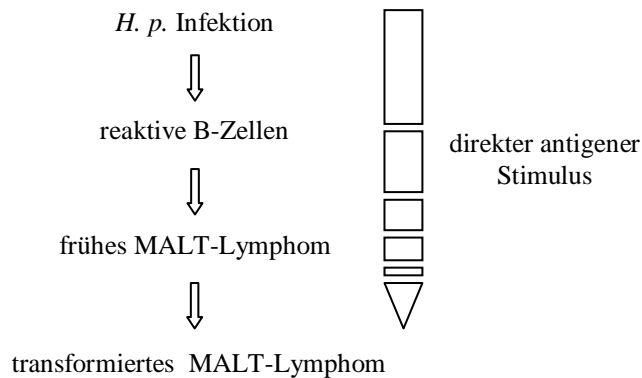


4. Diskussion

Proliferierende Zellen unterliegen trotz zahlreicher Reparaturmechanismen einem höherem Risiko DNA-Schädigungen zu erwerben als ruhende Zellen. Dies gilt auch für lang anhaltende Lymphproliferationen (chronische Entzündungen wie z. B. Sprue, Borreliose, Gastritis). Der Erwerb von DNA-Schädigungen führt zunehmend dazu, dass diese Zellen ihre physiologische Rolle nicht mehr erfüllen und häufig die Apoptose (den programmierten Zelltod) umgehen. Im Verlauf dieses Prozesses kann es zur Akkumulation weiterer DNA-Schädigungen (Mutationen) kommen, so dass am Ende dieses mehrstufigen Prozesses bösartig entartete (maligne) Zellen stehen. Diese malignen Zellen, die nicht mehr in der Lage sind das Zellwachstum zu kontrollieren, können sich im Organismus ausbreiten (Metastasierung) und führen trotz weit entwickelter Therapien häufig zum Tod.

Lymphome der *Mucosa associated lymphoid tissues* (MALT-Lymphome) sind ein Beispiel für die Tumorenstehung durch einen solchen Prozess. Die Organe, in denen diese Lymphome entstehen (Magen, Lunge, Speicheldrüse, Schilddrüse u. a.), enthalten primär kein lymphatisches Gewebe. Erst durch eine Infektion oder eine Autoimmunreaktion bildet sich das MALT, aus dessen Zellen diese Lymphome hervorgehen können[9-11]. So wurde beobachtet, dass sich Magen MALT-Lymphome häufig auf dem Boden einer durch *Helicobacter pylori* verursachten Gastritis entwickeln[14;15;37]. Die Eradikation des Bakteriums durch Antibiotikatherapie führte erstaunlicherweise in vielen Fällen zu einer Regression des Lymphoms[17;18]. Daraus entwickelte sich die Hypothese, dass *Helicobacter pylori* (*H. p.*) ein für Entstehung und Wachstum der Magen MALT-Lymphome notwendiger antigener Stimulus zu sein scheint (Abbildung 37). Das gilt allerdings nur bis zu einer bestimmten Entwicklungsstufe der Lymphome. In fortgeschrittenen Stadien verlieren die Tumore offensichtlich ihre Abhängigkeit von antigenen Stimuli und lassen sich, wie Untersuchungen zeigten, durch Antibiotikatherapie nicht mehr heilen. Diese Tatsache wird der Zunahme zytogenetischer Aberrationen und der damit verbundenen Aktivierung von Onkogenen zugeschrieben[38-41].

Abbildung 37



Schema der Magen MALT-Lymphom Pathogenese (verändert nach[42]).

Versuche zur Klärung der Frage, ob die Tumorzellen über ihre Immunglobuline von Antigenen stimuliert werden und wenn ja, um welche Antigene es sich dabei handelt, wurden bereits von zwei Arbeitsgruppen unternommen[23;24;43;44]. Die Immunglobuline der Tumorzellen wurden in beiden Untersuchungen mittels Heterohybridom-Technologie als monoklonale Antikörper hergestellt und zur Färbung von Gewebeschnitten eingesetzt. *Hussell et al.* untersuchten die Reaktivität der Immunglobuline von drei Magen MALT-Lymphomen an verschiedenen normalen Geweben. Dabei zeigte sich in einem Fall eine Reaktivität gegenüber follikulär dendritischen Zellen, in dem zweiten Fall war eine Bindung an Venolen der Peyer'schen Plaques und des Appendix zu sehen und im dritten Fall die Bindung an zytoplasmatische Antigene in Zellen verschiedenster Gewebe[23]. Auch *Greiner et al.* fanden in mehreren Fällen Reaktivitäten von Tumorigmoglobulinen gegenüber unterschiedlichsten Strukturen normaler Gewebe wie Blutgefäße, Bindegewebe, Epithelien verschiedener Schleimhäute und Plasmazellen der Darmmukosa[24;43;44]. Die in einem Fall überprüfte Bindung des Tumorigmoglobulin an *Helicobacter pylori* oder andere Bakterien im Western Blot zeigte kein positives Ergebnis[24].

