

1. Einleitung

Lymphome sind bösartige Tumore, die von den B- oder T-Zellen des Immunsystems ausgehen. Entsprechend ihrer zellulären Herkunft werden sie als B- oder T-Zell-Lymphome bezeichnet. Bei den Lymphomen der Mukosa assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT, *Mucosa associated lymphoid tissue*) handelt es sich in der Mehrzahl um B-Zell-Lymphome, die vor allem im Magen, aber auch in anderen Organen wie Lunge, Speicheldrüse und Schilddrüse entstehen. MALT-Lymphome des Magens sind häufig mit dem Mykobakterium *Helicobacter pylori* assoziiert und können, zumindest in einem frühen Stadium, durch Antibiotika-basierte Eradikation von *Helicobacter pylori* geheilt werden. Aufgrund dieses besonderen klinischen Verhaltens liegt die Vermutung nahe, dass in diesem frühen Stadium ein antigener Stimulus für die Tumorentstehung und die Aufrechterhaltung des Tumorwachstums erforderlich ist. Es war deshalb Ziel dieser Arbeit die Antigene zu identifizieren, die von den Immunglobulinen (Antikörpern) der Tumorzellen der MALT-Lymphome erkannt werden.

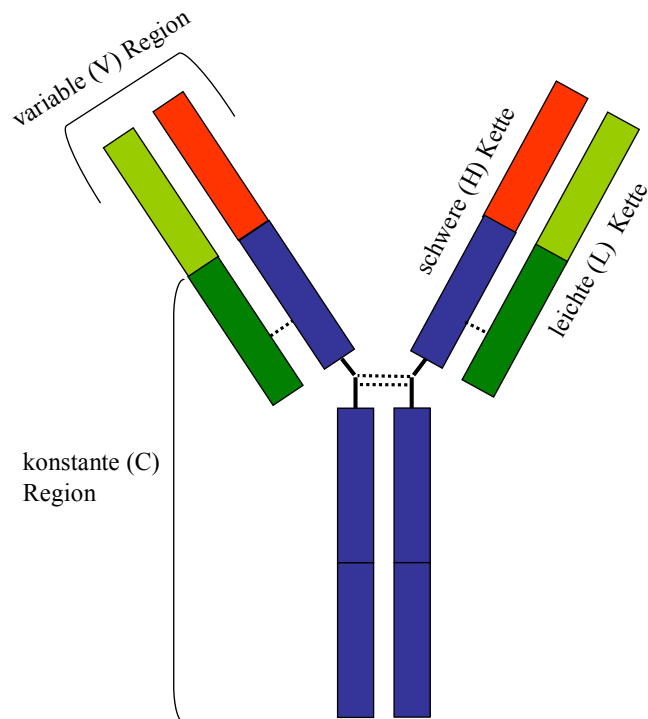
1.1. Die Funktion von B-Zellen im Immunsystem

B-Zellen bekämpfen in den Körper eingedrungene Bakterien und Viren durch das Auslösen der humoralen Immunantwort. Die Erkennung dieser Pathogene (Antigene) erfolgt über die Immunglobuline (Antikörper), die auf der Zelloberfläche der B-Zellen exprimiert werden. Durch den Antigenkontakt proliferiert die entsprechende B-Zelle und ein Teil ihrer Nachkommen differenziert sich über mehrere Stadien zu Antikörper-sekretierenden Plasmazellen. Die Antikörper binden an das Antigen und neutralisieren seine potenziell schädliche Wirkung zum einen dadurch, dass z. B. Toxine und Pathogene nicht mehr an ihren Zielorten binden können, und zum anderen durch die Rekrutierung von Effektorzellen bzw. -molekülen, die die Pathogene zerstören. Bei den Effektorzellen handelt es sich um Phagozyten (Makrophagen, Granulozyten, Monozyten), die an Antigen gebundene Antikörper erkennen, diese Komplexe aufnehmen und sie dann in ihrem Zellinneren abbauen. Die Effektormoleküle sind Bestandteile des Komplementsystems, die entweder ebenfalls den Abbau der Pathogene über Phagozytose vermitteln oder die Bakterienzellen direkt lysieren.

