

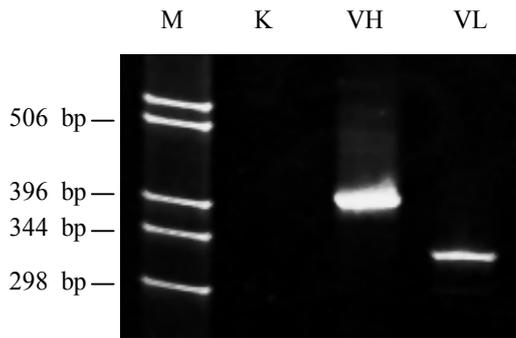
## 3. Ergebnisse

### 3.1 Etablierung des BerH2-Kontroll-scFv

Zur Klärung der Fragestellung dieser Arbeit nach der Spezifität der auf den Tumorzellen von MALT-Lymphomen exprimierten Immunglobulinen, sollten die entsprechenden Immunglobulingene kloniert und als *single-chain-fragment-variable* (scFv)-Antikörper exprimiert werden. Diese scFvs dienten zum Screening nach den von den Tumorzell-Immunglobulinen erkannten Antigenen. Zur Kontrolle wurden auch die Immunglobulingene der BerH2-Hybridomzelllinie kloniert und als scFv hergestellt. Der BerH2-Antikörper richtet sich gegen das CD30 Antigen, einen 120 kDa großen Transmembranrezeptor aus der Familie der Tumor-Nekrose-Faktoren, der auf aktivierten normalen humanen lymphoiden Zellen und auf den Tumorzellen von Hodgkin- und Anaplastisch-Großzelligen-Lymphomen exprimiert wird. Mit dem BerH2-scFv wurden alle folgenden Experimente zur Identifizierung der potenziellen Bindungspartner der Tumor-scFvs parallel durchgeführt, um sicherstellen, dass scFv-Antikörper prinzipiell in der Lage sind Antigene mit den gewählten Methoden zu erkennen.

Der erste Schritt zur Herstellung des BerH2-scFv bestand in der Amplifikation der Immunglobulin-Schwer- und -Leichtkettengene der Hybridomzelllinie durch eine PCR mit Primern, die für die jeweiligen 5'- und 3'- Enden der Gene spezifisch waren. Die entstandenen PCR Produkte sind in Abbildung 4 zu sehen und entsprechen den erwarteten Größen von 395 bp (schwere Kette) und 334 bp (leichte Kette). Die BerH2 Schwer- und Leichtkettengene wurden dann so kloniert, dass sich zwischen ihnen eine Sequenz befand, die für ein Polypeptid aus Glycin-Serin Abfolgen ((G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>) kodiert, und das für die Verbindung der beiden Ketten im späteren Protein sorgt. Dabei lag die schwere Kette am 5'- und die leichte Kette am 3'- Ende dieser Sequenz. Außerdem wurde an das 3'- Ende des Immunglobulin-Leichtkettengens, dem C-Terminus des späteren scFv, eine Sequenz angefügt, die für ein V5-Epitop und eine Polyhistidin-Sequenz (His-Tag) kodiert.

Abbildung 4



**Amplifikationsprodukte der Immunglobulin-Schwer- und -Leichtkettengene des BerH2-Hybridoms** (Polyacrylamidgel nach Ethidiumbromid Färbung).

M: Standard mit Angabe der Größe in Basenpaaren (bp)

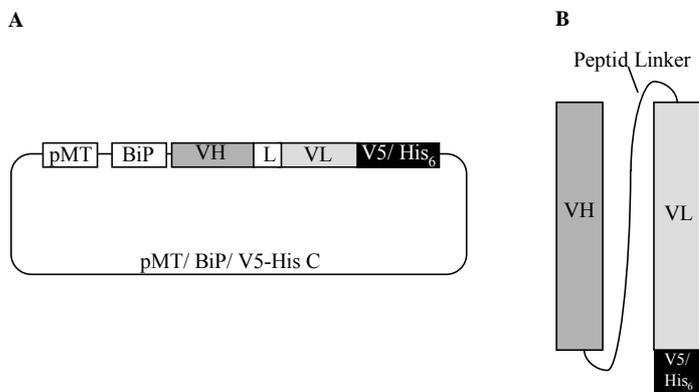
K: Kontrolle ohne DNA

VH: schwere Kette nach Reamplifikation

VL: leichte Kette nach Primäramplifikation

Gegen beide Epitope existieren Antikörper, über die der Nachweis des BerH2-scFv ermöglicht wird. Über den His-Tag kann zudem eine Aufreinigung durch Nickelchelataffinitätschromatographie erfolgen. Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung dieser Expressionskassette und des exprimierten scFv.

Abbildung 5



**Schematische Darstellung der im Expressionsvektor pMT/ BiP/ V5-His C enthaltenen Expressionskassette (A) und des entstehenden scFv (B).**

pMT: Metallothionein Promotor

BiP: sekretorische Signalsequenz

VH: Immunglobulin-Schwerkettengen

VL: Immunglobulin-Leichtkettengen

L: kodierende Sequenz des Peptid Linkers ((G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>)

V5/ His<sub>6</sub>: kodierende Sequenz des V5- und des Polyhistidin-Epitops (His-Tag)

Der Vektor wurde in *Drosophila Schneider 2* (S2) Zellen transfiziert und der BerH2-scFv wurde von diesen sekretorisch in den Zellkulturüberstand exprimiert. Dort ließ sich das exprimierte Protein durch Western Blot Analyse in Form eines Signals der erwarteten Größe

von 31 kDa nachweisen (Abbildung 6). Der Kulturüberstand untransfizierter S2 Zellen wies dieses Signal nicht auf.

**Abbildung 6**



**Western Blot zur Darstellung des BerH2-scFv in Überständen transfizierter S2 Kulturen.**

Der Nachweis erfolgte mit Hilfe des V5-Antikörpers.

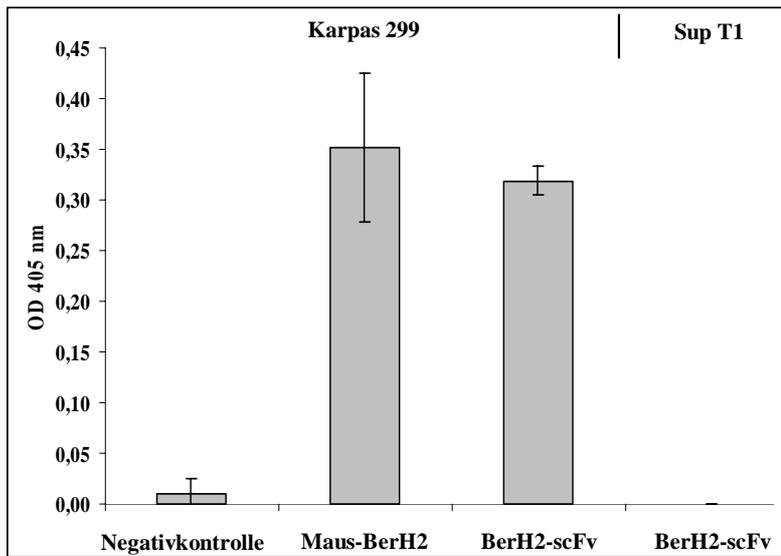
Spuren 1 – 5: Überstände verschiedener, transfizierter S2 Kulturen

M: Markerproteine mit Angabe der Größen in Kilodalton (kDa)

Ü: Kulturüberstand untransfizierter Zellen

Zur Analyse der Bindungsfähigkeit des BerH2-scFv wurde der Kulturüberstand im *Enzyme-Linked-Immunesorbent-Assay* (ELISA) und im *Fluorescence-Activated-Cell-Sorter* (FACS) eingesetzt. In beiden Assays wurde die Bindung des BerH2-scFv an Zellen, die das CD30 Antigen auf ihrer Zelloberfläche exprimieren im Vergleich zu der des murinen BerH2-Antikörpers und zu der von Bestandteilen des Kulturüberstandes untransfizierter Zellen gemessen. Als Kontrollexperiment wurde die Bindung des BerH2-scFv an CD30-negative Zellen analysiert. Die Ergebnisse des ELISA (Abbildung 7) zeigen eine Bindung des BerH2-scFv an die CD30 exprimierenden Zellen, nicht aber an die CD30-negativen Zellen. Diese Bindung ist deshalb nicht auf andere Bestandteile im Zellkulturmedium zurückzuführen. Im Vergleich zum murinen BerH2-Antikörper liegt die Bindungsfähigkeit des scFv etwas niedriger.

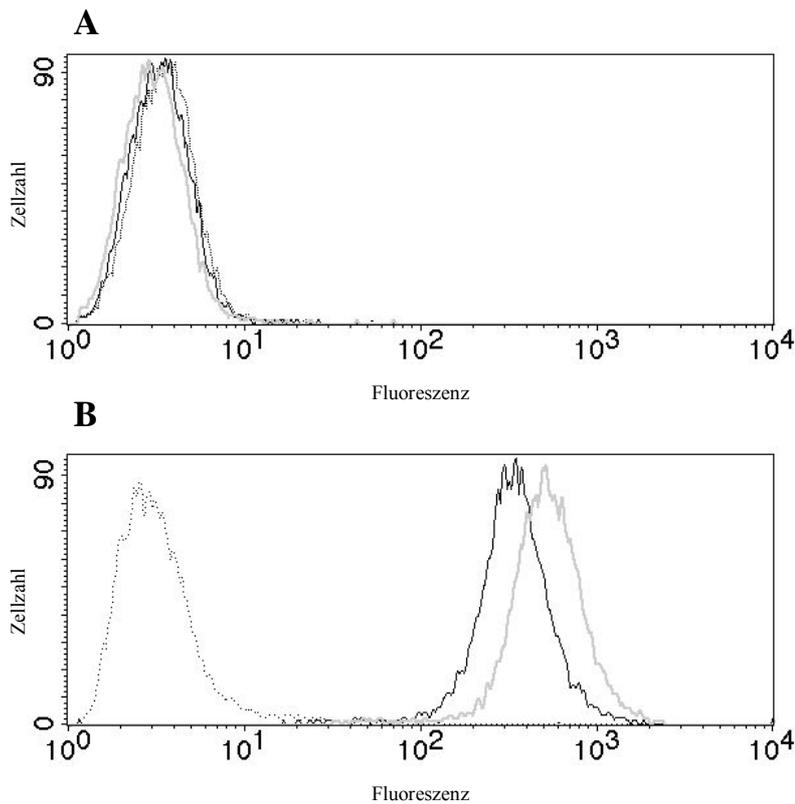
Abbildung 7

**ELISA zur funktionellen Analyse des BerH2-scFv.**

CD30-positive (Karpas 299) und CD30-negative (SupT1) Zellen wurden mit BerH2-scFv haltigem Kulturüberstand transfizierter Schneider 2 Zellen inkubiert. Zur Kontrolle wurden die CD30-positiven Zellen außerdem mit dem Kulturüberstand untransfizierter Zellen (Negativkontrolle) und mit Kulturüberstand des BerH2-Antikörper sekretierenden Hybridoms inkubiert. Die Detektion erfolgte über anti-His-Tag-Antikörper und anti-Maus AP konjugierte Antikörper. Die Balken repräsentieren jeweils den Mittelwert aus drei Experimenten, deren Standardabweichung eingezeichnet ist.

Die Kontrollinkubation von Kulturüberstand untransfizierter S2 Zellen zeigte keine Bindung an beide Zelllinien. Die Bindungsfähigkeit des murinen BerH2-Antikörpers lag etwas höher als die des BerH2-scFv.

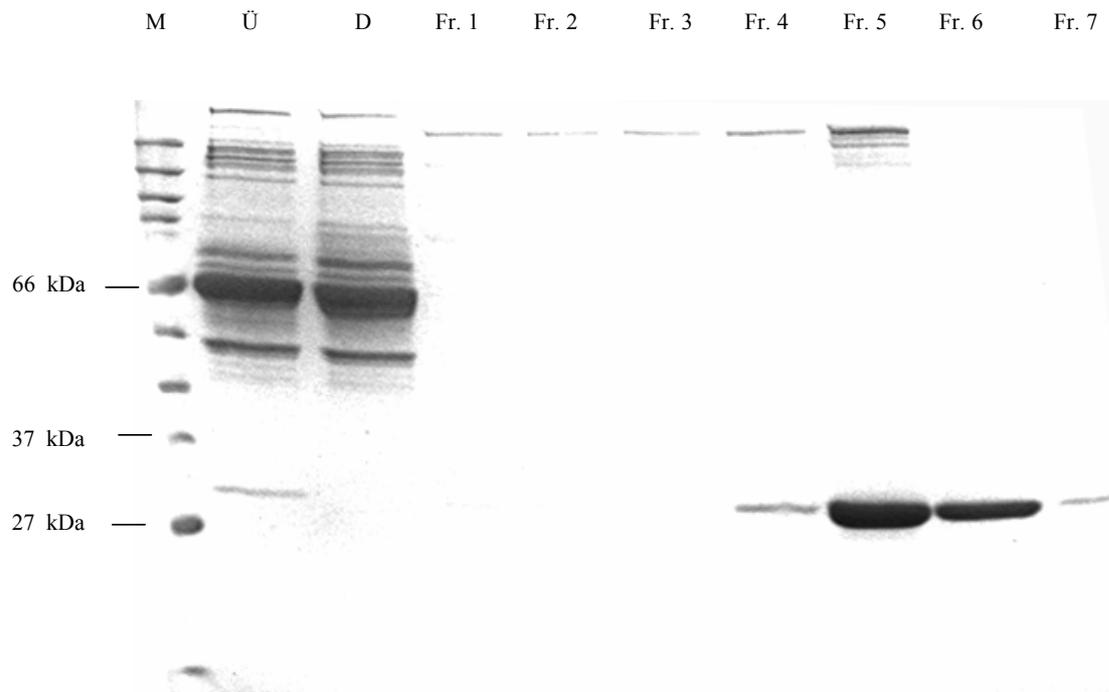
Abbildung 8

**FACS Analyse zur Überprüfung der Funktionalität des BerH2-scFv.**

CD30-negative DG75 Zellen (A) und CD30-positive Karpas 299 Zellen (B) wurden mit BerH2-scFv haltigem Kulturüberstand transfizierter Schneider 2 Zellen inkubiert (schwarze Linie). Zur Kontrolle wurden alle Zellen außerdem mit dem Kulturüberstand untransfizierter Zellen (gestrichelte Linie) und mit Kulturüberstand des BerH2-Antikörper sekretierenden Hybridoms inkubiert (graue Linie). Die Detektion erfolgte über anti-His-Tag-Antikörper und anti-Maus FITC markierte Antikörper.

Nachdem die spezifische Bindung des BerH2-scFv an das CD30 Antigen bewiesen worden war, wurde der BerH2-scFv mittels Nickelchelat-Affinitätschromatographie aus dem Kulturüberstand aufgereinigt. Abbildung 9 zeigt beispielhaft das Ergebnis einer solchen Aufreinigung in Form einer denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) einzelner Fraktionen. Der Hauptteil des im Kulturüberstand vorhandenen Proteins wurde nicht an die Säule gebunden. Geringe Mengen von gebundenem Fremdprotein wurden mit einem Imidazolgradienten von der Säule gewaschen und der BerH2-scFv schließlich mit 500 mM Imidazol eluiert. Die Konzentrationsbestimmung ergab eine Ausbeute von 7,2 mg scFv pro Liter Kulturüberstand.

Abbildung 9



**SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung einzelner Fraktionen einer Nickelchelataffinitätschromatographie zur Aufreinigung des BerH2-scFv.**

Zum Entfernen unspezifischer Proteine wurde die Säule mit einem Gradienten von 0 – 25 mM Imidazol gewaschen (Fraktionen (Fr.) 1 – 4) und der BerH2-scFv anschließend mit 500 mM Imidazol eluiert (Fraktionen 5 - 7). Die errechnete Größe des BerH2-scFv liegt bei 31 kDa.

