

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

II. Medizinischen Klinik und Poliklinik

Abteilung Onkologie, Hämatologie und Knochenmarktransplantation mit Sektion Pneumologie

Direktor Prof.Dr.C. Bokemeyer

**Funktionelle Charakterisierung der Epitopbindung von B-Zell-
Rezeptoren auf chronischen lymphatischen Leukämiezellen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Antje Jackst

aus Wilhelmshaven

Hamburg 2010

Angenommen von der medizinischen Fakultät am: 14.06.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof.Dr.Martin Trepel

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: Prof.Dr.B.Fleischer

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof.Dr.M.Horstmann

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Einleitung	6
1.1 Chronische lymphatische Leukämie	6
1.1.1 Epidemiologie	6
1.1.2 Ätiologie	6
1.1.3 Diagnose.....	7
1.1.4 Stadieneinteilung	7
1.1.5 Therapie.....	9
1.2 Der B-Zell-Rezeptor und seine Rolle bei der Lymphomentstehung.....	10
1.3 Phage-Display-Peptide Libraries (Phagen-Peptidbanken).....	15
1.4 Vorarbeiten zu den in dieser Arbeit geschilderten Untersuchungen	17
2 Ziele der Arbeit	20
3 Material	21
3.1 Patientenproben	21
3.2 Reagenzien.....	21
3.3 Nährmedien	22
3.4 Kits	24
3.5 Enzyme und Puffer	24
3.6 Bakterienstämme.....	25
3.7 Plastik- und Glaswaren	25
3.8 Geräte.....	25
4 Methoden	26
4.1 Zellkulturmethoden	26
4.1.1 Isolierung und Kultivierung von mononukleären Zellen.....	26
4.1.2 Zellzählung	27
4.2 Allgemeine molekularbiologische Arbeitstechniken.....	27
4.2.1 RNA-Extraktion	27
4.2.2 Transkription in komplementäre DNA (cDNA).....	27
4.2.3 Amplifikation der Immunglobuline mittels PCR.....	28
4.2.4 Agarosegelelektrophorese	30
4.2.5 Gelaufreinigung von DNA Fragmenten.....	30
4.2.6 Klonierung der amplifizierten DNA.....	31
4.2.7 Hitzeschock-Transformation	31
4.2.8 Amplifikation	32

4.2.9	DNA Minipräparation	32
4.2.10	Sequenzanalyse und Auswertung.....	32
4.2.11	Platten- und Flüssigkultur.....	33
4.3	Spezielle Arbeitsmethoden mit Phagen.....	34
4.3.1	Verwendete Phagenklone	34
4.3.2	Einzelklonphagenherstellung	35
4.3.3	Titration einer Bakteriophagenlösung	35
4.4	Screening der Phagenbindung an CLL-Zellen.....	36
4.5	Datenerhebung und klinische Parameter.....	38
4.6	Statistik	38
5	Ergebnisse	40
5.1	B-Zell-Rezeptor-Epitoperkennungsmuster	40
5.2	Auswertung prognostischer Parameter.....	44
5.2.1	Alter.....	44
5.2.2	Chromosomale Aberrationen	45
5.2.3	IGV _H Gen und Mutationsstatus des B-Zell-Rezeptors.....	47
5.3	Vergleich der Kategorie 2 mit der Kontrollgruppe.....	50
5.3.1	Vergleich der chromosomalen Aberrationen der Kategorie 2 und der Kontrollgruppe	51
5.3.2	Vergleich der Kategorie 2 mit der Kontrollgruppe hinsichtlich des IGV _H Gens und des Mutationsstatus	52
5.3.3	Time to first treatment (TTFT, Zeitraum zwischen Diagnosestellung und der ersten Therapie der CLL)	53
6	Diskussion.....	57
6.1	Übersicht.....	57
6.2	Bildung von Kategorien anhand der B-Zell-Rezeptor- Epitoperkennungsmuster	58
6.3	Korrelation der Epitoperkennungsmuster mit bekannten prognostischen Parametern.....	60
6.4	Prognostische Bedeutung des Epitoperkennungsmusters.....	63
6.5	Perspektiven.....	67
7	Zusammenfassung.....	70
8	Abkürzungsverzeichnis	72
9	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	73
10	Literaturverzeichnis	74
11	Danksagung	81
12	Lebenslauf.....	82

13 Eidesstattliche Erklärung 83

1 Einleitung

1.1 Chronische lymphatische Leukämie

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) gehört zu den niedrig malignen Non-Hodgkin-Lymphomen der B-Zell-Reihe. Sie ist charakterisiert durch die klonale Expansion und Akkumulation kleiner, morphologisch reif wirkender, jedoch immunologisch inkompetenter B-Lymphozyten im Knochenmark, im peripheren Blut, in Lymphknoten und der Milz. Die WHO-Klassifikation unterscheidet neben der CLL noch eine Unterform als „small lymphocytic leukemia“ (B-SLL, kleinzelliges B-Zell Lymphom) (Jaffe et al., 2001, Harris et al., 1999). Bei dieser Unterform steht der Lymphknotenbefall stark im Vordergrund und nicht der leukämische Verlauf.

1.1.1 Epidemiologie

Die CLL gehört mit einem Anteil von ca. 30% zu den häufigsten Leukämieformen in Europa und Amerika (Jaffe et al., 2001). In Deutschland tritt die CLL mit einer über alle Altersgruppen gerechneten Inzidenz von 3/100.000 pro Jahr auf (Hallek et al., 2002). Die Inzidenz steigt mit dem Alter stark an; so beträgt sie bei über 80-jährigen 30/100.000 pro Jahr. Das mittlere Erkrankungsalter liegt ungefähr bei 72 Jahren.

1.1.2 Ätiologie

Die Ursache der CLL ist bis heute unbekannt. Die Bedeutung physikalischer und chemischer Noxen ist umstritten, wird aber eher nicht als wesentliche Ursache angenommen (Hamblin, 2008). Genetische Faktoren spielen wohl eine gewisse Rolle: Kinder von CLL-Patienten haben im Vergleich zur Normalbevölkerung ein erhöhtes Risiko, an einer CLL zu erkranken (Yuille et al., 2000).

1.1.3 Diagnose

Die Diagnose der CLL ist häufig ein Zufallsbefund im Rahmen von Routineuntersuchungen, bei denen eine Leukozytose im Blutbild auffällt. Zum Zeitpunkt der Diagnose sind bis zu 50% der Fälle asymptomatisch. Die Diagnosestellung beruht auf der typischen Morphologie im Blutaussstrich, dem Knochenmarksbefund und einem bestimmten Immunphänotyp. Diagnosekriterien nach den Richtlinien des NCI (National Cancer Institute der USA) und dem IWCLL (International Workshop on CLL 1989) sind eine über drei Monate anhaltende Lymphozytose im peripheren Blut von $>5000/\mu\text{l}$. Die Lymphozytenmembran ist sehr labil und beim Anfertigen eines Blutaussstriches kommt es oft zur Zellruptur, die man als „Gumprechtsche Kernschatten“ beobachten kann. Bei den Lymphozyten handelt es sich um klonale B-Lymphozyten, die durch eine Durchflusszytometrie von aktiven Lymphozyten unterschieden werden können. Die Klonalität zeigt sich in der Leichtkettenrestriktion, der Expression der Immunglobulin-Leichtketten nur des Typs Kappa oder nur des Typs Lambda. Die CLL-Zellen exprimieren das sonst bei T-Zellen exprimierte Antigen CD5 und die B-Zell Oberflächenantigene CD19, CD20 und CD23. Die B-Zell Oberflächenantigene CD20 und CD79B sind charakteristischerweise nur gering exprimiert (Hallek et al., 2008).

1.1.4 Stadieneinteilung

Das klinische Stadium der CLL lässt Rückschlüsse auf die durchschnittliche Lebenserwartung zu, allerdings sind auch innerhalb einer Stadiengruppe, die Krankheitsverläufe sehr variabel. Die klinische Stadieneinteilung, die nach Binet (Binet et al., 1981, Binet et al., 1977) oder nach der Rai Klassifikation (Rai and Montserrat, 1987, Rai et al., 1975) erfolgt, ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Prognoseabschätzung anhand der Stadieneinteilung nach Binet (Binet et al., 1981, Binet et al., 1977) und Rai (Rai and Montserrat, 1987, Rai et al., 1975)

Stadium	Merkmale	mittlere Überlebenszeit (Monate)
Rai Klassifikation		
0	Lymphozytose	>150
I	Lymphozytose + Lymphknotenvergrößerung	101
II	Lymphozytose +Lymphknotenvergrößerung +Hepato-u./o. Splenomegalie	71
III	Lymphozytose +Lymphknotenvergrößerung +Hepato u./o.Splenomegalie +Anämie mit Hb <11g/dl	19
IV	Lymphozytose +Lymphknotenvergrößerung +Hepato u./o.Splenomegalie +Anämie mit Hb <11g/dl +Thrombozytopenie <100.000/μl	19
Binet Klassifikation		
A	<3 vergrößerte Lymphknotenregion	>120
B	>3 vergrößerte Lymphknotenregion	60-84
C	+/- Anämie mit Hb <11g/dl +/- Thrombozytopenie <100.000/μl	< 36

Die Abschätzung der Prognose, allein anhand der klinischen Befundkonstellation ist recht ungenau und ist gerade bei jüngeren Patienten in frühen Stadien aufgrund der hohen Variabilität sehr unzuverlässig. Um eine präzisere Risikoabschätzung erreichen zu können, finden deshalb weitere Laborparameter, sowie genetische und biologische Marker ihre Anwendung.

Ziel dieser genaueren Bestimmung des individuellen Risikoprofils ist die Identifikation von Patienten mit einem rasch progredienten Verlauf. Folgende Parameter sagen unabhängig vom Stadium einen eher ungünstigeren Verlauf voraus (Hamblin, 2007, Hallek et al., 1997, Zwiebel and Cheson, 1998, Van Bockstaele et al., 2009).

- Serummarker
 - Erhöhte Serum-LDH-Aktivität
 - Erhöhte Serum- β 2-Mikroglobulinkonzentration
 - Erhöhter Serumspiegel des löslichen CD23
- Proliferationsmarker
 - Lymphozytenverdopplungszeit < 12 Monate
 - Diffuse Knochenmarkinfiltration
- Zytogenetik
 - Chromosomale Aberration (11q23 und 17p13)
 - Fehlen von somatischen Hypermutationen der Immunglobulin-VH-Genregion
- Surrogatmarker für den Mutationsstatus
 - Positivität für CD38
 - Positivität für ZAP-70

1.1.5 Therapie

Die Therapie ist bis heute in der Regel nicht kurativ möglich. Die Entscheidung, wann mit der Behandlung begonnen wird, ist daher individuell zu treffen. Generell besteht Einigkeit darüber, dass Patienten im Rai-Stadium III-IV und im Binet-Stadium C sowie deutlich symptomatische Patienten im Rai-Stadium II oder Binet-Stadium B therapiert werden sollten. Bei einer stabilen und nicht symptomatischen Anämie bzw. Thrombozytopenie kann aber im Einzelfall ein abwartendes Verhalten durchaus berechtigt sein. Medikamentöse Grundlage der Therapie ist meist der Einsatz von Alkylanzien, Nukleosidanaloga, seltener auch von Anthrazyklinen. Lange Zeit galt als Standardtherapie eine orale Monotherapie mit dem Alkykanz Chlorambucil (Wilhelm et al., 1997). Die Remissionsraten liegen ungefähr bei 40%, wobei komplette Remissionen selten sind. Durch die Einführung der Purinanaloga wie das Fludarabin und 2-

Chlordesoxyadenosin (Cladribin) hat sich die Behandlungsstrategie bei der CLL gewandelt. In der Primärtherapie führt der Einsatz von Fludarabin zu Gesamt-Ansprechraten von etwa 80% und ein Drittel der Patienten erreicht eine Komplettremission (Keating et al., 1998). Eine Kombination von Fludarabin und Cyclophosphamid kann die Ergebnisse weiter verbessern. Als neuere Therapiemöglichkeiten sind monoklonale Antikörper wie Rituximab (monoklonaler Antikörper gegen CD20) oder Alemtuzumab (monoklonaler Antikörper gegen CD52) hinzu gekommen. Rituximab wird meistens kombiniert mit Zytostatika verabreicht. Eine weitere Option zur Rezidivtherapie ist eine Hochdosischemotherapie mit allogener bzw. autologer Stammzelltransplantation, die zwar potentiell zur Heilung führen kann, allerdings mit einer hohen therapiebedingten Mortalität belastet ist.

1.2 Der B-Zell-Rezeptor und seine Rolle bei der Lymphomentstehung

Die chronische lymphatische Leukämie (CLL) zählt zu den häufigsten Leukämieformen und trotzdem ist die Pathogenese noch nicht geklärt. Ein besonderes Augenmerk bei der Suche nach Ursachen für die Entstehung der CLL liegt dabei in den letzten Jahren auf der Erforschung des B-Zell-Rezeptors (BZR), der auf der Oberfläche von gesunden wie auch von malignen Zellen exprimiert wird.

Der B-Zell-Rezeptor ist ein Immunglobulin und somit Antigenrezeptor auf der Oberfläche von reifen B-Lymphozyten, der spezifisch für den jeweiligen Zellklon ist (Chiorazzi et al., 2005). Die B-Zellen können diesen Rezeptor in membranständiger Form exprimieren oder als Antikörper sezernieren. Er stellt einen Komplex aus einem membrangebundenen Immunglobulin (Ig) und aus zwei Ig- α /Ig- β heterodimeren, transmembranösen Proteinen dar. Diese transmembranösen Proteine, die auch als CD79 a/b bezeichnet werden, sind für die Signalweiterleitung wichtig. Das membrangebundene Immunglobulin besteht aus zwei identischen leichten und schweren Ketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. In der Keimbahn werden zwei unterschiedliche leichte Ketten (λ =lambda und κ =kappa) und fünf verschiedenen

schwere Ketten kodiert. Die schweren Ketten werden je nach Immunglobulin γ -Kette bei IgG, α -Kette bei IgA, μ -Kette bei IgM, ϵ -Kette bei IgE und δ -Kette bei IgD benannt. Aufgrund der Struktur der Immunglobuline kann man einen konstanten und einen variablen Teil unterscheiden. Die variable Region stellt die Antigenbindungsregion dar. Die konstante Region definiert fünf verschiedene Immunglobulinklassen, die sich in einzelnen Aminosäuresequenzen, Molekulargewicht, Kohlenhydratgehalt und in ihrer Funktion unterscheiden. Sie werden je nach Typ der schweren Kette als IgG, IgA, IgM, IgD und IgE bezeichnet. Immunglobuline können durch Papain bzw. Pepsin in funktionelle Abschnitte gespalten werden: der Amino-terminale Abschnitt wird als Fab-Fragment (Antigenbindendes Fragment) bezeichnet, während der restliche Abschnitt als Fc-Fragment (crystillizable oder constant Fragment) beschrieben wird. Das Fc-Fragment bestimmt unter anderem die Immunglobulinklasse und dient der Komplementaktivierung. In der variablen Region gibt es drei so genannte hypervariable Bereiche, die CDR Regionen (complementarity determining regions). Die größte Variabilität weist die CDR-3 Region auf, der auch die größte Bedeutung für die Antigenbindung zukommt (Xu and Davis, 2000). Die hypervariablen Regionen der schweren und leichten Ketten, bilden jeweils gemeinsame hypervariable Domänen, die die Antigenbindungsstelle repräsentieren. Die Antigenbindungsstelle ist hochcharakteristisch für einen Antikörper bestimmter Spezifität und wird auch als Idiotyp bezeichnet. Zwischen den hypervariablen Regionen liegen die Rahmen-Regionen (frame work regions), sie bilden das strukturelle Gerüst der Antigenbindungsstelle. Die große Variabilität der Immunglobuline entsteht durch somatische Genumlagerungen und somatische Mutationen. Die Gene, die für die leichte bzw. schwere Kette codieren, liegen auf unterschiedlichen Chromosomen. Die genetische Information für die leichte Kette liegt auf dem Chromosom 22q11 bzw. 2p12 (kappa bzw. lambda), während die Information für die schwere Kette auf dem Chromosom 14p32 liegt. Die Immunglobulinsegmente werden in einem nicht rekombinanten Zustand vererbt, die Rekombination und somatische Genumlagerung erfolgt erst während der B-Zell-Reifung im Knochenmark. Bei dem Vorgang der somatischen Genumlagerung der schweren Kette werden jeweils eine Variante der variablen

(V-Gen), diversity (D-Gen), joining (J-Gen) und konstanten (C-Gen) Genabschnitte zusammengefügt (Early et al., 1980). Die Diversität entsteht durch die Vielzahl von Möglichkeiten der Konstruktion. Bei der leichten Kette werden V-, J- und C-Genabschnitte miteinander verbunden. In diesem Zustand wird der B-Lymphozyt als Pro-B-Zelle beschrieben und erst nach einem kompletten Rearrangement exprimiert die Zelle ein membranständiges IgM-Molekül im B-Zell-Rezeptor Komplex und wird als unreife B-Zelle bezeichnet. Durch die negative Selektion werden autoreaktive B-Zellen aussortiert und die B-Zellen tragen ein zusätzliches IgD Molekül, wodurch sie dann eine naive B-Zelle darstellen. Diversität wird zum Schluss noch durch die somatische Hypermutation erhöht, die erst nach einem Antigenkontakt im Keimzentrum erfolgt. Dadurch wird die Spezifität jedes B-Zell Klons erhöht.

Einige Studien unterstützen sehr stark die Hypothese, dass die Stimulation des B-Zell-Rezeptors (BZR) in der Pathophysiologie der CLL eine Rolle spielt. Diese Beobachtungen werden dadurch unterstützt, dass Signalmoleküle wie CD38 (Damle et al., 1999) und ZAP 70 (zeta associated Protein) (Chen et al., 2002) in dem Krankheitsverlauf der CLL eine Rolle spielen. Die CLL galt lange als eine Transformation von gesunden zu malignen B-Zellen, die durch genetische Aberration entsteht. Doch trotz dieser chromosomalen Aberrationen proliferieren primäre Lymphomzellen gewöhnlich nicht in vitro. Dies könnte darauf hindeuten, dass ein externer Stimulus für das Wachstum notwendig ist. So könnten bestimmte Wachstumsfaktoren oder Zytokine der Stimulus sein. Allerdings scheint auch eine chronische Antigenstimulation über den B-Zell-Rezeptor eine Möglichkeit zu sein. Die Theorie, dass die Pathogenese der CLL durch bestimmte Antigene ausgelöst oder aufrechtgehalten werden kann, wird auch als „antigenic-drive“ Theorie bezeichnet. Die CLL B-Zellen haben ein phänotypisches Profil von antigenaktivierten B-Zellen (Damle et al., 2002) und zeigen ein Genexpressionsmuster, das ebenfalls Kennzeichen des Status der Antigenpräsentation trägt (Klein et al., 2001). Es konnte für die CLL in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass der BZR Autoantigene (Borche et al., 1990, Sthoeger et al., 1989) oder auch virale Antigene (Mann et al., 1987) erkennt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der maligne BZR nicht durch dieselben randomisiert verteilten Immunglobulin-Gene codiert wird,

sondern nur bestimmte Gene für die variable schwere Immunglobulinkette (IGV_H) des malignen BZR codieren. Der erste Beweis, dass die leukämischen B-Zellen der CLL Patienten ein eingeschränktes Genrepertoire für die variable schwere Kette der Immunglobuline besitzt, konnte bereits 1998 durch Fais et al. gezeigt werden (Fais et al., 1998). Diese Autoren konnten ebenfalls bereits Unterschiede in dem Gengebrauch der CDR-3 Region der schweren variablen Kette (HCDR-3) feststellen und postulierten die Existenz von bestimmten IGV_H Genen in der CLL. Unabhängig von dieser Arbeit, konnte durch eine weitere Arbeitsgruppe demonstriert werden, dass die somatischen Mutationen in den IGV_H Genen der CLL B-Zellen die Erkrankten in zwei Gruppen einteilen (Hamblin et al., 1999). Somatische Mutationen der IGV_H Gene tragen zwischen 50 und 70% der CLL-Patienten (Schroeder and Dighiero, 1994). Diese Untergruppen unterscheiden sich auch im klinischen Verlauf. Patienten, die einen mutierten BZR auf der B-Zelloberfläche tragen, haben mehrheitlich einen indolenteren Verlauf als die Patienten, die einen unmutierten BZR exprimieren. Als mutiert wird ein BZR bezeichnet, der weniger als 98% Übereinstimmungen in der Gensequenz für die IGV_H der Keimbahnlinie besitzt. Als unmutiert wird ein Rezeptor mit mehr als 98% Übereinstimmungen definiert (Hamblin et al., 1999). Es ist möglich, den Mutationsstatus noch weiter zu unterteilen: 100% Homologie wird als unmutiert, 99-99,9% als minimal mutiert, 98-98,9% als grenzwertig-mutiert und weniger als 98% Homologie wird als mutiert bezeichnet (Murray et al., 2008). Die Verwendung bestimmter Ig-Gene sagt häufig etwas über den zu erwartenden Verlauf einer CLL aus. So ist z.B. das IGV_H 3-21 Gen unabhängig von dem Mutationsstatus mit einem schlechten klinischen Verlauf assoziiert (Tobin et al., 2002). Dabei fällt auch auf, dass die verwendeten 3-21 Gene zum Teil eine hohe Homologie in der Aminosäuresequenz der CDR-3 Region besitzen. Insgesamt besteht bei der CLL ein eingeschränktes Repertoire von Genen für die leichte variable Immunglobulinkette (IGV_L). Von den vielen Immunglobulingenen, die für die schwere und leichte variable Region des BZR zur Verfügung stehen, werden bestimmte Gene bevorzugt verwendet. Am häufigsten treten folgende Genfamilien auf: IGV_H 1-69, IGV_H 3-07, IGV_H 3-23 und IGV_H 4-34 auf (Schroeder and Dighiero, 1994). Diese Einengung des BZR-Genrepertoires von

malignen B-Zellen im Vergleich zu gesunden B-Zellen könnte ebenfalls ein Hinweis auf eine Selektion, durch Antigene hindeuten.

Ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Rolle von Antigenen in der Entstehung der CLL sind die beobachteten schon oben angedeuteten stereotypen HCDR-3 Regionen in der schweren variablen Immunglobulinkette. Mit dem Begriff „stereotyp“ beschreibt man die Übereinstimmung in mindestens 60% der Aminosäuresequenz der CDR-3 Region bei unterschiedlichen Patienten (Messmer et al., 2004a). Bei der CLL exprimieren mehr als 26% der Patienten solche stereotypen fast identischen BZR, die sich bislang in 110 Untergruppen mit jeweils homologen BZR einteilen ließen (Murray et al., 2008, Stamatopoulos et al., 2007, Bomben et al., 2009). In der Wahrscheinlichkeit des Auftretens von homologen BZR gibt es einen Unterschied zwischen unmutierten und mutierten BZR. Die Häufigkeit liegt bei unmutierten BZR bei 40%, während es bei mutierten BZR nur bei 10% liegt (Murray et al., 2008). Das Auftreten von stereotypen BZR unterscheidet sich stark bei Verwendung bestimmter IGH_H Genen. So treten bei 34% der Fälle mit IGH_H 1 Gene-Verwendung stereotype HCDR-3 Regionen auf, bei 23% der Fälle mit IGH_H 4 Gen-Verwendung und nur bei 15% der Fälle mit IGH_H 3 Gen-Verwendung (Stamatopoulos et al., 2007) auf. Die Verteilung von stereotypen HCDR-3 Regionen in den einzelnen Subgruppen ist sehr unterschiedlich (Abbildung 1).

