

Aus der ASKLEPIOS-Klinik St. Georg
Abteilung für Hämatologie und Stammzelltransplantation
(Direktor: Prof. Dr. med. Norbert Schmitz)

**Charakterisierung von tumorspezifischen humoralen
Immunantworten gegen den immaturen Lamininrezeptor bei
Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Ilja Ralf Jacob

aus Bonn

Kiel 2009

1. Berichtstatter:	Prof. Dr. Matthias Zeis
2. Berichtstatter:	Prof. Dr. Harald Schöcklmann
Tag der mündlichen Prüfung:	22.09.2010
Zum Druck genehmigt, Kiel, den	22.09.2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Die chronische lymphatische Leukämie – Grundsätzliches.....	6
1.2	Tumorimmunologische Grundlagen	8
1.3	Tumorantigene bei der CLL und der immature Lamininrezeptor (iLR).....	9
2	Fragestellung	11
3	Patienten, Material und Methoden	12
3.1	Methodisches Vorgehen.....	12
3.2	Patienten.....	13
3.3	Material	14
3.3.1	Peptide.....	14
3.3.2	Antikörper und rekombinante Proteine	14
3.3.3	Phosphat-Puffer.....	15
3.3.4	Waschpuffer	15
3.3.5	Häufig verwendete Materialien und Geräte	15
3.4	Methoden.....	17
3.4.1	Aufreinigung von PBMZ aus EDTA-Blut und Kryokonservierung	17
3.4.2	Bestimmung der Zellzahl	18
3.4.3	Zytogenetische Analysen	18
3.4.4	Durchflusszytometrische Untersuchung der PBMZ	18
3.4.5	Entnahme und Kryokonservierung von Seren	19
3.4.6	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).....	19
3.4.6.1	iLR-Epitopmapping-ELISA	20
3.4.6.2	IgG-Subtypenanalyse im ELISA.....	20
3.4.6.3	ELISA-Inhibitions-Test.....	21

3.4.7	Western Blot-Analyse auf iLR-Expression und Antikörpernachweis auf rekombinantes iLR-Protein	21
3.4.8	Statistik.....	22
4	Ergebnisse.....	23
4.1	Expression von iLR auf normalen B-Lymphozyten und malignen Zellen der B-CLL.	23
4.2	Nachweis einer humoralen Immunantwort gegen das iLR-Protein in Seren von unbehandelten CLL-Patienten.....	25
4.2.1	iLR-reaktive Seren erkennen verschiedene Peptid-Epitope aus der iLR-Sequenz	26
4.2.2	Subklassen-Analyse iLR-spezifischer IgG-Antikörper.....	28
4.2.3	Untersuchungen zur Spezifität der iLR-reaktiven Antikörper	29
4.3	Zusammenhang zwischen humoraler Immunreaktivität gegen das iLR-Protein und der Dauer des progressionsfreien Überlebens	32
5	Diskussion	35
5.1	Tumorantigene bei der CLL und der immature Lamininrezeptor.....	35
5.2	Nachweis humoraler Immunität gegen den iL-Rezeptor bei unbehandelten CLL-Patienten	36
5.3	Induktion einer humoralen antitumoralen Immunität – ein günstiger Prognosefaktor?	38
5.4	Defiziente adaptive Immunität bei CLL-Patienten	39
5.5	Fazit und klinische Konsequenzen	42
6	Zusammenfassung	43
7	Anhang.....	44
8	Literaturverzeichnis.....	46
9	Danksagung	58
10	Lebenslauf	59

Abkürzungsverzeichnis

AG	Antigen
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
B-CLL	B-Zelllinien spezifische CLL
CD	Cluster of Differentiation
CLL	chronische lymphatische Leukämie
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat, ein Komplexbildner
ELISA	Enzyme linked Immunoabsorbent Assay
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorter
FCS	fötales Kälberserum
HIV	humanes Immundefizienz Virus
Id	Idiotyp
Ig	Immunglobulin
IgV _H	Immunglobulin-Schwerketten
iLR(P)	immaturer Lamininrezeptor(protein)
kDa	Kilodalton (Einheit)
M/mM	Mol/Milimol
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
OD	Optische Dichte oder Extinktion
OFA	Onkofetales Antigen
PBMZ	Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut
PFS	Progressionsfreies Intervall (bis zum Fortschreiten der Erkrankung)
SZT	Stammzelltransplantation
T _H	T-Helferzelle

1 Einleitung

1.1 Die chronische lymphatische Leukämie – Grundsätzliches

Definition. Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) ist ein niedrigmalignes, zumeist B-Zelllinien (B-CLL) spezifisches Non-Hodgkin-Lymphom. Kennzeichnend ist eine klonale Proliferation und Akkumulation von reif erscheinenden, jedoch genetisch und funktionell defekten, immuninkompetenten B-Lymphozyten in den lympho-hämatopoetischen Kompartimenten (Blut, Knochenmark, Milz, Lymphknoten). Die CLL stellt mit einer jährlichen Inzidenz von 3–6/100.000 Neuerkrankungen das häufigste Non-Hodgkin-Lymphom (11 %) und die häufigste Leukämieform der westlichen Hemisphäre dar (Morton et al., 2006; Byrd et al., 2004; Hallek et al., 2002). Der Altersmedian liegt bei ca. 65 Jahren, wobei aber auch wesentlich jüngere Patienten betroffen sein können (Mauro et al., 1999; Keating et al., 2003). Der natürliche Verlauf der Erkrankung ist langsam; die mittlere Überlebenszeit beträgt ca. zehn Jahre (Mitterlechner et al., 2006; Montserrat, 2004). Liegen allerdings ein fortgeschrittenes Stadium (Stadium B oder C nach der Binet-Klassifikation- s. auch Anhang Tab. 7, Binet et al., 1977) und weitere prognostisch ungünstige Faktoren (s. unten) vor, ist von einem wesentlich ungünstigeren Krankheitsverlauf auszugehen, der eine frühzeitige Behandlung des Malignoms erforderlich macht (Stevenson et al., 2004). Die große klinische Variabilität und Heterogenität des Krankheitsbildes stellt die wesentliche Rationale für die Suche nach verlässlichen biologischen Prognosefaktoren dar, um die Patienten risikoadaptiert einer optimalen Behandlungsmodalität zuzuführen (Tobin et al., 2005; Chiorazzi et al., 2005). Im Laufe der letzten Jahre konnte dabei eine Reihe von ungünstigen Prognosefaktoren identifiziert werden, wie eine schnelle Lymphozytenverdoppelungszeit (< 12 Monate), erhöhte β 2-Mikroglobulinkonzentration, definierte chromosomale Aberrationen, wie insbesondere 11q- und 17p-, und wie die Expression von ZAP-70 und CD38 (Byrd et al., 2004; Binet et al., 2006; Chiorazzi et al., 2005; Cheson et al., 1996; Crespo et al., 2003; Dhodapkar et al., 1993; Juliusson et al., 1990; Hallek et al., 2002; Döhner et al., 2000; Lin et al., 2002; Stilgenbauer und Döhner, 2004; Gachard et al., 2008). Neben den chromosomalen Veränderungen gilt der Mutationsstatus der schweren Immunglobulinketten-Gene (sog. IgV_H-Gene) als einer der wichtigsten prognostisch verwertbaren Parameter (Tobin et al., 2005). Dies führte zu einer Einteilung der CLL in eine Form der unmutierten CLL (UCLL) mit einer geringen Mutationsrate der IgV_H-Gene (> 98 % Homologie der IgV_H-Gene) und eine Form der mutierten CLL (MCLL, Homologie < 98 %) (Schroeder et al., 1994; Montserrat et al.,

2006). Dabei konnte gezeigt werden, dass das langfristige Überleben von Patienten mit einer UCLL signifikant geringer ist als bei CLL-Patienten mit einem mutierten IgV_H-Status (Hamblin et al., 1999; Damle et al., 1999; Tobin et al., 2005; Stilgenbauer und Döhner, 2004).

Therapiekonzepte bei der B-CLL. Trotz der Einführung innovativer Therapiekonzepte bleibt die CLL nach wie vor ein meist inkurables hämatologisches Malignom (Montserrat et al., 2006). Für die Primärtherapie ergeben sich unter Berücksichtigung von Parametern wie Alter, Krankheitsaktivität, Stadium und Begleiterkrankungen verschiedene Therapiemodalitäten: Das Prinzip der Beobachtung ohne Therapie („watch and wait“) gilt insbesondere für asymptomatische Patienten im frühen Krankheitsstadium. Bei symptomatischen Patienten (gehäufte fieberhafte Infekte als Zeichen einer tumorassoziierten Immunsuppression, Vorliegen einer B-Symptomatik mit Nachtschweiß und Gewichtsabnahme > 10 % innerhalb von sechs Monaten, lymphomassoziierte Schmerzen und Organfunktionseinschränkungen) bietet sich eine Vielzahl von Therapiestrategien, die von einer Monotherapie mit Chlorambucil über fludarabinhaltige Polychemotherapieprotokolle (Wendtner et al., 2004; Hallek et al., 2004; Eichhorst et al., 2006) bis hin zur autologen und allogenen Blutstammzelltransplantation (SZT) reichen. Momentan scheint eine langfristige, komplette Eliminierung residualer B-CLL-Zellen sich nur durch das Konzept der allogenen SZT nach Einsatz einer myeloablativen Hochdosischemotherapie verwirklichen zu lassen. Diese eignet sich vor allem bei jüngeren Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung (Jantunen et al., 2006; Robak, 2006; Montserrat et al., 2006; Döhner et al., 2000). Dosisreduzierte Konditionierungsregime konnten hier zu einer relevanten Reduktion der transplantationsassoziierten Mortalität führen (Dreger et al., 2003), so dass auch ältere Patienten einer allogenen SCT zugeführt werden können (Dreger et al., 2007). Ein weiterer Ansatz gelang mit der Einführung der monoklonalen Antikörper Rituximab (anti-CD20) und Alemtuzumab (anti-CD52). Beide Antikörper dienten primär als Monotherapeutikum bei Patienten mit rezidivierend aufgetretener CLL. Mit Rituximab liegen jedoch auch Studienerfahrungen in der Primärtherapie in Kombination mit fludarabinhaltigen Polychemotherapieprotokollen vor. Diese zeigen eine Erhöhung der Rate der Patienten mit Auftreten einer kompletten Remission und eine Verlängerung des progressionsfreien Intervalls (PFS) (Christian et al., 2008).

1.2 Tumorimmunologische Grundlagen

Es ist bislang unklar, ob und inwieweit eine immunologische Kontrolle durch das körpereigene Immunsystem zu dem variablen klinischen Erscheinungsbild der B-CLL beiträgt, jedoch gibt es schon seit längerem Hinweise auf eine permanente Auseinandersetzung des Immunsystems mit körpereigenen, maligne entarteten Zellen. Theorien, wie das Konzept der „Cancer Immune Surveillance“ von Burnet (Burnet, 1957, 1964), gehen davon aus, dass das Immunsystem befähigt ist, Tumorzellen zu eliminieren. Andere Immunologen propagieren, wie mit dem Konzept des „Cancer Immuno-Editing“ (Dunn et al., 2002, 2004), einen dynamischen Wechselprozess zwischen Immunsystem und Tumorzellen (Ichim, 2005). Dabei käme es entweder zur direkten Elimination, zur zeitlich begrenzten proliferatorischen Kontrolle (Equilibrium) oder aber zum „Escape“ des Tumors. Damit gemeint ist der Entzug aus der immunologischen Kontrolle durch veränderte Eigenschaften, wie z.B. durch reduzierte Expression von MHC-Molekülen oder definierten kostimulierenden Molekülen (Becker et al., 1993; Garrido et al., 1997). In den vergangenen Jahren konnten von verschiedenen Forschergruppen Hinweise auf eine derartige Auseinandersetzung zwischen dem Immunsystem und malignen Zellen gefunden werden. So konnte u.a. gezeigt werden, dass beim diffus großzelligen B-Zell-Lymphom eine erhöhte peritumorale Infiltration mit T-Helfer-Zellen, die als Hinweis für einen solchen Wechselprozess gewertet wurden, mit einem verbesserten Langzeitüberleben der Patienten assoziiert ist (Ansell et al., 2001).

Neben Studien über die Interaktion des Tumors mit dem T-Zell-Arm des adaptiven Immunsystems (Le Dieu et al., 2006; Radford et al., 2005) wurden in den letzten Jahren zunehmend Untersuchungen durchgeführt, die den Einfluss einer humoralen, d.h. antikörperabhängigen, Immunantwort auf die Kontrolle von Tumorzellen propagieren. So konnte die Forschergruppe um Sugiyama belegen, dass Patienten mit akuter myeloblastischer Leukämie tumorspezifische Antikörper gegen das in zahlreichen malignen Myeloblasten hochgradig exprimierte Wilms Tumor 1 Protein (WT1) entwickeln (Elisseeva et al. 2002). Andere Arbeitsgruppen berichteten von tumorantigenspezifischen antikörpervermittelten Immunantworten bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie oder multiplem Myelom, die nach einer allogenen Blutstammzelltransplantation zusätzliche Lymphozytentransfusionen desselben Spenders erhielten (Wu et al., 2000; Bellucci et al., 2004). Bei Patienten mit CLL existieren bislang nur wenige Studien, die den Einfluss der humoralen Immunantwort auf die CLL untersuchen.

Zur Messung tumorspezifischer humoraler Immunität ist jedoch die Verfügbarkeit eines definierten Tumorantigens, welches von dem jeweiligen Tumor des Interesses exprimiert wird, obligat (Friedrichs et al., 2006).

1.3 Tumorantigene bei der CLL und der immature Lamininrezeptor (iLR)

Tumorantigene sind quantitativ und/oder qualitativ veränderte Proteine, die vermehrt oder exklusiv in oder auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert werden und spezifisch vom adaptiven Immunsystem erkannt werden (Coggin et al., 2005a; Radford et al., 2005). Bei hämatologischen Neoplasien lassen sich überexprimierte Antigene von genetisch alterierten und individualspezifischen Antigenen unterscheiden. Bei der CLL ist die Zahl der bekannten Tumorantigene limitiert. Die drei Wesentlichen sind im Nachstehenden charakterisiert:

Epitope aus der Immunglobulin-Schwerkette. Die für jede B-Zell-Neoplasie spezifische hypervariable Region (CDRIII-Region, engl.: complementary determining region) aus der Immunglobulin-Schwerkette stellt ein für jede CLL *individualspezifisches Tumorantigen* dar. Es gelang bei mehreren Patienten autologe T-Lymphozyten nachzuweisen, die befähigt waren, Strukturen der CDRIII-Region spezifisch im Kontext des Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Klasse I- und Klasse II-Moleküls zu erkennen (Rezvany et al., 2000; Hansson et al., 2003).

Survivin gehört zu der Inhibitor-of-Apoptosis-Proteinfamilie und wird zyklusabhängig von einer Vielzahl maligner Neoplasien hochreguliert, während es in adulten, terminal differenzierten Gewebszellen nicht nachweisbar ist (Friedrichs et al., 2006; Casati et al., 2003). Jüngste Befunde belegen, dass insbesondere jene CLL-Zellen eine hohe Survivinexpression aufweisen, die einen veränderten Karyotyp (Deletion am Chromosom 13 und 17) aufweisen (Stilgenbauer und Döhner, 2004).

Der *immature Lamininrezeptor* (iLR) ist ein hochkonserviertes Protein, das erstmals synonym als onkofetales Antigen (OFA) beschrieben wurde (Coggin et al., 1971). Der iLR wird ubiquitär im fetalen Gewebe sowie von nahezu allen Tumoren exprimiert, während er auf gesunden adulten Gewebszellen nicht nachgewiesen werden konnte (Coggin et al., 1998, 1999, 2005b; Zelle-Rieser et al., 2001; Siegel et al., 2003). Durchflusszytometrische Untersuchungen weisen daraufhin, dass der überwiegende Anteil (> 90 %) der untersuchten CLL-Zellen in hoher Dichte das iLR-Protein exprimiert. Aufgereinigte B-Lymphozyten gesunder Spender, Monozyten, Granulozyten, CD34⁺ und T-Lymphozyten zeigten hingegen

keine nachweisbare Expression von iLR (Siegel et al., 2003). Weitere Studien ergaben, dass das iLR-Protein eine spezifische T-Zell-vermittelte Immunantwort induzieren kann. So wurden gesunde Balb/c-Mäuse mit syngenem, bestrahltem OFA/iLRP hochexprimierenden Tumorzellen immunisiert. Diese Behandlung hatte eine kreuzprotektive T-Zell-vermittelte Immunität gegen ein Spektrum iLR-exprimierender Tumorzellen zur Folge, während eine spezifische Immunantwort gegen iLR-Protein-negative Tumoren ausblieb (Rohrer et al., 1994, 2001; Coggin et al., 1988). In neueren Studien ließen sich in Tieren, die mit rekombinant synthetisiertem iLR-Protein immunisiert wurden, eine dosisabhängige, iLR-spezifische humorale sowie eine von CD8⁺-T-Lymphozyten vermittelte Immunantwort nachweisen (Rohrer et al., 2001, 2006). In präklinischen Studien der Arbeitsgruppe um Zeis konnten iLR-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL) generiert werden, die befähigt waren, iLR-exprimierende Leukämiezellen selektiv abzutöten (Siegel et al., 2003, 2006).

2 Fragestellung

Der immature Lamininrezeptor stellt, wie oben aufgezeigt, aufgrund seines tumorselektiven Expressionsprofils und seiner dokumentierten Immunogenität eine interessante Zielstruktur für tumorimmunologische Studien bei Patienten mit einer B-CLL dar. Schwerpunkt der Arbeit war die in vitro Analyse der humoralen Immunantwort gegen den immaturren Lamininrezeptor bei unbehandelten Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie.

Im Einzelnen sollten folgende Fragen untersucht werden:

1. Liegt eine Expression von iLR auf B-CLL-Zellen vor?
2. Lässt sich in Seren von unbehandelten CLL-Patienten eine anti-iLR-spezifische humorale Immunantwort nachweisen?
3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen der Dauer des progressionsfreien Überlebens (PFS) von CLL-Patienten und dem Nachweis von anti-iLR-Antikörpern in deren Seren?