Aufgrund der uneinheitlichen Ergebnisse und der insgesamt geringen Zahl an Studien, war es Ziel dieser Doktorarbeit, durch eine veränderte Strategie die Zielstrukturen der Tumorigmoglobuline zu identifizieren und deren Rolle bei der Lymphomentstehung zu untersuchen. Im Unterschied zu den oben beschriebenen Veröffentlichungen wurden die Immunglobuline der Tumorzellen in dieser Arbeit nicht als Hybridom-Antikörper, sondern als rekombinante *single chain fragment variable* Antikörper (scFvs) hergestellt[45;46]. ScFvs bestehen aus der Antigen-bindenden Domäne eines Arms eines kompletten Antikörpers, also

einer schweren und einer leichten Immunglobulinkette ohne konstante Region. Vergleiche zwischen monoklonalen Antikörpern und von ihnen abgeleiteten scFvs zeigten, dass die scFvs in der Regel die gleiche Antigenaffinität und -spezifität besitzen, wie die monomeren kompletten Antikörper[47;48]. Auch die physikalische Stabilität ist vergleichbar und aus diesen Gründen finden scFvs mittlerweile eine breite Anwendung in der Medizin[49] und Biotechnologie[50]. Der Vorteil der Verwendung von scFvs gegenüber Hybridom-Antikörpern für das hier beschriebene Projekt liegt in der Art ihrer Herstellung. Als Ausgangsmaterial dient die DNA der Tumorzellen, aus der die vorher identifizierten vollständigen Immunglobulingenumlagerungen gezielt amplifiziert, dann kloniert und als scFv exprimiert werden. Die Übereinstimmung, der für die Experimente verwendeten scFv-Antikörper mit den Immunglobulinen der Tumorzellen ist damit sichergestellt. Ein weiterer Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass man nicht, wie bei der Hybridom-Technologie, auf natives Tumormaterial angewiesen ist, da die notwendige DNA auch aus tiefgefrorenem Gewebe und unter Umständen sogar aus Paraffin-eingebettetem Material gewonnen werden kann.

Zur Herstellung der scFvs wurden Insektenzellen (*Drosophila Schneider 2*) verwendet[51]. Durch die Wahl eines eukaryotischen Expressionssystems wurde die Funktionalität der rekombinanten Proteine durch richtige Faltung und post-translationale Modifikationen (N-Glycosylierung) gewährleistet[52;53]. Außerdem ermöglichte es die Etablierung stabil transfizierter Zelllinien, die induzierbare Expression der scFvs in den Zellkulturüberstand und davon ausgehend eine relativ einfache Aufreinigung über Affinitätschromatographie. Die erhaltenen Mengen an rekombinantem Protein (6 - 20 mg/Liter Kulturüberstand) lagen etwas unter den mit prokaryotischen Systemen theoretisch erreichbaren Werten[53], waren aber für die Versuche völlig ausreichend.

Um die Techniken zur Klonierung, Expression, Aufreinigung und Überprüfung der Antigenspezifität der scFvs zu etablieren, wurde zunächst ein bekannter muriner Antikörper als scFv hergestellt. Dabei handelte es sich um den BerH2-Antikörper, der gegen das CD30 Antigen gerichtet ist, das auf den Tumorzellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms (cHL) und des Anaplastisch-Großzelligen-Lymphoms (ALCL) überexprimiert wird[54]. Außerdem ist es in deutlich geringerer Menge auf lymphatischen Blasten in normalem lymphatischem Gewebe nachweisbar[55]. Der Vergleich der Bindungsfähigkeit des für diese Arbeit synthetisierten BerH2-scFv mit der des bekannten murinen BerH2-Antikörpers mittels ELISA und FACS zeigte, dass der BerH2-scFv selektiv an das CD30 Antigen bindet. Die Stärke der Bindung des scFv war in diesen Assays, wie erwartet, aufgrund seiner Monovalenz etwas