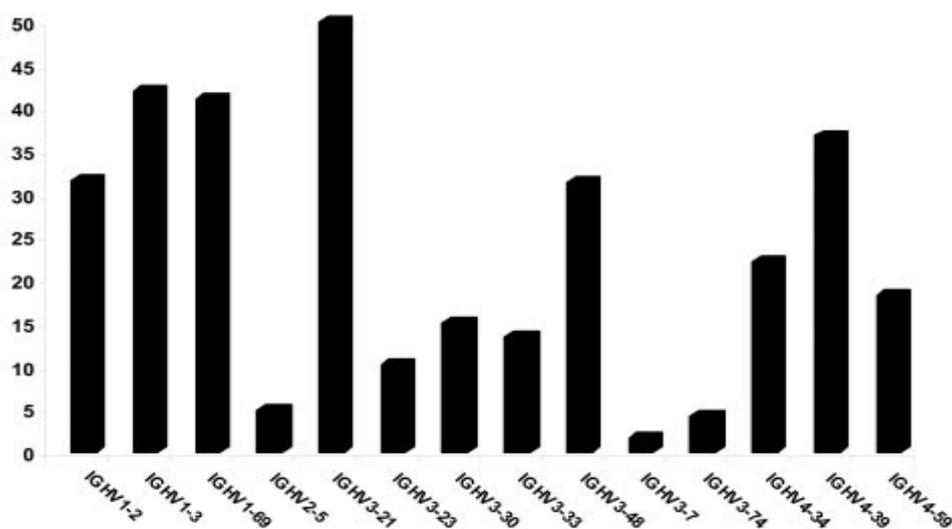


Abbildung 1: Häufigkeiten von stereotypen HCDR-3 Regionen bei Verwendung bestimmter IGH_H Gene in CLL-Zellen (Stamatopoulos et al., 2007)

Die Kategorisierung von CLL Patienten basierend auf dem Mutationsstatus der Gene für die IGH_H und die Existenz der stereotypen B-Zell-Rezeptoren, die mit dem klinischen Verlauf korrelieren, lässt stark eine Rolle des BZR in der Pathogenese der CLL vermuten. Inwieweit ein möglicher Antigenkontakt die maligne Transformation oder die weitere Lymphomentwicklung fördert, ist bislang noch unklar.

1.3 Phage-Display-Peptide Libraries (Phagen-Peptidbanken)

Die Phage-Display Technologie ist eine gut etablierte Methode zur schnellen Identifikation von Liganden für eine Vielzahl von Zielstrukturen wie z.B. Antikörperfragmente, Proteine, Enzyme etc. Dabei wird ein Peptid in Fusion mit einem Kapsidprotein eines Bakteriophagen exprimiert. Das fusionierte Protein wird auf der Oberfläche des Phagenpartikels präsentiert, während die DNA, welche für das Fusionspeptid kodiert, als Teil des viralen Genoms im Inneren des Virions bleibt. Diese Verbindung zwischen dem Liganden-Genotyp und dem Phänotyp erlaubt die rasche Identifizierung von spezifisch bindenden Peptidliganden für eine Vielzahl von Zielmolekülen (Antikörper, Enzyme, Rezeptoren etc.). Die eigentliche Selektion erfolgt in einem „Biopanning“ genannten Selektionsprozess (Abbildung 2).

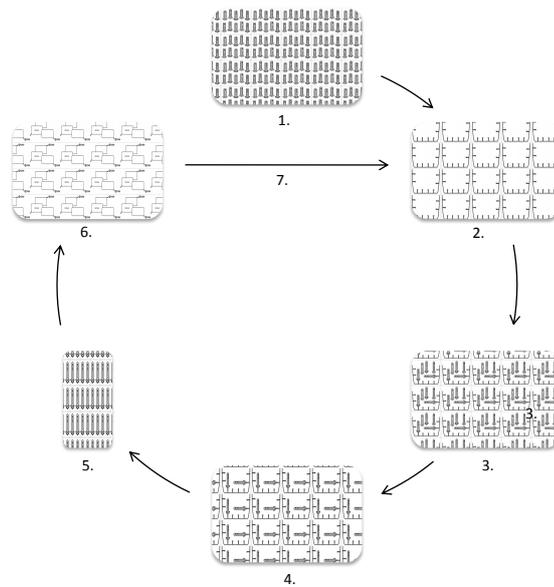


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Biopanning Vorganges. Eine Phagen-Peptidbank (1.) wird zu dem immobilisierten Zielmolekül (2) gegeben und inkubiert (3.). Nicht gebundene Phagen werden durch waschen (4) entfernt. Spezifisch gebundene Phagen werden eluiert (5), amplifiziert (6) und die Anreicherung wird wiederholt (7). Nach drei bis vier Selektionsrunden können einzelne Klone isoliert werden.

Die verwendeten Phagenpeptidbanken bestehen aus Phagenkollektiven, die an ihrer Oberfläche Peptide mit randomisierter Aminosäuresequenz exprimieren (bis zu 10^9 Permutationen pro Peptidbank) (Smith and Scott, 1993). Die Peptidbankselektion kann so durchgeführt werden, dass die Peptide zur Bindung einzelner Phagenklone an aufgereinigte Proteine oder Zellmembranrezeptoren binden. Zum Phage Display werden unterschiedliche Phagenspezies eingesetzt. In unserer Studie verwendeten wir den fd-Phagen (Abbildung 3). Er gehört zu den filamentösen Phagen, wie auch der f1 und der M13 Phage. Es sind einzelsträngige DNA Phagen, die nur solche E.coli Stämme infizieren können, welche den so genannten F-Faktor enthalten. Sie lysieren ihre Wirtsbakterien nicht, sondern replizieren in den Bakterien, ohne diese dabei zu zerstören. Hierzu ist es erforderlich, dass die N-terminal an Kapsidproteine (pIII, pVI, pVII, pVIII oder pIX) fusionierten Peptide durch die Plasmamembran geschleust werden können.

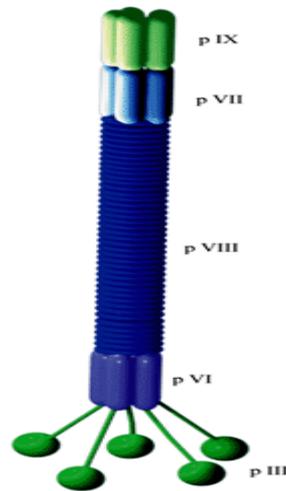


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines fd-Phagen mit den verschiedenen Oberflächenproteinen (Arap, 2005)

Durch diese Technik ist es auch möglich, Liganden zu isolieren, die spezifisch an die antigenbindende Region eines rekombinanten B-Zell-Rezeptors der CLL binden, in dem sie strukturell das Epitop nachahmen.

1.4 Vorarbeiten zu den in dieser Arbeit geschilderten Untersuchungen

Aus Phagen-Peptidbanken konnten Liganden als mögliche Epitopanaloga von Antikörpern identifiziert werden. Die Aminosäuresequenzen der selektierten Peptide wurden mit der Sequenz des bekannten Antigens verglichen und aus Übereinstimmungen in der Sequenz konnte auf das Epitop geschlossen werden. Grundsätzlich ist eine solche Selektion von Epitopanaloga auch mit rekombinanten B-Zell-Rezeptor-Idiotypen von CLL-Patienten möglich, das bislang aber nicht konsequent bis zur Antigenevaluation und Exploration therapeutischer Implikationen weiterverfolgt wurde.

Bei der Pathogenese der chronischen lymphatischen Leukämie (CLL) geht man davon aus, dass aus einer ursprünglichen B-Zelle sich das Malignom entwickelt. Folglich exprimiert jede Tochterzelle eines malignen B-Zellklons denselben BZR.

Es gibt für die CLL Hinweise darauf, dass es große Übereinstimmungen in dem Aufbau der CDR Regionen der schweren Kette des BZR verschiedener

Patienten gibt (Stamatopoulos et al., 2007, Bomben et al., 2009, Murray et al., 2008). In diesen Arbeiten konnten die CLL-Patienten anhand ihrer CDR-Sequenz in Subgruppen mit nahezu identischen BZR eingeteilt werden. Das führte zu der Hypothese, dass es eine Gruppe von Antigenen gibt, die durch die B-Zell-Rezeptoren der CLL erkannt werden und so möglicherweise zu deren Überleben und Proliferation entscheidend beitragen. In solchen Zusammenhängen wurde auch der Begriff der "antigenic-drive"-Hypothese gebildet. Allerdings gibt es bis heute nur wenig Wissen darüber, welche Antigene in der Lage sein könnten, einen „antigenic drive“ lymphatischer Neoplasien hervorzurufen.

Es konnte in dem Labor der Arbeitsgruppe Trepel zu dieser Fragestellung ein Verfahren etabliert werden, mit dem aus randomisierten Phagen-Peptidbanken Liganden isoliert werden, die spezifisch an die antigenbindende Region eines rekombinanten B-Zell-Rezeptors der CLL binden, indem sie strukturell das Epitop nachahmen, so genannte „Epitopmimics“. Aus diesen Vorarbeiten, entwickelte sich auch die hier vorgelegte Arbeit.

In diesen Vorarbeiten wurden aus Phagenpeptidbanken Peptidliganden als Epitopmimics auf CLL-Antikörperfragmenten isoliert. Dazu wurden B-Zell-Rezeptoren von neun zufällig ausgewählten CLL-Patienten als rekombinante IgG Fab Fragmente hergestellt. Fab Fragmente bestehen aus zwei Ketten des Immunglobulins, einer schweren und einer leichten Kette, die zusammen eine Antigenbindungsstelle bilden. Jede dieser Ketten besteht aus einer konstanten und einer variablen Region. Die Struktur ist dadurch sehr stabil. Die Selektion auf den neun rekombinanten CLL-B-Zell-Rezeptoren wurde mit Peptidbanken unterschiedlicher Peptidlänge durchgeführt. Für sieben von den neun rekombinanten CLL B-Zell-Rezeptoren konnten selektiv bindende Peptidliganden isoliert werden. Bei zwei Rezeptoren unterschiedlicher Patienten lagen eine nahezu identische CDR-3 Region der Rezeptoren vor. Folgerichtig wurden auf diesen Rezeptoren auch nahezu identische Peptide als Epitopmimics selektiert.

Um sicher zu gehen, dass die selektierten Peptide auch auf dem natürlich exprimierten BZR auf CLL-Zellen binden und nicht an die rekombinanten BZR,

wurde dies mittels Immunfluoreszenz verifiziert. Um die Bindung auf den BZR auch in einem größeren Kollektiv von Proben durchführen zu können, wurde die spezifische Bindung dann in einem Phagenbindungsassay, wie im Methodenteil dieser Arbeit beschrieben, durchgeführt. Es konnte in einer Gruppe von 60 Patienten gezeigt werden, dass mit sechs unterschiedlich selektierten Phagenpeptiden alle CLL-Zellen erkannt wurden und anhand des Bindungscharakters in Gruppen zugeordnet werden konnten. Dabei zeigte sich eine überraschende Kreuzreaktivität. Ein Phagenklon band nicht nur an seinen selektierten Idiotyp, sondern auch an andere Idiotypen, die sich in der CDR-3 Sequenz unterschieden und nach der in der Literatur etablierten Einteilung (Murray et al., 2008, Stamatopoulos et al., 2007, Bomben et al., 2009) nicht zu einem Subset gehören. Im Rahmen dieser Vorarbeiten konnte festgestellt werden, dass CLL-Zellen unterschiedlicher Patienten das gleiche Epitop erkennen konnten, obwohl ihre B-Zell-Rezeptoren hinsichtlich der Aminosäuresequenz der CDR-3 Region scheinbar nicht verwandt sind.

2 Ziele der Arbeit

Basierend auf den in Kapitel 1.4 geschilderten Vorarbeiten stellte sich die Frage, ob sich auch in einem größeren Patientenkollektiv die CLL-Proben anhand ihres B-Zell-Rezeptor Epitoperkennungsmusters den schon vermuteten funktionellen Kategorien zuordnen lassen und ob sich sogar vielleicht neue Kategorien zeigen lassen. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob sich anhand der Zugehörigkeit einer Patientenprobe zu einer dieser funktionellen Kategorien mit identischem Epitoperkennungsmuster mit klinischen, insbesondere prognostischen Parametern korrelieren lässt. Dies sollte anhand mehrerer in der Literatur gut evaluierter klinischer und laborchemischer Parameter untersucht werden.

Mit dieser Arbeit sollte das Verständnis des B-Zell-Rezeptors in der Biologie der CLL weiter vertieft und so das Verständnis für die Grundlage der Pathogenese dieser Erkrankung erweitert werden.

3 Material

3.1 Patientenproben

Die verwendeten Blutzellen wurden per Venenpunktion oder Knochenmarkspunktion gewonnen. Alle Patienten erfüllten die Kriterien zur Diagnose einer chronisch lymphatischen Leukämie.

Insgesamt wurden im Zeitraum von Anfang 2007 bis Dezember 2008 Blutproben von 113 Patienten entnommen. Untersucht wurden Patienten aus dem Universitätsklinikum Freiburg, Abteilung für Hämatologie und Onkologie (Leiter: Prof. Dr. Dr. h.c. Roland Heinrich Mertelsmann) und aus dem Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf, Abteilung für Onkologie und Hämatologie (Leiter: Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer). Die Proben von gesunden Probanden stammten von freiwilligen Blutspenden von Mitarbeitern der wissenschaftlichen Arbeitsgruppe Trepel.

3.2 Reagenzien

Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumchlorid NH_4Cl	Carl Roth, Karlsruhe
Bacto Tryptone	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto Yeastextract	Becton Dickinson, Heidelberg
Bacto Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Calciumchlorid CaCl_2	Carl Roth, Karlsruhe
Cyclohexan	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid	Carl Roth, Karlsruhe
Dibutylphalat	Sigma-Aldrich, Steinheim
dNTP 10mM	Fermentas, St.Leon-Rot
Ethanol 99%	Sigma-Aldrich, Steinheim

Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
Fetales Kälberserum	Biochrom, Berlin
Ficoll Biocoll Separation Solution	Biochrom, Berlin
Glycerin	Carl Roth, Karlsruhe
Glucose	Carl Roth, Karlsruhe
IPTG (Isopropyl β -D-Thiogalactoside)	Carl Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat KH_2PO_4	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid KCl	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid MgCl_2	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat Na_2HPO_4	Carl Roth, Karlsruhe
Noble Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Polyethylenglycol	Carl Roth, Karlsruhe
PBS (Tris Buffered saline)	Invitrogen, Karlsruhe
RPMI	Invitrogen, Karlsruhe
TBS (Tris Buffered Saline)	Invitrogen, Karlsruhe
Tetrazyklin	Carl Roth, Karlsruhe
Terrific Broth TB	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau 0,4%	Invitrogen, Karlsruhe
X-GAL (5-Bromo-4chloro-3-indolyl- β -D-galactoside)	Fermentas, St.Leon-Rot

3.3 Nährmedien

Luria-Bertani (LB)-Medium

10 g/l	Bacto Tryptone
5 g/l	Bacto Yeastextract
10 g/l	NaCl

Für die Verwendung von Agarplatten wurden noch zusätzlich 15g/l Bacto Agar mit eingewogen. Anschließend wurde die Lösung mit Hilfe von Natronlauge auf einen pH 7,0 eingestellt. Zur Herstellung der Agarplatten wurde das Medium nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 55°C in Petrischalen gegossen.

Nach dem Abkühlen wurde dem LB-Medium das jeweilige Antibiotikum hinzugefügt.

Antibiotikum	Stocklösung	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	150 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	200 µg/ml
Tetrazyklin	5 mg/ml	20 µg/ml
IPTG/Xgal	50 mg/ml IPTG	25 µg/ml
	40 mg/ml Xgal	20 µg/ml

Anschließend wurden die Platten bei 4°C im Kühlraum gelagert.

TB-Medium

47 g/l Terrific Broth TB Invitrogen

4 ml Glycerin

Die Lösung wurde mittels Natronlauge auf einen pH Wert von 7,0 eingestellt. Das Medium wurde autoklaviert und nach dem Abkühlen auf 55°C, wurden noch 10% Supplement und 200µg/ml Kanamycin hinzugefügt. Supplement bestand aus 23,1g/l Kaliumhydrogenphosphat und 164,28g/l Dikaliumhydrogenphosphat, welches mit destilliertem Wasser in Lösung gebracht und steril filtriert wurde.

SOB Medium

Bacto Tryptone	20 g/l
Bacto Yeast Extract	5 g/l
NaCl	500 mg/l
1M KCl	2,5 ml/l

Vor dem Autoklavieren wurde das Medium mit Natronlauge auf einen pH Wert von 7,0 eingestellt.

SOC Medium

SOB Medium	48,5 ml/50ml
1M Glucose	1 ml/50ml
1M MgCl ₂	500 µl/50ml

3.4 Kits

QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
CloneJet PCR Cloning Kit	Fermentas, St.Leon-Rot
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden

3.5 Enzyme und Puffer

Terminale Transferase	New England Biolabs, Beverly (USA)
T4 Ligase	New England Biolabs, Beverly (USA)
NEB4 Buffer	New England Biolabs, Beverly (USA)
5x First Strand Buffer	New England Biolabs, Beverly (USA)
Super Script II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Go Taq Polymerase	Promega, Mannheim
5x Go Taq Buffer	Promega, Mannheim

Xba I	New England Biolabs, Beverly (USA)
Not I	New England Biolabs, Beverly (USA)

3.6 Bakterienstämme

E.coli ER 2738	New England Biolabs, Frankfurt
Genotyp: $F'proA^+B^+ lac^q \Delta(lacZ)M15$ $zzf::Tn10(Tet^R)/ fhuA2 glnV \Delta(lac-proAB)$ $thi-1 \Delta(hsdS-mcrB)5$	
E.coli K91kan	G.Smith, Universität von Missouri, Columbia (USA)

3.7 Plastik- und Glaswaren

Reaktionsgefäße (verschiedene Größen)	Sarstedt, Nümbrecht
Kryoröhrchen	Nunc, Düsseldorf
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	Sarstedt, Nümbrecht

3.8 Geräte

Autoklav Typ EL	Systemec, Wettenberg
Brutschrank mit Begasung	Thermo Scientific, Karlsruhe
Mikrozentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Nanodrop	Thermo Scientific, Karlsruhe
Sterilwerkbank	Thermo Scientific, Karlsruhe
Schüttler Innova 2000	New Brunswick Scientific, Nürtingen

4 Methoden

4.1 Zellkulturmethoden

4.1.1 Isolierung und Kultivierung von mononukleären Zellen

Um die PBMC (peripheral blood mononuclear cells) aus den Blut- oder Knochenmarksproben der CLL-Patienten aufzureinigen, wurde das Blut oder das Knochenmark mit PBS in einem Verhältnis von 1:1 in einem Reaktionsgefäß verdünnt. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden 15ml des Dichtegradienten vorgelegt. Als Dichtegradient wurde die Biocoll Separating Solution verwendet. Das verdünnte Blut (35ml) wurde langsam über den Dichtegradienten geschichtet. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß bei 2000rpm für 20 Minuten bei 4°C ohne anschließende Bremse zentrifugiert. In dem Reaktionsgefäß waren nun gut abgrenzbare Schichten unterschiedlicher Zusammensetzung sichtbar. Zunächst wurde die oberste Schicht, das Serum, abpipettiert und verworfen. Die PBMC Interphase wurde mit der Pipette abgesaugt, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut mit PBS 1:1 verdünnt. Es wurde davon ausgegangen, dass die Interphase bei den Blutproben der CLL-Patienten zum größten Teil aus Lymphozyten bestanden und es somit nicht nötig war, die Interphase noch weiter in ihre Einzelzusammensetzung zu differenzieren. Diese Lösung wurde dann bei 1500rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der neu gebildete Überstand wurde ebenfalls mit einer Pipette abgesaugt und verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde dann in 50ml PBS resuspendiert. Die Zellzahl wurde zu diesem Zeitpunkt mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Anschließend wurde die Lösung bei 1500rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder entfernt. Das Zellpellet wurde nun im Einfriermedium (fetales Kälberserum + 10% Dimethylsulfoxid) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Dimethylsulfoxid (DMSO) verhindert die Ausbildung von Eiskristallen in den Zellen, was zur Zerstörung der Zellen führen würde. Um den zytotoxischen Einfluss des DMSO auf die Zellen so gering wie möglich zu

halten, wurden sie schnell zunächst bei 20°C für 24 Stunden eingefroren, um dann am nächsten Tag in den -80°C Gefrierschrank gelagert zu werden.

4.1.2 Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte durch die Anfärbung der Zellen mit 0,4 prozentigen Trypanblau. Die Membran von lebenden Zellen ist für diesen Farbstoff undurchlässig, während sich tote Zellen damit anfärben lassen. Anhand dieser unterschiedlichen Anfärbbarkeit lassen sich die Zellen differenzieren und mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer auszählen. Dazu wurden 10µl der Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert und alle vier Quadranten ausgezählt. Ein Quadrant dieser Neubauer Zählkammer besteht aus 16 einzelnen Feldern. Der gebildete Mittelwert wurde mit 10^4 multipliziert und ergab die gesuchte Zellzahl pro µl Lösung.

4.2 Allgemeine molekularbiologische Arbeitstechniken

4.2.1 RNA-Extraktion

Die Extraktion der RNA aus den gewonnenen Lymphozyten der Patienten erfolgte mit Hilfe des RNA Extraktionskits. Die gewonnene RNA wurde in RNase-freiem Wasser gelöst und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert. Die Menge der RNA wurde photometrisch bestimmt, in dem die Absorption bei 260nm mit dem Gerät Nanodrop der Firma Thermo Scientific, Karlsruhe gemessen wurde. Das Verhältnis 260/280 galt als Maß für die Reinheit und sollte zwischen 1,9 und 2,0 betragen.

4.2.2 Transkription in komplementäre DNA (cDNA)

Die komplementäre DNA wurde mit Hilfe von SuperScript II Reverse Transkriptase durchgeführt.

Es wurden folgende Komponenten zusammengefügt.

Oligo(dT)12-18 (500µg/ml)	1µl
RNA	1ng-5µg (max. 10µl)
dNTP Mix 10mM	1µl
Steriles destilliertes Wasser	bis 12µl

Alle Komponenten wurden in ein autoklaviertes-Reaktionsgefäß 0,2µl pipettiert, anschließend für 5 Minuten bei 65°C erhitzt und dann auf Eis gestellt.