1.2 Der Aufbau der Immunglobuline

Ein Immunglobulin (Antikörper) besteht aus zwei verschiedenen Polypeptidketten, der kürzeren leichten- und der längeren schweren Kette, von denen jeweils zwei identische in einem Protein vorkommen (Abbildung 1). Über Disulfidbrücken sind je eine schwere und eine leichte Kette, sowie die beiden schweren Ketten untereinander verbunden. Von den leichten Ketten gibt es zwei verschiedene Formen, kappa und lambda. Jede schwere und leichte Kette besteht aus einem konstanten und einem variablen Teil, die mit C bzw. V und dem Buchstaben für die Kettenart, H (heavy) oder L (light), bezeichnet werden. Die konstanten Teile sind Bindungsstellen für verschiedene Effektormoleküle, die variablen Regionen der Ketten bilden die Antigen-bindende Domäne und unterscheiden sich von Immunglobulin zu Immunglobulin. Diese Variabilität entsteht während der Entwicklung der B-Zellen und ist die Voraussetzung für die erfolgreiche Abwehr der verschiedensten Pathogene.

Abbildung 1



Schematische Darstellung der Struktur eines Immunglobulins.

Jeweils eine schwere (H)- und eine leichte (L) Kette sind über Disulfidbrücken verbunden. Zwei dieser identischen Paare sind wiederum über Disulfidbrücken zu einem vollständigen Ig-Molekül verbunden. Die Unterteilung der einzelnen Ketten in die variablen- und konstanten Regionen ist durch unterschiedliche Farben verdeutlicht.

