

Aus der Medizinischen Klinik, Klinikum Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Charakterisierung der humoralen Immunantwort
nach Phagenidiotypvakzinierung
im murinen BCL1-Lymphommodell**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christina Sonntag
aus Bonn

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. B. Emmerich

Mitberichtersteller: Prof. Dr. med. Th. Brocker
Prof. Dr. med. M. Dreyling

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. T. Röhnisch
Dr. med. Dr. rer. nat. C. Bourquin

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2007

Meiner lieben Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Biologie, Klinik und Therapie von Lymphomen	1
1.1.1. Non-Hodgkin-Lymphome	1
1.1.2. Bisherige Therapie und neue Therapieansätze	2
1.2. Prinzipien immuntherapeutischer Verfahren bei der Tumortherapie	3
1.3. Vakzinierungsstrategien zur Lymphomtherapie	5
1.3.1. Der Idiotyp als Tumorantigen	5
1.3.2. Bisherige Ergebnisse der Idiotyp-Vakzinen	6
1.3.3. Schnellere Produktion durch gentechnisch hergestellte Idiotypvakzinen	7
1.4. Phagen-basierte Idiotypvakzinierung als neue Therapieoption.....	10
1.4.1. Phagen als Vektoren für die Idiotypvakzinierung.....	10
1.4.2. Bisherige Pilotstudien im murinen BCL1-Lymphommodell.....	12
1.4.3. Klinische Phase-I-Pilotstudie beim Multiplen Myelom nach HDT.....	13
1.5. Zielsetzung der Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Ausgangsmaterialien.....	15
2.1.1. Chemikalien, Geräte und andere Materialien	15
2.1.2. Antikörper	17
2.1.3. Zelllinien.....	17
2.1.4. Phagen und Bakterien	18
2.1.5. Tiere	18
2.2. Tierversuche	18
2.2.1. Bestimmungen des Tierschutzgesetzes.....	18
2.2.2. Tierhaltung.....	18
2.2.3. Das murine BCL1-Lymphommodell	18
2.2.4. Studiendesign der Tierversuche.....	19
2.2.5. In vivo-Kultur von BCL1-Lymphomzellen	19
2.2.6. Versuchsgruppen	20
2.2.7. Anästhesieprotokoll zur Blutentnahme.....	21
2.2.8. Körperliche Untersuchung der Mäuse.....	21
2.2.9. Studienabbruchkriterien des Tierversuchs	21
2.3. Produktion von Phagenvakzinen	22
2.3.1. Herstellung von filamentösen fd-Phagen	22
2.3.2. Large Scale Phagemid Rescue zur Herstellung von rekombinanten BCL1g8 Phagenvakzinen.....	23
2.3.3. Herstellung der neuen Phagenidiotypvakzinformulierung	25
2.3.4. Aufreinigung von Phagen und Entfernung von Endotoxinen	26
2.3.5. Phagen-ELISA zur Titerbestimmung von Phagen	26
2.3.6. Quantifizierung von Phagen durch Proteinbestimmung (nach Bradford).....	27
2.3.7. Quantitativer Endotoxinnachweis mittels LAL-Methode	27
2.3.8. Kontrolle der Phagenpräparation mittels Tricine-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .	28
2.4. Durchflusszytometrische Untersuchungen.....	30
2.5. ELISA (enzyme-linked-immunosorbent-assay)	31
2.5.1. Sandwichelisa	31
2.5.2. Präabsorptionelisa	32
2.5.3. Zell-ELISA.....	32
2.6. Zellkultur.....	33

2.6.1. Kultivierung von Zelllinien	33
2.6.2. Bestimmung der Zellzahl	33
2.6.3. Einfrieren von Zellen.....	33
2.7. Aufreinigung von monoklonalen IgM-Antikörpern aus Hybridomen	34
2.7.1. Aufreinigung von Immunglobulinen über Protein A Säulen	34
2.7.2. Aufreinigung von Immunglobulinen über Gamma Bind Plus Sepharose.....	35
2.7.3. Quantitative Proteinbestimmung der aufgereinigten Antikörper mittels BCA.....	36
2.7.4. Analyse der aufgereinigten Antikörper mittels SDS-PAGE nach Laemmli	36
2.7.5. Coomassie-Blau Färbung von Polyacrylamidgelen	37
2.7.6. Silberfärbung von Polyacrylamidgelen.....	37
2.8. Statistische Analysen.....	38
3. Ergebnisse.....	39
3.1. Phagenidiotypvakzinierung und Tumorchallenge im BCL1-Lymphommodell	39
3.2. In-vivo Expansion von BCL1-Lymphomzellen.....	39
3.2.1. Durchflusszytometrische Untersuchungen von in-vivo expandierten BCL1-Zellen	40
3.2.2. Untersuchung der Immunglobulinsubklassen auf expandierten BCL1-Lymphomzellen...	41
3.3. Überleben nach Vakzinierung mit BCL1-Idiotypvakzinen	42
3.4. Aufreinigung von BCL1-IgM, BFF3-IgM und dem anti-BCL1 AK	42
3.4.1. Aufreinigung von 123F6 und BFF3 mittels Protein A Sepharose.....	43
3.4.2. Nachweis von anti-BCL1 Antikörpern im Überstand von MC106A5.....	43
3.4.3. Gamma Bind Plus Sepharose zur Aufreinigung von Ratten anti-BCL1 IgG2a.....	44
3.5. Analyse der Phagen-spezifischen humoralen Immunantwort nach Phagenidiotypvakzinierung	46
3.5.1. Screening der Einzelseren auf Phagenantikörper	46
3.5.2. Optimierung der Vakzindosis	47
3.5.3. Charakterisierung der Phagenantikörper	49
3.5.4. Auswirkungen von GM-CSF auf die Phagen-spezifische Antikörperantwort	51
3.5.5. Vergleich der Immunogenität unterschiedlicher Idiotypvakzinformulierungen	53
3.6. Analyse der anti-Idiotypischen Immunantwort nach Phagenidiotypvakzinierung.....	56
3.6.1. Entwicklung eines Zell-ELISAs zur Detektion von anti-BCL1 Serumantikörpern	56
3.6.2. Nachweis von anti-BCL1-spezifischen Antikörpern mittels ELISA	57
3.6.3. Untersuchung der Spezifität von Anti-BCL1 Antikörpern.....	60
4. Diskussion.....	63
4.1. Durchführung der Tierversuche im murinen BCL1-Lymphommodell.....	63
4.2. Phagen als Vektoren für die Idiotypvakzinierung	65
4.3. Nachweis der humoralen Immunantwort gegen Phagen	66
4.3.1. Immunantwort gegen unterschiedliche Phagenvakzinformulierungen	66
4.3.2. Subtypenanalyse zur Unterscheidung einer möglichen Th1- bzw. Th2-Antwort.....	67
4.4. Tumorspezifische humorale Immunantwort nach Phagenidiotypvakzinierung	68
4.4.1. anti-BCL1 Antikörperantwort nach Vakzinierung mit rekombinanten BCL1-g8 Phagenvakzinen.....	68
4.4.2. anti-idiotypische humorale Immunantwort nach Vakzinierung mit neuer Phagenidiotypvakzinformulierung.....	70
4.4.3. Vergleich der Phagenidiotypvakzinen mit dem Goldstandard BCL1-KLH.....	71
4.5. Bedeutung von GM-CSF als immunstimulatorisches Adjuvans	72
4.6. Vergleich der Phagenvakzinierung mit anderen Immunisierungsstrategien	73
5. Zusammenfassung und Ausblick.....	75
6. Literaturverzeichnis	76
7. Verzeichnis der Abkürzungen.....	88

8. Danksagung.....	92
9. Lebenslauf.....	93

1. Einleitung

1.1. Biologie, Klinik und Therapie von Lymphomen

Lymphome sind maligne Erkrankungen der Lymphknoten oder des lymphatischen Gewebes, die durch Transformation verschiedener Entwicklungsstadien der B- oder T-Lymphozyten entstehen. Nach morphologischen Kriterien unterscheidet man zunächst Hodgkin-Lymphome (Lymphogranulomatose) und die Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). Letztere zeichnen sich durch das Fehlen von Sternberg-Reed-Riesenzellen und Hodgkin-Zellen aus und stellen eine Gruppe sehr heterogener Lymphome dar. Trotz bedeutender Fortschritte auch in der Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen, sind die Therapieergebnisse immer noch unbefriedigend, da niedrig-maligne Lymphome im Gegensatz zu hochmalignen Lymphomen nach wie vor nicht heilbar sind und deshalb neuen Therapieformen erforderlich sind. Attraktive Therapiemöglichkeiten stellen hierbei Vakzinierungsstrategien dar, wobei die Phagen-basierte Idiotypvakzinierung als innovative Methode in dieser Arbeit untersucht wurde.

1.1.1. Non-Hodgkin-Lymphome

Non-Hodgkin-Lymphome stellen die häufigsten Neoplasien des Blutsystems dar und sind verantwortlich für mehr als 19.000 Todesfälle jährlich in den Vereinigten Staaten (Jemal, Murray et al. 2005). Den überwiegenden Anteil der Non-Hodgkin-Lymphome machen mit 80% die B-Zell-Lymphome aus, während T-Zell-Lymphome mit 20% geringer vertreten sind. Obgleich in vielen Fällen die Ätiologie noch weitgehend ungeklärt ist und beispielsweise kein erhöhtes Risiko durch Tabakrauchen oder Alkoholkonsum angenommen wird (Besson, Brennan et al. 2006), findet sich eine Assoziation mit Virusinfektionen oder Immundefizienzerkrankungen. So lassen sich beispielsweise gehäuft Lymphome nach Infektionen mit EBV (Epstein-Barr Virus), HTLV (humanes lymphotropes Virus) oder mit KSHV (Kaposi Sarkom assoziiertes Herpesvirus) beobachten (Carneiro-Proietti, Catalan-Soares et al. 2006; Fakhari, Jeong et al. 2006; Gandhi 2006). Auch nach HIV-Infektionen treten vermehrt Lymphome auf, wobei es sich hierbei meist um hochmaligne Formen, wie z.B. das Burkitt-Lymphom handelt (Rabkin, Devesa et al. 1993; Grulich and Vajdic 2005). Nach jahrelangem Dissens bestehen mit der REAL-Klassifikation (revidierte europäisch-amerikanische Lymphomklassifikation) (Harris, Jaffe et al. 1994) und der WHO-Klassifikation (Harris, Jaffe et al. 2000; Chan 2001) jetzt einheitliche Klassifizierungen der Lymphome, die die unterschiedlichen Entitäten aufgrund von zytogenetischen, immunhistochemischen und klinischen Aspekten definieren.

Grundsätzlich lassen sich niedrig-maligne, intermediär-maligne und hochmaligne Lymphome unterscheiden. Hochmaligne Lymphome zeigen meist einen aggressiven Verlauf und können unbehandelt binnen weniger Monate zum Tode führen. Demgegenüber weisen die niedrig-malignen Lymphome einen chronischen Verlauf auf und zeichnen sich durch eine günstigere Prognose mit einer Lebenserwartung von mehreren Jahren (5-10 Jahre) aus. Klinisch beobachtet man bei Lymphompatienten zumeist Lymphknotenschwellungen, die multipel oder solitär auf-

treten können. Sehr häufig sind auch sogenannte B-Symptome mit Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsverlust. Die meisten Patienten sind allerdings initial beschwerdefrei und neigen erst im Krankheitsverlauf zu Komplikationen wie Lymphadenopathien, Milzschwellung, Knochenmarkinfiltration mit möglicher hämatopoetischer Insuffizienz und erhöhter Infektionsanfälligkeit.

1.1.2. Bisherige Therapie und neue Therapieansätze

Neue Erkenntnisse und zunehmendes Wissen über Zytogenetik, Biologie und Immunologie ermöglichten bemerkenswerte Fortschritte und Erweiterungen in der Behandlung von Lymphomen, insbesondere durch die Einführung der Antikörpertherapie in den letzten 10 Jahren. Das wird z.B. an der Einführung des seit 1997 angewandten chimären anti-CD20 Antikörpers Rituximab (Mabthera) deutlich, der zum einen an den Zellen direkt zytotoxisch wirkt und zum anderen durch Modulation der zellulären und molekularen Signaltransduktionswege eine Chemosensitivierung bewirkt (Alas, Emmanouilides et al. 2001; Jazirehi and Bonavida 2005; Jazirehi, Huerta-Yepey et al. 2005). Deshalb ist sowohl die Monotherapie als auch die Kombinationstherapie von Mabthera mit einer Chemotherapie sinnvoll. Teilweise kann die Chemotherapie bei Lymphompatienten durch Mabthera ersetzt oder aber ergänzt werden, was in der Regel deutlich bessere Ansprechraten und auch ereignisfreie Überlebensraten zur Folge hat.

Aggressive Lymphome führen unbehandelt oder bei Therapieversagen in wenigen Wochen bis Monaten zum Tode. Allerdings lässt sich auch eine Kuration durch intensive Chemotherapien erreichen, die gemäß den Ergebnissen der DSHNHL (Deutsche Studiengruppe hochmaligne Non-Hodgkin-Lymphome) auch von älteren Patienten toleriert werden. Auch hier führt die zusätzliche Gabe des chimären Antikörpers Rituximab zur Chemotherapie zur Verbesserung der Überlebenszeit mit Verringerung der Rezidivraten (Coiffier, Lepage et al. 2002). Bei rezidivierten, aggressiven Non-Hodgkin-Lymphomen stellt die Hochdosistherapie mit autologer Stammzelltransplantation die Therapie der Wahl mit echten Heilungschancen dar. In der Parma-Studie konnte die Überlegenheit der Hochdosistherapie gegenüber konservativen Therapieformen belegt werden (Philip, Guglielmi et al. 1995). Rituximab wurde bislang zur Verbesserung der Ergebnisse in der Mobilisierungstherapie mit Chemotherapie kombiniert.

Demgegenüber lassen sich niedrig-maligne, indolente Lymphome in der Regel nur in sehr frühen Stadien durch eine alleinige Strahlentherapie kurativ behandeln. Da die Diagnosestellung meist erst zu einem späteren Zeitpunkt erfolgt (Stadium III oder IV), ist eine Heilung dann nicht mehr zu erzielen. Die Therapie ist in dieser Situation oft palliativ ausgerichtet und verfolgt die im englischen Sprachgebrauch übliche „watch and wait“-Strategie (Young, Longo et al. 1988; Ardeschna, Smith et al. 2003). Durch Erweiterung des konventionellen Chemotherapieschemas COP (Cyclophosphamid, Vincristin und Prednison) mit Doxorubicin zum derzeitigen Standardschema (CHOP) konnten zwar längere progressionsfreie Intervalle erzielt werden, eine Verbesserung der Gesamtüberlebensrate blieb jedoch aus (Nickenig C. 2004). Auch Monotherapien mit dem Purinanalogon Fludarabin sind gut wirksam, jedoch einer Kombinationschemotherapie unterlegen (Klasa, Meyer et al. 2002). Es können gute Remissionsraten durch Kombination von Fludarabin mit Cyclophosphamid sowie Mitoxantron bei therapierefraktären indolenten Lym-

phomen und Rezidiven beobachtet werden (Santini, Nati et al. 2001). Auch bei niedrig malignen Lymphomen wurde Rituximab erfolgreich eingesetzt (McLaughlin, Grillo-Lopez et al. 1998; Jensen, Elter et al. 2006) und führte in Kombination mit verschiedenen Chemotherapie-Schemata (CHOP, CVP, MCP, FCM) zu verbesserten Ergebnissen (Herold, Dolken et al. 2003; Czuczman, Weaver et al. 2004; Hiddemann, Kneba et al. 2005; Marcus, Imrie et al. 2005). Außerdem findet die Radioimmuntherapie mit den Antikörpern ^{90}Y -Ibritumomab und ^{131}I -Tositumomab mit einer vergleichbaren Aktivität und einer Gesamtansprechrates von 60-80% in der Lymphomtherapie Verwendung (Cheson 2003). Andere attraktive Strategien stellen die Konsolidierung durch Radioimmuntherapie nach initialer Chemotherapie (Press, Unger et al. 2003), sowie myeloablative Radioimmuntherapien mit nachfolgender autologer hämatopoetischer Stammzelltransplantation dar (Gopal, Gooley et al. 2003). Die Bedeutung der autologen Stammzelltransplantation (ASCT) im Vergleich zur Therapie mit $\text{IFN}\alpha$ und erweiterten Polychemotherapien wurde in den letzten Jahren in mehreren klinischen Studien verdeutlicht (Lenz, Dreyling et al. 2004; Deconinck, Foussard et al. 2005; Dreyling, Lenz et al. 2005).

1.2. Prinzipien immuntherapeutischer Verfahren bei der Tumorthherapie

Konventionelle Therapien liefern für viele maligne Erkrankungen keine zufriedenstellenden Ergebnisse, so dass immuntherapeutische Verfahren zunehmend in den Vordergrund wissenschaftlichen Interesses rücken. Zur Immuntherapie zählen die Gabe von Antikörpern, die Impfung mit Tumorantigenen und der Transfer von Zellen des Immunsystems, z.B. die adoptive Antigen-spezifische T-Zell-Therapie. Schon seit mehr als 25 Jahren wird versucht, Antikörper gegen Tumorzellmerkmale als Medikamente einzusetzen. Dabei werden Tumorzellen durch direkte zytotoxische Effekte oder aber durch Beeinflussung von Signalwegen (z.B. Induktion von Apoptose) bekämpft. Des Weiteren ist die Kopplung von Zellgiften und radioaktiven Substanzen an die Antikörper und damit ein direkter Transport zum Tumor möglich (targeting). Eine Verstärkung der Effekte erhofft man sich durch Konjugation von Antikörpern mit radioaktiven Beta-Strahlern (Jod-Isotope, Yttrium) in Form der Radioimmuntherapie oder als Trägersubstanz für an sie gekoppelte Toxine. Neben dem Einsatz des monoklonalen anti-CD20 Antikörpers (Rituximab) oder dem anti-CD52 Antikörper (Alemtuzumab) zur Therapie maligner Lymphome, bieten sich anti-idiotypische Antikörper an (vgl. Kap.1.3.1). Der Einsatz univalenter Antikörper, sowie monoklonaler Antikörper gegen den Idiotyp wurde von Glennie und George et al. in Tiermodellen untersucht (Glennie and Stevenson 1982; George, McBride et al. 1991). Nach Immunisierung von Patienten mit individualisiert produzierten, monoklonalen anti-idiotypischen Antikörpern wurden zunächst erstaunliche Ergebnisse verzeichnet, die sogar in mehreren Fällen Heilungen vermuten ließen (Miller, Maloney et al. 1982; Davis, Maloney et al. 1998). Allerdings traten nach einiger Zeit rasch Rezidive auf, die auf eine leicht veränderte Tumorzellpopulation zurückzuführen waren. Meist fanden sich Punktmutationen in den hypervariablen Bereichen des Idiotyps. Diese Escape-Phänomene können durch eine aktive Immunisierung mit Tumorantigenen umgangen werden, da hierdurch eine polyklonale Immunantwort induziert wird (Meeker, Lowder et al. 1985; Caspar, Levy et al. 1997). Vakzinierungsverfahren stellen deshalb

eine interessante Therapieoption dar. Die Impfstoff-präparationen bestehen dabei in der Regel aus Tumorantigenen oder den dafür kodierenden Genen, die alleine, an Vektoren gebunden oder mit dendritischen Zellen den Patienten wiederholt in Haut, Muskelgewebe oder Lymphknoten injiziert werden. Tumorstoffe können entweder als therapeutische Impfung bei fortgeschrittener Erkrankung oder als prophylaktische Impfung gegen Rezidive eingesetzt werden.

Grundsätzlich können die spezifische, erworbene und die angeborene, unspezifische Immunantwort unterschieden werden. Bedeutend für immuntherapeutische Verfahren ist allerdings die spezifische, erst durch ein Antigen ausgelöste Immunantwort, die sich durch Anpassung, Gedächtnis und Spezifität auszeichnet. So ist das Ziel der Immuntherapie, die körpereigene Abwehr gegen die vom Tumor exprimierten Antigene zu richten und die möglichen „Escape-Mechanismen“ des Tumors zu umgehen. Abwehrmechanismen der Tumoren, die ein Eingreifen des Immunsystems erschweren, stellen beispielsweise eine verminderte Expression von HLA-Antigenen, Mangel an kostimulatorischen Faktoren oder Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, LFA-1 und anderen Integrinen dar. Unterschiedliche Wege eine Immunität zu erzielen, stehen dem Körper zur Verfügung. Die humorale Immunantwort zeichnet sich durch die von B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen induzierte, charakteristische Immunglobulinsynthese aus, wodurch eine Neutralisierung der Krankheitserreger, eine Opsonierung und eine Aktivierung des Komplementsystems erreicht werden kann. Voraussetzung für eine Antikörperproduktion ist allerdings der Kontakt eines Antigens mit B-Lymphozyten, die zu antigenpräsentierenden Zellen (APC) werden und die Interaktion mit CD4-Helferzellen. Diese differenzieren sich zu Th2-Lymphozyten, die durch Zytokinausschüttung (IL-4, IL-5, IL-10) eine Differenzierung der B-Zellen in Antikörper-produzierende Plasmazellen erreichen. Unter antikörperabhängiger zellvermittelter Zytotoxizität (ADCC) versteht man das Eingreifen natürlicher Killerzellen, die antikörperbehaftete Zielzellen zerstören. Inwieweit die ADCC als zytotoxische Abwehr auch zur Zerstörung von Tumorzellen beiträgt, wurde in Studien schon in den achtziger Jahren untersucht (Dearman, Stevenson et al. 1988).

Demgegenüber kann durch T-Lymphozyten oder auch natürliche Killerzellen (NK) eine zelluläre Immunantwort induziert werden, die ebenfalls eine Zerstörung der Zielzelle bewirkt. Voraussetzung für eine T-Zell induzierte Immunität ist allerdings eine direkte Wechselwirkung zwischen T-Lymphozyten und den MHC-Molekülen der Tumorzellen über den T-Zell-Rezeptor (TCR), sowie meist eine Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen (APC). Dazu zählen dendritische Zellen (DC), Makrophagen oder B-Lymphozyten, die über Adhäsionsmoleküle (Integrine) mit T-Zellen in Kontakt treten und weitere kostimulatorische Signale liefern wie z.B. B7-1 (CD80) oder B7-2 (CD86), wodurch native T-Zellen aktiviert werden. Um die körpereigene Abwehr zu stimulieren, ist eine Präsentation sowohl des antigenspezifischen, als auch des kostimulatorischen Signals nötig. Dies erklärt einerseits die Problematik der Entwicklung von Therapien auf T-Zell-ebene, andererseits wird dadurch ein Schutz vor einer Immunantwort gegen Selbst-Antigene gewährleistet. Dendritische Zellen, die sowohl MHC-I, MHC-II, Integrine und kostimulatorische Moleküle exprimieren, gelten als die potentesten Aktivatoren der T-Zellen. Die Idiotypvaksinierung mit dendritischen Zellen ist aktuell Gegenstand intensiver Forschungsarbeit. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass durch eine Idiotypvaksinierung mit dendritischen Zellen eine pro-

tektive Immunantwort gegen B-Zell Lymphome und multiple Myelome induziert werden kann (Cohen, Haimovich et al. 2005).

1.3. Vakzinierungsstrategien zur Lymphomtherapie

1.3.1. Der Idiotyp als Tumorantigen

Bei Lymphomen bieten sich Vakzinierungsstrategien in besonderem Maße an, da bei ihnen tumorspezifische Erkennungsmerkmale (Idiotypen) auf der Oberfläche exprimiert werden (Stevenson, Elliott et al. 1977), die ideale Zielmoleküle für immuntherapeutische Behandlungsansätze darstellen (Stevenson and Glennie 1985). Unter dem Idiotyp (Id) versteht man das variable Fragment von Immunglobulinen, das von den Tumorzellen eines B-Zell-Lymphoms exprimiert wird. Da es sich hierbei um eine klonale Erkrankung der B-Zell-Reihe handelt, exprimieren die Tumorzellen alle einen identischen Antikörper auf ihrer Oberfläche. Der Idiotyp hat somit immer dieselbe Konfiguration, kann allerdings durch einzelne Hypermutationen im variablen Bereich gering polymorphe Veränderungen aufweisen. Der Idiotyp wird durch ein einzigartiges Gen kodiert, das durch Rekombination der sogenannten V(Variable)-, D(Diversity)- und J(Joining)-Segmente entsteht. Die variablen Regionen des Antikörpers, sowohl der schweren, als auch der leichten Kette, werden auf diese Weise durch somatische Rekombination gebildet und mit der konstanten Region einer Immunglobulin-Subklasse (Isotyp) fusioniert. Somit wird deutlich, dass es sich bei dem Idiotyp um ein tumorspezifisches Antigen handelt, welches vom malignen B-Zell-Klon exprimiert wird. Einerseits ist diese Tumorspezifität für immuntherapeutische Verfahren von Vorteil, da gezielt eine Immunantwort gegen den Idiotyp generiert werden kann, andererseits stellt die Patientenspezifität dieses Tumorantigens einen Nachteil dar und zwingt zur individualisierten und damit teuren und zeitraubenden Therapieentwicklung für jeden Einzelfall.

Vorraussetzung aller immuntherapeutischen Ansätze stellt allerdings die optimale Präsentation der Tumorantigene dar. Allerdings werden Immunglobuline je nach Lymphomentität in sehr unterschiedlichem Ausmaß präsentiert: So weiß man, dass beispielsweise bei der B-CLL Immunglobuline nur sehr schwach auf der Oberfläche exprimiert werden. Zu beachten ist ferner, dass Lymphomzellen analog zu gesunden B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen (APC) fungieren und somit MHC-Moleküle der Klasse I und II, kostimulatorische Moleküle (B7) und Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, LFA-3) exprimieren. Davon abgesehen werden von aktivierten B-Zellen neben exogenen Antigenen insbesondere der Idiotyp als eigenes Antigen präsentiert (Weiss and Bogen 1989; Weiss and Bogen 1991; Bogen and Weiss 1993). Die ideale Lymphomvakzine zielt somit auf ein Antigen ab, das ausschließlich auf Lymphomzellen exprimiert wird und die existierende Toleranz des Immunsystems gegenüber diesem Antigen überwindet.

1.3.2. Bisherige Ergebnisse der Idiotyp-Vakzinen

Tierexperimentelle Studien konnten zeigen, dass durch Immunisierung mit Idiotypvakzinen eine protektive, anti-idiotypische Immunantwort induziert werden kann, die sowohl durch humorale, als auch durch zelluläre Immunmechanismen vermittelt wird (Campbell, Carroll et al. 1987; George, Tutt et al. 1987; Campbell, Esserman et al. 1990; Wilson, George et al. 1990). Die Bedeutung der durch zytotoxische T-Zellen vermittelten, idiotypspezifischen Immunantwort ist allerdings unklar, obwohl gezeigt werden konnte, dass sich idiotypspezifische T-Zellen nicht nur gegen Epitope der CDR3-Region, sondern auch gegen gemeinsame Epitope in den „framework“-Regionen der Immunglobuline richten können (Trojan, Schultze et al. 2000). Diskutiert wird, ob zelluläre oder humorale Immunreaktionen für die therapeutische Wirksamkeit von größerer Bedeutung sind (Pop, Smallshaw et al. 2005). So wirken freie Idiotypproteine durch Komplexierung von anti-idiotypischen Antikörpern inhibitorisch auf die Immunantwort (Kaminski, Kitamura et al. 1987). Andererseits ließen sich therapeutische Effekte auch ohne Nachweis von Antikörpern nachweisen, was für eine zellvermittelte Immunantwort spricht (Lundin, Hofgaard et al. 2003). Letztlich ist das Ziel gegenwärtiger Vakzinierungsstrategien die Induktion humoraler und zellulärer Immunantworten, um synergistische Effekte zu erreichen (Savelyeva, King et al. 2005).

Fest steht allerdings, dass unkonjugierte Idiotypproteine aufgrund ihrer geringen Immunogenität keine signifikanten therapeutischen Effekte zeigen (George, Folkard et al. 1988) und sie deshalb an stark immunogene Trägersubstanzen wie *KLH* (Keyhole limpet hemocyanin) gekoppelt werden müssen. Die sogenannte Goldstandardvakzine Id-KLH wurde erstmals 1988 unter Verwendung von sehr zeit- und arbeitsintensiven Heterohybridomtechniken für die Produktion klinisch eingesetzt. Von insgesamt 32 Patienten mit einem follikulärem Lymphom in erster kompletter Remission nach Chemotherapie ließ sich bei knapp der Hälfte eine anti-idiotypische Immunantwort induzieren (Kwak, Campbell et al. 1992; Hsu, Kwak et al. 1993). Des Weiteren konnte in Nachuntersuchungen bei der Mehrzahl der Patienten eine deutlich länger anhaltende Remission als in der Kontrollgruppe beobachtet werden (Hsu, Caspar et al. 1997; Press, Leonard et al. 2001). Eine weitere Studie am NIH konnte ähnlich gute Ergebnisse erzielen, wobei 19 von 20 Patienten eine durch zytotoxische T-Zellen vermittelte idiotypspezifische Immunantwort aufwiesen. Das besondere an dieser Studie lag darin, dass erstmals gezeigt werden konnte, dass durch eine Idiotypvakzinierung eine komplette molekulare Remission induziert werden kann (Bendandi, Gocke et al. 1999). Die Wirksamkeit der Idiotypvakzinierung konnte somit in klinischen Studien bereits vor mehr als 10 Jahren belegt werden, obwohl sich die Angaben hinsichtlich der Wirkungsmechanismen unterscheiden. Seither wurden Id-KLH Vakzinen unter Zusatz von Immunstimulantien und in Abwandlung der Produktionsverfahren in unterschiedlicher Weise weiter untersucht. So wurde z.B. auch die Wirkung des zusätzlich verabreichten Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktors (*GM-CSF*) zur Steigerung der T-Zell-Antwort in diversen Studien geprüft. *GM-CSF* wird in vivo vorwiegend von T-Zellen und Makrophagen sezerniert und gilt als bedeutender Faktor der Hämatopoese. Dieses Zytokin fungiert als Schlüsselmediator für Wachstum, Reifung, Migration und Antigen-präsentierende

Eigenschaften von dendritischen Zellen (Banchereau, Briere et al. 2000). Erstmals im Jahre 1993 beschrieb Dranoff die Bedeutung von GM-CSF bei zellulären Vakzinen (Dranoff, Jaffee et al. 1993). Sowohl im murinen Modell, als auch in klinischen Studien wurde die positive Wirkung von GM-CSF als Adjuvans zur Idiotypvakzinierung mit der Induktion spezifischer T-Zell-Antworten aufgezeigt (Kwak, Young et al. 1996; Osterborg, Yi et al. 1998; Mellstedt, Fagerberg et al. 1999; Mellstedt, Fagerberg et al. 1999). Von Kwak et al., sowie Stritzke und Mitarbeitern wurden in murinen Lymphommodellen verstärkte therapeutische Effekte der Idiotypvakzinierung in Kombination mit GM-CSF beobachtet (Kwak, Young et al. 1996; Stritzke, Zunkel et al. 2003). Auch in klinischen Studien zeigten nach Idiotyp-KLH Vakzinierung mit GM-CSF beinahe alle Patienten eine tumorspezifische T-Zell-Antwort und es ließ sich die Induktion einer molekularen Remission erzielen, während Immunisierungen ohne GM-CSF vorwiegend eine humorale Immunantwort induzierten (Bendandi, Gocke et al. 1999). Diese ermutigenden Ergebnisse ließen GM-CSF zu einem bevorzugten Adjuvans in Vakzinierungsstudien werden (Schumacher 2001).

Zur Induktion einer zellulären Immunantwort ist auch der Gebrauch von *dendritischen Zellen* von Nutzen. Um mittels einer Idiotyp-KLH Vakzine eine Immunantwort auszulösen, muss diese von Antigen-präsentierenden Zellen in Peptide zerlegt und anschließend auf MHC I oder II Molekülen präsentiert werden. So lassen sich dendritische Zellen als hoch effiziente Antigen-präsentierende Zellen verwenden, um die Wirkung von Idiotypvakzinen zu verstärken (Timmerman and Levy 1999; Schumacher 2001; Timmerman, Czerwinski et al. 2002). Zur Gewinnung dendritischer Zellen bietet sich zum einen die direkte Isolierung aus dem peripheren Blut, zum anderen eine in-vitro Herstellung durch Umdifferenzierung von Monozyten an. Nach Kultivierung mit Tumorproteinen und anschließender Aufnahme, Prozessierung und Präsentation können diese als zelluläre Vakzinen verwendet werden. In präklinischen Studien wurde nachgewiesen, dass murine dendritische Zellen, die in vitro mit dem Idiotypantigen gepulst wurden, Mäusen Schutz vor einem Tumorchallenge verleihen (Flamand, Sornasse et al. 1994). Hierbei scheint die Lymphomprotektion unabhängig von einer Antikörperantwort zu sein und ist gänzlich T-Zell-vermittelt (Cohen, Haimovich et al. 2005). In einer ersten klinischen Pilotstudie mit autologen dendritischen Zellen bei 4 Patienten mit follikulärem B-Zell-Lymphom ließ sich eine zellvermittelte anti-idiotypische Immunantwort induzieren und es zeigten sich bemerkenswerte klinische Effekte (1 komplette Remission, 1 partielle Remission, 1 molekulare Remission) (Hsu, Benike et al. 1996). Interessant sind die Resultate der Langzeitnachsuntersuchung an 35 Patienten. Immunisierungen mit Id-gepulsten DC führten zu T-Zell-vermittelten und humoralen anti-Id Immunantworten mit teils dauerhaften Tumorregressionen. Außerdem konnte der Effekt durch zusätzliche Booster-Injektion mit Idiotyp-KLH noch verbessert werden (Timmerman, Singh et al. 2002).

1.3.3. Schnellere Produktion durch gentechnisch hergestellte Idiotypvakzinen

Da Idiotypvakzinen für jeden Patienten einzeln hergestellt werden müssen und die Produktion mittels Heterohybridomtechniken sehr zeit- und arbeitsaufwändig ist, wurde nach einfacheren Herstellungsprozessen gesucht. Diese Überlegungen führten schließlich zur Entwicklung von gentechnologischen Verfahren für die Vakzinproduktion. Hierbei bieten sich neben DNA-Vakzi-

nierungsstrategien (Hawkins, Winter et al. 1993; Stevenson, Zhu et al. 1995; Stevenson, Zhu et al. 2000; Stevenson, Rice et al. 2004) auch rekombinante Idiotypvakzinen an. Bisher wurden unter anderem Tabakpflanzen und Bakterien als Expressionssysteme verwendet (McCormick, Kumagai et al. 1999; Osterroth, Alkan et al. 1999) und in 2 murinen Modellen ließ sich durch Id-exprimierende Adenoviren eine tumorprotektive Immunität erzielen (Timmerman, Caspar et al. 2001; Armstrong, Dermime et al. 2002). Eine Übersicht über gentechnologisch produzierte Vakzinen liefert nachfolgende Abbildung.

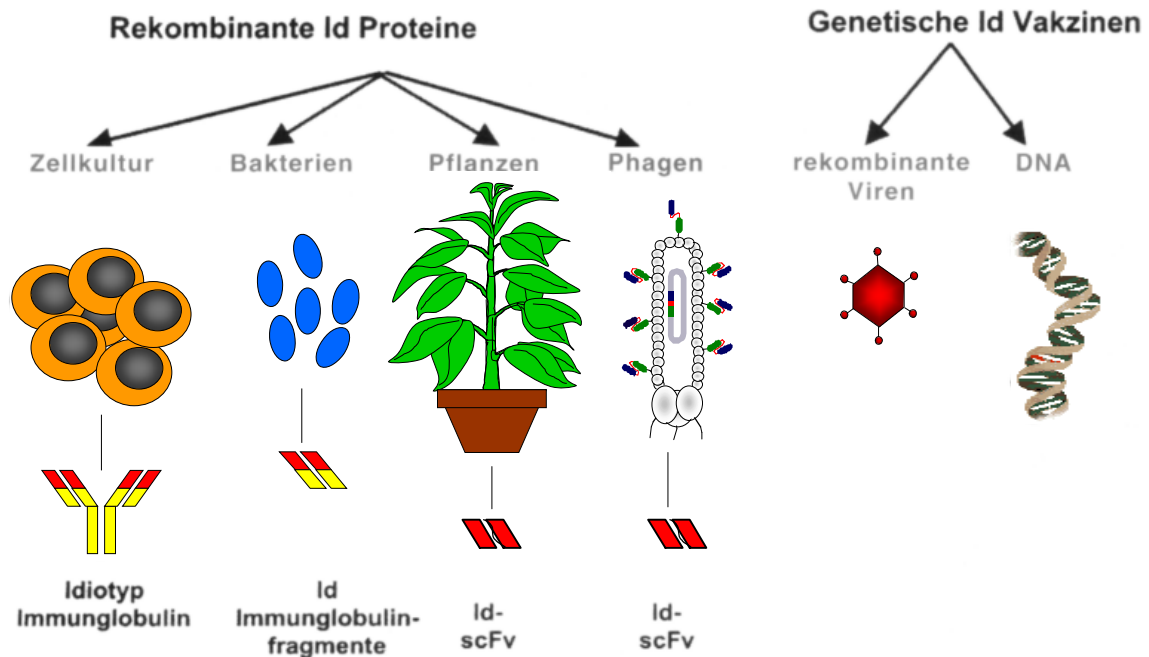


Abb. 1 Gentechnische Produktionsverfahren zur Herstellung von Idiotypvakzinen

(Abb. modifiziert nach Ron Levy, Lugano 2002)

Bei DNA-Vakzinierungsstrategien können die variablen Regionen der Idiotypsequenzen über PCR-Technologien amplifiziert und zu Einzelstrangfragmenten verknüpft werden (Hawkins, Zhu et al. 1994). Durch DNA-Vakzinen aus Einzelstrangfragmenten (scFv), die mit immunologisch wirksamen Signalsequenzen des Fragment C von Tetanustoxin fusioniert worden sind, kann eine protektive Immunität gegen Lymphome induziert werden (King, Spellerberg et al. 1998). Die Idiotypsequenz kann auch an andere Fusionspartner wie z.B. die Zytokinsequenz von GM-CSF oder die konstanten Region xenogener Immunglobuline verbunden werden (Tao and Levy 1993; Syrengelas, Chen et al. 1996; King, Spellerberg et al. 1998; Benvenuti, Burrone et al. 2000; Zhu, Rice et al. 2001). In beiden Fällen sind Id-DNA-Vakzinen wirksam und es kann eine protektive Wirkung induziert werden, die vor allem durch anti-idiotypische Antikörper vermittelt ist, während zelluläre Immunmechanismen keine ausreichende Tumorprotektion vermitteln (Syrengelas, Chen et al. 1996; Syrengelas and Levy 1999; Cesco-Gaspere, Benvenuti et al. 2005). Erste klinische DNA-Vakzinierungsstudien zeigten zwar eine gute Verträglichkeit der Vakzine, die anti-idiotypische Immunantwort war jedoch sehr schwach ausgeprägt (Hawkins,

Russell et al. 1997; Biragyn, Surenhu et al. 2001; Timmerman, Czerwinski et al. 2002). So wies nur 1 von 12 Patienten eine anti-idiotypische T-Zell-Antwort auf und anti-idiotypische Antikörper ließen sich bei keinem der Patienten nachweisen (Timmerman, Singh et al. 2002). Vorläufige Ergebnisse einer klinischen Studie von Stevenson et al. zeigen die Induktion einer Idiotyp- und FrC-spezifischen Immunität nach Immunisierung mit DNA-Vakzinen, kodierend für den Idiotyp in Fusion mit dem C-Fragment des Tetanus Toxins (scFv-FrC). Die endgültigen Ergebnisse liegen noch nicht vor (Stevenson, Rice et al. 2004).

Eine Reihe rekombinanter Herstellungsverfahren wurden entwickelt, um Idiotypvakzinen schnell und kosteneffizient zu produzieren. Sie unterscheiden sich in den Immunglobulinstrukturen und Proteinexpressionssystemen. So werden beispielsweise von Genitope, Inc. (Redwood City, California, USA) rekombinante Techniken verwendet, um Idiotypproteine mit einer humanen IgG3 Struktur in murinen Lymphomzellen herzustellen (My Vax) (Timmerman J. 2000). Außerdem kann ein Baculovirus-Vektorsystem zur Expression von Idiotypproteinen in sf9 Insektenzellen genutzt werden (Jones and Morikawa 1996). Dieses Verfahren wird von der Favril Corporation (San Diego, California, USA) verwendet. Bei der FavId Vakzine handelt es sich um rekombinant produzierte Idiotypvakzine, die an KLH gekoppelt (Id-KLH) und in Kombination mit GM-CSF verabreicht werden. Bisherige Studien konnten die schnelle und effiziente Produktion innerhalb von 8-12 Wochen, sowie die immunogenen Eigenschaften und eine klinische Wirksamkeit bei Patienten mit follikulärem Lymphom nachweisen. Derzeit wird FavId in einer Phase III Studie nach vorheriger Rituximabtherapie getestet (Hurvitz and Timmerman 2005). Des weiteren machte sich CellGenix (Freiburg, Deutschland) rekombinante Techniken zunutze, um Idiotypproteine in *Escherichia coli* als Fab-Fragmente zu produzieren (IdioVax) und berichtet von erfolgreichen Produktionsraten (Osterroth, Alkan et al. 1999; Velkeen H. 2003). Einen weiteren Versuch stellt das Herstellungsverfahren von Large Scale Biology (Vacaville, California, USA) dar. Hier wurden rekombinante Tabak-Mosaik-Viren verwendet, um Idiotypproteine als sogenannte „single-chain variable-region immunoglobulin fragments“ (scFv) in Tabakpflanzen herzustellen (Reddy SA CD 2002; Hurvitz and Timmerman 2005). Eine neue Methode zur Produktion von Idiotyp-Vakzinen wird von Kanter et al. im Jahre 2004 und Yang et al. im Jahre 2005 beschrieben (Kanter G YJ 2004; Yang, Kanter et al. 2005). Hierbei handelt es sich um auf *E.coli* basierende zellfreie in-vitro Systeme. Mit diesem System wurden scFv Idiotypproteine für ein murines B-Zell-Lymphom hergestellt, die ein Idiotyp-GM-CSF Fusionsprotein enthielten, wobei die variablen Regionen des Idiotypproteins korrekt gefaltet blieben und GM-CSF seine biologische Aktivität beibehielt. Derzeit laufen Phase-III-Studien zur Prüfung der Wirksamkeit rekombinanter Idiotypvakzinen, wobei offen ist, ob sich diese Verfahren klinisch durchsetzen.