Nun wurden die folgenden Komponenten hinzugefügt:

5x First Strand Buffer	4µl
0,1 M DTT	2µl

Die Komponenten wurden kurz zentrifugiert und für 2 Minuten bei 42°C inkubiert. Als nächstes wurde 1µl der SuperScript II Reverse Transkriptase hinzugefügt und erneut bei 42°C für 50 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch das Erhitzen auf 70°C für 15 Minuten beendet. Die cDNA musste zur weiteren Verarbeitung gefällt werden. Dazu wurden 20µl der cDNA mit 2µl 3M Natriumacetat und 60µl 100% Ethanol bei -80°C für 30 Minuten gefällt. Danach wurde die Lösung bei 14000rpm für 20 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 150µl Ethanol 70% resuspendiert und erneut bei 14000rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet und dann mit 20µl destillierten Wasser resuspendiert. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

4.2.3 Amplifikation der Immunglobuline mittels PCR

Durch die Verwendung von familienspezifischen Primer bei der Polymerase-Kettenreaktion war es möglich, die Immunglobulinfamilie des jeweiligen Patienten aus der präparierten cDNA genau zu detektieren und im Anschluss zu amplifizieren. Alle PCR-Reaktionen wurden nach dem folgenden Schema angesetzt, wobei sich die jeweiligen Reaktionsansätze nur durch die Verwendung der unten aufgeführten familienspezifischen Primer unterschieden.

5xGoTaq Buffer	10µl
dNTP 10mM	1µl
C _M Primer 1:10 verdünnt	1µl
GoTaq Polymerase	0,25µl
Familienspezifischer Primer	1µl
cDNA 1:10 verdünnt	1µl
destilliertes Wasser	ad 50µl

Tabelle 2: Primersequenzen

Primer	Sequenzen
VH1a	5'-CAGGtKcAGCTGGTGCAG-3'
VH1b	5'-CAGGTCCAGCTTGTGCAG-3'
VH1c	5'-sAGGTCCAGCTGGTACAG-3'
VH1d	5'-CArATGCAGCTGGTGCAG-3'
VH2a	5'-CAGATCACCTTGAAGGAG-3'
VH2b	5'-CAGGTCACCTTGArGGAG-3'
VH3a	5'-GArGTGCAGCTGGTGGAG-3'
VH3b	5'-CAGGTGCAGCTGGTGGAG-3'
VH3c	5'-GAGGTGCAGCTGTTGGAG-3'
VH4a	5'-CAGsTGCAGCTGCAGGAG-3'
VH4b	5'-CAGGTGCAGCTACAGCAG-3'
VH5a	5'-GArGTGCAGCTGGTGCAG-3'
VH6a	5'-CAGGTACAGCTGCAGCAG-3'
VH7a	5'-CAGGTsCAGCTGGTGCAA-3'
C _M	5-CTCTCAGGACTGATGGGAAGC-3'

Für die PCR wurden folgende Einstellungen verwendet.

Initial Denaturation	95°C	2 Minuten	} 30 Zyklen
Denaturation	95°C	1 Minute	
Annealing	55°C	1 Minute	
Extension	72°C	1 Minute	
Final Extension	72°C	10 Minuten	
Soak	4°C		

4.2.4 Agarosegelelektrophorese

Die Analyse der PCR-Fragmente wurde mit Hilfe von 1%igen Agarosegel durchgeführt. Dazu wurden 5g Agarose mit 500ml TAE Puffer gemischt und in einem Mikrowellenherd aufgekocht, bis die Lösung klar und vollkommen gelöst war. Anschließend wurde das Gel zur weiteren Verarbeitung auf ca. 40°C abgekühlt. 100ml Agarosegel wurden mit 3µl Ethidiumbromid unter dem Abzug gemischt. Der Gelschlitten wurde an den offenen Seiten mit Klebeband verschlossen, ein Taschenkamm wurde positioniert und das Gel in die Form gegossen. Nachdem das Gel etwas ausgehärtet war, wurde der Taschenkamm und das Klebeband entfernt und das Gel in die Elektrophoreseapparatur gelegt. Die Apparatur wurde mit 1xTAE Puffer aufgefüllt bis das Gel komplett bedeckt war. Die Proben wurden mit 10x Gelbeladungspuffer gemischt und dann in die Geltaschen pipettiert. Als Größenmarker wurde eine 1kB DNA Ladder der Firma Fermentas verwendet. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 90Volt durchgeführt, bis die Proben über die Hälfte der Länge des Gels hinaus gewandert waren. Die DNA wurde durch UV-Beleuchtung visualisiert.

4.2.5 Gelaufreinigung von DNA Fragmenten

Zur Aufreinigung der Gelfragmente wurde das QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen verwendet. Unter der UV-Beleuchtung konnten die gewünschten Fragmente aus dem Agarosegel geschnitten werden. Diese Gelfragmente wurden dann mit dem dreifachen Volumen von QG Puffer bei 50°C unter vortexen gelöst. Danach wurde ein Gelvolumen Isopropanol hinzugefügt und dann auf eine beigefügte Minisäule aufgetragen. Nach mehreren

Zentrifugations- und Waschschrinen wurde die gewonnene DNA in 30 μ l destilliertes Wasser eluiert.

4.2.6 Klonierung der amplifizierten DNA

Die in dieser Arbeit durchgeföhrtten Klonierungen erfolgten nach dem Protokoll des Clone Jet Kit der Firma Fermentas. Das Kit kann sowohl für PCR Produkte mit glatten Enden (blunt ends) wie auch für Produkte mit überhängenden Enden (sticky ends), wie sie bei der Verwendung von Taq Polymerasen entstehen, verwendet werden. Das Kit beinhaltet einen pJet 1.2/blunt cloning vector(50ng/ μ l), der ein Suizid-Restriktionsenzym enthält, so dass nur Zellen mit rekombinanten Plasmiden als Kolonien wachsen können.

Es wurden folgende Komponenten nach Herstellerprotokoll zusammengefügt.

2x Reaction buffer	10 μ l
PCR-Produkt	2 μ l
Nukleasefreies Wasser	auf 17 μ l
DNA blunting Enzyme	1 μ l

Die Komponenten wurden kurz zentrifugiert und gevortext. Anschließend bei 70°C für 5 Minuten inkubiert und danach kurz auf Eis gelegt.

Danach folgte die Ligation mit den im Kit enthaltenen Komponenten.

pJet 1.2/blunt cloning vector (50ng/ μ l)	1 μ l
T4 DNA Ligase (5u/ μ l)	1 μ l

Die Komponenten wurden kurz zentrifugiert und gevortext. Danach erfolgte die Inkubation bei 22°C für 30 Minuten.

4.2.7 Hitzeschock-Transformation

Kompetente E.coli XL1 blue Bakterien wurde langsam auf Eis dazu aufgetaut. Es wurden 50 μ l der Bakteriensuspension mit 5 μ l Ligationsansatz vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 45 Sekunden einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und dann auf Eis für 2

Minuten wieder abgekühlt. Als nächstes wurde 250µl warmes SOC Medium hinzugefügt und für eine Stunde bei 37°C und 150rpm im Schüttler inkubiert. Der gesamte Ansatz wurde dann auf LB-Ampicillin Agarplatten ausplattiert, die zuvor mit 100µl IPTG (50mg/ml) benetzt wurden und anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert.

4.2.8 Amplifikation

Am nächsten Tag wurden die gewachsenen Kolonien mit einer Pipettenspitze gepickt und in 1ml LB-Ampicillin Medium (100µl/ml) über Nacht bei 37°C und 200rpm im Schüttler amplifiziert. An dem darauf folgenden Tag wurde die Kultur bei 5000rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert

4.2.9 DNA Minipräparation

Die Gewinnung von Plasmid-DNA wurde mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen und anhand des entsprechenden Handbuchs (Stand 12/2006) durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde danach in 30µl destilliertes Wasser eluiert. Zur Überprüfung, ob die Klonierung tatsächlich erfolgreich war, wurde im Anschluss ein Restriktionsverdau mit NOTI und XBAI durchgeführt. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37°C.

4.2.10 Sequenzanalyse und Auswertung

Die Sequenzierreaktion wurde mit dem Big Dye Reaction Kit, dem Forward Primer aus dem CloneJet PCR Cloning Kit durchgeführt. Es wurde ein Gesamtansatz von 10µl wie folgt angesetzt.

Big Dye Reagenz (rosa)	2µl
Big Dye Puffer (farblos)	2µl
Forward Primer	1µl
Plasmid DNA	5µl

Folgendes Programm wurde im Thermocycler für die Sequenzierreaktion verwendet:

Initial Denaturation	96°C	1.30 Minute	
Denaturation	96°C	20 Sekunden	} 30 Zyklen
Annealing	53°C	15 Sekunden	
Elongation	60°C	4.0 Minuten	
Soak	4°C		

Anschließend wurden die Proben durch Zugabe von folgenden Komponenten gefällt:

Natriumacetat 3M	10µl
destilliertes Wasser	80µl
Ethanol 100%	300µl

Der Ansatz wurde bei 13000rpm für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 100µl Ethanol 70% gewaschen. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 Minuten bei 4°C durchgeführt. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet bei 37°C für ca. 30 Minuten getrocknet. Die Sequenzierung selbst wurde im Sequenzierlabor der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf durchgeführt. Die Analyse der Sequenz, Bestimmung der schweren variablen Immunglobulinfamilie und Bestimmung der complementarity determining region 3 (CDR-3), erfolgte mit dem Computerprogramm IMGt/V-QUEST (<http://imgt.cines.fr/>)(Lefranc, 1999).

4.2.11 Platten- und Flüssigkultur

Mit einer sterilen Impföse wurden die Bakterien auf einer sterilen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Selektion der Bakterien auf Plasmide wurden den LB-Agarplatten das entsprechende Antibiotikum hinzugefügt. Bei den E.coli ER2738 Bakterien wurden die LB-Agarplatten mit Tetrazyklin und für die E.coli K91kan Bakterien mit Kanamycin angereichert.

Die Anzucht der E.coli Stämme erfolgte in LB-Tetrazyklin Medium für die E.coli K12 Bakterien und in TB-Kanamycin Medium für die E.coli K91 Bakterien bei 37°C.

4.3 Spezielle Arbeitsmethoden mit Phagen

4.3.1 Verwendete Phagenklone

Die in dieser Arbeit verwendeten Phagenklone stammten aus der Vorarbeit der Arbeitsgruppe des Betreuers dieser Dissertation. In seinem Labor konnten durch randomisierte Phagenpeptidbanken Liganden isoliert werden, die spezifisch an die antigenbindene Region eines rekombinanten B-Zell-Rezeptors der CLL binden, indem sie strukturell das Epitop nachahmen (siehe Kapitel 1.4). Diese Selektion war auf sieben von neun rekombinanten Fab Fragmenten der CLL-B-Zellrezeptoren erfolgreich. Für jedes dieser Fab-Fragmente wurde ein Epitopmimic als Phagenklon für die hier geschilderten Untersuchungen gewählt. Ihre Aminosäuresequenz sowie die Zuordnung zu der Patientenprobe auf deren B-Zellrezeptorfragment sie selektiert wurden, ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: verwendete Phagenklone

Epitop-Mimics	CLL-Patientencode	verwendete Phagenpeptidbank*	Phagensequenzen
1	001/002	X ₁₂	WNWPLPPVRQFS
2	003	X ₇	RWWWPTR
3	004	X ₇	FCSFCVL
4	005	BS	YHRWCVMRRACFEAP
5	006	BS	LEYACNGPSQLCSYVR
6	007	X ₁₈	SQSPPRYWAWCAGYWCEL
Kontrollphage			YMTPLSSQKKS
fd-Kontrollphage			ohne Insert

*X=zufällige randomisierte Aminosäureposition, BS=X₄CX₆CX₄ in Betafaltblattstruktur

4.3.2 Einzelklonphagenherstellung

Für Klone aus der X₁₂ Peptidbank wurde eine Kultur von E.coli K12 Bakterien in 40 ml LB-Tetrazyklin Lösung angesetzt und über Nacht im Schüttler bei 200 rpm und 37°C bis zur makroskopischen Eintrübung der Kultur wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurde die Bakterienlösung 1:100 verdünnt. Die Bakteriensuspension wurde dann auf zwei Erlenmeierkolben aufgeteilt und jeweils 5µl von den Stocklösungen der r1 Phagen (Kontrollphage) und 263/6 Phagen hinzugegeben. Erneut wurde die Lösung bis zur makroskopischen Eintrübung im Schüttler bei 200 rpm und 37°C inkubiert. Die Kultur wurde dann als nächstes in weitere Reaktionsgefäße verteilt und bei 8000rpm für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 15% Polyethylenglycol/NaCl (PEG/NaCl) für mindestens eine Stunde auf Eis gefällt. Anschließend folgte eine erneute Zentrifugation bei 8000 rpm und 4°C für 20 Minuten. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl TBS Lösung im gelöst. Um den bakteriellen Debris vollständig zu entfernen wurde die Phagenlösung für 10 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde die Phagenlösung in Reaktionsgefäß pipettiert und im Kühlschrank bei 5°C gelagert.

Für die Herstellung der E.coli K91 Einzelphagenklone wurde zunächst eine Kultur mit K91kan Bakterien in 20 ml TB-Medium angesetzt und für ca. 3-4 Stunden im Schüttler bei 200 rpm und 37°C wachsen gelassen. Von dieser Bakteriensuspension wurden dann 200 µl mit 10 µl der jeweiligen Phagenstocklösung (Epitop-Mimics 1-6 und Kontrollphagen) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 60 ml TB-Medium hinzugegeben und bei 200rpm und 37°C über Nacht im Schüttler wachsen gelassen. Die weitere Versuchsdurchführung erfolgte wie oben für die Derivate der X₁₂-Bank beschrieben.

4.3.3 Titration einer Bakteriophagenlösung

Um den Titer einer Phagenlösung festzustellen, wurden Verdünnungsreihen angefertigt. Die E.coli K91 Bakterien wurden in TB-Medium (+ 10% Supplement und 100mg/ml Kanamycin) und die E.coli K12 Bakterien wurden in LB-Medium (20µg/l Tetrazyklin) inokuliert und im Schüttler bei 200rpm und 37°C bis zur

makroskopischen Eintrübung inkubiert. Währenddessen wurde eine Mikrotiterplatte für die Verdünnungsreihe vorbereitet. Es wurden Verdünnungsstufen von 10^{-5} bis 10^{-11} mit der zu titrierenden Phagenlösung angelegt. Die Verdünnung wurde mit PBS durchgeführt. War die gewünschte Dichte der Bakterienlösung erreicht, wurden 180µl der jeweiligen Bakterienlösung in die Reaktionsgefäße gegeben. Anschließend wurden die Bakterienlösungen mit den Phagenlösungen für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 100µl jeder Verdünnungsstufe mit Hilfe von Glasperlen auf LB-Tetrazyklin beziehungsweise auf LB-Kanamycin Agarplatten ausplattiert. Die Agarplatten wurden im Brutschrank über Nacht bei 37°C inkubiert. Erst am nächsten Tag wurden die gewachsenen Kolonien gezählt und durch die Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor der exakte Phagengehalt der zu bestimmenden Phagenlösung errechnet.

4.4 Screening der Phagenbindung an CLL-Zellen

Die Bindung von einzelnen Phagenklonen an CLL-Zellen wurde in einem speziellen Bindungsassay untersucht.

Das Ergebnis des Phagenbindungsassays wurde quantitativ beurteilt, indem zwischen starker Bindung (im Verhältnis zum Kontrollphagen fünfmal stärkere Bindung), schwacher (im Verhältnis zum Kontrollphagen zwei-fünfmal stärkere Bindung) und negativer Bindung unterschieden wurden.

Der Phagenbindungsassay wurde mit E. coli K91kan Bakterien (bzw. auf E. coli ER2738 K12 Bakterien für Derivate der X12 Phagenpeptidbank) quantifiziert. Um Phagenbindungen zu detektieren, die durch unspezifische Proteinwechselwirkungen entstanden, wurden für jedes Screening auch Kontrollphagen verwendet. Als Kontrollphagen dienten Phagen ohne Peptidinsert oder zufällig ausgewählte Phagenklone mit derselben Peptidlänge. Die Kontrollphagen besaßen aber dieselbe Antibiotikaresistenz. Die Kontrollphagen wurden fd-Phage (ohne Insert) bzw. r1 Phage (für die X₁₂ Peptidbank) benannt.

Am Versuchstag wurde ein Kryoröhrchen von dem zu untersuchenden CLL-Patienten in einem 37°C warmen Wasserbad langsam aufgetaut. Die Zellen

wurden anschließend vorsichtig in ein 15ml Reaktionsgefäß überführt und mit 10ml auf 37°C vorgewärmtes RPMI-Medium (+10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin), vermischt. Die Zellanzahl wurde dann mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Es wurden 1×10^6 Zellen pro ein 1ml-Reaktionsgefäß aufgeteilt. Für ein vollständiges CLL-Screening waren acht Patientenproben mit jeweils 1×10^6 Zellen nötig. Als nächstes wurden die Zellen bei 1200rpm bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette entfernt und das Zellpellet in 200µl RPMI resuspendiert. Es wurden 5×10^8 TU (transducing Units) von jedem einzelnen zu untersuchenden Phagen und dem Kontrollphagen zu den Zellen hinzugegeben. Durch leichtes Schwenken wurden die Phagen mit den Zellen vermischt und dann bei Raumtemperatur für 10 Minuten auf einem horizontalen Schüttler inkubiert.

Währenddessen wurde das BRASIL-Öl (Biopanning and Rapid Analysis of Selective Interactive Ligands) vorbereitet. Das BRASIL-Öl bestand aus 90% N-Butyl-Phtalat und 10% Cyclohexan. Es wurde zur Trennung der zellgebundenen Phagen von den ungebundenen Phagen benutzt und analog der Beschreibung von Giordano et al. durchgeführt (Giordano et al., 2001). Ein 400µl Reaktionsgefäß wurde mit 200µl BRASIL-Öl befüllt und das Phagen-Zellgemisch wurde tropfenweise und möglichst vollständig auf das BRASIL-Öl gegeben. Anschließend wurde es für 10 Minuten bei 4°C und 10000rpm zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befanden sich die zellgebundenen Phagen als sichtbares Pellet in der unteren hydrophoben Schicht, während sich die nicht gebundenen Phagen in gelöster Form in der oberen Schicht befanden. Für die weitere Verarbeitung wurden die Reaktionsgefäße dann bei -80°C für mindestens 10 Minuten eingefroren. Danach war es möglich, mit einem Skalpell das Reaktionsgefäß oberhalb des Pellets abzuschneiden und nach leichtem Ausklopfen wurde das Röhrchen mit der Spitze nach unten in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß gegeben. Das Zellpellet wurde mit 500µl Bakterienkultur bedeckt, und anschließend darin resuspendiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 30 Minuten in einem Heizblock. Nach der Inkubation wurden 100µl der Bakterienlösung auf vorbereitete Tetrazyklin bzw. IPTG/Xgal Agarplatten ausplattiert. Durch die mit Antibiotika versetzten Agarplatten konnte sichergestellt werden, dass nur die Bakterien wachsen konnten, die eine durch

den Phagen vermittelte Antibiotikaresistenz besaßen. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die gewachsenen Kolonien auf den Platten gezählt.

4.5 Datenerhebung und klinische Parameter

Die Datenerfassung erfolgte durch Einsicht in die Krankenakten der jeweiligen Patienten. Wir erhoben folgende prognostische Faktoren

- Mutationsstatus des B-Zell-Rezeptors
- Zeitraum zwischen Diagnosestellung und erster Therapie (Time to first treatment)
- Surrogatmarker für den Mutationsstatus
 - Expression von CD 38
 - Expression von ZAP 70
- zytogenetische Aberrationen
- Lymphozytenverdopplungszeit
- variables schweres Immunglobulinkettengen
- Aminosäuresequenz der schweren CDR3 Region

Darüber hinaus erfassten wir

- Alter
- Datum der Diagnosestellung
- Beobachtungszeitraum
- Überlebenszeitraum

Aufgrund der zu geringen Fallzahl oder zu wenigen verfügbaren Daten konnte eine statistische Auswertung der Surrogatmarker für den Mutationsstatus und der Lymphozytenverdopplungszeit nicht erfolgen.

4.6 Statistik

Die Krankengeschichten wurden hinsichtlich des Zeitraums zwischen Diagnosestellung und erster Therapie für die CLL (time to first treatment TTFT) retrospektiv untersucht. Als behandlungsfreier Zeitraum galt das Intervall zwischen Diagnosestellung und dem Therapiebeginn der CLL. Dieses

Therapieintervall wurde mit Hilfe der Kaplan-Meier Methode statistisch ausgewertet. Mit Hilfe der Cox-Regression konnte der Einfluss von bestimmten Variablen auf das TTFT überprüft werden. Der Vergleich von mehreren Gruppen hinsichtlich des TTFT erfolgte mit dem log-rank Test. Eine statistische Signifikanz wurde mit einem p-Wert von 0,05 angenommen. Weitere Daten wurden mit Methoden der deskriptiven Statistik, wie zum Beispiel Häufigkeiten (absolut und/oder prozentual), Anzahl der verfügbaren bzw. nicht verfügbaren Werte, Mittelwert, Standardabweichung und Median berechnet und tabellarisch dargestellt.

Die EDV-Auswertung der Daten erfolgte mit der Tabellenkalkulation Microsoft Excel 2007 und dem Statistikprogramm SPSS. Für die statistische Auswertung erfolgte eine Kollaboration mit dem Zentrum für Biometrie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf.

5 Ergebnisse

In der Studie wurden insgesamt 100 CLL-Patienten untersucht. Der Beobachtungszeitraum der Patienten lag im Median bei 89,5 Monaten.

Von den 100 CLL-Patienten starben sechs Patienten innerhalb des Beobachtungszeitraumes. Der Median des Überlebenszeitraumes lag bei 71,5 Monaten.

5.1 B-Zell-Rezeptor-Epitoperkennungsmuster

Es wurde das Epitop-Bindungsverhalten der B-Zellrezeptoren auf CLL-Zellen von insgesamt 100 CLL-Patienten überprüft. In die Analyse flossen auch die bereits in den Vorarbeiten evaluierten Fälle ein.

Damit das Bindungsverhalten miteinander verglichen werden konnte, wurde es semi-quantitativ in drei Abstufungen bewertet: eine starke Phagenbindung wurde definiert als eine Bindung, die fünfmal stärker als die des Kontrollphagen war, eine mittlere Bindung, wenn die Phagenbindung zwischen zwei- und fünfmal stärker als die des Kontrollphagen war und eine schwache Bindung lag vor, wenn die Bindung nicht reproduzierbar oder weniger als zweifach im Vergleich zu dem Kontrollphagen war. Das Ergebnis des Bindungsverhaltens einer Patientenprobe wurde mindestens dreimal wiederholt. Eine Übersicht über das B-Zell-Rezeptor-Epitoperkennungsmuster des Gesamtkollektivs zeigt Tabelle 4.

Patienten, die in ihrem Bindungsmuster an einen oder mehrere der Epitope übereinstimmten, fassten wir jeweils in einer Kategorie zusammen. Anhand des Epitoperkennungsmusters konnten wir die Patienten somit in 17 unterschiedliche Kategorien einteilen. Im Vergleich zu den Vorarbeiten konnten vier neue Kategorien mit einem spezifischen Antigenerkennungsmuster gebildet werden. Von diesen siebzehn Kategorien, umfassten sechs Kategorien zwischen vier und 24 CLL-Fälle, während den restlichen elf Kategorien zwischen zwei und drei Patienten angehörten. Darüber hinaus verblieb eine Restgruppe mit einzigartigen (also nicht wiederholt angetroffenen)

Bindungsmuster (n=10), deren Bindungsverhalten, deshalb noch keiner vorhandenen Subkategorie zugeordnet werden konnte.