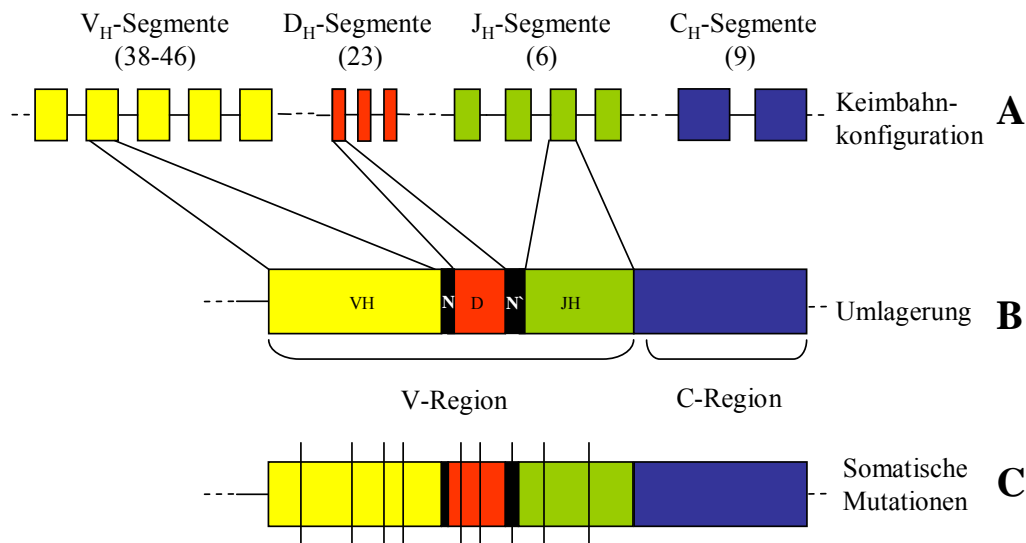
..... Disulfidbrücken-Bindungen

1.3 Die normale Entwicklung von B-Zellen

Die Entwicklung der normalen B-Zellen beginnt im Knochenmark aus B-Zell determinierten Stammzellen. Zu diesem Zeitpunkt liegen alle Gensegmente; aus denen die variable, Antigen-bindende Region (V-, D- und J-Segmente) und der konstante Teil (C-Segmente) der Immunglobuline gebildet werden; getrennt voneinander in der Keimbahnkonfiguration vor (Abbildung 2A). Während der Entwicklung zu unreifen, naiven B-Zellen werden zunächst die variablen Regionen der Immunglobulin-Schwerkettengene und dann die der Immunglobulin-Leichtkettengene umgelagert (Abbildung 2B). Dazu werden jeweils ein V- und ein J-Segment (leichte Kette) bzw. ein V-, ein D- und ein J-Segment (schwere Kette) weitgehend zufällig aus dem großen Pool von V- (38-46), D-(23), und J-Segmenten (6) ausgewählt und zu einem kodierenden Abschnitt zusammengesetzt[1;2].

Durch den zufälligen Auswahlmechanismus der einzelnen Segmente, entsteht ein Teil der Variabilität der Immunglobuline, da bei jeder Umlagerung verschiedene Kombinationsmöglichkeiten gewählt werden können. Jedes V-Segment kann theoretisch mit jedem J- bzw. D-Segment kombiniert werden. Da außerdem unterschiedlich umgelagerte schwere und leichte Ketten kombiniert werden können, beträgt die theoretisch mögliche Zahl an unterschiedlichen Immunglobulinen durch diesen Mechanismus bereits $2,5 \times 10^6$. Der größere Teil der Diversität der Antigen-bindenden Regionen wird allerdings auf andere Art geschaffen, nämlich durch die Insertion von zufälligen Nukleotidsequenzen bei der Verbindung der V-, (D-) und J-Segmente, sowie durch variable Verkürzung der Enden der umgelagerten Gensegmente[3;4]. Dieser Aufbau eines großen Repertoires an verschiedenen Antikörpern ist wichtig, um den Schutz des Körpers gegenüber der Vielzahl an existierenden potenziellen Pathogenen zu gewährleisten.

Abbildung 2



Aufbau und Umlagerung der Immunglobulingene am Beispiel des Schwerekettengens (IgH).

In der Darstellung der Keimbahnkonfiguration (A) sind von jeder Gruppe exemplarisch einige Segmente in jeweils unterschiedlichen Farben dargestellt. Die Anzahl aller auf Chromosom 14 liegenden funktionalen Segmente ist in Klammern angegeben[1]. Die unterbrochenen Linien symbolisieren die stark schematische, nicht maßstabsgetreue Wiedergabe der DNA Sequenz. Die somatischen Mutationen (C) sind durch senkrechte Striche dargestellt.

