UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

II. Medizinische Klinik und Poliklinik des Onkologischen Zentrums
am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinikdirektor Prof. Dr. med. C. Bokemeyer

Untersuchungen zur Interaktion von CLL B-Zell-Rezeptoren mit Autoantigenen

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Thomas Dein

aus Hamburg

Hamburg 2013

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 04.02.2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. M. Trepel

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. med. F. Ayuketang

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. med. M. Horstmann

Für meine Eltern und meinen Bruder Jan

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ..... **I**

1 Einleitung **1**

1.1 Chronisch lymphatische Leukämie 1

1.2 B-Zell-Rezeptor 3

1.2.1 Aufbau 3

1.2.2 Der B-Zell-Rezeptor bei der CLL 5

1.3 Ziele dieser Arbeit 7

2 Material und Methoden **9**

2.1 Materialien und Geräte 9

2.1.2 Vektor 9

2.1.3 Zelllinien 11

2.1.4 Medien und Zusätze für die Zellkultur 11

2.1.5 Tissue microarray 12

2.1.6 Gelelektrophorese 12

2.1.7 Immunzytochemie 13

2.1.8 Puffer und Lösungen 13

2.1.9 Chemikalien 14

2.1.10 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien 14

2.1.11 Geräte 15

2.2 Methoden 15

2.2.1 Zellkultur 15

2.2.2 Aufreinigung der Antikörper mittels Affinitätschromatographie 16

2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 17

2.2.4 Färben eines SDS-Gels mit Coomassie-Blau 18

2.2.5 Quantifizierung der Antikörperkonzentration 18

2.2.6 Immunzytochemie der Zelllinien 19

2.2.7 Auswertung der Immunzytochemie der Zelllinien 20

2.2.8 Immunzytochemie der Tissue microarrays 20

3 Ergebnisse **23**

3.1 Basisinformationen zu den CLL-B-Zellrezeptoren 23

3.2 Antikörperaufreinigung 24

3.3 Immunzytochemie 25
3.3.1 Übersicht 25
3.3.2 Methodenetablierung 26
3.3.2.1 Fixierung 26
3.3.2.2 Permeabilisierung 26
3.3.2.3 Konzentrationen des Sekundärantikörpers 27
3.3.2.4 CLL-Antikörper 27
3.3.2.5 Phalloidin 28
3.3.3 Färbemuster der CLL-Antikörper 28
3.3.3.1 Färbemuster von Ig014 29
3.3.3.2 Färbemuster von Ig015 30
3.3.3.3 Färbemuster von Ig022 30
3.3.3.4 Färbemuster von Ig023 31
3.3.3.5 Färbemuster von Ig024 31
3.3.3.6 Färbemuster von Ig025 33
3.3.4 Färbemuster von Rituximab 34
3.3.5 Färbemuster des anti-Vimentin-Antikörpers 35
3.3.6 Färbemuster des Sekundärantikörpers anti-human-IgG 36
3.3.7 Färbemuster der Tissue microarrays 37
4 Diskussion 39
4.1 Übersicht 39
4.2 Kritische Bewertung der Methoden und Ergebnisse 40
4.3 Betrachtung der Ergebnisse im Kontext der Literatur 43
4.4 Perspektiven 45
5 Zusammenfassung 47
6 Abkürzungsverzeichnis 49
7 Literaturverzeichnis 51
8 Danksagung 56
9 Lebenslauf 57
10 Eidesstattliche Erklärung 58

1 Einleitung

1.1 Chronisch lymphatische Leukämie

Die chronisch lymphatische Leukämie (CLL) ist eine niedrigmaligne, leukämisch verlaufende Sonderform der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) mit einer klonalen Expansion von immuninkompetenten, aber in ihrer Lebenszeit verlängerten Lymphozyten. Sie ist mit 25-30% die häufigste Leukämieform der westlichen Welt und zeigt eine mit dem Alter steigende Inzidenz, wobei etwa doppelt so viele Männer wie Frauen erkranken[12]. Mit 97% ist der weit überwiegende Teil auf eine monoklonale B-Zelle (sog. B-CLL) zurückzuführen und die sog. T-CLL macht nur einen geringen Anteil der chronisch lymphatischen Leukämien aus. Ätiologie und Pathogenese sind bis heute weitestgehend ungeklärt; allerdings können genetische Faktoren eine Rolle spielen, da familiäre Häufungen auftreten[50]. Aufgrund des niedrigmalignen, oft langwierigen Verlaufs ist die CLL in früheren klinischen Stadien häufig asymptomatisch und äußert sich erst im weiteren Krankheitsverlauf mit Symptomen wie Infektneigung, Leistungsminderung, geschwollenen Lymphknoten und Nachtschweiß.

Die Diagnose CLL lässt sich in der Regel anhand des Differentialblutbildes und der Immunphänotypisierung stellen. Im peripheren Blut zeigt sich eine Leukozytose mit einer Zunahme kleiner, reif wirkender Lymphozyten[4], die beim Ausstreichen platzen können und dann charakteristische Gumprecht-Kernschatten zeigen (Abb. 1).

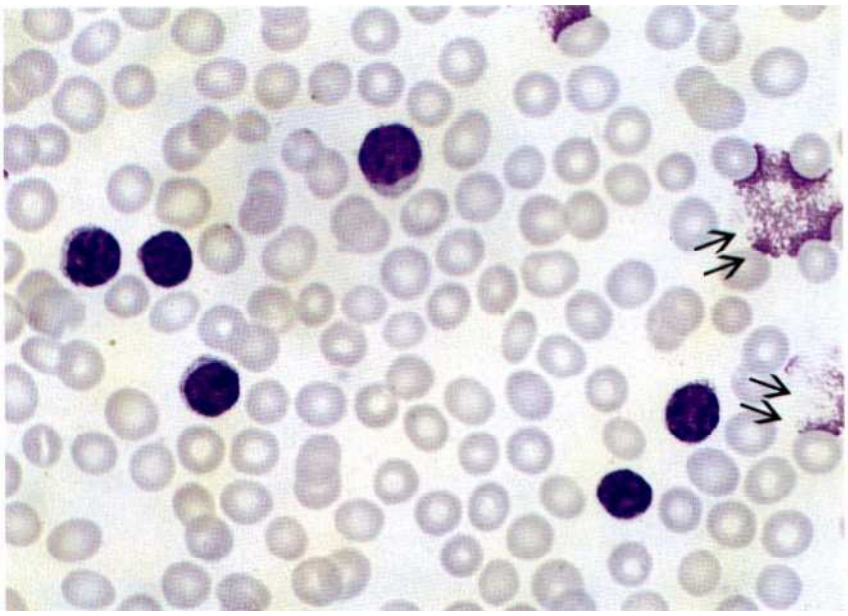


Abbildung 1: Ausstrich des peripheren Blutes (aus Referenz 33). Die mit Pfeilen markierten Strukturen sind sog. Gumprecht-Kernschatten. Sie entstehen beim Ausstreichen durch Platzen der Lymphozyten. Dieses Phänomen ist charakteristisch, aber nicht beweisend für die CLL.

Der Immunphänotypisierung kommt eine entscheidende Rolle in der Diagnostik und der Einschätzung der Prognose der CLL zu. Spezifische Oberflächenantigene (CD5, CD19, CD20, CD23, CD79b) charakterisieren die B-CLL-Lymphozyten und dienen der Diagnosestellung[23].

Trotz großer Fortschritte zum Verständnis der Erkrankung und neuen Therapieansätzen kann die CLL nach wie vor in den allermeisten Fällen nur palliativ therapiert werden. Viele asymptomatische CLL-Patienten werden nach der Diagnosestellung noch nicht behandelt, sondern der Spontanverlauf wird zunächst in engmaschigen Abständen beobachtet („Watchful-Waiting“). Sollte eine Therapie nötig werden, sind die Ziele eine komplette Remission, eine lange progressionsfreie Zeit und eine insgesamt verlängerte Überlebenszeit, wobei die Therapiemöglichkeiten der CLL mannigfaltig sind und verschiedenste Substanzenkombinationen zu Verfügung stehen.

1.2 B-Zell-Rezeptor

1.2.1 Aufbau

Immunglobuline liegen als lösliche Antikörper oder, in membranständiger Form als B-Zell-Rezeptor (BCR) vor und bestehen aus vier Proteinketten. Die zwei identischen leichten Ketten und zwei identischen schweren Ketten sind Y-förmig angeordnet und über Disulfidbrücken miteinander verknüpft (Abb. 2). Die leichten Ketten werden aus je zwei globulären Segmenten gebildet, während die schweren aus je drei (IgG, IgA) bzw. vier (IgM, IgE) Abschnitten bestehen. Diese Segmente liegen in einer Betafaltblattstruktur vor und sind untereinander über sog. „Loops“ verbunden[37] (Abb. 3).

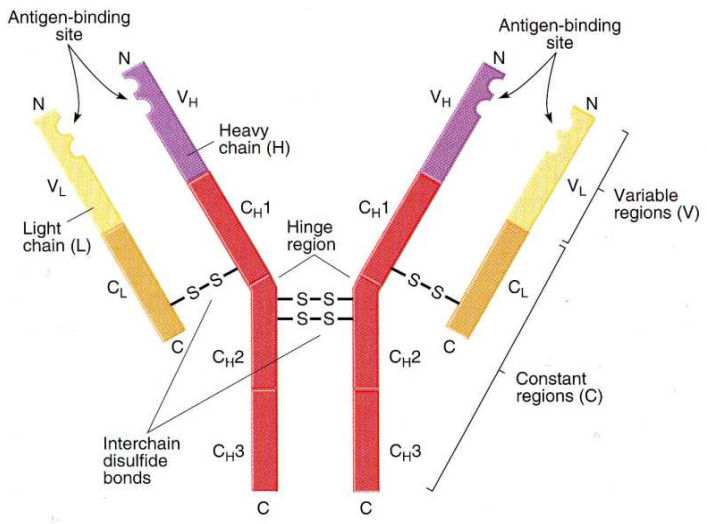


Abbildung 2: Schematischer Aufbau eines Antikörpers (aus Referenz 45). Die leichten Ketten (gelb) bestehen aus je einem variablen (V_L) und einem konstanten Segment (C_L). Die schweren Ketten (rot/violett) haben ebenso je eine variable Region (V_H), aber mehrere konstante Regionen in aufsteigender Nummerierung (C_{H1-3}). Zwischen den einzelnen Segmenten sind die Disulfidbrücken, sowie die „Hinge-Region“ (Gelenk-Region) zwischen C_{H1} und C_{H2} zu erkennen. Die antigenbindende Region ist an V_L und V_H lokalisiert.

Proteolytisch lässt sich der BCR in zwei F_{ab} (Fragment antigen binding) und einen F_c (Fragment crystallizable) spalten. Die F_{ab} bilden sozusagen die Arme der Y-Struktur (bestehend aus V_L, C_L, V_H, C_{H1}) und das F_c den Stamm aus C_{H2-3}. An der Spitze der F_{ab} befinden sich die beiden Antigenbindungsstellen.

Die Zugehörigkeit zum jeweiligen Antikörpersubtyp wird durch die konstante Region der schweren Kette festgelegt. IgG ist über die γ-Kette definiert, IgM über die μ-Kette, IgA über die α-Kette, IgE über die ε-Kette und IgD über die δ-Kette. Bei der leichten Kette wird anhand des konstanten Segments nur zwischen λ- oder κ-Zugehörigkeit unterschieden[14].

Von entscheidender Bedeutung für die Immunantwort ist, dass die Immunglobuline in großer Vielfalt vorliegen, um möglichst viele Antigene erkennen zu können. Das breite Spektrum an unterschiedlichen Antigenbindungseigenschaften wird durch die complementarity determining regions (CDR 1-3) sichergestellt. Diese hypervariablen Regionen bilden durch Faltungen den epitoperkennenden Anteil des antigenbindenden Fragments.

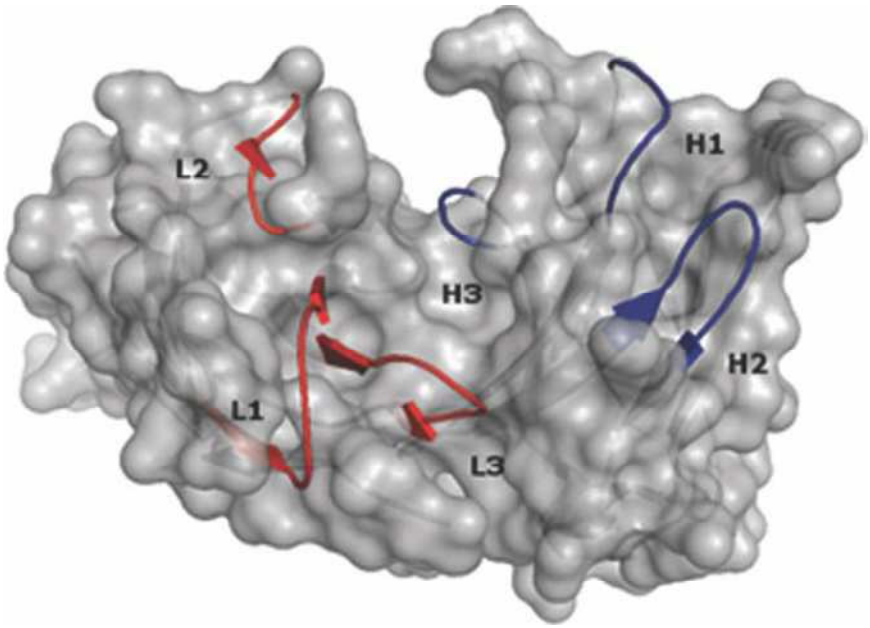


Abbildung 3: Beispielhafte Anordnung der komplementaritätsbestimmenden Regionen (aus Referenz 48). Die CDR der leichten Kette sind in rot hervorgehoben und mit L1-L3 (Light 1-3) nummeriert, die der schweren Kette in blau und bezeichnet mit H1-H3 (Heavy 1-3). Die CDR liegen in Schleifen („loops“) vor und bilden so die variable, antigenbindende Region im engeren Sinne.

Die enorme Vielfalt der variablen Teile der Ketten kommt folgendermaßen zustande: Durch somatische Rekombination der V- (variable)/D- (diversity)/ J- (joining) Gensegmente kann während der Reifung der B-Zellen im Knochenmark

aus einer kleinen Anzahl an Gensegmenten eine große Vielfalt an Genprodukten gewonnen werden. Bei V_L ist die Rekombination der Genabschnitte V/J auf Chromosomen 22 für die λ-Kette und V/J auf Chromosomen 2 für die κ-Kette zuständig. Für V_H kommt noch das D-Gensegment hinzu und die Rekombination erfolgt aus drei Gensegmenten auf Chromosomen 14. Jeder der V-/D-/J-Abschnitte liegt vor der Rekombination in mehreren funktionsfähigen Kopien vor und wird nach dem Zufallsprinzip miteinander kombiniert.

Zusätzlich zur somatischen Rekombination stehen dem Organismus noch andere Möglichkeiten zur Verfügung, um die Vielfalt zu gewährleisten. Die sog. somatische Hypermutation erfolgt in peripheren lymphatischen Organen und beginnt erst mit der antigenvermittelten Aktivierung reifer B-Zellen. Punktmutationen im Genom der B-Zellen führen zur Entstehung von mutierten, und bestenfalls höher affinen, BCR. Der Antikörper mit der höchsten Affinität wird dann selektiert und kloniert. Peripher und nach Antigenaktivierung kann es ebenfalls zum Isotypenwechsel kommen. Aus IgM können durch DNA-Rekombinationen andere Antikörpersubtypen wie IgG oder IgA entstehen, wobei nur die konstante Region verändert wird. Die Antigenspezifität bleibt bei einem Klassenwechsel unverändert, allerdings ändert sich die Effektorfunktion.