Tabelle 4: Epitoperkennungsmuster des Gesamtkollektivs*

Kategorie	Pat.	Epitop-Mimics für						MS	Subset	IGHV	HCDR3 Sequenz			
		Fab 01	Fab 02	Fab 03	Fab 04	Fab 05	Fab 06							
Kategorie 1	44	rot	rot	rot	rot	rot	rot	UM	1	1-3	ARDQWLVLGMYFDYW			
	83	rot	rot	rot	rot	rot	rot	UM	1	1-2	AREQWLVLGYFDYW			
	34	rot	rot	rot	rot	rot	rot	M	3-7	VRDDGMAYSYSRQYDAFDI				
	40	rot	rot	rot	rot	rot	rot	UM	3-7	ARGVGQQGVNDW				
	32	rot	rot	rot	rot	rot	rot	UM	3-20	ARVRGFYSGSLEDYGM DV				
	42	rot	rot	rot	rot	rot	rot	UM	3-11	AREGSYVSGARPEHDW				
	109	rot	rot	rot	rot	rot	rot	M	4-34	ARVPSVLRGVTVRRPIDEFW				
	135	rot	rot	rot	rot	rot	rot	M	4-59	AQGQVWSANNWFVP				
	127	rot	rot	rot	rot	rot	rot	UM	1-8	ARAPSPiAVPDVYGM DVW				
	93	rot	rot	rot	rot	rot	rot	M	4-34	TRGHFFPESEYDFWSDHSYSMDV				
	102	rot	rot	rot	rot	rot	rot	M	6-1	ARESDLAWGFEDSW				
	101	rot	rot	rot	rot	rot	rot	M	3-72	ARGATVATNYYYGLDV				
	134	rot	rot	rot	rot	rot	rot	UM	27	3-48	ARAGYYYDSSGYSDPDY			
	117	rot	rot	rot	rot	rot	rot	UM	4-39	ATQNVRYFDWLSPPYFDYW				
	126	rot	rot	rot	rot	rot	rot	M	3-49	TRIVVGPTRAIRGVVDGMDVW				
	132	rot	rot	rot	rot	rot	rot	M	3-23	VKDRLTLAVFEIW				
	137	rot	rot	rot	rot	rot	rot	n.e	n.e	n.e	n.e			
97	rot	rot	rot	rot	rot	rot	M	4-61	ARYGGDSASDYWWFAPW					
88	rot	rot	rot	rot	rot	rot	M	3-23	AKDYLR					
136	rot	rot	rot	rot	rot	rot	UM	1-69	ARDLFVFGITIFGVEKLYGM DVW					
104	rot	rot	rot	rot	rot	rot	M	1-2	AREGDYISTHHGM DV					
138	rot	rot	rot	rot	rot	rot	UM	3-11	ARIESRGVCSGGSCYTNYYYMDVW					
120	rot	rot	rot	rot	rot	rot	M	3-7	ARGGRLDKSGYSWGD					
99	rot	rot	rot	rot	rot	rot	UM	5-51	ARRDCSSTCYARNADAW					
Kategorie 2	12	rot	rot	rot	rot	rot	M	2	3-21	ARDANGMDV				
	11	rot	rot	rot	rot	rot	M	2	3-21	ARDQNGMDV				
	10	rot	rot	rot	rot	rot	UM	2	3-21	AVDGRNGMDV				
	1	rot	rot	rot	rot	rot	M	2	3-21	ALDRDGM DV				
	2	rot	rot	rot	rot	rot	UM	9	1-69	ARGEGPIFGVIRPNLYYMDVW				
	67	rot	rot	rot	rot	rot	UM	9	4-34	ARGRRSITIFGVITDPYYYYMDV				
	22	rot	rot	rot	rot	rot	UM	3	1-69	AREQPDVWVADVGYGGMDVW				
	21	rot	rot	rot	rot	rot	UM	7	1-69	GRAVANVDFWSGYNKGYGGMDVW				
	16	rot	rot	rot	rot	rot	M	3-21	STGHI GAVDY					
	18	rot	rot	rot	rot	rot	M	3-21	ARPTQGVTTDY					
	17	rot	rot	rot	rot	rot	M	3-21	ARAXXTMVQXIPSLW					
	24	rot	rot	rot	rot	rot	UM	3-9	AKGGARWIQLTVRSYYYYGMDV					
	95	rot	rot	rot	rot	rot	M	3-23	AKTISRSDGV DVW					
	23	rot	rot	rot	rot	rot	UM	50	1-69	ARFMDYYDSGGYVNPQYYYYGMDV				
	15	rot	rot	rot	rot	rot	UM	7	1-69	ARAVQIEDYDFWSGYVHPKYYGMDVW				
	35	rot	rot	rot	rot	rot	UM	3-9	AKDUFELEWLLPFGSGYYYYGMDV					
	Kategorie 3	37	rot	rot	rot	rot	rot	M	3-23	AKGVTPANKFDYW				
39		rot	rot	rot	rot	rot	M	3-7	AKDLNTYKGGYVW					
38		rot	rot	rot	rot	rot	M	110	3-15	TTDRGGGYGM DVW				
86		rot	rot	rot	rot	rot	UM	3-20	ARVRGFYSGSLEDYGM DV					
103		rot	rot	rot	rot	rot	UM	3-9	PRSSGTVAARYYYYGMDVW					
105		rot	rot	rot	rot	rot	M	3-53	ARFTTSSQDYDFW					
100		rot	rot	rot	rot	rot	UM	3-23	AKVGDSSGSVDY					
90		rot	rot	rot	rot	rot	M	3-7	ARDYSSYDVSTGYKPSYFDKW					
107		rot	rot	rot	rot	rot	n.e	n.e	n.e	n.e				
Kategorie 4		122	rot	rot	rot	rot	rot	M	3-23	TKEGANWGTALFPSEVW				
		30	rot	rot	rot	rot	rot	M	3-72	VRGRMGSLDY				
		31	rot	rot	rot	rot	rot	M	3-72	ARAGGNQVGNSAFDHW				
		29	rot	rot	rot	rot	rot	M	3-74	ARDRRIAVAGSDAYYYGLDWW				
		28	rot	rot	rot	rot	rot	M	3-49	CGKGYSPENYSPHYW				
		3	rot	rot	rot	rot	rot	UM	3-30	AGVVEMATIGGVFSGMDV				
		81	rot	rot	rot	rot	rot	UM	3-21	ATDGSSSGGGM DVW				
		13	rot	rot	rot	rot	rot	M	2	1-2	GATDANYNMDV			
	33	rot	rot	rot	rot	rot	M	5-51	VRSWRYSSAGCEGDWYFDL					
	43	rot	rot	rot	rot	rot	M	3-23	AKSQYYDSGNLRNRYFDL					
	45	rot	rot	rot	rot	rot	M	4-34	ARGDFASGFLDSW					
	Kategorie 6	27	rot	rot	rot	rot	rot	M	1-18	ARDWSPTVSTVDC				
		20	rot	rot	rot	rot	rot	M	3-7	AXEAASCNNGICLLQTDYW				
		36	rot	rot	rot	rot	rot	M	1-46	ARRGSSTGYFYAMDVW				
		141	rot	rot	rot	rot	rot	UM	98	3-48	ATGHRYYDFWSGYTDPYYYYGMDVW			
		65	rot	rot	rot	rot	rot	UM	1-69	ASPPPNYDFWSG				
		60	rot	rot	rot	rot	rot	M	3-11	ARGPPIKMWVETRNNVFDPW				
106		rot	rot	rot	rot	rot	M	3-48	ARADSSGYMLDP					
Kategorie 8		52	rot	rot	rot	rot	rot	n.e	n.e	n.e	n.e			
		53	rot	rot	rot	rot	rot	UM	3-74	AREKKKAYDFWSGYSDAFIW				
		87	rot	rot	rot	rot	rot	M	4-59	ESGPCLRLRYGLL				
		Kategorie 9	14	rot	rot	rot	rot	rot	UM	1	1-2	ARDQWLTLGNVFDY		
			50	rot	rot	rot	rot	rot	UM	4-5	ARARLFLEWYFDYW			
			91	rot	rot	rot	rot	rot	UM	1-69	ARSDLTYDFW			
			Kategorie 10	114	rot	rot	rot	rot	rot	UM	70	3-23	AKEIPLLWFGEKEDW	
				59	rot	rot	rot	rot	rot	M	3-23	AKDSSPGDFGGNPGDY		
				110	rot	rot	rot	rot	rot	M	1-18	ARDPVISSGYAANVFDP		
				41	rot	rot	rot	rot	rot	M	2-5	AHRQVMNSAWNSGFVDF		
	26			rot	rot	rot	rot	rot	M	1-2	CATAAARGPYVAGTGYVFDPW			
	Kategorie 12			61	rot	rot	rot	rot	rot	M	4-4	ARHGDSSGMDV		
				84	rot	rot	rot	rot	rot	n.e	n.e	n.e	n.e	
				Kategorie 13	66	rot	rot	rot	rot	rot	UM	1-69	ARQGYCTNGVC	
					51	rot	rot	rot	rot	rot	M	3-23	AKDFGTMITVTEFDH	
					58	rot	rot	rot	rot	rot	M	3-74	TREGGTYCGGNCWSWFDPW	
					Kategorie 14	125	rot	rot	rot	rot	rot	UM	N40	4-39
49						rot	rot	rot	rot	rot	M	3-23	AKCGTGWVSNHDSW	
48						rot	rot	rot	rot	rot	M	N19	3-11	ARAPNYDSSGYV
Kategorie 15						54	rot	rot	rot	rot	rot	M	3-23	AKDINDYGLLADYW
		96				rot	rot	rot	rot	rot	M	3-7	ARDFGQGPYDSDGW	
		Kategorie 16				56	rot	rot	rot	rot	rot	M	4-34	ARDHCTGVGCKAGGRSLRFDPW
						94	rot	rot	rot	rot	rot	M	2-5	CAYSVGDCGSTCINWFDPW
			62			rot	rot	rot	rot	rot	M	4-39	ANGGGDGEVDY	
			Kategorie 17			63	rot	rot	rot	rot	rot	M	4-4	ARHAIGWYLPGLS
						64	rot	rot	rot	rot	rot	M	3-72	ARAYCTSTICKSSVHGMDV
						121	rot	rot	rot	rot	rot	M	1-69	VQGGFYLDSSGYAAAFDIW
						92	rot	rot	rot	rot	rot	n.e	n.e	n.e
	57					rot	rot	rot	rot	rot	M	4-31	ARGARFLLTGYSKPPLDY	
	82					rot	rot	rot	rot	rot	UM	34	3-7	ARVTTYDLTGFEWYMYMDV
	46			rot		rot	rot	rot	rot	M	1-18	ARQAFVLGWYDY		
	47			rot		rot	rot	rot	rot	M	6-1	ARDAAVPAGGAQWFDP		
	89			rot		rot	rot	rot	rot	M	3-7	ARDQWSSGWFDYW		
	Nicht-klassifizierbare Fälle				rot	rot	rot	rot	rot	M	3-7	ARDQWSSGWFDYW		

* Die auf Phagen exprimierten Epitop-Mimics für die genannten Fabs wurden mit den CLL-Proben inkubiert und die Bindung semiquantitativ erfasst. Eine starke Bindung wird in rot, eine mittlere Bindung in rosa und eine schwache Bindung in grün gezeigt. Die CLL-Proben wurden anhand ihres Epitoperkennungsmusters in 17 Kategorien eingruppiert (Spalte ganz links). Der Mutationsstatus (MS), wie mutiert (M) und unmutiert (UM), die Subsets nach Literatur (Murray et al., 2008, Stamatopoulos et al., 2007, Bomben et al., 2009) und die Aminosäuresequenz der CDR3 Region der schweren Kette werden für in den rechten vier Spalten gezeigt. Daten die nicht evaluiert werden konnten, werden mit n.e. bezeichnet.

Die Zahl dieser CLL-Fälle mit einem individuell, innerhalb des Kollektivs einzigartigem Epitoperkennungsmuster konnten im Vergleich zur Vorarbeit (n=60, Kapitel 1.4) von 17,5% auf 10% reduziert werden. Somit konnten jetzt 90% der untersuchten CLL-Fälle anhand ihres spezifischen Bindungsverhaltens bestimmten Kategorien zugeordnet werden. Alle der 100 CLL-Fälle banden aber an mindestens einen der Epitop-Mimic-tragenden Phagenklone. Der Großteil (76%) der CLL-Proben zeigte sogar ein multireaktives (> 2 Epitope) Bindungsverhalten.

Die Kontrolle wurde mit mononukleären peripheren Blutzellen von gesunden Probanden und mit nicht-hämatogenen Zelllinien (293 T-Zellen, HeLa-Zellen), die kein Immunglobulin exprimierten, durchgeführt. Diese Experimente wurden parallel zu den Verum-Bindungsexperimenten mit CLL-Zellen durchgeführt, sind aber der Übersichtlichkeit wegen in Tabelle 5 separat dargestellt. Diese Tabelle zeigt, dass die Epitop-Mimics nicht an diese Kontrollproben banden (Tabelle 5).

Tabelle 5: Epitop-Mimic-Phagenbindung an nicht-CLL Kontrollen

Kontrollzelltyp	Epitop-Mimics für					
	Fab1	Fab2	Fab3	Fab4	Fab5	Fab6
293 T						
HeLa						
PBMC1						
PBMC2						

Als Kontrollen wurden peripheral blood mononuclear cells (PBMC) von zwei gesunden Probanden und die Zelllinien HeLa und 293 T-Zellen verwendet. Analog zu der Tabelle 4 symbolisiert grün eine schwache bzw. keine Bindung. Die Bindungsassays wurden parallel zu den in Tabelle 4 gezeigten Bindungsassays durchgeführt.

Von den 100 CLL-Patienten unseres Kollektivs konnten 21% CLL Patienten, anhand ihrer homologen CDR3 Regionen den von Stamatopoulos et al. (Stamatopoulos et al., 2007), Murray et al. (Murray et al., 2008) und Bomben et al. (Bomben et al., 2009) vorgeschriebenen Subsets zugeordnet werden (Tabelle 6). CLL Proben die zum gleichen Subset gehörten, zeigten häufig auch ein ähnliches Bindungsverhalten und konnten so einer Kategorie zugeordnet werden. Die Kategorie 1, 9 und 7 beinhalteten nur Patienten mit unmutierten B-

Zell-Rezeptoren, während vier von den fünf Patienten, die zur Kategorie 2 gehörten, einen mutierten BZR zeigten.

Tabelle 6 : Übersicht über die vertretenen Subsets und deren absoluten und relativen Häufigkeiten in den Epitopbindungskategorien (Tabelle 4)

Subset*	Anzahl (%)
1	3 (14%)
2	5 (24%)
3	1 (5%)
7	2 (10%)
9	2 (10%)
27	1 (5%)
34	1 (5%)
70	1 (5%)
98	1 (5%)
110	1 (5%)
N40	1 (5%)
N19	1 (5%)

* Subset nach (Murray et al., 2008, Stamatopoulos et al., 2007, Bomben et al., 2009)

Aus der Kategorie 2 (n=13) konnten allein acht CLL-Patienten diesen Subsets zugeordnet werden. Es gehörten vier Patienten zu dem Subset 2, zwei zum Subset 9 und jeweils ein Patient zum Subset 3 und 7. Alle CLL-Patienten der Kategorie 2 zeigten ein starkes oder mittleres Bindungsverhalten mit allen sechs Epitop-Mimics. Die Patienten, die dem Subset 2 angehörten, wiesen auch alle das IGV_H Gen 3-21 auf.

5.2 Auswertung prognostischer Parameter

5.2.1 Alter

Es wurde das Alter der Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose der CLL erhoben und mit den Epitopbindungskategorien ins Verhältnis gesetzt. Der Altersdurchschnitt betrug bei den 100 untersuchten CLL-Patienten 61,7 Jahre, wobei der jüngste Patient 39 Jahre und der älteste Patient 87 Jahre alt waren. Mit Ausnahme der Kategorie 9 und 15 waren die Altersmittelwerte bei den

einzelnen Kategorien relativ homogen um den Gesamtmittelwert aller Kategorien verteilt (Abbildung 4).

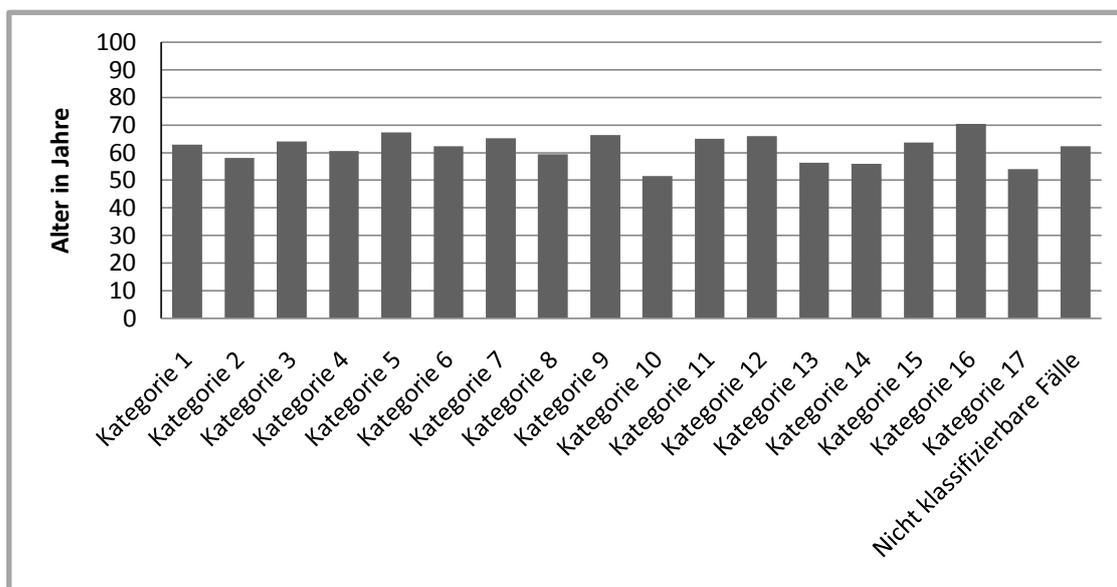


Abbildung 4: Altersverteilung in den unterschiedlichen Gruppen

Der Unterschied der Kategorie 9 (Altersmittelwert 66,3 Jahre) und Kategorie 15 (Altersmittelwert 63,6 Jahre) zu den anderen Kategorien war statistisch nicht signifikant.

5.2.2 Chromosomale Aberrationen

Von den 100 CLL-Patienten lag bei 88 ein zytogenetischer Befund vor. Bei zwölf Patienten war eine Bestimmung des Karyotyps nicht möglich oder konnte aus anderen Gründen nicht durchgeführt werden. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung wiesen 74% der 88 Fälle chromosomale Veränderungen auf. Tabelle 7 listet die vorkommenden Aberrationen auf und zeigt deren Verteilung. Von den 88 Patienten zeigten 71 Patienten eine chromosomale Aberration, 13 Patienten zeigten zwei und bei zwei Patienten konnten mehr als drei Aberrationen nachgewiesen werden (Tabelle 7).

Tabelle 7: Vorkommen von chromosomalen Aberration bei den CLL-Patienten der untersuchten Kohorte

chromosomale Aberration	Anzahl der Patienten (%) *
Deletion 13q14	58 (65,9)
Deletion 11q22	11 (12,5)
Trisomie 12	10 (11,4)
Deletion 17p13	3 (3,4)
normaler Karyotyp	22 (25)

*71 von 88 Patienten mit vorliegendem zytogenetischen Befund, zeigten eine chromosomale Aberration, 13 Patienten hatten zwei Aberrationen und zwei Patienten wiesen mehr als drei Aberrationen auf.

Unter den 58 Patienten, die eine 13q14 Deletion aufwiesen, war es bei 43 Patienten die einzige Aberration. Bei den restlichen 13 Patienten war die 13q Deletion mit einer 11q Deletion (7 Patienten), Trisomie 12 (4 Patienten) und 17p Deletion (1 Patient) verbunden. In einem Fall war eine Deletion 11q mit einer Trisomie 12 kombiniert. Eine alleinige 11q Deletion trat in einem von elf Fällen (9,1%), eine Trisomie 12 in vier von zehn Fällen (40%) und eine 17p Deletion in einem von drei Fällen (33,3%) auf.

In einem weiteren Schritt wurde die Verteilung der chromosomalen Aberration in den einzelnen Kategorien untersucht (Abbildung).

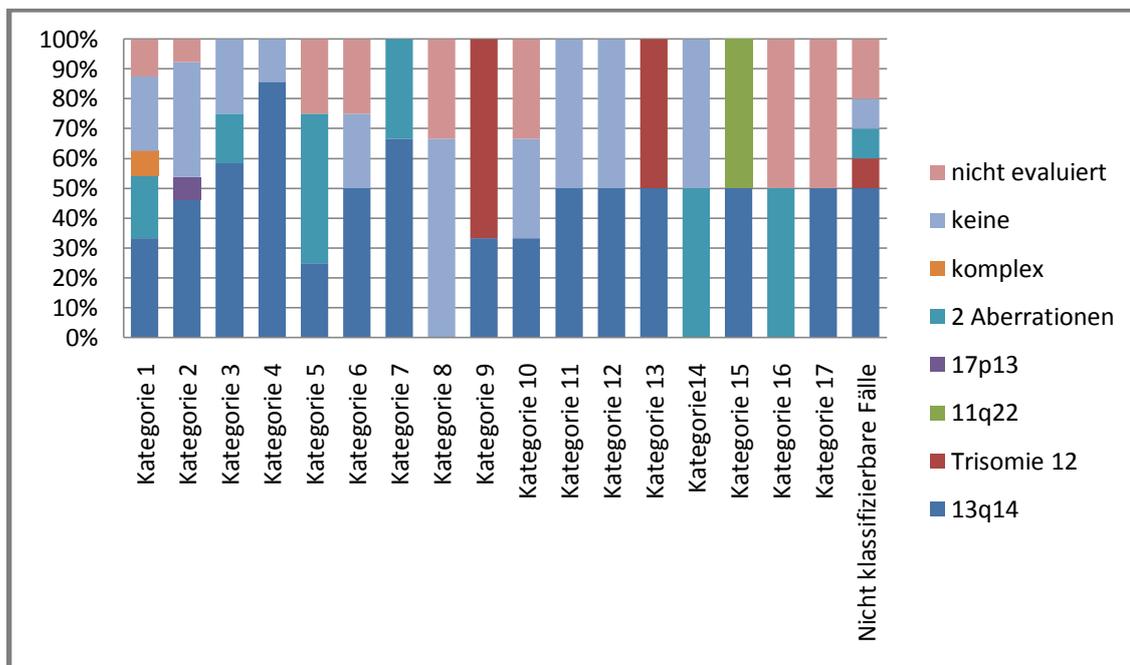


Abbildung 5: Verteilung der chromosomalen Aberrationen in den einzelnen Kategorien

In den Kategorien 1-6, die zwischen vier und 24 Patienten (n= 64) beinhalteten, war die Deletion 13q14 die am häufigsten vorkommende chromosomale Aberration (47%). Insgesamt zeigten 50% des Gesamtkollektivs mit einem zytogenetischen Befund (n=88) eine Deletion vom 13q14 Typ. Es wiesen 15% der 88 CLL-Fälle mit vorliegendem zytogenetischen Befund, zwei chromosomale Aberrationen auf. In der Kategorie 1 (n=24) waren zwei chromosomale Aberrationen mit 20,8% überdurchschnittlich vertreten. Allerdings war dieses Ergebnis nicht statistisch signifikant (p=0,1923). Die CLL-Patienten der Kategorie 4 (n=7) zeigten keinen Karyotyp, der für eine schlechtere Prognose sprechen würde. In dieser Kategorie kamen nur Deletionen des Typs 13q14 vor und ein Patient wies gar keine chromosomale Aberration auf.