geringer als die des bivalenten kompletten Antikörpers, lag aber in der gleichen Größenordnung. Wesentlich ausgeprägter war dieser Aviditätsunterschied in der Immunhistologie. Mit den üblichen Färbetechniken (APAAP, ABC) war die Darstellung des CD30 Antigens durch den BerH2-scFv an Gefrier- und Paraffingewebe von Hodgkin- und ALCL-Lymphomen nur schwach und auf lymphatischen Blasten in Tonsillengewebe gar nicht möglich. Der murine BerH2-Antikörper dagegen färbte, im Einklang mit der Literatur, die CD30-positiven Zellen im Gefrier- und Paraffingewebe der cHL und ALCL, sowie im Gefriergewebe von Tonsillen deutlich, die normalen lymphatischen Blasten in Paraffin-eingebetteten Tonsillen wurden schwach angefärbt. Erst durch das im Rahmen dieser Arbeit etablierte immunhistologische Verstärkersystem (Biotinyl-Tyramid) und die damit verbundene Erhöhung der Sensitivität des immunhistologischen Nachweises konnte auch mit dem BerH2-scFv eine kräftige Anfärbung des CD30 Antigens, sowohl im Tumor-, als auch im Normalgewebe, erreicht werden (Paraffin- und Gefriergewebe). Die mit einer Signalverstärkung einhergehende Problematik der Amplifikation von unspezifischen Signalen konnte durch eine sorgfältige Optimierung des Systems behoben werden. Zusammengefasst bestätigten die Versuche mit dem BerH2-scFv, dass die für die Untersuchungen gewählte Methode zur Herstellung der Tumor-scFvs geeignet ist, da die Bindungseigenschaften der Immunglobuline in den entsprechenden scFvs erhalten bleiben und ihre Bindung an Antigene, unter Verwendung geeigneter Techniken, nachweisbar ist. Der BerH2-scFv wurde als Kontrollantikörper in allen folgenden Experimenten mit den MALT-Lymphom-scFvs mitgeführt.

Für die Herstellung der scFvs aus den umgelagerten Immunglobulinen der MALT-Lymphome wurden sieben Fälle ausgewählt. Bei vier dieser Fälle handelte es sich um Magen MALT-Lymphome aus der institutseigenen Gewebebank, drei weitere Fälle kamen aus dem Institut für Pathologie der Universität Würzburg und stammten aus Lunge, Schilddrüse und Speicheldrüse. Die Auswahl erfolgte durch erfahrene Pathologen aufgrund einer eindeutigen Diagnose entsprechend der WHO Klassifikation[19] und die ausreichende Verfügbarkeit von Formalin fixiertem- und gefrorenem Gewebe. Eine weitere Voraussetzung war, dass die Klonalität der Tumorzellen durch eine Amplifikation ihrer Immunglobulinumlagerungen nachweisbar war. Diese Klonalität wurde durch die Amplifikation der Immunglobulinogene und die anschließende Analyse der PCR Produkte durch die GeneScan Methode demonstriert. Die Analyse der Sequenzen der Immunglobulin-Schwerkettengene zeigte, dass in vier der sieben MALT-Lymphome Segmente der VH3 Familie (2 x *VH3-07*, 2 x *VH3-23*) für die Umlagerung verwendet worden waren. In einem Fall war ein VH4 Segment (*VH4-59*) und in

zwei der untersuchten Fälle waren VH1 Segmente (*VH1-02*, *VH1-69*) umgelagert. Die VH Segmente *1-02*, *1-69*, *3-07* und *3-23* finden sich häufig in den Immunglobulingenumlagerungen von Autoantikörpern[56-59]. Die Verwendung dieser Segmente in den Immunglobulingenen von sechs der hier untersuchten sieben MALT-Lymphome könnte daher ein Hinweis darauf sein, dass es sich auch bei den Tumorummoglobulinen um Antikörper handelt, die körpereigene Proteine (Autoantigene) erkennen.