Unter Zusammenwirken all dieser Mechanismen steht dem Menschen eine enorme Vielfalt an unterschiedlichen Antikörpern (schätzungsweise 10^8-10^{11}) zur Verfügung[34].

1.2.2 Der B-Zell-Rezeptor bei der CLL

Obwohl die Pathogenese der CLL nicht abschließend erklärt ist, wurde in den letzten Jahren deutlich, dass dem BCR in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle zukommt. Anhand verschiedener den BCR betreffenden Parameter lassen sich Subtypen der Erkrankung unterscheiden, die mit unterschiedlichem Verlauf einhergehen[15].

Es lassen sich CLL-B-Zellen mit mutierten variablen Regionen der schweren Kette des Immunglobulins (M-IGHV) von solchen mit unmutierten Regionen (UM-IGHV) unterscheiden[9,18]. Die Zuweisung zu einer der beiden Subgruppen „unmutiert“

oder „mutiert“ erfolgt in Abhängigkeit der Abweichung der Gene für V_H von der ursprünglichen Keimbahnsequenz. Per definitionem tragen V_H-Sequenzen, die zu über 98% mit den Sequenzen der ursprünglichen Keimbahn übereinstimmen, den Status „unmutiert“, darunter liegende Prozentzahlen den Status „mutiert“[38]. Unmutierte CLL-B-Zellen scheinen gehäuft in Klonen mit langen CDR3-Regionen der leichten und schweren Ketten aufzutreten, die eine gesteigerte Autoreaktivität aufweisen[15,21,32,46]. Auffallend sind auch die unterschiedlichen Telomerlängen und die Differenz der Telomeraseaktivität der unmutierten und mutierten B-CLL-Zellen. Unmutierte weisen kurze Telomere und eine erhöhte Enzymaktivität auf, was jeweils auf eine erhöhte Proliferationsrate zurückzuführen ist[10]. Zusammenfassend könnte man annehmen, dass Vorläuferzellen, die einen unmutierten BCR tragen, durch eine Erweiterung des Erkennungsspektrums einen Vorteil in der antigenspezifischen Stimulation besitzen und es somit wahrscheinlicher zur klonalen Proliferation kommt[35].

Es gibt Hinweise darauf, dass sowohl M-IGHV als auch UM-IGHV von gemeinsamen nativen B-Zell-Vorläufern stammen und im Verlauf unterschiedliche Verwandlungen durchlaufen[19]. Dabei ist es bisher nicht vollständig geklärt, wo und wann die unterschiedliche Prägung stattfindet, aber es wird angenommen, dass die mutierte Form aus einer Gedächtnis-B-Zelle entsteht[25], die eine somatische Hypermutation durchlaufen hat. Die unmutierte Form scheint antigenaktiviert, aber ohne somatische Hypermutation zu verbleiben[31].

Von besonderem Interesse ist, dass sich bei über 20% der CLL-Patienten mit unmutierten IGHV sehr ähnliche Anordnungen der V-, D- und J-Segmente und somit stereotypische BCR finden[44], welche auch ähnliche bzw. gleiche Autoantigene erkennen[19]. Dieser hohe Grad an Übereinstimmung findet sich weder bei der mutierten IGHV-Form, noch wäre er rein statistisch bei M-IGHV oder UM-IGHV zu erwarten.

Eine der Grundlagen dieser Arbeit bildet die Erkenntnis, dass unmutierte BCR häufiger ein polyreaktives Expressionsmuster gegenüber Autoantigenen zeigen. Im Gegensatz hierzu zeigen mutierte BCR eher ein mono- oder oligoreaktives Muster[19]. Die unterschiedliche Reaktivität könnte zum unterschiedlichen Verlauf der Erkrankung beitragen.

Entscheidend ist, dass die BCR-Stereotypie und die Erkenntnis, dass unmutierte CLL-Zellen polyreaktiv Autoantigene erkennen, die These des Antigenic drive unterstützen, wonach CLL-Zellen über ihren B-Zellrezeptor aktiviert und zur Proliferation angeregt werden[50].

Genetische Abweichungen, wie etwa die Deletion 13q14[12], sollen in dieser Arbeit nicht weiter vertieft werden, haben aber ebenfalls großen Einfluss auf Verlauf und Prognose.

1.3 Ziele dieser Arbeit

Es gibt Hinweise darauf, dass das Erkennen und die Interaktion von B-Zell-Rezeptoren und bestimmten Antigenen bzw. deren Epitope einen entscheidenden Anteil an der Pathogenese und dem Verlauf einer CLL haben[2-3,7,19,35,44,50].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist daher die Interaktionen zwischen den B-Zell-Rezeptoren als rekombinante Antikörper von sechs CLL-Patienten und möglichen (Auto-)Antigenen immunhistochemisch zu charakterisieren. Es werden Erkenntnisse zur Interaktion auf zellulärer bzw. subzellulärer Ebene erwartet und es soll untersucht werden, ob nur Strukturen an der Zelloberfläche erkannt werden oder auch intrazelluläre, wie etwa der Nucleus. Des Weiteren soll visualisiert werden, inwiefern sich die Expressionsmuster der einzelnen B-Zell-Rezeptoren verschiedener Patienten gleichen oder unterscheiden.

Zu erwarten ist, dass sich die Färbemuster der BCR, je nach Grad der Autoreaktivität, unterscheiden. Es könnte zu zytoplasmatischen und nukleären Färbungen kommen sowie zu einer Anfärbung beider Kompartimente. Möglicherweise lassen die Expressionsmuster Rückschlüsse auf subzelluläre Strukturen, wie beispielsweise Strukturproteine, zu.

Die Arbeit wurde zu diesem Zweck in zwei Abschnitte unterteilt. Im ersten Abschnitt sollten verschiedene Gewebe auf Tissue microarrays (TMA) mittels Immunhistochemie untersucht werden. In einem zweiten Teil sollten, ebenfalls immunhistochemisch, die Zelllinien M2-10B4, HEp-2, 293T, HeLa und MCF-7 in vitro mit sechs CLL-BCR als rekombinante Antikörper angefärbt werden.

Zur Färbung der TMA wurden chimäre Huhn/Human-Antikörper (Ak) verwendet. So war es möglich, statt eines anti-human-Ak einen anti-Huhn-Ak als Sekundärantikörper zu verwenden und so unspezifische Hintergrundfärbung zu minimieren.

Es sollte das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz in der Zwei-Schritt-Technik angewandt werden[16]. Die rekombinanten BCR der CLL-Patienten fungierten in löslicher Form als primäre Antikörper und wurden mit einem Sekundärantikörper detektiert. Dieser war ein anti-human-IgG- bzw. anti-Huhn-Antikörper.

Die wesentliche Frage ist, ob ein autoreaktives Muster zwischen den CLL-BCR und den potentiellen Auto- und/oder Neo-Antigenen nachgewiesen werden kann und so die Basis für eine spezifizierte Antigen-Identifikation bietet.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Patientenmaterial

Alle in dieser Arbeit getesteten Antikörper stammten von Patienten, die an einer chronisch lymphatischen Leukämie erkrankt waren und im Universitätsklinikum Freiburg vorstellig wurden. Eine Einverständniserklärung zur Verwendung des Patientenmaterials lag für alle CLL-Antikörper vor. Die experimentelle Nutzung erfolgte nach Vorliegen eines Ethikvotums des Universitätsklinikums Freiburg. Die Nomenklatur der sechs Antikörper wurde wie folgt festgelegt: Ig014, Ig015, Ig022, Ig023, Ig024 und Ig025. Eine weitergehende Einteilung der Antikörper nach CDR3-Region, Mutationstatus und Subset findet sich unter 3.1. Als transfizierte, produzierende Zelllinie wurden 293T-Zellen genutzt.

2.1.2 Vektor

Der verwendete Vektor „pBud-opti-human IgG1/pBudCE4.1“ mit Zeozin-Resistenz kodiert für die konstanten Ketten der Antikörper, wobei die Informationen für die variablen Ketten noch individuell einkloniert werden mussten. Die entsprechende Vektorenkarte ist in Abb. 4 dargestellt.

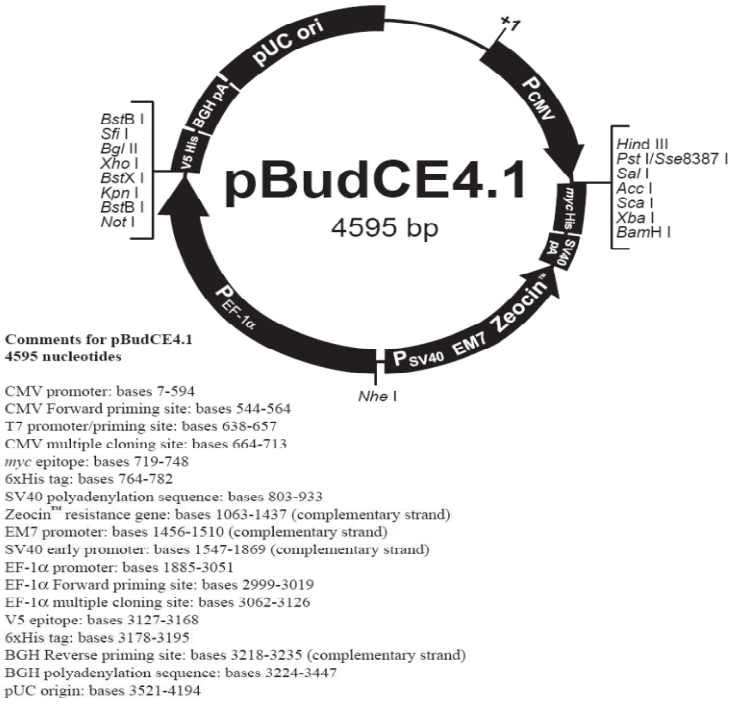


Abbildung 4: Vektorenkarte des pBudCE4.1-Vektors[20]. Dieser Vektor kodiert für die konstanten Immunglobulinketten. Die kodierende Sequenz für die variablen Ketten wurde einkloniert.

2.1.3 Zelllinien

Die fünf immunhistochemisch untersuchten Zelllinien sind in Tabelle 1 mit einer kurzen Beschreibung der Morphologie und ihrer Bezugsquelle dargestellt. Alle ausgewählten Zelllinien, außer MCF-7, exprimieren Vimentin.

Tabelle 1: Zelllinien.

Zelllinie	Beschreibung / Morphologie / Bezugsquelle
M2-10B4	murine Fibroblasten-Zelllinie; Morphologie: adhärentes Wachstum; Bezug: freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Dr. Katja Zirlik, Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum Freiburg
HEp-2	humane Larynxkarzinom-Zelllinie; Morphologie: adhärentes Wachstum; Bezug: freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. Haag, Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
293T	humane fetale Nierenepithelzelllinie; Morphologie: adhärentes Wachstum; Bezug: freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch David Baltimore, California Institute of Technology, Pasadena, USA
HeLa	humane Zervixkarzinom-Zelllinie; Morphologie: adhärentes Wachstum; Bezug: American Type Culture Collection
MCF-7	humane Mammakarzinom-Zelllinie; Morphologie: adhärentes Wachstum; Bezug: American Type Culture Collection

2.1.4 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Alle Zelllinien, außer den M2-10B4-Zellen, wurden in Dulbecco´s Modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert. Die M2-10B4-Zellen wurden in RPMI 1640 gehalten. Beide Medien wurden über Gibco bezogen. In den folgenden Abschnitten werden die verwendeten Substanzen, Materialien und Geräte, sowie deren Bezugsquelle in tabellarischer Form aufgeführt.

Fetal Calf Serum (FCS) Gibco

Penicillin-Streptomycin (P/S)	Gibco
Zeozin	Invitrogen
Trypsin-EDTA	Proteine, Antigene, Antikörper (PAA)

2.1.5 Tissue microarray

Der hier verwendete Tissue microarray wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Guido Sauter, Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, zur Verfügung gestellt. Dieser Array ist bereits, in modifizierter Form mit zusätzlichen Proben, in der Literatur beschrieben worden[47].

Die; für die TMA-Objektträger, verwendeten Gewebe bzw. deren Ursprungsorgane/-gewebe werden im folgenden Text alphabetisch aufgelistet, wobei die malignen Gewebe zuletzt genannt werden und nicht entsprechend der alphabetischen Reihenfolge. In Klammer hinter dem jeweiligen Gewebe ist die Anzahl der Stanzen auf dem Array angegeben. Alle Gewebestanzen stammen aus intraoperativ gewonnen Exzisionen.

Gewebestanzen: Colon mucosa (5), Colon muscularis (3), Endometrium (4), Glandula parotis (4), Haut (4), Herzmuskel (4), Hoden (4), Lunge (4), Lymphknoten (4), Magenkorpus (4), Milz (4), Nebenhoden (4), Nebenniere (4), Nierenrinde (4), Pankreas (4), Plazenta (4), Prostata (4), Schilddrüse (4), Skelettmuskulatur (4), Thymus (4), Tonsille (4), Colon-Ca (10), Mamma-Ca (10), Prostata-Ca (10).

2.1.6 Gelelektrophorese

Gelelektrophoreseapparatur	Bio Rad
Markerproteine (PageRuler Prestained Protein Ladder)	Fermentas

2.1.7 Immunzytochemie

Coverslip-Glasplättchen	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG
Objektträger	Roth
Alexa-Fluor 594 Phalloidin	Invitrogen
Mounting Medium with DAPI	Vectashield
Kaninchen-anti-human IgG-Antikörper-FITC	Sigma-Aldrich
Rituximab	Roche
anti-Vimentin-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology
anti-Rabbit-Antikörper-FITC	Santa Cruz Biotechnology

2.1.8 Puffer und Lösungen

Die im Folgenden aufgelisteten Lösungen wurden selbst hergestellt. Als Quelle der kommerziell erworbenen Chemikalien wird der jeweilige Hersteller angegeben.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Quelle
PBS		Gibco
PBS high salt	1000ml PBS, 50,53g NaCl	Eigenproduktion
Elutionspuffer	Glycin 0,1 M pH 4,0	Eigenproduktion
Laufpuffer	990ml ddH_2O, 3g Tris base, 14,4g Glycin, 10ml 10% SDS-Lösung	Eigenproduktion
Coomassie-Färbelösung	450ml dH_2O, 2,5g Coomassie Brilliant Blue R-250, 450ml Methanol, 100ml Essigsäure	Eigenproduktion

Coomassie-Entfärbelösung	450ml dH_2O, 450ml Methanol, 100ml Essigsäure	Eigenproduktion
TBS	1000ml dH_2O, 6,5g Tris, 8,76g NaCl, pH 7,5	Eigenproduktion
TBST	1000ml dH_2O, 6,5g Tris, 8,76g NaCl, 0,2ml Tween 20, pH 8	Eigenproduktion

2.1.9 Chemikalien

Chemikalie	Zusammensetzung	Quelle
Tris-HCl	1000ml dH2O, 158g TRIS, versch. pH-Werte	Eigenproduktion
Ethanol		J.T.Baker
Isopropanol		Fluka
Sodiumdodecylsulfate (SDS)		Roth
Protein A Sepharose		GE Healthcare
Triton X-100		Merck
Paraformaldehyd		Sigma-Aldrich
Tween 20		Sigma-Aldrich
Imidazol		Sigma
Nickel-Nitriloessigsäure-Agarose (Ni^{2+}-NTA-Agarose)		Invitrogen

2.1.10 Plastikwaren und Verbrauchsmaterialien

Zellkulturflaschen, steril, verschiedene Größen	Greiner Bio-one
Kunststoffpipetten Typ Pasteur, verschiedene Größen	Isolab
24-Well Platten, steril	Greiner Bio-one

Pipettenspitzen, steril, mit/ohne Filter	Sarstedt
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf
Kunststoffröhrchen (15 ml, 50 ml)	BD Biosciences
Zellschaber	Sarstedt
Vakuumfiltrationssystem	VWR
Plastiksäule	Bio Rad
Verschlussfolie (Parafilm)	American National Can Company

2.1.11 Geräte

Pipetten, verschiedene Volumina	Eppendorf
Zentrifuge 5810	Eppendorf
Durchlichtmikroskop Axiovert 40 CFL	Leitz
Photometer Nanodrop 1000	Thermo Scientific
Sterile Werkbank HeraSafe HS1	Heraeus Instruments
Brutschrank HERAcell 240	Thermo Scientific
Gefrierschrank V.I.P.™ Series	Sanyo
Konfokalmikroskop TCS SP2	Leica
Heizblock TB2	Biometra

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in DMEM oder RPMI 1640 mit zugesetzten 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin-Streptomycin (P/S) im Zellinkubator bei 37℃, 5% CO_2-Gehalt und einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert.