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 Methodisches Vorgehen

Bei oben genannter Fragestellung wurde folgendes methodische Vorgehen festgelegt: Die Zell-Expression von iLR wurde mittels Durchflusszytometrie und Western Blot-Verfahren untersucht. Zur Detektion einer humoralen Immunantwort verwendeten wir verschiedene ELISA-Verfahren zur qualitativen und quantitativen Bestimmung. Die Analyse der progressionsfreien Intervalle erfolgte dann retrospektiv aus klinischen Aufzeichnungen. Zur Verdeutlichung dient Abb 1. In den folgenden Abschnitten sind die näheren Informationen zum verwendeten Patientengut und Material sowie die Methoden beschrieben.

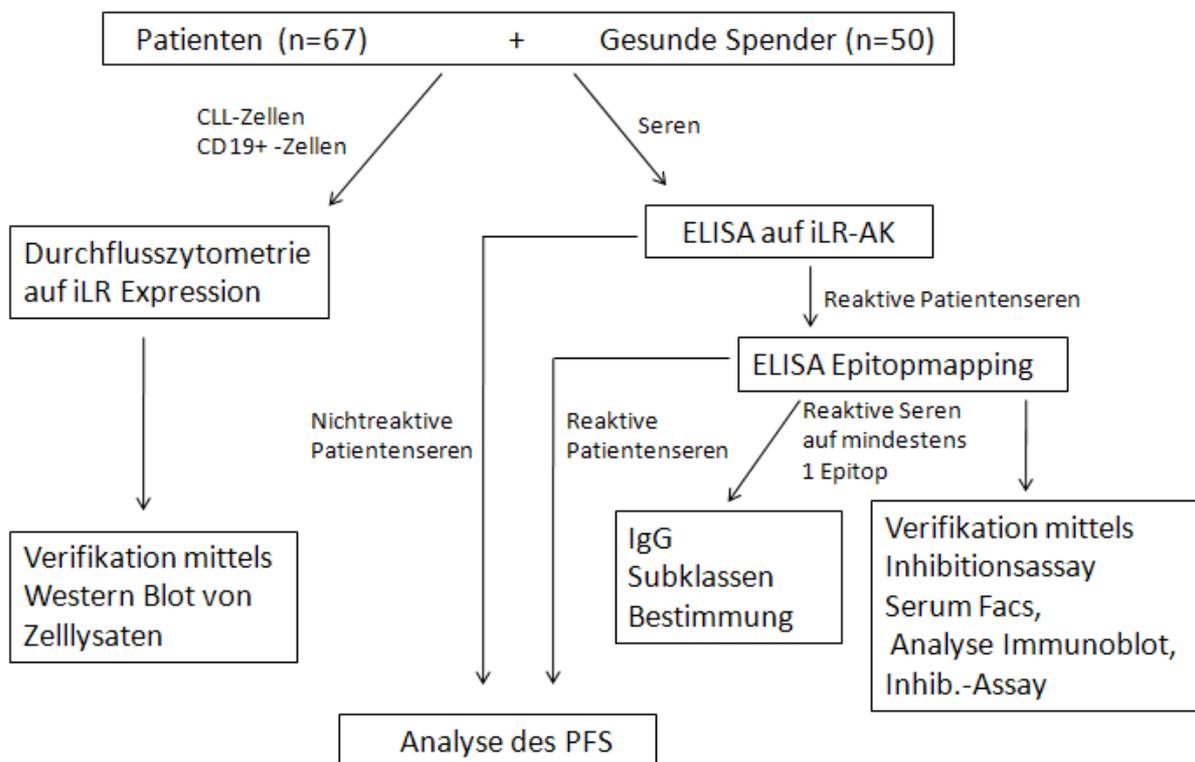


Abb. 1: Methodisches Vorgehen

3.2 Patienten

In dieser Studie erfolgte die retrospektive Analyse der peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMZ) sowie der Seren von 67 Patienten mit unbehandelter CLL und von 50 gesunden Spendern. Diese dienten als negative Kontrollgruppe. Die Diagnose und Einteilung der CLL war dabei schon nach den immunologischen und morphologischen Parametern der Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (Jaffe et al., 2002) erfolgt. Es lagen, abgesehen von drei Patienten, die Ergebnisse von allen Patienten hinsichtlich des Mutationsstatus der Immunglobulin-Schwerketten-Gene (IgV_H Gene) sowie die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen (FISH) zur Bestimmung des genetischen Risikoprofils vor. Die Patientencharakteristika sind Tab. 1 zu entnehmen. Klinische Aufzeichnungen dienten zur Bestimmung des progressionsfreien Überlebens. Alle Patienten wurden schriftlich nach den Richtlinien der Deklaration von Helsinki aufgeklärt. Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission (Hamburger Ärztekammer) genehmigt.

Patientencharakteristika	Anzahl	Prozent
Gesunde Spender:	50	
Patienten:	67	
Geschlecht		
Männlich	50	74,6 %
Weiblich	17	25,4 %
Männl./Weibl. Ratio	2,9 : 1	
Klin. Stadium bei Diagnose		
Binet A	60	89,5 %
Binet B	6	9,0 %
Binet C	1	1,5 %
Mutationsstatus		
Mutiert (< 98 % Homologie)	30	44,8 %
Biallelisch	1	
Unmutiert (> 98 % Homologie)	34	49,3 %
Biallelisch	1	
Nicht verfügbar	3	4,5 %
Zytogenetik		
Normal	26	38,8 %
Deletion 13q14	27	40,2 %
Deletion 11q	12	17,9 %
Deletion 17p	1	1,5 %
Trisomie 12	7	10,4 %

Tab. 1: Patientencharakteristika

3.3 Material

3.3.1 Peptide

Zur Durchführung des Epitopmappings wurden aus der Sequenz des humanen iLR-Proteins 42 Peptide mit einer Länge von 17–20 Aminosäuren synthetisiert (Peptide & Elephants, Berlin, Deutschland). Sie lagen in einer Reinheit von > 70 % und in 10 % Dimethyl Sulfoxid (DMSO) gelöst vor. Verdünnt mit Phosphat-Puffer wurden sie bei -20°C gelagert. Die Auswahl der Peptide erfolgte in der Art, dass sich die jeweils benachbarten Peptide um fünf Aminosäurenreste überlappten. In Tabelle 8 im Anhang sind die Aminosäurenlängen der Kandidatenpeptide zu entnehmen.

3.3.2 Antikörper und rekombinante Proteine

In dieser Arbeit wurden für die Analysen folgende Antikörper und Proteine verwendet:

Antikörper	Hersteller
Anti-OFA/iLRP-mAK (monoklonale Maus-AK)	Prof. Dr. J.H. Coggin, Mobile, Alabama, USA
Mouse anti-human IgG POD	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Mouse anti-human IgM POD	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Mouse anti-human IgG1POD - IgG4 POD	Cytomed, Berlin, Deutschland
Mouse anti-human CD38-PE	Caltag Lab., Burlingame, CA, USA
Mouse anti-human CD-19-PerCP/Cy5.5	Beckmann Coulter, Fullerton, USA
Rekombinantes Humanes iLR-Protein	Prof. Dr. J.H. Coggin, Mobile, Alabama, USA
Rekombinantes HIVpp24-Protein	Aalto, Dublin, Irland
Tetanus Toxoid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Horseradish Phosphatase-linked Goat anti-Maus IgG	Dianova, Hamburg, Deutschland

Tab. 2: Verwendete Antikörper

3.3.3 Phosphat-Puffer

Als Phosphat-Puffer (PBS) wurde Dulbecco's PBS ohne Zusatz von Kalzium und Magnesium verwendet (Instamed 9,55 g/l PBS Dulbecco, Biochrom AG, Berlin) und in Aqua dest. (Aqua Delta Select) gelöst.

3.3.4 Waschpuffer

Für alle Waschschrte im ELISA wurde PBS + 0,5 % TWEEN 20 als Waschpuffer verwendet.

3.3.5 Häufig verwendete Materialien und Geräte

Soweit im Text nicht anders angegeben, wurden die Materialien folgender Hersteller verwendet:

Produkt	Hersteller
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Mountain View, USA
Eppendorf Combitips Plus 5 ml, 10 ml, 25 ml	Eppendorf Biopur, Hamburg, Deutschland
24-well Zellkultur-Platten	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
96-well-Rundbodenplatte	Costar, Cambridge, USA
Nitrozellulosemembran	Machery & Nagel, Düren, Deutschland
96-well Nitrozellulose-Platten	Millipore, Billerica, MA, USA
10 ml Rundbodenröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon tube)	Becton Dickinson, Mountain View, USA
Seal Plate	ExcelScientific, Wrightwood, USA
96-well high binding ELISA-Platten	Greiner BioOne GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Tab. 3: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller, Firmensitz
FACScan Calibur (Durchflusszytometer)	Becton Dickinson, Mountain View, USA
Microplate Reader BIO-RAD Model 680	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Microplate Manager Vers. 5.2 Build 103	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Magnetically activated cell sorter (MACS)	Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Germany
McFreeze-Container	Nunc, Dänemark

Tab. 4: Geräte

Produkt	Hersteller, Firmensitz
Instamed 9,55 g/l PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Tween 20 (Polysorbat)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Aqua Delta Select	Delta Select GmbH, Dreieich, Deutschland
Fötale Kälber Serum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Salzsäure 1 mol/l	Merck, Darmstadt, Deutschland
Schwefelsäure 95–98 % reinst	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ficoll	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Substrate Reagent Pack	R&D Systems, Minneapolis, USA
FACSFlow™	Becton Dickinson, Mountain View, USA
FACSclean™	Becton Dickinson, Mountain View, USA
FACSRinse™	Becton Dickinson, Mountain View, USA
Reagenz-Set "Intraprep"	Beckmann Coulter, Fullerton, USA
Humanes β_2 -Mikroglobulin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
NaCl 0,9 % (Natriumchlorid)	Braun, Melsungen, Deutschland

EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Braun, Melsungen, Deutschland
TBS/T (Tris Buffered Saline/Tween 20)	BioRad, München, Deutschland
Mini Protease Inhibitor	Roche, Basel, Schweiz
Tryptanblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
ECL (Enhanced Chemiluminescence-Lösung)	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Nonident P-40	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

Tab. 5: Reagenzien

3.4 Methoden

3.4.1 Aufreinigung von PBMZ aus EDTA-Blut und Kryokonservierung

Durch das Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation wurden die korpuskulären Anteile des Blutes aufgetrennt. Mittels eines Dichtemediums, welches eine größere Dichte als periphere mononukleäre Zellen aus dem Blut (PBMZ) und eine geringere als die von Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten aufweist, erfolgte die Separation des im Verhältnis von 1:2 mit sterilem PBS verdünnten EDTA-Vollblutes. Jeweils 7 ml Blut wurden vorsichtig über 3 ml Separationsmedium in 10 ml Rundboden-Zentrifugenröhrchen geschichtet und anschließend 20 Min. bei 1000 G ohne Bremse zentrifugiert.

Die Interphase (Lymphozytenfraktion und Monozyten) wurde mittels einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die so gewonnenen PBMZ wurden mit sterilem PBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 800 G für 15 Min. mit Bremse zentrifugiert. Dieser Reinigungsschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Zur nachfolgenden Kryokonservierung wurde eine Zellkonzentration von 2×10^7 in 1 ml fötalem Kälberserum (FCS) + 20 % Dimethylsulfoxid (DMSO) eingestellt und zunächst mit dem McFreeze-Container (Nunc, Dänemark) auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. 24 Stunden später erfolgte die Lagerung in flüssigem Stickstoff. Die Technik des langsamen Einfrierens und des schnellen Auftauens ist ausschlaggebend für das Überleben der PBMZ. Die Isolierung und Auftrennung von CD19+ B-Zellen sowie die Isolierung von CD4+-, CD8+-, CD14+-,

CD56+-, und CD34+-Zellen erfolgte mittels eines Zell-Sortierers (MACS), womit Reinheitsgrade von > 90 % erreicht werden konnten.

3.4.2 Bestimmung der Zellzahl

Die jeweilige zu bestimmende Zellsuspension wurde 1:100 mit Tryptan-Blau verdünnt. Dazu wurden 990µl Trypanblau zu 10µl Leukozytengemisch in ein Eppendorf Röhrchen gegeben, durchmischt und davon 10µl in die Neubauer-Kammer (Superior) eingefüllt. Alle vier Quadranten mit 16 Einzelquadraten wurden in L-Form ausgezählt, durch vier geteilt. Das Ergebnis war gleich $\times 10^6$ /ml bei einer 1:100-Verdünnung.

3.4.3 Zytogenetische Analysen

Die zytogenetischen Untersuchungen auf die chromosomalen Veränderungen Deletion 11q, Trisomie 12, Deletion 13q und Deletion 17p erfolgten mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungsanalyse von Dr. M. Tiemann (Institut für Hämatopathologie, Hamburg).

3.4.4 Durchflusszytometrische Untersuchung der PBMZ

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (engl.: Fluorescence-Activated Cell Sorter, FACS) können prinzipiell alle Merkmale eines Partikels, die sich über Lichtbeugung, -streuung oder Fluoreszenz charakterisieren lassen, analysiert werden. Eine Charakterisierung der Größe sowie der Innenstruktur eines Partikels lassen sich auf diese Weise vornehmen. Durch Anfärbung definierter Strukturen mit speziellen Farbstoffen, gegebenenfalls unter Zuhilfenahme farbstoffmarkierter, monoklonaler Antikörper, ist eine weitere Differenzierung möglich. Die durchgeführten FACS-Untersuchungen dienten zur Bestimmung der Expression von iLR auf der Oberfläche von CLL-Zellen. Die Datenaquirierung und Verarbeitung aller durchflusszytometrischen Analysen erfolgte unter Anwendung des o.g. FACS-Gerätes, die Auswertung mittels CellQuest Pro Software (Becton Dickinson, Mountain View, USA).

Die Untersuchung der vorliegenden PBMZ von CLL-Patienten auf das Vorliegen einer iLR-Antigen Expression auf der Zelloberfläche erfolgte nach dem folgenden Procedere: Die vorliegende Zellsuspension wurde in ein Falcon Tube überführt und bei 2.200 U/Min. zehn Min. zentrifugiert. Nach Aufnahme der so gewonnenen Zellfraktion in 1 ml PBS + 1 % FCS

wurden diese gezählt (s.o.) und auf eine Zellkonzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden 100 μ l dieser Zellsuspension in einem FACS-Röhrchen über einen Zeitraum 30 Min. auf Eis mit jeweils 5 μ l anti-iLR-Antikörper inkubiert. Das sich hieran anschließende Waschen der Zellsuspension erfolgte unter Zugabe von 200 μ l PBS + 1 % FCS pro Röhrchen und anschließender 5-minütiger Zentrifugation bei 1.000 U/Min. Daraufhin wurde der Sekundärantikörper, ein FITC-konjugierter Goat-anti-Mouse-AK, in einer Verdünnung von 5 μ g auf 100 μ l PBS + 1 % FCS vorliegend, hinzugegeben und die Suspension für 15 Min. auf Eis gelegt. Nach erneutem zweimaligen Waschen der Zellen mit 200 μ l PBS + 1 % FCS erfolgte die Resuspendierung mit 200 μ l PBS + 1 % FCS + 2 % Paraformaldehyd und anschließend die Bestimmung der Fluoreszenzintensität mittels FACS-Analyse.

3.4.5 Entnahme und Kryokonservierung von Seren

Serumproben von gesunden Freiwilligen sowie von Patienten mit CLL wurden nach schriftlicher Einwilligung durch eine periphere Venen-Blutentnahme mit vorgesehenen Serumröhrchen entnommen. Die Seren wurden anschließend in 1 ml Röhrchen aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kryokonserviert.

3.4.6 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Die von den gesunden Freiwilligen sowie von den CLL-Patienten gewonnenen Serumproben wurden hinsichtlich einer möglichen anti-iLR-Reaktivität im standardisierten ELISA-Verfahren untersucht. Als Negativkontrolle diente die Untersuchung auf eine Reaktivität gegen das HIVpp24-Protein. Für die Positivkontrolle wurde das Tetanustoxoid verwendet. Es wurden jeweils Doppelwertbestimmungen durchgeführt. Der Test erfolgte auf 96well Mikrotiterplatten, die über Nacht (16 Std.) bei $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit dem rekombinanten, aufgereinigten, humanen iLR-Protein (in einer Konzentration von 6 μ g/ml), dem HIVpp24-Protein (1 μ g/ml) oder dem Tetanus-Toxoid (1 μ g/ml) inkubiert wurden. Es wurden pro Well 100 μ l der jeweiligen Lösung verwendet. Die Blockierung erfolgte durch die Zugabe von PBS mit 1 % BSA für zwei Std. bei Raumtemperatur. Verwendet wurden 200 μ l Lösung pro Well. Anschließend erfolgte ein Waschschrift, der in dem folgenden Procedere immer gleichartig verlief. Benutzt wurde hierbei eine PBS-Lösung mit 0,1 % Tween 20. Gewaschen wurde

insgesamt fünfmal mit jeweils 250 µl. Danach erfolgte die Inkubation der Proben mit dem jeweiligen Patientenserum. Dieses wurde dafür im Verhältnis 1:50 mittels einer 0,5 % Serumalbumin (BSA) in PBS Lösung verdünnt. Verwendet wurden jeweils 100 µl/well. Die Inkubation erfolgte für eine Std. bei +37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank. Nach einem Waschschrift erfolgte die Zugabe von Peroxydase-konjugiertem (POD) anti-human-IgG-AK (anti-human IgG-POD) bzw. anti-human IgM-POD-Antikörper für eine Std. bei Raumtemperatur. Die Antikörper wurden hierfür im Verhältnis 1:10⁵ in PBS verdünnt und jedes Well wiederum mit 100 µl der Lösung beschickt. Nach einem weiteren Waschvorgang erfolgte die Substratzugabe für die enzymatische Farbreaktion. Verwendet wurde hierfür das Substrate Reagent Pack (100 µl/well). Die Substratumsetzung erfolgte bei Raumtemperatur im Dunkeln für 15 Min. und wurde anschließend mit einer 1 mol H₂SO₄-Lösung (100 µl/well) gestoppt. Direkt im Anschluss erfolgte die photometrische Messung der Extinktion bei einer Referenzwellenlänge von 450 nm. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt

3.4.6.1 iLR-Epitopmapping-ELISA

Serumproben, in denen eine spezifische Immunantwort mittels des oben dargestellten ELISA nachgewiesen werden konnte, wurden in einem weiteren Schritt einem Epitopmapping mit 42 iLR-Kandidatenpeptiden unterzogen. Die Aufteilung der Peptide bezogen auf das Protein sind in Tab. 8 (siehe Anhang) aufgeführt. Das Procedere des Epitopmappings erfolgte analog des oben beschriebenen ELISA. Die jeweiligen Kandidatenpeptide (1–42) wurden in PBS gelöst und in einer Konzentration von 10 µg/ml zugeführt.

