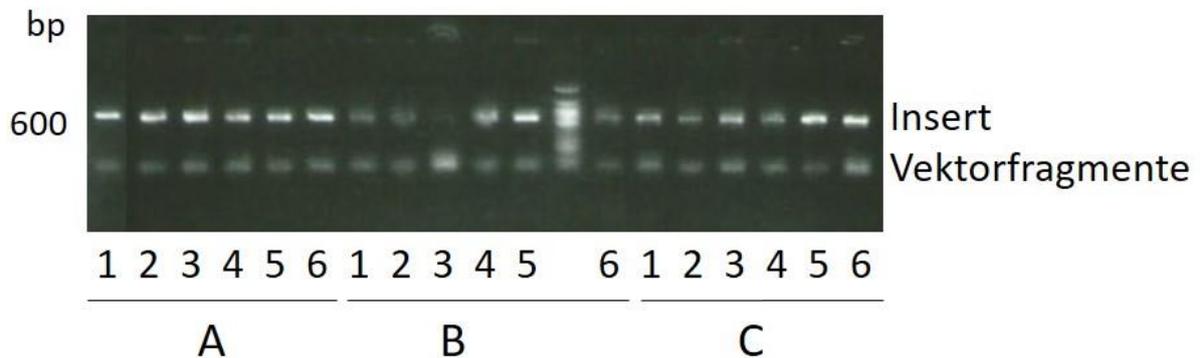


Abbildung 16: Agarose-Gel-Elektrophorese zur Kontrolle der erfolgreichen Klonierung der Neurabin I-BAR-Regionen in den TOPO-TA-Vektor mittels Kolonien-PCR mit den Primern MI3 forward und MI3 reverse.

2% Agarose-Gel. Ethydiumbromid-Färbung. Darstellung der BAR-Region (NRBI-Epitop + angrenzende Region) von jeweils 6 Klonen der BAR-Regionen Typ A, B und C (siehe Abbildung 7).

Im nächsten Schritt (Abbildung 9, Schritt ⑤) wurde die Gensequenz der BAR-Regionen jeweils des ersten Klons mit den Enzymen ApaLI und XhoI aus dem TOPO-TA-Vektor herausgeschnitten. Die Agarose-Gel-Elektrophorese zeigte die erfolgreiche Auftrennung des Vektors (Abbildung 17). Für die weitere Aufarbeitung wurde das untere Fragment bei 360 bp aus dem Agarose-Gel extrahiert und mit dem „Zymoclean Gel DNA Recovery Kit“ (Zymo Research) aufgereinigt.

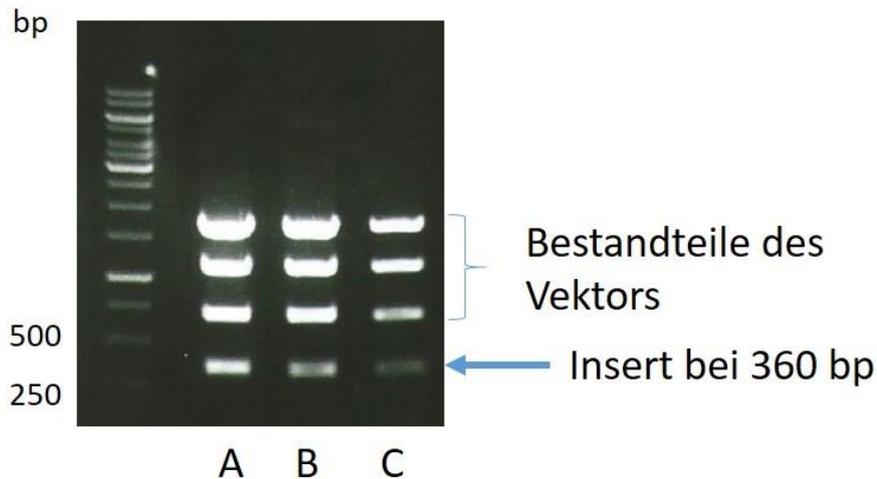


Abbildung 17: Agarose-Gel-Elektrophorese zur Isolierung der BAR-Region der BAR-Bodies A, B und C zur Klonierung in den pCES1-Vektor anstelle der variablen Region der Leichtkette (VL) mit den Restriktionsendonukleasen *ApaI* und *XhoI*.

*1% Agarose-Gel. Ethydiumbromid-Färbung. Bei 360 bp Darstellung der DNA-Fragmente der BAR-Region (NRBI-Epitop + angrenzende Region) für die Klonierung in die Leichtkette (VL) der BAR-Bodies Typ A, B und C (siehe Abbildung 7). Verdau des TOPO-TA-Vektors mit den Restriktionsenzymen *ApaI* und *XhoI*.*

Als nächstes (Abbildung 9, Schritt ⑥) wurden 25 ng der BAR-Regionen A, B und C als Insert in den pCES1-Vektor, welcher bereits die Schwerkette und den konstanten Teil der Kappa-Leichtkette enthielt (Abbildung 9, Konstrukt ④), 150 ng), kloniert. TGI E. coli-Bakterien wurden mit dem neuen Konstrukt (Abbildung 9, Konstrukt ⑦) transformiert und auf 2xTY-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert. Die gewachsenen Einzelkolonien dienten als Template für die Kolonien-PCR mit den Primern M13 reverse und kappa-antisense. Die Agarose-Gel-Elektrophorese bestätigte das Vorliegen der gewünschten Klone in den Bakterien durch die DNA-Bande bei 500 bp (Abbildung 18).

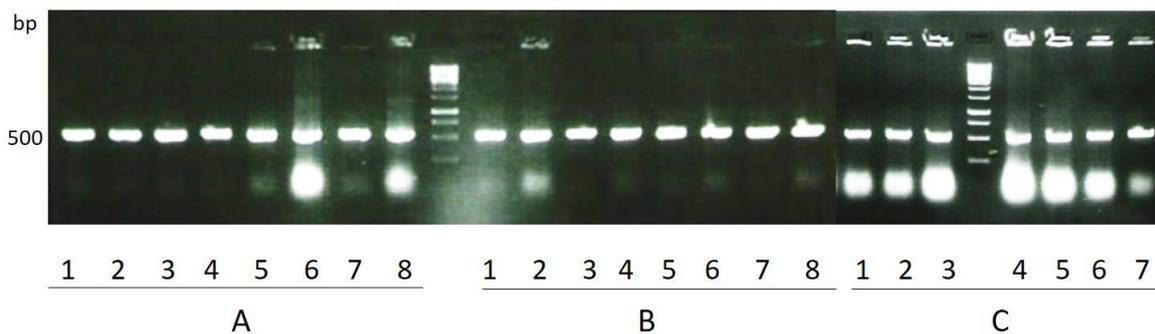


Abbildung 18: Agarose-Gel-Elektrophorese zur Kontrolle der erfolgreichen Ligation der BAR-Region der BAR-Bodies A, B und C in den pCES1-Vektor mit den Primern M13 reverse und kappa-antisense.

2% Agarose-Gel. Ethydiumbromid-Färbung. Darstellung der BAR-Region (NRBI-Epitop + angrenzende Region) der Klone 1 - 8 des BAR-Body A, der Klone 1 - 8 des BAR-Body B und der Klone 1 - 7 des BAR-Body C. Die BAR-Bodies Typ A, B und C (siehe Abbildung 7) entsprechen den Konstrukten ⑦ auf Abbildung 9.

4.4.1.3. Sequenzierung

Zur Kontrolle der erfolgreichen Klonierung in den pCES1-Vektor erfolgte eine Sequenzierung der hergestellten Konstrukte (Abbildung 9, Konstrukt ⑦) Typ A, B und C (siehe Abbildung 8), welche zeigte, dass die gewünschte Sequenz des Neurabin I (NRBI) erfolgreich in den pCES1-Vektor kloniert wurde und damit den variablen Teil der schweren und leichten Kette ersetzte. In Abbildung 19 ist beispielhaft die Sequenz des BAR-Body ⑦ B abgebildet. Dargestellt sind die Signalsequenz des pCES1-Vektors, die Schnittstellen der Restriktionsenzyme, der Anfang und das Ende der Neurabin-Sequenz des BAR-Body B, sowie der konstante Teil der Schwer- respektive der Leichtkette. Die Sequenzen der BAR-Bodies ⑦ A, B und C sind im Aufbau analog, unterscheiden sich lediglich in den Aminosäuren der BAR-Region, genauer an den an die Epitopregion angrenzenden Aminosäuresequenzen. Die erhaltenen Konstrukte ⑦ A, B und C entsprachen in ihrer DNA-Sequenz der zuvor geplanten Sequenz der Expressionsklone.

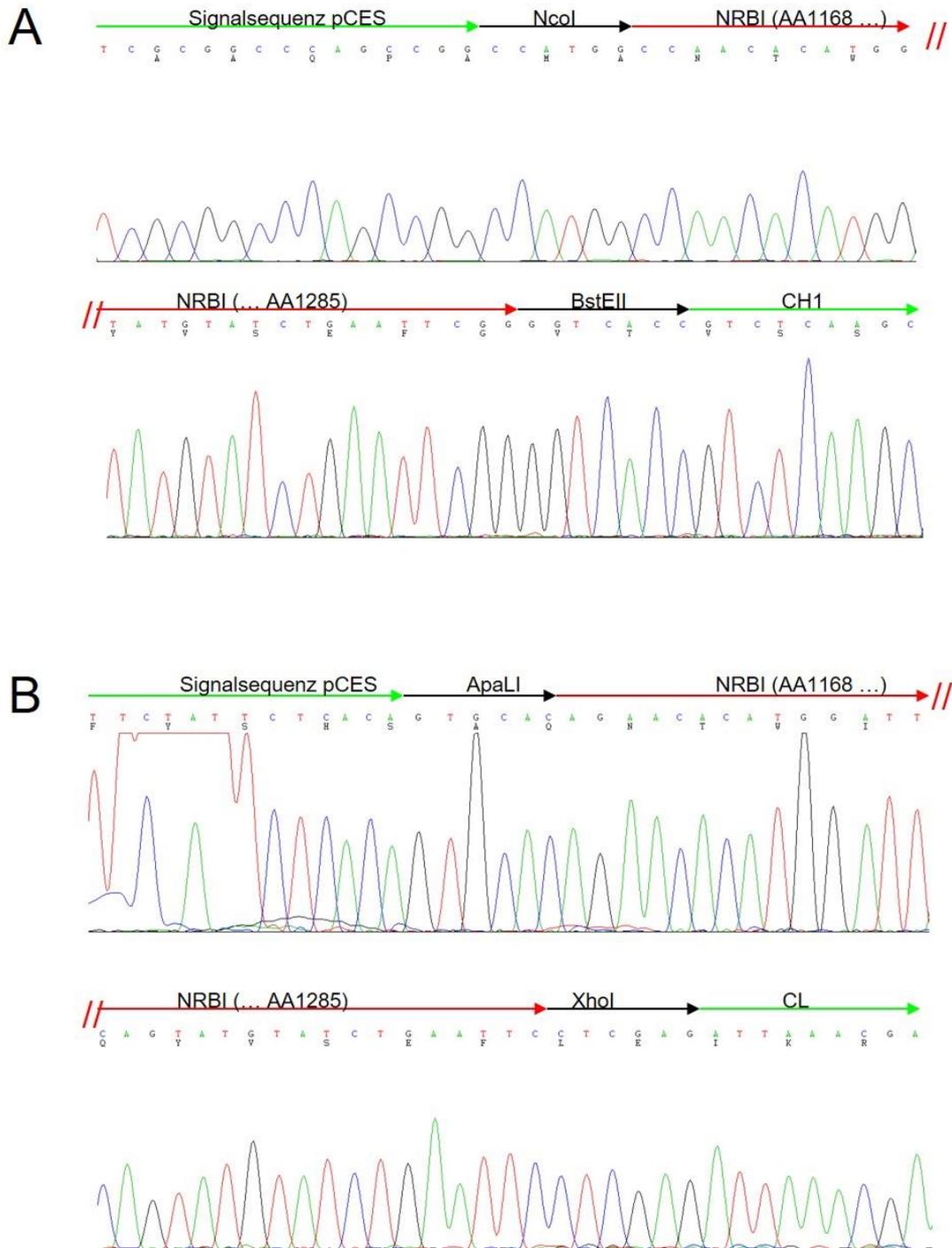


Abbildung 19: Sequenzierung des BAR-Body ⑦ B.

Dargestellt ist jeweils sowohl die DNA- als auch die Aminosäuresequenz der verwendeten Signalsequenz, die verwendeten Restriktionsschnittstellen (in (A) NcoI und BstEII, in (B) ApaLI und XhoI), der Anfang bzw. das Ende des NRBI-Fragmentes und der Beginn des konstanten Teils der Schwer- (A) respektive Leichtkette (B). Obwohl das komplette NRBI-Fragment nicht dargestellt ist, ist die durchgehende Aminosäuresequenz der Konstrukte erkennbar.

4.4.2. Produktion der BAR-Bodies

Zur Expression in Bakterien wurden TGI *E. coli*-Bakterien mit jeweils den Klonen 1 und 2 der hergestellten Konstrukte A, B und C (Abbildung 9, Konstrukt ⑦) transformiert. Die Bakterien wuchsen in 2xTY-Medium mit Ampicillin und Glucose bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 0,6 - 0,8$. Die Protein-Produktion in den TGI *E. coli*-Bakterien wurde durch Induktion mit Isopropylthiogalactosid (IPTG, 2 mM Endkonzentration) gestartet (Abbildung 9, Schritt ⑧).