V_H -Segmente : *variable* Gensegmente des Immunglobulin-Schwerekettengens

D_H -Segmente : *diversity* Gensegmente des Immunglobulin-Schwerekettengens

J_H -Segmente : *joining* Gensegmente des Immunglobulin-Schwerekettengens

C_H -Segmente : *constant* Gensegmente des Immunglobulin-Schwerekettengens

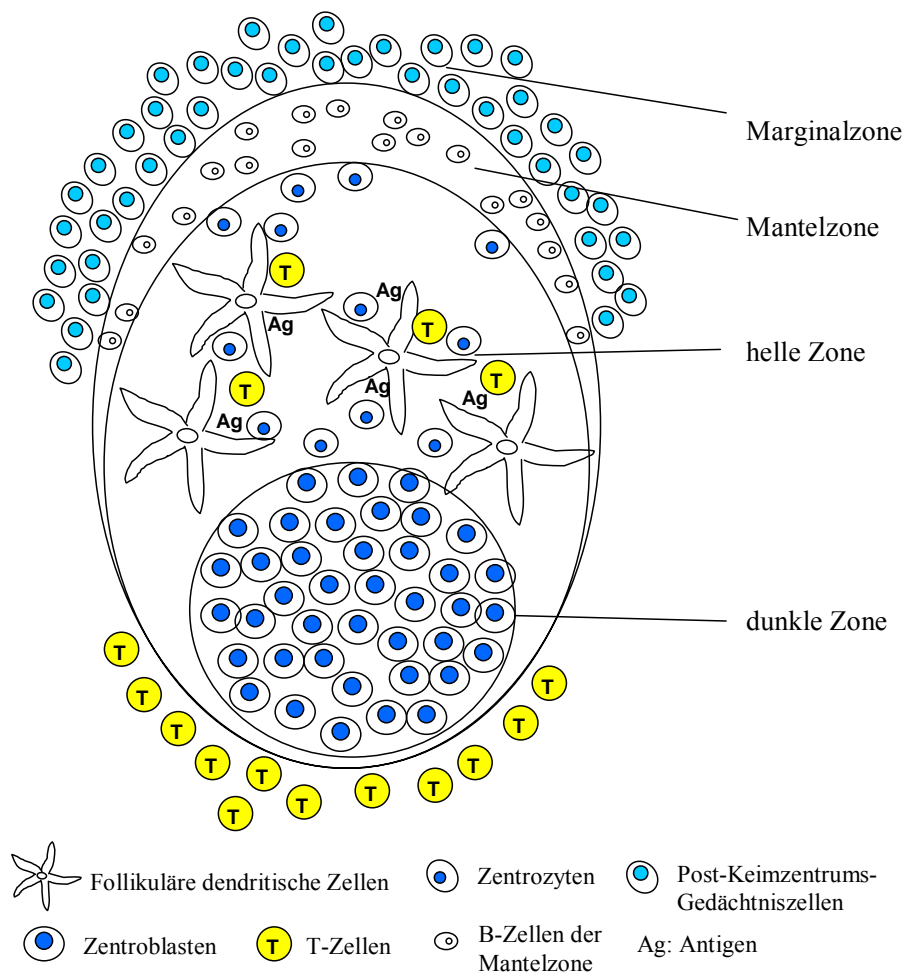
N, N' : zufällig generierte Nukleotidsequenzen

Die funktionsfähig umgelagerten vollständigen Immunglobuline werden an der Zelloberfläche exprimiert und daraufhin überprüft, ob sie körpereigene Strukturen erkennen. Ist dies nicht der Fall, verlassen diese Zellen als reife, naive B-Zellen das Knochenmark über das Blut und beginnen zwischen Blut und den sekundären lymphatischen Organen Milz, Lymphknoten und Schleimhaut-assoziiertem lymphatischem Gewebe (*mucosa associated lymphoid tissue*, MALT) zu zirkulieren. Bindet eine dieser B-Zellen ein Antigen, beginnt sie zu proliferieren und zu differenzieren. Ein Teil der Nachkommen produziert Antikörper, die allerdings noch nicht hochspezifisch sind (Primärantwort). Ein anderer Teil organisiert sich zur sekundären Immunantwort mit weiteren Zellarten zu besonderen histologischen Strukturen, den Keimzentren (Abbildung 3). Die Keimzentren entstehen in den primären Lymphfollikeln des lymphatischen Gewebes, dann Sekundärfollikel genannt, und können in dunkle- und helle Zone unterteilt werden. Die durch ein Antigen aktivierten B-Zellen proliferieren zunächst in der dunklen Zone und werden als Zentroblasten bezeichnet. In diesem Stadium findet die somatische Hypermutation der Immunglobulingene statt, mit dem Ziel die Affinität der Immunglobuline für das Antigen zu erhöhen[5;6]. In die variablen Teile der