3.4.6.2 IgG-Subtypenanalyse im ELISA

Zur weiteren Spezifizierung der humoralen IgG-vermittelten Immunantwort wurden anschließend iLR-reaktive Seren hinsichtlich ihrer IgG-Subklassen untersucht. Dieses erfolgte ebenfalls mit Hilfe des oben beschriebenen ELISA-Verfahrens. Das Coating, der Blockvorgang und die Inkubation mit dem jeweiligen Serum der Platte entsprechen dem unter 3.3.6 beschriebenen Vorgehen. Es erfolgte anschließend eine Konjugation mit den verschiedenen anti-human IgG1- bis IgG4-Antikörpern. Die Antikörper lagen dabei in folgenden Konzentrationen vor: anti-human IgG1 POD 1 zu 1.000 in PBS verdünnt; anti-human IgG2 POD 1 zu 2.000 in PBS verdünnt; anti-human IgG3 POD 1 zu 500 in PBS verdünnt; anti-human IgG4 POD 1 zu 2.000 in PBS verdünnt. Auch hier erfolgte die

Konjugation bei Raumtemperatur für eine Std. mit 100 µl Lösung/well. Das weitere Procedere ist unter 3.4.6 beschrieben.

3.4.6.3 ELISA-Inhibitions-Test

Zur weiteren Spezifizierung wurde das reaktive Serum von zwei unbehandelten CLL-Patienten einem Inhibitionstest unterzogen. Dazu wurde ein wie unter 3.4.6 beschriebener Standard-ELISA durchgeführt. Dem ELISA der beiden Patientenseren wurden im Rahmen dieser Untersuchung rekombinantes iLR-Protein, HIV-p24 Protein oder β 2-Microglobulin hinzugefügt. Dabei wurden die Proteine in steigenden Konzentrationen von 1 ng/well bis 10.000 ng/well mit den Reaktionsansätzen inkubiert. Beobachtet wurde daraufhin, ob eine hemmende Wirkung auf die Bindung der iLR-AK besteht. Bei negativer Hemmwirkung lässt sich somit auf weitere Spezifität schließen.

3.4.7 Western Blot-Analyse auf iLR-Expression und Antikörpernachweis auf rekombinantes iLR-Protein

Der Western Blot ist eine Methode zum Nachweis von Proteinen mit Hilfe von markierten Antikörpern nach Auftrennung der Proteine durch Elektrophorese. Verwendet wurde im Speziellen eine SDS-PAGE (engl. für sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis), eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese. Durch Anlegung einer Spannung wurden die Proteine aufgetrennt und anschließend auf eine entsprechende Membran (hier: Nitrocellulose) transferiert. Nach Bindung von spezifischen Antikörpern können dann die Proteine oder Proteinfractionen sichtbar gemacht werden. Diese Methode diente in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis einer iLR-Expression in Lysaten von normalen B-Lymphozyten und B-CLL-Zellen sowie zum Nachweis der Spezifität iLR-reaktiver Seren.

Zur Erstellung eines Zelllysates wurden die zu untersuchenden Zellen auf eine Konzentration von 1×10^7 /ml eingestellt und mit einem Lysepuffer versetzt, bestehend aus 50 mM Tris-HCL (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1 % Nonidet P-40, 2 mM EDTA (pH 8,0) und komplettem Mini Protease Inhibitor. Die so gewonnenen Zelllysate-Proteine für die Expressionsuntersuchungen oder die rekombinanten iLR-Proteine für die Antikörpernachweisuntersuchungen wurden im Nassblotverfahren mittels 12 % Gel in SDS-PAGE durch Anlegen einer konstanten Spannung

von 100 V an die gekühlte Blotkammer in 60 min separiert und auf eine Nitrozellulosemembran (Transferpuffer: 25 mM Tris, 0,2 M Glycin, 20 % Methanol) transferiert. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Membranen über Nacht in einer Lösung, bestehend aus 20 mM Tris (pH 8,0), 137 mM NaCl, 0,1 % Tween 20 und 5 % Trockenmilchpulver inkubiert.

Für die Expressionsuntersuchungen wurde der iLRP-Antikörper (mouse monoclonal anti-iLR-AK) in einer Konzentration von 0,75 µg/ml (in TBST und 5 % BSA) verdünnt und die Membran erneut über Nacht bei +4 °C inkubiert. Anschließend wurde der ungebundene Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit TBST entfernt. Daraufhin erfolgte in 45 Min. bei Raumtemperatur die Bindung des Zweit-Antikörpers, ein Horseradish-gebundener anti-Maus IgG-Sekundärantikörper der Ziege, der in einer Verdünnung von 1 zu 5.000 in TBST und Trockenmilchpulver vorlag. Die Visualisierung sämtlicher Immunoblots erfolgte mittels der Enhanced Chemiluminescence-Lösung (ECL) nach Anweisung des Herstellers.

Für die Detektion von anti-iLR-IgG-Antikörpern wurde die mit rekombinantem OFA-Protein beladene Membran eine Stunde lang mit in Milchpulverlösung im Verhältnis 1 zu 25 verdünntem Patientenserum versetzt und anschließend eine Stunde lang mit dem Sekundärantikörper, ein anti-human-IgG-POD der Maus, inkubiert.

3.4.8 Statistik

Um verlässliche Grenzwerte als Einschlusswerte (sogenannte Cut-off-Werte) für die im ELISA gemessenen Daten der optischen Dichte (sogenannte OD-Werte) zu ermitteln, wurden verschiedene statistische Ansätze unternommen. Diese Ansätze, wie die Auswahl des 95sten oder 99sten Wertes der Perzentile, der Wert der zweiten Standardabweichung der logarithmischen Verteilung oder das Verfahren mittels ROC (engl.: Receiver operating curve oder Receiver operating characteristic), ergaben geeignete Cut-off-Werte zwischen 0,06 und 0,13 für die OD. Im Hinblick auf die orientierende Untersuchungseigenschaft dieser Arbeit und zur Minimierung falsch positiver Ergebnisse, wurden OD-Werte von 0,11 für IgG und 0,13 für IgM als initiale Cut-off-Werte für eine positive Testung auf OFA-Antikörper definiert. Alle Messungen auf IgG und IgM-AK waren Doppelbestimmungen. Durch Bildung des Mittelwertes dieser ergab sich der verwendete OD-Wert. Der Student-T-Test war das

statistische Verfahren der Wahl, um Unterschiede hinsichtlich der iLR-Reaktivität zwischen gesunden Spendern und CLL-Patienten zu ermitteln.

Für die Analyse und den Vergleich des progressionsfreien Intervalls verwendeten wir das Verfahren nach Kaplan-Meier und dazu im Vergleich den Breslow-Test. Als progressionsfreies Intervall wird die Zeit von der Diagnosestellung bis zum Fortschreiten der Erkrankung, die letztmögliche Nachuntersuchung oder, unabhängig von den Ursachen, Tod des Probanden bezeichnet. Grundlagen hierfür bildeten vorhandene medizinische Aufzeichnungen. Die Untersuchung auf statistisch relevante Verteilungsunterschiede hinsichtlich des IgV_H-Status und der zytogenetischen Aberrationen zwischen den Versuchsgruppen erfolgte mit dem Fisher-Exakt-Test. Alle statistischen Analysen wurden mittels der SPSS/PC+ Software für Windows (Version 12.0) erstellt, und die statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert von $\leq 0,05$ bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 Expression von iLR auf normalen B-Lymphozyten und malignen Zellen der B-CLL

In einem ersten Schritt wurde die Frage untersucht, inwieweit maligne Zellen von Patienten mit unbehandelter chronischer lymphatischer Leukämie und aufgereinigte B-Lymphozyten von gesunden Spendern den immaturen Lamininrezeptor auf der Oberfläche exprimieren. Verwendet wurde dafür die Durchflusszytometrie unter Gebrauch des monoklonalen anti-iLR-spezifischen Antikörpers. Dabei konnte bei allen untersuchten 67 CLL-Patienten eine iLR-Expression nachgewiesen werden, während B-Lymphozyten aller gesunden Spender keine iLR-Expression zeigten. Die Rate der iLR-Expression bei den untersuchten B-CLL-Zellen variierte von Probe zu Probe von 15 % bis 98 % (Mittelwert: 63,3 %). Wie unter Kapitel 1.3 bereits dargestellt, konnte auch in früheren Versuchen keine iLR-Expression auf anderen hämatologischen Subpopulationen, darunter auch CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺, CD34⁺ und CD56-positive Zellpopulationen, gefunden werden. Als repräsentatives Ergebnis zeigt Abb. 2A die durchflusszytometrisch ermittelte iLR-Expression von vier CLL-Patienten und den CD19⁺-Zellen eines gesunden Spenders. Weiterhin wurde die iLR-Expression im Western Blot aus Zelllysaten von sechs CLL-Patienten und einem gesunden Spender gemessen. Dabei konnte bei allen untersuchten CLL-Proben, nicht jedoch im Zelllysate des gesunden Spenders,

eine spezifische Bande bei 37 Kilodalton (kDa) detektiert werden, was dem iLR-Protein zuzuordnen ist (Abb. 2B).

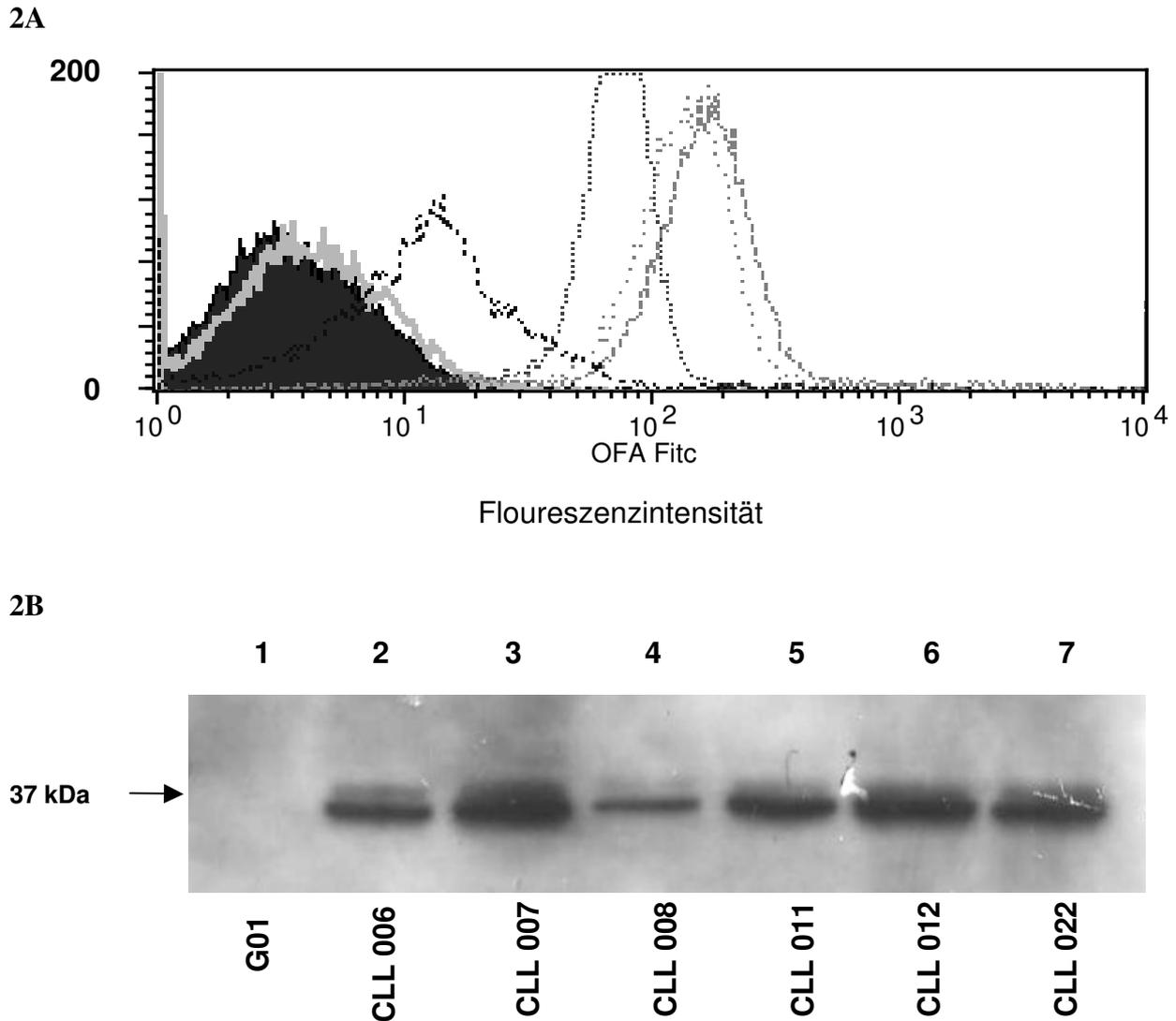


Abb. 2: Expression von iLR bei CLL-Patienten und gesunden Spendern

(A) FACScan von CD19⁺ Lymphozyten, schwarz-gefüllte Kurve: isotyp Kontrolle; graue Kurve: gesunder Spender; gepunktete Kurven: CLL-Patient 1–4.

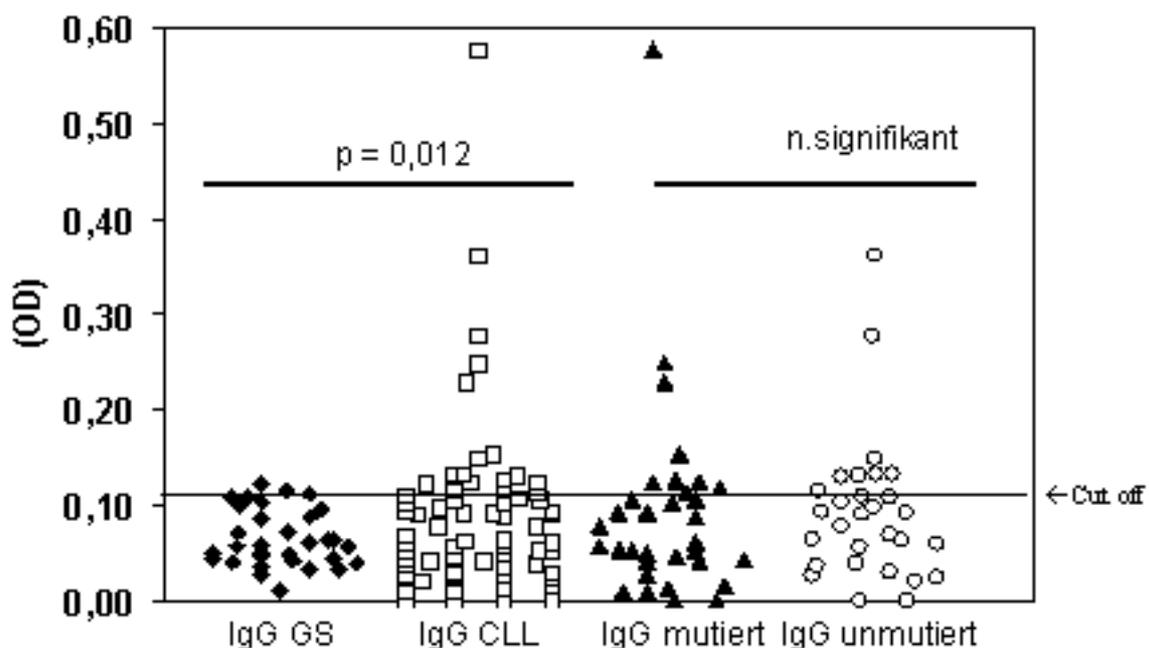
(B) Detektion von iLR im Western Blot: Zelllysate von einem gesunden Spender (Reihe 1) und verschiedenen CLL-Patienten (Reihe 2–7) wurde auf eine Nitrozellulose-Membran aufgebracht. Als primärer Antikörper diente der anti-iLR-monoklonale Maus-Antikörper.

4.2 Nachweis einer humoralen Immunantwort gegen das iLR-Protein in Seren von unbehandelten CLL-Patienten

Der Nachweis der durchgängigen iLR-Expression auf der Oberfläche von CLL-Zellen führt zu der Frage, ob sich eine anti-iLR-vermittelte humorale Immunantwort bei den CLL-Patienten nachweisen lässt. Zur Klärung wurde ein standardisierter ELISA mit den Serumproben der 67 CLL-Patienten und der 50 gesunden Spender durchgeführt. Abbildung 3 ist zu entnehmen, dass bei 22 der 67 unbehandelten CLL-Patienten (32,8 %) IgG-iLR-Antikörper (Abb. 3A) und bei 12 von 67 CLL-Patienten (17,9 %) eine IgM-vermittelte Immunantwort (Abb. 3B) gegen das iLR-Protein nachgewiesen werden konnte. Fünf der Patienten (7,4 %) wiesen dabei sowohl iLR-IgG- als auch iLR-IgM-Antikörper auf. Damit boten insgesamt 29 der 67 untersuchten Seren eine spezifische Reaktivität gegen das iLR-Protein. Demgegenüber konnten lediglich bei 4 der 50 gesunden Spender (8 %) anti-iLR-Titer ermittelt werden, die oberhalb des definierten Cut-off-Niveaus lagen. Die statistische Auswertung mittels Student-T-Test ergab damit signifikant höhere Werte für das Merkmal IgG-iLR-AK positiv ($p = 0,012$) und IgM-iLR-AK positiv ($p = 0,049$) gegenüber den gesunden Spendern.

Wie in Abb. 3 erkennbar, zeigten die Serumproben von Patienten mit mutiertem und unmutiertem Status der schweren Immunglobulinketten-Gene keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich einer iLR-Reaktivität.

