

**Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin III
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. Hartmut Döhner**

**Analyse neuer Antikörper gegen immunogene
Leukämie-Antigene**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
Matthias Demmler
geb. in Chemnitz

2010

Amtierender Dekan : Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth
1. Berichterstatter : PD Dr. med. Mark Ringhoffer
2. Berichterstatter : Prof. Dr. med. Daniel Walcher
Tag der Promotion : 18. November 2010

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Akute Myeloische Leukämie (AML)	1
1.1.1 Definition und Klassifikation	1
1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie	4
1.1.3 Symptomatik und klinischer Verlauf	4
1.1.4 Diagnostik	5
1.1.5 Therapie der AML	6
1.2 Leukämie-assoziierte Antigene bei Leukämie	9
1.2.1 RHAMM (Rezeptor für Hyaluronsäure vermittelte Motilität) ...	9
1.2.2 G250	11
1.2.3 WT1	12
1.2.4 Proteinase3 – PR1	12
1.2.5 PRAME	13
1.3 Ansätze für Peptidvakzinierung	14
1.4 Ziel der Arbeit	16
2. MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Grundausrüstung	17
2.1.1 Allgemeine Laborgeräte	17
2.1.2 Plastikwaren	18
2.1.3 Spezielle Chemikalien und Antikörper	19
2.2 Puffer	20
2.3 Zelllinien	21
2.4 Kulturmedien	21
2.5 Antikörper	22
2.6 Patienten	22
2.7 Materialgewinnung und Probenaufbereitung	23
2.7.1 Materialgewinnung	23
2.7.2 Zellisolation und Zellarchivierung	23
2.8 FACS-Analyse	24

2.8.1	Durchflusszytometrie	24
2.8.2	Intra- und extrazelluläre Färbung	26
2.9	Immunhistochemie / Zytospin.....	28
2.10	Statistische Methoden	29
3.	<u>ERGEBNISSE</u>	30
3.1	Ermittlung der Antikörper-Konzentration im Durchflusszyto- meter	31
3.2	Definition der Isotypkontrolle	31
3.3	Charakterisierung von Zelllinien	32
3.3.1.	Expression der LAA G250 und RHAMM auf Proteinebene.....	32
3.3.2	Korrespondierende Negativkontrollen	37
3.4	Analyse von myeloischen Blasten in Patienten mit AML	40
4.	<u>DISKUSSION</u>	48
4.1	Grundlagen der Therapie bei Patienten mit AML	48
4.2	Ansatz einer LAA-gerichteten Immuntherapie bei der AML	49
4.3	Bedeutung der untersuchten LAAs RHAMM und G250	50
4.4	Untersuchungen der Expression von G250 und RHAMM in Zelllinien	51
4.5	Analyse der Blutproben von AML-Patienten	53
5.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	55
6.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	57
7.	<u>DANKSAGUNG</u>	65

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
AL	Akute Leukämie
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ANCA	Antineutrophile-Zytoplasmatische Autoantikörper
CA	Carboanhydrase
CA-RPs	Carboanhydraseverwandte Proteine
CD	Cluster of Differentiation
CG-Ag	Cancer-Germline-Antigen
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CMPS	Chronisches Myeloproliferatives Syndrom
CR	Komplette Remission
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
BSA	Albumin bovine Fraction
DA	Daunorubicin + Cytarabin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
erk	Extrazelluläre regulierte Kinase
et al.	et alii, und andere
EU	Europäische Union
extra	Extrazellulär
Fa.	Firma
FAB	French-American-British-(Group-classification)
FACS	Durchflusszytometer (fluorescence activated cell sorter)
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forwardscatter
GO	Gemtuzumab Ozogamicin
GvHD	Graft versus Host disease, Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion

GvL-Effekt	Graft-versus-Leukemia-Effekt
h	Stunde
HABP	Hyaluronic acid binding protein
HER2	Human epidermal growth receptor 2
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen (human leucocyte antigen)
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
HV	Gesunder Patient (healthy volunteer)
IA	Idarubicin + Arabinosid C (Chemotherapie-Schema)
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
intra	Intrazellulär
ISO	Isotypkontrolle
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
LAA	Leukämie-assoziiertes Antigen
LICR	Ludwig Institute for Cancer Research
MA	Mitoxantrone + Arabinosid C
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex)
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
MLPC	Gemischte Lymphozyten-Peptid-Kultur (mixed lymphocyte peptide culture)
MRD	Minimal residual disease (Minimale Resterkrankung)
NY	New York-Antikörper
Nr.	Nummer
Pat.	Patient
Pat.-Nr.	Patientennummer
PB	Peripheres Blut
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cell)

PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
pH	pH-Wert (Pondus/ Potentia Hydrogenii)
PR3	Proteinase 3
PRAME	Preferentially expressed antigen of melanoma
PR	Proteinase
P/S	Penicillin/ Streptomycin
RCC	Renal cell carcinoma
RHAMM	Rezeptor für Hyaluronsäure vermittelte Motilität (Receptor for hyaluronic acid mediated motility)
RT	Raumtemperatur
SSC	Sidewardscatter
SZT	Stammzelltransplantation
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor (T cell receptor)
U/min	Umdrehungen pro Minute
WHO	World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation
WT-1	Wilms Tumorsuppressorgen WT-1
z.T.	Zum Teil

1. EINLEITUNG

1.1 Akute Myeloische Leukämie (AML)

1.1.1. Definition und Klassifikation

Akute Leukämien (AL) sind klonale Erkrankungen von Vorläuferzellen der Myelopoese oder Lymphopoese. Diese sind durch eine Vermehrung von Blasten in Knochenmark, zirkulierendem Blut und gegebenenfalls auch in anderen Organen (Milz, Leber) mit Verdrängung der normalen Blutbildung charakterisiert.

Häufig ist die hämatopoetische Insuffizienz mit Granulozytopenie, Anämie und Thrombozytopenie für die initiale Symptomatik verantwortlich und führt ohne spezifische Therapie meist innerhalb weniger Wochen bis Monate zum Tode. Akute Leukämien treten in allen Altersstufen auf. Über 90 % der akuten Leukämien im Kindesalter sind akute lymphatische Leukämien (ALL), während akute myeloische Leukämien (AML) mit ihren Unterformen mit einem Anteil von ca. 80 % häufiger im Erwachsenenalter sind. Etwa die Hälfte aller Patienten mit AML ist über 60 Jahre alt.

Zunehmend werden akute Leukämien nach erfolgreicher Chemo/Strahlentherapie anderer maligner Erkrankungen diagnostiziert (therapieassoziierte Leukämie). Hierbei handelt es sich meist um myeloische Leukämien. Im Vergleich zu den *de novo* auftretenden akuten Leukämien ist ihr Ansprechen auf eine Therapie schlechter.

Der AML liegt eine maligne Entartung von hämatopoetischen Progenitorzellen der myeloischen Zellreihe im Knochenmark zugrunde. Dadurch, dass sich leukämische Zellen den normalen Kontrollmechanismen von Proliferation und Differenzierung entziehen, verlieren sie die Fähigkeit der Ausreifung zu funktionellen Zellen [14, 53]. So kommt es zum raschen Wachstum der leukämischen Zellen, zur Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark und zu einer hämatopoetischen Insuffizienz [34].

Anhand der „French–American–British–Group“ (FAB–Klassifikation) aus dem Jahr 1976 bzw. deren Überarbeitungen aus dem Jahr 1985 wurde die AML mittels der Zytomorphologie und der Zytochemie in morphologische Subgruppen unterteilt [3].

Mit der zunehmenden Kenntnis der Pathogenese der AML und der Identifikation prognostisch relevanter spezifischer Chromosomenaberrationen wurde die AML durch die World Health Organisation (WHO) neu klassifiziert [23, 26, 55].

In dieser WHO-Klassifikation der AML wird die Zytomorphologie, die Zytochemie und die Immunphänotypisierung mit der Zyto- und Molekulargenetik sowie weiteren klinischen Besonderheiten kombiniert (Tabelle 1). Diese WHO-Klassifikation ermöglicht eine Aussage über die Prognose von AML-Erkrankungen.

Tab.1:**WHO-Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie (AML) [55]**

FAB = French-American-British-(Group-classification)

AML mit spezifischen zytogenetischen Translokationen	Fusionsgen
t(8;21)(q22;q22)	RUNX1T1;RUNX1; AML1/ETO
Eosinophilie inv(16)(p13q22) oder t(16;16)(p13;q22)	CBFβ/MYH 11
APL (Akute Promyelozyten Leukämie) mit t(15;17)(q22;q11-21)	PML/RARα und Varianten
AML (Akute Myeloische Leukämie) mit 11q23-Abnormitäten	MLL
AML mit multilineärer Dysplasie	
Mit vorherigem MDS (Myelodysplastisches Syndrom)	---
Ohne vorheriges MDS (Myelodysplastisches Syndrom)	---
AML und myelodysplastische Syndrome, therapieassoziiert	
Assoziiert mit alkylierenden Substanzen	---
Assoziiert mit Topoisomerase-II Inhibitoren	---
Andere	---
AML, nicht anderweitig klassifiziert	
	Entspricht nach FAB
AML mit minimaler Differenzierung	M0
AML ohne Ausreifung	M1
AML mit Ausreifung	M2
Akute myelomonozytäre Leukämie	M4
Akute monozytäre Leukämie	M5
Akute Erythroleukämie	M6
Akute megakaryozytäre Leukämie	M7
Akute Basophilenleukämie	M2 baso
Akute Panmyelose mit Myelofibrose	---
Myeloisches Sarkom	---

1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie

Mit dem Alter steigt die Inzidenz der AML kontinuierlich an und beträgt bei Erwachsenen etwa 3,8/100.000 Einwohner pro Jahr. Bei Menschen über 65 Jahren liegt die Inzidenz bei 17,9 pro 100.000 [34]. Das mediane Erkrankungsalter der Patienten liegt im Alter von ca. 70 Jahren [24], wobei, betrachtet man die Geschlechterverteilung bei der AML, das männliche Geschlecht überwiegt. In der Ätiologie einer malignen Neoplasie der Hämatopoese spielen beim Menschen verschiedene Risikofaktoren eine Rolle. So besteht vermutlich auf Grund von chromosomalen Instabilitäten bei Patienten mit Trisomie 21 (Down Syndrom) oder Patienten mit Fanconi-Anämie ein erhöhtes Risiko, an einer AML zu erkranken [9, 38]. Aus einem Myelodysplastischen Syndrom (MDS), einem Chronisch Myeloproliferativen Syndrom (CMPS) oder anderen hämatologischen Erkrankungen entwickelt sich sekundär häufig eine AML [55]. Darüber hinaus kann eine AML auch durch Schädigungen der hämatopoetischen Stammzellen entstanden sein, z.B. verursacht durch chemische Substanzen wie Benzol und Benzolderivaten [25, 42], organische Lösungsmittel [1] oder ionisierende Strahlen [39]. Eine häufige Ursache für eine Benzolexposition ist das Rauchen von Zigaretten. Für Raucher besteht so ein durchschnittlich 1,2 – 2,3 fach erhöhtes Risiko, an einer AML zu erkranken, folglich haben damit Kettenraucher das höchste Risiko dieser Gruppe [27]. Nach einer Chemotherapie erkranken ca. 10-15 % der Patienten an einer AML. Es lassen sich zwei Arten von chemotherapieinduzierter AML unterscheiden: Zum einen am häufigsten beobachtet nach Exposition mit Alkylantien und zum anderen nach Exposition mit Topoisomerase II-Inhibitoren [43, 47, 52]. Ebenfalls sind Personen, die Kontakt mit verschiedenen Pestiziden haben, einem erhöhten Risiko ausgesetzt [36].

1.1.3 Symptomatik und klinischer Verlauf

Typisch für die akute Leukämie ist das relativ rasche Einsetzen der Anfangssymptome, die durch die akut beginnende hämatopoetische Insuffizienz erklärbar sind. Im klinischen Bild stehen daher Befunde wie Anämie als Folge der sich rasch vermehrenden Blasten und damit der Verdrängung der hämatopoetischen Vorläu-

ferzellen des Knochenmarks in Form von Blässe und Leistungsabfall im Vordergrund.

Thrombopenie mit petechialen Blutungen sowie vermehrtes Zahnfleischbluten, also eine erhöhte Neigung zu Blutungen, wie es also vor allem bei der Promyelozyten-Leukämie vorkommt, sind auf die Störung der Homöostase des Gerinnungssystems durch maligne Blasten bzw. deren Spaltprodukte zurückzuführen.

Im Rahmen einer Granulozytopenie kann es zu hochfieberhaften Infekten, insbesondere Tonsillitiden, Entzündungen des Zahnfleisches und Pneumonien kommen. Hepato- und Splenomegalie, Lymphadenopathie oder Gingivahyperplasie und eine Leukemia cutis kann durch die leukämische Infiltration des extramedullären Gewebes verursacht werden [11].

Zur Leukostase mit okulärer oder cerebrovaskulärer Symptomatik kann eine Leukozytose mit mehr als 100.000 Leukozyten pro μl peripheres Blut führen. Hinzu kommen häufig unspezifische Beschwerden wie Abgeschlagenheit, Appetitlosigkeit und Müdigkeit [12].

1.1.4 Diagnostik

Typische Veränderungen zeigen sich bei der akuten myeloischen Leukämie im kleinen und großen Blutbild, letzteres auch bekannt als Differenzialblutbild, und im Knochenmark. Eine besondere Rolle spielt hier die mikroskopische Bewertung der Morphologie.

Während im kleinen Blutbild die Thrombozyten und Erythrozyten stark erniedrigt sind, (die Anzahl der Leukozyten ist bei der AML meist kaum vermehrt), finden sich im großen Blutbild viele unreife Vorläuferzellen (Blasten), die ins Blut ausgeschwemmt wurden.

Auch im Knochenmark wird die Bildung der Erythrozyten und Thrombozyten durch viele unreife Vorläuferzellen (Blasten) stark verdrängt. Mit Hilfe spezieller Untersuchungsmethoden wie der Immunphänotypisierung und der Immunhistochemie lassen sich Blasten durch die Expression von spezifischen Antigenen wie auch Leukämie-assoziierten Antigenen einem Reifungsstadium zuordnen.

Durch zytogenetische und molekularbiologische Verfahren werden Chromosomenänderungen, die in Leukämiezellen häufig vorliegen, typisiert und eingeordnet. Das ist für die Einschätzung der Prognose und die davon abgeleitete risikostratifizierte Therapie essentiell.

1.1.5 Therapie der AML

Für die Behandlung von Patienten mit AML gibt es verschiedene Risiko-adaptierte Ansätze: Das Behandlungsspektrum kann eine Polychemotherapie bis hin zu (je nach Risikostratifikation und Spendersituation) einer allogenen Stammzelltransplantation (SZT) umfassen [14, 15, 48]. Die Chemotherapie setzt sich aus einer Induktions- und einer Konsolidierungstherapie zusammen. Das Ziel der Induktionstherapie besteht darin, die Zahl der Leukämiezellen so weit zu reduzieren, dass sich die normale Hämatopoese regenerieren kann und weniger als 5% Blasten im Knochenmark vorhanden sind. Des Weiteren macht sich die Konsolidierungstherapie zum Ziel, die Leukämiezellzahl weiter zu reduzieren, bis die Leukämiezellen entweder komplett eliminiert oder so weit reduziert sind, dass körpereigene Abwehrmechanismen die Leukämie kontrollieren können. Bei 50-60 % der AML-Patienten können chromosomale Aberrationen nachgewiesen werden, welche derzeit neben dem Patientenalter den wichtigsten prognostischen Parameter für das Erreichen einer kompletten Remission und für das krankheitsfreie Überleben darstellen [5, 6, 41]. Durch diese zytogenetischen Faktoren lassen sich Risikogruppen mit unterschiedlicher Prognose stratifizieren (Abb. 2 links). Eine komplette Remission (CR) der Erkrankung wird heute bei etwa 70% der Patienten, die jünger als 60 Jahre sind, durch eine Standardchemotherapie erreicht [7, 17, 48]. Trotz der Behandlungserfolge der AML in den letzten Jahrzehnten kommt es immer noch häufig zu einem Rezidiv. Dies spiegelt die 5-Jahresüberlebensrate wider, welche bei allen an AML Erkrankten zusammengenommen nur bei ca. 20-40% liegt [34, 44]. Für ältere Patienten (>60 Jahre) ist die Prognose schlechter, da bei ihnen häufig ein ungünstiger Karyotyp vorliegt. Zudem ist meistens eine Komorbidität vorhanden, so dass die Remissionsrate dieser Patienten lediglich bei etwa 20-30 % liegt [13, 24]. Nur ein geringer Anteil (<10 %) der AML-Patienten,

die älter als 60 Jahre sind, kann kurativ behandelt werden [14, 47] (siehe Abb. 1 und Abb. 2 rechts).

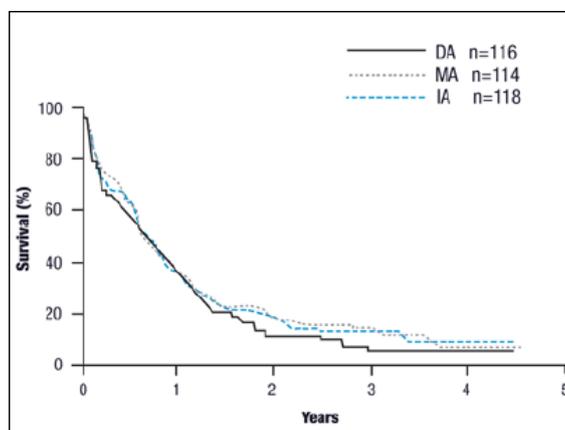
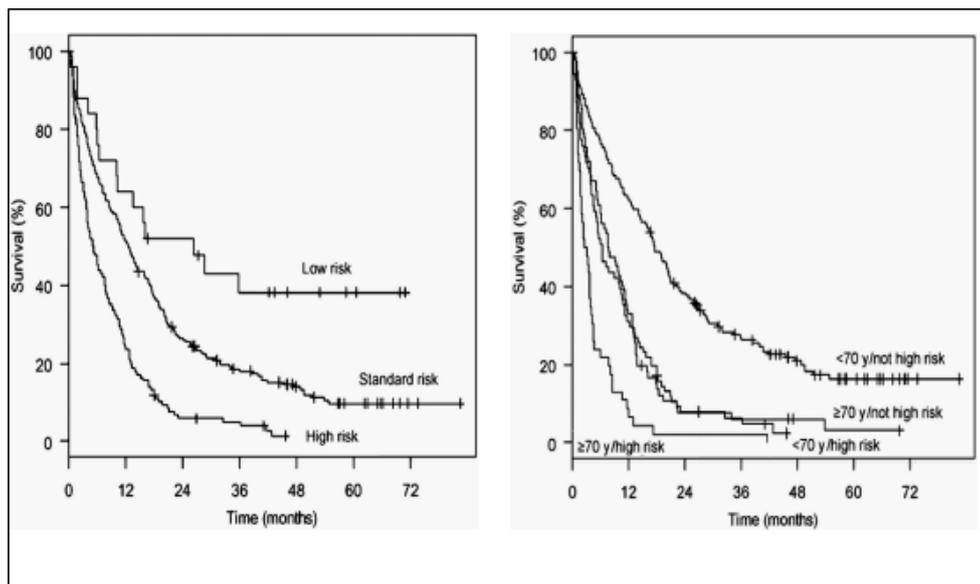


Abb. 1:

Darstellung der Überlebenskurve von 348 Patienten >60 Jahr mit einer akuten myeloischen Leukämie (aus Rowe et al. 2004 [47]).