Der pCES1-Vektor enthält hinter der Schwerkette ein His-Tag, welches die Reinigung des Proteins mit TALON Beads ermöglicht. Nach einem Waschschriff mit Lysepuffer konnten die Proben mit Imidazol eluiert werden, sodass im Eluat das Protein frei vorlag. In der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese mit einem 12% Trenngel wurde das Protein nach seiner Molekülmasse aufgetrennt. Im Westernblot (Abbildung 9, Schritt ⑨) erfolgte der Nachweis des Konstruktes über das His-Tag mittels murinem Penta-His-Antikörper und HRP-konjugiertem Anti-Maus-Antikörper bei einer Proteinbande von circa 85 kDa.

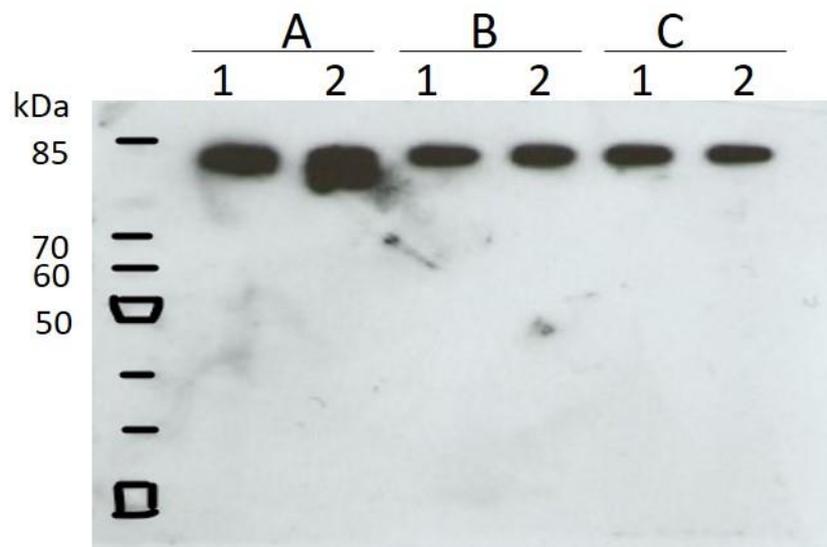


Abbildung 20: Westernblot zur Kontrolle der Expression der BAR-Bodies in den TGI *E. coli*-Bakterien.

Darstellung der BAR-Bodies Typ A, B und C (siehe Abbildung 7) mit jeweils den Klonen 1 - 2. Detektion der BAR-Bodies über His-Tag.

Mit dem „Photometer Gene Quant pro“ (Amersham plc) wurde die Konzentration der hergestellten BAR-Bodies bestimmt und daraus die absolute Menge berechnet. Die Größe der ursprünglichen Kultur betrug 4 ml und das Volumen der BAR-Bodies 200 μ l. Die Werte sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12: Konzentration und absolute Menge der produzierten BAR-Bodies

| BAR-Body | Konzentration (mg/ml) | Absolute Menge (µg) |
|-----------------|------------------------------|----------------------------|
| A 1 | 0,111 | 22,2 |
| A 2 | 0,071 | 14,2 |
| B 1 | 0,030 | 6,0 |
| B 2 | 0,039 | 7,8 |
| C 1 | 0,027 | 5,4 |
| C 2 | 0,054 | 10,8 |

4.4.3. Funktionelle Testung der BAR-Bodies

Nach der Produktion der BAR-Bodies wurde ihre Funktionalität an Lymphomzellen getestet. Zu dem Zeitpunkt der Durchführung gab es keine erhältliche Zelllinie des primären ZNS-Lymphoms. Aus diesem Grund musste ein B-Zell-Rezeptor, welcher gegen Neurabin I (NRBI) gerichtet ist und aus primärem Patientenmaterial kloniert wurde, in eine vorhandene Zelllinie kloniert werden (Abbildung 9, Schritt ⑩). Ausgewählt wurde die OCI-Ly3-Zelllinie, die aus einem humanen diffus großzelligen B-Zell-Lymphom etabliert wurde und die natürlicherweise einen B-Zell-Rezeptor exprimiert, der gegen ARS2 (Arsenite Resistance Protein 2) gerichtet ist. Das Plasmid, das den NRBI-reaktiven B-Zell-Rezeptor enthält, wurde mittels Elektroporation in die OCI-Ly3-Zellen transfiziert und so wurde die OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zelllinie hergestellt. Die Proteinexpression des transfizierten NRBI-reaktiven B-Zell-Rezeptors wurde durch die Zugabe von Doxycyclin aktiviert (Tet-on).⁶¹

Die mit einem NRBI-reaktiven B-Zell-Rezeptor transfizierten OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen (Abbildung 9, Konstrukt ⑪) wurden mit den BAR-Bodies inkubiert. Anschließend erfolgte mittels Anti-His-Antikörpern (gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff Allophycocyanin) nach mehreren Waschschritten die durchflusszytometrische Detektion der BAR-Bodies auf den OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen. Im „BD FACS Canto Flow Cytometer“ wurde das Streulicht des Farbstoffes gemessen und mit der „WinMDI Software“ ausgewertet. Als Positivkontrolle diente ein vorhandenes BAR-Toxin-Konstrukt, das aus der Epitopregion des NRBI (AA1204 - 1250) gekoppelt an das Toxin ETA‘ (NRBI-ETA‘) bestand und welches bereits in früheren Experimenten eine Bindung an die OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen gezeigt hatte. In der Auswertung der Messungen der Durchflusszytometrie zeigte die Positivkontrolle NRBI-ETA‘ eine Bindung an die Lymphomzellen mit NRBI-spezifischem B-Zell-Rezeptor, nicht aber an Lymphomzellen, die den NRBI-spezifischen BZR nicht exprimierten. Die BAR-Body-Konstrukte zeigten hingegen keine Bindung an OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen, auch wenn diese durch Doxycyclin-Induktion NRBI-spezifische B-Zell-Rezeptoren exprimierten.

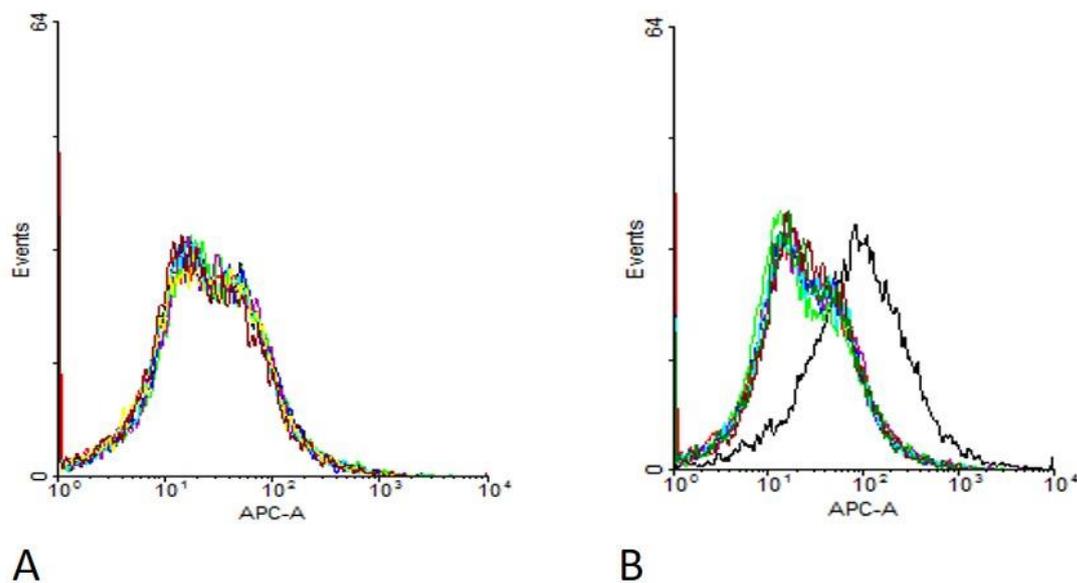


Abbildung 21: Bindungs-Assay der OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen mit den BAR-Bodies A, B und C.

Durchflusszytometrische Messung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Allophycocyanin (APC). A: OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen ohne Induktion des NRBI-spezifischen BZR. B: OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen, bei denen zuvor durch Doxycyclin die NRBI-reaktiven B-Zell-Rezeptoren induziert wurden. A + B: Die schwarze Kurve stellt die Positivkontrolle NRBI-ETA' (linearisiertes NRBI gekoppelt an ETA') dar und zeigt bei den OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen mit induziertem NRBI-reaktivem BZR (B) eine Bindung an die Lymphomzellen. Alle in dieser Arbeit hergestellten BAR-Bodies (jeweils zwei Klone der BAR-Bodies A, B und C) sind in den übereinander liegenden farbigen Kurven dargestellt und zeigen keine Bindung an die Zellen. Die rote Kurve ist die Negativkontrolle, bei der die Autofluoreszenz der OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen gemessen wurde.

4.4.4. Modifizierung des Formats der BAR-Bodies

Aufgrund der fehlenden Bindung der BAR-Bodies im Fab-Format an die Lymphomzellen wurde als Alternative zu dem Fab-Fragment ein neues Konstrukt entwickelt, welches nur noch eine Antigen-Bindungsstelle enthält. Die Leichtkette wurde aus dem pCES1-Vektor entfernt und das neue Konstrukt bestand nur noch aus der Neurabin I-BAR-Region als variablen Teil der Schwereketten (VH) und der CH1-Domäne der Schwereketten. Gekoppelt wurde das BAR-Body an das modifizierte Pseudomonas aeruginosa Exotoxin A (ETA'). Natürlicherweise erfolgt nach Bindung eines spezifischen Antigens an den passenden B-Zell-Rezeptor die Internalisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes. Wird das NRBI-enthaltende BAR-Body von den Lymphomzellen über den B-Zell-Rezeptor internalisiert, spaltet sich Exotoxin A ab und kann über eine Hemmung der Proteinsynthese zytotoxische Effekte ausüben.

In Abbildung 22 ist die schematische Darstellung des neuen Konstruktes gezeigt. Wie bereits bei den davor getesteten Konstrukten enthält das BAR-Body A das Neurabin I-Epitop am Anfang der BAR-Region, BAR-Body B das Epitop in der Mitte und BAR-Body C das Epitop am Ende der BAR-Region (siehe Abbildung 7). Die BAR-Region bestehend aus dem Epitop und der anliegenden Region des Neurabin I ist gekoppelt an den konstanten Teil der Schwereketten (CH1) und das Toxin ETA'. Die Konstrukte werden analog zu den Konstrukten im Fab-Format weiterhin als modifiziertes BAR-Body A, B und C bezeichnet.

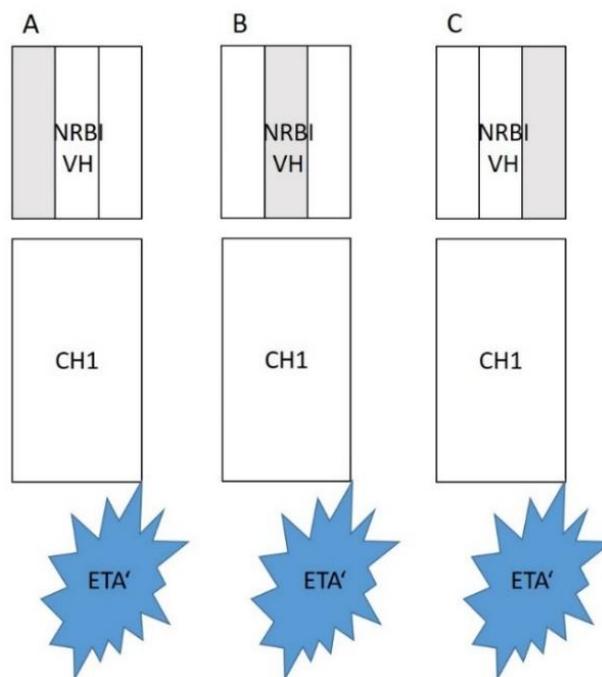


Abbildung 22: Schematische Darstellung der modifizierten BAR-Bodies A, B und C gekoppelt an ETA'.

Der graue Balken stellt die Epitopregion des Neurabin I dar. Im Vergleich zu den zuvor hergestellten BAR-Bodies im Fab-Format bestehen die neuen Konstrukte nur noch aus der BAR-Region (NRBI-Epitop + angrenzende Region) gekoppelt an CH1 der Schwereketten, das wiederum mit dem *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (ETA') als toxische Wirkkomponente verbunden ist.

Die Herstellung der modifizierten BAR-Bodies ist in Abbildung 23 gezeigt. Die einzelnen Arbeitsschritte werden im nachfolgenden Text (Abschnitte 4.4.6, 4.4.7 und 4.4.8) erläutert.