1.4. Phagen-basierte Idiotypvaksinierung als neue Therapieoption

1.4.1. Phagen als Vektoren für die Idiotypvaksinierung

Als Alternative zu aufwändigen Heterohybridomtechniken und um Idiotypproteinen immunogene Potenz zu verleihen, bietet sich die Phagen-basierte Idiotypvaksinierung an. Bei den hierzu verwendeten filamentösen Ff-Coliphagen handelt es sich um prokaryotische Viren, die ausschließlich gramnegative Bakterien infizieren und sich in diesen vermehren. Ff-Phagen sind ca. 900nm lange und 6-10nm dicke schlauchförmige Gebilde mit einem insgesamt für 10 Gene kodierenden Phagengenom aus Einzelstrang-DNA und 5 verschiedenen Hüllproteinen. Die Phagenhülle wird nahezu ausschließlich durch das Major Coat Protein g8p gebildet, das in 2.700-3000 Kopien vorkommt und alpha-helikal angeordnet ist (Newman, Swinney et al. 1977). Vier weitere Proteine (die Minor Coat Proteine g3p, g6p, g7p, g9p) sind an den Enden mit ca. 5 Kopien in die Phagenhülle integriert, wobei dem g3-Protein bei der Transfektion von Bakterien eine besondere Bedeutung zukommt (Pratt, Tzagoloff et al. 1969). In der Molekularbiologie wurde dieses Protein als Fusionsprotein im Rahmen der Phage-Display-Technologie verwendet (Smith 1985). Die nachfolgende Abbildung verdeutlicht den Aufbau filamentöser Phagen und die Expression von Tumorantigenen auf der Phagenoberfläche bei Phagenvakzinen.

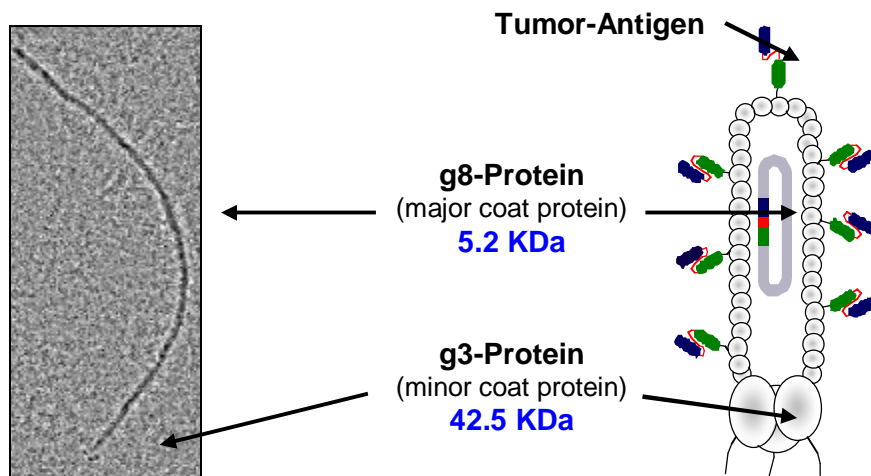


Abb. 2 Filamentöse Phagen

Das elektronenmikroskopische Bild von Steve Fuller zeigt die fadenförmige Struktur der Fd-Phagen. Am unteren Ende kann man die Knäufel des g3-Proteins erkennen. Auf der rechten Seite sieht man schematisch den Aufbau von Phagenvakzinen. Phagenvakzinen zeichnen sich dadurch aus, dass Tumorantigene auf ihrer Oberfläche exprimiert werden.

Erstmals beschrieben von Frederik Twort im Jahre 1915, wurden Bakteriophagen zunehmend als bewährte molekularbiologische Werkzeuge eingesetzt (Twort 1915). Neben ihrer Verwendung zur Genklonierung (Messing 1983; Messing 1991; Messing 1993) haben Phagen eine weit größere Bedeutung im Zusammenhang mit der *Phage-Display-Technologie* gewonnen. Mittels dieser Methode lassen sich DNA-Fragmente in das g3-Gen des Phagen einbringen und als Fusionsproteine auf der Phagenoberfläche exprimieren (Smith 1985). Darüber hinaus ist die

Technik zur Expression antigener Determinanten sowie zum Epitope Mapping einsetzbar (de la Cruz, Lal et al. 1988; Parmley and Smith 1989). Es lassen sich Antikörperfragmente auf Phagen exprimieren (McCafferty, Griffiths et al. 1990; Clackson, Hoogenboom et al. 1991) und der Gebrauch sogenannter *Phage-Display-Libraries* machte das Screening und die Produktion spezifischer Antikörper möglich (Scott and Smith 1990; Marks, Hoogenboom et al. 1991; Goletz, Christensen et al. 2002; March, Jepson et al. 2006). Nach genetischer Modifikation der Phagen durch Expression von Liganden, die an eukaryotische Rezeptoren binden, gelang auch die Transfektion eukaryotischer Zellen durch Phagen, so dass auch der Einsatz von Phagen zur Gentherapie möglich erscheint (Larocca, Witte et al. 1998; Ivanenkov, Felici et al. 1999; Larocca, Kassner et al. 1999). Außerdem wurden Bakteriophagen zur Behandlung Antibiotikaresistenter Infektionen eingesetzt und dabei die Wirksamkeit einer oralen Applikation nachgewiesen (Weber-Dabrowska, Dabrowski et al. 1987; Inal 2003; Borysowski, Weber-Dabrowska et al. 2005; Fischetti 2005; Borysowski, Weber-Dabrowska et al. 2006).

In unserer Arbeitsgruppe wurden Phagen entwickelt, die zur Idiotypvaksinierung von B-NHL geeignet sind. Den Phagen kommt dabei die Bedeutung eines immunogenen Trägersystems zu, das die idiotypspezifische Immunantwort verstärken soll. Zur Produktion der Vakzinen wurden insbesondere Phagemid-Rescue-Techniken angewandt. Dabei lassen sich Phagenhybride erzeugen, mittels derer Tumorantigene in Fusion mit dem g3- oder dem g8-Phagenhüllprotein exprimiert werden können. Diese Methode ermöglicht die Inkorporation von Idiotypproteinen in Form von single-chain-Fragmenten (scFv) in die Phagenhülle. Die g3-Phagenvakzine präsentiert jedoch durchschnittlich nur ein bis zwei Kopien des Fremdproteins auf der Oberfläche, was eine geringe Antigendichte und damit möglicherweise eine geringe Immunogenität zur Folge hat. Um multiple Kopien antigener Epitope auf der Phagenoberfläche zu exprimieren, ist eine Insertion von Genabschnitten in das g8-Protein besser geeignet (Ilyichev, Minenkova et al. 1992). Durch Integration antigener Determinanten in die Phagenhülle lassen sich so sehr wirksame Phagenpeptidvakzinen herstellen. (Minenkova, Ilyichev et al. 1993; Felici, Galfre et al. 1996; Galfre, Monaci et al. 1996). Die Tatsache, dass Phagen sich im immunologischen Sinne als Träger für Tumorantigene anbieten, da sie die Immunogenität nur schwach immunogener Tumorantigene verstärken, konnte bereits 1995 von Meola durch die Untersuchung der humoralen Immunantwort gegen Mimotope des Hepatitis B Oberflächenantigens eindrucksvoll gezeigt werden (Meola, Delmastro et al. 1995). Die humorale Immunantwort unterliegt dabei einem IgM-IgG Class-Switch und scheint von dem Vorhandensein von T-Helferzellen abhängig zu sein (Willis, Perham et al. 1993). Durch Phagen-vakzinen kann jedoch auch eine zelluläre Immunantwort induziert werden, was von unterschiedlichen Arbeitsgruppen an RSV-, Zystizerkose- und HIV-Modellen gezeigt werden konnte (Bastien, Trudel et al. 1997; Manoutcharian, Terrazas et al. 1999; De Berardinis, Sartorius et al. 2000). Von großer Bedeutung ist darüber hinaus, dass Phagen auch ohne Zusatz von Adjuvantien (Freudsches Adjuvans oder Aluminiumhydroxid) wirksam sind und quasi als ihr eigenes intrinsisches Adjuvans fungieren (de la Cruz, Lal et al. 1988; Greenwood, Willis et al. 1991; Willis, Perham et al. 1993). Im Gegensatz zu viralen Vektoren, die bei gentherapeutischen Verfahren eingesetzt werden, sind Phagen nicht humanpathogen und durch ihr hohes Sicherheitsprofil gekennzeichnet. Ein weiterer Vorteil

von Phagenvakzinen ist ihre leichte Herstellbarkeit. Phagenvakzinen sind somit als Vakzinierungsverfahren sehr vielversprechend. Zur Induktion einer anti-idiotypischen Immunantwort muss allerdings die Konformation des auf den Phagen exprimierten Idiotyps erhalten bleiben und den durch Hybridomtechniken hergestellten Proteinen mit ihren Antigen-bindenden Eigenschaften entsprechen.

1.4.2. Bisherige Pilotstudien im murinen BCL1-Lymphommodell

Die Wirksamkeit rekombinanter Phagenidiotypvakzinen konnte in einem protektiven, murinen BCL1-Lymphommodell gezeigt werden. Das murine BCL1-Lymphommodell wurde verwendet, weil es ein sehr etabliertes und häufig verwendetes Lymphom-Modell in BALB/c Mäusen ist (Slavin and Strober 1978) und der Idiotyp und die idiotypische Immunantwort gut charakterisiert sind. Wegen des charakteristischen frühen Auftretens einer Splenomegalie durch infiltrierende Lymphomzellen und der peripheren Ausschwemmung von Lymphomzellen im weiteren Verlauf der Erkrankung, zeigt das BCL1-Lymphom große Ähnlichkeit mit einer CLL (Warnke, Slavin et al. 1979). In den „Proof-of-Principle“ Studien zur Phagenvakzinierung wurden 12 BALB/c Mäuse pro Gruppe viermal in wöchentlichem Abstand mit je 1×10^{11} aufgereinigten g3- bzw. g8-Phagenvakzinen subkutan in die Bauchhaut immunisiert (vgl. Produktion von Phagenvakzinen, Kap. 2.3). Zum Wirkungsnachweis der protektiven Immunität wurde 7 Tage nach der letzten Vakzinierung ein Tumorchallenge mit 1×10^5 BCL1-Lymphomzellen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die mit rekombinanten BCL1-g8 Phagenvakzinen immunisierten Mäuse einen signifikanten Überlebensvorteil aufwiesen. In 20-30% der Fälle ließ sich eine komplette Tumorprotektion beobachten. Demgegenüber führte die BCL1-g3 Phagenvakzinierung in Einzelfällen zwar auch zu einer Tumorprotektion, jedoch war dieser Unterschied insgesamt nicht statistisch signifikant (siehe Abb. 3). Als Erklärung für die Ergebnisse wurde angenommen, dass die Antigendichte bei g8-Vakzinen aufgrund der höheren Kopienzahl höher ist als bei g3-Vakzinen und diese deshalb eine höhere Immunogenität besitzen. Zu erwähnen ist, dass diese Ergebnisse ohne Zusatz von immunstimulatorischen Adjuvantien oder GM-CSF erzielt wurden. Die durchgeführten Pilotstudien zur phagenbasierten Idiotypvakzinierung lieferten somit erste erfolgversprechende Ergebnisse, auf denen die in dieser Arbeit beschriebenen Folgeversuche aufbauen.

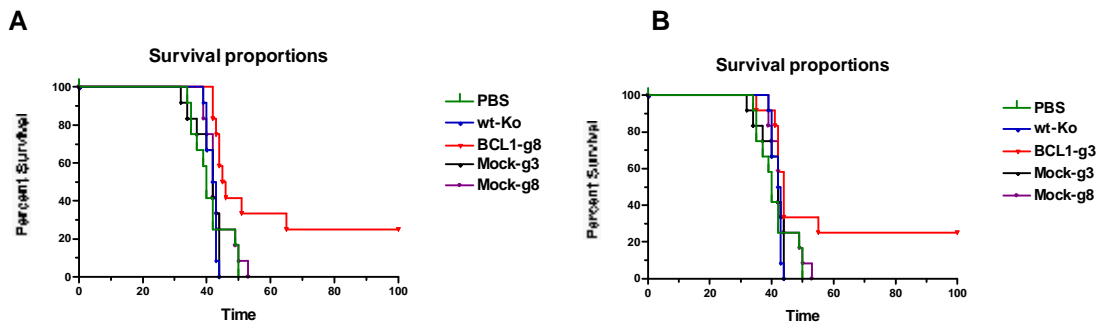


Abb. 3 Ergebnisse der Pilotstudie zur BCL1-Phagenidiotypvaksinierung

Die Immunisierung mit BCL1-g8 Phagenvakzinen (Abb. 3A) führt zu einer signifikanten Überlebensverlängerung der Mäuse (Shift der Kurve nach rechts) und bewirkt bei ca. 20-30% der Mäuse eine komplette Tumorsektion. Im Vergleich dazu zeigt die BCL1-g3 Phagenvaksinierung (Abb. 3B) zwar tumorprotektive Effekte, jedoch sind diese nicht signifikant gegenüber allen Kontrollen, möglicherweise weil die Antigenkonzentration und damit die Wirksamkeit der BCL1-g3 Phagenvakzinen geringer ist. Es wurde ein Tumorchallenge mit 1×10^5 Tumorzellen durchgeführt.

1.4.3. Klinische Phase-I-Pilotstudie beim Multiplen Myelom nach HDT

Aufgrund der ermutigenden Ergebnisse der ersten Tierversuche und der sehr guten Verträglichkeit der Phagenvakzinen ohne Hinweis auf Toxizitäten und lokale entzündliche Reaktionen, wurde eine klinische Phase-I Studie zur Phagenidiotypvaksinierung bei Patienten mit partieller Remission oder Rezidiv eines Multiplen Myeloms nach Hochdosistherapie (HDT) unter Leitung von Professor Emmerich am Klinikum der Universität München gestartet. Beim Plasmozytom handelt es sich um Neoplasien von Plasmazellen, die trotz bedeutender therapeutischer Fortschritte - einschließlich der Einführung von HDT und autologer Stammzelltransplantation, sowie neuerer Medikamente wie Bortezomib und ImiDs (immunmodulatorische Derivate) - allerdings nach wie vor nicht heilbar sind. Das therapeutische Potential der monoklonalen Antikörpertherapie zur Behandlung des Multiplen Myeloms lässt sich noch nicht abschätzen, da Myelomzellen nur wenige Antigene auf der Oberfläche präsentieren, die für eine Antikörpertherapie geeignet sind. Daneben wurden in Therapiever suchen auch Idiotypvaksinierungsstrategien zur Behandlung des Multiplen Myeloms entwickelt (Kwak 1998; Kwak, Thielemans et al. 1999; Mellstedt and Osterborg 1999; Reichardt, Okada et al. 1999; Massaia 2000; Reichardt, Milazzo et al. 2003; Reichardt and Brossart 2005). Da die Myelomzellen die tumorspezifischen Immunglobuline (Paraproteine) häufig sezernieren, ist zu erwarten, dass eine idiotypspezifische, humorale Immunantwort durch Antigenüberschuss blockiert wird. Daher wurde bei der bisherigen Myelomvaksinierung Wert auf die Induktion einer zellulären Immunantwort gelegt (Stevenson and Anderson 2000; Treon, Raje et al. 2000). Dennoch waren die Ergebnisse bislang eher enttäuschend.

Mit der vorgelegten klinischen Pilotstudie zur Phagenidiotypvaksinierung beim Multiplen Myelom sollte deshalb neben der Beurteilung einer Immunantwort vorwiegend die Verträglichkeit und Durchführbarkeit der Phagen-basierten Idiotypvaksinierung evaluiert werden. Es handelte sich um eine offene, prospektive Pilotstudie zur erstmaligen Anwendung von Phagenvakzinen am Menschen. Gemäß der klar definierten Ein- und Ausschlusskriterien wurden jeweils 3 Kohorten

à 5 Patienten untersucht, die in 3 unterschiedlichen Dosisstufen vakziniert wurden. Die Prüfsubstanz wurde individuell für den einzelnen Patienten in einem Zeitraum von 3-6 Wochen hergestellt und bestand aus Phagen-basierten Idiotyp-KLH Vakzinen plus GM-CSF. Die Immunisierungen wurden 3x in wöchentlichem, sowie 3x in monatlichem Abstand intradermal durchgeführt. GM-CSF wurde an den Tagen d_{1-3} nach Vakzinierung in einer Dosis von $100 \mu\text{g}/\text{m}^2$ am Applikationsort subkutan verabreicht. Bemerkenswerterweise führten die Phagenidiotypvakzinen in der mittleren Dosisstufe (1,25mg) bei 4 von 5 Patienten zu einer Stabilisierung oder Abnahme der Paraproteinmengen. Außerdem konnten in dieser Gruppe bei 4 von 5 Patienten gegen den Idiotyp gerichtete Antikörper mit Antikörpertitern von 1:25,000 und 1:90,000 nachgewiesen werden. Interessant war die Beobachtung einer zellulären Immunantwort, erkennbar an der positiven DTH-Reaktion. Eine zur Charakterisierung der zellulären Immunantwort durchgeführte Hautbiopsie zeigte infiltrierende Makrophagen und CD8^+ T-Lymphozyten, jedoch keine CD19 positiven Zellen. Ein weiteres Ergebnis dieser Studie war neben der Durchführbarkeit, auch die gute Verträglichkeit der Vakzine (Röhnisch, et al. in Bearbeitung).

Die Idiotyp-Phagenvakzinierung stellt somit eine interessante Therapieoption zur Behandlung von Lymphomen und Myelomen dar, deren Wirkmechanismus und künftiges Therapiepotential jedoch weitergehender Untersuchungen bedarf.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Niedrig maligne Lymphome in fortgeschrittenen Stadien lassen sich trotz intensiver konventioneller Therapiemaßnahmen nicht kurativ behandeln. Wegen dieser unbefriedigenden Therapiesituation werden neue wirksamere und verträglichere Therapien gesucht. Hierbei bietet die Idiotypvakzinierung einen vielversprechenden Therapieansatz, da hier vermehrt Langzeitremissionen beobachtet wurden. Die Besonderheit, der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen, liegt in der Verwendung von Phagen-basierten Idiotypvakzinen, da Phagen offenbar sowohl eine humorale, als auch zelluläre Immunantwort induzieren können. Phagenvakzinen wurden im Rahmen von Tierversuchen bereits wie oben beschrieben erfolgreich getestet, jedoch besteht nach wie vor Unklarheit über die Wirkungsmechanismen. Ziel dieser Arbeit war es daher, die humorale Immunantwort nach Phagenidiotypvakzinierung im murinen BCL1-Lymphommodell zu untersuchen und die Reproduzierbarkeit der Vakzinierungserfolge nachzuweisen. Wir untersuchten dazu rekombinante BCL1 g8-Vakzinen im Vergleich zu einer neuen, verbesserten Phagenvakzinformulierung sowie dem Goldstandard BCL1-KLH. Die Analyse einer phagenspezifischen bzw. idiotypspezifischen humoralen Immunantwort nach Vakzinierung mit verschiedenen Phagenpräparationen fand in dieser Arbeit besondere Beachtung. Außerdem wurde die Auswirkung von zusätzlicher GM-CSF Gabe auf die Induktion der Antikörperproduktion untersucht und die optimale Vakzindosis bestimmt.

2. Material und Methoden

2.1. Ausgangsmaterialien

2.1.1. Chemikalien, Geräte und andere Materialien

Amersham GmbH, Braunschweig:

Gamma Bind Plus Sepharose, Protein A Sepharose, Hi Trap Protein G HP

Apotheke, Klinikum Innenstadt, LMU München:

Elektrophorese Puffer, 1MTris-HCl Puffer, pH 8.0

Beckman, München:

Durchflusszytometer Coulter Epics XL-MCL

Beckman Coulter (Krefeld):

Antikörper für Facs-Analysen (s.u.)

Becton Dickinson, Heidelberg:

Falcon Röhrchen 10ml, 50ml, Plastik Reagenzröhrchen, Zellkulturflaschen, Plastik Petrischalen, FACS Röhrchen, 96-well Mikrotiterplatten

Biorad Lab., Richmond, Kalifornien, USA:

Ammonium Persulfat, Natriumdodecylsulfat (SDS), Elektrophorese-System Mini-Protean II, Plastikkamm (Comb 10 Tooth)

Bio Whittaker Molecular Applications, USA:

QCL-1000 (Quantitative Chromogenic LAL) 120 tests (Cat No. 50-647U), Endotoxin for QCL-1000 (Cat No. E50-640), LAL Reagent Water 500ml (Cat No. W50-500)

Caltag Lab., Burlingame, Ca:

Normal Goat Serum

Costar/Corning, NY, USA:

ELISA 96-well Mikrotiterplatten flat bottom (Cat No. 442587), Zellkulturplatten

Dianova, Hamburg:

Peroxidase-conjugated Affini Pure F(ab)2 Fragment Goat-Anti-Mouse IgG

Difco:

Bacto-Trypton (0123-17), Bacto-Yeast-Extract (0127-17), Bacto-Agar (0140-01)

Gibco Invitrogen, Karlsruhe:

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), foetales Kälberserum (FCS), PBS (phosphate buffered saline), Hepes Buffer (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure), MEM non-essential aminoacids, Penicillin-Streptomycin

Merck AG, Darmstadt:

Ammoniumsulfat, Calciumchlorid, Coomassie Brilliant Blue R250, Dinatriumhydrogenphosphat, Dinatriumthiosulfat, Eisessig, Essigsäure, Ethanol, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Formaldehyd, Isopropanol, Kaliumacetat, Kaliumchlorid, Kaliumdihydrogenphosphat, Magnesiumchlorid, Methanol, 2-Mercaptoethanol, Natriumacetat, Natriumazid, Natriumcarbonat, Natriumchlorid, Natriumphosphat, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumdodecylsulfat (SDS), PEG 8000, Salzsäure, Silbernitrat, Thiamine

Molecular Devices, München:

SPECTRAmax™ 250 Microplate Spectrophotometer

Nalgene, Rochester, USA:

Oak-Ridge Zentrifugenröhrchen (3115-0050)

Novartis Pharma, Nürnberg:

Leukomax 150, N1

Nunc, Wiesbaden:

96-well Nunc Immunoplates MaxiSorb F96 (Cat No.442404), Nunc Immuno Modules framed MaxiSorb F16 (Cat No. 467466), Nunc Immuno Stripes MaxiSorb F16 (Cat No. 469914), 8 well Strip Cap PE steril (Cat No. 430805), Nunc Polypropylen V-96 MicroWell™ plates (Cat No. 442587)

Pierce, Reckford, Illinois, USA:

Peroxidase Substrat Kit 1-Step ABTS (Cat No.37068.01), Protein Assay Micro BCA TM

Roth, Karlsruhe:

Elektrophoresemarker Roti-Mark 10-150, Rotiphorese Gel 30, Stop-Lösung (1N/0,5M H₂SO₄, Cat No.K027.1), Deckfolie für Microtiterplates Sealing tape

Sigma Chemie, München:

Rinderserum-Albumin (BSA), β-Mercaptoethanol, Dimethylsulfoxid (DMSO), Gel Loading Solution, Natriumazid, N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED), Tween20 (polyoxyethylene sorbitane monolaurate), 7-AAD (Amino-Actinomycin D) staining solution, KLH, Trypanblau, Minimal-Agarplatten, 20%Glucose steril, Ampicillin 50mg/ml steril, Kanamycin 30mg/ml steril, 1M IPTG steril, Triton X-114

Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA:

Antikörper für Facs- und Elisa-Analysen (s.u.)

Stratagene Heidelberg:

M13K07 Bakteriophagen, *E.coli* K12 TG1 Bakterien

2.1.2. Antikörper

Konjugierte Antikörper für die FACS-Analysen wurden bezogen von den Firmen Beckman Coulter (Krefeld) und Southern Biotech (Birmingham, Alabama, USA):

Co FITC, Co PE, CD4 FITC, CD8 PE, CD45 FITC, CD3 PE, CD4 PE, CD19 PE, Kappa FITC, Lambda FITC, IgM FITC

Die Detektions-Antikörper für die Elisa-Analysen wurden sämtlich von der Firma Southern Biotech (Birmingham, Alabama, USA) bezogen:

Goat-Anti-Mouse IgG-HRP, IgG1-HRP, IgG2a-HRP

Goat-Anti-Rat IgG-HRP

Rat-Anti-Mouse IgM-HRP, -lambda-HRP, -kappa-HRP

Antikörper gegen M13-Phagen:

Anti-fd Bakteriophage AK Rabbit IgG fraction (Sigma, B-7786)

Anti-fd AK, Biotin konj. Rabbit IgG Fraction (Sigma, B-2661)

Anti-M13 AK (Pharmacia, 27-9410-01)

Anti-M13 (gVIII) HRP Konjugat (Pharmacia, 27-9411-01)

Rabbit Anti-M13 Sera (Stratagene, 27-9411-01)

Anti-g3p (pIII) AK Mouse IgG (Mabtech, PSKN3)

Anti-g8p (pVIII) AK Mouse IgG_{2b} (Progen, 61097)

2.1.3. Zelllinien

Die zur Sezernierung monoklonaler Antikörper befähigten Hybridomzelllinien MC10-6A5 (rat anti-BCL1, IgG2a) und 123F6 (mouse BCL1-IgM) wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Stevenson, University of Southampton zur Verfügung gestellt. Die Kontrollzelllinie BFF3 (mouse IgM) wurde von der ATCC bezogen. Die Zellen wurden in complete DMEM + 10% FCS bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

MC10-6A5: Durch Fusion der Zellen *rattus norvegicus* und *mus musculus* hergestellte Hybridomzelllinie mit Produktion von Ratten anti-BCL1-IgG2a

123F6: Hybridomzelllinie hergestellt durch Fusion von BCL1-Zellen mit Maus-Myelomzellen, Produktion von Maus BCL1-IgM

BFF3: Hybridomzelllinie mit Sezernierung eines monoklonalen Maus-Antikörpers (IgM), Herstellung durch Fusion von NSO Myelomzellen mit Milzzellen einer BALB/c Maus nach Immunisierung mit gereinigtem Myosin

BCL1-Zellen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Dr. Bourquin zur Verfügung gestellt.

2.1.4. Phagen und Bakterien

M13K07 Bakteriophagen, VCSM Helferphagen und TG1 Bakterien wurden von der Firma Stratagene, Heidelberg bezogen.

2.1.5. Tiere

Für die Tierversuche wurden 9 Wochen alte BALB/c-Mäuse von Elevage Janvier, Rte des Chenes Secs, F-53940 Le Genest St Isle bezogen und gemäß den unter 2.2.1. beschriebenen Bedingungen, sowie in Übereinstimmung mit den Richtlinien für einen angemessenen Umgang mit Versuchstieren in der biomedizinischen Forschung gehalten.

2.2. Tierversuche

2.2.1. Bestimmungen des Tierschutzgesetzes

Die Tierversuche wurden entsprechend des Tierversuchsantrags von Dr. Röhnisch unter dem AZ 211-2531-70/02 von der Regierung von Oberbayern genehmigt und durchgeführt. Die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 17.02.1993 (BGBl S.254), zuletzt geändert durch Artikel 86 des Gesetzes vom 27.04.1993 wurden eingehalten und in Übereinstimmung mit den Richtlinien für einen angemessenen Umgang mit Versuchstieren in der biomedizinischen Forschung durchgeführt. Als Tierschutzbeauftragter wurde Dr. med. vet. Heinz-Peter Scheuber von der Zentralen Versuchstierhaltung des Klinikum der Universität München – Innenstadt, Abt. für Klinische Chemie und Biochemie in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik München, benannt.

2.2.2. Tierhaltung

Für die Tierversuche wurden gleich alte weibliche BALB/c-Mäuse von Elevage Janvier, Rte des Chenes Secs, F-53940 Le Genest St Isle verwendet. Die Haltung der Mäuse fand unter SPF (specific pathogen-free) Bedingungen zu je 3 Tieren in Makrolon-Typ-II-Käfigen (Venti-Rack System der Fa. BioZone) auf Tapvei 10mm Einstreu bei einer Temperatur von 21°C, einer Luftfeuchtigkeit von 50%, einem Luftaustausch von 12-16 Zyklen/h und einem Tag/Nacht-Rhythmus von je 12h statt. Die Tiere hatten Zugang zu Wasser und ssniff M-Haltung Futter (25 kGy bestrahlt) ad libitum. Zur Identifizierung wurde eine Ohrmarkierung angebracht. Die Tierversuche wurden im SPF-Raum des Tierstalls der Medizinischen Klinik Innenstadt, Klinikum der Universität München durchgeführt.

2.2.3. Das murine BCL1-Lymphommodell

Die Versuche wurden im murinen BCL1-Lymphommodell durchgeführt. Charakteristisch ist das frühe Auftreten einer Splenomegalie ca. 35-40 Tage nach einem Tumorchallenge mit 1×10^5 in-

vivo expandierten BCL1-Zellen aufgrund der Infiltration durch Lymphomzellen. Typisch ist auch die periphere Ausschwemmung von Lymphomzellen im späteren Verlauf der Erkrankung, so dass das BCL1-Lymphom große Ähnlichkeit zu einer chronischen lymphatischen Leukämie zeigt (Warnke, Slavin et al. 1979).

2.2.4. Studiendesign der Tierversuche

Zur Charakterisierung der Wirksamkeit von Phagenvakzinen wurden 3 Versuchsreihen (Versuchsgruppen, Vakzinierungsdosen, siehe Kapitel 2.2.6) mit insgesamt 150 BALB/c Mäusen durchgeführt. Bei jeder Versuchsreihe wurden 4 Immunisierungen subkutan in wöchentlichem Abstand mit unterschiedlichen Phagendosen (10^{10} , 10^{11} und 5×10^{11} Phagen) und Phagenpräparationen ohne Zusatz von Adjuvans durchgeführt. Ein Teil der Mäuse erhielt zusätzlich zur Vakzine GM-CSF (Leukomax, Novartis Pharma) ($4 \times 20 \mu\text{g}$ s.c.). Zum Wirkungsnachweis der Vakzinierung wurde 7 Tage nach der letzten Impfung ein Tumorchallenge mit intraperitoneal verabreichten BCL1-Zellen (1×10^5 und 1×10^3 Zellen) durchgeführt und das Überleben der Mäuse anhand von Kaplan-Meier Blots und Log-Rank-Tests analysiert. Es wurden in der Regel vitale Tumorzellen für den Tumorchallenge verwendet, die durch eine in-vivo Kultur in Mäusen expandiert worden sind. Nach dem Tumorchallenge wurden die Mäuse insgesamt mindestens 60 Tage, max. jedoch 100 Tage beobachtet. Zur Gewinnung von Serum wurden Blutentnahmen aus dem retrobulbären Venenplexus am Tag 0 vor Immunisierung, am Tag 28, sowie in der letzten Versuchsreihe am Tag 14 und 4 Monate nach der ersten Immunisierung durchgeführt. Pro Maus wurden ca. 200-300 μl Blut entnommen.

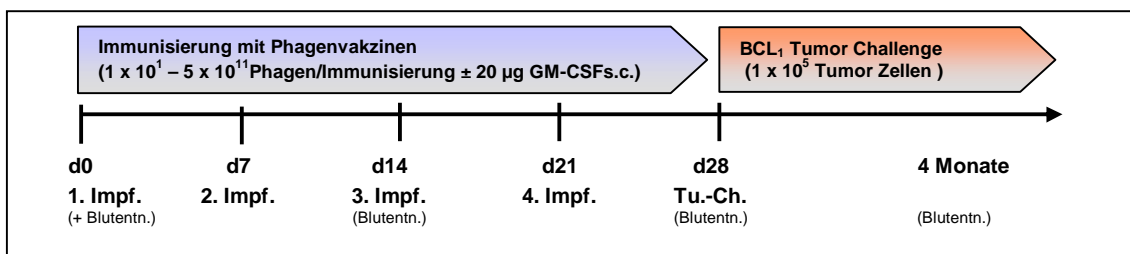


Abb. 4 Studiendesign der Phagenvakzinierungsstudien

Insgesamt wurden 3 Versuchsreihen mit unterschiedlichen Phagendosen und Phagenpräparationen durchgeführt (siehe Versuchsgruppen, Kapitel 2.2.6.).

2.2.5. In vivo-Kultur von BCL1-Lymphomzellen

Wegen der schlechten Expansion der BCL1-Lymphomzellen in der Zellkultur war eine Kultivierung in-vivo notwendig, die durch intraperitoneale Injektion von 10^6 Lymphomzellen induziert wurde. Eine Euthanasierung der Mäuse fand bereits bei ersten Anzeichen einer tumorbedingten Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens statt. Aus der entnommenen Milz war eine Präparation von etwa 1×10^8 – 1×10^9 Lymphomzellen möglich.

2.2.6. Versuchsgruppen

1. Versuchsreihe: (Frage: optimale Vakzinierungsdosis?)

Gruppen 1-4 (12 Mäuse/Gruppe für Tumorchallenge)

Gruppen 5-8 (6 Mäuse/Gruppe für humorale Immunreaktion, T-Zell-Assay)

Immunisierung: 4x in wöchentlichen Intervallen s.c.

Tumorchallenge: 1×10^5 frische BCL1-Zellen

Blutentnahme: Tag 0, Tag 28

Einzelmaustestungen, Triplikate, Serumverdünnung 1/200, 1/1000, 1/5000

Gruppe 1: 10^{10} BCL 1-g8 s.c.

Gruppe 2: 10^{11} BCL 1-g8 s.c.

Gruppe 3: 10^{12} BCL 1-g8 s.c.

Gruppe 4: 10^{12} Fd-Phagen s.c.

Gruppe 5: 10^{10} BCL 1-g8 s.c.

Gruppe 6: 10^{11} BCL 1-g8 s.c.

Gruppe 7: 5×10^{11} BCL 1-g8 s.c.

Gruppe 8: 5×10^{11} Fd-Phagen

2. Versuchsreihe: (Frage: Einfluss von GM-CSF auf die Immunantwort?)

Gruppen 1-7 (6 Mäuse/Gruppe)

Immunisierung: 4x in wöchentlichen Intervallen s.c., jeweils 5×10^{11} Phagen

GM-CSF: 4x 20µg s.c.

Tumorchallenge: TC1: 10^3 frische BCL 1-Zellen i.p.

TC2: 10^3 eingefrorene BCL 1-Zellen i.p.

Blutentnahme: Tag 28

Gruppenpool, Triplikate, Serumverdünnung 1/200, 1/1000, 1/5000

Gruppe 1: BCL1-g8, TC1

Gruppe 2: Fd-Phagen, TC1

Gruppe 3: PBS, TC1

Gruppe 4: BCL1-g8, TC2

Gruppe 5: Fd-Phagen, TC2

Gruppe 6: BCL1-g8 + GM-CSF, TC1

Gruppe 7: Fd-Phagen + GM-CSF, TC1

3. Versuchsreihe: (Frage: Vergleich mit BCL1-KLH als Goldstandard?)

Gruppen 1-6 (6 Mäuse/Gruppe)

Immunisierung: 4x in wöchentlichen Intervallen s.c., jeweils 5×10^{11} Phagen und 0,25mg BCL1-KLH

Tumorchallenge: nein

Blutentnahmen: Tag 0, Tag 14, Tag 28, nach 4 Monaten

Einzelmaustestung, Triplikate, Serumverdünnung 1/200

Gruppe 1:	PBS
Gruppe 2:	Fd-Phagen
Gruppe 3:	BCL1-g8 rekombinant
Gruppe 4:	BCL1-WT (neue Phagenvakzinformulierung)
Gruppe 5:	BCL1-KLH (Goldstandard)
Gruppe 6:	BFF3-WT (Mock-Kontrolle mit neuer Phagenvakzinformulierung)

2.2.7. Anästhesieprotokoll zur Blutentnahme

Für die Blutabnahmen wurden die Mäuse kurz analgosediert. Auf eine Äthernarkose wurde wegen des zu großen Stresses für die Tiere und wegen der schlechteren Steuerbarkeit verzichtet. Weitere invasive Maßnahmen wurden nicht durchgeführt. Für die Narkose wurde folgender Narkosemix verwendet:

Wirkstoff	Dosierung	Nebenwirkung
α_2 -Agonist <i>Medetomidin</i> (Dormitor [®]):	0.5 mg/kg KG i.p. (0.01 mg/Maus)	Sedativum, Analgesie, Bradykardie
Benzodiazepin <i>Midazolam</i> (Dormicum [®]):	5 mg/kg KG i.p. (0.1 mg/Maus)	Anxiolyse, Relaxation, Atemdepression, retrograde Amnesie
Morphin <i>Fentanyl</i> (Fentanyl [®]):	0.05 mg/kg KG i.p. (0.001 mg/Maus)	starke Analgesie, massive Atemdepression mäßige Sedierung, vagale Stimulation, Bradykardie

Zur Antagonisierung wurde verwendet:

Wirkstoff	Dosierung
α_2 -Blocker <i>Atipamezol</i> (Antisedan [®]):	2.5 mg/kg KG i.p. (0.05 mg/Maus)
Antagonist <i>Flumazenil</i> (Anexate [®]):	0.5 mg/kg KG i.p. (0.01 mg/Maus)
Antagonist <i>Naloxon</i> (Narcanti [®]):	1.2 mg/kg KG i.p. (0.024 mg/Maus)

2.2.8. Körperliche Untersuchung der Mäuse

Während des Tierversuchs wurden die Tiere in der Regel 1-2 wöchentlich sorgfältig untersucht. Diese Untersuchungen umfassten die Bestimmung des Allgemeinzustand und die Palpation der Milz zur Erfassung des Milzindex. Nach Durchführung des Tumorchallenge wurden je nach Tumorprogression zusätzliche Untersuchungen durchgeführt, um Leiden der Mäuse rechtzeitig zu erkennen. Daher wurden die Tiere ab Tag 30 nach Tumorchallenge 3x/Woche untersucht.

2.2.9. Studienabbruchkriterien des Tierversuchs

Als Abbruchkriterien galten das Erreichen eines präfinalen Tumorstadiums, eine Splenomegalie mit einem Milzindex von >3 nach Vitetta (Vitetta, Yuan et al. 1979; Vitetta, Tucker et al. 1997)

(siehe Abbildung), sowie sichtbare Hinweise auf einen progredienten, tumorbedingten Leidenszustand der Maus. Als weiteres Kriterium zum Abbruch wurde ein nicht zumutbares Leiden durch Nebenwirkungen der Phagenvakzinformulierung berücksichtigt, was jedoch nicht auftrat.

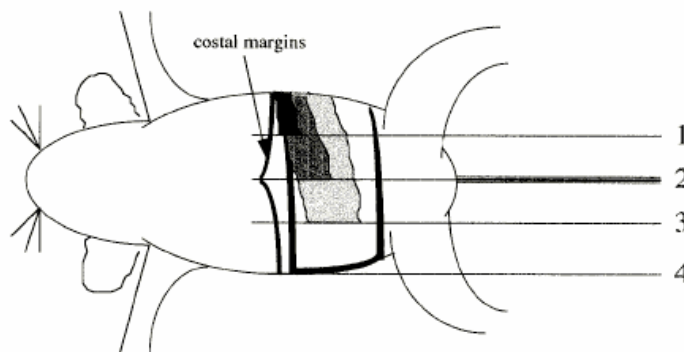


Fig 1. Determination of spleen indices. The ventral surface of the mouse was divided into four equal quadrants progressing from the left rib cage to the right rib cage. The terminus of each quadrant was assigned a splenic index of 1, 2 (median line of the mouse), 3, and 4 (right rib cage) (see solid lines in figure). Representations of spleens with splenic indices of 1 (black), 2 (dark gray), 3 (light gray), and 4 (white) bordered by black are illustrated. The costal margin is drawn to improve clarity.

Abb. 5 Bestimmung des Milzindexes

Die ventrale Oberfläche der Maus wird in 4 gleiche Quadranten vom linken Rippenbogen bis zum rechten Rippenbogen eingeteilt. Jedem Quadranten wird ein Milzindex von 1, 2 (Mittellinie der Maus), 3 und 4 (rechter Rippenbogen) zugeteilt. In der Abbildung sind Milzen mit einem Milzindex von 1 (schwarz), 2 (dunkelgrau), 3 (hellgrau) und 4 (weiß) dargestellt. Zur besseren Übersicht ist der Rippenbogen eingezeichnet. Normale 12 Wochen alte Balb/c Mäuse weisen einen Wert von 0,5 auf; d.h. die Milz befindet sich in der Hälfte zwischen dem linken Rippenbogen und dem ersten Quadranten.

2.3. Produktion von Phagenvakzinen

2.3.1. Herstellung von filamentösen fd-Phagen

Für die Tierversuche wurden Wildtyp-Phagen bzw. filamentöse M13K07-Phagen (Fa. Pharmacia) als Kontrolle verwendet. Zur Produktion der M13K07-Phagen wurden TG1-Zellen über Nacht bei 37°C auf Minimal Medium Platten vorkultiviert und am darauffolgenden Tag in 5ml 2x TY-Medium überführt und erneut über Nacht kultiviert. Anschließend wurde eine Subkultur in 2x TY-Medium angelegt und die Bakterien ca. 3 Stunden bis zu einer OD_{550} von max. 0.4–0.5 bei 37°C im Schüttler bei 225rpm kultiviert. Die Bakterien wurden dann 15–30min mit den M13K07 Phagen im Verhältnis 10:1 (Phagen:Bakterien) infiziert. Die infizierten Bakterien wurden anschließend für 1h bei 37°C im Schüttler bei 225rpm kultiviert und in 500ml 2x TY-Medium (+ 50µg/ml Kanamycin) über Nacht (16h) bei 37°C im Schüttler bei 200rpm unter Antibiotikaselektion, bei der sich nur die infizierten Bakterien vermehren können, vervielfältigt. Zur Isolierung der produzierten Phagen wurden die Bakterien bei 5000rpm 15min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand mit den Phagen nach Sterilfiltration mit MiniSart 0,45µm Sterilfiltern in 2 saubere Corning-Gefäße überführt und durch Zugabe von 1/5 Vol. PEG/NaCl bei 4°C präzipitiert. Nach Zentrifugation der Phagen wurde das Phagenpellet in 1x PBS oder TE-Puffer resuspendiert. Je nach Bedarf wurde der PEG-Fällungsschritt mehrfach wiederholt, um residuelle bakterielle Proteine zu entfernen. Zur Pasteurisierung wurden die Phagen durch ein 0.45µm Sterilfilter filtriert. Nach Bestimmung der Titer des Phagenstocks wurden die Phagen auf eine Konzentration von 1×10^{12} pfu/ml verdünnt. Phagenstocks, die nicht sofort verwendet wurden,

sind in PBS/15% Glycerol aliquotiert und bei -20°C gelagert worden. Vor der Verwendung im Tierversuch wurde eine Triton-X114 Zweiphasenpräparation zur Entfernung von Endotoxinen (s.u.) durchgeführt.