Zwei Jahre nach Diagnosestellung leben noch ca. 20 %, der mit intensiver Chemotherapie behandelten Pat. >60 Jahre. Kombiniert man verschiedene Chemotherapeutika mit Cytarabin zeigten sich hierbei keine relevanten Unterschiede. DA= Daunorubicin+Cytarabin, MA= Mitoxantrone+Cytarabin, IA= Idarubicin+Cytarabin

Eine schlechte Prognose haben Patienten mit einer primär chemotherapierefraktären Leukämie. Oft persistieren maligne Zellen gerade bei älteren Patienten und Patienten mit einem ungünstigen Karyotyp trotz primären Erreichens einer hämatologischen Remission und führen folglich zu einem Rezidiv [17]. Diese verbliebenen residuellen Zellen werden nach dem Erreichen einer klinischen Remission im Körper des Patienten als „minimale Resterkrankung“ („minimal residual disease“, MRD) bezeichnet [8, 46].

**Abb. 2:**

Darstellung der Überlebenskurven von 361 Patienten mit einer Akuten Myeloischen Leukämie (AML) in Abhängigkeit von ihrer Zytogenetik und ihrem Alter (aus Fröhling et al. [15]).

Linke Abbildung:

Die Prognose der AML-Patienten ist abhängig von ihrer zytogenetischen Risikozugehörigkeit. Low-risk: $t(15;17)$, $inv(16)$; Standard-risk: Normaler Karyotyp, $t(8;21)$, $t(11q23)$, $+8$ (non-compl.), $+11$ (non-compl.); High-risk: alle anderen.

Rechte Abbildung:

Die Prognose bei der AML-Patienten ist nicht nur allein von ihrer zytogenetischen Risikozugehörigkeit abhängig, sondern auch von ihrem Alter. Patienten <70 Jahre haben eine bessere Prognose als Patienten >70 Jahre.

Bei jüngeren AML-Patienten wird in der Primärtherapie abhängig von der Risikosituation (Karyotyp, Ansprechen auf die Therapie, Alter, Nebendiagnosen) und Spendersituation eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt, wenn eine refraktäre Erkrankung oder ein Rezidiv vorliegt [15, 48]. Man spricht von einer allogenen Stammzelltransplantation, wenn ein von einem gesunden Spender gewonnenes Transplantat auf einen Empfänger übertragen wird. Hierbei wird die Leukämiebehandlung nicht nur durch den zytostatischen Effekt, sondern auch durch einen immunologischen Effekt erreicht, der als Transplantat gegen Leukämie-Effekt oder im Englischen als Graft versus leukemia - Effekt (GVL-Effekt) bezeichnet wird. Kritisch ist hierbei allerdings, dass gegenwärtig der für die Patienten wünschenswerte GVL-Effekt nur unzureichend von der Graft- versus Host-Erkrankung trennbar ist.

Die Therapie von Patienten mit minimaler Resterkrankung, einer primär chemotherapieresistenten Leukämie oder einem Leukämie rezidiv, aber vor allem

von älteren Patienten, für die eine intensive Chemotherapie oder eine SZT nicht in Frage kommt, erfordert die Entwicklung neuer und/oder komplementärer Therapiekonzepte.

1.2 Leukämieassoziierte Antigene

Spezifische Immuntherapien für Patienten mit AML nutzen Leukämie-assoziierte Antigene (LAA) als Target-Strukturen. Somit könnten sie als therapeutische Option zur Verbesserung des GVL-Effekts nach allogener Stammzell-Transplantation zur Einleitung oder zur kompletten Remission (CR) durch Chemotherapie wahrgenommen werden.

Der erste Schritt zur Expression der LAA auf Proteinebene ist die Bildung von mRNA. In unserer Arbeitsgruppe wurde daher zunächst die Frequenz der mRNA-Expression definierter LAA bei AML-Patienten und in Leukämie-Zelllinien untersucht. Bei AML-Patienten fand sich eine hohe mRNA Expression folgender Antigene: MPP11 wurde in 86%, RHAMM in 70%, WT1 in 67%, PRAME in 64%, G250 in 51%, hTERT in 28%, Bage in 27% und Proteinase 3 in 67% der AML Patienten entdeckt. Die Real-time RT-PCR zeigt eine Tumor-spezifische Ausprägung der Antigene Bage, G250 und hTERT, sowie eine hauptsächlich auf Tumore begrenzte Expression für RHAMM, PRAME und WT1. Das Antigen MPP11 wurde überexprimiert [20].

Diese Antigene könnten für die Immuntherapie von Leukämie-Patienten fungieren und für monovalente oder polyvalente Vakzinierungsstrategien eingesetzt werden [20]. Die wichtigsten LAA für die Vakzinierung von Patienten mit Leukämien sollen im Folgenden kurz vorgestellt werden.

1.2.1 RHAMM (Rezeptor für Hyaluronsäure vermittelte Motilität)

Beim Rezeptor für Hyaluronsäure vermittelte Motilität“ (RHAMM/CD168) handelt es sich um ein Leukämie-assoziiertes Antigen (LAA). Das RHAMM/CD168-Molekül ist sowohl an der Zelloberfläche als auch intrazellulär exprimiert und bindet Hyaluronsäure (siehe Abb. 3) [33].

**Abb. 3:**

Immunzytologische Färbung mit einem Antikörper gegen RHAMM/CD168 eines AML-Blasten (links) und einer aus einem AML-Blasten generierten dendritischen Zelle (AML-DC)

AML = Akute myeloische Leukämie, RHAMM = Rezeptor für Hyaluronsäure vermittelte Motilität (Abbildungen entnommen aus Li et al., 2004)

Da das Expressionsmuster den "Cancer-Germline-(CG)-Antigenen" ähnlich ist, handelt sich hierbei um ein weitgehend Leukämie-spezifisch exprimiertes Antigen. Cancer-Germline-(CG)-Antigene zeigen eine starke Gewebe-spezifische Expression in Tumoren und Keimzellgeweben, jedoch nicht in anderen Normalgeweben. Aufgrund des Expressionsmusters sind bei Immuntherapien, die auf diese Antigene zielen, keine Autoimmunreaktionen gegen Normalgewebe zu befürchten.

Bei der Zellproliferation spielt RHAMM/CD168 eine wesentliche Rolle. Überexprimiert wird RHAMM/CD168 bei verschiedenen soliden Tumoren und bei malignen hämatologischen Erkrankungen wie der CLL, der AML oder dem Multiplen Myelom. Ebenfalls aktiviert RHAMM/CD168 die RAS-Signaltransduktionskaskade. Das intrazellulär exprimierte RHAMM/CD168 bindet direkt an die ERK-1 Kinase und interagiert indirekt mit der MEK-1-Kinase. Noch weitgehend unklar ist die Rolle von RHAMM/CD168 für die normale und die maligne hämatopoetische Stammzelle; von Bedeutung ist RHAMM/CD168 möglicherweise bei der Mobilisierung hämatopoetischer Stammzellen.

Inwieweit RHAMM/CD168 bei der Transformation der hämatopoetischen Stammzelle eine Rolle spielt und ob RHAMM/CD168 beim Progress der CLL beteiligt ist, muss noch weiter untersucht werden. Erste Untersuchungen zeigten eine stärkere RHAMM-Expression in fortgeschrittenen CLL-Stadien. Eine verstärkte spezifische T-Zellaktivität gegen RHAMM/CD168 könnte eine Lyse maligner lymphatischer Zellen ermöglichen und wäre damit ein neuer interessanter therapeutischer Ansatz gegen dieses bei der CLL überexprimierte Gen [16].

Ein von der Proteinsequenz abgeleitetes immunogenes Peptid (RHAMM-R3) wurde bereits im Sinne der spezifischen Immuntherapie in einer klinischen Phase I-Studie eingesetzt und zeigt bei der überwiegenden Zahl der Patienten ein immunologisches Ansprechen [51].

1.2.2 G250

G250, oder Carboanhydrase IX (CA), gehört zu den Carboanhydrase-Enzymen, welche die Tumorgenese mit kontrollieren. Bei Überexpression sind die CA an der Onkogenese beteiligt.

Carboanhydrasen sind Zn^{2+} -bindende Metalloenzyme, die die reversible Hydrierung von Kohlendioxid zu Kohlensäure katalysieren [37]:



Diese Enzyme finden sich in Tieren, Pflanzen und einige Bakterien. Während α -Carboanhydrasen in erster Linie bei Tieren gefunden wurden, sind β - und γ -Carboanhydrasen typisch für Pflanzen und Prokaryonten. Die Carboanhydrasen nehmen an einer Vielzahl physiologischer Prozesse wie Atmung, Knochenresorption, Glukoneogenese, Nierenstoffwechsel, Bildung von Liquor und Magensäure teil. Carboanhydrase-Isoenzyme sind hoch polymorphe Eiweißmoleküle mit unterschiedlichen kinetischen Eigenschaften, subzellulärer lokalisierter Verteilung und im Gewebe empfindlich gegenüber Inhibitoren.

Bis heute wurden elf enzymatisch aktive Mitglieder der α -Carboanhydrase-Familie beim Menschen identifiziert. Darüber hinaus wurden Carboanhydrase verwandte Proteine (CA-RPs) beschrieben. Zu den CA-RPs gehören CA VIII, CA X, CA XI, XIII und CA-Rezeptor-Protein Tyrosin β -Phosphatase und γ -Phosphatase. Dabei handelt es sich um Isoformen, die für die erforderliche Bindung zu Zn^{2+} mindestens einen der drei Histidinrückstände substituieren müssen. Die markante Erhaltung ihrer Sequenzen zwischen den verschiedenen Arten deutet auf eine Beibehaltung wichtiger zellulärer Funktionen hin. G250 ist eine Zielstruktur in der Immuntherapie des klarzelligen Nierenzellkarzinoms und hat darüber hinaus in die-

ser Entität auch eine prognostische und für bestimmte immunologische Therapieformen prädiktive Bedeutung. Dies war auch in einer klinischen Phase-II-Studie mit dem monoklonalen Antikörper Rencarex® (WX-G250) zu beobachten [4].

1.2.3 WT1

Das Wilms Tumorsuppressorgen WT-1 ist ein Tumorsuppressorgen des Menschen und liegt auf der Bande 13 des kurzen Arms von Chromosom 11. Es kodiert ein DNA-bindendes Zinkfingerprotein, das als Transkriptionsfaktor wirken kann, und spielt eine Rolle bei der Entwicklung der Niere und der Keimdrüsen. In transienten Transfektionen konnte eine Suppression von vielen GC-reichen Promotern gezeigt werden. Allerdings ist die biologische Relevanz dieser Zielgene in der Nierenentwicklung und Differenzierung jedoch sehr fraglich.

Mutationen in diesem Gen verursachen sogenannte Wilms-Tumoren, einen Nierentumor, der mit einer Häufigkeit von etwa 1: 10.000 bei Kindern zwischen 2 und 4 Jahren auftritt. Es handelt sich bei dem von WT-1 kodierten Protein um einen Transkriptionsfaktor, der die Aktivität anderer Gene steuert. Das WT-1 Protein kann dabei sowohl aktivierende wie auch reprimierende Wirkung haben und ist vor allem in den Nieren, den Keimdrüsen (Gonaden), dem Mesothel sowie in der Milz aktiv. WT1 wird seit einigen Jahren auch als LAA in der klinischen Phase I und II Studien bei Patienten mit AML oder MDS eingesetzt. In einer aktuellen Phase II Studie ließ sich bei 10 von 17 AML Patienten unter Vakzinierung eine stabile Erkrankung nachweisen; bei 4 Patienten fand sich eine deutliche Blastenreduktion [29].

1.2.4 Proteinase 3 – PR1

Proteinase 3 spielt eine wichtige Rolle bei der neutrophilen Reaktion auf Entzündungen. Myeloblastin (PR3) ist eine polymorphonucleare Leukozyten-Serin-Protease, welche Elastin, Fibronectin, Laminin und Kollagen Typ I, III und IV (in vitro) degradiert.

Vom Immunsystem gebildete Antikörper, die nicht mehr zwischen "eigen" und "fremd" unterscheiden können, sind Auslöser der Blutgefäßentzündungen oder Vaskulitiden. Sie richten sich sowohl gegen die häufigsten weißen Blutzellen, die neutrophilen Granulozyten, als auch gegen ein Enzym, das normalerweise im Zellplasma dieser Blutzellen sitzt, die Proteinase 3 (PR3).

Proteinase 3 ist hochkonzentriert in den ersten Granulas akuter und chronischer myeloischer Leukämie-Blasten und stellt somit eine potentielle T-Zell-Targetstruktur für ein Antigen dar. PR1 ist ein von Proteinase 3 abgeleitetes Tumorantigen, das, auf HLA-A2 präsentiert, von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt werden kann [40].

1.2.5 PRAME

PRAME (preferentially expressed antigen of melanoma) ist in einer Vielzahl humaner Neoplasien aberrant exprimiert. Es gehört zur Gruppe der Cancer/Testis-Antigene, da es natürlicherweise auch in Hodengewebe vorkommt.

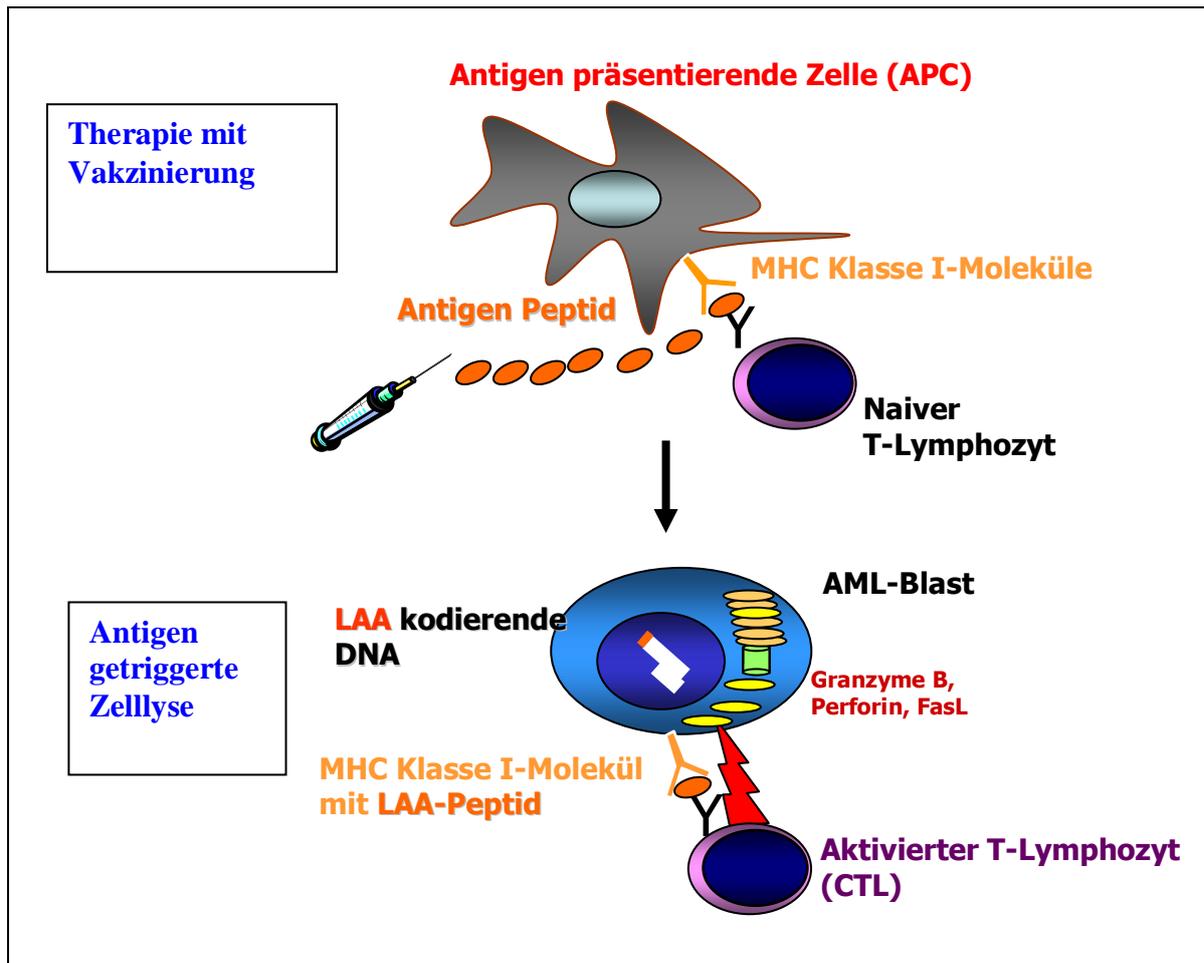
Aber auch vor allem in leukämischen Zellen der akuten myeloischen Leukämie ist PRAME exprimiert. Daher stellt es einen wichtigen Marker für Diagnose und Monitoring vieler maligner Erkrankungen, insbesondere der AML, dar. Interessant für Tumor-Immuntherapie-Ansätze wird es durch die Präsentation von PRAME-Antigenen auf der Oberfläche von Tumorzellen. PRAME ist sowohl bei der CML und AML exprimiert; bei AML-Patienten wurde auch eine prognostische Bedeutung in Kombination mit den LAA RHAMM und G250 nachgewiesen [22].

In mehreren Tumorarten korreliert die PRAME-Expression mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von Metastasen und einem schlechten klinischen Verlauf der Krankheit, was zur Vermutung führt, dass PRAME eine kausale Rolle in der Tumorentwicklung spielt. Da PRAME einen dominanten Repressor des Retinsäure-Rezeptor-Signalweges darstellt und somit eine onkogene Funktion besitzt, wird diese Theorie der Tumorentwicklung noch verstärkt.

1.3 Ansätze für Peptidvakzinierung

Letztendlich ist bei der AML wie auch bei der MDS oder MM eine definitive Eradikation aller malignen Zellen schwierig, so dass die Entwicklung neuer bzw. zusätzlicher Therapiekonzepte wie zum Beispiel einer spezifischen Immuntherapie notwendig ist. Voraussetzung ist hierbei die Definition und Charakterisierung geeigneter Targetstrukturen. So exprimieren maligne Zellen Antigenstrukturen, die spezifische Immunreaktionen auslösen können. Peptide, die von Leukämie-assoziierten Antigenen (LAAs) abgeleitet sind und von MHC-Molekülen der Klasse-I präsentiert werden, können diese spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) induzieren. Schon länger bekannt ist, dass das RHAMM-Antigen sowohl die Induktion einer humoralen als auch einer CD8⁺ vermittelten T-zellulären Immunantwort auslösen kann [19, 21]. Des Weiteren wurde mit dem Peptid RHAMM-R3 ein Peptidepitop charakterisiert, das ebenfalls spezifische Immunantworten von CD8⁺ T-Lymphozyten auslöst, die leukämische RHAMM-exprimierende Blasten lysieren können [19]. Aufgrund des Expressionsmusters und der spezifischen humoralen und zellulären Immunantworten wurde für Patienten mit AML, MDS, oder MM eine Phase einer I/II-Peptidvakzinierungsstudie mit dem RHAMM-Peptid durchgeführt [51].