M:Markerproteine mit Angabe der Größe in Kilodalton (kDa)

Ü :BerH2-scFv haltiger Kulturüberstand vor der Aufreinigung

D :ungebundene Proteine

Um die scFvs auch direkt und nicht nur über das V5-Epitop bzw. den His-Tag nachweisen zu können, wurden sie biotinyliert. Um zu untersuchen, ob die Konjugation von Biotinmolekülen, die auch in den antigenbindenden Bereichen (*complementarity determining regions*, CDRs) stattfindet, die Bindungsfähigkeit beeinflusst, wurde erneut eine FACS-Analyse mit dem biotinylierten BerH2-scFv, wie bereits beschrieben, durchgeführt. Sie zeigte, dass auch der biotinylierte BerH2-scFv an CD30-positive Zellen bindet, während die Inkubation mit CD30-negativen Zellen kein Signal ergab. Der biotinylierte murine Antikörper wies wiederum eine etwas stärkere Bindung auf (Daten nicht gezeigt).

## **3.2 Herstellung der scFvs aus MALT-Lymphom Tumorzellen**

### **3.2.1 Amplifikation der Immunglobulingenumlagerungen der MALT-Lymphome**

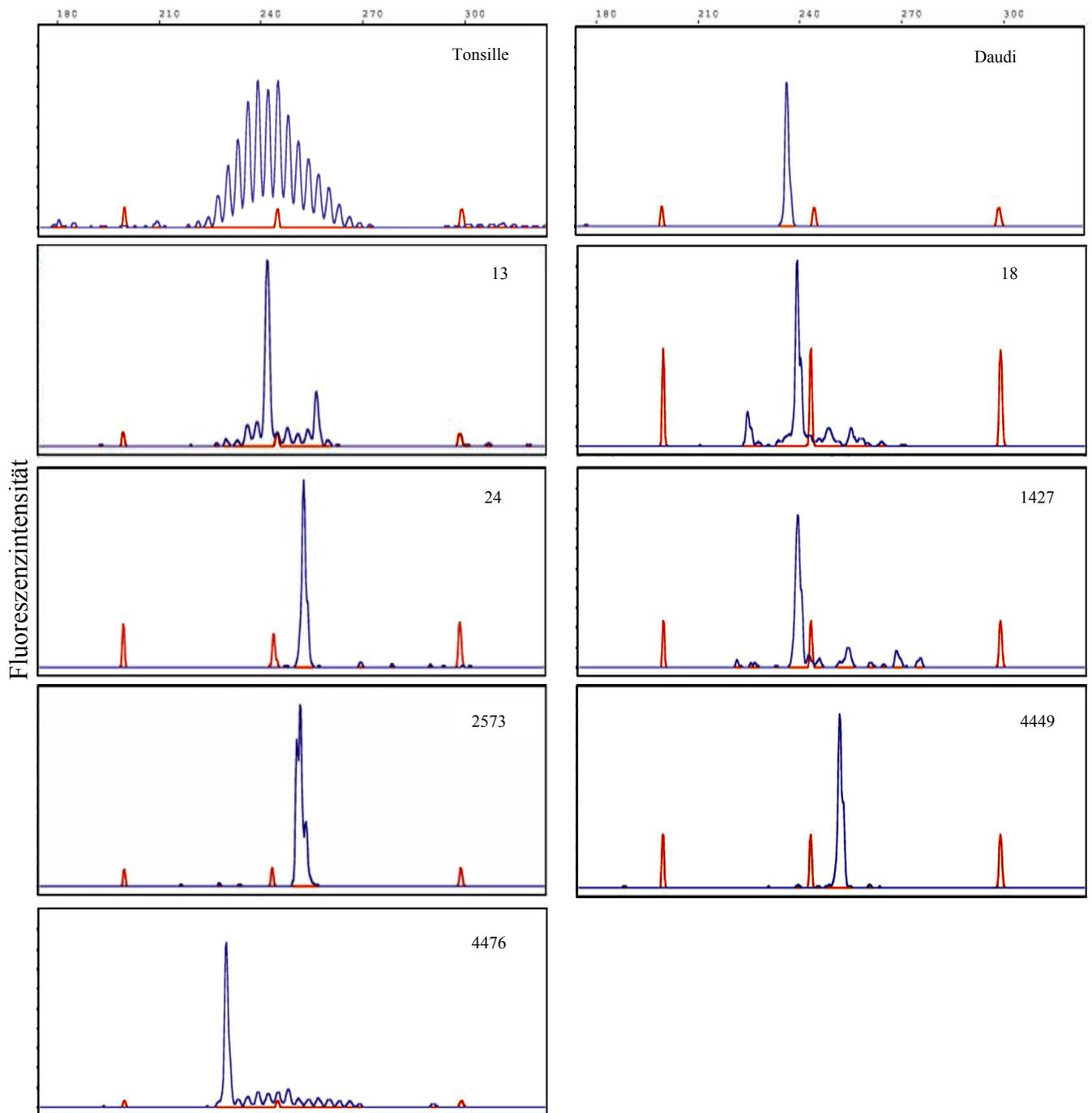
Die Immunglobulin-Leicht- und Schwereketten Gene der ausgewählten MALT-Lymphome (vgl. Material und Methoden) wurden mit Hilfe einer *nested* PCR mit jeweils familienspezifischen Primern amplifiziert. Die entstandenen PCR Produkte wurden anschließend mit der GeneScan Methode untersucht, um die Klonalität der Tumorzellen zu demonstrieren. Die Analyse basiert auf der, auf ein Nukleotid genauen, Größenbestimmung der Amplifikate in einem DNA Sequencer. Zur Kontrolle wurden neben den MALT-Lymphom Fällen auch die entsprechenden Immunglobulinketten einer Tonsille und einer geeigneten Zelllinie analysiert (Positivkontrollen). In einer Tonsille sind B-Zellen mit jeweils unterschiedlichen Immunglobulingenumlagerungen vorhanden, so dass die Amplifikation der Gene zu zahlreichen, unterschiedlich großen PCR Produkten führt. In einer B-Zelllinie dagegen haben alle Zellen, vergleichbar mit einem Tumor, die gleiche Immunglobulingenumlagerung und es entsteht nur ein Produkt mit einer definierten Größe.

Die Amplifikation der Immunglobulin-Schwereketten Gene (IgH, Abbildung 10) aus den MALT-Lymphomen zeigte in allen Fällen die Entstehung eines dominanten Produktes als Ausdruck der Präsenz einer klonalen B-Zell Population. In den Fällen 13, 18, 1427 und 4476 waren außerdem noch in geringem Maße Amplifikate anderer Größen zu sehen, die dadurch entstanden, dass sich im Tumor und seiner Umgebung ein „Hintergrund“ von normalen, reaktiven B-Zellen befindet. Die Kontrollen wiesen das erwartete polyklonale (Tonsille) und monoklonale Muster (Zelllinie) auf.

Die Immunglobulin-Leichtketten Gene des Kappa-Isotyps waren in fünf der sieben Fälle klonal umgelagert (Abbildung 11), die Fälle 13 und 18 verwendeten den Lambda-Isotyp (Abbildung 12). Auch hier zeigten sich in einigen Fällen noch zusätzliche Produkte durch geringe Anteile von normalen B-Zellen oder der Umlagerung des zweiten Allels.

Abbildung 10

## Basenpaare

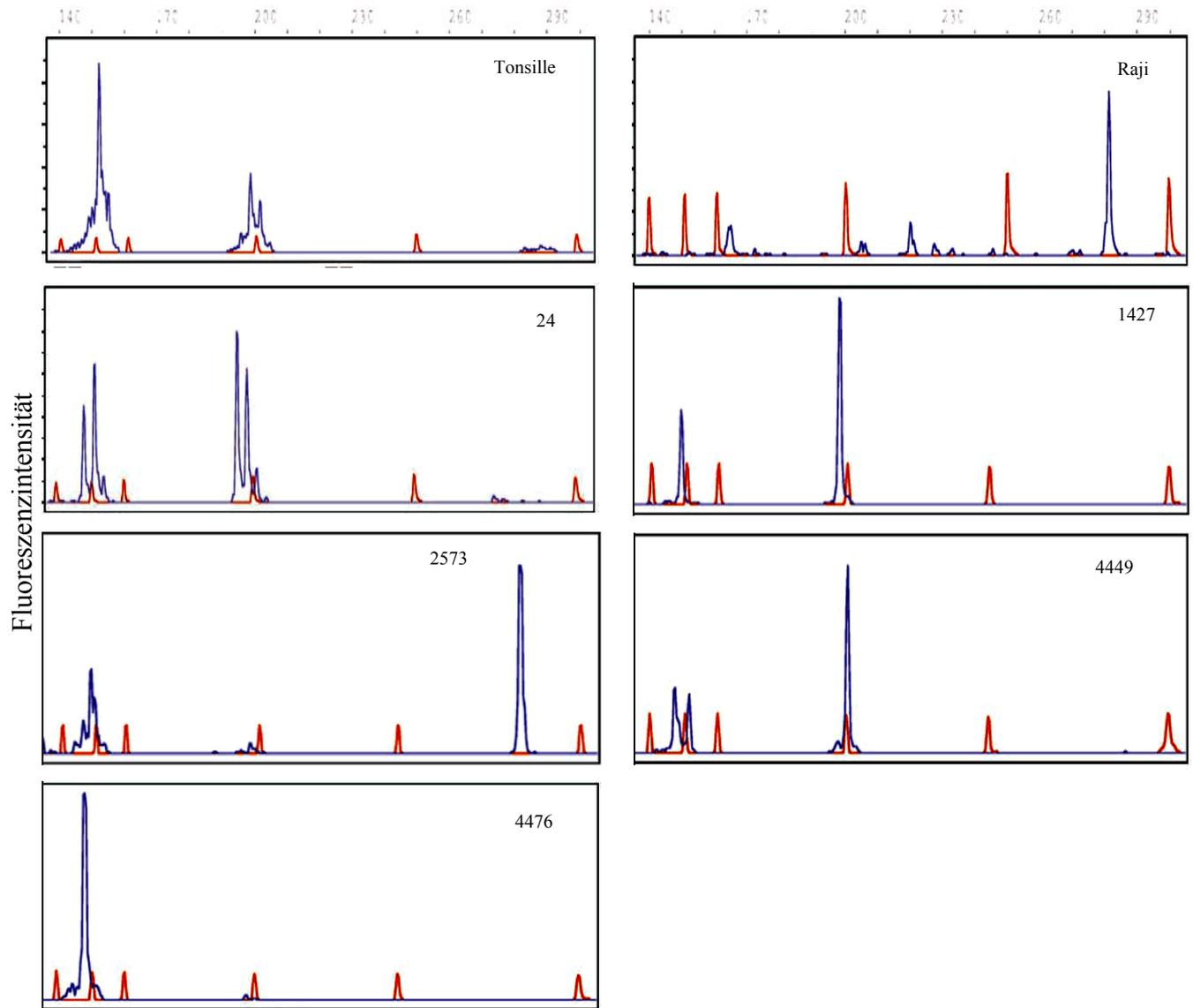


**GeneScan Analyse der Immunglobulin-Schwerkettengenumlagerungen der untersuchten Fälle zur Darstellung ihrer Monoklonalität.**

Als Kontrolle dienten Tonsille (polyklonal) und die B-Zelllinie Daudi (monoklonal). Die Elektropherogramme der Proben sind in Blau dargestellt, der interne Größenstandard erscheint in Rot.

Abbildung 11

## Basenpaare

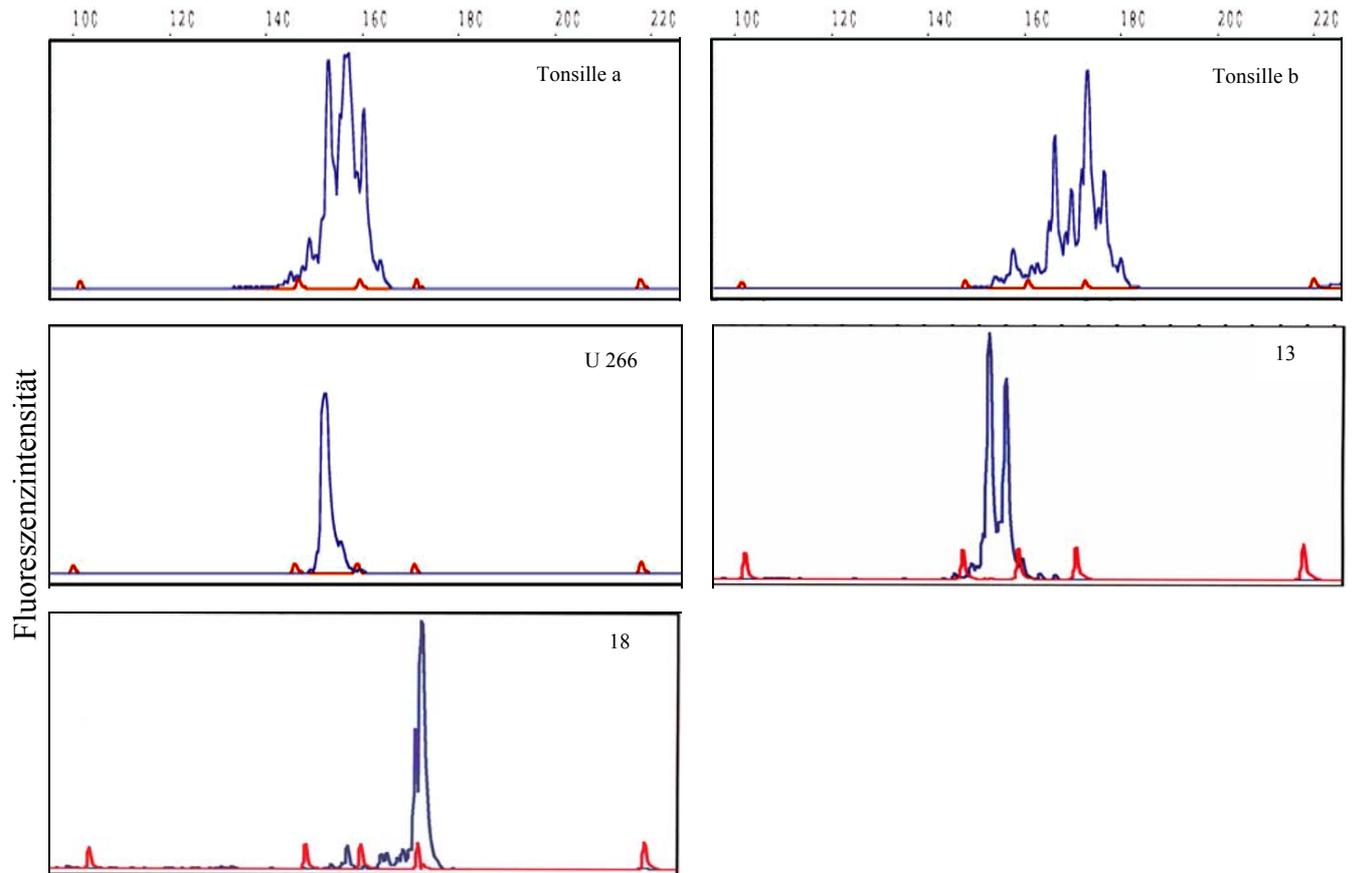


**GeneScan Analyse der Immunglobulin-Leichtkettengenumlagerungen (Kappa-Isotyp) der untersuchten Fälle zur Darstellung ihrer Monoklonalität.**

Als Kontrolle dienten Tonsille (polyklonal) und die B-Zelllinie Raji (monoklonal). Die Elektropherogramme der Proben sind in Blau dargestellt, der interne Größenstandard erscheint in Rot.