Minimal Medium (MM) AGAR

(Minimalmedium zur Kultur von TG1 Bakterien, damit diese F-Pili exprimieren)

6g $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$

3g KH_2PO_4

1g NH_4Cl

in 450ml A.d. lösen und mit NaOH auf pH 7,4 einstellen. Lösung auf 500ml A.d. auffüllen und 25min bei 121°C autoklavieren. In einer separaten 1l-Flasche 15g Bacto-Agar (Difco 0140-01) in 500ml A.d. resuspendieren und 25min bei 121°C autoklavieren. Beide Lösungen abkühlen lassen und dann zusammenschütten. Je 1ml 1M MgCl_2 , 1M CaCl_2 , 1M Thiamine und 5ml 20% Glucose dazugeben. Agar-Platte gießen.

1M $\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$ (10,33g auf 100ml A.d.)

1M $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ (14,7g auf 100ml A.d.)

1M Thiamine, HCl (33,73g auf 100ml A.d.)

20%Glucose, sterilfiltriert durch $0,2\mu\text{m}$ Filter

2x TY-Medium, 1000ml (für die Phagenkultivierung)

17g Bacto-Trypton (Difco 0123-17)

10g Bacto-Yeast-Extract (Difco 0127-17)

5g NaCl

1ml 1N NaOH

in 1000ml A.d. lösen und 25min bei 121°C autoklavieren.

10xPBS, pH 7.4

80g NaCl

2g KCl

2g KH_2PO_4

14,4g $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$

in 900ml A.d. lösen und mit NaOH auf pH 7,4 einstellen. Lösung auf 100ml mit A.d. auffüllen und 25min bei 121°C autoklavieren.

5xPEG/NaCl

300g PEG 8000

87,6g NaCl

in 1000ml A.d. lösen und 25min bei 121°C autoklavieren.

2.3.2. Large Scale Phagemid Rescue zur Herstellung von rekombinanten BCL1g8 Phagenvakzinen

Zur Herstellung der Phagenvakzinen wurden Phagemid-Rescue-Techniken verwendet. Mittels dieser Methode lassen sich Phagenhybride erzeugen, die Tumorantigene in Fusion mit dem g3- oder dem g8-Phagenhüllprotein exprimieren (siehe nachfolgende Abb.6). Dabei werden Idiotypproteine von BCL1 in Form von single-chain-Fragmenten (scFv) in die Phagenhülle inkorporiert.

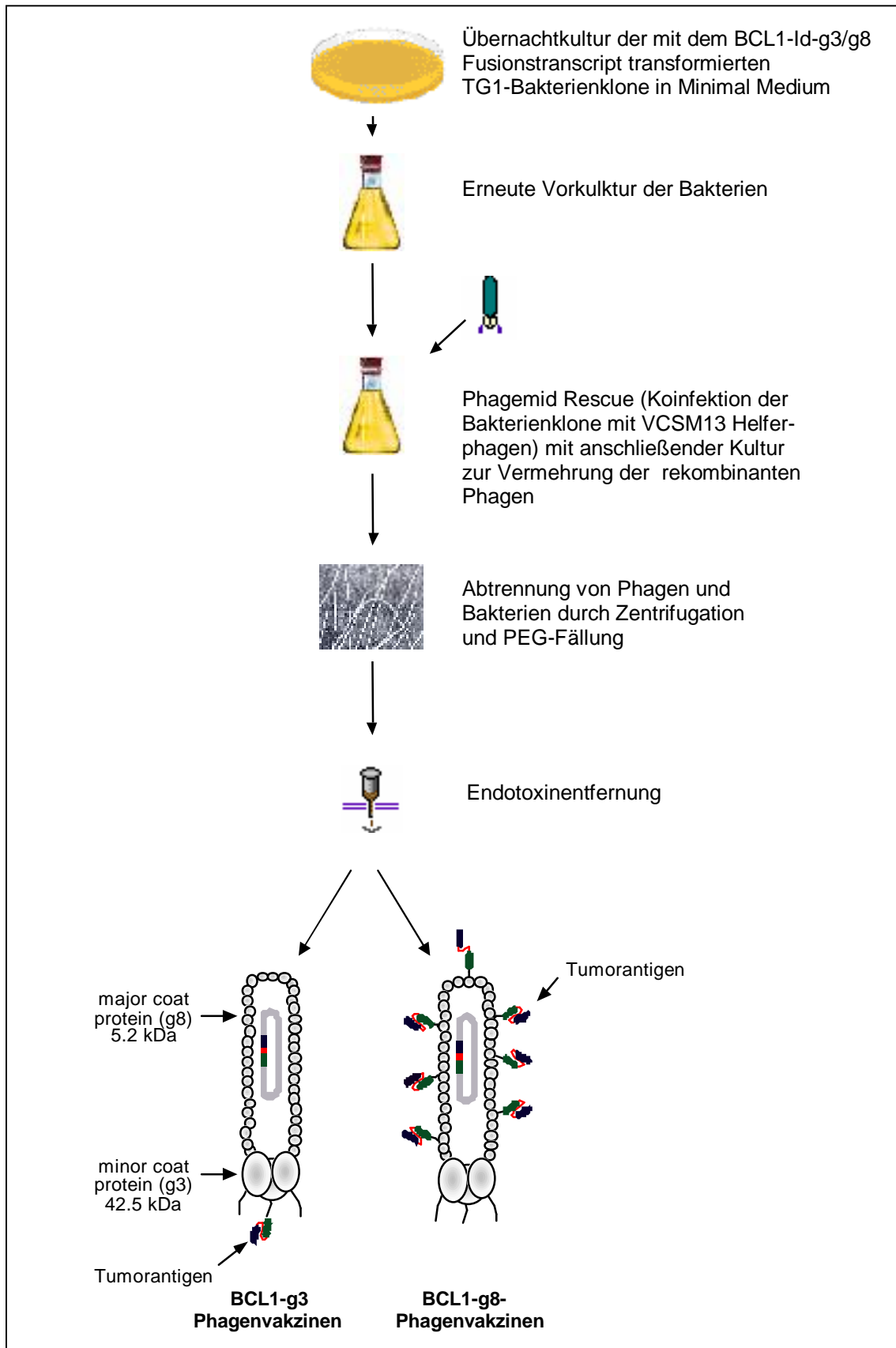


Abb. 6 Schema zur Herstellung von rekombinanten Phagenhybridvakzinen

Rekombinante Phagenvakzinen exprimieren die Tumorantigene (Idiotypantigene) als g3- bzw. g8-Fusionsproteine an der Phagenoberfläche: Hybridvakzinen werden diese Vakzinen deshalb genannt, weil durch die Phagemid-Rescue-Technologie sowohl die g3- bzw. g8-Fusionsproteine als auch unveränderte native g3- und g8-Hüllproteine in die Phagenhülle integriert werden.

Durch Optimierung des Herstellungsverfahrens konnten aus 8l Bakterien/Phagenkultur $> 1 \times 10^{14}$ rekombinante Phagenpartikel gewonnen werden. Zudem waren die produzierten Phagen durch Verbesserung des Aufreinigungsverfahrens nahezu frei von Endotoxinen (< 1 EU/ml). Neben Phagenvakzinen, die durch Phagemid-Rescue-Technologien hergestellt wurden, sind auch neue Phagenvakzinformulierungen produziert und getestet worden (vgl. Kap. 2.3.3).

Zur Herstellung der rekombinanten Phagenvakzinen wurden transformierte TG1-Klone (von der Arbeitsgruppe Dr. Röhnisch zur Verfügung gestellt), welche die Phagemide mit den Fusionsgenen aus Tumorantigenen und Phagenhüllprotein in sich trugen, über Nacht bei 37°C auf Minimal Agarplatten unter Zusatz von 100µg/ml Ampicillin und 1% Glucose inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Kolonien mit 2ml Minimal-Medium von der Agarplatte abgeschwemmt und in 50ml MM-Medium (MM-Stock) verdünnt. Für die Vorkultur wurden 2ml des MM-Stocks in 200ml auf 37°C vorgewärmten 2x TY-AG (2x TY Medium + 100µg/ml Amp und 2% Glucose) verdünnt und bis zur midlog-Phase bei einer $OD_{550nm} = 0.5$ (ca. 3.5 h) bei 225rpm bei 37°C kultiviert. Für den Phagemid-Rescue wurden M13K07- oder VCSM-Helferphagen in einem Verhältnis von mind. 1:1 (Phagen:Bakterien) zu den Bakterien gegeben. Die Bakterien wurden dann 1h bei 37°C im Schüttler bei 150rpm inkubiert. Danach erfolgte die Verdünnung (1:10) der Bakterien in 2 Liter 2x TY-AK (2x TY Medium + 100µg/ml Amp. und 50µg/ml Kanamycin). Zur Verbesserung der Expression der Tumorantigene auf der Phagenoberfläche wurde IPTG in der gewünschten Konzentration (0-1mM/ml) zugesetzt und die Bakterien 15h bei 30°C (g3-Klone) bzw. 37°C (g8-Klone) im Schüttler bei 180rpm kultiviert. Zur Ernte der Phagenvakzinen wurde die Bakterienkultur in einen 500ml Zentrifugenbecher überführt und bei 4500rpm 15 min bei 4°C abzentrifugiert (optional: Zentrifugation bei 8000rpm 15min bei 4°C wiederholen). Anschließend wurde der Überstand in ein 1000ml Gefäß überführt und die Phagen durch Zugabe von 1/5 Vol. (125ml) PEG/NaCl über Nacht im Eisbad oder im Kühlraum präzipitiert. Die Phagen wurden seriell in 250ml Zentrifugenbecher überführt und bei 4000rpm 15min bei 4°C abzentrifugiert. Das Phagenpellet wurde in 30ml 1x PBS resuspendiert. Als nächster Schritt erfolgte die Überführung der Phagensuspension in Oak-Ridge Zentrifugenröhrchen (Nalgene 3115-0050) und die Zentrifugation bei 15.000rpm, 4min bei 4°C. Hierdurch wurden die restlichen Bestandteile der Bakterien abzentrifugiert und die Phagensuspension erschien klar (optional: Phagen durch Zugabe von 1/5 Vol. PEG/NaCl ein weiteres Mal präzipitieren). Zur Pasteurisierung wurden die Phagen durch ein 0,45µm Sterilfilter filtriert. Bis zur Verwendung wurden die Phagen bei 4°C gelagert oder aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Zur Entfernung von kontaminierenden Proteinen und Endotoxinen erfolgte zusätzlich eine Triton X-114 Zweiphasenseparation mit anschließender PEG/NaCl-Fällung. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt (meist 4mal), bis die Phagenpräparation frei von Endotoxinen war.

2.3.3. Herstellung der neuen Phagenidiotypvakzinformulierung

Die Herstellung der neuen Phagenvakzinformulierung erfolgte durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Dr. Röhnisch, die mir die Phagenvakzinen für die nachfolgenden Experimente zur Verfügung stellten. Die Herstellung erfolgte dabei unter Verwendung von Technologien der Fa. Apalexo, die in der Patentanmeldung PCT aus dem Jahr 2005 von Donzeau et al. unter dem

Titel „Composition For Induction Of An Antigen-Specific Immune Response, Method For The Production And Utilization Of Said Composition“ beschrieben sind. Die neue Phagenvakzinformulierung unterscheidet sich von rekombinanten g8-Phagenvakzinen dadurch, dass quantitativ mehr Tumorantigene auf der Oberfläche als bei rekombinanten Phagenvakzinen exprimiert werden und dass die Idiotypproteine nicht als scFv exprimiert werden.

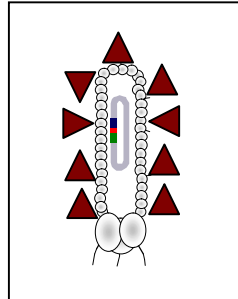


Abb. 7 Schema der neuen Phagenidiotypvakzinformulierung

Im Gegensatz zu rekombinanten BCL1-g8 Phagenvakzinen werden bei der neuen Phagenvakzinformulierung die Idiotypproteine ▲ nicht als scFv auf der Oberfläche exprimiert.

2.3.4. Aufreinigung von Phagen und Entfernung von Endotoxinen

Zur Entfernung von kontaminierenden Proteinen und Endotoxinen aus der Phagenpräparation wurde eine Triton X-114 Zweiphasenseparation durchgeführt. Dazu wurde 10ml Phagenüberstand zunächst sterilfiltriert und mit 1/5 Vol. PEG/NaCl präzipitiert. Nach Resuspension der Phagenpräparation in PBS wurde 1% Triton X-114 dazugegeben und die Präparation 10min auf Eis inkubiert bis eine homogene Suspension zu beobachten war. Die Probe wurde dann 5min bei 37°C inkubiert und kurz bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, wodurch sich 2 Phasen ausbildeten. Von den 2 Phasen wurde die obere Phase abgenommen und die Phasenseparation mit der wässrigen Phase 3 bis 4mal wiederholt. Es schloss sich eine erneute PEG/NaCl Präzipitation an. Schließlich wurden die Phagen in PBS resuspendiert und die gewünschte Konzentration eingestellt.

2.3.5. Phagen-ELISA zur Titerbestimmung von Phagen

Zur Titerbestimmung wurden Phagen-ELISAs durchgeführt. Pro well wurden auf einer Titerplatte 1µl Rabbit Anti-M13 Antikörper in 100µl Coatingpuffer verdünnt, aufgetragen. Zum Coaten der ganzen Platte wurde der Antikörper Rabbit Anti-M13 1:500 verdünnt (10µl auf 20ml NaCO₃) und zu je 100µl in die wells pipettiert. Die Platte wurde mit Deckfolie abgeklebt und ohne Schwenken 1h-2h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Coatingpuffer wurde abgossen und die Platten 3x mit je 200µl Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden 200µl Blockierlösung zu den wells gegeben und die Platten 30-60min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Phagen wurden auf einer Titerplatte seriell 1:10 in Verdünnungspuffer (20µl Phagen in 180µl Puffer) verdünnt. Die Platte wurde mit 200µl Waschpuffer 3-6x gewaschen und pro well 100µl der verdünnten Phagen gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation der Platten

45min bei RT. Die Platten wurden erneut 3-6x mit Waschpuffer gewaschen. 2µl Anti-M13 HRP-Konjugat Lösung wurden in 10ml Waschpuffer (1:5000) verdünnt und 100µl der Lösung in jedes well pipettiert. Die Platten wurden erneut 3-6x mit Waschpuffer gewaschen und anschließend 100µl RT-warmes ABTS Substrat pro well zugegeben. Die Titerplatte wurde 5-30min bei RT inkubiert. Zur Beendigung der enzymatischen Reaktion wurden 50µl 0,5M H₂SO₄ oder 100µl 1% SDS in die wells dazugegeben. Im ELISA Reader wurde die Platte bei 405nm gelesen. Anhand von Standard-OD-Kurven wurde die Anzahl der Phagenpartikel in den Phagenkulturen bestimmt.

Coatingpuffer:

0,1M NaHCO₃, pH 8,5

Blockierungspuffer:

1xPBS

1%BSA oder 10% Magermilchpulver

Waschpuffer:

1xPBS

0,1% Tween 20

Verdünnungspuffer:

1xPBS

1%BSA

0,1%Tween20

2.3.6. Quantifizierung von Phagen durch Proteinbestimmung (nach Bradford)

Zusätzlich zur Titerbestimmung wurde die Menge der Phagen durch Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford mit dem Protein Assay von BioRad gemessen. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe vom Proteinstandard (0.5mg/ml BSA) entsprechend den Anweisungen im Kit erstellt (Standard Range: 10µg – 100µg). Zur Proteinbestimmung wurde die im Kit befindliche Coomassieblau Lösung 1:5 mit Aqua dest. verdünnt und anschließend durch ein Whatman #1 Papierfilter filtriert. Zur Erstellung der Protein-Standard Kurve wurden jeweils 100µl der verschiedenen Standardlösungen in ein Reagenzröhrchen pipettiert; als Leerwert ein Röhrchen mit 100µl dest. Wasser. Anschließend wurden 5ml der verdünnten und gefilterten Farblösung dazugegeben und gut gemischt. Der Ansatz wurde mindestens 5min bis 1h bei RT inkubiert. Anschließend wurde 1ml Coomassieblaulösung zu jedem Eppendorfröhrchen gegeben und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Die photometrische Bestimmung der Coomassieblaukonzentration erfolgte bei A595 in einer 1cm Plastikkuvette. In gleicher Weise wurde mit den Phagenpräparationen 100µl (10-100µg) verfahren. Als Leerwert wurde ein Röhrchen mit 100µl PBS und dest. Wasser verwendet.

2.3.7. Quantitativer Endotoxinnachweis mittels LAL-Methode

Zum quantitativen Endotoxinnachweis wurde der chromogene Limulus-Amoebocyten-Lysat Assay durchgeführt. Der Test basiert auf dem Phänomen, dass Endotoxin die Aktivierung eines Proteins aus dem Limulus-Amoebocyten-Lysats (LAL) katalysiert. Das aktivierte Enzym verur-

sacht die Spaltung von p-Nitroanilin (pNA), wodurch ein gelber Farbstoff entsteht, der photometrisch bei einer Wellenlänge von 405-410nm gemessen werden kann. Pulverisiertes Endotoxin (ca. 20 EU) wurde in 1ml LAL-Wasser 15min in einem Vortexmischer resuspendiert (->ET-Stammlösung = x EU/ml). Die Endotoxin-Standards wurden frisch pipettiert und gut gemischt. Die ET-Stammlösung wurde entsprechend den Vorgaben auf 1EU/ml verdünnt. Folgende serielle Verdünnungen wurden hergestellt:

ET-A = 1 EU/ml	(50µl ET + 1050µl LAL-Wasser)
ET-B = 0,5 EU/ml	(0,5ml ET-A + 0,5ml LAL-Wasser)
ET-C = 0,25 EU/ml	(0,5ml ET-B + 0,5ml LAL-Wasser)
ET-D = 0,125 EU/ml	(0,5ml ET-C + 0,5ml LAL-Wasser)

Das chromogene Substrat (ca. 7mg/vial) wurde durch Zugabe von 6.5ml LAL-Wasser resuspendiert. LAL wurde vorsichtig in 1.4ml LAL-reinem Wasser resuspendiert (reicht für 28 wells). Anschließend wurden 50µl der Standardverdünnungen in Duplikaten entsprechend dem Pipettierschema in die Platten pipettiert und 50µl je Probe als Duplikate pipettiert (die Proben sollten so verdünnt sein, dass die Endotoxinkonzentration zwischen 0,1-1 EU liegt). 50µl LAL wurden zu den erstpipettierten wells gegeben und 10min bei 37°C inkubiert. Je 100µl der auf 37°C erwärmten Substratlösung wurde daraufhin in die wells gegeben und exakt 6min inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden schließlich 100µl Stopplösung (10% SDS) in die wells gegeben und die Mikrotiterplatte im ELISA-Reader bei 405-410nm gemessen.

2.3.8. Kontrolle der Phagenpräparation mittels Tricine-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Tricine-SDS-Polyacrylamidgele eignen sich zur Auftrennung von kleinen Peptidfragmenten mit einer Größe von 5 bis 20kDa, insb. zur Analyse von g8-Fusionstranskripten. Es werden dabei jedoch keine hochprozentigen Acrylamidgele mit hoher Quervernetzung verwendet, sondern im Vgl. zu den Laemmli-Gelen nur andere Puffer. Je nach verwendetem System können ohne die Verwendung von Gradientengelen auch Proteine in einem Bereich zwischen 1 und 100kDa aufgetrennt werden. Überladungseffekte durch Auftragen von zu viel Probenmaterial, wie man es gelegentlich bei der SDS-PAGE sieht, kommen nicht vor. Zur Durchführung der Tricine-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden die Glasplatten der Elektrophoresekammer sorgfältig gereinigt, mit Ethanol entfettet und entsprechend der Gerätevorschrift in die Gelgießvorrichtung eingespannt. Trenngele wurden entsprechend der nachfolgenden Tabelle zusammengemischt.

für 15 ml	10% T, 3% C	16.5% T, 3% C
Acrylamid (49.5% T, 3% C)	3 ml	5 ml
Tris-Cl/SDS Gelpuffer	5 ml	5 ml
Glycerol	2 g (1.6 ml)	2 g (1.6 ml)
10% APS	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl
H ₂ O	5.4 ml	3.4 ml

Das Trenngel wurde anschließend zügig mit einer 5ml Pipette bis zur Mitte in die Elektrophoresekammer gegossen, vorsichtig mit Isopropanol überschichtet und anschließend 30min polymerisiert. Anschließend wurde die Isopropanolschicht abgegossen und der Zwischenraum über dem Trenngel 3 bis 4x mit H₂O gespült und restliches H₂O mit einem gefalteten Whatmanpapier vorsichtig entfernt. Spacer- und Sammelgele wurden analog zum Trenngel entsprechend nachfolgender Tabelle hergestellt, jedoch ohne Verwendung von Glycerol. Spacergele wurden nur bei Herstellung von schmalporigen Gelen (16.5% T Gele) zur besseren Auftrennung der größeren Fragmente zwischen 30-70kDa verwendet und 2-3cm über das Trenngel gegossen.

für 15 bzw. 12.5 ml	„Spacer“ gel 10% T, 3% C	Sammelgel 4% T,3% C
Acrylamid (49.5% T, 3% C)	3 ml	1 ml
Tris-Cl/SDS Gelpuffer	5 ml	3.1 ml
10% APS	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl
H ₂ O	7 ml	8.4 ml

Die Lösung für das Sammelgel wurde mit einer 5ml Pipette bis zum oberen Rand der Glasplatten über das Tren- bzw. Spacergel gegossen. Anschließend wurden 0.75mm Teflonkämme ohne Luftblasen in das Gel gesteckt und das Sammelgel 30-60min polymerisiert. Für die SDS-Gelelektrophorese wurden 20µl Proteinaliquots (unverdünnte Phagenpräparation) mit 20µl 2x Tricine-Sample Puffer verdünnt und 30–60min bei 40-50°C inkubiert. Die Elektrophorese wurde dann entsprechend den Angaben des Geräteherstellers durchgeführt, wobei die obere Pufferkammer mit 1x Kathodenpuffer und die untere Elektrophoresekammer mit 1x Anodenpuffer etwa 1/3 gefüllt wurde. Nach Auftragen der Proben wurde die Elektrophorese für ca. 1h bei 30V (const. V) und anschließend bei einer Stromstärke von 150V (70mA) für 4h im Kühlraum durchgeführt. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront das untere Ende der Glasplatte erreicht hat. Zur Sichtbarmachung der Proteinbanden wurde das Gel mit Coomassieblau oder über Silberfärbung (s.u.) angefärbt.

5x Anodenpuffer

(0.2M Tris-HCl, adjusted with HCl to pH 8.9)

121.1g Tris-HCl

500ml H₂O

pH 8.9 mit HCl einstellen. Auf 1l mit H₂O verdünnen und bei 4°C lagern

1x Kathodenpuffer

(0.1M Tris-HCl, 0.1M Tricine, 0.1%SDS)

12.11g Tris-HCl

17.92g Tricine

1g SDS

auf 1L mit H₂O verdünnen und bei 4°C lagern

kein pH einstellen!

Tris-Cl/SDS Gelpuffer

(3M Tris-HCl, 0.3%SDS, pH 8.45)

182g Tris-Base

300ml H₂O

pH 8.45 mit 1N HCl einstellen.

auf 500ml mit H₂O verdünnen, durch 0.45µm Filter sterilfiltrieren

1.5g SDS dazugeben und bei 4°C lagern

Acrylamid-Bisacrylamid Lösung (49.5% T, 3% C)

T:= Totale Acrylamidkonzentration in % (% Acrylamid + % Bisacrylamid)

(Gramm Acrylamid + Gramm Bisacrylamid)/100 ml

C:= Crosslinkeranteil in % (% Bisacrylamid x 100 / T)

(Gramm Crosslinker)/(Gramm Acrylamid + Gramm Crosslinker)

48g Acrylamid

1.5g Bisacrylamid

auf 100ml mit H₂O auffüllen und bei 4°C lagern

4x Tricine-Sample-Puffer

(200mM Tris-HCl, pH 6.8, 12% w/v SDS, 48% w/v Glycerol, 0.4M DTT, 0.05% Serva Blue G)

anstelle von DTT kann auch 4% (v/v) β-ME verwendet werden

2ml 1M Tris-HCl, pH 6.8

3ml H₂O

1.6g SDS

0.62g Dithiotreitol

5mg Coomassie Blue G-250

4.8ml (6 g) Glycerol

auf 10ml mit H₂O auffüllen,

zum Lösen einige Minuten bei 50°C inkubieren, anschließend bei – 20°C lagern

bei Gebrauch auftauen und 10min bei 50°C inkubieren.

2.4. Durchflusszytometrische Untersuchungen

Vor der Durchführung des Tumorchallenges wurden die BCL1-Lymphomzellen aus der in-vivo-Kultivierung zur Überprüfung ihrer Reinheit immunzytologisch auf das Vorhandensein spezifischer Oberflächenmarker untersucht (CD4, CD8, CD45, CD3, CD19, IgM, Leichtkettenrestriktion). Es wurden immunzytologische Untersuchungen von frischen BCL1-Lymphomzellen im Vergleich zu normalen Milzzellen und aufgetauten BCL1-Zellen durchgeführt. Für die immunzytologischen Analysen wurde der Coulter Epics XL-MCL (Beckman, München) verwendet. Die

in 90%FCS (Gibco) und 10%DMSO (Sigma) eingefrorenen BCL1-Zellen wurden nach raschem Auftauen in ein Falcon-Röhrchen mit 10ml FACS-Puffer gegeben, anschließend zentrifugiert (10min, bei 4°C, 1200rpm) und in 5ml FACS-Puffer resuspendiert. Die frischen Milzzellen wurden zunächst in 15ml PBS eingelegt unter Zugabe von 400µl Heparin, anschließen durch ein Sieb in eine Gewebepetrischale püriert und 7min geschwenkt. Nach Resuspension der Zellen in FACS-Puffer erfolgte die Einstellung der Zellzahl auf 10^7 Zellen/ml. 50µl der Zellsuspension wurden 1:1 mit Trypanblau (0,4%, Sigma) gemischt und ca. 10µl davon in eine Neubauerzählkammer pipettiert. Aus dem Mittelwert der lebenden (nicht blau gefärbten) Zellen in den vier Großquadranten ergibt sich die Zellzahl/ml durch Multiplikation mit 10^4 und dem Verdünnungsfaktor.

Von der resuspendierten Zellsuspension wurden 100µl/well in eine 96-well-round-bottom Platte pipettiert, die Zellen mit 100µl FACS-Puffer gewaschen, in 50µl FACS-Puffer resuspendiert unter Zugabe von 10µl konjugierter Antikörper-Färbelösung. Anschließend wurden die Zellen 20min auf Eis im Dunklen inkubiert, 2x in 150µl FACS-Puffer gewaschen, in 100µl PBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen pipettiert unter Zugabe von 200µl PBS und 50µl 7-AAD working solution (10µg/ml). Nach erneuter Inkubation 20min auf Eis unter Lichtausschluss wurde anschließend die Messung im Durchflußzytometer durchgeführt.

FACS-Puffer:

1x PBS (Gibco)
3% FCS (Gibco)
0,1% NaN₃ (Sigma)

verwendete konjugierte Antikörper:

bezogen von den Beckman Coulter (Krefeld) und Southern Biotech (Birmingham, USA)

Kontr.-FITC, Kontr.-PE, CD4-FITC, CD8-PE, CD45-FITC, CD3-PE, CD4-PE, CD19-PE, Kappa-FITC, Lambda-FITC, IgM-FITC.

2.5. ELISA (enzyme-linked-immunosorbent-assay)

2.5.1. Sandwichelisa

Zur Charakterisierung der humoralen Immunantwort und zur Analyse einer Phagen- bzw. tumorspezifischen Antikörperproduktion nach Phagen-basierter Idiotypvaksinierung wurden Elisa-verfahren etabliert. Neben dem klassischen Sandwichelisaverfahren kamen Zell-ELISAs und Präabsorptions-ELISAs zur Anwendung.

Für den Sandwich-ELISA wurden 96-well Vinyl Assay Plates (Costar) verwendet, die zur Hälfte mit Capture-Antikörper beschichtet wurden (100µl/well): Fd-Phagen (M13K07 Helferphagen, Lagerung bei + 4°C, benötigte Konzentration 5×10^{10} pfu/ml), BCL1 gereinigt und BFF3 gereinigt (Ausgangskonzentration 4mg/ml, verdünnt mit PBS auf 10µg/ml). Anschließend wurden die Platten 1h bei 37°C gelagert und mit Blocklösung 200µl/well geblockt. Es schloss sich eine erneute Lagerung bei 37°C an. Nach 3x Waschen (jeweils mit 200µl Waschpuffer) erfolgte die Zugabe der zu untersuchenden Seren der Versuchsreihen. Es fanden sowohl Einzelmaustes-

tungen, als auch die Untersuchung als Gruppenpool statt, jeweils als Triplikate. Die Seren wurden mit PBS auf 1/200, 1/1000 und 1/5000 verdünnt und 100µl/well aufgetragen. Es schloss sich eine weitere Lagerung 1h bei 37°C und ein 3-maliger Waschschrift an. Die Detektions-Antikörper wurden mit PBS auf 1/1000 verdünnt und 100µl/well aufgetragen. Nach unterschiedlich langen Inkubationsschritten und Waschen erfolgte die Substratzugabe mittels ABTS (1-Step ABTS, Pierce) 100µl/well. Die Farbentwicklung wurde nach 20min durch Zugabe von 100µl 1% SDS (Natriumlaurylsulfat, Bio-Rad) gestoppt und die Farbintensität photometrisch bei 405nm bestimmt.

Detektionsantikörper:

Die Detektions-Antikörper wurden sämtlich von der Firma Southern Biotech bezogen

Goat-Anti-Mouse IgG-HRP, IgG1-HRP, IgG2a-HRP

Goat-Anti-Rat IgG-HRP

Rat-Anti-Mouse IgM-HRP, -lambda-HRP, -kappa-HRP

Blockpuffer:

1xPBS (Gibco) + 1%BSA (Sigma)

Waschpuffer:

1xPBS (Gibco) + 0,1%Tween 20 (Sigma)

2.5.2. Präabsorptionelisa

Vor Durchführung der Sandwich-ELISAs wurde eine Präabsorption der Seren der 3.Versuchsreihe mit aufgereinigtem BCL1 und BFF3 durchgeführt. Hierbei wurden Seren der mit BCL1-WT und BFF3-WT immunisierten Mäuse (Antikörperkonzentration 15µg/ µl) mit aufgereinigtem BCL1 (Ausgangskonzentration 4mg/ml) und BFF3 (Ausgangskonzentration 2mg/ml) im Verhältnis 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 unter Schwenken bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Proben wurden 10min bei 13.000rpm zentrifugiert und der Überstand gemäß den beschriebenen Bedingungen im ELISA verwendet.

2.5.3. Zell-ELISA

Zur Durchführung der Zell-ELISAs wurden Zellkulturplatten (Co) verwendet und mit BCL1-Zellen gecoatet (3×10^5 Zellen/well). Beim Blockversuch mit Goat Serum (Caltag, Normal Goat Serum) wurden 50µl Blockpuffer/well gemäß der Instruktion von Caltag Laboratories zugegeben und die Platten 1/2h auf Eis inkubiert. Die zu untersuchenden Seren wurden mit PBS auf 1/15, 1/30, 1/100 bzw. 1/500 verdünnt und 100µl/well pipettiert. Nach Inkubation von 1.5h auf Eis folgte 3-maliges Waschen der Zellen mit eiskaltem Waschpuffer (200µl/well). Die Zellen wurden anschließend im Enzym-Antikörper-Konjugat (100µl/well, Verdünnung 1/2000 in Waschpuffer) resuspendiert. Nach erneuter Inkubation und Waschen erfolgte die Zugabe von ABTS (100µl/well). Farbentwicklung, Stoppen und photometrische Bestimmung liefen analog zu oben beschriebenem Verfahren ab.

Verwendete Enzym-Antikörper-Konjugate:

Peroxidase-conjugated Affini Pure F(ab)₂ Fragment Goat-Anti-Mouse IgG (Dianova)
Goat-Anti-Mouse IgG-HRP, IgG1-HRP, IgG2a-HRP (Southern Biotech)
Rat-Anti-Mouse IgM-HRP, -lambda-HRP, -kappa-HRP (Southern Biotech)

Blockpuffer:

Waschpuffer + 3% Normal Goat Serum (Caltag)

Waschpuffer:

1xPBS (Gibco) + 1% FCS (Gibco)

2.6. Zellkultur

2.6.1. Kultivierung von Zelllinien

Die Hybridomzelllinien MC10-6A5 (rat anti-BCL1-Idiotyp, IgG2a), 123F6 (BCL1-IgM, Idiotyp) und BFF3 (Maus-IgM, Kontrollzelllinie) wurden kultiviert, um die von ihnen sezernierten Immunglobuline nach Aufreinigung als Positivkontrolle im ELISA, sowie zur Beschichtung im Sandwich-ELISA einzusetzen. Gemäß den empfohlenen Kulturbedingungen wurden die Zelllinien im Brutschrank bei 37°C und 5%CO₂ in Zellkulturflaschen (BD Falcon TM, sterile, 750ml) inkubiert und alle 3-4 Tage gesplittet. Der reife Überstand wurde abpipettiert, eingefroren und für Aufreinigungsverfahren verwendet. Alle Arbeiten wurden in einer Sterilbank unter sterilen Arbeitsbedingungen durchgeführt.

Standard-Kulturmedium für Hybridome:

Complete DMEM + 10% FCS
-500ml DMEM 4500mg/ml Glucose, Glutamax1 (Gibco)
-5ml Penicillin-Streptomycin: 104IU/ml Penicillin, 10mg/ml Streptomycin (Gibco)
-5ml MEM non-essential aminoacids (Gibco)
-50ml Hitze inaktiviertes FCS (30min bei 56 °C)
-5x10⁵ M β-Mercaptoethanol (Sigma)
-12,5ml HEPES Buffer 1M (Gibco)

2.6.2. Bestimmung der Zellzahl

50µl der Zellsuspension wurden mit dem gleichen Volumen Trypanblau (0,4%, Sigma) gemischt und ca. 10µl davon in eine Neubauerzählkammer pipettiert. Aus dem Mittelwert der lebenden (nicht blau gefärbten) Zellen in den vier Großquadranten ergibt sich die Zellzahl/ml durch Multiplikation mit 10⁴ und dem Verdünnungsfaktor.

2.6.3. Einfrieren von Zellen

Gut proliferierende Zellen wurden abzentrifugiert und gezählt. In 5ml eiskaltes Einfrieremedium wurden 10⁷ Zellen aufgenommen, zu 1ml in Kryoröhrchen aliquotiert und langsam in einer Styroporkiste auf -80°C eingefroren. Zur längeren Konservierung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Reaktivierung ließen sich die Zellen rasch im Wasserbad bei 37°C auftauen, wurden sofort in 10ml frisches Medium aufgenommen und abzentrifugiert, um das toxische DMSO zu entfernen. Das Zellpellet wurde je nach Größe in einer geringen Menge (5-10ml) frischen Mediums aufgenommen und in eine geeignete Kulturflasche überführt.

Einfríermedium:

90% FCS (Gibco)

10% DMSO (Sigma)

2.7. Aufreinigung von monoklonalen IgM-Antikörpern aus Hybridomen

2.7.1. Aufreinigung von Immunglobulinen über Protein A Säulen

Zur Aufreinigung von BCL1-IgM und einer IgM-Kontrolle wurden die Hybridomzelllinien 123F6 und BFF3 von der Arbeitsgruppe Röhnisch zur Verfügung gestellt. BCL1-IgM wurde zur Beschichtung von Sandwich-ELISAs zum Nachweis einer idiotypspezifischen Immunantwort gebraucht. Das von der Zelllinie BFF3-produzierte IgM-Molekül wurde als unspezifische IgM-Kontrolle benutzt. Klassische Verfahren zur Aufreinigung vom Immunglobulin M schließen Präzipitationsverfahren in Kombination mit Gelfiltration und Anionenaustauschchromatographie mit ein, jedoch sind diese Verfahren sehr zeitaufwändig und besitzen zudem nur eine geringe Ausbeute. Da es in der Literatur Berichte über die erfolgreiche Aufreinigung von Mäuse-IgM durch Protein A gibt (Crichton 1989), wurde zunächst versucht BCL1-IgM über Protein A Sepharose aufzureinigen, obgleich die Affinität von Protein A zu IgG deutlich höher ist als zu IgM. Protein A ist ein bakterielles Zellwandprotein von *Staphylococcus aureus* mit einer hohen Affinität zur Fc-Region von Immunglobulinen, einem Molekulargewicht von 42kDa und einer hohen pH-Stabilität von pH 2-10. Die Bindungsaffinität zum Fc-Teil von Antikörpern ist pH-abhängig und nach Bindung von Antikörpern in Gegenwart neutraler oder leicht alkalischer Puffer lassen sich die Immunglobuline mit einem abfallenden pH-Gradienten eluieren. Abhängig von Herkunft (Spezies) und Subklasse des Antikörpers kann die Bindungsstärke von Protein A erheblich variieren. Für unsere Versuche wurden "HiTrap Protein A Fast Flow" Säulen (Amersham-Pharmacia) verwendet.

Probenvorbereitung:

Der Zellkulturüberstand wurde im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Mit einem pH-Stick wurde der pH-Wert des Zellkulturüberstandes getestet, er sollte zwischen pH 7,0 und 8,0 liegen und musste gegebenenfalls durch Zugabe von 1M Tris-HCl pH 9,0 eingestellt werden. Die Lösung wurde durch ein 0,45µm Filter gegeben und es wurden 0,02% Natriumazid zugesetzt, um mikrobielle Kontaminationen zu vermeiden. Die Lösung wurde bis zum Anschluss an die Säule auf Eis oder bei 4°C gelagert.

Vorbereitung der Protein A-Sepharose Säule:

Die Protein A-Chromatographie wurde mit Hilfe einer Schlauchpumpe durchgeführt. Bei allen Arbeiten mit der Säule durfte eine Flussrate von 1ml/min nicht überschritten werden, da sonst

die Säulenmatrix leidet. Das Säulenmaterial ist in PBS/Azid bei 4°C gelagert. Die Säule wurde an die Schlauchpumpe angeschlossen und mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer mit einer Flussrate von 1ml/min gespült. Danach folgte ein Reinigungsschritt mit 10 Säulenvolumen Elutionspuffer und abschließend wurde mit 10 Säulenvolumen Waschpuffer gespült. Am Ende wurde der pH-Wert des Säulendurchflusses mit einem pH-Stick kontrolliert (der Durchfluss muss neutral sein, bevor der Probenauftrag gestartet wird). Es ist immer darauf zu achten, dass keine Luft auf die Säule gepumpt wird und die Säule „trocken läuft“.

Probenauftrag:

Der Probenauftrag erfolgte über Nacht bei 4°C. Aufgetragen wurde mit einer Flussrate von 1ml/min. Um ein Trockenlaufen der Säule auszuschließen, wurde eine Endlosschleife gelegt, indem der Säulendurchfluss im gleichen Gefäß wie der Probenauftrag gesammelt wurde.

Antikörperelution:

Die Säule wurde zunächst mit 20 Säulenvolumen Waschpuffer mit einer Flussrate von 1ml/min gewaschen. Je Gefäß werden 60µl 5M NaCl-Lösung vorgelegt. Nach dem Waschen der Säule wurde der Elutionspuffer angeschlossen und 8 Fraktionen à 1ml gesammelt. Durch Zugabe von 1M Tris-HCl pH 9,0 wurden alle Fraktionen möglichst zügig neutralisiert. Die Zugabe erfolgte in 20µl Schritten. Der pH-Wert sollte zwischen pH 7 und 8 liegen. Die Endvolumina der neutralisierten Fraktionen wurden protokolliert und die Fraktionen bei 4°C gelagert. Die Säule wurde direkt nach der Elution im Wechsel mit je 10 Säulenvolumen Waschpuffer/ Elutionspuffer/ Waschpuffer bei einer Flussrate von 1ml/min gespült. Abschließend wurde die Säule mit 10 Säulenvolumen PBS/Azid gespült, verschlossen und bei 4°C gelagert.

Lösungen:

Waschpuffer:	20mM Natriumphosphat pH 7.0
Elutionspuffer:	100mM Natriumcitrat pH 4,0
Neutralisationspuffer:	1M Tris-HCl pH 9,0
Natriumazid:	10% Natriumazid in dest. H ₂ O (bei 4°C gelagert)
PBS/Azid:	10mM Natriumphosphat pH 7,4
150mM NaCl	
0,02 % Natriumazid	
5 M NaCl:	5M NaCl in dest. H ₂ O

2.7.2. Aufreinigung von Immunglobulinen über Gamma Bind Plus Sepharose

Zur Aufreinigung des in den Überstand der Zellkultur sezernierten Antikörpers (rat anti-BCL1-Idiotyp, IgG2a) der Hybridomzelllinie MC10-6A5 wurde Gamma Bind Plus Sepharose (Amersham Biosciences, 5ml, Code No. 17-0886-01) verwendet, nachdem sich der anti-BCL1 Antikörper aus der Ratte, der als Positivkontrolle im ELISA Anwendung finden sollte, nicht durch o.g. Protein A Sepharose aufreinigen ließ. Gamma Bind G, Typ3, MW 15000 stellt eine rekombinante Form des Streptokokken Protein G dar und bindet an die Fc-Region von IgG (vor allem monoklonales Maus und Ratten IgG). Diese Substanz ist zum Analysieren und Aufreinigen von Immunglobulinklassen, -subklassen und -fragmenten geeignet. Das in E coli produzierte Gamma Bind Plus enthält zwei IgG-Bindungsstellen. Der Teil des nativen Protein G Moleküls wurde genetisch verändert, um unerwünschte Cross-Reaktionen mit Albumin zu verhindern.

