

Aus der Klinik für Innere Medizin I - Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie und Rheumatologie

SUMOyliertes Bystin und acetyliertes HSP40 als spezifische BZR-Antigene des sporadischen, EBV-negativen Burkitt-Lymphoms

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

vorgelegt von

Theresa Bock

geboren 03.06.1994 in Berlin

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildungsverzeichnis | 5 |
| Tabellenverzeichnis | 7 |
| Abkürzungsverzeichnis | 8 |
| Zusammenfassung | 11 |
| Reaktivität von Burkitt-Lymphom B-Zell-Rezeptoren gegen sekundär-modifizierte Autoantigene und daraus resultierende Wachstumsdynamiken | 11 |
| Summary | 12 |
| Reactivity of Burkitt's lymphoma B-cell receptors against secondary-modified autoantigens and resulting growth dynamics | 12 |
| Einleitung | 13 |
| Das Immunsystem | 13 |
| B-Zell-Entwicklung | 19 |
| B-Zell-Rezeptor Signalweg..... | 24 |
| Non-Hodgkin-Lymphome | 28 |
| Pathogenese der NHL..... | 28 |
| Burkitt-Lymphom | 42 |
| Burkitt-Lymphom – endemisch, sporadisch und Immundefizienz-assoziiert..... | 43 |
| Histologie und Zytologie | 44 |
| Immunphänotyp und Genetisches Profil | 44 |
| Assoziation mit EBV und Malaria..... | 45 |
| Burkitt-like Lymphom mit 11q Aberration..... | 47 |
| Therapie des Burkitt-Lymphoms | 48 |
| Materialien | 52 |
| Laborgeräte..... | 52 |
| Verbrauchsmaterialien | 52 |
| Molekularbiologische Materialien | 52 |
| Immunologische und proteinchemische Materialien | 55 |
| Lösungen und Medien..... | 56 |
| Methoden..... | 59 |

| | |
|---|----|
| DNA-Isolierung..... | 59 |
| Bestimmung der DNA-Konzentration mittels NanoDrop Spectrophotometer | 59 |
| PCR - Polymerase-Chain-Reaction | 59 |
| Ig-V-Gen-PCR..... | 61 |
| Spezifische PCR | 62 |
| Colony-PCR..... | 64 |
| Agarose-Gelelektrophorese..... | 64 |
| DNA-Aufreinigung aus Gelbanden | 65 |
| Transformation von Plasmiden und DNA in Bakterien | 66 |
| TOPO-TA-Klonierung | 67 |
| Overnight-Kultur | 68 |
| Aufreinigung der TA-TOPO-Klone nach Anzucht über Nacht..... | 68 |
| Restriktionsenzym-Verdau..... | 68 |
| Induktionskultur | 69 |
| Messung der Optischen Dichte | 70 |
| Fab-Aufreinigung..... | 71 |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 71 |
| Coomassie-Färbung..... | 72 |
| Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) | 73 |
| Western Blot..... | 74 |
| Darstellung Membran-gebundener Proteine durch Immunfärbung | 75 |
| BZR-Screening auf Autoantigene und Antigene infektiösen Ursprungs mittels Protein-Makroarray..... | 76 |
| BZR-Screening auf Autoantigene und Antigene infektiösen Ursprungs mittels Dot-Blots..... | 77 |
| Herstellung eines SUMO1-BYSL/ETA'-Immunotoxins | 78 |
| MTT-Assay..... | 80 |
| Ergebnisse..... | 81 |
| V-Gen- und spezifische PCR..... | 81 |
| Klonierung in den TA-TOPO-Vektor..... | 82 |
| Colony-PCR nach TA-TOPO-Klonierung | 82 |

| | |
|---|-----|
| Restriktionsenzym-Verdau und Ligation in pCES-Vektor | 82 |
| IMAC-Aufreinigung und SDS-PAGE der rekombinanten Fabs. | 90 |
| Bindungsaffinität gegenüber BystinSumo1 und C7-acetyliertes HSP40 im ELISA..... | 91 |
| Serum-Autoantikörper gegen SUMO-Bystin und acetyliertes HSP40 | 93 |
| Western Blot mit Lysaten von Burkitt-Lymphom Zelllinien..... | 96 |
| Proliferation durch Interaktion mit Zielantigenen..... | 96 |
| Inhibition der Proliferation mit BZR-Antigen-Toxinkonjugat | 97 |
| Diskussion | 99 |
| Literaturverzeichnis..... | 104 |
| Danksagung..... | 121 |
| Publikationen | 122 |
| Poster und Vorträge | 123 |
| Lebenslauf | 124 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Immunglobulins | 16 |
| Abbildung 2: Anordnung der framework regions und complementary determining regions der variablen Region von Schwer- und Leichtketten | 17 |
| Abbildung 3: Immunglobulin nach Spaltung mit Papain..... | 18 |
| Abbildung 4: Schematischer Ablauf der Class-Switch-Recombination..... | 23 |
| Abbildung 5: BZR-Signalgebung, vereinfachte Darstellung | 27 |
| Abbildung 6: Interaktionswege von BCL6 (Auszug)..... | 30 |
| Abbildung 7: Promotertranslokation am Beispiel von BCL6 und dem Ig-Promoter | 31 |
| Abbildung 8: Regulation des proteasomalen Abbaus von BCL6..... | 31 |
| Abbildung 9: Wichtige Proteininteraktionen | 39 |
| Abbildung 10: Vergleich verschiedener Therapieprotokolle des Burkitt-Lymphoms, aus "Adult Burkitt leukemia and lymphoma - Blum K, Lozanski G, Byrd J ²¹⁰ | 51 |
| Abbildung 11: VH-Primer nach van Dongen, Langerak, Brüggemann, Evans, Hummel et al. (2003) | 63 |
| Abbildung 12: 50 Bp DNA Marker; Nach New England Biolabs ²²³ (links) und Gene Ruler 1kb DNA Ladder, ThermoFisher Scientific ²²⁴ 2 (rechts) | 65 |
| Abbildung 13: pCR@2.1-TOPO Vektor, nach Thermo Fisher Scientific ²²⁹ | 67 |
| Abbildung 14: Schematische Abbildung des Lac-Operons; Gemeinfrei, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=505841 ; abgerufen am 11.06.2023..... | 70 |
| Abbildung 15: Struktur und Funktionsweise von Intein | 79 |
| Abbildung 16: Variable Immunglobulin-Gene der einzelnen Proben | 81 |
| Abbildung 17: Ausschluss interner NcoI/BstEII-Schnittstellen: 1: 1B2 VH4; 2: 1C1 VH3; 3: CA46 VH5; 4: Nalm6 VH1; | 82 |
| Abbildung 18: Colony-PCR nach Ligation in pCES-v-kappa; 1: Daudi VH3; 2 – 5: LAZ221 VH3; 6 – 9: Mutu1 VH3; | 83 |
| Abbildung 19: Colony-PCR nach Ligation in pCES-v-kappa; 1 – 2: 1A2 VH1; 3 – 6: 1B2 VH4; 7 – 10: 1C1 VH3; M: 1kbp Marker..... | 83 |
| Abbildung 20: Colony-PCR nach Ligation in pCES-v-kappa; 1 – 4: BJAB VH3; 5 – 8: BL41 VH3; 9 – 10: BL41 VH4; | 84 |
| Abbildung 21: Colony-PCR nach Ligation in pCES-v-kappa; M: 1kbp Marker; 1 – 4: Nalm6 VH1; 5 – 8: Raji VH1; | 84 |
| Abbildung 22: Colony-PCR nach Ligation in pCES-v-kappa; 1 – 3: BL41 VH4; 4 – 7: CA46 VH5; 8 – 10: Daudi VH3; | 84 |
| Abbildung 23: Ausschluss von ApaLI/XhoI-Schnittstellen: M: 1kbp Marker; 1: Mutu1 VK1; 2: Nalm6 VK1; 3: Raji VK3; | 85 |

| | |
|--|----|
| Abbildung 24: Ausschluss von ApaLI/XhoI-Schnittstellen: 1: BJAB VH3 pCES; 2: BL41 VH3 pCES; 3: BL41 VH4 pCES; 4: CA46 VH5 pCES; 5 – 6: Daudi VH3 pCES; 7: LAZ221 VH3 pCES; 8: Mutu1 VH3 pCES; 9: Nalm6 VH1 pCES; 10: Raji VH1 pCES; 11: 1A2 VH1 pCES; 12: 1B2 VH4 pCES; 13: 1C1 VH3 pCES; M: 1kbp Marker | 85 |
| Abbildung 25: Ausschluss von ApaLI/XhoI-Schnittstellen: 1: BJAB VK1; 2: BL41 VK3; 3: BL41 VK4; 4: BL41 VK2, 5: CA46 VK3; 6: Daudi VK1; 7: LAZ221 VK3; M: 1kbp Marker | 86 |
| Abbildung 26: Colony-PCR nach Ligation v. Schwer- und Leichtketten-DNA im pCES-Vektor: 1 – 4: BJAB VH3/VK1; | 86 |
| Abbildung 27: Colony-PCR nach Ligation v. Schwer- und Leichtketten-DNA im pCES-Vektor: 1 – 2: BL41 VH3/VK4; | 87 |
| Abbildung 28: Colony-PCR nach Ligation v. Schwer- und Leichtketten-DNA im pCES-Vektor: 1 – 2: CA46 VH5/VK3; 3 – 6: Daudi VH3/VK1; 7 – 10: LAZ221 VH3/VK3; M: 1kbp Marker..... | 87 |
| Abbildung 29: Colony-PCR nach Ligation v. Schwer- und Leichtketten-DNA im pCES-Vektor: 1 – 4: Mutu1 VH3/VK1; | 88 |
| Abbildung 30: Colony-PCR nach Ligation v. Schwer- und Leichtketten-DNA im pCES-Vektor: 1 – 4: 1A2 VH1/VK3; | 88 |
| Abbildung 31: Colony-PCR nach Ligation v. Schwer- und Leichtketten-DNA im pCES-Vektor: 1 – 4: 1B2 VH4/VK1; | 89 |
| Abbildung 32: Colony-PCR nach Ligation v. Schwer- und Leichtketten-DNA im pCES-Vektor: 1 – 5: Raji VH1/VK3; M: 1kbp Marker | 89 |
| Abbildung 33: SDS-Gelelektrophorese mit den Fabs nach IMAC-Aufreinigung, Coomassie-Färbung: 1: BJAB; 2: BL41 VH3/VK3; 3: BL41 VH3/VK4; 4: BL41 VH4/VK2; 5: CA46; 6: Daudi; 7: LAZ221; 8: Mutu1; 9: 1A2; | 90 |
| Abbildung 34: SDS-Gelelektrophorese mit den Fabs nach IMAC-Aufreinigung, Coomassie-Färbung: 1: 1C1; 2: Nalm6; | 90 |
| Abbildung 35: Auswertung ELISA auf Bystin und SUMO-Bystin mit rekombinanten Fabs durch Wallac Victor2 1420 Multilable, natürliche Fabs von BL41 und CA46 als Kontrollen | 92 |
| Abbildung 36: Auswertung ELISA auf HSP40 und acetyl. HSP40 mit rekombinanten Fabs durch Wallac Victor2 1420 Multilable, natürliche Fabs von BL41 und CA46 als Kontrollen | 92 |
| Abbildung 37: Auswertung ELISA Bystin und SUMO-Bystin mit Patienten-Seren durch Wallac Victor2 1420 Multilable, natürliche Fabs von BL41 und CA46 als Kontrollen..... | 93 |
| Abbildung 38: Auswertung ELISA auf HSP40 und acetyl. HSP40 mit Patienten-Seren durch Wallac Victor2 1420 Multilable, natürliche Fabs von BL41 und CA46 als Kontrollen..... | 94 |
| Abbildung 39: Western Blot von BL-Zelllinien auf Reaktivität gegen Bystin (B) und HSP40. (D) ... | 96 |
| Abbildung 40: Induktion einer signifikanten Proliferation der CA46-Linie durch SUMOyliertes Bystin und der BL41-Linie durch Zugabe von acetyliertem HSP40. Mit dem EZ4U-Test ermittelte Zunahme der Proliferation (die Säulen zeigen Formazan bei einer optischen Dichte (OD) von 450 nm)..... | 97 |

Abbildung 41: OD-Messung im Tetrazolin-Formazan Assay nach Zugabe der ETA-konjugierten Antigene (links) und nach Zugabe der ETA-Intein-gekoppelten Antigene (rechts) 98

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Proteinkonzentration der Fab-Proben nach Dialys gegen PBS 91

Tabelle 2: Detaillierte OD-Messungen der einzelnen Patientenproben bei 450nm nach ELISA 95

Tabelle 3: Beispiele klinischer Studien mit Immunotoxinen ²⁷⁴ 102

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------|--|
| ABC-DLBCL | <i>activated b cells diffuse large b cell lymphoma</i> |
| ADCC | <i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> |
| ADCP | <i>Antibody-dependent cellular phagocytosis</i> |
| AID | <i>AID (Aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase</i> |
| APC | <i>Antigen-präsentierende Zelle</i> |
| BAFF | <i>B-Tell-aktivierender Faktor</i> |
| BL | <i>Burkitt-Lymphom</i> |
| BTK | <i>Brutontyrosinkinase</i> |
| BZR | <i>B-Zell-Rezeptor</i> |
| CARD | <i>caspase-recruitment domain</i> |
| CAR-T-Zellen | <i>Chimäre Antigen-Rezeptor-T-Zellen</i> |
| CBM-Komplex | <i>CARD-BCL10-MALT1 signalosome complex</i> |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> |
| CDC | <i>Complement-dependent cytotoxicity</i> |
| CDK | <i>Cyclin-abhängige Kinase</i> |
| C-Domäne | <i>konstante Domäne</i> |
| CDR | <i>complementary determining region</i> |
| CKD | <i>Cyclin D</i> |
| C-Region | <i>konstante Region</i> |
| CSR | <i>Klassenwechselrekombination</i> |
| C-terminal | <i>Carboxy-terminal</i> |
| D | <i>diversity</i> |
| DLBCL | <i>Diffus großzelliges B-Zell Lymphom</i> |
| EBNA | <i>EBV nuclear antigen</i> |
| EBV | <i>Epstein-Barr-Virus</i> |
| ER | <i>endoplasmatisches Retikulum</i> |
| Fab | <i>fragment antigen binding</i> |
| Fc | <i>fragment crystallizable</i> |
| FR | <i>framework region</i> |
| G | <i>Guanosin</i> |
| GC | <i>Keimzentrum</i> |
| GCB-DLBCL | <i>germinal center B cells diffuse large b cell lymphoma</i> |
| HBV | <i>Hepatitis-B-Virus</i> |
| HCV | <i>Hepatitis-C-Virus</i> |
| His-Tag | <i>Histidin-tag</i> |
| HPV | <i>Humanes Papillomavirus</i> |
| HTLV1 | <i>Humanes T-lymphotropes Virus 1</i> |
| Ig | <i>Immunglobulin</i> |

| | |
|------------|---|
| IgH | <i>Immunglobulin Schwereketten</i> |
| IL | <i>Interleukin</i> |
| IMAC | <i>Immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie</i> |
| ITAM | <i>immunoreceptor tyrosin-based activation motifs</i> |
| J | <i>joining</i> |
| LLPC | <i>langlebige Plasmazellen</i> |
| LMP | <i>Epstein-Barr virus latent membrane protein</i> |
| MAC | <i>Membranangriffskomplex</i> |
| MALT | <i>mucosa associated lymphoid tissue</i> |
| MAPK | <i>Mitogen-aktivierte Proteinkinase</i> |
| MHC | <i>Major histocompatibility complex</i> |
| MIRL | <i>Membrane inhibitor of reactive lysis</i> |
| miRNA | <i>Micro-RNA</i> |
| NET | <i>Neutrophile extracellular trap</i> |
| NFκB | <i>nuclear factor κB</i> |
| NHL | <i>Non-Hodgkin Lymphom</i> |
| NK-Zellen | <i>Natürliche Killerzellen</i> |
| NLPHL | <i>Noduläres Lymphozyten-prädominantes Hodgkin-Lymphom</i> |
| N-terminal | <i>Amino-terminal</i> |
| OD | <i>Optische Dichte</i> |
| P | <i>Phosphat</i> |
| PCNSL | <i>primary central nervous system lymphoma</i> |
| PCR | <i>Polymerase-Kettenreaktion</i> |
| PI3K | <i>Phosphoinositol-3-Kinase</i> |
| PIP2 | <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat</i> |
| PIP3 | <i>Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat</i> |
| PIP5K | <i>Phosphatidylinositol-4-Phosphat-Kinase-5</i> |
| PKCβ | <i>Proteinkinase Cβ</i> |
| PLCγ | <i>Phospholipase Cγ</i> |
| pRb | <i>Retinoblastom-Protein</i> |
| PTM | <i>posttranslationale Modifikation</i> |
| RIPK | <i>Receptor-Interacting Protein Kinase</i> |
| S | <i>Switch</i> |
| SDS-PAGE | <i>Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</i> |
| SHM | <i>somatische Hypermutation</i> |
| SLC | <i>surrogate light chain</i> |
| ssDNA | <i>single-stranded DNA</i> |
| STAT | <i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i> |
| Tdt | <i>Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase</i> |

| | |
|-------|--|
| TGF | <i>Transforming growth factor</i> |
| TLR | <i>Toll-Like-Rezeptor</i> |
| TNF | <i>Tumor Necrosis Factor</i> |
| TNFR | <i>Tumor Necrosis Factor Receptor</i> |
| TRADD | <i>Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1 Associated Death Domain Protein</i> |
| TRAF | <i>TNF receptor associated factor</i> |
| Tyr | <i>Tyrosin</i> |
| V | <i>variable</i> |
| V-Gen | <i>variables Gen</i> |
| VH | <i>variable Domäne Schwereketten</i> |
| VK | <i>variable Domäne Leichtkette Kappa-Typ</i> |
| VL | <i>Domäne Leichtkette Lambda-Typ</i> |

Zusammenfassung

Reaktivität von Burkitt-Lymphom B-Zell-Rezeptoren gegen sekundär-modifizierte Autoantigene und daraus resultierende Wachstumsdynamiken

Die Grundlage dieser Arbeit bildet die Untersuchung von Burkitt-Lymphom B-Zell-Rezeptoren auf die Erkennung veränderter körpereigener Antigene, die möglicherweise über eine konstitutive B-Zell-Rezeptor-Signalgebung maßgeblich zur malignen Transformation von B-Zellen beitragen können. Um mögliche Zielantigene zu identifizieren, wurden im Voraus Zelllinien mittels eines in-house modifizierten Macroarrays auf Bindung an körpereigene Antigene mit bestimmten posttranslationalen Modifikationen gescreent. Hier zeigte sich eine Bindung des BZR der Zelllinie CA46 gegen SUMOyliertes Bystin und der Zelllinie BL41 gegen acetyliertes HSP40. Zur Identifikation weiterer potenzieller Ziel-Antigene wurden ergänzend Dot Blots gegen inaktivierte Plasmodien-Lysate sowie Proteinarrayscreenings gegen verschiedene virale und bakterielle Antigene durchgeführt. Gegen diese ließ sich keine Reaktivität der untersuchten BZR nachweisen. Diese Arbeit widmete sich im Weiteren der Untersuchung von Burkitt-Lymphom Zelllinien und Patientenproben auf Bindung an die sekundärmodifizierten Antigene acetyliertes HSP40 und SUMO1-Bystin. Des Weiteren lag der Fokus auf der Analyse der Wachstumsdynamik der Burkitt-Lymphom Zellen CA46 und BL41 nach Zugabe ihres korrespondierenden Antigens und der Induktion einer möglichen Zytotoxizität durch Kopplung der Antigene an *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin-A (ETA). Die B-Zell-Rezeptoren (BZR) mehrerer Burkitt-Lymphom Zelllinien wurden kloniert und die Bindung der BZR von BL41 und CA46 an acetyliertes HSP40 bzw. SUMOyliertes Bystin im ELISA und Western Blot bestätigt. Weiterhin wurden Blutproben von Patienten mit diagnostiziertem Burkitt-Lymphom auf Antikörper untersucht. Hier ließ sich für einen von acht Patienten eine Reaktivität an SUMO1-BYS sowie für einen weiteren Patienten eine Reaktivität gegen acetyliertes HSP40 im ELISA nachweisen. Im Proliferationsassay konnte nach Zugabe der modifizierten Antigene zu den Zelllinien BL41 und CA46 ein deutlich zunehmendes Zellwachstum im Vergleich zur Anwesenheit der nicht-posttranslational-modifizierten Antigen-Isoform gezeigt werden. Nach Intein-vermittelter Kopplung der posttranslational modifizierten Antigene an das ETA-Toxin von *Pseudomonas* konnte im Proliferationsassay eine relevante Zytotoxizität beobachtet werden.

Summary

Reactivity of Burkitt's lymphoma B-cell receptors against secondary-modified autoantigens and resulting growth dynamics

This work is based on the investigation of Burkitt lymphoma B-cell receptors for the recognition of altered endogenous antigens, which may contribute significantly to the malignant transformation of B cells via constitutive B-cell receptor signaling. To identify possible target antigens, cell lines were screened in advance using an in-house modified macroarray for binding to endogenous antigens with specific post-translational modifications. This revealed binding of the BCR of the CA46 cell line to SUMOylated bystine and of the BL41 cell line to acetylated HSP40. To identify further potential target antigens, dot blots against inactivated Plasmodium lysates and protein array screenings against various viral and bacterial antigens were also performed. No reactivity of the investigated BCRs was detected against these.

This work also focused on the investigation of Burkitt lymphoma cell lines and patient samples for binding to the secondary modified antigens acetylated HSP40 and SUMO1-bystin. Furthermore, the focus was on analysing the growth dynamics of the Burkitt lymphoma cells CA46 and BL41 after addition of their corresponding antigen and the induction of possible cytotoxicity by coupling the antigens to *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A (ETA). The B-cell receptors (BCR) of several Burkitt lymphoma cell lines were cloned, and the binding of the BCR of BL41 and CA46 to acetylated HSP40 and SUMOylated bystine, respectively, was confirmed by ELISA and Western blot. Furthermore, blood samples from patients diagnosed with Burkitt lymphoma were tested for antibodies. Here, reactivity to SUMO1-BYS was detected in one of eight patients and reactivity to acetylated HSP40 was detected in another patient in ELISA. In the proliferation assay, the addition of the modified antigens to the BL41 and CA46 cell lines showed a significant increase in cell growth compared to the presence of the non-post-translationally modified antigen isoform. After intein-mediated coupling of the post-translationally modified antigens to the ETA toxin from *Pseudomonas*, relevant cytotoxicity was observed in the proliferation assay.

Einleitung

Das Immunsystem

Anatomische und chemische Schutzmechanismen

Der menschliche Körper sieht sich mit einer Vielzahl potenzieller Krankheitserreger, sog. Pathogenen, konfrontiert. Um diesen begegnen zu können und sich zu schützen, hat er ein komplexes System zur Verteidigung gegenüber Mikroorganismen wie Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten entwickelt, das Immunsystem. Zusätzlich stehen ihm chemische und anatomische Schutzbarrieren zur Verfügung. Hierzu zählen Haut und Schleimhäute. Letztere sind häufig von einer muzzinösen Schicht bedeckt, die es Krankheitserregern erschwert, sich an die Schleimhäute anzuheften und deren mechanischen Abtransport fördert. Haut und Schleimhäute sind außerdem mit Populationen von Bakterien besiedelt, die unter normalen Umständen nicht pathogen wirken. Diese Populationen werden als Mikrobiota bezeichnet und unterliegen von Mensch zu Mensch individuellen Unterschieden. Grundsätzlich setzen sie sich unter anderem aus Gram-positiven Bakterien wie Clostridien, Enterokokken, Lactokokken und Lactobacillen sowie Gram-negativen Stämmen der Familie der Bacterioides zusammen. Diese produzieren und sezernieren antimikrobielle Substanzen, die Mikroorganismen abwehren und regen gleichzeitig die Zellen der anatomischen Barrieren selbst zur Produktion von Enzymen und Peptiden an, die Mikroorganismen angreifen.¹

Das angeborene Immunsystem

In Bezug auf das Immunsystem unterscheidet man den angeborenen Teil vom erworbenen Teil und die humorale von der zellulären Immunantwort.

Die wichtigsten Vertreter der humoralen Immunantwort bilden die Mitglieder des Komplementsystems. Bei diesen handelt es sich um Plasmaproteine, die im Blut und in extrazellulärer Flüssigkeit zirkulieren. Sie sind Teil des angeborenen Immunsystems, ihre Synthese findet in der Leber statt. Ihrer Funktion nach agieren die meisten Komplementfaktoren als Proteasen, die sich im Rahmen ihrer Signalkaskade gegenseitig aktivieren und gemeinsam ihre Effektormechanismen induzieren. Das Komplementsystem kann selbstständig gegen Mikroorganismen vorgehen oder zusammen mit Antikörpern und Immunzellen wirken. Die Haupteffekte, die vom Komplementsystem ausgeübt werden, sind:²

- 1) Die Opsonierung, also die Anlagerung an geschädigte Zellen oder Pathogene, welche wiederum die Erkennung und Phagozytose durch die Zellen des Immunsystems erleichtert.
- 2) Die Aktivierung von Leukozyten und somit die Initiierung einer Entzündungsreaktion.

- 3) Die Bildung des sog. Membranangriffskomplexes (MAC). Dieser setzt sich aus mehreren Faktoren des Komplementsystems (C5b – C9) zusammen und ist in der Lage, Poren in der Membran von Bakterien zu bilden und somit zur Lyse zu führen.

Die Aktivierung des Komplementsystems kann auf drei unterschiedlichen Wegen stattfinden, allen liegt als Ausgangspunkt die Erkennung mikrobieller Oberflächenstrukturen zu Grunde. In geringem Maße findet im Blut eine kontinuierliche Spontanaktivierung des Komplementsystems statt, wodurch eingedrungene Mikroorganismen innerhalb kürzester Zeit erkannt werden können. Um körpereigene Zellen vor einem versehentlichen Angriff durch das Komplementsystem zu schützen, tragen sie spezielle Oberflächenproteine, die das Komplementsystem in seiner Aktivierung bremsen, insbesondere CD55 und CD59³⁻⁵. CD59 (Membrane inhibitor of reactive lysis, MIRL) ist ein Protein auf der Zelloberfläche, welches durch gezielte Bindung von C8 dessen Assoziation mit C9 inhibiert, wodurch die Bildung des MAC gestört wird.⁶⁻⁸ CD55 (Decay accelerating factor, DAF) stellt ebenfalls ein Membranprotein dar und dient dem Schutz einer ungewollten Komplement-vermittelten Lyse körpereigener Zellen, in dem es die Bildung der C3- und C5-Konvertase unterbindet.^{8,9} Zum angeborenen Immunsystem gehörten neben dem Komplementsystem auch zelluläre Akteure. Hierzu zählen die Makrophagen, Granulozyten, Mastzellen, dendritischen Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Wie alle Mitglieder des angeborenen Immunsystems zeichnen sie sich durch ihre schnelle Reaktionszeit von nur wenigen Minuten nach Erkennung eines potenziellen Krankheitserregers, Alarminen (DAMPs; Damage-associated molecular patterns) durch Toll- oder NOD-Like-Rezeptoren oder einer beschädigten Zelle aus.

Makrophagen gehören zu den Phagozyten des Immunsystems. Das bedeutet, dass sie nach Erkennung von Pathogenen, u.a. nach deren Opsonierung durch das Komplementsystem, diese aufzunehmen vermögen und in ihrem Inneren zerstören. Peptide der abgetöteten Erreger können in Makrophagen an sog. MHC-Proteine (major histocompatibility complex) gekoppelt und anschließend auf ihrer Zelloberfläche präsentiert werden, um sie für andere Immunzellen erkennbar zu machen. Darüber hinaus sezernieren sie Substanzen, die weitere Zellen des Immunsystems aktivieren. Makrophagen sind langlebige Zellen, die man größtenteils im Gewebe findet. Bei den noch nicht endgültig differenzierten, im Blut befindlichen Vorläuferzellen der Makrophagen, handelt es sich um Monozyten.

Als Granulozyten bezeichnet man eine Gruppe von Granula-enthaltenden Zellen, die nach der Anfärbbarkeit ihres Zytoplasmas in neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten unterschieden werden. Neutrophile verhalten sich ähnlich wie Makrophagen, sie sind ebenfalls zur Phagozytose befähigt. Im Unterschied zu Makrophagen handelt es sich bei neutrophilen Granulozyten jedoch um sehr kurzlebige Zellen, die nach der Aufnahme eines Pathogens zugrunde gehen. Sie verfügen jedoch zusätzlich über die Fähigkeit, Mikroorganismen in sog. NETs (Neutrophile extracellular trap) einzufangen. Diese bestehen aus Chromatin und den in den

azurophilen Granula enthaltenen antimikrobiellen Substanzen, z.B. Serin-Proteasen und Myeloperoxidase, die nach Auflösen der granulozytären Zellmembran freigesetzt werden.¹⁰

Eosinophile und basophile Granulozyten enthalten in ihren Granula ebenfalls Enzyme und Proteine, die Pathogene zerstören können und bei Aktivierung der Zellen freigesetzt werden. Gemeinsam mit Mastzellen sind sie wahrscheinlich hauptsächlich an der Abwehr von Parasiten beteiligt.

Mastzellen finden sich überwiegend in peripheren Geweben und schützen insbesondere Oberflächen, die das Körperinnere auskleiden. Sie besitzen ebenfalls Granula, in denen sich hauptsächlich Histamin und Proteasen finden, die bei Bedarf freigesetzt werden und weitere Abwehrzellen rekrutieren.

Die dendritischen Zellen des Immunsystems sind ebenfalls eine gewebständige Zellpopulation. Auch sie besitzen die Fähigkeit zur Phagozytose und Präsentation über MHC-I und -II Proteine, wodurch sie weitere Immunzellen aktivieren und auch als professionell antigen-präsentierende Zellen (APCs) bezeichnet werden.

Zuletzt sind im Rahmen des angeborenen Immunsystems noch die die NK-Zellen zu nennen. Sie dienen hauptsächlich dem Schutz vor Viren und intrazellulären Erregern, die sie einerseits über die Perforin/Granzym-Achse mit lytischen Granula und andererseits über Liganden von Todesdomänenrezeptoren und Sekretion von Interferon- γ angreifen und vernichten können¹¹.

Das erworbene (adaptive) Immunsystem

Die Mechanismen des angeborenen Immunsystems stehen dem Körper von Geburt an zur Verfügung und sind in der Lage, innerhalb weniger Minuten auf einen potenziellen Krankheitserreger zu reagieren. Jedoch hält diese Reaktion in der Regel nur kurz an und bildet keine wiederkehrenden Mechanismen im Sinne eines immunologischen Gedächtnisses aus. Deshalb besteht die Notwendigkeit für eine längerfristige Abwehr, welche durch das erworbene/adaptive Immunsystem gewährleistet wird. Gebildet wird es von den antigenspezifischen B- und T-Lymphozyten. Beide sind in der Lage, nach einem ersten Kontakt mit einem Antigen langlebige Gedächtniszellen zu bilden, die bei einer erneuten Infektion eine schnelle, gezielte und stärkere Immunreaktion auslösen. Um Antigene zu erkennen, besitzen Lymphozyten spezielle Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche. Der Begriff „Antigen“ umfasst sämtliche Strukturen, die von Antikörpern oder spezifischen B- oder T-Zell-Rezeptoren auf Lymphozyten erkannt werden. Sind sie größer als der Erkennungsbereich eines einzelnen Rezeptors oder Antikörpers umfasst. Dadurch können sie an mehreren Lokalisationen gleichzeitig durch verschiedene Bindungspartner erkannt werden. Ein Bereich, der von einem antigen-spezifischen Rezeptor oder Antikörper erkannt wird, trägt die Bezeichnung Epitop. Ein einzelnes Antigen kann also multiple Epitope besitzen. B-Lymphozyten identifizieren Antigene über ein membranständiges Immunglobulin, den B-Zell-Rezeptor (BZR). Die lösliche Form eines Immunglobulins nennt man dagegen Antikörper. Nach Kontakt zu ihrem Ziel-Antigen können sich B-Lymphozyten zu Plasmazellen differenzieren, die ihren spezifischen BZR als Antikörper produzieren

und ins Blut sezernieren. Während B-Zellen ausschließlich dazu in der Lage sind, extrazelluläre Antigene zu erkennen, können die Rezeptoren von T-Zellen zusätzlich intrazelluläre Antigene oder Pathogene erkennen. Dies wird ihnen dadurch ermöglicht, dass ihr Rezeptor Antigene dann erkennt, wenn diese an MHC-Proteine gebunden sind. MHC-I-Proteine finden sich auf der Oberfläche aller kernhaltigen Körperzellen und dienen zur Erkennung dieser als körpereigen sowie zur Präsentation intrazellulärer Peptide in Form von Nonameren¹². Hiervon zu unterscheiden sind die MHC-II-Proteine, über welche die Präsentation aufgenommener Antigen-Fragmente erfolgt. Diese finden sich daher ausschließlich auf sogenannten Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten. Man kennt grundsätzlich zwei Arten von T-Zellen, die unterschiedliche Funktionen ausüben. Zytotoxische T-Zellen werden nach Erkennung ihres MHC-präsentierten Zielantigens aktiviert und zerstören die Antigen-präsentierende Zelle. T-Helferzellen können nach Antigen-Erkennung andere Immunzellen, wie z.B. B-Lymphozyten oder Makrophagen durch Freisetzen von Cytokinen oder stimulierende Rezeptorinteraktionen (CD40/CD40L) aktivieren.

Aufbau von Immunglobulinen

Wie bereits erwähnt, dienen Immunglobuline, ob löslich als Antikörper oder membranständig in Form des BZR, der Erkennung von Antigenen. Um dieser Funktion möglichst effektiv nachkommen zu können und gleichzeitig verschiedene Effekte zu vermitteln, sind Immunglobuline aus unterschiedlichen Domänen oder Regionen zusammengesetzt.

In Abb.1 ist eine vereinfachte Darstellung eines Immunglobulins zu sehen. Hieran soll im Folgenden exemplarisch dessen Aufbau erläutert werden.

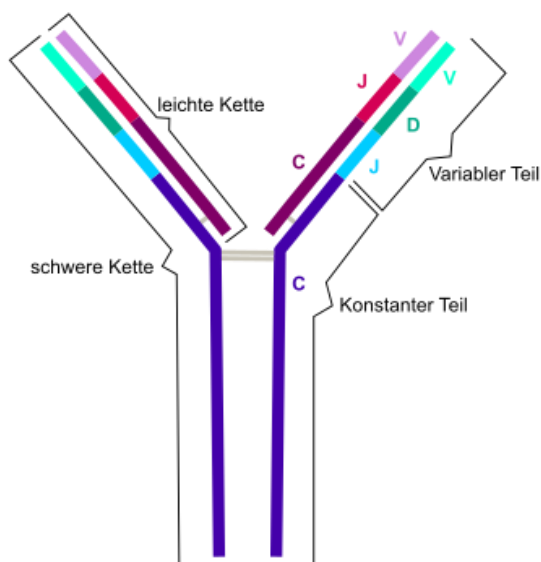


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines Immunglobulins

Ein IgG-, IgD- oder IgE-Immunglobulin verfügt grundsätzlich über zwei Schwer- und Leichtketten, die innerhalb eines Immunglobulins jeweils identisch sind und über Disulfidbrücken miteinander in Verbindung stehen (in der Abb. 1 grau). Schwereketten wagen mit einer Größe von ungefähr 45-50kDa auf, die Leichtketten sind etwa halb so groß mit ca. 25kDa. Sowohl die schweren als auch die leichten Ketten bestehen aus einem konstanten Teil (C-Domäne) mit carboxyterminalem Ende und einem variablen Teil (V-Domäne) mit aminoternalem Ende. Die V-Domäne besteht wiederum aus verschiedenen Genen, V (variable), D (diversity) und J (joining) für die Schwerekette bzw VJ für die Leichtkette, die miteinander kombiniert werden. Die C-Domäne der Schwerekette ist eigentlich eine Aneinanderkettung drei einzelner C-Domänen, die man ausgehend vom aminoternalen Ende mit CH1 – 3 nummeriert. Interaktionen zwischen dem Immunglobulin und seinem Effektor-Partner erfolgen ausschließlich über die CH3-Region.^{13,14} Zur Vereinfachung wird die C-Region nachfolgend jedoch als Einheit zusammengefasst.

Die Variabilität der V-Region der Schwer- und Leichtketten ist nicht auf ihrer gesamten Sequenzlänge gleichmäßig ausgeprägt, sondern weist drei Bereiche besonders hoher Variabilität auf, sog. hypervariable Regionen. Diese bezeichnet man als CDR1-3 (complementarity determining regions) und sie bilden letztendlich die Antigen-Bindungsstelle des Immunglobulins. Die CDR sind eingefasst in vier weniger variable Bereiche, die als Gerüst der Kette dienen, die framework regions.^{14,15} (FR1-4)



Abbildung 2: Anordnung der framework regions und complementary determining regions der variablen Region von Schwer- und Leichtketten

Anhand der Y-Form kann man auf Immunglobuline noch eine weitere strukturelle Einteilung anwenden. Diese geht auf frühere Experimente mit Antikörpern und die Spaltung dieser mit dem Enzym Papain zurück. Papain spaltet Immunglobuline derart, dass das „Bein“ und die beiden „Arme“ voneinander gelöst werden, sodass drei Spaltprodukte entstehen – die beiden „Arme“, denen die Bezeichnung Fab (fragment antigen binding) gegeben wurde und den Fc-Teil (fragment crystallizable), der aus dem „Bein“ des Y besteht. Zur besseren Veranschaulichung ist diese Einteilung in Abb. 3 nachzuvollziehen.¹³⁻¹⁵ Die Fab-Teile beinhalten die variablen Regionen der Schwer- und Leichtketten, die der Antigen-Erkennung dienen. Der Fc-Teil besteht aus dem Großteil der konstanten Domäne der Schwereketten und übernimmt bei löslichen Antikörpern die Vermittlung seiner Effektorfunktion, während er beim BZR in der Zellmembran verankert ist. Die Verbindungsstelle zwischen Fab und Fc bezeichnet man als hinge- oder Gelenk-Region. Sie

ermöglicht ein gewisses Ausmaß an räumlicher Flexibilität durch Einnahme unterschiedlicher Winkel zwischen den Fab-Teilen und dem Fc-Teil, um optimal mit Epitopen interagieren zu können.¹⁵⁻¹⁷

Funktion von Immunglobulinen

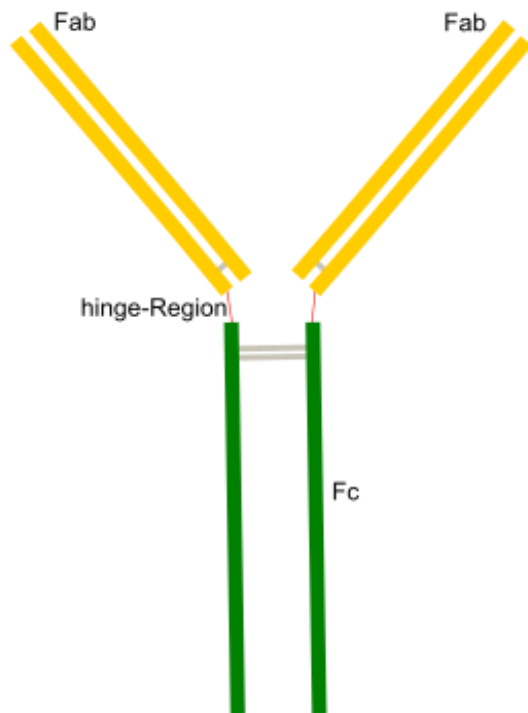


Abbildung 3: Immunglobulin nach Spaltung mit Papain. Als Spaltprodukte entstehen 2 Fab- und 1 Fc-Teil

Anhand des Fc-Teils werden Immunglobuline in verschiedene Klassen oder Isotypen eingeteilt. Alle Immunglobuline einer Klasse verfügen über eine ähnliche C-Domäne. Man unterscheidet IgM, deren C-Region man mit C_{μ} bezeichnet, IgD (C_{δ}), IgG (C_{γ}), IgE (C_{ϵ}) und IgA (C_{α}). Diese differieren in ihrer Struktur und der von ihnen in Gang gesetzten Mechanismen. Anders als die anderen Immunglobulinklassen bilden IgM und IgA Polymere, um ihre Effektorfunktion auszuüben. IgM lagern sich zu einem Pentamer aus fünf Immunglobulinen zusammen, IgA bilden Dimere aus 2 Immunglobulinen. Die durch Immunglobuline ausgelösten Effekte lassen sich grob in drei Gruppen einteilen: Einerseits dient die Bindung des Fc-Teils eines Immunglobulins an spezielle Fc-Rezeptoren der Initiierung und Erleichterung der Phagozytose (Antibody-dependent cellular phagocytosis (ADCP)) und Zerstörung (Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)) durch z.B. Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Durch diesen Mechanismus werden extrazelluläre Pathogene durch Bindung des Antikörpers zum Abbau opsoniert. Dieser Vorgang funktioniert ähnlich dem des Komplementsystems. Nach dem gleichen Prinzip können auf diese Weise im Blut befindliche Toxine von Antikörpern erkannt, gebunden und neutralisiert werden, bis sie von Makrophagen zum endgültigen Abbau phagozytiert werden. Zum anderen kann die Fc-Region

einiger Immunglobulin-Klassen durch Bindung an Komplementfaktoren eine Aktivierung des Komplementsystems einleiten und so eine Entzündungsreaktion hervorrufen (Complement-dependent cytotoxicity, CDC). Der dritte Mechanismus besitzt Transportfunktion, in dem durch Rezeptorbindung eine Sezernierung der Immunglobuline in Körpersekrete ermöglicht wird (z.B. Tränenflüssigkeit, Muttermilch).¹⁸ Antikörper üben in der Regel nicht eine isolierte Funktion aus, jedoch sind die verschiedenen Effektormechanismen Klassen-abhängig unterschiedlich stark ausgeprägt. So aktivieren IgG und IgM insbesondere das Komplementsystem, während IgE hochaffin an Mastzellen und Basophile binden.^{14,15,18} Innerhalb der IgG gibt es weiterhin verschiedenen Subklassen mit unterschiedlichen Aufgaben.

B-Zell-Entwicklung

B-Lymphozyten werden im Knochenmark aus gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzellen gebildet. Diese entstehen über mehrere Differenzierungsschritte unter Interaktion mit Stromazellen des Bindegewebes aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks und entwickeln sich schließlich zu B-Zellen, T-Zellen oder NK-Zellen¹⁹⁻²¹.

Die Entwicklung von B-Lymphozyten wird durch die Expression einer zufälligen Kombination aus einer Vielzahl von Genen, welche für die variable Region der Schwer (H) - und Leichtketten (L) des BZR codieren, initiiert, dem sog. VDJ-Rearrangement²²⁻²⁴. Einer der grundlegenden Prozesse, die im Rahmen des funktionellen Rearrangements während des B-Zell-Vorläuferstadiums stattfinden, sind DNA-Doppelstrang-Brüche zwischen den verschiedenen V-, D- und J-Segmenten, ausgelöst durch die RAG-Endonukleasen RAG1 und RAG2. Durch diesen Vorgang entstehen unterschiedliche Strangenden, die durch anschließende Reparaturprozesse neu zusammengefügt werden und die Kombination verschiedener V(D)J-Segmente ermöglichen.²⁵⁻²⁷ Zusätzlich wird die Diversität der generierten DNA-Sequenz durch das Enzym Tdt (Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase) noch erweitert. Dieses ist in der Lage, einzelne Nukleotide an den Verbindungsstellen zu entfernen oder neue einzufügen^{28,29}.

Die B-Zell-Reifung lässt sich durch die schrittweise Synthese der Schwer- und Leichtketten in vier Stadien unterteilen, die durch die Expression Stadien-spezifischer Oberflächenmarker definiert sind.^{23,30} In Pro-B-Zellen, der ersten Stufe im Rahmen der Differenzierung von der gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle zur reifen B-Zelle, werden zunächst ein D- und ein J-Segment am Genlocus der Schwere Kette verknüpft und diesen anschließend ein V-Segment angefügt^{23,31-33}. Durch eine erfolgreiche VDJ-Verknüpfung wird eine erste Schwere Kette (μ Kette) gebildet und diese mit den beiden Proteinen CD179A (V-preB) und CD179B (λ -5) verbunden, die als behelfsmäßige Leichtketten (SLC) dienen und die Bildung des Prä-BZR ermöglichen.^{23,30,32-34}

Dieser Schritt bildet eine Kontrollinstanz, bevor die Zelle in das Stadium der Prä-B-Zelle eintritt. Ist die Bildung des Prä-BZR erfolglos, z.B. aufgrund eines fehlerhaften VDJ-Rearrangements mit Bildung einer μ Kette, an die keine Leichtkette gebunden werden kann (unproduktive Schwere Kette),

wird die weitere Zell-Entwicklung gestoppt.³⁴ Die Expression einer produktiven μ -Kette im Prä-BZR ist somit Voraussetzung für die folgende Initiierung der Leichtkettensynthese^{35,36} und ermöglicht den Eintritt in die Prä-B-Zell-Phase. Vor Initiierung der Leichtkettensynthese durchläuft die Prä-B-Zelle zunächst mehrere Zellteilungen. Erst dann findet im Rahmen der Leichtkettensynthese das VJ-Rearrangement statt, äquivalent zum VDJ-Rearrangement während der Schwereketten-Synthese, dem die Bildung einer Leichtkette vom κ - oder λ -Typ folgt. Zuerst erfolgt stets der Versuch zur Produktion einer Leichtkette vom κ -Typ. Verläuft dieser erfolglos, folgt die Synthese einer λ -Typ-Leichtkette. Die Kombination einer produktiven Leichtkette mit der bereits vorhandenen Schwerekette bildet schließlich ein vollständiges Immunglobulin vom IgM-Typ auf der Zelloberfläche. IgM exprimierende B-Zellen werden als reife B-Zellen bezeichnet.^{30,31,37-39} Zu diesem Zeitpunkt hat jedoch noch kein Antigen-Kontakt stattgefunden, die B-Zellen sind also noch „naiv“.