Abbildung 12

## Basenpaare



**GeneScan Analyse der Immunglobulin-Leichtkettengenumlagerungen (Lambda-Isotyp) der untersuchten Fälle zur Darstellung ihrer Monoklonalität.**

Als Kontrolle dienten Tonsille (polyklonal) und die B-Zelllinie U266 (monoklonal). Die Elektropherogramme der Proben sind in Blau dargestellt, der interne Größenstandard erscheint in Rot. Die Darstellung der Amplifikation der Leichtkettengene des Lambda-Isotyps ist auf zwei Ansätze verteilt. Für die Tonsille sind die Ergebnisse beider Amplifikationen dargestellt (Tonsille a, b), für die Proben jeweils nur die Amplifikation, bei der ein monoklonales Produkt entstand.

## 3.2.2 Analyse der Immunglobulingensequenzen der MALT-Lymphome

### 3.2.2.1 Analyse der dominanten Immunglobulingenumlagerungen

Die dominanten PCR Produkte der Immunglobulin-Leicht- und Schwereketten gene der MALT-Lymphom Fälle wurden kloniert und sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit den Datenbanken VBase und IMGT (s. Material und Methoden) verglichen, in denen die Sequenzen aller bekannten Immunglobulingen-Keimbahnsegmente zusammengestellt sind. Die Segmente mit der jeweils größten Homologie zu den Tumor-Immunglobulingenumlagerungen wurden identifiziert (Tabelle 1, Abbildung 13-Abbildung 19).

**Tabelle 1**

Fall	VH Segment	VH Familie	JH Segment	Intraklonale Diversität VH	R/S VH <sup>1</sup>	VL Segment	VL Familie	JL Segment	Intraklonale Diversität VL
13	VH4-59	VH 4	JH 6	ja	k. A.	IGLV2-23	VL 2	JL 3	ja
18	VH1-02	VH 1	JH 4	nein	CDR: >2,5 FWR: >2,5	IGLV3-19	VL 3	JL 1	nein
24	VH1-69	VH 1	JH 6	ja	CDR: 1 FWR: 0,8	IGKV3-20	VK 3	JK 1	ja
1427	VH3-23	VH 3	JH 4	nein	CDR: 7 FWR: 1,4	IGKV3-20	VK 3	JK 1	nein
2573	VH3-07	VH 3	JH 4	nein	k. A.	IGKV4-01	VK 4	JK 1	ja
4449	VH3-07	VH 3	JH 3	ja	k. A.	IGKV3-15	VK 3	JK 1	nein
4476	VH3-23	VH 3	JH 4	ja	CDR: 0,5 FWR: 0,7	IGKV1-09	VK 1	JK 4	nein

#### Übersicht über die für die dominanten Tumor-Immunglobulingenumlagerungen verwendeten Keimbahnsegmente und die vorhandenen somatischen Mutationen.

<sup>1</sup>: Verhältnis der Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch führen (replacement, R) zu denen, durch die dies nicht geschieht (silent, S). Das Verhältnis gibt die Wahrscheinlichkeit der Antigenselektion von Immunglobulinsequenzen an; bei Antigenselektion sollte R/S CDR >2,5 und R/S FWR < 1,5 sein.

CDR: complementarity determining region (Antigenbindungsstelle)

FWR: framework region (stabilisierende Region)

VH: V (variable) Segment der schweren Kette

JH: J (joining) Segment der schweren Kette

VL: V (variable) Segment der leichten Kette

JL: J (joining) Segment der leichten Kette

k. A.: Keine Aussage möglich, da in den Sequenzen zu wenige Mutationen vorhanden sind

In den Fällen 1427 und 4476 setzte sich die schwere Kette aus den Segmenten *VH3-23* und *JH 4* zusammen, allerdings mit jeweils unterschiedlichen NDN-Bereichen. Die Fälle 2573 und 4449 verwendeten beide das VH Segment *VH3-07*, aber mit *JH4* (2573) und *JH3* (4449) unterschiedliche JH Segmente. In den Fällen 13 und 24 wurden die Segmente *VH4-59* bzw.

*VH1-69* jeweils mit dem *JH6* Segment umgelagert und im Fall 18 bestand die schwere Immunglobulinkette aus den Segmenten *VH1-02* und *JH4*.

Für die leichten Ketten wurden sowohl Segmente des Kappa Isotyps (Fälle 1427, 2573, 4449, 4476 und 24), als auch des Lambda Isotyps (Fälle 13 und 18) verwendet. In den Fällen 1427 und 24 wurden die Segmente *IGKV3-20* und *JK1* umgelagert. Das gleiche JK Segment wurde außerdem in den Fällen 2573 und 4449 verwendet, aber jeweils mit dem VK Segment *IGKV4-01* (2573) bzw. *IGKV3-15* (4449). Im Fall 4476 bestand die leichte Kette aus den Segmenten *IGKV1-09* und *JK4*, im Fall 13 aus *IGLV2-23/JL3* und im Fall 18 aus *IGLV3-19/JL1*.

Um sicherzustellen, dass es sich bei den Sequenzen um die Immunglobulingenumlagerungen handelt, die von den Tumorzellen exprimiert werden, wurden die Amplifikationen auch an cDNA und der DNA isolierter Tumorzellverbände (Mikrodissektion) durchgeführt. In allen Fällen zeigte sich sowohl in den Mikrodissektionen, als auch in der Amplifikation der cDNA die gleiche dominante Immunglobulingenumlagerung wie in den Gesamtextrakten, so dass die Abstammung der klonierten Immunglobulingenumlagerung von den Tumorzellen gewährleistet war.

Die umgelagerten Immunglobulingene aller Fälle wiesen - mit Ausnahme der leichten Kette des Falls 2573 - somatische Mutationen auf, die zum Teil intraklonale Abweichungen zeigten. Die Art und Verteilung der somatischen Mutationen in einem Immunglobulingen gibt Aufschluss darüber, ob das Immunglobulin durch ein Antigen selektiert wurde. Dies ist der Fall, wenn sich die Mutationen hauptsächlich in den, für die Antigenbindung sehr wichtigen, *CDR* (*complementarity detemining regions*)-Bereichen befinden und dort zu Aminosäureaustauschen führen. Ein solches Verteilungsmuster der Mutationen und damit ein Hinweis auf eine Antigenselektion des Immunglobulins lag bei den hier untersuchten MALT-Lymphomen im Fall 1427 vor. In drei der Fälle (2573, 4449 und 13) war es aufgrund der geringen Anzahl der Mutationen nicht möglich eine eindeutige Aussage im Hinblick auf eine Antigenselektion zu treffen. Das Verteilungsmuster der Mutationen in den Fällen 4476, 18 und 24 sprach gegen eine Antigenselektion.



## Abbildung 14

## A. Schwere Kette des MALT-Lymphoms 2573

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90      CDR1      110      120      130
          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
VH3-07   GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTCCAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGT AGCTATTGGA TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG
2573     .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          140      150      160      170      180      190      200      210      220      230      240      250      260
VH3-07   GGCTGGAGTG GGTGGCCAAC ATAAAGCAAG ATGGAAGTGA GAAATACTAT GTGGACTCTG TGAAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCACTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGAG
2573     .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          270      280      290      300      310      320      330      340      350
VH3-07   AGCCGAGGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGAGA
2573     .....C.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
JH4     .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          GACTA CTGGGGCCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC CTCA

```

## B. Leichte Kette des MALT-Lymphoms 2573

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90      CDR1      110      120      130
          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
IGKV4-01 GACATCGTGA TGACCCAGTC TCCAGACTCC CTGGCTGTGT CTCTGGGCGA GAGGGCCACC ATCAACTGCA AGTCCAGCCA GAGTGTTTTA TACAGCTCCA ACAATAAGAA CTACTTAGCT TGGTACCAGC
2573     .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          140      150      160      170      180      190      200      210      220      230      240      250      260
IGKV4-01 AGAAACCAGG ACAGCCTCCT AAGCTGCTCA TTTACTGGGC ATCTACCCGG GAATCCGGGG TCCCTGACCG ATTCAGTGGC AGCGGTCTG GGACAGATTT CACTCTCACC ATCAGCAGCC TGCAGGCTGA
2573     .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          270      280      290      300      310      320      330      340
IGKV4-01 AGATGTGGCA GTTTATTACT GTCAGCAATA TTATAGTACT CCTC
2573     .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
JK1     .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
          GGACGT TCGGCCAAGG GACCAAGGTG GAAATCAAAC

```

Sequenzvergleiche der dominanten Immunglobulingenulagerungen des MALT-Lymphoms 2573 mit den entsprechenden Keimbahnsequenzen

Legende siehe Seite 65.

Abbildung 15

A. Schwere Kette des MALT-Lymphoms 4449

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90      CDR1      110      120      130
          |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|
VH3-07  GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTCCAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGT AGCTATTGGA TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG
4449    .....
          140      150      160      170      180      190      200      210      220      230      240      250      260
          |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|
VH3-07  GGCTGGAGTG GGTGGCCAAC ATAAAGCAAG ATGGAAGTGA GAAATACTAT GTGGACTCTG TGAAGGGCCG ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCACTGTAT CTGCAAATGA ACAGCCTGAG
4449    .....
          270      280      290      300      310      320      330      340      350      360
          |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|
VH3-07  AGCCGAGGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGAG
4449    .....G.GAGAT TATGACTCCG GTGACTACAA .....
JH3     .....TGATGCTTTT GATATCTGGG GCCAAGGGAC AATGGTCACC GTCTCTTCA
    
```

B. Leichte Kette des MALT-Lymphoms 4449

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90      CDR1      110      120      130
          |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|
IGKV3-15 GAAATAGTGA TGACGCAGTC TCCAGCCACC CTGTCTGTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCAACTTAG CCTGGTACCA GCAGAAACCT GGCCAGGCTC
4449    .....T...T .C.....C.....
          140      150      160      170      180      190      200      210      220      230      240      250      260
          |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|
IGKV3-15 CCAGGCTCCT CATCTATGGT GCATCCACCA GGGCCACTGG TATCCAGGCC AGGTTTCAGTG GCAGTGGGTC TGGGACAGAG TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGTCT GAAGATTTTG CAGTTTATTA
4449    .....A.....
          270      280      290      300      310      320
          |...|  |...|  |...|  |...|  |...|  |...|
IGKV3-15 CTGTCAGCAG TATAATAACT GGCCTCC
4449    .....T.....C.....
JK1     .....GTG GACGTTCGGC CAAGGGACCA AGGTGGAAAT CAAAC
    
```

Sequenzvergleiche der dominanten Immunglobulingenlagerungen des MALT-Lymphoms 4449 mit den entsprechenden Keimbahnsequenzen

Legende siehe Seite 65.

Abbildung 16

A. Schwere Kette des MALT-Lymphoms 4476

```

                                CDR1
    10      20      30      40      50      60      70      80      90      100      110      120      130
    .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
VH3-23  GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTTAGC AGCTATGCCA TGAGCTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG
4476    .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                                CDR2
    140      150      160      170      180      190      200      210      220      230      240      250      260
    .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
VH3-23  GGCTGGAGTG GGTCTCAGCT ATTAGTGGTA GTGGTGGTAG CACATACTAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT CTGCAAAATGA ACAGCCTGAG
4476    .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                                CDR3
    270      280      290      300      310      320      330      340
    .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
VH3-23  AGCCGAGGAC ACGGCCGTAT ATTACTGTGC GAAAG A
4476    .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
JH4    G ACTACTGGGG CCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCCTCA

```

B. Leichte Kette des MALT-Lymphoms 4476

```

                                CDR1
    10      20      30      40      50      60      70      80      90      100      110      120      130
    .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
IGKV1-09 GACATCCAGT TGACCCAGTC TCCATCCTTC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CAGAGTCACC ATCACTTGCC GGGCCAGTCA GGGCATTAGC AGTTATTTAG CCTGGTATCA GCAAAAACCA GGGAAAGCCC
4476    .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                                CDR2
    140      150      160      170      180      190      200      210      220      230      240      250      260
    .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
IGKV1-09 CTAAGCTCCT GATCTATGCT GCATCCACTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA AGGTTGAGCG GCAGTGGATC TGGGACAGAA TTCACTCTCA CAATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG CAACTTATTA
4476    .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                                CDR3
    270      280      290      300      310      320      330      340
    .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
IGKV1-09 CTGTCAACAG CTTAATAGTT ACCCTC
4476    T.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
JK4    TCAC TTTCGGCGGA GGGACCAAGG TGGAGATCAA AC

```

Sequenzvergleiche der dominanten Immunglobulinenumlagerungen des MALT-Lymphoms 4476 mit den entsprechenden Keimbahnsequenzen

Legende siehe Seite 65.

## Abbildung 17

## A. Schwere Kette des MALT-Lymphoms 13

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90      CDR1
          |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
VH4-59   CAGGTGCAGC TGCAGGAGTC GGGCCCAGGA CTGGTGAAGC CTTCGGAGAC CCTGTCCCTC ACCTGCACTG TCTCTGGTGG CTCCATCAGT AGTTACTACT GGAGCTGGAT CCGGCAGCCC CCAGGGAAGG
13       |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
          140      150      160      170      CDR2
          |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
VH4-59   GACTGGAGTG GATTGGGTAT ATCTATTACA GTGGGAGCAC CAACTACAAC CCCTCCCTCA AGAGTCGAGT CACCATATCA GTAGACACGT CCAAGAACCA GTTCTCCCTG AAGCTGAGCT CTGTGACCGC
13       |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
          270      280      290      CDR3
          |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
VH4-59   TCGGGACACG GCCGTGTATT ACTGTGCGAG AG
13       |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
JH6      ..TTTCAACG TCGG...C.
          TACTAC TACTACGGTA TGGACGTCTG GGGCCAAGGG ACCACGGTCA CCGTCTCCTC A

```

## B. Leichte Kette des MALT-Lymphoms 13

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90      CDR1
          |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
IGLV2-23 CAGTCTGCCC TGA CTACAGCC TGCTCCCGT TCTGGGTCTC CTGGACAGTC GATCACCATC TCCTGCACTG GAACCAGCAG TGATGTTGGG AGTTATAACC TTGTCTCCTG GTACCAACAG CACCCAGGCA
13       |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
          140      150      160      170      CDR2
          |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
IGLV2-23 AAGCCCCCAA ACTCATGATT TATGAGGGCA GTAAGCGGCC CTCAGGGGTT TCTAATCGCT TCTCTGGCTC CAAGTCTGGC AACACGGCCT CCCTGACAAT CTCTGGGCTC CAGGCTGAGG ACGAGGCTGA
13       |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
          270      280      290      CDR3
          |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
IGLV2-23 TTATTACTGC TGCTCATATG CAGGTAGTAG CACTT
13       |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....| |.....|
JL3      ...C..T... ..G...C... ..G...G
          GGTA TTCGGCGGAG GGACCAAGCT GACCGTCTA G

```

Sequenzvergleiche der dominanten Immunglobulingenumlagerungen des MALT-Lymphoms 13 mit den entsprechenden Keimbahnsequenzen

Legende siehe Seite 65.



**Abbildung 19**

**A. Schwere Kette des MALT-Lymphoms 24**

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90      CDR1      110      120      130
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
VH1-69   CAGGTGCAGC TGGTGCAGTC TGGGGCTGAG GTGAAGAAGC CTGGGTCCTC GGTGAAGGTC TCCTGCAAGG CTTCTGGAGG CACCTTCAGC AGCTATGCTA TCAGCTGGGT GCGACAGGCC CCTGGACAAG
24       .....
          .....AC.....
          .....A.....
          .....T.....

          140      150      160      170      CDR2      180      190      200      210      220      230      240      250      260
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
VH1-69   GGCTTGAGTG GATGGGAGGG ATCATCCCTA TCTTTGGTAC AGCAAACCTAC GCACAGAAGT TCCAGGGCAG AGTCACGATT ACCGCGGACG AATCCACGAG CACAGCCTAC ATGGAGCTGA GCAGCCTGAG
24       .....
          .....G.....
          .....C.....
          .....T.....
          .....C.....
          .....A.....