Alle Aufreinigungsversuche wurden gemäß oben beschriebener Maßnahmen und der durch Amersham erteilten Instruktionen durchgeführt.

Bindungspuffer:

0,01M Natriumphosphat-Puffer, 0,15M Natriumchlorid, 0,01M EDTA pH 7,0

Elution-buffer:

0,5M Essigsäure pH 3,0

2.7.3. Quantitative Proteinbestimmung der aufgereinigten Antikörper mittels BCA

Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge der Überstände wurde der Micro BCA™ Protein Assay von Pierce verwendet und die Analyse entsprechend den Instruktionen des Herstellers in 96 well Platten (Microtest TM Primaria TM, flat bottom, Becton Dickinson) durchgeführt. Die Proben wurden in Verdünnungsreihen auf die Platte aufgetragen, 100µl der konzentrierten Farbstoff-Reagenz-Lösung zugeführt, 30min bei 65°C inkubiert und anschließend im Photometer (560nm) gelesen. Die Proteinkonzentration ließ sich anhand einer Standardkurve einer Verdünnungsreihe mit Rinderalbumin bestimmen.

2.7.4. Analyse der aufgereinigten Antikörper mittels SDS-PAGE nach Laemmli

Zur Analyse der eluierten Antikörperfraktionen wurden SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophoresen durchgeführt und anschließend mit Silber- oder Coomassie Blue gefärbt. Für die SDS Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese wurde das Mini-Protean II System von Biorad verwendet. Die Trenngellösung wurde zum Polymerisieren mit Isopropanol überschichtet und ½ h inkubiert. Daraufhin erfolgte die Überschichtung mit der Sammelgellösung, in die ein Plastikamm (Biorad, Comb, 10 TOOTH) gesteckt wurde. Vor dem Laden erfolgte das sorgfältige Spülen der Taschen, während die Proben in Auftragspuffer gekocht wurden (5min bei 95°C). Es wurden Molekulargewichtsmarker der Firma Roth (Roti-Mark 10-150) und als Kontrolle BSA (50, 100, 500ng) verwendet. Nach der Elektrophorese (10min bei 120V, 1/2h bei 100V) erfolgte die Färbung und Fixierung der Gele.

Elektrophoresepuffer:

Elektrophoresepuffer, pH 8,3, Apotheke Klinikum Innenstadt Art.Nr. T0031

Trenngellösung: 12% (5ml):

-1,6ml H₂O

-2,0ml 30% Acrylamid-Mix (Rotiphorese Gel 30, Roth, Art.Nr.3029.1)

-1,3ml 1,5 M Tris (pH 8,8) (Tris-HCl-Puffer, Apotheke Klinikum Innenstadt, Art.Nr. T0013)

-0,05ml 10% SDS (Natriumdodecylsulfat, Biorad)

-0,05ml 10% Ammoniumpersulfat (Biorad)

-0,002ml TEMED (Tetramethylethylendiamin, Sigma)

Sammelgellösung: 12% (1ml)

-0,68ml H₂O

-0,17ml 30% Acrylamid-Mix (Rotiphorese Gel 30, Roth, Art.Nr.3029.1)

-0,13ml 1,5 M Tris (pH 6,8) (Tris-HCl-Puffer, Apotheke Klinikum Innenstadt, Art.Nr. T0012)

-0,01ml 10% SDS (Natriumdodecylsulfat, Biorad)

-0,01ml 10% Ammoniumpersulfat (Biorad)

-0,001ml TEMED (Tetramethylethylendiamin, Sigma)

Auftragspuffer:

Gel Loading Solution (Sigma, 5ml, Nr. G-2526)

5% β -Mercaptoethanol (Sigma, 100ml, Nr. M-7154)**2.7.5. Coomassie-Blau Färbung von Polyacrylamidgelen**

Zum Nachweis größerer Proteinmengen (0,3-1 μ g) eignet sich die einfache Coomassiefärbung. Nach vorsichtigem Lösen des Gels aus der Glasvorrichtung wurde das Gel 10-20min in Coomassiefärbelösung vollständig durchfärbt und anschließend in Entfärbungslösung so lange inkubiert, bis der Hintergrund farblos war.

Coomassiefärbelösung: 0,1%

1g Coomassie (Coomassie brilliant blue R-250, Merck)

500ml Methanol (Merck)

75ml Essigsäure 100% (Merck)

auf 1L mit H₂O auffüllenEntfärbelösung:

200ml Methanol (Merck)

75ml Essigsäure 100% (Merck)

auf 1L mit H₂O auffüllen**2.7.6. Silberfärbung von Polyacrylamidgelen**

Der Nachweis geringster Proteinmengen ist mit einer Silberfärbung möglich. Die Nachweisgrenze der Silberfärbung liegt bei etwa 2 bis 10ng Protein und ist damit ca. 100x sensitiver als die Färbung mit Coomassie Brilliant Blue R. Für die Silberfärbung wurde das Gel nach der Elektrophorese 1h in Fixierlösung gelegt. Anschließend wurde das Gel 3x15 min mit 40% Ethanol gewaschen und 1min in Di-Natriumthiosulfatlösung inkubiert. Es schloss sich ein erneuter Waschschrift mit Wasser an. In frisch zubereiteter Färbelösung wurde das Gel 20min inkubiert und erneut gewaschen. Im nächsten Schritt wurde der Entwickler zugegeben und gewartet bis die silber-gefärbten Proteine sichtbar wurden. Es empfiehlt sich ein kurzes Abwaschen der Gele mit Wasser und eine Lagerung in Stopplösung im Dunklen für 10min. Zur Aufbewahrung eignen sich Wasser oder 30% Methanol.

Fixierlösung:

100ml Methanol (Merck)

24ml Eisessig (Merck)

200 μ l Formaldehyd (Formaldehydlösung 37%, Merck)mit H₂O auf 200ml auffüllenDi-Natriumthiosulfatlösung:

0,1g Di-Natriumthiosulfat in 500ml Wasser (Natriumthiosulfat, wasserfrei, Merck)

Färbelösung:

200mg Silbernitrat (Silbernitrat Reag.Ph Eur, Merck)

75 μ l Formaldehyd (Merck)

mit Wasser auf 100ml auffüllen

Entwickler:

400µg Di-Natriumthiosulfat (Merck)
50µl Formaldehyd (Merck)
6g Natriumcarbonat (wasserfrei zur Analyse, Merck)
mit Wasser auf 100ml auffüllen

Stopplösung:

50ml Methanol (Merck)
12ml Eisessig (Merck)
mit Wasser auf 100ml auffüllen

2.8. Statistische Analysen

Die Ergebnisse werden als arithmetisches Mittel angegeben. Die Streuung wird als Bereich oder Standardfehler des Mittels (SEM, standard error of mean) dargestellt. Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ angenommen und mittels Student's T-Test berechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Phagenidiotypvakzinierung und Tumorchallenge im BCL1-Lymphommodell

Zur Charakterisierung der Immunantwort nach Phagen-basierter Idiotypvakzinierung wurde für die Durchführung der Tierversuche das murine BCL1-Lymphommodell verwendet. Dabei handelt es sich um das erste in der Maus beschriebene Lymphom Modell, das spontan in einer älteren Balb/c Maus entstand (Slavin and Strober 1978). Charakteristisch für das BCL1-Lymphommodell sind das frühe Auftreten einer Splenomegalie durch infiltrierende Lymphomzellen und die periphere Ausschwemmung von Lymphomzellen im späteren Verlauf der Erkrankung, so dass das BCL1-Lymphom große Ähnlichkeit zu einer chronischen lymphatischen Leukämie zeigt (Warnke, Slavin et al. 1979). Um die Variabilität der Versuche möglichst gering zu halten, wurden für alle Tiere standardisierte Bedingungen festgesetzt (siehe Kap.2) und die Untersuchungen an einer ausreichend großen Versuchstierzahl von 150 BALB/c Mäusen mit einer Gruppengröße von 6 Mäusen/Gruppe durchgeführt.

Unser Versuchsaufbau stellt allerdings kein therapeutisches Modell dar, sondern es wurde ein protektives Tumormodell zur Überprüfung der Wirksamkeit von Phagenidiotypvakzinen gewählt, bei dem nach der Phagenidiotypvakzinierung ein Tumorchallenge mit BCL1-Zellen durchgeführt und anschließend das Überleben der Mäuse untersucht wurde. Dazu wurden die Tiere insgesamt 4x in wöchentlichem Abstand mit rekombinanten g3- und g8-Phagenidiotypvakzinen, sowie einer neuen Phagenidiotypvakzinformulierung in unterschiedlichen Dosierungen immunisiert (Versuchsgruppen und Vakzinierungsdosen siehe Kap.2). Die Seren wurden durch Blutabnahmen 14 Tage, 28 Tage und 4 Monate nach der Vakzinierung gewonnen. Zum Nachweis der protektiven Immunität wurde 7 Tage nach der letzten Immunisierung ein Tumorchallenge mit 1×10^5 BCL1-Lymphomzellen durchgeführt, was einer sehr hohen, letalen Dosis entspricht. Von Stevenson und Mitarbeitern wurden vergleichsweise niedrige Tumordosen (10^2 - 10^4 BCL1-Zellen) gewählt, wobei eine nachlassende Effektivität der Standardvakzine Id-KLH bei einem Tumorchallenge mit 10^4 BCL1-Zellen nachgewiesen wurde (George, Folkard et al. 1988).

3.2. In-vivo Expansion von BCL1-Lymphomzellen

Da sich BCL1-Lymphomzellen in Zellkultur nur schlecht kultivieren lassen, führten wir vor dem Tumorchallenge eine in-vivo Kultivierung von BCL1-Lymphomzellen durch. Dazu wurden BALB/c Mäusen 1×10^6 BCL1-Lymphomzellen i.p. injiziert und die Tiere nach 40 Tagen euthanasiert. Aus der entnommenen Milz war eine Präparation von etwa 1×10^8 Lymphomzellen möglich. Zur Qualitätskontrolle nach in vivo Kultivierung und vor dem Einsatz der BCL1-Zellen zum Tumorchallenge wurden durchflußzytometrische Analysen der BCL1-Zellen und Zell-ELISAs durchgeführt. Außerdem wurden Unterschiede bezüglich der Oberflächenmarker-expression

auch bei eingefrorenen BCL1-Zellen im Gegensatz zu frischen BCL1-Milzzellen untersucht, da aufgetaute BCL1-Zellen in nachfolgenden Zell-ELISA-Verfahren zur Anwendung kamen.

3.2.1. Durchflusszytometrische Untersuchungen von in-vivo expandierten BCL1-Zellen

Zur Detektion von Oberflächenmarkern auf BCL1-Lymphomzellen wurden durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt. Wir konnten nachweisen, dass trotz Einfrier- und Auftauvorgängen die Oberflächenmarker auf den BCL1-Lymphomzellen erhalten bleiben und der Einsatz aufgetauter Zellen zumindest für Zell-ELISA-Untersuchungen möglich ist. Bei den untersuchten BCL1-Zellen (10^7 Zellen/ml) fand sich eine gute Expression von CD19, CD45 und der Lambda-Leichtketten bei fehlender Expression von CD3, CD4, CD8 und Kappa-Leichtketten. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass durch Einfrierprozesse das Expressionsmuster und die Morphologie der Tumorzellen (Expressionsdichte bestimmter Antigen- und Streueigenschaften aufgrund Zellgröße und Granulation) verändert werden und die Vitalität und damit die Aggressivität der Tumorzellen negativ beeinflussen. Eingefrorene Zellen können deshalb nicht für einen Tumorchallenge verwendet werden.

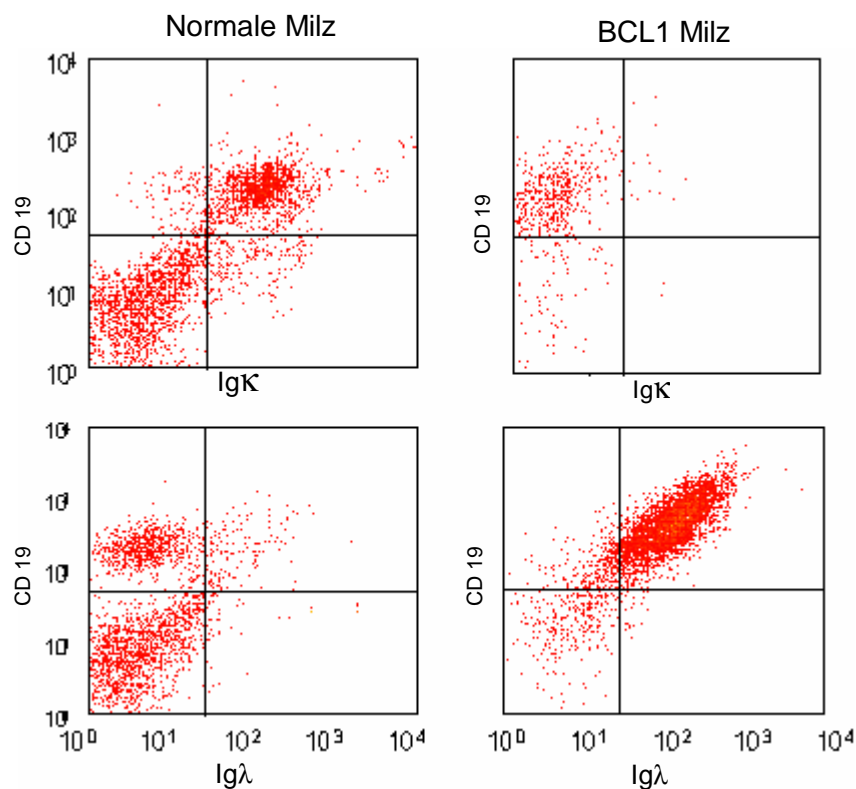


Abb. 8 Nachweis einer Lambda- Leichtkettenrestriktion bei BCL1-Zellen

Als Hinweise für die klonale Expansion der Lymphomzellen findet sich entweder eine Kappa- oder eine Lambda-Leichtkettenrestriktion. Im Gegensatz zu normalen Milzzellen, bei denen keine Leichtkettenrestriktion beobachtet werden konnte, lassen sich bei BCL1-Milzzellen nahezu ausschließlich Lambda-Leichtkettenstrukturen finden. Die Facs-Analysen wurden nach Färbung der Zellen mit kappa-FITC, lambda-FITC und CD19 PE durchgeführt.

3.2.2. Untersuchung der Immunglobulinsubklassen auf expandierten BCL1-Lymphomzellen

Zur weiteren Charakterisierung der expandierten BCL1-Lymphomzellen und insbesondere zur Untersuchung der Immunglobulinsubklassen auf den Lymphomzellen vor Verwendung der BCL1-Zellen in Zell-ELISAs wurden weitergehende Untersuchungen unternommen. Diese Untersuchungen waren nötig, da im Anschluss an die Immunisierung die Analyse der tumorspezifischen, anti-idiotypischen Immunantwort mittels ELISA geplant war. Die ELISAs sollten entweder klassisch unter Beschichtung mit aufgereinigtem Idiotyp oder auch als Zell-ELISA unter Beschichtung mit BCL1-Lymphomzellen durchgeführt werden. Wie aus der folgenden Abbildung ersichtlich, konnte auf den BCL1-Zellen eine Expression von Oberflächen-IgM und der Leichtkette Lambda nachgewiesen werden, was den publizierten Daten entspricht (Krolick, Isakson et al. 1979; George, Folkard et al. 1988). Oberflächenimmunglobuline der Typen IgG, IgG1 und IgG2a oder die Leichtkette Kappa ließen sich nicht nachweisen. Diese ausreichende Expression des Idiotyps auf der Zelloberfläche auch bei eingefrorenen Zellen führte im Folgenden zu Etablierungsversuchen eines Zellelisaverfahrens zur Detektion von anti-BCL1 Antikörpern nach Phagenidiotypvaksinierung.

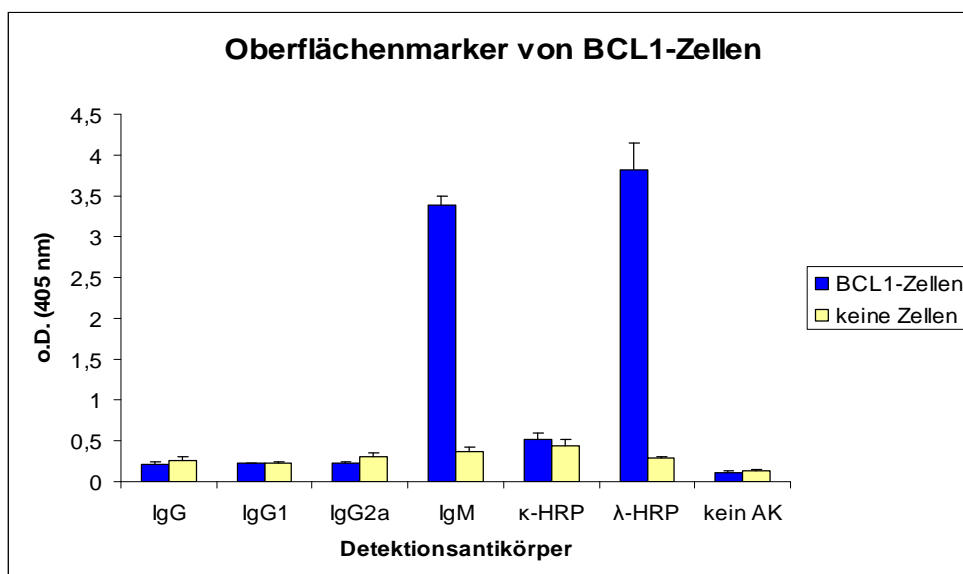


Abb. 9 Bestimmung der Immunglobulinsubklassen auf BCL1-Lymphomzellen

Bei BCL1-Zellen lässt sich der Idiotyp als Oberflächenimmunglobulin vom Typ IgM mit einer Lambda-Leichtkettenstruktur nachweisen. Es konnten keine Oberflächenmarker vom Typ IgG, IgG1 und IgG2a und keine Kappa-Leichtkettenstrukturen detektiert werden. Zur Analyse der BCL1-Zellen wurden 96-well Mikrotiterplatten mit BCL1-Zellen (3×10^5 Zellen/well) beschichtet. Als Detektionsantikörper wurden Goat-Anti-Mouse IgG-HRP, IgG1-HRP, IgG2a-HRP und Rat-Anti-Mouse IgM-HRP, -lambda-HRP, -kappa-HRP (Verdünnung 1/2000) verwendet.

3.3. Überleben nach Vakzinierung mit BCL1-Idiotypvakzinen

Insgesamt wurden jeweils 6 Mäuse pro Gruppe 4x mit 5×10^{11} Phagen ($50 \mu\text{g}$) s.c. wöchentlich geimpft und nach einem Intervall von einer weiteren Woche ein Tumorchallenge mit 10^5 frisch kultivierten (TC1) bzw. eingefrorenen BCL1-Tumorzellen (TC2) durchgeführt. In einem Arm wurde zusätzlich zu den Vakzinen GM-CSF in einer Dosis von $20 \mu\text{g}$ s.c. verabreicht. Als Kontrollen wurden PBS und Wildtyp-Phagen verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass durch BCL1-g8-Vakzinen die Überlebensdaten nach rechts verschoben sind, jedoch waren die Daten gegenüber der PBS-Kontrollgruppe nicht signifikant, weil es in der PBS-Gruppe nach dem Tumorchallenge einen Ausreißer mit einem Überleben von 65 Tagen gab. Gegenüber der Wildtyp-Phagen-Vakzinegruppe war dieser Unterschied jedoch signifikant. Eine Verbesserung der Ergebnisse ließ sich mit GM-CSF nicht erreichen (siehe Abb. 10). Ein weiteres Ergebnis der Tierversuche war, dass durch eingefrorene BCL1-Tumorzellen nicht bei allen Kontrollen eine letale Dosis erzielt wurde und die Überlebensdaten daher nicht erhoben werden konnten bzw. das Überleben deutlich besser war. Mit der neuen Phagenidiotypvakzinformulierung wurden bislang keine Experimente im protektiven Tumormodell durchgeführt.

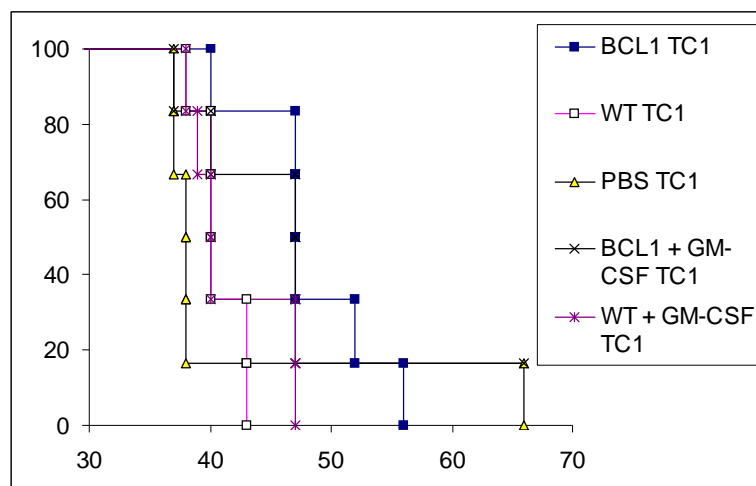


Abb. 10 Überleben nach Vakzinierung BCL1g8 Phagenvakzinierung mit und ohne GM-CSF, Darstellung als Kaplan Meyer-Kurve

Nach Vakzinierung mit BCL1-g8 Vakzinen zeigt sich im Vergleich zu der Wildtypkontrolle ein signifikant besseres Überleben nach dem Tumorchallenge, erkennbar an der Rechtsverschiebung der Kurve. Gegenüber der PBS-Gruppe war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant, da hier leider ein Ausreißer beobachtet werden konnte.

3.4. Aufreinigung von BCL1-IgM, BFF3-IgM und dem anti-BCL1 AK

Zur Charakterisierung der Phagen-spezifischen und anti-idiotypischen Immunantwort nach Phagenidiotypvakzinierung wurden verschiedene ELISAs etabliert. Für die Durchführung des Sandwich-ELISAs mussten jedoch zuvor der BCL1-IgM und die Isotyp-IgM-Kontrolle aufgereinigt werden. Für die Verwendung als Positivkontrolle musste außerdem der anti-BCL1 Antikörper

per aufgereinigt werden. Zu diesem Zweck wurden 3 Hybridomzelllinien (123F6, BFF3 und Mc10-6A5) gemäß den gültigen Bedingungen in DMEM kultiviert und die Überstände abgenommen.

123F6 bezeichnet eine Hybridomzelllinie, die durch Fusion von BCL1-Zellen mit Maus-Myelomzellen hergestellt wurde und zur Produktion von Maus BCL1-IgM befähigt ist.

Von der Zelllinie BFF3 wird ein unspezifisches monoklonales Maus Immunglobulin vom Typ IgM sezerniert, das in aufgereinigter Form als Kontroll-IgM in den ELISAs und als Mock-Kontrolle in der neuen Phagenvakzinformulierung verwendet wurde.

Der anti-BCL1 Antikörper der Hybridomzelllinie MC10-6A5 sollte in den ELISAs als Positivkontrolle dienen, da bei der Verwendung des puren Überstands im Zell-ELISA ein zu hoher Hintergrund gemessen wurde. Bei dem von MC10-6A5 sezernierten Immunglobulin handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper aus der Ratte vom Typ IgG2a, der gegen die BCL1-Idiotyp-Determinanten auf dem IgM Molekül gerichtet ist. Daneben existieren 6 weitere monoklonale Antikörper gegen den Idiotyp. Die Spezifität dieser Antikörper wurde neben der Fähigkeit, BCL1-IgM im Gegensatz zu einem Kontroll-IgM zu binden, bereits durch ELISA und mittels Immunofluoreszenzmuster von George et al gezeigt (George, McBride et al. 1991).

3.4.1. Aufreinigung von 123F6 und BFF3 mittels Protein A Sepharose

Zur Aufreinigung der von den Hybridomzelllinien 123F6 und BFF3 sezernierten Immunglobuline wurde Protein A Sepharose eingesetzt. 123F6 sezerniert den Idiotyp in den Überstand, der in aufgereinigter Form nachfolgend zur Beschichtung der ELISA-Platten verwendet wurde. Der von der Zelllinie BFF3 sezernierte Antikörper wurde in aufgereinigter Form als unspezifisches Kontroll-IgM genutzt.

Wir verwendeten zur Aufreinigung von BCL1-IgM und BFF3-IgM „HiTrap Protein A Fast Flow“ Säulen der Fa. Amersham. Trotz der Tatsache, dass es sich bei den von 123F6 und BFF3 sezernierten Immunglobulinen um monoklonale Maus Immunglobuline vom Typ IgM handelt, konnte mit Protein A eine ausreichende Aufreinigung mit einer Konzentration von 4mg/ml erzielt werden. Der Erfolg der Aufreinigung wurde in Sandwich-ELISAs und Gelelektrophoresen nachgewiesen.

3.4.2. Nachweis von anti-BCL1 Antikörpern im Überstand von MC106A5

Vor Beginn des Aufreinigungsverfahrens des anti-BCL1 Antikörpers aus der Ratte wurden alle eingefrorenen MC10-6A5 Überstände einzeln auf enthaltene anti-BCL1 Antikörper getestet. Nach Bestimmung der Gesamtproteinmenge im Überstand wurden zunächst Sandwich-ELISAs (Beschichtung mit Idiotyp (10µg/ml)) zur Antikörperdetektion durchgeführt. In allen Überständen ließen sich anti-BCL1 Antikörper in ausreichender Konzentration nachweisen. Anschließend wurden die Überstände mittels Gelelektrophorese auf Antikörper untersucht und mit Coomassie Blue gefärbt (s. Abb. 11). Dabei ließen sich sowohl Banden im Bereich von 25kDa und 50kDa nachweisen, die der leichten und schweren Kette des Antikörpers entsprechen. Des weiteren

lassen die Banden bei 75kDa und 150kDa den Rückschluss auf vorhandene Antikörper zu, da in diesen Größenbereichen der Zusammenschluss von einer leichten und schweren Kette (75 kD) bzw. die Gesamtantikörper (150 kD) zu finden sind. Im Anschluss an den Nachweis der anti-BCL1 Antikörper im Überstand wurden Pools hergestellt und Aufreinigungsversuche unternommen.

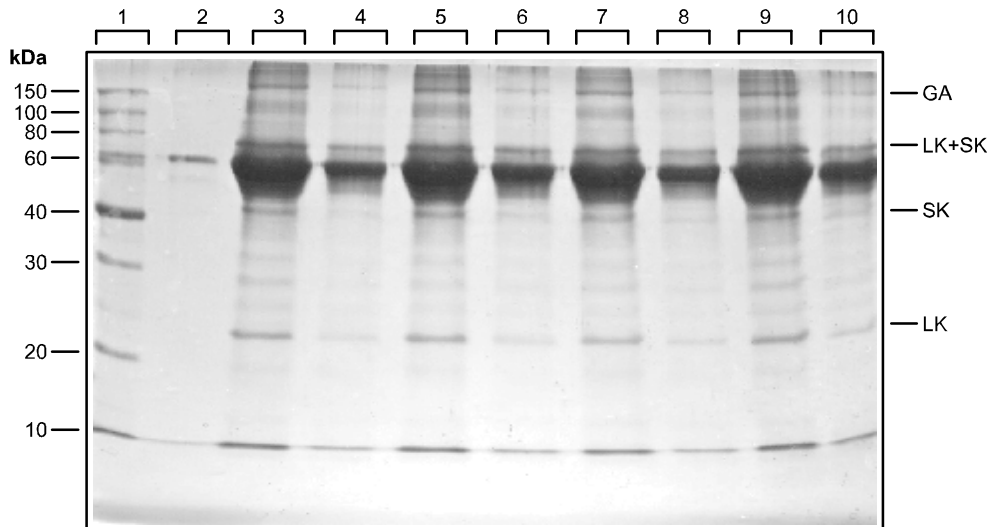


Abb. 11 SDS-Acrylamid-Gelelektrophorese zum Antikörpernachweis im MC10-6A5 Überstand

In einem 12% SDS-Polyacrylamidgel wurden je 3µl bzw. 1µl des puren Überstands in 1/5 Vol. Gel-Loading Puffer auf Antikörper analysiert (Spuren 3-10). Als Kontrollen wurden der Marker (Rotimark, 10-150) in Spur 1 und 500ng BSA in Spur 2 aufgetragen. Das Gel wurde anschließend mit Coomassie Blue gefärbt. Die bei 25kD und 50kD sichtbaren Banden entsprechen der leichten und schweren Kette des Antikörpers. Der Zusammenschluss einer leichten (LK) und schweren Kette (SK) bzw. der Gesamtantikörper (GA) ist durch die Banden bei 75kD und 150kD dargestellt. Die deutliche Bande bei 60kDa entspricht Albumin.

Spur 1: Marker
 Spur 2: 500ng BSA
 Spuren 3-10: jeweils 3µl bzw. 1µl purer Überstand

3.4.3. Gamma Bind Plus Sepharose zur Aufreinigung von Ratten anti-BCL1 IgG2a

Nach der erfolgreichen Idiotypaufreinigung wurden in analoger Weise Aufreinigungsversuche des monoklonalen Ratten anti-BCL1-IgG2a Antikörpers aus der Hybridomzelllinie MC10-6A5 mit Protein-A und Protein-G Säulen unternommen. Trotz diverser Versuche gestaltete sich die Aufreinigung schwierig. Letztlich ließ sich der Antikörper mit diesen Säulen nicht aufreinigen. Da Ratten-IgG2a AK nur eine geringe Affinität zu Protein A aufweisen, wurde zur Aufreinigung Gamma Bind Plus Sepharose verwendet, welches sich entsprechend den Herstellerangaben vor allem zum Aufreinigen monoklonaler Maus- und Ratten-Immunglobuline vom Typ IgG eignen soll. Jedoch ließ sich auch damit keine ausreichende Aufreinigung des Anti-BCL1-Antikörpers aus MC10-6A5 erzielen, wie nachfolgende Abbildungen verdeutlichen. Während im pur aufgetragenen Überstand und im Flow-through anti-BCL1 Antikörper detektiert werden konnten, ließen sich im Eluat aufgrund der ungenügenden Bindung an die Säule erneut keine anti-BCL1 Antikörper nachweisen. In der SDS-Gelelektrophorese konnten sowohl im aufgetragenen Überstand, als auch im Flow-through Antikörperbanden bei 150kDa, 75kDa und 25kDa nachgewie-

sen werden, aber nicht im Eluat. Die Banden bei 50kDa scheinen durch BSA überlagert. Auf die Verwendung von anti-BCL1 als zusätzliche Positivkontrolle musste deshalb verzichtet werden.

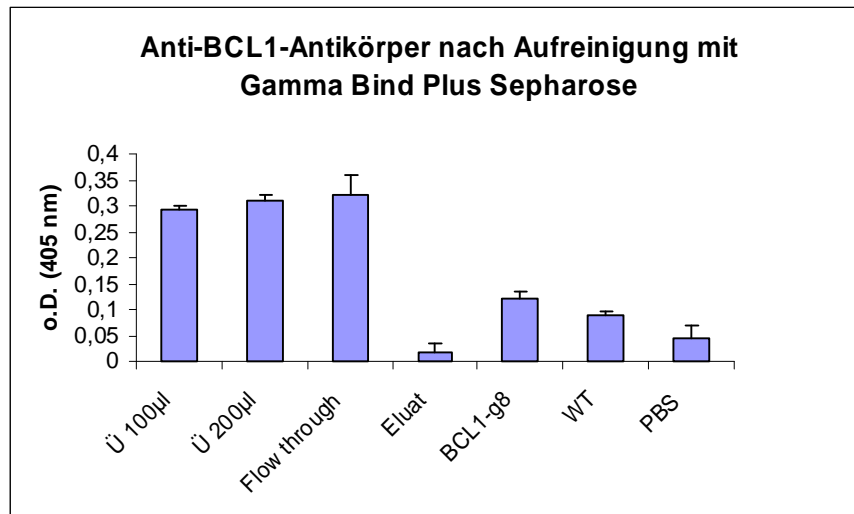


Abb. 12 Anti-BCL1-Antikörpernachweis nach Aufreinigung mit Gamma Bind Plus Sepharose mittels Elisa

Im Gegensatz zum Zellüberstand (Ü) und Flow-through ließen sich im Eluat aufgrund ungenügender Bindung an Gamma Bind Plus Sepharose keine messbaren Antikörperkonzentrationen feststellen. Zur Analyse der Aufreinigung wurden der pure MC10-6A5 Überstand (Ü 100µl und 200µl), Flow-through und Eluat (je 100µl) als Triplikate auf die mit BCL1 (10µg/ml) gecoatete Platte aufgetragen und mit dem Detektionsantikörper Goat-Anti-Mouse IgG-HRP (Verdünnung 1/1000) entwickelt. Als Kontrollen wurden gepoolte Seren von Mäusen nach Immunisierung mit BCL1-g8, Fd-Phagen und PBS verwendet.

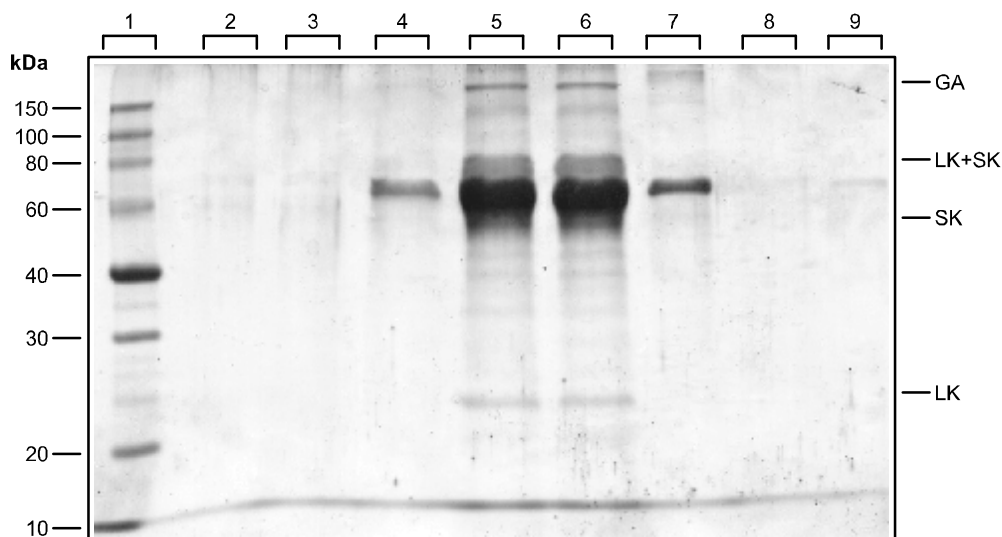


Abb. 13 Gelelektrophorese zum Antikörpernachweis nach Aufreinigung mit Gamma Bind Plus Sepharose

Nach Aufreinigungsversuch mittels Gamma Bind Plus Sepharose konnte nach Elution der aufgereinigte Antikörper nicht in ausreichender Konzentration nachgewiesen werden. Zur Analyse wurden reiner Überstand, Flow-through, Wash und 2 Eluate in 1/5 Vol. Gel-Loading Puffer auf ein 12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Im puren Überstand (6) und Flow-through (5) liessen sich Antikörperbanden bei 150kDa, 75kDa und 25kDa nachweisen. Als Kontrollen dienten der Marker (Rotimark, 10-150) (Spur 1) und BSA (50ng, 100ng, 500ng) (Spuren 7-9). Anschließend wurden Coomassie und Silberfärbungen durchgeführt, wobei auch bei der sensitiveren Silberfärbung keine Antikörper im Eluat sichtbar waren. **Spur1:** Marker, **Spuren2,3:** Eluat, **Spur4:** Wash, **Spur5:** Flow-through, **Spur6:** Überstand-pur, **Spur 7,8,9:** BSA 500, 100, 50.

3.5. Analyse der Phagen-spezifischen humoralen Immunantwort nach Phagenidiotypvakzinierung

Eine wesentliche Aufgabe der Doktorarbeit war die Charakterisierung der durch Phagenidiotypvakzinen induzierten humoralen Immunantwort. Es sollte geklärt werden, inwieweit Immunisierungen mit Phagenidiotypvakzinen zur Bildung von gegen Phagen bzw. gegen den Idiotyp gerichteten Antikörpern führten. Zunächst wurde untersucht, ob durch die Vakzinierung eine humorale anti-Phagen Immunantwort induziert werden konnte und ob überhaupt eine humorale Immunreaktion durch die Vakzinierung induziert wird. Insgesamt wurden dazu 3 Versuchsreihen mit insgesamt 150 Mäusen (je 6 Mäuse pro Gruppe) durchgeführt, die in Einzelmaustestungen untersucht wurden. Im ersten Teil der Arbeit wurden Dosisesskalationsstudien durchgeführt, um die optimale Phagenvakzindosis für die Immunisierung zu bestimmen. In den darauffolgenden Studien wurde die Wirkung von zusätzlich verabreichtem GM-CSF evaluiert. Es sollte außerdem geklärt werden, ob die getestete neue Phagenvakzinformulierung zu einer vergleichbaren humoralen Immunantwort wie die rekombinante g8-Phagenvakzine oder die Standard Id-KLH Vakzine führt. Alle Vakzinierungen wurden ohne Verwendung von Freud'schem Adjuvans in wöchentlichem Abstand insgesamt 4mal mit Phagenidiotypvakzinen, den PBS-Kontrollen, der Standardvakzine BCL1-KLH und der Mock-IgM Phagenvakzine durchgeführt. Die Seren wurden durch Blutentnahmen 14 Tage, 28 Tage und 4 Monate nach der Immunisierung gewonnen und anschließend mittels Elisaverfahren auf Phagen-spezifische bzw. idiotypspezifische Antikörper untersucht (zum Vakzinierungsschema bzw. zur Gruppen-einteilung siehe auch Kapitel 2, Studiendesign, Versuchsgruppen).

3.5.1. Screening der Einzeleren auf Phagenantikörper

Vor Durchführung der ELISAs zur Bestimmung der anti-Phagen Serumantikörper wurden alle Seren der 150 Mäuse in Einzelerenscreenings untersucht, um das Ansprechen der Vakzine innerhalb der einzelnen Gruppen zu beurteilen und eventuelle Ausreißer zu erkennen. Hierzu wurden alle Einzelproben der 3 Versuchsreihen in Doppelmessungen auf anti-Phagen Antikörper untersucht. Erst nach dem erfolgreichen Screening der Einzeleren wurden die Seren pro Gruppe für weitere Analysen gepoolt. Für die Screeninguntersuchung wurden Seren vom Tag 28 nach Immunisierung verwendet. Bemerkenswert ist, dass in *allen* mit Phagenvakzinen immunisierten Mäusen ein Ansprechen auf die Vakzinierung mit Bildung von anti-Phagen Antikörpern beobachtet werden konnte. Es zeigten sich keine Non-Responder. Immunisierungen mit filamentösen Wildtyp-Phagen und rekombinanten BCL1-g8 Phagen induzierten eine stärkere Anti-Phagen Antikörperbildung als die neue Phagenvakzin-formulierung. Die Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen (PBS, BCL1-KLH) und den mit Phagen immunisierten Gruppen waren signifikant ($p < 0,05$). Trotz der Durchführung der Versuche im Tiermodell mit möglichen intraindividuellen Unterschieden war die Variabilität zwischen den Einzelmäusen innerhalb einer Gruppe minimal. Die Durchführbarkeit der Vakzinierung im Tiermodell, das regelmäßige Ansprechen der einzelnen Tiere auf die Immunisierung, sowie die geeignete Methodik des ELISAs zum Antikörpernachweis konnten in diesen ersten Screeninguntersuchungen gezeigt werden.

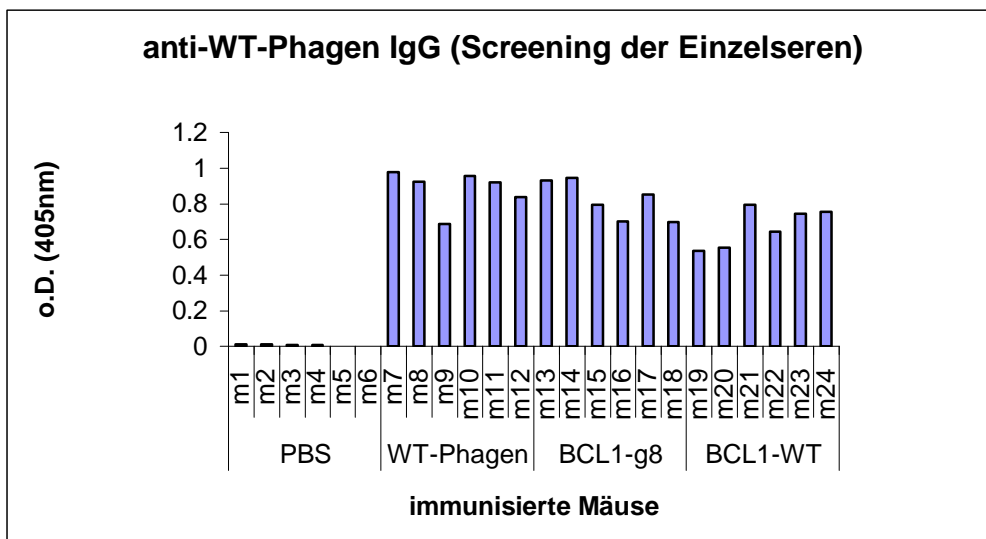


Abb. 14 Screening der Einzelseren auf anti-WT-Phagen-IgG mittels Elisa

Die Einzelserenanalyse verdeutlicht das regelmäßige Ansprechen auf die Vakzinierung ohne Gruppenausreißer. Nach Immunisierung mit WT-Phagen (m7-m12), rekombinanten BCL1-g8 Phagen (m13-m18) und gekoppelten BCL1-WT Phagen (m19-m24) (jeweils mit 5×10^{11} Phagen) lassen sich anti-WT-Phagen Antikörper nachweisen im Gegensatz zur Immunisierung mit PBS (m1-m6). Die Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe (PBS) und den mit Phagen immunisierten Gruppen waren signifikant ($p < 0,05$ für alle Gruppen). Dargestellt ist die Analyse der Einzelseren der 3. Versuchsreihe nach Blutabnahme am Tag 28 (Verdünnung 1/200). Die Seren wurden als Duplikate aufgetragen (keine Berechnung der Standardabweichung). Analog zu diesem Verfahren wurden alle Einzelseren der Studien 1-3 analysiert. Es konnte bei allen 150 untersuchten Mäusen ein erfolgreiches Ansprechen auf die Vakzine beobachtet werden.

