

Aus dem Pathologischen Institut
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. H. K. Müller-Hermelink

**Angeborene Immunität des Menschen:
Kreuzreaktionen tumorspezifischer monoklonaler
IgM-Antikörper**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Steffen Erk
aus Aschaffenburg

Würzburg, April 2007

Referent: Professor Dr. H. P. Vollmers

Korreferentin: Professor Dr. K. Ulrichs

Dekan: Professor Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 6.November 2007

Der Promovend ist Arzt

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Angeborene und erworbene Immunität.....	1
1.2 Zelluläre und humorale Komponenten des angeborenen Immunsystems.....	1
1.3 Rezeptoren des angeborenen Immunsystems.....	2
1.4 Humane Hybridoma Technologie.....	6
1.5 Vorstellung der getesteten natürlichen IgM-Antikörper.....	8
1.5.1 Reaktionsmuster der IgM-Antikörper mit Tumorgeweben.....	9
1.5.2 Genetischer Ursprung der IgM-Antikörper.....	10
1.6 Auswahl der getesteten Antigene.....	14
1.7 Ziel der Arbeit.....	15
2 Material und Methoden.....	17
2.1 Materialien.....	17
2.1.1 Bezugsquellen der verwendeten Verbrauchsmittel.....	17
2.1.2 Geräte.....	19
2.1.3 Software.....	20
2.1.4 Medien, Puffer, Lösungen.....	20
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Herstellung humaner monoklonaler Antikörper durch somatische Hybridisierung.....	21
2.2.1.1 Gewinnung von Lymphozyten aus Patientenmaterial.....	21
2.2.1.2 Somatische Hybridisierung.....	22
2.2.1.3 Reklonierung der Antikörper-produzierenden Hybridome.....	23
2.2.1.4 Kultivierung von Hybridomen.....	24
2.2.2 Nephelometrie.....	25
2.2.3 ELISA.....	25

3 Ergebnisse.....	28
3.1 Kreuzreaktionen der natürlichen IgM-Antikörper mit körpereigenen Antigenen.....	28
3.1.1 Actin.....	28
3.1.2 Myosin.....	31
3.1.3 Keratin.....	33
3.1.4 Vimentin und Desmin.....	35
3.1.5 Humane Plazenta-DNA.....	35
3.2 Kreuzreaktionen der natürlichen IgM-Antikörper mit bakteriellen Antigenen	37
3.2.1 Lipopolysaccharid (LPS).....	37
3.2.2 Lipoteichonsäure (LTS).....	37
3.2.3 Peptidoglykan (PGN).....	38
3.2.4 Flagellin.....	38
3.2.5 Heat Shock Protein 70 (HSP 70).....	38
3.2.6 <i>Helicobacter pylori</i> - Bestandteile.....	40
3.2.6.1 CagA-Antigen.....	41
3.2.6.2 VacA-Toxin.....	42
3.2.7 Bakterielle DNA: <i>E. coli</i> -DNA und <i>Cl. perfringens</i> - DNA.....	46
3.3 Gesamtübersicht über alle Kreuzreaktionen.....	47
 4 Diskussion.....	 49
4.1 Auswertung der Versuche nach der Genetik der natürlichen Antikörper.....	51
4.1.1 Auswertung nach dem gemeinsamen Keimbahn-Gen.....	51
4.1.1.1 Ursprung der schweren Kette.....	51
4.1.1.2 Ursprung der leichten Kette.....	53
4.1.2 Auswertung der Ergebnisse nach der Gesamtzahl der Antikörper- Mutationen.....	54
4.2 Gegenüberstellung: Antikörper aus Magen-Ca.-Patienten vs. Antikörper aus Patienten mit anderen Tumoren.....	55

4.3 Diskussion der Kreuzreaktionen der natürlichen Antikörper mit körpereigenen Antigenen.....	56
4.4 Diskussion der Kreuzreaktionen der natürlichen Antikörper mit bakteriellen Antigenen.....	57
4.5 Auswertung der Kreuzreaktionen der natürlichen Antikörper mit DNA.....	57
4.6 Antikörper ohne Kreuzreaktionen.....	58
4.7 Bisher bekannte Rezeptoren tumorspezifischer natürlicher IgM-Antikörper..	59
5 Zusammenfassung.....	61
6 Literaturverzeichnis.....	62
7 Abkürzungsverzeichnis.....	70