3A



3B

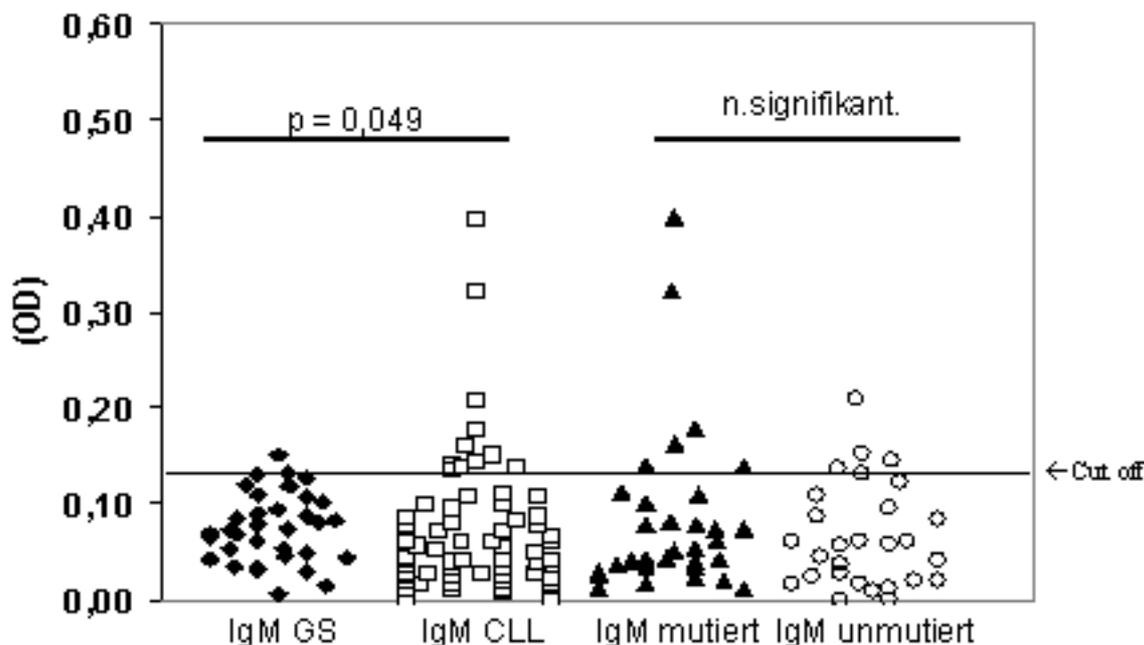


Abb. 3: Nachweis von anti-iLR-Antikörpern in Seren von unbehandelten CLL-Patienten.

Durch ELISA ermittelte Titer gegen das iLR-Protein für IgG- (3A)/IgM- (3B) iLR-AK bei 67 Patienten mit unbehandelter CLL und 50 gesunden Spendern (GS). Rechts sind jeweils die gemessenen OD-Werte nach dem Charakteristikum mutierter/unmutierter V_H -Gen-Status geordnet. Die schwarzen Balken zeigen die cut-off-Werte für IgG und IgM.

4.2.1 iLR-reaktive Seren erkennen verschiedene Peptid-Epitope aus der iLR-Sequenz

In einem weiteren ELISA wurden die 29 als positiv identifizierten Serumproben einem Epitopmapping unterzogen, um die Frage zu beantworten, welche Epitope der iLR-Sequenz von den nachgewiesenen Antikörpern erkannt werden können.

Hierzu wurde das iLR-Protein in 42 einander überlappende Peptide mit der Länge von 17 bis 20 Aminosäuren unterteilt (Peptide 1–42), die insgesamt die vollständige Sequenz des in den ELISA-Verfahren verwendeten rekombinanten OFA-Proteins wiedergeben. Die bekannten Charakteristika des iLR-Proteins, wie u.a. eine Transmembran-Domäne, die die Zellwand mit ihrem c-terminalen Ende zum extrazellulären Raum hin durchdringt, spiegeln in der Sequenz die Aminosäuren (AS) 86–101 wider. Abbildung 4 zeigt weitere Merkmale, wie zwei Laminin-Bindungsstellen (AS 161 bis AS 180 und AS 205 bis AS 229) und die am C-terminalen Ende lokalisierten repetitiven Sequenzen.

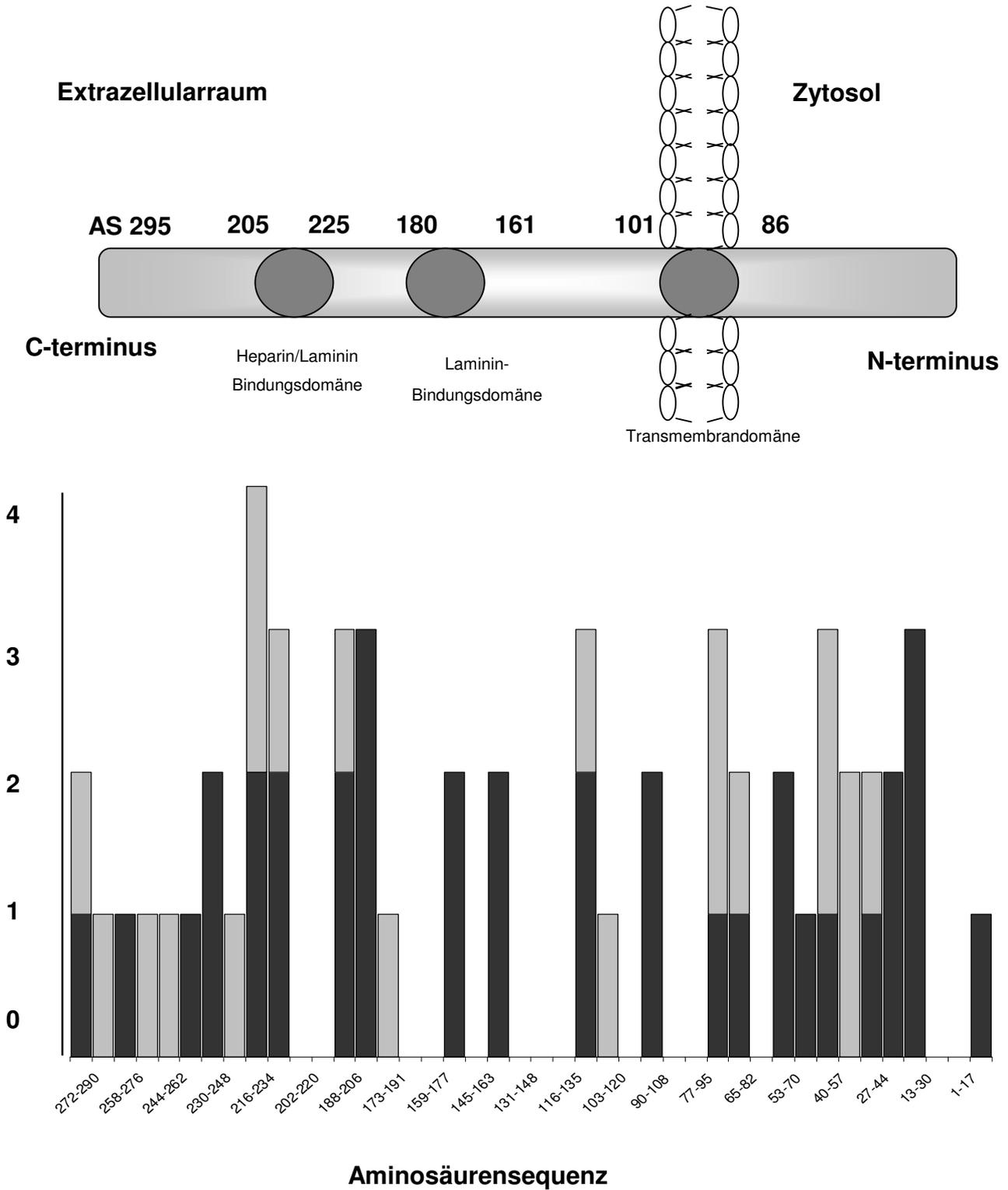


Abb. 4: Epitopmapping-Analysen iLR-reaktiver Serumproben von CLL-Patienten. Schematische Darstellung des iLR-Proteins und seiner funktionellen Domänen (oben). In Relation dazu zeigt sich die im ELISA gefundene Verteilung der nachgewiesenen reaktiven iLR-Epitope (unten).

Die durchgeführten ELISA-Epitopmapping-Analysen ergaben bei 18 von 29 CLL-Patienten eine Reaktion mit iLR-IgG-Antikörpern und bei 10 von 29 Patienten mit iLR-IgM-Antikörpern für distinkte Epitope. Bei fünf Patienten konnten sowohl eine IgG- als auch eine IgM-Antwort gegen ein bestimmtes Peptid-Epitop gemessen werden. Es zeigten sich somit 23 von den 29 Seren unbehandelter CLL-Patienten auf mindestens ein iLR-Epitop reaktiv, wobei jedoch 15 der 29 mehr als ein Peptid-Epitop erkannten. Es bleibt aber festzuhalten, dass der Großteil der reaktiven Seren lediglich eine spezifische Reaktivität gegenüber maximal zwei Epitopen aufwies. Hierbei waren die registrierten Epitope über die komplette iLR-Sequenz verteilt. Die Verteilung der erkannten Epitope in Bezug auf die funktionellen Domänen des iLR-Proteins und deren Orientierung zur Zelloberfläche zeigt Abb. 4. Keine der 20 untersuchten Serumproben gesunder Spender wies bei dem Epitopmapping eine spezifische Reaktivität auf (Daten nicht dargestellt). Zur Vermeidung falsch positiver, bzw. falsch negativer Ergebnisse wurden bei den weiterführenden Untersuchungen nur die 23 hier Epitop-reaktiven Seren verwendet.

4.2.2 Subklassen-Analyse iLR-spezifischer IgG-Antikörper

Alle 23 im Epitopmapping reaktiven Seren wurden zur Spezifizierung in einem weiteren ELISA der jeweiligen Subklassifizierung IgG1 bis IgG4 zugeordnet. Zu Kontrollzwecken wurden hierbei auch Serumproben von gesunden Spendern untersucht, obwohl diese keine Reaktion auf iLR im ELISA zeigten. Fasst man die jeweiligen maximalen Extinktionswerte für eine Subklasse jedes Patienten als dessen dominante IgG-Klasse auf, ergibt sich die in Abb. 5 dargestellte Verteilung der dominanten IgG-Subklassen. IgG1 stellte sich als die vorherrschende Subklasse bei 14 Patienten heraus, wohingegen die IgG3-Subklasse bei acht Patienten dominierend ausfiel. Bei fünf Patienten waren jedoch hohe Titer sowohl für IgG1 als auch für IgG3 messbar. IgG4 fand sich lediglich in einem, IgG2 bei keinem der 23 Patienten als vorherrschende IgG-Subklasse wieder.

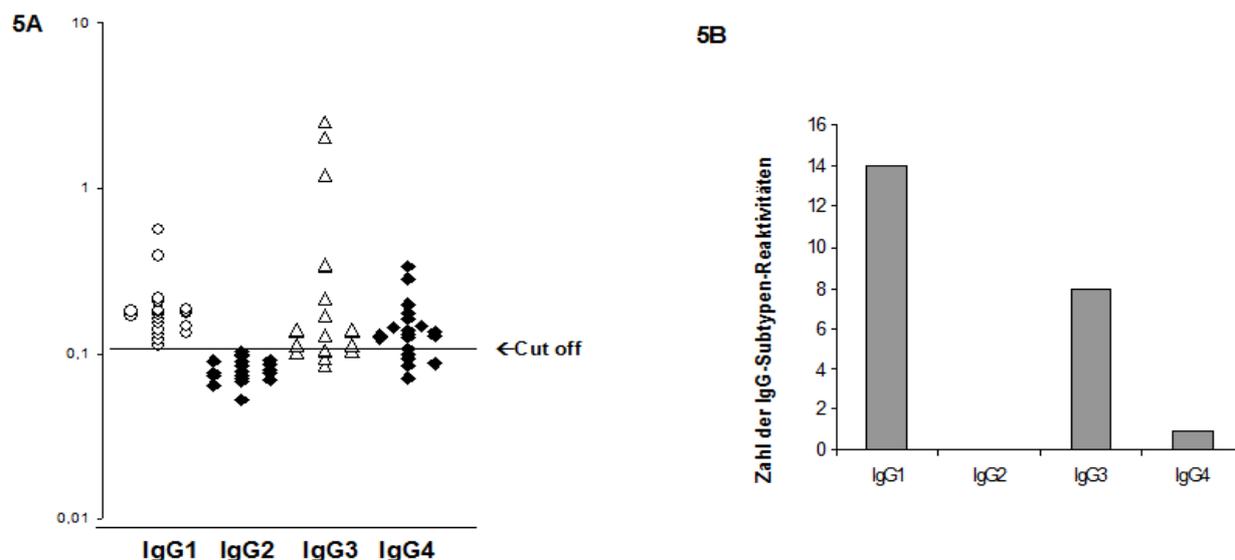


Abb. 5: IgG-Subklassen-Analyse iLR-reaktiver Seren von CLL-Patienten.

(A) Dargestellt sind die Analysen aller Patienten, deren Seren mindestens ein iLR-Peptid-Epitop spezifisch erkannten. Es sind die Werte für die optische Dichte für IgG1-, IgG2-, IgG3- und IgG4-OFA-AK logarhythmisch dargestellt.

(B) Zusammenfassung der jeweils dominanten IgG-Subklassen für die 23 CLL-Patienten.

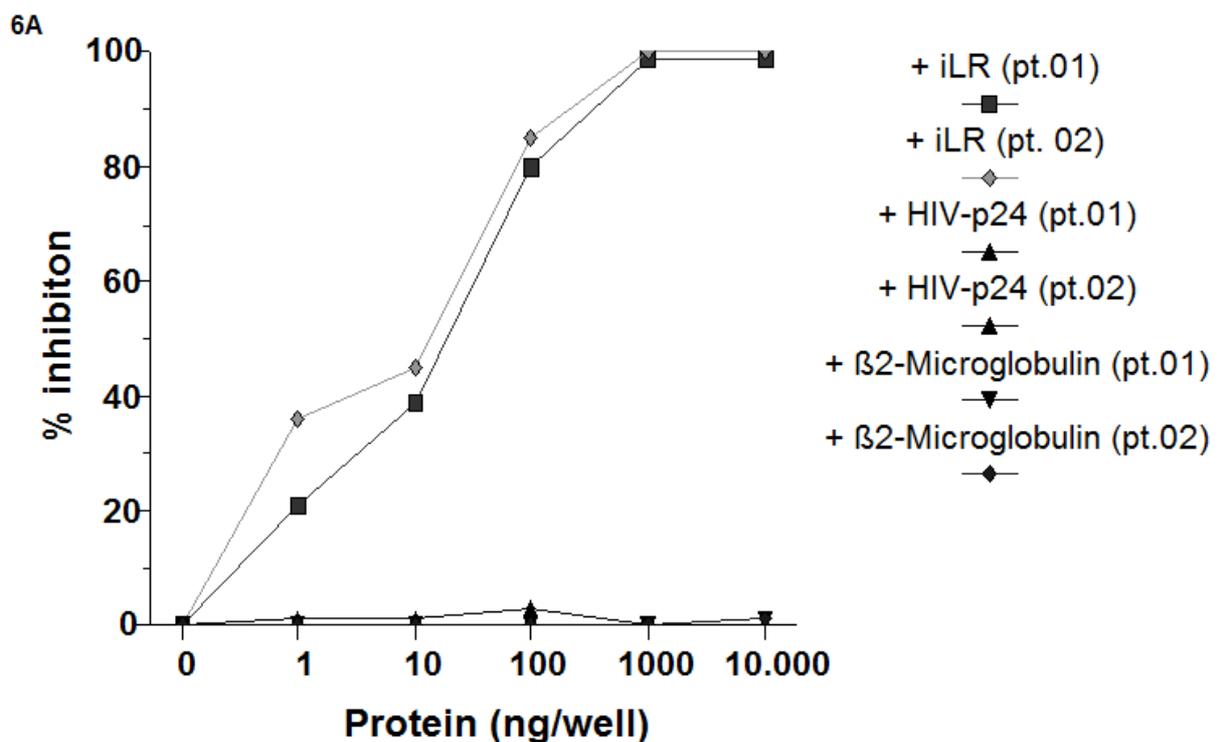
4.2.3 Untersuchungen zur Spezifität der iLR-reaktiven Antikörper

Inhibitions-Assay. Um die Spezifität der nachgewiesenen anti-iLR-Antikörper zu bestätigen, wurden Inhibitionsexperimente in Gegenwart des rekombinanten, humanen iLR-Proteins durchgeführt. Dieses diente bereits als Coating Antigen bei den ELISA-Analysen. Wie in Abb. 6A demonstriert, wurde die Reaktivität von zwei iLR-spezifischen Patientenserum durch die Zugabe von rekombinantem iLR-Protein in unterschiedlichen Konzentrationen dosisabhängig gehemmt. Durch die Zugabe von β 2-Mikroglobulin oder dem HIV-p24-Protein trat keine Reaktivität auf. Diese Ergebnisse belegen das die in den Serumproben nachgewiesenen anti-iLR-Antikörper das iLR-Protein spezifisch erkennen und binden.