Bevor sie das Knochenmark verlassen, durchlaufen unreife B-Zellen einen weiteren Kontrollmechanismus, der den exprimierten BZR auf Autoreaktivität, also die Bindung an körpereigene Proteine, überprüft. B-Zellen, die Autoreaktivität zeigen, können in einen von vier Prozessen eintreten^{30,34,40-42}:

- a) Rezeptor Editing: In der B-Zelle kommt es zu erneutem VJ-Rearrangement an der leichten Kette, mit dem Ziel der Bildung eines neuen, nicht-autoreaktiven BZR⁴³⁻⁴⁵.
- b) Klonale Deletion: B-Zellen, in denen das Rezeptor Editing erfolglos bleibt, können nicht in den weiteren Entwicklungsprozess eintreten und gehen in Apoptose^{46,47}.
- c) Anergie: B-Zellen, deren autoreaktive Bindung nicht sehr stark ist oder nur an kleinen Proteinen stattfindet, werden inaktiviert. Sie reagieren nicht länger auf die Bindung an Antigene und können nicht durch T-Zellen aktiviert werden. Sie unterliegen einer verkürzten Lebensdauer.^{40,48,49}
- d) Immunologische Ignoranz: Trotz bestehender Affinität reagieren die B-Zellen nicht länger auf ihr Autoantigen, es wird von ihnen weitestgehend „ignoriert“. Im Unterschied zu anergen B-Zellen kann es an ignoranten B-Zellen im weiteren Verlauf noch zu einer Aktivierung und Reaktion auf ihr Antigen kommen.

Trotz all dieser Regulationsmechanismen kann es vorkommen, dass autoreaktive B-Zellen den genannten Kontrollinstanzen entgehen und im Verlauf Autoimmunerkrankungen hervorrufen.⁵⁰

Die im Knochenmark an frühen B-Zellen ablaufenden Mechanismen zum Schutz vor Autoreaktivität werden unter dem Begriff der zentralen Toleranz zusammengefasst. Diese allein sind jedoch nicht ausreichend, um den Körper vor inadäquaten Immunreaktionen zu schützen. Daher findet sich ergänzend die sog. periphere Toleranz. Diese zielt überwiegend auf die B-T-Zell-Interaktion in der Peripherie nach Abschluss der B-Zell-Entwicklung ab und dient der Aufrechterhaltung des immunologischen Gleichgewichts und Limitierung der Immunantwort. Primär geht sie von regulatorischen B-Zellen aus, die über Sekretion von IL-10, TGF- β und wahrscheinlich auch IL-35 eine inhibitorische Wirkung auf CD4⁺-T-Zellen und die T-Zell-Proliferation vermittelt. Vermutet wird

außerdem eine zusätzliche Hemmung der Makrophagen-Funktion. Die periphere Toleranz spielt insbesondere im Bereich der Transplantationsmedizin eine wichtige Rolle, da eine verminderte Anzahl IL-10-sezierender B-Zellen mit einem erhöhten Risiko für chronische Transplantatabstoßung assoziiert ist. Auch im Rahmen allergischer Erkrankungen und therapeutischer Desensibilisierungen sind regulatorische B-Zellen beteiligt.^{51,52}

Jene B-Zellen, die die zentrale Toleranz erfolgreich durchlaufen haben und das Knochenmark in die Blutbahn verlassen, heißen transitionale B-Zellen. Im Unterschied zu reifen B-Zellen findet sich auf ihrer Oberfläche bisher nur wenig IgG und noch viel IgM. Zusätzlich exprimieren sie unter anderem IgD und den BAFF-Rezeptor, der für die weitere Reifung von entscheidender Bedeutung ist. Über das Blut gelangen die transitionalen B-Zellen in die Milz, wo sie in die Lymphfollikel einwandern. Auf ihrem Weg in die Milz kommen die transitionalen B-Zellen erneut mit einer Vielzahl von Autoantigenen in Berührung, die ihnen im Knochenmark bisher nicht präsentiert wurden. Kommt es hier im Verlauf zu einer starken Bindung an ein solches Antigen, wird entweder über den BZR ein apoptotisches Signal in Gang gesetzt und die Zelle stirbt, oder die Zelle geht in Anergie über. Anergien B-Zellen ist es nicht möglich, in die Follikel der Milz einzuwandern. Sie verbleiben im Blut und sterben nach wenigen Tagen.⁵³ Erfolgt eine Bindung mit nur geringer Affinität, kann erneut der Mechanismus der immunologischen Ignoranz greifen und die B-Zelle ihre Entwicklung fortsetzen. In den Follikeln der Milz interagieren transitionale B-Zellen insbesondere mit dendritischen Zellen, die den B-Zell-aktivierenden Faktor (BAFF) sezernieren und den BAFF-Rezeptor auf den B-Zellen aktivieren. Diese Aktivierung ermöglicht in Zusammenspiel mit einer schwachen Signalgebung über den BZR die Entwicklung zur reifen B-Zelle^{54,55}.

Die meisten reifen naiven B-Lymphozyten verlassen die Milz und zirkulieren durch die peripheren lymphatischen Gewebe, ein geringer Anteil der B-Lymphozyten verbleibt in der Randzone der Milz, wo sie eine schnelle Abwehrreaktion auf im Blut befindliche Pathogene vermitteln.^{56,57}

Die zirkulierenden B-Lymphozyten erreichen über den Blutstrom die Lymphknoten, in denen sie mit potenziellen Antigenen in Kontakt kommen. Aus den Venolen gelangen sie nach Durchwandern der Markstränge und der Paracortikalzone in die Follikel der Lymphknoten. Auf diesem Weg begegnen sie vermehrt Antigen-präsentierenden Zellen wie B-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen, die Antigene in die Lymphknoten transportieren.^{58,59}

Findet kein Kontakt mit einem bindenden Antigen statt, verlässt der B-Lymphozyt den Lymphknoten über die Lymphe und setzt seine Zirkulation fort.

Bindet ein B-Lymphozyt ein kompatibles Antigen, wird dieses über den BZR gebunden, aufgenommen, im Zellinneren in Peptide gespalten und Teile dieser Peptide über MHC-II-Komplexe wieder auf der Zelloberfläche präsentiert. Der B-Lymphozyt positioniert sich nun innerhalb des Lymphknotens angrenzend an die T-Zell-Zone. Begegnet er hier einer T-Helferzelle, die das über MHC-II präsentierte Peptid erkennt, kann die T-Zelle mit Hilfe des CD40-Liganden an den CD40-

Rezeptor der B-Zelle binden und diese aktivieren.^{30,60,61} Aktivierte B-Lymphozyten beginnen zunächst, sich mehrfach zu teilen und können dann in einen von zwei Prozessen eintreten.

Ein Teil der Zellen entwickelt sich zu sog. Plasmablasten, die teils im Lymphknoten verbleiben, teils in die Milz wandern, sich weiterhin teilen und IgM-Antikörper sezernieren. Der andere Teil der Zellen bewegt sich wieder in den Bereich der Lymphfollikel und bildet dort eine Population, die man als Keimzentrum (germinal center = GC) bezeichnet.^{62,63} Keimzentren bestehen aus proliferierenden B-Lymphozyten und Antigen-spezifischen folliculären T-Helferzellen in Umgebung ruhender B-Zellen, der sog. Mantelzone. Im Keimzentrum laufen verschiedene Prozesse ab, mit dem Ziel, die Affinität und Spezifität einer B-Zelle gegenüber ihrem Antigen zu optimieren. Initial sammeln sich zahlreiche B-Lymphozyten zur schnellen Proliferation (= Zentroblasten), in deren Rahmen der BZR den Prozess der somatischen Hypermutation (SHM) im Bereich der V-Regionen durchläuft.⁶³⁻⁶⁵ Diesen Teil des Keimzentrums bezeichnet man als „dunkle Zone“. Im Anschluss an weitere Zellteilungen wandern die B-Lymphozyten mit ihrem modifizierten BZR in den angrenzenden Bereich der „hellen Zone“, in dem insbesondere folliculäre dendritische Zellen und folliculäre T-Helferzellen angesiedelt sind.^{62,66-68} B-Lymphozyten im Bereich der hellen Zone tragen die Bezeichnung Zentrozyten. Hier wird der veränderte BZR über die antigentragenden folliculären dendritischen Zellen erneut mit dem Zielantigen konfrontiert. Kommt es zu einer ausreichend starken Bindung, wird das entsprechende Antigen über den BZR aufgenommen und wieder über MHC-II präsentiert.^{62,66,67} Mutierte B-Zellen mit hoher Antigenaffinität können mehr Antigene aufnehmen und entsprechend mehr MHC-II-gekoppelte Peptide exprimieren.⁶⁸ Sie erhalten über folliculäre T-Helferzellen verstärkt Überlebenssignale, Zellen mit geringerer oder verlorener Antigenaffinität gehen in Apoptose. Positiv selektionierte B-Zellen wandern zurück in die dunkle Zone und treten erneut in die aktive Zellteilung ein. Dieser Prozess des zyklischen Wiedereintritts wird wiederholt durchlaufen, um eine möglichst hohe Affinität und Spezifität des BZR gegenüber seinem Antigen zu erreichen, weshalb er als Affinitätsreifung bezeichnet wird.^{62,65,66,69-71}

Das Enzym, das den Prozess der SHM vermittelt, ist die AID (Aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase). Diese wird ausschließlich in B-Zellen exprimiert, die die GC-Reaktion durchlaufen und kann ihre Aktivität nur an ssDNA (single-stranded DNA) ausüben, also Sequenzen, die gerade aktiv von der RNA-Polymerase abgelesen werden. Sie vermittelt zunächst die Desaminierung von Cytidinresten in den transkribierten Bereich der IgV-Regionen, was die weiteren Mechanismen der SHM in Gang setzt. Durch die Desaminierung entsteht in der DNA Uridin, was dort natürlicherweise nicht zu finden ist und keine korrekte Basenpaarung mit dem gegenüberliegenden Guanin erlaubt. Die hierdurch entstehende Basenfehlpaarung aktiviert DNA-Reparaturmechanismen, welche in der Phase der SHM physiologischerweise etwa 10^6 -mal fehleranfälliger arbeiten als normal und in der Folge zu Mutationen in den Ig-V-Sequenzen führen.⁷²⁻⁷⁶ Neben der Affinitätsreifung findet in den B-Lymphozyten der GC noch ein weiterer wichtiger Prozess statt. Naive reife B-Lymphozyten exprimieren IgD und IgM auf ihrer Oberfläche. Aktivierte B-Lymphozyten und Plasmazellen sind

jedoch in der Lage, andere Klassen von Immunglobulinen zu produzieren. Dies wird durch den Prozess des Isotypenwechsels/Klassenwechselrekombination (CSR) ermöglicht. Auf der DNA sind den verschiedenen C-Genen der Schwereketten, die den Ig-Typ definieren, jeweils repetitive, G-reiche Sequenzen innerhalb der Introns vorgeschaltet. Diese werden als Switch (S)-Regionen bezeichnet. Jede dieser S-Regionen unterliegt der Kontrolle durch einen eigenen Promoter. Welcher Promoter im Rahmen der CSR induziert wird und entsprechend, welche Ig-Klasse von der B-Zelle künftig produziert wird, unterliegt dem Einfluss von Cytokinen, die während der Immunantwort u.a. von T-Helferzellen ausgeschüttet werden. Die CSR wird über eine irreversible, nicht-homologe DNA-Rekombination vermittelt. Auch hierbei ist der wichtigste Taktgeber die AID. Während der Transkription wird die RNA-Polymerase durch die repetitiven S-Regionen auf dem Nicht-Matritzenstrang ausgebremst oder sogar angehalten, wodurch die Einzelstränge für die AID zugänglich werden. Diese bindet zusammen mit weiteren Proteinen an die DNA und erzeugt eine Reihe von Einzelstrangbrüchen in beiden DNA-Strängen. Reparaturproteine fügen die beiden Switcher-Regionen an den Bruchstellen zusammen, wodurch die dazwischen liegenden DNA-Abschnitte herausgetrennt werden. Auf die VDJ-Gene folgen in der DNA-Sequenz nun zwei Switcher-Regionen, an die sich das gewünschte C-Gen anschließt, das es zu exprimieren gilt.^{73,77-}

79

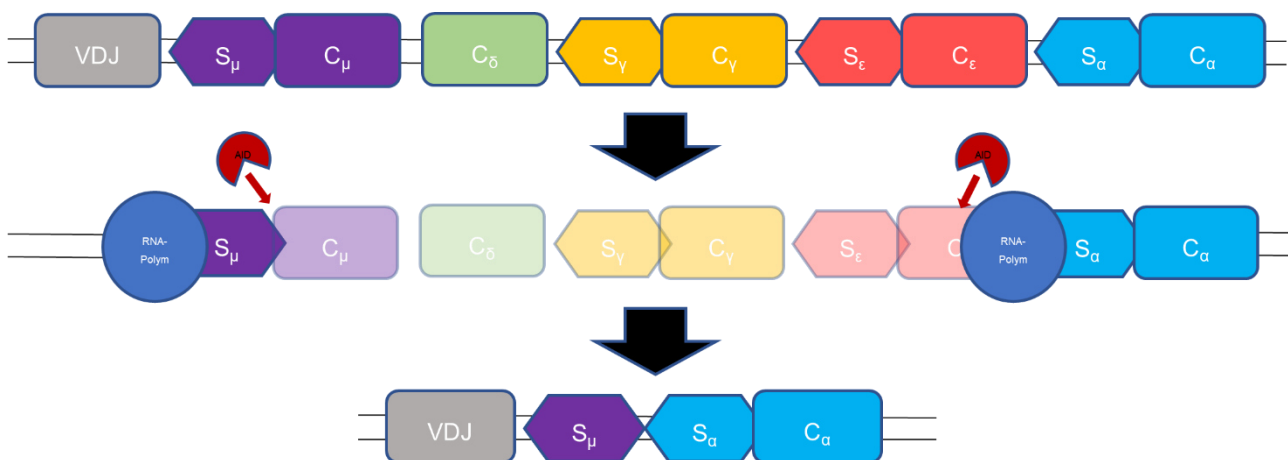


Abbildung 4: Schematischer Ablauf der Class-Switch-Rekombination

Die wechselnde Mobilisierung der B-Zellen zwischen der hellen und der dunklen Zone der GC wird durch Chemokinrezeptoren auf ihrer Zelloberfläche gesteuert. Zentroblasten, die sich in der dunklen Zone der GC in schneller Zellteilung befinden, exprimieren die beiden Rezeptoren CXCR4 und CXCR5. CXCR4 interagiert hier mit seinem Liganden CXCL12 (SDF-1), der sich auf den ansässigen Stromazellen findet. Mit dem Beginn der Wachstumsphase werden vermehrt Immunglobuline exprimiert, während es gleichzeitig zu einem Rückgang von CXCR4 kommt. Dies definiert den Übergang eines Zentroblasten in einen Zentrozyten, der durch die schwächer werdende CXCR4/CXCL12-Wechselwirkung in die helle Zone einwandern kann. Dort wird er durch die

Kommunikation von CXCR5 mit seinem Liganden CXCL13 (BLC) auf den folliculären dendritischen Zellen festgehalten. Mit der Zeit kommt es zu einem erneuten Hochregulieren von CXCR4 und der Zentrozyt kann zur erneuten schnellen Zellteilung wieder in den Bereich der dunklen Zone eintreten.^{66,80}

Während der GC-Reaktion hemmen der Transkriptionsfaktor *BCL6* und das von ihm aktivierte PAX5 in den B-Zellen die Differenzierung zu Plasmazellen, vornehmlich durch Unterdrückung von IRF4/MUM1, BLIMP1/PRDM1 und XBP1 sowie Aktivierung der AID. Durch eine hochaffine Bindung zwischen dem BZR und seinem Antigen werden in der Zelle Signalwege, insbesondere der BZR-Signalweg, in Gang gesetzt, die in einer Herunterregulation von *BCL6* und PAX5 resultieren. Hierdurch entfällt die Repression auf IRF4, BLIMP1 und XBP1, sodass diese nun u.a. über Vermittlung von Zellzyklusarrest und Proliferationshemmung die weiteren Differenzierungsschritte induzieren, an deren Ende die Entwicklung Ig-sezernierender CD20⁻, CD19⁻, CD79b⁻, CD38⁺, CD138⁺, BCMA⁺ und SLAMF7⁺ Plasmazellen steht.^{81–85}

Einige B-Lymphozyten verbleiben als Gedächtniszellen im Lymphknoten, sie produzieren vor allem Oberflächenimmunglobuline und können bei erneutem Antigen-Kontakt in kurzer Zeit zu Plasmazellen differenzieren, sodass im Falle einer Reinfektion eine schnelle und wirksame Antikörperantwort generiert wird. Ermöglicht wird ihnen dies vermutlich aufgrund der deutlich höheren Anzahl exprimierter MHC-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche im Vergleich zu naiven B-Zellen, wodurch sie in der Lage sind, Antigene effektiver aufzunehmen. Des Weiteren gibt es langlebige Plasmazellen (LLPCs), die über einen langen Zeitraum im Knochenmark persistieren und kontinuierlich spezifische Antikörper sezernieren.⁸⁶ Die genauen Prozesse, nach denen sich B-Gedächtniszellen entwickeln, sind noch nicht abschließend verstanden. Es existieren verschiedene Hinweise, nach denen sich B-Gedächtniszellen sowohl im Rahmen der GC-Reaktion als auch unabhängig von dieser entwickeln können. Weiterhin scheint ihre Bildung auch ohne Unterstützung durch T-Helferzellen möglich zu sein, während andere Arbeiten eine Interaktion mit diesen nahelegen.^{87–91}

B-Zell-Rezeptor Signalweg

Der reife BZR besteht aus einem membranständigen Immunglobulin und einem intrazellulären Anteil.^{92–94} Im Rahmen der B-Zell-Reifung durchläuft auch der BZR verschiedene Stadien und Modifikationen, bevor der reife Rezeptor auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Jede B-Zelle exprimiert genau ein spezifisches Immunglobulin.

Wie bereits beim Aufbau der Immunglobuline besprochen, werden IgG durch die Kombination zweier identischer Schwer- und Leichtketten gebildet.^{95,96} Jede dieser Ketten besteht aus einer konstanten (C) und einer variablen (V) Domäne.

Aus den V-Domänen der Schwer- und Leichtketten setzt sich die V-Region des Immunglobulins zusammen. Dieser kommt die Hauptfunktion der Antigen-Bindung zu.⁹⁵ Um eine bestmögliche

Abwehr gegenüber Pathogenen zu gewährleisten, muss das adaptive Immunsystem in der Lage sein, eine hohe Anzahl an Antigenen zu erkennen. Diese Funktion wird durch das funktionelle Rearrangement/VDJ-Rearrangement gewährleistet. Die V-Region von Ig-Ketten entsteht aus mehreren verschiedenen Gensegmenten: Die V-Region der Schwereketten setzt sich zusammen aus den Segmenten variable (V), diversity (D) und joining (J), die der Leichtkette aus den beiden Segmenten V und J.^{25,31,95-98} Es existieren multiple Varianten für jedes dieser Segmente. Pro Ig-Kette wird nur eine Variante jedes Segmentes exprimiert und diese zusammengefügt. Dadurch ergibt sich eine große Vielfalt möglicher V(D)J-Kombinationen, die jeweils die V-Region einer Schwere- oder Leichtkette bilden und so die Erkennung von über 5×10^{13} Antigenen ermöglichen.^{23,31,37,95}

Die C-Region der Schwereketten eines Antikörpers ist hydrophil, um seine Löslichkeit zu gewährleisten und vermittelt seine Effektorfunktion. Im Falle eines membrangebundenen Immunglobulins wie dem BZR entfällt diese Effektorfunktion. Stattdessen dient der konstante Ig-Teil hier der Verankerung des Rezeptors in der Zellmembran und besitzt zu diesem Zweck hydrophobe Eigenschaften. Der vollständige BZR wird aus einem membranständigen Immunglobulin sowie zwei akzessorischen Polypeptidketten, Ig α und Ig β , gebildet. Diese beiden Polypeptidketten bilden über Disulfidbrücken ein Dimer und lagern sich nichtkovalent mit der Fc-Region der Schwereketten zusammen. Sie besitzen intrazelluläre ITAM-Sequenzen (immunoreceptor tyrosin-based activation motifs), welche Tyrosinreste enthalten, die im Rahmen der Signalgebung über den BZR durch rezeptorassoziierte zyttoplasmatische Tyrosinkinasen phosphoryliert werden und somit die Übertragung der Rezeptoraktivierung in das Zellinnere ermöglichen.^{93,99-101}

Der Signalweg des BZR wird durch das Zusammenspiel mit seinem Corezeptor verstärkt. Bei diesem handelt es sich um einen Komplex aus den Oberflächenproteinen CD19, CD21 und CD81. Dieser Komplex bindet als Liganden ein Abbaufragment des Komplementfaktors C3 und lagert sich als Reaktion darauf mit dem BZR zusammen. CD19 spielt für die weiteren Signalkaskade eine wichtige Rolle. Es besitzt einen zyttoplasmatischen Anteil, der nach der Zusammenlagerung ebenfalls durch Tyrosinkinasen phosphoryliert und aktiviert wird.^{93,99-101}

Die Phosphorylierung der ITAM des BZR wird in B-Zellen durch Kinasen der Src-Familie wie Lyn vermittelt. An diese phosphorylierten Regionen bindet eine weitere Tyrosinkinase, Syk, mit ihrer SH2-Domäne, wodurch diese selbst aktiviert wird. Syk kann nun das Gerüstprotein SLP-65 (BLNK) aktivieren, welches im Zusammenspiel mit PIP3 eine Aktivierung der Brutontyrosinkinase (BTK) in Gang setzt.^{93,99-102} Die BTK liegt im inaktivierten Zustand zyttoplasmatisch vor und assoziiert nach Bindung von PIP3 mit der Zellmembran, wo sie durch Syk und Lyn phosphoryliert wird. Dies führt zu einer Autophosphorylierung von BTKs SH3-Domäne und ermöglicht seine Kinase-Aktivität. Als Proteinkinase kontrolliert die BTK durch posttranslationale Phosphorylierung die Aktivität anderer Proteine. Eines dieser Proteine ist die Phospholipase C γ (PLC γ), deren Lipaseaktivität durch BTK-vermittelte Phosphorylierung aktiviert wird. Sie hydrolisiert PIP2 in DAG und IP3, zwei wichtige intrazelluläre second messenger. IP3 kann über Rezeptorbindung am Endoplasmatischen Retikulum

(ER) die Öffnung von Calciumkanälen bewirken, die somit zu einem Ausstrom von Calciumionen aus dem ER ins Zytoplasma führen. Der intrazelluläre Anstieg der Calciumkonzentration hat die Öffnung weiterer Calciumkanäle in der Plasmamembran zur Folge, was einen Calciumeinstrom von extrazellulär nach intrazellulär bedingt. Durch den intrazellulären Calciumanstieg werden im Zellkern Transkriptionsfaktoren aktiviert.^{93,99–101,103–105}

Eine weitere Funktion der BTK ist die Rekrutierung von PIP5K, welche in der Plasmamembran PIP2 generiert, um ausreichend Substrat für die PLC_γ und die PI3K zur Verfügung zu stellen. Durch PI3K (Phosphoinositol-3-Kinase) wird PIP2 in der Plasmamembran phosphoryliert, wodurch PIP3 aus der Plasmamembran synthetisiert wird. Sie wird zusätzlich durch CD19, einen Teil des B-Zell-Corezeptor-Komplexes aktiviert.^{93,104,105}

PIP3 aktiviert seinerseits wieder die BTK im Sinne eines positiven Feedback-Mechanismus. Zusätzlich kann PIP3 die Kinase Akt rekrutieren, welche wiederum die Kinase mTOR aktiviert, die den Zellmetabolismus und Zellzyklus fördert. Weiterhin bindet Akt das Protein Bax und hemmt somit die Funktion von BCL2. Außerdem hemmt Akt das Protein p21. Beide Funktionen resultieren in einer Apoptose-Hemmung. Um die proliferativen Prozesse weiter zu verstärken, hemmt Akt auch noch das Protein FOXO, welches seinerseits eine hemmende Wirkung auf die Zellteilung ausübt.^{104–106}

Das durch die PLC_γ produzierte DAG induziert die Aktivität der Proteinkinase C_β (PKC_β), die ihrerseits eine Aktivierung des proliferationsfördernden NFκB-Signalweges vermittelt.^{104,105}

All diese Prozesse münden schließlich in einer Stimulation des Zellmetabolismus und Zellzyklus und somit der Proliferation des B-Lymphozyten.^{93,99–102,106}

Die Aktivierung von B-Lymphozyten erfolgt jedoch in den meisten Fällen nicht allein über Antigenbindung an den BZR. B-Lymphozyten können zusätzlich über ihren CD40-Oberflächenrezeptor Signale von aktivierten CD4⁺ T-Helferzellen durch Interaktion mit deren CD40-Liganden erhalten. Als Rezeptor aus der Gruppe der TNF-Rezeptoren vermittelt er eine additive Stimulation des PI3K-Weges zur Rekrutierung von Akt und aktiviert zusätzlich ebenfalls den NFκB-Signalweg.^{107,108}

Die BTK ist nicht nur in die intrazellulären Signalweiterleitung involviert, sie ist auch an der Internalisierung des BZR und der Antigen-Verarbeitung beteiligt, in dem sie direkt mit intrazellulären Aktinfilamenten interagiert und deren Umlagerung beeinflusst. Gemeinsam mit der PLC_γ, PKC_β und Ca²⁺ unterstützt sie auch die Integrin-vermittelte B-Zell-Adhäsion, welche bei der Interaktion zwischen B-Zellen und Follikulären Dendritischen Zellen im Rahmen der GC-Reaktion wichtig ist.^{104,105}

Die Hochregulierung des NFκB-Signalweges ist somit ein wichtiger Bestandteil der BZR-Aktivierung und erfolgt zeitgleich durch mehrere verschiedenen Mechanismen. Ein weiterer solcher Mechanismus wird durch sog. CBM-Komplexe vermittelt. Diesen lassen sich nicht nur bei der BZR- sondern auch der TZR-Aktivierung nachvollziehen. CBM-Komplexe (CARD-BCL10-MALT1 signalosome complex) bestehen aus einem CARD-Protein (CARD9, CARD10, CARD11 oder

CARD14), BCL10 und MALT1. CARD-Proteine (caspase-recruitment domain) finden sich in nahezu allen Körperzellen. In hämatopoetischen Zellen kommt CARD11 vor. Durch u.a. die aktivierte PKC β und Akt wird CARD11 nach BZR-Aktivierung phosphoryliert und verbindet sich mit BCL10 über dessen N-terminales Ende. Dieses ist seinerseits über sein C-terminales Ende mit MALT1 assoziiert, wodurch der CBM-Komplex zustande kommt. Der Komplex bindet an die I κ B-Kinase, um diese zu aktivieren. Die I κ B-Kinase ist essenzieller Bestandteil im letzten Schritt der NF κ B-Aktivierungsweges. Gain-of-function Mutationen von CARD11 können zur spontanen Bildung von CBM-Komplexen im Cytoplasma und einer Überaktivierung von NF κ B führen.^{109–112} Nach Bindung eines Antigens an den BZR geht der aktivierte B-Lymphozyt in der Endstrecke der BZR-Signalkaskaden in eine Phase des gesteigerten Zellmetabolismus über, in der man ihn als Lymphoblast bezeichnet. Nach multiplen Zellteilungen und Entstehung zahlreicher Tochterzellen mit einem klonalen BZR erfolgt die Differenzierung in Plasmazellen, die nun in der Lage sind, das als BZR exprimierte Immunglobulin in Form von Antikörpern zu sezernieren. Um dies in möglichst effektiver Form zu gewährleisten, wandern Plasmazellen zurück ins Knochenmark, wo sie ihre Antikörper direkt in den Blutkreislauf abgeben.

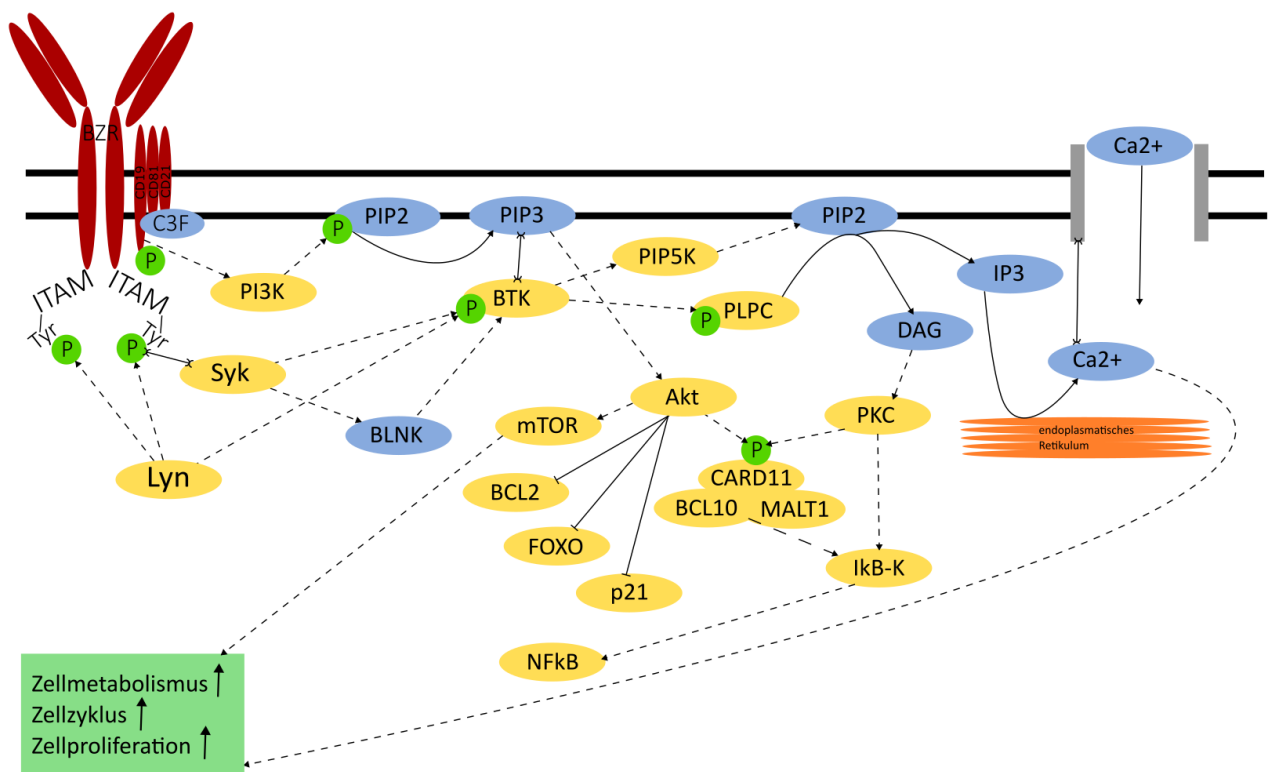


Abbildung 5: BZR-Signalgebung, vereinfachte Darstellung

Non-Hodgkin-Lymphome

Unter dem Begriff „Lymphom“ versteht man eine Gruppe solider Tumore, die von Zellen des Immunsystems ausgehen. Man unterscheidet hierbei zwei große Gruppen: Hodgkin Lymphome (HL) und Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). NHL machen mit fast 90% den Großteil aller Lymphome aus und werden weiter unterteilt in solche, die von den B-Zellen des Immunsystems ausgehen (85-90% aller NHL) und jene wenigen, die sich aus T-Lymphozyten oder Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) entwickeln.¹¹³ Ergänzend erfolgt eine Unterscheidung sog. indolenter NHL, welche nur langsam proliferieren, von den schnellwachsenden, aggressiven NHL. Im Folgenden soll der Fokus auf den B-Zell-NHL liegen.

Pathogenese der NHL

Bezüglich der Pathophysiologie solider Tumoren weiß man um eine Vielzahl von Amplifikationen, Deletionen und Punktmutationen, die zur Entstehung aberranter Gene führen, die einen Zugewinn oder Verlust ihrer vermittelten Funktion bedingen. Zusätzlich hierzu finden sich bei den B-NHL durch die Abläufe des V(D)J-Rearrangements und der GC-Reaktion (somatische Hypermutation und Class-Switch-Recombination) Veränderungen, die in Zusammenhang mit den Immunglobulin-Genen stehen.

Die komplexen Prozesse der Ig-Gen-Umlagerung, des Isotypenwechsels und der Affinitätsreifung sind für den Körper unabdingbare Vorgänge, um das Wirkspektrum und die Effektivität seiner Immunabwehr zu maximieren. Aufgrund der Vielschichtigkeit dieser Vorgänge sind sie jedoch höchst vulnerabel für das Auftreten pathologischer Varianten. Werden im Rahmen der somatischen Hypermutation außer den hierfür vorgesehenen Immunglobulinsequenzen auch Gene involviert, die aufgrund ihrer physiologischen Proteinfunktion ein hohes onkogenes Potenzial besitzen und diese unter die Regulation der hochaktiven Ig-Enhancer gelangen, kann dies Prozesse auslösen, die eine Entartung der Zelle zur Folge haben und zur Entstehung einer Neoplasie führen. So lässt sich in vielen B-Non-Hodgkin-Lymphomen eine solche aberrante SHM in besonders ausgeprägter Form nachvollziehen.^{114–121} Im Rahmen der Reifungsprozesse von B-Zellen kommt es physiologischerweise wiederholt zum Einfügen von DNA-Strangbrüchen. Diese begünstigen im Besonderen die Entstehung von Chromosomentranslokationen.¹²²

BCL2

In B-NHL betreffen solche Translokationen in den meisten Fällen die Ig-Loci und ein Protoonkogen oder Tumorsuppressorgen, welche dann durch den abnormen Einfluss eines Promoters oder Enhancers eine Dysregulation erfahren. Häufig hiervon betroffen sind *BCL2*, *BCL6* oder *MYC*.^{114,117} Die Translokation t(14;18) lässt sich in vielen Follikulären Lymphomen sowie einigen DLBCL nachweisen. Hier kommt es durch Verschiebung des *BCL2*-Gens in die unmittelbare Nähe des IgH-Locus zu einer Überexpression von *BCL2*, was in einer Hemmung der Apoptose resultiert.¹²³ Bei

BCL2 handelt es sich um ein Protoonkogen, das in gesunden Zellen eine Hemmung der Apoptose durch Bindung der Proteine BAX und BAK vermittelt. Im Rahmen der Apoptose heterodimerisieren BAX und BAK zu einem Komplex, der Poren in die äußere Mitochondrienmembran einfügt, wodurch die Konzentration von Cytochrom C ansteigt, um eine Kaskade an apoptotischen Folgeprozessen in Gang zu setzen. Durch Bindung an *BCL2* wird die Bildung dieser Heterodimere gehemmt. Als Gegenregulation wird *BCL2* im Zuge der Apoptose durch aktivierte Caspasen gespalten und in seiner anti-apoptotischen Wirkung gehemmt.

In vielen B-NHL, z.B. Follikulären Lymphomen, Mantelzelllymphomen und DLBCL vom GCB-Typ findet sich in variabler Ausprägung eine Überexpression von *BCL2*. Diese kann durch verschiedene Ursachen bedingt sein. Beispielsweise kommt es durch Deletion des 13q14-Locus u.a. zum Verlust von miR15 und miR16, die als negative Regulatoren von *BCL2* wirken. Die Translokation t(14;18) hingegen bringt das *BCL2*-Gen unter die Kontrolle eines IgH-Gen-Promoters, wodurch *BCL2* verstärkt exprimiert wird. All diese Veränderungen führen zu einer erhöhten Apoptoseresistenz der betroffenen Zellen.^{124,125} Dies wird bereits seit Jahren therapeutisch durch den Einsatz gezielter *BCL2*-Inhibitoren wie Venetoclax und Navitoclax in der Therapie lymphatischer und myeloischer Neoplasien genutzt.

BCL6

BCL6 ist ebenfalls ein Beispiel für ein Protoonkogen, welches ein umfangreiches Netzwerk an Signalen vermittelt und dessen Fehlregulation das sensible Gefüge in gesunden GC-B-Zellen aus dem Gleichgewicht bringen kann. *BCL6* ist der „Keimzentrumstranskriptionsfaktor“. Er hat eine überwiegend repressive Wirkkomponente und übt seine Funktion in der frühen GC-Phase bis zum Moment der weiteren Differenzierung der B-Zellen in Gedächtnis- oder Plasmazellen aus. Zu seinen Hauptaufgaben gehört es, eine vorzeitige Aktivierung der B-Zellen in der dunklen Zone der GC zu verhindern und ihre Weiterdifferenzierung zu unterdrücken. Dies geschieht u.a. durch Unterdrückung von Genen, die im Rahmen der B-/T-Zell-Interaktion aktiviert werden oder für die weitere Differenzierung der B-Zellen benötigt werden, z.B. IRF4. Letzteres ist wichtig bei der Initiierung des Ig-Klassenwechsels und der weiteren Differenzierung in Plasmazellen.^{82,85}

BCL6 übt seine inhibitorische Wirkung auch auf Apoptose-wirksame Proteine wie p53 und *BCL2* aus. Im Rahmen der GC-Reaktion kommt es durch erneute Umlagerungen im Ig-Locus während der Feinmodulierung der BZR-Affinität gegenüber seinem Antigen und der CSR wiederholt zur Erzeugung von DNA-Schäden – die B-Zellen weisen in dieser Phase ein ausgeprägt Apoptoseanfälliges DNA-Muster auf. *BCL6* schützt die Zellen während dieses Schrittes im Reifeprozess vor apoptotischen Signalen und erzeugt eine gewisse Toleranz gegenüber Schäden in der DNA-Struktur. Natürlich unterliegt *BCL6* selbst einer physiologischen Direktive. Zum einen besteht eine gegenseitige regulatorische Beziehung zwischen p53 und *BCL6*, sodass die Aktivierung von p53 gleichzeitig einen verstärkten Abbau von *BCL6* nach sich zieht.^{85,126,127}

Kommt es zum anderen zu einer hochaffinen Interaktion zwischen BZR und Antigen, so wird in der Folge die Proteinkinase MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) aktiviert. Diese fügt Phosphatgruppen an Serinreste im BCL6-Protein an und bahnt dieses für den proteasomalen Abbau. Die Detektion von Schäden in der DNA führt ebenfalls zu einer Phosphorylierung von BCL6, in diesem Szenario über die Serin-Proteinkinase ATM (Ataxia Teleangiectasia Mutated).

Eine Aktivierung des CD40-Rezeptors und die nachstehende Aktivierung von NFκB, welche zusätzlich auch noch durch den BZR erfolgt, resultiert in einer verstärkenden Impulsgebung an IRF4 und unterdrückt gleichzeitig die Transkription von *BCL6*, was dessen Inhibition von IRF4 abschwächt. Neben Signalen, die über eine BZR-Aktivierung vermittelt werden, wird BCL6 unabhängig hiervon nach Bindung durch FBXO11 dem Abbauweg über das Proteasom zugeführt.

Trotz dieser multifokalen Regulationsmechanismen kann es durch genetische Veränderungen zu einer Entkopplung des BCL6-Proteins kommen.

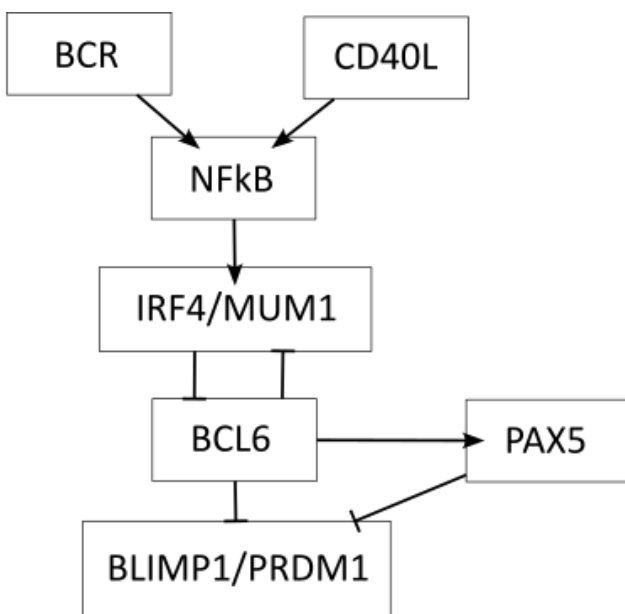


Abbildung 6: Interaktionswege von BCL6 (Auszug)

Durch chromosomale Verschiebung kann es passieren, dass verschiedenste Promotoren, z.B. für die Ig-Loci oder *PAX5*, vor das *BCL6*-Gen translozieren und somit in dessen regulatorischer Region liegen. Hierdurch bedingt sich eine übermäßige Expression von *BCL6*, welche in B-Zellen, die die GC-Reaktion verlassen und *BCL6* herunteradjustieren würden, weiterhin einen GC-Phänotyp aufrechterhält.

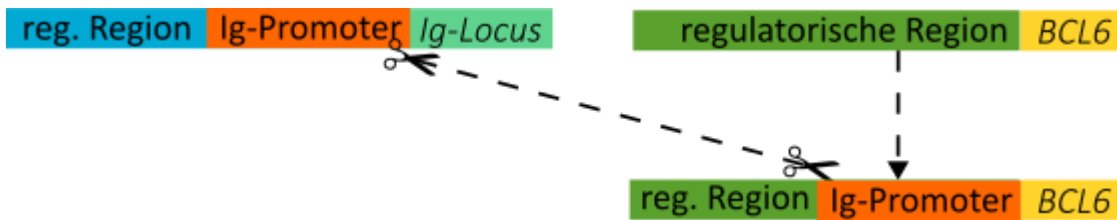


Abbildung 7: Promotertranslokation am Beispiel von *BCL6* und dem *Ig*-Promoter

Darüber hinaus existieren Mutationen in Acetyltransferasen, die in einer Verminderung oder sogar dem Verlust deren regulatorischer Funktion resultieren. Acetyltransferasen sind maßgeblich an der ausgleichenden Wechselwirkung zwischen p53 und *BCL6* beteiligt. Mutationen können auch direkt das *BCL6*-Gen betreffen. Durch Veränderung der Aminosäuresequenzen von Ser333 und Ser343 zu Alanin kommt es zu einer relevanten Verminderung der regulatorischen Phosphorylierung von *BCL6* und folglich einem verminderten Abbau des Proteins.

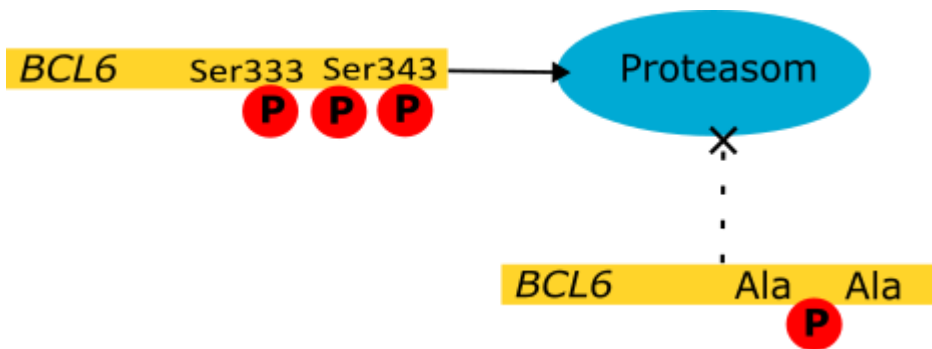


Abbildung 8: Regulation des proteasomalen Abbaus von *BCL6*

Eine unkontrollierte Überexpression von *BCL6* führt in der Zelle zur Aufrechterhaltung einer Umgebung, die über die GC-Reaktion hinaus eine hohe Apoptoseresistenz trotz fragiler Struktur des Erbguts ermöglicht, wodurch eine Anhäufung pathologischer DNA-Veränderungen begünstigt wird.^{85,128}

MYC

Ein weiteres Protein, das häufig an der Entstehung von B-NHL beteiligt ist, ist das Protoonkogen *c-MYC*. Dieses agiert in seiner physiologischen Funktion als Transkriptionsfaktor und ist in eine enorme Vielzahl von Prozessen und Stoffwechselabläufen involviert. Es vermittelt seine Eigenschaft nach Dimerisierung mit dem Protein Max. *MYC* spielt u.a. eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus, in dem es den Übergang von der G1- in die S-Phase anstößt. In der Folge kommt es zu einer Herunterregulation der *MYC*-Expression, was die weitere Differenzierung der Zelle ermöglicht. Weiterhin aktiviert *MYC* vielfältige Stoffwechselwege, wie Protein- und Nukleinsäurebiosynthese, um das Zellwachstum zu unterstützen. Außerdem wirkt *MYC* expressionsfördernd auf Proteine, die ihrerseits inhibitorische Regulatoren von Proteinen sind, die den PI3K-Signalweg inhibieren.¹²⁹

Diese Funktion steht im Gleichgewicht mit einer regulativen Induktion der Apoptose, unter anderem aber nicht ausschließlich über *TP53*, sowie der Hemmung anti-apoptotisch agierender Proteine.

MYC aktiviert in der Zelle normalerweise *ARF*, einen Transkriptionsfaktor, der eine Inhibition auf *Mdm2* ausübt, einem negativen Regulator von *TP53*.¹³⁰ Ein weiterer Wirkungsweg von *MYC* zur Förderung der Apoptose findet über Hemmung des anti-apoptotischen *BCL2*-Proteins und gleichzeitige Aktivierung von *Bax* und *Bak* statt, die ihrerseits pro-apoptotische Signale in Gang setzen. *MYC* ist außerdem in der Lage, Zellen gegenüber dem Todesrezeptorliganden *CD95-L* (Fas-Ligand) zu sensibilisieren und fördert gleichzeitig dessen Transkription. Weiterhin inhibiert *MYC* den Transkriptionsfaktor *NFκB*, der ebenfalls eine Apoptose-Hemmung vermittelt (s.u.).¹³⁰ *Bax* fungiert im Hinblick auf das Zellüberleben als Gegenspieler von *BCL-2* und eine Verschiebung des Verhältnisses von *BCL-2*:*Bax* zugunsten von letzterem scheint eine Sensibilisierung der Zellen gegenüber der Apoptose zu bewirken.¹³¹

In 80% der Burkitt-Lymphome findet sich eine Translokation des *MYC*-Gens unter einen Promoter des *Ig*-Locus, was wieder eine konstitutive Gen-Expression bedingt. Die häufigste Translokation ist *t(8;14)*, die Translokation unter den *IgH*-Promoter. Seltener finden sich Translokationen in die Leichtketten-Loci der Immunglobuline, etwa *t(2;8)* für die κ -Leichtketten und *t(8;22)* unter den λ -Leichtketten-Promoter.¹³² Eine Überexpression von *MYC* resultiert in einer großen Zellgröße bei geringer Zelldifferenzierung. Weiterhin wird vermutet, dass *MYC* Gene unterdrückt, die an der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten beteiligt sind und somit ein Loslösen der Zellen aus dem Verband mit Übergang in den Mitoseprozess verursacht. Dies könnte mit Ursache einer ausgeprägten Metastasierungsfähigkeit in Krebszellen sein.^{130,133–139}

Auch hier kann eine Störung dieses sensiblen Gleichgewichts in einer cancerogenen Transformation der Zelle enden. Die Translokation des *MYC*-Gens in die Nähe eines *Ig*-Enhancers birgt ein erhöhtes Risiko für das Auftreten pathologischer Mutationen im Rahmen der SHM.^{140–142} Solche Mutationen entfalten ihr Potenzial beispielsweise über eine Verminderung von *MYC*s pro-apoptotischer Wirkung oder einen verstärkten Abbau des Proteins.