          270      280      290      CDR3      300      310      320      330      340      350      360      370
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
VH1-69   ATCTGAGGAC ACGGCCGTGT ATTACTGTGC GAGAGA
24       .....
JH6       .....GGA GGGGGCCCTG CAGTGGCAGG ..... T.....
          .....CTACTACGGT ATGGACGTCT GGGGCCAAGG GACCACGGTC ACCGTCTCCT C
    
```

**B. Leichte Kette des MALT-Lymphoms 24**

```

          10      20      30      40      50      60      70      80      90      CDR1      110      120      130
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
IGKV3-20 GAAATGTGTG TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCAGCTACT TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA CCTGGCCAGG
24       .....

          140      150      160      170      CDR2      180      190      200      210      220      230      240      250      260
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
IGKV3-20 CTCCCAGGCT CCTCATCTAT GGTGCATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCA GACAGTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG CCTGAAGATT TTGCAGTGTA
24       .....
          .....G.....
          .....G.....

          270      280      290      CDR3      300      310      320
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
IGKV3-20 TTACTGTGTCAG CAGTATGGTA GCTCAC
24       .....
JK1       .....G.....GGAC .....
          .....GTTCGGCCAA GGGACCAAGG TGGAAATCAA AC
    
```

**Sequenzvergleiche der dominanten Immunglobulingenlagerungen des MALT-Lymphoms 24 mit den entsprechenden Keimbahnsequenzen**  
 Legende siehe Seite 65.

---

Legende zu Abbildung 13-Abbildung 19:

**Sequenzvergleiche der dominanten Immunglobulingenlagerungen der sieben untersuchten MALT-Lymphome mit den jeweils korrespondierenden Keimbahnsegmenten.**

Die Nomenklatur der Segmente entspricht der IMGT Datenbank (siehe Material und Methoden). Punkte repräsentieren Übereinstimmungen zwischen den Sequenzen, Abweichungen sind in Großbuchstaben angegeben. Die Länge der CDRs wird durch Linien dargestellt.

CDR 1-3: *complementarity determining region 1-3*

### 3.2.2.2 Rezeptor-Revision

Bei der Analyse der amplifizierten und klonierten Immunglobulingenumlagerungen der Fälle 13 und 4476 fielen Sequenzen auf, die zwar den gleichen CDR3 Bereich und das gleiche JH Segment wie die jeweiligen Tumorzellklone besaßen, sich aber in einem Teil des umgelagerten VH Segments unterschieden. Solche „Hybride“, deren VH Segment sich aus Teilen von zwei verschiedenen VH Segmenten zusammensetzt, können durch einen *Rezeptor-Revision* genannten Prozess entstehen. Um die Existenz dieser Umlagerungen innerhalb der Tumorzellpopulationen zu überprüfen, wurden die Immunglobulingenumlagerungen dieser beiden Fälle in zwei weiteren unabhängigen PCRs erneut amplifiziert. Die Auswertung dieser Experimente bestätigte für beide Fälle das Auftreten solcher „revidierten“ Immunglobulingenumlagerungen[36].

In den drei unabhängigen PCR Experimenten, in denen die Immunglobulingenumlagerung der Tumorzellen des Falls 13 amplifiziert wurde, entstanden insgesamt 53 Sequenzen mit identischem CDR3/JH Bereich. Anhand der jeweils verwendeten VH Segmente konnten sie in drei Gruppen eingeteilt werden (Abbildung 20). Die erste Gruppe bestand aus 49 Sequenzen, die die gleiche CDR3/JH Region und das gleiche VH Segment (*VH4-59*) aufwiesen. Innerhalb der Gruppe waren Abweichungen an einzelnen Nukleotidpositionen sichtbar, ein Hinweis auf einen noch nicht abgeschlossenen somatischen Mutationsprozess. Diese Gruppe entsprach dem durch GeneScan- und Sequenzanalysen (siehe vorherige Kapitel) identifizierten Haupttumorzellklon. Sequenzen, die in diese Gruppe eingeordnet werden konnten, entstanden in allen drei PCR Experimenten. Die zweite und die dritte Gruppe bestanden aus drei Sequenzen (Gruppen 2.1-2.3) bzw. einer Sequenz (Gruppe 3). Vergleiche der in diesen Gruppen umgelagerten VH Segmente mit dem *VH4-59* Segment der Gruppe 1 zeigten, dass nur die 3' Anteile (Positionen 190-298) identisch waren. Die 5' VH Regionen (Positionen 73-189) der Gruppen 2 und 3 dagegen unterschieden sich deutlich voneinander und auch von denen der Gruppe 1. Durch den Vergleich mit den bekannten Keimbahn VH Segmenten stellte sich heraus, dass Gruppe 3 dem *VH4-04* Segment am ähnlichsten war und die drei Sequenzen der Gruppe 2 die größte Homologie zu dem *VH4-61* Segment aufwiesen, aber unterschiedliche Allele verwendeten (Gruppe 2.1: *VH4-61\*07*; Gruppe 2.2, 2.3: *VH4-61\*02*). Jeweils eine Sequenz aus den Gruppen 2 und 3 stammte aus einem PCR Experiment, die beiden übrigen Sequenzen der Gruppe 2 stammten aus den anderen beiden PCRs.

Abbildung 20

A

	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180					
	CDR1												CDR2			
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....															
<b>VH4-59</b>	TCTGGTGG	CTCCATCAGT	AGT-----T	ACTACTGGAG	CTGGATCCGG	CAGCCCCCAG	GGAAGGGACT	GGAGTGGATT	GGGTATATCT	ATTACAGTGG	GAGCACCAAC	TACAACCCG				
<b>group 1</b>	.....															
<b>group 2.1</b>	.....T	.....C.....C	.....GGAAGT.	.....A	.....	.....G.C.	.....	.....	.....	.....	.....	.....				
<b>VH4-61-07</b>	.....	.....G.....C	.....GGTAGT.	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....				
<b>group 2.2</b>	.....	.....C.....C	.....AGTTCT.	.....A	.....	.....G.C.	.....	.....G..	.....CGA....	.....AC.....	.....T.....	.....				
<b>group 2.3</b>	.....	.....C.....C	.....AGTAGT.	.....	.....	.....G.C.	.....	.....	.....CG....C	.....AC.....	.....	.....				
<b>VH4-61-02</b>	.....	.....C.....C	.....GGTAGT.	.....	.....	.....G.C.	.....	.....	.....CG....	.....AC.....	.....	.....				
<b>group 3</b>	.....	.....C.....	.....--AGGA	.....GG.....	T...G...C	.....	.....G..	.....	.....C.AG.G...	TC.CT.....	G.....T..	C.....G				
<b>VH4-04</b>	.....	.....C.....	.....--AGTA	.....GG.....	T...G...C	.....	.....G..	.....	.....G.A....	..C.T.....	.....	.....G				

B

	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	
	CDR2											
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....											
<b>VH4-59</b>	TCCCTCAAGAG	TCGAGTCACC	ATATCAGTAG	ACACGTCCAA	GAACCAGTTC	TCCCTGAAGC	TGAGCTCTGT	GACCGCTGCG	GACACGGCCG	TGTATTACTG	TGCGAGAGA	
<b>group 1</b>	.....S.....T.....											
<b>group 2.1</b>	.....T.....											
<b>group 2.2</b>	.....G.....T.....											
<b>group 2.3</b>	.....G.....T.....											
<b>group 3</b>	.....C.....	.....G.....T.....										

	300	310	320	330	340	350	360	370	
	CDR3								
	..... ..... ..... ..... ..... ..... ..... .....								
<b>JH6b</b>	TTTCAACGCGG	ATTACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAG	.....M.....						
<b>group 1</b>	TTTCAACGCGG	.....C.....							
<b>group 2.1</b>	TTTCAACGCGG	.....							
<b>group 2.2</b>	TTTCAACGCGG	.....							
<b>group 2.3</b>	TTTCAACGCGG	.....							
<b>group 3</b>	TTTCAACGCGG	.....C.....							

Vergleiche der verschiedenen Umlagerungen des Immunglobulin-Schwerkettengens von Fall 13 untereinander und mit den entsprechenden Keimbahnsequenzen. Legende siehe Seite 68.

Legende zu Abbildung 20 und Abbildung 22:

**Vergleiche der verschiedenen Umlagerungen der Immunglobulin-Schwerkettengene (IgH) der Fälle 13 und 4476 untereinander und mit den entsprechenden VH Keimbahnsegmenten.**

(A) Vergleiche der neu umgelagerten 5'VH Bereiche untereinander und zu den korrespondierenden VH Keimbahnsegmenten.

(B) Vergleiche der gemeinsamen 3'VH Bereiche der umgelagerten IgH Gene zu den korrespondierenden VH Keimbahnsegmenten *VH4-59* (Fall 13) bzw. *VH3-07* (Fall 4476) und dem korrespondierenden JH Segment JH5a (beide Fälle).

Die Nomenklatur der Segmente entspricht der IMGT Datenbank (siehe Material und Methoden). Punkte repräsentieren Übereinstimmungen zwischen den Sequenzen, Abweichungen zwischen den neu umgelagerten 5'VH Bereichen, den korrespondierenden Keimbahnsegmenten und dem *VH4-59* Segment (Fall 13) bzw. dem *VH3-07* (Fall 4476) sind in Großbuchstaben angegeben.

Fall 13 : Gruppe 1: Konsensus aus 49 Sequenzen; Gruppen 2.1, 2.2, 2.3 und 3: jeweils eine Sequenz

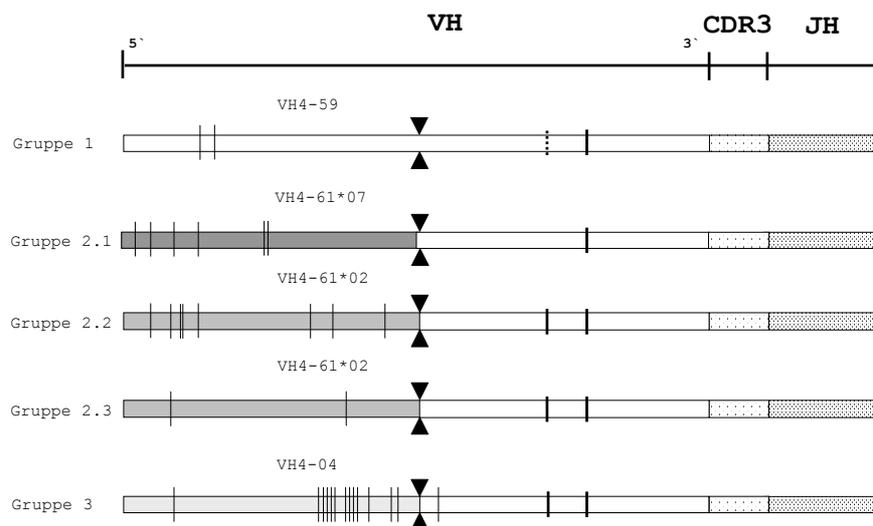
Fall 4476 : Gruppe 2: Konsensus aus 23 Sequenzen; Gruppen 1, 3.1 und 3.2 : jeweils eine Sequenz

CDR 1 - 3: *complementarity determining region* 1 - 3; die Länge der CDRs wird durch Linien dargestellt

▼ : wahrscheinliche Bruchstelle für die Hybridbildung

Bezogen auf das *VH4-59* Segment zeigten alle Sequenzen von Fall 13 in ihrem gemeinsamen 3'VH Anteil eine identische Mutation (Abbildung 20B, Position 255; Abbildung 21). Außerdem wiesen 26 Sequenzen aus allen drei Gruppen eine weitere gemeinsame Mutation auf (Position 240). Der Vergleich der abweichenden 5'VH Bereiche mit den jeweiligen Keimbahnsegmenten zeigte zwei weitere somatische Mutationen in dem *VH4-59* Teil von Gruppe 1. In den Sequenzen der Gruppe 2 traten sechs (Gruppe 2.1), bzw. acht (Gruppe 2.2) und zwei (Gruppe 2.3) Mutationen in dem *VH4-61* Teil auf. In der Gruppe 3 waren dreizehn weitere Nukleotidpositionen mutiert, im Vergleich zu dem *VH4-04* Segment. Das Auftreten von gemeinsamen und individuellen somatischen Mutationen (intraklonale Diversität) zusammen mit dem identischen CDR3/JH Bereich lassen vermuten, dass die Sequenzen der drei Gruppen auseinander hervorgegangen sind.