3.5.2. Optimierung der Vakzindosis

Im Rahmen der Dosisescalationsuntersuchungen (1. Versuchsreihe) wurde die optimale Phagendosis bestimmt und geprüft, inwieweit sich die Phagen-spezifische Antikörperbildung durch Immunisierung mit unterschiedlichen Phagendosen steigern lässt. Hierzu wurden 4 Gruppen (à 6 Mäuse) in wöchentlichem Abstand 4-malig mit 10^{10} , 10^{11} und 5×10^{11} rekombinanten BCL1-g8 Phagen, sowie mit 5×10^{11} Wildtyp Fd-Phagen immunisiert. Die Vakzinierungen fanden ohne den üblichen Zusatz von Adjuvantien statt. Die gewonnenen Seren von Tag 0 vor stattgehabter Immunisierung und von Tag 28 nach Immunisierung wurden mittels ELISA auf anti-Phagen Antikörper vom Typ IgG untersucht. Wie aus der folgenden Abbildung ersichtlich, konnten 4 Wochen nach Immunisierung mit Phagenvakzinen in allen Gruppen Phagen-spezifische Antikörper (IgG) nachgewiesen werden. In allen Dosisstufen wurden somit Phagen-spezifische Antikörper induziert. Zwischen der humoralen Immunantwort von Tag 0 und Tag 28 bestanden bei allen Gruppen signifikante Unterschiede ($p < 0,05$). Außerdem wurde mit zunehmender Dosierung der rekombinanten Phagenvakzine eine Steigerung der Anti-Phagen Immunantwort beobachtet. Während zwischen Dosierungen von 10^{10} und 10^{11} BCL1-g8 Phagen keine signifikante Zunahme der Antikörperbildung festgestellt wurde, führten Vakzinierungen mit 5×10^{11} BCL1-g8 Phagen bzw. Fd-Phagen zu einer signifikant gesteigerten Immunantwort. Dies führte zur Festlegung der Dosis von 5×10^{11} Phagen als ideale Vakzindosis im Mausmodell. Daher wurde in

den darauffolgenden Versuchsreihen Immunisierungen mit einer Phagendosis von 5×10^{11} Phagen durchgeführt. Zwischen Vakzinierungen mit 5×10^{11} BCL1-g8 Phagen und 5×10^{11} Fd-Phagen konnten hinsichtlich der anti-Phagen Antikörperantwort keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Hierbei muss aber beachtet werden, dass die Dosisescalationsstudie an 4 Gruppen mit einer Größe von jeweils 6 Mäusen durchgeführt wurde und dass sich möglicherweise bei Erhöhung der Versuchstierzahl eine signifikante Steigerung der Phagen-spezifischen Immunantwort auch bei geringeren Phagendosen erzielen lässt.

Abb. 15A

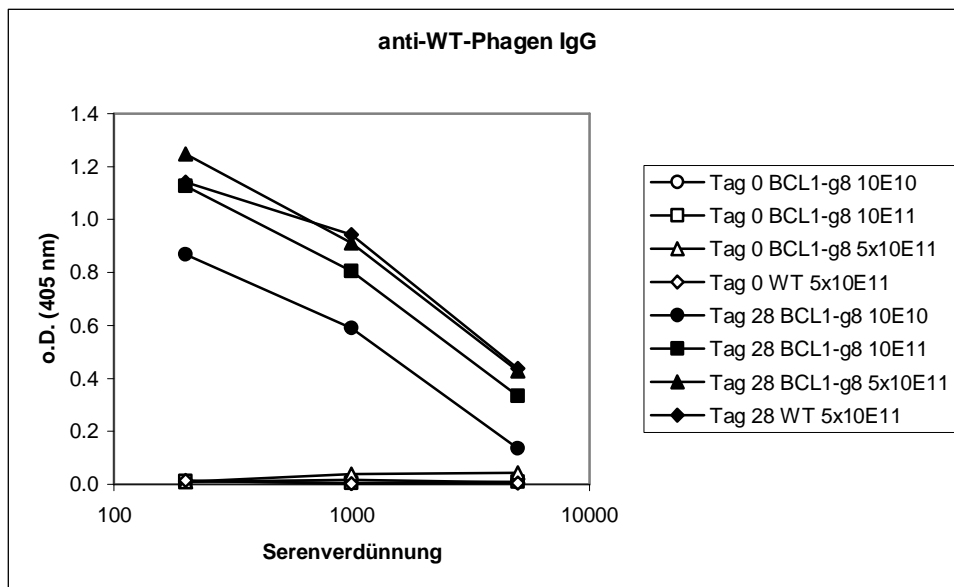


Abb. 15B

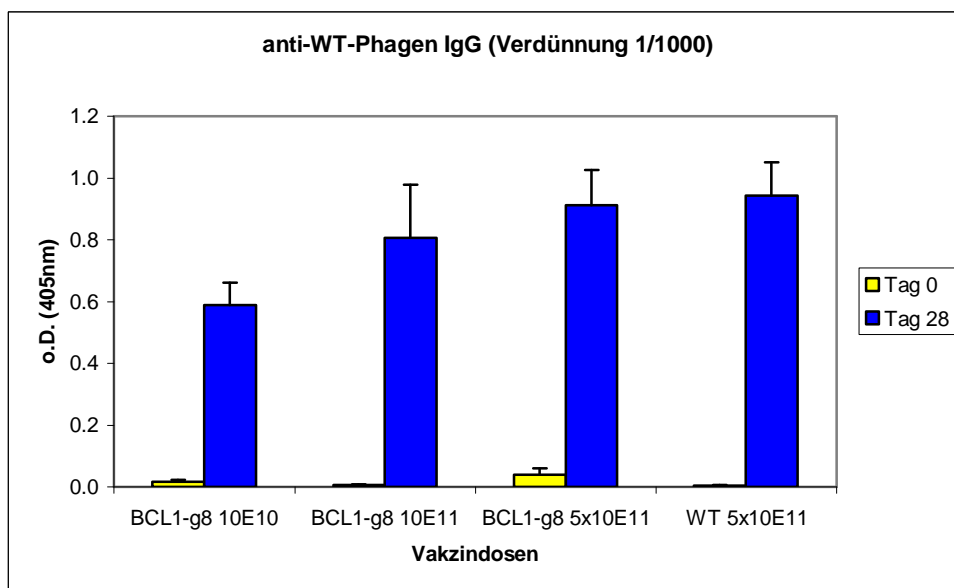


Abb. 15 Nachweis von anti-Fd-Phagen Antikörpern bei unterschiedlicher Vakzindosis

In der Dosisescalationsstudie wurde die Phagen-spezifische Antikörperantwort nach Immunisierung mit steigenden Phagendosen untersucht. Hierzu wurden 6 BALB/c Mäuse pro Gruppe in 3 Dosisstufen mit je 10^{10} , 10^{11} und 5×10^{11} BCL1-g8 Phagen bzw. 5×10^{11} Fd-Phagen 4-mal im Abstand von einer Woche im-

munisiert. Die Seren wurden am Tag 0 vor Vakzinierung und 28 Tage nach Vakzinierung gewonnen und mittels ELISA auf anti-Phagen Antikörper untersucht.

Die ELISA-Platten wurden dazu mit Fd-Phagen beschichtet und die Seren in unterschiedlichen Verdünnungen (1/200, 1/1000, 1/5000) aufgetragen. Als Detektionsantikörper wurde ein Goat-Anti-Mouse IgG-HRP verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass vor der Immunisierung (Tag 0) keine Phagen-spezifischen Antikörper nachweisbar sind. Durch die Immunisierung mit Phagenvakzinen wird jedoch dosisabhängig eine starke anti-Phagenantikörperbildung mit Zunahme der Antikörperkonzentration bei steigender Phagenvakzindosis induziert.

Die sinkende anti-Wildtypphagen Antikörperkonzentration bei zunehmender Serenverdünnung ist in Abbildung (A) dargestellt. Nach Immunisierungen mit 5×10^{11} Phagen ließen sich signifikant höhere Immunantworten feststellen als nach Vakzinierungen mit 10^{10} Phagen (B) (BCL1-g8 10^{10} vs. BCL1-g8 5×10^{11} : $p=0,028$; BCL1-g8 10^{10} vs. WT 5×10^{11} : $p=0,018$). Zwischen Immunisierungen mit Dosen von 10^{10} und 10^{11} Phagen, sowie zwischen 10^{11} und 5×10^{11} Phagen konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen führten zur Festlegung von 5×10^{11} Phagen als Vakzindosis. Alle weiteren Versuche wurden deshalb mit einer Dosis von 5×10^{11} Phagen durchgeführt. Die Analysen wurden als Einzelaustestungen durchgeführt und die Seren als Triplikate aufgetragen (Verdünnung 1/200, 1/1000, 1/5000 in A bzw. 1/1000 in B).

3.5.3. Charakterisierung der Phagenantikörper

Weitergehende Untersuchungen sollten zeigen, welche Subklassen von Anti-Phagen Antikörpern durch die Immunisierung mit Phagenvakzinen induziert werden und ob sich insbesondere auch Phagen-spezifische Immunglobuline der Subtypen IgG1, IgG2a und IgM nachweisen lassen, was für eine T-Zell-Abhängigkeit der Immunantwort sprechen könnte. Der sich darin offenbarende Isotyp- oder Klassenwechsel verleiht der humoralen Immunantwort vielfältige Funktionen und wird durch Cytokine gesteuert. Während IgM weniger als zehn Prozent der Immunglobuline im Plasma ausmacht und vorwiegend in den Frühstadien der Antikörperreaktion zu finden ist, stellt IgG den vorherrschenden Isotyp im Serum dar. Bei der Maus wird ein Isotypwechsel zu IgG1 vorwiegend durch IL-4 induziert, während der transformierende Wachstumsfaktor TGF- β einen Wechsel zu IgG2b und IgA hervorruft. Das von TH1-Zellen freigesetzte Interferon IFN- γ führt bevorzugt zum Wechsel zu IgG2a und IgG3.

Abb. 16A

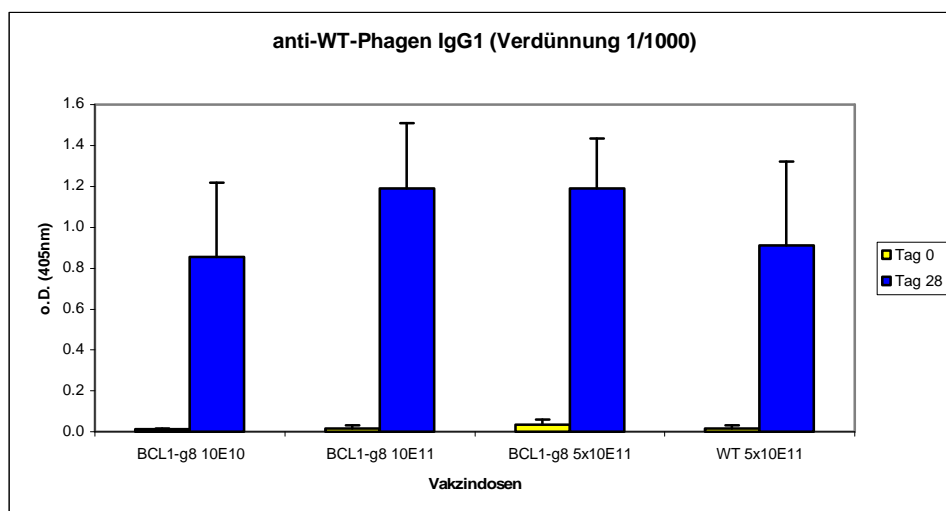


Abb. 16B

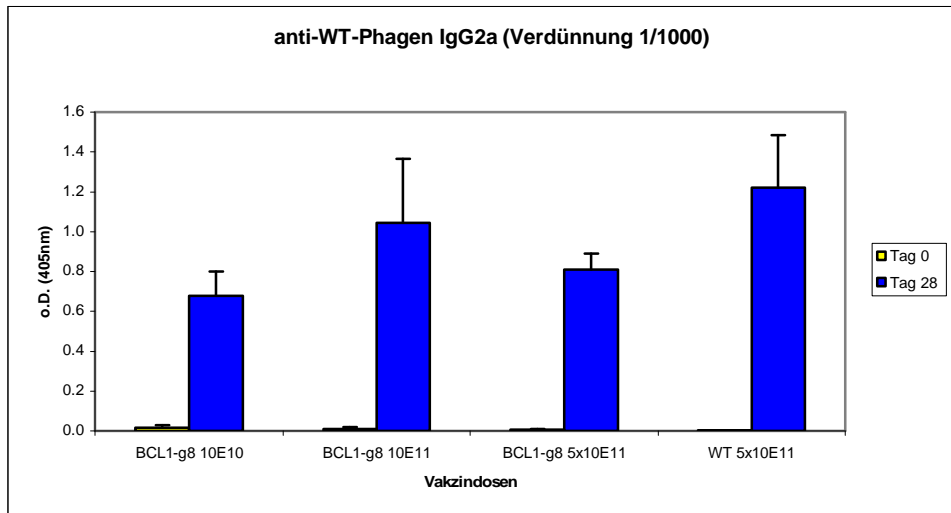


Abb. 16C

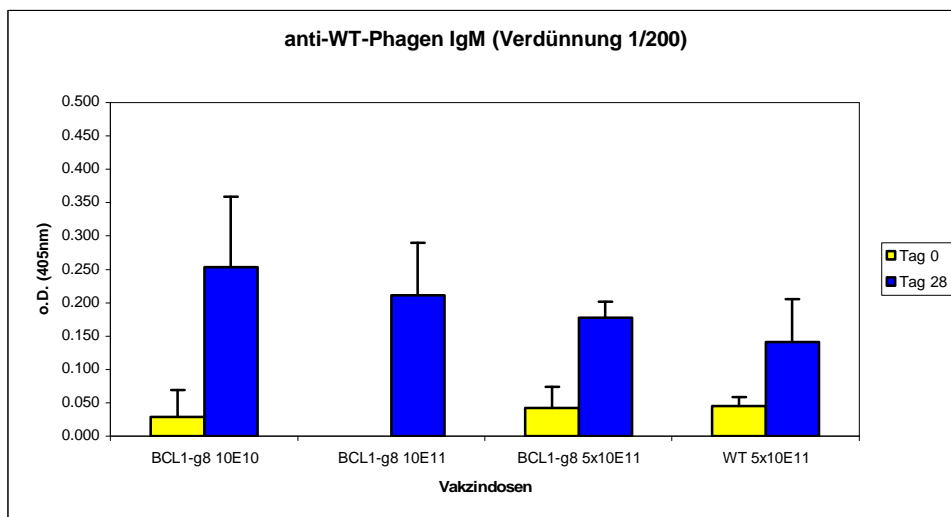


Abb. 16 Bestimmung von anti-Fd-Phagen Isotypen in Abhängigkeit von der Vakzindosis

Nach Immunisierung mit unterschiedlichen Phagendosen wurden Seren von Tag 0 und Tag 28 nach Vakzinierung mittels ELISA auf anti-Wildtypphagen Antikörper der Subtypen IgG1 (A), IgG2a (B) und IgM (C) untersucht (zum Elisaverfahren siehe auch Kapitel 2). Dazu wurden Vakzinierungen mit 10^{10} , 10^{11} und 5×10^{11} BCL1-g8 und 5×10^{11} Fd-Phagen und Blutabnahmen zu den Zeitpunkten Tag 0 und Tag 28 durchgeführt. 4 Wochen nach Immunisierung lässt sich eine Phagen-spezifische Immunantwort mit Überwiegen von IgG1 und IgG2a und geringem IgM-Anteil in allen immunisierten Gruppen nachweisen. Signifikante Unterschiede bestehen zwischen Seren von Tag 0 und Tag 28 ($p < 0,05$ für alle Gruppen). In der Isotypenanalyse konnte keine kontinuierliche Steigerung der Antikörperproduktion bei zunehmender Vakzindosis festgestellt werden. Bei der Untersuchung der Phagen-spezifischen Immunantwort vom Subtyp IgG1 wurde bei Vakzinierungsdosen von 10^{11} und 5×10^{11} Phagen ein Plateau erreicht, Untersuchungen der Subtypen IgG2a und IgM ergaben schwankende bzw. sinkende Antikörpertiter bei zunehmender Phagenvakzinierungsdosis. Die Seren der Einzelmäuse wurden als Triplikate getestet in einer Verdünnung von 1/1000 (IgG1, IgG2a) und 1/200 (IgM).

Die Untersuchung auf anti-Fd-Phagen Subtypen IgG1, IgG2a und IgM wurde analog der Bestimmung von anti-Fd-Phagen IgG jedoch mit anderen Detektionsantikörpern durchgeführt. Wie in der Abb.16 erkennbar, ließen sich nach Immunisierung mit rekombinanten BCL1-g8 Phagen und Fd-Phagen Phagen-spezifische Antikörper aller untersuchten Isotypen nachweisen. Ein kontinuierlicher Anstieg der anti-Phagen Antikörperantwort mit zunehmender Phagendosis - wie

bei der IgG-Antwort beobachtet -, wurde bei der Isotypenanalyse jedoch nicht festgestellt. Mit steigender Phagendosis konnte ein Plateau (IgG1) und sogar eine Abnahme der Antikörperkonzentration (IgG2a, IgM) beobachtet werden. Während bei einer Serenanalyse 4 Wochen nach Immunisierung ein Überwiegen von IgG1 und IgG2a bei einer Serumverdünnung von 1/1000 auftrat, konnte IgM selbst bei einer Verdünnung von 1/200 nur gering nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, da IgM als typisches Immunglobulin in der frühen Phase der Immunantwort auftritt. In dieser ersten Dosisescalationsstudie wurden allerdings Seren von Tag 28 nach Immunisierung analysiert.

3.5.4. Auswirkungen von GM-CSF auf die Phagen-spezifische Antikörperantwort

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Phagenvakzinen eine gute humorale Immunantwort induzieren, wurde in der nachfolgenden Studie untersucht, ob sich die Antikörperproduktion durch zusätzliche Gabe des Zytokins GM-CSF noch verbessern lässt. Hierzu fanden vier Immunisierungen in wöchentlichem Abstand mit rekombinanten BCL1-g8 Phagen und Wildtyp Fd-Phagen in einer Dosis von je 5×10^{11} Phagen statt. Mit jeder Vakzinierung erhielten die Mäuse zusätzlich $20 \mu\text{g}$ immunstimulatorisches GM-CSF subkutan. Die Negativkontrolle stellen die mit PBS immunisierten Mäuse dar. Die Ergebnisse zeigen, dass unter Zusatz von GM-CSF wiederum eine Phagen-spezifische Immunantwort vom Typ IgG nachgewiesen werden kann. Bei einem Serenvergleich in der Verdünnung 1/1000 zeigte sich, dass die Antikörperantwort nach zusätzlicher Gabe von GM-CSF zwar leicht erhöht ist, dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (siehe Abb. 17). Im Gegensatz zu einer alleinigen Immunisierung mit BCL1-g8 Phagen bzw. Fd-Phagen lässt sich also durch zusätzlich verabreichtes GM-CSF keine wesentliche Verbesserung der humoralen Immunantwort erzielen, jedoch ist denkbar, dass mit einer größeren Fallzahl dieser tendenzielle Unterschied statistisch signifikant sein könnte. Auch in den Überlebensstudien führte die zusätzliche Gabe vom GM-CSF zu keinem signifikanten Überlebensvorteil der immunisierten Mäuse.

Abb. 17A

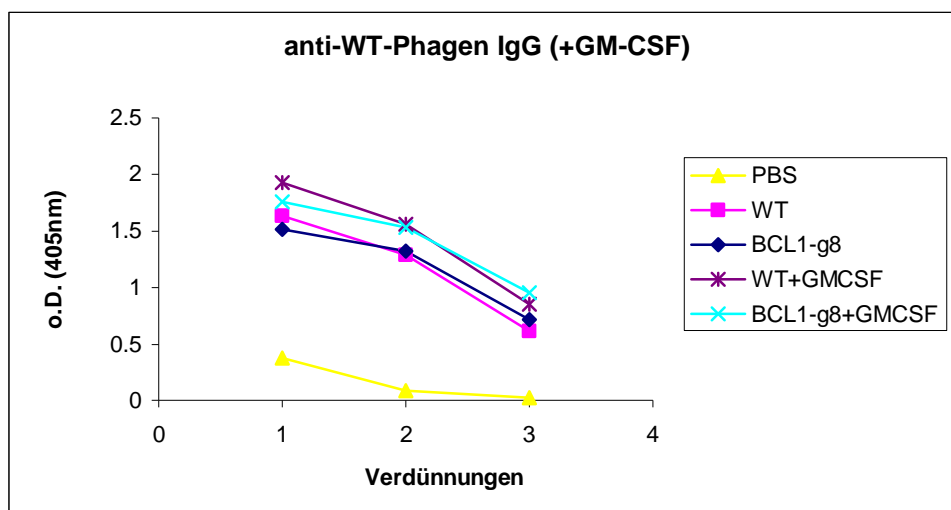


Abb. 17B

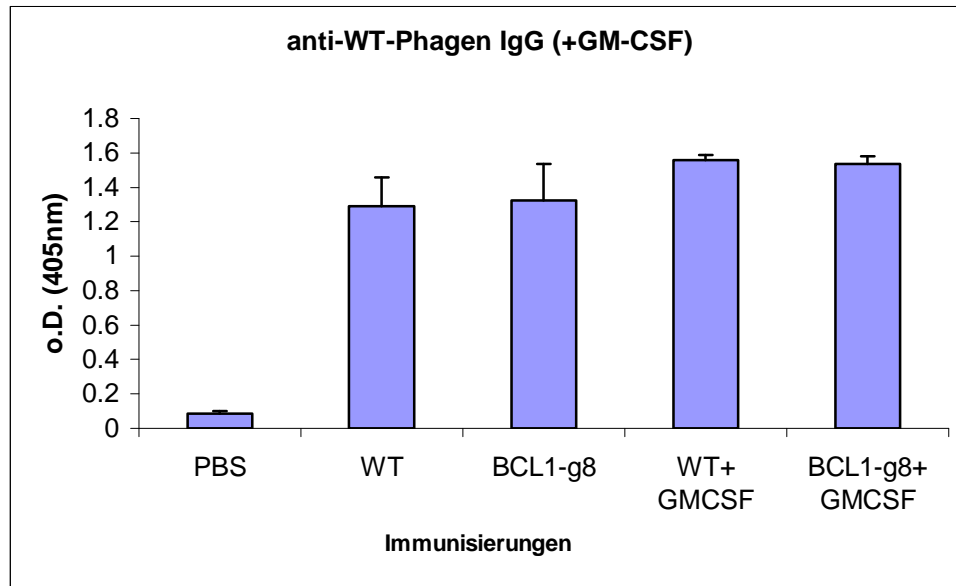


Abb. 17 Bestimmung von anti-Fd-Phagen IgG unter zusätzlicher Verabreichung von GM-CSF

In der 2. Versuchsreihe wurde die zusätzliche Gabe des Zytokins GM-CSF auf die humorale Immunantwort mit Bildung von Phagen-spezifischen Antikörpern untersucht. Hierzu wurden 5 Gruppen bestehend aus 6 Mäusen 4-malig in wöchentlichem Abstand mit PBS, Fd-Phagen und BCL1-g8 Phagen (Phagendosis von 5×10^{11} Phagen) immunisiert. Mit jeder Vakzinierung erhielten die Mäuse zusätzlich $20 \mu\text{g}$ immunstimulatorisches GM-CSF subkutan. Die Seren wurden durch Blutabnahmen 28 Tage nach Immunisierung gewonnen und mittels ELISA auf anti-Fd-Phagen vom Typ IgG getestet. Hierzu wurden die Platten mit Fd-Phagen beschichtet (5×10^{10} pfu/ml), die Seren in unterschiedlichen Verdünnungen aufgetragen und der Detektionsantikörper Goat-Anti-Mouse IgG-HRP zugegeben. Dargestellt sind die Serenverdünnungsreihen (1/200, 1/1000, 1/5000) (A) und die Serenverdünnung 1/1000 (B). Vier Wochen nach Vakzinierung konnte in allen immunisierten Gruppen im Gegensatz zur Kontrollgruppe (PBS) eine signifikante Immunantwort gegen Phagen festgestellt werden ($p < 0,05$ für alle Gruppen). Zusätzlich verabreichtes GM-CSF führte zu einer Steigerung der humoralen Immunantwort, der Unterschied zu Immunisierungen mit BCL1-g8 und Fd-Phagen allein war jedoch nicht statistisch signifikant. Getestet wurden gepoolte Seren der 2. Studie in Triplikaten.

Um zu untersuchen, ob durch Zusatz von GM-CSF auch qualitative Veränderungen der Immunantwort induziert werden, wurden auch die Antikörper-Subgruppen erneut bestimmt. Dabei zeigte sich, wie in Abb.18 erkennbar, dass nach zusätzlicher GM-CSF Gabe tendenziell höhere Antikörpertiter sowohl von IgG, als auch der Subtypen IgG1 und IgG2a nachweisbar sind. Vier Wochen nach Vakzinierung mit rekombinanten BCL1-g8 Vakzinen bzw. Fd-Phagen (je mit 5×10^{11} Phagen) ließen sich auch die Subtypen IgG1 und IgG2a nachweisen, wobei Mäuse, denen zusätzlich GM-CSF verabreicht wurde, eine geringgradig erhöhte Antikörperproduktion aufwiesen. Der Unterschied zu den anderen Gruppen war allerdings erneut nicht statistisch signifikant. Immunstimulatorisches GM-CSF in Kombination mit Phagenvakzinen führt somit allenfalls zu einer geringfügig gesteigerten humoralen Immunantwort. Phagen als Vektoren der Vakzinen scheinen gleichsam als eigenes intrinsisches Adjuvans zu fungieren und von immunstimulatorischen Adjuvantien unabhängig zu sein. Durch zusätzliche GM-CSF Gabe wurde die humorale Immunantwort weder im positiven, noch im negativen Sinne eindeutig beeinflusst.

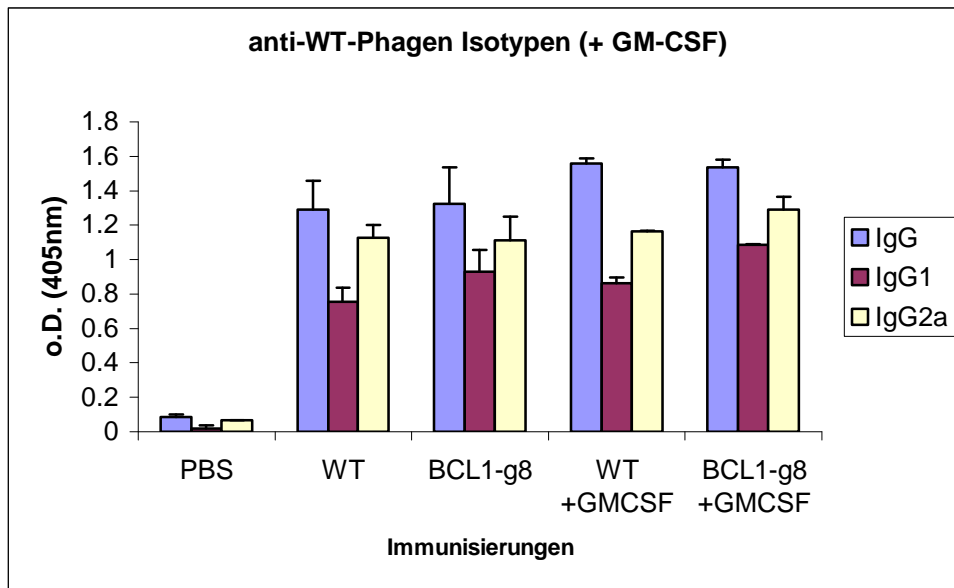


Abb. 18 Bestimmung von anti-Fd-Phagen Subtypen unter zusätzlicher Verabreichung von GM-CSF

Zur Untersuchung von qualitativen Unterschieden der Immunantwort nach zusätzlicher Gabe von GM-CSF wurde analog zur Serenanalyse auf anti-Fd-Phagen vom Typ IgG, eine Subtypenanalyse auf IgG1 und IgG2a durchgeführt. Hierzu wurden je 6 Mäuse pro Gruppe 4-malig in wöchentlichem Abstand mit PBS, Fd-Phagen und BCL1-g8 Phagen vakzinieren. Mit jeder Vakzinierung erhielten die Mäuse zusätzlich 20 µg immunstimulatorisches GM-CSF subkutan. Vier Wochen nach erfolgter Immunisierung wurden die Seren gewonnen und mittels ELISA (Beschichtung mit Fd-Phagen) auf anti-Phagen IgG1 und IgG2a untersucht. Als Detektionsantikörper kamen Goat-Anti-Mouse IgG1-HRP und IgG2a-HRP zur Verwendung. In allen mit Phagenvakzinen immunisierten Gruppen konnte im Gegensatz zur Kontrollgruppe (PBS) eine signifikante Immunantwort (IgG, IgG1, IgG2a) gegen Phagen festgestellt werden ($p < 0,05$ für alle Gruppen). Tendenziell ließen sich erhöhte Phagen-spezifische Antikörpertiter der Typen IgG, IgG1 und IgG2a nach zusätzlicher Gabe von GM-CSF nachweisen. Die Unterschiede zur Immunisierung ohne GM-CSF waren jedoch erneut nicht statistisch signifikant. Phagen als Vakzinvektoren scheinen von zusätzlichen Immunstimulantien unabhängig zu sein und fungieren selbst als ihr intrinsisches Adjuvans. Analysiert wurden gepoolte Seren der 2. Studie in Triplikaten unter Verwendung der Serenverdünnungen 1/200, 1/1000, 1/5000 (Darstellung der Verdünnung 1/1000).

3.5.5. Vergleich der Immunogenität unterschiedlicher Idiotypvakzinformulierungen

Nachdem in den ersten beiden Studien die optimale Vakzindosis von 5×10^{11} Phagen ermittelt worden war und festgestellt wurde, dass sich durch zusätzliche GM-CSF Gabe allenfalls eine geringfügige Steigerung der humoralen Immunantwort erzielen ließ, wurden im Rahmen der 3. Versuchsreihe unterschiedliche Phagenvakzinpräparationen miteinander und im Vergleich zum Goldstandard KLH verglichen. Dazu wurden zum einen rekombinante Phagenidiotypvakzinen untersucht, welche die Tumorantigene in Fusion mit dem g8-Phagenhüllproteinen als Phagenhybride exprimieren, zum anderen wurde eine neue Phagenidiotypvakzinformulierung (BCL1-WT) (vgl. auch Kap. 2.3.3) mit der als Goldstandard geltenden Id-KLH Vakzine verglichen. Da unkonjugierte Idiotypproteine aufgrund ihrer geringen Immunogenität keine signifikanten therapeutischen Effekte zeigen (George, Folkard et al. 1988), müssen sie an stark immunogene Trägersubstanzen wie *KLH* (Keyhole limpet hemocyanin) gebunden sein, um eine idiotypspezifische Immunreaktion auszulösen. Es war deshalb von großem Interesse, ob auch Phagenbasierte Idiotypvakzinen eine der Id-KLH Vakzine vergleichbare idiotypspezifische Immunant-

wort induzierten. Dazu wurden insgesamt 6 Gruppen (à 6 Mäuse) 4-malig in wöchentlichem Abstand vakziniert. Zur Immunisierung wurden Fd-Phagen, rekombinante BCL1-g8 Phagen, die neue Phagenvakzinformulierung (BCL1-WT) sowie Mock-Phagenvakzinen (BFF3-WT) mit einer Phagendosis von 5×10^{11} Phagen eingesetzt. Die Kontrollgruppen wurden mit PBS und der Standardvakzine BCL1-KLH (0,25 mg) immunisiert. Blutabnahmen zur Serengewinnung fanden am Tag 0 vor Vakzinierung, sowie 14 Tage, 28 Tage und 4 Monate nach Vakzinierung statt. Die Seren wurden anschließend in Elisaverfahren auf Phagen-spezifische bzw. idiotypspezifische Antikörper (siehe Kapitel 3.6) untersucht. Es zeigte sich, dass in allen Gruppen, denen Phagenvakzinen verabreicht wurden (WT, BCL1-g8, BCL1-WT, BFF3-WT), anti-Fd-Phagen Antikörper mit ansteigender Konzentration in den ersten 4 Wochen nachweisbar waren (siehe Abb. 19). Nach Vakzinierung mit PBS und BCL1-KLH und in den entnommenen Seren am Tag 0 vor Vakzinierung konnten keine Phagen-spezifischen Serumantikörper detektiert werden. Der Unterschied dieser Gruppen im Vergleich zu den mit Phagenvakzinen immunisierten Mäusen war signifikant ($p < 0,05$). Auch noch 4 Monate nach Vakzinierung konnten Phagen-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Auffallend war jedoch, dass sich nach Vakzinierung mit der neue Phagenidiotypvakzinformulierung insgesamt deutlich geringere Mengen an Anti-Phagenantikörpern nachweisen lassen. Besonders deutlich ist dieser Unterschied am Tag 14, dieser Unterschied ist jedoch am Tag 28 nicht mehr signifikant. Dies könnte beispielsweise durch Maskierung immunogener Phagenproteine durch den Idiotyp bei hoher Antigendichte in der neuen Phagenvakzinformulierung verursacht sein. Am wahrscheinlichsten spielen hier jedoch auch Dosiseffekte eine Rolle.

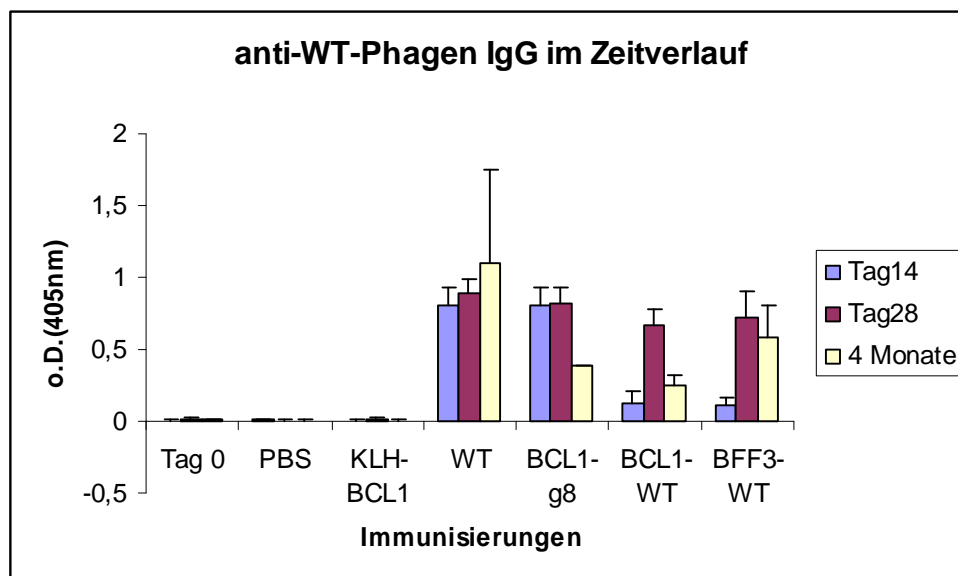


Abb. 19 Bestimmung von anti-Fd-Phagen IgG im Zeitverlauf nach Vakzinierung mit unterschiedlichen Phagenpräparationen

In dieser 3. Versuchsreihe wurde die Induktion Phagen-spezifischer Antikörper nach Immunisierung mit unterschiedlichen Phagenpräparationen im Vergleich mit der Standardvakzine Id-KLH untersucht. Dazu wurden je 6 Mäuse pro Gruppe 4-mal in wöchentlichem Abstand mit 0,25mg BCL1-KLH, Fd-Phagen, BCL1-g8, BCL1-WT und BFF3-WT und dem gleichen Volumen PBS immunisiert. Die Blutabnahmen wur-

den am Tag 0 vor Vakzinierung, sowie 14 Tage, 28 Tage und 4 Monate nach Immunisierung durchgeführt. Zur Analyse Phagen-spezifischer Antikörper wurde wie oben beschrieben vorgegangen.

Es zeigte sich, dass In den Kontrollgruppen (Serum von Tag 0, PBS, BCL1-KLH) keine anti-Fd-Phagen Serumantikörper nachgewiesen werden konnten. Vakzinierungen mit Fd-Phagen und BCL1-g8 Phagen induzierten eine stärkere Phagen-spezifische humorale Immunantwort als die neue Phagen-vakzinformulierung. Signifikante Unterschiede zwischen den Phagenpräparationen bestanden 14 Tage nach Vakzinierung (WT bzw. BCL1-g8 vs. BCL1-WT bzw. BFF3-WT: $p < 0,0001$), nicht jedoch zu späteren Zeitpunkten. Es lässt sich ein signifikanter Anstieg der Serumantikörper zwischen Tag 14 und Tag 28 nach Immunisierung mit der neuen Phagenvakzinformulierung beobachten (BCL1-WT Tag 14 vs. BCL1-WT Tag28: $p < 0,0001$). Auch noch 4 Monate nach Vakzinierung konnten anti-Fd-Phagen Antikörper nach Immunisierung mit Phagenvakzinen nachgewiesen werden. Die Serenanalysen von Tag 14 und Tag 28 wurden als Einzelmaustestung (6 Mäuse/Gruppe) in Duplikaten durchgeführt. Zur Serenanalyse nach 4 Monaten wurden je 2 Mäuse pro Gruppe in Duplikaten untersucht.

Nach Untersuchung auf anti-Phagen-IgG schloss sich auch in dieser Versuchsreihe die Iso-typenanalyse (IgG1, IgG2a, IgM) zu den Zeitpunkten 14 Tage und 4 Monate nach Immunisierung an. Erneut zeigte sich, dass sich nach Phagenvakzinierung anti-Fd-Phagen Antikörper der Subtypen IgG1 und IgG2a nachweisen lassen und dass die Phagenantikörper im Zeitverlauf ansteigen (siehe Abb. 20). Auch zeigte sich, dass mit der neuen Phagenidiotypvakzinformulierung 14 Tage nach Immunisierung eine geringere humorale Immunantwort gegen Phagen induziert wird als durch die rekombinanten g8-Phagenidiotypvakzinen. Im Zeitverlauf konnten aber 4 Monate nach Immunisierung nur geringfügige Unterschiede zwischen den rekombinanten g8-Phagenidiotypvakzinen und der neuen Phagenidiotypvakzinformulierung festgestellt werden. Während die Subtypen IgG1 und IgG2a dominierten und gleichermaßen nachweisbar waren, ließen sich IgM-Antikörper erwartungsgemäß nur früh im Verlauf der Immunantwort, nämlich 14 Tage nach Immunisierung, nachweisen und verschwanden später wieder.

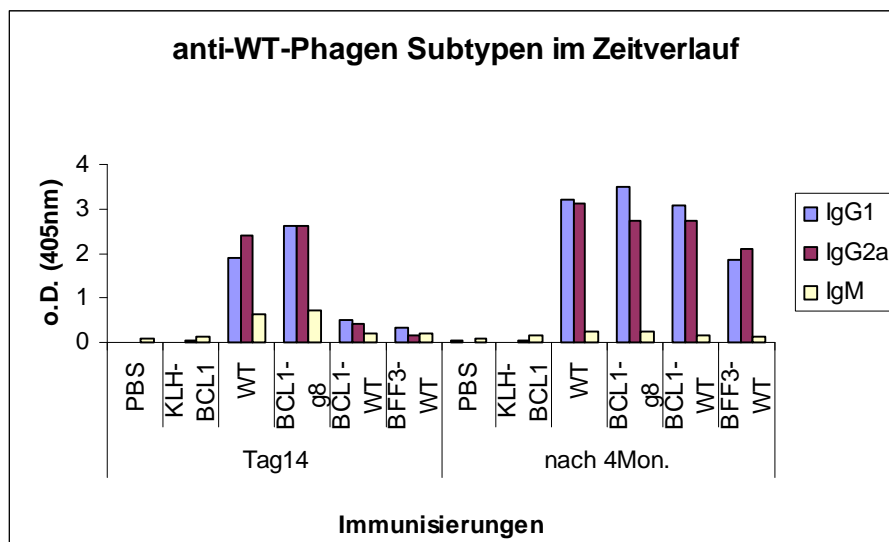


Abb. 20 Analyse von anti-Fd-Phagen Subtypen im Zeitverlauf nach Vakzinierung mit unterschiedlichen Phagenpräparationen

Neben dem Nachweis von anti-Phagen IgG nach Immunisierung mit unterschiedlichen Phagenvakzinen wurden die Seren der 3. Versuchsreihe auf Phagen-spezifische Antikörper der Subtypen IgG1, IgG2a und IgM untersucht. Die Analyse auf die Subklassen der Phagen-spezifischen Antikörper erfolgte mittels ELISA unter Verwendung der Detektionsantikörper Goat-Anti-Mouse IgG1-HRP, IgG2a-HRP und Rat-Anti-Mouse IgM-HRP.

In allen mit Phagenvakzinen immunisierten Gruppen ließen sich anti-Fd-Phagen Antikörper nachweisen. Insgesamt war die Anti-Phagen Immunantwort durch die neue Phagenidiotypvakzinformulierung geringer als bei den rekombinanten Phagenidiotypvakzinen. IgM-Antikörper wurden nur früh im Verlauf der Immunantwort, nämlich 14 Tage nach Immunisierung mit Fd-Phagen und BCL1-g8 Phagen detektiert.