TP53

Einer der entscheidenden Mechanismen, der das Überdauern abnormer Zellen und letztlich die Entstehung manifester Krebserkrankungen verschiedenster Art ermöglicht, ist das Umgehen der *p53*-vermittelten Apoptose. *TP53* ist in nahezu der Hälfte aller menschlichen Krebserkrankungen von Mutationen betroffen und somit das häufigste bekannte Target in der Tumorgenese.^{143–145} Dieser Effekt wird zusätzlich dadurch verstärkt, dass *p53* Tetramere bildet, wodurch monoallelische Mutationen zu einem Funktionsausfall von weit > 50% von *p53* führen können.

Seine Hauptaufgabe ist die Vermittlung von Zellzyklusarrest und Apoptose als Antwort auf verschiedenste Formen zellulären Stresses. Solcher kann sich insbesondere in Form von DNA-Schäden äußern, sowie durch Hypoxie, Überexpression von Onkogenen, die Abwesenheit von

Tumorsuppressoren oder ein hyperproliferatives Milieu in der Zelle.^{145–147} Unter physiologischen Bedingungen kommt p53 in eher geringer Konzentration in der Zelle vor und hat eine relativ kurze Halbwertszeit von etwa 10 Minuten. Im Falle von aktivierenden Signalen kommt es jedoch zu einer verstärkten Expression des Proteins.¹⁴⁵ Als Transkriptionsfaktor ebenso wie durch Protein-Protein-Interaktionen steht p53 in Verbindung mit einer großen Anzahl von Molekülen und Signalwegen, die vielfältige zelluläre Prozesse steuern. Seine eigene negative Regulation erfolgt maßgeblich über Mdm2, das über Bindung und Ubiquitilierung von p53 dessen Transaktivierungsdomäne blockiert und seinen Transport vom Zellkern ins Zytoplasma induziert, wo p53 dem proteasomalen Abbau zugeführt wird. Gleichzeitig induziert p53 autoregulatorisch die Expression von Mdm2.^{145,146,148–150}

Um zu verstehen, wie p53 pro-apoptotische Signale in Gang setzt und wie Veränderungen des Proteins oder seiner Interaktionspartner neoplastischen Zellen einen Proliferations- und Überlebensvorteil bieten können, muss man sich einen Überblick über die Abläufe des Zellzyklus verschaffen.

Der Zellzyklus wird in vier Phasen eingeteilt, G1-, S-, G2- und M-Phase. Die G1-Phase dient dem Wachstum der Zelle, weshalb Protein- und RNA-Synthese in dieser Phase besonders intensiv ablaufen. Die nachfolgende S-Phase dient der Replikation der DNA und der Chromosomenverdopplung. Dem schließt sich die G2-Phase an, in der die replizierte Erbinformation auf Fehler überprüft wird und ggf. Reparaturmechanismen induziert werden können. Gleichzeitig wird auch in dieser Phase eine verstärkte RNA-Synthese zur Bildung von Proteinen induziert, die für die nachfolgende Zellteilung benötigt werden. Schließlich geht die Zelle in die M-Phase über, die Gegenstand der eigentlichen Zellteilung mit Ausbildung des Spindelapparates und Verteilung der Chromosomen auf die entgegengesetzten Zellpole ist. Sie endet in der Ausbildung neuer Zellkern- und Plasmamembranen, mit denen zwei neue Tochterzellen entstehen.

Um einen möglichst fehlerfreien Ablauf dieser komplexen Prozesse zu gewährleisten, müssen mehrere Kontrollpunkte erfolgreich durchlaufen werden. Diese finden sich in der späten G1-Phase, am Ende der G2-Phase und in der Mitte der M-Phase, wo die Korrektheit der abgelaufenen Reaktionen überprüft wird, bevor die Zelle in die nächste Phase des Zellzyklus eintreten kann. Um die Weitergabe potenziell schädlicher Mutationen zu unterbinden, laufen in der G1- und der G2-Phase zusätzlich DNA-Kontrollvorgänge ab, die im Falle einer detektierten DNA-Schädigung einen Zellzyklusarrest verursachen und Reparaturmechanismen induzieren. Verlaufen diese erfolglos, wird die Apoptose eingeleitet.

Die Regulation des Zellzyklus wird durch heterodimere Komplexe aus Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) und verschiedenen Cyclinen vermittelt, deren Aktivität wiederum durch Phosphorylierung an verschiedenen Aminosäureresten bestimmt wird. Im Folgenden liegt der Fokus insbesondere auf den verschiedenen Justierungsabläufen der G1-Phase und deren Rolle in der Tumorgenese. Krebszellen verbleiben in der Regel im Zellzyklus und besitzen Mechanismen, die sie dazu befähigen, die endgültige Reifung und Differenzierung zu umgehen. Die G1-Phase ist hierfür

besonders vulnerabel.¹⁴³ Wie bereits angesprochen, wird der Übergang von einer Phase des Zellzyklus in die nächste durch CDKs und Cycline angestoßen. Beim Eintritt in die G1-Phase wird durch die Stimulation von Wachstumsfaktoren die Expression von D-Cyclinen induziert, die einen Komplex mit CDK4 und CDK6 eingehen (CDK4/6-CKD). Die katalytische Aktivität dieses Komplexes ist entscheidend, um den Übergang der Zelle in die S-Phase zu ermöglichen, in dem er die Phosphorylierung von pRb (Retinoblastom-Protein) vornimmt. pRb befindet sich im dephosphorylierten Zustand in seiner aktiven Form und bindet die E2F-Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität letztendlich den S-Eintritt beschließt. In gebundener Form kann E2F seine transkribierende Funktion nicht ausüben, durch die Phosphorylierung von pRb wird E2F jedoch aus der Bindung freigegeben und kann die notwendige Genexpression induzieren. Nach dem erfolgreichen Eintritt in die S-Phase nimmt die Aktivität von E2F wieder ab.^{143,145,147}

Werden während der G1-Phase Fehler oder Schäden in der DNA erkannt, wird p53 verstärkt exprimiert, um einen Zellzyklusarrest zu erzeugen. Dies tut es u.a., in dem es durch sequenzspezifische DNA-Bindung die Expression von pro-apoptotischen Proteinen wie p21, Bax, Fas uvm. stimuliert. P21 agiert als Inhibitor von CDK4/6-CKD. Es unterbindet dessen katalytische Aktivität und den damit verbundenen Progress des Zellzyklus.^{143,145,146} Hierdurch wird es der Zelle ermöglicht, DNA-Reparaturmechanismen in Gang zu setzen. Das Protein p14/ARF unterstützt die arretierende Wirkung von p53, in dem es dessen Inhibitor, Mdm2, hemmt. Interessanterweise wird p14/ARF u.a durch E2F und MYC induziert, sodass eine Überexpression eines dieser Moleküle die Konzentration von p53 in der Zelle erhöht und somit einen physiologischen Schutzmechanismus darstellt, der bei Eintritt eines unphysiologisch hyperproliferativen Milieus in der Zelle eingreift.^{146,150} Weiterhin wird CDK4/6-CykD außerdem über p16/INK4 α gehemmt.¹⁴⁷

Bei einer pathologischen Überaktivität von E2F bewirkt dieser zusätzlich eine Induktion von ARF und hat somit indirekt, über Förderung der Hemmung auf Mdm2, einen p53-unterstützenden Effekt.¹⁵¹

Eine Aktivierung von p53 kann durch viele verschiedene Faktoren erfolgen, denen allen ein relatives Zellentartungspotenziell gemeinsam ist. Aus diesem Grund ist es kaum überraschend, dass sich in den meisten humanen Krebserkrankungen Veränderungen von *TP53* finden, die dessen Funktionsverlust zur Folge haben. Ein häufiger Mechanismus ist das Unterbinden seiner Interaktion mit der DNA durch Veränderungen im Bereich seiner DNA-Bindungsdomäne durch missense-Mutationen, Deletionen oder Punktmutationen^{143,145,146}

In Tumoren mit Wildtyp-*TP53* finden sich stattdessen in der Regel Läsionen, die den ARF/Mdm2/p53-Signalweg betreffen, wie Deletionen oder Aberrationen des INK4/ARF-Locus oder eine pathologische Überexpression von Mdm2.^{146,147,150} Zellen, denen es möglich ist, den p53-Apoptoseweg abzuschwächen oder gänzlich zu umgehen, erlangen einen deutlichen Proliferationsvorteil gegenüber solchen mit wt-Tp53 und weisen eine erhöhte Gen- und chromosomale Instabilität auf. Gleichzeitig sind sie gegenüber der Apoptoseinduktion durch

Bestrahlung oder Zytostatika resistenter. In vielen therapierefraktären Erkrankungsrezidiven zeigt sich im Vergleich zum Erstausschub ein Zugewinn von Tp53-Mutationen.¹⁴⁶

NFκB

Ferner zu den bereits genannten Mechanismen, die an der Lymphomgenese beteiligt sein können, lohnt sich an dieser Stelle noch ein Blick auf den Transkriptionsfaktor NFκB (nuclear factor κB). Dieser liegt im inaktivierten Zustand in Inhibitor-gebundener Form im Zytoplasma vor. Im Rahmen einer Zellaktivierung wird ein vermehrter Abbau des Inhibitors initiiert, wodurch NFκB frei wird und in den Zellkern einwandert, um dort über seine Untereinheiten (RelA/RelC) an die DNA zu binden. Eine Aktivierung, die zur Initiierung der NFκB-Signalgebung führt, erfolgt oft über proinflammatorische Signale, sowie im Rahmen der physiologischen B-Zell-Reifung.^{152,153} Hauptsächlich agiert NFκB über eine Inhibition von Apoptose und DNA-Reparaturmechanismen durch Induktion anti-apoptotisch wirksamer Gene und wirkt gleichzeitig als „Promoter der Zellzyklus-Progression“. In myeloischen Zellen vermittelt NFκB vermutlich Wachstumssignale über vermehrte Aktivierung einer entsprechenden Zytokin-Synthese (z.B. IL-6, IL-2).

In verschiedenen Modellen, u.a. in der Maus, konnte gezeigt werden, dass eine Inaktivierung von NFκB über bspw. vermehrtes Vorliegen seines Inhibitors IκB-SR, zu einer verminderten Expression anti-apoptotischer Proteine führt und eine Tumorentwicklung blockieren kann.¹⁵²

Es ist anzunehmen, dass die Wirkung von NFκB auch in Abhängigkeit von TNFα erfolgt, da sich durch dessen Inhibition eine verminderte bis fehlende Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB beobachten lässt. Hierdurch kommt es zu einem verstärkten Ablauf der Apoptose und einem verminderten Tumorwachstum.¹⁵² Die zwei wichtigsten Rezeptoren der TNF-Superfamilie sind TNFR1 und TNFR2 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1 und 2). Während TNFR1 in nahezu allen menschlichen Geweben zu finden ist, wird TNFR2 v.a. auf Immun- und Endothelzellen sowie Neuronen exprimiert. Bei beiden Rezeptoren handelt es sich um Transmembranproteine, die ihre Wirkung über die Rekrutierung intrazellulärer Adapterproteine ausüben. TNFR2 interagiert über Bindung mit TRAF1 und TRAF2 und induziert hierauf zelluläre Überlebenssignale u.a. über NFκB, Akt und MAPK. Weiterhin wird als negative Rückkopplung der Abbau von TNFR2 eingeleitet. Im Unterschied zu TNFR2 verfügt TNFR1 über eine zytosolische Todesdomäne, welche zusätzlich apoptotische Signale in Gang setzen kann. Die Wirkung von TNFR1 erfolgt über die Rekrutierung von TRADD (Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1 Associated Death Domain Protein) und RIPK1 (Receptor-Interacting Protein Kinase 1). Letztere entscheidet über die Richtung der weiteren Signalkaskade, da abhängig von dessen Ubiquitinierungsstatus verschiedene Komplexe mit dem Rezeptor gebildet werden. Liegt RIPK1 in ubiquitiniert Form vor, entsteht der Komplex IIb, wodurch die Pro-Caspase 8 zur Caspase 8 aktiviert und der Zelltod eingeleitet wird.^{154–156}

Wie bereits für *BCL6* und *MYC* gezeigt, lässt sich auch eine Verbindung zwischen einer Überexpression von NFκB und dem Auftreten von Lymphomen zeigen. Deletionen von

Gensegmenten, die für die inhibitorische Region von p100 kodieren, sind u.a. mit der Entstehung von B-Zell-Lymphomen assoziiert. P100 bindet an eine Domäne von NFκB und sorgt dafür, dass dieses im Zytoplasma verbleibt. Der Abbau von p100 ermöglicht wiederum den Eintritt von NFκB in den Zellkern. Ein Fehlen der inhibitorischen Bindungsstelle von p100 führt folglich zu einer verminderten Inhibition von NFκB und damit einer stärkeren Apoptosehemmung.¹⁵²

TCF3, ID3 und Cyclin D3

Bei TCF3 handelt es sich um einen zentroblastischen Transkriptionsfaktor, der in gesunden Zellen durch Dimerisierung mit ID3 inhibiert wird, wodurch seine Bindung an die DNA nicht mehr möglich ist.^{129,157}

TCF3 vereint multiple proliferationsfördernde Funktionen in sich, die über verschiedene Effektoren proliferationsfördernde Vorgänge unterstützen.^{129,157,158} So ist es beteiligt an der Induktion des *CCND3*-Gens. Dieses codiert für das Protein Cyclin D3, welches im Zellzyklus einen wichtigen Faktor für den Übergang von der G1- in die S-Phase darstellt. TCF3 fördert die Transkription der Ig-Gene über Aktivierung ihrer Enhancer und führt direkt zu einer verstärkten BZR-Expression und -Signalgebung. Letztere erfolgt ergänzend über eine Expressionshemmung von Genen, die die ITAM-Sequenzen von CD79A und CD79B dephosphorylieren.^{129,158} Die genannten Prozesse führen in der Folge zu einer verstärkten Signalgebung über die PI3K-Kaskade, im Sinne einer tonischen BZR-Aktivierung.^{129,157,158}

Regulatorisch unterliegt TCF3 einem negativen Feedbackmechanismus durch Induktion seines eigenen Inhibitors, *ID3*. In gesunden Zellen wird diese Inhibition durch Dimerisierung der beiden Proteine über die DNA-Bindungsstelle von TCF3 ausgeübt, sodass durch Blockade der Region keine Bindung von TCF3 an die DNA stattfinden kann.^{129,157,158}

Neben Veränderungen im *TCF3*-Gen findet man in malignen Zellen noch häufiger Mutationen von *ID3*. Hier handelt es sich meist um missense-Mutationen mit loss-of-function Effekten, die eine Verminderung, zum Teil sogar einen vollständigen Verlust der inhibitorischen Wirkung auf TCF3 bedingen oder eine verringerte bis fehlende Expression von *ID3* auslösen und TCF3 folglich von der negativen Feedbackregulation entbinden.^{129,158–161} Bei *ID3* handelt es sich zum einen um ein Target-Gen von MYC, zum anderen erfolgt seine Induktion auch über die BZR-Aktivierung. Da beide Wege in Burkitt-Lymphom-Zellen desreguliert sind, wirken inaktivierende Mutationen von *ID3* im Hinblick auf das maligne Transformationspotenzial und die Signalverstärkung über PI3K synergistisch mit der bereits erwähnten Überaktivität von MYC.^{159,160}

In der proliferations- und überlebensfördernden Spirale von *TCF3/ID3*-Ereignissen existiert noch ein weiteres nennenswertes Gen, dessen Relevanz für die Pathogenese von B-NHL zu berücksichtigen ist. Wie bereits im Zusammenhang mit *TCF3* kurz angesprochen, codiert *CCND3* für Cyclin D3 und wird durch TCF3 induziert. Es sind jedoch auch Mutationen von *CCND3* selbst bekannt, die mit einer

erhöhten Stabilität des Gens einhergehen und eine Akkumulation von verändertem Cyclin D3 in der Zelle begünstigen.^{129,157,158}

Eine dieser Mutationen ist der Austausch von Threonin 238 (T238A). Dieses ist normalerweise Gegenstand einer regulatorischen Phosphorylierung, die den proteasomalen Abbau von Cyclin D3 induziert. Durch den Austausch geht diese Phosphorylierungsstelle verloren und es fällt vermehrt Cyclin D3 in der Zelle an.¹⁶² Ein weiterer Regulationsmechanismus auf Cyclin D3 ist die Inhibition seines proteasomalen Abbaus über Signale des BZR.¹⁶³

Cyclin D3 findet sich überwiegend in B-Lymphoblasten der dark zone und ist unerlässlich für die klonale Proliferation der B-Zellen im Rahmen der GC-Antwort.^{162–164} D-Cycline fungieren im Rahmen des Zellzyklus auch als Sensoren für extrinsische Wachstumssignale. Beim Eintritt der Zellen in die G1-Phase werden sie verstärkt synthetisiert, mit einem Konzentrationsmaximum kurz vor dem Übergang der Zellen in die S-Phase. Dem Einfluss von Mitogenen folgend, binden sie an ihre Interaktionspartner CDK4/6.¹⁴³ Die katalytische Funktion dieses Komplexes lässt sich ab etwa der Mitte der G1-Phase nachvollziehen und ist essenziell für den Progress der Zelle in die S-Phase. Dieser wird über den Tumorsuppressor Rb und weitere, vergleichbar wirkende Proteine initiiert. Rb befindet sich in dephosphorylierter Form in seinem aktiven Zustand und bindet den Transkriptionsfaktor E2F. In gelöster Form induziert E2F die Expression von Genen, die den S-Phase-Eintritt der Zelle ermöglichen. Durch die Aktivität des Cyclin-D/CDK-Komplexes wird Rb durch Phosphorylierung in seine inaktive Form überführt und gibt gebundenes E2F frei.¹⁴³ Cyclin D3 Knockout-Mäuse zeigen eine drastisch reduzierte Bildung von GC und einen nahezu vollständigen Verlust der G1-S-Progression von B-Lymphozyten in der dark zone mit einer gestörten Affinitätsreifung, was den wichtigen Einfluss von Cyclin D3 auf den Zellzyklusprogress unterstreicht.^{162–164} In Burkitt-Lymphomen finden sich häufig Gain-of-function Mutationen, die zur Bildung deutlich vergrößerter GC führen und eine signifikant höhere Zellproliferationsrate im Bereich der dark zone aufweisen. Die gesteigerte klonalen Zellexpansion wirkt prädisponierend für maligne Transformationen durch eine fortlaufende SHM.¹⁶² Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die generelle hohe Proliferationsrate von B-Zellen und die damit verbundene zeitweise Herunterregulation einiger DNA-Reparaturprozesse, wie z.B. p53-Suppression durch BCL6, das Risiko birgt, dass SHM-vermittelte Veränderungen auftreten, ohne dass sie in der Folge eine entsprechende Apoptose-Einleitung nach sich ziehen.¹²⁶ Abgesehen vom klassischen Hodgkin-Lymphom findet sich bei vielen Lymphomarten trotz aberranter DNA-Muster die Expression eines intakten BZR auf den malignen Zellen. Man vermutet einen hierdurch erworbenen Selektionsvorteil, der möglicherweise durch eine kontinuierliche Signalgebung über den BZR vermittelt wird. In vielen B-Zell-Lymphomen, beispielsweise dem ABC-DLBCL (activated b cells diffuse large b cell lymphoma), findet sich außerdem eine ausgeprägte Signalgebung über NFκB, die sich durch das Vorhandensein einer solchen BZR-Aktivierung erklären ließe.^{121,165}

In Bezug auf die BZR-Signalgebung unterscheidet man zwischen einer sog. tonischen, Antigen-unabhängigen Signalgebung, die über die PI3K/Akt-Kaskade als Überlebenssignal dient und einer Antigen-induzierten Signalgebung, die durch Quervernetzung mit dem Rezeptor über NFκB letztlich die B-Zell-Aktivierung induziert.¹²¹

Beide BZR-Stimulationsmechanismen lassen sich in zu Lymphomerkrankungen transformierten Lymphozyten nachvollziehen. In einigen Burkitt-Lymphomen finden sich Mutationen des Transkriptionsfaktors TCF3 und dessen Inhibitor ID3 bei gleichzeitiger Aktivierung des PI3K-Signalweges, im Sinne einer tonischen Signalgebung. Weiterhin findet sich in GCB-DLBCL (germinal center B cells diffuse large b cell lymphoma) eine Mutation in CD79a, die ebenfalls in einer tonischen BZR-Aktivierung resultiert.^{159,166}

Im Falle der ABC-DLBCL und PCNSL (primary central nervous system lymphoma) lässt sich eine chronisch aktive BZR-Stimulation, ähnlich der aktiven Signalgebung nach Antigenbindung zeigen, sowie durch Mutation von MYD88 und CD79.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹

MALT-Lymphome des gastrointestinalen Gewebes sind ein klassisches Beispiel für das Auftreten von Lymphomen infolge einer chronischen Entzündung mit konstitutiver B-Zell-Aktivierung. Sie sind häufig assoziiert mit einer starken Expression von *BCL10* und MALT-1, welche beide an der NFκB-Induktion nach AG-Rezeptor-Aktivierung beteiligt sind. Folglich kommt es zu einer permanenten Aktivierung von NFκB, die wiederum die Apoptose der B-Zellen unterdrückt und eine unkontrollierte Proliferation begünstigt.¹⁵²

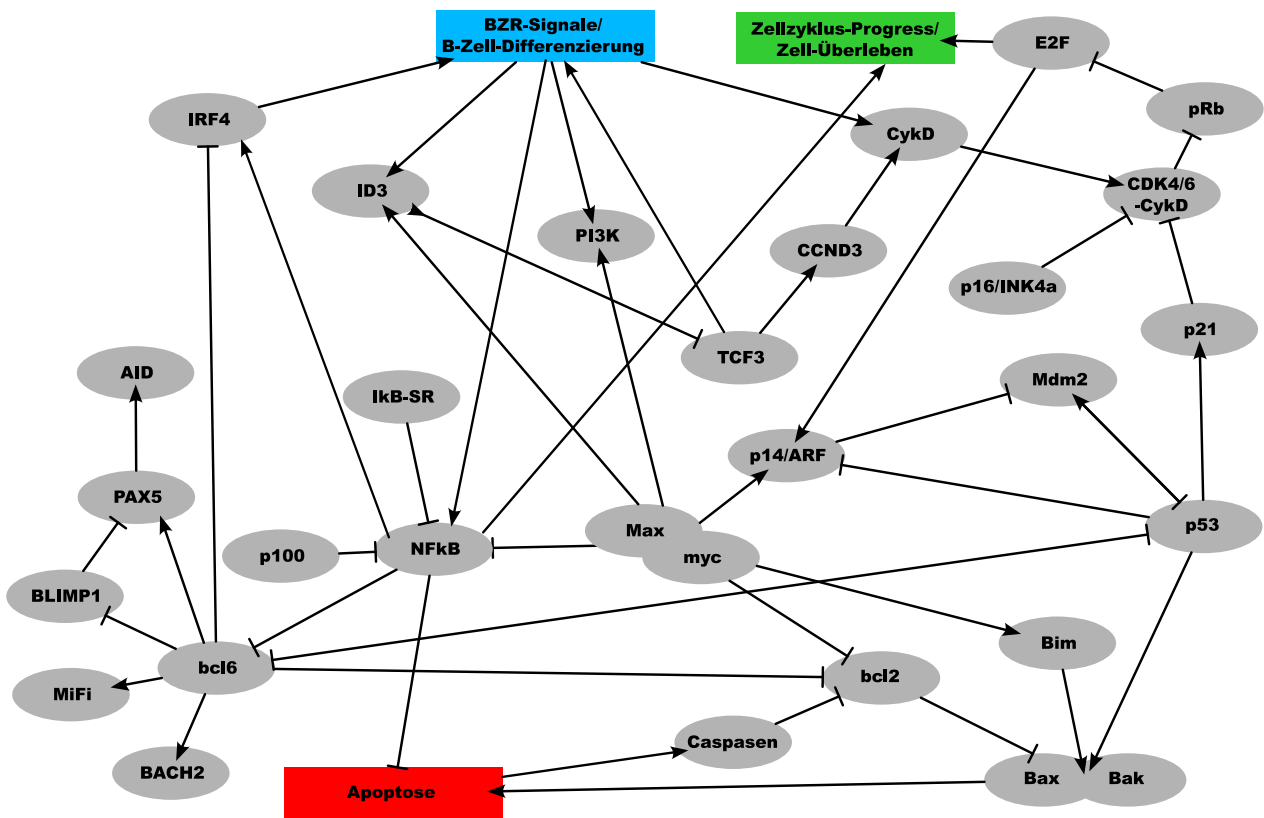


Abbildung 9: Wichtige Proteininteraktionen; Die Abbildung zeigt schematisch die physiologischen Interaktionen zwischen den relevantesten Proteinen, die beim Burkitt-Lymphom dereguliert sein können. Pfeil: Induziert/Stimuliert Protein xy; Strich: Hemmt Protein xy; Gestrichelte Linie: Nur bei pathologischer E2F-Überaktivität

Chronische BZR-Aktivierung durch infektiöse Antigene

Stimulierende Antigene können Strukturen unterschiedlicher Genese sein. Häufig finden sich solche im Rahmen fortbestehender oder rezidivierender Infektionen. Z.B. kommt es bei einem *Helicobacter pylori*-Befall gehäuft zur Entstehung lokaler MALT-Lymphome des Magens,¹⁷⁰⁻¹⁷³ während *Chlamydomphilia psittaci* MALT-Lymphome im Bereich der okkulären Adnexe verursacht. Ein Beispiel viraler Genese stellt die Hepatitis-C-Infektion dar, die man mit der Entstehung von splenischen Marginalzonenlymphomen in Verbindung bringt.

Bestärkt werden diese Annahmen durch das erfolgreiche Induzieren einer Tumorregression unter antiinfektiöser Therapie, weshalb dieses Vorgehen bei mehreren MZL-Subtypen bereits als antineoplastische Erstlinientherapie etabliert ist.^{173,174} Ein weiteres Beispiel sind *Moraxella catarrhalis* und *Rothia mucilaginosa* als Trigger des NLPHL (Noduläres Lymphozyten-prädominantes Hodgkin-Lymphom). Beim IgD⁺ NLPHL führt RpoC zu einer Stimulation der Fab-Domäne und das *Moraxella catarrhalis* Superantigen MiD/hag zu einer additiven Stimulation der Fc-Domäne des BZR von LP-Zellen.^{175,176}

Virale Infektionen

Im Falle des Burkitt-Lymphoms ist seit Langem eine Assoziation mit EBV-Infektionen bekannt. Der detaillierte Pathomechanismus hinter diesem Zusammenhang ist noch nicht abschließend bekannt. Es zeigt sich jedoch keine direkte Stimulation des BZR durch ein Antigen, stattdessen findet sich eine tonische Aktivierung der Signalgebung hinter dem Rezeptor.

Das cancerogene Potenzial einiger humanpathogener Viren lässt sich in multiplen Krebserkrankungen nachvollziehen. Prominente Beispiele sind die Entstehung von Zervix- und Plattenepithelkarzinomen infolge langjähriger Infektion mit HPV, die Rolle von HBV und HCV bei der Entstehung hepatozellulärer Karzinome oder das Auftreten adulter T-Zell-Lymphome/Leukämien in Assoziation mit HTLV1.¹⁷³

Eine Haupteigenschaft der Viren ist ihre lebenslange Persistenz in den betroffenen Körperzellen. Um im menschlichen Körper zu überleben und zum Eigenerhalt neue Zellen infizieren zu können, haben sie Mechanismen entwickelt, die sie vor einer Entdeckung durch das Immunsystem schützen und den befallenen Zellen einen Überlebensvorteil durch eine stärkere Resistenz gegen Apoptose und eine zusätzlich höhere Proliferationsrate verschaffen. Viren können in der Zelle entweder in Form sog. Episomen vorkommen, eines zirkulären Zustandes des Virusgenoms im Zellkern, oder durch Integration ihres Erbgutes in die DNA der Wirtszelle. Da Letzteres im Rahmen der Kontrollmechanismen des Zellzyklus das Risiko birgt, als pathologische Aberrationen der DNA erkannt zu werden und den Tod der Zelle zu induzieren, vermitteln viele Viren die Abschaltung proliferationshemmender Proteine.^{173,177-181} EBV codiert für mehrere Proteine, die diesen Mechanismus bedienen: Seine verschiedenen EBNA-Proteine (EBV nuclear antigen) inhibieren die Funktionen von pRb, p53, p16INK4α und p14ARF, während BHRF1 ein funktionelles BCL2-Homolog darstellt und in der Lage ist, ein Gegengewicht zur pro-apoptischen MYC-Wirkung zu bilden.^{173,177,180} Zusätzlich ist LMP-1 dazu in der Lage, extrinsische Apoptosesignale über den Fas/Fas-L zu blockieren.¹⁸⁰

Die alleinige Hemmung des Zelltodes ist jedoch nicht ausreichend, um das Überleben des Virus zu sichern. Multiple humanpathogene Viren machen sich daher die Signaltransduktion über NFκB und PI3K/Akt zur Generierung eines Wachstums- und Überlebenssignals zu Nutze. Bei HTLV-1 viralem Tax-Protein handelt es sich um einen Aktivator von NFκB.^{173,182} Das EBV-Protein LMP-1 (latent membrane protein 1) ist, wie der Name bereits impliziert, ein membrangebundenes Homolog von CD40. Es interagiert mit zytoplasmatischen Adapterproteinen und imitiert eine B-Zellaktivierung über den TNF-Rezeptor CD40. Über diesen Mechanismus vermittelt es den Abbau von IκB, dem Inhibitor von NFκB. Ein fast identischer Induktionsmechanismus wird auch durch das HBx-Protein (non-structural X protein) in Hepatitis-B-Virus-infizierten Zellen in Gang gesetzt. Zusätzlich führt auch die Interaktion von LMP1 und TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) zu einer Aktivierung des NFκB-Signalweges.¹⁸³ Neben der Akkumulation von NFκB aktiviert LMP-1 auch die Signalwege von PI3K/Akt, MAPK und STAT. Darüber hinaus konnte für LMP-1 eine Telomerase-induzierende

Funktion nachgewiesen werden, was einen entscheidenden Beitrag zur Immortalisierung EBV-infizierter Zellen darstellt. Ein weiteres proliferationsförderndes Protein von EBV ist LMP2A. Dieses besitzt in seiner Struktur ITAM-Domänen und aktiviert ebenfalls die PI3K-Kaskade sowie die Expression von *MYC*. Da es sich bei den Zielzellen von EBV um B-Lymphozyten handelt, ist das Kopieren der BZR-Signalgebung ein naheliegender Mechanismus.^{173,177,180,182,184}

Verschiedene Latenzphasen der EBV-Replikation finden sich in unterschiedlichen lymphogenen Malignomen wieder. In Burkitt-Lymphomen lassen sich typischerweise Proteine der Latenzphase I (EBNA1, EBER) nachweisen, während beim klassischen Hodgkin Lymphom in der Regel solche der Latenzphasen II und III, v.a. LMP-1 und -2 zu finden sind.¹⁸⁵ Heidemarie Neitzel beschrieb 1986 die laborchemische Immortalisierung primärer B-Zellen mittels EBV zu sog. LCLs (Lymphoblastoid Cell Lines), welche heutzutage ein etabliertes Standardverfahren darstellt.¹⁸⁶ Die Erstbeschreibung des Virus geht auf seine Entdecker Michael Anthony Epstein und Yvonne Barr zurück, die Partikel des Virus in Burkitt-Lymphom Zellen entdeckten.¹⁸⁷

HHV-8 (Humanes-Herpes-Virus-8) ist geläufig als ursächlicher Auslöser für das Kaposi-Sarkom und das primäre Erguss-Lymphom. Über Induktion von NFκB wird hier eine vermehrte Genexpression für pro-inflammatorische Zytokine, Adhäsionsproteine und Angiogenese-fördernde Faktoren wie VEGF erzielt.¹⁸²

Um die Erkennung Virus-infizierter Zellen als „krank“ und die daraus resultierende Vernichtung durch das Immunsystem zu vermeiden, aktivieren persistierende Viren häufig ein sog. Latenzprogramm in der Zelle. Dies bedeutet, dass das Virus zwar in die Zelle integriert ist, jedoch nur wenige bis keine viralen Proteine exprimiert werden. Eine weitere Beeinträchtigung des Immunsystems erfolgt am Beispiel von EBV durch Modulierung der Antigenprozessierung und -präsentation. EBNA1 verfügt über Aminosäure-Wiederholungen, die seine Prozessierung und Präsentation über HLA-I-Proteine verhindern. BNLF2a ist ein Protein, das mit dem Transporter der Antigen-Prozessierung interagiert und diesen blockiert. BARF1 ist eine lösliche Variante des CSF-1-Rezeptors, worüber es CSF-1 binden und dessen Sekretion hemmen kann.¹⁸⁰

HIV ist dagegen ein Virus, das zur Schwächung der Immunantwort im späteren Infektionsverlauf zu einer Abnahme der peripheren T-Zellen führt.

EBV codiert in einigen Genen für mehrere sog. Micro-RNA (miRNA). MiRNA sind nicht codierende RNA, die post-translational durch komplementäre Basenpaarung die Expression von Genen regulieren können und daher auch physiologisch in vielen Zellen zu finden sind. Sie spielen beispielsweise eine Rolle in der B-Zell-Entwicklung und der Vermittlung von Signalen des BZR in der Zelle.

Auch ihre Aktivität zielt in Virus-infizierten Zellen darauf ab, die Virus-Persistenz zu erhalten und die Proliferation der Zelle zu unterstützen. Die geschieht, wie bei allen der bereits besprochenen Mechanismen, insbesondere zur Förderung des G1-S-Überganges durch Runterregulation tumorsuppressiver Proteine und Aktivierung von Onkogenen. Einige EBV-miRNAs scheinen in der

Lage zu sein, PRDM1/BLIMP-1 zu blockieren und beeinträchtigen die Effektivität von DNA-Reparaturmechanismen.^{173,177,180}

Insbesondere Hepatitisviren rufen in der Umgebung der befallenen Zellen ein inflammatorisches Milieu hervor, ähnlich wie es bei der chronischen *Helicobacter pylori*-Infektion der Fall ist. Ausdruck dieser chronischen Inflammation ist die kontinuierliche Aktivität von Immunzellen wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, die wiederholt zytotoxische Substanzen wie Sauerstoffradikale freisetzen, welche fortwährende Gewebeläsionen und Erneuerungsprozesse verursachen.¹⁷³

Zusammen erhöhen diese vielfältigen Mutationen über die Zeit das Risiko einer Akkumulation von DNA-Schäden.

Neoplastische Transformationen werden in der Regel nicht durch einen einzelnen Auslöser bedingt, sondern durch das Zusammenspiel vieler Veränderungen, die letzten Endes die Kompensationsmöglichkeiten der Zelle überschreiten.

Burkitt-Lymphom

Erstmals beschrieben wurde das Burkitt-Lymphom durch seinen Namensgeber Denis Burkitt im Jahr 1956. Burkitt berichtete über eine Anhäufung von 38 Fällen in Kampala Uganda, wo Kinder mit rasch proliferativen tumorösen Veränderungen des Gesichtes auffielen. Typischerweise ausgehend von der Kieferregion, breiteten sie sich mit einer rapiden Wachstumsgeschwindigkeit aus. Häufig ließen sich weitere, insbesondere abdominelle Tumormanifestationen nachweisen. Zwar wurde die Erkrankung initial als Sarkom bezeichnet, histologisch wurden jedoch bereits zum damaligen Zeitpunkt lymphozytär anmutende Zellen mit ausgeprägter mitotischer Aktivität beschrieben, begleitet von Hämorrhagien und Nekrosen.¹⁸⁸

Das Burkitt-Lymphom stellt eines der aggressivsten definierten Non-Hodgkin-Lymphome B-lymphozytären Ursprungs dar und betrifft Männer tendenziell häufiger als Frauen. Durch die Verfügbarkeit intensiver Chemotherapien ist die Prognose dennoch sehr gut, sodass Überlebensraten von bis zu 90% in klinischen Studien erreicht werden.

Man unterscheidet traditionell zwischen drei Varianten des Burkitt-Lymphoms, endemisches (eBL), sporadisches (sBL) und Immundefizienz-assoziiertes (iBL) Burkitt-Lymphom. Die Unterscheidung verschiedener Erkrankungsformen geht darauf zurück, dass sie in Bezug auf ihr klinisches Erscheinungsbild, die Ausprägung genetischer Veränderungen und ihrer Inzidenzgebiete variieren. Im Unterschied zur 4. Auflage der WHO-Klassifikation lymphatischer Neoplasien wird in der 5. Auflage nur noch zwischen EBV-positiven bzw -negativen BL unterschieden. Im Gegensatz hierzu wird in der konkurrierenden ICC-Klassifikation an der traditionellen Einteilung in endemisch, sporadisch und Immundefizienz-assoziiert festgehalten.

Gemeinsam ist allen Formen der Erkrankung das Risiko einer ZNS-Beteiligung und eines generalisierten Verlaufes.

Die Lymphomzellen zeichnen sich durch eine hohe Proliferationsrate mit sowohl infiltrativem als auch verdrängendem Wachstumsmuster aus. Als makroskopisches Korrelat der kurzen Tumorzellverdopplungszeit zeigen sich begleitend regelhaft Nekrosefelder und Hämorrhagien, mikroskopisch ein Ki-67 Proliferationsindex von annähernd 100% und eingestreute Makrophagen, die das typische „Sternenhimmel“-Bild hervorrufen.¹³²

Burkitt-Lymphom – endemisch, sporadisch und Immundefizienz-assoziiert

Das endemische Burkitt-Lymphom ist fast ausschließlich im äquatorialen Afrika und Papua-Neuguinea verbreitet. Dort ist es verantwortlich für bis zu 50% aller Krebserkrankungen im Kindesalter. Die meisten Erkrankungsfälle werden zwischen dem 4. – 7. Lebensjahr erfasst.^{132,181}

Auffällig ist die starke Überschneidung seiner Inzidenzgebiete mit den holoendemischen Malaria-Regionen und die ausgeprägte Assoziation mit EBV-Infektionen. Die gezielte Eradikation von Malaria durch DDT (Dichlordiphenyltrichlorethan) ab 1950 führte gleichzeitig zu einem Rückgang der eBL-Inzidenz in diesen Gebieten, während sich nach Ende der Programme um 1970 ein erneuter Anstieg beobachten ließ. Bis zu 95% der neoplastischen Zellen bei der endemischen Variante sind positiv für EBV. Daher geht man von kooperierenden Mechanismen der beiden Erreger in der Pathogenese der endemischen Lymphom-Form aus (s.u.). Unterstützt wird diese Annahme durch die auffallend geringere Anzahl von Mutationen im Vergleich zum sporadischen Typ.

Die Erkrankung manifestiert sich in den meisten Fällen im Bereich der Gesichtsknochen, aber auch lokales Drüsengewebe wie die Schilddrüse oder Speicheldrüsen können involviert sein. Ebenso wurden Befälle der Röhrenknochen, Keimdrüsen und des Brustgewebes beschrieben.¹³²

Dem gegenüber steht die sporadische Form des Burkitt-Lymphoms. Diese tritt deutlich seltener auf, mit lediglich 1 – 3 Fällen/Mio. erwachsener Einwohner in Europa und den USA, ist dafür aber weltweit zu finden.^{132,181} Auch hier handelt es sich hauptsächlich um ein pädiatrisches Krankheitsbild, es existiert jedoch ein zweiter Peak für das Auftreten der Erkrankung bei Erwachsenen, weltweit im Mittel um das 30. Lebensjahr. Bezogen auf Deutschland liegt er deutlich höher, zwischen dem 70.-80. Lebensjahr. Im sporadischen Burkitt-Lymphom ist die Positivität für EBV deutlicher seltener, sie liegt nur etwa bei einem Drittel der Fälle vor und zeigt sich eher im adulten Patientenkollektiv. Sporadische Burkitt-Lymphome zeigen ein deutlicher ausgeprägteres Mutationsprofil, insbesondere betroffen sind mit bis zu 70% die Gene für *TCF3* und dessen negativen Regulators *ID3*.¹⁸⁹ Ein Befall des Gesichtsschädels zeigt sich hier selten, stattdessen stehen abdominelle bulks im Vordergrund, die insbesondere im ileocoecalen Bereich lokalisiert sind.¹³² Dies macht sich zum Teil erst in Form von Invaginationen als klinische Erstmanifestation bemerkbar.

Die dritte Ausprägung der Erkrankung stellt das Immundefizienz-assoziierte Burkitt-Lymphom dar. Dieses findet sich insbesondere in Verbindung mit HIV-Infektionen, weshalb es oft synonym als HIV-assoziiertes Burkitt-Lymphom bezeichnet wird. Es kann aber auch Patienten betreffen, die aus andersgearteten Gründen einer Immunsuppression unterliegen, beispielsweise nach solider

Organtransplantation oder therapeutisch im Rahmen von Autoimmunerkrankungen. Auffällig wird das Lymphom in der Regel bei fortgeschrittener HIV-Erkrankung mit noch hohen CD4+-T-Zellen. Im Kontrast zu den beiden vorgenannten Varianten finden sich hier typischerweise nodale Manifestationen und Befälle des Knochenmarks. Die Assoziation mit EBV liegt mit ca. 40% zwischen der des sporadischen und endemischen Burkitt-Lymphoms.¹³² Die Prognose des Immundefizienz-assoziierten Burkitt-Lymphoms ist insgesamt besser als die anderer HIV-assoziiierter Lymphome wie primärer B-Zell- oder primärer Erguss-Lymphome.

Histologie und Zytologie

Histologisch und zytologisch finden sich mittelgroße, monomorphe Zellen mit basophilem Zytoplasma, das mit Vakuolen durchsetzt ist, welche sich auch im Zellkern finden. Diese Morphologie wird als L3 bezeichnet. Ihr runder Zellkern enthält auffallend viel Nucleoli, die ebenfalls basophil zur Darstellung kommen. Aufgrund der hohen Proliferationsrate lassen sich viele Mitosefiguren mit begleitenden spontanen Apoptosezeichen finden. Als Reaktion des Körpers kommt es zur Einwanderung und Durchsetzung der Tumorzellmasse mit Makrophagen, wodurch histologisch das typische „Sternenhimmel“-Muster („starry sky pattern“) entsteht, welches teils auch als „water pod pattern“ bezeichnet wird.^{161,188,190}

Immunphänotyp und Genetisches Profil

Die Zellen des Burkitt-Lymphoms gehen aus B-Lymphozyten hervor, die man a.e. der dunkeln Zone der GC zuordnen kann. Dies lässt sich aus ihrem immunhistochemischen und genetischen Expressionsprofil ableiten. Auf den Lymphom-Zellen findet sich eine Vielzahl typischer B-Zell-Marker wie CD19, CD20, CD79a und PAX5, sowie typische GC-Marker (BCL6 und CD10). TCF-3 wird nahezu ausschließlich von den Centroblasten in der dunklen Zone der GC exprimiert, sodass naheliegt, dass es sich hierbei um die Ursprungszellen des Burkitt-Lymphoms handelt. Weiterhin tragen die malignen Zellen Oberflächen-IgM, die typischerweise mutierte V-Regionen aufweisen.^{129,161} Die Expression von IgM zeigt, dass es sich um eine reife B-Zellen-Neoplasie handelt, sie also aus reifen B-Zellen (Centroblasten) als Ursprungszellen hervorgeht. Zellen aus Vorläuferphasen sind durch die fehlende TdT-Expression ausgeschlossen.

Aufgrund der rasanten Teilungsgeschwindigkeit der Lymphomzellen gelingt in nahezu allen Fällen ein stark positiver Nachweis des Proliferationsmarkers Ki-67, mit einer Expression von bis zu 100%.^{129,161}

Ki-67 (Kiel 1967) ist in sich teilenden menschlichen Zellen während aller Phasen des Zellzyklus nachweisbar, nicht jedoch in ruhenden Zellen (G0-Phase). Die genauen Mechanismen seiner Funktionsweise sind noch nicht abschließend entschlüsselt und scheinen in verschiedenen Zelltypen zu differieren. Jedoch gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass Ki-67 für die S-Phase-Progression benötigt wird und essenziell für die Bildung der PCL („perichromosomal layer“) ist, wo

es unter anderem als Surfactant-ähnliche Schutzschicht eine Aggregation der kondensierten Chromosomen verhindert und so die ordnungsgemäße Interaktion mit dem Spindelapparat ermöglicht.^{191–195}

Im Allgemeinen bekannt ist das Burkitt-Lymphom für seine starke *MYC*-Expression durch die typische Translokation t(8;14) des *MYC*-Gens in den Locus für das Immunglobulin-Schwerketten-Gen. Seltener kommt es zu Translokationen in die Genregionen der Leichtketten auf den Chromosomen 2 für die κ -Leichtketten und 22 für die λ -Leichtketten (t(2;8) bzw. t(8;22)).^{129,140,161,196} Hierdurch wird das *MYC*-Gen unter den regulatorischen Einfluss des Ig-Enhancers versetzt, was eine Überexpression von *MYC* auslöst.^{137,140,142,197} Zusätzlich kommt es häufig zu einem Verlust der Bindungsstelle von BCL6, wodurch dessen hemmende Regulation auf *MYC* entfällt.¹²⁹

Dieses unphysiologische Expressionsmuster von *MYC* allein ist jedoch nicht ausreichend onkogen, um die Entstehung von manifesten Lymphomen zu verursachen.¹⁹⁸ Dies könnte darin begründet liegen, dass *MYC* in der Zelle auch pro-apoptotische Signale in Gang setzt und hierdurch ein gewisses Gleichgewicht aufrechterhalten wird. Neben der Translokation von *MYC* finden sich auch mutierte Genvarianten, welche die apoptotischen Effekte von *MYC* negativ beeinflussen und ein proliferationsförderndes Milieu in der Zelle erzeugen. Dies wird zusätzlich potenziert durch inaktivierende Mutationen von *TP53*, das unter physiologischen Bedingungen durch Induktion über *MYC* in der Zelle die Apoptose einleiten würde.¹²⁹

Mutationen von *TP53* sind in Burkitt-Lymphomen häufig, während der INK4/ARF-Locus in solchen Fällen in der Regel intakt ist. Dagegen ist dieser bei wt-p53 Varianten nicht selten Gegenstand von Deletionen. Eine Störung dieses Signalweges spielt eine entscheidende Rolle bei der Umgehung der zellulären Tumorsuppression in Krebszellen.¹⁴⁶

Zwar sind Translokationen von *MYC* in einem Großteil aller Burkitt-Lymphome nachweisbar, jedoch sind sie diesem nicht spezifisch vorbehalten, sondern finden sich auch in einer Vielzahl anderer humaner Krebserkrankungen.^{129,136,139,161,199–203} Auch findet sich in einem kleinen Teil der Burkitt-Lymphome kein Nachweis einer *MYC*-Translokation.¹⁶¹

Dagegen ist das kombinierte Auftreten mit Mutationen in dem Transkriptionsfaktor *TCF3* oder seines Inhibitors *ID3* in anderen Lymphomarten selten, während es für das Burkitt-Lymphom als charakteristisch angesehen wird.^{129,158,159,161}

In vielen Burkitt-Lymphomen lassen sich weiterhin, wie bereits genannt, aktivierende Mutationen im *CCND3*-Gen finden, die zu einer Akkumulation von Cyclin D führen.¹⁶²

Assoziation mit EBV und Malaria

EBV wurde 1964 erstmals in Burkitt-Zelllinien beschrieben¹⁸⁷. Während sBL-Tumore meist EBV⁻ und weniger als die Hälfte der iBL EBV⁺ sind, findet sich in eBL ein EBV-Nachweis in bis zu 95% der Fälle.^{132,147,178,184} Auch zeigt sich für das eBL eine hohe Überschneidung mit holoendemischen Malaria-Gebieten und eine Assoziation insbes. mit dem Befall durch *Plasmodium falciparum*, dem

auslösenden Erreger der *Malaria tropica*. So macht es im Bereich des äquatorialen Afrikas bis zu 50% aller Krebserkrankungen vor dem 15. Lebensjahr aus. Das entspricht im Maximum 6 Fällen/100.000 Einwohner jährlich und ist damit doppelt so häufig wie in Europa und den USA.^{132,181} Im Kontrast zu sporadischen Burkitt-Lymphomen finden sich in der endemischen Variante ein weniger stark ausgeprägtes und abgewandeltes Mutationsmuster, wenn gleich die *MYC*-Translokation auch hier das typische Merkmal der Erkrankung ist.^{132,178,184}

Dass die beiden Krankheitserreger EBV und *Plasmodium falciparum* an der Entstehung der endemischen Form des Burkitt-Lymphoms beteiligt sind, ist hochwahrscheinlich. Dennoch sind die genauen Mechanismen dahinter noch nicht in ihrem gesamten Umfang bekannt. Es gibt jedoch zahlreiche Anhaltspunkte dafür, wie die Infektionen eine Transformation der Zellen begünstigen.