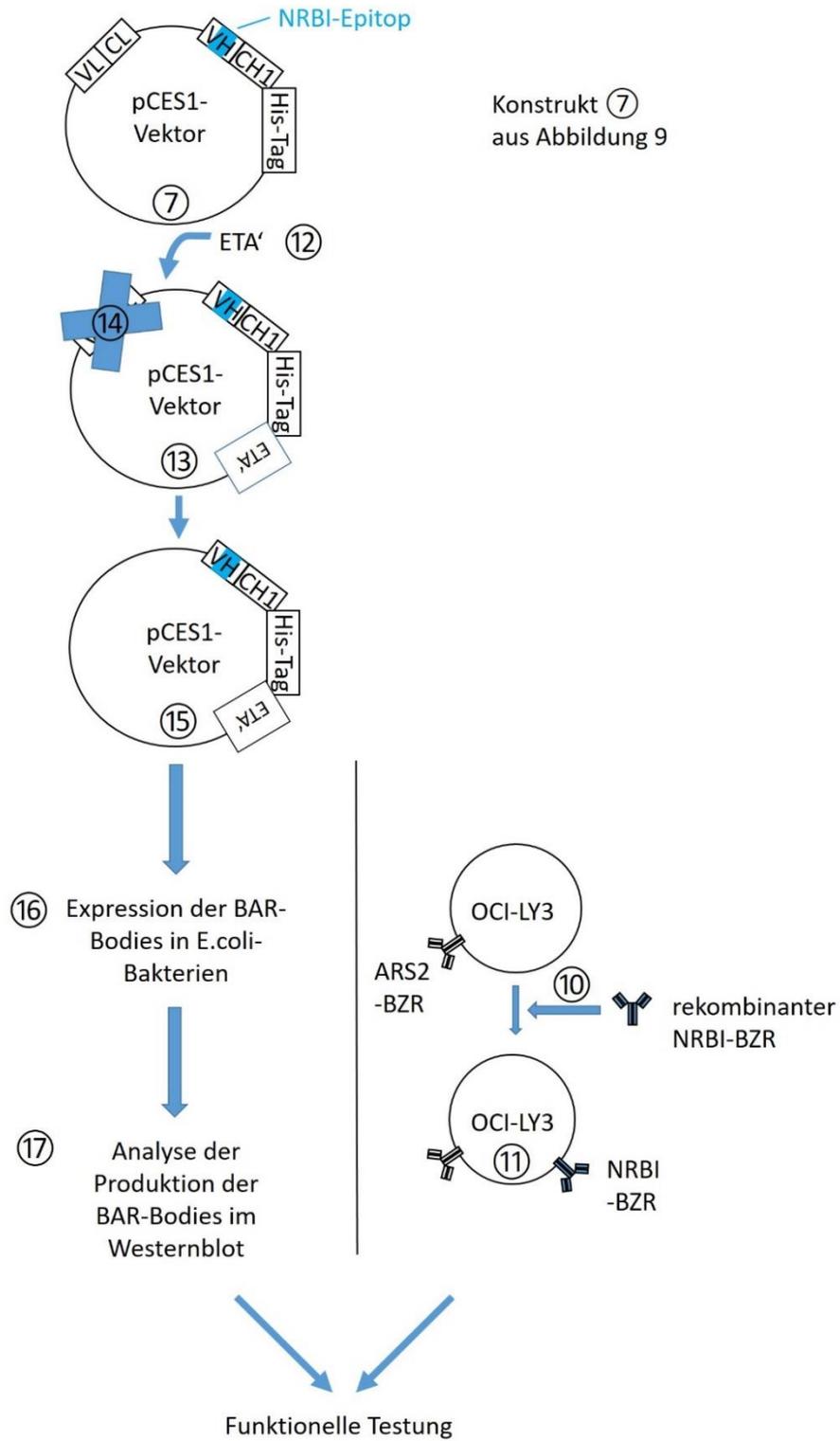


Abbildung 23: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Herstellung der modifizierten BAR-Bodies.

⑦ : pCES1-Vektor, welcher die DNA-Sequenz der BAR-Region (NRBI-Epitop + angrenzende Region) im variablen Teil der Schwereketten (VH), sowie die DNA-Kassette zur Herstellung von Antikörpern im Fab-Format enthält (siehe Abbildung 9).

⑩ - ⑪ : Klonierung des ZNS-Lymphom-BZR mit NRBI-Reaktivität in die DLBCL-Zelllinie OCI-Ly3 zur Herstellung der rekombinanten Zelllinie OCI-Ly3-recNRBI-BZR.

⑫ - ⑬ : Klonierung des modifizierten *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin in den pCES1-Vektor, der eine DNA-Kassette zur Herstellung von Antikörpern im Fab-Format enthält.

⑭ - ⑮ : Deletion der DNA-Sequenz der Leichtkette aus der DNA-Kassette des pCES1-Vektors.

⑯ - ⑰ : Expression der BAR-Bodies in TGI *E. coli*-Bakterien und Nachweis im Western Blot.

4.4.5. Klonierung der modifizierten DNA-Sequenz der BAR-Bodies

Der pCES1-Vektor (Abbildung 23, Konstrukt ⑦) wurde mit den Restriktionsenzymen NotI und EcoRI und dem orange Fermentas Puffer verdaut. Anschließend wurden 30 ng des pCES1-Vektors mit 15 ng der ETA'-DNA-Sequenz ligiert (Abbildung 23, Schritt ⑫).

Zur Entfernung der variablen Domäne der Leichtkette (VL) aus dem Konstrukt (Abbildung 23, Schritt ⑭) wurde der pCES1-Vektor (Abbildung 23, Konstrukt ⑬) mit den Restriktionsenzymen HindIII und AscI und dem red Fermentas Puffer verdaut. Hierbei entstanden keine komplementären Überhänge, was eine Re-Ligation verhinderte. Um glatte DNA-Enden („blunt ends“) für die Re-Ligation herzustellen wurde der Vektor mit 10 U Klenow-Fragment für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Ligation der entstandenen „blunt ends“ mittels T4-DNA-Ligase. Somit bestanden die modifizierten BAR-Bodies jetzt, wie in Abbildung 22 gezeigt, aus der NRBI-BAR-Region und dem konstanten Teil der Schwereketten (CH1) gekoppelt an das modifizierte *Pseudomonas* Exotoxin A (ETA').

TGI *E. coli*-Bakterien wurden mit dem neuen Vektor (Abbildung 23, Konstrukt ⑮) transformiert. Die DNA der Bakterien wurde in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit den Primern CH1 3' und dem Primer NRBI AA1204-ApaLI-s amplifiziert. Die erfolgreiche Klonierung wurde in der Agarose-Gel-Elektrophorese kontrolliert (Abbildung 24). Durch die Bindung des NRBI-Primers an die Aminosäure 1204 zeigten die so generierten PCR-Produkte der drei Konstrukte unterschiedliche Größen (siehe Abbildung 13). Das PCR-Produkt des BAR-Body A hatte eine Länge von circa 500 bp, das von BAR-Body B von circa 400 bp und das von BAR-Body C von circa 300 bp.

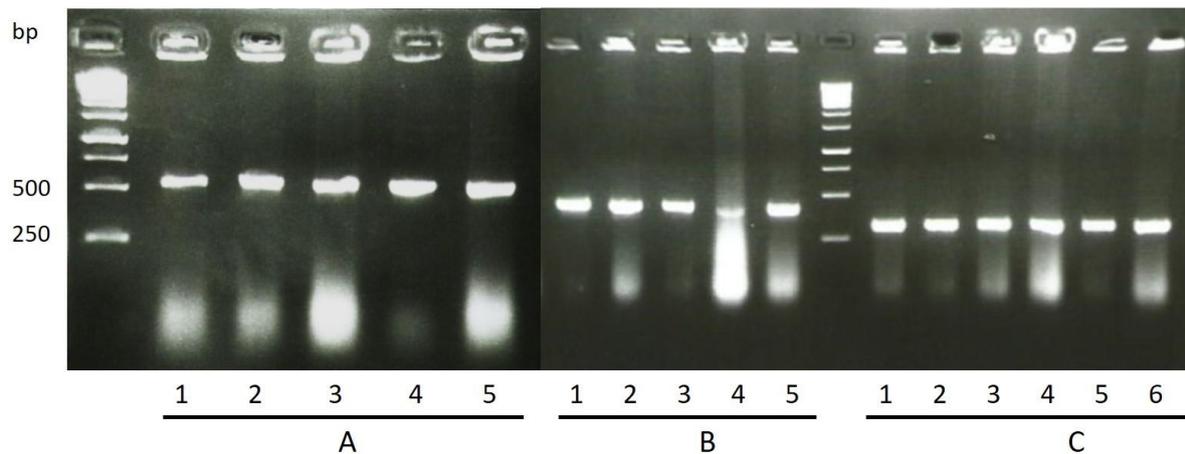


Abbildung 24: Agarose-Gel-Elektrophorese zur Kontrolle der erfolgreichen Klonierung der modifizierten Neurabin-BAR-Bodies in den pCES1-Vektor mit den Primern CH1 3' und NRBI AAI204-ApaLI-s.

2% Agarose-Gel. Ethydiumbromid-Färbung. Darstellung der Klone 1 - 5 des BAR-Body A, der Klone 1 - 5 des BAR-Body B und der Klone 1 - 6 des BAR-Body C. Die BAR-Bodies entsprechen den Konstrukten ⑮ in Abbildung 23.

Die so klonierten Konstrukte (Abbildung 23, Konstrukt ⑮) dienen als Expressionsklone der modifizierten BAR-Bodies. Zur Verdeutlichung sind die DNA- und Aminosäuresequenz des BAR-Body B in Abbildung 25 aufgeführt. Die Sequenzen der modifizierten BAR-Bodies A, B und C unterscheiden sich lediglich in der NRBI-BAR-Region (siehe Abbildung 7).

B M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M A N T W I T K A N
atgaaatacctatgtgcctacggcagccgctggattgttattactcgcggccagccggccatggccaacacatggattacaaaagcaaac

31 K R N P N P S S S S I F G R H S Q L M S V V W I Q E T N N F
aagagaaacccaaatccctcctcttcttcaatcttggagcattctcaactatgtctgtagtctggatccaagaaaccaataat

61 F F N D D F S P S S T S S A D L S G L G A E P K T P G L S Q
accctcaatgatgacttcagtcaccagcagtcaccagttcagcagacctcagcggcttaggagcagaacctaaaacaccagggtctctcag

91 S L A L S S D E I L D D G Q S P K H S Q C Q N R A V Q E W S
tccttagcactgtcatcagatgagatccttgatgatggacagtcctcccaaacacagtcagtgcaaatcggggcgttcaggaatggagt

121 V Q Q V S H W L M S L N L E Q Y V S E F G V T V S S A S T K
gtgcagcaggtttctcactggttaatgagcctaactctggagcagtatgtatctgaattcggggtcaccgtctcaagcgcctccaccaag

151 G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P
ggcccatcggctctccccctggcaccctcctccaagagcacctctggggcacagcggccctgggctgcctggtaacaggactacttcccc

181 E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S
gaaccggtagcgggtgctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtccacaccttcccggctgtcctacagtctcaggactctactcc

631 L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V
ctcagcagcgtagtgaccgtgcccctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaactgaatcacaagcccagcaaccaagggt

721 D K K V E P K S C A A A L E H H H H H H H H H H P G E G G S
gacaagaaagttgagcccaaatcttgtgcccgcgactcagcagcatcatcatcatcatcatcatcatcatcccggggagggcgccagc

811 L A A L T A H Q A C H L P L E T F T R H R Q P R G W E Q L E
ctggccgctgaccgagcaccaggcctgcccactgcccgtggagacttaccctgcatcgcagcgcgcccggctgggacaactggag

901 Q C G Y P V Q R L V A L Y L A A R L S W N Q V D Q V I R N A
cagtgccgctatccggtagcagcggctggtgcacctctacctggggcgcgactgtcatggaaccaggctgaccaggtgatccgcaacgcc

991 L A S P G S G G D L G E A I R E Q P E Q A R L A L T L A A A
ctggccagccccgagcggcggcaccctgggcaagcagatccgcgagcagcggagcaggcccgtctcgcgctgacctggccgcccgc

1081 E S E R F V R Q G T G N D E A G A A N A D V V S L T C P V A
gagagcagcgccttcgctccggcagggcaccggcaacgacagagcgggagcggccaacgcccagcgtggtgagcctgacctgcccggctcgc

1171 A G E C A G G P A D S G D A L L E R N Y P T G A E F L G D G G
gccggtgaaatgcgcccggcggcagcagcggcagcgcctgctggagcgaactatcccactggcgcggaggttccctcggcagcggcggc

1261 D V S F S T R G T Q N W T V E R L L Q A H R Q L E E R G Y V
gagtcagcttcagcaccggcggcagcagaaactggacggtagcggctgctccagcgcaccgccaactggaggagcgggctatgtg

1351 F V G Y H G T F L E A A Q S I V F G G V R A R S Q D L D A I
ttcgtcggctaccacggcaccttctcgaagcggcgaagcagatcgtctcggcggggtgcccgcgcgagccaggacctcagcgcgatc

1441 W R G F Y I A G D P A L A Y A Y A Q D Q E P D A R G R I R N
tggcgcgggtttctatatcgccggcagatccggcgtggcctacgcctacgccagaccaggaaccgacgcagcggcggatccgcaac

1531 G A L L R V Y V P R S S L P G F Y R T S L T L A A P E A A G
ggtgcctgctcggggtctatgtcccgcctctagcctgcccggcttctaccgaccagcctgacctggcgcgcccggaggcggcggc

1621 E V E R L I G H P L P L R L D A I T G P E E E G G R L E T I
gaggtcgaacggctgatcggccatccgctgcccgtgcccctggacgccatcaccggccccgaggaggaagggggcgcctggagaccatt

1711 L G W P L A E R T V V I P S A I P T D P R N V G G D L D P S
ctcggctggcgcgtggccgagcagcaccgtggtgattccctcggcagatccccaccgaccgcgcaactcggcggcagacctcagaccgctc

1801 S I P D K E Q A I S A L P D Y A S Q P G K P P R E D L K
agcatccccgacaaggaacaggcagatcagcgcctgcccgactacgccagccagcccggcaaacggcgcgagggacctgaagtaa

Abbildung 25: Darstellung der DNA- und Aminosäuresequenz des BAR-Body B.