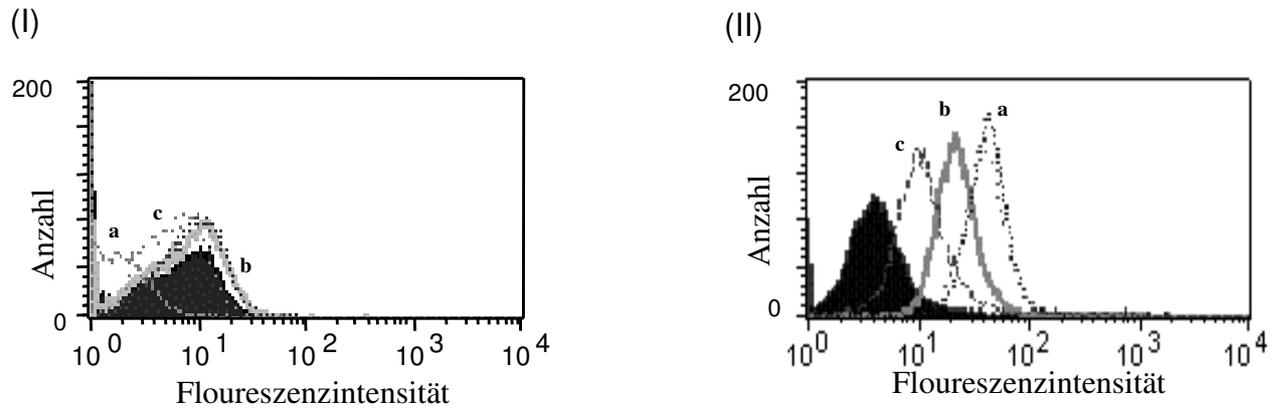
Serum-FACS-Analyse. Zur Klärung der Frage, ob die bei einem reaktiven Patientenserum nachweisbaren anti-iLR-Antikörper auch in der Lage sind, spezifisch iLR-exprimierende CLL-Zellen zu detektieren, wurden aufgereinigte iLR-positive und iLR-negative CLL-Zellen eines Patienten mit Richter-Syndrom in verschiedenen Verdünnungsstufen mit einem iLR-reaktiven Serum inkubiert und dann mittels eines anti-human-IgG-FITC-konjugierten Antikörper durchflusszytometrisch analysiert. Abbildung 6B illustriert dabei den

erfolgreichen konzentrationsabhängigen Nachweis iLR-positiver CLL-Zellen (II), während iLR-negative Zellen (I) nicht angefärbt wurden.

Western Blot-Analysen. Die spezifische Inhibition von reaktiven Patientenserum wurde zusätzlich auch mittels eines Immunoblot-Verfahrens nachgewiesen. Dabei wurden Nitrozellulosemembranen mit iLR-Protein beschichtet und mit iLR-reaktiven Serumproben inkubiert. Abbildung 6C (oben) demonstriert das Ergebnis einer zunehmenden Hemmung der Reaktivität eines CLL-Patientenserums in Abhängigkeit der vorangegangenen Inkubation mit steigenden Konzentrationen von rekombinantem iLR-Protein (Linie 3 bis 7), sichtbar durch Abschwächung der Bandenbildung. Die Banden zeigten sich im Bereich des Molekulargewichts von ca. 37 kDa, welches dem Molekulargewicht des iLR-Proteins entspricht. Hingegen zeigte sich zum Ausschluss einer unspezifischen Hemmung keinerlei Abschwächung der Bandenbildung durch die im gleichen Verhältnis steigenden Konzentrationen eines Ansatzes mit β 2-Microglobulin (Abb. 6C unten). Das Serum eines gesunden Spenders fungierte als Negativkontrolle (6C, Line 2).



6B



6C

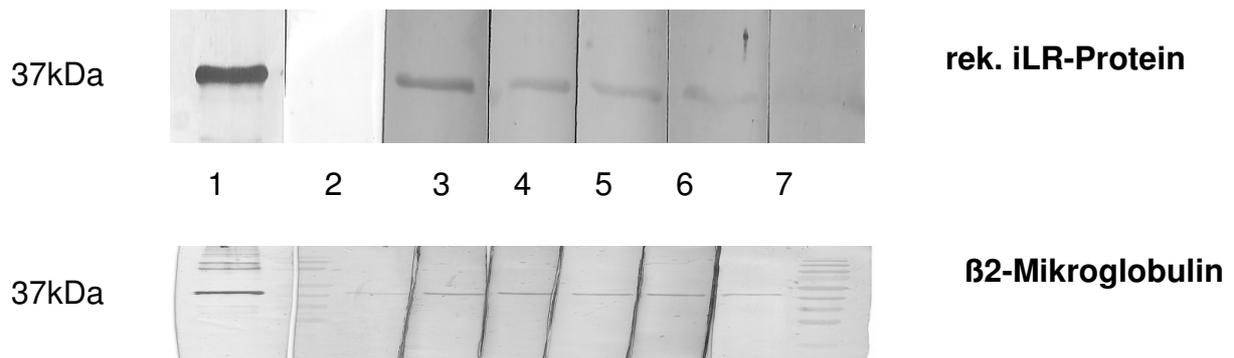


Abb. 6: Spezifitätsuntersuchungen der in Seren von CLL-Patienten nachweisbaren anti-iLR-Antikörper.

(A) Inhibitions-Assay: Anti-iLR-AK werden spezifisch durch die Zugabe von iLR-Protein gehemmt. Reaktive Seren von zwei CLL-Patienten wurden mit rekombinantem iLR-Protein, HIV-p24 Protein oder mit β 2-Mikroglobulin inkubiert und im ELISA untersucht. Die Ergebnisse sind als Prozentsatz der Inhibition hinsichtlich des Ausgangs-OD-Wertes dargestellt.

(B) FACS-Analyse: iLR-reaktives Serum in Verdünnungen von 1:25 (a), 1:50 (b) und 1:100 (c) erkennt die aufgereinigten iLR-positiven CD19⁺ B-Zellen eines CLL-Patienten (II), nicht jedoch die malignen iLR-negativen Zellen eines Patienten mit Richter-Syndrom (I). Die FACscan-Analyse erfolgte mit Hilfe eines sekundären anti-human-IgG-FITC-AK. Schwarz gefüllt: Isotopkontrolle.

(C) Western Blot: Rekombinantes iLR-Protein wurde mit Hilfe einer SDS-Page Elektrophorese aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem anti-iLR-AK (1), dem Serum eines gesunden Spenders (2) und dem reaktiven Serum eines CLL-Patienten (3–7) geblotted. Alle Seren wurden vor dem Einsatz für zwei Std. mit rekombinantem iLR-Protein (obere Reihe) oder β 2-Mikroglobulin (untere Reihe) in folgenden Konzentrationen inkubiert: 0 μ g/ml (2, 3), 3 μ g/ml (4), 6 μ g/ml (5), 12 μ g/ml (6) und 24 μ g/ml (7).

4.3 Zusammenhang zwischen humoraler Immunreaktivität gegen das iLR-Protein und der Dauer des progressionsfreien Überlebens

Um eine mögliche Korrelation zwischen dem Vorhandensein von spezifischen iLR-reaktiven Antikörpern und der Wahrscheinlichkeit einer Progression der CLL-Erkrankung nachzuweisen, erfolgte eine Analyse nach Kaplan-Meier. Hierzu wurden die 67 Patienten in zwei Patientenkohorten mit den Eigenschaften „Reaktivität gegen das iLR-Protein“ (n=23) einerseits und „keine Reaktivität nachweisbar“ (n=44) andererseits gebildet.

Die Gruppe der 23 Patienten mit positiver humoraler Immunaktivität umfasste 15 Patienten (65,2 %) mit mutiertem IgV_H-Status und acht Patienten mit unmutiertem IgV_H-Status (34,8 %). Somit ergeben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Verteilung des Merkmals mutierter zu unmutierter V_H-Status (p = 0,123). Auffällig different zeigte sich jedoch die Verteilung der mit Hilfe des FISH-Verfahrens erhobenen Aberrationen. Die als besonders ungünstig betrachteten Aberrationen (s. Kapitel 1.1) Del 17p und Del 11q wurden hier als Risikogruppe zusammengefasst. Da sechs der insgesamt sieben Trisomie 12 positiven Aberrationen ebenfalls eine Del 11q aufwiesen, wurden diese einfachheitshalber auch zu der Gruppe der Risikoaberration gezählt, inklusive des einen isolierten Tri 12 Trägers.

Damit ergibt sich die Verteilung des Merkmals „Risikoaberration“ von 2 zu 18 zwischen der „Serum reaktiven“ (8,6 %) und „Serum nicht reaktiven“ (40,9 %) Gruppe. Die genauen Charakteristika der beiden Gruppen sind Tab. 6 zu entnehmen:

Positive Humoralantwort	n = 23	%
Zytogenetik (FISH)		
Normal	9	39,1
Del 13q14	12	52,2
Tri 12	1	4,3
Del 11q	1	4,3
Del 17p	0	0
V_H-Status		
Mutiert (> 98 % Homologie)	15	65,2
Unmutiert (> 98 % Homologie)	8	34,8
Negative Humorale Immunantwort	n = 44	
Zytogenetik (FISH)		
Normal	17	38,6
Del 13q14	15	34,1
Tri 12	6	13,6
Del 11q	11	25,0
Del 17p	1	2,3
V_H-Status		
Mutiert (> 98 % Homologie)	18	43,2
Unmutiert (> 98 % Homologie)	23	50,0
Nicht verfügbar	3	6,8

Verteilung des Mutationsstatus von V_H-Genen: p = 0,123

Medianes PFS nach Merkmal/Risikofaktor:				
Merkmal	Anzahl	Medianes PFS (Monate)	Vertrauensintervall (95 %)	p
Pos. Reaktiv	23	114	64–164	0,029
Neg. Reaktiv	44	66	40– 92	
Unmut. V _H -Status	34	70	27–113	0,128
Mut. V _H -Status	30	96	63–129	
Risikoaberration (Del 11q, Del 17p (+Tri 12)):				
Vorhanden	15	36	24– 48	0,005
Nicht vorhanden	51	96	58–134	

Tab. 6: Charakteristika unbehandelter CLL-Patienten mit reaktiven und nicht reaktiven Sera gegen den iLR und medianes progressionsfreies Überleben nach Risikofaktor

Der mittlere Beobachtungszeitraum für die Bestimmung der Dauer des progressionsfreien Überlebens betrug 72 Monate. Wie im Kaplan-Meier Diagramm (Abb. 7) erkennbar, zeigte die Gruppe der 23 Patienten mit reaktivem Serum eine signifikant niedrigere Wahrscheinlichkeit einer Progression der Erkrankung im Vergleich zu jener Gruppe von Patienten mit nicht reaktivem Serum. So wies die „iLR-reaktive“ Kohorte ein medianes PFS von 114 Monaten im Vergleich zu 66 Monaten bei der nicht reaktiven Gruppe ($p = 0,029$) auf. Für Patienten mit unmutiertem V_H-Gen-Status ergab sich ein medianes progressionsfreies Überleben (PFS) von 70 Monaten im Vergleich zu 96 Monaten bei Patienten mit mutiertem Status. Deutlich divergent zeigte sich das PFS mit 36 gegenüber 96 Monaten hinsichtlich des Merkmals der Risikoaberration (s. Tabelle 6).

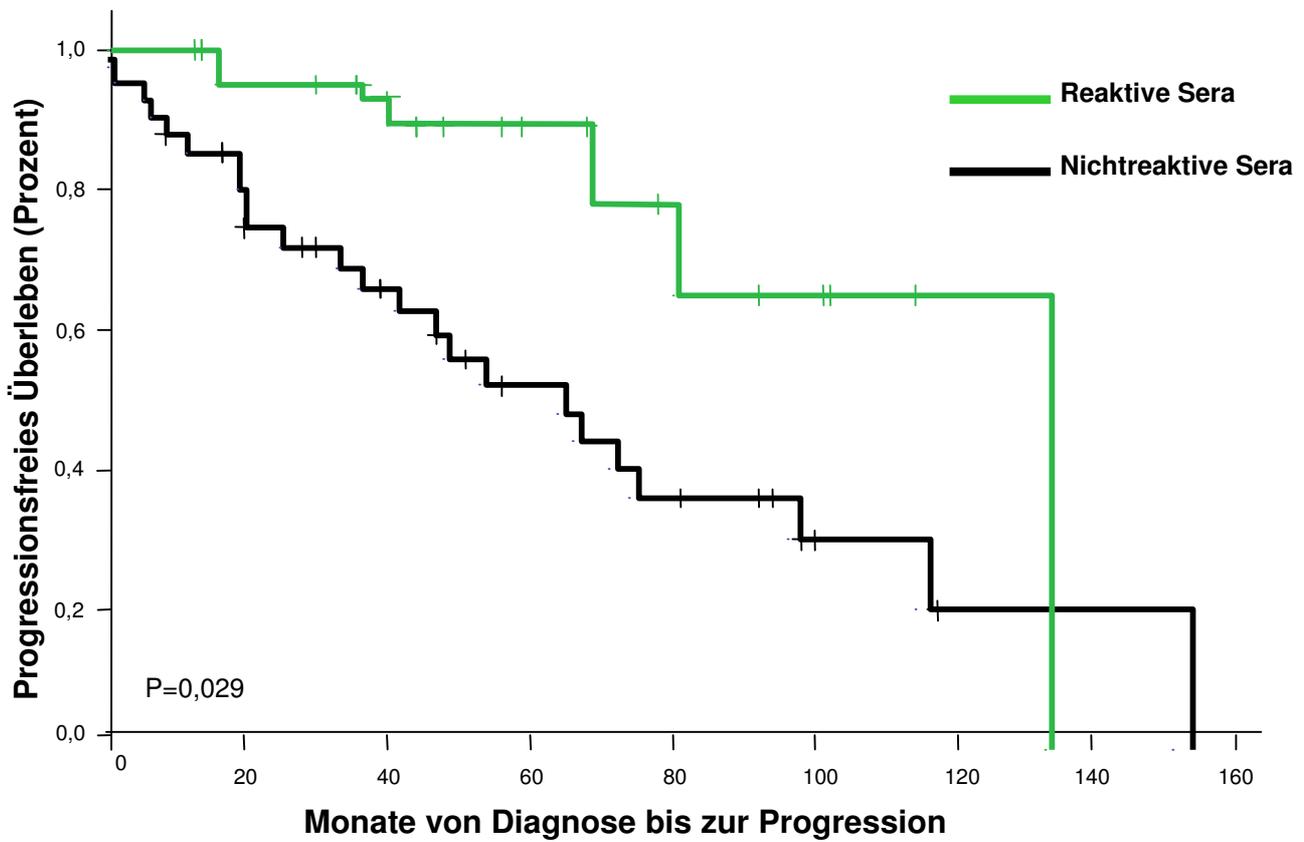


Abb. 7: Erhöhtes progressionsfreies Überleben von CLL-Patienten mit iLR-reaktiven Serum.

Kaplan-Meier Diagramm zur Abschätzung der Wahrscheinlichkeit des progressionsfreien Überlebens (in %) mit und ohne iLR-reaktives Serum: 67 unbehandelte CLL-Patienten wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit eingeteilt, mindestens ein iLR-Epitop spezifisch zu erkennen.

5 Diskussion

5.1 Tumorantigene bei der CLL und der immature Lamininrezeptor

Eine wesentliche Voraussetzung für die Analyse von tumorspezifischen Immunantworten ist die Verfügbarkeit definierter Tumorantigene, die, wie in der Einleitung bereits erwähnt, bei der chronischen lymphatischen Leukämie limitiert vorliegen. Der bei jedem B-CLL-Patienten individuell unterschiedliche B-Zell-Rezeptor und seine assoziierten komplementären Regionen, die durch die hypervariable Region der Immunglobulin-Schwerkette bestimmt werden, kann in Teilen als spezifisches idiotypisches Antigen (sog. Id-Antigen) fungieren. Während solche idiotypspezifischen autologen T-Zell- und auch humoral vermittelten Immunantworten für eine Reihe von Malignomen der B-Zellreihe, darunter auch für die B-CLL, nachgewiesen werden konnten (George et al., 1987; Kwak et al., 1992; Hsu et al., 1997; Hansson et al., 2003), steht diesem hochselektiven Ansatz zur Generierung patientenspezifischer Antigene ein hoher finanzieller und personeller Aufwand gegenüber (Rezvan et al., 2000). Andere bekannte, nicht individualspezifische Tumorantigene für die CLL sind Fibromodulin (FMOD) und Survivin. Bei beiden konnten im Falle einer CLL-spezifischen-Überexpression HLA-spezifische Peptid-Epitope identifiziert werden und zytotoxische T-Zell-Antworten gegen die CLL generiert werden (Schmitz et al., 2000; Zeis et al., 2003; Jelinek et al., 2003; Mikaelsson et al., 2005).

Auch für das iLR-Protein konnte in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt werden, dass eine MHC Klasse I abhängige T-Zell-vermittelte Immunantwort gegen definierte Epitope des iLRP nachweisbar ist (Siegel et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage untersucht, inwieweit auch eine antitumorale humorale Immunität gegen den iLR-Rezeptor bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie detektiert werden kann. Dabei wurde zunächst das Ziel verfolgt, die iLR-Expression in verschiedenen normalen sowie malignen hämatopoetischen Zellpopulationen zu bestimmen. Dies erfolgte mit Hilfe der Western Blot-Analyse anhand von Zelllysaten sowie durchflusszytometrisch unter Zuhilfenahme eines monoklonalen anti-iLR-Maus-Antikörpers. Es konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten B-CLL-Zellen eine signifikante iLR-Expression aufwiesen, während auf normalen Zellen und hämatopoetischen Subpopulationen keine iLR-Expression nachzuweisen war. Diese Befunde bestätigen die bereits zuvor gemachten Untersuchungen von Siegel und Mitarbeitern, die eine tumorselektive Expression des iLR-Rezeptors u.a. auf CLL-Zellen nachweisen konnten (Siegel et al., 2003; Rohrer et al., 2006).

Aufgrund der tumorspezifischen Expression und der nachgewiesenen Immunogenität des iLR, eine adaptive Immunantwort zu induzieren (Siegel et al., 2003, 2006), stellt der iLR eine attraktive Zielstruktur für tumorimmunologische Untersuchungen, im Speziellen bei der CLL, dar.

5.2 Nachweis humoraler Immunität gegen den iLR-Rezeptor bei unbehandelten CLL-Patienten

Bei o.g. Voraussetzung konnte in der vorliegenden Studie in 23 von 67 der untersuchten Serumproben von CLL-Patienten eine signifikante antikörpervermittelte Immunantwort gegen das iLR-Protein und dessen Epitope nachgewiesen werden. Durch FACS-Analysen, einen Inhibitions-ELISA sowie das Immunoblot-Verfahren konnte die gemessene Antikörperreaktion als eine spezifische gegen das 37 kDa iLR-Protein gerichtete Immunantwort bestätigt werden.