3.6. Analyse der anti-Idiotypischen Immunantwort nach Phagenidiotypvakzinierung

Neben dem Nachweis einer Phagen-spezifischen Immunantwort nach Phagenvakzinierung wurde untersucht, ob durch Phagenidiotypvakzinen eine spezifische, gegen den Idiotyp gerichtete humorale Immunantwort induziert werden kann. Des Weiteren stellte sich die Frage, ob durch Immunisierung mit Phagen-basierten Idiotypvakzinen eine protektive Immunantwort mit Bildung von spezifischen, gegen BCL1 gerichteten Antikörpern, induziert wird. Hierzu wurden Vakzinierungen mit unterschiedlichen Phagenpräparationen, aufbauend auf ersten Ergebnissen der Pilotstudie, im murinen BCL1-Lymphommodell durchgeführt. In diesen ersten Studien konnte gezeigt werden, dass Immunisierungen mit rekombinanten BCL1-g8 Phagenvakzinen eine signifikante Überlebensverlängerung induzieren. Außerdem ließ sich in 20-30% der Fälle eine komplette Tumorprotektion beobachten. In weiterführenden Versuchen wurde nun geprüft, ob sich diese Ergebnisse reproduzieren lassen und ob ggf. durch die neue Phagenvakzinformulierung (zur Herstellung vgl. Kap. 2.3.3) aufgrund der höheren Idiotypexpression bessere Ergebnisse erzielt werden können. Zu diesem Zweck wurden rekombinante BCL1-g8 Phagenvakzinen im Vergleich zur neuen Phagenvakzinformulierung (jeweils mit 5×10^{11} Phagen) und der Standardvakzine Id-KLH (0,25mg) untersucht. Zum Nachweis der Spezifität der Vakzinierung wurden BFF3-WT Phagenvakzinen verwendet, die sich in dem Idiotyp von den BCL1-Vakzinen unterschieden. Zur Untersuchung der spezifischen anti-idiotypischen Immunantwort wurden Blutproben am Tag 0, Tag 14, Tag 28 und 4 Monate nach Vakzinierung gewonnen und auf anti-BCL1 Antikörper untersucht. Hierzu fanden zunächst Vorversuche zur Etablierung eines geeigneten Elisaverfahrens statt. Da zu Beginn der Versuchsreihen der Idiotyp nicht in gereinigter Form vorlag und somit kein klassisches Elisaverfahren analog der Bestimmung von Phagen-spezifischen Antikörpern möglich war, mussten alternative Methoden in Erwägung gezogen werden. Daher wurde zunächst Zell-ELISAs zur Bestimmung von anti-BCL1 Serumantikörpern gewählt. Die Aufreinigung des von der Hybridomzelllinie 123F6 produzierten Idiotyps ermöglichte im weiteren Versuchsablauf jedoch die Etablierung eines Sandwichelisasverfahrens. Außerdem wurde aufgereinigtes BFF3 als Kontroll-IgM für die ELISAs eingesetzt.

3.6.1. Entwicklung eines Zell-ELISAs zur Detektion von anti-BCL1 Serumantikörpern

Nachdem auf BCL1-Lymphomzellen durchflußzytometrisch die Expression der Oberflächenimmunglobuline vom IgM-Lambda Typ nachweisbar waren, wurden BCL1-Zellen in Zell-ELISAs zur Detektion von anti-BCL1 Serumantikörpern verwendet. Dazu wurden ELISA-Platten mit BCL1-Zellen gecoatet und die zu untersuchenden Seren auf anti-BCL1 Serumantikörper getestet. Die Etablierung dieses Verfahrens fand unter Verwendung unterschiedlicher Zellkon-

zentrationen (3×10^6 Zellen/well, 3×10^5 Zellen/well, 6×10^4 Zellen/well), Serenverdünnungen (1/30, 1/100, 1/500) und verschiedener Detektionsantikörper (Peroxidase-conjugated Affini pure F(ab)₂ Fragment Goat-Anti-Mouse IgG, Goat-Anti-Mouse IgG-HRP, -IgG1-HRP, IgG2a-HRP, Rat-Anti-Mouse IgM-HRP, -lambda-HRP, -kappa-HRP) statt. Dennoch erwies sich die Methode des Zell-ELISAs zum Nachweis von anti-BCL1 Serumantikörpern als nicht geeignet. Es ließen sich auch in den Negativkontrollen (Tag 0, kein aufgetragenes Serum, Immunisierung mit PBS) hohe Hintergründe erkennen und wir vermuten eine unspezifische Bindung des Detektionsantikörper z.B. über Fc-Rezeptoren der BCL1-Zellen, sowie die Bindungen unspezifischer Antikörper aus den Seren. Deshalb wurde versucht, das Verfahren durch Blockade der Fc-Rezeptoren auf den BCL1-Zellen mit Ziegenserum zu optimieren. Trotz Blockierungsversuch konnte jedoch die Bindung unspezifischer, im Serum enthaltener Antikörper an die BCL1-Lymphomzellen nicht unterbunden werden. Zur Bestimmung von anti-BCL1 Antikörpern konnte ein Zell-ELISA verfahren deshalb bei uns nicht etabliert werden. Wir mussten daher ein Standard-ELISA-Verfahren verwenden und dazu den BCL1-Idiotyp aus der 123F6 Hybridomzelllinie aufreinigen (s.o.).

3.6.2. Nachweis von anti-BCL1-spezifischen Antikörpern mittels ELISA

Zum Nachweis der idiotypspezifischen humoralen Immunantwort wurden Seren der 3. Versuchsreihe nach Immunisierung mit unterschiedlichen Phagenvakzinformulierungen im Vergleich zur Standardvakzine BCL1-KLH (0,25mg) auf anti-BCL1 Antikörper getestet. Hierzu wurden ein Sandwich-ELISA etabliert, bei der die Elisaplatten mit aufgereinigtem BCL1-Id (10 µg/ml) gecoatet wurde. Es wurden alle Seren aus der 3. Versuchsreihe inklusive der Kontrollen im BCL1-ELISA getestet. Zum Nachweis der Spezifität der idiotypspezifischen Immunantwort wurde BFF3-IgM als Mock-Kontrolle verwendet. Zu diesem Zweck wurden Immunisierungen mit BCL1-Phagenvakzinen und BFF3-Phagenvakzinen durchgeführt. Neben einem BCL1-ELISA wurde deshalb auch ein BFF3-ELISA, bei dem die Elisaplatten mit aufgereinigtem BFF3-IgM (10 µg/ml) gecoatet wurden, zur Kontrolle der Spezifität der Immunantwort verwendet.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die neue BCL1-Phagenidiotypvakzinformulierung und BFF3-Phagenvakzinen anti-BCL1 Antikörper vom Typ IgG induziert wurden, jedoch nicht durch Wildtyp Fd-Phagen, PBS oder BCL1-g8 Phagen (siehe Abb. 21). Dabei zeigte sich nach den Immunisierungen mit der neuen BCL1-Phagenidiotypvakzinformulierung und BFF3-Phagenvakzinen ein hoher und noch ansteigender idiotypspezifischer Antikörpertiter im Zeitverlauf. Auch 4 Monate nach Immunisierung mit gekoppelten Phagenvakzinen waren noch Antikörper gegen BCL1 nachweisbar. Die fehlende Induktion von BCL1-spezifischen Antikörpern nach Vakzinierung mit rekombinanten BCL1-g8-Phagenvakzinen ist nicht einleuchtend. Denkbar ist jedoch, dass dieses unerwartete Ergebnis durch eine fehlerhafte Produktion mit einer zu geringen Idiotyp-Expressionsdichte oder durch eine fehlerhafte Faltung des exprimierten Idiotypproteins verursacht wurde. Auffallend ist außerdem, dass durch BCL1-KLH Vakzinen eine deutlich geringere humorale idiotypspezifischen Immunantwort induziert wird als durch die neue Phagenvakzinformulierung. Nachdem jedoch sowohl die BCL1-WT, als auch die BFF3-WT Vakzine zur Induktion ei-

ner anti-BCL1 Antikörperantwort führte, stellt sich die Frage, ob es sich bei den gebildeten Antikörpern um tumorspezifische, gegen den Idiotyp gerichtete Immunglobuline handelt oder ob lediglich unspezifische, gegen IgM gerichtete Antikörper vorliegen. Um dies zu klären, wurden weitergehende Versuche mit Beschichtung durch aufgereinigtes BFF3 und Präabsorptions-ELISAs durchgeführt (siehe Kap. 3.6.3).

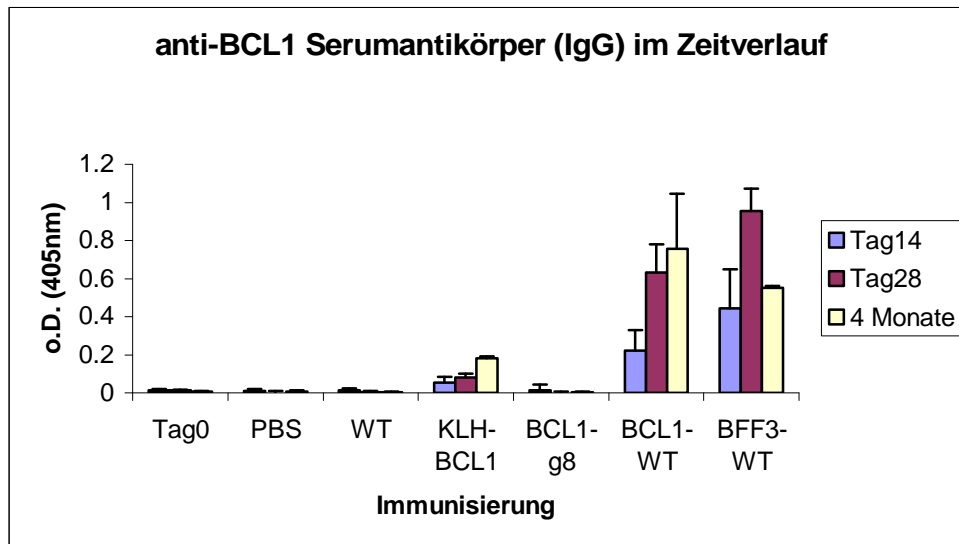


Abb. 21 ELISA zum Nachweis der idiotypspezifischen humoralen Immunantwort durch die neue Phagenidiotypvaksinformulierung (BCL1-WT) im Vergleich zu BCL1-g8 und BCL1-KLH

Seren der 3. Versuchsreihe wurden nach Immunisierung mit unterschiedlichen Phagenpräparationen auf anti-BCL1 Antikörper vom Typ IgG untersucht. Seren lagen vom Tag 0, Tag 14, Tag 28 und 4 Monate nach Immunisierung vor. Zur Analyse der Seren wurden Elisaplaten mit aufgereinigtem BCL1-IgM (10 µg/ml) beschichtet und Seren 1/200 verdünnt aufgetragen. Die Serenanalysen von Tag 14 und Tag 28 wurden als Einzelmaustestung in Duplikaten durchgeführt. Zur Serenanalyse nach 4 Monaten wurden je 2 Mäuse pro Gruppe untersucht und die Seren als Duplikate aufgetragen. Zur Detektion wurde ein Goat-Anti-Mouse IgG-HRP verwendet.

Es zeigt sich, dass durch die neuen Phagenvaksinformulierungen (BCL1-WT und BFF3-WT) eine signifikant bessere gegen BCL1-IgM gerichtete Antikörperantwort induziert wird als durch rekombinante g8-Phagenvakzinen (BCL1-g8) oder BCL1-KLH (BCL1-WT vs. BCL1-g8: $p=0,001$; BCL1-WT vs. BCL1-KLH: $p=0,0035$). Auch im Zeitverlauf kam es zu einer signifikanten Steigerung der humoralen Immunantwort zwischen Tag 14 und Tag 28 (BCL1-WT Tag14 vs. BCL1-WT Tag28: $p=0,0003$; BFF3-WT Tag14 vs. BFF3-WT Tag28: $p=0,0005$). Auffällig ist jedoch, dass auch nach Immunisierung mit BFF3-WT eine gegen BCL1 gerichtete Immunantwort induziert wird, was daran liegt, dass die ELISA-Platten mit dem kompletten IgM Molekül von BCL1 beschichtet wurden und offenbar auch eine anti-IgM gerichtete Immunantwort induziert wird.

Nachdem eine, durch die Phagenvakzinen induzierte, gegen BCL1 gerichtete Antikörperantwort vom Typ IgG nachgewiesen werden konnte, stellte sich auch hier die Frage nach den Subklassen und ob ein Class-Switch erfolgt ist. Es wurden deshalb die Subtypen IgG1 und IgG2a im Zeitverlauf analysiert. Dabei konnte nach Vakzinierung mit BCL1-WT, BFF3-WT und BCL1-KLH das Auftreten von anti-BCL1 IgG1 (Abb. 22A) und IgG2a (Abb. 22B) mit steigender Antikörperkonzentration im Zeitverlauf beobachtet werden. Während IgG1 bereits 14 Tage nach Immunisierung in ausreichender Menge nachgewiesen werden konnte, trat die vermehrte Antikörperbildung von IgG2a erst im weiteren Zeitverlauf auf. Außerdem zeigte sich, dass BCL1-KLH vorwiegend eine IgG1 Immunantwort induziert. Subtypen vom Typ IgG2a traten hingegen vorwiegend in Mäusen auf, denen die neue Phagenvaksinformulierung verabreicht wurde. Da dem

Isotyp IgG2a eine größere tumorprotektive Bedeutung zukommt als IgG (Kaminski, Kitamura et al. 1986), könnte das ein Hinweis auf die Wirksamkeit von Phagenvakzinen bei der Tumorstimmung sein.

Abb. 22A

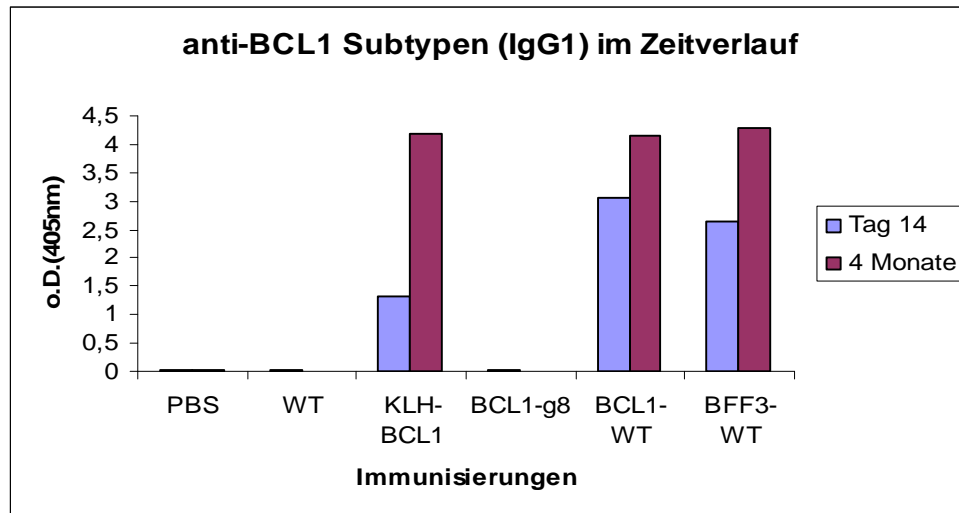


Abb. 22B

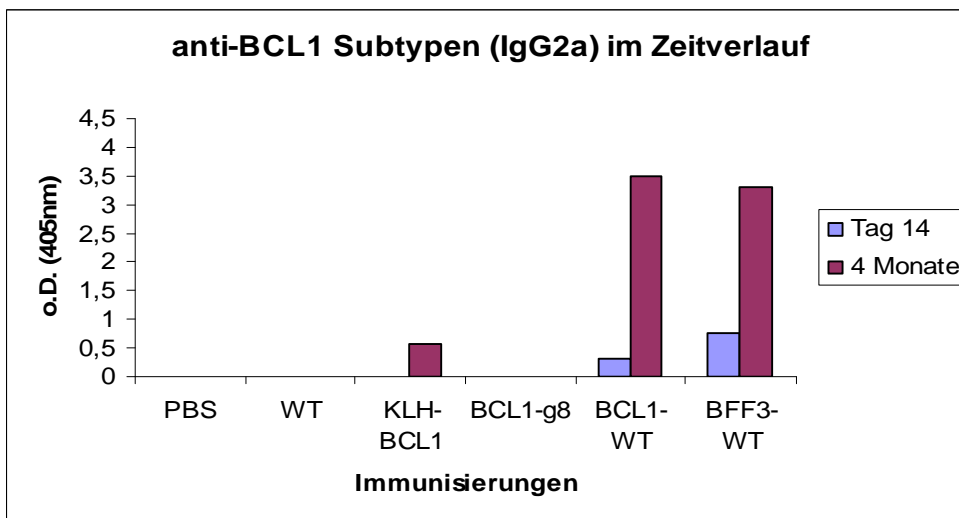


Abb. 22 Bestimmung der anti-BCL1 Subtypen IgG1 und IgG2a im Zeitverlauf nach Vakzinierung mit unterschiedlichen Phagenpräparationen

Analog zur Analyse von anti-BCL1 IgG wurden nach Immunisierung mit unterschiedlichen Phagenpräparationen Subtypenanalysen auf anti-BCL1 IgG1 (A) und IgG2a (B) durchgeführt. Zur Analyse der Seren wurden Elisaplatten mit aufgereinigtem BCL1-IgM (10 µg/ml) beschichtet und Seren 1/200 verdünnt aufgetragen. Zur Isotypenanalyse wurden Gruppenpools in Duplikaten verwendet. Die Serenanalysen von Tag 14 und Tag 28 wurden als Einzelmaustestung in Duplikaten durchgeführt. Zur Detektion wurde ein Goat-Anti-Mouse IgG1-HRP und IgG2a-HRP verwendet.

Nach Immunisierung mit der neuen Phagenvakzinformulierung (BCL1-WT und BFF3-WT) lassen sich Anti-BCL1 Antikörper vom IgG1 und IgG2a-Typ mit Anstieg der Konzentration im Zeitverlauf nachweisen. 14 Tage nach Immunisierung war vermehrt der Subtyp IgG1 nachweisbar. Im Gegensatz zu den Phagenvakzinen führten Immunisierungen mit BCL1-KLH vorwiegend zu einer IgG1-Immunantwort.

3.6.3. Untersuchung der Spezifität von Anti-BCL1 Antikörpern

Die Frage, ob es sich bei den nachgewiesenen anti-BCL1 Serumantikörpern um spezifisch gegen den Idiotyp gerichtete oder um unspezifische anti-IgM Antikörper handelte, wurde mit Hilfe einer IgM-Kontrolle aus BFF3 geprüft. Hierzu wurden ELISA-Platten mit aufgereinigtem BFF3-IgM (10µg/ml) beschichtet und die zu untersuchenden Seren aufgetragen. Neben einer Analyse auf anti-BFF3 IgG im Zeitverlauf wurden wie zuvor Subtypenanalysen (IgG1, IgG2a) durchgeführt. Vergleichbar mit den vorangegangenen Ergebnissen zeigte sich eine humorale Immunantwort gegen BFF3-IgM nach Immunisierung mit der neuen Phagenidiotypvakzinformulierung BCL1-WT und BFF3-WT und dem Goldstandard BCL1-KLH. Auch hier war die Anti-BFF3-Immunantwort bei den Phagenvakzinen signifikant höher als bei den BCL1-KLH Vakzinen (siehe Abb. 23). Durch Immunisierung mit Wildtypphagen und g8-Phagenidiotypvakzinen ließen sich keine Antikörper gegen BFF3 induzieren. Da die detektierten Antikörper im ELISA sowohl an BCL1 (vgl. auch Kap. 3.6.2.), als auch an das Kontroll-IgM BFF3 binden, gehen wir davon aus, dass es sich hierbei um eine Kreuzreaktion der Antikörper handelt, die sich zumindest zum Teil auch gegen die konstanten Regionen bzw. Frame-Work-Regionen des IgM-Moleküls richtet. Neben der Serenanalyse auf gegen IgM gerichtete Antikörper vom Typ IgG wurden Subtypenanalysen (anti-BFF3 IgG1, IgG2a) durchgeführt. Hierbei liessen sich die Isotypen IgG1 und IgG2a nachweisen mit deutlichem Anstieg von IgG2a im Zeitverlauf. Wie gezeigt werden konnte, fand sich zwischen der gegen BCL1 und BFF3 induzierten Immunantwort kein signifikanter Unterschied (s Abb. 24).

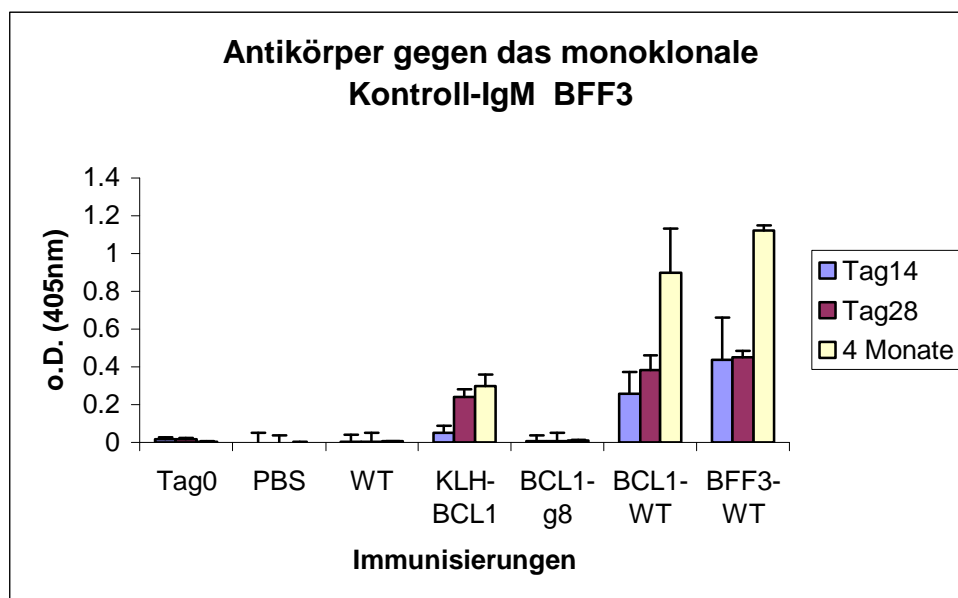


Abb. 23 Nachweis von Serumantikörpern (IgG) gegen das Kontroll-IgM aus BFF3 im Zeitverlauf

Analog zur Analyse von anti-BCL1 IgG wurden nach Immunisierung mit unterschiedlichen Phagen-präparationen Analysen auf anti-BFF3 AK durchgeführt. Zur Analyse der Seren wurden Elisaplatten mit aufgereinigtem BFF3-IgM (10 µg/ml) beschichtet und Seren 1/200 verdünnt aufgetragen. Die Serenanalysen von Tag 14 und Tag 28 wurden als Einzelmaustestung in Duplikaten durchgeführt. Zur Serenanalyse nach 4 Monaten wurden je 2 Mäuse pro Gruppe untersucht und die Seren als Duplikate aufgetragen. Zur Detektion wurde ein Goat-Anti-Mouse IgG-HRP verwendet.

Nach Immunisierung mit BCL1-WT und BFF3-WT lassen sich hohe Titer Anti-BFF3-AK vom IgG-Typ mit signifikanten Anstieg der Konzentration im Zeitverlauf nachweisen (BCL1-WT Tag14 vs. BCL1-WT 4Mon.: $p=0,0003$; BFF3-WT Tag14 vs. BFF3-WT 4Mon.: $p=0,0005$). Im Gegensatz zu den Phagenvakzinen führten Immunisierungen mit BCL1-KLH zu einer deutlich geringeren Anti-BFF3 Immunantwort.

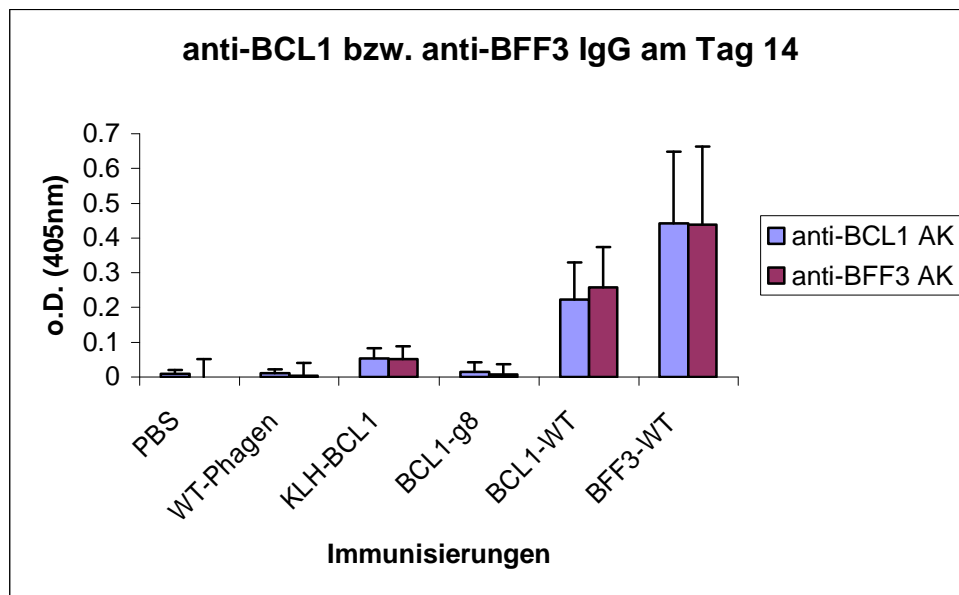


Abb. 24 Vergleich der anti-BCL1 Immunantwort mit der anti-BFF3 Immunantwort zu einem Zeitpunkt (Tag 14)

Bei dem direkten Vergleich der gegen BCL1 und BFF3 induzierten Immunantwort am Tag 14 findet sich kein signifikanter Unterschied. Diese Abbildung ermöglicht den direkten Vergleich der anti-BCL1 bzw. anti-BFF3 Immunantwort zu einem ausgewählten Zeitpunkt. Die Immunisierungen wurden wie oben beschrieben mit unterschiedlichen Vakzinformulierungen 4mal in wöchentlichem Abstand vorgenommen (PBS, WT-Phagen, KLH-BCL1, BCL1-g8, BCL1-WT, BFF3-WT) und die Seren in Elisaverfahren analysiert.

Nachdem eine vergleichbare humorale Immunantwort gegen BCL1 und BFF3 gezeigt werden konnte, wurden Präabsorptionsversuche der Seren mit aufgereinigtem BCL1 und BFF3 durchgeführt, um unspezifische anti-IgM Antikörper zu präabsorbieren und im Folgenden die spezifischen, gegen den Idiotyp gerichteten Antikörper zu detektieren. Hierzu wurden Einzelseren der 3. Versuchsreihe mit aufgereinigtem BCL1-Id bzw. mit BFF3-IgM im Verhältnis 5:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:5 inkubiert und anschließend mittels ELISA wie oben beschrieben analysiert. Zur Kontrolle wurden nicht präabsorbierte Seren getestet. Dabei zeigte sich, dass nach Präabsorption der Seren mit BCL1 bzw. BFF3 ein vergleichbarer deutlicher Abfall der anti-BCL1 und anti-BFF3 Antikörperkonzentration zu beobachten ist. Wir gehen daher davon aus, dass bei der Idiotypvaksinierung eine humorale Immunantwort gegen gemeinsame Epitope in den „frame-work“-Regionen der Immunglobuline und nicht nur gegen Epitope der CDR3-Region induziert wird. Der Beweis einer spezifischen, nur gegen den BCL1-Idiotyp gerichteten Immunantwort muss somit offen bleiben. Dieses System bietet viel Raum für Optimierung der Phagenvakzinen und Methoden zur feineren Detektion von idiotypspezifischen Antikörpern, die aber die Aufgabenstellung dieser Doktorarbeit sprengen würden.

Abb. 25A

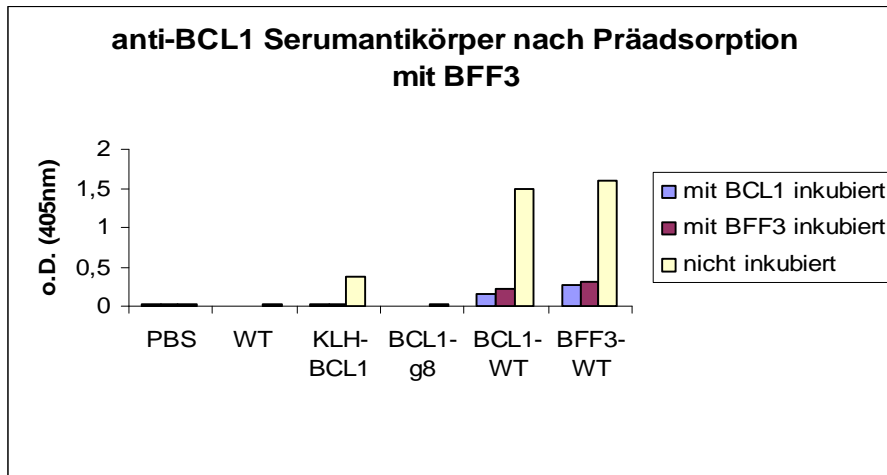
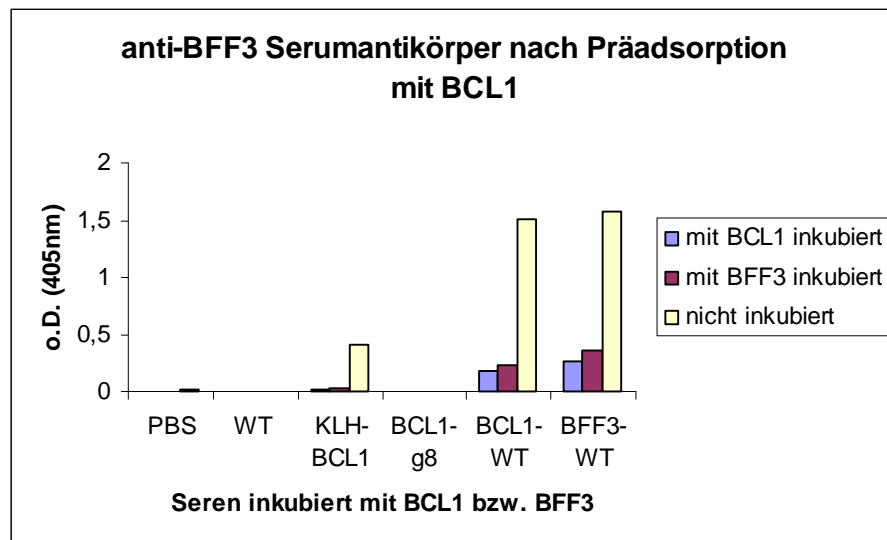


Abb. 25B

**Abb. 25 Präabsorptions-ELISA zur Bestimmung spezifischer anti-BCL1 Serumantikörper**

Zur Detektion der idiotypspezifischen humoralen Immunantwort wurde eine Präabsorption der Positiv-Seren an BFF3-IgM bzw. zur Kontrolle an BCL1-IgM durchgeführt und der Überstand anschließend mittels ELISA auf anti-BCL1 (A) und anti-BFF3 Antikörper (B) vom Typ IgG untersucht. Nach Präabsorption der Positivseren mit BCL1-IgM als auch mit BFF3-IgM ließ sich ein deutlicher Abfall der anti-BCL1 bzw. der anti-BFF3 Antikörperkonzentration beobachten ohne den Nachweis BCL1-spezifischer Immunglobuline zu erbringen. Wir gehen daher davon aus, dass bei der Phagenidiotypvaksinierung eine humorale Immunantwort gegen gemeinsame Epitope in den „frame-work“-Regionen der Immunglobuline und nicht nur gegen Epitope der CDR3-Region induziert wird.

4. Diskussion

Da die Therapie niedrig-maligner Lymphome in fortgeschrittenen Stadien und insbesondere die Rezidivtherapie mit konventionellen Methoden nicht zufriedenstellend sind, wird seit Jahren nach wirksameren Therapiemöglichkeiten gesucht. Ein attraktiver Ansatz ist dabei der Einsatz von immunologischen Therapieverfahren wie z.B. der Einsatz monoklonaler Antikörper, als auch Vakzinierungsstrategien. Lymphome bieten sich für Vakzinierungsstrategien in besonderem Maße an, da die Idiotypen als tumorspezifische Erkennungsmerkmale auf der Oberfläche exprimiert werden (Stevenson, Elliott et al. 1977) und ein ideales Zielmolekül für immuntherapeutische Behandlungsansätze darstellen (Stevenson and Glennie 1985). Bisherige Studien konnten belegen, dass sich durch die Idiotypvakzinierung eine anti-idiotypische Immunantwort induzieren lässt, die sowohl durch humorale, als auch durch zelluläre Immunmechanismen vermittelt wird (Campbell, Carroll et al. 1987; George, Tutt et al. 1987; Campbell, Esserman et al. 1990; Wilson, George et al. 1990). Allerdings zeigen unkonjugierte Idiotypproteine aufgrund ihrer geringen Immunogenität keine therapeutischen Effekte (George, Folkard et al. 1988) und eine Kopplung an stark immunogene Trägersubstanzen wie beispielsweise KLH ist nötig. Die Herstellung der Idiotypvakzinen über Heterohybridom-technologien als bisheriges Standardverfahren ist jedoch sehr zeitraubend und aufwändig, alternativ wurden deshalb Versuche unternommen, Idiotypvakzinen gentechnisch herzustellen. Neben der Verwendung von Tabakpflanzen und Bakterien als Expressionssystem (McCormick, Kumagai et al. 1999; Osterroth, Alkan et al. 1999) bieten sich auch Bakteriophagen als Expressionssystem und immunogenes, nicht humanpathogenes Trägersystem zur Idiotypvakzinierung an. So konnte durch die Phage-Display-Technologie gezeigt werden, dass sich Idiotypproteine als funktionelle Einheiten in Form von „single-chain“-Fragmenten auf der Oberfläche von Phagen exprimieren lassen. In Vorversuchen aus der Arbeitsgruppe Röhnisch konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass durch Phagenidiotypvakzinen im murinen BCL1-Modell eine Tumorsektion bei den vakzinierten Mäusen induziert werden kann (siehe Studienprotokoll, Dr. Röhnisch, MKI-TR 02/2002). Jedoch sind die Wirkungsmechanismen bislang noch weitestgehend unklar und es ist zu untersuchen, ob durch Phagenvakzinen eine humorale oder zelluläre Immunantwort induziert werden kann. Ziel dieser Arbeit war es daher, die induzierte humorale Immunantwort nach Phagenidiotypvakzinierung zu charakterisieren und zu klären, ob eine idiotypspezifische humorale Immunantwort nachweisbar ist. Es sollten außerdem unterschiedliche Phagenpräparationen mit der Goldstandardvakzine Id-KLH verglichen werden und die Auswirkungen von zusätzlich verabreichtem GM-CSF untersucht werden.

4.1. Durchführung der Tierversuche im murinen BCL1-Lymphommodell

Zur Beantwortung der o.g. Fragen wurden Tierversuche im murinen BCL1-Lymphommodell durchgeführt. Das murine BCL1-Lymphommodell wurde ausgewählt, weil es in der Arbeitsgruppe gut etabliert war. Bereits Ende der 70-er Jahre wurde die Bedeutung der Expression von IgM λ in hoher Anzahl zusammen mit IgD λ auf den BCL1 Tumorzellen als Angriffspunkt für anti-

idiotypische Effektormechanismen erkannt (Krolick, Isakson et al. 1979). Der Idiotyp wird sowohl in-vivo, als auch in-vitro nur in geringen Mengen sezerniert (Tutt, Stevenson et al. 1985). Aus der Arbeitsgruppe von F. Stevenson liegen zahlreiche Daten über die Wirksamkeit der Idiotypvaksinierung im BCL1-Lymphommodell vor. Der BCL1-Idiotyp ist daher immunologisch gut charakterisiert und es wurde uns aus dieser Arbeitsgruppe freundlicherweise die Hybridomzelllinie 123F6 zur Produktion des BCL1-Idiotyps sowie die Hybridomzelllinie MC10-6A5 zur Herstellung von Ratten-anti-BCL1 Antikörpern vom IgG2a Typ überlassen. Es existieren jedoch noch neben dem BCL1-Lymphommodell noch weitere Tumormodelle wie beispielsweise das A20-Modell, ein ebenfalls spontan entstandenes B-Zell-Lymphom mit Expression des Idiotyps der Subklasse IgG2a (Kim, Kanellopoulos-Langevin et al. 1979), sowie das 38C13 Lymphommodell mit Expression der Subklasse IgM aus Stanford (Campbell, Esserman et al. 1990). Die Expression des Idiotyps der Subklasse IgG2a im A20-Modell ist ein großer Nachteil des A20 Modells, da anti-idiotypische Antikörper vom IgG2a Typ in diesem Modell nicht gemessen werden können. Die Verwendung dieses Modells schloss sich dadurch aus.

Schlussfolgerungen aus den Ergebnissen des Tumormodelles sind jedoch mit Vorsicht zu ziehen. Die Ergebnisse können nicht 1:1 in die Klinik übertragen werden, da das Studiendesign einem protektiven und nicht einem therapeutischen Tumormodell entspricht. Zudem sind die Tierversuche einer großen Variabilität (Tierhaltung, Futter, Getränke, Narkosen etc.) unterworfen. Um diese möglichst gering zu halten, wurden für alle unsere Tiere standardisierte Bedingungen festgesetzt und die Versuche unter SPF-Bedingungen durchgeführt. Des Weiteren wurde eine ausreichend großen Versuchstierzahl von 150 BALB/c Mäusen mit einer Gruppengröße von 6 Mäusen/Gruppe verwendet, um signifikante Unterschiede ermitteln und repräsentative Aussagen treffen zu können. Trotz der sorgfältigen Vorbereitung der Tierversuche und der guten immunologischen Daten konnte jedoch nicht verhindert werden, dass die Ergebnisse in Bezug auf die Tumorprotektion eher enttäuschten: Zum Wirkungsnachweis der protektiven Immunität in-vivo wurde bei einigen Mäusen am Tag 7 nach der letzten Vakzinierung ein Tumorchallenge mit 1×10^5 BCL1-Lymphomzellen durchgeführt. Die Ergebnisse ergaben einen leichten Vorteil der BCL1-g8-Phagenvakzin-Gruppe gegenüber der Wildtyp-Kontrollgruppe, jedoch waren die Ergebnisse aufgrund eines Ausreißers gegenüber der PBS-Gruppe nicht signifikant (siehe Kap. 3.3, Abb. 10). Das Auftreten von Tumoren wurde durch die Vakzinierung nicht verhindert. Möglicherweise wurde aber auch eine zu hohe Dosis von in-vivo kultivierten BCL1-Zellen für den Tumorchallenge verwendet. Diese Dosis ergab sich zwar durch die Bestimmung der minimalen Tumordosis aus Vorversuchen, vielleicht war diese Dosis aber doch zu hoch. Von Stevenson und Mitarbeitern werden vergleichsweise niedrigere Tumordosen (10^2 - 10^4 BCL1-Zellen) für den Tumorchallenge verwendet und eine geringere Tumorprotektion von Id-KLH Vakzinen bei einem Tumorchallenge mit $\geq 10^4$ BCL1-Zellen nachgewiesen (George, Folkard et al. 1988).

4.2. Phagen als Vektoren für die Idiotypvakzinierung

Bisher wurden Idiotypvakzinen über sehr kosten- und zeitaufwändige Heterohybridomtechniken hergestellt und zur Immunogenitätssteigerung an KLH gekoppelt. Darüber hinaus sind liposomale Vakzinformulierungen verwendet worden, um die Wirksamkeit der Idiotyp-KLH Vakzine weiter zu erhöhen (Kwak, Pennington et al. 1998; Bendandi, Gocke et al. 1999; Neelapu, Baskar et al. 2004). Hierdurch wurde die Produktion der Vakzinen jedoch noch aufwändiger. Ein wesentlicher Vorteil der Phagen-basierten Idiotypvakzinierung ist deshalb die Vermeidung von Zellkulturverfahren wodurch die Produktionszeit von derzeit 3-6 Monaten auf 3-6 Wochen verkürzt werden kann. Da Phagen prokaryotischer Natur sind und sich in Säugetierzellen nicht replizieren, haben die Phagenidiotypvakzinen darüber hinaus ein überaus günstiges Sicherheitsprofil. Eine Gefährdung von Mensch und Umwelt durch rekombinante Phagen ist nicht zu befürchten und sie verursachen auch keine Erkrankungen beim Menschen. Deshalb werden sie gemäß des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) und des Gentechnikgesetzes (GenTG) in die Risikogruppe 1 eingestuft. Dieses gute Sicherheitsprofil ist vor allem bei Einzug der Phagenvakzinierung in die klinische Praxis von erheblicher Relevanz. Ein weiterer Vorteil der Phagenvakzinen ist der einfache Aufbau der Phagenpartikel ohne eigenen Stoffwechsel, die schnelle Herstellbarkeit in Bakterien und ihre hohe Immunogenität. Bisher konnte in diversen Studien gezeigt werden, dass durch Phagenpeptidvakzinen eine Antikörper-vermittelte protektive Immunantwort gegen verschiedene Viren, Parasiten und neuerdings auch gegen *Candida albicans* induziert werden kann (de la Cruz, Lal et al. 1988; Greenwood, Willis et al. 1991; Meola, Delmastro et al. 1995; Bastien, Trudel et al. 1997; Cao, Shi et al. 2005; Yang, Wang et al. 2005). Interessante Ergebnisse bezüglich einer zellulären Immunantwort nach Phagenvakzinierung lieferten die Arbeitsgruppen von Manoutcharian und De Berardinis, die zeigen konnten, dass durch Phagen offenbar nicht nur eine humorale, sondern auch eine zelluläre Immunantwort induziert werden kann (Manoutcharian, Terrazas et al. 1999; De Berardinis, Sartorius et al. 2000). Darüber hinaus gibt es Hinweise dafür, dass Tumorantigene quasi „huckepack“ in Antigen-präsentierende Zellen geschleust werden können und Phagen dabei als Delivery System fungieren (Daten aus der Arbeitsgruppe Dr. Röhnisch). Weitere Studien zeigen zudem, dass filamentöse Phagen die Fähigkeit besitzen, von Antigen-präsentierenden Zellen aufgenommen und via MHC I und II Signalwegen prozessiert zu werden (Gaubin, Fanutti et al. 2003) und daraufhin sowohl eine Th1-Antwort (Wu, Wan et al. 2002), als auch eine humorale Immunantwort gegen das auf den Phagen exprimierte Epitop (Simith 1993; Grabowska, Jennings et al. 2000; Irving, Pan et al. 2001) und eine spezifische CTL-Antwort (De Berardinis, Sartorius et al. 2000; Wan, Wu et al. 2001) auslösen können. Inwieweit sich durch die Phagenidiotypvakzinierung im murinen BCL1-Lymphommodell eine humorale Immunantwort gegen Phagen bzw. eine tumorspezifische Antikörperproduktion induzieren ließ, wird in den folgenden Kapiteln diskutiert.