Einige Prozesse, die EBV in B-Zellen auslöst und die das Zusammenfallen mutagener Veränderungen lancieren, wurden bereits bei der Pathogenese der NHL ausgeführt. Nach Übertragung über den Speichel breitet sich das Virus auf seine Zielzellen, die B-Lymphozyten aus. Da CD21 der Hauptrezeptor für EBV ist, kann es potenziell jeden Subtyp befallen, seine Persistenz erfolgt jedoch ausschließlich in B-Gedächtniszellen. Unklar ist, wie es dem Virus gelingt, diese zu erreichen. Hierzu existieren zwei verschiedene Annahmen:¹⁸⁰

- I. Das Virus infiziert direkt die vorhandenen Gedächtniszellen und induziert in diesen erneut das wiederholte Durchlaufen der GC-Reaktion oder einer GC-ähnlichen Reaktion.^{178,180}
- II. EBV befällt naive B-Zellen, die durch die Expression der viralen Proteine während der GC-Reaktionen einen Selektionsvorteil besitzen und sich zu Gedächtniszellen differenzieren.¹⁸⁰

Nachgewiesen wurde in jedem Fall, dass EBV in infizierten Zellen die AID und speziell EBNA1 die Enzyme RAG1 und RAG2 aktiviert.^{173,178} Dies bringt folglich auch die Anfälligkeit für DNA-Aberrationen mit sich und unterstützt vermutlich das Zustandekommen der *MYC*-Translokation in endemischen Burkitt-Lymphomen. In EBV⁺ endemischen Burkitt-Lymphomen findet sich typischerweise eine Expression der viralen Proteine der EBV-Latenzphase I (EBNA1 only), im Unterschied hierzu lassen sich beim klassischen Hodgkin-Lymphom die Proteine der EBV-Latenzphasen II und III nachweisen (EBNA1, LMP1, LMP2a)²⁰⁴.

Für EBV zeigt sich jedoch nicht nur in Afrika, sondern weltweit eine hohe Durchseuchung der Bevölkerung, sodass sich die hohe Assoziation mit dem endemischen Subtyp des Burkitt-Lymphoms hierdurch nicht hinreichend erklären lässt. Bis zu 90% der Menschen infizieren sich im Laufe ihres Lebens mit dem Virus.

Allerdings zeigt sich zusätzlich die starke Überschneidung der Lymphom-Inzidenz mit dem Malaria-Gürtel. In Afrika ist die Inzidenz für Malariaerkrankungen schon im Kindheitsalter hoch, in den holoendemischen Gebieten kann bei mehr als der Hälfte der unter fünfjährigen Kindern ein Z.n. Parasitämie nachgewiesen werden.¹⁸¹

Bei Malaria handelt es sich um eine parasitäre Erkrankung, die von der Anopheles-Mücke übertragen wird und auf verschiedene Plasmodien-Arten als Erreger zurückzuführen ist. Die

schwerste Form der Malaria, die Malaria tropica, wird durch *Plasmodium falciparum* ausgelöst. Die Parasiten befallen initial die Hepatozyten und entwickeln sich dort, bis sie aus der Leber ins Blut übergehen und die zirkulierenden Erythrozyten befallen. In diesen entwickeln und vermehren sie sich, bis der betroffene Erythrozyt hämolysiert wird und weitere Erreger ins Blut abgibt. Dies äußert sich meist in grippeähnlichen Symptomen, schwere Fälle können mit Organschäden und ZNS-Beteiligung bis hin zu Koma und Atemlähmung verlaufen.

Infizierte Erythrozyten exprimieren auf der Oberfläche das Membranprotein CIDR1 α (Cystein-rich-inter-domain-region 1 α). Dieses aktiviert B-Gedächtniszellen und kann in EBV⁺ Zellen die Virusproduktion anstoßen, wodurch dieses weitere B-Lymphozyten befällt.¹⁸¹

Für ihre Reproduktion benötigen Plasmodien Energie, die sie über den Abbau des Hämoglobins der Erythrozyten in Vakuolen gewinnen. Hierbei entsteht als Abbauprodukt das Molekül Hämozin. Hämozin ist funktionell ein Agonist des Toll-like-Rezeptors 9 (TLR-9), der während aller Differenzierungsstufen in den Endosomen der B-Lymphozyten exprimiert wird.¹⁸¹ TLR-9 bindet normalerweise CpG-DNA und induziert eine pro-inflammatorische Zytokinantwort. Weiterhin lösen Signale über TLR-9 eine Aktivierung des Enzyms AID aus und induzieren eine Hyperplasie der B-Zellen. Obendrein bewirkt eine Malaria-Infektion ebenfalls die Induktion von RAG1 und RAG2.¹⁸¹

Im Rahmen des Infektionsgeschehen lässt sich insgesamt eine chronische GC-Induktion mit starker AID-Expression feststellen. Kombiniert mit der ausgelösten Erhöhung der EBV-Viruslast und der hierdurch gestärkten Apoptoseresistenz, ergibt sich ein Zustand hoher Zellproliferation, der geprägt ist durch eine extreme Anfälligkeit gegenüber mutagener Ereignisse.^{129,181,205}

Bei der Entstehung des endemischen Burkitt-Lymphoms handelt es sich also sehr wahrscheinlich um einen kombinierten Pathoprozess, bei dem onkogene Einflüsse verschiedener Faktoren in einem Individuum zusammenkommen.

Burkitt-like Lymphom mit 11q Aberration

Eine lymphozytäre Neoplasie, reife high-grade B-NHL mit Aberration 11q wurde zwischenzeitlich in der 4. Auflage der WHO-Klassifikation als „provisorische BLL-Entität“ vorgeschlagen. Dem Namen entsprechend, ist es dem „echten“ Burkitt-Lymphom unter vielen Gesichtspunkten sehr ähnlich, wie seiner Morphologie, seinem phänotypischen Erscheinungsbild, seinem Genexpressionsprofil und auch dem klinischen Erkrankungsverlauf mit gutem therapeutischem Outcome. Etwa findet sich teilweise das typische „Sternenhimmel“-Muster und der hohe Proliferationsindex des Burkitt-Lymphoms wieder, das zytologische Muster ist jedoch deutlich variabler.

Entscheidend ist das Fehlen des typischen *MYC*-Rearrangements beim Burkitt-like Lymphom. Ebenso wenig lassen sich Mutationen in *TCF3*, *ID3* oder *CCND3* nachvollziehen. Stattdessen ist es gekennzeichnet durch Veränderungen des Chromosoms 11q in Form von Telomerverlusten oder peripheren Zugewinnen.^{132,206,207}

Ein weiterer Unterschied zum Burkitt-Lymphom ist das regelhafte Auftreten in Form nodaler Manifestationen im Kopf/Hals-Bereich, die beim klassischen BL fast ausschließlich in Vergesellschaftung mit dem Vorliegen einer Immunsuppression beobachtet werden.²⁰⁶ Aufgrund der geringen Fallzahl ist es bisher nicht gelungen, entitätsspezifische Marker des Lymphoms zu identifizieren, die über die 11q-Aberration hinausgehen. Die vorliegenden Analysen zeigen ein GCB-ähnliches Profil^{206,207} mit teils rekurrenten Mutationen von GNA13.²⁰⁷ Wagener et. al. identifizierten weiterhin stop-gain Mutationen von NFRKB.²⁰⁷

Aus den zum aktuellen Zeitpunkt veröffentlichten Daten ergibt sich das Bild einer Neoplasie, die sich bezüglich des nachgewiesenen Mutationsmusters vom Burkitt-Lymphom relevant unterscheidet.^{206,207}

In der 5. WHO-Auflage und der ICC-Klassifikation wird die Entität mittlerweile nicht mehr als BLL sondern als High-grade Lymphom mit 11q-Aberration betrachtet.

Therapie des Burkitt-Lymphoms

Eine große Herausforderung in der Therapie des Burkitt-Lymphoms stellen die Toxizitäts-bedingten Limitationen der Behandlung älterer Patienten (> 55 Jahre) dar. Im Laufe der Zeit wurden verschiedene intensive Therapieprotokolle angewendet, welche überwiegend aus der pädiatrischen Onkologie abgeleitet und für die Behandlung erwachsener Patienten adjustiert wurden.

Magrath et al. wendeten zwischen 1989 - 1993 bei 41 Patienten eine systemische Chemotherapie aus Cyclophosphamid, Doxorubicin, Ifosfamid, Vincristin, Etoposid, Methotrexat und HD-Cytarabin in Kombination mit einer intrathekalen Therapie aus Methotrexat und Cytarabin (CODOX-M/IVAC) an. Mit dieser gelang es, Komplettremissions-Raten von bis zu 95% bei einem Event-freien Überleben nach 2 Jahren von 92% zu erzielen, wobei sich kein Unterschied im Outcome zwischen pädiatrischen und erwachsenen Patienten zeigte. Die Therapie-assoziierte Toxizität bestand hierbei überwiegend im Sinne einer Hämatotoxizität mit ausgeprägter Neutropenie über bis zu 100 Tage (100%) mit begleitenden Infektionen (54,5%) bis hin zur Sepsis und Thrombopenie < 25.000/l (88,7%) sowie schweren Mukositiden.²⁰⁸⁻²¹⁰

Zwischen 1992 – 1997 wurde am MD Anderson Cancer Center in Houston eine Therapie bestehend aus hyperfraktioniertem Cyclophosphamid, Vincristin, Doxorubicin und Dexamethason im Wechsel mit HD-Methotrexat und Cytarabin mit intrathekalen Gabe von Methotrexat und Cytarabin (HyperCVAD) eingesetzt. Patienten > 60 Jahren erhielten eine Dosis-reduzierte Therapie. Unter Therapie kam es zu einer Mortalität von ca. 20%. Initial konnte eine komplette Remission in 81% der Fälle erreicht werden, nach 3 Jahren lag diese noch bei 61%. Die 3-Jahres-Überlebensraten lagen unter Therapie mit HyperCVAD bei 49%. Auch unter diesem Protokoll stellte eine Hämatotoxizität Grad 3 – 4 mit resultierenden Infektionen bis hin zur Sepsis (11%) die Hauptkomplikation dar.²¹⁰⁻²¹²

Das French Lymphome Malin B Regime, abgewandelt aus der Pädiatrie, kam von 1996 – 2001 an 72 Patienten mit medianem Alter von 33 Jahre und limitierter Knochenmarkinfiltration < 30% zur Anwendung. Patienten wurden hierbei anhand ihres Risikoprofils und Prognose in 3 Gruppen eingeteilt. Patienten mit guter Prognose (Gruppe A) erhielten 3 Zyklen Cyclophosphamid, Doxorubicin, Vincristin und Prednison (COPAD). In Gruppe C wurden Patienten mit Hoch-Risikoprofil bei ausgeprägter Knochenmarkinfiltration und/oder ZNS-Beteiligung eingeteilt. Sie erhielten eine Vorphase mit COP (Cyclophosphamid, Vincristin, Prednison), gefolgt von 8 Zyklen COPADM, CYVE mit erhöhter Dosis Methotrexat, Cytarabin und Etoposid, kombiniert mit intrathekaler Methotrexat/Cytarabin-Gabe. Patienten mit Stadium I – IV ohne Knochenmark- oder ZNS-Beteiligung, die weder ein Niedrig- noch Hoch-Risikoprofil aufwiesen, wurden Gruppe B zugeordnet und ebenfalls mit einer COP-Vorphase gefolgt von 5 Zyklen COPADM/CYM und intrathekalem HD-Methotrexat/Cytarabin behandelt. Unter diesen Protokollen lag das Event-freie Überleben bei 65%, das 2- bzw. 3-Jahres-Überleben bei um die 70% mit CR-Raten zwischen 80-89%. Komplikativ kam es im Rahmen der Hämatotoxizität bei > 40% zu einer febrilen Neutropenie, 50% entwickelten unter Therapie einen Transfusionsbedarf.^{209,210,213}

Dunleavy et. al. publizierten 2013 ihre Ergebnisse aus der Zeit von 11/2000 – 12/2009, in der sie 30 Patienten mit Burkitt-Lymphom behandelten. 19 HIV-negative Patienten erhielten als Therapie 6-8 Zyklen DA-R-EPOCH (Etoposid, Prednison, Vincristin, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Rituximab), 11 HIV-positive Patienten erhielten 3-6 Zyklen SC-EPOCH-RR (doppelte Rituximab-Dosis). Beide Patientenkollektive erhielten außerdem eine intrathekale Therapie mit Methotrexat. Im mittleren Follow-up von 86 Monaten bzw 73 Monaten (DA-R-EPOCH vs. SC-EPOCH-RR) zeigte sich insgesamt ein Progressionsfreies Überleben von 95% bzw. 100% bei einem Gesamt-Überleben von 100% bzw 95%. Komplikationen während der Therapie bestanden auch hier überwiegend aus einer febrilen Neutropenie.^{209,214}

Die Stanford-Protokolle verwendeten u.a. HD-Cyclophosphamid und HD-MTX (3000mg/m²) über 6-9 Therapiezyklen und erzielten damit ein durchschnittliches 2-Jahres-Überleben von 66,8%, in limitierten Stadien sogar bis 100%.²¹⁰

McMasters et al verwendeten das sog. Vanderbilt-Protokoll mit 2 intensiven Induktionstherapie aus HD-Cyclophosphamid, Methotrexat, Bleomycin, Vincristin und Doxorubicin. Die Komplettremissionsraten lagen bei 85%, das 5-Jahres-Krankheitsfreie Überleben bei 60%. Es ist jedoch zu beachten, dass hier lediglich ein sehr kleines Kollektiv aus 20 Patienten untersucht wurde.²¹⁰

Real-World Daten zeigen bei einigen Protokollen, insbesondere DA-R-EPOCH, ein vermehrtes Auftreten von ZNS-Rezidiven, sodass Patienten mit initialer ZNS-Beteiligung mit alternativen Protokollen behandelt werden sollten, die eine intensive ZNS-Prophylaxe beinhalten.²¹⁵

Ein weiteres etabliertes Therapieschema zur Behandlung des Burkitt-Lymphoms ist das GMALL B-ALL/NHL 2002 Protokoll. Hoelzer et. al. nutzten dieses Protokoll 2002 – 2011 zur Behandlung von

363 Patienten zwischen 16 und 85 Jahren. Das Protokoll besteht aus mehreren Blöcken (A, B, C bei Alter < 55 Jahre bzw. A, B bei Alter > 55 Jahren), jeweils 2-3x wiederholt, in Kombination mit insgesamt 8 Zyklen Rituximab, die jeweils vor und nach jedem Zyklus sowie 2x mal nach Abschluss der Chemotherapie appliziert wurden. Zusätzlich erfolgte eine viermalige intrathekale Triple-Prophylaxe mit Cytarabin, Methotrexat und Dexamethason. Unter dem Protokoll berichteten Hoelzer et. al. über Komplettremissions-Raten von 89% (\leq 55 Jahre) bzw. 84% ($>$ 55 Jahre). Das Gesamtüberleben nach medianem Follow-up von 3,6 Jahren lag bei 86% \pm 2% (\leq 55 Jahre) bzw. 62% \pm 2% ($>$ 55 Jahre) mit Progressionsfreiem Überleben von 82% \pm 3% (\leq 55 Jahre) bzw. 60% \pm 5% ($>$ 55 Jahre). Bei 12% der behandelten Patienten kam es nach initialer Komplettremission zu einem Rezidiv. Wie auch bei anderen Therapieprotokollen waren die Hauptkomplikationen hämatotoxischer Genese. 58% entwickelten eine Neutropenie Grad 3/4, bei 38% kam es zu Infektionen und schweren Mukosiden unter der Therapie.^{209,216}

Um die ausgeprägte Myelosuppression und die hierunter auftretenden Komplikationen (Infektionen, Neutropenie, Transfusionsbedarf) besser kontrollieren zu können, kommen heutzutage meist supportive Therapien mit G-CSF und gezielter Infektprophylaxe mit z.B. Cotrimoxazol und Ciprofloxacin zum Einsatz.²¹⁰

Essenzieller Bestandteil jeder Therapie sollte aufgrund der häufigen ZNS-Beteiligung die Evaluation einer ausreichend intensiven ZNS-wirksamen Therapie sein. In den meisten Fällen werden zu diesem Zwecke HD-Methotrexat und/oder HD-Cytarabin sowie eine ergänzenden intrathekale Therapie eingesetzt. Die ZNS-Bestrahlung hat hingegen bisher keinen Stellenwert in der Behandlung des Burkitt-Lymphoms, da sich hierunter kein besseres Outcome feststellen lässt, jedoch eine signifikant schwerere Neurotoxizität und neurologische Langzeitfolgen beobachtet wurden.²¹⁰

Eine allgemeine Definition „älterer Patienten“ existiert nicht, dennoch lässt sich bei Patienten > 55 Jahren generell ein schlechteres Therapie-Outcome nachvollziehen. Unabhängig des Therapieprotokolls ist das Burkitt-Lymphom jedoch insgesamt mit einer guten Prognose assoziiert und zeichnet sich durch das Erreichen hoher Komplettremissions- und Überlebensraten unter intensiver Therapie aus. Rezidive treten fast ausschließlich im ersten Jahr nach Therapie auf und sind generell selten. Bei Rezidivfreiheit über 2 Jahre nach Therapieabschluss ist in der Regel nicht mehr mit dem Auftreten eines Rezidivs zu rechnen.

| Reference | Protocol | No. of patients treated | Median age, y (range) | CR, % | DFS, % | EFS, % | OS, % |
|--------------------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------------|-------|--------------|-------------|-------------|
| Bernstein et al ⁵⁸ | Stanford | 18 | 25 (15-75) | 78 | 71.3 at 1 y* | N/A | 66.8 at 2 y |
| Lopez et al ⁵⁹ | MD Anderson 81-01 and 84-30 | 44 | 32 (17-72) | 80 | 60 at 5 y* | N/A | 52 at 5 y |
| McMaster et al ¹⁰ | Vanderbilt | 20 | 44.5 (21-69) | 85 | 60 at 5 y | N/A | N/A |
| Longo et al ⁶⁰ | ProMACE-MOPP | 17 | 36 (19-90) | 64.7 | 61 at 15 y | N/A | 35 at 15 y |
| | ProMACE-Cytabom | 8 | | 100 | 86 at 15 y | N/A | 88 at 15 y |
| Divine et al ⁶¹ | ACVBP | 52 | 34 | 85 | N/A | 47 at 5 y | 53 at 5 y |
| Soussain et al ¹¹ | LMB 81, 84, 86, and 89 | 65 | 26 (17-65) | 89 | N/A | 71 at 3 y | 74 at 3 y |
| Divine et al ⁶² | LMB 81, 84, 86, and 89 | 51 | 33 | 83 | N/A | 61 at 2 y | 66 at 2 y |
| Hoelzer et al ⁵⁵ | BNHL83 | 24 | 33 (15-38) | 63 | 50 at 8 y | N/A | 49 at 8 y |
| | BNHL86 | 35 | 36 (18-65) | 74 | 71 at 4 y | | 51 at 4 y |
| Todeschini et al ⁶³ | Modified POG 8617 | 8 | 35 (19-64) | 100 | N/A | 75 at 28 mo | N/A |
| Adde et al ⁶⁴ | CODOX-M/IVAC | 26 | 25 (18-59) | 92.3 | N/A | 84 at 1 y | N/A |
| LaCasce et al ⁶⁵ | CODOX-M/IVAC | 14 | 47 | 86 | 72 at 21 mo | N/A | N/A |
| Mead et al ⁹ | CODOX-M/IVAC | 52 | 35 (15-60) | 75 | N/A | 64.6 at 2 y | 72.8 at 2 y |
| Thomas et al ⁵⁶ | Hyper-CVAD | 26 | 58 (17-79) | 81 | 61 at 3 y* | N/A | 49 at 3 y |
| Cabanillas et al ⁶⁶ | R-Hyper-CVAD | 20 | 52 (27-77) | 89 | 86 at 1 y | N/A | N/A |
| Lee et al ⁶⁷ | CALGB 9251 | 54 | 44 (18-71) | 80 | 50 at 4 y | N/A | 52 at 4 y |

EFS indicates event-free survival; OS, overall survival; ProMACE-MOPP, methotrexate, doxorubicin, cyclophosphamide, etoposide, mechlorethamine, vincristine, procarbazine, and prednisone; ACVBP, doxorubicin, cyclophosphamide, vindesine, bleomycin, and prednisone; LMB, French B-cell non-Hodgkin lymphoma and B-ALL protocols; NHL, German B-cell non-Hodgkin lymphoma protocols; POG, Pediatric Oncology Group; CODOX-M/IVAC, cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, high-dose methotrexate/ifosfamide, etoposide, high-dose cytarabine; hyper-CVAD, hyperfractionated cyclophosphamide, vincristine, doxorubicin, dexamethasone, methotrexate, and cytarabine; R, rituximab; CALGB, Cancer and Leukemia Group B.

*In the Stanford⁵⁸, Vanderbilt¹⁰, and MD Anderson⁵⁶ studies, these values represent 1-year relapse-free survival, 5-year freedom from progression, and 3-year continuous CR rate, respectively. DFS and EFS are not reported in these series.

Abbildung 10: Vergleich verschiedener Therapieprotokolle des Burkitt-Lymphoms, aus "Adult Burkitt leukemia and lymphoma" - Blum K, Lozanski G, Byrd J ²¹⁰

Bezüglich der Salvage-Therapie im Rezidivfall gibt es bisher keine einheitliche Empfehlung, die Therapiestrategien werden hier individuell unter Berücksichtigung der bisherigen Therapie und dem jeweiligen Patientenfall entschieden. Die Therapieoptionen anhand von Studienberichten reichen von erneuter Chemotherapie über autologe Stammzelltransplantation bis zur allogenen Stammzelltransplantation und Therapieversuche mit CAR-T-Zellen.^{210,217,218}

Materialien

Laborgeräte

ELISA-Lesegerät:

Wallac Victor² 1420 Multilabel Counter L

Perkin Elmer, Waltham (USA)

Seriennr. 4200775

ELISA Platten:

Nunc Maxisorp 96 wells

Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

Gefrierschrank – 20°C

Liebherr, Bulle (Schweiz)

Gefrierschrank – 20°C

Bosch, Stuttgart (Deutschland)

Gefrierschrank – 80°C

Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

GFL Kreisschüttler 3015

Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel (Deutschland)

Kühlschrank 4°C

Bosch, Stuttgart

Kühlschrank 4°C

Liebherr, Bulle (Schweiz)

Nano drop Spectrophotometer ND-1000

PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen (Deutschland)

PCR-Maschine Veriti 96 Well Thermo Cycler

Applied Biosystems, Foster City (USA)

PCR-Maschine MJ Research PTC-200 Peltier

Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules

Thermal Cycler

(USA)

Pipetten 10µl, 100µl, 1000µl

Eppendorf, Hamburg (Deutschland)

Zentrifuge 5415 R

Eppendorf, Hamburg (Deutschland)

Zentrifuge 5840 R

Eppendorf, Hamburg (Deutschland)

Verbrauchsmaterialien

Molekularbiologische Materialien

Agarose

Merck, Darmstadt (Deutschland)

AmpliTaQ Gold™ DNA-Polymerase

Applied Biosystems, Waltham (USA)

Aqua dest.

Braun, Rottweil (Deutschland)

Coenzym A

Biomol GmbH, Hamburg (Deutschland)

DNA-Aufreinigung: Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit,

Zymo Research, Freiburg (Deutschland)

DNA-Isolierung: QIAamp DNA Blood Mini Kit (250),

QIAGEN, Hilden (Deutschland)

| | |
|--|--|
| DTT (Dithiothreitol) 10mM | Sigma-Aldrich, St. Louis (USA) |
| EDTA 10mM | Merck, Darmstadt (Deutschland) |
| Ethidiumbromid | Merck, Darmstadt (Deutschland) |
| Glycerol 5% | Merck, Darmstadt (Deutschland) |
| Marker 50bp DNA Ladder | New England Biolabs, Waltham (USA) |
| Marker PageRuler Prestained Protein Ladder (10-180kDa) | Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA) |
| Marker GeneRuler 1kb DNA Ladder | Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA) |
| MgCl ₂ Stammlösung | Merck, Darmstadt (Deutschland) |
| Nukleotide | Roche, Basel (Schweiz) |
| Nunc MaxiSorp™ flat-bottom | Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA) |
| p300, rekombinant | Biozol Diagnostica GmbH, Hamburg (Deutschland) |
| p65, GST-markiert | vom Labor zur Verfügung gestellt |
| Patientenproben (DNA) | |
| R1700017-1A ₂ (Burkitt-Lymphom) | Institut universitaire de pathologie, Lausanne (Schweiz) |
| R1700017-1B ₂ (Burkitt-Lymphom) | Institut universitaire de pathologie, Lausanne (Schweiz) |
| R1700017- 1C ₁ (Burkitt-Lymphom) | Institut universitaire de pathologie, Lausanne (Schweiz) |
| Patientenproben (Seren) (Burkitt-Lymphom) | |
| Pat. 1, Proben Nr. 1 - 4 | Institut für Virologie, Universitätsklinikum Homburg (Deutschland) |
| Pat. 2, Proben Nr. 5 - 13 | Institut für Virologie, Universitätsklinikum Homburg (Deutschland) |
| Pat. 3, Proben Nr. 14 – 16 | Institut für Virologie, Universitätsklinikum Homburg (Deutschland) |
| Pat. 4, Proben Nr. 17, 18 | Institut für Virologie, Universitätsklinikum Homburg (Deutschland) |

| | |
|---|--|
| Pat. 5, Proben Nr. 19 – 28 | Institut für Virologie, Universitätsklinikum Homburg (Deutschland) |
| Pat. 6, Proben Nr. 29, 31 | Institut für Virologie, Universitätsklinikum Homburg (Deutschland) |
| Pat. 7, Probe Nr. 32 | Institut für Virologie, Universitätsklinikum Homburg (Deutschland) |
| Pat. 8, Proben Nr. 33 – 38 | Institut für Virologie, Universitätsklinikum Homburg (Deutschland) |
| PVDF-Membran | Merck Millipore, Massachusetts (USA) |
| Primer: | |
| M13 forward / M13 reverse | Sigma-Aldrich, St. Louis (USA) |
| spezif. Primer | Sigma-Aldrich, St. Louis (USA) |
| FR1 Primer | Sigma-Aldrich, St. Louis (USA) |
| Leader/3' Primer | Sigma-Aldrich, St. Louis (USA) |
| Spin Minis: NucleoSpin ^R Plasmid (NoLid) (250 preps) | Macherey-Nagel, Düren (Deutschland) |
| TAE 50x | Merck, Darmstadt (Deutschland) |
| TAE 1x | vom Labor zur Verfügung gestellt |
| TOPO TM TA Cloning TM Kit for Subcloning | Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA) |
| Trichostatin A 0,1M | Sigma-Aldrich, St. Louis (USA) |
| V-Gen-PCR Kit: AmpliTaq Gold (n. Biomed-2 Report) | Sigma-Aldrich, St. Louis (USA) |
| Zelllinien | |
| BJAB (Burkitt-Lymphom) | vom Labor zur Verfügung gestellt |
| BL31 (Burkitt-Lymphom) | vom Labor zur Verfügung gestellt |
| BL41 (Burkitt-Lymphom) | vom Labor zur Verfügung gestellt |
| CA46 (Burkitt-Lymphom) | vom Labor zur Verfügung gestellt |
| Daudi (Burkitt-Lymphom) | vom Labor zur Verfügung gestellt |
| LAZ221 (präBALL) | vom Labor zur Verfügung gestellt |
| Mutu1 (Burkitt-Lymphom) | vom Labor zur Verfügung gestellt |
| Nalm6 (präBALL) | vom Labor zur Verfügung gestellt |
| Raji (Burkitt-Lymphom) | vom Labor zur Verfügung gestellt |

RAMOS (Burkitt-Lymphom)

vom Labor zur Verfügung gestellt

Immunologische und proteinchemische Materialien

Acrylamid 30%

Bakterien *Escherichia coli* DH5alpha

Bakterien *Escherichia coli* TG1

Bakterien-Lysate (hitzeinaktiviert)

Bystin-1-SUMOyliert

cOmplete™ Proteasehemmer-Cocktail (Tabletten)

Dialyse-Schlauch 10kD Ausschluss-Volumen

ECL-System

FLAG-tag-Bystin

FLAG-tag-HSP40

Goat-Anti-human-Fab-biotiniliert

HSP40-C7-acetyliert

IPTG

Makroarray UniPEX 1 und 2

Maus-Anti-Flag Klon M2

NAPPA-Array mit viralen Genen

OPD-Entwickler (Tabletten)

Plasmodium falciparum-Lysate (inaktiviert)

Roth, Karlsruhe (Deutschland)

Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und Zelllinien,
Braunschweig (Deutschland)

Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und Zelllinien,
Braunschweig (Deutschland)

Institut für Medizinische
Mikrobiologie und Hygiene,
Homburg/Saar (Deutschland)

José-Carreras-Institut für Immun-
und Gentherapie, UKS Homburg
(Deutschland)

Roche, Basel (Schweiz)

Serva, Heidelberg (Deutschland)

Pharmacia, Uppsala (Schweden)

José-Carreras-Institut für Immun-
und Gentherapie, UKS Homburg
(Deutschland)

José-Carreras-Institut für Immun-
und Gentherapie, UKS Homburg
(Deutschland)

dianova, Hamburg (Deutschland)

José-Carreras-Institut für Immun-
und Gentherapie, UKS Homburg
(Deutschland)

Thermo Fisher Scientific, Waltham
(USA)

Bioscience, Dublin (Irland)

Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

Virginia C. Piper Center, Arizona
State University (USA)

Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

Institut für Tropenmedizin,

Tübingen (Deutschland)
Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

Streptococcus Peroxidase

Lösungen und Medien

Agarose-Gel 2%:

180ml TAE 1x
3g Agarose
→ 2 Minuten aufkochen, erneut mischen,
weitere 2 Minuten aufkochen,
Abkühlen auf dem Schüttler bei 150 Umdrehungen/min
75µl Ethidiumbromid

Coomassie-Färbung:

1g Coomassie brilliant blue (Serva Blue R 250)
450ml Methanol
450ml H₂O
100ml Essigsäure
→ etwa 30 Min. färben

ELISA-Coating-Puffer (10ml)

Puffer A: 2,12g NaCO₃ ad 100ml Aqua dest
Puffer B: 1,68g NaHCO₃ ad 100ml Aqua dest
→ 1,7ml Puffer A + 0,8ml Puffer B + 7,5ml Aqua dest.

Entfärber -Lösung:

100ml Methanol
100ml Essigsäure
800ml Aqua dest.
→ etwa 1 Stunde entfärben

Laemmli-Puffer 5x

144g Glycin
30,34g TRIS
10g SDS
2l Aqua dest.

LB-Agar mit Ampicillin o. Kanamycin

25g LB-Medium
15g Agar
10g Trypton
10g NaCl
5g Hefeextrakt

| | |
|---------------------------------------|--|
| LB-Medium mit Ampicillin o. Kanamycin | <p>1l Aqua dest. 100µg Ampicillin o. Kanamycin</p> <p>5g Hefeextrakt 10g Trypton 15g Agar 10g NaCl 1l Aqua dest. 100µg Ampicillin o. Kanamycin</p> |
| POX-OPD-Entwickler (10ml) | <p>Lösung A: 0,2 M Dinatriumphosphat x 2 H₂O → 3,56g in 100ml Aqua dest. Lösung B: 0,1 M Citronensäure x 1 H₂O → 2,1 g in 100ml Aqua dest. 2,5ml Lösung A 2,5 ml Lösung B 1 Tbl. OPD 5ml H₂O₂ 30%</p> |
| SDS-Polyacrylamid Sammelgel: | <p>1µl TEMED 10µl SDS 10µl Ammoniumperoxodisulfat 130µl TRIS 1,0M (pH 6,8) 170µl Acrylamidmix, 30% 680µl Aqua dest.</p> |
| 10% SDS-Polyacrylamid Trenngel: | <p>2µl Tetramethylethylethylendiamid (TEMED) 50µl Natriumdodecylsulfat (SDS), 10% 50µl Ammoniumperoxodisulfat, 10% 1,3ml TRIS 1,5M (pH 8,8) 1,7ml Acrylamidmix, 30% 2ml Aqua dest.</p> |
| SOC-Medium | <p>20g Trypton 5g Hefeextrakt 0,5g NaCl 10ml KCl (250mM)</p> |

NaOH bis zum Erreichen von pH 7,0

1l Aqua dest.

5ml MgCl₂ (2M)

TAE-Elektrophorese-Puffer* (pro Liter)

242g TRIS base

57,1 ml glacial acetic acid

100ml 0,5 M EDTA (pH8,0)

**nach Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd. Edition; Sambrook, Fritsch, Maniats, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989*

TBS-Puffer (pro Liter)

8,78g NaCl

6,05g TRISZMA Hydrochlorid

1,4g TRIS

1l Aqua dest.

TBS + 0,1% Triton X-100 (= 1ml Tx100)

TRIS-Puffer (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)

2Ty-Ampicillin-Glucose-Agar

15g Agar

16g Trypton

10g Hefeextrakt

5g NaCl

1l Aqua dest.

25ml Glucose (40%)

100µg Ampicillin

2Ty-Ampicillin-Glucose-Medium

10g Hefeextrakt

16g Trypton

5g NaCl

1l Aqua dest.

25ml Glucose (40%)

100µg Ampicillin

Methoden

DNA-Isolierung

Die Isolierung der DNA aus in Flüssigmedien kultivierten Zellen erfolgte unter Verwendung des QIAamp DNA Blood Mini Kit (250), Cat.No.: 51106 (QIAGEN, Hilden) gemäß des Hersteller-Protokolls.

Bestimmung der DNA-Konzentration mittels NanoDrop Spectrophotometer

Um die Konzentration der gewonnenen DNA zu bestimmen, wurde das Nano drop Spectrophotometer ND-1000 von PEQLAB Biotechnologie genutzt.

Durch Messung der UV-Absorption der Probe bei 260nm und 280nm wird anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes vom Gerät die DNA-Konzentration in der aufgetragenen Probe berechnet.

Zur Berücksichtigung des jeweils verwendeten Lösungsmittels, z.B. Aqua dest. oder AE-Puffer, erfolgte vor Messung der Probe eine Messung der Absorption des Lösungsmittels als Nullabgleich. Toleriert wurden Messwerte < 0,4 als Ausgangswert.

PCR - Polymerase-Chain-Reaction

Bei der Polymerase-Ketten-Reaktion handelt es sich um ein etabliertes Verfahren zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten, die durch den Einsatz entsprechender Primer (Sense- und Antisense-Primer) definiert werden.

Die Reaktion verläuft in drei Schritten:

1. Denaturierung bei 94°C für 12:00 Minuten
2. Denaturierung bei 94°C für 0:30 Minuten

Dieser Schritt dient zur Auftrennung der DNA-Doppelstränge, um den Primern und der Taq-Polymerase eine Bindung an die Einzelstränge zu ermöglichen.

Die verwendete Dauer ist abhängig von der Länge der verwendeten Primer, die oben gemachten Zeitangaben beziehen sich speziell auf die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche.

3. Annealing bei 60°C für 0:30 Minuten

Hier kommt es zur Anlagerung der ausgewählten Primer an die entsprechenden Abschnitte der DNA, die der Taq-Polymerase als Syntheseursprung sowie als Stoppsignal dienen.

Bei diesem Schritt kann die gewählte Temperatur in Abhängigkeit der Primer-Länge sowie des Guanosin/Cytosin-Gehaltes der Primer variieren, sodass sich auch diese Angabe speziell auf die hier präsentierten Versuche bezieht.

4. Elongation bei 72°C für 1:00 Minuten/kb

Durch Schaffung der optimalen Arbeitstemperatur der hitzestabilen Taq-Polymerase kommt es zur Amplifikation der gewünschten DNA-Abschnitte an beiden Ursprungssträngen, wodurch eine exakte Kopie der ursprünglichen Information entsteht.

Am Ende eines einzelnen solchen Zyklus liegt der amplifizierte Abschnitt der DNA doppelt vor und kann im Folgenden ebenfalls als Reaktionsmatritze fungieren. Durch beliebig häufiges Wiederholen des Reaktionszyklus (ab Schritt 2) entsteht eine ausreichend große DNA-Menge. In dieser Arbeit wurden jeweils zwischen 35 und 40 Zyklen durchlaufen.

Die Anzahl der möglichen Zyklen, die bei der PCR durchlaufen werden können, wird durch mehrere Aspekte limitiert.

Zum einen kommt die Reaktion zum Erliegen, sobald die Menge der zur Verfügung stehenden Primer und Nukleotide erschöpft ist. Ist dieser Punkt erreicht, kann die Taq-Polymerase keine weiteren Nukleotide aneinanderreihen bzw. keinen Bindungspunkt an die DNA-Stränge finden und die Reaktion bricht ab.

Zum anderen kommt es mit fortlaufenden Zyklen zu einem immer weiter ansteigenden Anteil an Reaktionsprodukten. Diese neigen in zunehmender Konzentration dazu, sich während des Annealings aneinander anzulagern, anstatt mit den Primern zu hybridisieren. Des Weiteren ist die Hitzeanfälligkeit der Nukleotide zu berücksichtigen. Durch das mehrmalige Erhitzen wird ein Teil der Nukleotide im Rahmen der Denaturierung zerstört. Die Taq-Polymerase selbst unterliegt *in vitro* wie *in vivo* einer gewissen Fehleranfälligkeit, die zu Mutationen in einem Teil der Reaktionsprodukte führt, wodurch diese in der weiteren Verwendung zusätzliche Fehler verursachen (Folgefehler). In Abhängigkeit der eingesetzten Primer ergeben sich zahlreiche Verwendungsmöglichkeiten der PCR, denen verschiedene Zielstellungen zugrunde liegen. Die Durchführung sämtlicher PCR in dieser Arbeit erfolgte in den Geräten Veriti 96 Well Thermo Cycler und MJ Research PTC-200 Peltier.

Für die PCR lassen sich anhand des Vorgehens und der eingesetzten Primer verschiedene Unterformen unterscheiden, die darauf abzielen, ein möglichst genaues PCR-Produkt zu erhalten. Hierzu wurde einerseits die sog. Nested PCR entwickelt. Hierbei werden zwei PCR-Durchläufe durchgeführt, bei denen im zweiten Durchgang des PCR-Produkt aus dem ersten Durchgang als Template-DNA dient und zusätzlich sowohl der Sense- als auch der Antisense-Primer ausgetauscht werden, um eine genauere Sequenz-Amplifikation zu erreichen. Eine Abwandlung der Nested PCR ist die Seminested PCR, die vom grundlegenden Ablauf her identisch ist und ebenfalls im 2. PCR-Durchgang das neue PCR-Produkt als Template verwendet, jedoch nur maximal einer der verwendeten Primer ersetzt wird.^{219,220} Ein Beispiel für die Seminested PCR stellt in dieser Arbeit die V-Gen-Multiplex-PCR mit der nachfolgenden spezifischen PCR dar, in dem bei letzterer im Unterschied zur V-Gen-Multiplex-PCR die initialen FR1-Primer gegen spezifischere FR2-Primer ausgetauscht wurden, während der JH-consensus-Primer als Anti-Sense-Primer erhalten blieb.

Der PCR gegenüber gestellt werden muss das Next-Generation Sequencing (NGS). Beide Methoden ermöglichen eine hohe Sensitivität der zu amplifizierenden DNA und sind in der Lage, Gen-Varianten zu identifizieren. Jedoch ist eine Voraussetzung der PCR, dass die zu vervielfältigende DNA-Sequenz in Teilen bekannt ist, um geeignete Primer auszuwählen. Es wird also nur ein spezifischer Abschnitt der DNA sequenziert. Somit ist die PCR ein geeignetes Mittel bei einer geringen Anzahl von Proben oder DNA-Targets. Das NGS dagegen ermöglicht eine schnelle Sequenzierung mehrerer tausend Gene multipler Zieltargets, ohne dass hierfür eine Vorkenntnis bezüglich der Sequenz von Nöten ist. Somit kann eine große Anzahl von Sequenzen auf Basenebene in kurzer Zeit erfasst werden. Es erfasst sehr sensitiv unbekannte und seltene Genvarianten, Deletionen, Rearrangements und Translokationen ganzer Gene.^{221,222}

Für die Fragestellung in dieser Arbeit, bei der spezifisch die Immunglobulin-Gene einer verhältnismäßig kleinen Probenanzahl untersucht und reproduziert werden sollten, stellte die PCR daher die geeignetere Methode dar.

Ig-V-Gen-PCR

Die Ig-V-Gen-PCR dient der Amplifikation jener DNA-Abschnitte, die für die Information des Leicht- und Schwereketten-types der von der Zelle exprimierten Antikörper codieren. Als eine Art „Such-PCR“ werden unspezifischere, weiter 5' liegende FR1-Primer oder leader-Primer verwendet, welche für Ketten einer Familie gleich sind (z.B. VK1-Familie). Aufgrund der Existenz mehrerer Leicht- und Schwerekettenfamilien, werden die Proben in mehreren Ansätzen unter Verwendung verschiedener FR1-Primer auf verschiedene Kettenfamilien gescreent.

Für die Schwereketten wurden im Rahmen dieses Projektes Sense-Primer für die Kettenfamilien VH1 bis VH6 mit dem JH-consensus Antisense-Primer verwendet, für die Leichtketten die Sense-Primer VK1 bis VK5 und VK7 für den κ -Typ und VL1 bis VL3 für den λ -Typ, in Kombination mit den passenden Antisense-Primern.

Für die Reaktion wurde nachstehender Ansatz verwendet:

5 μ l PCR-Puffer

0,1 μ l Sense-Primer

0,1 μ l Antisense-Primer

3 μ l MgCl₂

1 μ l dNTP

0,2 μ l Taq-Polymerase

≈1 μ l DNA (\cong 100ng)

39,5 μ l Aqua dest.

Σ 50 μ l Gesamtvolumen

Nach Bestimmung der durch Isolierung gewonnenen DNA-Menge durch Spektralphotometrie konnte zunächst für jede Probe eine Ig-V-Gen-Multiplex-PCR mit den FR1-Primern für die Schwerekettenfamilien VH1 bis VH6 und für die Leichtketten VK1 bis VK5 und VK7 (κ -Typ) und VL1 bis VL3 (λ -Typ) erfolgen, um die übergeordnete Gruppe der Schwer- und Leichtkette zu bestimmen. Zur Erfolgskontrolle, ob in der post-PCR-Probe DNA-Fragmente der gesuchten Basenlänge vorhanden waren, wurde die Proben zur Durchführung einer Agarose-Gel-Elektrophorese mit einem 50bp Marker (New England Biolabs) in ein 2%iges Agarose-Gel geladen und anschließend unter UV-Licht die Banden auf Höhe von ungefähr 400-450bp ausgeschnitten. Um die gebundene DNA aus dem Gel zu lösen und aufzureinigen, wurde das Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, Cat.No.: D4001 (Zymo Research, Freiburg) verwendet.

Anschließend wurde eine Probe der gewonnenen DNA gemeinsam mit den verwendeten Primern zur Analyse der Sequenzen an die Seq It GmbH & Co.KG in Kaiserlautern, Rheinland-Pfalz geschickt.

Spezifische PCR

Nach erfolgreicher Sequenzanalyse der Produkte aus der IgV-Gen-Multiplex-PCR konnte eine spezifische PCR unter Verwendung der weiter C-terminal 3' gelegenen Primer erfolgen, welche für jede Probe spezifisch ausgewählt wurden. Dies ermöglicht die vollständige Amplifikation der benötigten DNA-Sequenz auf Basenniveau, um die genaue Sequenz der variablen Kettenabschnitte zu bestimmen. Der eingesetzte Ansatz setzte sich wie folgend zusammen:

3 μ l PCR-Puffer

\approx 1 μ l DNA (\triangleq 100ng)

0,1 μ l Sense-Primer

0,1 μ l Antisense-Primer

0,2 μ l dNTP

0,2 μ l Taq-Polymerase

25,4 μ l Aqua dest.