Immunglobulingene werden dabei mehr oder weniger zufällige Mutationen eingefügt, die zum Austausch von Aminosäuren und dadurch zur Veränderung der Affinität zum jeweiligen Antigen führen können (Abbildung 2C). Dies findet in den *complementarity determining regions* (CDR) der variablen Region häufiger statt, als in den *framework regions* (FWR)[7]. Die höher mutierten CDRs stellen die eigentliche Antigen-Bindungsstelle dar. Ob durch die somatischen Hypermutationen eine höhere Affinität der Antikörper zum Antigen erreicht wurde, wird in der hellen Zone der Keimzentren überprüft, in die die, jetzt Zentrozyten genannten und nicht oder nur noch langsam proliferierenden Zellen nach dem Ende des somatischen Mutationsprozesses wandern. Hier wird ihnen von follikulären dendritischen Zellen (FDC) Antigen präsentiert. Nur die B-Zellen, deren Immunglobuline eine hohe Affinität zum Antigen aufweisen und die mit ebenfalls Antigen aktivierten T-Zellen reagieren, überleben und vermehren sich. Zellen mit geringer Affinität zum Antigen werden durch Apoptose eliminiert.

Aus den positiv selektionierten B-Zellen entstehen entweder langlebige Plasmazellen oder Gedächtniszellen. Die Post-Keimzentrums-Gedächtniszellen siedeln sich in der unmittelbaren Umgebung der Keimzentren in der Marginalzone an. Sie exprimieren Immunglobuline auf ihrer Zelloberfläche und stehen so für eine schnelle Reaktion im Falle eines erneuten Kontaktes mit dem gleichen Antigen bereit. Die Plasmazellen verlassen das Keimzentrum in Richtung Knochenmark und Epithelien. Ihre Aufgabe ist es durch die Produktion großer Mengen löslicher Antikörper zur Eliminierung des Antigens beizutragen.

Abbildung 3



Schematische Darstellung eines Keimzentrums im Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe.

Dargestellt ist die im Text beschriebene Differenzierung Antigen-aktivierter B-Zellen von Zentroblasten über Zentrozyten zu Post-Keimzentrums-Gedächtniszellen. Die ebenfalls aus den Zentrozyten hervorgehenden Plasmazellen sind nicht dargestellt. In der Mantelzone vorkommende B-Zellen sind nicht Antigen-aktiviert und Überbleibsel der Primärfollikel.

1.4 Pathogenese von MALT-Lymphomen

MALT-Lymphome sind B-Zell Lymphome des Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebes (*mucosa associated lymphoid tissue*, MALT)[8]. Dieses sekundäre lymphatische Gewebe schützt den Körper gegen äußere pathogene Einflüsse und entsteht an Schleimhäuten und Epithelien als Reaktion auf Entzündungen. Diese können durch Infektionen, z. B. *Helicobacter pylori* Gastritis, aber auch durch autoimmune Prozesse wie Hashimoto-Thyreoiditis, myoepitheliale Sialadenitis oder Sjögren-Syndrom, entstehen. Konstitutiv ist das MALT lediglich im Dünndarm in Form der *Peyer-Plaques* vorhanden[9-11].

Der Aufbau des MALT mit Keimzentren und Follikelmänteln ähnelt den Sekundärfollikeln des nodalen lymphatischen Gewebes. Die Marginalzone ist allerdings breiter und reicht bis

zur Schleimhautoberfläche und infiltriert diese in Form von Zellclustern. Aus den B-Zellen der Marginalzone gehen die Tumorzellen des MALT-Lymphoms hervor. Im Verlauf der Krankheit breiten sie sich von dort in die umgebenden Follikelzwischenräume und Schleimhautbereiche aus und kolonisieren andere Follikel. Die funktionelle Einheit des MALT und der anschließenden Drüsen-, bzw. Oberflächenepithelien wird so zerstört.

1.5 Einfluss von Antigen-Stimulation auf die Entstehung der MALT-Lymphome

Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, kann man anhand der Struktur des Immunglobulins auf den Differenzierungszustand einer B-Zelle schließen. Zellen mit umgelagerten, aber unmutierten Genen weisen auf einen Differenzierungszustand vor einer Keimzentrumsreaktion hin, das Vorhandensein von somatischen Mutationen auf eine Keimzentrums- oder Post-Keimzentrums B-Zelle. Die beiden letzteren kann man daran unterscheiden, dass bei Post-Keimzentrums B-Zellen der Mutationsprozess schon abgeschaltet ist und alle Zellen die gleichen Mutationen in ihren Immunglobulinen aufweisen. In den Keimzentrumszellen dagegen ist der Mutationsprozess noch aktiv und die einzelnen Zellen weisen deshalb zum Teil unterschiedliche Mutationen auf.