Signalsequenz

Restriktionsschnittstellen

Neurabin I AA1168 – 1285 (NRBI-Epitop (AA1204 - 1250) + angrenzende Region)

Konstanter Bereich der Schwerkette (CH1)

His-Tag

ETA

4.4.6. Produktion der modifizierten BAR-Bodies

Die Produktion der BAR-Bodies wurde für die Klone 1 – 3 der BAR-Bodies A und B sowie für einen Klon (Klon 4) des BAR-Body C fortgeführt. Induktion, Elution und Lyse erfolgte wie im Abschnitt 4.4.2. bereits beschrieben. Die Expression der neuen Konstrukte in TGI E. coli-Bakterien (Abbildung 23, Schritt ⑯) wurde im Westernblot (Abbildung 23, Schritt ⑰) kontrolliert. Die Detektion des Konstruktes erfolgte mittels murinem Penta-His-Antikörper und HRP-konjugiertem Anti-Maus-Antikörper. Der Westernblot zeigte eine Proteinbande bei circa 100 kDa, was der theoretischen Größe des NRBI-BAR-Body entspricht.

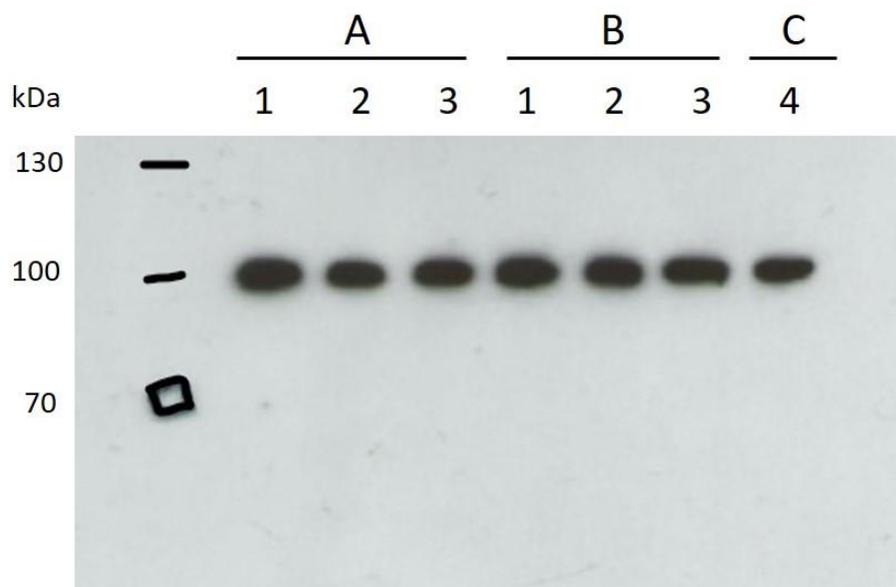


Abbildung 26: Westernblot zum Nachweis der modifizierten BAR-Bodies nach Expression in TGI E. coli-Bakterien.

Darstellung des BAR-Body A mit den Klonen 1 - 3, des BAR-Body B mit den Klonen 1 - 3 und des BAR-Body C mit dem Klon 4.

Im „Photometer Gene Quant pro“ (Amersham plc) wurde die Konzentration der hergestellten BAR-Bodies gemessen, woraus sich die in Tabelle 13 dargestellte absolute Menge der BAR-Bodies berechnen ließ. Die Menge der angeimpften Kulturen betrug 4 ml und das daraus gewonnene Volumen an gereinigten BAR-Bodies 200 µl. Der Klon 1 des BAR-Body A wies eine ungültige Konzentration auf und wurde deshalb für die weitere Arbeit verworfen.

Tabelle 13: Konzentration und absolute Menge der modifizierten BAR-Bodies

| BAR-Body | Konzentration (mg/ml) | Absolute Menge (µg) |
|--------------------|------------------------------|----------------------------|
| BAR-Body A, Klon 2 | 0,010 | 2,0 |
| BAR-Body A, Klon 3 | 0,004 | 0,8 |
| BAR-Body B, Klon 1 | 0,025 | 5,0 |
| BAR-Body B, Klon 2 | 0,018 | 3,6 |
| BAR-Body B, Klon 3 | 0,014 | 2,8 |
| BAR-Body C, Klon 4 | 0,010 | 2,0 |

4.4.7. Funktionelle Testung der modifizierten BAR-Bodies

4.4.7.1. Bindungs-Assay

Um die Bindung der produzierten NRBI-BAR-Bodies an NRBI-reaktiven B-Zell-Rezeptoren zu testen, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt. Hierbei erfolgte der Nachweis der BAR-Bodies über das integrierte His-Tag und einen an Allophycocyanin gekoppelten Anti-His-Antikörper. Wie bereits im Abschnitt 4.4.3. beschrieben wurden für die Bindungs-Assays Zellen der DLBCL-Zelllinie OCI-Ly3 mit einem NRBI-reaktiven B-Zell-Rezeptor transfiziert, dessen Expression über die Zugabe von Doxycyclin (1 µg/ml) reguliert wurde. Die so transfizierten Zellen werden OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen genannt. Die Auswertung erfolgte über „WinMDI Software“.

Von allen getesteten Konstrukten konnte lediglich für den Klon 2 des NRBI-BAR-Body B eine Bindung an den OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen gezeigt werden. Diese Bindung war erst nach Anschalten der Expression des NRBI-reaktiven B-Zell-Rezeptors durch die Zugabe von Doxycyclin (Tet-on) nachweisbar, was die Bindung an den NRBI-spezifischen B-Zell-Rezeptor beweist. Bei dem BAR-Body B handelt es sich um das BAR-Body, dessen Epitopregion mittig in der BAR-Region der Schwereketten enthalten ist (siehe Abbildung 7 und 8). Als Positivkontrolle diente das Neurabin I-BAR-Toxin, das sich aus dem reinen Epitop von NRBI gekoppelt an das modifizierte Pseudomonas aeruginosa Exotoxin A zusammensetzt (NRBI-ETA').

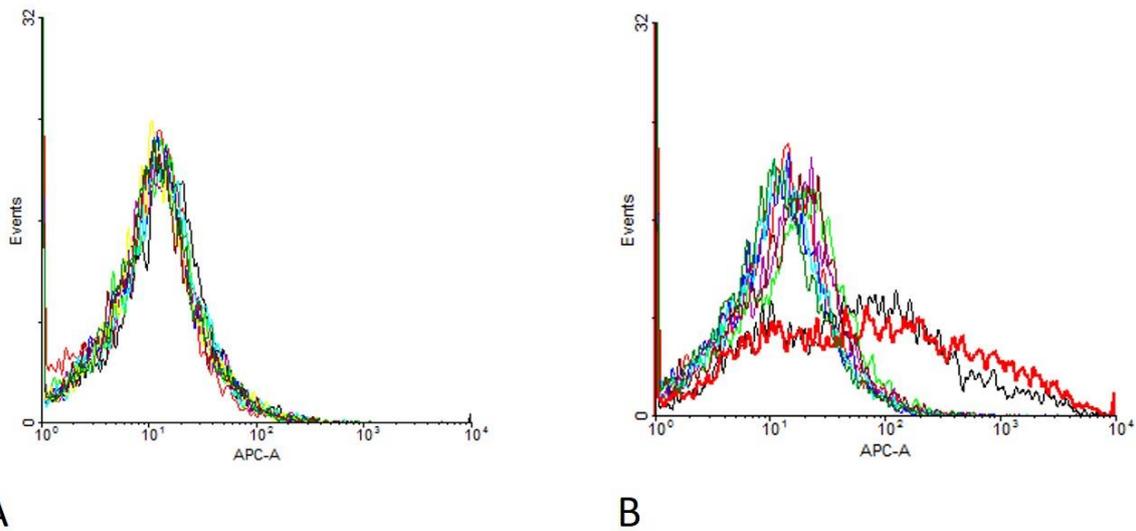


Abbildung 27: Bindungs-Assay der OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen mit den modifizierten BAR-Bodies.

Dargestellt sind Zellen ohne NRBI-BZR-Induktion (A) und Zellen nach Induktion des NRBI-BZR durch Doxycyclin (1 µg/ml) (B). Die dünne rote Kurve stellt die Negativkontrolle mit Zellen ohne Kontakt zu einem BAR-Body und somit die Autofluoreszenz der Zellen dar. Die schwarze Kurve stellt die Positivkontrolle NRBI-ETA' (linearisiertes NRBI-Epitop gekoppelt an ETA') dar. Die dicke rote Kurve in Abbildung B repräsentiert die Bindung des BAR-Body B, Klon 2, an die Lymphomzellen. Alle anderen in dieser Arbeit hergestellten BAR-Bodies sind in den übereinander liegenden farbigen Kurven dargestellt und zeigen keine Bindung an die Lymphomzellen.

BAR-Body B, Klon 2, wurde anschließend in einer größeren Kultur (50 ml) für die nachfolgenden Experimente neu induziert. Es wurden 337,6 µg des BAR-Body B, Klon 2, produziert.

Im Westernblot konnte erneut eine Bande bei circa 100 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 28).

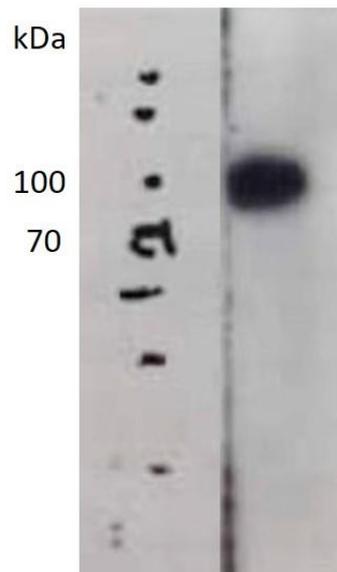


Abbildung 28: Westernblot zur Kontrolle der Expression des Konstruktes B, Klon 2, in den TGI *E. coli*-Bakterien.

Die Bindung des BAR-Body B, Klon 2, an die OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen wurde in einem weiteren Bindungs-Assay bestätigt (Abbildung 29). Als Negativkontrolle diente ein vorliegendes BAR-Toxin-Konstrukt des fremden Antigens MAZ gekoppelt an das Toxin ETA' (MAZ-ETA'). Die OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen haben keine MAZ-spezifischen B-Zell-Rezeptoren, so dass die Negativkontrolle keine Bindung an diesen Lymphomzellen zeigen sollte.

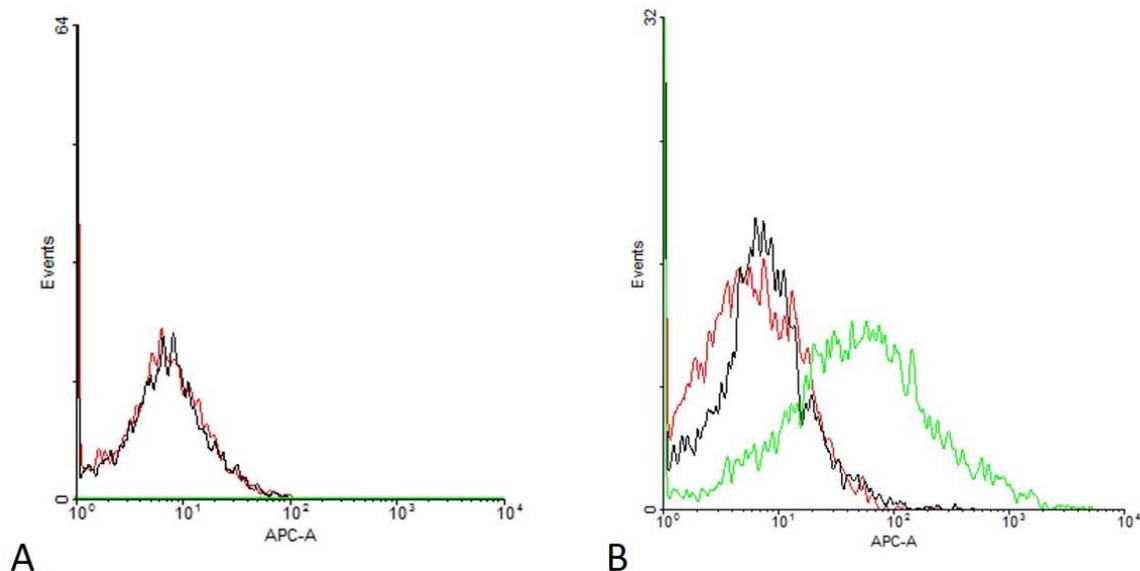


Abbildung 29: Bindungs-Assay des BAR-Body B, Klon 2, nach Inkubation mit OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen.

Dargestellt sind die Bindung des NRBI-BAR-Body an OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen ohne Expressionsinduktion des NRBI-BZR mittels Doxycyclin (A) und nach Induktion des NRBI-BZR (B). Die rote Kurve stellt die Leerkontrolle dar und zeigt die Autofluoreszenz der Zellen ohne Inkubation mit einem BAR-Body. Die schwarze Kurve zeigt eine weitere Negativkontrolle, nämlich die Inkubation mit dem an ETA‘ gekoppelten Antigen MAZ (MAZ-ETA‘). Die grüne Kurve zeigt die Inkubation mit dem NRBI-BAR-Body B, Klon 2, welches nach Induktion des NRBI-spezifischen BZR (B) an die OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen bindet.

4.4.7.2. Internalisierungs-Assay

Ein Internalisierungs-Assay wurde zur Überprüfung der Aufnahme des BAR-Body in Lymphomzellen mit NRBI-reaktivem B-Zell-Rezeptor durchgeführt. Dafür wurde zunächst mit einer ersten Färbung die Bindung des BAR-Body an den Oberflächen-BZR der rekombinanten OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen überprüft und im Anschluss eine intrazelluläre Färbung zum Nachweis der internalisierten BAR-Bodies durchgeführt.