Zusammenfassend konnten bis *dato* spezifische Target-Antigenepitope definiert werden und in Peptid-Vakzinierungs-Studien immunologische antileukämische Effekte induziert bzw. verstärkt werden. Die folgende Abbildung veranschaulicht in graphischer Weise den Wirkungsmechanismus des Peptidvakzinierungsansatzes [18].

**Abb. 4:****Peptidvakzinierung bei Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML).**

Die therapeutische Vakzinierung mit einem Peptid besteht aus einer subkutanen Injektion des Peptides in den Oberschenkel eines Patienten mit AML in der Nähe der regionalen Lymphknoten. Das injizierte exogene Peptid kann an ein Klasse-I-Molekül des Haupthistokompatibilitätskomplexes (Major Histocompatibility Complex, MHC) einer antigenpräsentierenden Zelle, der Langerhanszelle, binden und wird einem naiven $CD8^+$ T-Lymphozyten präsentiert, der zum nächsten Lymphknoten migriert (Oberer Teil der Abbildung). Der Zellkern eines AML-Blasten enthält eine DNA, die ein spezifisches Leukämie-assoziiertes Antigen (LAA) kodiert, das in Proteine übersetzt wird (Unterer Teil der Abbildung). Anschließend wird das Antigen in dem Signalweg des MHC Klasse I verarbeitet und auf der Oberfläche eines AML-Blasten von einem Klasse-I-Molekül des MHC präsentiert. Somit kann das präsentierte Peptid auf dem Rezeptor des MHC Klasse-I-Moleküls an den T-Zell-Rezeptor eines Lymphozyten binden, welcher wie in dem oberen Teil der Abbildung gezeigt, aktiviert wurde. Die aktivierte T-Zelle bindet wieder das MHC Klasse I-Molekül mit dem LAA-Epitop-Peptid, mit dem Ergebnis der Freisetzung von Granzym B, Perforin und FasL, welche zur Lyse der AML-Blasten führen [18].

CD = Cluster of Differentiation

1.4 Ziel der Arbeit

Während die mRNA Expression der LAA bereits gut dokumentiert ist, finden sich kaum Daten zur Expression auf Proteinebene.

Daher soll in dieser Arbeit ein antikörperbasierter Ansatz gewählt und die Expression der LAA RHAMM und G250 in AML-Blasten mittels Durchflusszytometrie und Immunhistochemie untersucht werden. Von besonderem Interesse ist dabei, ob die LAA im Zellinneren (intrazellulär) und auf der Zelloberfläche (extrazellulär) exprimiert werden. Zu diesem Zweck sollen sowohl nicht kommerziell als auch kommerziell erwerbbar Antikörper eingesetzt werden. Die immunphänotypische Analyse von RHAMM umfasst ein Panel von 3 Antikörpern (NY IgG2a; NY IgG2b; RHAMM-mAK H90, Novocastra), die Analyse von G250 2 Antikörper (M75-mAK; IgG2a mAK, Wilex).

In Kooperation mit dem pathologischen Institut sollen nach Durchführung eines Zytospin die immunphänotypisch gewonnenen Ergebnisse durch eine immunhistochemische Färbung verifiziert werden.

Bei positivem Nachweis hätte dies zum einen diagnostische Implikationen, weil so eine einfache Quantifizierung der RHAMM-Expression auf Proteinebene möglich würde. Zum anderen könnten diese Ergebnisse je nach Lokalisierung des Antigens in der Zelle auch die Basis für einen therapeutischen Einsatz der Antikörper bilden.

MATERIAL UND METHODEN

2.1 Grundausrüstungen

2.1.1 Allgemeine Laborgeräte

Autoklav	(Webeco, Bad Schwartau)
Axiophot TM -Mikroskop	(Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
Brutschrank	Steri-Cult Incubator (Forma Scientific, Marietta, Ohio, USA); B 5042 E (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland)
Cytozentrifuge	(Cytospin 2) von der Firma Shandon
Digitalwaage	Precisa 3000C-6000D (PAG Oerlikon, Zürich, Schweiz); Mettler PC 440 (Mettler, Giessen, Schweiz)
FACS-Gerät:	FACScan, Fa. Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) CellQuest TM
Flüssigstickstofftank	Taylor Wharton, Mildstedt, Deutschland
Gefrierschrank	-20°C: Bosch GmbH, München, Deutschland -20°C: Liebherr GmbH, Deutschland -80°C: Ultra Low, (Sanyo Fisher GmbH, München, Deutschland)
Kühlschrank	+4°C: Liebherr GmbH, Deutschland
Magnetrührer	KAMAG REO (Bender & Hobin)
Mikroskop	Carl Zeiss; Vergrößerung 3,2 fach 10, 16 und 100fach
Neubauer Kammer	(Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
Pipetten	0,5-10µl; 10-100µl; 50-250µl und 200-1000µl Eppendorf Reference (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Pipettierboy	(Integra Bioscenics)
Sterile Arbeitsbank	Hera-Safe HS-18 und HLB 2448 (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland)
Videokamera	KY-F75U (JVC, Tokyo, Japan)

Vortexer	Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)
Wasserbad	Julabo U3/ 7 (Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach/ West, Deutschland)
Zentrifugen	Beckmann GS-6R und GS-15R (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA) Biofuge pico (I) und Labofuge M (II) (Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland) alle mit Standard-Rotor

2.1.2 Plastikwaren

Alle verwendeten Plastikwaren wurden von den Firmen steril bezogen.

Einfrier-Röhrchen	Nunc Cryo Tube™ Vials (1,8 ml) (Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark)
FACS-Röhrchen (5ml)	FALCON® Polystyrene Round-Bottom Tube (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)
Gewebekulturflaschen	NUNCLON™ Surface (25,75 und 175cm ²) (Nalge Nunc International, Roskilde, Dänemark)
Pipetten	FALCON® Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25 und 50 ml) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)
Pipettenspitzen	epT.I.P.S. Standard (0,1 – 10 µl, 2 – 200 µl und 50 – 1000 µl) (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße	Safe-Lock Tube (0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml und 2 ml) (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Röhrchen	FALCON® Polypropylen Tubes (15 ml und 50 ml) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)
Sterilfilter	Minisart RC 15 (Sartorius)

2.1.3 Spezielle Chemikalien und Antikörper

Sämtliche Laborchemikalien wurden in höchstmöglicher Reinheit von den Firmen bezogen:

AB-Serum	Humanes AB-Serum (Deutsches Rotes Kreuz, Ulm, Deutschland)
Aqua destillata Spüllösung (1000ml)	Fa. Braun, Melsungen
BSA	Bovines Serum Albumin (Serva, Heidelberg, Deutschland)
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Delta-Select, München, Deutschland)
FACS-Antikörper	<ul style="list-style-type: none"> • New York 2a, 2b – LICR (Ludwig Institute for Cancer Research) • RHAMM NCL-CD 168 Fa. Novocastra + Polyclonal Goat-anti-mouse IgG FITC (2. Antikörper zu CD 168) = FITC • M75; cG250-Alexa 488, 1,4 mg/ml, MK 06060601 (freundlichst überlassen von Frau Prof. Pastorekova) • mG250 IgG 2a, Fa. Willex, 2,4 mg/ml • PE anti-human CD 34, Fa. BD PharmingenTM, #555822 • PECy5 anti-human CD 33, Fa. BD PharmingenTM, #551377 <p>2. Antikörper</p> <ul style="list-style-type: none"> • Polyclonal Goat-anti-mouse IgG FITC, Fa. Dako Cytomation, #F0479 <p>Isotypen Kontrolle = Negative Kontrolle</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mouse IgG 2a, Fa. Dako, #X0943

	<ul style="list-style-type: none"> • PE Mouse IgG1, Fa. BD Pharmingen™, #555749 • PerCP Mouse IgG1 k Isotype Control, Fa. BD Pharmingen™, #559425
Färbelösungen	<p>Trypanblau 0,4% (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)</p>
Fetales Kälberserum	Fa. Gibco BRL, Eggenstein
Ficoll-Lösung	<p>BIOCOLL Separating Solution, Dichte: 1,077 (Fa. Seromed-Biochrom AG, Berlin)</p>
L-Glutamin	<p>Zusatz für Zellkulturenmedium (Fa. Seromed-Biochrom AG, Berlin)</p>
Magnetische Markierung	<p>MicroBeads CD8 (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland)</p>
PBS 10x	<p>phosphate buffered saline 10x (w/o Calcium and Magnesium) (Fa. Gibco, Invitrogen C. AKL, NZ)</p>
Penicillin	<p>Zusatz für Zellkulturenmedium (Invitrogen Gibco, Grand Island, USA)</p>
RPMI 1640	Fa. Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Streptomycin	<p>Zusatz für Zellkulturenmedium (Invitrogen Gibco, Grand Island, USA)</p>
Trypanblau-Lösung 0,4%	Fa. Sigma

2.2 Puffer

.

PBS (engl. phosphate buffered saline)

In 1 l Aqua bidest wurden folgende Salze gelöst:

- 8,0 g Natriumchlorid
- 0,2 g Kaliumchlorid
- 1,44 g Natriumhydrogenphosphat

- 0,24 g Kaliumhydrogenphosphat.

Die Lösung wurde auf einen pH - Wert von 7,2 eingestellt und steril filtriert.

FACS - Puffer

Es wurden 500 ml PBS mit 5 g BSA (Albumin bovine Fraction) mit Hilfe des Magnetührers versetzt und steril filtriert.

2.3 Zelllinien

Die humanen Zelllinien K562 (Chronische Myeloische Leukämie (CML), Blasten crises) und SKRC52 (Sloan Kettering Nierenzellkarzinom Zelllinie 52) wurden in RPMI 1640, 10% fetales Kälberserum (FCS), 2mM L-gGutamine, 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 Einheiten/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert.

2.4 Kulturmedien

Medium zur K562-Zell-Kultivierung

K562-Zellen wurden in 1640 RPMI-Medium kultiviert. Zu 500 ml RPMI-Medium wurden folgende Zusätze gegeben:

- 1% Penicillin/Streptomycin
- 1% L-Glutamin
- 10% hitzeinaktiviertes FCS

Einfriermedium

Zu 500 ml 1640 RPMI-Medium wurden folgende Zusätze gegeben:

- 1% Penicillin/Streptomycin
- 1% L-Glutamin
- 20% humanes AB-Serum
- 10% DMSO (Dimethylsulfoxid)

plain – Medium

Zu 500 ml 1640 RPMI-Medium wurden folgende Zusätze gegeben:

- 1% Penicillin/ Streptomycin
- 1% L-Glutamin

2.5 Antikörper

Für die Immunphänotypisierung auf das LAA RHAMM wurden die Maus-Antikörper New York IgG 2a, New York IgG 2b, sowie der Novocastra Antikörper RHAMM H90 verwendet. Die New York Antikörper 2a und 2b stellte Gerd Ritter aus New York zur Verfügung. Dabei wurden die Zelllinie K562 als Positivkontrollen und Zellen von healthy volunteers (HV) als Negativkontrollen herangezogen. Der G250 Antikörper des Typs M75, gewonnen aus einem Zellkulturüberstand (freundlichst überlassen von Frau Prof. S. Pastorekova, Bratislava, Slowakische Republik) und der G250-AK von der Firma Wilex wurden zum möglichen Nachweis des G250-Antigens benutzt. Zellen von HVs wurden als Negativkontrollen verwendet, SKRC diente als Positivkontrolle.

2.6 Patienten

Alle Proben wurden von AML-Patienten entnommen, welche im Rahmen von klinischen Studien behandelt wurden. Eine Einverständniserklärung zur Erforschung ihres Zellmaterials, die von der Ethikkommission der Universität Ulm approbiert worden war, lag von allen AML-Patienten vor.

2.7 Materialgewinnung und Probenaufbereitung

2.7.1 Materialgewinnung

Aus EDTA-Vollblutproben von AML-Patienten sowie aus HLA-A2-Buffy-Coats (Citrat-Blut) erfolgte die Gewinnung von peripheren, mononukleären Blutzellen (PBMC). Buffy-Coats sind aufkonzentrierte, zelluläre Bestandteile des Blutes von gesunden Spendern.

Die Separation der PBMC aus Blut wird hier für Buffy-Coat-Blut beschrieben. Die Prozedur für Vollblutproben erfolgte analog.

2.7.2 Zellisolation und Zellarchivierung

Blut besteht zu ca. 55 % aus Blutplasma und zu 45 % aus korpuskulären Bestandteilen. Diese können in Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten unterteilt werden. Aufgrund der unterschiedlichen spezifischen Masse des Gewichts dieser Zelltypen kann zur Gewinnung mononukleärer Zellen von HV das Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation angewandt werden. Hierzu wurde das PB in einem Verhältnis 1:2 mit PBS verdünnt. Anschließend wurde das PB in einem Verhältnis 2:1 über ein Ficoll-Medium mit einem spezifischen Gewicht von 1,077g/ml geschichtet und dann bei 2000 U/min für 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) ohne Bremse zentrifugiert. Während Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer größeren spezifischen Masse den Gradienten passieren können, sammeln sich Lymphozyten, Monozyten (zusammen PBMC) und Thrombozyten aufgrund ihrer geringeren spezifischen Masse an der Plasma-Gradientengrenze an. Nach der Zentrifugation befanden sich die mononukleären Zellen zwischen Plasma und Ficollschicht und wurden mittels einer sterilen Pipette abgenommen. Um die in der PBMC-Fraktion noch enthaltenen Thrombozyten zu entfernen, wurden die PBMC zweimal mit PBS gewaschen. Nach zweimaligem Waschen mit 50 ml und 25 ml EDTA (Zentrifugation bei 1200 U/min für 10 Minuten bei RT) bestimmt man die Zellzahl mittels Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer. Dieser Farbstoff dringt in tote Zellen schnell ein und lässt sie unter dem Mikroskop schwach bis

tiefblau erscheinen, wogegen lebende Zellen den Farbstoff nur langsam aufnehmen und sich erst nach mehreren Minuten anfärben.

Zur Ermittlung der Zellzahl wurde ein Aliquot der zu bestimmenden Zellsuspension mit der Färbelösung in definiertem Verhältnis gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Nach dem Auszählen der Zellen in vier Großquadraten erfolgte die Berechnung der Zellzahl pro ml nach der Formel:

$$\frac{N \times V}{n} \times 10^4$$

- N = Zahl der gezählten Zellen
n = Zahl der ausgezählten Großquadrate
V = Verdünnungsfaktor
10⁴ = Kammerfaktor

Zur Kryokonservierung von Zellen wurde Einfriermedium (RPMI-Medium mit 20% AB-Serum, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin sowie 10% DMSO) verwendet.

Das Wegfrieren der Zellproben erfolgte als Aliquot der mononukleären Zellen. Mittels Einfriermedium wurde das Zellpellet mit je 1 x 10⁶ bis 5 x 10⁷ Zellen in 1,5 ml Kryoröhrchen weggefroren. Diese wurden in einen -80°C-Tiefkühlschrank überführt und am nächsten Tag in Flüssigstickstoff gelagert.

2.8 FACS-Analyse

2.8.1 Durchflusszytometrie

Spricht man heute von FACS (= fluorescence activated cell sorting), meint man damit die Untersuchung von Zellen mit einem Durchflusszytometer. Dabei handelt es sich bei dem Akronym FACS lediglich um die geschützte Handelsmarke der Firma Becton Dickinson (BD).

Mit Hilfe eines Durchflusszytometers können verschiedene mikroskopisch kleine Partikel anhand ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften und auch intra-

zellulären Zusammensetzung unterschieden werden. Für spätere Messungen wird eine Markierung der Zellen mit Antikörpern, die gegen bestimmte zelluläre Strukturen gerichtet sind, vorausgesetzt. Man spricht von einer direkten Markierung, wenn die Antikörper an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, bzw. von einer indirekten Markierung, wenn sie zum Nachweis zusätzlich an einen fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper gebunden werden müssen. Diese Antikörper sind meist gegen bestimmte Oberflächenproteine, zum Beispiel Proteine der CD-Klassifizierung (CD = Cluster of differentiation), gerichtet.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens der Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Hierbei werden die in einer Lösung befindlichen Zellen durch eine Kapillare gesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Dadurch kommt es zu einer Anregung der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe, die dadurch Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Durch ein komplexes System, bestehend aus Spiegeln und Filtern, kann dieses Licht im Durchflusszytometer gebündelt und zerlegt werden. Man bekommt also für jeden unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff ein spezifisches Signal. Außerdem lässt sich eine Aussage über die Größe und Granularität der Zelle machen, und das unabhängig von den gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen.

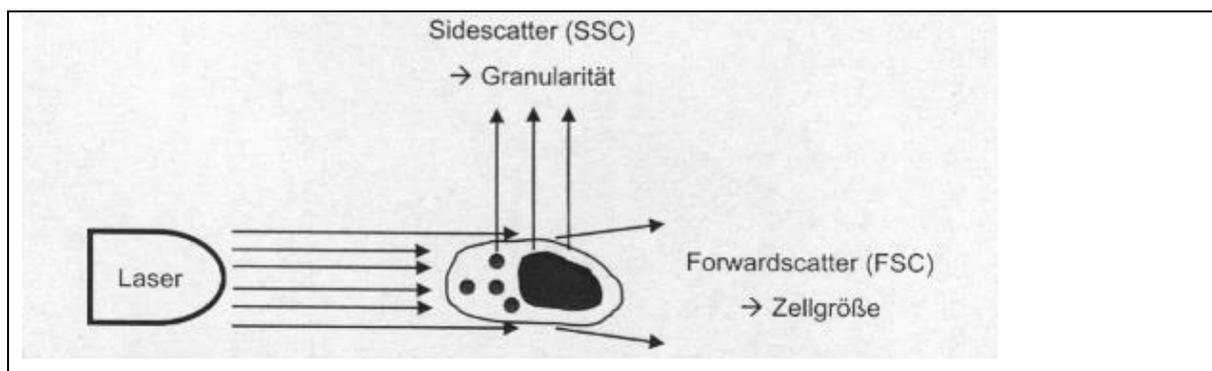


Abb. 5

Funktionsprinzip eines Durchflusszytometers (FACS).

In der Regel läuft eine FACS Messung in folgenden Schritten ab:

- Probenvorbereitung (Zellmarkierung)
- Inbetriebnahme des Durchflusszytometers
- Kompensation und Messung der Proben
- Auswertung der Messergebnisse

Als Parameter fungieren der Forwardscatter „FSC“, auch Vorwärtsstreulicht genannt, sowie der Sidewardscatter „SSC“, auch als Seitwärtsstreulicht bezeichnet. Dies bedeutet: Trifft das von einem Laser ausgesandte Licht auf eine Zelle, kann durch die Streuung der Lichtstrahlen in Verlängerung der Richtung des Laserstrahls die Zellgröße, gekennzeichnet durch den Forwardscatter „FCS“, bestimmt werden. Währenddessen stellt der Sidewardscatter „SSC“, der das der Zelle von Strukturen in einem 90°-Winkel reflektiertes Licht registriert, ein Maß für die Zellgranularität dar (Abb. 5).

Werden mehrere Laser verwendet, kann eine Vielzahl von Fluoreszenzfarben gleichzeitig gemessen werden.