Es handelte sich ausschließlich um adhärente Zellen, deshalb wurden diese vor dem Verteilen auf mehrere Kulturflaschen mit einem sterilen Zellschaber oder Trypsin-EDTA vom Boden der Kulturflasche gelöst.

Bei den transfizierten 293T-Zellen wurde dem DMEM noch Zeozin (Verhältnis 1:1000) hinzugefügt. Die von den Zellen produzierten, antikörper-beinhaltenden Überstände wurden gesammelt und bei -20℃ konservie rt.

Die Produktion der chimären human-/chicken-Antikörper verlief in gleicher Weise, es wurde jedoch ISF-1-Medium verwandt.

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer.

2.2.2 Aufreinigung der Antikörper mittels Affinitätschromatographie

Bei jeder Aufreinigung wurden ca. 200 ml Überstand verwendet. Die Überstände wurden zuerst durch ein Vakuumfiltrationssystem gefiltert, das für Immunglobulin, nicht jedoch für Zellen, durchlässig ist, um zu vermeiden, dass die Chromatographiesäule verstopft.
Die humanen Antikörper wurden über eine Säulenmatrix aus Protein-A-Sepharose aufgereinigt.
Zu Beginn wurde 1 ml Protein A-Sepharose in einen Plastiksäulenträger gegeben und mit je dem zehnfachen Volumen an PBS und Bindungspuffer (PBS high salt) gewaschen. Anschließend wurde der Überstand über die Säule gegeben und der Durchfluss aufgefangen, wobei ein Durchlauf von mehr als 50 ml pro Stunde vermieden wurde. Nachdem der gesamte Überstand über die Säule gelaufen war, wurde diese erneut mit je 50 ml PBS und 50 ml Bindungspuffer gewaschen. Dies geschah bis bei einer Wellenlänge von 280 nm am Photometer, keine Absorptionsunterschiede im Vergleich zur Referenzlösung mehr festzustellen waren.
Die Säule wurde verschlossen und 10 ml Elutionspuffer hinzu gegeben. Nach 3 min wurde die Säule wieder geöffnet und je 1 ml Eluat in einem vorbereiteten Kunststoffgefäß gesammelt. Die einzelnen Kunststoffgefäße wurden mit je 100 µl TRIS-HCl (pH 9.1) vorbereitet, um den niedrigen pH-Wert des Elutionspuffers zu neutralisieren.
Die Aufreinigung der chimären Ak erfolgte in ähnlicher Weise. Es wurde jedoch

statt Protein A-Sepharose Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni^{2+}-NTA-Agarose) verwendet und Imidazol zur Trennung der Ak von der Säule eingesetzt. Anschließend musste das Imidazol über Nacht bei +4°C mit PBS ausgewaschen werden.

2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Es wurden zwei Polyacrylamid-Gelschichten, das Sammelgel und das Trenngel, übereinander gegossen. Das Sammelgel ist die Schicht, deren Taschen mit 20 µl der aufzutrennenden Probe beladen wurden und von denen aus die Proteine auf schmale Banden fokussiert wurden. Im Trenngel wurden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Als Referenz für die Höhe einer Bande diente ein Markerprotein, das ein definiertes Proteinspektrum von 10 kDa bis 200 kDa anzeigt.

Um die Disulfidbrückenbindungen der Proteine aufzuspalten, wurde ß-Mercaptoethanol-haltiger Ladepuffer im Verhältnis 1:1 zu den Proben gegeben; anschließend wurden die Proteine 5 min bei 95℃ den aturiert.

Die verschiedenen Gele wurden nach Tabelle 2 vorbereitet.

Für die Herstellung des Polyacrylamidgels wurde zuerst das Trenngel gegossen. Zur gleichmäßigen Polymerisation wurde eine Schicht Isopropanol darüber gegeben. Nach einer halbstündigen Polymerisation wurde das Isopropanol mit Wasser abgewaschen, das Sammelgel darüber gegossen und ein Kamm in das noch flüssige Sammelgel gesteckt, um die einzelnen Taschen zu formen. Nach erneuter Polymerisation wurde das Gel, inklusive der Glasplatte, in die Laufapparatur eingespannt, die Anoden-/Kathodenkammer mit Laufpuffer gefüllt und die Taschen mit den Proben und den Markerproteinen beladen.

Die Gelelektrophorese wurde bei 170 Volt für eine Stunde durchgeführt.

Tabelle 2: Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels.

Gelkomponente	Trenngel (10%) [ml]	Sammelgel (5%) [ml]
H_2O Milli Q	4,0	2,1
30% Bisacrylamid	3,3	0,5
1,5 M TRIS (pH 8,8)	2,5	---
1,5 M TRIS (pH 6,8)	---	0,38
10% SDS	0,1	0,03
10% Ammoniumpersulfat	0,1	0,03
TEMED	0,004	0,003
Gesamtvolumen	10 ml	3 ml

2.2.4 Färben eines SDS-Gels mit Coomassie-Blau

Coomassie-Brilliant-Blau ist ein Triphenylmethanfarbstoff, der sich an Proteine anlagert und diese unspezifisch anfärbt. Ziel der Färbung war es, die Reinheit der rekombinanten Antikörperfragmente (leichte und schwere Ketten) zu verifizieren und eventuelle Verunreinigungen, die sich durch unspezifische zusätzliche Banden zeigen würden, auszuschließen.

Die Gele wurden 30 min in Coomassie-Färbelösung geschwenkt und anschließend ca. 90 min bis zum Entfärben des Hintergrundes mit Entfärbelösung inkubiert.

Der Färbe- und Entfärbevorgang konnte durch kurzes Erhitzen der Lösung in der Mikrowelle beschleunigt werden. Gefärbte Gele wurden nach kurzer Inkubation in H_2O Milli Q getrocknet, in Plastikfolie eingeschweißt und konserviert.

2.2.5 Quantifizierung der Antikörperkonzentration

Die Quantifizierung der Antikörperkonzentration erfolgte am Photometer (Nanodrop). Es wurde, nach Angaben des Herstellers, zuerst eine neutrale Messung mit Reinstwasser, dann eine Blankmessung mit dem Puffer (Elutionspuffer mit TRIS-HCl) durchgeführt, in dem die Antikörper gelöst sind, und anschließend die Antikörperlösung gemessen.

2.2.6 Immunzytochemie der Zelllinien

10^4-10^5 Zellen wurden nach der Trypsinisierung auf jedes Glasplättchen (sogenannte Coverslips) gegeben, nachdem diese in je einer Kammer einer 24-Well-Platte positioniert wurden. In jede Kammer mit einem Coverslip wurde 1 ml des jeweiligen Mediums gegeben. Anschließend wuchsen die Zellen als Monolayer für ein bis drei Tage bis zur gewünschten Anzahl und Morphologie.

Es wurde die sogenannte indirekte Methode der Immunzytochemie in der Zwei-Schritt-Technik angewandt. Das heißt, dass ein zu testender Primärantikörper auf Zellen aufgebracht wurde und mit einem, gegen diesen Primärantikörper gerichteten, Sekundärantikörper detektiert wurde. An den Sekundärantikörper war ein Farbstoff gekoppelt, der die Visualisierung ermöglichte.

Alle der nachfolgend genannten Inkubationszeiten erfolgten bei +4℃, wenn nicht anders beschrieben.

Das Medium wurde mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und die Coverslips einmalig fünf Minuten in PBS gewaschen. Es folgte eine 20-minütige Fixierung mit 4% Paraformaldehyd in ddH_2O, ein Waschschritt in PBS und eine 15-minütige Permeabilisierung mit 0,5% Triton in PBS. Nach erneutem Waschen wurden unspezifische Bindungsstellen mit 3% BSA in PBS für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) blockiert und anschließend nochmals gewaschen. An dieser Stelle wurden die Coverslips aus den Kammern der 24-Well-Platte genommen und auf eine mit Parafilm vorbereitete Fläche gelegt. Die Zellen wurden für eine Stunde mit dem zu testenden Antikörper inkubiert und dann dreimal gewaschen, bevor die Inkubation mit dem jeweiligen FITC-gekoppelten Sekundärantikörper für 45 min und erneutes dreimaliges Waschen folgte. Abschließend wurden die Zellen noch für 30 min mit Phalloidin (Alexa 594, λ = 594nm, Verdünnung 1:50) behandelt. Phalloidin bindet an Aktinfilamente und wird deshalb gern genutzt, um ein zytoplasmatisches Färbemuster zu erreichen. Nach finalem fünfminütigem Waschen wurden die Coverslips umgedreht und mit Mounting Medium mit DAPI auf einem Objektträger montiert und mit Nagellack versiegelt. Die Aufbewahrung erfolgte bei +4℃ und unter Lichtabsenz.

Alle Antikörper und Phalloidin wurden in 1% BSA in PBS auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

2.2.7 Auswertung der Immunzytochemie der Zelllinien

Die Auswertung der Immunzytochemiefärbungen erfolgte an dem Konfokalmikroskop Leica DM IRE2 in einer 63-fachen Ölimmersions-Vergrößerung. Zur Digitalisierung der aufgenommen Bilder wurde das vom Hersteller gelieferte Computerprogramm (Leica Confocal Software) verwendet. Damit war sowohl die Aufnahme von Einzelbildern verschiedener Farbkanäle, als auch das digitale Übereinanderlegen (Overlay) dieser Einzelbilder möglich. Das endgültige Bild besteht aus acht übereinandergelegten Einzelbildern (Average), um die spezifische Färbung möglichst genau darzustellen. Diese Methode wird angewandt, um den unspezifischen Hintergrund, soweit möglich, herauszufiltern.

2.2.8 Immunzytochemie der Tissue microarrays

In Kooperation mit dem Pathologischen Institut des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurden auf sog. „Tissue microarrays“ immunhistochemische Färbungen mit den CLL-Antikörpern angefertigt. Der Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, dass auf einem einzigen anzufärbenden Slide sehr viele unterschiedliche Gewebe gleichzeitig getestet werden können[26,42]. Die Versuche wurden mit den CLL-Antikörpern Ig014, Ig022 und Ig024 in veränderter Form durchgeführt. In veränderter Form bedeutet in diesem Zusammenhang, dass das F_c nicht mehr human ist, sondern vom Huhn stammt. Es entsteht also ein chimärer Huhn (F_c)/Human (F_{ab})-Antikörper. Der Vorteil besteht darin, dass das ursprüngliche Antigen noch erkannt wird, aber als Sekundärantikörper ein anti-Huhn-Antikörper verwandt werden kann, der bei dem zu untersuchenden, humanen Gewebe weniger unspezifische Hintergrundfärbung erzeugt, als ein anti-Human-Ak.

Die Herstellung der TMA wird an dieser Stelle nur grob zusammengefasst und es wird auf weiterführende Literatur verwiesen, da die TMA nicht eigens für die hier vorliegende Arbeit hergestellt wurden.

Zuerst wurden die Spenderblöcke ausgewählt und eine oder mehrere Stanzbiopsien entnommen. In einen leeren Paraffinblock (Empfängerblock) wurden, an den entsprechenden Stellen Löcher eingefügt, in welche die Stanzbiopsien des Spendergewebes eingebracht wurden. Anschließend wurde

eine selbstklebende Folie auf den angeschnittenen Empfängerblock geklebt und mit dem Rotationsmikrotom ein Schnittpräparat von 3-5 µm Dicke hergestellt. Nun klebte der Schnitt an der Folie, wurde auf einen Objektträger übertragen und die Folie wurde gelöst[4].

Das folgende Protokoll für die Immunhistochemie wurde in verschiedenen Varianten auf die drei Antikörper angewendet, um die besten Bedingungen zu etablieren.

Zu Beginn mussten die TMA entparaffiniert werden. Aus diesem Grund wurden die Objektträger (OT) eine Stunde in Xylol gebadet, dann in einer absteigenden Alkoholreihe bis zu destilliertem Wasser rehydriert und abschließend 5 min in TBST gewaschen.

Die Fixierung der Gewebeproben in neutral gepufferter 4% Formaldehyd-Lösung kann zu einer sog. Maskierung führen, d.h. einer Vernetzung der Proteine. Durch die Vernetzung konnte die Struktur der Epitope verändert werden. Die Versuche wurden sowohl ohne Demaskierung, als auch mit Demaskierung durch eine Protease, einen Dampftopf, einen Dampfgarer, eine Mikrowelle und durch unterschiedliche pH-Werte (pH 2, pH 6, pH 7,8, pH 9) durchgeführt. Anschließend wurden die OT 5 min in TBS gewaschen.

Zum Blockieren der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die OT 10 min in 1% H_2O_2 in Methanol gebadet und anschließend zweimal, je 5 min, mit TBS gewaschen.

Die Inkubationen der verschiedenen Antikörper fanden bei 30℃ statt. Die chimären Ak Ig014, Ig022 und Ig024 wurden mit Konzentrationen von 5-, 10-, 15µg/ml für je 30 min inkubiert. Anschließend wurde zweimal, je 5 min, mit TBS gewaschen. 10µg/ml des sekundären Antikörpers (Rabbit-anti-Chicken-HRP) wurden für 30 min inkubiert und es wurde wiederum zweimal 5 min mit TBS gewaschen. Der Tertiärantikörper (EnVision Polymer-HRP Goat-anti-Rabbit) wurde ebenfalls für 30 min inkubiert und abschließend wurde die zweimalige Waschung mit TBS wiederholt.

Zur Visualisierung wurden die OT zweimal 5 min in ddH_2O gewaschen, anschließend mit DAB-Chromogen (Liquid DAB DAKO K3468) für 10 min bei

Raumtemperatur inkubiert und danach nochmals 5 min in ddH_2O gewaschen. Im nächsten Schritt wurde der Zellkern 1 min mit Hämalaun angefärbt und 5 min mit Leitungswasser gebläut. Zuletzt wurden die OT in einer aufsteigenden Alkoholreihe bis Xylol getränkt und mit Mounting Medium (Eukitt) eingedeckelt.

3 Ergebnisse

3.1 Basisinformationen zu den CLL-B-Zellrezeptoren

Die Tabellen 3 und 4 zeigen in einer Zusammenfassung Informationen über die Aminosäuresequenzen der hypervariablen (CDR-3-)Regionen und den jeweiligen Mutationsstatus der variablen schweren und variablen leichten Ketten der hier verwendeten rekombinanten B-Zell-Rezeptoren. Außerdem ist die Zugehörigkeit zum jeweiligen Subset für die schweren Ketten und zum κ- beziehungsweise λ-Typ der variablen leichten Ketten dargestellt. Die BCR wurden als rekombinante Antikörper vom IgG-1Subtyp exprimiert.

Tabelle 3: Informationen zur schweren Kette der BCR. V_H gibt die zugehörige variable schwere Kette an. Die Einteilung der V_H in Subsets bezieht sich auf die Klassifikation nach Stamatopoulos[44] und Murray[35].