Auch bei den Tumorzellen von B-Zell-Lymphomen kann man anhand ihrer Immunglobulingene auf die Entwicklungsstufe der Zelle schließen, aus der sie hervorgegangen sind. Die Tumorzellen der MALT-Lymphome weisen umgelagerte und somatisch mutierte Immunglobulingene auf und exprimieren diese auf ihrer Zelloberfläche[12;13]. Dies spricht für die Abstammung von Post-Keimzentrums B-Zellen, was auch mit der Entstehung und Ausbreitung des Tumors aus der Marginalzone heraus übereinstimmt.

Die Analogie der MALT-Lymphomzellen zu den durch eine Antigenaktivierung entstandenen Post-Keimzentrums B-Zellen, legt die Vermutung nahe, dass eine solche Aktivierung auch am Anfang der Tumorentstehung stand. Hinweise auf die Richtigkeit dieser Theorie ergaben sich aus der Beobachtung, dass Magen-MALT-Lymphome sehr häufig mit einer Besiedlung durch *Helicobacter pylori* (*H. p.*) einhergehen[14-16]. Die Eliminierung des Bakteriums durch Antibiotika führt überraschend in ca. 75% der Fälle zu einem Verschwinden des Lymphoms und damit zu einer Heilung des Patienten[17;18]. Obwohl es sich morphologisch und histomorphologisch als ein echtes Lymphom darstellt[19], lässt sich das Magen-MALT-Lymphom, jedenfalls bis zu einem bestimmten Entwicklungsstadium bzw. Größe, durch

einfache Antibiotika Behandlung heilen. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Magen-MALT-Lymphom einen „antigenen“ Stimulus zur Entstehung und Aufrechterhaltung seines Wachstums benötigt. Ob dieses Signal direkt über die Bindung der Tumorumoglobuline an das Antigen erfolgt, oder über die Interaktion der Tumorzellen mit durch das Antigen aktivierten T-Zellen ist nicht geklärt. Für beides gibt es Hinweise. So proliferieren MALT-Lymphomzellen *in vitro* nach Zugabe von *Helicobacter pylori* nur in Gegenwart von Tumordinfiltrierenden T-Zellen[20;21]. Diese T-Zellen exprimieren außerdem Zytokine, die für die Interaktion zwischen B- und T-Zellen wichtig sind[22]. Auch die Interaktion der Tumorzell-Immunglobuline mit Antigenen konnte gezeigt werden. Immunhistologische Färbungen zeigten Bindungen der Lymphomantikörper an verschiedenste Strukturen normaler Gewebe[23;24]. Außerdem verwenden einige MALT-Lymphome für ihre Immunglobulinenumlagerungen Segmente, die auch häufig von Autoantikörpern benutzt werden[25;26].

1.6 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, Antigene, die von den auf den Tumorzellen exprimierten Immunglobulinen erkannt werden, zu identifizieren und so neue Einblicke in die Pathogenese der MALT-Lymphome zu gewinnen.

Dazu sollten von ausgewählten MALT-Lymphomen die Immunglobulin-Leicht- und -Schwarkettengene mittels PCR amplifiziert und so kloniert werden, dass sie anschließend als *single chain fragment variable* (scFv) Antikörper in Insektenzellen exprimiert werden konnten. Zur Identifizierung, der von den scFvs erkannten Antigene, sollten verschiedene Techniken Verwendung finden. Neben den immunhistologischen Nachweisen an zahlreichen normalen Geweben und Tumorgeweben, war auch das Screening von Peptidarrays und Proteinfiltren vorgesehen.