2.8.2 Intra- und extrazelluläre Färbung

Bevor also die gewünschten Messungen durchgeführt werden können, ist zu entscheiden, ob es sich um eine extrazelluläre oder intrazelluläre Färbung (extra- and intracellular staining) handelt. Da die Antigene einer Zelle sowohl auf der Zelloberfläche, als auch intrazellulär exprimiert werden können, muss man beide Versuchswege durchführen, um zu sehen, falls es zu einem Auftreten der Antigen-Antikörper-Komplexe kommt, ob dies im Zellinneren oder auf der Zelloberfläche geschieht. Es werden also in einem ersten Schritt die zu untersuchenden Zellproben aufgetaut. Diese wurden entweder im -80°C-Gefrierschrank oder für längerfristig im Flüssigstickstofftank gelagert. Die im Wasserbad aufgetauten Zellen werden unmittelbar zu 25ml plain-Medium pipettiert und zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das sich am Boden abgesetzte Zellpellet in 5ml PBS gelöst. Nun lassen sich mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer und Trypanblue die Zellen zählen. Pro Tube sollten mindestens 5×10^5 und maximal 2×10^6 Zellen zu finden sein. Egal, ob es sich um extra- oder intrazelluläres Färben handelt, müssen die Zellen der einzelnen Tubes mit FACS-Puffer ($\approx 2\text{ml PBS} + 1\% \text{BSA}$) gewaschen werden. Spricht man von extracellular staining, müssen folgende Schritte ablaufen, bevor gefacet wird: Die gewaschenen Zellen werden zunächst mit je $1\mu\text{l}$ Fc-Blocking Reagent (Serotec) versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird der Primär-AK hinzugegeben und wiederum inkubiert: 30 min, Raumtemperatur, im Dunkeln. Für die Isotyp-Kontrolle (im Folgenden ISO) wurde

zunächst 10µl mouse IgG2a vorgelegt. Nach der Inkubation folgte wieder ein Waschvorgang. Waschen, das heißt: Nach Zugabe von 2ml PBS wurde für ca. 7 min bei 1200 Umdrehungen zentrifugiert und im Anschluss der Überstand verworfen und trockenpipettiert. Anschließend wurden für die Isotyp-Kontrolle jeweils sämtliche Zweitantikörper, die in der Reaktion Verwendung fanden, hinzugegeben. Bei Anwendung nur eines Fluoreszenz-Markers wurde mit dem Sekundär-AK 10µl goat-anti-mouse IgG FITC gefärbt und für 30 min, aber diesmal bei 4°C, im Dunkeln inkubiert (Abb. 6). Nach einem weiteren Waschvorgang konnte die Probe mit 250µl PBS resuspendiert und dann im FACS-Gerät analysiert werden.

Flussschema des intra- und extrazellulären Färbeprotokolls

1x10⁶ Zellen pro Röhrchen

mit 2ml PBS + 1% BSA waschen

	1	2	3	4
	ISO-Extra	RHAMM-Extra	ISO-Intra	RHAMM-Intra
+	1µl Fc-Blocking Reagent (Serotec)		+	100µl IntraStain Reagent A
	inkubieren 10 min, RT, im Dunkeln			inkubieren 15 min, RT, im Dunkeln
+	10µl Maus IgG2a pure	5µl RHAMM NY IgG2a	waschen	1x 2ml PBS (7 min, 1200 rpm)
	inkubieren 30 min, RT, im Dunkeln		+	IntraStain Reagent B
	waschen 1x 2ml PBS (7 min, 1200 rpm)		+	1µl Fc-Blocking Reagent (Serotec)
+	10µl Ziege-anti-Maus IgG FITC		inkubieren	10 min, RT, im Dunkeln
	inkubieren 30 min, 4°C, im Dunkeln		+	10µl Maus IgG2a pure 5µl RHAMM NY IgG2a
	waschen 1x 2ml PBS (7 min, 1200 rpm)		inkubieren	30 min, RT, im Dunkeln
+	in 250µl PBS resuspendieren		waschen	1x 2ml PBS (7 min, 1200 rpm)
	FACS		+	10µl Ziege-anti-Maus IgG FITC
			inkubieren	30 min, 4°C, im Dunkeln
			waschen	1x 2ml PBS (7 min, 1200 rpm)
			+	in 250µl PBS resuspendieren
				FACS

Abb. 6:

Färbeprotokoll einer extra- und intrazellulären Versuchsanordnung

als Vorbereitung der Tubes 1-4 zur FACS-Analyse mit dem Antikörper RHAMM NY IgG2a, sowie hier nicht noch einmal explizit aufgeführt RHAMM NY IgG2b.

BSA = Albumin bovine Fraction, FACS = Durchflussszytometer, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, Ig = Immunglobulin, ISO = Isotypkontrolle, NY = New York-Antikörper, PBS = Phosphat-gepufferte

Kochsalzlösung, RHAMM = Rezeptor für Hyaluron-säure vermittelte Motilität, RT = Raumtemperatur

Will man eine Dreifachfärbung durchführen, werden die Tubes der ISO-Kontrollen mit je 10µl Mouse IgG PE und 10µl Mouse IgG PerCP, die übrigen Tubes mit je 10µl der CD33 und CD34 Antikörper versetzt, so dass nach einem weiteren Waschvorgang gefacst werden kann.

Bei entstehender Wartezeit lassen sich die Proben unter Zugabe von PBS + 1% Formaldehyd aufbewahren. Vor dem Facsen waschen und wieder in 250µl PBS resuspendieren. Ist der gewünschte Antikörper, wie beispielsweise G250 von der Firma Wilex, schon von Seiten des Herstellers markiert, so wird kein Sekundär-AK mehr benötigt, es kann also der Schritt des Färbens ausgelassen werden.

Soll geschaut werden, ob die Möglichkeit einer intrazellulären Antikörper-Antigen-Bindung besteht, bedient man sich der Methode der intrazellulären Färbung (intracellular staining). Dazu werden, wie in Abb. 6 dargestellt, die Tubes sowohl mit den Zellproben als auch mit den ISO-Kontrollen nach dem ersten Waschvorgang mit 100µl IntraStain Reagent A versetzt. Nach Inkubation und erneutem Waschen werden 100µl IntraStain Reagent B hinzu pipettiert. Im Weiteren erfolgt der Versuchsablauf, angefangen mit der Zugabe des Fc-Blocking Reagens, wie bei der extrazellulären Markierung.

2.9 Immunhistochemie / Zytospin

Die Immunhistochemie ist eine Methode, um relevante Proteine der Zellen nachzuweisen. Dies geschieht über Antigen-Antikörper-Bindungen auf zellulärer Ebene in situ. Die gewünschten Proteine werden markiert und anschließend lichtmikroskopisch ausgewertet.

Diese Methode beschreibt kurz gesagt [2]: Zytospins von PBMCs von HIV-Patienten dienen als negative Kontrollen, während K562 als positive Kontrolle für RHAMM und SKRC als positive Kontrolle für G250 fungieren. Des Weiteren wurden Gewebeproben, in Kooperation mit Prof. Dr. T. Barth, eingebettet in Paraffin als Beispiele für Tumore mit einem monoklonalem anti-RHAMM Antikörper

(CD168, clone 2D6, Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK) oder mit einem anti-G250 Antikörper mit einer Verdünnung von 1:100 inkubiert. Der Envision Kit (Dako, Carpinteria, CA, USA) dient als Erkennungssystem für den primären Antikörper. Negative Kontrollen werden ohne primäre Antikörper durchgeführt. Für die Mikroskopbilder wurde ein AxiophotTM Mikroskop der Firma Zeiss, Oberkochen, Deutschland, gekoppelt mit einer hochauflösenden Videokamera (JVC KY-F75U, Tokyo, Japan) verwendet. Bei der Mikroskopiersoftware handelte es sich um DiskusTM V.4.50.590.

Zytospin

Um einen Zytospin durchführen zu können, müssen die Zellen vorerst ausgezählt werden. Es werden einerseits $0,5 \times 10^5$ Zellen aus jeder der zu analysierenden Zelllinien, andererseits 1×10^5 Zellen der PBMCs oder Patientenzellen pro Objektträger, benötigt. Anschließend werden die Zellen in ca. 1ml PBS aufgenommen. Auf den Objektträger, der in eine Metallklammer gelegt wird, kommt ein Filterpapier und zwar so, dass die raue Seite nach oben zeigt. Über das Filterpapier kommt ein Plastikfilter. In diesen werden 100 μ l ($0,5 \times 10^5$ Zellen oder 1×10^5 Zellen) pro Objektträger pipettiert. Die Cytozentrifuge (Cytospin 2) von der Firma Shandon läuft für 3 min. bei 100 rpm. Bevor die Zytospins mit Hilfe von Aceton fixiert werden können, müssen sie minimal 30 min trocknen. Die folgende Fixierung in Aceton dauert 10 min. Unfixiert können die Zytospins für drei Tage aufbewahrt werden.

2.10 Statistische Methoden

Da es sich bei dieser Arbeit nicht um vergleichende Analysen handelt, kamen keine besonderen statistischen Methoden zur Anwendung. Die in der Einleitung verwendeten Abbildungen, die das Gesamtüberleben von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie unterschiedlicher Altersgruppen darstellen, sind Kaplan-Meier-Plots, die nach der publizierten Standardmethode generiert wurden [28].

3. ERGEBNISSE

3.1 Ermittlung der Antikörper-Konzentration im Durchflusszytometer

Um die optimale Antikörperkonzentration für die Immunphänotypisierung zu ermitteln, wurden individuelle Verdünnungsreihen für jeden der 5 eingesetzten Antikörper jeweils für eine extrazelluläre und eine intrazelluläre Färbung durchgeführt. So wurde die Mindestmenge des Antikörpers bestimmt, die den prozentual höchsten positiven Anteil anfärbte. Die so ermittelte Menge des jeweiligen Antikörpers in μl wurde für die weiteren Versuche übernommen. Als Beispiel sei die Verdünnungsreihe einer Positivkontrolle für den Antikörper M75 in Abb. 7 dargestellt. Dieser Antikörper färbt spezifisch das TAA und LAA G250 an. In diesem Fall wurde eine optimale Antikörper Menge von 5 μl für eine extrazelluläre Färbung und 10 μl für die intrazelluläre Färbung ermittelt.

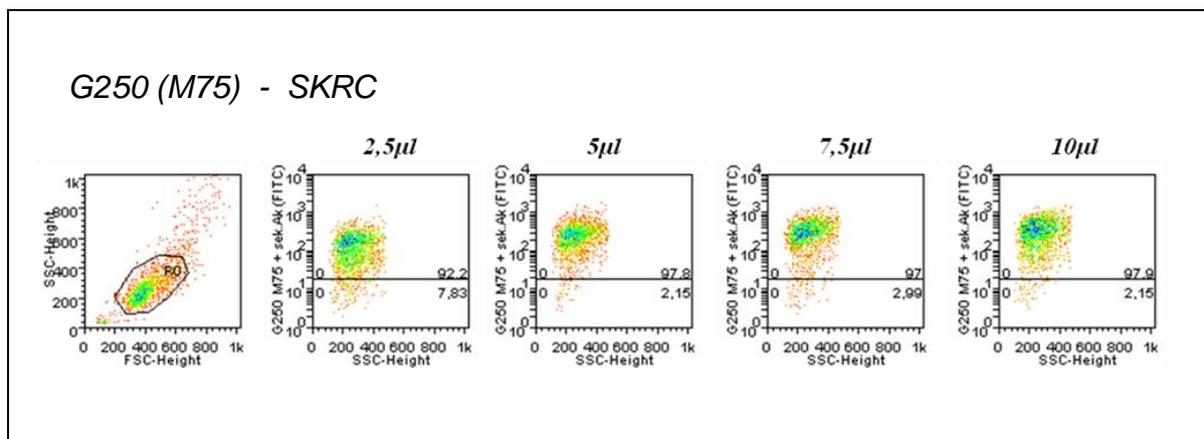


Abb. 7:

Verdünnungsreihe zur Ermittlung der zu pipettierenden Antikörpermengen

AK = Antikörper, FSC = Forwardscatter, SKRC = Zelllinie, SSC = Sidewardscatter

In Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration des verwendeten Antikörper variierte die Menge des Antikörpers erheblich. Die eingesetzten Mengen betragen für den G250 Wilex-Antikörper für beide Färbemethoden 0,8 μl und für den RHAMM-Novocastra-Antikörper für beide Färbemethoden jeweils 60 μl . Die uns freundlicherweise überlassenen Antikörperüberstände RHAMM-NY-2a und RHAMM-NY-2b wurden in den deutlich größeren Volumina von jeweils 50 μl verwendet. Trotz

vielfacher Variation der Antikörperkonzentration und Reaktionsbedingungen ließ sich für den Antikörper RHAMM-NY-2b kein positives Signal für RHAMM etablieren.

3.2 Definition der Isotypkontrolle

Nach Ermittlung der optimalen Antikörperkonzentration wurde die Isotypkontrolle definiert, indem ein unspezifischer Maus IgG-Antikörper eingesetzt wurde und anschließend mit fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern gefärbt wurde. Danach wurde die Grenze zu positiv gewerteten Zellen definiert und diese Trennung auch zu den negativ gewerteten Zellen während der gesamten nachfolgenden Färbungen mit dem jeweils spezifischen ersten Antikörper beibehalten. Dies wurde für alle nachfolgenden Experimente so eingehalten. Als Beispiel ist in Abbildung 8 wieder der G250-M75-Antikörper gezeigt. Hierzu wurde wieder die im vorherigen Schritt ermittelte optimale Antikörpermenge von 5 μ l des Antikörpers verwendet.

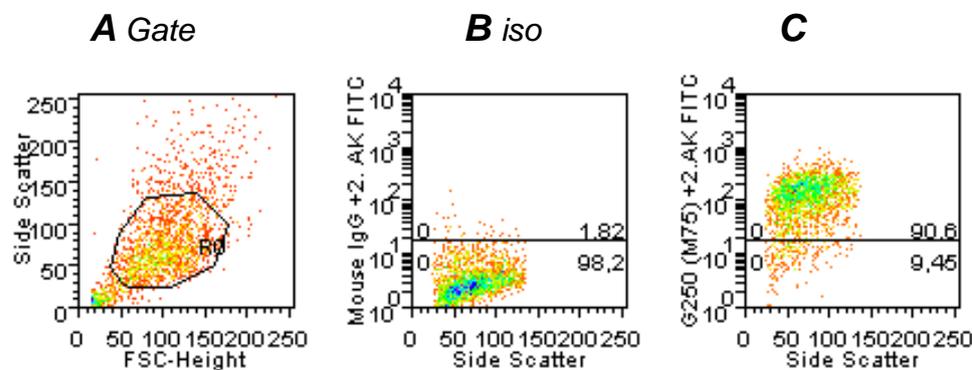


Abb. 8:

Isotypenkontrolle am Beispiel der Zelllinie SKRC

A: Gate

B: Iso (Isotypkontrolle)

C: Darstellung des positiven Anteils der Population unter der Verwendung von G250-M75 5 μ l Antikörper mit extrazellulärer Färbetechnik

AK = Antikörper, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, FSC = Forwardscatter, Ig = Immunglobulin, SSC = Sidewardscatter

3.3 Charakterisierung von Zelllinien

Der Test der Antikörper erfolgte zunächst an zwei humanen Zelllinien. Bei der K562-Zelllinie handelt es sich um eine erythroleukämische Zelllinie, die aus einem Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie im Stadium der Blastenkrise generiert wurde. Diese Zelllinie ist gut charakterisiert und exprimiert bekannterweise das RHAMM auf mRNA- und Proteinebene, während eine Expression von G250 bereits auf mRNA-Ebene nicht vorkommt [20].

SKRC-52 ist eine Zelllinie, die im Sloan-Kettering Institut in New York aus einem klarzelligen Nierenzellkarzinom etabliert wurde. Sie ist ebenfalls sehr gut charakterisiert. In dieser Zelllinie wurde mehrfach eine besonders hohe Expression des TAA/LAA G250 auch auf Proteinebene mittels Immunphänotypisierung nachgewiesen [32].

3.3.1. Expression der LAA G250 und RHAMM auf Proteinebene

Da Antigene nicht nur auf der Oberfläche, sondern auch im Zellinneren exprimiert werden können, wurden, wie bereits oben ausgeführt sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Färbungen durchgeführt. Mindestens 2×10^5 PBMN wurden bei jeder Messung eingesetzt. Sowohl für die zelloberflächliche als auch intrazelluläre Expressierung wurden in je ein FACS-Röhrchen 10 μ l des Fluoreszenzantikörpers Mouse FITC pipettiert. In das zweite FACS-Röhrchen wurden je 1 μ l des Fluoreszenzantikörpers G250 (Wilex) FITC, bzw., 10 μ l G250 (M75) pipettiert, wobei für den intrazellulären Antigennachweis die Zelle mit Hilfe des Intrastain-Verfahrens aufgespalten wurde.

Verwendung des G250-M75-Antikörpers. Die auftretende stark rötliche Färbung kommt über Antigen-Antikörper-Bindungen auf zellulärer Ebene zustande. Da die Immunhistochemie Proteine in Zellen nachweist, handelt es sich hierbei um markierte Proteine, welche lichtmikroskopisch dargestellt werden.

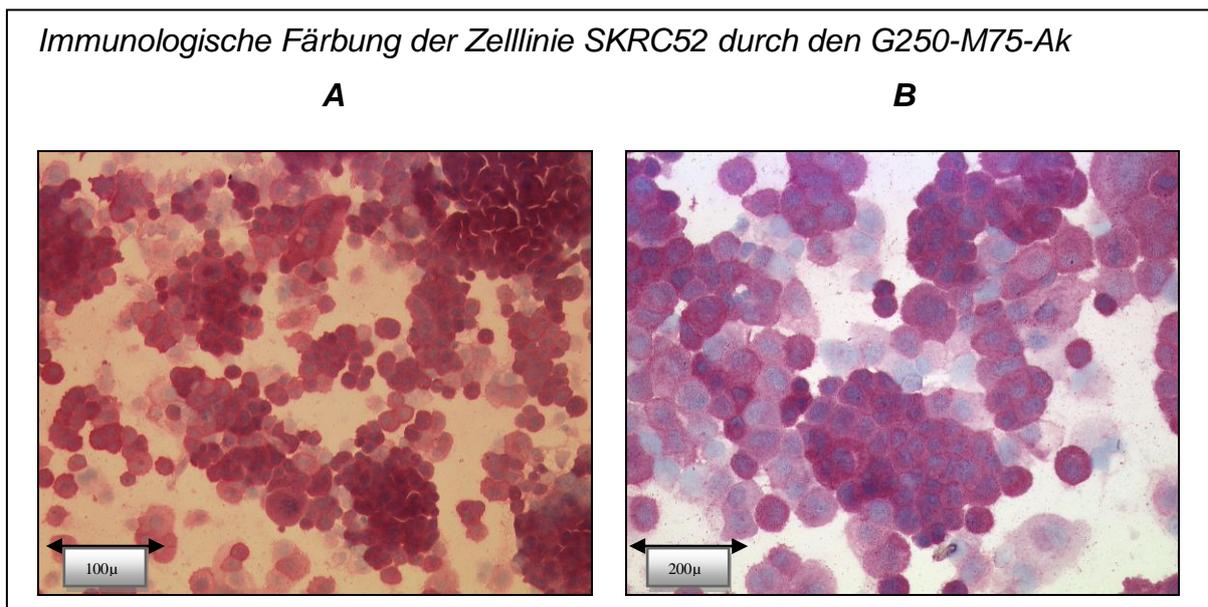


Abb. 10:

Immunzytologische Färbung (Zytospin) einer SKRC-Zelllinie mit einem G250-Antikörper

A: 100 fache Vergrößerung

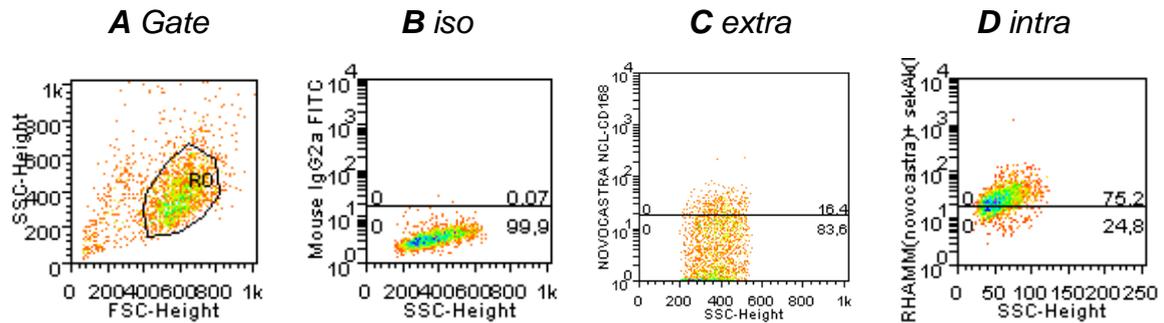
B: 200 fache Vergrößerung

Ak = Antikörper

Es zeigte sich eine ca. 80% Färbung der Tumorzellen mit diesem Antikörper. Als Resultat lässt sich hier also eine gute Übereinstimmung zwischen der Immunphänotypisierung und der Immunhistochemie festhalten.