Antikörper	V_H	CDR3-Region	Mutations-status	Subset
Ig014	V_H 1-2	ARDQWLTLGNYFDY	unmutiert	1
Ig015	V_H 1-69	ARAVQEDYDFWSGYYPNYYYYGMDVW	unmutiert	7
Ig022	V_H 1-69	AREQPDIVVVPADVGYYYGMDVW	unmutiert	3
Ig023	V_H 1-69	ARGEGPIFGVVIPNLYYYMDVW	unmutiert	9
Ig024	V_H 3-9	AKGGARWIQLTVRSYYYYYGMDV	unmutiert	-
Ig025	V_H 1-69	ARFMDYYDSSGYYNPQYYYYGMDV	unmutiert	7

Tabelle 4: Informationen zur leichten Kette der CLL-BCR. V_L gibt die zugehörige variable leichte Kette an.

Antikörper	V_L	CDR3-Region	Mutationsstatus
Ig014	V_L 3-20-kappa	QQYGSSPG#FTF	unmutiert
Ig015	V_L 3-9-lambda	QVWDSSTVVF	unmutiert
Ig022	V_L 1-39-kappa	QQSYSTRPF	unmutiert
Ig023	V_L 4-1-kappa	HQYHGVPYTF	mutiert
Ig024	V_L 3-20-kappa	QQYGRTF	unmutiert
Ig025	V_L 3-1-lambda	QAWDSSTDVVF	unmutiert

3.2 Antikörperaufreinigung

Die Aufreinigung der CLL-Antikörper erfolgte wie unter Punkt 2.2.3 beschrieben. Abbildung 5 zeigt beispielhaft ein mit Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Gel, bei dem die leichten und die schweren Ketten des Antikörpers Ig022 durch Reduktion, Denaturierung und Elektrophorese aufgetrennt wurden.

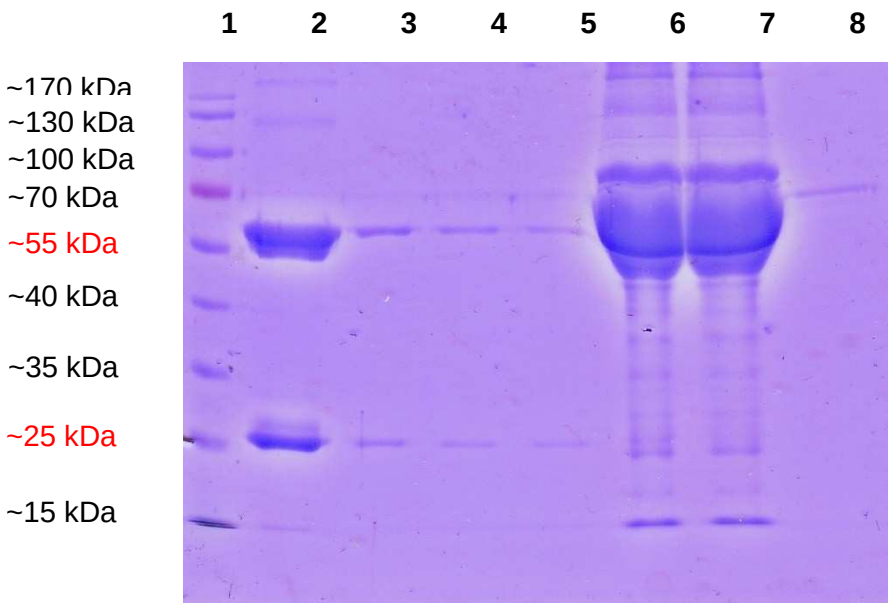


Abbildung 5: Ein mit Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Gel einer Aufreinigung von Ig022. Die aufgetragenen Banden zeigen: **1:** Markerprotein (Fermentas), **2:** Eluat 2, **3:** Eluat 4, **4:** Eluat 6, **5:** Eluat 8, **6:** antikörperbeinhaltender Überstand des Zellkulturmediums, **7:** Durchfluss der Protein A-Sepharose-Säule, **8:** Durchfluss der Protein A-Sepharose-Säule nach dem Waschen. **2-5** zeigen bei ~62 kDa die schwere Kette der Antikörper und bei ~25 kDa die leichte Kette. Die Antikörperkonzentration verringert sich von Eluat zu Eluat. **6** und **7** zeigen zwischen ~50-70 kDa eine große Proteinansammlung durch BSA. Bande **8** ist nahezu proteinfrei.

3.3 Immunzytochemie

3.3.1 Übersicht

Ziel dieser Arbeit war es, fünf Zelllinien (M2-10B4, HEp-2, 293T, HeLa, MCF-7) mit sechs verschiedenen Antikörpern (Ig014, Ig015, Ig022, Ig023, Ig024, Ig025) zu färben. Die Antikörper waren rekombinant exprimierte B-Zell-Rezeptoren sechs verschiedener CLL-Patienten. Es sollte festgestellt werden, ob hieraus eine Anfärbung resultiert, sich gegebenenfalls sogar ein spezifisches und repetitives Färbemuster erkennen lässt und somit potentielle Autoantigene identifiziert werden können. Als Positivkontrolle wurde ein FITC-gekoppelter anti-Vimentin-Antikörper verwendet, da außer MCF-7 alle gewählten Zelllinien Vimentin exprimieren. Als Isotypkontrolle wurde Rituximab gewählt, ein chimärer, monoklonaler anti-CD20-Antikörper. Es wurden bewusst Zelllinien

unterschiedlicher Gewebe gewählt, um ein mögliches Färbemuster zu verdeutlichen.

Als Farbstoffe wurden FITC, Phalloidin und DAPI verwendet. FITC war an den Sekundärantikörper (Kaninchen-anti-human IgG) gekoppelt. Phalloidin führt durch Anlagerung an Aktinfilamente zu einer zytoplasmatischen Färbung. DAPI lagert sich der DNA an und erzeugt eine Kernfärbung. Ausgewertet wurden die immunzytochemischen Färbungen an einem Konfokalmikroskop. Es war allerdings nicht möglich, mit diesem die DAPI-Färbung digitalisiert am Computer darzustellen, da es nicht über einen passenden LASER verfügte. Die DAPI-Färbung konnte somit nur analog am Durchlichtmikroskop untersucht werden.

3.3.2 Methodenetablierung

Ein wesentlicher Teil der Laborarbeit bestand in der Etablierung der Methodik wie sie unter Punkt 2.2.6 zu lesen ist. Die einzelnen Schritte der Färbung, wie Zeiten und Konzentrationen, wurden zuerst durch Testfärbungen optimiert und etabliert. Diese Versuche wurden bei jeder Zelllinie durchgeführt. Anschließend wurden die Ergebnisse in einem optimierten Protokoll zusammengefügt und auf das Testpanel angewandt. Die Daten der Testfärbungen aus 3.3.2.1-3.3.2.3 und 3.3.2.5 werden hier nicht gezeigt.

3.3.2.1 Fixierung

Die auf einem Coverslip gewachsenen Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert. Es wurden Probeläufe mit 2%, 3% und 4% PFA in H_2O Milli Q durchgeführt, wobei nur mit einer Konzentration von 4% eine ausreichende Anzahl an Zellen fixiert werden konnte um IHC-Färbungen durchzuführen. Als ausreichend wurde angesehen, wenn 20 Prozent des OT mit Zellen bedeckt waren. Bei niedrigeren Konzentrationen von PFA war die Aufrechterhaltung der Zellstruktur durch Proteinvernetzung nicht gewährleistet.

3.3.2.2 Permeabilisierung

Um eine intrazelluläre Anfärbung der Zellen zu ermöglichen, mussten diese permeabilisiert werden. Es wurden Versuche mit Konzentrationen von 0,04%, 0,05%, 0,08%, 0,1% und 0,5% Triton X-100 in PBS durchgeführt. Nur bei einer

Konzentration von 0,5% war die Permeabilisierung nahezu aller Zellen gewährleistet. Als ausreichend galt eine Permeabilisierung von mindestens 80 Prozent der Zellen. Bei niedrigeren Konzentrationen an Triton X-100 waren einzelne Zellen nicht permeabilisiert. Dies wurde deutlich, da sich innerhalb von Zellverbänden angefärbte und nicht angefärbte Zellen zeigten. Potentielle Antigene hätten den färbenden Antikörpern somit nicht zugänglich gemacht werden können.

3.3.2.3 Konzentrationen des Sekundärantikörpers

Die zu verwendende Konzentration des Sekundärantikörpers (anti-human-IgG) musste für jede Zelllinie einzeln geprüft werden. Deshalb wurden Testfärbungen mit Verdünnungen von 1:100, 1:500, 1:800, 1:1500, 1:2000 und 1:2500 durchgeführt. Der kommerzielle anti-Vimentin-Ak fungierte in diesem Zusammenhang bei allen Zelllinien, außer MCF-7, als Primärantikörper. Bei MCF-7-Zellen wurde Ig024 als Primär-Ak verwandt. Bei den Zelllinien M2-10B4 und 293T wurden bei einer Verdünnung von 1:800 Sekundärantikörper in PBS mit 1% BSA die gesuchten Ergebnisse erzielt und bei den restlichen Zelllinien bei einer Verdünnung von 1:2500. Gesucht wurde die Verdünnung, bei welcher der Sekundärantikörper selbst negativ ist, jedoch in ausreichender Konzentration vorliegt, um den Primärantikörper zu markieren.

Um sicherzustellen, dass der Sekundär-Ak ohne Primär-Ak keine Fluoreszenz auslöst wurde bei jedem Färbedurchgang ein Coverslip parallel zu den Weiteren identisch behandelt. Es wurde jedoch kein Primär-Ak auf dieses Coverslip appliziert. Wäre es folglich zu einer Fluoreszenzreaktion gekommen, hätte der Sekundär-Ak ohne Primär-Ak, also unspezifisch, gebunden.

3.3.2.4 CLL-Antikörper

Die zu untersuchenden Primärantikörper wurden in Konzentrationen von 50, 100, 150, 200 und 250µg/ml getestet. Bis 200µg/ml zeigte sich, dass die Färbung in der Intensität zunahm. Ab 200µg/ml erfolgte keine Intensitätszunahme mehr. Aus diesem Grund wurden die IHC-Färbungen mit 200µg/ml durchgeführt. Der Antikörper Ig024 konnte nur in einer Konzentration von 75µg/ml eingesetzt werden, da er nicht höher konzentriert vorlag. Für Rituximab als Isotypenkontrolle wurde daher auch immer eine zusätzliche Färbung mit 75µg/ml durchgeführt.

3.3.2.5 Phalloidin

Für die Anfärbung des Zytoplasmas durch Phalloidin wurden Inkubationszeiten von 10 min, 20 min und 30 min erprobt. Nur mit einer 30-minütigen Inkubation war eine Färbung zu erzielen.

3.3.3 Färbemuster der CLL-Antikörper

Die Abbildungen 7 bis 15 zeigen die Expressionsmuster der einzelnen Antikörper. Die Antikörper, die ein negatives Ergebnis zeigen, werden nur exemplarisch anhand einer Zelllinie gezeigt. Das Färbemuster von Phalloidin und das von DAPI werden in den Unterpunkten nicht näher beschrieben. Die im Folgenden beschriebenen Färbecharakteristika beziehen sich auf die FITC-Färbungen.

Teils waren die Phalloidinfärbungen deutlich stärker als die FITC-Färbungen und überlagerten diese daher bei den Overlaybildern. Dies ist auf unterschiedliche Färbungsintensitäten zurückzuführen, welche sich trotz standardisiertem Protokoll ergaben.

In Tabelle 5 sind alle Ergebnisse zusammengefasst.

3.3.3.1 Färbemuster von Ig014

Der CLL-Antikörper Ig014 zeigte bei allen Zelllinien ein zytoplasmatisches Färbemuster. Die Anfärbung war punktförmig-fleckig und in der perinukleären Region am stärksten ausgeprägt (Abb. 7).

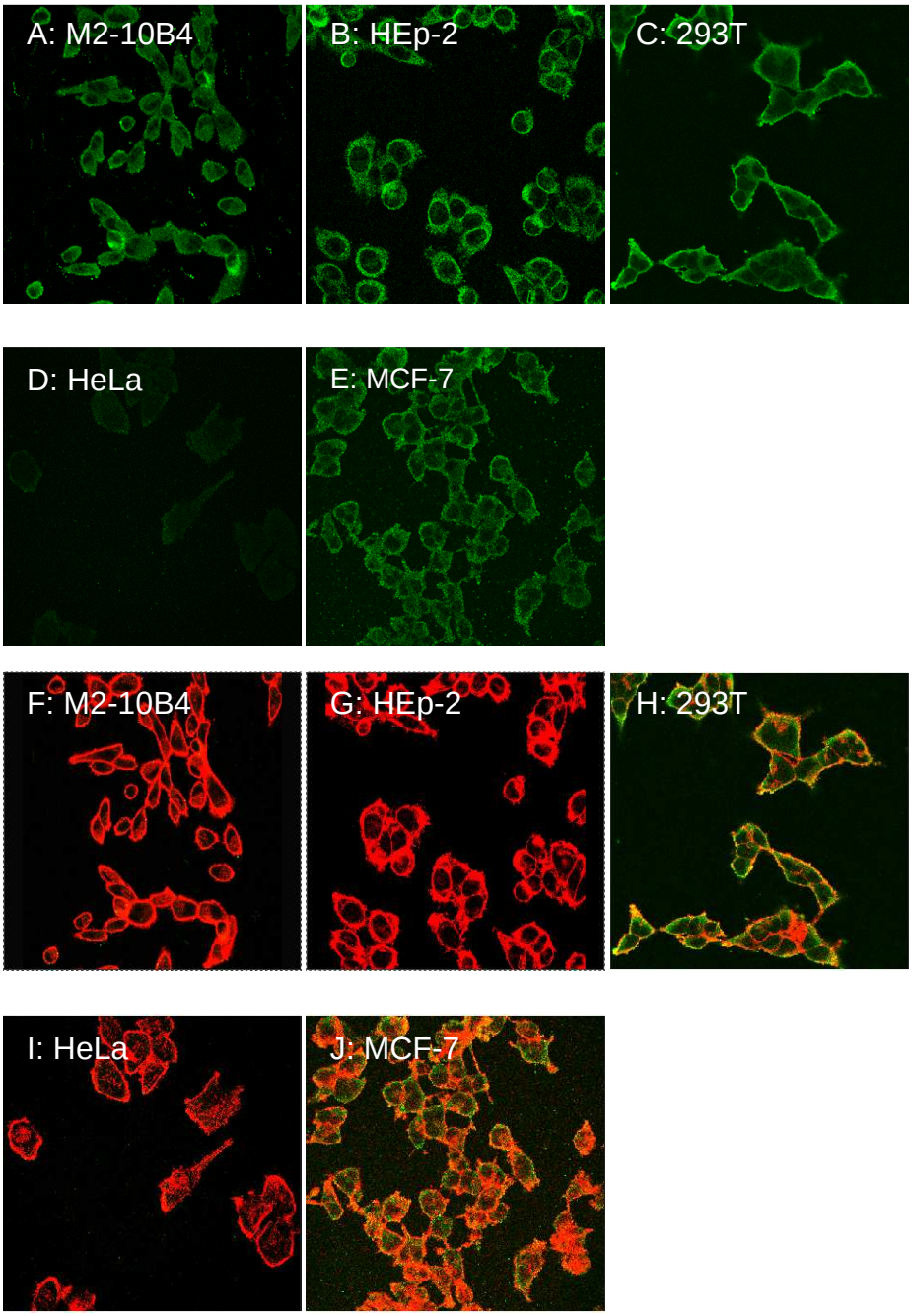


Abbildung 7: Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen der fünf mit dem CLL-Antikörper Ig014 gefärbten Zelllinien. Die Abbildungen **A-E** zeigen die antikörpervermittelten FITC-Färbungen und die Abbildungen **F-J** den Overlay der FITC- und der Phalloidinfärbungen.