Für die Oberflächenfärbung wurden OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen mit dem BAR-Body B, Klon 2, und als Negativkontrolle mit MAZ-ETA‘, inkubiert. Alle Proben wurden auf Eis gelagert, sodass die Internalisierung der BAR-Bodies verzögert wurde. Durch einen Waschschrift mit PBS wurden alle ungebundenen BAR-Bodies entfernt. Für die Messung im „BD FACS Canto Flow Cytometer“ wurden die Proben mit einem Anti-His-Antikörper gekoppelt an Allophycocyanin (APC) inkubiert. So konnte gezeigt werden, dass das BAR-Body B, Klon 2, sich auf der Oberfläche der getesteten Lymphomzellen

befand. MAZ-ETA‘ konnte nicht auf der Oberfläche der OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 30).

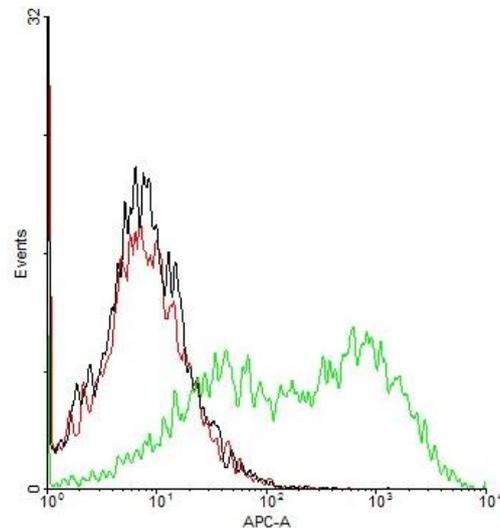


Abbildung 30: Oberflächenfärbung der OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen.

Durchflusszytometrische Messung. Bei den OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen wurde die Induktion des NRBI-spezifischen B-Zell-Rezeptors vor der Testung mittels Doxycyclin (1 µg/ml) aktiviert (Tet-on). Die grüne Kurve zeigt das vorhandene BAR-Body B, Klon 2, auf der Oberfläche der Zellen. Die rote Kurve zeigt eine Negativkontrolle bei der die OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen nicht mit einem BAR-Body inkubiert wurden. Die schwarze Kurve repräsentiert OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen, die mit einer weiteren Negativkontrolle, dem Antigen MAZ gekoppelt an ETA‘ (MAZ-ETA‘), inkubiert wurden. Die B-Zell-Rezeptoren der OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen zeigen keine Bindungsaffinität gegen das Antigen MAZ.

Für das Internalisierungs-Assay wurden analog zur Oberflächenfärbung drei Versuche mit OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen angesetzt, wobei der erste als Leerkontrolle diente, der zweite die Inkubation mit dem BAR-Body B, Klon 2, zeigte und der dritte als Negativkontrolle die Inkubation mit dem Kontrollantigen MAZ (MAZ-ETA‘) zeigte. Die Inkubation der Proben für 30 min auf Eis ermöglichte die Bindung des BAR-Body an die B-Zellen. Nach einem Waschschrift, der alle ungebundenen BAR-Bodies entfernt hat, wurden die Proben für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, wodurch die Internalisierung des BAR-Body ins Innere der Lymphomzellen ermöglicht wurde. Im Anschluss wurden die Zellen mit 2% Paraformaldehyd fixiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen mit Saponin permeabilisiert. Für die Messung im „BD FACS Canto Flow Cytometer“ wurden die Zellen mit einem Anti-His-Antikörper, der an den Fluoreszenzfarbstoff Allophycocyanin (APC) gekoppelt ist, für 30 min auf Eis inkubiert. Durch Saponin werden die

Ionenkanäle der Zelle geöffnet, was die Passage des sekundären Antikörpers ins Innere der Zellen und die Markierung der internalisierten BAR-Bodies ermöglicht. Die Auswertung der Messung erfolgte mit der „WinMDI Software“ und zeigte eine Internalisierung des BAR-Body B, Klon 2, in die OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen.

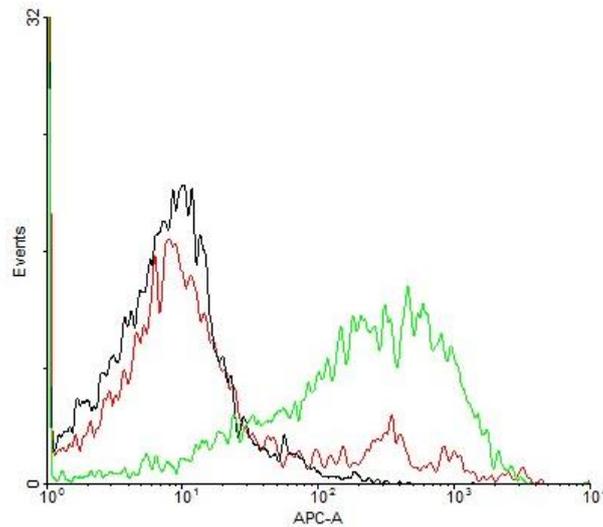


Abbildung 31: Internalisierungs-Assay an den OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen mit induziertem NRBI-BZR.

Durchflusszytometrische Messung. Die grüne Kurve, welche die Inkubation der Zellen mit dem BAR-Body B, Klon 2, repräsentiert, zeigt die Internalisierung des Konstruktes ins Innere der Lymphomzellen. Die rote Kurve, Zellen ohne Kontakt zu einem BAR-Body, sowie die schwarze Kurve, Zellen inkubiert mit der Negativkontrolle (MAZ-ETA'), zeigen keine Internalisierung in die OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen.

4.4.7.3. Zytotoxizitäts-Assay

Auf einer 96-Well-Platte wurden 5000 Zellen pro Well angesetzt, entsprechend der Konzentration der OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zell-Kulturen. Die Zellen wurden in drei Ansätzen einmal mit RPMI-1640, einmal mit der Negativkontrolle MAZ-ETA' und einmal mit dem hergestellten BAR-Body B, Klon 2, inkubiert. Es wurde weiterhin eine Minimallyse mit dem Zellmedium RPMI-1640 und eine Maximallyse mit RPMI-1640 und 0,5%-Triton-X angesetzt.

Nach Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ über Nacht wurden die Proben mit dem „Cytotoxicity Detection Kit PLUS (LDH)“ von Roche behandelt, wodurch die von getöteten Zellen freigesetzte Lactatdehydrogenase (LDH) mittels Farbumschlag gemessen werden konnte. Die Messung der Absorption bei 490 nm erfolgte im „Wallac Victor 2, 1420 Multilabel Counter“ (Perkin Elmer). Bei der

Auswertung zeigte sich eine spezifische Lyse von maximal 1% bei den OCI-Ly3-Zellen ohne induzierten B-Zell-Rezeptor, sowie bei den Zellen mit induziertem, NRBI-spezifischem B-Zell-Rezeptor, die nur mit Zellmedium oder mit dem Kontrollantigen MAZ-ETA‘ behandelt wurden. Die spezifische Lyse der OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen nach Inkubation mit dem BAR-Body B, Klon 2, ist in Tabelle 14 sowie in Abbildung 32 dargestellt. Die rekombinante Zelllinie, die einen NRBI reaktiven BZR exprimiert, zeigt eine deutliche Zytotoxizität nach Behandlung mit dem NRBI-BAR-Body. Diese ist spezifisch, da die Zytotoxizität nur nach Inkubation mit dem NRBI-BAR-Body und nicht mit der Negativkontrolle MAZ-ETA‘ nachgewiesen werden kann.

Aus den gemessenen Werten lässt sich die lineare Regressionskurve für die spezifische Lyse des BAR-Body B, Klon 2, bestimmen. Man erkennt, dass die spezifische Lyse abhängig von der Konzentration des BAR-Body ist. Dies wird bestätigt durch den Korrelationswert R^2 von 0,9955, welcher eine hohe Korrelation zwischen der Konzentration und der Zelltoxizität angibt. Mit steigender Dosis des BAR-Body steigt auch die spezifische Zytotoxizität. Die positive Steigung der Regressionsgeraden gibt an, dass die Wirkung, also die Zelllyse, von der Konzentration abhängig ist. Die Effektivdosis (ED) gibt die Menge an verabreichtem Wirkstoff an, bei dem eine bestimmte Effektivität erreicht wird. Die ED_{50} gibt die Konzentration an, bei der eine spezifische Lyse von 50% erreicht wird und beträgt für das BAR-Body B, Klon 2, 1,80 $\mu\text{g/ml}$.

Tabelle 14: Zytotoxizitäts-Assay

| Konzentration des BAR-Body B, Klon 2 ($\mu\text{g/ml}$) | Spezifische Lyse (%) |
|---|-----------------------------|
| 10 $\mu\text{g/ml}$ | 94% |
| 5 $\mu\text{g/ml}$ | 77% |
| 2,5 $\mu\text{g/ml}$ | 55% |
| 1,25 $\mu\text{g/ml}$ | 32% |

Konzentrationsabhängige, spezifische Lyse der OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen nach Inkubation mit dem NRBI-BAR-Body B, Klon 2.

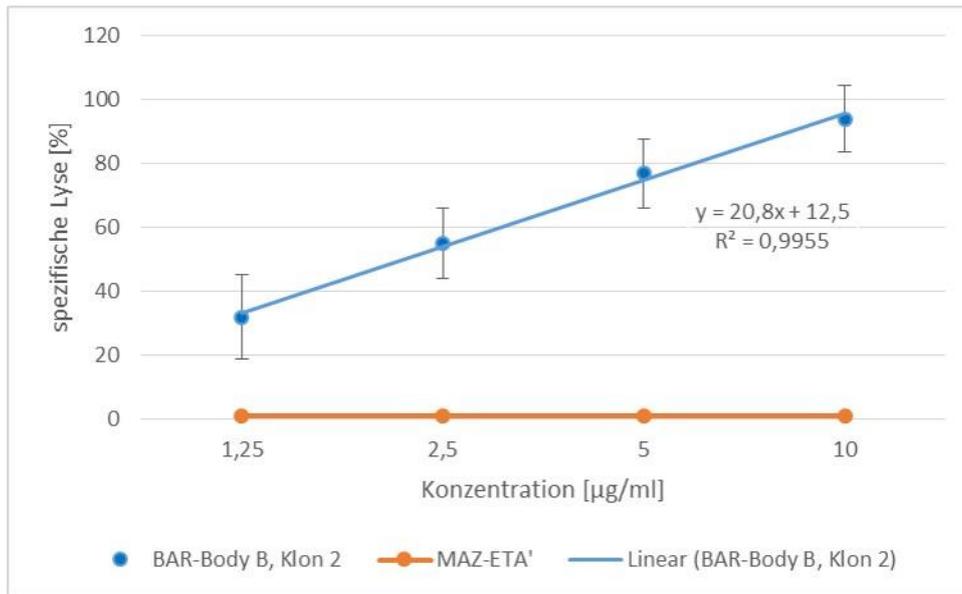


Abbildung 32: Graphische Auswertung des Zytotoxizitäts-Assays.

Darstellung der spezifischen Lyse der OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen nach Inkubation mit den BAR-Bodies in Abhängigkeit von der Konzentration der verwendeten Konstrukte. Blau: lineare Regressionsgerade nach Inkubation der Zellen mit dem BAR-Body B, Klon 2. Korrelationswert (R^2) = 0,9955. Orange: Inkubation der Zellen mit der Negativkontrolle MAZ-ETA'.

5. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und die in vitro Testung eines Konstruktes für die potenzielle Behandlung des primären ZNS-Lymphoms (PZNSL).

Ohne Therapie hat das PZNSL eine sehr schlechte Prognose mit einer medianen Überlebenszeit von nur ein bis zwei Monaten und trotz Hochdosischemotherapie kommt es bei circa 50% der Patienten zu Rezidiven.^{4, 7, 56} In den letzten Jahren wurden unterschiedliche Therapieverfahren umgesetzt, die zu einer Verbesserung der Prognose mit einer Steigerung des medianen Überlebens von 12,5 Monaten in den 1970er Jahren auf 26 Monate in den 2010er Jahren geführt haben.^{23, 39} Die Inzidenz des PZNSL beträgt zurzeit 0,5 / 100.000 Einwohner, wobei die Häufigkeit bei Patienten über dem 65. Lebensjahr deutlich zunimmt. Ältere Patienten können aufgrund der Intensität der neueren Therapieprotokolle jedoch nur eingeschränkt von diesen profitieren. Das Überleben der Patienten über 70 Jahren blieb in den letzten 40 Jahren unverändert mit einem medianen Überleben nach Therapie von 7 - 19 Monaten, was weitestgehend unabhängig von der durchgeführten Behandlung war.^{39, 56}

Durch alleinige Steroid-Therapie konnte eine Regression sowohl der Klinik, als auch der Größe der zerebralen Läsionen bei 40 - 80% der Patienten festgestellt werden.^{36, 50} Es kam jedoch bei den meisten Patienten nach der ersten Remission erneut zu Rezidiven, so dass nur in wenigen Einzelfällen eine Langzeit-Remission erreicht werden konnte.