4.3. Nachweis der humoralen Immunantwort gegen Phagen

4.3.1. Immunantwort gegen unterschiedliche Phagenvakzinformulierungen

Zur Analyse der Immunogenität von Phagen als Carrier für die Idiotypvakzine wurde zunächst die humorale Immunantwort gegen Phagen selbst untersucht. Diese Untersuchungen dienten zudem als Maß für die Fähigkeit der Mäuse, eine humorale Immunantwort auszubilden. Darüber hinaus sollte anhand dieser Untersuchungen die optimale Vakzindosis festgelegt werden. Wir verwendeten zur Bestimmung der anti-Phagen Antikörperantwort das Sandwichelieverfahren. Unabhängig von der verwendeten Phagenvakzinformulierung zeigte sich eine sehr gute humorale Immunantwort gegen Phagen bei allen Mäusen, was für das hohe immunogene Potential und die Eignung von Phagen als Vakzinvektor spricht. Eine Toleranzentwicklung ließ sich nicht nachweisen. Vielmehr zeigte sich im Zeitverlauf nach wiederholter Impfung ein Ansteigen der Antikörpertiter gegen Phagen.

Im Gegensatz zu Fd-Phagen und rekombinanten BCL1-g8 Vakzinen induzierte die neue Phagenidiotypvakzinformulierung initial eine geringere anti-Phagen Antikörperantwort, allerdings mit signifikantem Anstieg im Zeitverlauf zwischen Tag 14 und Tag 28 (siehe **Abb.19**), während durch BCL1-g8 Phagenvakzinen bereits am Tag 14 eine starke anti-Phagen Antikörperantwort nachweisbar war. Dies könnte mit einer zu geringen Idiotypexpressionsdichte auf den BCL1-g8 Phagenvakzinen infolge schlechter Produktionsverhältnisse bzw. alternativ mit der „geordneteren“ Expression der Idiotypproteine im Phagenverbund durch die Verwendung der Phagemid-Rescue-Technologie zusammenhängen. Denn bei der angewandten Phagemid-Rescue-Technik zur Phagenidiotypvakzinherstellung, bei der die Idiotypproteine des BCL1-Lymphoms als variable single chain Fragmente (scFv) in Fusion mit dem g3- oder dem g8-Protein der Phagenhülle integriert wurden, lassen sich grundsätzlich mehrere M13 Oberflächenproteine zur Fusion heterologer Peptide verwenden. Neben dem am häufigsten genutzten coat protein pIII, das nur mit 5 Kopien an einem Pol des M13 Phagen vertreten ist, lassen sich multiple Kopien von Fusionsproteinen in Fusion mit den Oberflächenproteinen pVIII (2670 Kopien) oder pVI, pVII, pIX generieren (Benhar 2001). Bedingt durch die höhere Antigendichte besitzen g8-Phagenvakzinen, bei denen die Tumorantigene in das g8-Protein integriert sind, eine deutlich höhere Immunogenität im Vergleich zu g3-Phagenvakzinen (siehe auch Ergebnisse der Pilotstudie der Arbeitsgruppe Röhnisch) (Parmley and Smith 1989; Greenwood, Willis et al. 1991). Allerdings sind nur kurze Peptide mit 6-8 Aminosäuren auf allen Kopien des Oberflächenproteins pVIII exprimierbar ohne die korrekte Phagenzusammensetzung zu gefährden (Iannolo, Minenkova et al. 1995; Malik, Terry et al. 1996). Um nun den Idiotyp als Fusionsprotein exprimieren zu können und gleichzeitig die korrekte Phagenzusammensetzung zu gewährleisten, wurden Phagenhybridvakzinen verwendet, die mittels Phagemid-Rescue-Technologien hergestellt werden. Dies resultiert in einer geringeren Antigendichte und erklärt die dementsprechend gesteigerte humorale Immunantwort gegen Phagen. Wie die Ergebnisse zeigen, ist dieses Produktionsverfahren offenbar auch mit einigen Unregelmäßigkeiten verbunden, an der die korrekte Expression der

Idiotypproteine leidet. Bei den neuen Phagenvakzinformulierungen wurden die Probleme bislang nicht beobachtet.

In Dosisesskalationsuntersuchungen konnten wir zeigen, dass Immunisierungen mit der rekombinanten BCL1-g8 Phagenvakzine in den Dosierungen mit 1×10^{10} , 1×10^{11} und 5×10^{11} Phagen, sowie Immunisierungen mit 5×10^{11} Fd-Phagen eine humorale Immunantwort mit Bildung von anti-Phagen IgG induzierten. Hierbei stellten wir eine signifikant höhere Antikörperantwort nach Vakzinierung mit 5×10^{11} Phagen im Gegensatz zu Immunisierungen mit geringeren Phagendosen fest (siehe **Abb.15**). Unsere Beobachtungen stützen also die Annahme, dass sich Phagen als immunogene Trägermoleküle zur Idiotypvakzinierung eignen und dass durch eine höhere Antigen dosis eine gesteigerte Antikörperantwort induziert wird. Wir legten somit die Dosis von 5×10^{11} Phagen (5×10^{11} Phagen entsprechen ca. 1 mg Protein) als geeignete Vakzindosis fest und führten alle weiteren Immunisierungen mit dieser Dosis durch. Höhere Titer wurden nicht getestet, da auch für einen späteren klinischen Einsatz am Menschen keine höheren Dosierungen produktionstechnisch praktikabel sind. Unsere Ergebnisse sind mit denen von Galfre et. al. vereinbar, denn auch hier konnte nach Immunisierung mit 10^9 bis 10^{12} Phagenpartikeln eine anti-Phagen Immunantwort induziert werden, wobei mit höheren Phagendosen auch eine gesteigerte, spezifisch gegen das Mimotop gerichtete Immunantwort beobachtet wurde (Galfre, Monaci et al. 1996). Aber auch hier wurde bei ca. 1×10^{12} ein oberes Limit für die Benchtop-Produktion von Phagenvakzinen gesehen.

4.3.2. Subtypenanalyse zur Unterscheidung einer möglichen Th1- bzw. Th2-Antwort

In unseren Subtypenanalysen konnten wir eine gleichmäßige Induktion von anti-Phagen IgG1 und IgG2a nachweisen, jedoch zeigte sich kein signifikantes Überwiegen eines Isotyps (siehe **Abb.20**). Auch 4 Monate nach Vakzinierung wurden beide Subtypen im Serum der immunisierten Mäuse festgestellt. Durch Dosisesskalation der Phagendosen ließ sich unerklärlicherweise keine signifikante Steigerung der IgG1 oder IgG2a-Bildung zeigen (siehe **Abb.16**). Wie erwartet, ließ sich eine IgM-Antwort nur zu Beginn der Untersuchung, nämlich 14 Tage nach stattgehabter Immunisierung als Frühantwort erkennen. Wir konnten somit den regelrechten Ablauf mit IgM als Früh- und IgG als Spätantwort nachweisen. In einer 1993 erschienenen Arbeit von Willis et al. wird erstmals die T-Zell-Abhängigkeit der Immunantwort und der Klassenwechsel von IgM zu IgG nach Immunisierung mit filamentösen Bakteriophagen beschrieben (Willis, Perham et al. 1993). Normalerweise ist es möglich, durch Charakterisierung der Isotypen Hinweise über eine Mitbeteiligung der T-Zell-vermittelten Immunantwort zu gewinnen. In der Maus wird z.B. durch das von Th2-Zellen gebildete IL-4 vorwiegend ein Isotypwechsel zu IgG1 und IgE induziert. Andererseits nehmen Th1-Zellen am Isotypenwechsel teil, indem sie IFN- γ freisetzen und somit den Wechsel zu IgG2a und IgG3 veranlassen. IgG2a ist im murinen Modell somit der Isotyp, der mit einer Th1-Antwort eng verbunden ist (Stevens, Bossie et al. 1988). Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe von Ron Levy in Stanford belegen zudem, dass IgG2a-Isotypen für die Lymphomprotektion am wichtigsten sind, da durch IgG2a eine Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) vermittelt wird (Syrengeles and Levy 1999). Kaminski konnte zeigen, dass

idiotypspezifische Antikörper vom Typ IgG2a zu einer 100-fach effektiveren Lymphomprotektion führen als idiotypspezifische IgG1 Antikörper (Kaminski, Kitamura et al. 1988). Da durch Phagen gleichermaßen eine IgG1 als auch eine IgG2a Antikörperantwort induziert wird, sind keine Rückschlüsse auf ein Überwiegen einer Th1- bzw. Th2-Antwort zu ziehen. Man kann aber annehmen, dass die Anti-Phagen Immunantwort T-Zell-vermittelt ist. Im Vergleich zu den Phagen fand sich bei der Standardvakzine BCL1-KLH vorwiegend eine IgG1 Immunantwort. Da wegen der o.g. Gründe der IgG2a Immunantwort eine größere tumorprotektive Bedeutung zukommt als der IgG1 Antwort (Kaminski, Kitamura et al. 1986), könnte das ein Hinweis auf die bessere Wirksamkeit von Phagenvakzinen im Vergleich zu den Id-KLH-Vakzinen sein. Man muss aber berücksichtigen, dass auch die BCL1-KLH Vakzinierung nicht optimal verlaufen ist und die Antikörpertiter erstaunlich niedrig sind. Letzteres ist möglicherweise jedoch durch einen Dosisseffekt bedingt.

4.4. Tumorspezifische humorale Immunantwort nach Phagenidiotypvakzinierung

4.4.1. anti-BCL1 Antikörperantwort nach Vakzinierung mit rekombinanten BCL1-g8 Phagenvakzinen

Das Hauptaugenmerk der Doktorarbeit galt der Charakterisierung der tumorspezifischen Immunantwort. Die entscheidende Frage war, ob durch die Phagenidiotypvakzinierung eine spezifische, gegen BCL1 gerichtete humorale Immunantwort nachweisbar ist. Bei der Wirksamkeit von Vakzinierungsstrategien wird der humoralen Immunantwort im Hinblick auf die tumorprotektiven Effekte große Bedeutung beigemessen (Miller, Maloney et al. 1982; George, Tutt et al. 1987; Campbell, Esserman et al. 1990; Davis, Maloney et al. 1998). Obwohl gegen humane B-Zell-Idiotypen zytotoxische T-Zellen generiert werden konnten (Schultze, Seamon et al. 1997; Osterroth, Garbe et al. 2000; Wen, Barlogie et al. 2001), scheint in Mäusen der hauptsächliche Effektormechanismus in der Induktion von anti-idiotypischen Antikörpern zu liegen (Syrengeles and Levy 1999) und auch der klinische Erfolg bei Patienten nach Idiotypvakzinierung korreliert mit der Induktion einer humoralen Immunantwort (Weng, Czerwinski et al. 2004).

Nach Immunisierung mit rekombinanten BCL1-g8 Phagenvakzinen konnten wir trotz wiederholter Einzelmaustestungen keine anti-BCL1 Serumantikörper und keine tumorprotektive Wirkung nachweisen. Da jedoch eine starke anti-Phagen Antikörperantwort nachgewiesen wurde, ist davon auszugehen, dass die Vakzinierung per se erfolgreich war. Diese Ergebnisse stehen somit in Diskrepanz zu der „Proof-Of-Principle“-Studie, bei der mit nahezu identischem Versuchsaufbau bei geringerer Vakzindosis (1×10^{11} BCL1-g8 Phagenvakzinen) eine Tumorprotektion und eine idiotypspezifische Immunantwort beobachtet wurde. Die einzig sinnvolle Erklärung für die Beobachtung kann somit nur in einer fehlerhaften Phagenpräparation liegen, die im Vorfeld der Tierversuche nicht aufgefallen war (s.u.). Die in der „Proof-Of-Principle“-Studie gewonnenen Erkenntnisse belegen aber, dass BCL1-g8 Vakzinen aufgrund der erhöhten Antigendichte ein besseres Wirkungspotential besitzen als BCL1-g3 Vakzinen. In der Nachfolgestudie

wurden daher BCL1-g8 Vakzinen mit der neuen Phagenvakzinformulierung verglichen. Auch in den von Meola et al. 1995 publizierten Daten ergeben sich Hinweise, dass eine Phagenvakzination mit cpVIII-Fusionsproteinen eine stärkere Immunantwort induziert als cpIII Fusionsproteine (Meola, Delmastro et al. 1995). Andererseits konnte durch Bastien und Mitarbeiter auch durch Phagenvakzinen mit cpIII Fusionsproteinen eine protektive Immunantwort gegenüber einer RSV-Infektion nachgewiesen werden (Bastien, Trudel et al. 1997). Der Einsatz und die Bedeutung rekombinanter Phagen als geeignete immunogene Trägermoleküle geht allerdings schon Jahre zurück, denn von de la Cruz et al. wurden erstmals Ende der achtziger Jahre kurze Peptide des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* mit dem coat protein III von filamentösen Phagen fusioniert (de la Cruz, Lal et al. 1988). Auch nachfolgende Arbeiten von Greenwood und Minenkova belegen die immunogenen Eigenschaften rekombinanter Phagen, indem Malaria Peptide und antigene Determinanten des human immunodeficiency virus (HIV) mit dem major coat protein gpVIII fusioniert und zu Immunisierungszwecken verwendet wurden (Greenwood, Willis et al. 1991; Minenkova, Ilyichev et al. 1993).

Die jetzt beobachteten, nicht überzeugenden Ergebnisse der Immunisierung mit rekombinanten g8-Phagenidiotypvakzinen sind wahrscheinlich auf die fehlerhafte Produktion der rekombinanten BCL1-g8 Phagenvakzinen mittels Phagemid-Rescue zurückzuführen. Hierbei wurden die BCL1-Idiotypen als variable-single-chain-Fragmente (scFv) in Fusion mit dem g8-Protein in die Phagenhülle integriert. Diese Technik ist den verschiedensten Variablen unterworfen, die trotz standardisierter Verfahren ihre Reproduzierbarkeit einschränken. So stellen genetische Instabilitäten aufgrund von Mutationen, fehlerhafte Kontrollmechanismen, sowie Transkriptionsprobleme und eine inkorrekte Faltung Hinderungsgründe zur Produktion identischer Klone und damit wirksamer rekombinanter Vakzinen dar. Außerdem ist die Haltbarkeit der Phagenpräparationen im Kühlschrank eingeschränkt und es empfiehlt sich die Anwendung frischer Präparate zur Immunisierung unter dem Gebrauch eines frozenen Stoks.

Da die korrekte Expression funktioneller Antikörperfragmente eine korrekte Disulphidbrücken-Formation erfordert, stellt der periplasmatische Raum mit oxidierenden Bedingungen ein geeignetes Zellkompartiment für die Assemblifikation dar im Vergleich zu den reduzierenden Bedingungen des Zytoplasmas (Wulfig and Pluckthun 1994). Daher schien die Verwendung von filamentösen Bakteriophagen im Gegensatz zu λ Phagen sinnvoll, da die Morphogenese filamentöser Phagen auf der Assemblifikation an der inneren Bakterienmembran und auf der Sekretion von Phagenpartikeln in den periplasmatischen Raum beruht. Allerdings beeinträchtigen große Fusionsproteine den Transport durch die Bakterienmembran und die Assemblifikation der Phagenpartikel (Iannolo, Minenkova et al. 1995; Malik, Terry et al. 1996; Iannolo, Minenkova et al. 1997). Hierdurch könnten Konformationsänderungen der aktiven Epitope verursacht werden, die nicht der nativen Proteinkonformation entsprechen und nachfolgend eine erfolgreiche Vakzination limitieren. Demgegenüber scheint der lytische Bakteriophage lambda einige Vorteile zu besitzen, da die Assemblifikation des Kapsids im Zytoplasma erfolgt, eine Translokation der Fusionsproteine durch die Bakterienmembran nicht nötig ist und zudem eine höhere Expressionsdichte erzielt werden kann (Vaccaro, Pavoni et al. 2006). Bei Expression als C-terminales

Fusionsprotein (Zucconi, Dente et al. 2001) mit dem D-Protein des λ Phagen kann der Prozentsatz der in das Kapsid integrierten rekombinanten Proteine bis zu 90% des Gesamt gpD Proteingehalts betragen (ca. 420 gpD Moleküle pro Phage). Das major coat protein pVIII filamentöser Phagen (ca. 2700 Kopien pro Phage) erlaubt allerdings nur einen Display von 1-24 rekombinanten Antikörpermolekülen pro Phagenpartikel (Kang, Barbas et al. 1991).

Insgesamt lässt sich feststellen, dass sich rekombinante Phagenpräparationen hervorragend zum Phage-Display mit der Erzeugung sogenannter „peptide epitope libraries“ und zum Screening spezifisch bindender Antikörper eignen (Devlin, Panganiban et al. 1990; Scott and Smith 1990; Benhar 2001; March, Jepson et al. 2006). Zur Produktion identischer Klone und damit zur wirksamen Vakzinherstellung ist eine Optimierung des Herstellungsverfahrens nötig, um die bereits gezeigte BCL1-g8 Vakzineffizienz reproduzieren zu können. Die Bemühungen haben schließlich zur Entwicklung einer neuen, verbesserten Phagenidiotypvakzinformulierung geführt.

4.4.2. anti-idiotypische humorale Immunantwort nach Vakzinierung mit neuer Phagenidiotypvakzinformulierung

Nachdem wir durch Immunisierung mit rekombinanten g8-Phagenidiotypvakzinen keine tumorprotektive Induktion von anti-BCL1 Antikörpern nachweisen konnten, testeten wir eine neue Phagenidiotypvakzinformulierung, die sich durch eine höhere Antigendichte und ein einfacheres Herstellungsverfahren auszeichnete (zum Herstellungsverfahren siehe Kap. 2.3.3). Wir konnten zeigen, dass sich durch Immunisierung mit der neuen Phagenidiotypvakzinformulierung (BCL1-WT und BFF3-WT als Kontrolle) eine anti-idiotypische Immunantwort induzieren ließ, wobei die Antikörper vorzugsweise vom Typ IgG1 und IgG2a waren (siehe **Abb.21,22**). Die anti-idiotypische humorale Immunantwort konnte durch Boosterimpfungen zwischen Tag 14 und Tag 28 noch weiter gesteigert werden und war auch noch 4 Monate nach Vakzinierung nachweisbar. Die neue Phagenidiotypvakzinformulierung eignet sich demnach besser zur Induktion einer idiotypspezifischen humoralen Immunantwort im Gegensatz zu der verwendeten Charge von BCL1-g8 Phagenvakzinen, da der Idiotyp offenbar richtig gefaltet und in ausreichender Zahl auf der Oberfläche präsentiert wurde, was bei der verwendeten Charge von BCL1-g8 Phagenvakzinen vermutlich nicht der Fall war. Dass die neue Phagenidiotypvakzinformulierung zu einer geringeren anti-Phagen Immunantwort führte, kann mit einer, durch die verbesserte Idiotypexpression erfolgten Maskierung von Phagenepitopen erklärt werden.

Ob bei der gegen BCL1 gerichteten Immunantwort spezifische, nur gegen den Idiotyp gerichtete Antikörper induziert wurden, konnte durch die durchgeführten Untersuchungen letztlich nicht sicher bewiesen werden, da durch die Immunisierung mit BCL1-WT und BFF3-WT sowohl eine anti-BCL1, als auch ein anti-BFF3 Immunantwort induziert wurde (vgl. **Abb.22,23,24**) und die humorale Immunantwort vermutlich gegen gemeinsame Epitope in den „frame-work“-Regionen der Immunglobuline und nicht nur gegen Epitope der CDR3-Region gerichtet war.

Aufgrund dieser Kreuzreaktion ließ sich die gegen IgM gerichtete humorale Immunantwort nicht von der spezifischen Immunantwort trennen, so dass nach der Präabsorption der Seren keine anti-BCL1 bzw. anti-BFF3 Antikörper im ELISA detektierbar waren. Der Beweis einer spezifi-

schen, nur gegen den BCL1-Idiotyp gerichteten Immunantwort konnte somit leider nicht erbracht werden. Im Rahmen dieser Arbeit musste darauf verzichtet werden, spezifische ELISA-Verfahren mit Fab-Fragmenten von BCL1 und BFF3 zu etablieren, jedoch wären derartige Ansätze für weitergehende Versuche überlegenswert.

Kritisch betrachtet ist jedoch auch denkbar, dass durch die Verwendung kompletter Immunglobuline inklusive der Fc-Region bei der Vakzinierung ein Epitope-Overload stattgefunden hat, der die spezifische - nur gegen den Idiotyp gerichtete - Immunantwort beeinträchtigt hat. Zur Erhöhung der Spezifität der Immunantwort müssten daher Fab-Fragmente des Idiotyps oder chimere Immunglobuline verwendet werden, allerdings stellt sich dann wie bei den BCL1-g8-Phagenvakzinen wieder das Problem der Konformität der produzierten Idiotypproteine.

4.4.3. Vergleich der Phagenidiotypvakzinen mit dem Goldstandard BCL1-KLH

Zur Beurteilung des Potentials von Phagen als Trägermoleküle des Idiotyps wurden Vergleiche zwischen der Id-KLH-Vakzine und den Phagenidiotypvakzinen angestellt. Vakzinierungen mit Keyhole limpet hemocyanin (KLH) als immunogener Carrier des Idiotyps wurden in diversen murinen Lymphommodellen erfolgreich getestet und gelten daher als Gold-Standard. Es konnte in diesen Studien gezeigt werden, dass Mäuse durch die Id-KLH Vakzinierung vor einer tödlichen Tumorchallenge geschützt werden können und dass Heilungen in Kombination mit Chemotherapien möglich sind, da durch die Id-KLH Vakzinierung eine polyklonale anti-idiotypspezifische Immunantwort induziert wird (Kaminski, Kitamura et al. 1987; Campbell, Esserman et al. 1990; Caspar, Levy et al. 1997). Zwischen verschiedenen Tumormodellen sind jedoch zum Teil erhebliche Unterschiede zu beobachten: Die Id-KLH Vakzine wurde zunächst an 38C13 (Campbell, Esserman et al. 1990) und BCL1 (George, Folkard et al. 1988) entwickelt. Doch schon bei höherer BCL1-Tumordosis wurde eine deutlich nachlassende Wirksamkeit von Id-KLH beobachtet. Daneben führten Impfungen mit Id-KLH im A20-Modell bestenfalls zu einer Lebensverlängerung, obwohl andere Idiotyp-Vakzinierungsstrategien oder zelluläre Vakzine hier gute Erfolge lieferten (Selmayr, Strehl et al. 1999).

Unsere Versuche zeigen, dass Immunisierungen mit Phagenidiotypvakzinen (BCL1-WT) im Vergleich zu BCL1-KLH Vakzinen zu einer stärkeren humoralen anti-BCL1 Immunantwort führen und sich ein steiler Anstieg der humoralen Immunantwort zwischen Tag 14 und Tag 28 finden lässt (siehe **Abb.21**). Neben diesen quantitativen Unterschieden zeigten sich jedoch auch qualitative Unterschiede bei der induzierten Immunantwort. So konnten wir die Bildung von IgG1- und IgG2a-Antikörpern nach Vakzinierung mit BCL1-WT nachweisen, während durch BCL1-KLH lediglich die Produktion von IgG1 induziert wurde (siehe **Abb.22**). Auch Timmerman et al. konnten nach Id-KLH Vakzinierung lediglich die Bildung von IgG1 nachweisen, während Immunisierungen mit Idiotyp-exprimierenden Adenoviren den Subtyp IgG2a induzierten und die Wirksamkeit der Standardvakzine übertrafen (Timmerman, Caspar et al. 2001). Bezüglich der Lymphomprotektion ist IgG2a dem Subtypen IgG1 allerdings überlegen (Kaminski, Kitamura et al. 1986; Syrengelas and Levy 1999). Phagenvakzinen scheinen somit im Vergleich zu den KLH-Vakzinen mindestens gleichwertig zu sein, wenn nicht besser. Zumindest sind Phagenvak-

zinen somit eine echte Alternative zu den Id-KLH Vakzinen. Diese Ergebnisse müssen jedoch durch weitere Untersuchungen bestätigt werden. Von großem Interesse dürften daher die Ergebnisse der „First-in-Man“ Phagenvakzinierungsstudie zur Therapie von Patienten im beginnenden Rezidiv eines Multiplen Myeloms nach Hochdosistherapie sein. Erste Erkenntnisse belegen auch hier die deutlich höhere Immunogenität der Phagen mit einem schnelleren und signifikant höheren Antikörpertiteranstieg gegen Phagen als gegen KLH. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass durch Phagenidiotypvakzinen eine tumorspezifische Immunantwort induziert werden kann (persönliche Mitteilung Dr. Röhnisch). Da Phagen ubiquitär vorkommen und beispielsweise auch im Münchner Trinkwasser nachweisbar sind (Hofschneider 1963), muss im Gegensatz zu den Tierversuchen bei den zu vakzinierenden Patienten mit einer Präexposition von Phagen gerechnet werden. Diese Präexposition von Phagen scheint aber keinen negativen Einfluss auf die Vakzinierungsergebnisse zu haben, vielmehr könnte im Gegenteil im Sinne eines positiven Memory-Effects die tumorspezifische Immunantwort positiv beeinflussbar sein. Diese Überlegungen decken sich mit den Ergebnissen aus früheren Tierexperimenten der eigenen Arbeitsgruppe (persönliche Mitteilung Dr. Röhnisch) und den Ergebnissen nach Vakzinierung mit Idiotyp-exprimierenden Adenoviren in 2 murinen B-Zell-Lymphommodellen. Hier konnten nach Präexposition mit unspezifischen Adenoviren durch die Immunisierung idiotypspezifische Antikörpertiter induziert werden und es wurde kein negativer Effekt auf die Immunisierung beobachtet (Timmerman, Caspar et al. 2001; Armstrong, Dermime et al. 2002).

4.5. Bedeutung von GM-CSF als immunstimulatorisches Adjuvans

Durch die Verwendung von Adjuvantien soll die Immunantwort gegen das eigentliche Impfantigen gesteigert und in eine günstige Richtung gelenkt werden (humoral, zellulär, Th1, Th2, CTL). Daher sind Adjuvantien oftmals fester Bestandteil von Impfstrategien (Singh and O'Hagan 1999). Von dem Zusatz von Zytokinen zu den Impfstoffen verspricht man sich eine gezieltere Regulation der Immunantwort, sowie eine Verstärkung der Effekte der Immunisierung.

Seit dem Vergleich verschiedener Zytokine zur Immunogenitätssteigerung von Tumorzellen durch Dranoff et al. dominiert GM-CSF die zellulären Tumorstoffe (Dranoff, Jaffee et al. 1993). Die große Bedeutung von GM-CSF liegt in den zahlreichen Effekten auf die Immunantwort: GM-CSF führt zu einer gesteigerten Antigenpräsentation auf einer Vielzahl von Zellen (Morrisey, Bressler et al. 1987; Fischer, Frosch et al. 1988; Heufler, Koch et al. 1988; Smith, Lamerson et al. 1990), bewirkt eine MHC II Antigenexpression auf Monozyten (Steis, VanderMolen et al. 1990; Blanchard and Djeu 1991), sowie eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Granulozyten und Monozyten (Grabstein, Urdal et al. 1986; Young, Lowe et al. 1990) und führt zu einer Verstärkung der T-Zellproliferation (Santoli, Clark et al. 1988). Daneben wird GM-CSF genau wie der hämatopoetische Wachstumsfaktor Flt-3 Ligand *in vivo* zur Generierung von dendritischen Zellen verwendet. Als Schlüsselmediator gilt GM-CSF seither für Wachstum, Reifung, Migration und die Antigen-präsentierenden Eigenschaften dendritischer Zellen, die zunehmend Verwendung in der Tumorstoffung finden (Banchereau, Briere et al. 2000; Banchereau and Palucka 2005).

Aufgrund seiner großen Bedeutung als Immunstimulans wurde von uns die Auswirkung von zusätzlich verabreichtem GM-CSF zu den Phagenidiotypvakzinen auf die humorale Immunantwort untersucht. Dabei wurde den Tieren je 20µg GM-CSF s.c. 4-malig in wöchentlichem Abstand mit der Immunisierung verabreicht. Die Ergebnisse zeigen, dass durch GM-CSF eine geringfügige Steigerung der humoralen Immunantwort beobachtet werden kann, die jedoch im Vergleich zu den Kontrollgruppen nicht signifikant war (siehe **Abb.17,18**). Eine Änderung in der Qualität der Immunantwort z.B. eine Steigerung der IgG2a Antwort bei gleichzeitiger Verminderung der IgG1 Antwort oder umgekehrt konnte nicht beobachtet werden. Daraus lässt sich schließen, dass Phagen als immunogene Trägermoleküle auch ohne Adjuvans zur Induktion einer humoralen Immunantwort wirksam sind. Inwieweit allerdings eine positive Beeinflussung der zellulären Immunantwort durch GM-CSF im Rahmen der Phagenidiotypvakzinierung erreicht werden kann, bleibt zu erkunden. Eine mögliche Ursache für die nur geringe Steigerung der humoralen Immunantwort könnte aber auch in der Verwendung von humanem GM-CSF (Leukomax) anstelle von murinem GM-CSF liegen. Untersuchungen von Kwak et al. im murinen 38C13 Lymphommodell belegen, dass durch Zusatz von murinem GM-CSF i.p. eine signifikante Steigerung der Immunantwort induziert werden kann. Dieser positive Effekt ist allerdings auf die Aktivierung des T-Zell-Arms beschränkt. Analog zu unseren Ergebnissen fand sich kein Effekt von GM-CSF auf die humorale Immunantwort (Kwak, Young et al. 1996).

Während durch die Id-KLH Vakzinierung ohne GM-CSF in klinischen Studien vorwiegend eine humorale, nicht CD8⁺ T-Zell abhängige Immunantwort induziert wird (Kwak, Campbell et al. 1992; Hsu, Caspar et al. 1997), konnte durch die Id-KLH Vakzinierung mit GM-CSF die Induktion einer tumorspezifischen T-Zell Antwort bei 18 von 20 Patienten mit Induktion einer molekularen Remission bei follikulären Lymphomen erzielt werden (Bendandi, Gocke et al. 1999). Diese ermutigenden Ergebnisse machten GM-CSF zum bevorzugten Adjuvans in der Therapie mit Id-KLH und führten zur Initiierung laufender Phase III Studien. Auch als Fusionsprotein gekoppelt an die schwere Kette des Idiotyps (38C13) übertrifft GM-CSF die protektive Wirkung von KLH (Tao and Levy 1993) und führt zu einer beschleunigten Antikörperantwort. Jedoch waren Fusionsproteine aus scFv und GM-CSF im 38C13 Tumormodell nur als Proteinvakzinen erfolgreich, als DNA-Vakzinen hingegen ohne Wirkung (Hakim, Levy et al. 1996).

4.6. Vergleich der Phagenvakzinierung mit anderen Immunisierungsstrategien

Alternativen zu den Phagenvakzinen stellen DNA-Vakzinen, Virus-basierte Vakzinen und die Vakzinierung mit dendritischen Zellen dar. Die DNA-Vakzinierung ist nicht zuletzt wegen des kostengünstigen, zeitsparenden und einfachen Produktionsverfahrens eine attraktive Alternative. Die DNA-Vakzinierung ist in besonderem Maße zur Induktion einer CTL-Antwort geeignet (Leitner, Ying et al. 1999). Problematisch und hinsichtlich der Wirksamkeit entscheidend ist jedoch das Ausmaß der intrazellulären Proteinexpression. Das wird insbesondere bei der Lymphomtherapie deutlich, wo die Induktion einer anti-idiotypischen Immunantwort von der in-vivo-Produktion der Idiotypproteine abhängig ist (Cesco-Gaspere, Benvenuti et al. 2005). DNA-

Vakzinen, die für die Idiotypproteine als scFv alleine codieren, führen jedoch nur zu schwachen Immunantworten, während DNA-Vakzinen, bei denen der Idiotyp als Fusionsprotein mit einem xenogenen Fc-Fragment oder GM-CSF exprimiert wird, eine idiotypspezifische Immunantwort induzieren können (Syrengelas, Chen et al. 1996). Auch DNA-Vakzinen mit Fusion des Idiotyps an das Fragment C des Tetanus Toxins scheinen wirksam zu sein, so dass sowohl eine spezifische humorale Immunantwort, als auch eine CD4+ abhängige zelluläre Immunantwort induziert werden kann (King, Spellerberg et al. 1998). Allerdings waren die Ergebnisse der klinischen Studien zur Idiotyp-DNA-Vakzinierung im Vergleich zu anderen Vakzinierungsstrategien enttäuschend (Timmerman, Singh et al. 2002).

Im 38C13 und BCL1-Modell ist eine einmalige Injektion von Id-Adenovirus mit humanem Fc-Teil einer zweimaligen Id-KLH-Immunsierung mindestens gleichwertig (keine Immunantwort nach Fusion mit muriner konstanter Kette). Die Schutzwirkung war assoziiert mit hohen anti-idiotypischen Antikörpertitern und wurde nicht durch eine CD4- bzw. CD8-Depletion beeinflusst (Timmerman, Caspar et al. 2001). Auch im A20-Modell wurde eine erfolgreiche Adenovirusvakzinierung gezeigt, denn A20-scFv gekoppelt mit humanem Fc-Teil induzierte sowohl eine Anti-Id Antikörperantwort, als auch eine CTL-Antwort und führte in über 40% zur Protektion vor einem Tumorchallenge. Bei deutlich schlechterer Protektion ließ sich durch Vakzinierung mit ungekoppeltem A20-scFv eine vergleichbare T-Zellantwort erzielen, jedoch keine humorale Immunantwort. Gegenüber der Adenovirus-Vakzinierung entfaltete die DNA-Vakzinierung aus einem Fusionskonstrukt mit Tetanus Fragment C keine protektive Wirkung im A20-Modell (Armstrong, Dermime et al. 2002).

Bei der Induktion einer spezifischen zellulären Immunantwort können auch dendritische Zellen (DCs) mit Erfolg eingesetzt werden. Osterroth und Mitarbeiter entwickelten ein System, um mit Fab-gepulsten DC in vitro eine Id-spezifische CTL zu generieren (Osterroth, Garbe et al. 2000). Allerdings war im 38C13-Modell zum Pulsen von DC nur Idiotyp mit xenogenem FC-Teil oder Id-KLH effektiv. Immunsierungen mit Id-KLH gepulsten DCs waren hinsichtlich der Tumorprotektion einer Vakzinierung mit Id-KLH überlegen, wobei der Antikörper-vermittelten (v.a. IgG2a) Tumorprotektion große Bedeutung zukommt (Timmerman and Levy 2000). Klinische Daten zeigen, dass durch eine Immunsierung mit Id-gepulsten DCs bei 35 Patienten in kompletter Remission nach Chemotherapie sowohl eine T-Zell-, als auch eine humorale anti-idiotypische Immunantwort induziert werden kann, die bei den Respondern zu langanhaltenden Tumorremissionen führte. In einer weiteren erst kürzlich durchgeführten Studie konnte erstmals auch die Induktion einer Tumorremission durch eine Vakzinierung bei Patienten mit nachweisbarer Lymphommanifestation nachgewiesen werden. Dabei ließ sich in 4 von 10 Patienten mit nachweisbarer Lymphommanifestation ein klinisches Ansprechen beobachten, davon 2 komplette Remissionen, 1 Teilremission und 1 molekulare Remission. Die Effekte der DC-Therapie wurden dabei durch nachfolgende Booster-Immunsierungen mit Id-KLH trotz offensichtlicher Resistenz gegenüber der DC-Vakzine verstärkt (Timmerman, Czerwinski et al. 2002). Die Idiotypvakzinierung mit dendritischen Zellen ist somit wirksam, der Einsatz von DCs zu Vakzinierungszwecken ist jedoch aufwändig und die optimalen Methoden der Präparation, Antigenbeladung und Präsentation müssen noch definiert werden (Serody, Collins et al. 2000).

5. Zusammenfassung und Ausblick

Auf der Suche nach wirksameren Therapiemöglichkeiten niedrig-maligner Lymphome sind Vakzinierungsstrategien auf dem Vormarsch. Lymphome bieten sich hierfür in besonderem Maße an, da Lymphomzellen den Idiotyp als tumorspezifisches Antigen auf der Oberfläche exprimieren. Neben der Goldstandardvakzine Id-KLH sind derzeit andere innovative Immunisierungsmethoden wie die DNA-Vakzinierung, Immunisierung mit dendritischen Zellen oder virale Vakzinen in Erprobung. Die Phagen-basierte Idiotypvakzinierung ist ein neues Verfahren zur Immuntherapie von Lymphomen. Wir konnten im BCL1-Lymphommodell zeigen, dass durch Phagenidiotypvakzinierung eine gegen BCL1 gerichtete humorale Immunantwort induziert werden kann. In den Tierversuchen konnte jedoch bei der insgesamt sehr hohen Dosis von 1×10^5 BCL1-Zellen zum Tumorchallenge aktuell keine Tumorprotektion nachgewiesen werden, obgleich in den Proof-of-Principle Studien mit den rekombinanten BCL1-g8 Vakzinen eine Tumorprotektion mit resultierender signifikanter Überlebensverlängerung bei 25-30% der Mäuse induziert werden konnte. Dennoch ist das therapeutische Potential von Phagenvakzinen anhand der durchgeführten Untersuchungen deutlich geworden, so war die durch Phagen induzierte humorale Immunantwort im Vergleich zu KLH deutlich stärker ausgeprägt. Bei der Immunisierung mit BCL1-WT Phagenvakzinen ließ sich eine gegen BCL1 gerichtete humorale Immunantwort vom IgG1 und IgG2a Typ induzieren. Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe von Ron Levy in Stanford belegen, dass IgG2a für die Lymphomprotektion am wichtigsten zu sein scheint, da durch IgG2a eine Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) vermittelt wird (Syrengelas and Levy 1999). Im Gegensatz zu den Phagenidiotypvakzinen konnte in unseren Experimenten mit Id-KLH Vakzinen keine IgG2a Immunantwort induziert werden. Indirekt ergeben sich durch die von uns erhobenen Daten auch Hinweise auf die zelluläre Immunantwort durch Phagenvakzinen, obgleich die zelluläre Immunantwort im Rahmen der vorliegenden Dissertation nicht untersucht wurde. Durch den beobachteten Isotyp-Klassenwechsel mit Bildung von IgG1 und IgG2a Antikörpern ergeben sich aber Hinweise auf die T-Zell Abhängigkeit der durch Phagenvakzinen induzierten Immunantwort, wodurch das immunogene Potential der Phagenvakzinen unterstrichen wird. In der Maus wird durch das von Th2-Zellen gebildete IL-4 vorwiegend ein Isotypwechsel zu IgG1 induziert, durch das von Th1-Zellen gebildete IFN- γ ein Isotypwechsel zu IgG2a. Diese Ergebnisse waren von GM-CSF unabhängig und wurden durch Zusatz von GM-CSF weder qualitativ noch quantitativ signifikant beeinflusst. Ob durch die verwendeten Phagenidiotypvakzinen auch eine spezifische zytotoxische T-Antwort induziert wird, ist noch offen und wird derzeit untersucht. Insgesamt lässt sich aber feststellen, dass Phagen wegen der schnellen und kostengünstigen Produktion, des guten Sicherheitsprofils, sowie aufgrund der immunogenen Eigenschaften geeignete Vektoren für Vakzinierungsstrategien sind. Die Optimierung der Vakzinformulierung, der Produktions- und Aufreinigungsverfahren, sowie des verwendeten Tumorantigens (Fab-Fragmente versus ScFv versus komplettes Idiotypprotein) sind jedoch notwendig.

6. Literaturverzeichnis

- Alas, S., C. Emmanouilides, et al. (2001). "Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis." *Clin Cancer Res* **7**(3): 709-23.
- Ardeshna, K. M., P. Smith, et al. (2003). "Long-term effect of a watch and wait policy versus immediate systemic treatment for asymptomatic advanced-stage non-Hodgkin lymphoma: a randomised controlled trial." *Lancet* **362**(9383): 516-22.
- Armstrong, A. C., S. Dermime, et al. (2002). "Immunization with a recombinant adenovirus encoding a lymphoma idiotype: induction of tumor-protective immunity and identification of an idiotype-specific T cell epitope." *J Immunol* **168**(8): 3983-91.
- Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." *Annu Rev Immunol* **18**: 767-811.
- Banchereau, J. and A. K. Palucka (2005). "Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer." *Nat Rev Immunol* **5**(4): 296-306.
- Bastien, N., M. Trudel, et al. (1997). "Protective immune responses induced by the immunization of mice with a recombinant bacteriophage displaying an epitope of the human respiratory syncytial virus." *Virology* **234**(1): 118-22.
- Bendandi, M., C. D. Gocke, et al. (1999). "Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte-monocyte colony-stimulating factor against lymphoma." *Nat Med* **5**(10): 1171-7.
- Benhar, I. (2001). "Biotechnological applications of phage and cell display." *Biotechnol Adv* **19**(1): 1-33.
- Benvenuti, F., O. R. Burrone, et al. (2000). "Anti-idiotypic DNA vaccines for lymphoma immunotherapy require the presence of both variable region genes for tumor protection." *Gene Ther* **7**(7): 605-11.
- Besson, H., P. Brennan, et al. (2006). "Tobacco smoking, alcohol drinking and non-Hodgkin's lymphoma: A European multicenter case-control study (EpiLymph)." *Int J Cancer*.
- Biragyn, A., M. Surenhu, et al. (2001). "Mediators of innate immunity that target immature, but not mature, dendritic cells induce antitumor immunity when genetically fused with nonimmunogenic tumor antigens." *J Immunol* **167**(11): 6644-53.
- Blanchard, D. K. and J. Y. Djeu (1991). "Differential modulation of surface antigens on human macrophages by IFN-gamma and GM-CSF: effect on susceptibility to LAK lysis." *J Leukoc Biol* **50**(1): 28-34.
- Bogen, B. and S. Weiss (1993). "Processing and presentation of idiotypes to MHC-restricted T cells." *Int Rev Immunol* **10**(4): 337-55.
- Borysowski, J., B. Weber-Dabrowska, et al. (2005). "[The potential use of bacteriophages in view of the current antibiotic therapy crisis]." *Pol Arch Med Wewn* **113**(1): 73-8.
- Borysowski, J., B. Weber-Dabrowska, et al. (2006). "Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents." *Exp Biol Med (Maywood)* **231**(4): 366-77.
- Calarota, S., G. Bratt, et al. (1998). "Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1-infected patients." *Lancet* **351**(9112): 1320-5.
- Campbell, M. J., W. Carroll, et al. (1987). "Idiotype vaccination against murine B cell lymphoma. Humoral and cellular responses elicited by tumor-derived immunoglobulin M and its molecular subunits." *J Immunol* **139**(8): 2825-33.