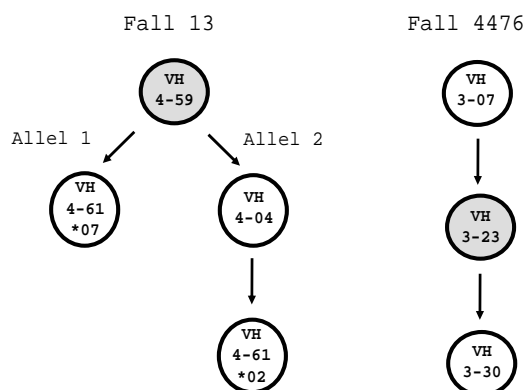
Von dem *VH1-69* Gen ist außerdem bekannt, dass es bevorzugt in MALT-Lymphomen der Speicheldrüse umgelagert wird[60;61]. Vergleiche der klonspezifischen CDR3 Bereiche der Immunglobulingenumlagerungen mehrerer MALT-Lymphome der Speicheldrüse durch *Miklos et al.* zeigten Sequenzübereinstimmungen auf Aminosäureebene an den Übergängen zwischen einigen V- und D-Segmenten und D- und J Segmenten[62]. Diese Gemeinsamkeiten werden in der Literatur als Hinweise auf eine mögliche Selektion der Immunglobuline durch ein gemeinsames Antigen gewertet. Das hier untersuchte Lymphom aus der Speicheldrüse verwendet ebenfalls das *VH1-69* Gen für die Umlagerung des Immunglobulin-Schwerkettengens. Die Aminosäuresequenz des klonspezifischen CDR3 Bereiches stimmt am V-D Übergang aber nur in zwei der drei konservierten Positionen und am D-J Übergang gar nicht mit den von *Miklos et al.* publizierten Sequenzen überein[62]. Die These eines gemeinsamen antigenen Stimulus für in der Speicheldrüse entstehende MALT-Lymphome lässt sich anhand dieser Sequenz daher nicht bestätigen.

Die Immunglobulingene aller in dieser Arbeit untersuchten Fälle wiesen, im Einklang mit der Abstammung der Tumorzellen von Post-Keimzentrums B-Zellen, somatische Mutationen auf. Die Zahl der Mutationen variierte allerdings in den einzelnen Fällen stark, zwischen 3 und 26 für das Immunglobulin-Schwerkettengen und 0 und 17 für das Immunglobulin-Leichtkettengen. Im Gegensatz zu anderen Untersuchungen, in denen das Mutationsmuster eines großen Teils der untersuchten MALT-Lymphome Zeichen einer Selektion der Immunglobulin-Schwerkettengene durch Antigene aufwies[12;26;63], war eine Antigenselektion anhand der Mutationen in den hier untersuchten Fällen nur im Fall 1427 zu beobachten. Im Fall 18 erfüllte zwar das Mutationsmuster der *complementarity determining regions* (CDRs) die entsprechenden Kriterien, aber die *framework regions* (FWRs) waren zu stark mutiert, um für eine Antigenselektion zu sprechen. Ungewöhnlicherweise führte in diesem Fall jede somatische Mutation zu einem Aminosäureaustausch.

In fünf der sieben Fälle (13, 24, 2573, 4449 und 4476) wichen die DNA Sequenzen der Immunglobulin-Schwerkettengene innerhalb der jeweiligen Klone an einzelnen Positionen

voneinander ab. Diese Form der intraklonalen Diversität findet man normalerweise in Antigen aktivierten Keimzentren B-Zellen. Sie entsteht dadurch, dass der Vorgang der somatischen Mutation, der die Affinität der Immunglobuline zu dem Antigen steigern soll, aktiv ist. In den Fällen 13 und 4476 fanden sich zusätzlich zu den intraklonalen somatischen Basensubstitutionen Austausch von Anteilen der umgelagerten VH Bereiche[36]. Während dieses als Rezeptor-Revision bekannten Prozesses werden die 5' VH Bereiche umgelagerter Immunglobulingene durch die entsprechenden Sequenzabschnitte weiter downstream auf Chromosom 14 gelegener Keimbahn VH Segmente ersetzt[64;65]. Der klonspezifische CDR3 Bereich der ursprünglichen Umlagerung bleibt dabei erhalten. Anhand der chromosomalen Lokalisation der VH Segmente bestand daher die Möglichkeit, die Reihenfolge der drei (Fall 4476) bzw. vier (Fall 13) Rezeptor-Revisionen zu ermitteln[36]. Weitere Hinweise auf die zeitliche Abfolge gaben die Anzahl der gemeinsamen und individuellen Mutationen in den Umlagerungen. Im Fall 13 (Abbildung 38) verwendete demnach die erste Umlagerung sehr wahrscheinlich das *VH4-59* Segment. Aus ihr entwickelte sich der Haupttumorklon. Ausgehend von dieser Umlagerung fanden zwei Revisionen statt. Einmal wurde der 5' Bereich des *VH4-59* Segments durch den entsprechenden Teil des auf demselben Chromosom gelegenen *VH4-61*07* Gens ersetzt, für die zweite Revision wurde der 5' Teil des *VH4-04* Segments vom zweiten Allel verwendet. Aus dieser *VH4-04/VH4-59* Umlagerung entstand ein weiterer Hybrid unter Verwendung des *VH4-61*02* Segments. Im Fall 4476 (Abbildung 38) war vermutlich *VH3-07* das für die erste Umlagerung benutzte VH Segment. Es wurde ersetzt durch den 5' Bereich des *VH3-23* Gens und aus dieser Umlagerung entstand der Haupttumorklon. In einer zweiten Rezeptor-Revision wurde der *VH3-23* Anteil durch den entsprechenden Bereich des *VH3-30* Segments ausgetauscht.