Als Nächstes wurde die Expression des TAA/LAA RHAMM ebenfalls mit beiden Methoden untersucht. Es wurde hierzu der kommerzielle Antikörper von Novocastra und die Antikörperüberstände NY-2a eingesetzt.

Expression von RHAMM in der Zelllinie K562 durch den Novocastra-Ak



Expression von RHAMM in der Zelllinie K562 durch den New-York 2a-Ak

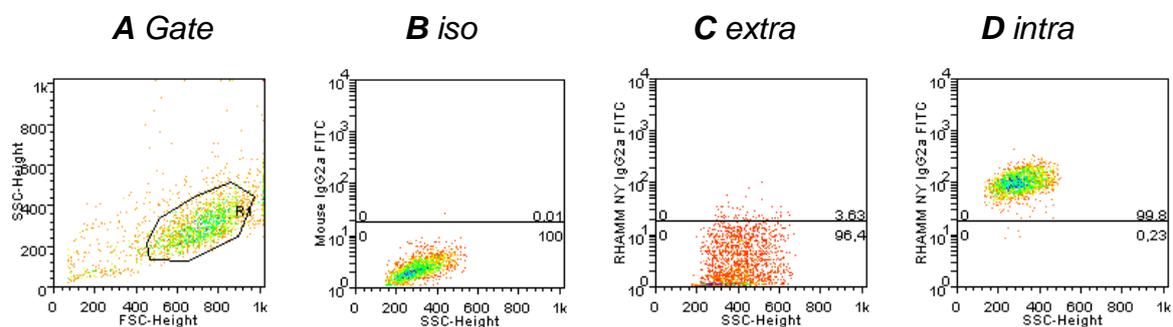


Abb. 11:

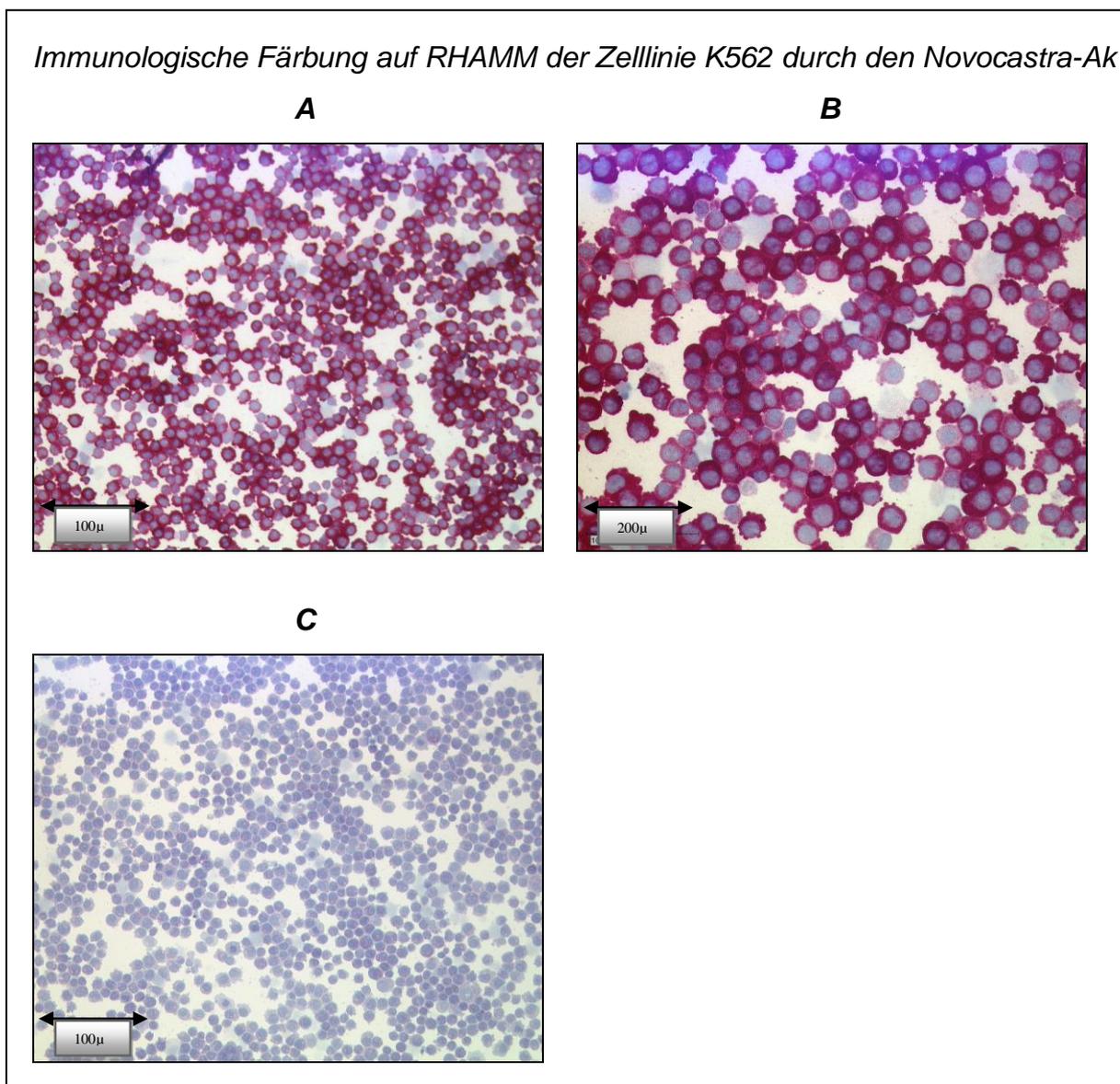
FACS-Messung der PBMCs einer mononucleären Zelle des peripheren Blutes.

- A:** Gesamtpopulation
B: Iso (Isotypkontrolle)
C: Eigentlicher Versuch der Darstellung positiven Anteils der Population auf der Zelloberfläche unter Verwendung von: Novocastra 10µl Antikörper
 New York 2a 70µl Antikörper
D: Darstellung des positiven Anteils der Population intrazellulär unter Verwendung von: Novocastra 60µl Antikörper
 New York 2a 70µl Antikörper

AK = Antikörper, FACS = Durchflusszytometer, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, FSC = Forwardscatter, Ig = Immunglobulin, PBMC = mononucleäre Zellen des peripheren Blutes, RHAMM = Rezeptor für Hyaluronsäure vermittelte Motilität, SSC = Sidewardscatter

In der Abb. 11 ist auch noch einmal der Versuch der Darstellung der New York 2a positiven Zellpopulation gezeigt. Wie aus Abbildung hervorgeht, ist nur in der intrazellulären Technik ein positives Signal zu finden. In den Folgeversuchen wurden daher keine extrazellulären Färbeversuche mit dem New York 2a-Antikörper unternommen.

Auch in diesem Fall wurden die immunphänotypisch gewonnenen Ergebnisse für den Novocastra-Antikörper in Kooperation mit Prof. Barth durch immunhistochemisch untersuchte Zytospins abgesichert.

**Abb. 12:**

**Immunzytologische Färbung (Zytospin) einer K562-Zelllinie mit einem RHAMM-Antikörper
Mit Primärantikörper**

A: 100 fache Vergrößerung

B: 200 fache Vergrößerung

Ohne Primärantikörper

C: 100 fache Vergrößerung

Ak = Antikörper, RHAMM = Rezeptor für Hyaluronsäure vermittelte Motilität

Wie in der Abb. 12 A+B dargestellt, findet gleichfalls, konkordant mit der Immunphänotypisierung, eine Anfärbung von ca. 70% der Tumorzellen für RHAMM in der Immunhistochemie statt. In Abb. 12 C wird als Vergleich ein antikörpernatives Präparat ohne Färbung der Zellen gezeigt.

Bei den Färbeversuchen mit dem Antikörper New York 2b ließ sich trotz umfassender Variation der Antikörperkonzentration und der Reaktionsbedingungen kein positives Signal ableiten (Abb. 13).

Expression von RHAMM in der Zelllinie K562 durch den New-York 2b-Ak

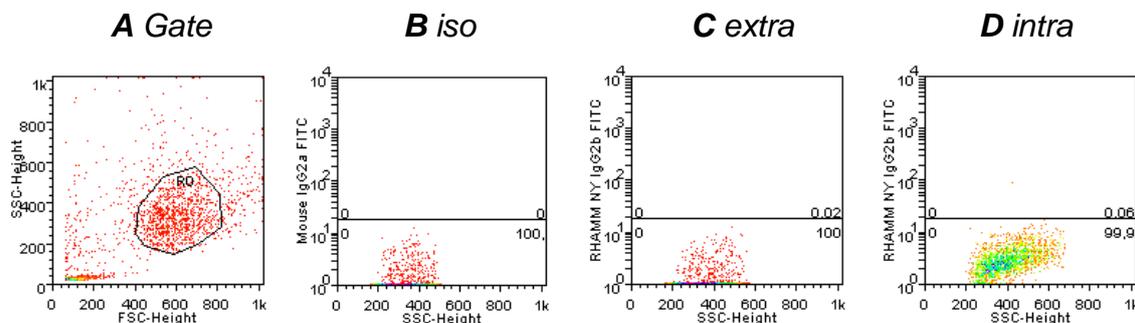


Abb. 13:

FACS-Messung der PBMCs einer mononucleären Zelle des peripheren Blutes.

- A:** Gesamtpopulation
- B:** Iso (Isotypkontrolle)
- C:** Eigentlicher Versuch der Darstellung des New York 2b positiven Anteils der Population auf der Zelloberfläche unter Verwendung von 50µl Antikörper
- D:** Eigentlicher Versuch der Darstellung des New York 2b positiven Anteils der Population unter Verwendung der gleichen Antikörperkonzentration wie in Abb. B

AK = Antikörper, FACS = Durchflusszytometer, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, FSC = Forwardscatter, Ig = Immunglobulin, PBMC = mononucleäre Zellen des peripheren Blutes, RHAMM = Rezeptor für Hyaluronsäure vermittelte Motilität, SSC = Sidewardscatter

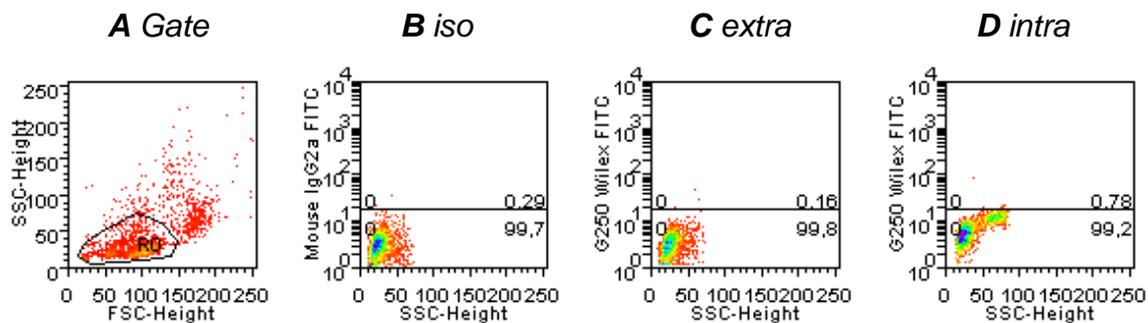
Der Antikörperüberstand NY2b wurde daher für die weiteren Untersuchungen wegen des fehlenden Positivsignals außer Acht gelassen.

3.3.2 Korrespondierende Negativkontrollen

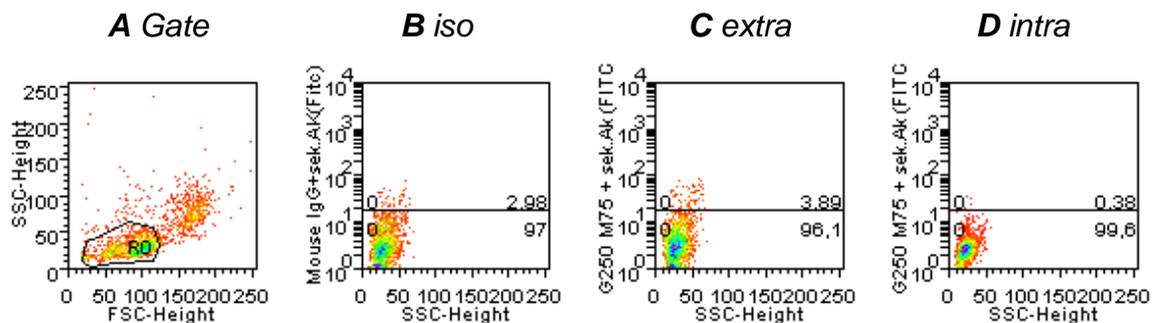
Als Negativkontrolle wurden bei allen Versuchsreihen Proben von HV's benutzt. Wie bei der Positivkontrolle wurde sowohl für die extra- als auch intrazelluläre Färbung je in ein FACS-Röhrchen 10µl des Fluoreszenzantikörpers Mouse FITC pipettiert. Ein zweites FACS-Röhrchen wird für das extrazelluläre Expressieren mit 5µl und das intrazelluläre Expressieren mit 10µl versetzt, anschließend wurden 10µl G250 (M75) hinzupipettiert. Da dieser Antikörper aber von sich aus noch unmarkiert ist, wurde nach dessen Inkubation mit einem fluoreszierenden Sekundär-Antikörper gefärbt. Auch hier fand mit Hilfe des Intrastain-Verfahrens die Per-

foration der Zellmembran statt, so dass man von einem intrazellulären Antigen-nachweis sprechen kann. In der Abbildung 14 sind die korrespondierenden Negativkontrollen zu den in 3.3.1 ausgeführten Ergebnissen dargestellt.

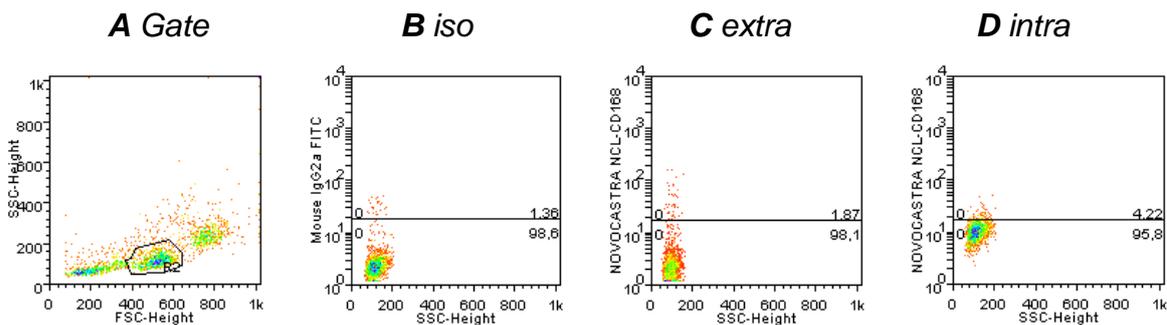
Negativkontrolle G250 (Willex)-Ak - HV



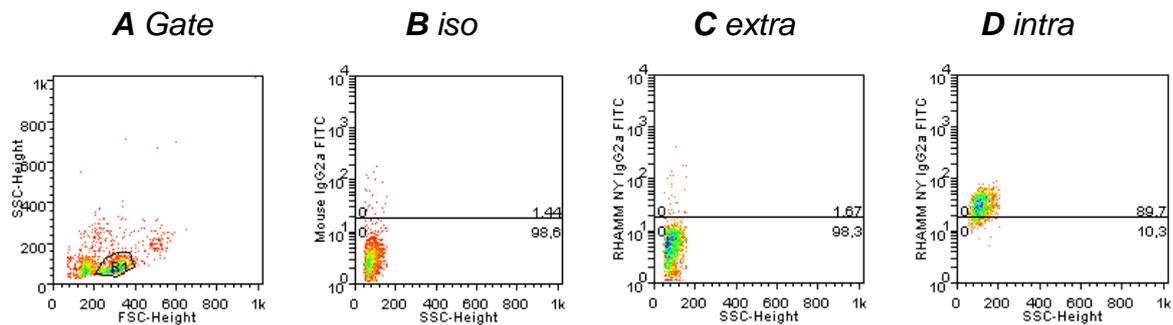
Negativkontrolle G250 (M75)-Ak - HV



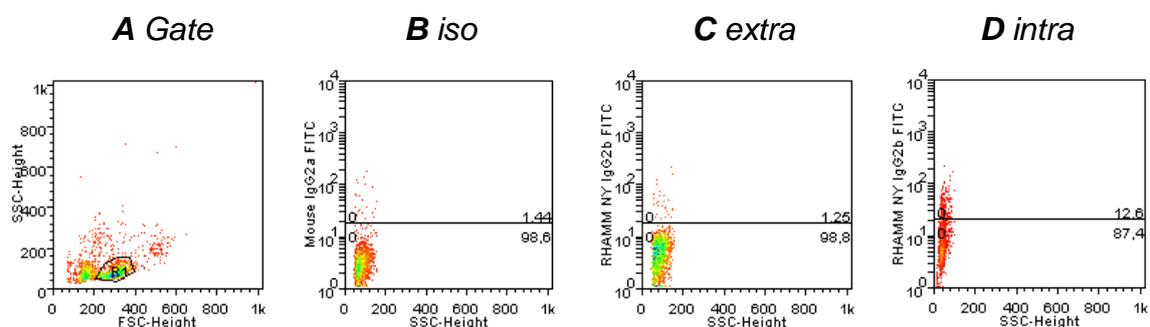
Negativkontrolle NOVOCASTRA-Ak - HV



Negativkontrolle RHAMM New-York 2a -Ak - HV



Negativkontrolle RHAMM New-York 2b -Ak - HV

**Abb. 14:****FACS-Messung der peripheren Blutmonozyten (PBMC) einer HV-Probe beim Expressieren der Antikörper.**

- A:** Gesamtpopulation mit Monozyten oberhalb des Gates (Granulozyten wurden bereits bei der Ficoll-Separation entfernt)
- B:** Iso (Isotypkontrolle)
- C:** Darstellung des negativen Anteils der Population auf der Zelloberfläche unter Verwendung von:
 von: G250 (Willex) 0,8µl Antikörper
 G250 (M75) 5µl Antikörper
 Novocastra 10µl Antikörper
 New York 2a 50µl Antikörper
 New York 2b 50µl Antikörper
- D:** Darstellung des negativen Anteils der Population intrazellulär unter Verwendung von:
 G250 (Willex) 0,8µl Antikörper
 G250 (M75) 10µl Antikörper
 Novocastra 40µl Antikörper
 New York 2a 70µl Antikörper
 New York 2b 50µl Antikörper

AK = Antikörper, CD = Cluster of Differentiation, FACS = Durchflusszytometer, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, FSC = Forwardscatter, HV = gesunder Patient (healthy volunteer), Ig = Immunglobulin, PBMC = mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, RHAMM = Rezeptor für Hyaluronsäure vermittelte Motilität, SSC = Sidewardscatter

Im Gegensatz zu den deutlichen antigenpositiven Reaktionen aus 3.3.1 sehen die in der Abbildung 15 dargestellten Negativkontrollen, die ohne Primärantikörper

durchgeführt wurden, bloss aus. Hier kommt zu keiner spezifischen Antikörperbindung.