1 Einleitung

1.1 Angeborene und erworbene Immunität

Um potentiell pathogene Keime und spontan transformierte Zellen erkennen und beseitigen zu können, verfügt jeder Organismus über ein Immunsystem. Bei Vertebraten, also auch beim Menschen, unterscheidet man dabei die primäre, angeborene von der sekundären, erworbenen Immunität. Die Mechanismen des Immunsystems können anhand von Oberflächenrezeptoren effizient zwischen körpereigenen und „Nicht-Selbst“-Strukturen (z.B. Krankheitserregern) unterscheiden und eine zelluläre und humorale Immunantwort auslösen.

Das angeborene Immunsystem umfasst eine bestimmte Anzahl von keimbahncodierten Rezeptoren, die ohne weitere Reifung häufig vorkommende Merkmale, sog. *patterns*, von Pathogenen erkennen. Zur Aktivierung der angeborenen Immunabwehr ist keine Antigen-Präsentation durch T-Zellen erforderlich, wodurch die schnelle Reaktion des innaten Immunsystems bereits Minuten nach dem Eindringen von Mikroorganismen garantiert ist (Vollmers, 2002). Nur wenn die Erreger die angeborenen Abwehrmechanismen des Wirtes umgehen oder überwinden, ist eine adaptive Immunantwort notwendig. Zumeist kann nach dem Eindringen von Mikroorganismen über Haut und Schleimhäute, welche eine erste mechanische, chemische und mikrobiologische Barriere darstellen, die Entstehung einer Infektion bereits durch die angeborenen Abwehrmechanismen verhindert werden. Sollten diese Mechanismen nicht zur Beseitigung der Erreger genügen, wird die sekundäre Immunabwehr aktiviert. Sie kann durch Reifung (Rekombination) und Mutation der codierenden Gene eine zusätzliche, höhere Variabilität der Rezeptoren erreichen (Du Pasquier, 2001; Rinkevich, 1999; Williams, 2001). Dabei entstehende antigenspezifische Effektorzellen können die Krankheitserreger gezielt angreifen und eliminieren.

1.2 Zelluläre und humorale Komponenten des angeborenen Immunsystems

Sowohl die angeborene als auch die erworbene Abwehr setzen sich aus einer zellulären und einer humoralen Komponente zusammen. Zelluläre Bestandteile des natürlichen Immunsystems sind beispielsweise Makrophagen, Mastzellen, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen, Antikörper-produzierende B-Zellen und neutrophile

Granulozyten (Beutler, 2004; Vollmers, 2002; Vollmers, 2005b). Fremde Moleküle werden anhand von Oberflächenrezeptoren erkannt und anschließend phagozytiert oder mittels Enzymen oder toxischer Substanzen unschädlich gemacht. Des Weiteren können Zytokine und andere Mediatoren freigesetzt werden, die eine Entzündungsreaktion bewirken und weitere Abwehrzellen anlocken. Zur humoralen Komponente der natürlichen Immunabwehr zählen natürliche Antikörper, die von B1-Zellen produziert werden (siehe Kapitel 1.3.2) und die bereits im Blut vorkommen, ohne dass ihre Bildung durch einen Antigenkontakt stimuliert wurde (Boes, 2000). Ebenso zählt das Komplementsystem zum humoralen angeborenen Immunsystem: Dieses kann durch Antigen-Antikörper-Komplexe, Pathogenoberflächen oder die Bindung des Serumproteins Lektin an die Oberfläche des Pathogens in Gang gesetzt werden. Seine Aufgabe ist die Opsonierung von Krankheitserregern und auch die Auslösung einer Reihe von Entzündungsreaktionen, die den Kampf gegen eine Infektion unterstützen. Außerdem kann durch den porenbildenden lytischen Komplex eine direkte Zerstörung von Pathogenen erfolgen.