Abbildung 38



Reihenfolge der Revisionsereignisse in den Tumorzellen der Fälle 13 und 4476.

Die Kreise stellen die verschiedenen aus den Rezeptor-Revisionen hervorgegangenen Klone dar und sind mit den jeweils verwendeten VH Segmenten beschriftet.

Die Kreise, die die Haupttumorklone repräsentieren sind grau unterlegt.

Die Pfeile geben die Reihenfolge der Revisionen an.

Die Rezeptor-Revision führt, wie auch die somatischen Mutationen, zu einer Veränderung der Immunglobulingenumlagerung der B-Zellen, die durch ein Antigen aktiviert wurden[66-68]. Intraklonale Diversität in den Immunglobulingenen, sowohl durch *ongoing somatic mutations* als auch durch Rezeptor-Revision, ist in normalen B-Zellen ein Anzeichen für einen aktiven Selektionsprozess. Die Antigenselektion von B-Zellen lässt sich anhand des Verteilungsmusters der somatischen Mutationen innerhalb der umgelagerten Immunglobulingene erkennen. Das Auftreten intraklonaler Diversität in den Tumorzellen der untersuchten MALT-Lymphome könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch die Immunglobuline der Tumorzellen einem solchen Selektionsprozess unterliegen. Allerdings spricht die Verteilung der Mutationen in den hier untersuchten Fällen, mit einer Ausnahme, nicht für eine Selektion durch ein Antigen. Es daher anzunehmen, dass es sich bei den Vorläufern der Tumorzellen nicht um Antigen selektierte Gedächtnis B-Zellen handelt, die durch eine gerichtete Aktivierung zur weiteren Differenzierung angeregt wurden.

Da über die Natur der von den Tumorzell-Immunglobulinen erkannten Antigene wenig bekannt ist, sollten die Immunglobuline der sieben MALT-Lymphome, in Form der scFvs, sowohl auf ihre Bindung an körpereigene Proteine, als auch auf die an Fremdproteine, besonders von *Helicobacter pylori*, untersucht werden. Als eine Methode dazu wurde die Immunhistologie ausgewählt, da in unserem Institut für Pathologie eine umfassende Gewebekbank vorhanden ist, anhand derer die Bindung der Tumor-scFvs an Antigene in verschiedensten Organen und Tumoren untersucht werden kann. Die experimentelle Voraussetzung für die Anwendung der Immunhistologie für die Suche nach den unbekanntem Bindungspartnern der Tumor-scFvs war durch die im Rahmen dieser Arbeit etablierte immunhistologische Verstärkungsmethode (s. o.) als sehr sensitives und spezifisches Detektionssystem gegeben. Die Reaktivität der Tumor-Immunglobuline der sieben MALT-Lymphome wurde an 21 verschiedenen Formalin fixierten- und 14 verschiedenen tiefgefrorenen Normalgeweben, sowie an Gewebeschnitten von MALT-Lymphomen untersucht. Außerdem wurde die Bindung an Strukturen in Schnitten von *Helicobacter pylori* positiven Magenbiopsaten überprüft.

Nach Auswertung der Versuche konnten spezifische Bindungen an körpereigene Strukturen, wie sie bei *Hussell et al.* und *Greiner et al.*[23-25;43;44] beobachtet und weiter oben beschrieben wurden, nicht festgestellt werden. Die Anfärbungen von einzelnen Drüsenzellen, Endothelzellen, Muskelzellen und Granulozyten in unterschiedlichen normalen Geweben stellten sich in unseren Fällen als unspezifisch heraus, da sie in gleicher Weise auch in der Negativkontrolle oder in den Färbungen mit dem BerH2-scFv auftraten. Lediglich mit dem