3.3.3.2 Färbemuster von Ig015

Der CLL-Antikörper Ig015 zeigte bei allen getesteten Zelllinien ein negatives Ergebnis, was exemplarisch an der Zelllinie M2-10B4 gezeigt ist (Abb. 8).

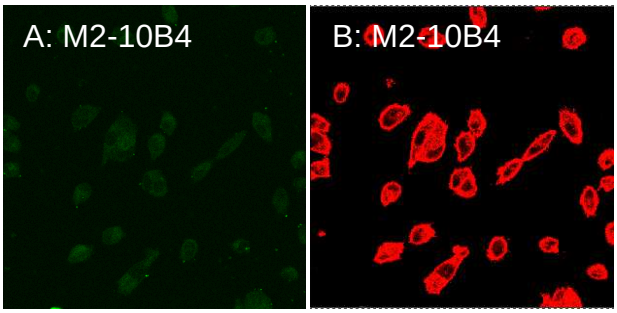


Abbildung 8: Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen der mit dem CLL-Antikörper Ig015 gefärbten Zelllinie M2-10B4. Die Abbildung **A** zeigt die antikörpervermittelte FITC-Färbung und die Abbildung **B** den Overlay der FITC- und der Phalloidinfärbungen.

3.3.3.3 Färbemuster von Ig022

Der CLL-Antikörper Ig022 zeigte bei allen getesteten Zelllinien ein negatives Ergebnis, was exemplarisch an der Zelllinie M2-10B4 gezeigt ist (Abb. 9).

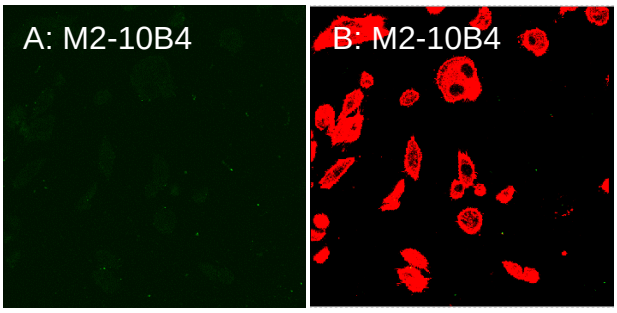


Abbildung 9: Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen der mit dem CLL-Antikörper Ig022 gefärbten Zelllinie M2-10B4. Die Abbildung **A** zeigt die antikörpervermittelte FITC-Färbung und die Abbildung **B** den Overlay der FITC- und der Phalloidinfärbungen.

3.3.3.4 Färbemuster von Ig023

Der CLL-Antikörper Ig023 zeigte bei allen getesteten Zelllinien ein negatives Ergebnis, was exemplarisch an der Zelllinie M2-10B4 gezeigt ist (Abb. 10).

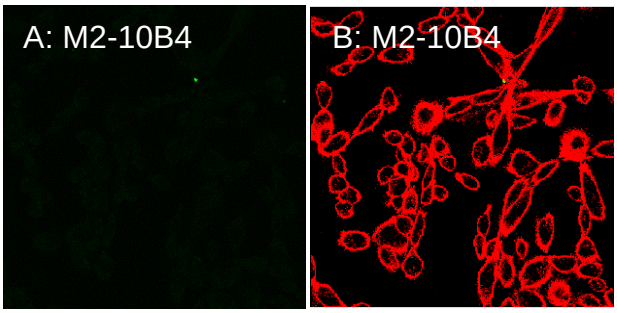


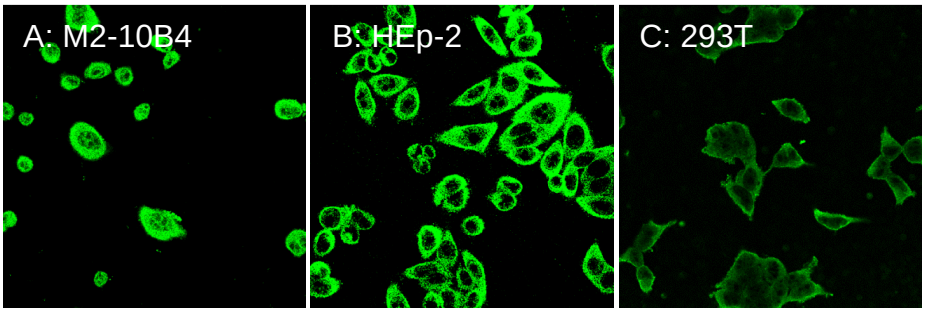
Abbildung 10: Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen der mit dem CLL-Antikörper Ig023 gefärbten Zelllinie M2-10B4. Die Abbildung **A** zeigt die antikörpervermittelte FITC-Färbung und die Abbildung **B** den Overlay der FITC- und der Phalloidinfärbungen.

3.3.3.5 Färbemuster von Ig024

Der CLL-Antikörper Ig024 zeigte bei den Zelllinien M2-10B4, HEp-2, HeLa und 293T eine starke zytoplasmatische und eine leichte nukleäre Färbung. Auffallend war, dass die Nukleoli von der Färbung ausgespart waren. Die Stärke der Färbung war unterschiedlich ausgeprägt und bei den M2-10B4-, den HEp-2- und den HeLa-Zellen kräftiger als bei den 293T-Zellen.

Bei den MCF-7-Zellen zeigte sich eine zytoplasmatische Anfärbung ohne Kernfärbung und auch hier war sie weniger stark ausgeprägt als bei den drei erstgenannten Zelltypen (M2-10B4, HEp-2, HeLa).

Die Färbungen aller Zelllinien hatten ein punktförmiges, meist in der perinukleären Region stärker ausgeprägtes, Färbemuster gemein (Abb. 11).



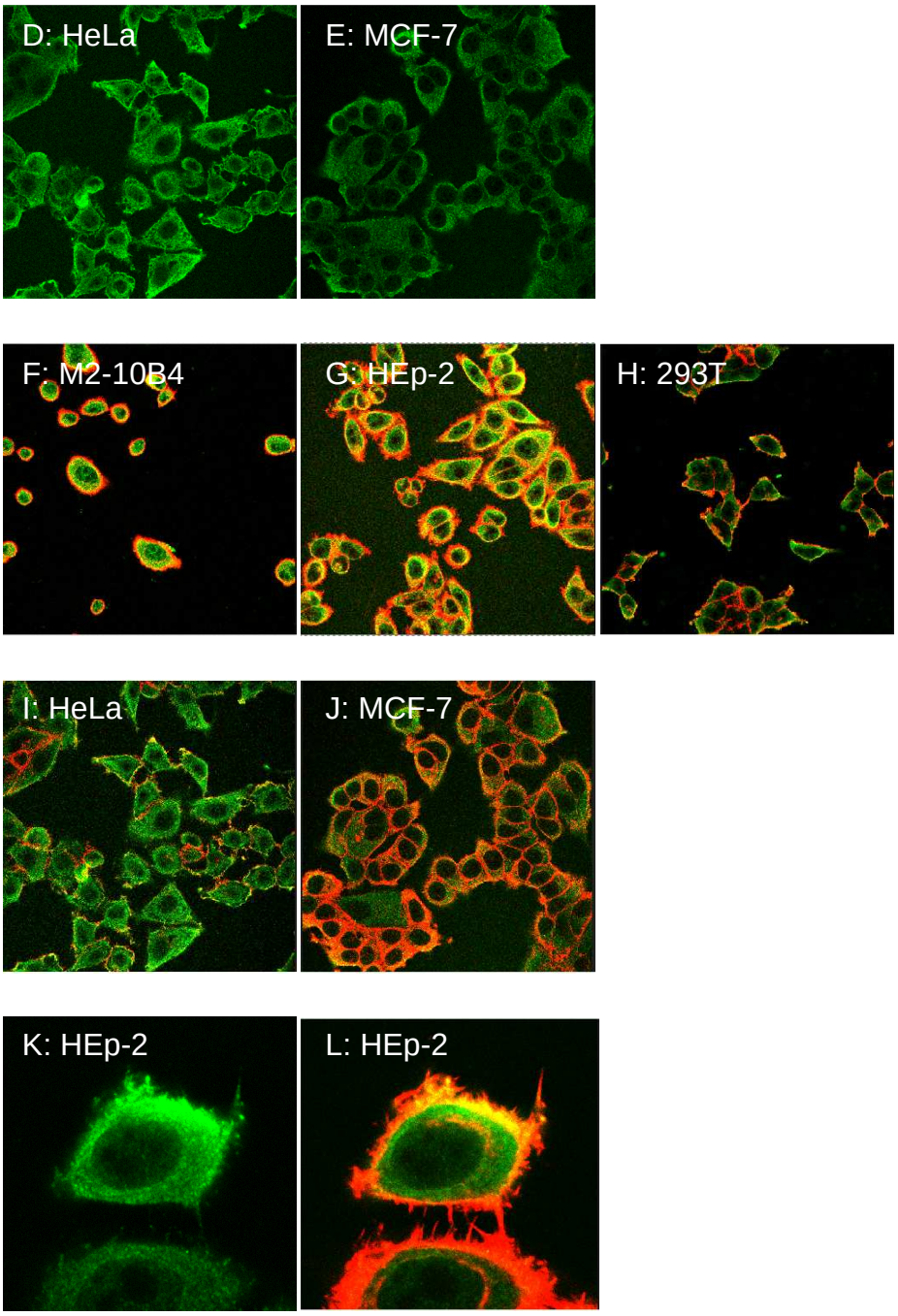
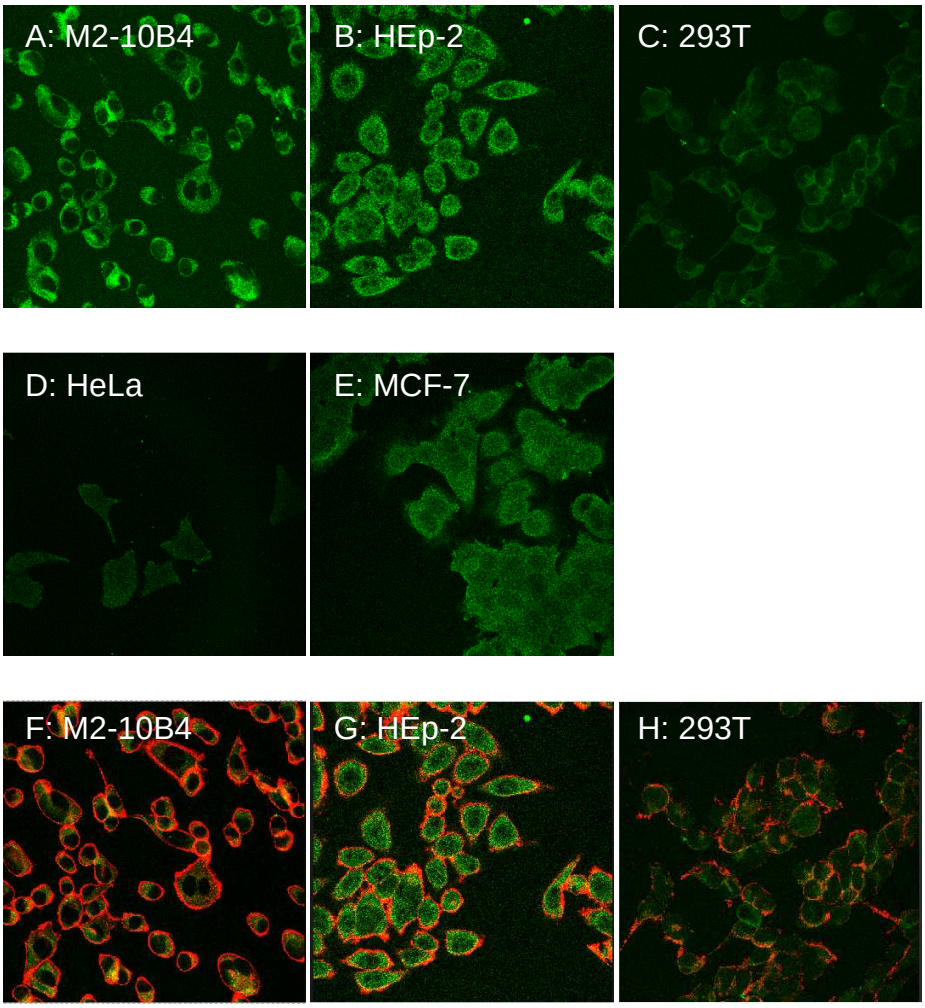


Abbildung 11: Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen der fünf mit dem CLL-Antikörper Ig024 gefärbten Zelllinien. Die Abbildungen **A-E** zeigen die antikörpervermittelten FITC-Färbungen und die Abbildungen **F-J** den Overlay der FITC- und der Phalloidinfärbungen. **K** und **L** zeigen einen vergrößerten Bildausschnitt mit FITC-Färbung (**K**) bzw. als Overlay (**L**) von HEp-2-Zellen.

3.3.3.6 Färbemuster von Ig025

Der CLL-Antikörper Ig025 zeigte auf M2-10B4-Zellen eine zytoplasmatische Färbung (Abb. 12A). Auf HEp-2-Zellen zeigte sich wiederum eine Anfärbung des Zytoplasmas mit einer zusätzlich schwachen nukleären Färbung und einer Nukleoliaussparung (Abb. 12B). Bei MCF-7-Zellen waren sowohl Zytoplasma als auch der Nukleus angefärbt und nicht zu unterscheiden (Abb. 12E). Bei 293T- und HeLa-Zellen zeigten sich mit diesem Antikörper keine Färbungen (Abb. 12C+D). Das, bereits bei den anderen Ak beschriebene, punktförmige Färbemuster präsentierte sich auch bei diesem Antikörper.



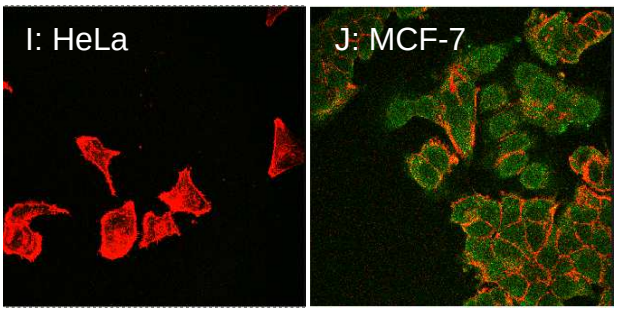


Abbildung 12: Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen der fünf mit dem CLL-Antikörper Ig025 gefärbten Zelllinien. Die Abbildungen **A-E** zeigen die antikörpervermittelten FITC-Färbungen und die Abbildungen **F-J** den Overlay der FITC- und der Phalloidinfärbungen.

3.3.4 Färbemuster von Rituximab

Der als Isotypenkontrolle (Negativkontrolle) verwandte kommerzielle Antikörper Rituximab zeigte auf allen getesteten Zelllinien ein negatives Ergebnis. Die Daten werden exemplarisch anhand der Versuche mit HEp-2-Zellen gezeigt (Abb. 13).