1.3 Rezeptoren des angeborenen Immunsystems

Die Aktivierung des angeborenen Immunsystems erfolgt über bestimmte Rezeptoren. Sie erreichen ihre genetische Variabilität durch Kombination verschiedener Keimbahn-Gene. Zusätzliche Deletionen, Insertionen und Fehler bei der Rekombination sorgen für eine noch größere Variabilität der Rezeptoren; diese genügt, um ein breites Spektrum von Antigenen auf pathogenen Organismen abzudecken und einen ausreichenden Schutz zu bieten, ohne dass zusätzliche Mutationen stattfinden müssen (Pohle, 2004; Vollmers, 2005b).

Die Rezeptoren der innaten Immunabwehr erkennen Pathogene entweder direkt (z.B. natürliche Antikörper oder mannanbindendes Lektin) oder lösen über bestimmte Signale zelluläre Reaktionen aus (z.B. Toll-like Rezeptoren). Erkannt werden repetitive Strukturen, sogenannte *patterns*, die auf Oberflächen von Pathogenen vorkommen; die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkennen also keine spezifischen Einzelstrukturen, z.B. kurze Sequenzen von Aminosäuren, wie dies bei der erworbenen Immunabwehr der Fall ist. Bei den *patterns* handelt es sich um Kohlenhydrat- oder Lipidreste, die sich im Laufe der Evolution praktisch nicht verändert haben (wohingegen z.B. Proteine ständigen Mutationen unterliegen) (Hensel, 1999a, 2001a;

Brändlein, 2003b). Diese konservierten Muster werden unabhängig von Mutationsereignissen exprimiert (Janeway, 2001).

Die Bindung von Pathogenen an die Rezeptoren des angeborenen Immunsystems führt zu schnellen Reaktionen, wodurch der rasche Wirkungseintritt der angeborenen Immunabwehr zu erklären ist. Die Rezeptoren liegen dabei entweder als sezernierte Proteine oder als membranständige Rezeptoren auf den Zellen des angeborenen Immunsystems vor.

Zu den membranständigen Rezeptoren zählen die Toll-Rezeptoren (TLR), die eine Familie von Transmembranrezeptoren darstellen, die in der Evolution konserviert wurden und offenbar ausschließlich als signalgebende Rezeptoren wirken. Sie wurden ursprünglich bei der Taufliege *Drosophila* entdeckt und kommen z.B. auf dendritischen Zellen und Makrophagen vor.

An diese TLRs binden Strukturen, die sich im Laufe der Evolution praktisch nicht verändert haben und die nur von mikrobiellen Pathogenen (sog. PAMPs, pathogen-associated microbial patterns) exprimiert werden. Auf die verschiedenen Arten von Pathogenen wird jeweils die passende Reaktion eingeleitet (Medzhitov, 2001; Janeway, 2002; Takeda, 2005), so z.B. die Phagozytose oder die Freisetzung von Zytokinen, wodurch die sekundäre Immunantwort in Gang gesetzt wird (Pasare, 2004). Zu diesen PAMPs zählen bakterielle Zellwandbestandteile wie Lipopolysaccharid, Peptidoglykan, Lipoteichonsäure und Lipopeptide, ebenso Flagellin, bakterielle DNA, virale dsRNA, Protozoen- und Pilzbestandteile (Takeda, 2005; Medzhitov, 2001; Pasare, 2004; Takeuchi, 1999; Beutler, 2004).

Bisher wurden elf verschiedene Toll-like Rezeptoren identifiziert: Die TLRs-1 bis -9 sind beim Menschen und bei der Maus gleichermaßen zu finden, der TLR-10 ist wahrscheinlich beim Menschen funktionell, während er bei der Maus nicht produziert wird, und beim TLR-11 ist es genau umgekehrt: Dieser wird von der Maus gebildet, nicht jedoch vom Menschen (Takeda, 2005; Beutler, 2004).