1427-scFv konnten Färbemuster identifiziert werden, die sich deutlich von den Kontrollen unterschieden. Bei den gefärbten Zellen handelte es sich morphologisch um einzelne Plasmazellen in Tonsillen, die Mehrzahl der Plasmazellen war jedoch 1427-scFv negativ. Färbungen mit dem 1427-scFv zusammen mit einem Antikörper gegen den Plasmazell-spezifischen Transkriptionsfaktor MUM1/IRF4[69] zeigten, dass alle durch den 1427-scFv markierten Zellen auch MUM1/IRF4 positiv waren. Dadurch konnte auf der Basis des Immunphänotyps bestätigt werden, dass es sich bei den durch den 1427-scFv gefärbten Zellen um Plasmazellen handelt. Diese Plasmazellen gehörten jedoch nicht einer einzelnen Subklasse an, wie durch weitere immunhistologische Doppelmarkierungen mit dem 1427-scFv und Immunglobulinsubklassen-spezifischen Antikörpern (anti-IgA, -D, -E, -G, -M) gezeigt werden konnte. Sowohl in den Färbungen mit dem anti-IgG als auch mit dem anti-IgA Antikörper waren doppelt markierte Zellen sichtbar. Die Reaktivität des 1427-scFv scheint daher gegen ein Immunglobulinsubtypen unabhängiges Antigen gerichtet zu sein. *Greiner et al.* hatten auch die Bindung eines Tumorummoglobulins an Plasmazellen verschiedener Subklassen in der Mukosa von Magen und Dünndarm beschrieben [24]. Eventuell dient in einigen Fällen eine Plasmazellsubpopulation als antigener Stimulus der MALT-Lymphomzellen.

Neben den Normalgeweben wurden auch Gewebeschnitte einiger MALT-Lymphome immunhistologisch auf die Bindung eines der Tumor-scFv untersucht. Es waren aber mit keinem der scFv spezifische Signale zu erkennen. Wenn die Tumorzellen einen antigenen Stimulus benötigen, befindet er sich, zumindest in den untersuchten Fällen, anscheinend nicht in unmittelbarer Nähe des Tumors. Ebenso scheint *Helicobacter pylori*, nach den vorliegenden Ergebnissen, als direkter antigener Stimulus nicht in Frage zu kommen. Keiner der Tumor-scFvs erkannte Proteine des Bakteriums in Gewebeschnitten von *H. p.*-positiven Magenbiopsaten oder in nativen bzw. denaturierten Proteinextrakten im Western Blot. Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von *Greiner et al.* überein, auch hier wurde keine Bindung eines der Tumorummoglobuline an *H. p.* gefunden[24]. Insgesamt zeigte in den immunhistologischen Untersuchungen einer breiten Palette von Gefrier- und Paraffingeweben, bis auf den 1427-scFv, keiner der sieben Tumor-scFv ein spezifisches Färbemuster.

Zur weiteren Klärung der Reaktivität der Tumor-scFvs wurden Proteinfiler verwendet, auf denen sich fast 30.000 als Proteine exprimierte cDNA Klone aus humanem fötalem Gehirngewebe befinden.[70]. Da die Zellen dieses Gewebes noch keine weitreichende Differenzierung erfahren haben, exprimieren sie ein breites Spektrum an Proteinen und die

Filter eignen sich daher sehr gut die Reaktivität der Tumor-scFvs gegenüber humanen Proteinen festzustellen. Die Experimente mit den Proteinfiltren wurden exemplarisch mit den drei scFvs 13, 18 und 1427 durchgeführt. Sie wurden ausgewählt, weil die MALT-Lymphome aus deren Tumorzellen diese drei scFvs hergestellt wurden, aus verschiedenen Organen stammen (Schilddrüse, Lunge, Magen), und um die in der Immunhistologie beobachtete Reaktivität des 1427-scFv weiter zu untersuchen. Wie bei den Gewebeschnitten, war auch in diesen Experimenten der 1427-scFv der einzige Antikörper, der eine Bindung zeigte. Es konnten zwei spezifische Signale identifiziert werden. Im Gegensatz dazu ließen weder der 13-scFv noch der 18-scFv einen spezifischen Nachweis eines der 30.000 Proteine auf dem Array zu. Nach der Bestimmung der Koordinaten der beiden Bindungspartner des 1427-scFv auf dem Proteinarray und der Sequenzierung der zugehörigen cDNA Klone, stellten sich beide als identisch heraus. Dies spricht für die Spezifität der Bindung des 1427-scFv an das von der cDNA kodierte Protein. Anhand von Datenbankvergleichen wurde es als CGI-126 oder HSPC 155 Protein identifiziert. Die physiologische Funktion dieses Proteins ist unbekannt. Die zugehörige mRNA wird, laut Datenbankeinträgen, in den meisten normalen Geweben und auch in Tumoren exprimiert, eine deutlich höhere Expression wurde jedoch in Plasmazelllinien beobachtet. Dazu passt, dass der 1427-scFv auch in der Immunhistologie ein Plasmazellantigen erkannt hatte. Bei einer spezifischen Reaktivität des 1427-scFv gegenüber dem CGI-126/HSPC 155 Protein hätte man aufgrund des beschriebenen breiten Expressionsspektrums der CGI-126/HSPC 155 mRNA auch ein entsprechendes Färbemuster in den Gewebeschnitten erwartet. Dies war aber nicht der Fall. Der ausbleibende Nachweis in der Immunhistologie kann möglicherweise durch eine fehlende oder eine sehr geringe Translation der CGI-126/HSPC 155 mRNA erklärt werden, die unterhalb der Detektionsgrenze liegt.