Σ 30 μ l Gesamtvolumen

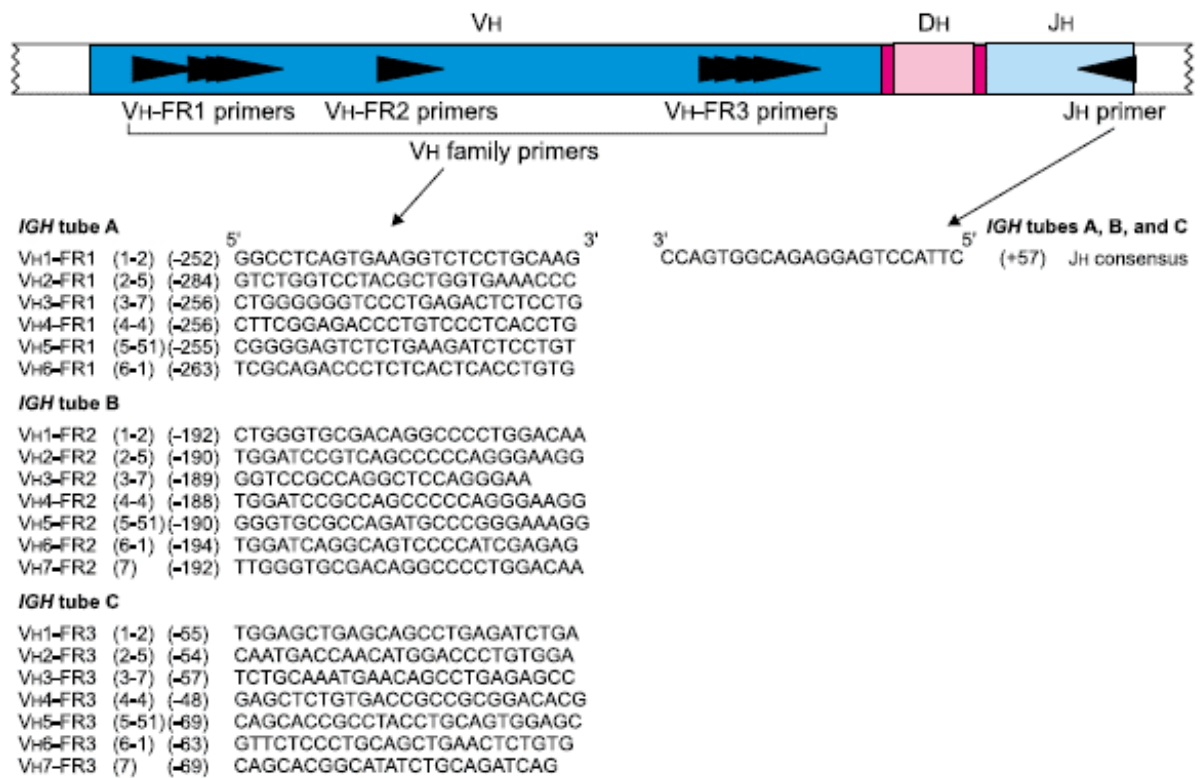


Abbildung 11: VH-Primer nach van Dongen, Langerak, Brüggemann, Evans, Hummel et al. (2003)

Im Anschluss wurde wieder eine Agarose-Gel-Elektrophorese mit dem 50bp Marker zum Screening auf PCR-Produkte der erwarteten Kettenlänge von 400-450bp durchgeführt. Auch diese Banden wurden unter photometrischer Beurteilung ausgeschnitten und nachfolgend aufgereinigt. Anschließend erfolgte eine erneute Sequenzanalyse.

Colony-PCR

Die Colony-PCR dient der Überprüfung auf Nährplatten kultivierter Bakterienklone auf das Vorhandensein einer gewünschten DNA-Sequenz. Im Rahmen dieser Arbeit wurde hiermit auf die Aufnahme der DNA-Sequenz im TA-TOPO-Vektor gescreent. Daher wurden als Primer solche gewählt, die im Bereich des TOPO-Vektors binden und dort den Replikationsursprung ermöglichen. Wir verwendeten dazu den M13 forward und M13 reverse als Sense- bzw Anti-Sense-Primer. Pro Agar-Platte wurden im Schnitt 4 - 8 gewachsene Kolonien untersucht. Der Reaktionsansatz setzte sich für jede Probe/Kolonie folgendermaßen zusammen:

1µl PCR-Puffer
0,03µl Sense-Primer (100µM)
0,03µl Antisense-Primer (100µM)
0,07µl dNTP
0,07µl Taq-Polymerase
8,8µl Aqua dest.

∑ 10µl Gesamtvolumen

Nach Vorbereiten der Ansätze wurden die ausgewählten Kolonien auf der Agar-Platte einzeln mit einer Pipettenspitze angetippt und diese mehrfach rührend durch den PCR-Ansatz gezogen, um die Bakterien zu lösen. Die verwendeten Spitzen wurden gekühlt gelagert, um bei erfolgreichem Nachweis zur erneuten Kulturanzucht in Flüssigmedien zu fungieren.

Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese bedient sich der Eigenschaft geladener Teilchen, in einem elektrischen Feld zu wandern, um diese nach Ladung und Größe aufzutrennen. Im Falle von DNA-Fragmenten macht man sich hierfür die negativen Ladungen der enthaltenen Phosphatreste zu Nutze. Wird nun eine Gleichstromspannung an die Gelkammer angelegt, wandern die DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladungsreste in Richtung Anode. Längere DNA-Fragmente begegnen beim Durchwandern des Gels einem höheren Widerstand und bewegen sich entsprechend langsamer als kürzere Basenfragmente. Hierdurch lässt sich durch Hinzugabe eines bekannten Größenmarkers am Ende die Länge der Fragmente bestimmen. Der im Gel enthaltene Fluoreszenzfarbstoff, hier Ethidiumbromid, interkaliert während des Prozesses mit den DNA-Basen, wodurch die entstehenden Banden im Anschluss unter UV-Licht sichtbar gemacht werden können. In diesem Fall diente dies der Prüfung auf das Vorhandensein von DNA-Fragmenten der richtigen Länge.

Die PCR-Produkte wurden in ein 1%iges- oder 2%iges Agarose-Gel geladen, das in eine Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer gelegt und an eine Spannung von 50-100V angeschlossen wurde. Zur Größenbestimmung wurde ein 50bp Marker als Standard mitgeladen. Nach 30-60

Minuten wurde das Gel unter UV-Licht beurteilt und Gelbanden auf Höhe der gewünschten Fragmentlänge ausgeschnitten.

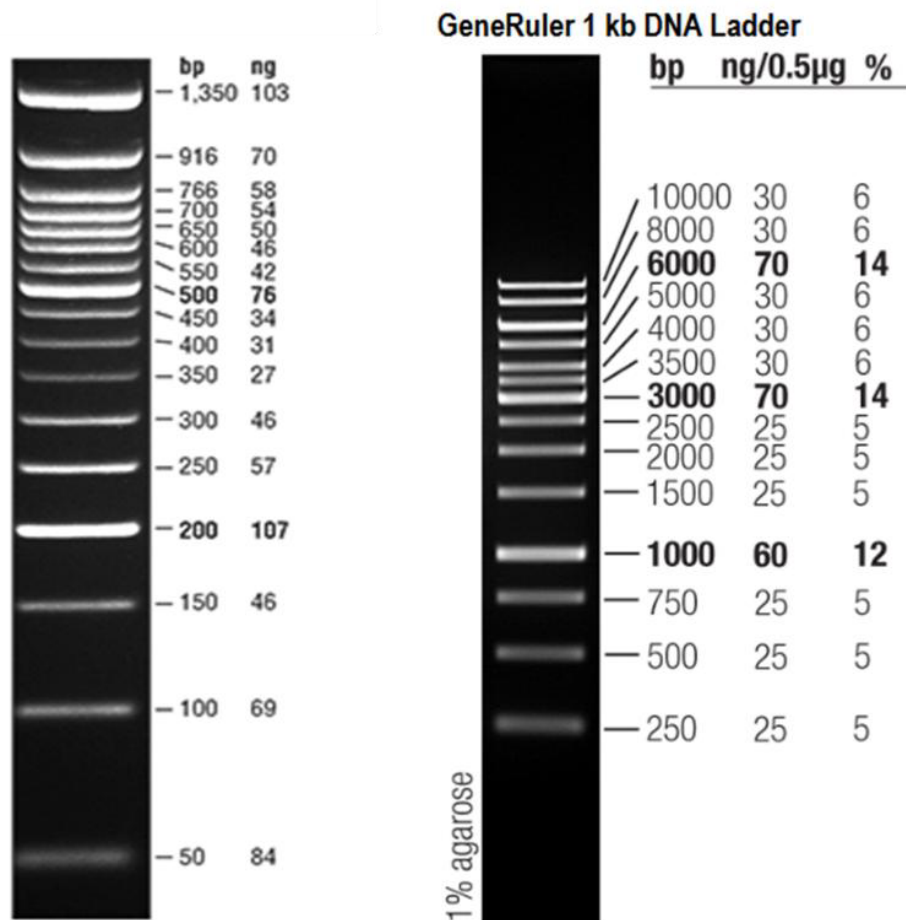


Abbildung 12: 50 Bp DNA Marker; Nach New England Biolabs²²³ (links) und Gene Ruler 1kb DNA Ladder, ThermoFisher Scientific²²⁴ 2 (rechts)

DNA-Aufreinigung aus Gelbanden

Zur Aufreinigung von in Elektrophorese-Gelen gebundener DNA wurde das Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, Cat.No.: D4001 (Zymo Research, Freiburg) gemäß Protokoll eingesetzt, jedoch abweichend unter Verwendung von 500µl ADB-Puffer pro Probe und Eluierung in 12µl Aqua dest. Dieser Schritt erfolgte zur Reinigung der DNA von möglichen Gel-Resten, Proteinen und weiteren Verunreinigungen, die die folgende Verwendung der DNA erschweren würden und potenziell zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen.

Die aufgereinigte DNA wurde anschließend zur Sequenzanalyse an die SEQ-IT GmbH & Co. KG nach Kaiserslautern geschickt.

Transformation von Plasmiden und DNA in Bakterien

Transformation bezeichnet die Aufnahme freier DNA, häufig in Form von Plasmiden, in Bakterien. In der Molekularbiochemie macht man sich diesen Vorgang zu Nutze, um bspw. Resistenzgene gegenüber Antibiotika oder die Information für Proteine, die von Bakterien produziert werden sollen, in diese einzubringen. Dies kann über verschiedene Wege erreicht werden.

Eine zweckdienliche Methode ist die Verwendung von Bakterienstämmen, die natürlicherweise bereits in der Lage sind, Fremd-DNA in sich aufzunehmen. Der erste bakterielle Vertreter, für den diese Kompetenz zur natürlichen Transformation 1928 durch Griffith nachgewiesen wurde, war *Streptococcus pneumoniae*.²²⁵ Mittlerweile kennt man eine Vielzahl weiterer Bakterien, die zur Aufnahme von Fremd-DNA befähigt sind, z.B. *Haemophilus influenzae*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus spp.* und weitere.²²⁶

Andere Bakterienarten besitzen diese Fähigkeit nicht, sodass sie künstlich erzeugt werden muss. Die Elektroporation stellt eine Möglichkeit dar, bei der die Bakterien für wenige Millisekunden einer starken Spannung ausgesetzt werden, um Poren in ihrer Zellmembran zu induzieren, durch die die DNA ins Innere gelangt.²²⁷

Laborchemische Optionen bestehen darin, die Bakterien verschiedenen Chemikalien auszusetzen, bspw. Calciumchlorid, Magnesiumchlorid, DMSO, PEG (Polyethylenglycol).²²⁸ Teilweise werden diese Methoden mit einem Hitzeschock kombiniert, was bedeutet, dass die Bakterien mit der zu transformierenden DNA zusammengebracht und zunächst gekühlt werden, bevor sie für 45s einer deutlich höheren Temperatur, etwa 42°C, ausgesetzt werden.

Heutzutage können kompetente Bakterienstämme einfach kommerziell erworben werden, wie auch die hier verwendeten Bakterienstämme DH5α und TG1, bei denen es sich um transformationsfähige Bakterien der Spezies *Escherischia coli* handelt. Die Hitzeschock-Methode wird teilweise zusätzlich angewandt, da man sich hierdurch eine höhere Effizienz der Transformation verspricht.

Zum Einbringen der DNA/Vektoren wurden diese mit 80µl Kultur von DH5α- oder TG1-Bakterien in ein Eppendorfgefäß pipettiert und für 30 Minuten auf Eis gelegt. In dieser Zeit soll eine Anlagerung der Bakterien an die DNA und bereits eine erste Aufnahme erfolgen. Im Anschluss wurde, im Sinne eines Hitzeschocks, das Gefäß für 90 Sekunden in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 42°C gestellt. Nach dem Hitzeschock wurde das Gefäß erneut für einige Minuten auf Eis gestellt. Zur Anzucht der Bakterien wurde zunächst eine Vorkultur in 200µl SOC-Medium angesetzt, die für 30-60 Minuten bei 37°C auf einem Schüttler im Brutraum ruhte. Zur endgültigen Kultivierung wurde die Vorkultur nachfolgend auf Agarplatten (LB oder 2Ty) ausplattiert und erneut über Nacht im Brutraum oder für zwei Tage bei Raumtemperatur angezüchtet.

TOPO-TA-Klonierung

Bei der Klonierung wird ein DNA-Fragment in einen Vektor eingebracht. Dieser wird im Anschluss in Bakterien transferiert und dadurch eine starke Vermehrung der eingebrachten DNA ermöglicht. Die TA-Klonierung nutzt die terminale Transferaseaktivität der Taq-Polymerase, durch die am Ende eines Arbeitsschrittes zusätzliche Desoxyadenosine an das 3'-Ende des PCR-Produktes angehängt werden, was zur Entstehung eines linearen DNA-Fragmentes mit A-Überhang führt. Durch die Verwendung eines ebenfalls linearen Vektors, der komplementäre Desoxythymidin-Überhänge besitzt, entsteht durch Bindung zwischen den überlappenden A/T-Überhängen ein ringförmiges Plasmid. Dieses wurde in den Bakterienstamm DH5 α eingebracht, transformationsbefähigte Bakterien der Spezies *E. coli*, die danach für 30-60 Minuten bei 37°C (Schüttler im Brutraum) in 200 μ l SOC-Medium in Vorkultur gebracht und anschließend auf mit Ampicillin oder Kanamycin angereicherten Agar-Platten (LB oder 2Ty) kultiviert wurden. Da der TOPO-TA-Vektor Resistenz-Gene sowohl für Ampicillin als auch für Kanamycin enthält, besitzen die Bakterien, in die das Plasmid erfolgreich eingebracht wurde, zusätzlich einen Selektionsvorteil gegenüber Plasmid-freien Bakterien, wodurch die Wahrscheinlichkeit erhöht wird, ausschließlich Plasmid-positive Klone anzuzüchten. Zur Überprüfung der über Nacht angewachsenen Bakterien-Klone auf Plasmid-Positivität wurde mit 4 Kolonien pro Nährplatte eine PCR (Colony-PCR) durchgeführt. Jene Kolonien, die in der sich anschließenden Agarose-Gelelektrophorese Fragmente der gewünschten Größe (\approx 650bp) aufwiesen, wurden als erneute Zellkultur über Nacht angezüchtet (Overnight-Kultur). Für die TA-TOPO-Klonierung im Rahmen dieser Arbeit wurde das TOPO™ TA Cloning™ Kit for Subcloning von Thermo Fisher Scientific verwendet.

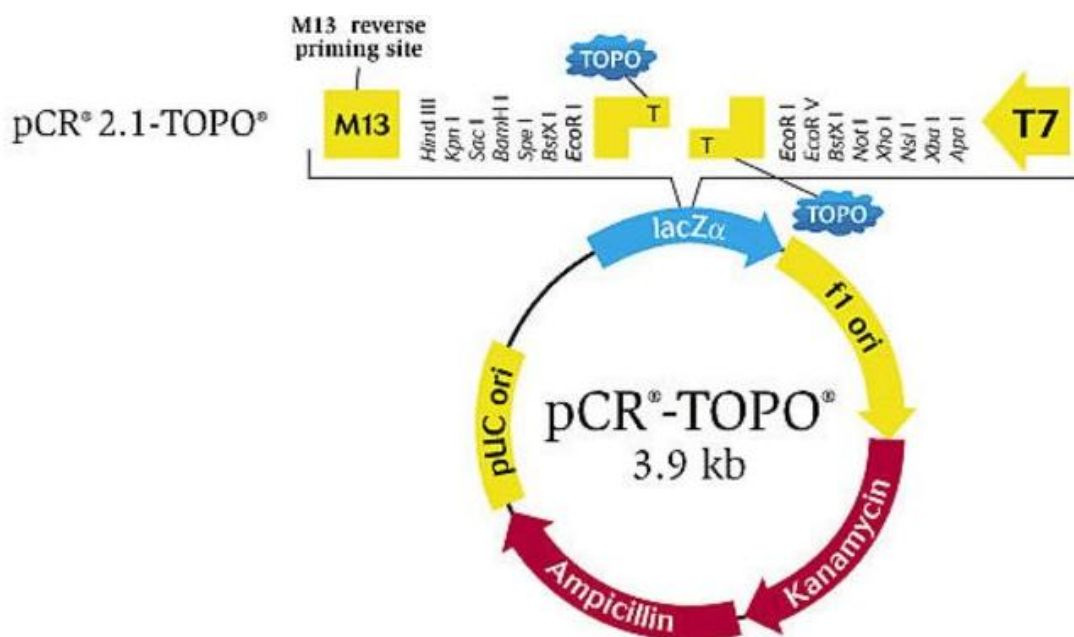


Abbildung 13: pCR®2.1-TOPO Vektor, nach Thermo Fisher Scientific²²⁹

Overnight-Kultur

Plasmid-positive Bakterienklone wurden zum Zweck der erneuten Vermehrung über Nacht auf dem Schüttler im Brutraum bei 37°C in je 2ml LB-Medium pro Klon kultiviert. Um eine Vermehrung ausschließlich der gewünschten Bakterien zu ermöglichen, wurde dem LB-Medium zwecks Selektion Ampicillin im Verhältnis 1:1000 oder Kanamycin im Verhältnis 1:4000 zugesetzt. Die Auswahl des Antibiotikums richtete sich nach dem Antibiotikazusatz der Nährplatte, auf der die Kultivierung der Bakterien nach TA-TOPO-Klonierung stattfand.

Aufreinigung der TA-TOPO-Klone nach Anzucht über Nacht

Zur Isolierung und Reinigung der Plasmide aus den angewachsenen Bakterienklonen wurde das NucleoSpin® Plasmid (NoLid) Kit von Machery-Nagel verwendet. Die isolierten Plasmide wurden anschließend zur Sequenzanalyse an die SEQ-IT GmbH & Co. KG nach Kaiserslautern geschickt. Dieser Schritt und die nachfolgende Auswertung der Sequenzen dienten der Verifikation der im Plasmid enthaltenen Protein-Sequenz.

Restriktionsenzym-Verdau

Restriktionsendonukleasen sind ein fest etablierter Bestandteil der heutzutage praktizierten Gentechnik. Die ursprüngliche Aufgabe dieser bakteriellen Enzyme ist es, Bakterien vor fremder DNA zu schützen, indem sie spezifische Methylierungsmuster in der bakterieneigenen DNA erkennen und innerhalb oder in unmittelbarer Nähe dieser Sequenzen DNA schneiden. Die von ihnen erkannten Sequenzen haben eine Länge von vier bis acht Basenpaare. Aufgrund ihrer Spezifität existieren zahlreiche Untergruppen. Die hier verwendeten Typ-II-Restriktionsendonukleasen erkennen Sequenzen, welche palindrom sind, also sowohl in Sense-, als auch in Antisense-Richtung die gleiche Information codieren und somit auf beiden DNA-Strängen gleich sind.

Restriktionsenzyme erzeugen beim Schneiden fast immer Schnittenden mit je einem 5'-Phosphat und einem 3'-OH-Ende. Dabei können zwei verschiedene Schnittmuster entstehen. Zum einen gibt es sogenannte sticky ends, die einander überlappen und entweder einen 3'- oder einen 5'-Überhang besitzen, abhängig davon, welches Ende das längere ist. Die zweite Möglichkeit ist die Entstehung von blunt ends, also glatten Enden, bei denen die DNA-Stränge genau gegenüber geschnitten wurden. In dieser Arbeit wurden Restriktionsenzyme genutzt, um die Schwer- und Leichtketten-Fragmente an der passenden Stelle zu schneiden und sie in den Zielvektor (pCES) einzubringen, über den die Proteininformationen schließlich in die produzierenden Bakterien kloniert wurde. Zuerst wurde mit der Schwerketten-DNA der Proben ein Restriktionsenzym-Verdau durchgeführt, um sie an der gewünschten Schnittstelle (NcoI/BstEII) zu schneiden. Zuvor wurden mögliche interne NcoI/BstEII-Schnittstellen ausgeschlossen bzw. wurden, im Falle eines Vorhandenseins solcher,

diese mit der gleichen entstehenden Aminosäuresequenz mutagenisiert. Zur Erfolgskontrolle diente eine Elektrophorese in 1%igem Agarose-Gel zusammen mit einem 1kbp Marker.

Die entsprechenden Banden auf Höhe zwischen 1500 - 2000bp wurden ausgeschnitten und die DNA aufgereinigt, um im Anschluss die Ligation mit dem gewünschten Endvektor (pCES-v-kappa) durchzuführen.

Die Ligation erfolgte über das nachfolgende Schema: Es wurde eine Mischung aus Ligase, 50ng Vektor und 6-9ng des gewünschten Inserts (Schwer- bzw Leichtketten-DNA) hergestellt, die anschließend für 2h bei Raumtemperatur ruhte. In dieser Zeit erfolgt optimalerweise die Aufnahme des Inserts in den Vektor und ein Verschluss der Schnittstellen mit Hilfe der Ligase. Nach Ablauf der Zeit wurde das Gemisch in TG1-Bakterien transformiert, die über Nacht auf 2Ty-Agar-Platten im Brutraum (37°C) kultiviert wurden. Auch hier wurde zur Überprüfung der Ergebnisse eine Colony-PCR mit den Primern kappa-sense und CH1-3' (anti-sense) mit anschließender Gel-Elektrophorese durchgeführt. Die Insert-positiven Klone wurden als Overnights erneut kultiviert und am nächsten Tag SpinMinis angefertigt, die zur Sequenzierung verschickt wurden.

Enthielt die DNA sowohl den Vektor als auch die gewünschte Schwerketten-Sequenz, wurde erneut ein Restriktionsenzym-Verdau durchgeführt, dieses Mal mit ApaLI/XhoI. Ähnlich wie für die Schwerkette wurde dann auf interne Restriktionsenzymstellen für ApaLI/XhoI in den Leichtketten- und auch den Schwerkettenfragmenten überprüft und bei Bedarf mutagenisiert.

Dieser Verdau wurde ebenfalls mit der Leichtketten-DNA durchgeführt. Zur Überprüfung erfolgte erneut die Durchführung einer Gel-Elektrophorese mit anschließender Aufreinigung der Banden.

Diesem Schritt folgte eine Ligation mit dem Schwerketten-positiven Vektor und der zugehörigen, geschnittenen Leichtketten-DNA. Dazu wurden 1µl Vektor (\approx 50ng) und 1-3µl (\approx 6-9ng) Leichtketten-DNA eingesetzt. Die Bestimmung der exakten Menge richtete sich nach der in der Photometrie gemessenen DNA-Konzentration nach Aufreinigung der Elektrophorese-Banden.

Das Ergebnis wurde wieder in TG1-Bakterien kloniert, die nachfolgend über Nacht bei 37°C angezüchtet wurden. Der Ligations- und Klonierungserfolg wurde am Folgetag mit Hilfe einer Colony-PCR und Gel-Elektrophorese evaluiert.

Erfolgsversprechende Banden auf Höhe von \approx 3000bp wurden aufgereinigt und sequenziert. Bestätigte die Auswertung der Sequenzen das Vorhandensein der Schwer- und Leichtketten-DNA im Vektor, so wurden die entsprechenden Klone als Overnights in 2ml 2Ty-Flüssigmedium bei 37°C angezüchtet.

Induktionskultur

Die Induktion bezeichnet die Forcierung der Proteinsynthese durch Transkriptionsstimulation eines entsprechenden Gens.

Der Ansatz der endgültigen Induktionskultur setzte sich zusammen aus 4ml flüssigem Nährmedium (2Ty) und 40µl der Overnight-Kultur (\approx 1:100). Diese Kombination wurde für 2 Stunden bei 37°C auf

dem Schüttler inkubiert. Zur Beurteilung des Bakterienwachstums erfolgte währenddessen wiederholt eine Messung der Optischen Dichte der Kultur im Spectrometer. Bei Erreichen einer OD600 von 0,6 wurde durch Zugabe von 4ml 2mM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) die Genexpression induziert. IPTG ist in der Lage, an die Promoterregion des lac-Operons zu binden und dort die Wirkung von Repressoren aufzuheben. Dadurch wird eine verstärkte Transkription der im lac-Operon codierten Gene, wie lacZ, ermöglicht.²³⁰ LacZ ist innerhalb des Vektors enthalten. Die Induktionskultur wurde anschließend erneut für 4 Stunden auf den Schüttler gestellt, bei einer Temperatur von 30°C. Nach Ablauf der Zeit wurde die flüssige Zellkultur bei 13.000U/min (Eppendorf Zentrifuge 5840 R) für eine Minute zentrifugiert und der Überstand abpipettiert, um die Bakterienpellets zu isolieren.



Abbildung 14: Schematische Abbildung des Lac-Operons; Gemeinfrei, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=505841>; abgerufen am 11.06.2023

Messung der Optischen Dichte

Die Messung der Optischen Dichte bestimmt die Trübung einer Lösung. Es handelt sich um ein Verfahren zur quantitativen Erfassung von Stoffen in einem Medium. Erfasst wird mit Hilfe eines Spectrometers die Abschwächung der Intensität von Licht einer definierten Wellenlänge beim Durchgang durch die zu erfassende Lösung. Die Optische Dichte kann in diesem Zusammenhang als andere Bezeichnung für die Extinktion verstanden werden.²³¹ Das Verfahren diente hier zur Erfolgs- und Verlaufskontrolle der Induktionskultur.

Die zu untersuchende Lösung wird möglichst ohne Bildung von Luftblasen in eine Kunststoffküvette pipettiert und in das Spectrometer eingebracht. Um die Berechnung der Stoffkonzentration zu ermöglichen, müssen Wellenlänge und Schichtdicke festgelegt und eine Nullmessung (Blank) mit dem entsprechenden Medium durchgeführt werden.²³¹

In diesem Fall entsprach dies dem für die Induktionskultur verwendeten LB-Medium. Die Messung erfolgte in Kunststoffküvetten mit einer Schichtdicke von 10mm (1ml Fassungsvermögen), bei einer Wellenlänge von 600nm (OD600). Als Zielwert wurde eine OD600 von 0,6 festgelegt. Bei Erreichen dieses Wertes kann von einem ausreichenden Bakterienwachstum ausgegangen werden.

Fab-Aufreinigung

Die isolierten Bakterienpellets wurden mit PBS (pH 8,0) und einer Proteaseinhibitor-Cocktail-Tablette (Roche) lysiert und reagierten bei 4°C für 30 Minuten auf dem Rolltisch, um die exprimierten Fabs von der Bakterienoberfläche zu lösen.

Nach 30 Minuten Reaktionszeit wurde die Suspension mit 13.000U/min unter Beibehaltung einer Temperatur von 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Dadurch kommt es zur Ablagerung von Bakterienresten und großmolekularen Verunreinigungen am Gefäßboden. Der entstandene Überstand mit den gelösten Fabs wurde vorsichtig in ein neues Gefäß pipettiert und 50 µl Talonharz hinzugegeben. Bei Talon handelt es sich um ein Reagenz zur Durchführung einer Immobilisierten Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC). Hinter der IMAC verbirgt sich ein Verfahren zur Aufreinigung von Proteinen, die einen Poly-Histidin-Überhang besitzen. Unter Verwendung eines Stoffes, der hoch-spezifisch an diese Histidin-Überhänge bindet und so einen Komplex mit den zu reinigenden Proteinen bildet, können diese gezielt gebunden und aus der Ursprungslösung herausgefiltert werden. Die Komplexbildner können entweder bereits auf der Filtersäule gebunden sein oder, wie in diesem Fall, in Form einer Lösung vorliegen, die der Probe zugefügt und im Anschluss auf eine Filtersäule gegeben wird. Nach Zugabe der Talon-Lösung ruhte die Probe bei 4°C für 20 Minuten auf dem Rolltisch, um die Komplexbildung zu ermöglichen. Danach wurde die Probe auf eine Filtersäule überführt und bei 13.000U/min für eine Minute unter Beibehaltung einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Um Proteine zu eliminieren, die unspezifisch einen Komplex mit Talon eingegangen und nur schwach gebunden waren, wurden drei Waschschriffe mit je 1 ml PBS (pH8,0) durchgeführt und nach jeder Zugabe für eine Minute bei 13.000U/min zentrifugiert.

Nach dem letzten Schritt wurden die verbleibenden gebundenen Proteine in 200µl PBS (pH8,0) unter Zugabe von 150mM Imidazol eluiert. Diese Kombination wurde für 5 Minuten geschwenkt, um die Proteine von der Säulenmembran zu lösen.

Über Nacht wurde ein Teil der Lösung in Dialyseschläuchen mit 10kDa Ausschluss-Volumen gegen PBS dialysiert. Es folgte eine Proteinmessung im Photometer bei OD 260/280 (GeneQuant Pro, Amersham Bioscience).

Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE stellt ebenfalls ein Verfahren zur Sortierung von Proteinen anhand ihrer molekularen Masse dar und wurde erstmals von Laemmli 1970 beschrieben.²³² Zur Auftrennung entlang eines elektrischen Gradienten werden die entsprechenden Proben mit Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate, SDS) versetzt und durch Erhitzen denaturiert. Bei SDS handelt es sich um ein negativ geladenes Detergens. Dieses lagert sich durch die Entfaltung der Proteine im Rahmen der Hitze-Denaturierung an deren Oberfläche an und interferiert mit deren Eigenladung. Hierdurch erhalten die Proteine eine linear ausgerichtete, negativ geladene Struktur, die durch Abstoßung der gleichgeladenen SDS-Moleküle untereinander stabilisiert wird. Nach Erzeugung eines elektrischen

Feldes durch Anschluss eines Gleichstroms, wandern die Proteine wie bei der Agarose-Elektrophorese entlang der Spannung in Richtung des positiven Pols. Auch hier können kürzere/leichtere Peptidketten in derselben Zeit eine größere Distanz überwinden als längere Ketten. Neben der Hinzugabe von SDS besteht ein weiterer entscheidender Unterschied zur Agarose-Gelelektrophorese darin, dass bei der SDS-PAGE zwei verschiedene Gele zum Einsatz kommen, die miteinander kombiniert werden. Unterhalb des Sammelgels, in dessen Taschen die Proben pipettiert werden, befindet sich ein Trenngel. Dieses ist im Vergleich zum Sammelgel, das primär der horizontalen Anordnung der Proben dient, durch seinen höheren Anteil an Polyacrylamid feinporiger und besitzt einen alkalischeren pH-Wert, um eine möglichst präzise Größendifferenzierung zu ermöglichen. Die nahtlose Aneinanderreihung der beiden Gele wird durch zeitversetztes Herstellen in derselben Form erreicht. Als Form dienten zwei Glasplatten mit einem Abstandshalter, der eine Dicke von 0,75mm besitzt.

Für die Versuche wurde zunächst ein 10%iges Polyacrylamid-Trenngel gegossen. Nach vollständiger Polymerisation des Gels (ca. 30 – 40 Minuten) wurde darauf das Sammelgel gegossen und an dessen Ende ein Probenkamm zur Ausbildung der benötigten Probenaschen eingelegt. Der Kamm wurde nach Aushärten des Gels vorsichtig entfernt. Hierbei ist darauf zu achten, die entstandenen Aussparungen nicht zu beschädigen, um ein Austreten der einzubringenden Flüssigkeiten aus dem Gel zu verhindern.

Das fertige Gel wurde im eingespannten Zustand mitsamt den formgebenden Glasplatten in die Elektrophoresekammer eingelassen und diese mit Puffer gefüllt. Bei der SDS-PAGE kommt der sog. Laemmli-Puffer, ein Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Glycin-SDS-Gemisch, zum Einsatz. Nun wurden die aufzutrennenden Proben mit dem SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt (1:5) und in die Geltaschen pipettiert. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde zusätzlich ein Größenmarker in eine der Taschen eingebracht. Hier kam der PageRuler™ Prestained Protein Ladder von Thermo Fisher Scientific zur Anwendung, der aus Proteinen von 10 bis 180kDa besteht. Im Anschluss wurde, dem Prinzip der Agarose-Gel-Elektrophorese entsprechend, eine Spannung an die Elektrophoresekammer angelegt, in diesem Fall 200V und für 30 – 40 Minuten belassen. Um im Anschluss die Proteine im Gel sichtbar zu machen, wurde dieses nach Coomassie gefärbt. Alternativ kann geblottet werden.

Die SDS-PAGE wurde unter anderem mit dem nicht-dialysierten Teil der Fab-Proben durchgeführt, um zu überprüfen, ob der IMAC-Reinigungsvorgang erfolgreich war und Proteine der erwarteten Größe vorlagen, sowie mit Lysaten der Burkitt-Lymphom Zelllinien, um in einem anschließenden Western Blot auf das Vorkommen der sekundär modifizierten Antigene zu testen.

Coomassie-Färbung

Coomassie™-Brilliantblau ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der seinen Ursprung in der Textilindustrie hat. Zur Färbung von Proteinen in Elektrophorese-Gelen wurde er erstmals 1963 von Fazekas de

St. Groth et. al. beschrieben²³³ und 1965 von Meyer und Lambert auf Proteine in einem Polyacrylamid-Gel angewendet.²³⁴ Heutzutage nutzt man den Farbstoff regelhaft zur schnellen Darstellung von Proteinen in Elektrophorese-Gelen, da er sich an basische Aminosäureketten anlagert. Das zu färbende Gel wird aus der Glasform gelöst und für min. 30 Minuten vollständig in die Färberlösung eingelegt. Um die Proteinbanden gegenüber dem Hintergrund abgrenzen zu können, muss dieser im Anschluss entfärbt werden. Dies wird durch zwei Durchgänge einer ca. 60-minütigen Inkubation in Entfärberlösung erreicht.

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mit den dialysierten Fabs wurde ein ELISA auf Nunc MaxiSorp™ 96 wells Platten von Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Der ELISA ist eine lang bewährte Möglichkeit zur Überprüfung und Veranschaulichung von Antikörper-Antigen-Interaktionen, deren Entwicklung bereits in den 1970er Jahren maßgeblich durch die Arbeit von Engvall und Perlmann getragen wurde.²³⁵

Um die Interaktionen und Bindungen von Antigenen und Antikörpern sichtbar und messbar zu machen, verwendet man ein bereits bekanntes Antigen in einer Standardlösung und vergleicht dessen Reaktion mit der einer unbekannt Probe.²³⁶ Hierzu nutzt man eine Enzym-vermittelte Farbreaktion, die quantitativ messbar ist und somit Rückschlüsse auf das Bindungsverhalten der verwendeten Substrate zulässt. Abhängig von der zu untersuchenden Reaktion und der Fragestellung lassen sich verschiedene ELISA-Typen unterscheiden, die in ihrer Komplexität und Sensitivität unterschiedlich bewertet werden können.²³⁵

In dieser Arbeit kam der sogenannte indirekte ELISA (SANDWICH-ELISA) zur Anwendung. Dabei wird das festgelegte Antigen auf der Platte immobilisiert und die auf Bindung zu untersuchenden Antikörper dazugegeben. Zum Nachweis einer möglichen Bindung setzt man einen zweiten Antikörper ein, der an den ersten Antikörper bindet. Dieser zweite Antikörper ist mit einem Farbstoff konjugiert. Dieser Farbstoff wird durch das anschließend zugegebene Enzym aktiviert und lässt sich am Ende in einem Mikroplatten-Leser messen. In diesem Fall wurde das Prinzip abgewandelt, in dem ein biotinlierter Sekundär-Antikörper eingesetzt wurde. Die verwendete Peroxidase Streptavidin bindet hochspezifisch an Biotin und setzt so im Anschluss dort den verwendeten OPD-Entwickler um, wodurch die Farbreaktion zustande kommt.

Bei den Antigenen, die in dieser Arbeit auf Bindung überprüft wurden, handelte es sich um an Stelle 1 SUMOyliertes Bystin (Bystin-Sumo1) und an C7 acetyliertes HSP40 (HSP40C7-acetyl.). Als Positivkontrollen dienten die natürlichen Fabs der Zelllinien CA46 (für Bystin-Sumo1) und BL41 (HSP40C7-acetyl.), für die eine Bindung bereits beschrieben wurde.²³⁷ Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung vorgenommen, um eine höhere Verlässlichkeit der Ergebnisse zu erreichen. Der ELISA wurde nach dem folgenden Protokoll vorgenommen, die Mengenangaben verstehen sich als Zugabe pro Well in den ELISA-Platten:

Zu Beginn wurden die Platten über Nacht bei 4°C mit 50 µl eines Anti-FLAG-Antikörpers aus der Maus (M2) in einem Verhältnis von 1:2500 gecoatet. Dies gewährleistet eine bessere Bindung der C-terminal FLAG-getaggten Antigene. Am folgenden Tag wurden die Platten mit dem Waschpuffer TBS/0,1% Tx100 gründlich gewaschen, um überschüssiges Protein zu entfernen. Geblockt wurden die Platten mit 1,5%iger Gelatine unter Verwendung von 100µl über eine Stunde bei Raumtemperatur. Dem Blocken folgte erneut ein Waschschrift. Im Anschluss wurden 50µl der Antigene HSP40C7-acetyl. und Bystin-Sumo1 in einer Konzentration von 10µg/ml auf die Platte gegeben und diese für eine Stunde bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 50µl der rekombinanten Fabs im Verhältnis 1:10 \pm 20µg/ml dazugegeben. Die Verdünnung erfolgte in dem Waschpuffer TBS/0,1% Tx100. Nach Zugabe der Fabs wurden die Platten erneut mit TBS gewaschen und 50µl eines biotinierten Anti-human-Antikörpers aus der Ziege im Verhältnis 1:2500 dazugegeben. Um die Bindung des Antikörpers an den zu detektierenden Antikörper zu gewährleisten, ruhten die Platten erneut für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem Durchführen eines Waschvorganges wurden 50µl Streptavidin im Verhältnis 1:50.000 auf die Platten gegeben. Nach 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Platten erneut gewaschen und im Anschluss 100µl OPD-Entwickler dazugegeben. Die schnelle Reaktion zwischen Peroxidase und OPD wurde durch anschließende Zugabe von 25µl 3M Salzsäure (HCL) zum Erliegen gebracht. Die Messung des Farbumschlages erfolgte initial mit einem Wallac Victor² 1420 Multilable Counter L (Seriennr. 4200775) von PerkinElmer bei 490nm. Das Gerät wurde im weiteren Verlauf gewechselt.

Western Blot

Der Begriff "Blotting" beschreibt das Übertragen von Fragmenten wie DNA (Southern Blot), RNA (Northern Blot), oder Proteinen (Western Blot), auf eine Trägermembran. Das erste entwickelte Blotting-Verfahren geht auf Edwin Southern zurück, der es 1975 einsetzte, um DNA-Fragmente in einem Elektrophorese-Gel nachzuweisen.²³⁸ Im Laufe der Zeit wurden aus dieser Technik weitere Vorgehensweisen entwickelt, um auch RNA-Fragmente und Proteine übertragen und nachweisen zu können. Beim Western Blot werden Proteine übertragen, bei denen es sich in diesem Ansatz um Lysate von Zelllinien nach Auftrennung mittels SDS-PAGE handelte. Als Trägermembran diente eine PVDF(Polyvinylidenfluorid)-Membran (Immobilon-P Transfer Membranes). Die Überführung der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgt wieder entlang eines elektrischen Feldes. Die durch SDS negativ geladenen Proteine wandern dem senkrecht angelegten Feld folgend zum Pluspol und gelangen so auf die Membran. Bevor die PVDF-Membran genutzt werden kann, muss sie aktiviert werden. Hierfür wird sie für 5 – 10 Minuten in Methanol gelegt, um die Hydrophobie der Membran zu reduzieren. Anschließend wird sie in den Transferpuffer getränkt und auf das Gel gelegt. Auf die Unterseite des Gels (Katodenseite), sowie oben auf die Trägermembran (Anodenseite) wird jeweils ein Filterpapier gelegt, das zuvor ebenfalls in Transferpuffer eingeweicht wurde. Dieser Aufbau befindet sich in einer Blotting-Apparatur, in unserem Labor handelte es sich dabei um ein Gerät der

Firma Bio-Rad (Transfer-Blot SD, semi-dry transfer cell). Der Blotting-Vorgang im Gerät erfolgte bei 23 V und 450 mA und dauert in etwa 30 – 40 Minuten.

Nachdem die Proteine auf die Membran übertragen wurden, wird diese geblockt, um in nachfolgenden Versuchen unspezifische Reaktionen an freien Bindungsstellen der Membran zu minimieren. Hierfür wurde ein Gemisch aus TBS/Tx100 und 10% fettfreiem Trockenmilchpulver verwendet, dem die Membran über Nacht bei einer Temperatur von 4°C ausgesetzt wurde. Das semi-dry Verfahren bietet den Vorteil, dass es einfacher anzuwenden und weniger zeitaufwändig ist als ein klassischer wet transfer. Seine Limitation liegt beim Transfer von Proteinen >300kDa, da in dieser Größenordnung seine Effizienz gegenüber dem wet transfer nachlässt.

Ein großer Vorteil des Western Blots gegenüber dem ELISA liegt darin, dass durch die vorhergehende Auftrennung der Proben die Anwesenheit und Bindung verschiedener Proteine durch entsprechende Auswahl der eingesetzten Antikörper überprüft werden kann. Im Anschluss kann der Antikörper von der Membran gestrippt und ein weiterer Durchlauf mit einer neuen Fragestellung auf derselben Membran vorgenommen werden.

Darstellung Membran-gebundener Proteine durch Immunfärbung

Um die Proteine, welche auf der Membran gebunden sind, darzustellen, müssen diese farbig markiert werden. Dies erfolgte mittels sog. Immunfärbung. Bei diesem Prinzip kommen mehrere Antikörper zum Einsatz. Zunächst wird ein primärer Antikörper verwendet, der in der Lage ist, eine Bindung an die darzustellenden Proteine zu schaffen. Verwendet wurde hierfür ein rekombinanter SUMO1-BYSL-Fab und ein Fab gegen acetyliertes HSP40 (HSP40acetyl.), die jeweils mit einem His₆-Tag ausgestattet waren. In Abbildung 36 wurden keine PTM-spezifischen Fabs verwendet.

Der His-Tag bezeichnet eine Abfolge von mehreren Histidinen, in der Regel zwischen 6 und 9, der sich in der Proteinbiochemie für verschiedene Zwecke wie Proteinaufreinigung, -isolation, oder -markierung zu Nutze gemacht wird. Hier bot er die Möglichkeit, durch einen zweiten, sekundären Antikörper, der sich gegen den His-Tag richtet, jene Proteine sichtbar zu markieren, an die der His-getaggte SUMO1-BYSL- oder HSP40acet.-Fab gebunden hatte.

Die mit His-Tag versehenen Fabs wurden in einer Konzentration von 2µg/ml (ca. 5-10ml) für eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Membran inkubiert und anschließend zur Eliminierung unspezifischer und nicht-gebundener Antikörper mehrere Waschschrte mit TBS/Triton X durchgeführt. Danach folgte eine erneute einstündige Inkubation der Membran mit 5-10ml sekundärem Antikörper in 1:2000 Verdünnung. Hierfür stand in dieser Arbeit der murine anti-His-Antikörper von Qiagen zur Verfügung. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Membran erneut mehrfach mit Triton X gewaschen. Zur Darstellung einer möglichen Bindung mittels Chemilumineszenz wurde die Membran nun mit einem tertiären anti-Maus-Antikörper (5-10ml, 1:3000, BIORAD) inkubiert, der mit einer Peroxidase konjugiert ist (HRP-labeled). Nach erneutem Waschen wurde Entwicklersubstanz ECL (Signal Fire™ New England Biolab) auf die Membran

gegeben und diese in einer Klarsichtfolie deponiert. Die Folie wurde mitsamt der einliegenden Membran in einer Dunkelkammer für 5-10 Minuten unter einen kompatiblen Film (Hyperfilm™ ECL™, Merck) gelegt, der durch die Reaktion zwischen Peroxidase und Entwicklerlösung die Bindungsposition der Antikörper auf dem Film darstellt. Um die Schwärzung des Films zu demaskieren, wurde dieser nach 5-10 Min. in 1:5 verdünnte Entwicklerlösung (Adefo Mix Sa Entwickler, Adefo-Chemie GmbH) gelegt und dort für weitere 5 Minuten belassen. Nach Abwaschen der Entwicklerlösung mit Wasser wurde der Film zur Fixierung für 5 Minuten in eine Fixierlösung (Adefo Mix Sa Fixierer, Adefo-Chemie GmbH), ebenfalls Verdünnung 1:5, gelegt. Nach erneutem Abwaschen mit Wasser konnte der Film getrocknet und beurteilt werden.

BZR-Screening auf Autoantigene und Antigene infektiösen Ursprungs mittels Protein-Makroarray

Proteinarrays sind heutzutage Standard in der Analyse multipler Testsubstanzen. Makroarrays ermöglichen ein Screening auf bis zu 10.000 Substrate gleichzeitig. Diese sind auf einem Trägermaterial, meist einer Membran, maschinell tropfenförmig aufgetragen und immobilisiert. Auf die Membran kann das zu screenende Untersuchungsmaterial aufgetragen werden, verwendbar sind etwa Isolate von Nukleinsäuren oder Proteinen, Plasma, Liquor oder Körperflüssigkeiten. Im Anschluss findet in der Regel eine Markierung des Untersuchungsmaterials, z.B. mittels sekundärer Antikörper oder einer fluoreszierenden Substanz statt, um ein Auslesen des Arrays zu ermöglichen und mögliche Bindungen sichtbar zu machen.²³⁹ Makroarrays kamen in dieser Arbeit zum Einsatz, um die rekombinanten BZR sowie mittels Papain-Verdau hergestellte natürlichen BZR aus acht Zelllinien (BL31, BL41, CA46, RAMOS, DAUDI und RAJI) auf Bindung an Antigene infektiösen Ursprungs und Autoantigene zu screenen.²⁴⁰ Dazu wurden Protein-Makroarrays mit Klonen der cDNA-Expressionsbibliotheken UniPEX 1 und 2 (Bioscience, Dublin, Irland) verwendet und die Membranen zunächst über Nacht bei 4°C in einer Mischung aus 10% (w/v) fettfreiem Trockenmilchpulver in TBST (TBS, 0,1% (v/v) Tween20) geblockt. Nach zwei Wasch-Durchläufen mit TBST wurde die Membran mit den BZR jeweils in einer Konzentration von 10Ug/ml für eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgten drei weitere Waschschrte mit TBST, um unspezifische oder niedrig-affine Bindungen zu lösen und überschüssige BZR zu entfernen. Zum Nachweis möglicher Bindungsreaktionen erfolgte nun eine 60-minütige Inkubation mit einem Sekundäntikörper 1:2500 (v/v) (biotinylierter Ziegen-Anti-Human-Fab der schweren und leichten Kette, DIANOVA, 109-065-088) und Strep-POX (1:5.000) in 2%igem Gemisch (w/v) Milch/TBST. Nach mehreren weiteren Waschschrten mit TBST wurden Signale mit einem ECL-System von Pharmacia detektiert und nach Herstellerprotokoll bei bestimmten Mustern als wahrscheinliche Treffer identifiziert.