Bei sieben dieser TLRs ist der entsprechende Ligand bekannt (Underhill, 2002). Beispielsweise wird das in der Zellwand gram-negativer Bakterien vorkommende Lipopolysaccharid (LPS) zunächst vom LPS-bindenden Protein (LBP), einem in der Leber produzierten Akut-Phase-Protein, erkannt und gebunden, bevor dieser LPS:LBP-Komplex anschließend an CD14 bindet, welches frei im Plasma oder an der Oberfläche

von Phagozyten vorkommt. Der TLR-4 interagiert daraufhin mit CD14 (Miyake, 2003; Schröder, 2003) und es erfolgt über eine Signaltransduktions-kaskade die Aktivierung von NF- κ B im Zellkern, wodurch Mediatoren der angeborenen Immunität, nämlich Chemokine und Zytokine (v.a. TNF- α) freigesetzt werden (Janeway, 2002; Weiss, 2004), die bei einer unkontrollierten systemischen Bakterien-infektion eventuell bis zum septischen Schock führen können. Man hat außerdem gezeigt, dass der TLR-4 bei der Erkennung endogener Liganden wie Heat Shock Proteinen, Fibrinogen oder Oligosacchariden von Hyaluronsäuren beteiligt ist (Takeda, 2005). Der TLR-4 ist der bislang am besten erforschte Toll-like Rezeptor.

Ein weiteres Beispiel für Toll-like Rezeptoren ist der TLR-2, der für die Erkennung bakterieller Lipoproteine, Lipoteichonsäure und Peptidoglykan essentiell ist (Schwandner, 1999), aber zudem mykobakterielle, Protozoen- und Pilz-Bestandteile erkennt (Ozinsky, 2000; Takeda, 2005). Außerdem soll der TLR-2 auch LPS von Nicht-Enterobakterien, z.B. *Leptospira interrogans*, *Porphyromonas gingivalis* und *Helicobacter pylori* binden, welches eine andere Struktur als das typische LPS gram-negativer Bakterien hat; dieses wird wie zuvor beschrieben durch den TLR-4 erkannt (Takeda, 2005). Der TLR-2 ist ein Beispiel dafür, dass TLRs multiple Partner haben können, mit denen sie interagieren.

Der TLR-3 spielt eine Rolle bei der Erkennung von dsRNA, die von den meisten Viren während der Replikation gebildet wird (Takeda, 2005).

Der TLR-5 bindet bakterielles Flagellin (Ramos, 2004; Hayashi, 2001) und stellt eine Besonderheit unter den Toll-like Rezeptoren dar, da das von ihm erkannte konservierte Muster im Gegensatz zu den anderen TLRs ein Protein ist (Ramos, 2004).

Die TLRs -7 und -8 erkennen kleine synthetische antivirale Moleküle (Jurk, 2002).

Für die immunologische Antwort auf unmethylierte CpG-Dinucleotide wird der TLR-9 benötigt (Hemmi 2000; Akira, 2004). Diese kommen vorwiegend in bakterieller und viraler DNA vor, wohingegen die CpG-Frequenz in Säugetierzellen niedrig ist und diese Dinucleotide meist methyliert sind, weshalb das Immunsystem mit Hilfe dieses spezifischen TLR's bakterielle und virale DNA von Selbst-DNA unterscheiden kann (Hemmi 2000; Takeda, 2005).

Der erst kürzlich bei der Maus entdeckte TLR-11 wird von Blasen-Epithelzellen exprimiert und spielt eine Rolle bei Infektionen durch uropathogene Bakterien; ein Ligand wurde jedoch noch nicht identifiziert (Takeda, 2005).

Zu den humoralen Faktoren der natürlichen Immunabwehr gehören neben dem Komplementsystem auch die freien natürlichen Antikörper. Produziert werden sie von CD5-positiven B-Zellen, sog. B1-Zellen (Casali, 1989; Vollmers 1989; Bohn, 1999; Boes, 2000; Brändlein 2003a; Dono, 2004; Vollmers, 2005b). Diese B1-Zellen unterscheiden sich phylogenetisch, phänotypisch und funktionell von den konventionellen B2-Lymphozyten (Martin, 2001; Kipps, 1989; Rothstein, 2002; Hayakawa, 2000; Herzenberg, 2000; Wortis, 2001; Vollmers, 2005b). Die Antikörper binden an das entsprechende Antigen und der Antigen-Antikörper-Komplex führt zur Aktivierung des Komplementsystems oder zur direkten Bindung durch Phagozyten, wodurch der Krankheitserreger abgetötet wird und weitere zelluläre Reaktionen induziert werden. Außerdem können natürliche Antikörper nach ihrer Bindung an Zellrezeptoren Apoptose oder Lipoptose (= eine spezielle Form der Apoptose von Tumorzellen durch intrazelluläre Lipidanhäufung) induzieren (Pohle, 2004; Vollmers, 2005a).