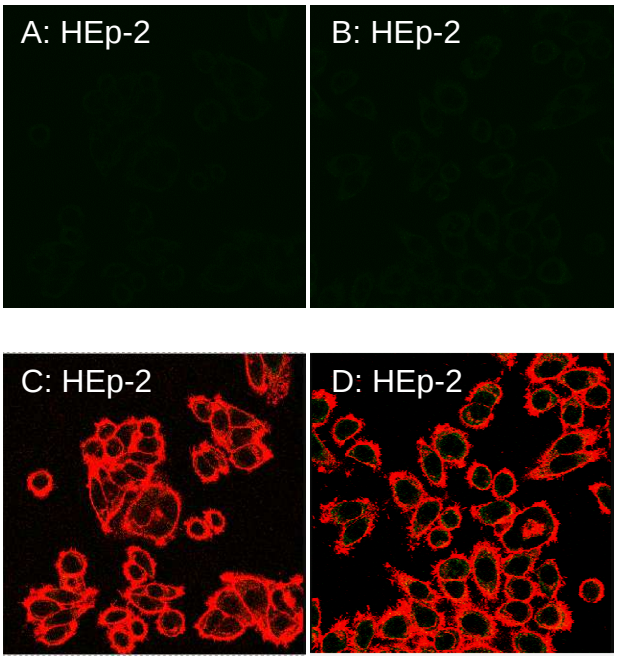
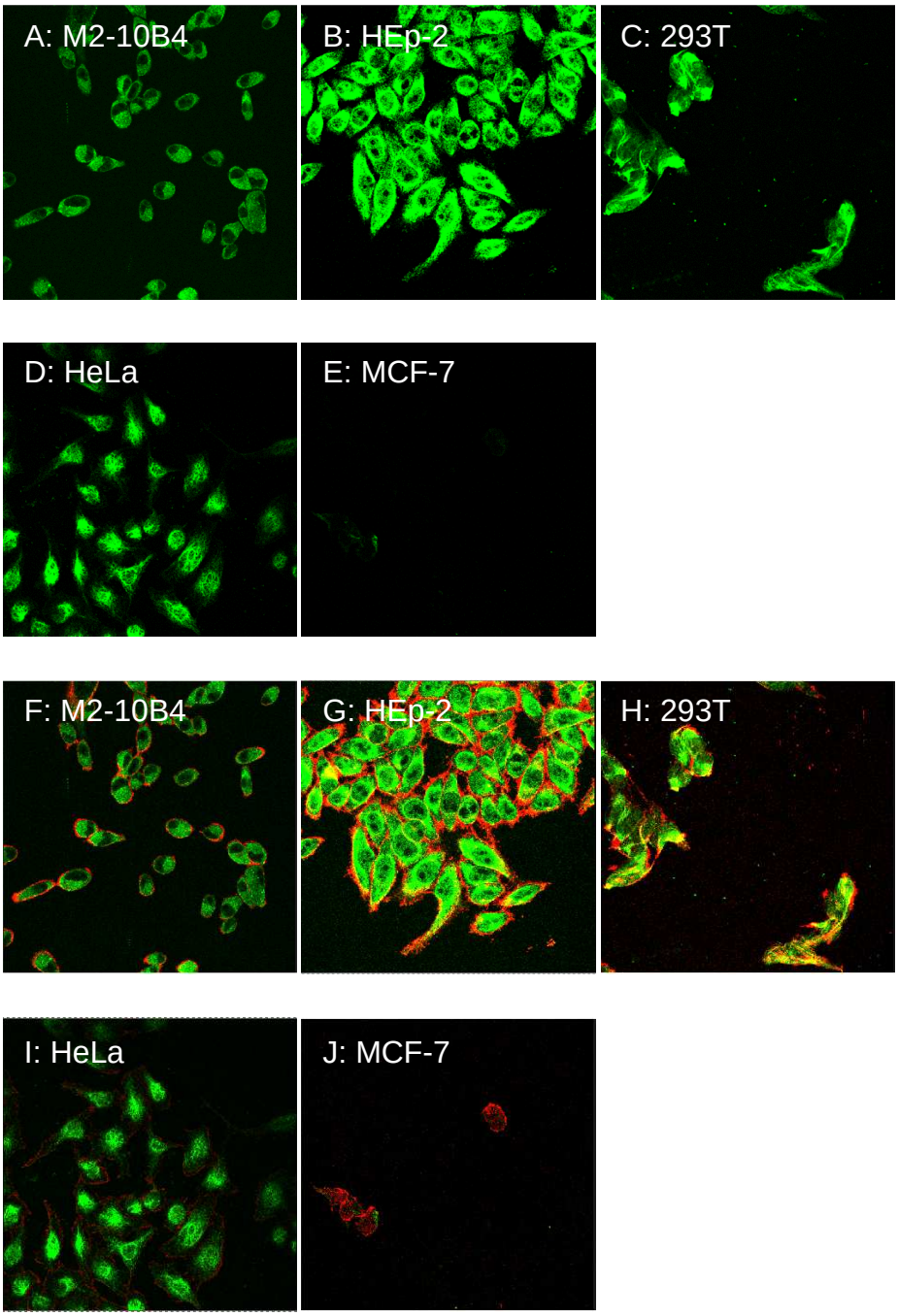


Abbildung 13: Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen der mit der Isotypenkontrolle Rituximab gefärbten HEp-2-Zellen. Die Abbildungen **A** und **B** zeigen die antikörpervermittelten FITC-Färbungen mit einer Konzentration von 200µg/ml Rituximab (**A**) bzw. 75µg/ml Rituximab (**B**). Die Färbungen **C** und **D** den Overlay der FITC- und der Phalloidinfärbungen mit 200µg/ml (**C**) bzw. 75µg/ml Rituximab (**D**).

3.3.5 Färbemuster des anti-Vimentin-Antikörpers

Der als Positivkontrolle eingesetzte anti-Vimentin-Antikörper zeigte bei allen Zelllinien, außer bei MCF-7, eine starke Färbung. Charakterisiert war sie durch ein spiralförmig-zytoplasmatisches Färbemuster, das in der perinukleären Region am deutlichsten ausgeprägt war. Da MCF-7-Zellen kein Vimentin produzieren, erklärt sich das negative Ergebnis dieser Zelllinie (Abb. 14).



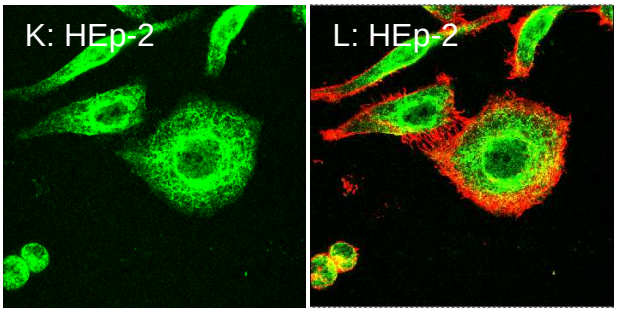


Abbildung 14: Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen der fünf mit der Positivkontrolle anti-Vimentin-Antikörper gefärbten Zelllinien. Die Abbildungen **A-E** zeigen die antikörpervermittelten FITC-Färbungen und die Abbildungen **F-J** den Overlay der FITC- und der Phalloidinfärbungen. **K** und **L** zeigen einen vergrößerten Bildausschnitt von HEp-2-Zellen mit FITC-Färbung (**K**) bzw. den Overlay (**L**).

.

3.3.6 Färbemuster des Sekundärantikörpers anti-human-IgG

Der FITC-gekoppelte Sekundärantikörper zeigte ohne Primär-Ak erwartungsgemäß keine Färbung (Abb. 15) und wurde nach der Austitration (vergleiche 3.3.2.3) in der jeweils für eine bestimmte Zelllinie optimierten Konzentration appliziert (vergleiche Tab. 5).

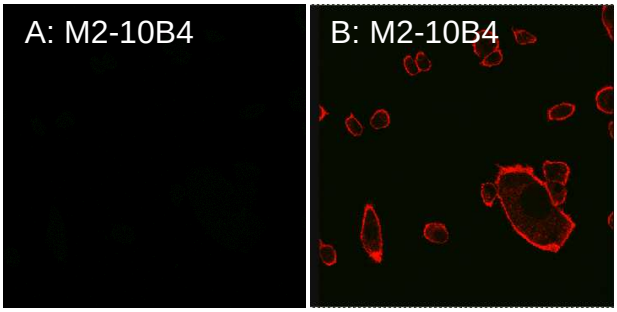


Abbildung 15: Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen der mit dem Sekundärantikörper gefärbten Zelllinien. Exemplarisch gezeigt werden M2-10B4-Zellen. Die Abbildung **A** ist FITC-gefärbt und die Abbildung **B** zeigt den Overlay der FITC- und der Phalloidinfärbungen.

In Tabelle 5 sind noch einmal die Ergebnisse mit Färbemustern, allen Konzentrationen, sowie die Verdünnungen der Sekundärantikörper dargestellt.

Tabelle 5: Übersicht und Zusammenfassung aller Färbungen. Die Legende ist wie folgt zu lesen: **-** = negativ, **+** = schwach positiv, **++** = positiv, **+++** = stark positiv. Das Verhältnis in der Zeile „Sekundärantikörper“ gibt die jeweilige Verdünnung derselben an.

	M2-10B4	HEp-2	293T	HeLa	MCF-7
Rituximab 200µg/ml	-	-	-	-	-
Rituximab 75µg/ml	-	-	-	-	-
Sekundär-antikörper	- 1:800	- 1:2500	- 1:800	- 1:2500	- 1:2500
anti-Vimentin-Antikörper 20µg/ml	+++ zytoplasma-tisch	+++ zytoplasma-tisch	+ zytoplasma-tisch	+++ zytoplasma-tisch	-
Ig014 200µg/ml	+ zytoplasma-tisch	+ zytoplasma-tisch	+ zytoplasma-tisch	+ zytoplasma-tisch	+ zytoplasma -tisch
Ig015 200µg/ml	-	-	-	-	-
Ig022 200µg/ml	-	-	-	-	-
Ig023 200µg/ml	-	-	-	-	-
Ig024 75µg/ml	++ zytoplasma-tisch, wenig nukleär mit Nucleoli-Aussparung	++ zytoplasma-tisch, wenig nukleär mit Nucleoli-Aussparung	+ zytoplasma-tisch, wenig nukleär mit Nucleoli-Aussparung	++ zytoplasma-tisch, wenig nukleär mit Nucleoli-Aussparung	+ zytoplasma -tisch
Ig025 200µg/ml	+ zytoplasma-tisch	+ zytoplasma-tisch	-	-	+ zytoplasma -tisch

3.3.7 Färbemuster der Tissue microarrays

Die Tissue microarrays wurden mit den Antikörpern Ig014, Ig022 und Ig024 gefärbt um Hinweise darauf zu erhalten, ob diese Immunglobuline Autoantigene in bestimmten Geweben erkennen. Die CLL-Antikörper wurden nicht in ihrer ursprünglichen Form verwendet, sondern als chimärer Huhn/Human-Antikörper, um einen anti-Huhn-Sekundärantikörper verwenden zu können, der weniger

unspezifische Hintergrundfärbung erzeugen sollte. Hierbei zeigte das CLL-Immunglobulin Ig014 ein beinahe ubiquitäres und diffuses Färbemuster, in welchem allerdings kein Zelltyp abgrenzbar war. Der Ig022 zeigte keine Anfärbung und der Ig024 ebenfalls ein diffuses, nukleäres Expressionsmuster ohne mögliche Zellabgrenzung in einigen Geweben.

Auf keinem der getesteten Gewebe (vergleiche 2.1.5) zeigte sich ein spezifisches Färbemuster, welches eine Abgrenzung der Zellkompartimente und eine Aussage zum Bindungsverhalten der Ak zuließ. Auch nach unterschiedlichen Vorbehandlungen der Gewebe (vergleiche Punkt 2.2.8) und intensivem Betrachten zeigte sich eine leichte, diffuse, unspezifische Braunfärbung aller zellulären Bestandteile. Abb. 16 zeigt exemplarisch eine Färbung mit Ig024 an Nierenrindengewebe.

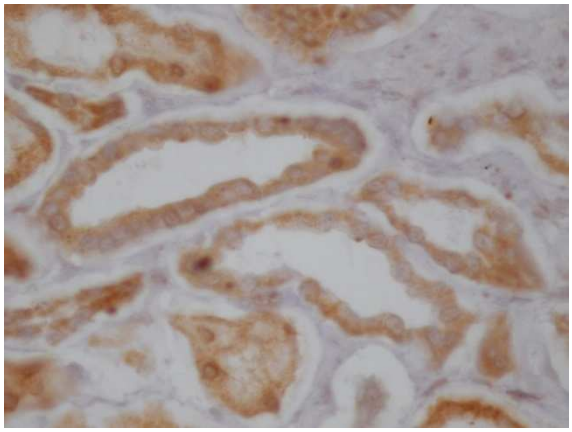


Abbildung 16: Färbung von Nierenrindengewebe mit chimärem Ig024. Das Bild zeigt einen Ausschnitt einer TMA-Färbung von Nierenrindengewebe. Es ist eine diffuse, unspezifische Braunfärbung zu erkennen. Einzelne Zellstrukturen oder –kompartimente lassen sich nicht mit Sicherheit abgrenzen.

4 Diskussion

4.1 Übersicht

Die chronisch lymphatische Leukämie ist die häufigste Leukämieform der westlichen Welt und kann bis heute leider meist nur in palliativer Absicht therapiert werden. Neue, potentiell kurative Therapiestrategien müssen daher an dem bisher noch unzureichenden Verständnis der Pathogenese ansetzen. In diesem Zusammenhang verdichten sich die Hinweise, dass der B-Zell-Rezeptor eine wichtige Rolle spielen könnte. So zeigt sich zum Beispiel, dass ein Erkennen von mehreren Epitopen durch den BCR mit einem aggressiveren klinischen Verlauf der CLL korreliert[3]. In dieser Arbeit sollten Interaktionen zwischen dem BCR und Autoantigenen mittels immunhistochemischer Färbungen untersucht werden. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der Methodenetablierung und der Färbung der Zelllinien M2-10B4, HEp-2, 293T, HeLa und MCF-7 mit den CLL-Antikörpern von sechs Patienten (Ig014, Ig015, Ig022, Ig023, Ig024, Ig025).

Der Ig014 zeigt auf allen getesteten Zelllinien eine schwach positive, zytoplasmatische Färbung. Ähnlich verhält es sich mit dem Ig025, allerdings nur bei den M2-10B4-, HEp-2- und MCF-7-Zellen. Der CLL-Antikörper Ig024 liefert hier die interessantesten Ergebnisse. Positiv angefärbt werden konnten: M2-10B4, HEp-2 und HeLa. 293T und MCF-7 zeigten ein weniger ausgeprägtes, aber positives Färbemuster. Alle Zelllinien, außer MCF-7, wiesen eine dominante zytoplasmatische Färbung und eine weniger ausgeprägte Färbung des Nukleus auf. Im Nukleus fiel eine Aussparung der Nukleoli auf. MCF-7 wies ausschließlich eine Anfärbung des Zytoplasmas auf. Mit Ig015, Ig022 und Ig023 konnten keine positiven Anfärbungen der getesteten Zelllinien erzielt werden.

Es konnte dargestellt werden, dass die CLL-Antikörper zu unterschiedlichen Expressionsmustern führten. Hier konnte zwischen Ak unterschieden werden, die lediglich eine zytoplasmatische bzw. eine nukleäre Färbung zeigten und solchen, die beide Zellkompartimente färbten. Indirekte Rückschlüsse auf subzelluläre Strukturen lassen sich zum Beispiel durch zytoplasmatische Anfärbungen ziehen, wobei diese auf eine Interaktion zwischen CLL-Ak und Strukturproteinen hinweisen.

Es zeigt sich anhand der vorliegenden Daten, dass sich Antigene in den getesteten Zelllinien befinden. Diese entscheidende Erkenntnis bildet die Grundlage für die weitere Antigen-Identifikation.

Anhand von Vimentin soll diese Interaktion in den folgenden Abschnitten näher betrachtet werden.