5.2.3 IGV_H Gen und Mutationsstatus des B-Zell-Rezeptors

Die komplette IGV_H Sequenz konnten wir bei 95 von den 100 CLL-Patienten bestimmen. Bei fünf Patienten war die Sequenzbewertung nicht erfolgreich. Die Bestimmung der IGV_H Rearrangements erfolgte mittels Sequenzabgleich im IMGT Programm (www.imgt.org/) (Lefranc et al., 1999). Jede Sequenz wurde mit einer Keimbahnlinie durch das BLAST Programm (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) der NCBI (National Cancer for

Biotechnology Information; National Library of Medicine; National Institutes of Health, Bethesda, MD 20984, USA) verglichen.

In Abbildung 6 sind die Verteilungen der nachgewiesenen Genfamilien aufgezeigt. Aus der Übersicht lassen sich drei dominante Genfamilien abgrenzen.

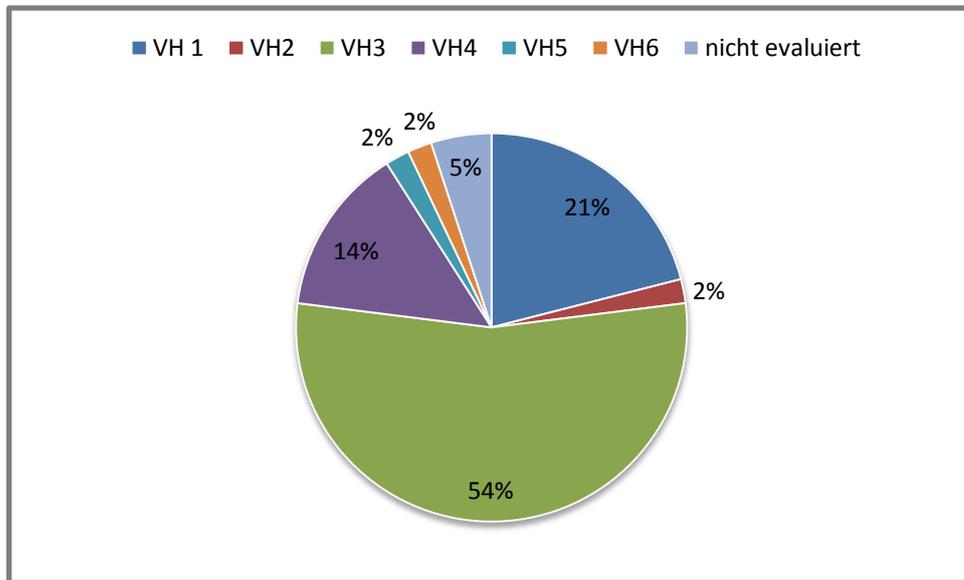


Abbildung 6: Häufigkeitsverteilung der IGV_H Genfamilien

Die führende Genfamilie war mit 54% die VH3 Familie. Die VH1 Familie war mit 21% und die VH4 Familie mit 14% vertreten. Nur in zwei Fällen (2%) konnte jeweils ein Mitglied der VH2, VH5 und VH6 Genfamilie nachgewiesen werden.

Die Aufgliederung der einzelnen Genfamilien in ihre Subklassen zeigt Abbildung 7. In der Genfamilie VH3 waren die Gene VH 3-23 (22%), VH3-7 (17%) und VH 3-21 (15%) am häufigsten vertreten. In der VH1 Genfamilie war das VH 1-69 Gen mit 47% dominierend. Das Gen VH 4-34 war mit 29% führend in der VH4 Familie vertreten.

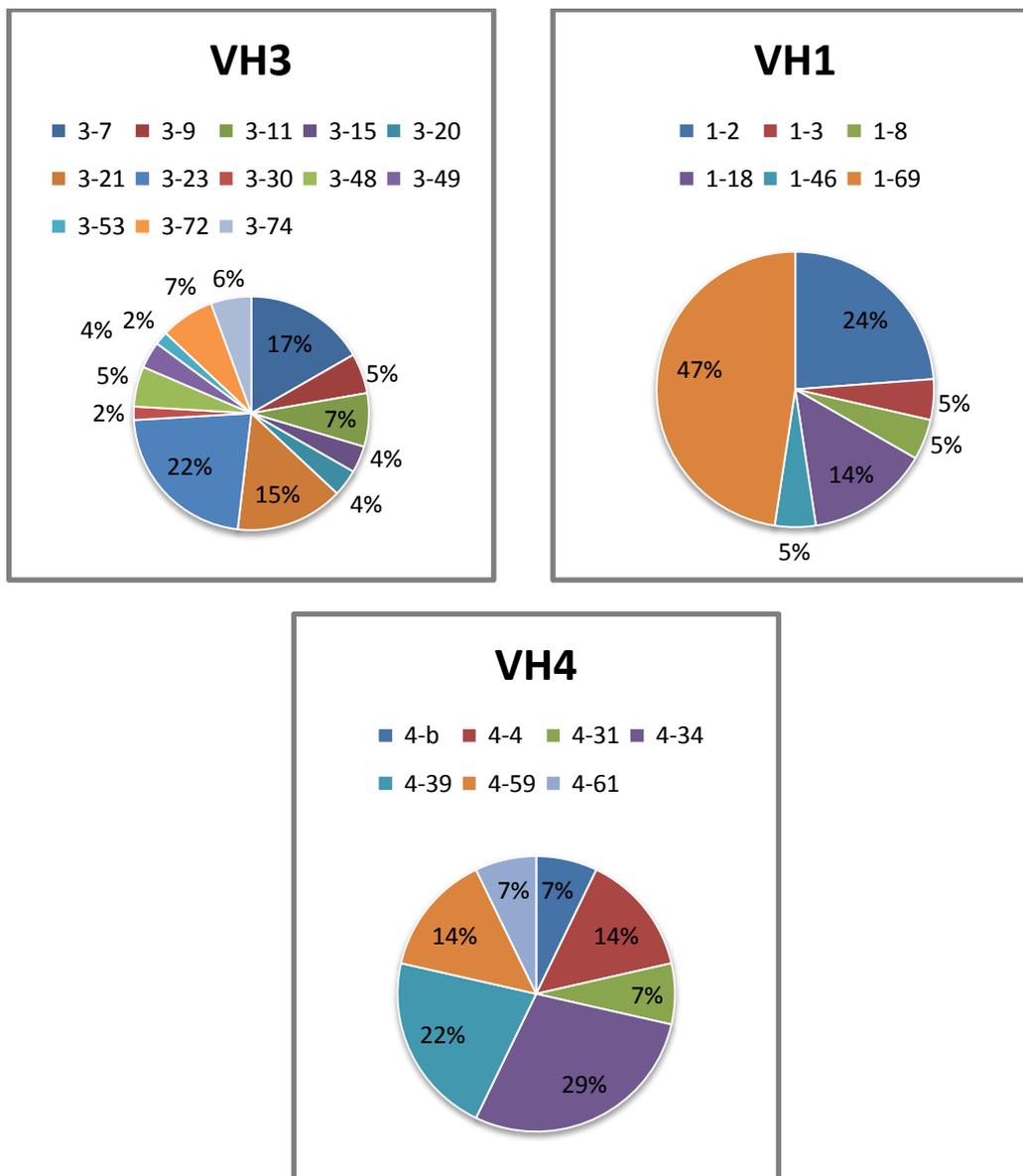


Abbildung 7: Häufigkeit der Subklassen in den Genfamilien VH3, VH1 und VH4 in der Gesamtkohorte der 100 CLL-Patienten

Der jeweilige Anteil der verwendeten Immunglobulingene in den einzelnen Bindungskategorien (Abbildung 8) zeigt zunächst eine heterogene Verteilung. Bei genauerer Betrachtung fällt in der Kategorie 2 eine deutliche Überrepräsentation der VH3 Subklasse VH 3-21 auf. In der Kategorie 2 (n=13) besaßen 7 Patienten (54%) das Immunglobulingen 3-21. Die CLL-Patienten der Kategorie 4 (n=7) beinhalteten nur Subklassen der Genfamilie VH3. Die statistische Auswertung der Kategorien 11-17 ist aufgrund der geringen Patientenanzahl (ein bis zwei Patienten pro Kategorie) nur bedingt möglich.

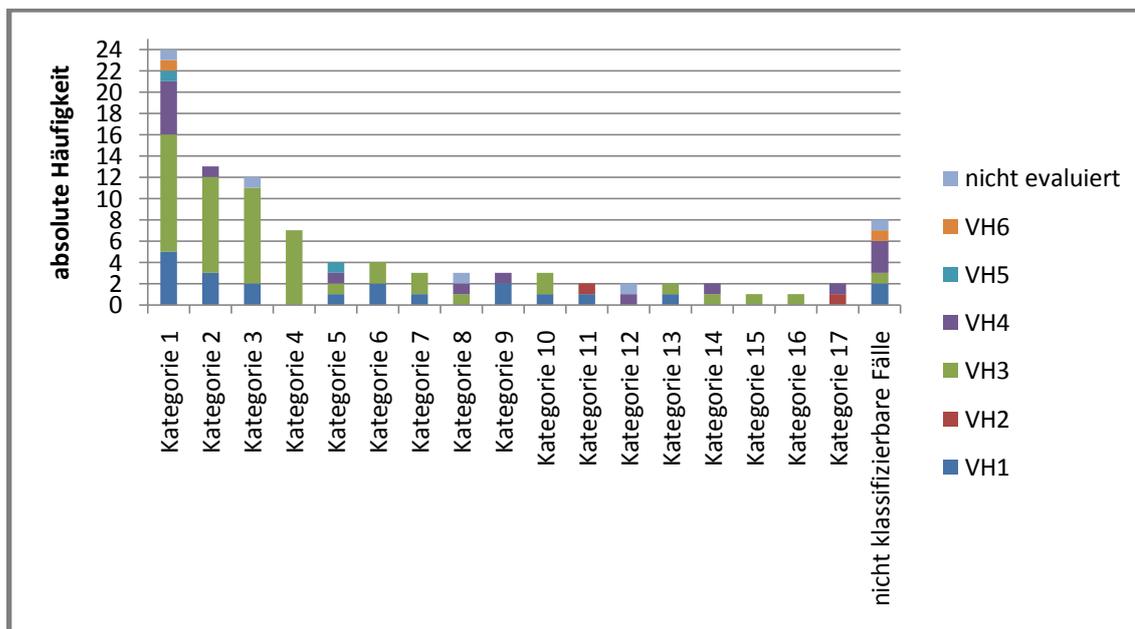


Abbildung 8: Verteilung der VH Familien in den einzelnen Bindungskategorien

Für die Gesamtpopulation wurde das Mutationsverhältnis berechnet. Bei dieser Analyse wurden alle Fälle als mutiert betrachtet, die weniger als 98% Übereinstimmungen zu der Keimbahnlinie aufwiesen. Als unmutiert wurden die Fälle bezeichnet, die mehr als 98% Homologien zeigten. Von der Gesamtpopulation zeigten 60% einen mutierten B-Zell-Rezeptor, während 35% einen unmutierten Rezeptor aufwiesen. Bei fünf Patienten aus der Gesamtkohorte konnte eine Mutationsanalyse des B-Zell-Rezeptors nicht erfolgen.

5.3 Vergleich der Kategorie 2 mit der Kontrollgruppe

Das Epitoperkennungsmuster der Kategorie 2 zeigte mit jedem der untersuchten Epitop-Mimics ein starkes bis mittleres Bindungsverhalten. Darüber hinaus fiel eine Akkumulation von „klassischen Subsets“ (Murray et al., 2008, Stamatopoulos et al., 2007, Bomben et al., 2009) in dieser Kategorie auf. Die Häufung der Subsets und das multireaktive Bindungsverhalten unterschied die Kategorie 2 von den restlichen Bindungsgruppen. Wir überprüften, ob die Zugehörigkeit zu einer Kategorie anhand des Epitoperkennungsmusters auch eine klinische Signifikanz hat. Dafür haben wir den klinischen Verlauf der Patienten der Kategorie 2 mit der Kontrollgruppe verglichen. Als Kontrollgruppe

wurden alle klassifizierbaren Fälle bis auf die Patienten der Kategorie 2 zusammengefasst. Die Kontrollgruppe umfasst damit 87 Fälle und die Kategorie 2 beinhaltet 13 CLL-Fälle.

Die einzelnen Kategorien unterschieden sich hinsichtlich des Alters nur marginal. Die Patienten der Kategorie 2 hatten ein Durchschnittsalter von 58 Jahren und lagen damit um 1,7 Jahre unter dem Durchschnitt. Allerdings waren fünf von 13 Patienten bei Diagnosestellung unter 50 Jahren.

5.3.1 Vergleich der chromosomalen Aberrationen der Kategorie 2 und der Kontrollgruppe

Wir verglichen die Verteilung der chromosomalen Aberrationen der Kategorie 2 mit der Kontrollgruppe (alle Kategorien außer Kategorie 2) (Abbildung 9). Die Kategorie 2 erscheint hinsichtlich der Verteilung der chromosomalen Aberrationen homogen. Die Verteilung zwischen den 13q14 Deletionen und dem normalen Karyotyp erschien nahezu ausgeglichen, nur ein Patient wies eine 17p Deletion auf.

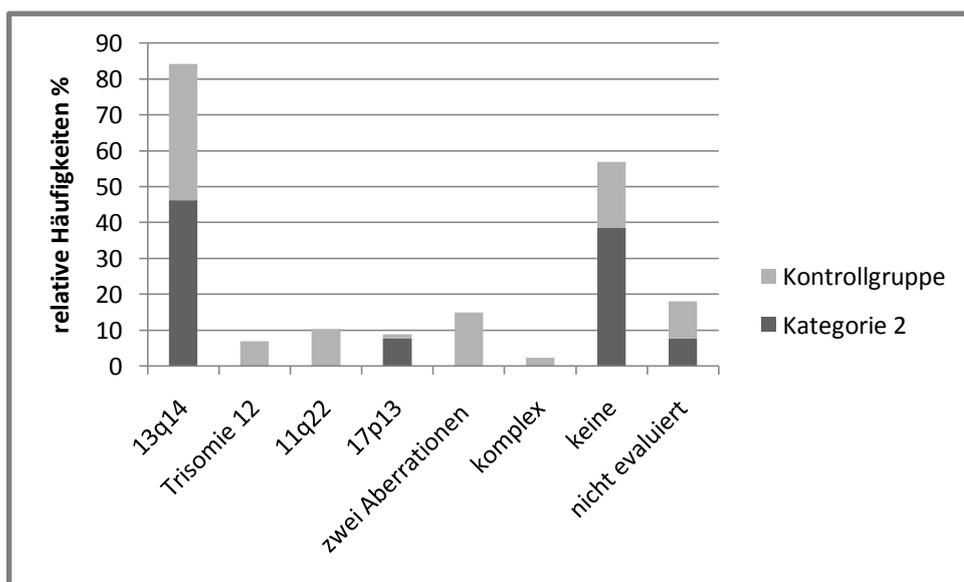


Abbildung 9: Vergleich der chromosomalen Aberrationen der Kategorie 2 mit der Kontrollgruppe

Die Verteilung der chromosomalen Aberrationen in der Kontrollgruppe entspricht weitestgehend den der Gesamtpopulation (Tabelle 7).

5.3.2 Vergleich der Kategorie 2 mit der Kontrollgruppe hinsichtlich des IGV_H Gens und des Mutationsstatus

Wir haben die Verteilung der IGV_H Familien der Kontrollgruppe, der verwendeten IGV_H - Familien in der Kategorie 2 gegenübergestellt. In der Abbildung 10 sind die Frequenzen der einzelnen VH-Familien dargestellt. In der Kategorie 2 war die Verteilung der einzelnen verwendeten

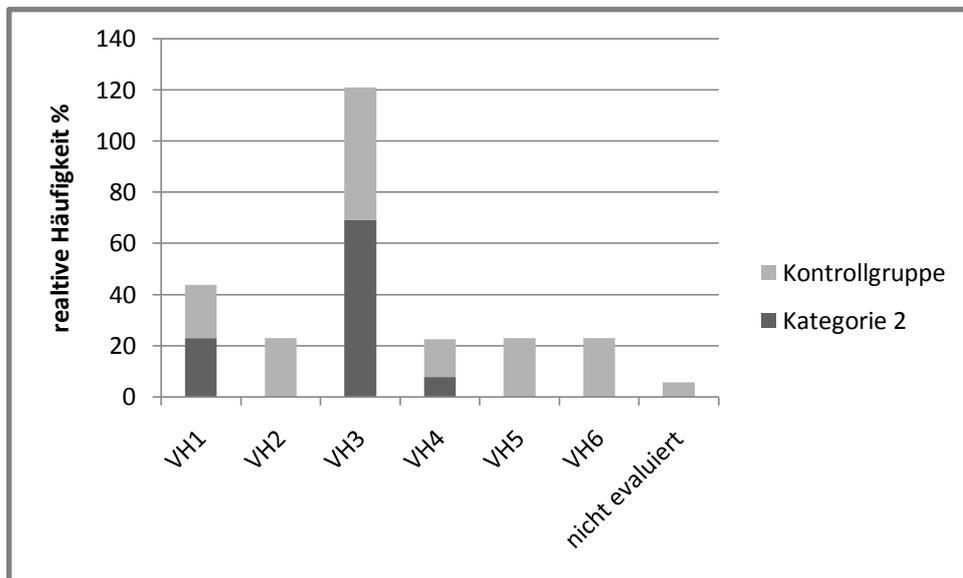


Abbildung 10: Vergleich der Frequenzen der Immunglobulingenfamilien in der Kategorie 2 und der Kontrollgruppe

Genfamilien weitestgehend gleich wie in der Kontrollgruppe. Die Genfamilie VH3 war am häufigsten vertreten, danach folgten die VH1- und die VH4-Familien.

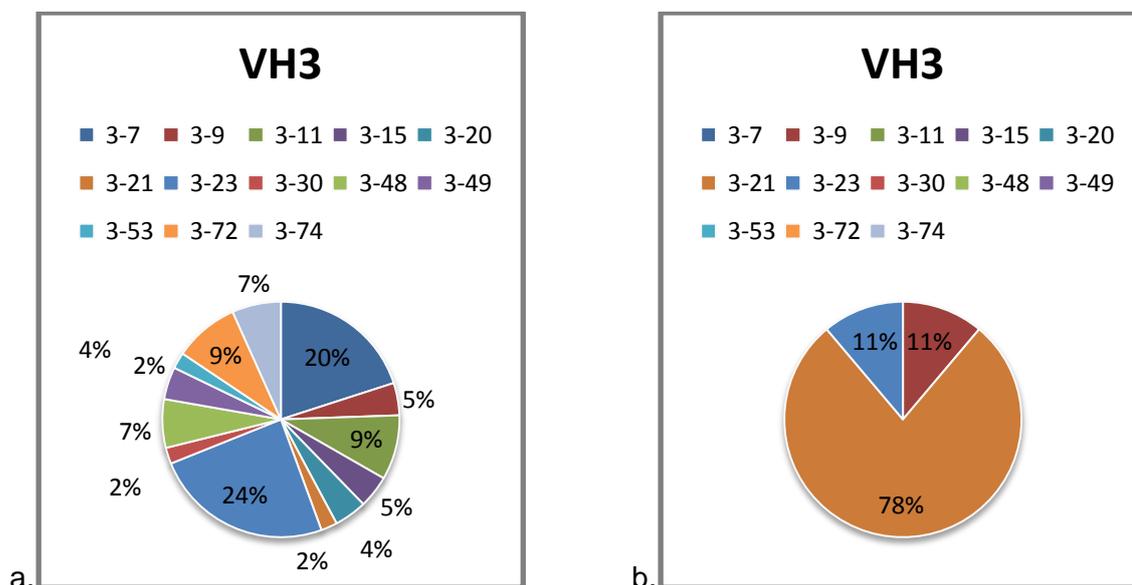


Abbildung 11: Aufteilung der VH3-Familien in der Kontrollgruppe (a) und der Kategorie 2 (b)

Bei der Aufteilung der VH3-Familie in den einzelnen Immunglobulingensubfamilien (Abbildung 11) fiel auf, dass in der Kategorie 2 das VH 3-21 Gen mit 78% im Vergleich zu der Kontrollgruppe (9%) sehr dominant war.

Das Verhältnis von mutierten zu unmutierten BZR in der Kategorie 2 und der Kontrollgruppe wurde miteinander verglichen. Die Patienten der Kategorie 2 zeigen fast ein ausgeglichenes Verhältnis von mutierten (52,8%) zu unmutierten (46,2%) BZR. Das Verhältnis des Mutationsstatus (mutiert: 64,6% versus unmutiert: 35,4%) der Kontrollgruppe war vergleichbar mit der der Kategorie 2. Der Unterschied in dem Mutationsstatus der Kategorie 2 und der Kontrollgruppe war nicht statistisch signifikant ($p=0,4795$).

5.3.3 Time to first treatment (TTFT, Zeitraum zwischen Diagnosestellung und der ersten Therapie der CLL)

Wir überprüften, ob die Zugehörigkeit zu einer Kategorie anhand des Epitoperkennungsmusters mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung korreliert. Dafür untersuchten wir die TTFT (time to first treatment) der CLL-Patienten, die der Kategorie 2 angehörten mit der TTFT der Patienten aus der Kontrollgruppe. Die TTFT war definiert als die Zeitspanne zwischen der Diagnosestellung und der ersten Therapiegabe. Die TTFT gilt in der CLL als ein Surrogatmarker für

die Progressionsgeschwindigkeit der Krankheit. Sie wurde für die zu untersuchenden Kollektive in Form einer Kaplan-Meier Kurve dargestellt. Zur Erstellung der Kaplan-Meier Kurve wurde die behandlungsfreie Zeit der Kategorie 2 und der Kontrollgruppe erfasst, wobei der Therapiebeginn der CLL als „Ereignis“ definiert wurde. Die Kaplan-Meier Kurve in

Abbildung 12 zeigt, dass die Kategorie 2 eine deutlich kürzere behandlungsfreie Zeit aufweist als die Patienten der Kontrollgruppe. Die statistische Irrtumswahrscheinlichkeit berechnete sich im Log-Rank Test auf $p=0,011$ und lag damit im statistisch signifikanten Bereich. Die mittlere TTFT lag in Kategorie 2 bei 27 Monaten im Vergleich zu 87 Monaten in der Kontrollgruppe.