**Abbildung 21**



**Schematische Darstellung der Beziehungen zwischen den Sequenzgruppen von Fall 13.**

Gruppe 1 : Konsensus aus 49 Sequenzen

Gruppen 2.1, 2.2, 2.3 und 3: jeweils eine Sequenz

▼ : wahrscheinliche Bruchstelle für die Hybridbildung

senkrechte Striche repräsentieren somatische Mutationen

fettgedruckte Striche solche somatischen Mutationen, die in allen drei Gruppen auftreten

Im Fall 4476 entstanden in den drei PCR Experimenten 26 Sequenzen mit gleichem CDR3/JH Bereich und gleichem 3'VH Anteil, die ebenfalls in drei Gruppen eingeteilt werden konnten (Abbildung 22). Eine Gruppe umfasste 23 Sequenzen, die neben dem CDR3/JH Bereich, auch das gleiche VH Segment (*VH3-23*) aufwiesen und sich nur in einzelnen Nukleotidpositionen unterschieden (Gruppe 2). Bei dieser Gruppe handelte es sich um den Haupttumorzellklon (siehe 3.2.2.1). Sequenzen dieser Gruppe traten in allen drei PCR Experimenten auf. Die beiden anderen Gruppen wurden durch eine bzw. zwei Sequenzen

Abbildung 22

**A**

	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	
	----- CDR2 -----										
	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>VH3-07</b>	GAAGG	GGCTGGAGTG	GGTGGCCAAC	ATAAAGCAAG	ATGGAAGTGA	GAAATACTAT	GTGGACTCTG	TGAAGGGCCG	ATTCACCATC	TCCAGAGACA	ACG
<b>group 1</b>	.....	..T.....	.....	.....A...	.....G.....	.....G.....	.....T.....	.....G.....	.....	.....	.....
<b>group 2</b>	.....	.....	...CT..GCT	..T.GTGGGA	G...TG.GAG	T.C...T...	.CA.....C.	.C.....	G.....	.....	..TT
<b>VH3-23</b>	.....	.....	...CT..AGCT	..T.GTGGTA	G...TG..AG	C.C.....C	.CA.....C.	.....	G.....	.....	..TT
<b>group 3.2</b>	C.....	.....	.....AGTT	..TGTT.T.	.....A.	T.....	.CA.....C.	.....	.....	.....	..TT
<b>group 3.1</b>	C.....	.....	.....AGTT	..TCAT.T.	.....A.	T.....	.CA.....C.	.....	.....	.....	..TT
<b>VH3-30</b>	C.....	.....	.....AGTT	..TCAT.T.	.....A.	T.....	.CA.....C.	.....	.....	.....	..TT

**B**

▼

	230	240	250	260	270	280	290
	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
<b>VH3-07</b>	CCAAGAA	CTCACTGTAT	CTGCAAATGA	ACAGCCTGAG	AGCCGAGGAC	ACGGCTGTGT	ATTACTGTGC
<b>group 1</b>	A.....T	G.....A...	.....G	.....	..T...C...	.....CA.T.	.....A...
<b>group 2</b>	..G.A..	..A...A...	.....	.....T.....	.....	.....CA.T.	.....T.....
<b>group 3.1</b>	..G.A..	..A...A...	.....	.....T.....	.....	.....CA.T.	.....T.....
<b>group 3.2</b>	..G.A..	..A...A...	.....	.....T.....	.....	.....CA.T.	.....T.....

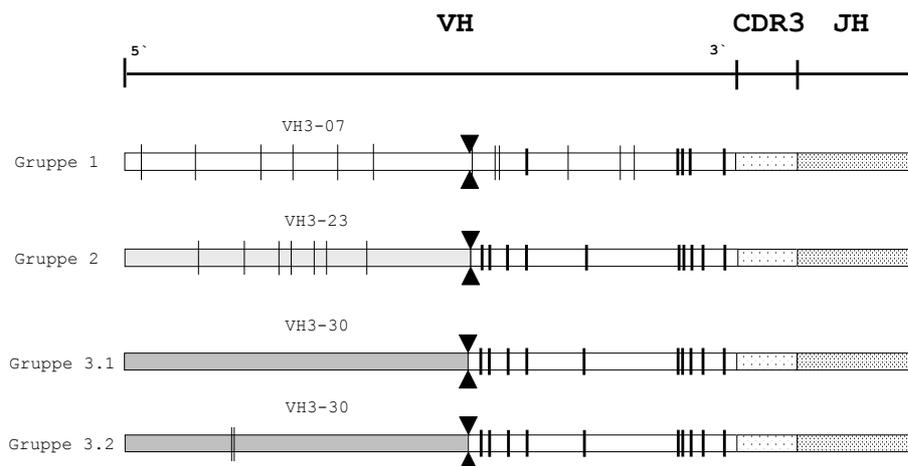
  

	----- CDR3 -----			
	300	310	320	330
	.....	.....	.....	.....
<b>JH5a</b>	.....	.....	.....	.....
<b>group 1</b>	CGTTTCGG	..AG..C..T.....	.....C.....	.....
<b>group 2</b>	CGTTTCGG	..AG..C..T.....	.....C.....	.....
<b>group 3.1</b>	CGTTTCGG	..AG..C..T.....	.....C.....	.....
<b>group 3.2</b>	CGTTTCGG	..AG..C..T.....	.....C.....	.....

Vergleiche der verschiedenen Umlagerungen des Immunglobulin-Schwerkettengens von Fall 4476 untereinander und mit den entsprechenden Keimbahnsequenzen. Legende siehe Seite 68.

repräsentiert, die alle aus verschiedenen PCRs stammten. Die Sequenzen dieser Gruppen hatten die gleiche CDR3/JH Region und den gleichen 3`VH Anteil (Position 224-296), wie Gruppe 2, ihre 5`VH Bereiche (Positionen 126-223) wichen aber deutlich voneinander sowie von denen der Gruppe 2 ab. Die 5`VH Region von Gruppe 1 hatte die größte Homologie zu dem *VH3-07* Keimbahnsegment, die 5`VH Sequenzen der Gruppe 3 waren dem *VH3-30* Segment am ähnlichsten. Die Analyse der Mutationen aller 26 Sequenzen zeigte die gleichen fünf somatischen Mutationen in den 3`VH Bereichen, im Vergleich zu dem *VH3-07* Keimbahnsegment (Abbildung 22B, Abbildung 23). Weitere fünf Mutationen waren identisch in der Gruppe 3 und in den 23 Sequenzen von Gruppe 2. Der 3`VH Anteil der Gruppe 1 enthielt, zusätzlich zu den fünf gemeinsamen Mutationen, sechs weitere Mutationen, die in keiner der Sequenzen der anderen Gruppen zu finden waren. Der Vergleich der unterschiedlichen 5`VH Bereiche mit den jeweiligen Keimbahnsegmenten zeigte sieben weitere Mutationen in den 23 Sequenzen der Gruppe 2. Die Sequenzen der Gruppe 1 enthielten sechs zusätzliche Mutationen zu den elf Mutationen im 3`VH Bereich und die beiden Sequenzen der Gruppe 3, die zehn Mutationen im 3`VH Bereich aufwiesen, enthielten keine (Gruppe 3.1) bzw. zwei (Gruppe 3.2) weitere Mutationen im 5`*VH3-30* Anteil. Dieses Muster an gemeinsamen und individuellen Mutationen (intraklonale Diversität) und der gemeinsame CDR3/JH Bereich weisen, wie im Fall 13, auf eine Verwandtschaft der Sequenzen untereinander hin.

Abbildung 23



#### Schematische Darstellung der Beziehungen zwischen den Sequenzgruppen von Fall 4476.

Gruppe 2 : Konsensus aus 23 Sequenzen

Gruppen 1, 3.1 und 3.2: jeweils eine Sequenz

▼ : wahrscheinliche Bruchstelle für die Hybridbildung

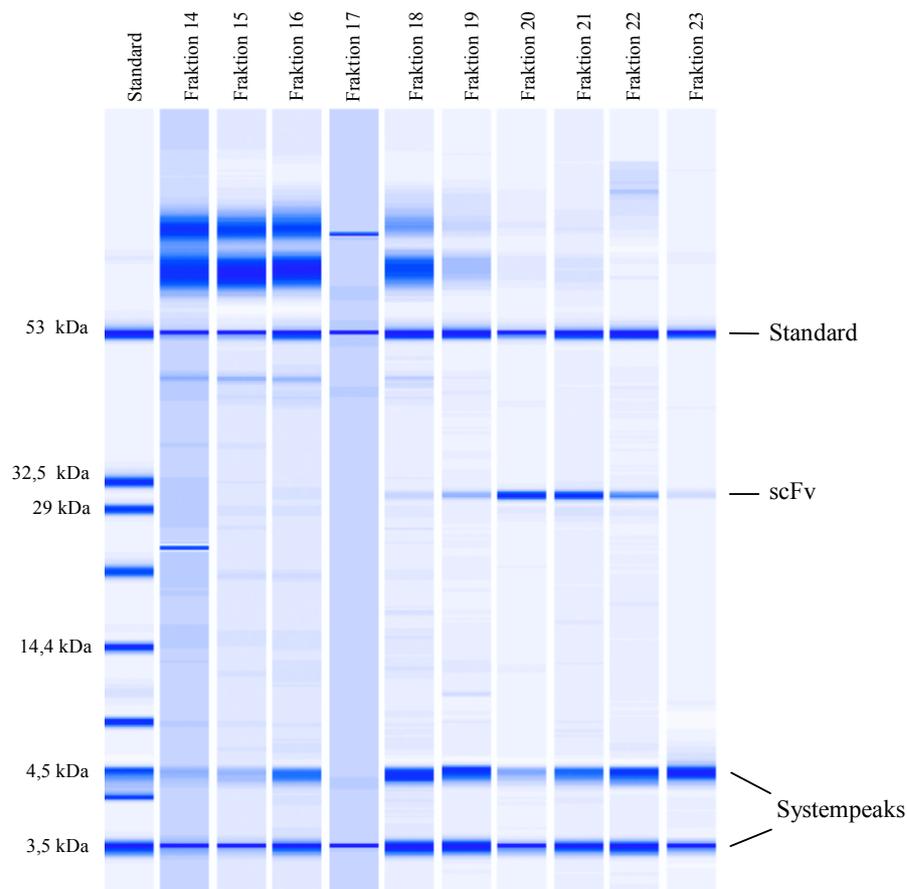
senkrechte Striche repräsentieren somatische Mutationen

fettgedruckte Striche solche somatischen Mutationen, die in allen drei Gruppen auftreten

### 3.2.3 Expression der Tumorumglobulingene als scFv-Antikörper

Die kompletten Immunglobulin-Schwer- und Leichtkettengene wurden zunächst, wie bereits für den BerH2-scFv beschrieben, für jedes der sieben MALT-Lymphome einzeln in den Vektor pIT2 kloniert, der die für den Glycin-Serin Linker kodierende Sequenz enthält. Diese Kassetten wurden anschließend jeweils in den Vektor pMT/BiP/V5-His umkloniert, dieser dann in S2 Zellen transfiziert und die Immunglobulingene als scFvs exprimiert. Die Aufreinigung der daraus resultierenden sieben verschiedenen scFvs aus dem Kulturüberstand der Insektenzellen erfolgte über Nickelchelate-Affinitätschromatographie. Das Ergebnis einer solchen Chromatographie ist beispielhaft für den 1427-scFv in Abbildung 24 dargestellt. Durch das Waschen mit 25 mM Imidazol wurden zunächst Fremdproteine entfernt (Fraktionen 14 – 18) und der scFv dann mit 500 mM Imidazol stark angereichert von der Säule eluiert (Fraktionen 19 – 23). Er ist als Bande von ca. 30 kDa Größe auf dem Gelbild zu erkennen. Die Konzentrationsbestimmung des 1427-scFv in den einzelnen Fraktionen ergab eine Gesamtmenge von 7 mg scFv pro Liter Kulturüberstand. Für die anderen scFvs variierten diese Mengen zwischen 6 und 20 mg pro Liter Kulturüberstand. Abbildung 25 zeigt alle hergestellten scFvs in aufgereinigter Form. Die Größen lagen zwischen 30 und 38 kDa.

Abbildung 24

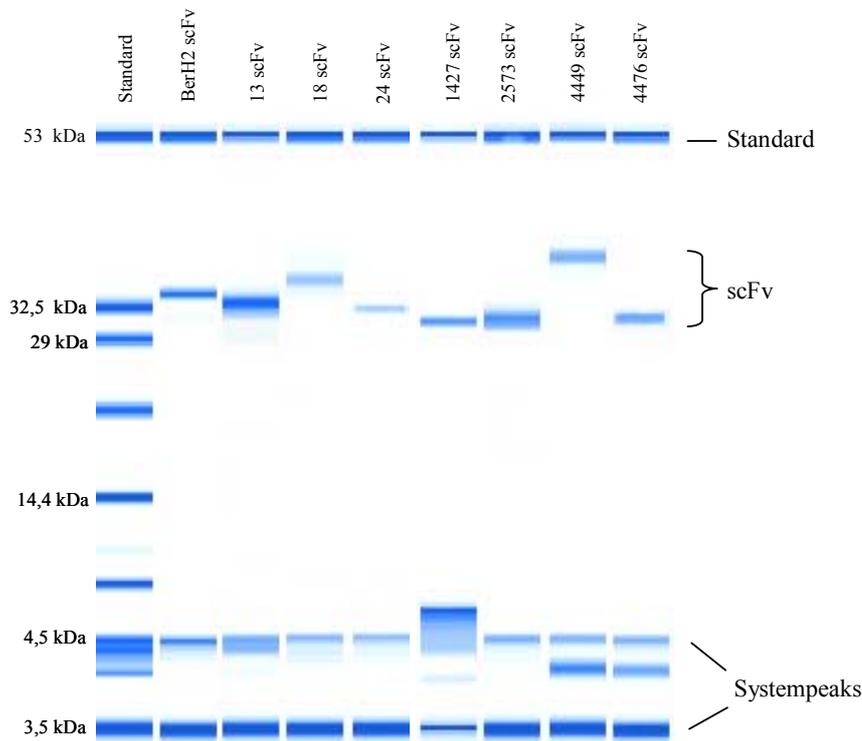


**Darstellung verschiedener Fraktionen der chromatographischen Aufreinigung des 1427-scFv aus dem Kulturüberstand stabil transfizierter Schneider 2 Zellen (simuliertes Gelbild einer Bioanalyser Messung).** Die Signale von 3,5 bis 4,5 kDa sind „Systempeaks“. Die Bande bei 53 kDa repräsentiert einen internen Größen- und Quantifizierungsstandard.

Fractionen 14 - 18: während des Waschens mit 25 mM Imidazol eluierte Proteine

Fractionen 19 - 23: mit 500 mM Imidazol eluierter scFv-Antikörper

Abbildung 25



**Darstellung der sieben verschiedenen, über Affinitätschromatographie aufgereinigten Tumor scFvs-Moleküle und des BerH2-scFv (simuliertes Gelbild einer Bioanalyser Messung).**

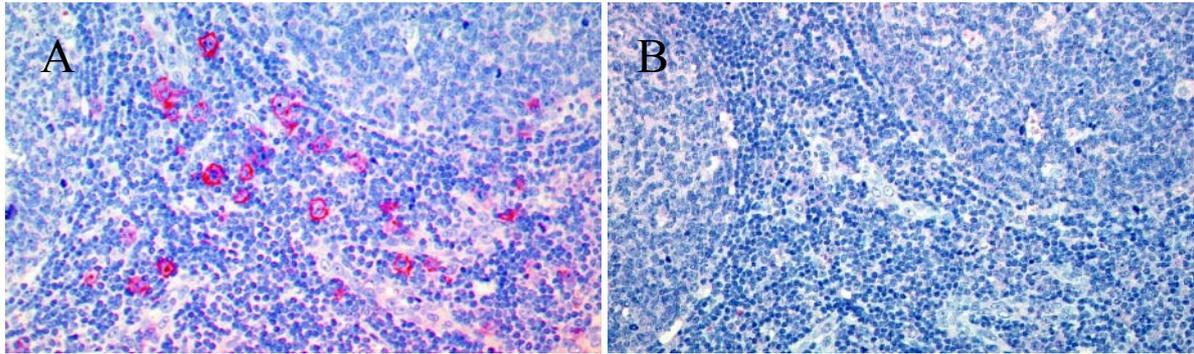
Die Tumor-scFvs haben Größen zwischen 30 und 38 kDa. Die Signale von 3,5 bis 4,5 kDa sind „Systempeaks“. Die bei der Analyse des 1427-scFv zu erkennende Verschiebung der 4,5 kDa Bande in einen anderen Größenbereich liegt an dem höheren Tween-Gehalt des Puffers dieser Probe. Die Bande bei 53 kDa repräsentiert einen internen Größen- und Quantifizierungsstandard.

### 3.3 Immunhistologie

#### 3.3.1 Etablierung des Verstärkersystems

Die immunhistologische Darstellung von Antigenen erfolgt in der Regel durch sensitive Techniken (APAAP, ABC) auf der Basis kompletter Antikörper. Bei der Verwendung von scFvs kann die Bindungsaffinität im Vergleich zu kompletten Antikörpern stark reduziert sein und eine Detektion der darzustellenden Antigene verhindern. Dies konnte ein Vergleich des BerH2-scFv mit dem kompletten murinen BerH2-Antikörper eindrucksvoll demonstrieren (Abbildung 26). Während der komplette Antikörper in einer Tonsille deutlich blastäre lymphatische Zellen markiert (A), ist mit dem BerH2-scFv unter Einsatz gängiger Färbetechniken keine Anfärbung dieser Zellen zu erkennen (B).

Abbildung 26



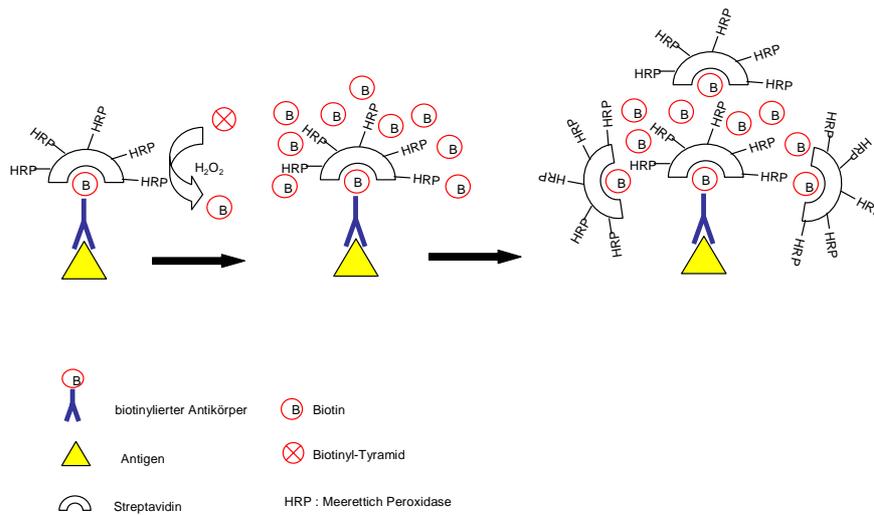
**Immunhistologischer Nachweis des CD30 Antigens mit der Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP) Methode an einer Tonsille (Paraffinmaterial).**

Die beiden Abbildungsteile zeigen den gleichen Ausschnitt von zwei seriellen Schnitten derselben Tonsille. Mit dem murinen BerH2-Antikörper ist eine deutliche Anfärbung CD30-positiver Zellen zu erkennen (A), mit dem BerH2-scFv hingegen lässt sich in dem gleichen Gewebeabschnitt mit der APAAP Methode keine Darstellung der CD30 Expression erzielen (B).