Für weitere Bindungsstudien der Tumorummoglobuline wurden am Institut für Medizinische Immunologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte unter Anleitung von Dr. Volkmer-Engert Peptidarrays hergestellt. Ein solcher Array besteht aus 5520 verschiedenen Peptiden, die jeweils 15 Aminosäuren lang sind und eine zufällige Sequenz haben. Die Peptide wurden auf einer Zellulosemembran synthetisiert[71-73]. Die Zahl der auf diese Weise hergestellten potenziellen Epitope ist größer als die der Peptide, da Antikörpern durchschnittlich 6 - 8 Aminosäuren eines Antigens erkennen und so jedes Peptid mehrere überlappende Epitope darstellt[74]. Aufgrund der zufällig generierten Sequenz der Peptide bietet dieser Array auch die Möglichkeit die Bindung der scFvs an nicht humane Epitope zu überprüfen. Für die Versuche wurden zwei identische Peptidarrays hergestellt.

Die Inkubation der beiden Arrays mit den verschiedenen scFvs zeigte jeweils distinkte Signale. Bei einer Wiederholung der Experimente stellten sich diese jedoch als nicht reproduzierbar heraus. Vermutlich war die Bindung der scFvs an die Peptide so fest, dass sich die Arrays nicht, wie geplant, durch eine Entfernung der scFvs regenerieren ließen, sondern die entsprechenden Peptide weiterhin blockiert waren. In dem nächsten Experiment standen sie damit nicht mehr als Bindungspartner zur Verfügung und der nächste scFv hat, wahrscheinlich mit geringerer Affinität, an andere Peptide gebunden. Dies könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Muster der aufeinander folgenden Inkubationen sein. Aufgrund dieser Problematik konnte nur die jeweils erste Inkubation jedes Arrays ausgewertet werden. In beiden Fällen war dazu der 4476-scFv verwendet worden, so dass die Ergebnisse dieser beiden Versuche miteinander verglichen werden konnten. Die Signale, die sich in beiden Experimenten signifikant von denen der Kontrolle unterschieden, wurden ausgewertet. Neun Peptide erfüllten dieses Kriterium und wurden untereinander und mit Datenbanken verglichen. Dabei konnten keine Homologien zueinander oder zu anderen Proteinen, einschließlich des vom 1427-scFv gebundenen CGI-126/HSPC 155 Proteins, entdeckt werden.