Im Folgenden soll diskutiert werden, wie diese Untersuchungen optimiert werden könnten und es soll ein Ausblick gegeben werden, wie dies zum besseren Verständnis der Erkrankung beitragen könnte. Zusätzlich soll diskutiert werden wie dieser Wissenszuwachs in Zukunft zur Verbesserung der Therapie genutzt werden könnte.

In der Immunhistochemie der Tissue microarrays zeigte der Ig014 eine unspezifische, beinahe ubiquitäre Färbung. Der Ig022 zeigte eine negative Anfärbung und der Ig024 ein unspezifisches, nukleäres Expressionsmuster in einigen Geweben. Unspezifisch ist, in diesem Zusammenhang, als fehlende Möglichkeit der Zelltypendifferenzierung definiert. Die Färbungen ergeben somit keinen konkreten Hinweis auf die Autoantigenerkennung in bestimmten humanen Geweben, zumindest in paraffineingebetteter Form derselben.

4.2 Kritische Bewertung der Methoden und Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit bestand aus einer Vielzahl an einzelnen methodischen Schritten, woraus sich auch eine Vielzahl an potentiellen Fehlerquellen ergab. Es soll zunächst auf die in-vitro-Färbungen der fünf Zelllinien bzw. das Anzüchten der Zelllinien eingegangen werden. Die zu färbenden Zellen wuchsen unterschiedlich stark adhärent und daher ergaben sich bei den 293T-Zellen Schwierigkeiten mit der Fixierung. Als weitere Herausforderung erwies sich, dass die Zellen einen Monolayer, also einen einschichtigen Zellrasen, bilden sollten, aber jede Zelle auch die für diese Zelllinie typische Morphologie aufweisen sollte. Es konnte allerdings vorkommen, dass mehrere Zellschichten übereinander wuchsen bevor das charakteristische Aussehen erreicht war. Es musste nun eine angemessene „Erntezeit“ gewählt werden, um einen entsprechenden Kompromiss zwischen beiden Anforderungen zu finden. Mehrere übereinander gewachsene Zellen

konnten die Färbungen ebenso wie eine atypische Morphologie bzw. Zellen in unterschiedlichen Reifestadien beeinflussen und verfälschen.

Allerdings zeigen unsere Untersuchungen, welcher B-Zell-Rezeptor mit Antigenen welcher Zelllinie spezifisch interagiert, was die Grundlage für eine zukünftige Antigenidentifizierung bildet. So könnten in zukünftigen Untersuchungen Zelllysate verwendet werden, um potentielle Antigene besser ermitteln und genauer untersuchen zu können. Die einzelnen Lysate könnten per Western Blot, Immunpräzipitation (IP) oder Reverse phase protein lysate microarrays (RPMA) untersucht werden und somit genauere Aussagen zum Antigen getroffen werden, als bei der Anfärbung einer intakten Zelle[43]. Anschließend könnte die Antigenidentifikation per Massenspektrometer fortgeführt werden.

Insbesondere der Ig024 zeigt ein repetitives Erkennungsmuster von verschiedenen Zellkompartimenten. Ob es sich um ein im Nukleus und im Zytoplasma vorliegendes Protein handelt oder um verschiedene Antigene kann nur in anschließenden Untersuchungen geklärt werden. Somit kann zum Grad der Polyreaktivität keine Aussage getroffen werden. Entsprechend Binder et al. korreliert das Ausmaß der Polyreaktivität mit einem mehr oder weniger aggressiven klinischen Verlauf[3]. Sollte sich also zeigen, dass das Bindungsverhalten von Ig024 polyreaktiv ist, könnten die vorliegenden Ergebnisse für die „Theorie des Antigenic Drive“ sprechen, die in den letzten Jahren vielfach postuliert wurde[50]. Dies bedeutet, dass eine persistierende Stimulation zur Entartung einer B-Zelle führen könnte und so entscheidend zur Entstehung und Aufrechterhaltung der chronisch lymphatischen Leukämie beitragen würde. Polyreaktive BCR führen mit erhöhter Wahrscheinlichkeit zu einer Stimulation und an dieser Stelle könnte der aggressivere klinische Verlauf des Patienten, von dem Ig024 ursprünglich stammt, für den Antigenic Drive sprechen. Selbstverständlich lassen sich anhand eines rekombinanten Ak keine validen Rückschlüsse ziehen. Allerdings zeigt sich ein interessanter Ansatzpunkt auf.

Interessant ist auch, dass sich CLL-B-Zellen in vitro nicht kultivieren lassen und ex vivo schnell absterben, u.a. da sie Stromazellen des Knochenmarks und des Blutes zur Protektion vor spontaner Apoptose benötigen. Falls die Stromazellen also Antigene präsentieren, könnte auf diesem Wege die ständige, für die CLL-Zellen elementare Antigenstimulation gewährleistet werden. Vimentin, ein

zytoskelettales Protein der Klasse III in Zellen mesenchymaler Herkunft, ist in diesem Zusammenhang ein wichtiges Protein. Es konnte sowohl in Stromazellen als auch an der Oberfläche von diesen lokalisiert werden und die Überlebenszeit von CLL-Zellen konnte durch Blockierung des Vimentins signifikant verkürzt werden. Es wurde veröffentlicht, dass Ig014 Vimentin als Antigen erkennt[2]. In dieser Arbeit zeigte Ig014 auf allen Zelllinien ein positives Färbemuster von ähnlicher Intensität. Dass MCF-7-Zellen, welche als einzige Zellen kein Vimentin exprimieren, erkannt wurden, muss dieser Annahme nicht widersprechen, da selbstverständlich auch andere Strukturen erkannt werden können[6,27,50]. Für die weitere Charakterisierung von durch Ig014 erkannten Antigenen könnte in Zukunft mit Lysaten der MCF-7-Zellen gearbeitet werden, um andere potentielle Antigene zu identifizieren. Neben Vimentin wurden weitere Proteine, wie Myosin, als Autoantigene für BCR veröffentlicht[8].

Auch bei der Immunhistochemie der TMA bestehen viele potentielle Fehlerquellen. Durch die Fixierung mit Formalin kann es zu einer Maskierung der Epitope kommen. Sollten diese durch die verschiedenen Maßnahmen, wie etwa Proteolyse oder Erhitzen in einer Mikrowelle, nicht wieder demaskiert werden können, bleiben sie für die Antikörper unerkennbar. Die Demaskierung kann allerdings zu Veränderungen der Morphologie führen.

Die diffuse, nahezu ubiquitäre Färbung im TMA durch den Ig014 kann verschiedene Ursachen haben. Eine mögliche unspezifische Anfärbung durch den Sekundärantikörper wurde ausgeschlossen. Solche Färbemuster können jedoch auch aus starker Kreuzreaktivität des primären Antikörpers oder inkompletter Entparaffinierung resultieren. Der Ig022 erkennt in unseren Färbungen keine Strukturen, dies liegt vermutlich an dem Antikörper selbst und bestätigt sich bei den Färbungen der Zelllinien. Die diffuse, nukleäre Färbung des Ig024 könnte ihre Ursache ebenfalls in Problemen bei der Entparaffinierung und der Demaskierung der Epitope haben.

Es gilt als bewiesen, dass der Ig014 in humaner Form Vimentin als Antigen erkennt[2], was aber nicht in der im TMA eingesetzten chimären Huhn/Human-Form bestätigt werden konnte, da sich hierbei keine spezifische Färbung zeigte, Vimentin aber in allen Geweben exprimiert wird. Offensichtlich weicht das Bindungsverhalten in diesem neuen Kontext von dem ursprünglichen ab. Ein

neuer möglicher Ansatzpunkt wären immunhistochemische TMA-Färbungen in einem Maus/Human-Modell. Es könnten chimäre Antikörper mit murinem F_c-Teil und humanem F_{ab}-Teil verwendet werden. Als Sekundärantikörper würde ein anti-Maus-Ak verwendet, welcher zu geringeren unspezifischen Hintergrundfärbungen auf humanem Gewebe führen sollte. Die Hoffnung dabei wäre, dass die Bindungseigenschaften im Maus/Human-Modell weniger von denen der humanen Form abweichen als sie es im Huhn/Human-Modell taten.

Nach Abschluss der Experimente dieser Arbeit kam der Verdacht auf, dass das verwendete FCS größere Mengen Rinderimmunglobuline enthielt und diese, ebenso wie die CLL-Ak, bei der Aufreinigung an die Protein-A-Sepharose-Säule gebunden haben. Sollte sich diese Vermutung bestätigen, lagen die CLL-BCR möglicherweise in deutlich kleinerer Konzentration vor als angenommen. Diese Abweichung könnte entscheidende Auswirkungen auf die Expressionsmuster bzw. auf die Färbeintensität der BCR gehabt haben.

Die Hypothese der Rinderimmunglobulinkontamination sollte in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

4.3 Betrachtung der Ergebnisse im Kontext der Literatur

Die antigenvermittelte Aktivierung einer B-Zelle über den BCR kann z.B. durch bakterielle Oberflächenproteine oder aber durch körpereigenes Gewebe stattfinden. Diese Aktivierung kann sowohl zur Apoptose als auch zur Proliferation der jeweiligen B-Zelle führen[7]. Bei Autoimmunreaktivität wäre das gezielte Absterben wünschenswert, tritt allerdings nicht immer ein. Eine Aktivierung des BCR durch Antigene bei der Pathogenese der CLL könnte man sich folgendermaßen vorstellen. Wenn eine B-Zelle über ihren BCR organismuseigenes Gewebe erkennt und so aktiviert wird sollte sie eigentlich in nachfolgenden Prozessen eliminiert werden. Sollte die Zelle diesen Prozess, z.B. durch Expression anti-apoptotischer Gene, umgehen können, so wird sie aufgrund der BCR-Aktivierung proliferieren und ihre Tochterzellen mit identischem BCR[29] werden wiederum durch das identische körpereigene Gewebe aktiviert und vermehren sich. Diese monoklonale Expansion könnte dann durch Akquise weiterer Mutationen in die maligne Transformation münden. Welche molekulare

Kaskade in Gang gesetzt wird und die genauen zugrundeliegenden Mechanismen sind leider noch unbekannt. Es wurde publiziert, dass CLL-B-Zellen verschiedener Patienten ein ähnliches und limitiertes Antikörperrepertoire exprimieren und die Anordnung der V-/(D-)/J-Segmente große Ähnlichkeit aufweist, obwohl diese Segmente eigentlich sehr variabel sind[15,17,21,24,39].

Die Autoreaktivität von CLL-BCR wurde in diversen Arbeiten immunhistochemisch untersucht. Die Arbeitsgruppe um Hervé unterscheidet, nach dem Grad der somatischen Hypermutation, zwischen unmutierten und mutierten B-Zellen bzw. deren Antikörper und macht deutlich, dass es gravierende Unterschiede in der Polyreaktivität gibt. In der Arbeit von Hervé wurden HEp-2-Zellen immunhistochemisch gefärbt und die Reaktivität mittels ELISA geprüft. Unmutierte Zellen zeigten eine erhöhte Polyreaktivität und sowohl ein zytoplasmatisches als auch ein nukleäres Färbemuster, während mutierte B-Zellen weniger potentielle Antigene erkannten, also weniger polyreaktiv waren und eher zu einer ausschließlich zytoplasmatischen Anfärbung führten[19]. Für die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper gilt: alle V_H tragen den Status unmutiert, alle V_L den Status unmutiert, außer Ig023 (vergleiche Tab. 3 und Tab. 4). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen in Teilen die von Hervé, andererseits kommt es zu teils abweichenden Resultaten. Einige Antikörper zeigten keinerlei Färbung (Ig015, Ig022, Ig023), andere (Ig014, Ig025) zeigten, vom Status her unmutiert, nur eine zytoplasmatische Anfärbung. Der unmutierte Antikörper Ig024 zeigt sowohl eine zytoplasmatische als auch eine nukleäre Färbung. Interessant ist, dass der Ig024 als reaktivster Antikörper auch klinisch mit einem schlechteren Verlauf assoziiert war. Das stärker ausgeprägte Erkennen von Epitopen geht mit einem aggressiveren klinischen Verlauf (gemessen an der Zeit von Diagnosestellung bis zur ersten Therapie, sog. „Time to first treatment“) einher[3].

Die vermehrte Nutzung von Tissue microarrays in der Hämato-/Onkologie hat sich im Laufe der letzten Jahre rasant entwickelt[42]. Allerdings wurden TMA bevorzugt in der Diagnostik und auf der Suche nach prognostischen Parametern, wie etwa der Expression von bestimmten Oberflächenproteinen, verwandt. Wie bereits erwähnt, lassen sich mit diesem Verfahren relativ schnell und kostengünstig große Mengen an Proben testen[28,30,36]. Zu Untersuchungen der Pathogenese der CLL und zur Interaktion des B-Zell-Rezeptors mit potentiellen (Auto-)Antigenen finden

sich im Kontext der internationalen Literatur kaum Veröffentlichungen. Eben aus diesem Grunde sind Untersuchungen zum Bindungsverhalten von CLL-Antikörper an einer Vielzahl von gesunden und entarteten Geweben ein sehr interessanter Ansatz. Sie sollten daher auch in Zukunft, unter optimierten Bedingungen, weiter verfolgt werden, um befriedigendere Ergebnisse zu erzielen als sie in der vorliegenden Arbeit erreichbar waren. In diesem Rahmen wäre das oben bereits erwähnte Mausmodell ein möglicher Ansatz.

4.4 Perspektiven

Die CLL ist eine sehr heterogene Krankheitsgruppe. Faktoren, wie bspw. der Mutationsstatus der IGHV oder die individuelle HCDR3-Region, können für den Patienten große Unterschiede für die Prognose bedeuten. Individualisierung wird voraussichtlich zukünftig in der Therapie eine noch größere Rolle spielen. Unter anderem gilt es, die Hochrisikopatienten von denjenigen zu unterscheiden, die durch eine frühe Therapieaufnahme kein besseres Outcome erwarten. Ein weiteres Ziel ist eine spezifische Behandlung mit möglichst wenig therapielimitierenden Nebenwirkungen, die im Idealfall zu einer anhaltenden kompletten Remission führt. Für die Entwicklung solcher Therapien könnte ein Schlüssel im Verständnis des Antigenic Drive liegen, wie es etwa bei den MALT-Lymphomen im Gastrointestinaltrakt und der Assoziation mit dem Bakterium Helicobacter pylori mit dessen Eradikation gezeigt werden konnte. Die Frage ist also, wie man die entarteten, monoklonalen B-Zellen spezifisch und effizient angreifen kann. Einerseits werden sicher in Zukunft noch mehr spezifische therapeutische Antikörper wie etwa Rituximab und Alemtuzumab[40] Anwendung finden und andererseits gibt es den BCR als potentiellen Angriffspunkt auf den nachfolgend genauer eingegangen werden soll. Ein Ansatz könnte die Kopplung von Chemotherapeutika wie Doxorubicin an selektierte epitopnachahmende Peptidliganden für den BCR sein und so die Einbringung der Zellgifte in genau jene klonale B-Zellen, welche theoretisch die einzigen Strukturen sind, die die Peptide erkennen. Arap et al. haben einen derartigen Ansatzpunkt anhand von humanen Brustkrebszellen gezeigt[1]. Als Transporter von inhibitorischer siRNA, die die Proteinexpression und somit die Proliferation der Tumorzellen vermindert, können spezifische Peptide ebenso genutzt werden, was anhand vom Rezeptor

ErbB-2 auf Mammakarzinomzelllinien gezeigt wurde[22,41]. Zudem wurde publiziert, dass das Mikromilieu durch anhaltende Antigenpräsentation zur Verhinderung der Apoptose beitragen könnte. So kommt es bei einem Absterben von NLC zu einer Freisetzung von potentiellen Antigenen wie bspw. Vimentin und nach neueren Erkenntnissen ist sogar eine aktive Sekretion möglich. Durch diese Informationen macht sich natürlich auch das Umfeld der B-CLL-Zellen etwa in Lymphknoten zu einem interessanten Angriffspunkt für neue Therapiestrategien[2].