Um die Suche nach potenziellen Ziel-Antigenen auszuweiten, erfolgte mit den rekombinanten Fabs zusätzlich ein Screening gegen verschiedene posttranslational modifizierte UniPEX1- und 2-Protein-Makroarrays, hierunter u.a. SUMO1ylierung, Ubiquitinierung, Citrullinierung und Acetylierung. Die

SUMOylierung der Protein-Makroarrays erfolgte nach einem bereits zuvor beschriebenen Prinzip²⁴¹, zur Ubiquitinierung wurden synchronisierte HeLa-Zellextrakte eingesetzt.²⁴² Um eine Acetylierung zu erreichen, wurden die Makroarrays mit 50 mM TRIS pH8, 150mM NaCl, 5% Glycerol, 0,1M Trichostatin A, 10 mM EDTA, 10 mM DTT, 20 pg rekombinantem p300 und 20 pM Coenzym A über einen Zeitraum von 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Ein Abbruch der Reaktion wurde durch mehrfache ausgiebige Waschvorgänge herbeigeführt. Um eine korrekte Acetylierung an Lys310 nachvollziehen zu können, diente GST-markiertes p65 (RelA) als Kontrolle.

Diese Methoden waren bereits im Labor etabliert und die so in-house modifizierten Membranen wurden zur Verfügung gestellt.

BZR-Screening auf Autoantigene und Antigene infektiösen Ursprungs mittels Dot-Blots

Der Dot-Blot ist dem Makroarray sowie dem Western Blot vom Prinzip her ähnlich, jedoch werden hier die gewünschten, zu untersuchenden Proben (in diesem Fall inaktivierte Pathogen-Lysate) selbstständig auf eine Trägermembran (meist Nitrocellulose oder PVDF) geladen, geblockt und somit immobilisiert, bevor auch hier eine Inkubation mit einem potenziellen Bindungspartner erfolgt. Um die BZR auch auf Reaktivität gegen Plasmodien-Antigene zur überprüfen, erfolgte ein Screening mittels Dot-Blots gegen inaktivierte *Plasmodium falciparum*-Lysate, welche vom Institut für Tropenmedizin Tübingen, Deutschland zur Verfügung gestellt wurden.

Zur Identifizierung einer potenziellen Reaktivität gegen bakterielle Antigene wurde außerdem ein Dot-Blot mit hitzeinaktivierten Lysaten von 13 verschiedenen Bakterienstämmen, u.a. *M. catarrhalis*, *M. osloensis*, *M. nonliquefaciens*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, koagulase-negative Staphylokokken, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter radioresistens* und *Neisseria spp.* Die Lysate wurde durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Homburg/Saar, Deutschland, zur Verwendung überlassen. Aufgetragen wurden diese auf eine PVDF-Membran in einer Konzentration von jeweils 10pg und anschließend in 10% (w/v) fettfreiem Trockenmilchpulver in TBST (TB5, 0.1P [v/v] Tween 20) bei 4°C über Nacht geblockt. Nach Waschen mit TBST wurden die Membranen 1h lang mit den einzelnen Fabs (10µg/ml) inkubiert und danach erneut mit TBST gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Dot-Blots zunächst mit einem biotinylierten Ziegen-Anti-Human-Fab-Antikörpern der schweren und leichten Kette (DIANOVA, 109-065-088), der in einer Verdünnung von 1:5.000 (v/v) als Sekundäntikörper diente, für 1h inkubiert, direkt im Anschluss erfolgte eine 10-minütige Inkubation mit Strep-POX (1:5.000) in 2 % (w/v) Milch/TBST. Beide Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur. Die Bindung wurde im letzten Schritt mit einem ECL-System (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland) nachgewiesen.

Um auch mögliche virale Antigene als Reaktivitätspartner zu erfassen, wurde noch ein speziell angefertigter Array mit 2206 viralen Genen, die durch die NAPPA-Technologie von 158 Viren

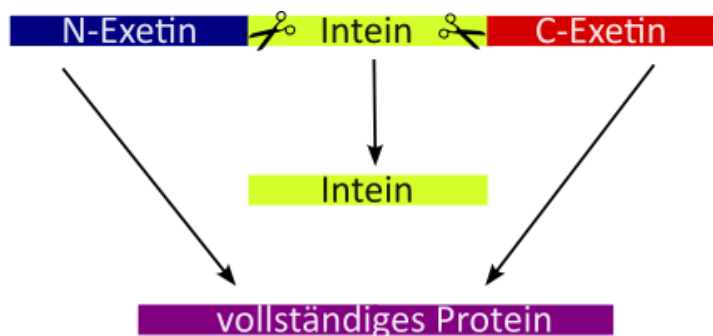
exprimiert wurden, im Virginia C. Piper Center (Arizona State University, USA) auf Reaktivitäten der BL-Fabs geprüft. Normalisierte Werte ≥ 2 wurden als Indikator für eine Positivität definiert.^{243–245}

Herstellung eines SUMO1-BYSL/ETA'-Immunotoxins

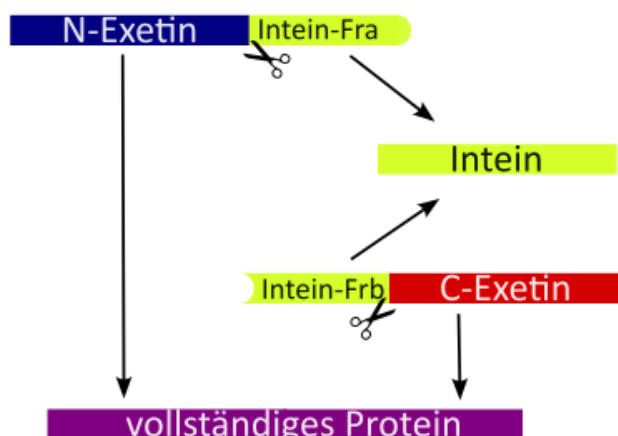
Immunotoxine bezeichnen chimäre Moleküle, die aus einem immunologisch wirksamen Protein und einem Toxin zusammengesetzt sind. Durch die zielgerichtete Bindungskomponente wird eine Reaktivität gegen Zellen mit spezifischen Strukturen (maligne Zellen) bei möglichst gleichzeitigem Erhalt der Unversehrtheit gesunder Zellen angestrebt. Als bindende Komponente können beispielsweise Antikörper oder Liganden dienen, die definierte Rezeptoren oder Oberflächenantigene erkennen.^{246–248} Als toxische Komponente werden zumeist das Diphtherie-Toxin aus *Corynebacterium diphtheriae* oder das Pseudomonas-Exotoxin-A von *Pseudomonas aeruginosa* verwendet. Beide wirken nach Aufnahme in die Zelle als Inhibitoren der Proteinsynthese, in dem sie EF-2 über Ribosylierung von ADP inaktivieren.²²⁷ Es existieren allerdings auch viele weitere Immunotoxine unter Anwendung bakterieller (u.a. Shiga-, Cholera- oder Anthrax-Toxin) oder pflanzlicher/mykotischer (z.B. Rizin, α -Sarcin, Abrin) Toxine.^{247–249} Die ersten Immunotoxine wurden in den 1970er Jahren entwickelt. Die sog. Immunotoxine der 1. Generation bestanden aus Antikörpern, die mit einem intakten Toxin konjugiert worden waren. Folglich verfügte letzteres noch über seine eigene Zellbindungsdomäne, sodass es zusätzlich zu den Zielzellen auch zum Angriff gesunder Zellen kam. In der Weiterentwicklung zur 2. Generation wurde daher die Bindungsdomäne der Toxine entfernt, um eine spezifischere Bindung über den Antikörper zu erreichen. Die hierdurch entstandenen Moleküle zeigten aufgrund ihrer großen Struktur jedoch nur eine schlechte Tumorpenetranz. Heute kommen daher Immunotoxine der 3. Generation zum Einsatz, bei denen in der Regel die Zellbindungsdomäne der Toxine direkt durch den variablen Teil eines Antikörpers oder einen Liganden ersetzt und die Größe des entstehenden Moleküls weiter reduziert werden konnte. Ein Beispiel ist das Immunotoxin Anti-TacFv-PE38. Dieses zielt mit dem monoklonalen Anti-Tac-Antikörper gegen CD25 als Zielstruktur, der mit dem Pseudomonas-Exotoxin-A gekoppelt wurde. Das Pseudomonas-Exotoxin-A besteht aus drei Hauptdomänen: Domäne I am N-terminalen Ende dient der Zellbindung. Diese wurde bei Anti-TacFv-PE38 größtenteils entfernt und durch Anti-Tac ersetzt, wodurch die geringe Größe des Immunotoxins von 38kDa ermöglicht wird. Domäne II (Translokationsdomäne zur Aufnahme in die Zelle) und Domäne III (katalytische Domäne zur Vermittlung der toxischen Wirkung) sind dagegen erhalten.²⁴⁸

Der Arbeit von Nachreiner et al. von 2008 folgend²⁵⁰, wurde in unserem Labor ein in *E.coli* rekombinant exprimiertes Immunotoxin produziert, bestehend aus BYSL und dem verkürzten Pseudomonas-Exotoxin-A (ETA') und wie bereits beschrieben SUMOyliert (s.o.). Hierdurch konnte jedoch keine toxische Wirkung in der Zelllinie CA46 induziert werden. Im nächsten Schritt wurde daher eine Intein-vermittelte Herangehensweise gewählt.²⁵¹

Bei Inteinen handelt es sich um Protein-Introns, welche über eine autokatalytische Funktion verfügen und somit in der Lage sind, sich selbstständig aus der Proteinkette herauszuschneiden. Sie verfügen über eine regulatorische Funktion, z.B. durch posttranslationales, situationsgesteuertes Spleißen von Proteinen, ohne selbst an der Funktion des Zielproteins beteiligt zu sein.^{252,253} Proteine, die Inteine enthalten, werden meist als Vorläuferpeptide exprimiert und erst posttranslational durch die Aktivierung der Inteine zum vollständigen Protein verknüpft. Inteine können auch als sog. „Homing“-Endnukleasen wirken, also Doppelstrangbrüche in zusammengehörigen Allelen homologer Chromosomen erzeugen.²⁵² Die Aktivierung von Inteinen kann spontan erfolgen oder durch verschiedene Einflüsse initiiert werden, bspw. pH-Veränderungen, Temperatur, UV-Strahlung etc.^{252,253} Ihre Codierung kann entweder in zusammenhängender Form vorliegen oder sie kommen selbst als Fragmente in Polypeptidketten vor, welche sich erst im Rahmen der katalytischen Funktion zusammenfügen.



a) zusammenhängendes Intein



b) fragmentiertes Intein

Abbildung 15: Struktur und Funktionsweise von Inteinen

Zur Herstellung des Immunotoxins auf Intein-Basis wurden die BYSL-Antigenkomponente mit N-terminalem HIS6-Tag, Fu, BYSL Xa und die nachfolgende INTN-Stelle^{EFE}-MX1N separat vom Toxinfragment, bestehend aus der INT-Stelle (MBP, MXC1) und dem Toxinanteil CEFL, ETA',

exprimiert. Nach der Expression wurde die BYSL-Antigenstruktur wie oben erläutert SUMOyliert, in dem sie für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit SUMO-Extrakt und Aktivierungspuffer inkubiert wurde. Zur Konjugation der Wirk- und Bindungskomponente zum vollständigen Immunotoxin wurden beide Strukturen anschließend miteinander bei Raumtemperatur inkubiert.²⁴⁰

MTT-Assay

Der MTT-Assay dient der Bestimmung der Zellviabilität oder zytotoxischen Wirkung von Stoffen. MTT oder 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid ist ein Tetrazoliumsalz, das wahrscheinlich aufgrund seiner positiven Ladung und Lipophilie in das Zellinnere eintreten kann. In metabolisch aktiven, lebenden Zellen wird es durch mitochondriale Dehydrogenasen und andere Moleküle, wie NAD(P)H, zu Formazan reduziert. Formazan hat eine bläulich-violette Farbe und absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 550-600nm. Daher kann die Menge an Formazan in einer Probe photometrisch gemessen werden und erlaubt Rückschlüsse auf die Zellzahl. Diese ist dabei direkt proportional zur Menge an entstandenem Formazan. Die Nutzung dieser Eigenschaften zur Bestimmung der Zellviabilität geht auf Mosmann im Jahr 1983 zurück und wurde über die Zeit vielfach weiterentwickelt und optimiert.²⁵⁴⁻²⁵⁶ Im Umkehrschluss kann die Methode auch zur Erfassung der zytotoxischen Wirkung einer Substanz verwendet werden. Nach der Apoptose kommt es innerhalb kürzester Zeit zur Inaktivierung der Mitochondrien in der betroffenen Zelle. Da die Reduktion von MTT zu Formazan von der mitochondrialen Aktivität abhängig ist, kann der Prozess in diesen Zellen nicht länger ablaufen, in der Folge entsteht in der Probe weniger Formazan.

Für die hier durchgeführten Versuche wurde das EZ4U Cell Proliferation Assay Kit, BI-5000 von Biomedica nach Herstellerprotokoll verwendet, um die Zelllinien BL41 und CA46 nach Hinzugabe des jeweiligen BZR-Antigens auf Proliferation oder Zytotoxizität durch ein SUMO-1-BYSL/ETA'-Immunkonjugat (Pseudomonas Exotoxin A) zu überprüfen. Für diese Fragestellung wurden 4×10^4 /ml Zellen von BL 41 oder CA46 in 200µl Zellkultur-Medium gegeben und Bystin, SUMOyliertes Bystin, HSP40, acetyliertes HSP40 oder die Immunkonjugate hinzugegeben. Nach 24-stündiger Inkubation bei einer Temperatur von 37°C im Brutraum wurden die Proben auf eine Well-Platte pipettiert und mit 20µl MTT versetzt. Direkt im Anschluss wurde die Optische Dichte bei 450nm in einem Wallac Victor Lesegerät gemessen.

Ergebnisse

V-Gen- und spezifische PCR

Wie bereits im Abschnitt „Methoden“ erläutert, wurde zunächst die DNA aus den vorliegenden Zellen mittels QIAamp DNA Blood Mini Kit (250), Cat.No.: 51106 (QIAGEN, Hilden) nach Hersteller-Proktoll isoliert. Nach Durchführung der Ig-V-Gen-Multiplex-PCR und der nachfolgenden spezifischen PCR wurden in den Sequenzanalysen folgende spezifische Kombinationen von Schwer- und Leichtketten-Genen für die untersuchten Proben identifiziert:

| Case | VH/VL segment Gen | Homology (%) | D segment Gen | JH/JL segment Gen | Homology (%) | CDR 3 length (AA) | Junction |
|--------|----------------------|-----------------|------------------|----------------------|-----------------|----------------------|------------------------|
| BJAB | IGHV3-30*02 | 91 | IGHD5-24*01 | IGHJ4*02 | 85.4 | 16 | CAKEGTGDGYNHYDYW |
| | IGKV1-39*01 | 95.7 | | IGKJ1*01 | 89.5 | 11 | CQQSYSTPWTF |
| BL41 | IGHV4-34*01 | 94.4 | IGHD5-12*01 | IGHJ4*02 | 86.5 | 14 | CAKAMSGSDSLNYW |
| | IGKV2-28*01 | 99.3 | | IGKJ4*01 | 92.1 | 11 | CMQTLQTPLTF |
| CA46 | IGHV5-51*01 | 99.3 | IGHD3-22*01 | IGHJ4*02 | 79.2 | 13 | CARARFDRGGDYW |
| | IGKV3-20*01 | 99.3 | | IGKJ1*01 | 89.5 | 12 | CQQYGSSPPWTF |
| Daudi | IGHV3-74*01 | 83 | IGHD5-24*01 | IGHJ4*02 | 81.3 | 13 | CVRGNGQKCFDYW |
| | IGKV1-39*01 | 90 | | IGKJ4*01 | 89.5 | 10 | CQQNYNFSFTF |
| LAZ221 | IGHV3-23*01 | 98.6 | IGHD1-1*01 | IGHJ4*02 | 81.3 | 15 | CAKDRDWNDPSPFDYW |
| | IGKV3-15*01 | 98.2 | | IGKJ1*01 | 83.8 | 11 | CQQYNNWPKTF |
| Mutu | IGHV3-48*03 | 91.3 | IGHD3-3*01 | IGHJ4*02 | 83.3 | 18 | CARVSATSDSFLNFFDLW |
| | IGKV1-27*01 | 95 | | IGKJ4*01 | 88.9 | 11 | CQKYNSAPLTF |
| Nalm6 | IGHV1-69*12 | 100 | IGHD6-13*01 | IGHJ6*03 | 100 | 23 | CARDRRGEWPPSDYYYYYMDVW |
| | IGKV1-39*01 | 100 | | IGKJ3*01 | 74.3 | 10 | CQQSYSTPWG |
| Raji | IGHV3-21*06 | 88.2 | IGHD3-22*01 | IGHJ4*02 | 81.3 | 21 | CARQKNDFSDNNSYSNFDWF |
| | IGKV3-20*01 | 90.8 | | IGKJ2*01 | 92.3 | 12 | CQQYGSSTLFTF |
| I | IGHV1-8*01 | 93.8 | IGHD7-27*01 | IGHJ4*02 | 75 | 12 | CARAKRGVVPYW |
| | IGKV3-20*01 | 97.9 | | IGKJ1*01 | 89.5 | 11 | CQQYGTSPWTF |
| II | IGHV4-34*01 | 93.7 | IGHD2-2*01 | JGHJ6*02 | 80.7 | 15 | CAGGNSTSYGVVDVW |
| | IGKV1-17*01 | 96.1 | | IGKJ1*01 | 86.8 | 11 | CLQHNNYPWTF |
| III | IGHV3-30*02 | 97.9 | IGHD6-13*01 | IGHJ6*02 | 75.8 | 20 | CVRDPQQLVRGHQYCGLDVW |
| | IGKV3-20*01 | 98.6 | | IGKJ1*01 | 92.1 | 11 | CQQYGSSPWTF |

Abbreviations: IGV, immunoglobulin variable gene; VH/VL, immunoglobulin heavy chain variable region gene/immunoglobulin light chain variable region gene; JH/JL, immunoglobulin JH gene/immunoglobulin JL gene.

Abbildung 16: Variable Immunglobulin-Gene der einzelnen Proben

Klonierung in den TA-TOPO-Vektor

Die aufgereinigte DNA der spezifischen PCR für die Leicht- und Schwereketten-Immunglobulingene wurden unter Verwendung des TOPO™ TA Cloning™ Kit for Subcloning von Thermo Fisher Scientific jeweils einzeln in den pCR®2.1-TOPO Vektor (Thermo Fisher Scientific) kloniert und auf LB-Ampicillin- oder Kanamycin-Agarplatten kultiviert, um durch die Vermehrung der Bakterien eine stabilere DNA zu produzieren. Weiterhin enthält der TOPO-Vektor die benötigten Schnittstellen für den später folgenden Restriktionsenzym-Verdau.

Colony-PCR nach TA-TOPO-Klonierung

Nach Anzucht der Bakterien wurden pro Agarplatte 4 Bakterien-Kolonien gepickt und mit diesen eine Colony-PCR mit M13-Primern durchgeführt. Mit den PCR-Produkten wurde wieder eine Agarose-Gel-Elektrophorese mit 50bp Marker durchgeführt und unter UV-Licht dieses Mal Banden der Größe um 650bp ausgeschnitten, aufgereinigt und sequenziert. Zusätzlich wurden Kolonien, für die PCR-Produkte der gewünschten Größe in der Elektrophorese identifiziert werden konnten, in Overnight-Kultur gebracht, um diese gezielt zu vermehren.

Bestätigte sich in der Sequenzauswertung das Vorliegen der jeweiligen Schwer- oder Leichtketten-DNA innerhalb des Vektors, wurde die DNA aus den Bakterien der Overnight-Kultur isoliert und mit dieser ein Restriktionsenzym-Verdau durchgeführt.

Restriktionsenzym-Verdau und Ligation in pCES-Vektor

Der Restriktionsenzym-Verdau wurde zunächst mit der Schwereketten-DNA durchgeführt. Hierzu wurden die Restriktionsenzyme verwendet, die an den Schnittstellen NcoI/BstEII schneiden. Um den Erfolg der Reaktion zu überprüfen, wurde mit der Probe wieder eine Agarose-Gel-Elektrophorese durchgeführt, dieses Mal in einem 1%igen Gel und mit dem 1kb Marker von ThermoFisher Scientific.

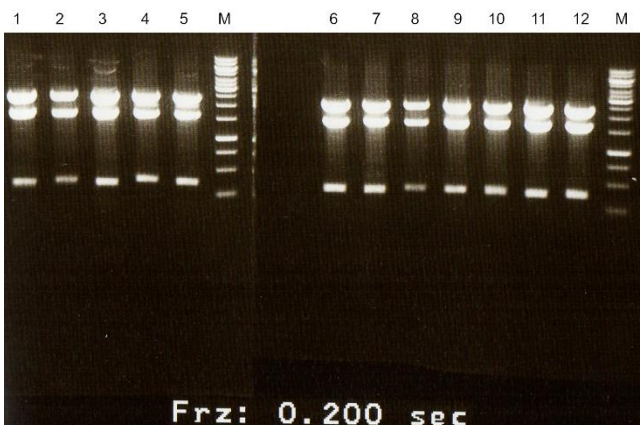


Abbildung 17: Ausschluss interner NcoI/BstEII-Schnittstellen: 1: 1B2 VH4; 2: 1C1 VH3; 3: CA46 VH5; 4: Nalm6 VH1; 5: BL41 VH3; M: 1kbp Marker; 6: BL41 VH4; 7: Daudi VH3; 8: Raji VH1; 9: Mutu1 VH3; 10: LAZ221 VH3; 11: 1A2 VH1; 12: BJAB VH3

Die gesuchte DNA-Kette findet sich zwischen 1500 – 2000bp, in Abbildung 15 entspricht dies der unteren Bande im Bereich der Doppelbanden. Diese wurden aus dem Gel getrennt und die DNA aufgereinigt, sodass im nächsten Schritt die Ligation in den pCES-Vektor und die gemeinsame Transformation in produktionsfähige TG1-Bakterien erfolgen konnte, die über Nacht im Brutraum auf Agarplatten angezüchtet wurden. Am Folgetag wurde zur Evaluation des Transformationserfolges eine Colony-PCR mit sich anschließender Agarose-Gel-Elektrophorese für jede Probe angefertigt (s. Abb. 18 - 22):

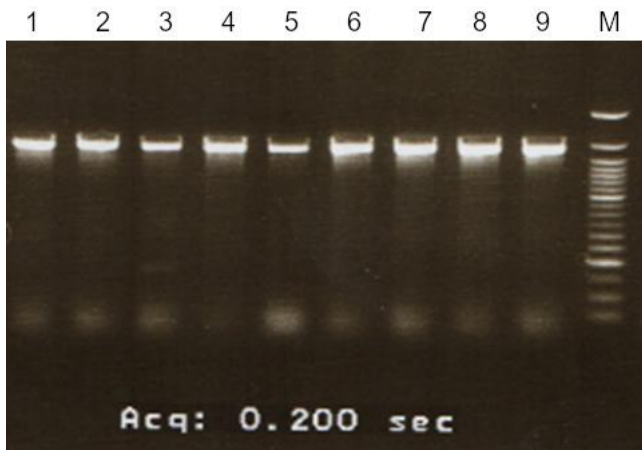


Abbildung 18: Colony-PCR nach Ligation in pCES-v-kappa; 1: Daudi VH3; 2 – 5: LAZ221 VH3; 6 – 9: Mutu1 VH3; M: 1kbp Marker

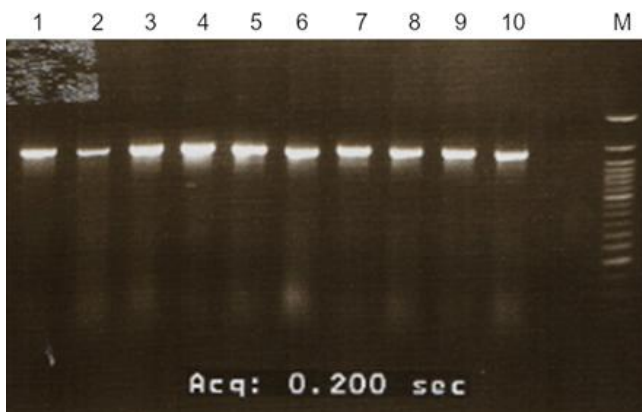


Abbildung 19: Colony-PCR nach Ligation in pCES-v-kappa; 1 – 2: 1A2 VH1; 3 – 6: 1B2 VH4; 7 – 10: 1C1 VH3; M: 1kbp Marker

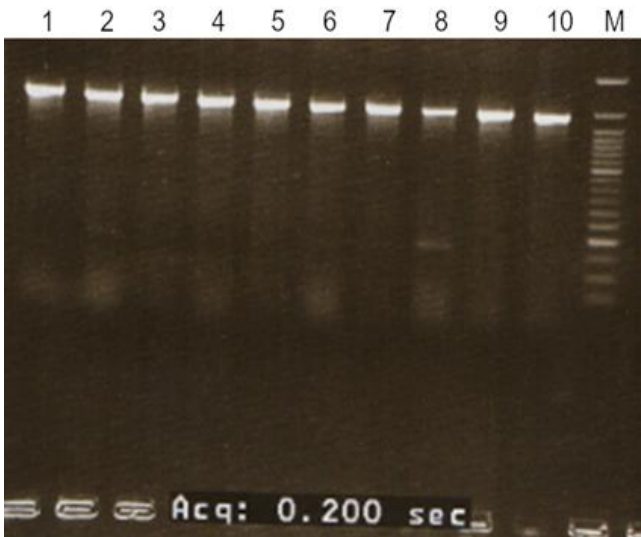


Abbildung 20: Colony-PCR nach Ligation in pCES-v-kappa; 1 – 4: B220 VH3; 5 – 8: B220 VH3; 9 – 10: B220 VH4; M: 1kbp Marker

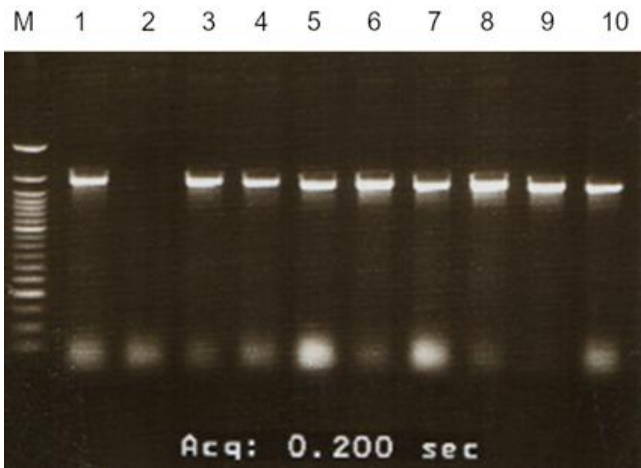


Abbildung 21: Colony-PCR nach Ligation in pCES-v-kappa; M: 1kbp Marker; 1 – 4: Nalm6 VH1; 5 – 8: Raji VH1; 9 – 10: 1A2 VH1

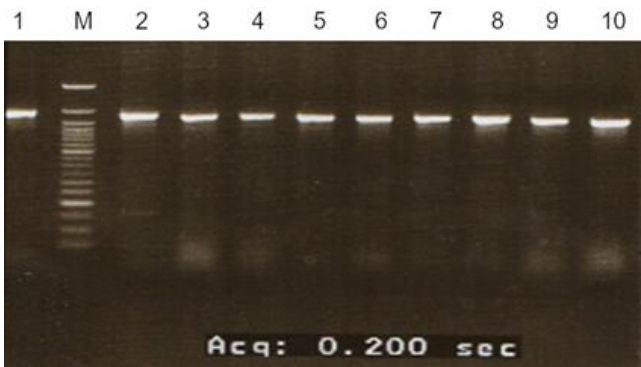


Abbildung 22: Colony-PCR nach Ligation in pCES-v-kappa; 1 – 3: B220 VH4; 4 – 7: CA46 VH5; 8 – 10: Daudi VH3; M: 1kbp Marker

Zeigten sich, wie in den Abbildungen anhand der zur Darstellung kommenden Banden zu sehen, die angeimpften Bakterienkolonien positiv für das gesuchte Insert, wurden diese über Nacht rekultiviert und am nächsten Tag die DNA in Form von SpinMinis isoliert und zur Sequenzanalyse verschickt. Konnte in der Sequenzanalyse das Vorliegen der Schwerkettensequenz innerhalb des Vektors nachgewiesen werden, erfolgte ein Restriktionsenzymverdau der Schwerketten-DNA im pCES-Vektor und der Leichtketten-DNA aus der TOPO-Klonierung mit den Restriktionsenzymen für die Schnittstellen ApaLI/XhoI. Der Erfolg wurde mit Hilfe einer Gel-Elektrophorese überprüft (Abb. 23 - 25):

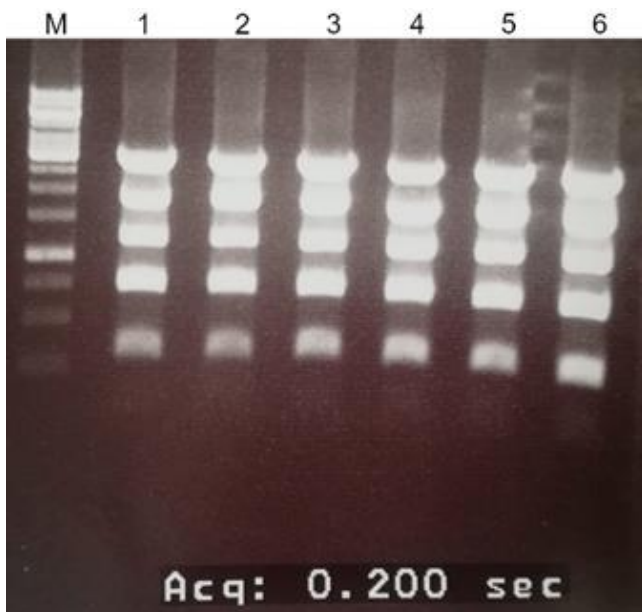


Abbildung 23: Ausschluss von ApaLI/XhoI-Schnittstellen: M: 1kbp Marker; 1: Mutu1 VK1; 2: Nalm6 VK1; 3: Raji VK3; 4: 1A2 VK3; 5: 1B2 VK1; 6: 1C1: VK3; 6 VK1; 3: Raji VK3; 4: 1A2 VK3; 5: 1B2 VK1; 6: 1C1: VK3

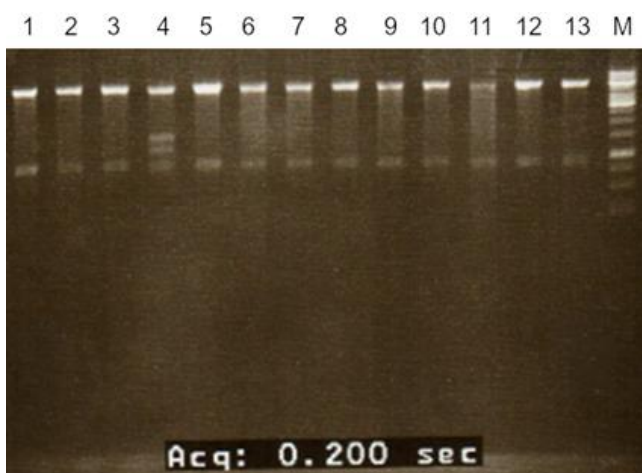


Abbildung 24: Ausschluss von ApaLI/XhoI-Schnittstellen: 1: BJAB VH3 pCES; 2: BL41 VH3 pCES; 3: BL41 VH4 pCES; 4: CA46 VH5 pCES; 5 – 6: Daudi VH3 pCES; 7: LAZ221 VH3 pCES; 8: Mutu1 VH3 pCES; 9: Nalm6 VH1 pCES; 10: Raji VH1 pCES; 11: 1A2 VH1 pCES; 12: 1B2 VH4 pCES; 13: 1C1 VH3 pCES; M: 1kbp Marker

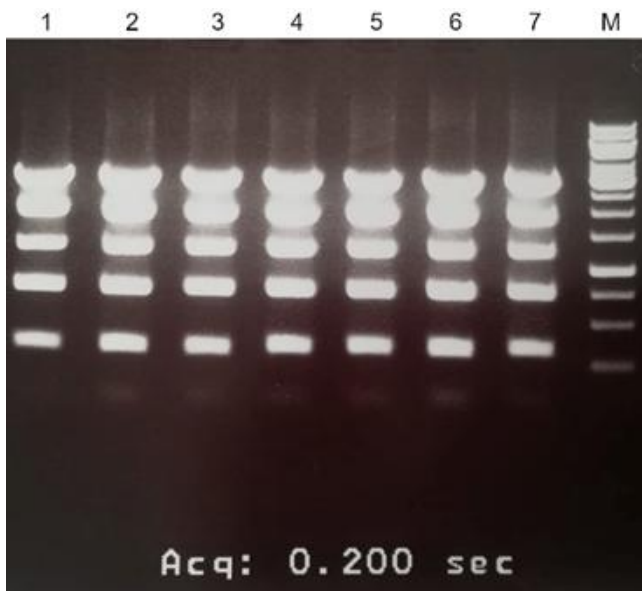


Abbildung 25: Ausschluss von *Apa*LI/*Xho*I-Schnittstellen: 1: BJAB VK1; 2: BL41 VK3; 3: BL41 VK4; 4: BL41 VK2, 5: CA46 VK3; 6: Daudi VK1; 7: LAZ221 VK3; M: 1kbp Marker

Auch hier wurden die benötigten Banden aus dem Gel isoliert und die DNA zur weiteren Nutzung aufgereinigt. Die zusammengehörigen Paare aus Leichtketten-DNA und Schwerketten-positiven Vektoren wurden gemeinsam in den pCES-Vektor ligiert und zur Vervielfältigung in TG1-Bakterien transformiert. Der Ligations- und Klonierungserfolg wurde nach Kultivierung über Nacht in einer Colony-PCR und Gel-Elektrophorese evaluiert. Die Banden auf der Höhe von ≈ 3000 bp wurden ausgeschnitten, aufgereinigt und sequenziert. Bestätigte die Auswertung der Sequenzen das Vorhandensein des Kettenpaares im Vektor, wurde für die entsprechenden Klone eine Overnight-Kultur angelegt. 40 μ l dieser Overnight-Kultur wurden für die Induktionskultur verwendet.

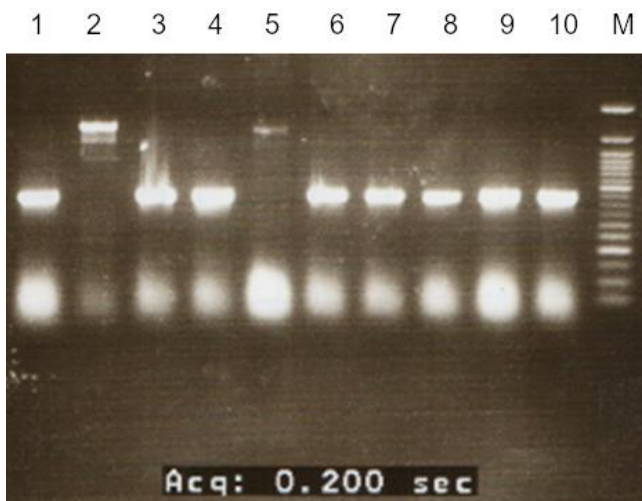


Abbildung 26: Colony-PCR nach Ligation v. Schwer- und Leichtketten-DNA im pCES-Vektor: 1 – 4: BJAB VH3/VK1; 5 – 8: BL41 VH3/VK3; 9 – 10: BL41 VH3/VK4; M: 1 kbp Marker

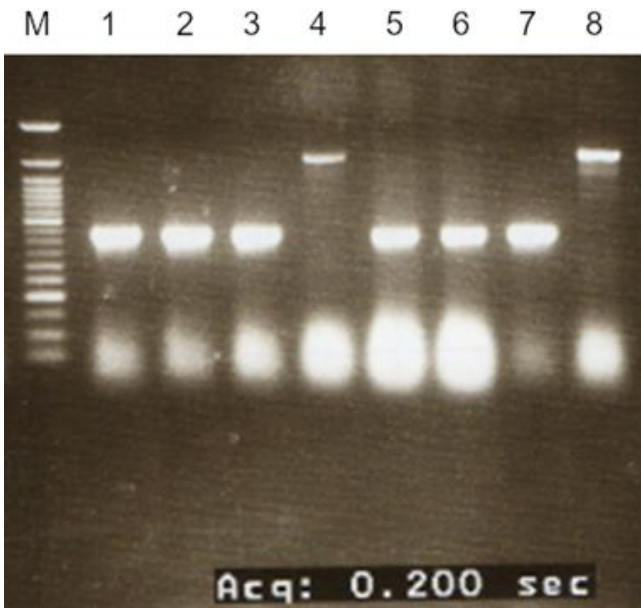


Abbildung 27: Colony-PCR nach Ligation v. Schwer- und Leichtketten-DNA im pCES-Vektor: 1 – 2: BL41 VH3/VK4; 3 – 6: BL41 VH4/VK3; 7 – 8: CA46 VH5/VK3; M: Marker

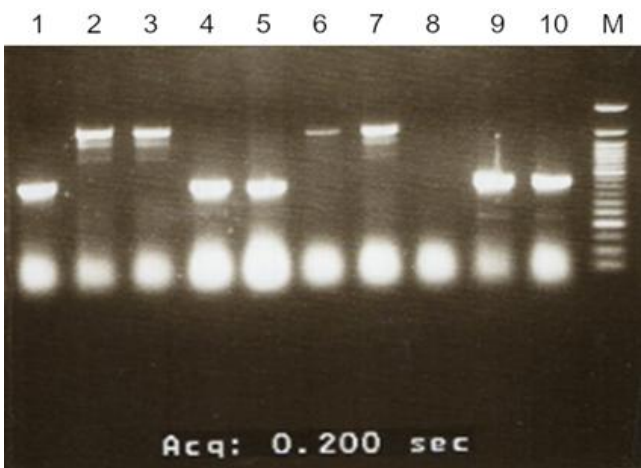


Abbildung 28: Colony-PCR nach Ligation v. Schwer- und Leichtketten-DNA im pCES-Vektor: 1 – 2: CA46 VH5/VK3; 3 – 6: Daudi VH3/VK1; 7 – 10: LAZ221 VH3/VK3; M: 1kb Marker

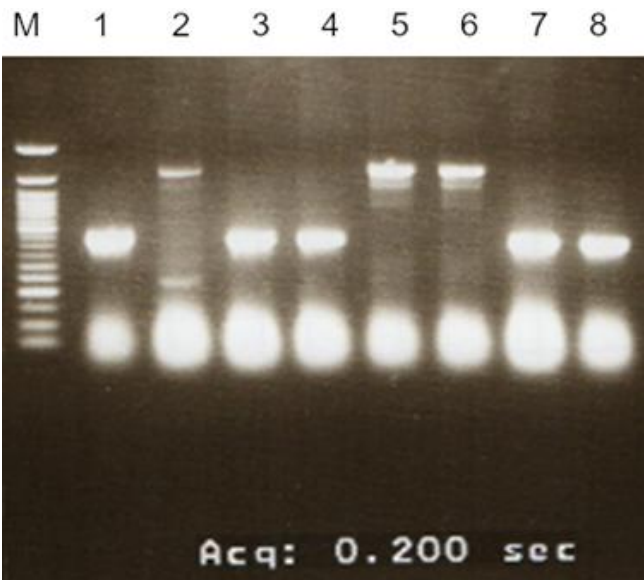


Abbildung 29: Colony-PCR nach Ligation v. Schwer- und Leichtketten-DNA im pCES-Vektor: 1 – 4: Mutu1 VH3/VK1; 5 – 8: Nalm6 VH1/VK1; M: Marker

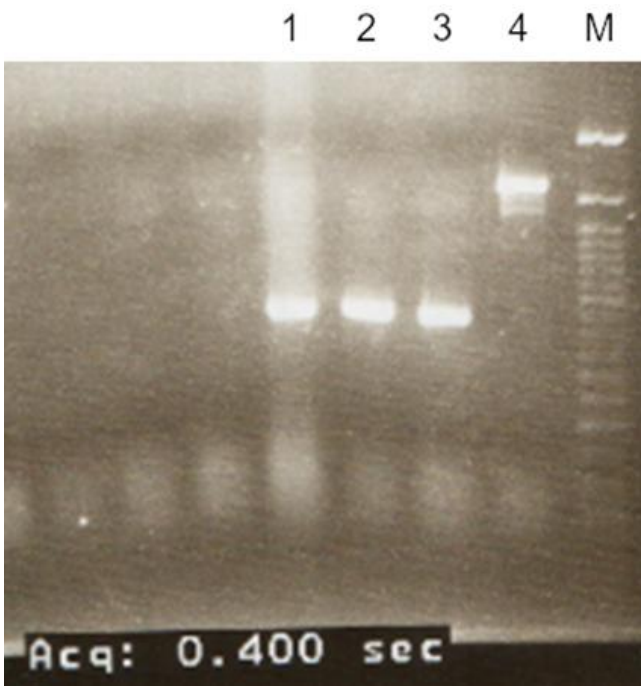


Abbildung 30: Colony-PCR nach Ligation v. Schwer- und Leichtketten-DNA im pCES-Vektor: 1 – 4: 1A2 VH1/VK3; M: 1kbp Marker

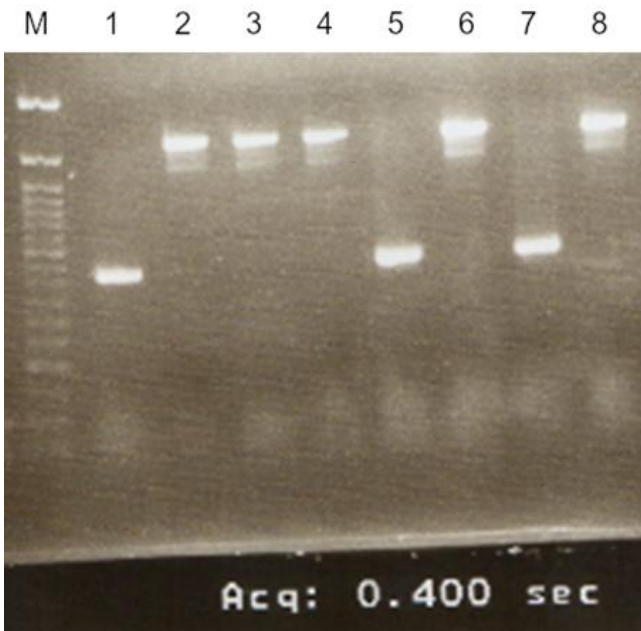


Abbildung 31: Colony-PCR nach Ligation v. Schwer- und Leichtketten-DNA im pCES-Vektor: 1 – 4: 1B2 VH4/VK1; 5 – 8: 1C1 VH3/VK3; M: 1kbp Marker

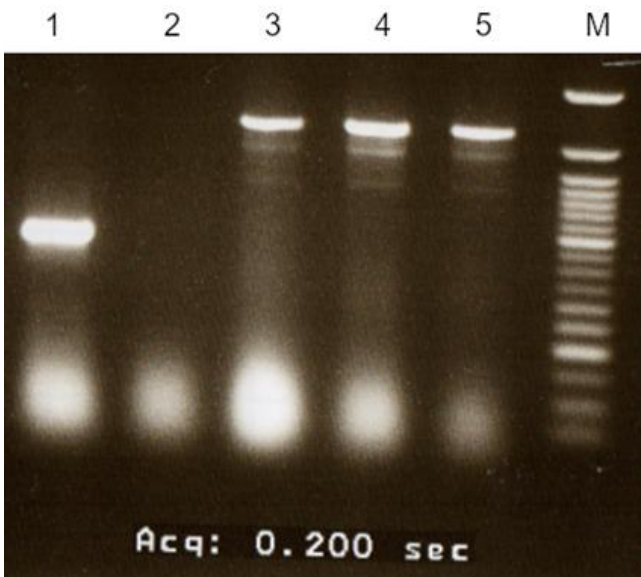


Abbildung 32: Colony-PCR nach Ligation v. Schwer- und Leichtketten-DNA im pCES-Vektor: 1 – 5: Raji VH1/VK3; M: 1kbp Marker

IMAC-Aufreinigung und SDS-PAGE der rekombinanten Fabs.

Die aus der Induktionskultur gewonnenen Bakterienpellets wurden zur Gewinnung der produzierten His₆-getaggten Fabs mit PBS lysiert und mittels IMAC-Verfahren aufgereinigt.

Um den Reinigungsvorgang zu überprüfen, wurde ein Teil der Fab-Proben gemeinsam mit dem PageRuler™ Prestained Protein Ladder als Marker mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und das Gel nach Coomassie gefärbt.

Dies erbrachte den Nachweis von Proteinen der zu erwartenden Größe von ca 40 kDa. Aufgrund der vorhergegangenen Induktionskultur und der IMAC-Aufreinigung, darf davon ausgegangen werden, dass es sich bei den zur Darstellung gekommenen Proteinen um die exprimierten Fab-Antikörper handelt.