Zur Erhöhung der Sensitivität des immunhistologischen Nachweises der scFvs wurde deshalb in dieser Arbeit ein Verstärkersystem (*Catalyzed Signal Amplification System, CSA, DAKO*) etabliert, das auf der Peroxidase vermittelten Oxidation von Biotinyl-Tyramid zu Biotin basiert. Dadurch wird das am Ort des Antigens zur Detektion verfügbare Biotin vervielfacht (Abbildung 27). Hierfür wird ein an Antigen gebundener biotinylierter Primärantikörper zunächst von einem Komplex aus Streptavidin und Peroxidase detektiert. Die gebundene Peroxidase katalysiert dann die Umwandlung des im nächsten Schritt zugegebenen Biotinyl-Tyramids in zahlreiche Biotinmoleküle und amplifiziert auf diese Weise das Biotin am Ort der Antigen-Antikörper Bindung. Danach wird erneut ein Streptavidin-Peroxidase Komplex zugegeben, der an die entstandenen Biotinmoleküle bindet und die Färbung anschließend durch ein chromogenes Peroxidase Substrat, das zur Entwicklung eines braunen Niederschlags am Ort des Antigens führt, abgeschlossen.

Durch diese Methode wurde die Sensitivität des immunhistologischen Nachweises mehrere hundertmal gesteigert und eine deutliche, in der Signalintensität mit dem murinen BerH2-Antikörper vergleichbare oder sogar stärkere, Darstellung des CD30 Antigens durch den BerH2-scFv im normalen lymphatischen Gewebe erreicht (Abbildung 28). Eine Signalverstärkung um mehrere hundertmal birgt allerdings auch die Gefahr der Darstellung von unspezifischen Signalen, die bei Verwendung von unverstärkten Nachweissystemen unterhalb des Detektionsniveaus liegen.

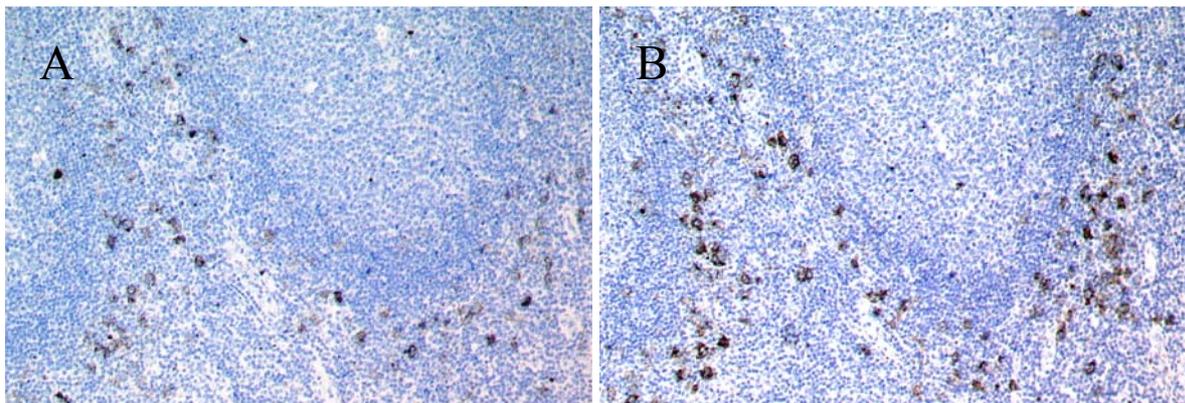
Abbildung 27



**Schematische Darstellung des immunhistologischen Verstärkersystems (*Catalyzed Signal Amplification System, CSA, DAKO*).**

Diese unspezifischen Signale werden hauptsächlich durch endogenes Biotin und Avidin sowie endogene Peroxidasen verursacht, können darüber hinaus aber auch durch eine geringe unspezifische Bindung von Sekundärreagenzien entstehen. Dies war in den ersten Experimenten der Fall, in denen zum Nachweis der scFvs ein Antikörper gegen das V5-Epitop am C-Terminus des scFv und ein biotinylierter Brückenantikörper verwendet wurden.

Abbildung 28

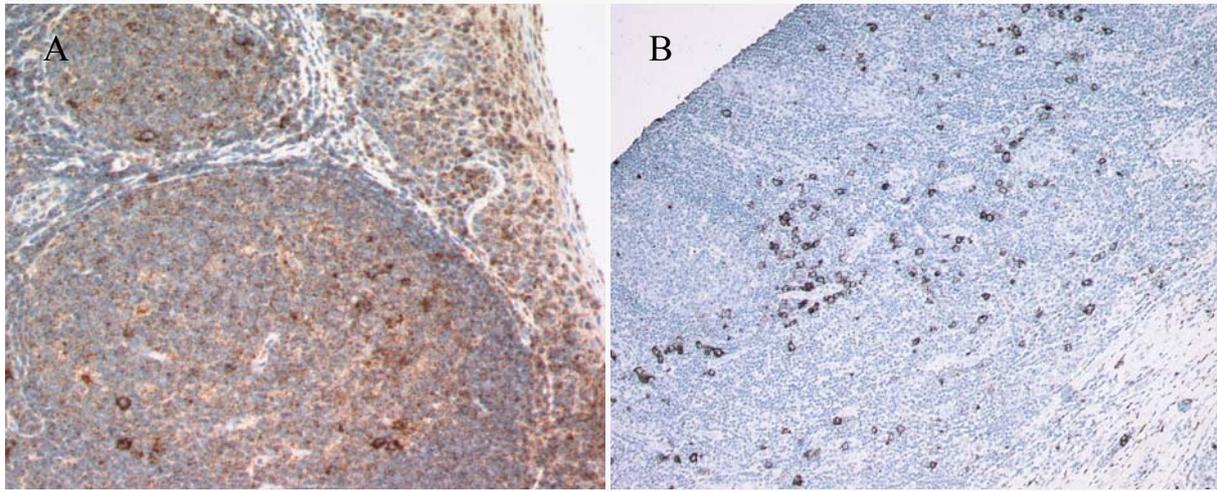


**Immunhistologischer Nachweis des CD30 Antigens mit der CSA Methode an einer Tonsille (Paraffinmaterial).**

Die beiden Abbildungsteile zeigen serielle Schnitte derselben Tonsille, sowie den gleichen Bildausschnitt. Die Verwendung des CSA Verstärkersystems ermöglichte eine dem murinen BerH2 Antikörper (A) entsprechende Darstellung CD30-positiver Zellen durch den BerH2-scFV (B).

Wie Abbildung 29A zeigt, kommt es durch die beiden sekundären Antikörper zu einem starken braunen Hintergrund, zu dem auch die noch nicht optimierte Blockierung des endogenen Biotin, Avidin und der endogenen Peroxidasen beiträgt.

**Abbildung 29**



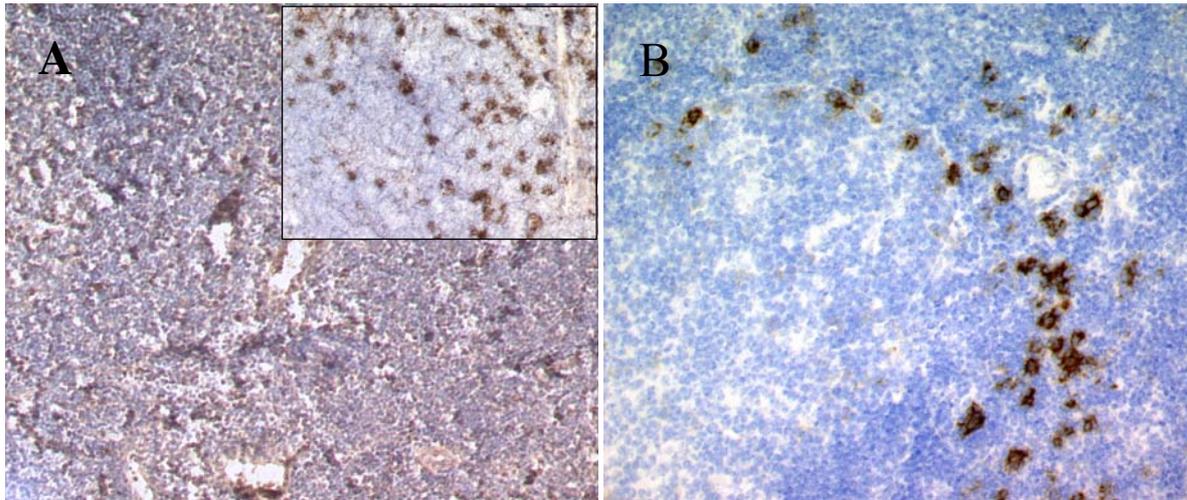
**Optimierung der CSA Methode.**

Färbung einer Tonsille (Paraffinmaterial) mit dem BerH2-scFv. A: Färbung mit kurzer Peroxidase Blockade (5 min) und ohne Biotin-Avidin Blockierung; Nachweis des BerH2-scFv durch Sekundärreagenzien (anti-V5-Antikörper, biotinylierter Brückenantikörper), B: optimierte Färbung mit verlängerter Peroxidase Blockade (2 x 15 min), Biotin-Avidin Blockierung und Nachweis des biotinylierten BerH2-scFv durch Streptavidin-HRP. Die optimierte Färbung ist fast frei von Hintergrund und zeigt wesentlich deutlichere Signale als (A).

Nach der Optimierung der Blockierung und dem Wegfall der sekundären Antikörper durch eine direkte Biotinmarkierung der scFvs, wies die Färbung dagegen keinerlei Hintergrund mehr auf und die markierten Zellen traten deutlich hervor (Abbildung 29B).

Bei der Anwendung dieser optimierten Verstärkertechnik an Gefrierschnitten war der Erhalt der Zellmorphologie ein kritischer Punkt. Die normalerweise zur Blockierung endogener Peroxidasen verwendete  $H_2O_2$ -Lösung griff das Gewebe stark an. Die Morphologie der einzelnen Zellen war kaum noch zu erkennen und die durch den BerH2-scFv erhaltenen Signale nur als diffuse braune Flecken sichtbar (Abbildung 30A). Durch Umstellung auf die Glucoseoxidasemethode, bei der das  $H_2O_2$  langsam, und damit gewebeschonend durch eine enzymatische Reaktion entsteht, konnte die Zellmorphologie weitgehend erhalten werden und die Färbung des membranständigen CD30 Antigens war deutlich zu erkennen (Abbildung 30B). Auf diese Weise konnten am Gefrierewebe die Signale des BerH2-scFv mehrere hundertmal verstärkt und eine dem kompletten murinen BerH2 Antikörper identische Signalintensität erreicht werden.

Abbildung 30



**Einfluss von zwei verschiedenen Peroxidase Blockierungsmethoden auf die Morphologie von Gefriergewebe (Tonsille).**

Die Färbung wurde mit dem BerH2-scFv und der optimierten CSA Methode durchgeführt. Die Blockierung endogener Peroxidasen mit  $H_2O_2$  (A) ist weniger effektiv und das Gewebe wird deutlich mehr in Mitleidenschaft gezogen, als durch die Glukoseoxidasemethode (B).

Die in diesem Abschnitt dokumentierte erfolgreiche und sensitive Darstellung des CD30 Antigens durch den BerH2-scFv war eine notwendige Basis für die Experimente mit den Tumor-scFvs. Da über deren potenziellen Bindungspartner keinerlei Informationen vorlagen, war der Einsatz eines empfindlichen Detektionssystems äußerst wichtig. Der mit der CSA Methode erreichte große Verstärkungseffekt verdeutlichte aber auch die Notwendigkeit der vorsichtigen Einschätzung und Überprüfung von positiven Signalen.

### 3.3.2 Färbung von Normalgeweben

#### 3.3.2.1 Paraffinmaterial

Mit Hilfe des optimierten CSA Verstärkersystems wurde die Reaktivität der Tumor-scFvs zunächst an 21 verschiedenen Formalin fixierten und Paraffin eingebetteten Normalgeweben untersucht (Tabelle 2). In den Geweben des Gastrointestinaltraktes kam es häufig zu einer unspezifischen, auch in der Negativkontrolle bzw. in der BerH2-Kontrolle vorhandenen, Anfärbung von einzelnen Granulozyten, Drüsenzellen und weiteren vereinzelt auftretenden Zellen. In der BerH2-scFv Kontrolle kam es zusätzlich, wie erwartet, zu einer Anfärbung

CD30-positiver Blasten in den Geweben mit lymphatischen Anteilen (Tonsille, Dünndarm). Der einzige scFv, der eine spezifische, reproduzierbare Anfärbung bestimmter Zellarten

Tabelle 2

Gewebe	Färbemuster								
	Negativ Kontrolle	BerH2 scFv	13 scFv	18 scFv	24 scFv	1427 scFv	2573 scFv	4449 scFv	4476 scFv
Tonsille <sup>1</sup>	-	blastäre, lymphatische Zellen	-	-	-	Subpopulation von Plasmazellen	-	-	Subpopulation von Plasmazellen
Milz <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Speicheldrüse	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ösophagus	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Magen <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dünndarm <sup>4</sup>	-	blastäre, lymphatische Zellen	-	-	-	-	-	-	-
Duodenum	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dickdarm <sup>5</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Appendix	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Niere	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nebenniere	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoden	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prostata	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Uterus	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ovar	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Schilddrüse <sup>6</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Weichgewebe (Nerv)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leber	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lunge	-	-	-	-	-	-	-	-	-
quergestreifte Muskulatur	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Haut	-	-	-	-	-	-	-	-	-

#### Übersicht über die gefärbten Normalgewebe (Paraffinmaterial) mit Angabe der Färbemuster der verschiedenen scFvs und Kontrollen.

Als „unspezifische Färbung“ bezeichnete Signale waren auch in der Negativkontrolle (Färbung ohne Antikörper) bzw. mit der BerH2-scFv Kontrolle zu beobachten. Die Gewebe waren zu einem Gewebearray zusammengestellt (Biochip, Prof. A. C. Feller, Universitätsklinikum Lübeck); Tonsille, Milz, Dünndarm und Schilddrüse wurden außerdem noch als Einzelschnitte gefärbt.

-: keine spezifischen Signale

<sup>1</sup>: unspezifische Färbung einzelner Granulozyten und weiterer vereinzelter Zellen im umgebenden Muskelgewebe

<sup>2</sup>: unspezifische Färbung von vereinzelter lymphatischer Zellen

<sup>3</sup>: unspezifische Färbung einzelner Drüsenzellen, Granulozyten und weiterer vereinzelter Zellen im umgebenden Muskelgewebe

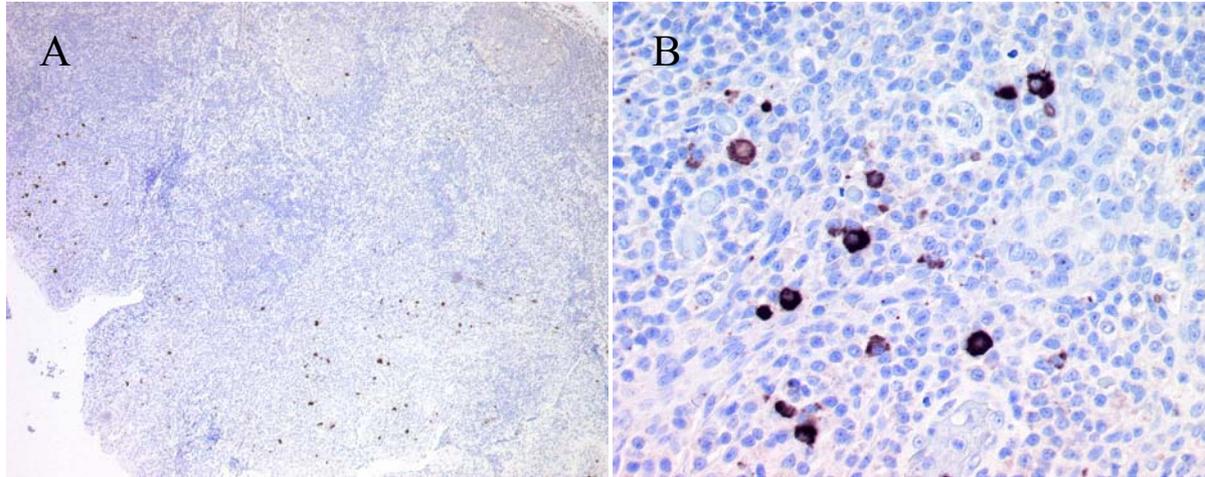
<sup>4</sup>: unspezifische Färbung einzelner Zellen im Drüsenbereich und von einzelnen Granulozyten und weiterer vereinzelter Zellen im umgebenden Muskelgewebe

<sup>5</sup>: unspezifische Färbung von einzelnen Drüsenzellen und weiterer vereinzelter Zellen im Drüsenbereich

<sup>6</sup>: unspezifische Färbung der Follikellumina

zeigte, war der 1427-scFv. Mit diesem scFv ließ sich in Gewebeschnitten von Tonsillen eine kräftige Anfärbung von Zellen mit der Morphologie von Plasmazellen beobachten, die weder mit der BerH2-scFv Kontrolle noch mit einem der anderen 6 scFvs sichtbar war (Abbildung 31).