Epitopmappinguntersuchungen der anti-iLR-AK positiven Seren ergab den Befund, dass anti-iLR-Antikörper zumindest jeweils ein distinktes Epitop aus der iLR-Aminosäuresequenz erkannten. Die detektierten Epitope befanden sich dabei in Bezug auf die Struktur des iLR-Proteins in der extrazellulären, der intrazellulären sowie auch transmembranen Domäne.

Erwähnenswert ist, dass bei fünf der untersuchten Patienten sowohl IgG- als auch IgM-Antikörper gegen den iLR nachgewiesen werden konnten. Da antigenspezifische T-Helfer-Zellen für die Induktion eines Immunglobulin-Klassenwechsels (engl.: class-switch) von IgM nach IgG notwendig sind, spricht die Präsenz von detektierten iLR-IgG-Antikörpern für das Vorhandensein einer komplexen Immunaktivierung, in welcher T- und B-Lymphozyten eine zentrale Rolle spielen.

Das Auftreten von IgM- und IgG-iLR-AK zeigte sich dabei unabhängig von dem Vorliegen eines mutierten bzw. unmutierten Status der Immunglobulin-Schwerketten. In diesem Zusammenhang zeigte bereits eine Studie von Sinisalo et al. (2004) keinen Unterschied in der humoralen Aktivität zwischen Patienten mit MCLL und UCLL. Untersucht wurde dabei u.a. die Serumaktivität von Immunglobulinen und das immunologische Ansprechen auf eine Haemophilus influenza Typ b Impfung. Daraus schließt die Forschergruppe, dass für die reduzierte Überlebensdauer der UCLL-Patienten eher weniger Defekte in der Immunität bzw. daraus resultierender Infektionen verantwortlich zu sein scheinen. Dieses lässt hoffen, dass sich mögliche immuntherapeutische Strategien unabhängig vom Mutationsstatus der Ig-Schwerketten etablieren lassen (Sinisalo et al., 2004).

Eine IgG-Subklassen-Analyse der im Serum enthaltenen anti-iLR-IgG-Antikörper ergab ein vorherrschendes Auftreten der IgG1- und IgG3-Subklassen bei der Mehrheit der Patientenproben. Eine IgG1- und IgG3-Subklassen dominierte Antikörperreaktion wird präferentiell im Rahmen einer Th1-vermittelten Immunantwort beobachtet (Wu et al., 2005; Greve et al., 2001; Gnjatic et al., 2003; Abbas et al., 1996, Hussain et al., 1994). Zytokine, wie das Interleukin-2 und Gamma-Interferon, die während einer Th1-polarisierten Immunreaktion produziert werden, stellen notwendige Mediatoren für die Induktion und Generierung antigenspezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten dar. Im Gegensatz dazu werden IgG4-Antikörper dominierte Antworten hauptsächlich mit einer Th2-Helfer-Zell-Antwort in Verbindung gebracht (Abbas et al., 1996). Dabei konnte anhand von verschiedenen Studien gezeigt werden, dass bei Patienten mit manifesten Tumorerkrankungen oder Patienten, bei denen ein Progress der Erkrankung zu beobachten ist, eine Th2-polarisierte Immunantwort vorherrscht bzw. ein Shift von einem Th1-basierten zu einem Th2-basierten Zytokinprofil zu beobachten ist (Maeda und Shiraishi, 1996; Lee et al., 1999; Becker, 2006). Folglich könnten die in dieser Studie nachgewiesenen vorherrschenden IgG-Subklassen als ein Hinweis auf eine Th1-basierende Immunreaktion gegen das iLR-Protein gewertet werden.

Der Mechanismus und die Bedeutung einer antikörpervermittelten Tumorkontrolle ist von komplexer Natur und ist bislang nicht vollständig aufgeklärt. Die Gruppe Wu et al. beschrieb eine humorale Immunantwort gegen das intrazellulär lokalisierte WT1-Protein bei Patienten mit verschiedenen hämatologischen Neoplasien, darunter die akute myeloische Leukämie, das myelodysplastische Syndrom und die chronische myeloische Leukämie. Dabei korrelierte die bestehende Tumormasse des jeweiligen Patienten mit dem WT1-Antikörpertiter. (Wu et al., 2005). So ließen sich in Serumproben von Leukämiepatienten, die nach Behandlung mit einer Polychemotherapie oder einer allogenen Blutstammzelltransplantation eine komplette Remission ihrer malignen Grunderkrankung entwickelten, keine WT1-Antikörper nachweisen. Dieser Befund legt die Vermutung nahe, dass eine tumorspezifische humorale Immunantwort dann erlischt, wenn das jeweilige Antigen des Interesses, in diesem Falle das WT1-Antigen, eliminiert wurde. Entlang dieser Argumentationslinie könnten auch die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde interpretiert werden: Das Vorliegen eines signifikant erhöhten anti-iLR-Antikörpertiter bei persistierender Antigenpräsenz. Andererseits konnten in einer jüngeren Studie von Atanackovic et al. (2007) in Seren von Plasmozytompatienten Antikörper gegen verschiedene sog. Cancer Testis Antigene nachgewiesen werden, obwohl

die jeweiligen Antigene zum Zeitpunkt der ELISA-Messung nicht mehr exprimiert wurden, da sich das Malignom im klinischen Zustand der kompletten Remission befand.

5.3 Induktion einer humoralen antitumoralen Immunität – ein günstiger Prognosefaktor?

Der in der vorliegenden Arbeit dargestellte Befund eines verlängerten progressionsfreien Überlebens bei Patienten mit iLR reaktivem Serum lässt eine krankheitskontrollierende Funktion der iLR-Antikörper vermuten, obschon sie klinisch betrachtet nicht hinreichend in der Lage zu sein scheinen, CLL-Zellen *in vivo* komplett zu eliminieren. Demgegenüber konnte in weiterführenden Analysen unserer Arbeitsgruppe demonstriert werden, dass in den Seren nachgewiesene anti-iLR-Antikörper nicht nur befähigt waren, sich spezifisch auf der Oberfläche von iLR-exprimierenden CLL-Zellen zu binden, sondern diese darüber hinaus auch komplementvermittelt und via ADCC effektiv im ⁵¹Chrom-Freisetzungstest abzutöten. Dieser Befund ist neuartig und konnte bislang von keiner anderen Forschergruppe gezeigt werden (Friedrichs et al., 2008).

Ähnliche Beobachtungen wurden von Weng et al. (2004) berichtet. Untersucht wurden hier Immunantworten gegen Id-Proteine von Patienten mit einem follikulären Lymphom. Nach Vakzinierung mit einem von Lymphomzellen isolierten individualspezifischen Idotypprotein entwickelten mehrere Probanden eine Id-spezifische humorale Immunantwort. Diese Patienten zeigten ein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben gegenüber jenen Patienten, die nach der therapeutischen Vakzinierung keine tumorspezifische humorale Immunantwort boten. Eine *in vitro* Funktionsanalyse der in den Seren nachgewiesenen Antikörper gegen die jeweiligen autologen Lymphomzellen wurde von der Arbeitsgruppe hingegen nicht durchgeführt. Demgegenüber konnte in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass das Immunsystem in einer signifikanten Zahl von CLL-Patienten befähigt war, eine *spontane* Immunantwort gegen den iL-Rezeptor als *nicht* individualspezifisches Antigen zu entwickeln.

Die Datenlage bezüglich eines verlängerten PFS bei nachweisbarer tumorspezifischer humoraler Aktivität ist bis jetzt allerdings begrenzt. Hinweise auf den Nutzen einer möglichen humoralen Immunantwort zeigen aber auch Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen. So konnten zahlreiche durch AK nachweisende serologische Verfahren, wie z.B. die SEREX Methode (Sahin et al., 1995), entdeckte Tumorantigene auch als geeignete T-Helfer-Zell-stimulierende Antigene identifiziert werden (Jager et al., 2000). Diese werden

notwendigerweise zur Vervollständigung einer antitumoralen Immunantwort benötigt. Damit wird das Vorhandensein von AK zwar nicht direkt, aber möglicherweise indirekt durch kombinierte B- und T-Zellaktivität mit einer günstigen antitumoralen Aktivität in Verbindung gebracht.

Für einen solchen Zusammenhang sprechen u.a. Ergebnisse von Reilly et al.: Hier konnte in einem Tierversuchsmodell mit transgenen HER-2/*neu* Mäusen, die eine immunologische Toleranz gegenüber dem *neu*-Antigen aufwiesen, gezeigt werden, dass eine *neu*-spezifische Vakzinierung zu einem Anstieg der *neu*-spezifischen T-Zellen, nicht jedoch der *neu*-spezifischen AK führt. Diese Konstellation hatte keinen suffizienten antitumoralen Schutz zur Folge (Reilly et al. 2000). FVB/N Mäuse ohne Toleranz gegenüber dem *neu*-Ag wiesen hingegen einen Anstieg beider Parameter auf und zeigten sich befähigt, eine ansonsten letale Zelldosis einer Mammakarzinomlinie effektiv zu eliminieren. Eine in vitro Depletion der CD4+ T-Zellen führte hingegen wieder zu einem tumorbedingten Tod der Mäuse. Ähnlich sah das Bild bei CD8-T-Zell-inhibierten aber IgG-AK reaktiven Mäusen aus, wenn auch das Tumorwachstum sich verzögert zeigte. Diese tierexperimentellen Befunde machen deutlich, dass nur eine konzertierte Aktion aus einer humoralen und einer zellulären Immunantwort erforderlich ist, um einen Tumor effektiv zu eliminieren (Reilly et al., 2001).

5.4 Defiziente adaptive Immunität bei CLL-Patienten

Der zugrundeliegende Mechanismus für diese humorale Schutzfunktion bei Tumorerkrankungen ist noch, wie erwähnt, weitestgehend unverstanden. Drei mögliche Mechanismen der unmittelbaren Tumortoxizität von AK sind dabei vorrangig denkbar:

(1) Durch komplementvermittelte zelluläre Zytotoxizität (CDC) im Rahmen der Aktivierung der Komplementkaskade im sog. klassischen Weg. Dabei führt die Bindung von Komplementfaktor (C1-Fragmenten C1q) am Fc-Rezeptor eines Antikörpers zu einer Aktivierung der Komplementkaskade, die in der Bildung eines zytotoxischen Membranangriffskomplexes endet und zum Tod der Zielzelle führt (Janeway et al., 2005).

(2) Zum anderen durch ADCC (engl. für antibody dependent cellular cytotoxicity), wobei an Tumorzellen gebundene AK durch Effektorzellen, wie z.B. natürliche Killer-Zellen oder Makrophagen, mit Hilfe des zellständigen Fc-Rezeptors erkannt und zerstört werden.

(3) Durch die direkte Lyse/Apoptose von Tumorzellen durch AK-Bindung und anschließende Induktion einer intrazellulären Signalkaskade, die zur Einleitung des programmierten

Zelltodes führt. Durch diese Bindung an den B-Zell-Rezeptor scheint die Tyrosin-Phosphorylierung wichtiger intrazellulärer Proteine gefördert zu werden, die eine Zellvermehrung zu hemmen scheinen (DeFranco, 1992; Goodnow et al., 1988). Untermauert wird dies z.B. durch Studien, die die Fähigkeit und Stärke von AK zur Signaltransduktion mit dem klinischen Ansprechen und dem Verlauf positiv in Verbindung bringen (Vuist et al., 1994; Weng et al., 2004). Die beiden Forschergruppen arbeiteten hier mit Id-Protein-spezifischen Antikörpern. Die genauen molekularen Vorgänge der Apoptoseauslösung durch monoklonale Antikörper sind nicht genau bekannt. Apoptotische Vorgänge in der Zelle führen zur Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien, zum Verlust der transmembranösen mitochondrialen Spannung sowie zur Aktivierung von Caspasen. Zusätzlich werden intrazelluläre Calciumkonzentrationserhöhungen diskutiert. Gleichzeitig werden antiapoptotische Gene herunterreguliert.

Obwohl signifikante AK-Titer gegen den iL-Rezeptor bei unbehandelten CLL-Patienten in dieser Arbeit beobachtet wurden, und reaktives Serum sich bei weiterführenden Untersuchungen von Friedrichs et al. grundsätzlich in der Lage zeigte, funktionelle Mechanismen wie die ADCC und komplementvermittelte Lyse *in vitro* zu initiieren (Friedrichs et al., 2008), bleibt die Wirksamkeit bzw. die genaue Effizienz der Lyse *in vivo* unbekannt.

Verschiedene Aspekte, die die mangelnde Effizienz der anti-iLR-Antikörper *in vivo* erklären könnten, sind denkbar:

(1) *Mangel an Komplementfaktoren.* In früheren retrospektiv durchgeführten Studien an CLL-Patienten konnte gezeigt werden, dass Patienten, die sich im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung befanden, signifikant geringere Konzentrationen der Komplementfaktoren C1 und C4 im Serum aufwiesen als CLL-Patienten, die sich im unbehandelten Frühstadium der CLL befanden. Darüber hinaus war eine geringe Komplementkonzentration mit einem signifikant verkürzten Überleben assoziiert (Heath et al., 1985; Fist et al., 1986). Wenngleich primär von einer immunkompromittierenden Wirkung ausgegangen werden muss, so wäre in dem hier beschriebenen Kontext auch eine gestörte immunologische antikörpervermittelte Tumorkontrolle als Kofaktor denkbar (Varga et al., 1995).

(2) *Fc-Rezeptor-Polymorphismus als Ursache für defiziente humorale Immunität.* Genetische Polymorphismen in den Fc-Rezeptoren der Immuneffektorzellen können ebenfalls zu einer deutlichen Wirkungsverminderung der applizierten Antikörper führen. So konnte gezeigt werden, dass im Fc γ RezeptorIII (Fc γ RIII, CD16) ein Polymorphismus durch Variabilität einer Aminosäure an Position 158 besteht. Patienten, deren Genom homozygot für die Aminosäure

Valin kodiert (Fc γ RIIIa-158 Val/Val), haben eine höhere Affinität zu IgG1-Subklassen-Antikörpern als Patienten, die heterozygot für Val/Phe oder homozygot für Phe/Phe kodieren. Dies spiegelt sich beispielsweise in klinischen Aktivitätsunterschieden wider: CLL-Patienten mit Autoimmunerkrankungen, die die Phe/Phe Variante des Fc-Rezeptors tragen, benötigen den zehnfachen Serumspiegel des gegen das Molekül CD20 gerichteten Antikörpers Rituximab zur äquieffektiven B-Zelldepletion. Auch bei Patienten mit follikulärem Lymphom war die objektive Erfolgsrate bei homozygoten Patienten für die Valin-Variante des Fc γ RIII nach Rituximab-Therapie höher (Clynes et al., 2000; Villamor et al., 2003; Weng et al., 2004). Inwieweit der hier beschriebene Fc-Rezeptor-Polymorphismus Ursache für die mangelnde in-vivo-Aktivität der nachgewiesenen anti-iLR-Antikörper ist, kann nur durch entsprechende molekularbiologische Untersuchungen an den Effektorzellen der jeweiligen CLL-Patienten überprüft werden.

(3) *Generelle Defizienz der adaptiven Immunität.* Letztendlich weist die Majorität der CLL-Patienten signifikante Defekte der adaptiven Immunität auf (Wadhwa et al., 2006; Krackhardt et al., 2002). Die T-Zelldefekte umfassen dabei im Vergleich zu gesunden Personen eine Inversion des CD4/CD8 Verhältnisses, eine gesteigerte Anzahl an aktivierten T-Zellen, ein oligoklonales TCR-Repertoire, eine Reduktion der zellulären Zytokinsekretion sowie eine reduzierte Expressionsrate von kostimulierenden Molekülen (Tötterman et al., 1989; Tinhofer et al., 1998; Rezvany et al., 1999; Farace et al., 1994; Rossi et al., 1996; Görgün et al., 2005; Scrivener et al., 2003). Des Weiteren zeigen CLL-Zellen immunsuppressive Eigenschaften, die u.a. mit ihrer eigenen Produktion von TGF-Beta und IL-10 sowie einer direkten funktionellen Schwächung IgG-produzierender Plasmazellen in Beziehung zu stehen scheinen (Aguilar-Santelises et al., 1999; Sampalo et al., 2000). Nicht zuletzt kommt es bei CLL-Patienten durch eine verminderte Anzahl an T-Helfer-Zellen oft zu einem alterierten Antikörperspektrum sowie zu einer im Rahmen der Erkrankung häufig auftretenden Autoantikörperproduktion und Hypogammaglobulie (Colovic et al., 2002). Die meisten der in der vorliegenden Studie analysierten Patienten wiesen jedoch keine signifikante Hypogammaglobulie auf, und es ließ sich darüber hinaus keine Korrelation zwischen nicht-iLR-reaktivem Serum und dem Gesamt-IgG-Level im Serum feststellen (Mündliche Mitteilung von PD Dr. med. M. Zeis; Daten nicht veröffentlicht).

Obwohl das heutige Verständnis der exakten immunologischen Vorgänge noch sehr begrenzt ist, scheinen die o.g. Faktoren für die gestörte Fähigkeit des Immunsystems, eine Tumorerkrankung zu kontrollieren, von Bedeutung zu sein.

5.5 Fazit und klinische Konsequenzen

Serum anti-iLR-Antikörper als Prognosemarker. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig bei CLL-Patienten dokumentiert werden, dass der Nachweis von Serum-Antikörpern, die gegen den auf der Oberfläche von CLL-Zellen exprimierten immaturren Lamininrezeptor gerichtet sind, mit einem verlängerten progressionsfreien Überleben der jeweiligen CLL-Patienten assoziiert ist. Um die klinische Bedeutung zirkulierender anti-iLR-Antikörper als möglichen neuartigen Prognosemarker zu validieren, sind prospektiv randomisierte Studien an einer weitaus größeren Patientenkohorte von Nöten.

Entwicklung eines therapeutischen monoklonalen anti-iLR-Antikörpers. In weiterführenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe von PD Dr. M. Zeis konnte belegt werden, dass die im Serum von CLL-Patienten nachweisbaren anti-iLR-Antikörper im ADCC- und komplementabhängigen Assay befähigt sind, iLR-exprimierende CLL-Zellen zu erkennen und selektiv abzutöten (Friedrichs et al., 2008). Diese Daten und die Tatsache, dass es sich bei dem iL-Rezeptor um ein tumorselektives Zielmolekül handelt, welches auf der Oberfläche von Tumorzellen verschiedenster Entität, insbesondere jedoch der CLL, nachzuweisen ist, lassen das iLR-Molekül als Target für die Entwicklung eines therapeutischen Antikörpers attraktiv erscheinen.