Die aktuelle Erstlinien-Therapie bei der Behandlung eines primären ZNS-Lymphoms besteht aus systemischer Chemotherapie. Die bei der Behandlung von systemischen Lymphomen angewendeten Chemotherapeutika sind für die Therapie des PZNSL ineffektiv, da diese die Blut-Liquor-Schranke nicht passieren können. Beim PZNSL müssen die Chemotherapeutika zu den hochproliferativen Lymphomzellen im zentralen Nervensystem gelangen. Dafür müssen sie die Blut-Liquor-Schranke überqueren können. Methotrexat (MTX) gehört zu den liquorgängigen Chemotherapeutika und wird bei der Therapie des PZNSL als Hochdosis-MTX (> 3 g/m² KOF) eingesetzt. Als Monotherapeutikum zeigt es eine gute Verträglichkeit mit einer moderaten Toxizität (WHO Grad III) bei unter 10% der behandelten Patienten. Eine komplette Remission mit Hochdosis-MTX (HD-MTX) als Monotherapie kann bei 30 - 40% der Patienten erreicht werden.^{25, 28}

Durch die Kombination der Hochdosis-MTX-basierten Chemotherapie mit weiteren liquorgängigen Chemotherapeutika, wie zum Beispiel Hochdosis-Cytosinarabinosid (HD-AraC), Thiotepa oder Ifosfamid, konnte das Lang-Zeit-Überleben verbessert werden.¹⁸ Jedoch geht die kombinierte Chemotherapie mit einem erhöhten Risiko für schwerwiegende Infektionen und Toxizität einher, wobei die Therapie-assoziierte Mortalität im Vergleich zu der HD-MTX-Monotherapie unverändert blieb.⁶ Durch die Einführung des CD20-Antikörpers Rituximab in Kombination mit der HD-MTX-basierten Chemotherapie konnte ein verbessertes Therapie-Ansprechen festgestellt werden.²⁵ Die IELSG32 (International Extranodal Lymphoma Study Group-32) hat in einer randomisierten Phase 2 Studie die

verbesserte Gesamt-Remissions-Rate durch die Kombination aus Chemotherapie und Immuntherapie mit Methotrexat, Cytosinarabinosid, Thiotepa und Rituximab (MATRix Kur) hervorgehoben.¹⁹ Es traten unter der Therapie mit Rituximab vermehrt hämatologische Nebenwirkungen auf, signifikante Unterschiede bezüglich schwerwiegenden infektiösen Komplikationen oder der Therapie-assoziierten Mortalität bestanden nicht.

Ein weiterer Therapieansatz für die Behandlung des primären ZNS-Lymphoms ist die Radiotherapie. Im Gegensatz zu der Behandlung von extranodalen Non-Hodgkin-Lymphomen außerhalb des ZNS muss für die Therapie des PZNSL durch alleinige Bestrahlung mit einem schlechteren lokalen Tumorrückgang sowie einem reduzierten Gesamtüberleben gerechnet werden. Die perkutane fraktionierte Ganzhirn-Bestrahlung mit Dosen über 40 Gy führt nur bei etwa 40% der Patienten zu einer kompletten Remission. Die Rezidiv-Rate ist sehr hoch mit einem medianen Überleben unter einem Jahr.⁴⁵ Durch die Kombination der Radiotherapie mit einer kombinierten Chemotherapie kann eine verbesserte Tumorkontrolle erzielt werden. Prospektive Studien zeigen eine Verbesserung des medianen Überlebens auf 31 - 90 Monate.^{13, 25, 40} Die Neurotoxizität der Bestrahlung stellt jedoch ein sehr großes Problem dar und kann noch Monate bis Jahre nach der Behandlung weiterbestehen. So kommt es häufig zu Leukenzephalopathien und kortikalen oder subkortikalen Atrophien. Diese können in einigen Fällen zu schweren kognitiven Defiziten sowie zu Pflegebedürftigkeit führen. Fünf Jahre nach Bestrahlung lassen sich Zeichen der Neurotoxizität bei 12 - 65% der Patienten feststellen. Die Bestrahlung-assoziierte Mortalitätsrate beträgt 16 - 66% und ist vor allem bei Patienten über dem 60. Lebensjahr erhöht.^{13, 40} In einer randomisierten Phase III-Studie konnte die Ganzhirnbestrahlung als Konsolidierungstherapie zu keiner Verbesserung des Gesamtüberlebens im Vergleich zur HD-MTX-basierten Chemotherapie führen.⁶⁰ Dementsprechend bleibt die Rolle der Ganzhirnbestrahlung unklar und sollte nicht routinemäßig verwendet werden, sondern erst nach Ausschöpfung anderer Therapieverfahren sowie bei Kontraindikationen für systemische Chemotherapie.²⁵

Es gibt aktuell keine evidenzbasierte Standardtherapie, die das Vorgehen bei der Behandlung eines an einem PZNSL-erkrankten Patienten auf der Basis wissenschaftlich gestützter Erkenntnisse vorgibt. Der Großteil der Therapie-Empfehlungen basiert auf retrospektiven und nur wenigen prospektiven Studien.²³

Konventionelle Chemotherapien und auch die Ganzhirnbestrahlung gehen mit starken Nebenwirkungen einher, die während der Therapie aber auch noch Jahre nach erfolgreicher Therapie auftreten können.^{19, 23, 24} Schlussfolgernd kann man sagen, dass die momentane Standardtherapie, die aus ZNS-gängigen Chemotherapeutika und dem CD20-Antikörper Rituximab besteht, einen Teil der Patienten heilen kann, diese jedoch mit starken Nebenwirkungen und einem hohen Risiko für bleibende ZNS-Schäden und Zweitmalignome einhergeht. Da außerdem etwa 60% der Patienten primär therapierefraktär sind oder nach Erstlinientherapie rezidivieren^{23, 29, 34}, zeigt sich die Notwendigkeit für neue Therapieansätze des primären ZNS-Lymphoms, die gut wirksam und nebenwirkungsarm sind.⁴

Neben den klassischen Therapieformen der Chirurgie, der Radiotherapie und der Chemotherapie wird die Immuntherapie in der Onkologie immer häufiger erfolgreich angewendet. Seit der EU-Zulassung des CD20-Antikörpers Rituximab im Jahre 1998 ist dieser heute in der Behandlung maligner B-Zell-Erkrankungen unabdingbar.^{15, 48, 51} Mit ihm wurde eine neue Ära der Therapie in der Onkologie und auch in der Therapie der Lymphome eingeleitet. Neben dem CD20-Antigen wurden weitere Epitopregionen auf der Oberfläche von Lymphomen identifiziert, die als potenzielle Ziele für monoklonale Antikörper dienen können.^{41 59, 62} Monoklonale Antikörper können die Lymphomzellen über unterschiedliche Wege eliminieren, zum Beispiel über Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC), Komplement-abhängige Zytotoxizität, direkten Zelltod oder indem sie Mechanismen zur Umgehung der Immunantwort entgegenwirken (zum Beispiel Checkpoint-Inhibitoren⁴³).⁵⁷

Mittlerweile finden auch Abwandlungen des klassischen Antikörperformats Anwendung in der Therapie von malignen Erkrankungen. BiTEs („bispecific T-cell engagers“)² sind bispezifische monoklonale Antikörper, welche ausschließlich die variablen Domänen von zwei Antikörpern enthalten, die über ein Verbindungsmolekül verknüpft sind. Ein aktuell erfolgreich in der Therapie von akuten lymphatischen Leukämien und B-Zell-Lymphomen eingesetzter bispezifischer Antikörper ist Blinatumomab.³⁰ Eine der beiden variablen Antikörper-Domänen bindet an den B-Zell-Marker CD19, während die zweite Domäne gegen das CD3-Antigen, das auf allen T-Zellen vorkommt, gerichtet ist. Auf diese Weise werden zytotoxische T-Zellen in die direkte Nähe von CD19 positiven B-Lymphomzellen gebracht was zu einer Aktivierung der T-Zellen und Lyse der B-Zellen führt.

Eine weitere Therapieoption stellen CAR T-Zellen dar.^{9, 54} Hier kommt es zur Transplantation von autologen T-Zellen, die einen genetisch modifizierten T-Zell Rezeptor (chimärer Antigen-Rezeptor; CAR), welcher spezifisch ein Tumorepitop erkennt, exprimieren. Als Erkennungsmolekül des in die T-Zellen transfizierten chimären Rezeptors wird ebenfalls die variable Region eines Antikörpers mit der gewollten Spezifität verwendet. T-Zellen, die mit einem CAR transfiziert wurden, der CD19 erkennt, können als sehr effektive Therapie von B-Zell-Lymphomen und akuten lymphatischen Leukämien eingesetzt werden.^{9, 17, 54}

Diese unterschiedlichen Formen der Immuntherapie werden zwar erfolgreich bei B-Zell-Lymphomen angewendet, haben jedoch einen bedeutenden Nachteil. Die Antigene CD20 oder CD19, die in den meisten Fällen als Ziel der Antikörper basierten Therapien verwendet werden, befinden sich auf allen reifen B-Lymphozyten und auch auf den meisten B-Zell-Vorläuferstufen. Somit werden alle reifen B-Zellen und viele B-Zell-Vorläuferstufen eines Patienten angegriffen und nicht nur die malignen Lymphomzellen. Es kommt dementsprechend zu einer langanhaltenden B-Zell-Depletion mit erhöhter Infektanfälligkeit.

Durch die Entdeckung der BARs („B-cell receptor antigens for reverse targeting“) von Pfreundschuh et al.⁴⁹ gibt es nun eine neue Möglichkeit spezifisch maligne B-Zell-Klone zu erkennen, indem

ausschließlich der B-Zell-Rezeptor maligner B-Lymphozyten über deren natürliches Antigen (BARs, siehe Abschnitt 2.3) als Zielstruktur dient. So werden nur die malignen Lymphomzellen aber nicht die gesunden, reifen B-Lymphozyten angegriffen. Für das PZNSL wurde herausgefunden, dass bei etwa 67% der Patienten das Antigen Neurabin I von den B-Zell-Rezeptoren auf der Oberfläche der Lymphomzellen erkannt wird.^{49, 61} Es wird vermutet, dass chronische Stimulation der B-Zell-Rezeptoren primärer ZNS-Lymphome durch das Antigen Neurabin I eine Rolle in der Pathogenese dieser Lymphomentität spielt. Durch die Kopplung von BARs an eine toxische Wirkungskomponente können die malignen B-Lymphozyten mit dem BAR-spezifischen B-Zell-Rezeptor gezielt angegriffen werden. Durch die Bindung an den spezifischen B-Zell-Rezeptor, welcher sich ausschließlich auf den Lymphomzellen befindet, können gezielt die malignen Zellen angegriffen werden, während die gesunden B-Lymphozyten nicht geschädigt werden. Dieses Vorgehen ermöglicht es theoretisch die Nebenwirkungen im Vergleich zu der klassischen Chemotherapie, welche alle schnell teilenden Zellen angreift, oder zu der Immuntherapie, die sich gegen Oberflächenstrukturen wie CD20 und CD19, welche sich auf allen reifen B-Zellen befinden, stark zu reduzieren. Somit ist dieser Therapieansatz sehr spezifisch und potentiell nebenwirkungsarm.

Eine Möglichkeit das ZNS-Lymphom-Antigen Neurabin I in ein neues Therapiekonzept umzusetzen ist die Integrierung von Neurabin I in ein Antikörperformat. Bei dem Antikörperformat handelt es sich um ein bereits erfolgreich getestetes und etabliertes Therapieformat. Dieses neue Therapieformat wurde BAR-Body genannt. Der Fc-Teil des Antikörpers wird für die Testung der Bindung des BAR-Body an Lymphomzellen mit NRBI-reaktiven B-Zell-Rezeptor nicht benötigt, so dass Neurabin I lediglich in Antikörperfragmente (Fab-Fragmente, siehe Abschnitt 2.4) integriert wurde. Für die Bindung des BAR-Body an den B-Zell-Rezeptor der Lymphomzellen wurde NRBI in die variable Domäne der Schwer- und Leichtkette eines Fab-Fragmentes kloniert.

Für das primär hergestellte Fab-Fragment, das aus einer schweren und leichten Kette bestand, konnte keine Bindung an Lymphomzellen gezeigt werden, die mit einem rekombinanten NRBI-reaktiven B-Zell-Rezeptor transfiziert waren. Die Ursachen für diese fehlende Bindung sind nicht bekannt. Unter anderem kann sie durch eine mögliche Interaktion zwischen den NRBI-Epitopregionen der Schwer- und der Leichtkette bedingt sein. Bei der Faltung der Neurabin I-Epitopregion kann es zur sterischen Hinderung kommen, so dass die räumliche Ausdehnung eine Bindung an den NRBI-spezifischen BZR verhindert. Des Weiteren kann es durch die nahe aneinander liegenden NRBI-BAR-Regionen zu elektrostatischen Interaktionen kommen. Auch in diesem Fall wäre keine Bindung des NRBI-Epitops an den spezifischen B-Zell-Rezeptor mehr möglich.

Um diese vermuteten sterischen Hindernisse zu umgehen wurde ein neues Format für das BAR-Body entwickelt, das nur noch aus der Schwerekette besteht und somit auch nur eine Antigen-Bindungsstelle besitzt. Analog zum vorherigen Konstrukt wurde die Bindung an Lymphomzellen mit NRBI-reaktivem B-Zell-Rezeptor getestet.

Einer der getesteten monovalenten BAR-Body Klone (Typ B, siehe Abbildung 7) zeigte Bindungsaktivität an Zellen mit rekombinantem NRBI-reaktivem B-Zell-Rezeptor. Bei diesem BAR-Body befand sich das NRBI-Epitop mittig in der Sequenz der variablen Domäne (BAR-Body B, Klon 2).