Der hier verwendete Peptidarray ist hauptsächlich zur Identifizierung von linearen Antigen-Epitopen geeignet, also solchen, die als Abfolge von Aminosäuren auf der Primärsequenz des Antigens liegen. Von diesen Aminosäuren ist nicht jede in gleichem Maße an der Bindung mit dem Antikörper beteiligt. Bezogen auf die neun Peptide, an die der 4476-scFv auf dem Array gebunden hat, bedeutet dies, dass nur einige Aminosäuren der zufällig generierten Peptide unbedingt notwendig für die Bindung an den scFv sind. Die anderen können im natürlich vorkommenden Epitop durch Aminosäuren ähnlicher physiko-chemischer Eigenschaften ausgetauscht sein. Dies kann ein Grund für die fehlende Homologie der Peptide zu Proteinen in den Datenbanken sein. Es ist auch möglich, dass der 4476-scFv kein lineares, sondern ein diskontinuierliches Epitop erkennt. Solche Epitope bestehen aus Domänen, die sich durch die dreidimensionale Faltung des Antigens in räumlicher Nähe befinden, auf der Primärsequenz aber voneinander getrennt sind. Für die Nachbildung derartiger Antigen-Bindungsstellen sind in den meisten Fällen Peptide mit deutlich mehr als 15 Aminosäuren notwendig. Solche Peptide lassen sich aber nur noch sehr schlecht stabil auf einer Membran synthetisieren und werden daher von dem hier verwendeten Peptidarray nicht erfasst. Auch mit Hilfe des Peptidarrays konnte kein eindeutiger Rückschluss auf das von den scFvs erkannte Protein gezogen werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen konnten die aus anderen Studien vorliegenden, zahlreichen Hinweise auf eine Reaktivität der Tumorzellen gegenüber Antigenen (Umlagerung von VH-Segmenten, die auch von Autoantikörpern verwendet werden[56-59]; somatische Mutationen[13] und intraklonale Diversität der Immunglobulingene[12;26;63]; klinisches Verhalten[17;18]; Bindung der Tumorzell-Immunglobuline an körpereigene Strukturen in Gewebeschnitten[23;24;43;44]), nicht bestätigen. Es wurden insgesamt sieben verschiedene, die Immunglobuline von MALT-Lymphom Tumorzellen repräsentierende, scFvs mit Hilfe von immunhistologischen Färbungen und der Durchmusterung großer Protein- bzw. Peptidbibliotheken auf eine Reaktivität gegenüber unterschiedlichsten Proteinen untersucht. Von den sieben scFvs zeigten nur zwei (1427-scFv, 4476-scFv) eine Bindung an potenzielle Antigene. Der 1427-scFv erkannte mit zwei verschiedenen Screeningmethoden (Immunhistologie, Proteinfilter) Proteine, die auf normalen Plasmazellen exprimiert werden, deren genaue Funktion aber unbekannt ist. Für den 4476-scFv konnten auf dem Peptidarray neun Bindungspartner identifiziert werden. Aufgrund der fehlenden Homologie zu Datenbankeinträgen ist anhand ihrer Sequenzen aber keine weitere Aussage zur Art des bzw. der zugehörigen Proteine möglich. In früheren Untersuchungen wurden von *Hussell et al.* und *Greiner et al.*[23-25;43;44], mit Hilfe immunhistologischer Färbungen in 70 - 100% der untersuchten Fälle eine Bindung der Tumorummunglobuline an in normalem humanem Gewebe vorkommende Proteine festgestellt. Die Autoren schlossen daraus, dass ein Autoantigen am Anfang der Ereignisse steht, die zu der Entstehung von MALT-Lymphomen führen. Für diese Versuche wurden die Tumorummunglobuline, durch die Fusion von Tumorzellen mit murinen Myelomzellen, in Form von Hybridom-Antikörpern hergestellt. Die Übereinstimmungen dieser Hybridom-Antikörper mit den ursprünglichen Tumorummunglobulinen wurden anhand des Isotyps und des isoelektrischen Punktes überprüft, nicht aber anhand der hoch charakteristischen Immunglobulingenumlagerung. Damit war nicht sichergestellt, dass die für diese immunhistologischen Untersuchungen[23-25;43;44] verwendeten Antikörper in ihrer Spezifität den Immunglobulinen der Tumorzellen der MALT-Lymphome entsprachen. Dieser äußerst wichtige Punkt war dagegen bei dem für diese Arbeit gewählten technischen Ansatz, der Verwendung von rekombinanten Antikörpern, gewährleistet. Da mit diesem Ansatz aber die Ergebnisse der früheren Studien nicht bestätigt werden konnten, besteht die Möglichkeit, dass eine Reaktivität der Tumorummunglobuline gegenüber (Auto-)Antigenen in dem bisher angenommenen Maße nicht existiert. Die Regression der Tumore nach Wegnahme eines antigenen Stimulus (*Helicobacter pylori*) könnte auch durch einen anderen Mechanismus, als den der Antigen-

Antikörper Bindung zu erklären sein. Es gibt Untersuchungen an Magen MALT-Lymphomen, die darauf hinweisen, dass Tumor-infiltrierende T-Zellen einen Einfluss auf das Tumorwachstum haben. So wurde gezeigt, dass die Proliferation von Tumorzellen in Gegenwart von *Helicobacter pylori* Extrakten abhängig ist von der Anwesenheit *Helicobacter pylori* aktivierter T-Zellen[20;21].

Die Expression der Immunglobulingene von MALT-Lymphom Tumorzellen in Form von scFvs ermöglichte die Untersuchung ihrer Bindungsspezifitäten mit unterschiedlichsten Methoden. Zwei der sieben scFvs zeigten eine Positivität in der Immunhistologie und auf dem Proteinfiler bzw. dem Peptidarray. Einen Rückschluss auf die Bedeutung der durch die scFvs erkannten Proteine für die Pathogenese der MALT-Lymphome war jedoch nicht möglich. Die Tatsache, dass für die meisten scFvs keine Bindungspartner identifiziert werden konnten, verweist auf die Möglichkeit, dass die Mehrzahl der MALT-Lymphome aus unspezifisch aktivierten B-Zellen entstehen. Die durch *H. p.* Eradikation verursachte Wegnahme der T-Zellstimulation leitet – zumindest in einem frühen Tumorstadium – auch die Eliminierung der klonalen Tumorzellen des MALT-Lymphoms ein.