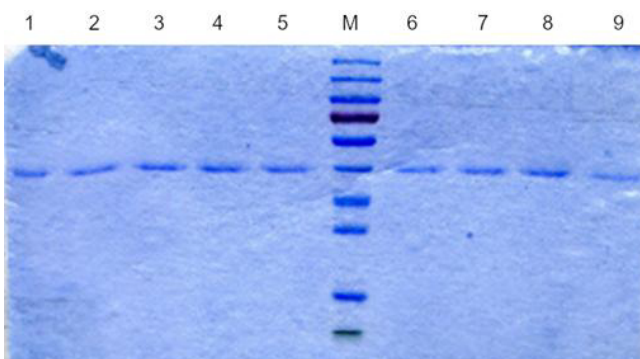


Abbildung 33: SDS-Gelelektrophorese mit den Fabs nach IMAC-Aufreinigung, Coomassie-Färbung: 1: BJAB; 2: BL41 VH3/VK3; 3: BL41 VH3/VK4; 4: BL41 VH4/VK2; 5: CA46; 6: Daudi; 7: LAZ221; 8: Mutu1; 9: 1A2; M: 10 – 180 kDa Marker

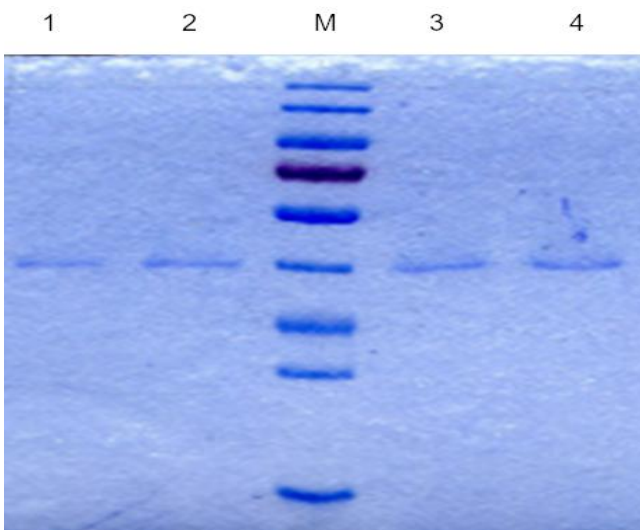


Abbildung 34: SDS-Gelelektrophorese mit den Fabs nach IMAC-Aufreinigung, Coomassie-Färbung: 1: 1C1; 2: Nalm6; 3: Raji; 4: 1B2; M: 10 – 180 kD Marker

Ein weiterer Teil der gewonnenen Fabs wurde über Nacht gegen PBS dialysiert und anschließend die Proteinkonzentration des Dialysates photometrisch bestimmt:

Tabelle 1: Proteinkonzentration der Fab-Proben nach Dialyse gegen PBS

| Probe | DNA-Konzentration | Probe | DNA-Konzentration |
|---------------------|--------------------------|--------------|--------------------------|
| BJAB | 241 µg/ml | 1A2 | 326 µg/ml |
| BL41 VH3/VK3 | 288 µg/ml | 1C1 | 334 µg/ml |
| BL41 VH3/VK4 | 336 µg/ml | Nalm6 | 321 µg/ml |
| BL41 VH4/VK2 | 343 µg/ml | Raji | 338 µg/ml |
| CA46 | 337 µg/ml | 1B2 | 336 µg/ml |
| Daudi | 333 µg/ml | Mutu1 | 336 µg/ml |

Bindungsaffinität gegenüber BystinSumo1 und C7-acetyliertes HSP40 im ELISA

Um zu überprüfen, ob die rekombinanten Fabs der Zelllinien und Patientenproben eine Bindungsaffinität gegenüber einem der sekundär modifizierten Kandidaten-Antigene BystinSumo1 und acetyliertes HSP40 besitzen, wurde mit den dialysierten Fabs ein indirekter ELISA durchgeführt. Als Positivkontrolle für eine erfolgte Bindung dienten die natürlichen Fabs der Zelllinien CA46 für BystinSumo1 und BL41 für C7-acetyliertes HSP40, da für diese bereits eine Reaktion nachgewiesen worden war.

Die Messergebnisse der Reaktion bei OD 450nm sind in den Abbildungen 35 und 36 dargestellt. Hier bestätigte sich die bereits vorbekannte Reaktion der natürlichen Fabs sowie zusätzlich der rekombinanten Fabs von Ca46 und BL41 in der Kombination von VH4 mit VK2.

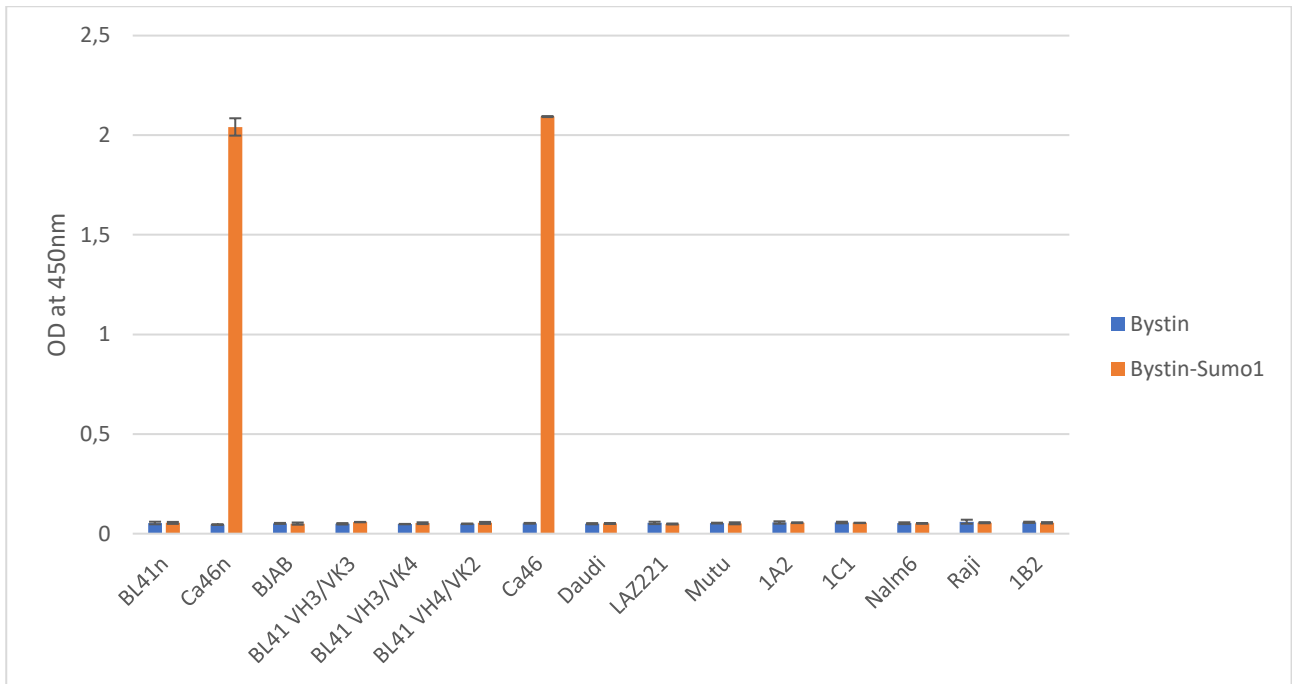


Abbildung 35: Auswertung ELISA auf Bystin und SUMO-Bystin mit rekombinanten Fabs durch Wallac Victor2 1420 Multilable, natürliche Fabs von BL41 und CA46 als Kontrollen

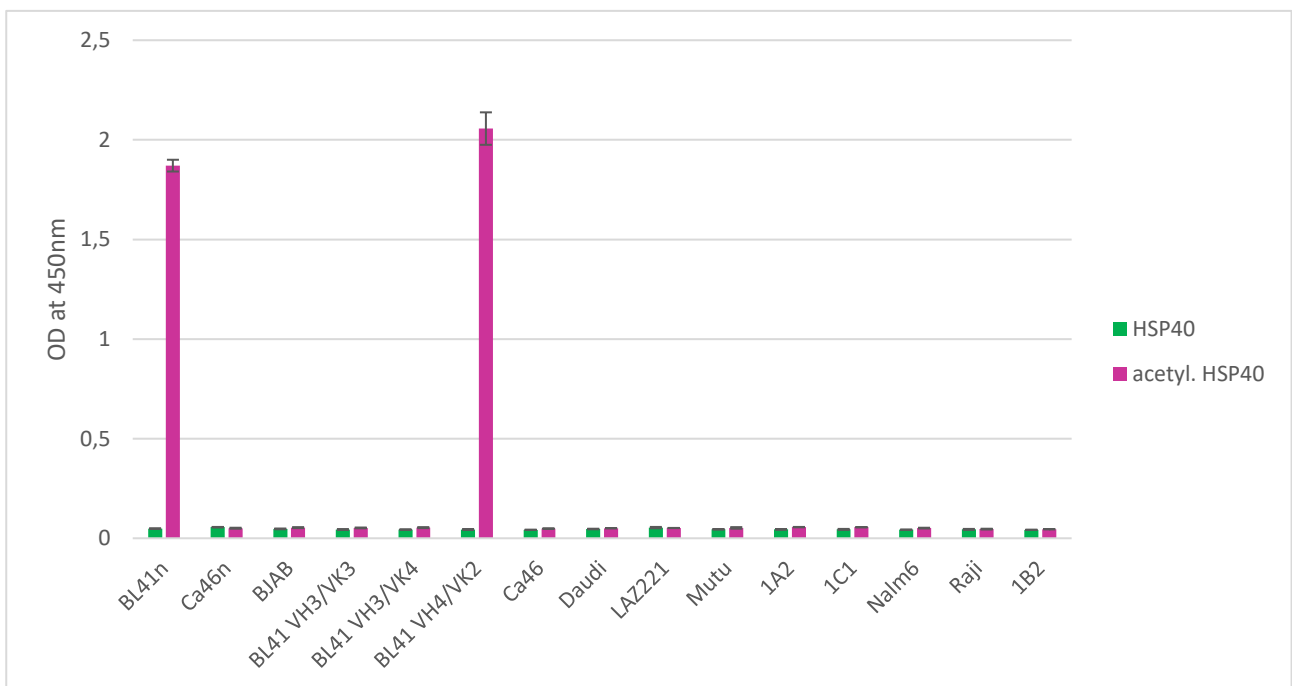


Abbildung 36: Auswertung ELISA auf HSP40 und acetyl. HSP40 mit rekombinanten Fabs durch Wallac Victor2 1420 Multilable, natürliche Fabs von BL41 und CA46 als Kontrollen

Serum-Autoantikörper gegen SUMO-Bystin und acetyliertes HSP40

Mit Seren von Patienten mit Burkitt-Lymphom wurde ebenfalls ein ELISA nach dem gleichen Schema durchgeführt, nachdem diese zuvor auf 1:100 verdünnt wurden.

Aufgrund der unterschiedlichen Probenanzahl der einzelnen Patienten, wurden im Falle des Vorliegens mehrerer Proben eines Patienten zur übersichtlicheren Darstellbarkeit die Mittelwerte der Messergebnisse verwendet. Die detaillierten Messergebnisse der einzelnen Patientenproben sind in Tabelle 2 aufgeführt.

In den Abbildungen 37 und 38 kann das Auswertungsergebnis nachvollzogen werden. In Abbildung 37 lässt sich erkennen, dass die Probe von Patient 4 eine Bindung an SUMOyliertes Bystin, jedoch keine Reaktion auf unverändertes Bystin zeigt. In Abbildung 38 findet sich für die Probe von Patient 7, sowohl eine Bindung an unverändertes HSP40 als auch an die acetylierte Form des Antigens.

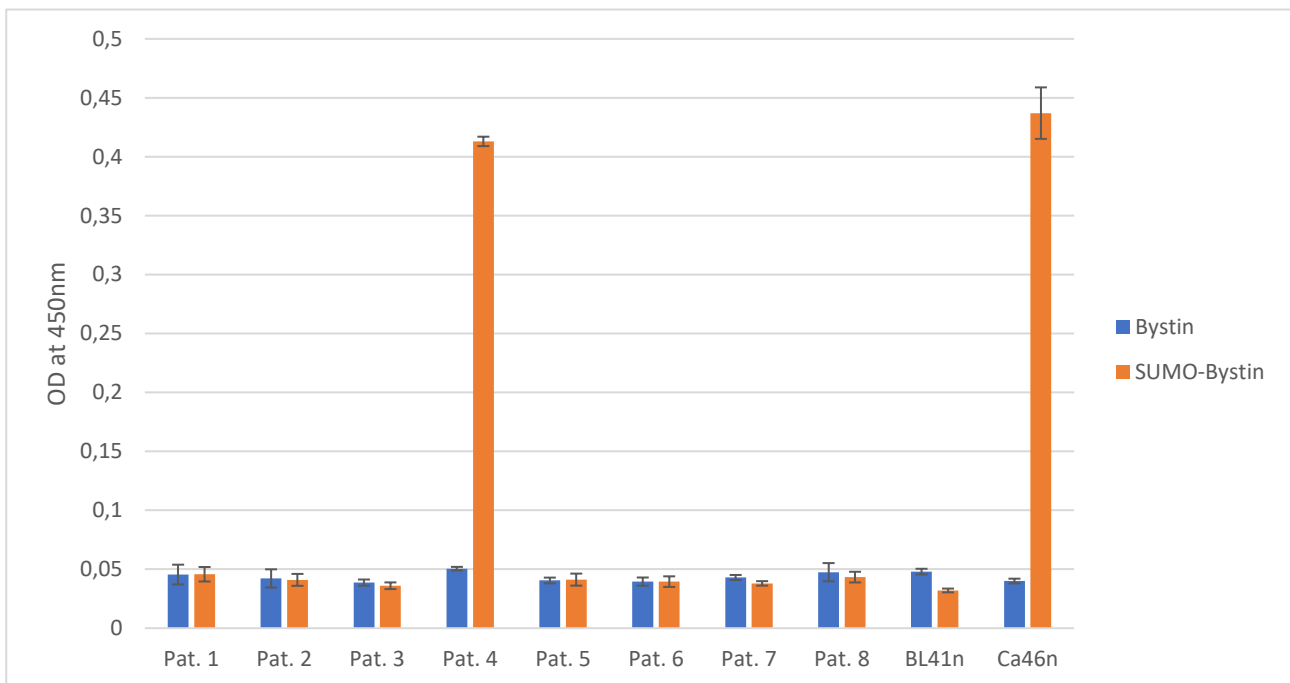


Abbildung 37: Auswertung ELISA Bystin und SUMO-Bystin mit Patienten-Seren durch Wallac Victor2 1420 Multilable, natürliche Fabs von BL41 und CA46 als Kontrollen

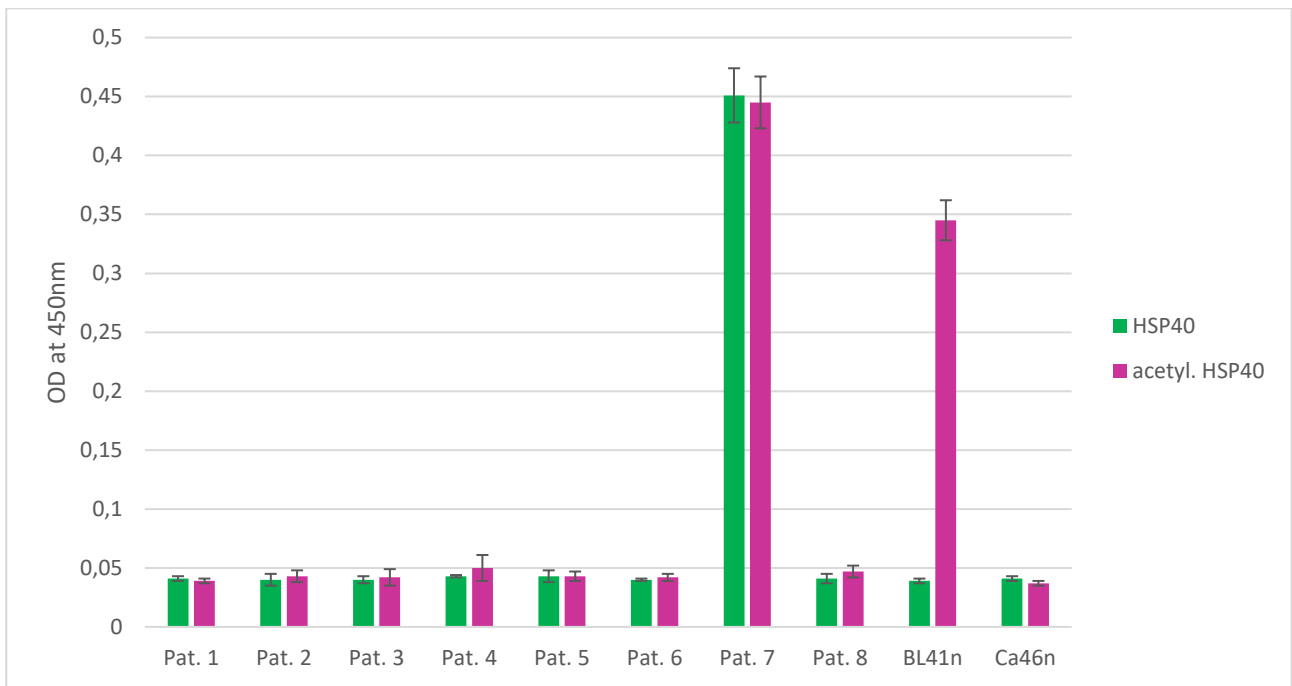


Abbildung 38: Auswertung ELISA auf HSP40 und acetyl. HSP40 mit Patienten-Seren durch Wallac Victor2 1420 Multilable, natürliche Fabs von BL41 und CA46 als Kontrollen

Tabelle 2: Detaillierte OD-Messungen der einzelnen Patientenproben bei 450nm nach ELISA

| Antigen | Pat. 1 | Pat. 2 | Pat. 3 | Pat. 4 | Pat. 5 | Pat. 6 | Pat. 7 | Pat. 8 | BL41n | Ca46n |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|
| Bystin | 0,044 | 0,034 | 0,035 | 0,049 | 0,038 | 0,043 | 0,043 | 0,052 | 0,048 | 0,04 |
| | 0,036 | 0,035 | 0,041 | 0,052 | 0,037 | 0,036 | | 0,055 | | |
| | 0,043 | 0,044 | 0,04 | | 0,039 | | | 0,053 | | |
| | 0,059 | 0,042 | | | 0,042 | | | 0,04 | | |
| | | 0,062 | | | 0,042 | | | 0,051 | | |
| | | 0,04 | | | 0,043 | | | 0,034 | | |
| | | 0,04 | | | 0,045 | | | | | |
| | | 0,044 | | | 0,04 | | | | | |
| | | 0,039 | | | 0,041 | | | | | |
| | | | | | 0,038 | | | | | |
| SUMO-Bystin | 0,051 | 0,043 | 0,04 | 0,409 | 0,05 | 0,044 | 0,038 | 0,037 | 0,032 | 0,437 |
| | 0,052 | 0,037 | 0,034 | 0,417 | 0,039 | 0,035 | | 0,045 | | |
| | 0,043 | 0,034 | 0,034 | | 0,042 | | | 0,046 | | |
| | 0,037 | 0,035 | | | 0,043 | | | 0,05 | | |
| | | 0,047 | | | 0,035 | | | 0,044 | | |
| | | 0,05 | | | 0,035 | | | 0,038 | | |
| | | 0,039 | | | 0,035 | | | | | |
| | | 0,041 | | | 0,046 | | | | | |
| | | 0,043 | | | 0,047 | | | | | |
| | | | | | 0,04 | | | | | |
| HSP40 | 0,038 | 0,036 | 0,037 | 0,044 | 0,047 | 0,041 | 0,451 | 0,038 | 0,039 | 0,041 |
| | 0,043 | 0,036 | 0,039 | 0,042 | 0,047 | 0,039 | | 0,044 | | |
| | 0,041 | 0,049 | 0,043 | | 0,052 | | | 0,037 | | |
| | 0,04 | 0,043 | | | 0,041 | | | 0,047 | | |
| | | 0,04 | | | 0,036 | | | 0,041 | | |
| | | 0,042 | | | 0,038 | | | 0,039 | | |
| | | 0,043 | | | 0,038 | | | | | |
| | | 0,036 | | | 0,048 | | | | | |
| | | 0,032 | | | 0,042 | | | | | |
| | | | | | 0,045 | | | | | |
| Acetyl. HSP40 | 0,04 | 0,038 | 0,05 | 0,042 | 0,046 | 0,044 | 0,445 | 0,046 | 0,345 | 0,037 |
| | 0,037 | 0,053 | 0,039 | 0,057 | 0,046 | 0,04 | | 0,049 | | |
| | 0,039 | 0,037 | 0,037 | | 0,045 | | | 0,048 | | |
| | 0,041 | 0,039 | | | 0,04 | | | 0,053 | | |
| | | 0,042 | | | 0,037 | | | 0,046 | | |
| | | 0,045 | | | 0,036 | | | 0,038 | | |
| | | 0,045 | | | 0,045 | | | | | |
| | | 0,041 | | | 0,049 | | | | | |
| | | 0,043 | | | 0,041 | | | | | |
| | | | | | 0,041 | | | | | |

Western Blot mit Lysaten von Burkitt-Lymphom Zelllinien

Nach Auftrennung von Lysaten der Burkitt-Lymphom Zelllinien BL31, BL41, BJAB, CA46, Daudi, Raji und Ramos mittels SDS-Polyacryl-Gelelektrophorese und Übertragung mittels Western Blot, wurde die Membran über Nacht geblockt.

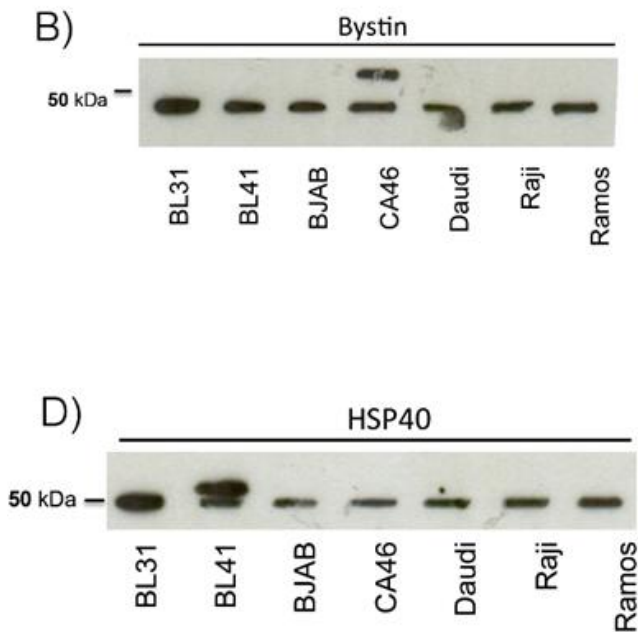


Abbildung 39: Western Blot von BL-Zelllinien auf Reaktivität gegen Bystin (B) und HSP40. (D)

In der Immundetektion zeigte sich das Vorhandensein von BystinSUMO1 nur für die Zelllinie CA46, während eine Reaktivität für HSP40acetyl. ausschließlich in der Probe von BL41 detektiert werden konnte. Erkennbar ist dies am Zustandekommen der zweiten Bande in Abbildung 35 B) und D).

Proliferation durch Interaktion mit Zielantigenen

Um zu untersuchen, ob die BZR-Antigenbindung der Zelllinien Einfluss auf ihre Proliferationsdynamik ausübt, wurde mit den Zelllinien BL41 und CA46 ein Tetrazolin/Formazan Assay (EZ4U, Biomedica) durchgeführt. Hier zeigte sich nach Inkubation mit den Zielantigenen in der OD-Messung bei 450nm eine signifikante Zunahme der Formazan-Konzentration in den Proben. Dieser Konzentrationsanstieg lässt auf eine Zunahme der Anzahl metabolisch aktiver Zellen in den Proben schließen, woraus eine Proliferationsinduktion nach Antigenkontakt geschlossen werden kann.

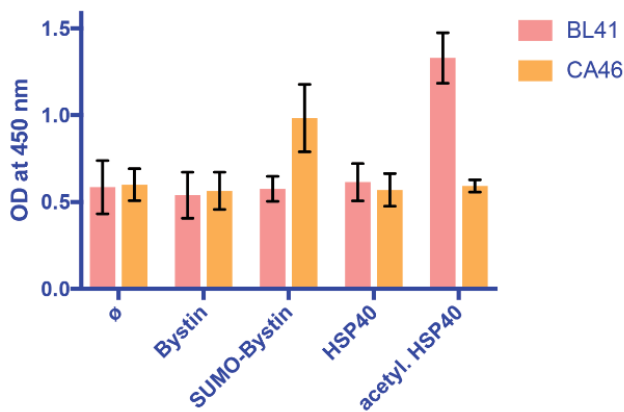


Abbildung 40: Induktion einer signifikanten Proliferation der CA46-Linie durch SUMOyliertes Bystin und der BL41-Linie durch Zugabe von acetyliertem HSP40. Mit dem EZ4U-Test ermittelte Zunahme der Proliferation (die Säulen zeigen Formazan bei einer optischen Dichte (OD) von 450 nm)

Inhibition der Proliferation mit BZR-Antigen-Toxinkonjugat

Im nächsten Schritt wurde die Auswirkung der Antigen-Bindung nach Konjugation mit einem ETA-Toxin in einfacher (Abb. 41 links) und Intein-basierter Form (Abb. 41 rechts) beobachtet.

Im Kontrast zur Zugabe der reinen sekundär-modifizierten Antigene, wirkte sich die Toxin-Kopplung negativ auf den Formazan-Gehalt in den Proben aus, in der OD-Messung ließ sich eine Abnahme von Formazan verzeichnen. Wie bereits im Abschnitt „Methodik“ erklärt, erfolgt die Reduktion von MTT zu Formazan in den Mitochondrien. Durch das Absterben von Zellen gehen diese zugrunde, sodass in einer bestimmten Zeit weniger Formazan entsteht. Dies entspricht einer Verminderung der Tetrazolin-Metabolisierung, sodass hieraus ein Rückgang der vorhandenen metabolisch aktiven Zellen abgeleitet werden kann. Aufgrund der Abwesenheit anderer Einflussfaktoren, lässt dies die Annahme einer zytotoxischen Wirkung nach Hinzugabe des ETA-Intein-gekoppelten Antigens zu. Durch Bindung an das Ziel-Antigen wird dieses entsprechend der BZR-Wirkung in die Zelle aufgenommen. Dies erfolgt gemeinsam mit dem angekoppelten *Pseudomonas*-Exotoxin, welches, im Zytoplasma angekommen, seine toxische Wirkung über Inaktivierung von EF-2 entfaltet.²⁴⁷ Anhand der Abbildung 41 lässt sich erkennen, dass die zytotoxische Wirkung ausschließlich nach Hinzugabe des Intein-basierten Immunotoxins eingetreten ist. Dies erklärt sich durch die SUMOylierungsstellen im ETA'-Teil des Immunotoxins. Bei direkter Kopplung an das Antigen werden diese im Rahmen der nachfolgenden SUMOylierung des Antigens ebenfalls SUMOyliert, wodurch sich seine Oberflächenstruktur verändert und es seine toxische Wirkung nicht mehr entfalten kann (Ergebnisse nicht gezeigt).²⁴⁰ Durch die Verwendung des Inteins werden Toxin und Antigen erst nach der SUMOylierung gekoppelt, sodass die Struktur des Toxins erhalten bleibt.

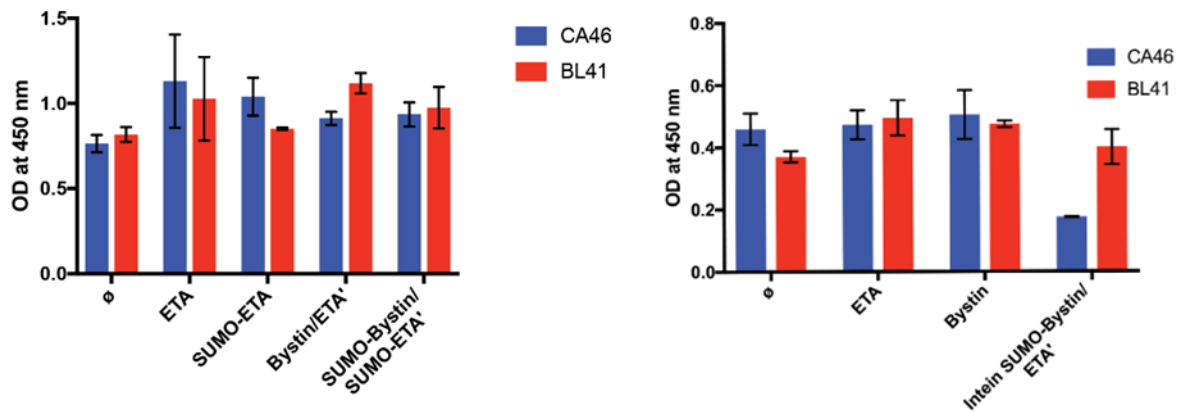


Abbildung 41: OD-Messung im Tetrazolin-Formazan Assay nach Zugabe der ETA-konjugierten Antigene (links) und nach Zugabe der ETA-Intein-gekoppelten Antigene (rechts)

Diskussion

Für die beiden etablierten Zelllinien sporadischer Burkitt-Lymphome, BL41 und CA46, konnten spezifische Zielantigene ihrer BZR identifiziert werden. Beide Zelllinien stammen von EBV-negativen Burkitt-Lymphom-Fällen ab. Die identifizierten Antigene zeigen jeweils atypische posttranslationale Modifikationen. Von solchen atypisch modifizierten Antigenen weiß man bereits im Zusammenhang mit anderen Krankheitsbildern, dass sie autoimmune Reaktionen auslösen können. Dies ist bei vielen rheumatologischen Erkrankungen der Fall, wie die posttranslationale Veränderung von Arginin zu Citrullin, für die Autoantikörper bei der Rheumatoiden Arthritis nachgewiesen werden konnten²⁵⁷ oder die Entdeckung spezifischer T-Zell-Klone bei der Autoimmun-Encephalomyelitis, die N-terminale Aminosäuren des Myelin basic protein als Autoantigen erkennen.²⁵⁸ Darüber hinaus existieren solche immunogenen PTMs auch im Formenkreis der lymphoproliferativen Erkrankungen. So wurde für die Trägerschaft von posttranslational SUMOyliertem HSP90 oder phosphoryliertem SLP2 ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Plasmazell Dyskrasien beschrieben.²⁴¹ Ein Zusammenhang zwischen den hier identifizierten Antigenen und dem Auftreten der Erkrankung scheint daher nicht unwahrscheinlich. Diese Vermutung wird verstärkt, da die atypischen modifizierten Isoformen nur jeweils bei der einen Zelllinie nachgewiesen werden konnten.

Multiple genetische Aberrationen, wie Mutationen im *TCF3*- oder *ID3*-Gen, oder das prominente *MYC*-Rearrangement bieten plausible Erklärungen für die Pathogenese des Burkitt-Lymphoms. Diese oder ähnliche Veränderungen mit gleichermaßen einschneidenden Auswirkungen auf die betroffenen Zellen und ihr malignes Transformationspotenzial finden sich auch bei anderen aggressiven Lymphomen.^{22,165,259} Die außerordentliche Aggressivität des Burkitt-Lymphoms scheint hierdurch jedoch nicht hinreichend begründet, sodass sich die Frage nach weiteren attributiven Stimuli aufdrängt. Allerdings lässt sich diese Aggressivität auch durch *MYC*-Translokation sowie Mutationen in *TCF3/ID3* usw. erklären.

Die Vorstellung einer begünstigten malignen Transformation und Proliferation von B-Zellen, die sich auf eine chronische Stimulation des BZR durch ein Antigen zurückführen lässt, existiert bereits seit mehr als einem halben Jahrhundert²⁶⁰ und für mehrere aggressive Lymphome, wie das DLBCL vom ABC-Typ²⁶¹ oder das Primäre ZNS-Lymphom²⁶² sind bereits körpereigene Antigene beschrieben worden, die BZR-Signale generieren und eine Zellproliferation induzieren.

Häufig weisen diese atypische PTMs auf. Die hier präsentierten Ergebnisse der Proliferationsassays lassen den Schluss zu, dass für einige sporadische Burkitt-Lymphome ebenfalls eine solche BZR-Stimulation durch posttranslational modifizierte Antigene zur Proliferation beiträgt. Da eine Proliferationsinduktion nur bei Kontakt mit dem modifizierten Antigen, nicht jedoch der unveränderten Isoform erfolgte, darf die Annahme gestellt werden, dass die malignen Zellen durch die zusätzlichen, über den BZR vermittelten Überlebenssignale einen Selektionsvorteil erlangen, dieser jedoch mit einer Abhängigkeit von der spezifischen Antigen-Reaktion einhergeht. Dies wird gestützt durch den beobachteten Rückgang der Proliferation nach Inkubation mit dem *Pseudomonas*

aeruginosa Exotoxin A konjugierten, posttranslational modifizierten Antigen, die unweigerlich ein Zugrundegehen der stimulierten Zellen zur Folge hatte. Auffällig ist auch der Nachweis der beiden modifizierten Antigen-Isoformen mittels Western Blot ausschließlich in den Zelllinien, deren BZR eine Stimulation durch diese erfahren, wodurch sich eine Kausalität der Korrelation aufdrängt.

Da für Blutproben von Burkitt-Lymphom-Patienten nur eine stark eingeschränkte Verfügbarkeit bestand, war die Anzahl der zugänglichen Fallproben sehr limitiert. Hierdurch ist die Aussagekraft der Ergebnisse und eine allgemeine Übertragung dieser auf das Krankheitsbild deutlich begrenzt. Wie weit die identifizierten Antigene in der Gesamtheit der Burkitt-Lymphom-Erkrankungen verbreitet sind, ist daher nicht valide abschätzbar. Hier könnten BL-Kryogewebebanken und einfache WB auf die Antigene oder die Expression korrespondierender IgVH/VL-Gene aus BL-Datenbanken weiterhelfen. Die Identifizierung pathologischer BZR-Reaktivitäten im Rahmen der Sekundärprophylaxe könnte in der Zukunft eine interessante Perspektive bieten.

Eine der Hauptlimitationen einer erfolgreichen bzw. in voller Dosis und angemessener Dichte verabreichten Primär-Therapie des Burkitt-Lymphoms stellt die Toxizität der verwendeten Substanzen gerade in „klassischen Burkitt-Protokollen“ dar.^{208,212–214,216} Zwar hat sich das Therapieansprechen seit Hinzunahme von Rituximab als monoklonalem CD20-Antikörper verbessert, dennoch birgt die Entwicklung einer noch zielgerichteteren, patienten-individuellen, Antigen-spezifischen Therapie ein Potenzial zur Reduktion der Therapie-assoziierten Toxizität und (Langzeit-)Mortalität. CAR-T-Zellen sind ein aktuelles Beispiel für den Erfolg individualisierter Therapiekonzepte. Limitierend sind zum jetzigen Zeitpunkt die Kosten für derartige Therapien. So beträgt der finanzielle Aufwand einer CAR-T-Zell-Therapie Stand 2024 bis zu 320.000€, jedoch sind bereits verschiedene Möglichkeiten zur Kostenreduktion in der Diskussion. Weiterhin stellen verkürzte Krankenhausaufenthalte und eine vermehrte Ambulantisierung onkologischer Patienten durch besser verträgliche Therapiekonzepte letztendlich eine Entlastung des Gesundheitssystems dar. Allerdings sind CAR-T-Zellen zum aktuellen Zeitpunkt nicht für rezidierte Burkitt-Lymphome zugelassen.

Die Anwendung von Immunotoxinen zur Behandlung onkologischer Patienten ist seit Langem in der klinischen Praxis angekommen. ONTAK® (Denileukin diftitox), ein Immunotoxin aus dem Diphtherie-Toxin und IL-2, das gegen den IL-2-Rezeptor gerichtet ist, wurde initial bereits 1999 für die Behandlung des persistierenden oder rezidivierenden kutanen T-Zell-Lymphoms (CTCL) zugelassen, allerdings wenig eingesetzt.²⁶³ Eine weiterentwickelte Version des Immunotoxins (Lymphir) erhielt 2024 die volle Zulassung für die Behandlung des CTCL nach Behandlung mit einer Erstlinien-therapie.²⁶⁴ Die häufigsten Therapie-assoziierten Komplikationen stellten in einer Placebo-kontrollierten Studie, veröffentlicht 2010, grippale Beschwerden wie Fieber, Fatigue, Muskelbeschwerden und Übelkeit dar.²⁶⁵ In weiteren, über die Jahre durchgeführten Studien zeigte

sich eine auftretende Lymphopenie als häufigste hämatologische Nebenwirkung, welche sich in der Regel innerhalb von 2 Wochen wieder normalisierte.²⁶⁶ Ein weiteres, 2018 von der FDA zur Behandlung der Haarzell-Leukämie zugelassenes Immunotoxin, ist Lumoxiti® (Moextumomab pasudotoxin). Es besteht aus dem variablen Teil eines Anti-CD22-Immunglobulins, gekoppelt an *Pseudomonas* Exotoxin (PE38). Die häufigsten Nebenwirkungen unter der Therapie werden in Form peripherer Ödeme, Übelkeit, Kopfschmerzen, Fieber und Fatigue beschrieben.²⁶⁷ Als drittes Beispiel lässt sich Elzonris® (Tagraxofusp-erzs) zur Behandlung der Blastischen plasmazytoiden dendritischen Zellneoplasie (BPDCN) anführen, ebenfalls 2018 zugelassen. Es richtet sich gegen CD123⁺ Zellen und setzt sich zusammen aus IL-3 und dem Diphtherie-Toxin. Auch hier zeigt sich insgesamt eine gute Verträglichkeit unter Therapie, verglichen mit den sonst häufig angewandten ALL-Protokollen. Als häufigste Nebenwirkungen werden eine Erhöhung der Blutzucker- und Leberwerte sowie einer Verminderung des Albumins, der Thrombozyten sowie des Hämoglobins genannt.²⁶⁸

Häufig eingesetzte Immunotoxine sind außerdem Antikörper-Konjugate wie u.a. Brentuximab-vedotin gegen CD30 beim Hodgkin Lymphom^{269,270} sowie Polatuzumab-vedotin gegen CD79b²⁷¹ und Loncastuximab-tesirin gegen CD19 für die Therapie des DLBCL.^{272,273}

Eine Vielzahl weiterer Immunotoxine befindet sich in der Phase klinischer Studien (s. Tabelle 3).

Tabelle 3: Beispiele klinischer Studien mit Immunotoxinen ²⁷⁴

| Study Title | NCT Number | Status | Conditions | Interventions | Sponsor | Study Type |
|--|-------------|----------------|--|--|-----------------------------------|----------------|
| Safety Study of CAT-8015 Immunotoxin in Patients With CLL, PLL or SLL With Advance Disease | NCT00457860 | Unknown status | <ul style="list-style-type: none"> Leukemia | <ul style="list-style-type: none"> Drug: Immunotoxin therapy Drug: CAT-8015 immunotoxin Procedure: Biological therapy | Cambridge Antibody Technology | Interventional |
| Safety Study of CAT-8015 Immunotoxin in Patients With HCL With Advance Disease | NCT00462189 | Unknown status | <ul style="list-style-type: none"> Leukemia Hairy Cell Leukemia HCL | <ul style="list-style-type: none"> Drug: Immunotoxin therapy Drug: CAT-8015 Immunotoxin Procedure: Biological therapy | Cambridge Antibody Technology | Interventional |
| Immunotoxin in Peritoneal Carcinomatosis- ImmunoPeCa Trial | NCT02219893 | Completed | <ul style="list-style-type: none"> Colorectal Neoplasms | <ul style="list-style-type: none"> Drug: MOC31PE Immunotoxin | Oslo University Hospital | Interventional |
| BL22 Immunotoxin in Treating Patients With Refractory Chronic Lymphocytic Leukemia, Prolymphocytic Leukemia, or Non-Hodgkin's Lymphoma | NCT00126646 | Completed | <ul style="list-style-type: none"> Leukemia Lymphoma | <ul style="list-style-type: none"> Drug: BL22 immunotoxin Procedure: antibody-drug conjugate therapy Procedure: immunotoxin therapy | MedImmune LLC | Interventional |
| Immunotoxin Therapy in Treating Patients With Hairy Cell Leukemia | NCT00021983 | Completed | <ul style="list-style-type: none"> Leukemia | <ul style="list-style-type: none"> Biological: BL22 immunotoxin | National Cancer Institute (NCI) | Interventional |
| BL22 Immunotoxin in Treating Patients With Non-Hodgkin's Lymphoma or Chronic Lymphocytic Leukemia | NCT00024115 | Withdrawn | <ul style="list-style-type: none"> Leukemia Lymphoma | <ul style="list-style-type: none"> Drug: BL22 immunotoxin Procedure: antibody therapy Procedure: biological response modifier therapy 1 more | National Cancer Institute (NCI) | Interventional |
| BL22 Immunotoxin In Treating Young Patients With Relapsed or Refractory Acute Lymphoblastic Leukemia or Non-Hodgkin's Lymphoma | NCT00077493 | Suspended | <ul style="list-style-type: none"> Leukemia Lymphoma | <ul style="list-style-type: none"> Drug: BL22 immunotoxin Procedure: antibody-drug conjugate therapy Procedure: immunotoxin therapy 1 more | MedImmune LLC | Interventional |
| Safety Study of CAT-8015 Immunotoxin in Patients With NHL With Advance Disease | NCT00515892 | Unknown status | <ul style="list-style-type: none"> Leukemia Non-Hodgkin's Lymphoma NHL | <ul style="list-style-type: none"> Drug: Immunotoxin therapy Drug: CAT-8015 Immunotoxin Procedure: Biological therapy 2 more | Cambridge Antibody Technology | Interventional |
| Immunotoxin in Treating Patients With Leukemia or Lymphoma | NCT00002765 | Completed | <ul style="list-style-type: none"> Leukemia Lymphoma | <ul style="list-style-type: none"> Biological: LMB-2 immunotoxin | National Cancer Institute (NCI) | Interventional |
| LMB-9 Immunotoxin in Treating Patients With Advanced Colon, Breast, Non-small Cell Lung, Bladder, Pancreatic, or Ovarian Cancer | NCT00005858 | Completed | <ul style="list-style-type: none"> Bladder Cancer Breast Cancer Colorectal Cancer 3 more | <ul style="list-style-type: none"> Biological: LMB-9 immunotoxin | University of Maryland, Baltimore | Interventional |

Anhand dieser Beispiele können die hier vorgestellten Ergebnisse in der Zukunft möglicherweise als Ausgangspunkt einer solch hoch-individuellen Therapie in der Behandlung von Burkitt-Lymphomen dienen. Eine Ausweitung der Antigen-Screenings ist hierzu notwendig. Das Screening auf posttranslational modifizierte Autoantigene ist weit davon entfernt, die Gesamtheit der in Frage kommenden Proteine abzudecken. Es ist denkbar, dass eine Vielzahl von Antigenen existiert, die eine Rolle für die chronische B-Zell-Stimulation beim Burkitt-Lymphom spielen. Möglicherweise sind diese so individuell wie das Patientenkontinuum im klinischen Alltag. Andererseits könnte auch eine begrenzte Varianz an Antigenen existieren, die es eines Tages ermöglicht, Patienten in einzelne Gruppen mit dem gleichen pathologischen Antigen-Stimulus zusammenzufassen und so ggf. die Entwicklung einer gerichteten Therapie oder Sekundärprophylaxe zu ermöglichen und lukrativ zu machen. Die Identifizierung dieser Antigene bildet einen kleinen Erfolg in dieser Richtung ab. Weitere

Untersuchungen zur Identifizierung möglicher Auslöser bergen ein spannendes Potenzial für zukünftige Arbeiten.

Ein durchgeführtes Screening auf Reaktivität gegen ein kleines Panel von bakteriellen und viralen Proteinen sowie Plasmodien-Lysate ergab leider keine positiven Ergebnisse. Die Vermutung einer infektiösen Beteiligung bei der Genese des Burkitt-Lymphoms aufgrund seiner häufigen Assoziation mit *Plasmodium falciparum*- und EBV-Infektionen, sowie dem Ileozökalbereich als nicht seltener extranodaler Manifestationsort, liegt jedoch nahe. Auch bildet das Panel der gescreenten Bakterien-Lysate und Virus-Proteine nur ein begrenztes Spektrum der infektiösen Mikroorganismen ab, sodass eine Intensivierung der Forschungsarbeit in diesem Bereich lohnend erscheint.

Limitationen dieser Arbeit stellte vor allem die begrenzte Anzahl an zur Verfügung stehenden Fallproben, insbesondere endemischer und pädiatrischer Burkitt-Lymphome, dar, sodass trotz großer Bemühungen nur eine sehr geringe Anzahl von Fällen untersucht werden konnte, von denen wiederum nur wenig Material zur Verfügung stand.

Eine intensivere Asservierung von Forschungsmaterial, z.B. in Form von Proben aus klinischen Studien/Registern sowie die Inkludierung auch pädiatrischer Studiengruppen und eine bessere Zugänglichkeit zu vorhandenen Proben sind ein wichtiger Faktor für den Erfolg zukünftiger Projekte und einen noch weiter reichenden Erkenntnisgewinn über das Burkitt-Lymphom.

Literaturverzeichnis

1. Gallo, R. L. & Hooper, L. V. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol* **12**, 503–516 (2012).
2. Noris, M. & Remuzzi, G. Overview of Complement Activation and Regulation. *Semin Nephrol* **33**, 479–492 (2013).
3. Golay, J. *et al.* Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood* **95**, (2000).
4. Varsano, S., Frolkis, I., Rashkovsky, L., Ophir, D. & Fishelson, Z. Protection of Human Nasal Respiratory Epithelium from Complement-mediated Lysis by Cell-membrane Regulators of Complement Activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **15**, (1996).
5. Brooimans, R. A., van Wieringen, P. A. M., van Es, L. A. & Daha, M. R. Relative roles of decay-accelerating factor, membrane cofactor protein, and CD59 in the protection of human endothelial cells against complement-mediated lysis. *Eur J Immunol* **22**, 3135–3140 (1992).
6. Couves, E. C. *et al.* Structural basis for membrane attack complex inhibition by CD59. *Nat Commun* **14**, (2023).
7. Davies, A. *et al.* CD59, an LY-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. *Journal of Experimental Medicine* **170**, (1989).
8. Toomey, C. B., Cauvi, D. M. & Pollard, K. M. The Role of Decay Accelerating Factor in Environmentally Induced and Idiopathic Systemic Autoimmune Disease. (2014) doi:10.1155/2014/452853.
9. Dho, S. H., Lim, J. C. & Kim, L. K. Beyond the Role of CD55 as a Complement Component. *Immune Netw* **18**, (2018).
10. Papayannopoulos, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* **18**, 134–147 (2018).
11. Paolini, R., Bernardini, G., Molfetta, R. & Santoni, A. NK cells and interferons. *Cytokine Growth Factor Rev* **26**, 113–120 (2015).
12. Natarajan, K., Li, H., Mariuzza, R. A. & Margulies, D. H. MHC class I molecules, structure and function. *Rev Immunogenet* **1**, 32–46 (1999).
13. EDELMAN, G. M. Antibody structure and molecular immunology. *Scand J Immunol* **34**, 4–22 (1991).
14. Porter, R. R. *Structural Studies of Immunoglobulins*. <https://www.science.org> (1973).
15. Padlan, E. A. Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* **31**, 169–217 (1994).
16. Wilson, I. A. & Stanfield, R. L. Antibody-antigen interactions: new structures and new conformational changes. *Curr Opin Struct Biol* **4**, 857–867 (1994).
17. Davies, D. R. & Cohen, G. H. Interactions of protein antigens with antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7–12 (1996).