Um das therapeutische Potential des BAR-Body zu testen, wurde das Konstrukt an das modifizierte *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (ETA') als Wirkkomponente gekoppelt. Das Konstrukt sollte nach Bindung an den NRBI-reaktiven B-Zell-Rezeptor der Lymphomzellen internalisiert werden woraufhin ETA' intrazellulär freigesetzt wird und seine zytotoxische Wirkung entfalten kann. Durchflusszytometrisch konnte sowohl die Bindung an den NRBI-reaktiven B-Zell-Rezeptor auf der Oberfläche der Lymphomzellen, als auch die Internalisierung des abgewandelten BAR-Body nachgewiesen werden. Mittels Zytotoxizitäts-Assay konnte gezeigt werden, dass es nach Internalisierung des BAR-Body zur Lyse der Lymphomzellen kommt. Eine Erhöhung der Konzentration des BAR-Body führte dabei zu einer verstärkten Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH) aus den Lymphomzellen, was einer gesteigerten Zytotoxizität entspricht. Das modifizierte BAR-Body-Konstrukt konnte somit erfolgreich in vitro an Lymphomzellen mit einem NRBI-reaktiven BZR getestet werden und zeigte eine ED₅₀-Dosis von 1,80 µg/ml.

Dies zeigt, dass das BAR-Body-Format prinzipiell als BAR-Therapieformat geeignet ist. In einem nächsten Schritt kann nun die Funktion des Konstruktes in vivo getestet werden. Die gängige Vorgehensweise ist ein Mausmodell, bei dem immunsupprimierten Mäusen ZNS-Lymphomzellen injiziert werden, diese zu einem Lymphom anwachsen und anschließend mit dem BAR-Body therapiert werden. Unter anderem durch die Auswertung des Ansprechens der künstlichen Lymphome auf die Therapie kann die Wirksamkeit des BAR-Body untersucht werden. Sollten diese Versuche erfolgreich sein könnte eine klinische Studie aufgesetzt werden. Da es sich bei dem primären ZNS-Lymphom um eine seltene Erkrankung handelt wird die Durchführung einer prospektiven Therapiestudie mit einer ausreichenden Patientenzahl eine Herausforderung darstellen.¹

Bevor die Anwendung am Menschen überhaupt erwogen werden kann müsste das hier beschriebene BAR-Body eukaryotisch hergestellt werden, da die Gefahr schwerer Immunreaktionen auf prokaryotisch hergestellte Proteine besteht.

Eine weitere Herausforderung stellt das Auftreten des PZNSL im zentralen Nervensystem dar. Damit unterscheidet sich das primäre ZNS-Lymphom von den anderen Non-Hodgkin-Lymphomen. Das zu entwickelnde Medikament muss nämlich zu den Lymphomzellen im Gehirn, den Meningen oder dem Rückenmark gelangen. Bei der Injektion ins Blut muss hierfür das BAR-Body die Blut-Hirn-Schranke überqueren können, um seine Wirkung am Lymphom entfalten zu können. Die Blut-Hirn-Schranke verhindert den unkontrollierten Durchfluss vom Blut in den Liquor. Ein weiterer Schritt der in vivo-Testung des BAR-Body bestünde also darin, die Durchlässigkeit des Konstruktes durch die Blut-Liquor-Schranke zu ermitteln. Es gibt mehrere Wege, die es ermöglichen, diese zu überqueren. Eine

Möglichkeit ist der passive Durchtritt durch Diffusion, wobei die Ladung, die Fettlöslichkeit und die molekulare Größe (unter 500 Da) des Konstruktes eine wichtige Rolle spielen. Eine weitere Möglichkeit besteht in der Ausnutzung von körpereigenen Transportproteinen, die größere hydrophile Moleküle durch die Blut-Liquor-Schranke befördern. Des Weiteren kann das Konstrukt an einen Liganden gekoppelt werden, welcher an den Rezeptoren der Blut-Liquor-Schranke erkannt wird.²¹ Um die Blut-Liquor-Schranke zu umgehen besteht außerdem die Möglichkeit, das BAR-Body direkt in den Liquorraum zu injizieren. Man spricht von einer intrathekalen oder intraventrikulären Injektion. Bei Hirntumoren wird diese Art der Medikamentenzufuhr oft als nicht sehr wirksam angesehen, wahrscheinlich bedingt durch die geringe Permeabilität der Stoffe in das Gehirnparenchym.³¹ Für das PZNSL konnte die Arbeitsgruppe von Pels et al.⁴⁷ jedoch die erfolgreiche Kombination von systemischer und intraventrikulärer Polychemotherapie zeigen. Ohne die intraventrikuläre Therapie kommt es zu hohen Remissionsraten, jedoch treten bei den meisten Patienten bereits früh Rezidive auf.⁴⁷ Durch die sehr erfolgreiche systemische Anwendung des IgG1-Antikörpers Rituximab in der Therapie der primären ZNS-Lymphome kann davon ausgegangen werden, dass die Blut-Hirn-Schranke zumindest teilweise von Antikörper-ähnlichen Konstrukten überwunden werden kann.^{19, 23} Zu dieser Wirksamkeit trägt sicherlich bei, dass es durch das Vorliegen einer malignen Erkrankung im ZNS zu einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke kommt, was zu einer Erhöhung deren Durchlässigkeit führen könnte.^{25, 38}

Ob das aktuell verwendete BAR-Body-Format das am besten geeignete Format ist, um BARs in die Therapie umzusetzen ist nicht geklärt. Die Bioverfügbarkeit von Proteinen ist stark abhängig von deren Größe. Durch das Anfügen weiterer Fc-Teile an BARs könnten diese vergrößert und deren renale Rückresorption erhöht werden, was insgesamt zu einer verbesserten Bioverfügbarkeit führen könnte. Wenn BARs hingegen in kleinere Konstrukte integriert werden wie zum Beispiel bispezifische Antikörper besteht die Gefahr der schnellen renalen Elimination, jedoch könnten diese durch ihre geringe Größe deutlich besser in den Tumor eindringen, um dort ihre Wirkung zu entfalten.

Die Rolle von Neurabin I in der Pathogenese des primären ZNS-Lymphoms ist noch nicht abschließend geklärt. Es wird angenommen, dass eine chronische Stimulation der Lymphomzellen durch das Antigen Neurabin I, welche durch eine Überaktivierung des B-Zell-Rezeptor-Signalweges vermittelt wird, zu einer gesteigerten Proliferation und Entartung der B-Zellen führt. Diese Theorie ist aktuell allerdings noch umstritten und muss durch weitere Studien bestätigt werden. Für die klinische Anwendung ist dieser wissenschaftliche Diskurs jedoch nicht von Bedeutung, da das ZNS-Antigen Neurabin I, unabhängig von dessen Rolle in der Pathogenese, ausschließlich von ZNS-Lymphomzellen erkannt wird, was es durch Kopplung an eine Wirkkomponente zu einem hochspezifischen Therapeutikum macht.

Zusammenfassend beschreibt diese Arbeit die Entwicklung und die in vitro-Testung eines neuen Therapieansatzes für das primäre ZNS-Lymphom. Das als BAR-Body getaufte Konstrukt muss für die weitere Entwicklung noch zusätzliche Testungen und Optimierungen durchlaufen, um so eine gut wirksame, nebenwirkungsarme und spezifische Therapie für Patienten mit einem primären ZNS-Lymphom darstellen zu können.

6. Literaturverzeichnis

1. Abrey LE et al. (2006) Primary central nervous system lymphoma: the Memorial Sloan-Kettering Cancer Center prognostic model. *J Clin Oncol.* 24:5711-5715.
2. Baeuerle PA, Reinhardt C (2009) Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Res.* 69:4941-4944.
3. Bataller L et al. (2003) The MAZ protein is an autoantigen of Hodgkin's disease and paraneoplastic cerebellar dysfunction. *Ann Neurol.* 53:123-127.
4. Baumgarten L et al. (2018) The diagnosis and treatment of primary CNS lymphoma – An interdisciplinary challenge. *Dtsch Arztebl Int.* 115:419-426.
5. Baumgarth N, Roederer M (2000) A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Method.* 243:77-97.
6. Bergner N et al. (2012) Role of chemotherapy additional to high-dose methotrexate for primary central nervous system lymphoma (PCNSL). *Cochrane Database Syst Rev.* 11:CD009355.
7. Berlit P (2013) Basiswissen Neurologie. 6. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
8. Bewarder M et al. (2016) CD3/CD28: A novel bispecific format for the treatment of B-cell lymphomas. *Blood.* 128:3516.
9. Brentjens RJ, Curran KJ (2012) Novel cellular therapies for leukemia: CAR-modified T cells targeted to the CD19 antigen. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2012:143-151.
10. Buchner M, Müschen M (2014) Targeting the B cell receptor signaling pathway in B lymphoid malignancies. *Curr Opin Hematol.* 21:341-349.
11. Clontech Laboratories, Inc. A Takara Bio Company (2016) TALON Metal Affinity Resins User Manual. www.clontech.com
12. Davis RE et al. (2010) Chronic Active B Cell Receptor Signaling in diffuse Large B Cell Lymphoma. *Nature.* 463:88-92.
13. De Angelis LM et al. (2002) Combination chemotherapy and radiotherapy for primary central nervous system lymphoma: Radiation Therapy Oncology Group Study 93-10. *J Clin Oncol.* 20:4643-4648.
14. De Haard HJ et al. (1999) A large non-immunized human Fab fragment phage library that permits rapid isolation and kinetic analysis of high affinity antibodies. *J Biol Chem.* 274:18218-18230.
15. Dotan E, Aggarwal C, Smith MR (2010) Impact of Rituximab (Rituxan) on the treatment of B-cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *P T.* 35:148-157.
16. DSMZ. Datenblatt zur Zelllinie OCI-LY3.
<https://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-761.html>
Leibniz-Institut – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH.
17. Ellenbrecht CT et al. (2016) Reengineering chimeric antigen receptor T cells for targeted therapy of autoimmune disease. *Science.* 353:179-184.

18. Ferreri AJ et al. (2009) High-dose cytarabine plus high-dose methotrexate versus high-dose methotrexate alone in patients with primary CNS lymphoma: a randomized phase 2 trial. *Lancet*. 374:1512-1520.
19. Ferreri AJ et al. (2016) Chemoimmunotherapy with methotrexate, cytarabine, thiotepa and rituximab (MATRix regimen) in patients with primary CNS lymphoma: results of the first randomization of the International Extranodal Lymphoma Study Group-32 (IELSG32) phase 2 trial. *Lancet Haematol*. 3:e217-227.
20. Flowers CR, Armitage JO (2010) A decade of progress in lymphoma: advances and continuing challenges. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 10:414-423.
21. Fu BM (2012) Experimental methods and transport models for drug delivery across the blood-brain barrier. *Curr Pharm Biotechnol*. 13:1346-1359.
22. Fuchs M et al. (2018) Hodgkin Lymphom. Onkopedia Leitlinien. DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. Berlin.
23. Grommes C, De Angelis LM (2017) Primary CNS Lymphoma. *J Clin Oncol*. 35 :2410-2418.
24. Han CH, Batchelor TT (2017) Primary Central Nervous System Lymphoma. *Continuum (Minneap Minn)*. 23:1601-1618.
25. Hoang-Xuan K et al. (2015) Diagnosis and treatment of primary CNS lymphoma in immunocompetent patients : guidelines from the European Association for Neuro-Oncology. *Lancet Oncol*. 16:e322-332.
26. Hoogenboom HR et al. (1998) Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology*. 4:1-20.
27. Invitrogen by life technologies (2014) TOPO TA Cloning Kit. Thermo Fisher Scientific Inc.
28. Jahnke K et al. (2005) High-dose methotrexate toxicity in elderly patients with primary central nervous lymphoma. *Ann Oncol*. 16:445-449.
29. Jahnke K et al. (2006) Relapse of primary central nervous system lymphoma: clinical features, outcome and prognostic factors. *J Neurooncol*. 80:159-165.
30. Kantarijan H et al. (2017) Blinatumomab versus Chemotherapy for advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 376:836-847.
31. Kemper EM et al. (2004) Modulation of the blood-brain barrier in oncology: therapeutic opportunities for the treatment of brain tumours? *Cancer Treat Rev*. 30:415-423.
32. Kennedy R, Klein U (2018) Aberrant Activation of NF- κ B Signaling in Aggressive Lymphoid Malignancies. *Cells*. 7:189.
33. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*.227:680-685.
34. Langner-Lermercier S et al. (2016) Primary CNS lymphoma at fist relapse/progression : characteristics, management and outcome of 256 patients from the French LOC network. *Neuro Oncol*. 18:1297-1303.

35. Lehnert H, Werdan K (2006) Innere Medizin – essentials. 4. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
36. Leslie LA et al. (2017) Targeting indolent non-Hodgkin lymphoma. *Expert Rev Hematol.* 10:299-313.
37. Matthew BS, Carson KA, Grossman SA (2006) Initial response to glucocorticoids. *Cancer.* 106:383-387.
38. Maugeri R et al. (2016) Aquaporins and Brain Tumors. *Int J Mol Sci.* 17:1029.
39. Mendez JS et al. (2018) The elderly left behind – changes in survival trends of primary central nervous system lymphoma over the past 4 decades. *Neuro Oncol.* 20:687-694.
40. Morris PG et al. (2013) Rituximab, methotrexate, procarbazine and vincristine followed by consolidation reduced-dose whole-brain radiotherapy and cytarabine in newly diagnosed primary CNS lymphoma: final results and long-term outcome. *J Clin Oncol.* 31:3971-3979.
41. Motta G et al. (2010) Monoclonal Antibodies for Non-Hodgkin's Lymphoma: State of the Art and Perspectives. *Clin Dev Immunol.* 2010:428253.
42. Nachreiner T et al. (2008) Depletion of autoreactive B-lymphocytes by a recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein-based immunotoxin. *J Neuroimmunol.* 195:28-35.
43. Naidoo J et al. (2015) Toxicities of the anti-PD-1 and anti-PD-L1 immune checkpoint antibodies. *Ann Oncol.* 26:2375-2391.
44. Nakanishi H et al. (1997) Neurabin: a novel neural tissue-specific actin filament-binding protein involved in neurite formation. *J Cell Biol.* 139:951-961.
45. Nelson DF et al. (1999) Radiotherapy in treatment of primary central nervous system lymphoma (PCNSL). *J Neurooncol.* 43:241-247.
46. Patrick LB, Mohile NA (2015) Advances in Primary Central Nervous System Lymphoma. *Curr Oncol Rep.* 17:60.
47. Pels H et al. (2009) Early relapses in primary CNS lymphoma after response to polychemotherapy without intraventricular treatment: results of a phase II study. *J Neurooncol.* 91:299-305.
48. Pfreundschuh M et al. (2006) CHOP-like chemotherapy plus rituximab compared with CHOP-like chemotherapy alone in young patients with good-prognosis diffuse large B-cell lymphoma: a randomized controlled trial by the Mabthera International Trial (MinT) Group. *Lancet Oncology.* 7:379-391.
49. Pfreundschuh M et al. (2015) BARs (B-cell receptor antigens for reverse targeting): A Novel and Ultimately Specific Treatment Concept for B-Cell Neoplasms. *Blood.* 126:3995.
50. Pirotte B et al. (1997) Glucocorticoid-induced long-term remission in primary cerebral lymphoma: case report and review of literature. *J Neurooncol.* 32:63-69.
51. Prica A et al. (2017) Rituximab in Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukaemia: A Practice Guideline. *Clin Oncol.* 29:e13-28.