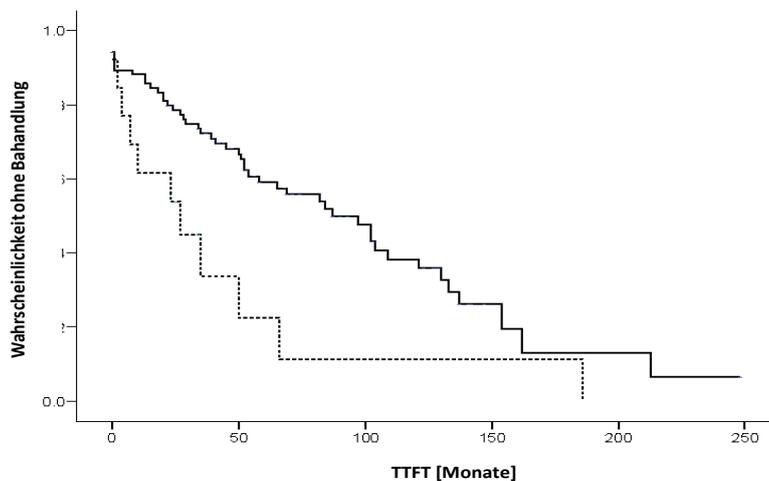


Abbildung 12: Kaplan-Meier Kurve zur Darstellung der time to first treatment (TTFT). Vergleich der Kategorie 2 (gepunktete Linie) mit der Kontrollgruppe (durchgezogene Linie). Log-rank test $p=0,011$

Wir untersuchten, ob die geringere TTFT der Kategorie 2 auch allein durch bestimmte Marker erklärt werden könnte. Dabei wurden folgende Parameter erfasst: Verteilung der Subsets, Mutationsstatus und IGV_H Genzugehörigkeit. Die Kategorie 2 beinhaltet Patienten, die anhand ihrer BZR Konfiguration bestimmten BZR-Subsets (Murray et al., 2008, Stamatopoulos et al., 2007) zugeordnet werden konnten, die mit einer schlechteren Prognose (geringere

TTFT) korrelieren. So gehörten vier Patienten (30,8%) aus der Kategorie 2, den Subsets 1,2 oder 3 an. Darüber hinaus fanden sich sieben Patienten (53,8%) die das IGV_H Gen 3-21 aufwiesen. Die CLL-Fälle mit einem Hochrisikoprofil zeigten zudem ein multireaktives Epitoperkennungsmuster und häuften sich in der Kategorie 2 an (Chi-Quadrat Test, $p < 0,001$). Als Hochrisikoprofil wurde ein unmutierter BZR, das Immunglobulingen VH 3-21 und die Deletionen 11q23 und 17p13 definiert. Wir untersuchten, ob die kürzere TTFT der Kategorie 2 allein durch die Anhäufung von Patienten mit einem Hochrisikoprofil zu erklären ist oder ob die Assoziation dieser Epitopbindungskategorie mit der ungünstigen Prognose unabhängig vom Mutationsstatus und bestimmten BZR Konfigurationen ist. Wir konnten feststellen, dass die kürzere TTFT nicht allein mit dem Risikoprofil zu erklären ist, vielmehr ist die Gruppenzugehörigkeit als ein unabhängiger Faktor anzusehen. Der behandlungsfreie Zeitraum (TTFT) der Kategorie 2 war deutlich verkürzt im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Der Einfluss des Mutationsstatus und der BZR-Konfiguration wurde mit Hilfe der Cox-Regression berechnet, indem die Kalkulation um diese Parameter bereinigt wurde. Der Effekt der Gruppenzugehörigkeit blieb signifikant (Cox-Regression, $p=0,034$).

Als einen weiteren Parameter, der möglicherweise Einfluss auf die Progression der CLL hat, untersuchten wir die Anzahl der erkannten Epitope. In Analysen der TTFT von Kategorien, die nur vier oder weniger Epitope erkannten, konnten wir feststellen, dass sie sich zu den Kategorien, die fünf bis sechs Epitope erkannten, unterschieden.

Wir verglichen dazu die Kaplan Meier-Kurven der TTFT von Patienten, die fünf oder sechs Epitope („multireaktive Gruppe“) erkannten mit Patienten, die zwischen 1-4 Epitope erkannten.

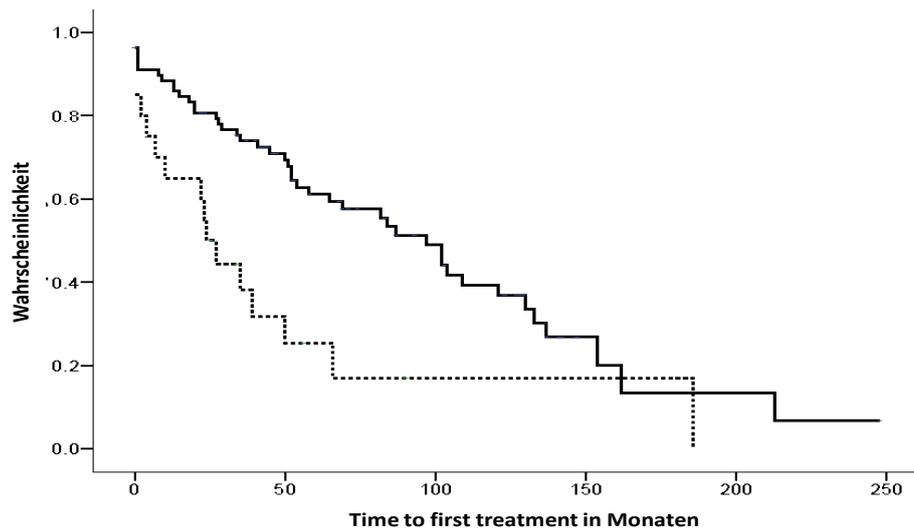


Abbildung 13: Kaplan-Meier Kurve zur Darstellung der time to first treatment (TTFT). Vergleich der multireaktiven Gruppe (gepunktete Linie) mit der Kontrollgruppe (durchgezogene Linie), (CLL-Zellen, die an fünf oder sechs Epitop-Mimics banden, im Vergleich zu den Fällen, die an weniger Epitop-Mimics (1-4) banden).

Abbildung 13 zeigt die Kaplan-Meier Kurve der multireaktiven Gruppe (Kategorien 2,9 und 13) und die der Gruppe, die an einem bis vier Epitope gebunden haben. Es ist zu sehen, dass CLL-Patienten, die ein multireaktives Epitopbindungsmuster zeigten, eine deutlich kürzere TTFT aufwiesen. Die mittlere TTFT in der multireaktiven Gruppe lag bei 24 Monaten, im Vergleich zu 97 Monaten in der Gruppe mit einem weniger multireaktiven Epitoperkennungsmuster.

6 Diskussion

6.1 Übersicht

Die chronische lymphatische Leukämie zählt zwar zu den häufigsten Leukämien in der westlichen Welt (Rozman and Montserrat, 1995), doch ist noch wenig über die zugrundeliegende Biologie bekannt. Größeres Verständnis zur Entstehung der CLL erhofft man sich durch Forschung an dem B-Zell-Rezeptor der Lymphomzellen. Es gibt starke Hinweise für eine Beteiligung von Antigenen in der Entstehung der CLL. Diese Hinweise werden unterstützt durch ein eingeschränktes Repertoire der exprimierten Immunglobulingene und durch eine hohe Anzahl von Homologien in der CDR3 Region. In den letzten Jahren war es möglich, die restringierten CLL-Idiotypen anhand der Sequenz ihrer CDR in detaillierte und klar definierte „Subsets“ einzuteilen (Bomben et al., 2009, Murray et al., 2008, Stamatopoulos et al., 2007, Lanemo Myhrinder et al., 2008). Danach sind mindestens 26% aller CLL-Idiotypen in bestimmte Gruppen mit jeweils identischer oder nahezu identischer CDR3-Region klassifizierbar. Hinsichtlich der Rolle einer potentiellen Interaktion von B-Zell-Rezeptoren und definierten Antigenen bei der CLL bleiben aber weiterhin sehr viele Fragen offen. So wurden in den letzten Jahren bei Bindungsstudien von CLL-B-Zell-Rezeptoren mit definierten Proteinen nur vereinzelt bestimmte Antigene identifiziert. Dabei wurden vor allem Autoantigene entdeckt, die auch im Rahmen von Autoimmunkrankheiten eine Rolle spielen (Catera et al., 2008, Chiorazzi et al., 2005, Chu et al., 2008, Herve et al., 2005, Messmer et al., 2004a). In Anbetracht der großen möglichen Anzahl von Antigenen erscheint diese Methode als nicht auszureichend, um die Rolle der B-Zell-Rezeptor-Antigeninteraktion bei der CLL zu klären.

In dem Labor der Arbeitsgruppe Trepel konnte eine Methode, zur Untersuchung der Interaktion des BZR der CLL-Lymphomzellen mit Epitopen entwickelt werden. Es wurden Epitop-nachahmende Peptide, so genannte Epitop-Mimics, erzeugt, in dem randomisierte Phagen-Peptidbanken auf rekombinant hergestellten B-Zell-Rezeptoren selektiert wurden.

So konnte durch die in Kapitel 1.4 geschilderten Vorarbeiten gezeigt werden, dass Zellen von unterschiedlichen CLL-Patienten mit dem gleichen Epitop in Verbindung treten können, obwohl sie Unterschiede in der Aminosäuresequenz der Epitop-erkennenden Region des BZR aufwiesen. Es sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob sich die CLL-Proben auch in einem größeren Patientenkollektiv anhand ihres Epitoperkennungsmusters in Kategorien zuordnen lassen. Dabei sollte die Annahme, dass es möglicherweise nur eine relativ kleine Gruppe an BZR Epitop-Interaktionsmuster gibt, überprüft werden. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob die Zugehörigkeit einer Patientenprobe zu einer bestimmten funktionellen Subgruppe mit klinischen, insbesondere prognostisch relevanten Parametern korreliert werden kann.

6.2 Bildung von Kategorien anhand der B-Zell-Rezeptor-Epitoperkennungsmuster

Früher wurde angenommen, dass die CLL-B-Zellen von unreifen immunologisch inkompetenten B-Lymphozyten abstammen. Man ging davon aus, dass diese inaktiven Zellen nur eine niedrige Teilungsrate und eine kurze Überlebenszeit haben und somit eher „akkumulieren“ als durch rasche Proliferation vermehren (Dameshek, 1967). Mittlerweile hat sich diese Vorstellung relativiert. Heute wird davon ausgegangen, dass die leukämischen Zellen von reifen, antigenerfahrenen und immunologisch kompetenten B-Lymphozyten abstammen, die eine gewisse Teilungsrate besitzen und durch genetische Veränderung über Apoptose-verhindernde Mechanismen verfügen, die zu einem längeren Überleben beitragen (Chiorazzi and Ferrarini, 2003). Unter anderem dadurch ist die Hypothese entstanden, dass die Pathogenese und der klinische Verlauf der CLL in Zusammenhang mit Antigenreaktionen stehen (Messmer et al., 2004a, Chiorazzi and Ferrarini, 2003, Stamatopoulos et al., 2007, Refaeli et al., 2008, Damle et al., 2002). Der gravierendste Hinweis, der diese Vermutung unterstützt, entstand durch die Untersuchung der B-Zell-Rezeptoren bei der CLL. Hierbei wurde festgestellt, dass bei ca. 26% der Patienten in der antigenbindenden Region des BZR, insbesondere in der CDR3 Region der schweren Immunglobulinkette, Subgruppen („Subsets“) mit jeweils hoher Ähnlichkeit oder Übereinstimmung vorlagen (Stamatopoulos et al., 2007,

Messmer et al., 2004a, Fais et al., 1998, Murray et al., 2008, Thorselius et al., 2006, Tobin et al., 2003). Anhand dieser stereotypen BZR konnten Patienten in 150 abgrenzbare Subsets klassifiziert werden (Messmer et al., 2004a, Chiorazzi and Ferrarini, 2003, Fais et al., 1998, Murray et al., 2008, Bomben et al., 2009). Das deutet daraufhin, dass die homologen BZR der CLL-Patienten dieselben oder zumindest ähnliche Epitope erkennen und dass diese im Überleben und Proliferation der CLL-Zellen eine bedeutsame Funktion besitzen (antigenic-drive Hypothese). Die klinische Signifikanz einer solchen Einteilung in BZR-Subsets wurde bislang an zwei bestimmten Subsets gezeigt (Capello et al., 2004, Thorselius et al., 2006).

In den Vorarbeiten konnte an einer kleineren Studienpopulation gezeigt werden, dass mit sechs hergestellten Epitop-Mimics CLL-Zellen von verschiedenen Patienten erkannt werden. Diese Arbeit nahmen wir als Basis für unsere Untersuchung. Wir erhöhten das Kollektiv auf 100 CLL-Patienten und untersuchten das Bindungsverhalten mit denselben sechs Epitop-Mimics. Es war uns möglich zu zeigen, dass auch in einer größeren Population alle Patienten eine Bindung mit den Phagenpeptiden eingehen. Diese 100 CLL-Patienten konnten anhand ihres Epitoperkennungsmusters in siebzehn funktionelle Kategorien eingeteilt werden. Diese Ergebnisse sind durchaus überraschend, wenn man bedenkt, dass die CLL lange als eine Krankheit galt, die von einem B-Zellklon mit zufällig erworbenen genetischen Aberrationen abstammt. Es wäre daher nicht zu erwarten gewesen, dass die BZR von CLL-Patienten solche funktionellen Ähnlichkeiten zeigen. In unseren Experimenten erkannten die CLL-Zellen mit stereotype B-Zell-Rezeptoren eines Subsets, basierend auf der Aminosäuresequenz der CDR3 Region (Murray et al., 2008, Stamatopoulos et al., 2007, Bomben et al., 2009, Hadzidimitriou et al., 2009), Epitop-Mimics nach einem ähnlichen Muster und konnten meist in eine Kategorie zusammengefasst werden. Das deutet daraufhin, dass homologe BZR tatsächlich ähnliche oder identische Epitope erkennen. Diese funktionellen Kategorien beinhalteten aber auch immer CLL-Zellen von Patienten, die keinen dieser stereotypen BZR exprimierten. Folglich ist das Epitoperkennungsmuster unabhängig von der CDR3 Region des BZR. Diese Kreuzreaktivität kann als ein weiteres Indiz für die Rolle der „antigenic-drive“ Hypothese in der Pathogenese

der CLL verstanden werden. Nach Analyse des Bindungsverhaltens scheint es möglich, dass die Anzahl der möglichen Antigene, mit denen die CLL-BZR interagieren erstaunlich limitiert ist. Unsere Beobachtungen unterstützen somit die wiederholt postulierte Annahme, dass der BZR in der Pathogenese der CLL eine bedeutsame Rolle spielt (Messmer et al., 2004b, Chiorazzi and Ferrarini, 2003, Damle et al., 2002, Messmer et al., 2004a, Refaeli et al., 2008, Stevenson and Caligaris-Cappio, 2004, Bomben et al., 2009, Murray et al., 2008, Stamatopoulos et al., 2007).

Die sechs Epitop-Mimics, die für diese Studie auf BZR von sieben zufällig ausgewählten CLL-Patienten selektiert worden sind, repräsentieren natürlich nicht die Gesamtheit aller CLL-Patienten. Umso erstaunlicher ist es aber, dass die Zellen aller 100 untersuchten CLL-Patienten mit mindestens einem dieser Epitop-Mimics eine Bindung eingingen. 90% der CLL-Zellen konnten anhand des Bindungsverhaltens in eine funktionelle Bindungskategorie zugeordnet werden. Im Vergleich zu den mit geringerer Patientenzahl durchgeführten Vorarbeiten nahm die Anzahl der Fälle, die durch ihr Epitoperkennungsmuster noch nicht klassifizierbar waren, also keine gemeinsamen Bindungsmuster mit anderen Fällen hatten, sogar ab. Die einzelnen Kategorien vergrößerten sich durch Erhöhung der Studienpopulation und zudem ließen sich drei neue Kategorien abgrenzen. Wir konnten aus diesen Beobachtungen schlussfolgern, dass unabhängig voneinander entstandene chronisch lymphatische Leukämien Idiotypen auf der Oberfläche der Lymphomzellen tragen, die dasselbe Peptid erkennen, auch wenn diese BZR-Idiotypen unterschiedliche Aminosäuresequenzen in den CDR3 Regionen haben. Dadurch wäre die mögliche Anzahl von Antigenen, die eine Rolle in der Pathogenese der CLL spielen deutlich geringer als angenommen und würde unser Krankheitsverständnis über die CLL stark verändern.

6.3 Korrelation der Epitoperkennungsmuster mit bekannten prognostischen Parametern

Die Morphologie, der Immunphänotyp und die Genexpression der malignen B-CLL Zellen sind relativ homogen, dagegen ist der klinische Verlauf sehr variabel

(Stevenson and Caligaris-Cappio, 2004, Klein and Dalla-Favera, 2005, Ferrarini and Chiorazzi, 2004). Deshalb wurden in den letzten Jahren zahlreiche Studien durchgeführt, in denen die Parameter zur Erstellung von Prognosen für CLL-Patienten untersucht worden sind. Wir untersuchten unsere 100 CLL Patienten anhand von etablierten prognostischen Parametern, um eine Korrelation der Kategorien mit diesen Faktoren herauszufinden.

Zu den klassischen prognostischen Parametern zählt das Alter der Patienten bei Diagnosestellung (Catovsky et al., 1989, Montserrat et al., 1991, Jaksic et al., 1991). Die Inzidenz der CLL nimmt ab dem 5. Lebensjahrzehnt stark zu. Das Durchschnittsalter der Patienten betrug in der hier durchgeführten Studie 61,7 Jahre und lag damit im Vergleich zu epidemiologischen Daten der amerikanischen Surveillance, Epidemiologic and End Results-Datenbank (SEER <http://www.seer.cancer.gov/>), die ein mittleres Alter bei CLL-Diagnose von 72 Jahren angeben, um 10,3 Jahre darunter (National Cancer Institute: SEER Surveillance, 2002-2006). Dieser Unterschied mag zum einen an der vergleichsweise geringen Fallzahl in unserem Kollektiv liegen und möglicherweise auch an dem kontinentalen Unterschied. Eventuell hat auch das besondere Patientenkontext einer Universitätsklinik darauf Einfluss. Außerdem wird die CLL vielleicht in Deutschland aufgrund der unterschiedlichen Gesundheitssysteme früher als in Amerika diagnostiziert. Bei der Untersuchung der Altersverteilung in den einzelnen funktionellen Kategorien konnten wir mehrheitlich keine signifikante Assoziation von Alter und Kategorie feststellen. Allerdings fiel eine Kumulation von unter 50-jährigen Patienten in der Kategorie 2 auf. Die Patienten, die bei Diagnosestellung jünger als 50 Jahre waren, wiesen aber auch vermehrt andere negative prognostische Parameter auf.

Als ein wichtiger prognostischer Faktor gilt der Mutationsstatus der Gene, die für die variable Region der Immunglobuline des BZR codieren. Naive B-Zellen unterlaufen während der ersten Immunreaktionen in den Keimzentren lymphatischer Organe somatische Hypermutationen, die zu einer Umwandlung ihres Antigenrepertoires führt. Anhand des Ausprägungsgrades der Mutationen der schweren variablen Ig-Kette lässt sich die CLL in zwei große Gruppen unterteilen. Patienten, deren leukämische Zellen einen „unmutierten“ (d.h.

weniger als 2,5% veränderte Basen im Vergleich zur Keimbahnsequenz) BZR exprimieren, haben einen rascher progressiven Verlauf der CLL und zeigen ein kürzeres Überleben im Vergleich zu Patienten mit „mutierten“ (d.h. >2,5% Basenveränderungen im Vergleich zur Keimbahnsequenz) Immunglobulinen (Damle et al., 1999, Hamblin et al., 1999, Schroeder and Dighiero, 1994). Im Rahmen der hier dargestellten Studie haben wir die Zellen der CLL-Patienten nach ihrem Bindungsverhalten mit den Epitop-Mimics in funktionelle Kategorien unterteilt. Es wäre zu erwarten gewesen, dass unsere Kategorie 2 aufgrund des schlechteren klinischen Verlaufs der einzelnen Patienten eine Kumulation von unmutierten Ig VH-Genen zeigt. Stattdessen wies die Kategorie 2 ein fast ausgeglichenes Mutationsprofil auf. Es war uns also nicht möglich, den schlechten klinischen Verlauf allein durch den Mutationsstatus zu erklären.

B-Zell-Rezeptoren die auf CLL-Zellen exprimiert werden, zeigen ein für die CLL typisches Immunglobulin-Repertoire (Stamatopoulos et al., 2005, Fais et al., 1998, Ghiotto et al., 2006). Dieses Ig-Repertoire ist für die CLL ein etablierter Parameter, um den klinischen Verlauf vorhersagen zu können. Das Vorhandensein von somatischen Mutationen (s.o.) ist assoziiert mit bestimmten IGV_H Genen. Die Verwendung der Ig-Gene VH1-69 und VH4-39 korrelieren häufig mit einem unmutierten BZR (Johnson et al., 1997, Chiorazzi and Ferrarini, 2003). Hingegen ist die VH-3 Genfamilie oft mit einem mutierten BZR assoziiert. Eine Ausnahme stellt die VH3-21-Genfamilie dar, die unabhängig von dem Mutationszustand des BZR einen rascheren Krankheitsverlauf zeigt (Tobin et al., 2002, Thorselius et al., 2006). Auch die Verteilung der IGV_H Familien in den funktionellen Subgruppen haben wir untersucht und es fiel eine deutliche Häufung der VH3-21 Familie in der Kategorie 2 auf. Es wäre also denkbar gewesen, dass der raschere progressive Krankheitsverlauf dieser Kategorie in der Kumulation der VH3-21 Genfamilie begründet ist. Interessanterweise konnten wir aber in der statistischen Auswertung diese Häufung nicht allein durch die Häufung der VH3-21 Familie erklären, so dass das Epitoperkennungsmuster der Kategorie 2 als unabhängiger prognostischer Marker erhalten bleibt.

Als vierten prognostischen Faktor untersuchten wir die Verteilung der chromosomalen Aberrationen. In der CLL sind fünf chromosomale Aberrationen bekannt, die mit unterschiedlichen Prognosen in Verbindung stehen (Döhner et al., 2000, Juliusson et al., 1990). Am häufigsten ist die Deletion 13q14 vertreten (Fitchett et al., 1987). Die Patienten, die diese Deletion tragen, haben die beste Prognose. Die Trisomie 12 ist die zweithäufigste Aberration und zeigt wechselnde klinische Verläufe (Döhner et al., 2000). Die Deletion 11q23 und die 17p13 sind die am seltensten vorkommenden Aberrationen und sind jeweils mit einer schlechten Prognose assoziiert (Döhner et al., 1995, Döhner et al., 1997). Insgesamt zeigte unsere Studienpopulation eine Verteilung der chromosomalen Aberrationen, die auch mit anderen Studien zu vergleichen ist (Döhner et al., 2000). Die Kategorie 2 weist einen hohen Anteil von 13q14 Deletion (46,2%) und Patienten ohne chromosomale Aberrationen (38,5%) auf. Die Kategorie 2 beinhaltet nur einen Patienten mit einer 17p Deletion, die für einen schlechten klinischen Verlauf sprechen würde. Die Häufigkeit dieses prognostischen Markers erklärt somit nicht den Krankheitsverlauf der Kategorie 2.