Zytospin eines HVs

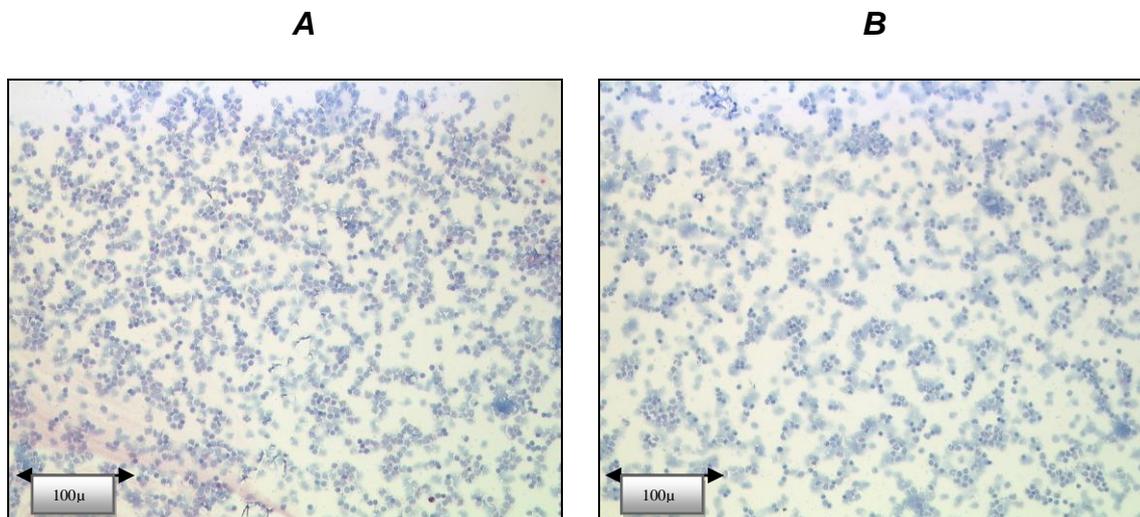


Abb. 15:

Immunzytologische Färbung (Zytospin) eines HVs (healthy volunteer) als Negativkontrolle

mit einem: **A:** G250-Antikörper 100 fache Vergrößerung

B: RHAMM-Antikörper 100 fache Vergrößerung

RHAMM = Rezeptor für Hyaluronsäure vermittelte Motilität

3.4 Analyse von myeloischen Blasten in Patienten mit AML

Nach der erfolgreichen Etablierung der Bedingungen für die Färbung mit den Antikörpern G250-Wilex, G250-M75 und RHAMM-Novocastra, wurden diese Bedingungen auf periphere Blutproben von AML-Patienten übertragen.

Hierzu wurde PBMC aus dem peripheren Blut von Patienten isoliert, die an einer akuten myeloischen Leukämie erkrankt waren.

Diese Proben wurden stets bei Nachweis von peripheren Blasten entweder bei Diagnosestellung oder im 1. Rezidiv entnommen. Diagnostische Informationen zu den hier verwendeten Patienten mit AML sind in Tab. 2 aufgeführt.

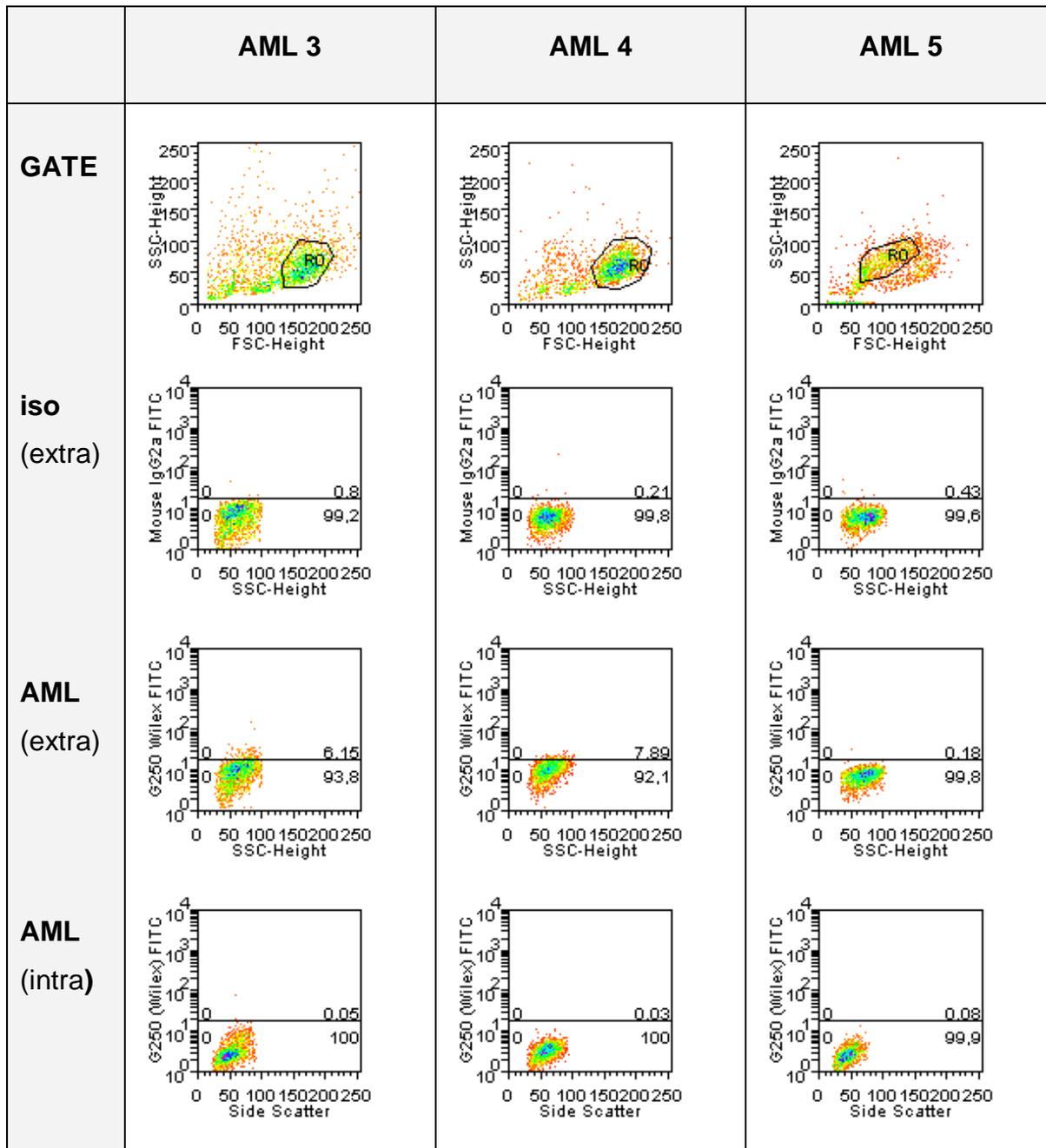
Tab. 2:

Auflistung, der in den durchgeführten Versuchsreihen verwendeten Proben von Patienten mit einer akuten myeloischen Leukämie (AML)

Pat.-Nr. = Patientenummer

Pat.-Nr.	Initia- lien	Geburts- jahr	Ge- schlecht	Alter	Diagnose	Zytogenetik
1	Z. W.	1958	m	49	AML	t(8;21)
2	W. G.	1923	m	85	AML	Nicht durchgeführt
3	O. M.	1965	m	43	AML	46xy,t(2;12)(p21;q13)
4	M. P.	1950	m	58	AML	45x,y inv.(16)(p13q22)
5	S. M.	1944	w	64	AML	t(6;11)
6	R. K.	1940	m	68	AML	del 16q22
7	T. L.	1938	m	70	AML	Nicht durchgeführt

Die ersten immunphänotypischen Analysen wurden mit dem G250-Wilex-Antikörper durchgeführt. Hier waren die Isotyp-Kontrollen durchweg negativ. Die Ergebnisse der Immunphänotypisierung sind in Abb. 16 dargestellt.

**Abb. 16:****Immunphänotypischen Analysen der AML-Patienten 3-5 mit dem G250-Wilex-Antikörper.**

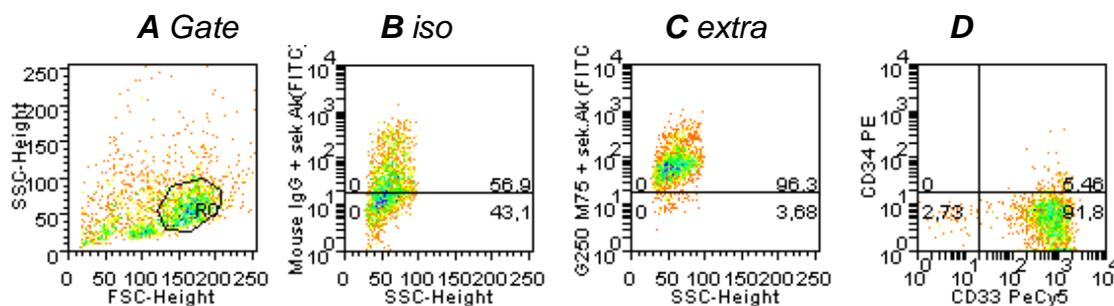
Es wurde, sowohl extrazellulär (extra) als auch intrazellulär (intra) 0,8µl Antikörper verwendet. AML = akute myeloische Leukämie, extra + intra = Darstellung des jeweiligen negativen bzw. positiven Anteils der Population, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, FSC = Forwardscatter, Gate = Gesamtpopulation (Monozyten oberhalb des Gates), Ig = Immunglobulin, Iso = Isotypkontrolle, SSC = Sidewardscatter,

Die Expressionsraten für G250 auf AML Blasten lagen in einem relativ niedrigen Bereich. Es ließen sich bei der extrazellulären Färbung maximal 8% G250 posi-

ve Zellen nachweisen. Bei der intrazellulären Färbung lag die Expressionsrate deutlich unter 1%.

Anschließend wurden Untersuchungen zum Antikörper G250-M75 durchgeführt. Wie bei den Untersuchungen zu den Zelllinien bereits festgestellt, ließen sich bei einer Reihe von AML-Proben die Mehrzahl der AML-Blasten extrazellulär positiv anfärben. Exemplarisch sind hier in dieser Abb. 17 die Patienten AML3 und 4 gezeigt.

AML3 – G250 (M75)



AML4 – G250 (M75)

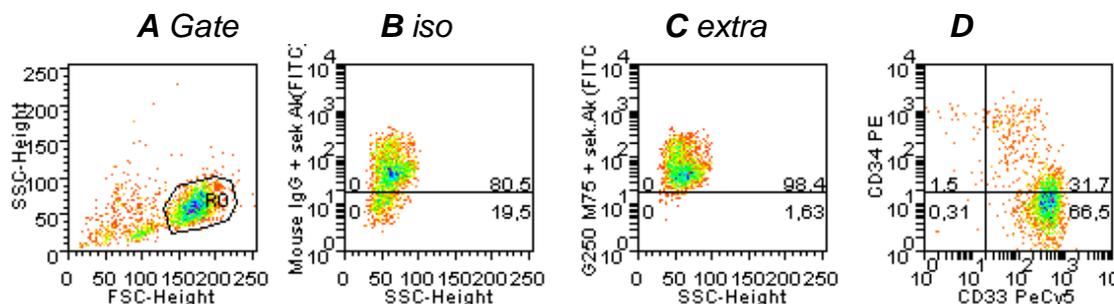


Abb. 17:

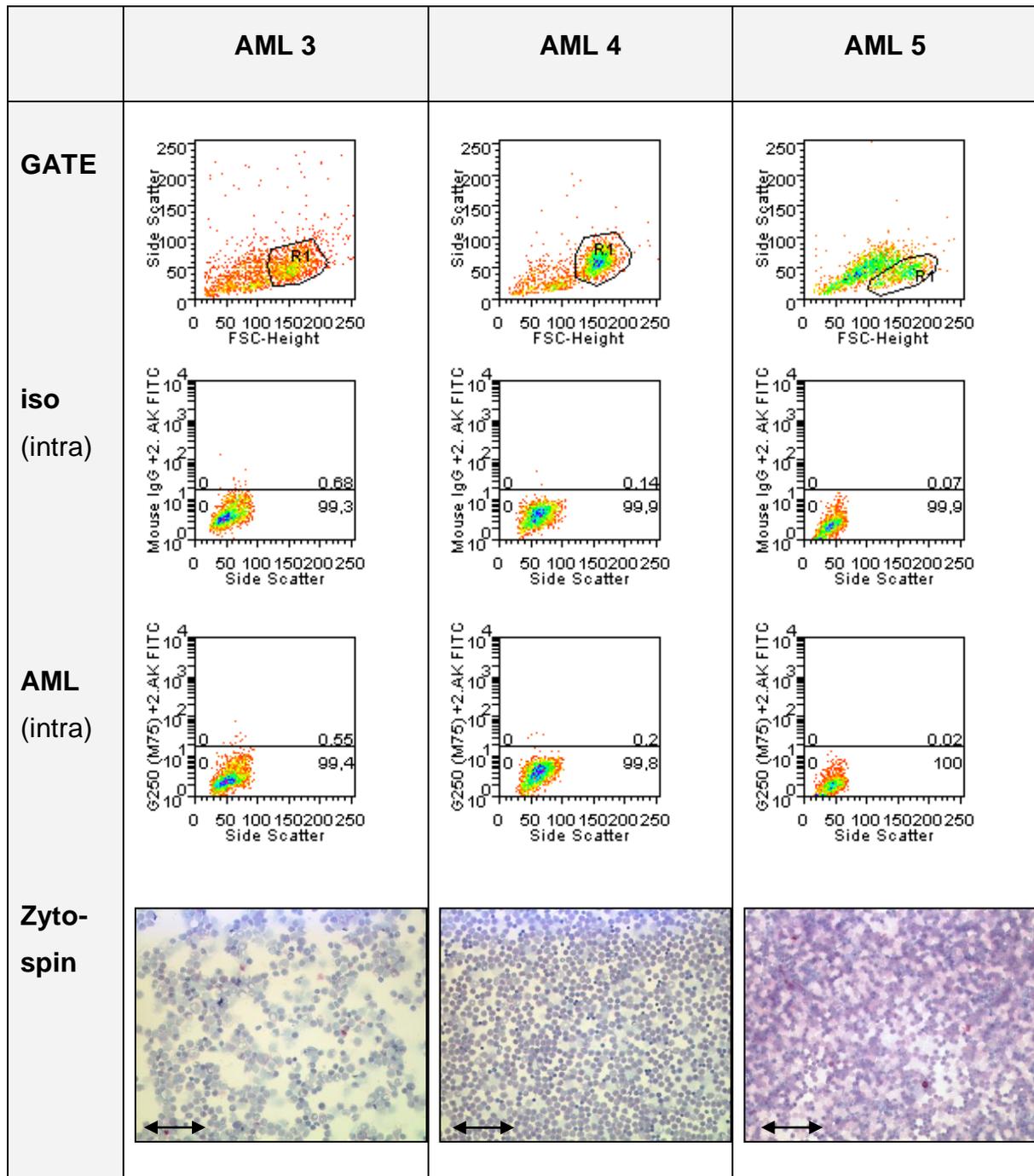
FACS-Messung der PBMC einer AML-Probe beim Exprimieren der Antikörper auf der Zelloberfläche.

- A:** Gesamtpopulation mit Monozyten, unterhalb des Gates befindet sich Zelldebris
B: Ins Positive reichende Zellwolke durch Darstellung des G250 (M75) positiven Anteils während der Isotypenkontrolle → Marker für eine unspezifische Bindung für die Population
C: Darstellung des G250 (M75) positiven Anteils der Population bei den Patientenproben AML3 und AML4
D: Doppelmarkierung mit CD33/CD34 als Marker für maligne Zellen (verwendete Antikörpermenge C-E: 5µl)

AML = akute myeloische Leukämie, Ak = Antikörper, CD = Cluster of Differentiation, FACS = Durchflusszytometer, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, FSC = Forwardscatter, HV = gesunder Patient (healthy volunteer), Ig = Immunglobulin, iso = Isotypenkontrolle, PBMC = mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, SSC = Sidewardscatter

Ersichtlich wird aus dieser Grafik, dass das Antigen für G250 (M75) bei dem AML-Patienten 4 zu 98,4 % gebunden wird. Betrachtet man nur die Abbildungen 17 A,

C+D einzeln, könnte man meinen, G250 (M75) wird spezifisch gebunden. Wird zusätzlich in einer weiteren Grafik, Abb. 17 B, SSC zur Isotypenkontrolle Mouse IgG aufgeführt, ist eine zu 56.9% bzw. 80,5% positive Wolke zu verzeichnen, welche bei einer spezifischen Bindung im negativen Bereich zu finden sein sollte. Folglich handelt es sich bei einem Großteil der positiv gefärbten Zellen um unspezifische Bindungen des Antikörpers. Wie diese Diskrepanz zu den Untersuchungen in den Zelllinien zustande kommen kann, soll später diskutiert werden. Im Gegensatz zu der unspezifisch positiven Isotypkontrollen bei der extrazellulären G250-M75 Färbung waren die Isotypkontrollen bei der Intrazellulären Färbung mit G250-M75 stets negativ. In der Abbildung 18 sind daher vergleichend die AML-Patienten 3-5 dargestellt und direkt mit dem entsprechenden immunhistochemisch gefärbten Zytopspin verglichen.

**Abb. 18:**

Immunphänotypischen Analysen der AML-Patienten 3-5 mit dem G250-M75-Antikörper. Es wurden intrazellulär (intra) 10µl Antikörper (AK) verwendet.