Generierung einer therapeutischen Vakzine gegen den iL-Rezeptor. Neben der Möglichkeit der Generierung eines therapeutischen anti-iLR-Antikörpers, welcher im Rahmen einer passiven Immuntherapie appliziert werden könnte, stellt die Generierung einer therapeutischen anti-iLR-Vakzine eine weitere attraktive Option dar. Während in vorangegangenen Arbeiten der Gruppe von PD Dr. M. Zeis bereits T-Zell-Epitope aus der iLR-Sequenz identifiziert werden konnten, die eine HLA-A2-spezifische T-Zellantwort zu induzieren in der Lage waren, konnten in der vorliegenden Arbeit im Rahmen des Epitopmappings verschiedene distinkte B-Zell-Epitope identifiziert werden, die in der extrazellulären Domäne des iL-Rezeptors lokalisiert sind. Diese Epitope können als wertvolle Determinanten für die Generierung von Peptid-Vakzinen dienen, die in der Lage sein könnten, eine humorale Immunantwort gegen die extrazelluläre Domäne des iL-Rezeptors in vivo zu induzieren.

6 Zusammenfassung

Patienten mit einer chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) können stark variierende klinische Krankheitsverläufe mit mittleren Überlebenszeiten, die sich von Monaten bis Jahrzehnten erstrecken können, aufweisen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, inwieweit eine Kontrolle der Tumorzellen durch das wirtseigene Immunsystem zu diesen variablen Überlebenszeiten beitragen könnte. Im Speziellen wurde die humorale Immunantwort gegen den auf der Oberfläche von CLL-Zellen selektiv exprimierte immature Lamininrezeptor (iLR) näher analysiert. Dabei wurden Seren von 67 unbehandelten, zytogenetisch und immunphänotypisch gut charakterisierten CLL-Patienten im standardisierten ELISA hinsichtlich der Präsenz von anti-iLR-Antikörpern untersucht. In 29 von 67 (43,3 %) Seren unbehandelter CLL-Patienten ließen sich Antikörper vom Typ IgG und IgM nachweisen, die gegen den iLR gerichtet waren, während lediglich bei 4 von 50 (8 %) gesunden Spendern anti-iLR-Antikörper gefunden wurden. Ein bei den iLR-reaktiven Seren durchgeführtes Epitopmapping, das die gesamte iLR-Aminosäuresequenz umfasste, ergab, dass alle Seren zumindest ein distinktes Epitop aus dem iLR-Protein erkannten. Studien im Rahmen von FACS-Analysen, Inhibitions-ELISA sowie von Immunoblot-Verfahren bestätigen die Spezifität dieser humoralen Immunantwort gegen den iL-Rezeptor. Eine IgG-Subklassen-Analyse dokumentiert eine von IgG1- und IgG3-vermittelte Immunantwort. Setzt man die humorale anti-iLR-Immunantwort mit der Dauer des progressionsfreien Überlebens bei diesen Patienten in Korrelation, zeigt sich ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben bei Patienten mit messbaren anti-iLR-Titern im Vergleich zu Patienten mit nicht reaktivem Serum. Diese Arbeit zeigt erstmalig einen möglichen Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen klinischen Verlaufsformen bei der CLL und einer humoralen Immunantwort gegen den auf der Oberfläche von CLL-Zellen exprimierten iL-Rezeptor.

7 Anhang

Risiko	Stadium	Definition	Med. Überleben
niedrig	A	< 3 vergrößerte Lymphknotenregionen*	> 120 Monate
mittel	B	> 3 vergrößerte Lymphknotenregionen*	60 Monate
hoch	C	Hb < 10 g/dl und/oder Thrombozytopenie < 100.000/ul Lymphknotenstatus irrelevant	24 Monate

*Hb > 10 g/dl und Thrombozyten > 100.000/ul

Tab. 7: Stadieneinteilung der CLL nach Binet et al., 1977

Peptidnummer	Start-AS	End-AS	AS-Länge
1	1	17	17
2	7	25	19
3	13	30	18
4	20	37	18
5	27	44	18
6	34	50	17
7	40	57	18
8	47	64	18
9	53	70	18
10	59	77	19
11	65	82	18
12	71	89	19
13	77	95	19
14	83	101	19
15	90	108	19
16	97	114	18
17	103	120	18
18	109	127	19
19	116	135	20
20	124	142	19
21	131	148	18
22	138	156	19
23	145	163	19
24	152	170	19
25	159	177	19
26	166	184	19
27	173	191	19
28	181	199	19
29	188	206	19
30	195	213	19
31	202	220	19
32	209	227	19
33	216	234	19
34	223	241	19
35	230	248	19
36	237	255	19
37	244	262	19
38	251	269	19
39	258	276	19
40	265	283	19
41	272	290	19
42	277	295	19

Tab. 8: Aminosäurelängen der generierten iLR-Epitope

8 Literaturverzeichnis

- 1.) Abbas, A.K.; Murphy, K.M.; Sher, A. (1996): Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383, 787–793
- 2.) Aguilar-Santelises, M.; Gigliotti, D.; Osorio, L.M.; Santiago, A.D.; Mellstedt, H.; Jondal, M. (1999): Cytokine expression in B-CLL in relation to disease progression and in vitro activation. *Med. Oncol.*, 16, 289–295
- 3.) Ansell, S.M.; Stenson, M.; Habermann, T.M.; Jelinek, D.F.; Witzig, T.E. (2001): Cd4+ T-cell immune response to large B-cell non-Hodgkin's lymphoma predicts patient outcome. *J. Clin. Oncol.*, 20, 2904–2905
- 4.) Atanackovic, D.; Arfsten, J.; Cao, Y.; Gnjatic, S.; Schnieders, F.; Bartels, K.; Schilling, G.; Faltz, C.; Wolschke, C.; Dierlamm, J.; Ritter, G.; Eiermann, T.; Hossfeld, D.K.; Zander, A.R.; Jungbluth, A.A.; Old, L.J.; Bokemeyer, C.; Kröger, N. (2007): Cancer-testis antigens are commonly expressed in multiple myeloma and induce systemic immunity following allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 109, 1103–1112
- 5.) Becker, J.C.; Brabletz, T.; Czerny, C.; Termeer, C.; Brocker, E.B. (1993): Tumor escape mechanisms from immunosurveillance: induktion of unresponsiveness in a specific MHC-restricted CD4+ human T cell clon by the autologous MHC class II+ melanoma. *Int. Immunol.*, 5, 1501–1508
- 6.) Becker Y. (2006): Molecular immunological approaches to biotherapy of human cancers--a review, hypothesis and implications. *Anticancer Res.*, 26, 1113–1134
- 7.) Bellucci, R.; Wu, C.J.; Chiaretti, S.; Weller, E.; Davies, F.E.; Alyea, E.P.; Dranoff, G.; Anderson, K.C.; Munshi, N.C.; Ritz, J. (2004): Complete response to donor lymphocyte infusion in multiple myeloma is associated with antibody responses to highly expressed antigens. *Blood*, 103, 656–663
- 8.) Binet J.L.; Lepage, M.; Dighiero, G.; Charron, D.; Vaugier, G.; Merle Beral, H.; Natali, J.C.; Raphael, M.; Nizet, B.; Follezzouti, J.Y. (1977): A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia. Prognostic significance. *Cancer*, 40, 855–865

- 9.) Binet, J.L.; Caligaris-Cappio, F.; Catovsky, D.; Cheson, B.; Davis, T.; Dighiero, G.; Dohner, H.; Hallek, M.; Hillmen, P.; Keating, M.; Montserrat, E.; Kipps, T.J.; Rai, K. (2006): Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Blood*, 107, 859–61
- 10.) Burnet, M. (1957): Cancer – A Biological Approach I. The Processes Of Control. II. The Significance of Somatic Mutation. *Br. Med. J.*, 1, 779–786
- 11.) Burnet, M. (1964): Immunological factors in the process of carcinogenesis. *Br. Med. Bull.*, 20, 154–158
- 12.) Byrd, J.C.; Stilgenbauer, S.; Flinn, I.W. (2004): Chronic lymphocytic leukemia. (Review). *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 163–183
- 13.) Casati, C.; Dalerba, P.; Rivoltini, L.; Gallino, G.; Deho, P.; Rini, F.; Belli, F.; Mezzanzanica, D.; Costa, A.; Andreola, S.; Leo, E.; Parmiani, G.; Castelli, C. (2003): The apoptosis inhibitor protein survivin induces tumor-specific CD8+ and CD4+ T cells in colorectal cancer patients. *Cancer Research*, 63, 4507–4515
- 14.) Cheson, B.D.; Bennett, J.M.; Grever, M.; Kay, N.; Keating, M.J.; O'Brien, S.; Rai, K.R. (1996): National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*, 87, 4990–4997
- 15.) Chiorazzi, N.; Rai, K.R.; Ferrarini, M. (2005): Chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.*, 352, 804–815
- 16.) Christian, B.A.; Lin T.S. (2008): Antibody therapy for chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Hematol.*, 45, 95–103
- 17.) Clynes, R.A.; Towers, T.L.; Presta, L.G.; Ravetch, J.V. (2000): Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.*, 6, 443–446
- 18.) Coggin, J.H. Jr.; Ambrose, K.R.; Bellomy, B.B.; Andersen, N.G. (1971): Tumor immunity in hamsters immunized with fetal tissues. *J. Immunol.*, 107, 526–533
- 19.) Coggin, J.H. Jr.; Rohrer, S.D.; Leinbach, E.D.; Hester, R.B.; Liu, P.I.; Heath, L.S. (1988): Radiation-induced lymphoblastic lymphomas/leukemias and sarcomas of mice express conserved, immunogenic 44-kilodalton oncofetal antigen. *Am. J. Pathol.*, 130, 136–146

- 20.) Coggin, J.H. Jr.; Barsoum, A.L.; Rohrer, J.W. (1998): Tumors express both unique TSTA and crossprotective 44 kDa oncofetal antigen. *Immunol. Today*, 19, 405–408
- 21.) Coggin, J.H. Jr.; Barsoum, A.L.; Rohrer, J.W. (1999): 37 kiloDalton oncofetal antigen protein and immature laminin receptor protein are identical, universal T-cell including immunogens on primary rodent and human cancers. *Anticancer Res.*, 19, 5535–5542
- 22.) Coggin, J.H. Jr.; Barsoum, A.L.; Rohrer, J.W.; Thurnher, M.; Zeis, M. (2005a): Contemporary definitions of tumor specific antigens, immunogens and markers as related to the adaptive responses of the cancer-bearing host. *Anticancer Res.*, 25, 2345–2355
- 23.) Coggin, J.H. Jr.; Barsoum, A.L.; Rohrer, J.W.; Thurnher, M.; Zeis, M.; Schwarzenberger, P.O. (2005b): Cancer vaccine technology update: the immunobiology of 37 kDa oncofetal antigen/immature laminin receptor protein (OFA/iLRP) and RNA, a universal tumor immunogen. *Mod. Asp. Immunobiol.*, 16, 27–34
- 24.) Colovic, N.; Bogdanovic, A.; Martinovic-Cemicik, V.; Jankovic, G. (2002): Prognostic significance of serum immunoglobulins in B-chronic lymphocytic leukemia. *Archive of Onc.*, 9, 79–82
- 25.) Crespo, M.; Bosch, F.; Villamor, N.; Bellosillo, B.; Colomer, D.; Rozman, M.; Marce, S.; Lopez-Guillermo, A.; Campo, E.; Montserrat, E. (2003): ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med*, 348, 1764–1775
- 26.) Damle, R.N.; Wasil, T.; Fais, F.; Ghiotto, F.; Valetto, A.; Allen, S.L.; Buchbinder, A.; Budman, D.; Dittmar, K.; Kolitz, J.; Lichtman, S.M.; Schulman, P.; Vinciguerra, V.P.; Rai, K.R.; Ferrarini, M.; Chiorazzi, N. (1999): Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 94, 1840–1847
- 27.) DeFranco, A.L. (1992): Tyrosine phosphorylation and the mechanism of signal transduction by the B-lymphocyte antigen receptor. (Review). *Eur. J. Biochem.*, 210, 381–388
- 28.) Dhodapkar, M.; Tefferi, A.; Su, J.; Phyliky, R.L. (1993): Prognostic features and survival in young adults with early/intermediate chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): a single institution study. *Leukemia*, 7, 1232–1235

- 29.) Döhner, H.; Stilgenbauer, S.; Benner, A.; Leupolt, E.; Krober, A.; Bullinger, L.; Döhner, K.; Bentz, M.; Lichter, P. (2000): Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med*, 343, 1910–1916
- 30.) Dreger, P.; Brand, R.; Hansz, J.; Milligan, D.; Corradini, P.; Finke, J.; Deliliers, G.L.; Martino, R.; Russell, N.; Van Biezen, A.; Michallet, M.; Niederwieser, D.; Chronic Leukemia Working Party of the EBMT (2003): Treatment-related mortality and graft-versus-leukemia activity after allogeneic stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia using intensity-reduced conditioning. *Leukemia*, 17, 841–848
- 31.) Dreger, P.; Corradini, E.; Kimby, M.; Michallet, D.; Milligan, J.; Schetelig, W.; Wiktor-Jedrzejczak, D.; Niederwieser, M.; Hallek, M.; Montserrat, E. (2007): Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia*, 21, 12–17
- 32.) Dunn, G.P.; Bruce, A.T.; Ikeda, H.; Old, L.J.; Schreiber, R.D. (2002): Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.*, 3, 991–998
- 33.) Dunn, G.P.; Old, L.J.; Schreiber, R.D. (2004): The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting (Review). *Immunity*, 21, 137–148
- 34.) Eichhorst, B.F.; Busch, R.; Hopfinger, G.; Pasold, R.; Hensel, M.; Steinbrecher, C.; Siehl, S.; Jäger, U.; Bergmann, M.; Stilgenbauer, S.; Schweighofer, C.; Wendtner, C.M.; Döhner, H.; Brittinger, G.; Emmerich, B.; Hallek, M.; German CLL Study Group (2006): Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Blood*, 107, 885–891
- 35.) Elisseeva, O.A.; Yoshihiro, O.; Tsuboi, A.; Ogata, K.; Wu, F.; Kin, H.; Nomura, T.; Sugiyama, H. (2002): Humoral immune responses against Wilms tumor gene WT1 product in patients with hematopoietic malignancies. *Blood*, 99, 3272–3278
- 36.) Farace, F.; Orlanducci, F.; Dietrich, P.Y.; Gaudin, C.; Angevin, E.; Courtier, M.H.; Bayle, C.; Hercend, T.; Triebel, F. (1994): T cell repertoire in patients with B chronic lymphocytic leukemia. Evidence for multiple in vivo T cell clonal expansions. *J. Immunol.*, 153, 4281–4290

- 37.) Fist, G.; Miszlay, Zs.; Czink, E.; Varga, L.; Pálóczi, K.; Szegedi, Gy.; Hollin, S.R. (1986): C1 and C4 abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia and their significance. *Immunol. Letts*, 14, 255–259
- 38.) Friedrichs, B.; Siegel, S.; Andersen, M.H.; Schmitz, N.; Zeis, M. (2006): Survivin-derived peptide epitopes and their role for induction of antitumor immunity in hematological malignancies. *Leuk. Lymphoma*, 47, 978–985
- 39.) Friedrichs, B.; Siegel, S.; Kloess, M.; Barsoum, A.; Coggin, J. Jr.; Rohrer, J.; Jacob, I.; Tiemann, M.; Heidorn, K.; Schulte, C.; Kabelitz, D.; Steinmann, J.; Schmitz, N.; Zeis, M. (2008): Humoral immune responses against the immature laminin receptor protein show prognostic significance in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J. Immunol.*, 180, 6374–6384
- 40.) Gachard, N.; Salviat, A.; Boutet, C.; Arnoulet, C.; Durrieu, F.; Lenormand, B.; Leprêtre, S.; Olschwang, S.; Jardin, F.; Lafage-Pochitaloff, M.; Penther, D.; Sainty, D.; Reminieras, L.; Feuillard, J.; Béné, M.C. (2008): Multicenter study of ZAP-70 expression in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia using an optimized flow cytometry method. *Haematologica*, 93, 215–223
- 41.) Garrido, T.; Ruiz-Cabello, F.; Cabera, T.; Perez-Villar, J.J.; Lopez-Botet, M.; Duggan-Keen, M.; Stern, P.L. (1997): Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol. Today*, 18, 89–95
- 42.) George, A.J.; Tutt, A.L.; Stevenson, F.K. (1987): Anti-idiotypic mechanisms involved in suppression of a mouse B cell lymphoma, BCL1. *J. Immunol.*, 138, 628–634
- 43.) Gnjatic, S.; Atanackovic, D.; Jäger, E.; Matsuo, M.; Selvakumar, A.; Altorki, N.K.; Maki, R.G.; Dupont, B.; Ritter, G.; Chen, Y.T.; Knuth, A.; Old, L.J. (2003): Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 8862–8867
- 44.) Görgün, G.; Holderried, T.A.; Zahrieh, D.; Neuberg, D.; Gribben, J.G. (2005): Chronic lymphocytic leukemia cells induce changes in gene expression of CD4 and CD8 T cells. *J. Clin. Invest.*, 115, 1797–1805
- 45.) Goodnow, C.C.; Crosbie, J.; Adelstein, S.; Lavoie, T.B.; Smith, C.S.; Brink, R.A.; Pritchard, B.H.; Wotherspoon, J.S.; Loblay, R.H.; Raphael, K. (1988): Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature*, 334, 676