Zusammenfassend ist somit festzustellen, dass der raschere progressive Krankheitsverlauf der Kategorie 2 mit den bislang bekannten prognostischen Markern nicht eindeutig zu erklären ist.

6.4 Prognostische Bedeutung des Epitoperkennungsmusters

Kürzlich durchgeführte Studien haben gezeigt, dass der variable klinische Verlauf von CLL-Patienten eng mit bestimmten Eigenschaften des BZR zusammenhängt. Der klinische Verlauf der CLL ist sehr unterschiedlich, die Zeit bis zu ersten Therapiemaßnahmen kann Monate aber auch viele Jahre betragen. Etwa ein Drittel der Patienten benötigt nie eine Behandlung und hat ein langes Überleben, etwa ein Drittel hat lange einen indolenten Verlauf mit anschließendem progressivem Verlauf und etwa ein Drittel zeigt einen aggressiven Verlauf und benötigt kurzfristig die ersten Therapiemaßnahmen (Dighiero, 2003). Die etablierten Klassifikationen nach Rai et al. (Rai et al., 1975) und Binet et al. (Binet et al., 1981) reichen nicht aus, um vorhersagen zu

können, welche Patienten, die einen indolenten Verlauf haben, ein progressives Fortschreiten der Erkrankung bekommen werden (Dighiero et al., 1998).

Nachdem wir anhand des Epitoperkennungsmusters die CLL Patienten in funktionelle Kategorien klassifizieren konnten, wollten wir die prognostische Bedeutung der Kategorien näher untersuchen. Um die klinische Signifikanz der Zugehörigkeit zu den funktionellen Kategorien zu bestimmen, evaluierten wir einen in der CLL etablierten prognostischen Parameter, den Zeitraum zwischen Diagnosestellung und der ersten Therapiemaßnahme (TTFT). Die Kategorien 2, 9 und 13 unterschieden sich von den anderen funktionellen Kategorien durch ihr multireaktives Bindungsverhalten. Wir fanden in unseren Untersuchungen heraus, dass die Zugehörigkeit der CLL-Patienten zu den Kategorien 2, 9 und 13 mit einem schlechteren klinischen Verlauf im Vergleich zur Kontrollgruppe korrelierten. Diese Beobachtung wurde dadurch bekräftigt, dass der progressivere Krankheitsverlauf der Kategorie 2 statistisch unabhängig von bekannten prognostischen Parametern wie dem Mutationsstatus und Immunglobulinen-Repertoire war. In dieser Studie war es uns möglich zu zeigen, dass das Epitoperkennungsmuster einen unabhängigen Faktor für den klinischen Verlauf der CLL-Patienten darstellt. Dabei sind die Gesamtgröße und die Patientenanzahl unserer multireaktiven Kategorien durchaus vergleichbar mit bereits durchgeführten Untersuchungen an bestimmten der o.g. stereotypen „Subsets“ hinsichtlich der klinischen Bedeutung (Thorselius et al., 2006, Capello et al., 2004).

Es ist bekannt, dass die Signalvermittlung des BZR eine wichtige Rolle in Funktion und Überleben einer B-Zelle spielt (Lam et al., 1997, Meffre and Nussenzweig, 2002, Niiro and Clark, 2002). Für maligne Lymphomzellen wird die Expression dieses membrangebundenen Immunglobulins inzwischen für essentiell gehalten (Kuppers, 2005, Meeker et al., 1985). Gerade für die Pathogenese der CLL wird vermutet, dass der BZR und damit die Antigenerkennung durch die Lymphomzelle für Überleben und Proliferation bedeutsam ist und so zum pathogenetischen Geschehen der Erkrankung wesentlich beiträgt („antigenic-drive“ Theorie). Durch unser Verfahren, war es uns möglich mit den aus randomisierten Phagen-Peptidbanken Liganden zu isolieren, die spezifisch an die antigenbindende Region eines rekombinanten B-

Zell-Rezeptor banden, indem sie strukturell das Epitop nachahmten. Dass diese Einteilung nach dem multireaktiven Epitoperkennungsmuster durch die CLL-B-Zell-Rezeptoren nicht nur eine Begleiterscheinung ist, sondern auch mit der Pathogenese der CLL korreliert, konnten wir anhand unserer multireaktiven Kategorien zeigen, die sich gegenüber dem Gesamtkollektiv durch einen deutlich aggressiveren Verlauf auszeichnen. In diesem Zusammenhang ist es interessant, die Signalwege des BZR bei Antigen- bzw. Epitopbindung genauer zu betrachten. Ein möglicher Erklärungsansatz verfolgt dabei die Unterschiede in den Signalwegen des BZR von Lymphomzellen zu normalen B-Zellen. Der BZR von naiven B-Zellen in der Milz oder in Lymphknoten wird durch Antigenbindung aktiviert. Der BZR besteht aus zwei kovalent verknüpften schweren Ig-Ketten, zwei kovalent verknüpften leichten Ketten, sowie den nicht kovalent assoziierten Transmembranmolekülen $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ (CD79a und CD79b), die für die Verknüpfung des BZR mit intrazellulären Signalmolekülen sorgen. Durch die Antigenerkennung wird der Antigen-Rezeptorkomplex aggregiert und die Tyrosinkinase aktiviert, wodurch die Signalproteine des BZR phosphoryliert und somit aktiviert werden. Die Aktivierung des BZR kann die B-Zellproliferation, das Überleben, die Differenzierung, die Anergie und die Apoptose triggern (Niiro and Clark, 2002). Wir wissen mittlerweile, dass eine anhaltende Aktivierung von bestimmten Signalmolekülen wie der Proteinkinase B (AKT) und der extrazellulär Signal-regulierte Kinase (ERK), das Überleben von CLL B-Zell Klone verlängern kann, indem wichtige antiapoptotische Proteine hochreguliert werden (Petlickovski et al., 2005, Deglesne et al., 2006, Kitada et al., 1998, Stevenson and Caligaris-Cappio, 2004, Niiro and Clark, 2002). Es ist denkbar, dass CLL-Zellen durch diese Aktivierung der Signalkaskade eine längere Überlebenszeit gewinnen (Mockridge et al., 2007, Lanham et al., 2003, Zupo et al., 1996). Diese Signalwege können durch bestimmte Eigenschaften des Rezeptors selbst oder durch externe Stimulation wie multiple Antigen-Interaktionen aktiviert werden (Muzio et al., 2008, Guarini et al., 2008, Lanham et al., 2003). Es ist denkbar, dass B-Zell-Rezeptoren, die durch unterschiedliche Antigene stimuliert worden sind, eher zu einer anhaltenden Aktivierung der Signalwege führen und somit die Lymphomzellen länger überleben und folglich auch gegenüber etablierten Chemotherapeutika

resistenter sein können (Kitada et al., 1998). Übertragen auf unsere Arbeit würde dies bedeuten, dass variable Epitopbindungen an den BZR der CLL-Patienten aus unseren multireaktiven Kategorien (Kategorie 2,9 und 13) den aggressiveren Krankheitsverlauf verursachen, indem die Signalwege länger anhaltend aktiviert werden und das Überleben der Lymphomzelle sichern. Diese Form der Signalaktivierung würde auch erklären, weshalb der aggressivere Krankheitsverlauf unserer Kategorie 2 unabhängig von bislang etablierten prognostischen Markern ist. In einem Review kamen Efremov et al. zu dem Schluss, dass CLL-Zellen mit einem unmutierten BZR möglicherweise T-Zell unabhängig Antigene erkennen (Efremov et al., 2007). Diese unmutierten BZR induzieren eine langanhaltende Stimulation der Signalwege, die ein Überleben der Lymphomzellen fördern. Hingegen haben CLL B-Zellen vom mutierten Typ eher eine chronische Antigenstimulation durch lösliche Autoantigene erfahren, wodurch diese Zellen dann in einen anergen Zustand geraten (Efremov et al., 2007). Die Konstellation des Mutationsprofils unserer Kategorien (Kategorie 2,9 und 13), die ein multireaktives Epitoperkennungsmuster zeigten, würden dieser Schlussfolgerung allerdings widersprechen, da diese Kategorie aus mutierten wie unmutierten BZR bestehen. Allerdings zeigen die CLL-Zellen, die einen mutierten BZR aufweisen, in allen bis auf einem Fall eine gleichzeitige Expression der VH3-21, bei der die Prognose unabhängig vom Mutationsstatus ungünstig ist (Thorselius et al., 2006, Tobin et al., 2003, Tobin et al., 2002). Darüber hinaus zeigen sie ein unterschiedlich starkes Bindungsverhalten, wenn auch immer multireaktiv (Tabelle 4). Es wäre also denkbar, dass sie sich nur im Hinblick auf die Stärke der Signalaktivität des BZR unterscheiden. Ein weiterer interessanter Aspekt kommt durch die Arbeitsgruppe von Messmer et al., die bei der Bildung von Gruppen allein durch ähnliche oder identische IGV_H Sequenzen zu bedenken geben, dass die Antigenpezifität durch die Antikörperstruktur nicht nur durch die Sequenz gegeben ist (Messmer et al., 2009). So ist es möglich, dass unterschiedliche IGV_H Sequenzen für Antikörper codieren, die dasselbe Antigen erkennen (Messmer et al., 1999). Auf die Ergebnisse der Epitoperkennungsmuster unserer Studie übertragen bedeutet dies, dass die multireaktiven Gruppen, sich zwar in der Aminosäuresequenz der IGV_H-Ketten

und dem Mutationsstatus teilweise unterscheiden, aber möglicherweise dieselbe Tertiärstruktur besitzen und somit dasselbe Epitop erkennen können. Diese Betrachtungsweise könnte auch die heterogene Zusammensetzung unserer multireaktiven Kategorie, hinsichtlich von etablierten Parametern (Mutationsstatus, IGV_H-Sequenz), erklären. Abschließend ist also festzustellen, dass unsere Studie die Hypothese stärkt, dass der funktionelle Status des BZR und das Epitoperkennungsmuster den Krankheitsverlauf der CLL bestimmen. Über welchen Mechanismus die CLL-Zellen in diesen Zustand gelangen, ob durch eine bestimmte CDR3 Aminosäuresequenz, durch Mutationen oder durch spezifische IGV_H-Gene, spielt dann möglicherweise für die Progression der Erkrankung eine untergeordnete Rolle.

6.5 Perspektiven

In dieser Studie war es uns möglich, zufällig ausgewählte CLL-Patienten anhand des Epitoperkennungsmusters in Kategorien zu klassifizieren. Darüber hinaus konnten wir dem multireaktiven Bindungsmuster eine klinische Signifikanz zuweisen.

Für die Zukunft wäre es von großem Interesse, weitere Epitop-Mimics von anderen CLL-Patienten herzustellen und diese dann zunächst auf das bestehende Kollektiv zu untersuchen. Im weiteren Verlauf könnten dann die erweiterten Epitop-Mimics auch anhand eines vergrößerten Patientenkollektivs untersucht werden.

Durch unsere gewonnenen Daten wäre eine Einteilung der CLL-Patienten in funktionelle Kategorien anhand des Bindungsmusters denkbar. Es wäre sinnvoll, wenn in Zukunft die prognostische Einteilung der CLL-Patienten mittels einer Klassifikation in Kategorien, wie sie hier vorgestellt sind, erweitert würden und so der funktionell-biologische Gesichtspunkt in der Klassifikation der CLL berücksichtigt werden würde. Für die klinische Bewertung einer solchen funktionellen Klassifikation der klinischen Signifikanz wäre es unabdingbar, eine große Multicenter-Analyse durchzuführen, um eine sichere Beurteilung der Bedeutung der Kategorienbildung gewährleisten zu können.

Die heterogene Zusammensetzung hinsichtlich des Mutationsstatus der multireaktiven Kategorien (Kategorie 2,9 und 13) ist vielleicht auch mit einer unterschiedlichen Signalaktivität des jeweiligen BZR verbunden. Deshalb wäre es von Interesse, in weiteren Studien die Signalwege der B-Zell-Rezeptoren der CLL-Patienten mit einem multireaktiven Epitoperkennungsmuster zu untersuchen. Das Epitoperkennungsmuster zeigt auch, dass die BZR trotz unterschiedlicher Aminosäuresequenz in der CDR3 Region dasselbe Peptid erkennen. Wenn man dies auf die „antigenic-drive“ Hypothese überträgt, wäre die potentielle Anzahl von Antigenen, die eine Rolle in der Krankheitsentstehung spielen deutlich geringer als vermutet. Eine Antigenidentifikation wäre durch diese Einschränkung eventuell leichter möglich und könnte die tatsächliche Rolle von Antigenen in der Pathogenese erläutern. Würde sich bei der Identifikation der Antigene ein Zusammenhang mit einem bestimmten Erreger herausstellen, ähnlich wie es bei den MALT (mucosa associated lymphoid tissue)-Lymphomen des Gastrointestinaltraktes und dem Bakterium *Helicobacter pylori* der Fall ist, könnte dies einen neuen Ansatz in der Therapie der CLL ermöglichen.

In der Onkologie besteht ein besonders großes Interesse an der zielgerichteten Behandlung, der so genannten Targeted-Therapie; das gilt auch für die CLL. Solch eine zielgerichtete Therapie war zwar vor Entdeckung der funktionellen Kategorien in der CLL mittels monoklonaler Antikörper wie Rituximab oder Alemtuzumab schon durchführbar, aber eine absolut tumorspezifische Targeted-Therapie über den individuellen BZR schwer vorstellbar, denn es hätte für jeden Patienten eine individuell hergestellte tumorspezifische Therapie produziert werden müssen. Die hier beschriebene Entdeckung der funktionellen Kategorienbildung in der CLL könnte eine Targeted-Therapie innerhalb einer Kategorie ermöglichen. Die von uns selektierten Peptide könnten die Voraussetzung für eine solche Targeted-Therapie bieten. Nach unseren Erkenntnissen wäre eine BZR-gerichtete Therapie aktuell am besten für die Patienten mit einem multireaktiven Bindungsmuster durchführbar und somit für immerhin 18% der CLL-Patienten. Nimmt man noch die große Kategorie 1, die ein monoreaktives Bindungsmuster zeigte hinzu, erweitert sich die Anzahl der möglichen CLL-Patienten für solch eine zielgerichtete Therapie auf 42%.

Gleichzeitig würde diese Therapie vor allem den Patienten zu Gute kommen, die einen aggressiven Krankheitsverlauf zeigen. Die Zellen aller 100 CLL-Patienten sind eine Bindung mit dem exprimierten Epitop-Mimic für den Fab 1 eingegangen. Dies bedeutet, dass mit einer Targeted-Therapie für dieses Epitop alle Patienten getroffen werden könnten, wenn auch mit einer geringen Affinität. Die Therapie wäre spezifisch auf den BZR gerichtet und die Lymphomzellen würden so getötet bzw. das Wachstum der Lymphomzellen gehemmt werden. Als zielgerichtete Behandlung wäre sie vermutlich auch nebenwirkungsarmer als die bisherigen Therapiemöglichkeiten für CLL Patienten. Diese Therapieoption würde neue Wege in der Behandlung von der CLL ermöglichen.

7 Zusammenfassung

Bei der chronisch lymphatischen Leukämie existieren bei mindestens 26% der Patienten in der antigenbindenden Region des B-Zell-Rezeptors (BZR), insbesondere in der CDR3 Region der schweren Kette, starke Übereinstimmungen dieser Region innerhalb abgrenzbarer Subsets von Patienten. Diese Homologien führten zu der Hypothese, dass es eine Gruppe von Antigenen gibt, die durch die BZR der CLL erkannt werden und so zu deren Überleben und Proliferation entscheidend beitragen. Bislang war es aber nicht möglich, bestimmte Antigene in direkten Zusammenhang mit der Pathogenese der CLL zu bringen. Es konnte in unserer Arbeitsgruppe ein Verfahren etabliert werden, mit dem aus randomisierten Phagen-Peptidbanken Liganden isoliert werden, die spezifisch an die antigenbindende Region eines rekombinanten BZR der CLL binden, indem sie strukturell das Epitop nachahmen (Epitop-Mimics).

In dieser Arbeit wollten wir das Verständnis des B-Zellrezeptors und seine Funktion in der CLL vertiefen und so die Pathogenese der Krankheit erläutern. Anhand des Bindungsverhaltens der B-Zell-Rezeptoren auf CLL-Zellen mit den Epitop-Mimics, konnten Patienten in Kategorien klassifiziert werden. Wir überprüften, ob die gefundenen BZR-Epitoperkennungsmuster auch an einem größeren Patientenkollektiv verifiziert werden können. Darüber hinaus wollten wir untersuchen, ob die Zugehörigkeit zu bestimmten Kategorien mit identischem Epitoperkennungsmuster mit bekannten prognostischen Parametern korreliert.

In der vorliegenden Arbeit stellten wir fest, dass CLL-Zellen unterschiedlicher Patienten dasselbe Epitop erkennen können, obwohl sie sich in der Sequenz der CDR3 Region ihres BZR unterscheiden. Es war uns möglich, die CLL-Zellen von zufällig ausgewählten 100 CLL-Patienten hinsichtlich ihres Interaktionsmusters mit den sechs verschiedenen Epitopen, in siebzehn Kategorien mit identischem Epitoperkennungsmuster zu kategorisieren. Im weiteren Verlauf konnten wir für die Kategorien, die ein multireaktives

Bindungsverhalten zeigten, eine Korrelation des Bindungsmusters mit dem klinischen Verlauf nachweisen. So zeigten Patienten, die einer Kategorie angehörten, die fünf oder sechs Epitope erkannten, einen deutlich rascheren Krankheitsverlauf gegenüber der Kontrollgruppe. Die prognostische Bedeutung dieses Epitoperkennungsmusters war unabhängig von anderen bereits bekannten prognostischen Parametern wie dem IGV_H-Mutationsstatus und der verwendeten Ig-Genfamilie. Die Epitop-Interaktionsmuster geben auch einen Hinweis darauf, dass falls Antigene eine Rolle in der Biologie der CLL spielen, die Anzahl möglicher Antigene deutlich geringer ist, als erwartet. Schlussfolgernd lässt sich bemerken, dass der funktionelle Status des BZR und sein Epitoperkennungsmuster in bedeutsamer Weise den Krankheitsverlauf der CLL bestimmen. Daher sollte das Epitoperkennungsmuster in Zukunft bei der prognostischen Abschätzung von CLL-Patienten berücksichtigt und in zukünftige Modelle zur Krankheitsverlaufsabschätzung einbezogen werden.

8 Abkürzungsverzeichnis

AKT	Proteinkinase B
BRASIL	Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands
BZR	B-Zell-Rezeptor
CDR	complementarity determining region
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	extrazellulär Signal-regulierte Kinase
Fab	Antigenbindendes Fragment
Fc	konstantes Antikörperfragment
FCS	Fetales Kälberserum
Ig	Immunglobulin
IGV _H	variable schwere Immunglobulinkette
M	mutiert
MS	Mutationsstatus
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rpm	Rotation pro Minute
RT	Raumtemperatur
SYK	spleen tyrosine kinase
TTFT	Time to first treatment
UM	unmutiert

9 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

<i>Tabelle 1: Prognoseabschätzung anhand der Stadieneinteilung nach Binet (Binet et al., 1981, Binet et al., 1977) und Rai (Rai and Montserrat, 1987, Rai et al., 1975)</i>	<i>8</i>
<i>Tabelle 2: Primersequenzen</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 3: verwendete Phagenklone</i>	<i>34</i>
<i>Tabelle 4: Epitoperkennungsmuster des Gesamtkollektivs*</i>	<i>42</i>
<i>Tabelle 5: Epitop-Mimic-Phagenbindung an nicht-CLL Kontrollen</i>	<i>43</i>
<i>Tabelle 6 : Übersicht über die vertretenen Subsets und deren absoluten und relativen Häufigkeiten in den Epitopbindungskategorien (Tabelle 4)</i>	<i>44</i>
<i>Tabelle 7: Vorkommen von chromosomalen Aberration bei den CLL-Patienten der untersuchten Kohorte.....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 1: Häufigkeiten von stereotypen HCDR-3 Regionen bei Verwendung bestimmter IGV_H Gene in CLL-Zellen (Stamatopoulos et al., 2007)</i>	<i>14</i>
<i>Abbildung 2: Schematische Darstellung des Biopanning Vorganges.....</i>	<i>16</i>
<i>Abbildung 3: Schematische Darstellung eines fd-Phagen mit den verschiedenen Oberflächenproteinen (Arap, 2005).....</i>	<i>17</i>
<i>Abbildung 4: Altersverteilung in den unterschiedlichen Gruppen</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 5: Verteilung der chromosomalen Aberrationen in den einzelnen Kategorien</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 6: Häufigkeitsverteilung der IGV_H Genfamilien</i>	<i>48</i>
<i>Abbildung 7: Häufigkeit der Subklassen in den Genfamilien VH3, VH1 und VH4 in der Gesamtkohorte der 100 CLL-Patienten.....</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 8: Verteilung der VH Familien in den einzelnen Bindungskategorien</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 9: Vergleich der chromosomalen Aberrationen der Kategorie 2 mit der Kontrollgruppe</i>	<i>51</i>
<i>Abbildung 10: Vergleich der Frequenzen der Immunglobulingenfamilien in der Kategorie 2 und der Kontrollgruppe.....</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 11: Aufteilung der VH3-Familien in der Kontrollgruppe (a) und der Kategorie 2 (b) .</i>	<i>53</i>
<i>Abbildung 12: Kaplan-Meier Kurve zur Darstellung der time to first treatment (TTFT).....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 13: Kaplan-Meier Kurve zur Darstellung der time to first treatment (TTFT). Vergleich der multireaktiven Gruppe mit der Kontrollgruppe (CLL-Zellen, die an fünf oder sechs Epitop-Mimics banden, im Vergleich zu den Fällen, die an weniger Epitop-Mimics (1-4) banden).....</i>	<i>56</i>

10 Literaturverzeichnis

- ARAP, M. (2005) Phage display technology - Applications and Innovations. *Genetics and Molecular Biology*, 1-9.
- BINET, J. L., AUQUIER, A., DIGHIERO, G., CHASTANG, C., PIGUET, H., GOASGUEN, J., VAUGIER, G., POTRON, G., COLONA, P., OBERLING, F., THOMAS, M., TCHERNIA, G., JACQUILLAT, C., BOIVIN, P., LESTY, C., DUAULT, M. T., MONCONDUIT, M., BELABBES, S. & GREMY, F. (1981) A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, 48, 198-206.
- BINET, J. L., LEPOPRIER, M., DIGHIERO, G., CHARRON, D., D'ATHIS, P., VAUGIER, G., BERAL, H. M., NATALI, J. C., RAPHAEL, M., NIZET, B. & FOLLEZOU, J. Y. (1977) A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. *Cancer*, 40, 855-64.
- BOMBEN, R., DAL BO, M., CAPELLO, D., FORCONI, F., MAFFEI, R., LAURENTI, L., ROSSI, D., DEL PRINCIPE, M. I., ZUCCHETTO, A., BERTONI, F., ROSSI, F. M., BULIAN, P., CATTAROSSO, I., ILARIUCCI, F., SOZZI, E., SPINA, V., ZUCCA, E., DEGAN, M., LAURIA, F., DEL POETA, G., EFREMOV, D. G., MARASCA, R., GAIDANO, G. & GATTEI, V. (2009) Molecular and clinical features of chronic lymphocytic leukaemia with stereotyped B cell receptors: results from an Italian multicentre study. *Br J Haematol*, 144, 492-506.
- BORCHE, L., LIM, A., BINET, J. L. & DIGHIERO, G. (1990) Evidence that chronic lymphocytic leukemia B lymphocytes are frequently committed to production of natural autoantibodies. *Blood*, 76, 562-9.
- CAPELLO, D., GUARINI, A., BERRA, E., MAURO, F. R., ROSSI, D., GHIA, E., CERRI, M., LOGAN, J., FOA, R. & GAIDANO, G. (2004) Evidence of biased immunoglobulin variable gene usage in highly stable B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 18, 1941-7.
- CATERA, R., SILVERMAN, G. J., HATZI, K., SEILER, T., DIDIER, S., ZHANG, L., HERVE, M., MEFFRE, E., OSCIER, D. G., VLASSARA, H., SCOFIELD, R. H., CHEN, Y., ALLEN, S. L., KOLITZ, J., RAI, K. R., CHU, C. C. & CHIORAZZI, N. (2008) Chronic lymphocytic leukemia cells recognize conserved epitopes associated with apoptosis and oxidation. *Mol Med*, 14, 665-74.
- CATOVSKY, D., FOOKS, J. & RICHARDS, S. (1989) Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. A report from the MRC CLL 1 trial. MRC Working Party on Leukaemia in Adults. *Br J Haematol*, 72, 141-9.
- CHEN, L., WIDHOPF, G., HUYNH, L., RASSENTI, L., RAI, K. R., WEISS, A. & KIPPS, T. J. (2002) Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 100, 4609-14.
- CHIORAZZI, N. & FERRARINI, M. (2003) B cell chronic lymphocytic leukemia: lessons learned from studies of the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol*, 21, 841-94.
- CHIORAZZI, N., RAI, K. R. & FERRARINI, M. (2005) Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 352, 804-15.