AML = akute myeloische Leukämie, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, FSC = Forwardscatter, Gate = Gesamtpopulation (Monozyten oberhalb des Gates), Ig = Immunglobulin, intra = Darstellung des negativen bzw. positiven Anteils der Population, Iso = Isotypkontrolle, SSC = Sidewardsscatter, $\longleftrightarrow \approx 100\mu$

Abschließend wurde die Expression des LAA RHAMM auf myeloischen Blasten mit dem RHAMM-Novocastra-Antikörper untersucht. Hierzu wurden

Immunphänotypisierungen mit intrazellulärer Färbung, sowie Zytospins durchgeführt. In der Abbildung 19 sind wiederum die Patienten AML 3-5 dargestellt.

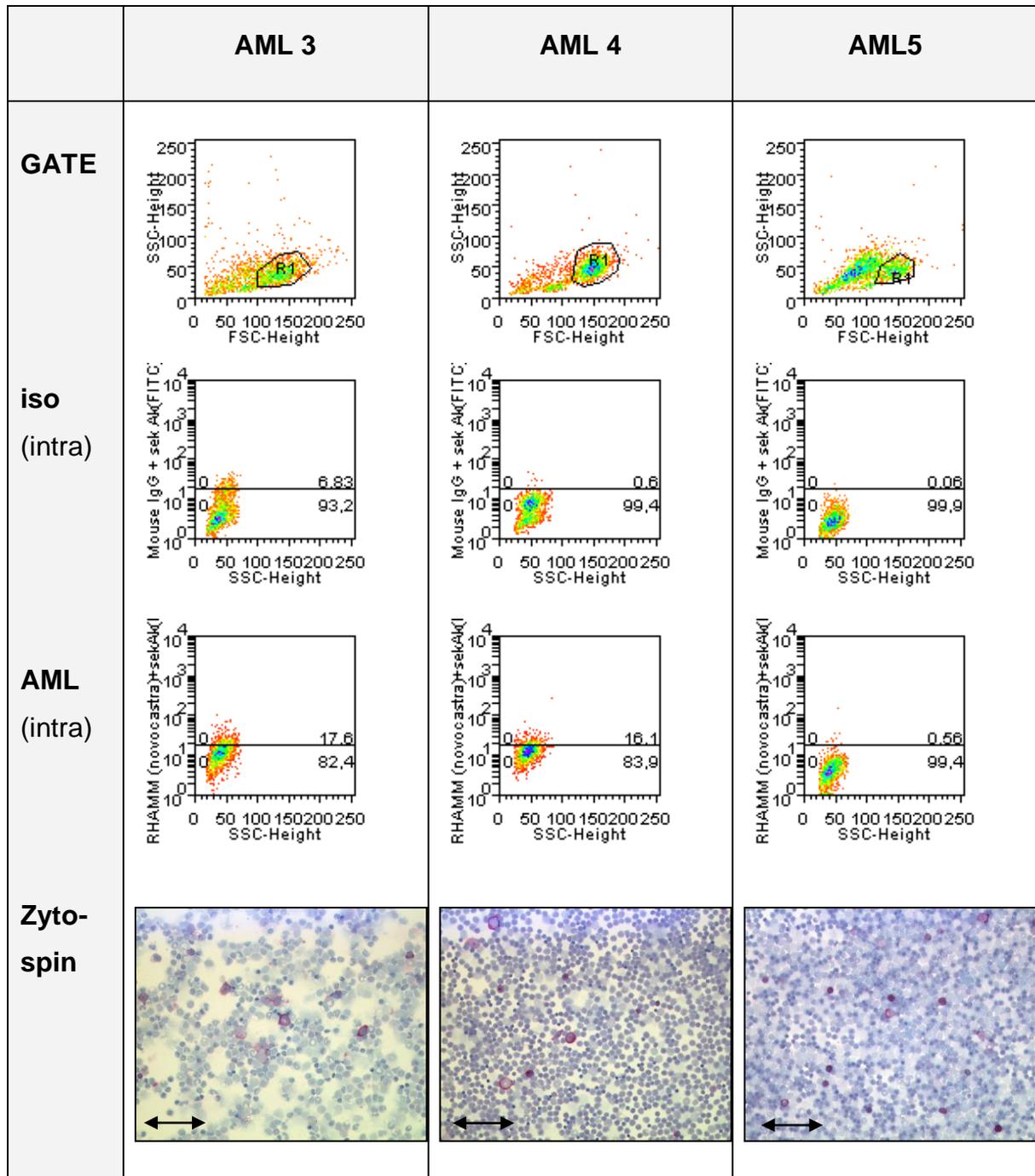


Abb. 19:

Immunphänotypischen Analysen der AML-Patienten 3-5 mit dem RHAMM-Novocastra-Antikörper. Es wurden intrazellulär (intra) 60µl Antikörper (AK) verwendet.

AML = akute myeloische Leukämie, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, FSC = Forwardscatter, Gate = Gesamtpopulation (Monozyten oberhalb des Gates), Ig = Immunglobulin, intra = Darstellung des negativen bzw. positiven Anteils der Population, Iso = Isotypkontrolle, RHAMM = Rezeptor für Hyaluronsäure vermittelte Motilität, SSC = Sidewardscatter, $\longleftrightarrow \approx 100\mu$

Mit diesem Antikörper war eine deutlich höhere Antigenexpression für RHAMM als vorher für G250 zu detektieren. Die Expression belief sich zwischen 0,56 und 17,6% (Mittelwert = 8,705% / Median bei 8,33%). Hier ergab sich prinzipiell eine gute Übereinstimmung im Vergleich zur Immunhistochemie, die in der semiquantitativen Analyse ebenfalls eine schwache Expression aufwies.

Tab.3:**Vergleich der experimentell ermittelten Ergebnisse von Immunphäno-typisierung und Immunhistochemie**

Ak = Antikörper, AML = akute myeloische Leukämie, EC = extrazellulär (auf der Zelloberfläche), FACS = Durchflusszytometer, HV = gesunder Patient (healthy volunteer), IC = intrazellulär, ICH = Immunhistochemie, nt = nicht getestet, NYIg = New York Immunglobulin, RHAMM = Rezeptor für Hyaluronsäure vermittelte Motilität, K562 + SKRC = Zelllinien
x = nicht geeignet, ++ = stark positiv, + = schwach positiv

AK		FACS								IHC			
		K562		SKRC		AML		HV		K562	SKRC	AML	HV
		IC	EC	IC	EC	IC	EC	IC	EC				
G 2 5 0	Willex	nt	nt	++	++	-	+	-	-	nt	nt	nt	nt
	M75	nt	nt	++	++	-	+	-	-	nt	++	-	-
R H A M M	Novocastra	++	++	nt	nt	+	-	-	-	++	nt	+	-
	NY IgG 2a	+	-	nt	nt	-	-	+	-	nt	nt	nt	nt
	NY IgG 2b	x	x	nt	nt	-	-	-	-	nt	nt	nt	nt

4. DISKUSSION

Seit den 1950er Jahren stellte die Chemotherapie mit zellschädigenden und meist relativ einfach gebauten chemischen Substanzen die einzige Behandlungsmethode für fortgeschrittene systemische Tumorerkrankungen und insbesondere für hämatologische Neoplasien dar. Erst in den letzten zwei Jahrzehnten wurden, einhergehend mit dem besseren Verständnis der molekularen Pathogenese dieser Erkrankungen, zielgerichtete Strategien zur Krebstherapie entwickelt, die besser definierte Angriffspunkte zur Bekämpfung von Tumorzellen nutzen. Sie wirken spezifisch und kommen damit dem Ziel der besseren Krankheitskontrolle mit geringeren Nebenwirkungen näher. Typische Vertreter dieser Medikamentengeneration sind Signalübertragungshemmer (z.B. Tyrosinkinaseinhibitoren oder mTOR-Antagonisten), Gentherapeutika und Immuntherapeutika. Einige dieser Medikamente sind noch in der klinischen Prüfung, andere wie die Tyrosinkinaseinhibitoren Sunitinib und Sorafenib oder der Antikörper Rituximab haben bereits den Eingang in die routinemäßige klinische Anwendung gefunden.

4.1 Grundlagen der Therapie bei Patienten mit AML

Wie schon einleitend beschrieben, gibt es für die Behandlung von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie risikoadaptierte Ansätze, die sich in ihrer Intensität und Zielsetzung grundlegend unterscheiden. Die Bandbreite des Therapiespektrums reicht von einer wenig intensiven Therapie in palliativer Intention bei älteren oder komorbiden Patienten bis hin zu einer allogenen Stammzelltransplantation (SZT), die immer mit kurativer Zielsetzung durchgeführt wird. So wird AML-Patienten, bei denen eine refraktäre Erkrankung oder ein Rezidiv vorliegt, in der Primärtherapie abhängig von der Risikosituation (Karyotyp, Ansprechen auf die Therapie, Alter, Nebendiagnosen) und Spendersituation, eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt [15, 48]. Als entscheidende Einflussgröße auf die Prognose der an einer AML erkrankten Patienten haben sich in den letzten Jahren die Zytogenetik und zusätzliche molekulare Marker erwiesen [30, 49, 50]. Auf dieser Grundlage wurde auch die neue WHO-Klassifikation für myeloische

Neoplasien entwickelt, in der zytogenetischen Aberrationen eine grundlegende Bedeutung zukommt [55].

Besonders problematisch ist ein chemotherapiebasierender Therapieansatz bei älteren Patienten, da ihre Leukämiezellen häufiger eine Hochrisiko-Zytogenetik oder die Expression von Multi-Drug-Resistance-Genen aufweisen [31]. Die schlechtere Toleranz der konventionellen Konsolidierungstherapie in dieser Altersgruppe trägt zusätzlich zur schlechten Prognose bei [35]. Obwohl in den letzten Jahren dosisreduzierte Transplantationsprotokolle entwickelt wurden, welche die Zielgruppe transplantierbarer Patienten deutlich vergrößert haben, kommt die Mehrzahl der Patienten dennoch für einen derart intensiven Therapieansatz in Frage.

Die oben beschriebenen Marker versetzen uns außerdem in die Lage, mit Methoden, die meist PCR-basiert sind, molekulare Resterkrankung (MRD) sehr früh zu identifizieren. Gerade in einer solchen Situation wäre es wünschenswert eine wenig toxische Therapie zur Verfügung zu haben, welche die Krankheit auf diesem Niveau kontrollieren oder sogar eliminieren kann, ohne dass es zu einem hämatologischen Rezidiv kommt. Dies setzt die Existenz leukämiespezifischer Strukturen voraus, die für solch einen Therapieansatz nutzbar gemacht werden könnten.

4.2 Ansatz einer LAA-gerichteten Immuntherapie bei der AML

Anfang der 90er Jahre wurde das erste Tumorantigen MAGE-1 aus einer Melanomzelllinie kloniert, das erwiesenermaßen cytotoxische T-Zellen zu einer spezifischen Immunantwort stimulieren konnte [54]. Über Jahre konzentrierte sich die Identifikation solcher TAA mit dem Melanom und dem Nierenzellkarzinom auf die zwei soliden Tumorentitäten, die als immunogen angesehen wurde. In dieser Zeit benutzten die meisten Arbeitsgruppen Cosmid-basierte Expressionssysteme oder die SEREX-Methode, die 1995 in der Arbeitsgruppe von Michael Pfreundschuh etabliert wurde [45]. Die Übertragung dieser letzteren Methode auf Patienten mit myeloischen Neoplasien verifizierte zum einen aus den soliden Tumoren bekannte Antigene als ebenfalls leukämieassoziiert (wie z.B. Wt-1, PRAME oder G250), führte zum anderen aber auch zur Entdeckung neuer antigenrelevanter Strukturen wie RHAMM [21].

An solche Zielstrukturen sind 3 Anforderungen zu stellen: Erstens sollten sie mit einer hohen Expressionsstärke auf der Oberfläche der Zellen exprimiert sein, zweitens sollte die Expression möglichst homogen sein, um Selektionseffekte und einen Immunescape zu vermeiden, und drittens sollte die Zielstruktur auf körpereigenem Gewebe nicht exprimiert sein, um systemische Nebenwirkungen einer solchen Therapie zu minimieren.

Die Expression mehrerer LAA auf einem Leukämiezellklon wäre dabei sicher von Vorteil, weil durch den damit möglichen polyvalenten immuntherapeutischen Ansatz das Risiko eines Immunescape gleichfalls vermindert würde.

Die ersten Analysen zur Expression dieser Antigene waren PCR-basiert und können damit lediglich die Expression auf mRNA-Ebene nachweisen, ohne die relevante Expression auf Proteinebene darstellen zu können. Gerade der oben aufgeführte Punkt der homogenen Expression ist mittels PCR nicht zu klären, da er lediglich die Expression des jeweiligen Antigens in einem Zellgemisch erfassen kann und keine Aussage auf Einzelzellebene ermöglicht. Daher ist für die abschließende Bewertung der Eignung eines Antigens als Zielstruktur ein Antikörperbasierter Nachweis unerlässlich.

4.3 Bedeutung der untersuchten LAAs RHAMM und G250

Durch umfangreiche PCR basierte Expressionsanalysen gelang die Identifikation und Bewertung einer Vielzahl von LAA. Die Expressionsfrequenz in den untersuchten Patientenproben belief sich zwischen 27 und 100% [20]. Aus dieser großen Zahl von LAA heben sich die Antigene RHAMM, G250 und PRAME hervor, weil die Expression dieser Antigene in einer Microarray-Analyse signifikant mit dem Gesamtüberleben assoziiert waren. Dabei war G250 das einzige Antigen, welches alleine einen signifikanten Einfluss auf die Prognose hatte ($p = 0.022$). Dies lässt zumindest über eine hohe immunogene Wirkung dieser Antigene und mit einer durch die ausgelöste T-Zellantwort verbundenen immunologischen Kontrolle spekulieren.

Auch diese Beobachtung führte dazu, dass eine peptidbasierte RHAMM-Vakzinierungsstudie initiiert wurde. Die Ergebnisse wurden bereits publiziert und zeichnen sich bei der Mehrzahl der Patienten durch ein durch Elispos nachgewiesenes immunologisches Ansprechen und bei einem Teil der Patienten durch ein klinisches Ansprechen aus [51].

Für G250 wurde bei 95% der Patienten mit klarzelligem Nierenkarzinom eine Expression auf den Zellen nachgewiesen. Eine 2007 veröffentlichte Phase I-Studie in der ein chimärer G250-Antikörper mit Iod-131 markiert wurde, führte bei einem Patienten zu einer kompletten Remission und bei 60% der Gesamtkollektivs zu einer Stabilisierung der Erkrankung [10]. Zieht man die oben ausgeführte prognostische Relevanz von G250 in Patienten mit akuter myeloische Leukämie in Betracht, stellt dieses Antigen zweifellos auch in dieser Entität eine attraktive immunologische Zielstruktur dar.

4.4 Untersuchungen der Expression von G250 und RHAMM in Zelllinien

Mit denen in dieser Arbeit durchgeführten antikörperbasierten Untersuchungen sollten RHAMM und G250 als immunologische Zielstrukturen auf Zelllinien und Blasten bei Patienten mit myeloischer Leukämie untersucht werden. Ein wichtiges Ziel war es, einen Antikörper zu finden, der eine zuverlässige Beurteilung der Expression dieser zwei Antigene ermöglicht. Falls solch ein diagnostisch verwertbarer Antikörper identifiziert würde, wäre durchaus auch zu überlegen, ob der Einsatz dieses Antikörpers auch in therapeutischer Option möglich wäre.

Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die Differenzierung zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Antigenexpression gelegt.

Als Zelllinie wurde im Fall von G250 die klarzellige Nierenzellkarzinomzelllinie SKRC 52 gewählt. Im Durchschnitt exprimieren 35% aller Zellen in klarzelligem Nierenzellkarzinomen G250 [32]. Im Vergleich hierzu weist die SKRC-52-Zelllinie eine G250-Expression auf über 90% aller Zellen auf und erscheint wegen der homogenen G250-Expression zur Antikörpercharakterisierung als besonders geeignet.

Es wurden hier zwei Antikörper eingesetzt, die beide eine hohe G250 Expression in der SKRC-52 Zelllinie nachweisen konnten. Dabei wurden durch den Wilex-Antikörper sowohl bei der intra- als auch bei der extrazellulären Anfärbung eine Expression von 99% nachgewiesen, bei dem M75-Antikörper war die intrazelluläre Expression mit 88% um 10% niedriger als die extrazelluläre Expression mit 98%. Die Ergebnisse mit beiden Antikörpern sind in guter Übereinstimmung mit den Daten von Li et al. [32], die mit einem murinen IgG2a Antikörper eine Expressionsrate von 94% nachwiesen.

Da in dieser Arbeit auch neu generierte Antikörper getestet werden sollten, wurde von Anfang an darauf geachtet, die Ergebnisse der Immunphänotypisierung durch eine zweite Methode abzusichern. Durch die Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Barth war es möglich, eine semiquantitative Vergleichsuntersuchung mittels Immunhistochemie zu Verfügung zu haben. Im Falle der G250 Analyse in SKRC-52 wurde der M75 Antikörper unter Visualisierung mittels Envision-Kit eingesetzt und bestätigte in der semiquantitativen Auswertung eindeutig die in der Immunphänotypisierung gefundenen Ergebnisse (Abb. 10).

Für die Charakterisierung der RHAMM-Antikörper wurde die Zelllinie K562 gewählt. Für diese Zelllinie wurde eine hohe Expression von RHAMM auf RNA-Ebene beschrieben. Hier wurden insgesamt 3 verschiedene Antikörper, ein kommerziell erhältlicher Anti-CD168-Antikörper und 2 Antikörperüberstände, die uns vom Ludwigs-Institut of Cancer Research zur Verfügung gestellt wurden, eingesetzt. Hier zeigten sich für den Novocastra-Antikörper deutlich diskrepante Werte zwischen der intrazellulären (75%) und der extrazellulären Färbung (16%). Dies liegt wahrscheinlich darin begründet, dass bei der intrazellulären Färbung die Zellmembran zwar permeabilisiert wird, der Antikörper sich allerdings nicht nur intrazellulär, sondern auch zusätzlich auf der Zellmembran ablagert. Insofern kann der deutlich höhere Wert für die intrazelluläre Färbung als Summationseffekt von intra- und extrazellulärem Antikörper interpretiert werden. In der semiquantitativen Analyse durch die immunhistochemische Färbung des Zytospins, der ja auch sowohl membrangebundenes Antigen wie auch intrazelluläres Antigen anfärbt, lassen sich auch diese Ergebnisse klar bestätigen.

Die Ergebnisse, die sich durch die Färbungen mit den Antikörperüberständen ergaben, sind schwieriger zu interpretieren. Zwar zeigt sich bei der Färbung mit dem RHAMM-NY-2a-Antikörper eine hohe intrazelluläre Anfärbung bei negativer Isotypkontrolle. Allerdings war auch die korrespondierende Negativkontrolle bei gesunden Kontrollpersonen mit einer Expressionsrate von fast 90% stark positiv. Bei in der Literatur beschriebener bekannter RHAMM-Negativität für gesunde Kontrollpersonen in der RT-PCR weist dies am ehesten auf eine unspezifische Kreuzreaktivität mit einem unbekanntem anderen Antigen hin. Gleiches gilt auch für den Antikörper RHAMM-NY-2b. Die beiden letzten Antikörper wurden daraufhin nicht zur weiteren Analyse der Patientenproben eingesetzt.