52. Renart J, Reiser J, Stark GR (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76:3116-3120.
53. Schlegel U, Illerhaus G (2015) Leitlinie für Diagnostik und Therapie in der Neurologie: Primäre ZNS-Lymphome (PZNSL). 5. Deutsche Gesellschaft für Neurologie.
54. Schuster SJ et al. (2017) Chimeric Antigen Receptor T Cells in Refractory B-Cell Lymphomas. *N Engl J Med*. 377:2545-2554.
55. Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW (2012) Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*. 380:848857.
56. Shiels MS et al. (2016) Trends in primary central nervous system lymphoma incidence and survival in the U.S. *BR J Haematol*. 174:417-424.
57. Suresh T et al. (2014) New antibody approaches to lymphoma therapy. *J Hematol Oncol*. 7:58.
58. Swerdlow SH et al. (2016) The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 127:2375-2390.
59. Teo EC, Chew Y, Phipps C (2016) A review of monoclonal antibody therapies in lymphoma. *Crit Rev Oncol Haematol*. 97:72-84.
60. Thiel E et al. (2010) High-dose methotrexate with or without whole brain radiotherapy for primary CNS lymphoma (G-PCNSL-SG-1): a phase 3, randomised, non-inferiority trial. *Lancet Oncol*. 11:1036-1047.
61. Thurner L et al. (2018) Hyper N-glycosylated SAMD14 and Neurabin-I as Driver CNS Autoantigens of PCNSL. *Blood*. 132:2744-2753.
62. Thurner L et al. (2018) LRPAP1 is a frequent proliferation-inducing antigen of BCRs of mantle cell lymphomas and can be used for specific therapeutic targeting. *Leukemia*. 33:148-158.
63. Thurner L et al. (2018) The riddle of lymphoma BCR-antigens. *Oncotarget*. 9:35805-35806.
64. Torchia J, Weiskopf K, Levy R (2016) Targeting lymphoma with precision using semisynthetic anti-idiotypic peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113:5376-5381.
65. Young R, Staudt L (2013) Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nat Rev Drug Discov*. 12:229-243.

7. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------|--|
| AA | Aminosäure |
| ADCC | Antikörper-abhängige zell-vermittelte Toxizität |
| AIDS | Erworbenes Immun-Schwäche-Syndrom |
| APC | Allophycocyanin |
| Aqua dest. | Aqua destillata |
| ARS2 | Arsenite Resistance Protein 2 |
| BZR | B-Zell-Rezeptor |
| DLBCL | Diffus großzelliges B-Zell-Lymphom |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTPs | Desoxyribonukleosidtriphosphate |
| E. coli | Escherichia coli |
| ED | Effektivdosis |
| ETA | Exotoxin A (Pseudomonas aeruginosa) |
| IPTG | Isopropylthiogalactosid |
| KOF | Körperoberfläche |
| LB | Lysogeny Broth |
| LDH | Lactatdehydrogenase |
| LRPAPI | Low Density Lipoprotein-Related Protein-Associated Protein I |
| MAZ | myc-assoziiertes Zinkfinger-Protein |
| NHL | Non-Hodgkin-Lymphom |
| NRBI | Neurabin I |
| PBS | Phosphate-Buffered Saline |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PZNSL | primäres ZNS-Lymphom |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| TAE | TRIS-Acetat-EDTA-Puffer |
| ZNS | Zentrales Nervensystem |

8. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Antikörpers. | 9 |
| Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Fab-Fragmentes. | 10 |
| Abbildung 3: Schematische Darstellung des Fab-Fragmentes mit NRBI. | 11 |
| Abbildung 4: Vektorkarte des pCR 2.1-TOPO-Vektors. ²⁷ | 21 |
| Abbildung 5: Prinzip der TOPO-TA-Klonierung. ²⁷ | 22 |
| Abbildung 6: Vektorkarte des pCES1-Vektors. ¹⁴ | 24 |
| Abbildung 7: Schematische Darstellung der Aminosäure-Sequenz der BAR-Region mit der BZR- bindenden Epitopregion von Neurabin I (blau) der drei BAR-Bodies A, B und C. | 34 |
| Abbildung 8: Schematische Darstellung der BAR-Bodies im Fab-Format mit Darstellung der Position der Epitopregion von NRBI. | 35 |
| Abbildung 9: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Herstellung der BAR-Bodies. | 36 |
| Abbildung 10: Agarose-Gel-Elektrophorese nach der PCR auf den NRBI-Klon mit den Schwerkettenprimern. | 38 |
| Abbildung 11: Agarose-Gel-Elektrophorese zur Überprüfung der erfolgreichen Klonierung der BAR-Region in den TOPO-TA-Vektor mittels Kolonien-PCR mit den Primern M13 forward und M13 reverse. | 39 |
| Abbildung 12: Agarose-Gel-Elektrophorese zur Isolierung der BAR-Region der BAR-Bodies A, B und C zur Klonierung in die Schwerkette mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und BstEII. | 40 |
| Abbildung 13: Schematische Darstellung der Bindung der Primer NRBI AA1204-ApaLI-s und CH1 3' an die BAR-Region der BAR-Bodies A, B und C. | 41 |
| Abbildung 14: Agarose-Gel-Elektrophorese zur Kontrolle der erfolgreichen Klonierung der BAR-Region der BAR-Bodies A, B und C in die Schwerkette des pCES1-Vektors mittels Kolonien-PCR mit den Primern CH1 3' und NRBI AA1204-ApaLI-s. | 42 |
| Abbildung 15: Agarose-Gel-Elektrophorese nach PCR auf NRBI-Klon mit den Leichtkettenprimern. | 43 |
| Abbildung 16: Agarose-Gel-Elektrophorese zur Kontrolle der erfolgreichen Klonierung der Neurabin I-BAR-Regionen in den TOPO-TA-Vektor mittels Kolonien-PCR mit den Primern M13 forward und M13 reverse. | 44 |
| Abbildung 17: Agarose-Gel-Elektrophorese zur Isolierung der BAR-Region der BAR-Bodies A, B und C zur Klonierung in den pCES1-Vektor anstelle der variablen Region der Leichtkette (VL) mit den Restriktionsendonukleasen ApaLI und XhoI. | 45 |
| Abbildung 18: Agarose-Gel-Elektrophorese zur Kontrolle der erfolgreichen Ligation der BAR-Region der BAR-Bodies A, B und C in den pCES1-Vektor mit den Primern M13 reverse und kappa-antisense. | 46 |

| | |
|---|----|
| Abbildung 19: Sequenzierung des BAR-Body ⑦ B..... | 47 |
| Abbildung 20: Westernblot zur Kontrolle der Expression der BAR-Bodies in den TGI E. coli-Bakterien. | 48 |
| Abbildung 21: Bindungs-Assay der OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen mit den BAR-Bodies A, B und C. | 50 |
| Abbildung 22: Schematische Darstellung der modifizierten BAR-Bodies A, B und C gekoppelt an ETA‘..... | 51 |
| Abbildung 23: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Herstellung der modifizierten BAR-Bodies. | 52 |
| Abbildung 24: Agarose-Gel-Elektrophorese zur Kontrolle der erfolgreichen Klonierung der modifizierten Neurabin-BAR-Bodies in den pCES1-Vektor mit den Primern CH1 3‘ und NRBI AA1204-ApaLI-s..... | 54 |
| Abbildung 25: Darstellung der DNA- und Aminosäuresequenz des BAR-Body B..... | 55 |
| Abbildung 26: Westernblot zum Nachweis der modifizierten BAR-Bodies nach Expression in TGI E. coli-Bakterien..... | 56 |
| Abbildung 27: Bindungs-Assay der OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen mit den modifizierten BAR-Bodies. | 58 |
| Abbildung 28: Westernblot zur Kontrolle der Expression des Konstruktes B, Klon 2, in den TGI E. coli-Bakterien..... | 59 |
| Abbildung 29: Bindungs-Assay des BAR-Body B, Klon 2, nach Inkubation mit OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen..... | 60 |
| Abbildung 30: Oberflächenfärbung der OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen..... | 61 |
| Abbildung 31: Internalisierungs-Assay an den OCI-Ly3-recNRBI-BZR-Zellen mit induziertem NRBI-BZR. | 62 |
| Abbildung 32: Graphische Auswertung des Zytotoxizitäts-Assays..... | 64 |

9. Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Stadieneinteilung der Non-Hodgkin-Lymphome nach der Ann-Arbor-Klassifikation | 4 |
| Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Laborgeräte | 12 |
| Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien | 12 |
| Tabelle 4: Übersicht über die angesetzten Lösungen und Medien | 13 |
| Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Kits | 15 |
| Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Antikörper | 16 |
| Tabelle 7: Übersicht über die weiteren verwendeten Enzyme | 16 |
| Tabelle 8: Konditionen der Polymerase-Kettenreaktion | 18 |
| Tabelle 9: Neurabin I-Primer | 19 |
| Tabelle 10: Übersicht über die weiteren verwendeten Primer | 19 |
| Tabelle 11: Aufbau der 96-Well-Platte | 31 |
| Tabelle 12: Konzentration und absolute Menge der produzierten BAR-Bodies | 49 |
| Tabelle 13: Konzentration und absolute Menge der modifizierten BAR-Bodies | 57 |
| Tabelle 14: Zytotoxizitäts-Assay | 63 |

10. Publikation

Poster-Präsentation im Oktober 2019 bei der „5th annual international conference NEW CONCEPTS IN LYMPHOID MALIGNANCIES“ in Estoril, Portugal, organisiert von „ESH, European School of Haemtaology“

Titel: „Targeting B-cell lymphomas by incorporating BARs (B-cell receptor Antigens for Reverse targeting) in IgG1-antibodies“

Moritz Bewarder¹, Stephan Stilgenbauer¹, Maximilian Kiefer¹, Helene Will¹, Lisa Goerens¹, Natalie Fadle¹, Evi Regitz¹, Frank Neumann¹, Klaus-Dieter Preuss¹, Michael Pfreundschuh† and Lorenz Thurner¹

¹ José Carreras Center for Immuno- and Gene Therapy, Dept. Internal Medicine I, Saarland University Medical School, Homburg/Saar, Germany.

11. Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Personen ganz herzlich bedanken, die mich auf unterschiedliche Weise bei der Durchführung sowie dem Schreiben dieser Dissertationsarbeit unterstützt haben.

Einen besonderen Dank an Prof. Dr. M. Pfreundschuh für das Überlassen dieses Themas und die Ermöglichung dieser Doktorarbeit im José-Carreras-Zentrum am Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg.

Ich bedanke mich herzlichst bei Prof. Dr. S. Stilgenbauer für die unkomplizierte Übernahme dieser Doktorarbeit und die Möglichkeit die Arbeit weiter führen zu können.

Einen weiteren Dank geht an meinen Betreuer Dr. M. Bewarder für die Heranführung an das Thema, die Betreuung und Unterstützung bei der Arbeit im Labor und für die sorgfältige Durchsicht der Dissertationsarbeit beim Schreiben.

Ich danke besonders Dr. D. Preuss für seine ständige Bereitschaft als Ansprechpartner, für seine schnelle und kompetente Unterstützung während meiner gesamten Zeit im José-Carreras-Zentrum, sowie für die Durchsicht und konstruktiven Anregungen während des Schreibens.

Ein außerordentlicher Dank geht an Evi Regitz und Natalie Fadle für die Heranführung an die experimentellen Verfahrensweisen, die tatkräftige Unterstützung bei der Arbeit im Labor und ihre Bereitschaft für Fragen jeglicher Art. Ich danke auch allen weiteren Mitarbeitern des José-Carreras-Zentrum des Universitätsklinikum des Saarlandes in Homburg für das angenehme Arbeitsklima, die Ratschläge und Hilfestellungen.

Ich bedanke mich bei meinen Mit-Doktoranden Helene Will und Max Kiefer für ihre gute Zusammenarbeit im Labor.

Abschließend bedanke ich mich besonders bei meinen Eltern für ihren Rückhalt und ihre Unterstützung bei meinem Studium, sowie der Doktorarbeit. Ich danke meinem Freund für seine Impulse bei labortechnischen Fragen und seine ständigen Ermutigungen. Ein großer Dank geht an meine Familie und meinen Freundeskreis, die mir immer wieder zeigen, dass sie hinter mir stehen und mich unterstützen.