- 46.) Greve, B.; Magnusson, C.G.; Melms, A.; Weissert, R. (2001): Immunoglobulin isotypes reveal a predominant role of type 1 immunity in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, 121, 120–125
- 47.) Hallek, M.; Eichhorst, B.F. (2004): Chemotherapy combination treatment regimens with fludarabine in chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. J.*, 5 Suppl. 1, 20–30
- 48.) Hallek, M.; Bergmann, M.; Brittinger, G.; Dohner, H.; Dreger, P.; Herold, M.; Hopfinger, G.; Jager, U.; Knauf, W.; Nerl, C.; Rummel, M.; Schmitt, B.; Wendtner, C.M.; Emmerich, B. (2002): Chronic lymphatic leukemia. Current therapy concepts. *Internist*, 43, 1245–1254
- 49.) Hamblin, T.J.; Davis, Z.; Gardiner, A.; Oscier, D.G.; Stevenson, F.K. (1999): Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukaemia. *Blood*, 94, 1848–1854
- 50.) Hansson, L.; Rabbani, H.; Fagerberg, J.; Osterborg, A.; Mellstedt, H. (2003): T-cell epitopes within the complementarity-determining and framework regions of the tumor-derived immunoglobulin heavy chain in multiple myeloma. *Blood*, 101, 4930–4936
- 51.) Heath, M.E.; Cheson, B.D. (1985): Defective complement activity in chronic lymphocytic leukaemia. *Am. J. Hematol.*, 19, 63–67
- 52.) Hsu, F.J.; Caspar, C.B.; Czerwinski, D.; Kwak, L.W.; Liles, T.M.; Syrengelas, A.; Taidi-Laskowski, B.; Levy, R. (1997): Tumor-Specific Idiotype Vaccines in the Treatment of Patients With B-Cell Lymphoma – Long-Term Results of a Clinical Trial. *Blood*, 89, 3129–3135
- 53.) Hussain, R.; Dockrell, H.M.; Chiang, T.J. (1994): IgG subclass antibody to *Mycobacterium leprae* 18,000 MW antigen is restricted to IgG1 and IgG3 in leprosy. *Immunology*, 83, 495–500
- 54.) Ichim, C.V. (2005): Revisiting immunosurveillance and immunostimulation: Implications for cancer immunotherapy. *J. Transl. Med.*, 3, 8
- 55.) Jaffe, E.S.; Harris, N.L.; Stein, H.; Vardiman, J.W. (2002): World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. *Ann. Oncol.*, 13, 490–491

- 56.) Jager, E.; Nagata, Y.; Gnjatic, S.; Wada, H.; Stockert, E.; Karbach, J.; Dunbar, P.R.; Lee, S.Y.; Jungbluth, A.; Jäger, D.; Arand, M.; Ritter, G.; Cerundolo, V.; Dupont, B.; Chen, Y.T.; Old, L.J.; Knuth, A. (2000): Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 4760–4765
- 57.) Jahrsdörfer, B.; Wooldridge, J.E.; Blackwell, S.E.; Taylor, C.M.; Link, B.K.; Weiner, G.J. (2005): Good prognosis cytogenetics in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated in vitro with low susceptibility to apoptosis and enhanced immunogenicity *Leukemia* 19, 759–766
- 58.) Janeway, C.A.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchik, M. (2005): *Immunologie*, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- 59.) Jantunen, E.; Itala, M.; Siitonen, T.; Juvonen, E.; Koivunen, E.; Koistinen, P.; Volin, L.; Remes, K.; Nousiainen, T. (2006): Autologous stem cell transplantation in patients with chronic lymphocytic leukaemia: the finnish experience. *Bone Marrow Transplant*, 37, 1093–1098
- 60.) Jelinek D.F.; Tschumper, R.C.; Stolovitzky, G.A.; Iturria, S.J.; Tu, Y.; Lepre, J.; Shan, N.; Kay, N.E. (2003): Identification of a global gene expression signature of B-chronic lymphocytic leukemia. *Mol.Cancer Res.*, 1, 346–361
- 61.) Juliusson, G.; Oscier, D.G.; Fitchett, M.; Ross, F.M.; Stockdill, G.; Mackie, M.J.; Parker, A.C.; Castoldi, G.L.; Guneo, A.; Knuutila, S. et al. (1990): Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N. Engl. J. Med.*, 323, 720–724
- 62.) Keating, M.J.; Chiorazzi, N.; Messmer, B.; Damle, R.N.; Allen, S.L.; Rai, K.R.; Ferrarini, M.; Kipps, T.J. (2003): Biology and treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, 153–175
- 63.) Krackhardt, A.M.; Witzens, M.; Harig, S.; Hodi, F.S.; Zauls, A.J.; Chessia, M.; Barrett, P.; Gribben, J.G. (2002): Identification of tumor-associated antigens in chronic lymphocytic leukemia by SEREX. *Blood*, 100, 2123–2131
- 64.) Kwak, L.W.; Campbell, M.J.; Czerwinski, D.K.; Hart, S.; Miller R.A.; Levy, R. (1992): Induction of immune responses in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumors. *N. Engl. J. Med.*, 22, 327, 1236–1237

- 65.) Le Dieu, R.; Gribben, J. (2006): Vaccine- and immune-based therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Oncol.*, 33, 220–229
- 66.) Lee, B.-N.; Duvic, M.; Tang, C.-K.; Buenos-Ramos, C.; Estrov, Z.; Reuben, J.M. (1999): Dysregulated synthesis of intracellular type 1 and type 2 cytokines by T cells of patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 6, 79–84
- 67.) Lin, K.; Sherrington, P.D.; Dennis, M.; Matrai, Z.; Cawley, J.C.; Pettitt A.R. (2002): Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV (H) mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 100, 1404–1409
- 68.) Maeda, H.; Shiraishi, A. (1996): TGF-beta contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor bearing mice. *J. Immunol.*, 156, 73–78
- 69.) Mauro, F.R.; Foa, R.; Giannarelli, D.; Cordone, I.; Crescenzi, S.; Pescarmona, E.; Sala, R.; Cerretti, R.; Mandelli, F. (1999): Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood*, 94, 448–454
- 70.) Mikaelsson, E.; Danesh-Manesh, A.H.; Luppert, A.; Jeddi-Tehrani, M.; Rezvany, M.R.; Sharifian, R.A.; Safaie, R.; Roohi, A.; Osterborg, A.; Shokri, F.; Mellstedt, H.; Rabbani, H. (2005): Fibromodulin, an extracellular matrix protein: characterization of its unique gene and protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Blood*, 105, 4828–4835
- 71.) Mitterlechner, T.; Fiegl, M.; Muhlbock, H.; Oberaigner, W.; Dirnhofer, S.; Tzankov, A. (2006): Epidemiology of non-hodgkin lymphomas in Tyrol/Austria from 1991 to 2000. *J. Clin. Pathol.*, 59, 48–55
- 72.) Montserrat, E. (2004): Assessing prognosis in patients with chronic lymphocytic leukaemia a quarter of a century after Rai and Binet staging systems. *Annals of Oncol.*, 15, 1450–1451
- 73.) Montserrat, E.; Moreno, C.; Esteve, J.; Urbano-Ispizua, A.; Gine, E.; Bosch, F. (2006): How I treat refractory CLL. *Blood*, 107, 1276–1283
- 74.) Morton, L.M.; Wang, S.S.; Devesa, S.S.; Hartge, P.; Weisenburger, D.D.; Linet, M.S. (2006): Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992–2001. *Blood*, 107, 265–276

- 75.) Radford, K.J.; Vari, F.; Hart, D.N.J. (2005): Vaccine strategies to treat lymphoproliferative disorders. *Pathology*, 37, 534–550
- 76.) Reilly, R.T.; Gottlieb, M.B.; Ercolini, A.M.; Machiels, J.P.; Kane, C.E.; Okoye, F.I.; Muller, W.J.; Dixon, K.H.; Jaffee, E.M. (2000): HER-2/neu is a tumor rejection target in tolerized HER-2/neu transgenic mice. *Cancer Research*, 60, 3569–3576
- 77.) Reilly, R.T.; Machiels, J.-P.H.; Emens, L.A.; Ercolini, A.M.; Okoye, F.I.; Rachel Y. Lei, R.Y.; Weintraub, D.; Jaffee, E.M. (2001): The Collaboration of Both Humoral and Cellular HER-2/neu-targeted Immune Responses Is Required for the Complete Eradication of HER-2/neu-expressing Tumors. *Cancer Research*, 61, 880–883
- 78.) Rezvany, M.R.; Jeddi-Tehrani, M.; Osterborg, A.; Kimby, E.; Wigzell, H.; Mellstedt, H. (1999): Oligoclonal TCRBV gene usage in B-cell chronic lymphocytic leukemia: major perturbations are preferentially seen within the CD4 T-cell subset. *Blood*, 94, 1063–1069
- 79.) Rezvany, M.R.; Jeddi-Tehrani, M.; Rabbani, H.; Lewin, N.; Avila-Carino, J.; Osterborg, A.; Wigzell, H.; Mellstedt, H. (2000): Autologous T lymphocytes may specifically recognize leukaemic B cells in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br. J. Haematology*, 111, 608–617
- 80.) Robak, T. (2006): New agents in chronic lymphocytic leukemia. *Curr. Treat. Options Oncol.*, 7, 200–212
- 81.) Rohrer, J.W.; Rohrer, S.D.; Barsoum, A.; Coggin, J.H. Jr. (1994): Differential recognition of murine tumor-associated oncofetal transplantation antigen and individually specific tumor transplantation antigens by syngeneic cloned BALB/c and RFM mouse T cells. *J. Immunol.*, 152, 754–764
- 82.) Rohrer, J.W.; Barsoum, A.L.; Coggin J.H. (2001): The development of a new universal tumor rejection antigen expressed on human and rodent cancers for vaccination, prevention of cancer, and anti-tumor therapy. *Mod. Asp. Immunobiol.*, 5, 191–195
- 83.) Rohrer, J.W.; Barsoum, A.L.; Coggin, J.H. Jr. (2006): Identification of oncofetal antigen/immature laminin receptor protein epitopes that activate BALB/c mouse OFA/iLRP-specific effector and regulatory T cell clones. *J. Immunol.*, 176, 2844–2856

- 84.) Rossi, E.; Matutes, E.; Morilla, R.; Owusu-Ankomah, K.; Heffernan, A.M.; Catovsky, D. (1996): Zeta chain and CD28 are poorly expressed on T lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 10, 494–497
- 85.) Sahin, U.; Türeci, O.; Schmitt, H.; Cochlovius, B.; Johannes, T.; Schmits, R.; Stenner, F.; Luo, G.; Schobert, I.; Pfreundschuh, M. (1995): Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 11810–11813
- 86.) Sampalo, A.; Navas, G.; Medina, F.; Segundo, C.; Cámara, C.; Brieva, J.A. (2000): Chronic lymphocytic leukemia B cells inhibit spontaneous Ig production by autologous bone marrow cells: role of CD95-CD95L interaction *Blood*, 96, 3168–3174
- 87.) Schmitz, M.; Diestelkoetter, P.; Weigle, B.; Schmachtenberg, D.; Stevanovic, S.; Ockert, D.; Rammensee, H.G.; Rieber, E.P. (2000): Generation of survivin-specific CD8⁺ T effector cells by dendritic cells pulsed with protein or selected peptides. *Cancer Research*, 60, 4845
- 88.) Schroeder, H.W. Jr.; Dighiero, G. (1994): The pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol. Today*, 15, 288–294
- 89.) Scrivener, S.; Goddard, R.V.; Kaminski, E.R.; Prentice, A.G. (2003): Abnormal T-cell function in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk. Lymphoma*, 44, 383–389
- 90.) Siegel, S.; Wagner, A.; Kabelitz, D.; Marget, M.; Coggin, J.H. Jr.; Barsoum, A.; Rohrer, J.; Schmitz, N.; Zeis, M. (2003): Induction of cytotoxic T-cell responses against the oncofetal antigen – immature laminin receptor for the treatment of hematologic malignancies. *Blood*, 102, 4416–4423
- 91.) Siegel, S.; Wagner, A.; Friedrichs, B.; Wendeler, A.; Wendel, L.; Kabelitz, D.; Steinmann, J.; Barsoum, A.; Coggin, J.; Rohrer, J.; Dreger, P.; Schmitz, N.; Zeis, M. (2006): Identification of HLA-A*0201-presented T cell epitopes derived from the oncofetal antigen – immature laminin receptor protein in patients with hematological malignancies. *J. Immunol.*, 176, 6935–6944
- 92.) Sinisalo, M.; Aittoniemi, J.; Koski, T.; Tobin, G.; Thunberg, U.; Sundström, C.; Rosenquist, R.; Käyhty, H.; Vilpo, J. (2004): Similar humoral immunity parameters in chronic lymphocytic leukemia patients independent of VH gene mutation status. *Leuk Lymphoma*, 45(12), 2451–2454

- 93.) Stevenson, F.K.; Caligaris-Cappio, F. (2004): Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood*, 103, 4389–4395
- 94.) Stilgenbauer, S.; Döhner, H. (2004): Molecular genetics and its clinical relevance. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.*, 18, 827–848
- 95.) Tinhofer, I.; Marschitz, I.; Kos, M.; Henn, T.; Egle, A.; Villunger, A.; Greil, R. (1998): Differential Sensitivity of CD4⁺ and CD8⁺ T Lymphocytes to the Killing Efficacy of Fas (Apo-1/CD95) Ligand⁺ Tumor Cells in B Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood*, 91, 4273–4281
- 96.) Tobin, G.; Rosenquist, R. (2005): Prognostic usage of V_H gene mutation status and its surrogate markers and the role of antigen selection in chronic lymphocytic leukemia. *Med. Oncol.*, 22, 217–228
- 97.) Tötterman, T.H.; Carlsson, M.; Simonsson, B.; Bengtsson, M.; Nilsson, K. (1989): T-cell activation and subset patterns are altered in B-CLL and correlate with the stage of the disease. *Blood*, 74, 786–792
- 98.) Varga, L.; Czink, E.; Mislai, Z.S.; Paloczi, K.; Banyait, A.; Szegedit, G.; Fust, G. (1995): Low activity of the classical complement pathway predicts short survival of patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Clin. Exp. Immunol.*, 99, 112–116
- 99.) Villamor, N.; Montserrat, E.; Colomer, D. (2003): Mechanism of action and resistance to monoclonal antibody therapy. *Semin. Oncol.*, 30, 424–433
- 100.) Vuist, W.M.; Levy, R.; Maloney, D.G. (1994): Lymphoma regression induced by monoclonal anti-idiotypic antibodies correlates with their ability to induce Ig signal transduction and is not prevented by tumor expression of high levels of bcl-2 protein. *Blood*, 83, 899–906
- 101.) Wadhwa, P.D.; Morrison, V.A. (2006): Infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Oncol.*, 33, 240–249
- 102.) Wendtner, C.M.; Eichhorst, B.F.; Hallek, M.J. (2004): Advances in chemotherapy for chronic lymphocytic leukemia. *Semin. Hematol.*, 41, 224–233
- 103.) Weng, W.-K.; Czerwinski, D.; Timmerman, J.; Hsu, F.J.; Levy, R. (2004): Clinical Outcome of Lymphoma Patients After Idiotypic Vaccination Is Correlated With Humoral Immune Response and Immunoglobulin G Fc Receptor Genotype. *J. Clin. Onc.*, Vol. 22, 23, 4717–4724

- 104.) Wu, C.J.; Yang, X.F.; McLaughlin, S.; Neuberg, D.; Canning, C.; Stein, B.; Alyea, E.P.; Soiffer, R.J.; Dranoff, G.; Ritz, J. (2000): Detection of a potent humoral response associated with immune-induced remission of chronic myelogenous leukemia. *J. Clin. Invest.*, 106(5), 705–14
- 105.) Wu, F.; Oka, Y.; Tsuboi, A.; Elisseeva, O.K.; Nakajima, H.; Fujiki F.; Masuda T.; Murakami, M.; Yoshihara, S.; Ikegama K.; Hosen, N.; Kawakami, M.; Nakagawa, M.; Kubota, T.; Soma, T.; Yamagami, T.; Tsukaguchi, M.; Ogawa, H.; Oji, Y.; Hamaoka, T.; Kawase, I.; Sugiyama, H. (2005): Th1-biased humoral immune responses against Wilms tumor gene WT1 product in the patients with hematopoietic malignancies. *Leukemia*, 19, 268–274
- 106.) Zeis, M.; Siegel, S.; Wagner, A.; Schmitz, M.; Marget, M.; Kühl-Burmeister, R.; Adamzik, I.; Kabelitz, D.; Dreger, P.; Schmitz, N.; Heiser, A. (2003): Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells. *J. Immunol.*, 170, 5391–5397
- 107.) Zelle-Rieser, C.; Barsoum, A.L.; Sallusto, F.; Ramoner, R.; Rohrer, J.W., Hörtl, L.; Bartsch, G.; Coggin, J.H. Jr.; Thurnher, M. (2001): Expression and immunogenicity of oncofetal antigen-immature laminin receptor in human renal cell carcinoma. *J. Urol.*, 165, 1705–1709

9 Danksagung

In erster Linie möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. med. Matthias Zeis für seine Unterstützungen und Anregungen zu dieser Arbeit danken, er stand mir für Frage und Antwort stets zur Seite und leistete eine sehr gute Betreuung.

Für die viele Geduld und Unterstützung möchte ich den Mitarbeiterinnen im Hämatologie-Labor Dipl. Biol. Sabine Zeis, MTA Linda Carstens, BTA Steffi Kroll und Dipl. Biol. Sandra Siegel danken.

Abschließend gilt mein besonderer Dank meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung und Geduld.

10 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name:	Ilja Jacob
Geburtsdatum:	27.09.1977
Geburtsort:	Bonn

Schulbildung

1984 – 1987	Grundschule der Internationalen Schule SHAPE, SHAPE Belgien
1987 – 1988	Hans-Claussen-Grundschule, Pinneberg
1988 – 1991	Johannes-Brahms-Gymnasium, Pinneberg
1991 – 1993	Städtisches Gymnasium Rheinbach
1993 – 1997	Gymnasium Willhöden, Hamburg
1997	Abitur
1997 – 1998	Wehrdienst in der 2./PzAufklLehrBtl. 3 Lüneburg

Studium

März 1998	Beginn des Medizinstudiums an der Universität Hamburg
14.03.00	Ärztlichen Vorprüfung
28.08.01	1.Staatsexamen
23.03.04	2.Staatsexamen
13.06.05	3.Staatsexamen

Beruflicher Werdegang

März 2001 – Juli 2003	Wissenschaftliche Hilfskraft im Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin, Hamburg
Seit 05/07	Assistenzarzt in der Kardiologie, Herz-Kreislaufzentrum Bad Segeberg