**Abbildung 31**

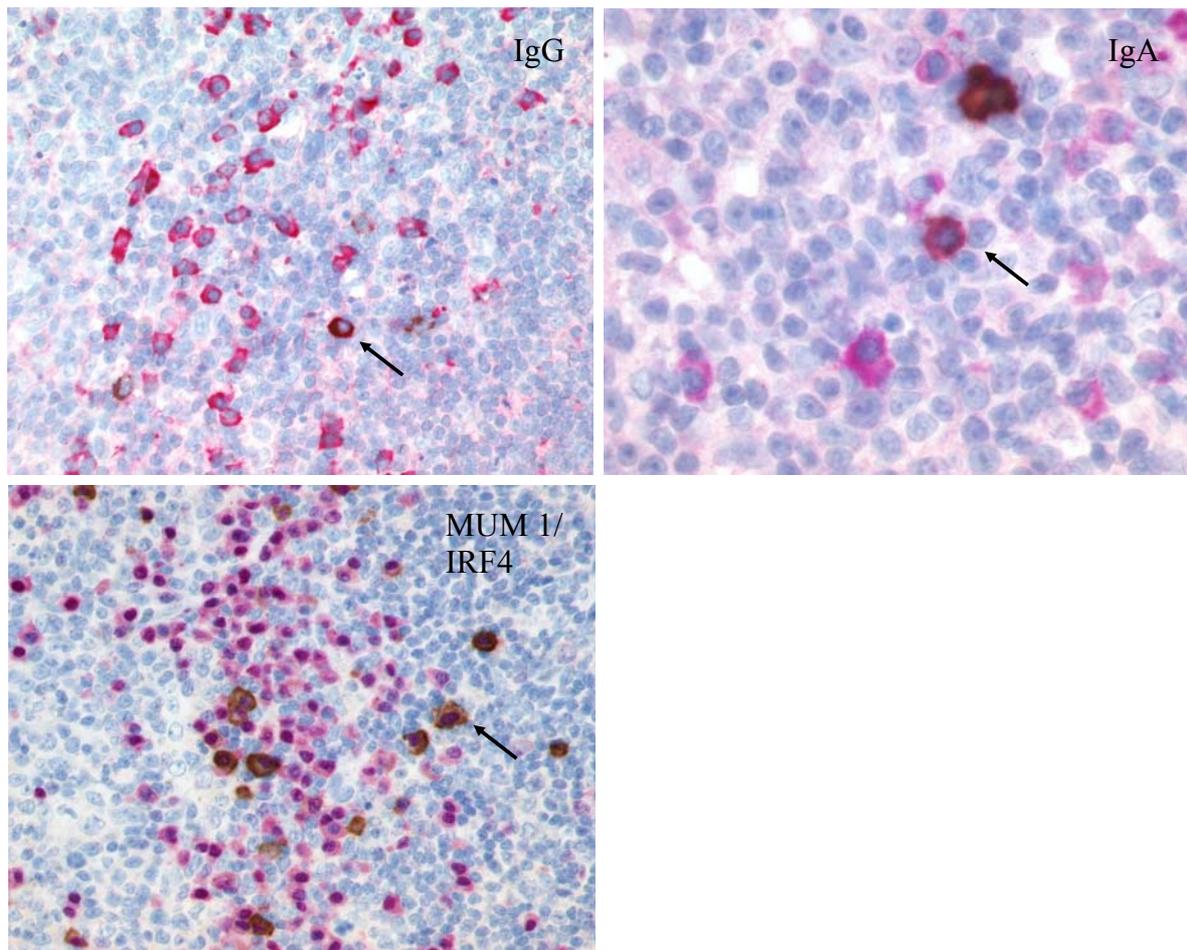


**Immunhistologische Färbung einer Tonsille (Paraffinmaterial) mit dem 1427-scFv.**

(A) Übersicht und (B) im Detail; das Verteilungsmuster und die Morphologie der gefärbten Zellen entsprechen Plasmazellen.

Um mehr Informationen über die Identität der gefärbten Zellen zu erhalten, wurden Färbungen mit dem 1427-scFv zusammen mit einem Antikörper gegen den Plasmazell-spezifischen Transkriptionsfaktor MUM1/IRF4 (Multiple Myeloma Oncogene 1/Interferon Regulatory Factor 4) durchgeführt. Alle mit dem 1427-scFv angefärbten Zellen wiesen auch eine Färbung mit dem MUM1/IRF4 Antikörper auf. Anhand dieser Doppelmarkierung konnten die durch den 1427-scFv markierten Zellen als Plasmazellen identifiziert werden. Weitere Färbungen, in denen zusätzlich zu dem 1427-scFv je ein Plasmazellsubpopulation spezifischer Antikörper (anti-IgA, -IgD, -IgE, -IgG, -IgM) verwendet wurde, sollten zeigen, ob der 1427-scFv Plasmazellen eines bestimmten Subtyps erkennt. In den anti-IgG bzw. anti-IgA Antikörper Doppelfärbungen waren in den Tonsillenschnitten einige doppelt markierte Zellen zu erkennen (Abbildung 32). Eine Doppelmarkierung mit anti-IgD, -IgE und -IgM Antikörpern und dem 1427-scFv war nicht eindeutig nachweisbar. Diese Ergebnisse zeigten, dass der 1427-scFv nicht eine einzige Immunglobulinsubklasse darstellt, sondern ein Subtypen unabhängiges Antigen erkennt.

Abbildung 32



**Doppelmarkierungen von Tonsillen mit dem 1427-scFv (braun) und Antikörpern gegen Plasmazellen der Immunglobulinklassen G bzw. A und den Plasmazell-spezifischen Transkriptionsfaktor MUM1/IRF4 (rot).**

Einige doppelt markierte Zellen sind beispielhaft durch einen Pfeil gekennzeichnet.

### 3.3.2.2 Gefriermaterial

Da die Formalinfixierung zur Denaturierung von Antigenen führt, wurde der Nachweis der potenziell von den Tumor-scFvs erkannten Antigene auch auf Gefriermaterial ausgedehnt, in dem die Antigene weitgehend in nativer Form vorhanden sind. Eine Zusammenstellung der gefärbten Gewebe und entsprechenden Färbemuster findet sich in Tabelle 3. In Übereinstimmung mit den Färbungen am Paraffinmaterial, wurden mit der BerH2-scFv Kontrolle blastäre lymphatische Zellen angefärbt. Die in den anderen Geweben vorkommenden Signale konnten, da sie auch in den Kontrollen vorhanden waren, als unspezifisch identifiziert werden und entsprachen den bereits im Paraffinmaterial

beobachteten Färbemustern. Signale, die auf eine spezifische Reaktivität der Tumor-scFvs gegenüber den Geweben gedeutet hätten, traten nicht auf.

**Tabelle 3**

Gewebe	Färbemuster								
	Negativ Kontrolle	BerH2 scFv	13 scFv	18 scFv	24 scFv	1427 scFv	2573 scFv	4449 scFv	4476 scFv
Tonsille	-	blastäre lymphatische Zellen	-	-	-	-	-	-	-
Milz	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lunge	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Plazenta	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoden	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mamma	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Magen <sup>1</sup>	-	blastäre lymphatische Zellen	-	-	-	-	-	-	-
Schilddrüse <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pankreas	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Leber	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Haut	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Niere <sup>3</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dünndarm <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dickdarm <sup>4</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Übersicht über die 14 gefärbten Normalgewebe (Gefriermaterial) mit Angabe der Färbemuster der verschiedenen scFvs und Kontrollen.**

Als „unspezifische Färbung“ bezeichnete Signale waren auch in der Negativkontrolle (Färbung ohne Antikörper) bzw. mit der BerH2-scFv Kontrolle zu beobachten.

-: keine spezifischen Signale

<sup>1</sup>: unspezifische Färbung von Drüsenzellen

<sup>2</sup>: unspezifische Färbung der Follikellumina

<sup>3</sup>: unspezifische Färbung der Glomeruli

<sup>4</sup>: unspezifische Färbung von Drüsenzellen und einzelnen Granulozyten und weiterer vereinzelter Zellen im umgebenden Muskelgewebe

### 3.3.3 Färbung von MALT-Lymphom Gewebe

#### 3.3.3.1 Paraffinmaterial

Um zu untersuchen, ob die Tumor-scFvs Strukturen in MALT-Lymphomen erkennen, wurden Färbungen an Paraffinschnitten von vier Magen MALT-Lymphomen durchgeführt. Dabei handelte es sich um die Lymphome, aus deren Tumorzellen die scFvs 1427, 2573, 4449 und 4476 hergestellt worden waren. Die immunhistologische Färbung dieser Tumorgewebe mit

der BerH2-scFv Kontrolle zeigte, wie erwartet, in allen vier Fällen die Anfärbung von blastären lymphatischen Zellen. Auch die in den Normalgeweben aufgetretenen unspezifischen Färbungen von Drüsenzellen und einzelnen Granulozyten und weiterer vereinzelter Zellen konnte erneut beobachtet werden (Tabelle 4). Von den Tumor-scFvs zeigte keiner eine Reaktivität gegenüber Strukturen der Lymphomgewebe.

Tabelle 4

Gewebe	Färbemuster								
	Negativ Kontrolle	BerH2 scFv	13 scFv	18 scFv	24 scFv	1427 scFv	2573 scFv	4449 scFv	4476 scFv
1427 <sup>1</sup>	-	blastäre lymphatische Zellen	-	-	-	-	-	-	-
2573 <sup>1</sup>	-	blastäre lymphatische Zellen	-	-	-	-	-	-	-
4449 <sup>1</sup>	-	blastäre lymphatische Zellen.	-	-	-	-	-	-	-
4476 <sup>1</sup>	-	blastäre lymphatische Zellen	-	-	-	-	-	-	-

**Färbemuster der verschiedenen scFvs und Kontrollen an den 4 Magen MALT-Lymphom Fällen (Paraffinmaterial), aus denen die scFvs 1427, 2573, 4449 und 4476 generiert wurden.**

Als „unspezifische Färbung“ bezeichnete Signale waren auch in der Negativkontrolle (Färbung ohne Antikörper) bzw. mit der BerH2-scFv Kontrolle zu beobachten.

- : keine spezifischen Signale

<sup>1</sup>: unspezifische Färbung von Drüsenzellen und einzelnen Granulozyten und vereinzelter weiterer Zellen im Drüsenbereich, sowie im umgebenden Muskelgewebe

### 3.3.3.2 Gefriermaterial

Entsprechend den Normalgeweben, wurden auch die Färbungen der vier MALT-Lymphome, die zur Herstellung der scFvs 1427, 2573, 4449 und 4476 verwendet worden waren, nicht nur am Paraffinmaterial, sondern auch an Gefrierschnitten durchgeführt (Tabelle 5). Die BerH2-scFv Kontrolle färbte wie am Paraffinmaterial blastäre lymphatische Zellen. Auch die unspezifische Anfärbung der Drüsenzellen, einzelnen Granulozyten und vereinzelter weiterer Zellen trat erneut auf. Die Tumor-scFvs zeigten auch unter diesen Versuchsbedingungen keine Reaktion mit Strukturen im Tumorgewebe.

Tabelle 5

Gewebe	Färbemuster								
	Negativ Kontrolle	BerH2 scFv	13 scFv	18 scFv	24 scFv	1427 scFv	2573 scFv	4449 scFv	4476 scFv
1427 <sup>1</sup>	-	blastäre lymphatische Zellen	-	-	-	-	-	-	-
2573 <sup>1</sup>	-	blastäre lymphatische Zellen	-	-	-	-	-	-	-
4449 <sup>1</sup>	-	blastäre lymphatische Zellen	-	-	-	-	-	-	-
4476 <sup>1</sup>	-	blastäre lymphatische Zellen	-	-	-	-	-	-	-

**Färbemuster der verschiedenen scFvs und Kontrollen an den 4 Magen MALT-Lymphom Fällen (Gefriermaterial), aus denen die scFvs 1427, 2573, 4449 und 4476 generiert wurden.**

Als „unspezifische Färbung“ bezeichnete Signale waren auch in der Negativkontrolle (Färbung ohne Antikörper) bzw. mit der BerH2-scFv Kontrolle zu beobachten.

-: keine spezifischen Signale

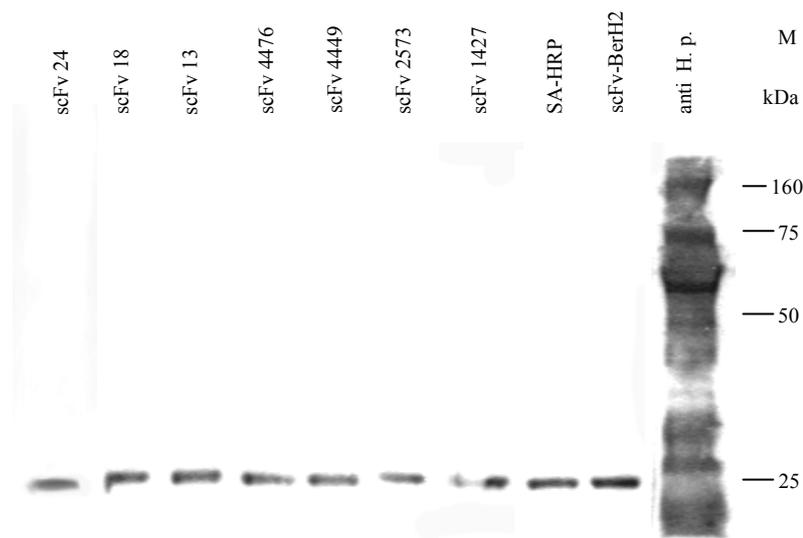
<sup>1</sup>: unspezifische Färbung von Drüsenzellen und einzelnen Granulozyten und vereinzelter weiterer Zellen im Drüsenbereich, sowie im umgebenden Muskelgewebe

### 3.4 Reaktivität der Tumor-scFvs gegenüber *Helicobacter pylori*

#### 3.4.1 Western Blot

Die Reaktivität der Tumor-scFvs gegenüber *Helicobacter pylori* wurde zunächst im Western Blot untersucht. Die aus den Bakterienzellen extrahierten Proteine wurden dazu sowohl in nativer, als auch in denaturierter Form eingesetzt. Im denaturierten Proteinextrakt konnte in allen Spuren ein Signal von ca. 25 kDa detektiert werden (Abbildung 33). Die Kontrollinkubation mit Streptavidin-HRP zeigte aber, dass dieses Signal auf eine unspezifische Bindung des Streptavidin-HRPs an eines der Proteine zurückzuführen war. Eine spezifische Reaktion der Tumor-scFvs war nicht zu erkennen.

Abbildung 33



**Western Blot eines denaturierten *Helicobacter pylori* Proteinextraktes.**

Pro Spur wurden 30 µg Protein aufgetragen und jeweils mit einem scFv (0,5 µg/ml) bzw. mit dem anti-*Helicobacter* Antikörper (1:1000) oder Streptavidin-HRP (1:1000) inkubiert.

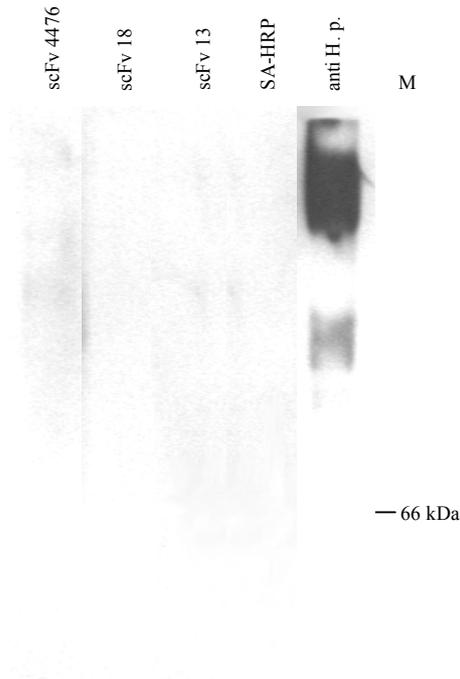
M: Proteinstandard, mit Angabe der Größen (kDa) der einzelnen Proteine

anti H. p.: polyklonaler Kaninchen anti-*Helicobacter pylori* Antikörper

SA-HRP: Streptavidin-Merrettich Peroxidase Konjugat

Gegenüber nativen Proteinen von *Helicobacter pylori* zeigte sich ein ähnliches Bild wie für die denaturierten Proteine (Abbildung 34). Es waren keine Signale sichtbar, die auf eine Bindung der Tumor-scFvs an Proteine von *Helicobacter* gedeutet hätten. Die nach Inkubation mit dem scFv 4476 schwach sichtbaren Banden konnten in einem Wiederholungsexperiment dem Streptavidin-HRP zugeordnet werden.