Es sollte geklärt werden, ob sich ein autoreaktives Muster anhand der IHC-Färbungen zeigt. Für Ig014, Ig024 und Ig025 liegt ein solches, bei einzelnen Zelllinien, vor und kann zur Definition der Antigenquelle genutzt werden. Auf Basis dieser Erkenntnis können gezielte Untersuchungen an Zelllysaten folgen, da beweisen wurde, dass sich das Antigen bzw. die Antigene in den untersuchten Zelllinien befinden. Zur Untersuchung der Zelllysate könnten sowohl Western Blots und Immunpräzipitationen als auch TMA mit spezifischen Ak verwendet werden. Sofern sich der Grad an Reaktivität als klinischer Parameter etabliert, könnte er sogar zur Diagnostik und Prognosevorhersage genutzt werden.

5 Zusammenfassung

Die Grundlage zu dieser Arbeit bildet die Erkenntnis, dass der B-Zell-Rezeptor und seine Antigenstimulation vermutlich eine bedeutende Rolle in der Pathogenese und dem Verlauf der chronisch lymphatischen Leukämie einnehmen.

Die vorliegende Arbeit ist in zwei Versuchsteile untergliedert. Beide Teile untersuchen die Interaktion zwischen CLL-B-Zell-Rezeptoren und potentiellen Autoantigenen. Es sollte gezeigt werden, ob Strukturen auf zellulärer und/oder subzellulärer Ebene erkannt werden und sich die Färbemuster der Ak unterscheiden. Bei einem Teil handelt es sich um immunhistochemische Färbungen der Zelllinien M2-10B4, HEp-2, 293T, HeLa und MCF-7 mit rekombinanten B-Zellrezeptoren von sechs CLL-Patienten (Ig014, Ig015, Ig022, Ig023, Ig024, Ig025), die als primärer Antikörper der Färbung fungierten.

Für den anderen Teil der Arbeit wurden solche immunhistochemische Färbungen an Tissue microarrays unterschiedlicher humaner Gewebe angefertigt. Untersucht wurde das Bindungsverhalten des Ig014, des Ig022 und des Ig024, wobei die B-Zellrezeptoren alle in Form von Huhn/Human-Immunglobulinhybriden getestet wurden.

Bei der Anfärbung der Zellen zeigte der Ig014 auf allen Zelllinien ein zytoplasmatisches, schwach positives Färbemuster, der Ig024 eine unterschiedlich stark ausgeprägte, zytoplasmatische und nukleäre Anfärbung auf allen Zelllinien und der Ig025 markierte nur das Zytoplasma der M2-10B4-, der HEp-2- sowie der MCF-7-Zellen. Ig015, Ig022 und Ig023 erzeugten keine positive Färbung.

Bei der Immunhistochemie der TMA zeigte der Ig014 ein nahezu ubiquitäres, aber unspezifisches Expressionsmuster. Der Ig024 präsentierte in einigen Geweben eine unspezifische, nukleäre Färbung, wohingegen der Ig022 keine Anfärbung erzeugte. Trotz Einsatz eines anti-Huhn-Sekundärantikörpers zeigten die humanen Gewebe eine starke unspezifische Hintergrundfärbung.

Zusammenfassend konnte eine Interaktion zwischen CLL-BCR und Auto- und/oder potentiellen Neo-Antigenen gezeigt werden. Weitere Ergebnisse sind,

dass sich die BCR immunhistochemisch in ihrem Färbe- und damit Interaktionsmuster unterscheiden und sich anhand der Färbelokalisation Rückschlüsse auf zelluläre und subzelluläre Strukturen ziehen lassen. Somit besteht der Verdacht, dass ein Strukturprotein erkannt wird, welches sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus vorliegt, nicht jedoch die Nucleoli umspannt. Eine Erkennung von mehreren Proteinen kann allerdings anhand der vorliegenden Daten nicht ausgeschlossen werden.

Anhand dieser Arbeit war es möglich die getesteten Zelllinien als Antigenquellen zu definieren und es konnte gezeigt werden welcher BCR mit Antigenen welcher Zelllinie spezifisch interagiert. Diese Erkenntnisse dienen als Grundlage für die weitere Ag-Identifikation mittels Western Blot, Immunpräzipitation, TMA und Massenspektrometrie, wobei in zukünftigen Untersuchungen Zelllysate verwendet werden könnten.

6 Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
BCR	B-Zell-Rezeptor
BSA	Bovine Serum Albumin
B-CLL	Chronisch lymphatische Leukämie der B-Zellreihe
Ca	Carcinom
CD	Cluster of differentiation
CDR	Complementarity-determining region
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
DAPI	4’-6-Diamino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
F_{ab}	**A**ntigen**b**indendes Antikörperfragment
F_c	**K**onstantes Antikörperfragment
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HCDR	Heavy Complementarity-determining region
HRP	Horseradish Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IGHV	Immunglobulin Heavy Variable
IP	Immunpräzipitation

kDa	Kilo Dalton
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
Ni^{2+}-NTA-Agarose	Nickel-Nitriloessigsäure-Agarose
NLC	Nurse-like cells
OT	Objektträger
PBS	Phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
RPMA	Reverse phase protein lysate microarrays
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfate
TBS	Tris Buffered Saline
TBST	Tris Buffered Saline mit Tween
TMA	Tissue microarray
TRIS/Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
T-CLL	Chronisch lymphatische Leukämie der T-Zellreihe
V_H	Variable Heavy - variabler Teil der schweren Kette bei Antikörpern
V_L	Variable Light - variabler Teil der leichten Kette bei Antikörpern

7 Literaturverzeichnis

[1] Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E (1998) Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. Science Jan 16;**279**(5349):377-80.

[2] Binder M, Léchenne B, Ummanni R, Scharf C, Balabanov S, Trusch M, Schluter H, Braren I, Spillner E, Trepel M (2010) Stereotypical chronic lymphocytic leukemia B-cell receptors recognize survival promoting antigens on stromal cells. PLoS One **5**(12):e15992.

[3] Binder M, Müller F, Jackst A, Lechenne B, Pantic M, Bacher U, Zu Eulenburg C, Veelken H, Mertelsmann R, Pasqualini R, Arap W, Trepel M (2010) B-cell receptor epitope recognition correlates with the clinical course of chronic lymphocytic leukemia. Cancer **117**(9):1891-900.

[4] Böhm M, Hallek M, Schmiegel W (2009) Innere Medizin, 6. Auflage, Urban und Fischer Verlag, München.

[5] Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G (2001) Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. J Pathol **195**(1): 72-9.

[6] Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ (2000) Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. Blood **96**(8):2655-63.

[7] 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.

[8] Chu CC, Catera R,Hatzi K,Yan XJ, Zhang L, Wang XB, Fales HM, Allen SL, Kolitz JE, Rai KR, Chiorazzi N (2008) Chronic lymphocytic leukemia antibodies with a common stereotypic rearrangement recognize nonmuscle myosin heavy chain IIA. Blood **112**:5122-5129.

[9] Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D. Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N (1999) Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. Blood **94**(6): 1840-7.

[10] Damle RN, Batliwalla FM, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Sison C, Allen SL, Kolitz J, Vinciguerra VP, Kudalkar P, Wasil T, Rai KR, Ferrarini M, Gregersen PK,

Chiorazzi N (2004) Telomere length and telomerase activity delineate distinctive replicative features of the B-CLL subgroups defined by immunoglobulin V gene mutations. Blood **103**(2):375-82.

[11] Diehl LF, Karnell LH, Menck HR (1999) The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. The National Cancer Data Base report on age, gender, treatment, and outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia. Cancer **86**(12): 2684-92.

[12] Dighiero G, Hamblin T (2008) Chronic lymphocytic leukaemia. Lancet. **371**(9617): 1017-29.

[13] Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P (2000) Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med **343**(26): 1910-6.

[14] Edelman GM (1991) Antibody structure and molecular immunology. Scand J Immunol. **34**(1):1-22.

[15] Fais F, Ghiotto F, Hashimoto S, Sellars B, Valetto A, Allen SL, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai K, Rassenti LZ, Kipps TJ, Dighiero G, Schroeder HW Jr., Ferrarini M, Chiorazzi N (1998) Chronic lymphocytic leukemia B cells express restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. J Clin Invest. **102**(8): 1515-25.

[16] Fritschy JM, Härtig W (2001) Immunofluorescence. eLS.

[17] Ghiotto F, Fais F, Valetto A, Albesiano E, Hashimoto S, Dono M, Ikematsu H, Allen SL, Kolitz J, Rai KR, Nardini M, Tramontano A, Ferrarini M, Chiorazzi N (2004) Remarkably similar antigen receptors among a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. J Clin Invest. **113**(7):1008-16.

[18] Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK (1999) Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. Blood **94**(6): 1848-54.

[19] Herve M, Xu K, Ng YS, Wardemann H, Albesiano E, Messmer BT, 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**(6):1636-43.

[20] Invitrogen (2010) Datasheet pBudCE4.1. User Manual part no. 25-0389. Carlsbad, USA [Online im Internet] URL: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pbudce4_1man.pdf [Stand: 22.7.2011, 12:01].

[21] Johnson TA, Rassenti LZ, Kipps TJ (1997) Ig VH1 genes expressed in B cell chronic lymphocytic leukemia exhibit distinctive molecular features. J Immunol. **158**(1):235-46.

[22] Karasseva NG, Glinsky VV, Chen NX, Komatireddy R, Quinn TP (2002) Identification and characterization of peptides that bind human ErbB-2 selected from a bacteriophage display library. J Protein Chem **21**(4):287-96.

[23] Kern W, Diem H, Haferlach T (2005) Immunphänotypisierung in der modernen Leukämiediagnostik. Dtsch Med Wochenschr. **130**:215-219.

[24] Kipps TJ, Tomhave E, Pratt LF, Duffy S, Chen PP, Carson DA (1989) Developmentally restricted immunoglobulin heavy chain variable region gene expressed at high frequency in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A **86**(15):5913-7.

[25] Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, 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**(11): 1625-38.

[26] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998) Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. Nat Med. **4**(7):844-7.

[27] Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C, Stryckmans P (1998) Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. Blood **91**(7):2387-96.

[28] Leuenberger M, Frigerio S, Wild PJ, Noetzli F, Korol D, Zimmermann DR, Gengler C, Probst-Hensch NM, Moch H, Tinguely M (2009) AID protein expression in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma is associated with poor prognosis and complex genetic alterations. Mod Pathol. **23**(2):177-86.

[29] Levy R, Warnke R, Dorfman RF, Haimovich J (1977) The monoclonality of human B-cell lymphomas. J Exp Med. **145**(4):1014-28.

[30] Marjanović G, Dojčinov S (2005) Tissue microarray - a valuable method in diagnosis and prognosis of hematological malignances. Arch Oncol. **13**(3-4):131-5.

[31] Matejuk A, Beardall M, Xu Y, Tian Q, Phillips D, Alabyev B, Mannoor K, Chen C (2009) Exclusion of natural autoantibody-producing B cells from IgG memory B cell compartment during T cell-dependent immune responses. J Immunol **182**(12): 7634-43.

[32] Meffre E, Schaefer A, Wardemann H, Wilson P, Davis E, Nussenzweig MC (2004) Surrogate light chain expressing human peripheral B cells produce self-reactive antibodies. J Exp Med. **199**(1):145-50.

[33] Mitrou PS, Länger F (2000) Atlas der Knochenmark-Neoplasien, TUZ Rhein-Main e.V, Frankfurt/Main.

[34] Murphy K, Travers P, Walport M (2009) Janeway Immunologie, 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

[35] 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**(3):1524-33.

[36] Obermann EC, Marienhagen J, Stoehr R, Wuensch PH, Hofstaedter F (2005) Tissue microarray construction from bone marrow biopsies. Biotechniques **39**(6): 822-26.

[37] Ramsland PA, Farrugia W (2002) Crystal structures of human antibodies: a detailed and unfinished tapestry of immunoglobulin gene products. J Mol Recognit. **15**(5):248-59.

[38] Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, Simon R, Davis RE, Yu X, Yang L, Pickeral OK, Rassenti LZ, Powell J, Botstein D, Byrd JC, Grever MR, Cheson BD, Chiorazzi N, Wilson WH, Kipps TJ, Brown PO, Staudt LM (2001) Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. J Exp Med. **194**(11):1639-47.

[39] Schroeder HW Jr., Dighiero G (1994) The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia: analysis of the antibody repertoire. Immunol Today **15**(6):288-94.

[40] Schweighofer CD, Ritgen M, Eichhorst BF, Busch R, Abenhardt W, Kneba M, Hallek M, Wendtner CM (2009) Consolidation with alemtuzumab improves progression-free survival in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL) in first remission: long-term follow-up of a randomized phase III trial of the German CLL Study Group (GCLLSG). Br J Haematol. **144**(1):95-8.

[41] Shadidi M, Sioud M (2003) Identification of novel carrier peptides for the specific delivery of therapeutics into cancer cells. FASEB J **17**(2):256-8.

[42] Simon R, Sauter G (2002) Tissue microarrays for miniaturized high-throughput molecular profiling of tumors. Exp Hematol. **30**(12):1365-72.

[43] Spurrier B, Ramalingam S, Nishizuka S (2008) Reverse-phase protein lysate microarrays for cell signaling analysis. Nat Protoc **3**(11): 1796-808.

[44] 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**(1):259-70.

[45] Thompson JF (2010) Human A&P Lecture Sections. Clarksville, USA [Online im Internet] URL: http://apbrwww5.apsu.edu/thompsonj/Anatomy%20&%20Physiology/2020/2020%20Exam%20Reviews/Exam%202/CH21%20antibody_structure-giant-diagram.htm [Stand: 04.01.2012, 13.15].

[46] Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC (2003) Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. Science **301**(5638):1374-7.

[47] Went PT, Dirnhofer S, Bundi M, Mirlacher , Schraml P, Mangialaio S, Dimitrijevic S, Kononen J, Lugli A, Simon R, Sauter G (2004) Prevalence of KIT Expression in Human Tumors. J Clin Oncol 22:4514-4522.

[48] Wong SE, Sellers BD, Jacobson MP (2010) Effects of somatic mutations on CDR loop flexibility during affinity maturation. Proteins **79**(3):821-9.

[49] Yee KW, O'Brien SM (2006) Chronic lymphocytic leukemia: diagnosis and treatment. Mayo Clin Proc **81**(8): 1105-29.

[50] Zenz T, Mertens D, Kuppers R, Dohner H, Stilgenbauer S (2010) From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. Nat Rev Cancer **10**(1):37-50.

8 Danksagung

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Trepel, möchte ich herzlich für ein spannendes Forschungsjahr in der Hämato-/Onkologie, für die zahlreichen Diskussionen und wertvollen Ratschläge danken.

Herzlichen Dank an Frau PD Dr. med. Mascha Binder für die Betreuung meiner Arbeit.

Ganz herzlich danke ich der gesamten Arbeitsgruppe, insbesondere Barbara und Agnes, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Simon des Instituts für Pathologie am UKE für die gute Zusammenarbeit im Rahmen der TMA-Untersuchungen.

Ich danke meinen Eltern von ganzem Herzen für all die Liebe und Unterstützung. Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Jan, danke für alles und touched the ground but never went down.

Soraya, ich bin Dir unendlich dankbar für Deine Geduld, Deine Aufbauarbeit und all Deine Kraft über die letzten Jahre.

Meiner WG und allen Freunden danke ich für eine fantastische Zeit und einen gemeinsamen Übergang in die Arbeitswelt.

9 Lebenslauf

10 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.

Unterschrift: .....