- CHU, C. C., CATERA, R., HATZI, K., YAN, X. J., ZHANG, L., WANG, X. B., FALES, H. M., ALLEN, S. L., KOLITZ, J. E., RAI, K. R. & CHIORAZZI, N. (2008) Chronic lymphocytic leukemia antibodies with a common stereotypic rearrangement recognize nonmuscle myosin heavy chain IIA. *Blood*, 112, 5122-9.
- DAMESHEK, W. (1967) Chronic lymphocytic leukemia--an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood*, 29, Suppl:566-84.
- DAMLE, R. N., GHIOTTO, F., VALETTO, A., ALBESIANO, E., FAIS, F., YAN, X. J., SISON, C. P., ALLEN, S. L., KOLITZ, J., SCHULMAN, P., VINCIGUERRA, V. P., BUDDE, P., FREY, J., RAI, K. R., FERRARINI, M. & CHIORAZZI, N. (2002) B-cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated, antigen-experienced B lymphocytes. *Blood*, 99, 4087-93.
- 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, 1840-7.
- DEGLÉSNE, P. A., CHEVALLIER, N., LETESTU, R., BARAN-MARSZAK, F., BEITAR, T., SALANOUBAT, C., SANHES, L., NATAF, J., ROGER, C., VARIN-BLANK, N. & AJCHENBAUM-CYMBALISTA, F. (2006) Survival response to B-cell receptor ligation is restricted to progressive chronic lymphocytic leukemia cells irrespective of Zap70 expression. *Cancer Res*, 66, 7158-66.
- DIGHIERO, G. (2003) Unsolved issues in CLL biology and management. *Leukemia*, 17, 2385-91.
- DIGHIERO, G., MALOUM, K., DESABLENS, B., CAZIN, B., NAVARRO, M., LEBLAY, R., LEPORRIER, M., JAUBERT, J., LEPEU, G., DREYFUS, B., BINET, J. L. & TRAVADE, P. (1998) Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med*, 338, 1506-14.
- DÖHNER, H., FISCHER, K., BENTZ, M., HANSEN, K., BENNER, A., CABOT, G., DIEHL, D., SCHLENK, R., COY, J., STILGENBAUER, S. & ET AL. (1995) p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*, 85, 1580-9.
- 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, 1910-6.
- DÖHNER, H., STILGENBAUER, S., JAMES, M. R., BENNER, A., WEILGUNI, T., BENTZ, M., FISCHER, K., HUNSTEIN, W. & LICHTER, P. (1997) 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*, 89, 2516-22.
- EARLY, P., HUANG, H., DAVIS, M., CALAME, K. & HOOD, L. (1980) An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: VH, D and JH. *Cell*, 19, 981-92.
- EFREMOV, D. G., GOBESSI, S. & LONGO, P. G. (2007) Signaling pathways activated by antigen-receptor engagement in chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Autoimmun Rev*, 7, 102-8.

- FAIS, F., GHIOTTO, F., HASHIMOTO, S., SELLARS, B., VALETTO, A., ALLEN, S. L., SCHULMAN, P., VINCIGUERRA, V. P., RAI, K., RASSENTI, L. Z., KIPPS, T. J., DIGHIERO, G., SCHROEDER, H. W., JR., FERRARINI, M. & CHIORAZZI, N. (1998) Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *J Clin Invest*, 102, 1515-25.
- FERRARINI, M. & CHIORAZZI, N. (2004) Recent advances in the molecular biology and immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol*, 41, 207-23.
- FITCHETT, M., GRIFFITHS, M. J., OSCIER, D. G., JOHNSON, S. & SEABRIGHT, M. (1987) Chromosome abnormalities involving band 13q14 in hematologic malignancies. *Cancer Genet Cytogenet*, 24, 143-50.
- GHIOTTO, F., FAIS, F., ALBESIANO, E., SISON, C., VALETTO, A., GAIDANO, G., REINHARDT, J., KOLITZ, J. E., RAI, K., ALLEN, S. L., FERRARINI, M. & CHIORAZZI, N. (2006) Similarities and differences between the light and heavy chain Ig variable region gene repertoires in chronic lymphocytic leukemia. *Mol Med*, 12, 300-8.
- GIORDANO, R. J., CARDO-VILA, M., LAHDENRANTA, J., PASQUALINI, R. & ARAP, W. (2001) Biopanning and rapid analysis of selective interactive ligands. *Nat Med*, 7, 1249-53.
- GUARINI, A., CHIARETTI, S., TAVOLARO, S., MAGGIO, R., PERAGINE, N., CITARELLA, F., RICCIARDI, M. R., SANTANGELO, S., MARINELLI, M., DE PROPRI, M. S., MESSINA, M., MAURO, F. R., DEL GIUDICE, I. & FOA, R. (2008) BCR ligation induced by IgM stimulation results in gene expression and functional changes only in IgV H unmutated chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Blood*, 112, 782-92.
- HADZIDIMITRIOU, A., DARZENTAS, N., MURRAY, F., SMILEVSKA, T., ARVANITI, E., TRESOLDI, C., TSAFTARIS, A., LAOUTARIS, N., ANAGNOSTOPOULOS, A., DAVI, F., GHIA, P., ROSENQUIST, R., STAMATOPOULOS, K. & BELESSI, C. (2009) Evidence for the significant role of immunoglobulin light chains in antigen recognition and selection in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 113, 403-11.
- HALLEK, M., BERGMANN, M. & EMMERICH, B. (2002) Chronische lymphatische Leukämie. *Dtsch Arztebl*, 99, 1294-1301.
- HALLEK, M., CHESON, B. D., CATOVSKY, D., CALIGARIS-CAPPIO, F., DIGHIERO, G., DÖHNER, H., HILLMEN, P., KEATING, M. J., MONTSERRAT, E., RAI, K. R. & KIPPS, T. J. (2008) Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, 111, 5446-56.
- HALLEK, M., KUHN-HALLEK, I. & EMMERICH, B. (1997) Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 11 Suppl 2, S4-13.
- HAMBLIN, T. J. (2007) Prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*, 20, 455-68.
- HAMBLIN, T. J. (2008) Have we been wrong about ionizing radiation and chronic lymphocytic leukemia? *Leuk Res*, 32, 523-5.
- 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 leukemia. *Blood*, 94, 1848-54.

- HARRIS, N. L., JAFFE, E. S., DIEBOLD, J., FLANDRIN, G., MULLER-HERMELINK, H. K., VARDIMAN, J., LISTER, T. A. & BLOOMFIELD, C. D. (1999) World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol*, 17, 3835-49.
- HERVE, M., XU, K., NG, Y. S., WARDEMAN, H., ALBESIANO, E., MESSMER, B. T., CHIORAZZI, N. & MEFFRE, E. (2005) Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *J Clin Invest*, 115, 1636-43.
- JAFFE, E., HARRIS, N., STEIN, H. & VARDIMAN, J. (2001) *World Health Organization Classification of Tumors Pathology and Genetics of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*, Lyon, IARC Press.
- JAKSIC, B., VITALE, B., HAUPTMANN, E., PLANINC-PERAICA, A., OSTOJIC, S. & KUSEC, R. (1991) The roles of age and sex in the prognosis of chronic leukaemias. A study of 373 cases. *Br J Cancer*, 64, 345-8.
- JOHNSON, T. A., RASSENTI, L. Z. & KIPPS, T. J. (1997) Ig VH1 genes expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia exhibit distinctive molecular features. *J Immunol*, 158, 235-46.
- 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, 720-4.
- KEATING, M. J., O'BRIEN, S., LERNER, S., KOLLER, C., BERAN, M., ROBERTSON, L. E., FREIREICH, E. J., ESTEY, E. & KANTARJIAN, H. (1998) Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood*, 92, 1165-71.
- KITADA, S., ANDERSEN, J., AKAR, S., ZAPATA, J. M., TAKAYAMA, S., KRAJEWSKI, S., WANG, H. G., ZHANG, X., BULLRICH, F., CROCE, C. M., RAI, K., HINES, J. & REED, J. C. (1998) Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses. *Blood*, 91, 3379-89.
- KLEIN, U. & DALLA-FAVERA, R. (2005) New insights into the phenotype and cell derivation of B cell chronic lymphocytic leukemia. *Curr Top Microbiol Immunol*, 294, 31-49.
- KLEIN, U., TU, Y., STOLOVITZKY, G. A., MATTIOLI, M., CATTORETTI, G., HUSSON, H., FREEDMAN, A., INGHIRAMI, G., CRO, L., BALDINI, L., NERI, A., CALIFANO, A. & DALLA-FAVERA, R. (2001) Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*, 194, 1625-38.
- KUPPERS, R. (2005) Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*, 5, 251-62.
- LAM, K. P., KUHN, R. & RAJEWSKY, K. (1997) In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell*, 90, 1073-83.
- LANEMO MYHRINDER, A., HELLQVIST, E., SIDOROVA, E., SODERBERG, A., BAXENDALE, H., DAHLE, C., WILLANDER, K., TOBIN, G., BACKMAN, E., SODERBERG, O., ROSENQUIST, R., HORKKO, S. & ROSEN, A. (2008) A new perspective: molecular motifs on oxidized LDL, apoptotic cells, and

- bacteria are targets for chronic lymphocytic leukemia antibodies. *Blood*, 111, 3838-48.
- LANHAM, S., HAMBLIN, T., OSCIER, D., IBBOTSON, R., STEVENSON, F. & PACKHAM, G. (2003) Differential signaling via surface IgM is associated with VH gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 101, 1087-93.
- LEFRANC, M. P. (1999) IMGT the international ImMunoGeneTics information system. [<http://imgt.cines.fr/>], URL:[12.08.2008, 15:08 Uhr].
- LEFRANC, M. P., GIUDICELLI, V., GINESTOUX, C., BODMER, J., MULLER, W., BONTROP, R., LEMAITRE, M., MALIK, A., BARBIE, V. & CHAUME, D. (1999) IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res*, 27, 209-12.
- MANN, D. L., DESANTIS, P., MARK, G., PFEIFER, A., NEWMAN, M., GIBBS, N., POPOVIC, M., SARNGADHARAN, M. G., GALLO, R. C., CLARK, J. & ET AL. (1987) HTLV-I-associated B-cell CLL: indirect role for retrovirus in leukemogenesis. *Science*, 236, 1103-6.
- MEEKER, T., LOWDER, J., CLEARY, M. L., STEWART, S., WARNKE, R., SKLAR, J. & LEVY, R. (1985) Emergence of idiotype variants during treatment of B-cell lymphoma with anti-idiotype antibodies. *N Engl J Med*, 312, 1658-65.
- MEFFRE, E. & NUSSENZWEIG, M. C. (2002) Deletion of immunoglobulin beta in developing B cells leads to cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 11334-9.
- MESSMER, B. T., ALBESIANO, E., EFREMOV, D. G., GHIOTTO, F., ALLEN, S. L., KOLITZ, J., FOA, R., DAMLE, R. N., FAIS, F., MESSMER, D., RAI, K. R., FERRARINI, M. & CHIORAZZI, N. (2004a) Multiple distinct sets of stereotyped antigen receptors indicate a role for antigen in promoting chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*, 200, 519-25.
- MESSMER, B. T., ALBESIANO, E., MESSMER, D. & CHIORAZZI, N. (2004b) The pattern and distribution of immunoglobulin VH gene mutations in chronic lymphocytic leukemia B cells are consistent with the canonical somatic hypermutation process. *Blood*, 103, 3490-5.
- MESSMER, B. T., RAPHAEL, B. J., AERNI, S. J., WIDHOPF, G. F., RASSENTI, L. Z., GRIBBEN, J. G., KAY, N. E. & KIPPS, T. J. (2009) Computational identification of CDR3 sequence archetypes among immunoglobulin sequences in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*, 33, 368-76.
- MESSMER, B. T., SULLIVAN, J. J., CHIORAZZI, N., RODMAN, T. C. & THALER, D. S. (1999) Two human neonatal IgM antibodies encoded by different variable-region genes bind the same linear peptide: evidence for a stereotyped repertoire of epitope recognition. *J Immunol*, 162, 2184-92.
- MOCKRIDGE, C. I., POTTER, K. N., WHEATLEY, I., NEVILLE, L. A., PACKHAM, G. & STEVENSON, F. K. (2007) Reversible anergy of sIgM-mediated signaling in the two subsets of CLL defined by VH-gene mutational status. *Blood*, 109, 4424-31.
- MONTSERRAT, E., GOMIS, F., VALLESPI, T., RIOS, A., ROMERO, A., SOLER, J., ALCALA, A., MOREY, M., FERRAN, C., DIAZ-MEDIAVILLA, J. & ET AL. (1991) Presenting features and prognosis of chronic lymphocytic leukemia in younger adults. *Blood*, 78, 1545-51.
- MURRAY, F., DARZENTAS, N., HADZIDIMITRIOU, A., TOBIN, G., BOUDJOGRA, M., SCIELZO, C., LAOUTARIS, N., KARLSSON, K., BARAN-MARZSAK, F., TSAFTARIS, A., MORENO, C., ANAGNOSTOPOULOS, A., CALIGARIS-

- CAPPIO, F., VAUR, D., OUZOUNIS, C., BELESSI, C., GHIA, P., DAVI, F., ROSENQUIST, R. & STAMATOPOULOS, K. (2008) Stereotyped patterns of somatic hypermutation in subsets of patients with chronic lymphocytic leukemia: implications for the role of antigen selection in leukemogenesis. *Blood*, 111, 1524-33.
- MUZIO, M., APOLLONIO, B., SCIELZO, C., FRENQUELLI, M., VANDONI, I., BOUSSIOTIS, V., CALIGARIS-CAPPIO, F. & GHIA, P. (2008) Constitutive activation of distinct BCR-signaling pathways in a subset of CLL patients: a molecular signature of anergy. *Blood*, 112, 188-95.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE: SEER SURVEILLANCE, E., AND END RESULTS (2002-2006) SEER Sat Fact Sheet: Chronic lymphocytic leukemia online.[<http://www.seer.cancer.gov/>], URL:[11.08.2009, 13:04Uhr].
- NIIRO, H. & CLARK, E. A. (2002) Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol*, 2, 945-56.
- PETLICKOVSKI, A., LAURENTI, L., LI, X., MARIETTI, S., CHIUSOLO, P., SICA, S., LEONE, G. & EFREMOV, D. G. (2005) Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood*, 105, 4820-7.
- RAI, K. R. & MONTSERRAT, E. (1987) Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Hematol*, 24, 252-6.
- RAI, K. R., SAWITSKY, A., CRONKITE, E. P., CHANANA, A. D., LEVY, R. N. & PASTERNAK, B. S. (1975) Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 46, 219-34.
- REFAELI, Y., YOUNG, R. M., TURNER, B. C., DUDA, J., FIELD, K. A. & BISHOP, J. M. (2008) The B cell antigen receptor and overexpression of MYC can cooperate in the genesis of B cell lymphomas. *PLoS Biol*, 6, e152.
- ROZMAN, C. & MONTSERRAT, E. (1995) Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 333, 1052-7.
- SCHROEDER, H. W., JR. & DIGHIERO, G. (1994) The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. *Immunol Today*, 15, 288-94.
- SMITH, G. P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*, 228, 1315-7.
- SMITH, G. P. & SCOTT, J. K. (1993) Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol*, 217, 228-57.
- STAMATOPOULOS, K., BELESSI, C., HADZIDIMITRIOU, A., SMILEVSKA, T., KALAGIAKOU, E., HATZI, K., STAVROYIANNI, N., ATHANASIADOU, A., TSOMPANAKOU, A., PAPADAKI, T., KOKKINI, G., PATERAKIS, G., SALOUM, R., LAOUTARIS, N., ANAGNOSTOPOULOS, A. & FASSAS, A. (2005) Immunoglobulin light chain repertoire in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 106, 3575-83.
- STAMATOPOULOS, K., BELESSI, C., MORENO, C., BOUDJOGRAH, M., GUIDA, G., SMILEVSKA, T., BELHOUL, L., STELLA, S., STAVROYIANNI, N., CRESPO, M., HADZIDIMITRIOU, A., SUTTON, L., BOSCH, F., LAOUTARIS, N., ANAGNOSTOPOULOS, A., MONTSERRAT, E., FASSAS, A., DIGHIERO, G., CALIGARIS-CAPPIO, F., MERLE-BERAL, H., GHIA, P. & DAVI, F. (2007) Over 20% of patients with chronic lymphocytic leukemia carry stereotyped receptors: Pathogenetic implications and clinical correlations. *Blood*, 109, 259-70.

- STEVENSON, F. K. & CALIGARIS-CAPPIO, F. (2004) Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood*, 103, 4389-95.
- STHOEGER, Z. M., WAKAI, M., TSE, D. B., VINCIGUERRA, V. P., ALLEN, S. L., BUDMAN, D. R., LICHTMAN, S. M., SCHULMAN, P., WEISELBERG, L. R. & CHIORAZZI, N. (1989) Production of autoantibodies by CD5-expressing B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*, 169, 255-68.
- THORSELIUS, M., KROBER, A., MURRAY, F., THUNBERG, U., TOBIN, G., BUHLER, A., KIENLE, D., ALBESIANO, E., MAFFEI, R., DAO-UNG, L. P., WILEY, J., VILPO, J., LAURELL, A., MERUP, M., ROOS, G., KARLSSON, K., CHIORAZZI, N., MARASCA, R., DÖHNER, H., STILGENBAUER, S. & ROSENQUIST, R. (2006) Strikingly homologous immunoglobulin gene rearrangements and poor outcome in VH3-21-using chronic lymphocytic leukemia patients independent of geographic origin and mutational status. *Blood*, 107, 2889-94.
- TOBIN, G., THUNBERG, U., JOHNSON, A., ERIKSSON, I., SODERBERG, O., KARLSSON, K., MERUP, M., JULIUSSON, G., VILPO, J., ENBLAD, G., SUNDSTROM, C., ROOS, G. & ROSENQUIST, R. (2003) Chronic lymphocytic leukemias utilizing the VH3-21 gene display highly restricted Vlambda2-14 gene use and homologous CDR3s: implicating recognition of a common antigen epitope. *Blood*, 101, 4952-7.
- TOBIN, G., THUNBERG, U., JOHNSON, A., THORN, I., SODERBERG, O., HULTDIN, M., BOTLING, J., ENBLAD, G., SALLSTROM, J., SUNDSTROM, C., ROOS, G. & ROSENQUIST, R. (2002) Somatic mutated Ig V(H)3-21 genes characterize a new subset of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 99, 2262-4.
- TREPEL, M., ARAP, W. & PASQUALINI, R. (2002) In vivo phage display and vascular heterogeneity: implications for targeted medicine. *Curr Opin Chem Biol*, 6, 399-404.
- VAN BOCKSTAELE, F., VERHASSELT, B. & PHILIPPE, J. (2009) Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review. *Blood Rev*, 23, 25-47.
- WILHELM, M., TONY, H. P., RUECKLE-LANZ, H. & WILMS, K. (1997) First-line therapy of advanced chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 11 Suppl 2, S14-8.
- XU, J. L. & DAVIS, M. M. (2000) Diversity in the CDR3 region of V(H) is sufficient for most antibody specificities. *Immunity*, 13, 37-45.
- YUILLE, M. R., MATUTES, E., MAROSSY, A., HILDITCH, B., CATOVSKY, D. & HOULSTON, R. S. (2000) Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies. *Br J Haematol*, 109, 794-9.
- ZUPO, S., ISNARDI, L., MEGNA, M., MASSARA, R., MALAVASI, F., DONO, M., COSULICH, E. & FERRARINI, M. (1996) CD38 expression distinguishes two groups of B-cell chronic lymphocytic leukemias with different responses to anti-IgM antibodies and propensity to apoptosis. *Blood*, 88, 1365-74.
- ZWIEBEL, J. A. & CHESON, B. D. (1998) Chronic lymphocytic leukemia: staging and prognostic factors. *Semin Oncol*, 25, 42-59.

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Professor Dr. Martin Trepel für das Thema meiner Doktorarbeit und für die sehr gute Betreuung bedanken. Er hat mir die Möglichkeit zum wissenschaftlichen Arbeiten gegeben und mich während dieser Zeit mit seinen Ideen und der fortwährenden Unterstützung stets voran getrieben.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Betreuerin Dr. Mascha Binder für ihre Geduld, den vielen Erklärungen und für die immerwährende Unterstützung bedanken. Des Weiteren möchte ich mich für die große Hilfsbereitschaft bei Dipl. Johannes Kohlschütter bedanken. Ein weiterer besonderer Dank gilt auch Dr. Tanja Schneider-Merk, die mir durch ihre Erfahrung zur Beendigung dieser Arbeit sehr geholfen hat.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bedanken. Jeder einzelne stand mir immer mit Rat und Tat zur Verfügung und hat mit vielen hilfreichen Ideen zum Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Rezeptortargeting“ an der medizinischen Universitätsklinik Freiburg für die freundliche Überlassung der medizinischen Patientenunterlagen bedanken.

Vielen Dank.

12 Lebenslauf

13 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ort, Datum

Antje Jackst