- Campbell, M. J., L. Esserman, et al. (1990). "Idiotype vaccination against murine B cell lymphoma. Humoral and cellular requirements for the full expression of antitumor immunity." J Immunol **145**(3): 1029-36.
- Cao, Y. C., Q. C. Shi, et al. (2005). "Vaccination against very virulent infectious bursal disease virus using recombinant T4 bacteriophage displaying viral protein VP2." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **37**(10): 657-64.
- Carneiro-Proietti, A. B., B. C. Catalan-Soares, et al. (2006). "HTLV in the Americas: challenges and perspectives." Rev Panam Salud Publica **19**(1): 44-53.
- Caspar, C. B., S. Levy, et al. (1997). "Idiotype vaccines for non-Hodgkin's lymphoma induce polyclonal immune responses that cover mutated tumor idiotypes: comparison of different vaccine formulations." Blood **90**(9): 3699-706.
- Cesco-Gaspere, M., F. Benvenuti, et al. (2005). "BCL1 lymphoma protection induced by idiotype DNA vaccination is entirely dependent on anti-idiotypic antibodies." Cancer Immunol Immunother **54**(4): 351-8.
- Chan, J. K. (2001). "The new World Health Organization classification of lymphomas: the past, the present and the future." Hematol Oncol **19**(4): 129-50.
- Cheson, B. D. (2003). "Radioimmunotherapy of non-Hodgkin lymphomas." Blood **101**(2): 391-8.
- Clackson, T., H. R. Hoogenboom, et al. (1991). "Making antibody fragments using phage display libraries." Nature **352**(6336): 624-8.
- Clark, J. R. and J. B. March (2004). "Bacteriophage-mediated nucleic acid immunisation." FEMS Immunol Med Microbiol **40**(1): 21-6.
- Cohen, S., J. Haimovich, et al. (2005). "B-cell lymphoma and myeloma protection induced by idiotype vaccination with dendritic cells is mediated entirely by T cells in mice." J Immunother **28**(5): 461-6.
- Coiffier, B., E. Lepage, et al. (2002). "CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma." N Engl J Med **346**(4): 235-42.
- Coligan E., K. A. M., Margulies D. H., Shevach E. M., and W. Strober (1991). "Current Protocols in Immunology". Wiley, New York.
- Crichton, DN., B. Cohen, et al. (1989). "Purification of mouse IgM on protein A." Immunol. Today **10**(10): 325
- Czuczman, M. S., R. Weaver, et al. (2004). "Prolonged clinical and molecular remission in patients with low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma treated with rituximab plus CHOP chemotherapy: 9-year follow-up." J Clin Oncol **22**(23): 4711-6.
- Davis, T. A., D. G. Maloney, et al. (1998). "Anti-idiotypic antibodies can induce long-term complete remissions in non-Hodgkin's lymphoma without eradicating the malignant clone." Blood **92**(4): 1184-90.
- De Berardinis, P., R. Sartorius, et al. (2000). "Phage display of peptide epitopes from HIV-1 elicits strong cytolytic responses." Nat Biotechnol **18**(8): 873-6.
- de la Cruz, V. F., A. A. Lal, et al. (1988). "Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage." J Biol Chem **263**(9): 4318-22.
- Dearman, R. J., F. K. Stevenson, et al. (1988). "Lymphokine-activated killer cells from normal and lymphoma subjects are cytotoxic for cells coated with antibody derivatives displaying human Fc gamma." Blood **72**(6): 1985-91.
- Deconinck, E., C. Foussard, et al. (2005). "High-dose therapy followed by autologous purged stem-cell transplantation and doxorubicin-based chemotherapy in

- patients with advanced follicular lymphoma: a randomized multicenter study by GOELAMS." Blood **105**(10): 3817-23.
- Devlin, J. J., L. C. Panganiban, et al. (1990). "Random peptide libraries: a source of specific protein binding molecules." Science **249**(4967): 404-6.
- Dranoff, G., E. Jaffee, et al. (1993). "Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3539-43.
- Dreyling, M., G. Lenz, et al. (2005). "Early consolidation by myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission significantly prolongs progression-free survival in mantle-cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the European MCL Network." Blood **105**(7): 2677-84.
- Fakhari, F. D., J. H. Jeong, et al. (2006). "The latency-associated nuclear antigen of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus induces B cell hyperplasia and lymphoma." J Clin Invest **116**(3): 735-42.
- Felici, F., G. Galfre, et al. (1996). "Phage-displayed peptides as tools for characterization of human sera." Methods Enzymol **267**: 116-29.
- Fischer, H. G., S. Frosch, et al. (1988). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activates macrophages derived from bone marrow cultures to synthesis of MHC class II molecules and to augmented antigen presentation function." J Immunol **141**(11): 3882-8.
- Fischetti, V. A. (2005). "Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives." Trends Microbiol **13**(10): 491-6.
- Flamand, V., T. Sornasse, et al. (1994). "Murine dendritic cells pulsed in vitro with tumor antigen induce tumor resistance in vivo." Eur J Immunol **24**(3): 605-10.
- Galfre, G., P. Monaci, et al. (1996). "Immunization with phage-displayed mimotopes." Methods Enzymol **267**: 109-15.
- Gandhi, M. K. (2006). "Epstein-Barr virus-associated lymphomas." Expert Rev Anti Infect Ther **4**(1): 77-89.
- Gaubin, M., C. Fanutti, et al. (2003). "Processing of filamentous bacteriophage virions in antigen-presenting cells targets both HLA class I and class II peptide loading compartments." DNA Cell Biol **22**(1): 11-8.
- George, A. J., S. G. Folkard, et al. (1988). "Idiotypic vaccination as a treatment for a B cell lymphoma." J Immunol **141**(6): 2168-74.
- George, A. J., H. M. McBride, et al. (1991). "Monoclonal antibodies raised against the idiotype of the murine B cell lymphoma, BCL1 act primarily with heavy chain determinants." Hybridoma **10**(2): 219-27.
- George, A. J., A. L. Tutt, et al. (1987). "Anti-idiotypic mechanisms involved in suppression of a mouse B cell lymphoma, BCL1." J Immunol **138**(2): 628-34.
- Glennie, M. J. and G. T. Stevenson (1982). "Univalent antibodies kill tumour cells in vitro and in vivo." Nature **295**(5851): 712-4.
- Goletz, S., P. A. Christensen, et al. (2002). "Selection of large diversities of antiidiotypic antibody fragments by phage display." J Mol Biol **315**(5): 1087-97.
- Gopal, A. K., T. A. Gooley, et al. (2003). "High-dose radioimmunotherapy versus conventional high-dose therapy and autologous hematopoietic stem cell transplantation for relapsed follicular non-Hodgkin lymphoma: a multivariable cohort analysis." Blood **102**(7): 2351-7.

- Grabowska, A. M., R. Jennings, et al. (2000). "Immunisation with phage displaying peptides representing single epitopes of the glycoprotein G can give rise to partial protective immunity to HSV-2." Virology **269**(1): 47-53.
- Grabstein, K. H., D. L. Urdal, et al. (1986). "Induction of macrophage tumoricidal activity by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." Science **232**(4749): 506-8.
- Greenwood, J., A. E. Willis, et al. (1991). "Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from Plasmodium falciparum circumsporozoite protein as antigens." J Mol Biol **220**(4): 821-7.
- Grulich, A. E. and C. M. Vajdic (2005). "The epidemiology of non-Hodgkin lymphoma." Pathology **37**(6): 409-19.
- Hakim, I., S. Levy, et al. (1996). "A nine-amino acid peptide from IL-1beta augments antitumor immune responses induced by protein and DNA vaccines." J Immunol **157**(12): 5503-11.
- Harris, N. L., E. S. Jaffe, et al. (2000). "The World Health Organization classification of neoplasms of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting--Airlie House, Virginia, November, 1997." Hematol J **1**(1): 53-66.
- Harris, N. L., E. S. Jaffe, et al. (1994). "A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group." Blood **84**(5): 1361-92.
- Hawkins, R. E., S. J. Russell, et al. (1997). "A pilot study of idiotypic vaccination for follicular B-cell lymphoma using a genetic approach. CRC NO: 92/33. Protocol NO: PH1/027." Hum Gene Ther **8**(10): 1287-99.
- Hawkins, R. E., G. Winter, et al. (1993). "A genetic approach to idiotypic vaccination." J Immunother **14**(4): 273-8.
- Hawkins, R. E., D. Zhu, et al. (1994). "Idiotypic vaccination against human B-cell lymphoma. Rescue of variable region gene sequences from biopsy material for assembly as single-chain Fv personal vaccines." Blood **83**(11): 3279-88.
- Herold, M., G. Dolken, et al. (2003). "Randomized phase III study for the treatment of advanced indolent non-Hodgkin's lymphomas (NHL) and mantle cell lymphoma: chemotherapy versus chemotherapy plus rituximab." Ann Hematol **82**(2): 77-9.
- Heufler, C., F. Koch, et al. (1988). "Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells." J Exp Med **167**(2): 700-5.
- Hiddemann, W., M. Kneba, et al. (2005). "Frontline therapy with rituximab added to the combination of cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP) significantly improves the outcome for patients with advanced-stage follicular lymphoma compared with therapy with CHOP alone: results of a prospective randomized study of the German Low-Grade Lymphoma Study Group." Blood **106**(12): 3725-32.
- Hofschneider, P. H. (1963). "Untersuchungen über "kleine" E.coli K12 Bakteriophagen. 1. und 2. Mitteilung." Z Naturforsch B **18**: 203-10.
- Hsu, F. J., C. Benike, et al. (1996). "Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells." Nat Med **2**(1): 52-8.
- Hsu, F. J., C. B. Caspar, et al. (1997). "Tumor-specific idio type vaccines in the treatment of patients with B-cell lymphoma--long-term results of a clinical trial." Blood **89**(9): 3129-35.
- Hsu, F. J., L. Kwak, et al. (1993). "Clinical trials of idio type-specific vaccine in B-cell lymphomas." Ann N Y Acad Sci **690**: 385-7.

- Hurvitz, S. A. and J. M. Timmerman (2005). "Current status of therapeutic vaccines for non-Hodgkin's lymphoma." Curr Opin Oncol **17**(5): 432-40.
- Hurvitz, S. A. and J. M. Timmerman (2005). "Recombinant, tumour-derived idiotype vaccination for indolent B cell non-Hodgkin's lymphomas: a focus on Favld." Expert Opin Biol Ther **5**(6): 841-52.
- Iannolo, G., O. Minenkova, et al. (1997). "Construction, exploitation and evolution of a new peptide library displayed at high density by fusion to the major coat protein of filamentous phage." Biol Chem **378**(6): 517-21.
- Iannolo, G., O. Minenkova, et al. (1995). "Modifying filamentous phage capsid: limits in the size of the major capsid protein." J Mol Biol **248**(4): 835-44.
- Ilyichev, A. A., O. O. Minenkova, et al. (1992). "Inserting foreign peptides into the major coat protein of bacteriophage M13." FEBS Lett **301**(3): 322-4.
- Inal, J. M. (2003). "Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **51**(4): 237-44.
- Irving, M. B., O. Pan, et al. (2001). "Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics." Curr Opin Chem Biol **5**(3): 314-24.
- Ivanenkov, V., F. Felici, et al. (1999). "Uptake and intracellular fate of phage display vectors in mammalian cells." Biochim Biophys Acta **1448**(3): 450-62.
- Jazirehi, A. R. and B. Bonavida (2005). "Cellular and molecular signal transduction pathways modulated by rituximab (rituxan, anti-CD20 mAb) in non-Hodgkin's lymphoma: implications in chemosensitization and therapeutic intervention." Oncogene **24**(13): 2121-43.
- Jazirehi, A. R., S. Huerta-Yepez, et al. (2005). "Rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) inhibits the constitutive nuclear factor- κ B signaling pathway in non-Hodgkin's lymphoma B-cell lines: role in sensitization to chemotherapeutic drug-induced apoptosis." Cancer Res **65**(1): 264-76.
- Jemal, A., T. Murray, et al. (2005). "Cancer statistics, 2005." CA Cancer J Clin **55**(1): 10-30.
- Jensen, M., T. Elter, et al. (2006). "Prolonged remission in a patient with relapsed follicular lymphoma after a single course of rituximab." Onkologie **29**(3): 90-2.
- Jones, I. and Y. Morikawa (1996). "Baculovirus vectors for expression in insect cells." Curr Opin Biotechnol **7**(5): 512-6.
- Kaminski, M. S., K. Kitamura, et al. (1986). "Importance of antibody isotype in monoclonal anti-idiotype therapy of a murine B cell lymphoma. A study of hybridoma class switch variants." J Immunol **136**(3): 1123-30.
- Kaminski, M. S., K. Kitamura, et al. (1987). "Idiotype vaccination against murine B cell lymphoma. Inhibition of tumor immunity by free idiotype protein." J Immunol **138**(4): 1289-96.
- Kang, A. S., C. F. Barbas, et al. (1991). "Linkage of recognition and replication functions by assembling combinatorial antibody Fab libraries along phage surfaces." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(10): 4363-6.
- Kanter G YJ, V. A., Swartz JR., Levy R. (2004). "A novel method for producing custom-made idiotype vaccines for lymphoma immunotherapy using a cell-free expression system." Blood **104**:(Abstract #1410).
- Kim, K. J., C. Kanellopoulos-Langevin, et al. (1979). "Establishment and characterization of BALB/c lymphoma lines with B cell properties." J Immunol **122**(2): 549-54.

- King, C. A., M. B. Spellerberg, et al. (1998). "DNA vaccines with single-chain Fv fused to fragment C of tetanus toxin induce protective immunity against lymphoma and myeloma." *Nat Med* **4**(11): 1281-6.
- Klasa, R. J., R. M. Meyer, et al. (2002). "Randomized phase III study of fludarabine phosphate versus cyclophosphamide, vincristine, and prednisone in patients with recurrent low-grade non-Hodgkin's lymphoma previously treated with an alkylating agent or alkylator-containing regimen." *J Clin Oncol* **20**(24): 4649-54.
- Koganei, S., M. Ito, et al. (2005). "B-1a cell origin of the murine B lymphoma line BCL1 characterized by surface markers and bacterial reactivity of its surface IgM." *Immunol Lett* **98**(2): 232-44.
- Krolick, K. A., P. C. Isakson, et al. (1979). "BCL1, a murine model for chronic lymphocytic leukemia: use of the surface immunoglobulin idiotype for the detection and treatment of tumor." *Immunol Rev* **48**: 81-106.
- Kwak, L. W. (1998). "Tumor vaccination strategies combined with autologous peripheral stem cell transplantation." *Ann Oncol* **9 Suppl 1**: S41-6.
- Kwak, L. W., M. J. Campbell, et al. (1992). "Induction of immune responses in patients with B-cell lymphoma against the surface-immunoglobulin idiotype expressed by their tumors." *N Engl J Med* **327**(17): 1209-15.
- Kwak, L. W., R. Pennington, et al. (1998). "Liposomal formulation of a self lymphoma antigen induces potent protective antitumor immunity." *J Immunol* **160**(8): 3637-41.
- Kwak, L. W., K. Thielemans, et al. (1999). "Idiotypic vaccination as therapy for multiple myeloma." *Semin Hematol* **36**(1 Suppl 3): 34-7.
- Kwak, L. W., H. A. Young, et al. (1996). "Vaccination with syngeneic, lymphoma-derived immunoglobulin idiotype combined with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor primes mice for a protective T-cell response." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(20): 10972-7.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Larocca, D., P. D. Kassner, et al. (1999). "Gene transfer to mammalian cells using genetically targeted filamentous bacteriophage." *Faseb J* **13**(6): 727-34.
- Larocca, D., A. Witte, et al. (1998). "Targeting bacteriophage to mammalian cell surface receptors for gene delivery." *Hum Gene Ther* **9**(16): 2393-9.
- Leitner, W. W., H. Ying, et al. (1999). "DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects." *Vaccine* **18**(9-10): 765-77.
- Lenz, G., M. Dreyling, et al. (2004). "Myeloablative radiochemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in first remission prolongs progression-free survival in follicular lymphoma: results of a prospective, randomized trial of the German Low-Grade Lymphoma Study Group." *Blood* **104**(9): 2667-74.
- Lundin, K. U., P. O. Hofgaard, et al. (2003). "Therapeutic effect of idiotype-specific CD4+ T cells against B-cell lymphoma in the absence of anti-idiotypic antibodies." *Blood* **102**(2): 605-12.
- Malik, P., T. D. Terry, et al. (1996). "Role of capsid structure and membrane protein processing in determining the size and copy number of peptides displayed on the major coat protein of filamentous bacteriophage." *J Mol Biol* **260**(1): 9-21.
- Manoutcharian, K., L. I. Terrazas, et al. (1999). "Phage-displayed T-cell epitope grafted into immunoglobulin heavy-chain complementarity-determining regions: an effective vaccine design tested in murine cysticercosis." *Infect Immun* **67**(9): 4764-70.
- March, J. B., J. R. Clark, et al. (2004). "Genetic immunisation against hepatitis B using whole bacteriophage lambda particles." *Vaccine* **22**(13-14): 1666-71.

- March, J. B., C. D. Jepson, et al. (2006). "Phage library screening for the rapid identification and in vivo testing of candidate genes for a DNA vaccine against *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* small colony biotype." Infect Immun **74**(1): 167-74.
- Marcus, R., K. Imrie, et al. (2005). "CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma." Blood **105**(4): 1417-23.
- Marks, J. D., H. R. Hoogenboom, et al. (1991). "By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage." J Mol Biol **222**(3): 581-97.
- Massaia, M. (2000). "Idiotype vaccination of myeloma patients after chemotherapy." Acta Oncol **39**(7): 807-8.
- McCafferty, J., A. D. Griffiths, et al. (1990). "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains." Nature **348**(6301): 552-4.
- McCormick, A. A., M. H. Kumagai, et al. (1999). "Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(2): 703-8.
- McLaughlin, P., A. J. Grillo-Lopez, et al. (1998). "Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program." J Clin Oncol **16**(8): 2825-33.
- Meeker, T., J. Lowder, et al. (1985). "Emergence of idiotype variants during treatment of B-cell lymphoma with anti-idiotypic antibodies." N Engl J Med **312**(26): 1658-65.
- Mellstedt, H., J. Fagerberg, et al. (1999). "Augmentation of the immune response with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other hematopoietic growth factors." Curr Opin Hematol **6**(3): 169-75.
- Mellstedt, H., J. Fagerberg, et al. (1999). "Local low-dose of soluble GM-CSF significantly augments an immune response against tumour antigens in man." Eur J Cancer **35 Suppl 3**: S29-32.
- Mellstedt, H. and A. Osterborg (1999). "Active idiotype vaccination in multiple myeloma. GM-CSF may be an important adjuvant cytokine." Pathol Biol (Paris) **47**(2): 211-5.
- Meola, A., P. Delmastro, et al. (1995). "Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage." J Immunol **154**(7): 3162-72.
- Messing, J. (1983). "New M13 vectors for cloning." Methods Enzymol **101**: 20-78.
- Messing, J. (1991). "Cloning in M13 phage or how to use biology at its best." Gene **100**: 3-12.
- Messing, J. (1993). "M13 cloning vehicles. Their contribution to DNA sequencing." Methods Mol Biol **23**: 9-22.
- Miller, R. A., D. G. Maloney, et al. (1982). "Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody." N Engl J Med **306**(9): 517-22.
- Minenkova, O. O., A. A. Ilyichev, et al. (1993). "Design of specific immunogens using filamentous phage as the carrier." Gene **128**(1): 85-8.
- Morrissey, P. J., L. Bressler, et al. (1987). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments the primary antibody response by enhancing the function of antigen-presenting cells." J Immunol **139**(4): 1113-9.
- Neelapu, S. S., S. Baskar, et al. (2004). "Human autologous tumor-specific T-cell responses induced by liposomal delivery of a lymphoma antigen." Clin Cancer Res **10**(24): 8309-17.

- Newman, J., H. L. Swinney, et al. (1977). "Hydrodynamic properties and structure of fd virus." *J Mol Biol* **116**(3): 593-603.
- Nickenig C., D. M., Schiegnitz E. et al. (2004). "CHOP improves response rates but not overall survival in follicular and mantle cell lymphoma (MCL) - results of a randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). Annual Meeting of the American Society of Hematology, San Diego." *Blood*: 104:176a (Abstr 611).
- Osterborg, A., Q. Yi, et al. (1998). "Idiotype immunization combined with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in myeloma patients induced type I, major histocompatibility complex-restricted, CD8- and CD4-specific T-cell responses." *Blood* **91**(7): 2459-66.
- Osterroth, F., O. Alkan, et al. (1999). "Rapid expression cloning of human immunoglobulin Fab fragments for the analysis of antigen specificity of B cell lymphomas and anti-idiotype lymphoma vaccination." *J Immunol Methods* **229**(1-2): 141-53.
- Osterroth, F., A. Garbe, et al. (2000). "Stimulation of cytotoxic T cells against idiotype immunoglobulin of malignant lymphoma with protein-pulsed or idiotype-transduced dendritic cells." *Blood* **95**(4): 1342-9.
- Parmley, S. F. and G. P. Smith (1989). "Filamentous fusion phage cloning vectors for the study of epitopes and design of vaccines." *Adv Exp Med Biol* **251**: 215-8.
- Philip, T., C. Guglielmi, et al. (1995). "Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma." *N Engl J Med* **333**(23): 1540-5.
- Pop, L. M., J. E. Smallshaw, et al. (2005). "Failure of vaccination with idiotypic protein or DNA, (+/-IL-2), the depletion of regulatory T cells, or the blockade of CTLA-4 to prolong dormancy in mice with BCL1 lymphoma." *J Immunother* **28**(6): 525-34.
- Pratt, D., H. Tzagoloff, et al. (1969). "Conditional lethal mutants of the small filamentous coliphage M13. II. Two genes for coat proteins." *Virology* **39**(1): 42-53.
- Press, O. W., J. P. Leonard, et al. (2001). "Immunotherapy of Non-Hodgkin's lymphomas." *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*: 221-40.
- Press, O. W., J. M. Unger, et al. (2003). "A phase 2 trial of CHOP chemotherapy followed by tositumomab/iodine I 131 tositumomab for previously untreated follicular non-Hodgkin lymphoma: Southwest Oncology Group Protocol S9911." *Blood* **102**(5): 1606-12.
- Rabkin, C. S., S. S. Devesa, et al. (1993). "Increasing incidence of non-Hodgkin's lymphoma." *Semin Hematol* **30**(4): 286-96.
- Ranieri, E., W. Herr, et al. (1999). "Dendritic cells transduced with an adenovirus vector encoding Epstein-Barr virus latent membrane protein 2B: a new modality for vaccination." *J Virol* **73**(12): 10416-25.
- Reddy SA CD, R. R., Reinl S., et al. (2002). "Plant derived single-chain Fv idiotype vaccines are safe and immunogenic in patients with follicular lymphoma: results of a phase I study." *Blood (Abstract #609)*.
- Reichardt, V. L. and P. Brossart (2005). "Dendritic cells in clinical trials for multiple myeloma." *Methods Mol Med* **109**: 127-36.
- Reichardt, V. L., C. Milazzo, et al. (2003). "Idiotype vaccination of multiple myeloma patients using monocyte-derived dendritic cells." *Haematologica* **88**(10): 1139-49.

- Reichardt, V. L., C. Y. Okada, et al. (1999). "Idiotype vaccination using dendritic cells after autologous peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma--a feasibility study." *Blood* **93**(7): 2411-9.
- Santini, G., S. Nati, et al. (2001). "Fludarabine in combination with cyclophosphamide or with cyclophosphamide plus mitoxantrone for relapsed or refractory low-grade non-Hodgkin's lymphoma." *Haematologica* **86**(3): 282-6.
- Santoli, D., S. C. Clark, et al. (1988). "Amplification of IL-2-driven T cell proliferation by recombinant human IL-3 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." *J Immunol* **141**(2): 519-26.
- Savelyeva, N., C. A. King, et al. (2005). "Inhibition of a vaccine-induced anti-tumor B cell response by soluble protein antigen in the absence of continuing T cell help." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(31): 10987-92.
- Schultze, J. L., M. J. Seamon, et al. (1997). "Autologous tumor infiltrating T cells cytotoxic for follicular lymphoma cells can be expanded in vitro." *Blood* **89**(10): 3806-16.
- Schumacher, K. (2001). "Clinical results of the ID-KLH vaccination with local GM-CSF in patients with follicular lymphomas (published in Nature Med 1999; 5: 1171-1177) summary of the lecture by L. W. Kwak." *J Cancer Res Clin Oncol* **127 Suppl 2**: R10-3.
- Scott, J. K. and G. P. Smith (1990). "Searching for peptide ligands with an epitope library." *Science* **249**(4967): 386-90.
- Selmayr, M., J. Strehl, et al. (1999). "Induction of tumor immunity by autologous B lymphoma cells expressing a genetically engineered idiotype." *Gene Ther* **6**(5): 778-84.
- Serody, J. S., E. J. Collins, et al. (2000). "T cell activity after dendritic cell vaccination is dependent on both the type of antigen and the mode of delivery." *J Immunol* **164**(9): 4961-7.
- Smith (1993). "Surface display and peptide libraries. Cold Spring Harbor Laboratory, April 4-7, 1992. Proceedings." *Gene* **128**(1): 1-144.
- Singh, M. and D. O'Hagan (1999). "Advances in vaccine adjuvants." *Nat Biotechnol* **17**(11): 1075-81.
- Slavin, S. and S. Strober (1978). "Spontaneous murine B-cell leukaemia." *Nature* **272**(5654): 624-6.
- Smith, G. P. (1985). "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." *Science* **228**(4705): 1315-7.
- Smith, P. D., C. L. Lamerson, et al. (1990). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates human monocyte accessory cell function." *J Immunol* **144**(10): 3829-34.
- Steis, R. G., L. A. VanderMolen, et al. (1990). "Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with advanced malignancy: a phase Ib trial." *J Natl Cancer Inst* **82**(8): 697-703.
- Stevens, T. L., A. Bossie, et al. (1988). "Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells." *Nature* **334**(6179): 255-8.
- Stevenson, F. K. and K. C. Anderson (2000). "Preparing the ground for vaccination against multiple myeloma." *Immunol Today* **21**(4): 170-1.
- Stevenson, F. K., J. Rice, et al. (2004). "DNA fusion gene vaccines against cancer: from the laboratory to the clinic." *Immunol Rev* **199**: 156-80.
- Stevenson, F. K., D. Zhu, et al. (1995). "A genetic approach to idiotypic vaccination for B cell lymphoma." *Ann N Y Acad Sci* **772**: 212-26.

- Stevenson, F. K., D. Zhu, et al. (2000). "DNA vaccination against cancer antigens." Ernst Schering Res Found Workshop(30): 119-36.
- Stevenson, G. T., E. V. Elliott, et al. (1977). "Idiotypic determinants on the surface immunoglobulin of neoplastic lymphocytes: a therapeutic target." Fed Proc **36**(9): 2268-71.
- Stevenson, G. T. and M. J. Glennie (1985). "Surface immunoglobulin of B-lymphocytic tumours as a therapeutic target." Cancer Surv **4**(1): 213-44.
- Stritzke, J., T. Zunkel, et al. (2003). "Therapeutic effects of idioype vaccination can be enhanced by the combination of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 2 in a myeloma model." Br J Haematol **120**(1): 27-35.
- Syrengeles, A. D., T. T. Chen, et al. (1996). "DNA immunization induces protective immunity against B-cell lymphoma." Nat Med **2**(9): 1038-41.
- Syrengeles, A. D. and R. Levy (1999). "DNA vaccination against the idioype of a murine B cell lymphoma: mechanism of tumor protection." J Immunol **162**(8): 4790-5.
- Tao, M. H. and R. Levy (1993). "Idioype/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor fusion protein as a vaccine for B-cell lymphoma." Nature **362**(6422): 755-8.
- Timmerman J., C. D., Taid B. et al. (2000). "A Phase I/II trial to evaluate the immunogenicity of recombinant idioype protein vaccines for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma (NHL)." Blood **96** (Abstract #578).
- Timmerman, J. M., C. B. Caspar, et al. (2001). "Idioype-encoding recombinant adenoviruses provide protective immunity against murine B-cell lymphomas." Blood **97**(5): 1370-7.
- Timmerman, J. M., D. K. Czerwinski, et al. (2002). "Idioype-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients." Blood **99**(5): 1517-26.
- Timmerman, J. M. and R. Levy (1999). "Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy." Annu Rev Med **50**: 507-29.
- Timmerman, J. M. and R. Levy (2000). "Linkage of foreign carrier protein to a self-tumor antigen enhances the immunogenicity of a pulsed dendritic cell vaccine." J Immunol **164**(9): 4797-803.
- Timmerman, J. M., G. Singh, et al. (2002). "Immunogenicity of a plasmid DNA vaccine encoding chimeric idioype in patients with B-cell lymphoma." Cancer Res **62**(20): 5845-52.
- Treon, S. P., N. Raje, et al. (2000). "Immunotherapeutic strategies for the treatment of plasma cell malignancies." Semin Oncol **27**(5): 598-613.
- Trojan, A., J. L. Schultze, et al. (2000). "Immunoglobulin framework-derived peptides function as cytotoxic T-cell epitopes commonly expressed in B-cell malignancies." Nat Med **6**(6): 667-72.
- Tutt, A. L., F. K. Stevenson, et al. (1985). "Secretion of idioypic IgM by the mouse B-cell leukaemia (BCL1) occurs spontaneously in vitro and in vivo." Immunology **55**(1): 59-63.
- Twort, F. (1915). "An investigation on the nature of the ultramicroscopic viruses." Lancet: 1241-1243.
- Vaccaro, P., E. Pavoni, et al. (2006). "Efficient display of scFv antibodies on bacteriophage lambda." J Immunol Methods **310**(1-2): 149-58.
- Velkeen H., M. K., Osterroth F., et al. (2003). "Immune responses and clinical outcome of patients with advanced non-Hodkin lymphoma after immunization with a novel recombinant vaccine." Blood **102**: (Abstract #3342).

- Vitetta, E. S., T. F. Tucker, et al. (1997). "Tumor dormancy and cell signaling. V. Regrowth of the BCL1 tumor after dormancy is established." Blood **89**(12): 4425-36.
- Vitetta, E. S., D. Yuan, et al. (1979). "Characterization of the spontaneous murine B cell leukemia (BCL1). III. Evidence for monoclonality by using an anti-idiotypic antibody." J Immunol **122**(5): 1649-54.
- Wan, Y., Y. Wu, et al. (2001). "Induction of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes response in vivo by filamentous phage display vaccine." Vaccine **19**(20-22): 2918-23.
- Wang, R., D. L. Doolan, et al. (1998). "Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine." Science **282**(5388): 476-80.
- Warnke, R. A., S. Slavin, et al. (1979). "The pathology and homing of a transplantable murine B cell leukemia (BCL1)." J Immunol **123**(3): 1181-8.
- Weber-Dabrowska, B., M. Dabrowski, et al. (1987). "Studies on bacteriophage penetration in patients subjected to phage therapy." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **35**(5): 563-8.
- Weiss, S. and B. Bogen (1989). "B-lymphoma cells process and present their endogenous immunoglobulin to major histocompatibility complex-restricted T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(1): 282-6.
- Weiss, S. and B. Bogen (1991). "MHC class II-restricted presentation of intracellular antigen." Cell **64**(4): 767-76.
- Wen, Y. J., B. Barlogie, et al. (2001). "Idiotypic-specific cytotoxic T lymphocytes in multiple myeloma: evidence for their capacity to lyse autologous primary tumor cells." Blood **97**(6): 1750-5.
- Weng, W. K., D. Czerwinski, et al. (2004). "Clinical outcome of lymphoma patients after idiotype vaccination is correlated with humoral immune response and immunoglobulin G Fc receptor genotype." J Clin Oncol **22**(23): 4717-24.
- Willis, A. E., R. N. Perham, et al. (1993). "Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage." Gene **128**(1): 79-83.
- Wilson, A., A. J. George, et al. (1990). "Recognition of a B cell lymphoma by anti-idiotypic T cells." J Immunol **145**(11): 3937-43.
- Wu, Y., Y. Wan, et al. (2002). "Phage display particles expressing tumor-specific antigens induce preventive and therapeutic anti-tumor immunity in murine p815 model." Int J Cancer **98**(5): 748-53.
- Wulfing, C. and A. Pluckthun (1994). "Protein folding in the periplasm of Escherichia coli." Mol Microbiol **12**(5): 685-92.
- Yang, J., G. Kanter, et al. (2005). "Rapid expression of vaccine proteins for B-cell lymphoma in a cell-free system." Biotechnol Bioeng **89**(5): 503-11.
- Yang, Q., L. Wang, et al. (2005). "Prophylactic vaccination with phage-displayed epitope of *C. albicans* elicits protective immune responses against systemic candidiasis in C57BL/6 mice." Vaccine **23**(31): 4088-96.
- Young, D. A., L. D. Lowe, et al. (1990). "Comparison of the effects of IL-3, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and macrophage colony-stimulating factor in supporting monocyte differentiation in culture. Analysis of macrophage antibody-dependent cellular cytotoxicity." J Immunol **145**(2): 607-15.
- Young, R. C., D. L. Longo, et al. (1988). "The treatment of indolent lymphomas: watchful waiting v aggressive combined modality treatment." Semin Hematol **25**(2 Suppl 2): 11-6.

-
- Zhu, D., J. Rice, et al. (2001). "DNA fusion vaccines against B-cell tumors." Trends Mol Med **7**(12): 566-72.
- Zucconi, A., L. Dente, et al. (2001). "Selection of ligands by panning of domain libraries displayed on phage lambda reveals new potential partners of synaptotagmin 1." J Mol Biol **307**(5): 1329-39.

7. Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
7-AAD	7-Amino-Actinomycin D staining solution
ABTS	2-2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid)
ADCC	Antikörper-vermittelte zellgebundene Zytotoxizität
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATCC	American Type Culture Collection
BCL1	erstes, spontan in der Maus entstandenes Lymphom/Leukämie-Modell
BFF3	Hybridomzelllinie (Produktion von monoklonalen anti-IgM)
BSA	Bovines Serum-Albumin
CD	cluster of differentiation
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
CFSE	5-(6)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester
cfu	Colony forming units
CHOP	Chemotherapie-Schema mit Cyclophosphamid, Vincristin, Prednison, Doxorubicin
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CVP	Chemotherapie-Schema mit Cyclophosphamid, Vincristin, Prednison
cpm	Counts per minute
DC	Dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelstrang
DTH-Test	Delayed-Type Hypersensitivity Test
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay

EtOH	Ethanol
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FCM	Chemotherapie mit Fludarabin, Cyclophosphamid, Mitoxantron
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
g	Gramm
g3/g8	Gene 3 bzw. 8 für die coat proteine III, VIII
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HDT	Hochdosistherapie
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	human leucocyte antigen
HRP	horse radish peroxidase
ICAM	intercellular adhesion molecule
Id	Idiotyp
i.d.	intradermal
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ImiDs	Immunomodulatory Drugs
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Kda	Kilodalton
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
MC10-6A5	Hybridomzelllinie (Produktion von anti-BCL1 IgG2a)
MCP	Chemotherapieschema mit Mitoxantron, Chlorambucil, Prednison
MHC	Major histocompatibility complex
Min	Minute(n)
Mio.	Million(en)

mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NK-Zellen	Natürliche Killerzelle
nm	Nanometer
o.D.	optische Dichte
PBMC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerithrin
pfu	plaque forming units
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
scFv	single-chain Fragment der variablen Domäne
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec.	Sekunde(n)
SEM	Standard error of mean
SPF	specific pathogen-free
ss	Einzelstrang
t	Zeit
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Th1, Th2	T-Helferzellen vom Typ 1 bzw. 2
Tris	Tris(hydroxymehtyl)-aminomethan
Tween20	Polyoxyethylene sorbitane monolaurate
TZR	T-Zellrezeptor
U	Einheit der Enzymaktivität (Unit)
V	Volt

Vol.	Volumen
W	Watt
WT	Wildtyp-Phagen

8. Danksagung

Die vorliegende Doktorarbeit wurde im hämatologischen Forschungslabor von Herrn Prof. Dr. B. Emmerich an der Medizinischen Klinik des Klinikums Innenstadt der Universität München durchgeführt. An dieser Stelle möchte ich mich herzlich für die Überlassung des interessanten Themas und des Arbeitsplatzes bedanken.

Meinen beiden Betreuern, Frau Dr. Dr. C. Bourquin und Herrn Dr. Tim Röhnisch gilt mein besonderer Dank für die herzliche und kontinuierliche Unterstützung, die vielen praktischen Tips und nützlichen Gespräche, sowie für die freundliche Arbeitsatmosphäre. Ihre weitreichende Erfahrung und das außerordentliche Engagement waren mir eine große Hilfe beim Fertigstellen dieser Arbeit.

Ebenso möchte ich mich bei Beata Rutz und Thomas Böhm bedanken für ihre praktischen Anregungen und Hilfestellungen. Auch meinem Mitdoktoranden Roland Stäuble gilt mein Dank für seine „lockeren“ Sprüche und natürlich für das Bereitstellen des aufgereinigten Idiotyps.

Für die exzellente Hilfe bei den Tierarbeiten und das Versorgen der Tiere möchte ich mich herzlich bei allen Tierpflegern des Tierstalls bedanken, ohne die die Versuche nicht hätten durchgeführt werden können.

Den Doktoranden der AG PD. Dr. G. Meinhard danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit im Labor und die gegenseitige Unterstützung.

Allen Mitgliedern der Abteilung für Hämatologie und Onkologie in der Medizinischen Klinik danke ich für die gute Zusammenarbeit, sowie für die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Briese von Amersham, der mir bei Fragen zur Antikörperaufreinigung mit nützlichen Tips zur Seite stand.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei Michael Haunreiter für seine schier unendliche Geduld und Nachsicht, sowie für die zahllosen Anregungen zur Textverarbeitung bedanken. Außerdem gilt mein Dank allen anderen lieben Freunden für die Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei meinem „Lieblings-Quasi-Cousin“ Paul Pesch aus Köln, der in nächtlichen Aktionen den PC vor dem Zusammenbruch bewahrt hat.

Mein besonderer Dank gilt meinen lieben Eltern, die mir diese Arbeit durch ihre Unterstützung erst ermöglicht haben.

9. Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Christina Sonntag
Geburtstag: 26. Oktober 1979
Geburtsort: Bonn
Vater: Manfred Michael Sonntag, Arzt
Mutter: Bärbel Sonntag, geb. Melech, Chemotechnikerin
Geschwister: Alexander Sonntag, Student

Schulbildung:

1986-1990: Grundschule Bad Wiessee
1990-1999: Gymnasium Tegernsee
25.06.1999: Abitur

Studium:

1999-2005: Medizinstudium an der Ludwig-Maximilian-Universität München
Aug. 2001: Physikum
Aug. 2002: 1.Staatsexamen
Aug. 2004: 2.Staatsexamen
Nov. 2005: 3.Staatsexamen

Praktika / Auslandsstudien:

März 2000: Krankenpflegepraktikum in Gynäkologie, Kreiskrankenhaus
Agatharied/Miesbach
Aug. 2000: Krankenpflegepraktikum in Geriatrie, Kreiskrankenhaus
Agatharied/Miesbach
Feb. 2002: Chirurgie, Cho Ray Hospital, Saigon, Vietnam
Sept. 2002: Gynäkologie, Barmherzige Brüder, Wien
April 2003: Psychiatrie, BKH Kaufbeuren
Sept. 2003: Anästhesie, Hopital St. Louis, Paris,
März 2004: Innere Medizin, Hausarztpraxis, Dr. med. Gabriele Völker, Bad Wiessee

Okt./Nov.2004: Neurologie, München Harlaching
Dez./Jan.2005: Neurologie, Western Hospital, Toronto, Canada
Feb.-Mai 2005: Innere Medizin, Stadtspital Triemli, Zürich
Juni-Aug.2005: Chirurgie, Universitätsspital, Genf
Dezember 2005: Erhalt der Approbation

Dissertation:

11/2002-11/2005: Dissertation an der Medizinischen Klinik, Klinikum Innenstadt der Universität München, Abt. Hämatologie/Onkologie, Leiter Prof. Dr. B. Emmerich mit dem Thema: Charakterisierung der humoralen Immunantwort nach Phagenidiotypvakzinierung im murinen BCL1-Lymphommodell. Betreuung: Herr Dr. Tim Röhnisch, Frau Dr. Dr. Carole Bourquin

Berufliche Tätigkeit:

Seit Juni 2006: Assistenzärztin an der Psychiatrischen Universitätsklinik Zürich, Klinik für Soziale Psychiatrie und Allgemeinpsychiatrie ZH West (Prof. Dr. med. Dipl.-Psych. W. Rössler, Prof. Dr. med. Dr. phil. P. Hoff)