Abbildung 34



#### Western Blot eines nativen *Helicobacter pylori* Proteinextraktes.

Die dargestellte Färbung mit den drei scFvs 4476, 13 und 18 repräsentiert auch die Reaktivität der anderen scFvs. Pro Spur wurden 30 µg Protein aufgetragen und jeweils mit einem scFv (2 µg/ml) bzw. mit dem anti-*Helicobacter* Antikörper (1:10.000) oder Streptavidin-HRP (1:1000) inkubiert.

M: BSA (66 kDa, pI = 4,8)

anti H. p.: polyklonaler Kaninchen anti-*Helicobacter pylori* Antikörper

SA-HRP: Streptavidin-Meerrettich Peroxidase Konjugat

### 3.4.2 Immunhistologie

Die Reaktivität der Tumor-scFvs gegenüber *Helicobacter pylori* wurde zusätzlich an *Helicobacter pylori*-positiven Magenbiopsaten überprüft. Diese Experimente konnten nur an Paraffinmaterial durchgeführt werden, da das Bakterium in Gefrierschnitten aufgrund der fehlenden Fixierung von tiefgefrorenen Gewebeproben nicht nachweisbar war. In Tabelle 6 sind die an fünf verschiedenen, in Formalin fixierten, Fällen beobachteten Färbemuster aufgeführt.

Tabelle 6

Gewebe	Färbemuster								
	Negativ Kontrolle	BerH2 scFv	13 scFv	18 scFv	24 scFv	1427 scFv	2573 scFv	4449 scFv	4476 scFv
1558/ 97 <sup>1</sup>	-								
11740/ 97 <sup>1</sup>	-	blastäre lymphatische Zellen	-	-	-	-	-	-	-
15981/ 97 <sup>1</sup>	-	blastäre lymphatische Zellen	-	-	-	-	-	-	-
18995/ 97 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20212/ 97 <sup>1</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Färbemuster der verschiedenen scFvs und Kontrollen an fünf *Helicobacter pylori* positiven Magenbiopsaten (Paraffinmaterial).**

Als „unspezifische Färbung“ bezeichnete Signale waren auch in der Negativkontrolle (Färbung ohne Antikörper) bzw. mit der BerH2-scFv Kontrolle zu beobachten.

-: keine spezifischen Signale

<sup>1</sup>: unspezifische Färbung von Drüsenzellen und einzelnen Granulozyten und anderen Zellen im Drüsenbereich und im umgebenden Muskelgewebe

Wie bereits in den anderen immunhistologischen Färbungen, zeigte sich auch hier oft die Anfärbung von Drüsenzellen und einzelnen Granulozyten und anderen Zellen, die aber aufgrund ihres gleichzeitigen Vorkommens in den Kontrollen als unspezifisch identifiziert wurde. Der BerH2-scFv markierte in zwei Fällen lymphatische Blasten. In den anderen Fällen war diese Färbung nicht zu sehen, da die Schnittebene ausschließlich im Drüsenbereich lag, in dem keine blastären lymphatischen Zellen vorhanden waren. Spezifische Signale der Tumor-scFvs waren in den Magenbiopsaten nicht nachweisbar.

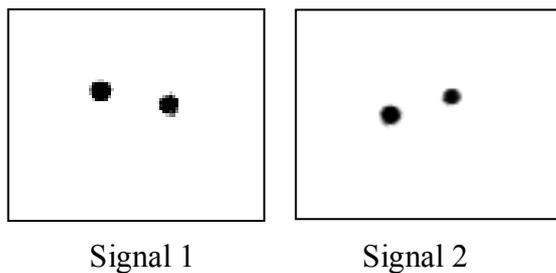
### **3.5 Reaktivität der Tumor-scFvs gegenüber einer exprimierten cDNA Bibliothek aus humanem fötalem Gehirngewebe (Proteinfilter)**

In fötalem Gehirngewebe wird aufgrund der noch nicht ausgeprägten Differenzierung ein breites Spektrum an Proteinen exprimiert. Die vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (RZPD) vertriebenen Proteinfilter, ein Set aus zwei PVDF-Membranen, auf die insgesamt 27.648 Proteine aus diesem Gewebe aufgebracht wurden, eigneten sich deshalb gut, um potenzielle Bindungspartner der Tumor-scFvs zu identifizieren. Bei den Proteinen handelt es sich um in *E.coli* exprimierte Fragmente einer redundanten cDNA Bibliothek aus humanem fötalem Gehirngewebe, die auf die Membranen „gespottet“

wurden. Im Falle der Bindung eines scFv an eines dieser Proteine, kann man aufgrund der Spot Koordinaten des Proteins auf dem Filter den zugehörigen cDNA Klon identifizieren, sequenzieren und in Datenbanken nach der Identität des Gens suchen.

Die Filter wurden mit den scFvs 13, 18, und 1427 inkubiert, wobei der Nachweis jeweils über das V5-Epitop der scFvs erfolgte. Zur Kontrolle wurden die Experimente auch nur mit den Sekundärreagenzien (anti-V5 Antikörper, anti-Maus HRP Antikörper) und ohne scFv durchgeführt, wobei reproduzierbar fünf Signale auftraten. Dies waren auch die einzigen Signale, die nach den Inkubationen mit den scFvs 13 und 18 auf den Filtern zu sehen waren. Es gab also keine spezifischen Bindungen dieser Antikörper an eines der aufgetragenen Proteine. Im Gegensatz dazu zeigte der 1427-scFv zwei Bindungen, die nicht auf die Sekundärreagenzien zurückzuführen waren (Abbildung 35). Eine Wiederholung des Experimentes bestätigte das Ergebnis.

**Abbildung 35**



**Färbung der Proteinfilter mit dem 1427-scFv**

Die Abbildung zeigt jeweils die Ausschnitte der Filter, die nach Inkubation mit dem 1427-scFv (10µg/ml) ein spezifisches Signal zeigten. Die doppelten Punkte jedes Signals entstehen durch das zweifache Auftragen jedes cDNA Klon auf die Filter. Nur wenn beide Spots ein Signal ergeben ist dieses spezifisch.

Nach der Identifizierung und Sequenzierung der beiden zugehörigen cDNA Klone stellte sich heraus, dass beide Klone in ihrer Sequenz identisch waren. Die Eingabe der Konsensus Sequenz in die Nukleotid Sequenz Datenbank *nr* des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) ergab eine Übereinstimmung von 100 % bzw. 99 % zu drei Datenbankeinträgen (AF151884, BC005187, AF161504). Bei diesen drei Sequenzen handelte es sich jeweils um die mRNA Sequenz des gleichen Gens, das auf Chromosom 1 im Locus 1q23.1 lokalisiert ist. Homologe dieses Gens finden sich in der Maus und in der Ratte (je 91 % Ähnlichkeit). Die mRNA wird laut Literatur im humanen Gewebe ubiquitär exprimiert, eine Überexpression konnte in Plasmazelllinien und in Mammakarzinomen, die eine relativ große Plasmazell-Beimischung aufwiesen, beobachtet werden. Sie kodiert für ein potenzielles Protein das als CGI-126 Protein oder als HSPC155 Protein bezeichnet wird, dessen Funktion aber nicht bekannt ist. Die große Homologie zu

Maus und Ratte bleibt auf der Proteinebene erhalten (98 %) und auch in anderen Organismen sind Proteine ähnlicher Sequenz vorhanden (*Anopheles gambiae* 80 % Homologie, *Drosophila melanogaster* 79 %, *Caenorhabditis elegans* 71 %, *Arabidopsis thaliana* 66 %). Das homologe Maus Protein enthält Strukturelemente eines Ubiquitin-konjugierenden Enzyms (E2) und der daraufhin vorgenommene Vergleich der translatierten Sequenz des cDNA Klons mit der *Protein families database of alignments and HMMs* (Pfam, <http://www.sanger.ac.uk/software/Pfam>) bestätigte das Vorkommen dieser funktionellen Domäne. Zu anderen humanen Ubiquitin-konjugierenden Enzymen zeigte der cDNA Klon weder auf DNA- noch auf Proteinebene eine Homologie.

### **3.6 Reaktivität der Tumor-scFvs gegenüber einer Peptidbibliothek (Peptidarray)**

Der Peptidarray bot, wie die Proteinfiler, durch die definierte Position jedes Peptidspots die Möglichkeit von einem detektierten Signal direkt zu einer Sequenzinformation, in diesem Fall einer Aminosäuresequenz, zu gelangen.

Zur Auswertung, die von Armin Weiser (Institut für Medizinische Immunologie, Campus Mitte, Charité-Universitätsmedizin Berlin) mit Hilfe der Genespotter Software (Microdiscovery, Berlin) durchgeführt wurde, wurde jeweils eine Inkubation von Membran A und B mit dem 4476-scFv herangezogen. Das Ergebnis der Inkubation von Membran A mit dem 4476-scFv ist in Abbildung 36 dargestellt. Die Signale, die sich zwischen der Kontrollinkubation (anti-His-HRP) und der Inkubation mit dem 4476-scFv unterscheiden, sind mit einem roten Kreis markiert. Die anderen Signale stammen entweder vom anti-His-HRP Antikörper oder wurden aufgrund ihrer geringen Signalstärke als nicht signifikant gewertet. Als 4476-scFv spezifisch gewertet wurden aber nur solche Signale, die sich sowohl auf Membran A, als auch auf Membran B von der Negativkontrolle unterschieden, also reproduzierbar waren. Insgesamt wurden 9 Peptide als potenzielle Bindungspartner des 4476-scFv identifiziert. Sie sind in Tabelle 7 aufgelistet.

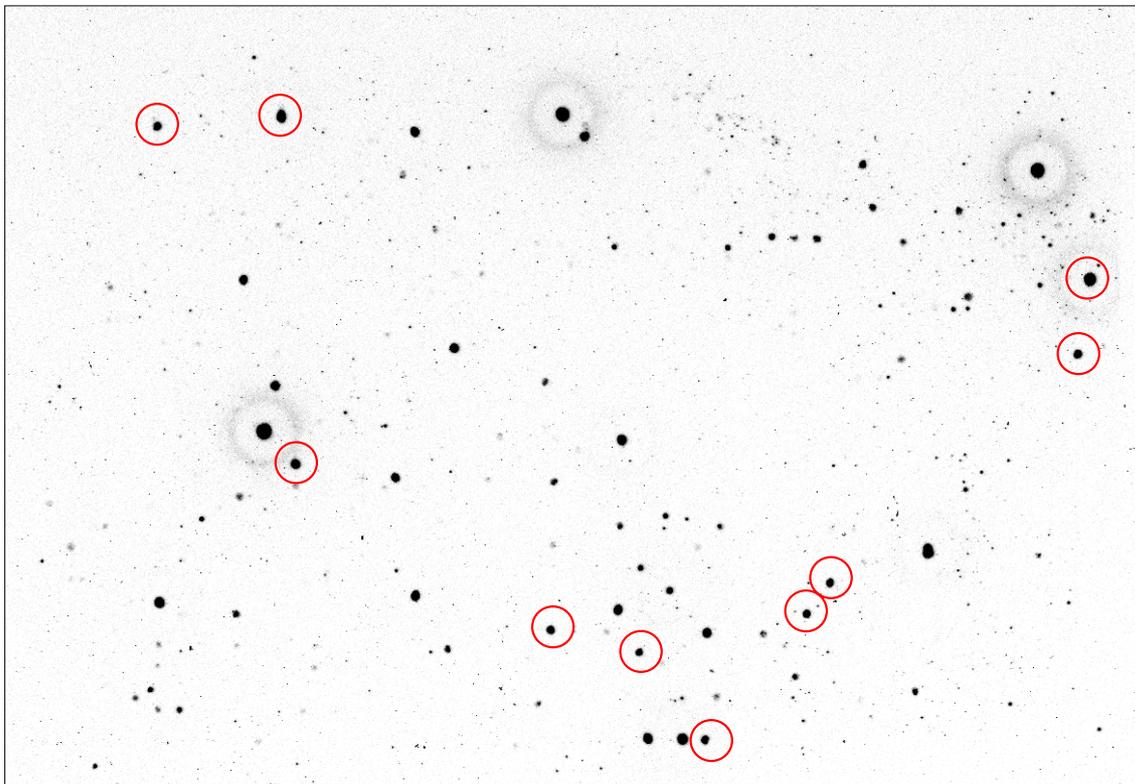
Tabelle 7

Nummer	Peptidsequenz
1	YSGWYSLHTRMSMLV
2	YWFKMNHNMSPFILM
3	PMVFTHKIRMINHAS
4	YFHSMKDSRGRNHT
5	YQNTSHWGTRWRSVL
6	YYYQRFNAMILAMFF
7	YTLRFAYKRDPFRER
8	YRKWDYERFYVDPDG
9	YKWRTELYWNTWGFT

Sequenzen der Peptide, an die der 4476-scFv signifikant auf dem Peptidarray bindet.

Eine Gemeinsamkeit von acht dieser neun Peptide ist der Beginn der Sequenz mit Tyrosin (Y). Weitere Homologien zwischen den Sequenzen der einzelnen Peptide konnten nicht festgestellt werden. Auch die Eingabe der Peptide in die Datenbank *nr* des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) zeigte keine einheitlichen Ergebnisse.

Abbildung 36



**Peptidarray (Membran A) nach Inkubation mit dem 4476-scFv.**

Die Membran wurde über Nacht mit dem 4476-scFv inkubiert (10 µg/ml), anschließend für 2 h mit dem anti-His-HRP Antikörper inkubiert und die gebundenen scFv dann über Chemilumineszenz detektiert. Die roten Kreise markieren die Signale, die sich von der Kontrollinkubation (anti-His-HRP) unterscheiden.

Relativ häufig (5/9 Peptiden) wurde eine Ähnlichkeit zu Proteinen mit Zinkfinger Domäne gefunden. Die Peptidsequenzen wiesen auch keine Gemeinsamkeiten mit der Sequenz des cDNA Klons aus dem mit dem 1427-scFv durchgeführten Proteinfiterexperiment auf.