4.5 Analyse der Blutproben von AML-Patienten

Nachdem 3 Antikörper Ihre Wertigkeit bei der Analyse von Zelllinien unter Beweis gestellt hatten, wurden die Untersuchungen auf periphere Blutproben von AML-Patienten ausgedehnt. Diese Blutproben wurden entweder bei Erstdiagnose oder im hämatologischen Rezidiv mit einem hohen peripheren Blastenanteil entnommen. Zunächst wurden die Färbungen mit dem Wilex-Antikörper auf G250 durchgeführt. Hier fand sich eine Expression von maximal 8% in der extrazellulären Immunphäotypisierung. Intrazellulär war die Färbung negativ. Diese niedriggradige Expression von G250 auf Proteinebene ist ein bekanntes Phänomen und deckt sich mit den Beobachtung anderer Arbeitsgruppen (J. Greiner, persönliche Mitteilung).

Die Immunphäotypisierungen mit dem M75-Antikörper sind nicht diagnostisch, da die Isotypkontrolle wiederholt positiv wurde. Die Gründe hierfür sind unklar, es kann hier nur spekuliert werden, ob die unterschiedlichen Kulturbedingungen mit unterschiedlicher Supplementierung (z.B. humanes Serum statt fetalem Kälberserum) hierfür verantwortlich sind.

Für die Untersuchung auf RHAMM wurde, nachdem sich die RHAMM-NY-Ak nicht verwenden ließen, lediglich der kommerziell erhältliche Novocastra-Antikörper eingesetzt. Die Expression für RHAMM in der Immunphäotypisierung belief sich zwischen 0,56 und 17,6% (Mittelwert = 8,705% / Median bei 8,33%).

Hier wurde von Herrn Prof. Dr. T. Barth ebenfalls ein vergleichender Zytospin angefertigt und immunhistochemisch gefärbt. Vergleicht man nun die beiden Methoden bei der RHAMM-Färbung lässt sich eine Anfärbung finden, die allerdings nur wenige Zellen betrifft. Dies ist in guter Übereinstimmung mit immunphänotypisch ermittelten Größenordnungen, die ebenfalls im Niedrigprozentbereich lagen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

RHAMM (Receptor for hyaluronic acid mediated motility) und G250 sind wichtige Leukämie-assoziierte Antigene (LAAs) bei Patienten, die an einer akuten myeloischen Leukämie (AML) erkrankt sind. Die Expression dieser LAA in Kombination mit einem weiteren LAA PRAME (Preferentially expressed antigen of melanoma) erlaubt eine prognostische Aussage über das Überleben von Patienten mit AML. RHAMM ist eine Zielstruktur für eine T-Zell-basierte Immuntherapien, die als Peptidvakzinierung bei AML-Patienten auf Phase I/II-Niveau bereits positive Studienergebnisse erbracht hat. G250 wird sowohl von Zellen des klarzelligen Nierenzellkarzinoms auf Proteinebene als auch von AML-Blasten auf mRNA-Ebene exprimiert. Ein gegen G250 gerichteter radioaktiv markierter monoklonaler Antikörper wurde bei Patienten mit Nierenzellkarzinomen ebenfalls in einer Phase I/II-Studie eingesetzt.

In dieser Arbeit wurden nach Ermittlung der optimalen Konzentration für jeden Antikörper anschließend hoch antigenexprimierende Zelllinien zur Charakterisierung der Antikörper eingesetzt. Hierbei ergab sich mit beiden G250-Antikörpern eine hohe Expression dieses Antigens auf der Nierenzellkarzinomzelllinie SKRC-52. Diese Daten ließen sich überdies in der Immunhistochemie klar bestätigen und stimmen gut mit der Literatur überein. Bei der Untersuchung der RHAMM-Expression ergab sich in Zelllinie K562 ein uneinheitliches Bild. Während durch den Novocastra-Antikörper insbesondere in der intrazellulären Immunphänotypisierung und in der Immunhistochemie eine hohe RHAMM-Expression nachgewiesen wurde, waren bei den NY (New York)-RHAMM-Antikörpern bei antigen-negativen Kontrollen eine Expression nachweisbar. Wegen dieser unspezifischen Reaktivität wurden die Antikörper von den weiteren Analysen ausgeschlossen.

Bei den Blutproben, die von AML-Patienten gewonnen wurden, ließ sich in der Immunphänotypisierung eine niedrige Expression von G250 und von RHAMM auf Proteinebene nachweisen, die deutlich niedriger als in den Zelllinien liegt. Ein Vergleich der Expression von G250 in der Immunphänotypisierung und in der Immunhistochemie ist nicht möglich, da verschiedene Antikörper eingesetzt wurden. Hingegen deckt sich die Höhe der RHAMM-Expression in beiden verwendete-

ten Methoden. Die Untersuchungen bestätigen, dass beide LAA attraktive Zielstrukturen für immuntherapeutische Ansätze, gegebenenfalls auch antikörperbasiert, sein können. Die doch niedrigen Expressionsraten auf Proteinebene mahnen jedoch zur Vorsicht und sollten unbedingt durch weitere Antikörper überprüft werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Albin M, Bjork J, Welinder H, Tinnerberg H, Mauritzson N, Johansson B, Billstrom R, Stromberg U, Mikoczy Z, Ahlgren T, Nilsson PG, Mitelman F, Hagmar L. Acute myeloid leukemia and clonal chromosome aberrations in relation to past exposure to organic solvents. *Scand J Work Environ Health* 26: 482-491, 2000
2. Barth TFE, Martin-Subero JI, Joos S, et al. Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 101: 3681-3686, 2003
3. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103: 620-625, 1985
4. Bleumer I, Knuth A, Oosterwijk E, Hofmann R, Varga Z, Lamers C, Kruit W, Melchior S, Mala C, Ullrich S, De Mulder P, Mulders PF, Beck J. A phase II trial of chimeric monoclonal antibody G250 for advanced renal cell carcinoma patients. *Br J Cancer* 90: 985-990, 2004
5. Bloomfield CD, Lawrence D, Byrd JC, Carroll A, Pettenati MJ, Tantravahi R, Patil SR, Davey DT, Schiffer CA, Arthur DC, Mayer RJ. Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res* 58: 4173-4179, 1998
6. Breems DA, Van Putten WL, Huijgens PC, Ossenkoppele GJ, Verhoef GE, Verdonck LF, Vellenga E, De Greef GE, Jacky E, Van der Lelie J, Boogaerts MA, Löwenberg B. Prognostic index for adult patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *J Clin Oncol* 23: 1969-1978, 2005

7. Bullinger L, Döhner K, Bair E, Fröhling S, Schlenk RF, Tibshirani R, Döhner H, Pollack JR. Use of Gene-Expression Profiling to Identify Prognostic Subclasses in Adult Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 350: 1605-1616, 2004
8. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood* 85: 1416-1434, 1995
9. Cavani S, Perfumo C, Argusti A, Pierluigi M, Perroni L, Schmiegelow K, Petersen MB, Cotter FE, Strigini P, Dagna-Bricarelli F, Nizetic D. Cytogenetic and molecular study of 32 Down syndrome families: potential leukaemia predisposing role of the most proximal segment of chromosome 21q. *Br J Haematol* 103: 213-216, 1998
10. Davis ID, Wiseman GA, Lee FT, Gansen DN, Hopkins W, Papenfuss AT, Liu Z, Moynihan TJ, Croghan GA, Adjei AA, Hoffman EW, Ingle JN, Old LJ, Scott AM. A phase I multiple dose, dose escalation study of cG250 monoclonal antibody in patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer Immun* 7: 13, 2007
11. Dietel M, Suttorp N, Zeitz M, Harrison, Fauci, Braunwald: *Harrisons Innere Medizin*. Deutsche Ausgabe in Zusammenarbeit mit der Charité, 16. Auflage, Abw Wissenschaftsverlag Berlin, S. 679, 2005
12. Döhner H, Estey E. Acute myeloid leukaemia, *Lancet*. 368: 1894-1907, 2006
13. Estey E. Clinical trials in AML of the elderly: should we change our methodology. *Leukemia* 18: 1772-1774, 2004
14. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 368: 1894-1907, 2006

15. Fröhling S, Schlenk R, Kayser S, Morhardt M, Benner A, Döhner K, Döhner H. Cytogenetics and age major determinants of outcome in intensively treated acute myeloid leukemia patients older than 60 years: results from AMLSG trial AML HD98-B. *Blood* 108: 3280-3287, 2006
16. Giannopoulos K, Schmitt M. Targets and strategies for T-cell based vaccines in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 47: 2028-2036, 2006
17. Giles FJ, Keating A, Goldstone AH, Avivi I, Willman CL, Kantarjian HM. Acute myeloid leukemia. *Hematology* 1: 73-110, 2002
18. Greiner J, Döhner H, Schmitt M. Cancer vaccines for patients with acute myeloid leukemia--definition of leukemia-associated antigens and current clinical protocols targeting these antigens. *Haematologica* 91: 1653-1661, 2006
19. Greiner J, Li L, Ringhoffer M, Barth TF, Giannopoulos K, Guillaume P, Ritter G, Wiesneth M, Döhner H, Schmitt M. Identification and characterization of epitopes of the receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM/CD168) recognized by CD8⁺ T cells of HLA-A2-positive patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 106: 938-945, 2005
20. Greiner J, Ringhoffer M, Taniguchi M, Li L, Schmitt A, Shiku H, Döhner H, Schmitt M. mRNA expression of leukemia-associated antigens in patients with acute myeloid leukemia for the development of specific immunotherapies. *Int J Cancer* 108: 704-711, 2004
21. Greiner J, Ringhoffer M, Taniguchi M, Schmitt A, Kirchner D, Krähn G, Heilmann V, Gschwend J, Bergmann L, Döhner H, Schmitt M. Receptor for hyaluronan acid-mediated motility (RHAMM) is a new immunogenic leukemia-associated antigen in acute and chronic myeloid leukemia. *Exp Hematol* 30: 1029-1035, 2002

22. Greiner J, Schmitt M, Li L, Giannopoulos K, Bosch K, Schmitt A, Döhner K, Schlenk RF, Pollack JR, Dohner H, Bullinger L. Expression of tumor-associated antigens in acute myeloid leukemia: Implications for specific immunotherapeutic approaches. *Blood* 108: 4109-4117, 2006
23. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. The 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. *Ann Oncol* 10: 1419-1432, 1999
24. Hiddemann W, Kern W, Schoch C, Fonatsch C, Heinecke A, Wormann B, Büchner T. Management of acute myeloid leukemia in elderly patients. *J Clin Oncol* 17: 3569-3576, 1999
25. Hutt AM, Kalf GF. Inhibition of human DNA topoisomerase II by hydroquinone and p-benzoquinone, reactive metabolites of benzene. *Environ Health Perspect* 104: 1265-1269, 1996
26. Jaffe ES, Harris NL, Diebold J, Muller-Hermelink HK. World Health Organization classification of neoplastic diseases of hematopoietic and lymphoid tissues. A progress report. *Am J Clin Pathol* 111: 8-12, 1999
27. Kane EV, Roman E, Cartwright R, Parker J, Morgan G. Tobacco and the risk of acute leukaemia in adults. *Br J Cancer* 81: 1228-1233, 1999
28. Kaplan EL und Meier P Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53: 457-481, 1958
29. Keilholz U, Letsch A, Busse A, Asemussen AM, Bauer S, Blau IW, Hofmann WK, Uharek L, Thiel E, Scheibenbogen C. A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood* 113: 6541-6548, 2009

30. Krauter J, Wagner K, Schäfer I, Marschalek R, Meyer C, Heil G, Schaich M, Ehninger G, Niederwieser D, Krahl R, Büchner T, Sauerland C, Schlegelberger B, Döhner K, Döhner H, Schlenk RF, Ganser A. Prognostic factors in adult patients up to 60 years old with acute myeloid leukemia and translocations of chromosome band 11q23: individual patient data-based meta-analysis of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. *J Clin Oncol* 27: 3000-3006, 2009

31. Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J, McConnell T, Slovak ML, Chen IM, Head DR, Appelbaum FR, Willman CL. Acute Myeloid Leukemia in the Elderly: Assessment of Multidrug Resistance (MDR1) and Cytogenetics Distinguishes Biologic Subgroups With Remarkably Distinct Responses to Standard Chemotherapy. *Blood* 89: 3323-3329, 1997

32. Li G, Passebosco-Faure K, Lambert C, Gentil-Perret A, Blanc F, Oosterwijk E, Mosnier JF, Genin C, Tostain J. The expression of G250/mn/CA9 antigen by flow cytometry: its possible implication for detection of micrometastatic renal cancer cells. *Clin Cancer Res* 7: 89-92, 2001

33. Li L, Reinhardt P, Schmitt A, Barth TF, Greiner J, Ringhoffer M, Döhner H, Wiesneth M, Schmitt M. Dendritic cells generated from acute myeloid leukemia (AML) blasts maintain the expression of immunogenic leukemia associated antigens. *Cancer Immunol Immunother* 54: 685-693, 2005

34. Löwenberg B, Dowing JR, Burnett A. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 14: 1051-1062, 1999

35. Mayer R, Davis R, Schiffer C, Berg D, Powell B, Schulman P, Omura G, Moore J, McIntyre O, Frei E. Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 331: 896-903, 1994

36. Meinert R, Schuz J, Kaletsch U, Kaatsch P, Michaelis J. Leukemia and non-Hodgkin's lymphoma in childhood and exposure to pesticides: results of a

- register-based case-control study in Germany. *Am J Epidemiol* 151: 639-650, 2000
37. Meldrum NU, Roughton FJW. Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *Journal of Physiology* 80: 113-142, 1933
38. Mertens AC, Wen W, Davies SM, Steinbuch M, Buckley JD, Potter JD, Robison LL. Congenital abnormalities in children with acute leukemia: a report from the Children`s Cancer Group. *J Pediatr* 133: 617-623, 1998
39. Mitchel RE, Jackson JS, McCann RA, Boreham DR. The adaptive response modifies latency for radiation-induced myeloid leukemia in CBA/H mice. *Radiat Res* 152: 273-279, 1999
40. Molldrem J, Dermime S, Parker K, Jiang YZ, Mavroudis D, Hensel N, Fukushima P, Barrett AJ. Targeted T-cell therapy for human leukemia: cytotoxic T lymphocytes specific for a peptide derived from proteinase 3 preferentially lyse human myeloid leukemia cells. *Blood* 88: 2450-2457, 1996
41. Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Review*: 115-136, 2004
42. Paustenbach DJ, Bass RD, Price P. Benzene toxicity and risk assessment, 1972-1992: implications for future regulation. *Environ Health Perspect* 101: 177-200, 1993
43. Pui CH, Behm FG, Raimondi SC, Dodge RK, George SL, Rivera GK, Miro J, Kalwinsky DK, Dahl GV, Murphy SB. Secondary acute myeloid leukemia in children treated for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 321: 136-142, 1989
44. Pulsoni A, Pagano L, Latagliata R, Casini M, Cerri R, Crugnola M, De Paoli L, Di Bona E, Invernizzi R, Marmont F, Petti MC, Rigolin G, Ronco F, Spa-

- dano A, Tosti ME, Visani G, Mele A, Mandelli F. Survival of elderly patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica* 89: 296-302, 2004
45. Sahin U, Türeci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I, Pfreundschuh M. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci* 92: 11810-11813, 1995
46. San Miguel JF, Vidriales MB, Lopez-Berges C, Diaz-Mediavilla J, Gutierrez N, Canzio C, Ramos F, Calmuntia MJ, Perez JJ, Gonzales M, Orfao A. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood* 98: 1746-1751, 2001
47. Sandoval C, Pui CH, Bowman LC, Heaton D, Hurwitz CA, Raimondi SC, Behm FG, Head DR. Secondary acute myeloid leukemia in children previously treated with alkylating agents, intercalating topoisomerase II inhibitors, and irradiation. *J Clin Oncol* 11: 1039-1045, 1993
48. Schlenk RF, Benner A, Hartmann F, del Valle F, Weber C, Pralle H, Fischer JT, Gunzer U, Pezzutto A, Weber W, Grimminger W, Preiss J, Hensel M, Frohling S, Döhner K, Haas R, Döhner H. Risk-adapted postremission therapy in acute myeloid leukemia: results of the German multicenter AML HD93 treatment trial. *Leukemia* 17: 1521-1528, 2003
49. Schlenk RF, Döhner K. Impact of new prognostic markers in treatment decisions in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* 16: 98-104, 2009
50. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, Habdank M, Späth D, Morgan M, Benner A, Schlegelberger B, Heil G, Ganser A, Döhner H. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* 358: 1909-1918, 2008

51. Schmitt M, Schmitt A, Rojewski MT, Chen J, Giannopoulos K, Fei F, Yu Y, Götz M, Heyduk M, Ritter G, Speiser DE, Grnjatic S, Guillaume P, Ringhofer M, Schlenk RF, Liebisch P, Bunjes D, Shiku H, Döhner H, Greiner J. RHAMM-R3 peptide vaccination in patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, and multiple myeloma elicits immune logic and clinical responses. Schmitt et al. *Blood* 111: 1357-1365, 2008
52. Smith SM, Le Beau MM, Huo D. Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia or myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood* 102: 43-52, 2003
53. Stone RM, O`Donnell MR, Sekeres MA. Acute Myeloid Leukemia. *Hematology* 1: 98-117, 2004
54. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254: 1643-1647, 1991
55. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organisation (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 100: 2292-2302, 2002

7. DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Hartmut Döhner bedanken, dass ich die Räumlichkeiten des Tumormunologie-Labors der Universitätsklinik Ulm, Klinik für Innere Medizin III, zur wissenschaftlichen Nutzung zur Verfügung gestellt bekommen habe und in seiner Abteilung promovieren durfte.

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Michael Schmitt. Er brachte mir viel Geduld entgegen und sorgte mit wertvollen Ratschlägen und fundiertem Fachwissen für das Gelingen der Arbeit.

Mein sehr herzlicher Dank gebührt Herrn PD Dr. med. Mark Ringhoffer, der nach dem beruflichen Wechsel von Prof. Dr. med. Michael Schmitt nach Rostock die Rolle meines Doktorvaters mit viel Engagement übernahm. Mit seiner sehr persönlichen Unterstützung und Motivation war er mir stets eine große Hilfe.

Frau Dr. med. Anita Schmitt stand mir jederzeit mit viel Geduld und wissenschaftlicher Unterstützung zur Seite. Dafür danke ich ihr.

Gleichen Dank möchte ich Frau Marlies Götz entgegenbringen, die mich im Labor jederzeit in praktischen Details beriet.

Prof. Dr. med. Thomas Barth, Prof. Dr. med. Jochen Greiner und Cornelia Herbst möchte ich an dieser Stelle ebenfalls meinen Dank aussprechen.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne deren Unterstützung und Verständnis ein Studium einschließlich Doktorarbeit niemals möglich geworden wäre.

Familie Gutter danke ich ebenfalls herzlich für ihre liebevolle Unterstützung.

Danke sage ich auch Herrn und Frau Dr. med. dent. Klaiber, die mich sehr kollegial und freundschaftlich in ihre Praxis aufnahmen und den Verlauf der vorgelegten Arbeit begleiteten.