18. Davies, D. R. & Metzger, H. Structural basis of antibody function. *Annual review of immunology* vol. 1 87–117 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.01.040183.000511> (1983).
19. Welinder, E., Åhsberg, J. & Sigvardsson, M. B-lymphocyte commitment: Identifying the point of no return. *Seminars in Immunology* vol. 23 335–340 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.smim.2011.08.005> (2011).
20. Chao, M. P., Seita, J. & Weissman, I. L. Establishment of a normal hematopoietic and leukemia stem cell hierarchy. in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* vol. 73 439–449 (2008).
21. Jacobsen, K., Kravitz, J., Kincade, P. W. & Osmond, D. G. Adhesion receptors on bone marrow stromal cells: In vivo expression of vascular cell adhesion molecule-1 by reticular cells and sinusoidal endothelium in normal and γ -irradiated mice. *Blood* **87**, 73–82 (1996).
22. Nogai, H., Dörken, B. & Lenz, G. Pathogenesis of non-Hodgkin's lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* vol. 29 1803–1811 Preprint at <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.33.3252> (2011).
23. Pieper, K., Grimbacher, B. & Eibel, H. B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 131 959–971 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046> (2013).
24. Hozumi, N. & Tonegawa, S. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 3628–3632 (1976).
25. Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R. & Alt, F. W. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annual Review of Immunology* vol. 24 541–570 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115830> (2006).
26. Fugmann, S. D., Lee, A. I., Shockett, P. E., Villey, I. J. & Schatz, D. G. The RAG proteins and V(D)J recombination: Complexes, ends, and transposition. *Annual Review of Immunology* vol. 18 495–527 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.495> (2000).
27. Oettinger, M. A., Schatz, D. G., Gorka, C. & Baltimore, D. RAG-1 and RAG-2, adjacent genes that synergistically activate V(D)J recombination. *Science (1979)* **248**, (1990).
28. Komori, T., Okada, A., Stewart, V. & Alt, F. W. Lack of N regions in antigen receptor variable region genes of TdT-deficient lymphocytes. *Science (1979)* **261**, (1993).
29. Gilfillan, S., Dierich, A., Lemeur, M., Benoist, C. & Mathis, D. Mice lacking TdT: Mature animals with an immature lymphocyte repertoire. *Science (1979)* **261**, (1993).
30. Eibel, H., Kraus, H., Sic, H., Kienzler, A. K. & Rizzi, M. B cell biology: An overview topical collection on basic and applied science. *Curr Allergy Asthma Rep* **14**, (2014).
31. Pandey, J. P. Immunoglobulin Genetics. in *Immunoglobulins in Health and Disease* (ed. French, M. A. H.) 23–29 (Springer Netherlands, Dordrecht, 1986). doi:10.1007/978-94-009-4169-4_2.

32. Loffert, D. *et al.* Early B-Cell Development in the Mouse: Insights from Mutations Introduced by Gene Targeting. *Immunol Rev* **137**, 135–153 (1994).
33. Melchers, F. *et al.* Repertoire selection by pre-B-cell receptors, and B-cell receptors, and genetic control of B-cell development from immature to mature B cells. *Immunol Rev* **175**, 33–46 (2000).
34. Hardy, R. R. & Hayakawa, K. B CELL DEVELOPMENT PATHWAYS. *Annu.Rev.Immunol* **19**, 592–621 (2001).
35. Reth, M., Petrac, E., Wiese, P., Lobel, L. & Alt, F. W. Activation of V kappa gene rearrangement in pre-B cells follows the expression of membrane-bound immunoglobulin heavy chains. *EMBO J* **6**, 3299–3305 (1987).
36. Reth, M. G., Ammirati, P., Jackson, S. & Alt, F. W. Regulated progression of a cultured pre-B-cell line to the B-cell stage. *Nature* **317**, 353–355 (1985).
37. Alt, F. W., Blackwell, T. K. & Yancopoulos, G. D. Development of the primary antibody repertoire. *Science (1979)* **238**, 1079–1087 (1987).
38. Pieper, K., Grimbacher, B. & Eibel, H. B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 131 959–971 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046> (2013).
39. Osmond, D. G., Rolink, A. & Melchers, F. Murine B lymphopoiesis: Towards a unified model. *Immunol Today* **19**, 65–68 (1998).
40. Goodnow, C. C., Sprent, J., Barbara, B. F. & Vinuesa, C. G. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* vol. 435 590–597 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nature03724> (2005).
41. Casellas, R. *et al.* Contribution of receptor editing to the antibody repertoire. *Science (1979)* **291**, 1541–1544 (2001).
42. Chen, C. *et al.* The site and stage of anti-DNA B-cell deletion. *Nature* vol. 373 252–255 Preprint at <https://doi.org/10.1038/373252a0> (1995).
43. Tiegs, S. L., Russell, D. M. & Nemazee, D. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *Journal of Experimental Medicine* **177**, 1009–1020 (1993).
44. Nemazee, D. & Hogquist, K. A. Antigen receptor selection by editing or downregulation of V(D)J recombination. *Current Opinion in Immunology* vol. 15 182–189 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0952-7915\(03\)00008-6](https://doi.org/10.1016/S0952-7915(03)00008-6) (2003).
45. Eschbach, C. *et al.* Efficient generation of B lymphocytes by recognition of self-antigens. *Eur J Immunol* **41**, 2397–2403 (2011).
46. Nemazee, D. & Buerki, K. Clonal deletion of autoreactive B lymphocytes in bone marrow chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 8039–8043 (1989).
47. Nemazee, D. A. & Bürki, K. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature* **337**, 562–566 (1989).

48. Goodnow, C. C. *et al.* Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* **334**, 676–682 (1988).
49. Erikson, J. *et al.* Expression of anti-DNA immunoglobulin transgenes in non-autoimmune mice. *Nature* **349**, 331–334 (1991).
50. Meffre, E. & Wardemann, H. B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. *Current Opinion in Immunology* vol. 20 632–638 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.09.001> (2008).
51. Meng, X. *et al.* Immunological mechanisms of tolerance: Central, peripheral and the role of T and B cells. *Asia Pac Allergy* **13**, 175 (2023).
52. Parodis, I., Long, X., Karlsson, M. C. I. & Huang, X. B Cell Tolerance and Targeted Therapies in SLE. *J Clin Med* **12**, 6268 (2023).
53. Cyster, J. G. & Goodnow, C. C. Antigen-induced exclusion from follicles and anergy are separate and complementary processes that influence peripheral B cell fate. *Immunity* **3**, 691–701 (1995).
54. Lam, K. P., Kühn, R. & Rajewsky, K. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* **90**, 1073–1083 (1997).
55. Harless, S. M. *et al.* Competition for BLYS-mediated signaling through Bcmd/BR3 regulates peripheral B lymphocyte numbers. *Current Biology* **11**, 1986–1989 (2001).
56. Martin, F., Oliver, A. M. & Kearney, J. F. Marginal Zone and B1 B Cells Unite in the Early Response against T-Independent Blood-Borne Particulate Antigens. *Immunity* **14**, 617–629 (2001).
57. Oliver, A. M. *et al.* Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *Eur. J. Immunol* **27**, 2366–2374 (1997).
58. Okada, T. & Cyster, J. G. B cell migration and interactions in the early phase of antibody responses. *Curr Opin Immunol* **18**, 278–285 (2006).
59. Phan, T. G., Gray, E. E. & Cyster, J. G. The microanatomy of B cell activation. *Curr Opin Immunol* **21**, 258 (2009).
60. Parker, D. C. T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* **11**, 331–360 (1993).
61. Pieper, K., Grimbacher, B. & Eibel, H. B-cell biology and development. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 131 959–971 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046> (2013).
62. MacLennan, I. C. M. *GERMINAL CENTERS Further ANNUAL REVIEWS*. *Annu. Rev. Immunol* vol. 12 17–39 www.annualreviews.org (1994).
63. Berek, C., Berger, A. & Apel, M. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* **67**, 1121–1129 (1991).
64. Miller, C., Stedra, J., Kelsoe, G. & Cerny, J. Facultative role of germinal centers and T cells in the somatic diversification of IgVH genes. *J Exp Med* **181**, 1319–1331 (1995).

65. Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K. & Weiss, U. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* **354**, 389–392 (1991).
66. Allen, C. D. C., Okada, T. & Cyster, J. G. Germinal-Center Organization and Cellular Dynamics. *Immunity* vol. 27 190–202 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.07.009> (2007).
67. Kepler, T. B. & Perelson, A. S. Cyclic re-entry of germinal center B cells and the efficiency of affinity maturation. *Immunol Today* **14**, 412–415 (1993).
68. Victora, G. D. *et al.* Germinal Center Dynamics Revealed by Multiphoton Microscopy Using a Photoactivatable Fluorescent Reporter. *Cell* **143**, 592 (2010).
69. Victora, G. D. *et al.* Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* **143**, 592–605 (2010).
70. Anderson, S. M. *et al.* Taking Advantage: High-Affinity B Cells in the Germinal Center Have Lower Death Rates, but Similar Rates of Division, Compared to Low-Affinity Cells. *The Journal of Immunology* **183**, 7314–7325 (2009).
71. MacLennan, I. C. M. Somatic mutation. From the dark zone to the light. *Curr Biol* **4**, 70–72 (1994).
72. Bransteitter, R., Pham, P., Scharfft, M. D. & Goodman, M. F. Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4102–4107 (2003).
73. Muramatsu, M. *et al.* Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* **102**, 553–563 (2000).
74. Pham, P., Bransteitter, R., Petruska, J. & Goodman, M. F. Processive AID-catalysed cytosine deamination on single-stranded DNA simulates somatic hypermutation. *Nature* **424**, 103–107 (2003).
75. Di Noia, J. M. & Neuberger, M. S. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annual Review of Biochemistry* vol. 76 1–22 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.061705.090740> (2007).
76. Odegard, V. H. & Schatz, D. G. Targeting of somatic hypermutation. *Nature Reviews Immunology* vol. 6 573–583 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri1896> (2006).
77. Chaudhuri, J. & Alt, F. W. Class-switch recombination: Interplay of transcription, DNA deamination and DNA repair. *Nature Reviews Immunology* vol. 4 541–552 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri1395> (2004).
78. Revy, P. *et al.* Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* **102**, 565–575 (2000).
79. Basu, U. *et al.* The RNA exosome targets the AID cytidine deaminase to both strands of transcribed duplex DNA substrates. *Cell* **144**, 353–363 (2011).
80. Allen, C. D. C. *et al.* Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nat Immunol* **5**, 943–952 (2004).

81. Nera, K. P. & Lassila, O. Pax5 - A critical inhibitor of plasma cell fate. *Scandinavian Journal of Immunology* vol. 64 190–199 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2006.01809.x> (2006).
82. Shapiro-Shelef, M. & Calame, K. C. Regulation of plasma-cell development. *Nature Reviews Immunology* vol. 5 230–242 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri1572> (2005).
83. Shapiro-Shelef, M. *et al.* Blimp-1 is required for the formation of immunoglobulin secreting plasma cells and pre-plasma memory B cells. *Immunity* **19**, 607–620 (2003).
84. Busslinger, M. Transcriptional control of early B cell development. *Annual Review of Immunology* vol. 22 55–79 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.22.012703.104807> (2004).
85. Basso, K. & Dalla-Favera, R. Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. *Immunol Rev* **247**, 172–183 (2012).
86. Ionescu, L. & Urschel, S. Memory B Cells and Long-lived Plasma Cells. *Transplantation* **103**, 890–898 (2019).
87. Takemori, T., Kaji, T., Takahashi, Y., Shimoda, M. & Rajewsky, K. Generation of memory B cells inside and outside germinal centers. *European Journal of Immunology* vol. 44 1258–1264 Preprint at <https://doi.org/10.1002/eji.201343716> (2014).
88. Bergmann, B. *et al.* Memory B Cells in Mouse Models. *Scandinavian Journal of Immunology* vol. 78 149–156 Preprint at <https://doi.org/10.1111/sji.12073> (2013).
89. Good-Jacobson, K. L. & Tarlinton, D. M. Multiple routes to B-cell memory. *International Immunology* vol. 24 403–408 Preprint at <https://doi.org/10.1093/intimm/dxs050> (2012).
90. Laidlaw, B. J., Duan, L., Xu, Y., Vazquez, S. E. & Cyster, J. G. The transcription factor Hhex cooperates with the corepressor Tle3 to promote memory B cell development. *Nat Immunol* **21**, 1082–1093 (2020).
91. McHeyzer-Williams, L. J. & McHeyzer-Williams, M. G. Antigen-specific memory B cell development. *Annual Review of Immunology* vol. 23 487–513 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115732> (2005).
92. Treanor, B. B-cell receptor: From resting state to activate. *Immunology* vol. 136 21–27 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2012.03564.x> (2012).
93. Cambier, J. C., Pleiman, C. M. & Clark, M. R. Signal transduction by the B cell antigen receptor and its coreceptors. *Annual Review of Immunology* vol. 12 457–486 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.002325> (1994).
94. Seda, V. & Mraz, M. B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells. *Eur J Haematol* **94**, 193–205 (2015).
95. Tonegawa, S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**, 575–581 (1983).
96. Schroeder, H. W. & Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**, (2010).

97. Adams, J. M. The organization and expression of immunoglobulin genes. *Immunology Today* vol. 1 10–17 Preprint at [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(80\)90015-8](https://doi.org/10.1016/0167-5699(80)90015-8) (1980).
98. Rajewsky, K. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* vol. 381 751–758 Preprint at <https://doi.org/10.1038/381751a0> (1996).
99. Kurosaki, T. & Hikida, M. Tyrosine kinases and their substrates in B lymphocytes. *Immunol Rev* **228**, 132–148 (2009).
100. Harwood, N. E. & Batista, F. D. Early events in B cell activation. *Annual Review of Immunology* vol. 28 185–210 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101216> (2010).
101. Campbell, K. S. Signal transduction from the B cell antigen-receptor. *Curr Opin Immunol* **11**, 256–264 (1999).
102. Koretzky, G. A., Abtahian, F. & Silverman, M. A. SLP76 and SLP65: Complex regulation of signalling in lymphocytes and beyond. *Nature Reviews Immunology* vol. 6 67–78 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri1750> (2006).
103. Okkenhaug, K. & Vanhaesebroeck, B. PI3K in lymphocyte development, differentiation and activation. *Nature Reviews Immunology* vol. 3 317–330 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nri1056> (2003).
104. Singh, S. P., Dammeijer, F. & Hendriks, R. W. Role of Bruton's tyrosine kinase in B cells and malignancies. doi:10.1186/s12943-018-0779-z.
105. Hendriks, R. W., Yuvaraj, S. & Kil, L. P. Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. (2014) doi:10.1038/nrc3702.
106. Limon, J. J. & Fruman, D. A. Akt and mTOR in B cell activation and differentiation. *Front Immunol* **3**, (2012).
107. Banchereau, J. *et al.* The CD40 antigen and its ligand. *Annual Review of Immunology* vol. 12 881–922 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.12.1.881> (1994).
108. Rickert, R. C., Jellusova, J. & Miletic, A. V. Signaling by the tumor necrosis factor receptor superfamily in B-cell biology and disease. *Immunological Reviews* vol. 244 115–133 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01067.x> (2011).
109. Hinz, M. & Scheidereit, C. The I κ B kinase complex in NF- κ B regulation and beyond. *EMBO Rep* **15**, 46 (2013).
110. Turvey, S. E. *et al.* The CARD11-BCL10-MALT1 (CBM) signalosome complex: Stepping into the limelight of human primary immunodeficiency. doi:10.1016/j.jaci.2014.06.015.
111. Schaefer, B. C. The CBM complex: A growing multiplicity of cellular functions, regulatory mechanisms and connections to human disease. *Cell Immunol* **356**, 104189 (2020).
112. Shinohara, H., Maeda, S., Watarai, H. & Kurosaki, T. I κ BB kinase beta-induced phosphorylation of CARMA1 contributes to CARMA1 Bcl10 MALT1 complex formation in B cells. *J Exp Med* **204**, 3285–3293 (2007).

113. Shankland, K. R., Armitage, J. O. & Hancock, B. W. Non-Hodgkin lymphoma. *The Lancet* vol. 380 848–857 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60605-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60605-9) (2012).
114. Pasqualucci, L. *et al.* Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* **412**, 341–346 (2001).
115. Pasqualucci, L. *et al.* BCL-6 mutations in normal germinal center B cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 11816–11821 (1998).
116. Pasqualucci, L. *et al.* AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat Genet* **40**, 108–112 (2008).
117. Küppers, R. & Dalla-Favera, R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* vol. 20 5580–5594 Preprint at <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204640> (2001).
118. Wang, X., Li, Z., Naganuma, A. & Ye, B. H. Negative autoregulation of BCL-6 is bypassed by genetic alterations in diffuse large B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, (2002).
119. Migliazza, A. *et al.* Frequent somatic hypermutation of the 5' noncoding region of the BCL6 gene in B-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 12520–12524 (1995).
120. Tsujimoto, Y., Gorham, J., Cossman, J., Jaffe, E. & Croce, C. M. The t(14;18) chromosome translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ joining. *Science* (1979) **229**, (1985).
121. Thurner, L. *et al.* Role of Specific B-Cell Receptor Antigens in Lymphomagenesis. *Front Oncol* **10**, (2020).
122. Dorsett, Y. *et al.* A role for AID in chromosome translocations between c-myc and the IgH variable region. *J Exp Med* **204**, 2225–2232 (2007).
123. Bakhshi, A. *et al.* Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around Jh on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell* **41**, 899–906 (1985).
124. Klanova, M. & Klener, P. BCL-2 proteins in pathogenesis and therapy of B-Cell non-hodgkin lymphomas. *Cancers* vol. 12 Preprint at <https://doi.org/10.3390/cancers12040938> (2020).
125. Ruvolo, P. P., Deng, X. & May, W. S. Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia* vol. 15 Preprint at <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402090> (2001).
126. Phan, R. T. & Dalla-Favera, R. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* **432**, 635–639 (2004).
127. Basso, K. *et al.* Integrated biochemical and computational approach identifies BCL6 direct target genes controlling multiple pathways in normal germinal center B cells. *Blood* **115**, 975–984 (2010).
128. Schlager, S. *et al.* Inducible knock-out of BCL6 in lymphoma cells results in tumor stasis. *Oncotarget* **11**, 875 (2020).

129. Schmitz, R., Ceribelli, M., Pittaluga, S., Wright, G. & Staudt, L. M. Oncogenic mechanisms in Burkitt lymphoma. *Cold Spring Harb Perspect Med* **4**, (2014).
130. Hoffman, B. & Liebermann, D. A. Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene* vol. 27 6462–6472 Preprint at <https://doi.org/10.1038/onc.2008.312> (2008).
131. Toshiyuki, M. & Reed, J. C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293–299 (1995).
132. Swerdlow SH *et al.* *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Revised 4th Edition)*. IARC: Lyon 2017. (Lyon, 2017).
133. Dang, C. v. MYC on the path to cancer. *Cell* vol. 149 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.003> (2012).
134. Dang, C. V. *et al.* The c-Myc target gene network. *Seminars in Cancer Biology* vol. 16 253–264 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.semancer.2006.07.014> (2006).
135. Boxer, L. M. & Dang, C. V. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* vol. 20 5595–5610 Preprint at <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204595> (2001).
136. Meyer, N. & Penn, L. Z. Reflecting on 25 years with MYC. *Nature Reviews Cancer* vol. 8 976–990 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrc2231> (2008).
137. Dang, C. V., O'Donnell, K. A. & Juopperi, T. The great MYC escape in tumorigenesis. *Cancer Cell* vol. 8 177–178 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2005.08.005> (2005).
138. Li, Z. *et al.* A global transcriptional regulatory role for c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8164–8169 (2003).
139. Henriksson, M., Selivanova, G., Lindström, M. & Wiman, K. G. Inactivation of Myc-induced p53-dependent apoptosis in human tumors. *Apoptosis* vol. 6 133–137 Preprint at <https://doi.org/10.1023/A:1009644716727> (2001).
140. Taub, R. *et al.* Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, (1982).
141. Erikson, J., Finan, J., Nowell, P. C. & Croce, C. M. Translocation of immunoglobulin V(H) genes in Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 5611–5615 (1982).
142. Davis, M., Malcolm, S. & Rabbitts, T. H. Chromosome translocation can occur on either side of the c-myc oncogene in Burkitt lymphoma cells. *Nature* **308**, 286–288 (1984).
143. Sherr, C. J. Cancer cell cycles. *Science* vol. 274 1672–1674 Preprint at <https://doi.org/10.1126/science.274.5293.1672> (1996).
144. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. & Harris, C. C. p53 mutations in human cancers. *Science* (1979) **253**, (1991).
145. Levine, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* vol. 88 323–331 Preprint at [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81871-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81871-1) (1997).

146. Henriksson, M., Selivanova, G., Lindström, M. & Wiman, K. G. *Inactivation of Myc-Induced P53-Dependent Apoptosis in Human Tumors*. *Apoptosis* vol. 6 133–137 (Kluwer Academic Publishers, 2001).
147. Lindström, M. S. & Wiman, K. G. Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma. *Semin Cancer Biol* **12**, 381–387 (2002).
148. Marei, H. E. *et al.* p53 signaling in cancer progression and therapy. *Cancer Cell International* vol. 21 Preprint at <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02396-8> (2021).
149. Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A. & Oren, M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296–299 (1997).
150. Zindy, F. *et al.* Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* **12**, 2424–2433 (1998).
151. Polager, S. & Ginsberg, D. p53 and E2f: partners in life and death. *Nat Rev Cancer* (2009) doi:10.1038/nrc2718.
152. Karin, M. Nuclear factor- κ B in cancer development and progression. *Nature* vol. 441 431–436 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nature04870> (2006).
153. Biswas, R. & Bagchi, A. NF κ B pathway and inhibition: an overview. *Computational Molecular Biology* (2016) doi:10.5376/cmb.2016.06.0001.
154. Cabal-Hierro, L. *et al.* TRAF-mediated modulation of NF- κ B AND JNK Activation by TNFR2. *Cell Signal* **26**, 2658–2666 (2014).
155. Rodríguez, M. *et al.* NF- κ B signal triggering and termination by tumor necrosis factor receptor 2. *Journal of Biological Chemistry* **286**, 22814–22824 (2011).
156. Holbrook, J., Lara-Reyna, S., Jarosz-Griffiths, H. & Mcdermott, M. F. Open Peer Review Tumour necrosis factor signalling in health and disease [version 1; referees: 2 approved]. (2019) doi:10.12688/f1000research.17023.1.
157. Rohde, M. *et al.* Relevance of ID3-TCF3-CCND3 pathway mutations in pediatric aggressive B-cell lymphoma treated according to the non-Hodgkin lymphoma Berlin-Frankfurt-münster protocols. *Haematologica* **102**, 1091–1098 (2017).
158. Schmitz, R. *et al.* Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* **490**, 116–120 (2012).
159. Richter, J. *et al.* Recurrent mutation of the ID3 gene in Burkitt lymphoma identified by integrated genome, exome and transcriptome sequencing. *Nat Genet* **44**, 1316–1320 (2012).
160. Panea, R. I. *et al.* The whole-genome landscape of Burkitt lymphoma subtypes. *Blood* **134**, 1598–1607 (2019).
161. Swerdlow SH *et al.* *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (Revised 4th Edition)*. IARC: Lyon 2017. (Lyon, 2017).
162. Pae, J. *et al.* Cyclin D3 drives inertial cell cycling in dark zone germinal center B cells. *Journal of Experimental Medicine* **218**, (2021).

163. Cato, M. H., Chintalapati, S. K., Yau, I. W., Omori, S. A. & Rickert, R. C. Cyclin D3 Is Selectively Required for Proliferative Expansion of Germinal Center B Cells. *Mol Cell Biol* **31**, 127–137 (2011).
164. Peled, J. U. *et al.* Requirement for cyclin D3 in germinal center formation and function. *Cell Res* **20**, 631–646 (2010).
165. Küppers, R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nature Reviews Cancer* vol. 5 251–262 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrc1589> (2005).
166. Corso, J. *et al.* Elucidation of tonic and activated B-cell receptor signaling in Burkitt's lymphoma provides insights into regulation of cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 5688–5693 (2016).
167. Alizadeh, A. A. *et al.* Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* **403**, 503–511 (2000).
168. Davis, R. E. *et al.* Chronic active B-cell-receptor signalling in diffuse large B-cell lymphoma. *Nature* **463**, (2010).
169. Gomes de Castro, M. A. *et al.* Differential organization of tonic and chronic B cell antigen receptors in the plasma membrane. *Nat Commun* **10**, (2019).
170. Wotherspoon, A. C., Ortiz-Hidalgo, C., Falzon, M. R. & Isaacson, P. G. Helicobacter pylori-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *The Lancet* **338**, (1991).
171. Wotherspoon, A. C. Helicobacter pylori infection and gastric lymphoma. *British Medical Bulletin* vol. 54 Preprint at <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a011683> (1998).
172. Craig, V. J. *et al.* Gastric MALT lymphoma B cells express polyreactive, somatically mutated immunoglobulins. *Blood* **115**, (2010).
173. Morales-Sánchez, A. & Fuentes-Pananá, E. M. Human viruses and cancer. *Viruses* vol. 6 Preprint at <https://doi.org/10.3390/v6104047> (2014).
174. Wotherspoon, A. C. *et al.* Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of Helicobacter pylori. *The Lancet* **342**, (1993).
175. Thurner, L. *et al.* B-cell receptor reactivity against Rothia mucilaginosa in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. doi:10.3324/haematol.2023.282698.
176. Thurner, L. *et al.* Lymphocyte predominant cells detect Moraxella catarrhalis-derived antigens in nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. doi:10.1038/s41467-020-16375-6.
177. Yin, H., Qu, J., Peng, Q. & Gan, R. Molecular mechanisms of EBV-driven cell cycle progression and oncogenesis. *Med Microbiol Immunol* **208**, 573–583 (2019).
178. Shannon-Lowe, C., Rickinson, A. B. & Bell, A. I. Epstein-barr virus-associated lymphomas. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* vol. 372 Preprint at <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0271> (2017).

179. Ambinder, R. F. Human lymphotropic viruses associated with lymphoid malignancy: Epstein-Barr and HTLV-1. *Hematology/Oncology Clinics of North America* vol. 4 821–833 Preprint at [https://doi.org/10.1016/s0889-8588\(18\)30469-6](https://doi.org/10.1016/s0889-8588(18)30469-6) (1990).
180. Hatton, O. L., Harris-Arnold, A., Schaffert, S., Krams, S. M. & Martinez, O. M. The interplay between Epstein-Barr virus and B lymphocytes: Implications for infection, immunity, and disease. *Immunol Res* **58**, 268–276 (2014).
181. Magrath, I. Epidemiology: Clues to the pathogenesis of Burkitt lymphoma. *British Journal of Haematology* vol. 156 744–756 Preprint at <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.09013.x> (2012).
182. Gilmore, T. D. The Rel/NF- κ B/I κ B signal transduction pathway and cancer. *Cancer Treat Res* **115**, 241–265 (2003).
183. Giehler, F. *et al.* Epstein-Barr virus-driven B cell lymphoma mediated by a direct LMP1-TRAF6 complex. doi:10.1038/s41467-023-44455-w.
184. Abate, F. *et al.* Distinct Viral and Mutational Spectrum of Endemic Burkitt Lymphoma. *PLoS Pathog* **11**, (2015).
185. Niller, H. H., Wolf, H., Minarovits, J. & Helmut Niller, H. Regulation and dysregulation of Epstein-Barr virus latency: Implications for the development of autoimmune diseases. (2009) doi:10.1080/08916930802024772.
186. Neitzei, H. *A Routine Method for the Establishment of Permanent Growing Lymphoblastoid Cell Lines.* *Hum Genet* vol. 73 (1986).
187. Epstein, M. A., Achong, B. G. & Barr, Y. M. VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *Lancet* **1**, 702–703 (1964).
188. Burkitt, D. A sarcoma involving the jaws in african children. *British Journal of Surgery* **46**, 218–223 (1958).
189. Schmitz, R. *et al.* Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* **490**, 116–120 (2012).
190. Zhang, D. D., Medeiros, C. G., Liang, M. & Medeiros, L. J. Origin of the terms 'water pot' and 'starry sky' in Burkitt lymphoma. *Pathology* **56**, 118–120 (2024).
191. Scholzen, T. & Gerdes, J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* vol. 182 311–322 Preprint at [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200003\)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9) (2000).
192. Sun, X. & Kaufman, P. D. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma* vol. 127 175–186 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00412-018-0659-8> (2018).
193. Sun, X. *et al.* Ki-67 Contributes to Normal Cell Cycle Progression and Inactive X Heterochromatin in p21 Checkpoint-Proficient Human Cells. *Mol Cell Biol* **37**, (2017).

194. Booth, D. G. & Earnshaw, W. C. Ki-67 and the Chromosome Periphery Compartment in Mitosis. *Trends in Cell Biology* vol. 27 906–916 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.08.001> (2017).
195. Cuylen, S. *et al.* Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes. *Nature* **535**, 308–312 (2016).
196. Dalla-Favera, R. *et al.* Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 7824–7827 (1982).
197. Erikson, J., Finan, J., Nowell, P. C. & Croce, C. M. Translocation of immunoglobulin V(H) genes in Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 5611–5615 (1982).
198. Roschke, V., Kopantzev, E., Dertzbaugh, M. & Rudikoff, S. Chromosomal translocations deregulating c-myc are associated with normal immune responses. *Oncogene* **14**, 3011–3016 (1997).
199. Hoffman, B. & Liebermann, D. A. Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene* vol. 27 6462–6472 Preprint at <https://doi.org/10.1038/onc.2008.312> (2008).
200. Prendergast, G. C. Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene* vol. 18 2967–2987 Preprint at <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202727> (1999).
201. Hoffman, B. & Liebermann, D. A. Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene* vol. 27 Preprint at <https://doi.org/10.1038/onc.2008.312> (2008).
202. Pelengaris, S., Khan, M. & Evan, G. c-MYC: More than just a matter of life and death. *Nature Reviews Cancer* vol. 2 764–776 Preprint at <https://doi.org/10.1038/nrc904> (2002).
203. Kalkat, M. *et al.* MYC deregulation in primary human cancers. *Genes* vol. 8 2–30 Preprint at <https://doi.org/10.3390/genes8060151> (2017).
204. Thorley-Lawson, D. A. EBV the prototypical human tumor virus—just how bad is it? *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **116**, 251–261 (2005).
205. Robbiani, D. F. *et al.* Plasmodium Infection Promotes Genomic Instability and AID-Dependent B Cell Lymphoma. *Cell* **162**, 727–737 (2015).
206. Gonzalez-Farre, B. *et al.* Burkitt-like lymphoma with 11q aberration: A germinal center-derived lymphoma genetically unrelated to Burkitt lymphoma. *Haematologica* **104**, 1822–1829 (2019).
207. Wagener, R. *et al.* The mutational landscape of Burkitt-like lymphoma with 11q aberration is distinct from that of Burkitt lymphoma. *Blood* **133**, 962–966 (2019).
208. Magrath, I. *et al.* Adults and children with small non-cleaved-cell lymphoma have a similar excellent outcome when treated with the same chemotherapy regimen. *J Clin Oncol* **14**, 925–934 (1996).
209. Crombie, J. & LaCasce, A. The treatment of Burkitt lymphoma in adults. *Blood* **137**, 743–750 (2021).
210. Blum, K. A., Lozanski, G. & Byrd, J. C. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* vol. 104 3009–3020 Preprint at <https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0405> (2004).

211. Garcia-Manero, G. & Kantarjian, H. M. The hyper-CVAD regimen in adult acute lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* **14**, 1381–1396 (2000).
212. Thomas, D. A. *et al.* Hyper-CVAD program in Burkitt's-type adult acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* **17**, 2461–2470 (1999).
213. Diviné, M. *et al.* Burkitt lymphoma in adults: A prospective study of 72 patients treated with an adapted pediatric LMB protocol. *Annals of Oncology* **16**, 1928–1935 (2005).
214. Dunleavy, K. *et al.* Low-Intensity Therapy in Adults with Burkitt's Lymphoma A BS TR AC T. *N Engl J Med* **369**, 1915–1940 (2013).
215. Sweetenham, J. W. *et al.* Adult Burkitt's and Burkitt-like Non-Hodgkin's Lymphoma-Outcome for Patients Treated With High-Dose Therapy and Autologous Stem-Cell Transplantation in First Remission or at Relapse: Results From the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Journal of Clinical Oncology* **14**, 2465–2472 (1996).
216. Hoelzer, D. *et al.* Improved outcome of adult Burkitt lymphoma/leukemia with rituximab and chemotherapy: report of a large prospective multicenter trial. *Blood* **124**, 3870–3879 (2014).
217. Chemotherapy resistant Burkitt lymphoma: Possible novel therapies including CAR-T cell infusion | Enhanced Reader.
218. Bundesausschuss, G. Abschlussbericht Beratungsverfahren MB Richtlinie Methoden Krankenhausbehandlung Allogene Stammzelltransplantation (SZT) bei aggressiven B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen (B-Zell-NHL).
219. Pascho, R. J., Chase, D. & McKibben, C. L. Comparison of the membrane-filtration fluorescent antibody test, the enzyme-linked immunosorbent assay, and the polymerase chain reaction to detect *Renibacterium salmoninarum* in salmonid ovarian fluid. *J Vet Diagn Invest* **10**, 60–66 (1998).
220. Advantages & Limits of Nested PCR vs. Standard PCR | AAT Bioquest. <https://www.aatbio.com/resources/application-notes/advantages-limits-of-nested-pcr-vs-standard-pcr>.
221. Behjati, S. & Tarpey, P. S. What is next generation sequencing? doi:10.1136/archdischild-2013-304340.
222. NGS vs qPCR. <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/beginners/advantages/ngs-vs-qpcr.html>.
223. 50 bp DNA Ladder | NEB. https://www.neb.com/en/products/n3236-50-bp-dna-ladder#Product%20Information_Properties%20&%20Usage.
224. GeneRuler 1 kb DNA Ladder Contents and storage.
225. Griffith, F. The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)* **27**, 113–159 (1928).
226. O'Connell, L. M. *et al.* Natural Transformation in Gram-Positive Bacteria and Its Biotechnological Relevance to Lactic Acid Bacteria. *Annu Rev Food Sci Technol* **13**, 409–431 (2022).

227. Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**, 6127–6145 (1988).
228. Chan, W. T., Verma, C. S., Lane, D. P. & Gan, S. K. E. A comparison and optimization of methods and factors affecting the transformation of *Escherichia coli*. *Biosci Rep* **33**, (2013).
229. TOPO™ TA Cloning™ Kit, with pCR™2.1-TOPO™, One Shot TOP10 Chemically Competent *E. coli*, and PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K450002#/K450002>.
230. Boezi, J. A. & Cowie, D. B. Kinetic studies of beta-galactosidase induction. *Biophys J* **1**, 639–647 (1961).
231. Hallmann, J. *et al.* Bestimmung der Zelldichte von Bakterienkulturen mit Hilfe der Hellma® Faseroptischen Sonde in Kombination mit dem Eppendorf BioSpectrometer®. 1–7 (2013).
232. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
233. De St. Groth, S. F., Webster, R. G. & Datyner, A. Two new staining procedures for quantitative estimation of proteins on electrophoretic strips. *Biochim Biophys Acta* **71**, 377–391 (1963).
234. Meyer, T. S. & Lamberts, B. L. Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim Biophys Acta* **107**, 144–145 (1965).
235. Aydin, S. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides (N.Y.)* **72**, 4–15 (2015).
236. Engvall, E. & Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **8**, 871–874 (1971).
237. Bock, T. *et al.* B-cell receptors of EBV-negative Burkitt lymphoma bind modified isoforms of autoantigens. *EJHaem* **3**, 739–747 (2022).
238. Southern, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **98**, (1975).
239. Stöcker W. and Schlumberger, W. Makroarray. in *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (ed. Gressner Axel M. and Arndt, T.) 1561–1562 (Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2019). doi:10.1007/978-3-662-48986-4_2013.
240. Bock, T. *et al.* B-cell receptors of EBV-negative Burkitt lymphoma bind modified isoforms of autoantigens. *EJHaem* **3**, (2022).
241. Preuss, K. D., Pfreunds Schuh, M., Fadle, N., Regitz, E. & Kubuschok, B. Sumoylated HSP90 is a dominantly inherited plasma cell dyscrasias risk factor. *J Clin Invest* **125**, 316–323 (2015).
242. Merbl, Y. & Kirschner, M. W. Large-scale detection of ubiquitination substrates using cell extracts and protein microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2543 (2009).
243. Miersch, S. *et al.* Serological autoantibody profiling of type 1 diabetes by protein arrays. *J Proteomics* **94**, 486–496 (2013).

244. Díez, P. *et al.* NAPPA as a Real New Method for Protein Microarray Generation. **4**, 214–227 (2015).
245. Manzano-Román, R. & Fuentes, M. A decade of Nucleic Acid Programmable Protein Arrays (NAPPA) availability: News, actors, progress, prospects and access. *J Proteomics* **198**, 27–35 (2019).
246. Definition of immunotoxin - NCI Dictionary of Cancer Terms - NCI. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/immunotoxin>.
247. Madhumathi, J. & Verma, R. S. Therapeutic targets and recent advances in protein immunotoxins. *Curr Opin Microbiol* **15**, 300–309 (2012).
248. Shapira, A. & Benhar, I. Toxin-based therapeutic approaches. *Toxins (Basel)* **2**, 2519–2583 (2010).
249. Choudhary, S., Mathew, M. & Verma, R. S. Therapeutic potential of anticancer immunotoxins. *Drug Discov Today* **16**, 495–503 (2011).
250. Nachreiner, T. *et al.* Depletion of autoreactive B-lymphocytes by a recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein-based immunotoxin. *J Neuroimmunol* **195**, 28–35 (2008).
251. Thiel, I. V *et al.* Protein Ligation An Atypical Naturally Split Intein Engineered for Highly Efficient Protein Labeling**. *Angew. Chem. Int. Ed* **53**, 1306–1310 (2014).
252. Lennon, C. W. & Belfort, M. Inteins. *Curr Biol* **27**, R204–R206 (2017).
253. Di Ventura, B. & Mootz, H. D. Switchable inteins for conditional protein splicing. *Biol Chem* **400**, 467–475 (2019).
254. Riss, T. L. *et al.* Cell Viability Assays. *Assay Guidance Manual* (2016).
255. Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L. & Blázquez-Castro, A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem* **120**, 159–167 (2018).
256. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55–63 (1983).
257. Schellekens, G. A., De Jong, B. A. W., Van Den Hoogen, F. H. J., Van De Putte, L. B. A. & Van Venrooij, W. J. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J Clin Invest* **101**, 273–281 (1998).
258. Zamvil, S. S. *et al.* T-cell epitope of the autoantigen myelin basic protein that induces encephalomyelitis. *Nature* **324**, 258–260 (1986).
259. Blombery, P. A., Wall, M. & Seymour, J. F. The molecular pathogenesis of B-cell non-Hodgkin lymphoma. *European Journal of Haematology* vol. 95 280–293 Preprint at <https://doi.org/10.1111/ejh.12589> (2015).
260. Dameshek, W. & Schwartz, R. S. Leukemia and Auto-Immunization. Some Possible Relationships. *Acta Haematol* **24**, (1960).

261. Thurner, L. *et al.* Identification of the atypically modified autoantigen Ars2 as the target of B-cell receptors from activated B-cell-type diffuse large B-cell lymphoma. *Haematologica* **106**, 2224–2232 (2021).
262. Thurner, L. *et al.* Hyper- N-glycosylated SAMD14 and neurabin-I as driver autoantigens of primary central nervous system lymphoma. *Blood* **132**, 2744–2753 (2018).
263. FDA Grants Full Approval to ONTAK® (denileukin diftitox) For Use in Patients with Cutaneous T-Cell Lymphoma (CTCL) | News Release : 2008 | Eisai Co., Ltd. <https://www.eisai.com/news/news200856.html>.
264. FDA Approves Denileukin Diftitox in R/R Cutaneous T-Cell Lymphoma. <https://www.cancernetwork.com/view/fda-approves-denileukin-diftitox-in-r-r-cutaneous-t-cell-lymphoma>.
265. Prince, H. M. *et al.* Phase III placebo-controlled trial of denileukin diftitox for patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology* **28**, 1870–1877 (2010).
266. Kaminetzky, D. & Hymes, K. B. *Denileukin Diftitox for the Treatment of Cutaneous T-Cell Lymphoma. Biologics: Targets & Therapy* vol. 2 <https://www.dovepress.com/> (2008).
267. Lin, A. Y. & Dinner, S. N. Moxetumomab pasudotox for hairy cell leukemia: preclinical development to FDA approval. *Blood Adv* **3**, 2905–2910 (2019).
268. Jen, E. Y. *et al.* FDA approval summary: Tagraxofusp-erzs for Treatment of Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm. *Clinical Cancer Research* **26**, 532–536 (2020).
269. Connors, J. M. *et al.* Brentuximab Vedotin with Chemotherapy for Stage III or IV Hodgkin's Lymphoma. *New England Journal of Medicine* **378**, 331–344 (2018).
270. Bundesausschuss, G. Brentuximab Vedotin (neues Anwendungsgebiet: Hodgkin-Lymphom, Erstlinie).
271. Vedotin, P. Stellungnahme zur erneuten Nutzenbewertung des G-BA von Arzneimitteln gemäß § 35a SGB V. (2024).
272. Tesirin, L. Stellungnahme zur Nutzenbewertung des G-BA von Arzneimitteln gemäß § 35a SGB V.
273. Refractory, / *et al.* The 66th ASH Annual Meeting Abstracts POSTER ABSTRACTS 627.AGGRESSIVE LYMPHOMAS: PHARMACOLOGIC THERAPIES Loncastuximab Tesirine in Combination with Venetoclax Is Safe and Shows Efficacy in Patients with Relapsed. *Blood* **144**, 4499–4500 (2024).
274. Search for: immunotoxin therapy | List Results | ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/search?intr=immunotoxin%20therapy&viewType=Table>.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich für die vielfältige Unterstützung bedanken, die mir zu Teil geworden ist, um den Abschluss meiner Dissertationsarbeit in dieser Form möglich zu machen.

Nicht nur für seine Geduld, sondern insbesondere für seine Bereitschaft, mir diese Dissertation unter seiner Betreuung zu ermöglichen und mir während dieser gesamten Zeit stets mit konstruktiver Kritik und freundlichen Ratschlägen zur Seite zu stehen, gilt mein aufrichtiger Dank meinem Doktorvater **Prof. Dr. Lorenz Thurner**, Leitender Oberarzt der Klinik für Hämato-Onkologie und Rheumatologie des Universitätsklinikums des Saarlandes. Die Zeit unter seiner Anleitung im José-Carreras-Zentrum und in der Klinik war auf professioneller und persönlicher Ebene eine nachhaltige Bereicherung.

Weiterhin danke ich dem gesamten **Team des José-Carreras-Zentrum für Immun- und Genterapie** für den mir zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz und die Vielzahl an bereitgestellten Materialien für meine Experimente. Im Besonderen möchte ich meinen Dank an **Evi Regitz** und **Natalie Fadle** hervorheben, die sich neben ihren beruflichen Aufgaben die Zeit genommen haben, mich hervorragend bei der Laborarbeit anzuleiten und stets geduldig für Rückfragen, Erklärungen und Unterstützung zur Verfügung zu stehen.

Beim **Institut universitaire de pathologie aus Lausanne (Schweiz)** und dem **Institut für Virologie des Universitätsklinikums Homburg** bedanke ich mich für die mir überlassenen Patientenproben zur Ausweitung meiner Arbeit

Aus meinem privaten Umfeld möchte ich meinen Dank **meinen Eltern, Carola und Harald Walczak und Lutz-Henning Bock** aussprechen, die nicht selten lange Diskussionen und Telefonate auf sich genommen haben, um mir mit aufbauenden und motivierenden Gesprächen zur Seite zu stehen und deren allgegenwärtige liebevolle Unterstützung mir meinen bisherigen Lebensweg erst ermöglicht habt.

Insbesondere danke ich **meinem älteren Bruder, Lennart Bock**, dessen pragmatisches und diszipliniertes Vorgehen während seiner eigenen Promotion mit dem allgegenwärtigen Motivationsspruch „Dann mach’s doch einfach trotzdem.“ mir ein wichtiges Vorbild und moralischer Ansporn war und mit dem ich die verschiedenen Möglichkeiten der Datenauswertung diskutieren konnte.

Zuletzt gilt mein Dank meinem langjährigen und guten Freund **Jan-Ole Niet**, für die differenzierte Durchsicht dieser Arbeit und wertvollen Anmerkungen, sowie die abschließende Unterstützung bei der Layout-Optimierung.

Publikationen

B-cell receptors of EBV-negative Burkitt lymphoma bind modified isoforms of autoantigens.
EJHaem. 2022 Jun 16;3(3):739-747. doi: 10.1002/jha2.475. PMID: 36051037; PMCID: PMC9421956.

Bock T, Bewarder M, Cetin O, Fadle N, Regitz E, Schwarz EC, Held J, Roth S, Lohse S, Pfuhl T, Wagener R, Smola S, Becker SL, Bohle RM, Trümper L, Siebert R, Hansmann ML, Pfreunds Schuh M, Drexler HG, Hoth M, Kubuschok B, Roemer K, Preuss KD, Hartmann S, Thurner L.

LRPAP1 is a frequent proliferation-inducing antigen of BCRs of mantle cell lymphomas and can be used for specific therapeutic targeting

Leukemia. 2019 Jan;33(1):148-158. doi: 10.1038/s41375-018-0182-1. Epub 2018 Jun 28. PMID: 29955130.

Thurner L, Hartmann S, Fadle N, Kemele M, Bock T, Bewarder M, Regitz E, Neumann F, Nimmesgern A, von Müller L, Pott C, Kim YJ, Bohle RM, Wasik M, Schuster SJ, Hansmann ML, Preuss KD, Pfreunds Schuh M.

Ars2-containing bispecific, Fab- and IgG1-format BAR-bodies to target DLBCL cells.

EJHaem. 2022 Dec 27;4(1):125-134. doi: 10.1002/jha2.635. PMID: 36819155; PMCID: PMC9928785.

Kiefer M, Thurner L, Bock T, Cetin O, Kos I, Lesan V, Kaddu-Mulindwa D, Bittenbring JT, Fadle N, Regitz E, Hoth M, Neumann F, Preuss KD, Pfreunds Schuh M, Christofyllakis K, Bewarder M.

Poster und Vorträge

Case report: Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) in a patient with metastatic renal cell cancer undergoing therapy with dual immune checkpoint-inhibition.

Bock T, et al., Oncology Research and Treatment 44 (Suppl. 2): 230 (plus poster) abstr. ep644, 2021.

Available from: URL: <http://doi.org/10.1159/000518417>

Posttranslational modifizierte Neoantigene als Zielstrukturen von BZRs sporadischer Burkitt-Lymphome

Vortrag, DGHO-Jahrestagung 2019

Bock T., Hartmann S., Bewarder M., Rixecker T., Fadle N., Kemele M., Regitz E., Smola S., Pfuhl T., Held J., Bohle R.M., Wagener R., Siebert R., Hansmann M.-L., Stilgenbauer S., Kubuschok B., Preuss K.-D., Thurner, Lorenz

Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht