

5. Zusammenfassung

Als MALT (*Mucosa associated lymphoid tissue*) bezeichnet man das lymphatische Gewebe, das in Schleimhäuten vorkommt und den Körper gegen pathogene Einflüsse von außen schützt. Es ist nur in wenigen Organen konstitutiv vorhanden und entsteht in der Regel erst als Reaktion auf Infektionen oder Entzündungen. Im Falle lang anhaltender (chronischer) Entzündungsreaktionen besteht die Gefahr, dass lymphatische Zellen genetische Defekte erwerben bzw. akkumulieren, aus denen sich Tumore (Lymphome) entwickeln können. Ein Beispiel für die Tumorenstehung aus einer chronischen Entzündung sind die Magen MALT-Lymphome, die sich in den meisten Fällen im Rahmen einer durch das Bakterium *Helicobacter pylori* hervorgerufenen Gastritis entwickeln. Bei den Tumorzellen der MALT-Lymphome handelt es sich um B-Zellen, die Immunglobuline an ihrer Zelloberfläche exprimieren. Die Struktur dieser Immunglobuline zeigt Merkmale, wie sie für Antigen-induzierte Gedächtnis-B-Zellen typisch sind. Aufgrund der Beobachtung, dass die Eradikation von *H. pylori* (Antibiotikabehandlung) zur kompletten Regression des MALT-Lymphoms führt, wurde das Konzept entwickelt, dass die Lymphomentstehung auf dem Boden einer Antigen induzierten Entzündung erfolgt und dass die Tumorzellen, zumindest in der initialen Phase, Antigenkontakt für ihre Proliferation benötigen.

Die Identifizierung der Antigene, die für diese Stimulation des Wachstums der Tumorzellen verantwortlich sind, war das Ziel dieser Doktorarbeit.

Dazu wurden sieben MALT-Lymphome verschiedener Lokalisationen (4x Magen, je 1x Lunge, Speicheldrüse und Schilddrüse) ausgewählt. Die klonalen Immunglobulingen-umlagerungen der Tumorzellen wurden amplifiziert, kloniert und als scFv-Antikörper exprimiert. Die Untersuchung der Antigen-spezifität der sieben scFvs erfolgte durch die immunhistologische Färbung einer großen Palette von Normalgeweben und MALT-Lymphomen sowie *H. pylori* positiven Magenbiopsaten. Die Reaktivität der scFv-Antikörper gegenüber *H. pylori* Proteinen wurde an nativen und denaturierten Zelllysaten im Western Blot überprüft. Parallel dazu wurden eine ca. 30.000 Proteine umfassende Expressionsbank aus humanem fötalem Gehirn (Proteinfilter) und eine Peptidbibliothek mit 5520 Peptiden, die jeweils mehrere überlappende Epitope darstellen (Peptidarray) mit den scFvs untersucht.

Der 1427-scFv erkannte in immunhistologisch gefärbten Gewebeschnitten von Tonsillen ein Immunglobulinsubklassen unabhängiges Plasmazellantigen. Auf dem Proteinfilter erkannte er das Protein CGI-126/HSPC 155, dessen physiologische Funktion nicht bekannt ist. Die

zugehörige mRNA wird, laut Datenbank, in einem breiten Spektrum von normalen und malignen Geweben exprimiert. Darüber hinaus konnte eine deutlich höhere Expression in Plasmazelllinien beobachtet werden. Für den 4476-scFv konnten auf dem Peptidarray neun Peptide als Bindungspartner ermittelt werden. Eine Homologie der Sequenzen zu vorhandenen Datenbankeinträgen lag nicht vor.

Die für die scFvs 1427 und 4476 gefundenen Bindungspartner ließen keinen Rückschluss auf ihre Bedeutung für die MALT-Lymphom Entstehung zu. Für die anderen fünf scFvs konnte mit den gewählten Methoden keine Bindung an Proteine gezeigt werden. Dies kann bedeuten, dass der Ausgangspunkt der Tumorzellentwicklung eine unspezifische B-Zell-Aktivierung ist, die keinen gerichteten somatischen Mutationsprozess auslöst und durch die daher keine, ein bestimmtes Antigen erkennende Immunglobuline entstehen.

Summary

Mucosa associated lymphoid tissue (MALT) describes secondary lymphoid tissues located at mucosal sites which function as a protection against external pathogens. MALT is constitutively present in only few organs, but it rather develops as a consequence of infection or inflammation. In the case of ongoing (chronic) inflammation, lymphatic cells are at risk to acquire and/or accumulate genetic defects, that might lead to the development of tumors. An example for tumor (lymphoma) development on the basis of chronic inflammation are gastric MALT-lymphomas, which frequently develop in the context of a *Helicobacter pylori* induced gastritis. The tumor cells of MALT-lymphomas have been identified as B-cells that express immunoglobulin molecules on their cell surface. The structure of their immunoglobulin genes resembles that of antigen-activated memory B-cells. Based on the observation that eradication of *Helicobacter pylori* by antibiotic treatment leads to a complete remission of most gastric MALT-lymphomas, the concept evolved that the tumor development is associated with an antigen-induced inflammation and that the tumor cells require, at least in an initial phase, the contact with an antigen for their proliferation.

The identification of the antigens responsible for the growth of the tumor cells, was the aim of this thesis.

For this purpose seven MALT-lymphomas of different locations (4x stomach; 1x lung, salivary gland and thyroid gland, respectively) were selected. The clonal immunoglobulin rearrangements of the tumor cells were amplified, cloned and expressed as *single chain fragment variety* (scFv)-antibodies. The antigen specificity of the seven scFvs was analyzed

by immunohistochemical staining of a wide variety of normal human tissues and the MALT-lymphomas, where they derive from, as well as *H. pylori* positive gastric biopsies. The reactivity of the scFvs against *H. pylori* proteins was further examined in Western Blots of native and denatured cell lysates. In parallel an expression library comprising approximately 30.000 proteins from human fetal brain (protein filter) and a peptide library with 5520 peptides (peptide array), each representing several overlapping epitopes were screened.

The 1427-scFv recognized an immunoglobulin subtype independent plasma cell antigen in sections of immunohistochemically stained tonsils. On the protein filter it recognized the protein CGI-126/HSPC 155, a molecule of unknown physiological function. The corresponding mRNA is, according to databases searched, expressed in a wide variety of normal and malignant tissues. In addition a significant elevated expression level was found in plasma cells. For the 4476-scFv, nine peptides could be identified as binding partners on the peptide array, however without homology to any sequence in public databases.

The binding partners identified for the scFvs 1427 and 4476 allowed no conclusions about their role in MALT-lymphoma development. For the other five scFvs no binding to any structure could be identified with any of the methods chosen. Thus, in contrast to published studies, in this thesis the majority of immunoglobulins derived from the tumor cells of MALT-lymphomas showed no reactivity against (auto-) antigens. Therefore the starting point of the tumor cell development appears to be an unspecific activation, that does not elicit an antigen-directed mutational process and thus fail to produce an immunoglobulin that recognizes a specific antigen.