Natürliche Antikörper gehören hauptsächlich zur Klasse der IgM-Antikörper, aber gelegentlich auch zu den IgG- oder IgA-Antikörpern (Konishi, 1993; Boes, 2000; Casali, 1989; Vollmers, 2002). Diese IgM-Antikörper sind keimbahncodiert und erhöhen im Gegensatz zu Antikörpern der erworbenen Immunabwehr nicht ihre Variabilität durch Mutationsereignisse und Reifung. Jeder Antikörper muss ein breites Spektrum verschiedener spezifischer Antigene erkennen (beispielsweise verschiedene Kohlenhydrat-Muster) und deswegen ist die Affinität der natürlichen Antikörper zu jedem spezifischen Epitop relativ niedrig. Dagegen haben die gereiften Antikörper der erworbenen Immunabwehr eine hohe Affinität zu ihrem (einigen) Antigen (Campbell, 1987). Häufig wird deshalb davon gesprochen, dass natürliche Antikörper „unspezifisch“ reagieren.

Doch wozu dienen diese „unspezifisch“ reagierenden natürlichen Antikörper? Es wurde gezeigt, dass sie Selbst- und Nicht-Selbst-Antigene erkennen können (Konishi, 1993) und eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Beseitigung in den menschlichen Organismus eindringender Pathogene wie Bakterien, Viren und Parasiten (Trypanosoma, Leishmanien und Trichomonaden) spielen (Fearon, 1996; Boes, 1998, 2000; Ochsenbein, 1999; Konishi, 1993). Die natürlichen Antikörper sind dabei bereits

im menschlichen Körper zu finden bevor ein Kontakt des Immunsystems mit dem entsprechenden Antigen stattgefunden hat (Boes, 2000).

Ebenso sind die natürlichen Antikörper an der Elimination transformierter menschlicher Zellen (Tumorzellen) beteiligt (Vollmers, 2002, 2005a; Brändlein, 2003b). Tausende tumorreaktiver humaner monoklonaler natürlicher Antikörper wurden mit Hilfe der humanen Hybridoma Technologie (Trioma Technik) aus Krebspatienten und gesunden Probanden isoliert. Aus gesunden Patienten können sie vergleichbar häufig isoliert werden wie aus Tumorpatienten (Campbell, 1987). Gezeigt hat sich, dass nur Antikörper vom IgM-Typ mit Tumorzellen reagieren, nicht aber solche vom IgG- oder IgA-Isotyp (Brändlein, 2003b; Brändlein, 2004).

Spontan entstehende maligne Zellen werden nicht nur über eine Aktivierung des Komplementsystems beseitigt, sondern auch indem die natürlichen Antikörper die Apoptose dieser Zellen induzieren (Vollmers, 1989, 1995; Ollert, 1996; David, 1999; Hensel, 1999a, 2001b; Brändlein, 2002, 2003a, 2003b; Vollmers, 2005a, 2005b). Denn Apoptose ist der beste Weg, transformierte Zellen möglichst schnell und ohne Entzündungsprozess, durch den weiterer Schaden entstehen könnte, zu beseitigen.

Dass diese tumorspezifischen IgM-Antikörper auch in gesunden Personen vorkommen, d.h. dass sie also nicht erst infolge eines Antigenkontakts gebildet werden, ist ein guter Beweis für die Theorie, dass es sich dabei um vererbte Antikörper der innaten und nicht der erworbenen Immunabwehr handelt.

1.4 Humane Hybridoma Technologie

Die beste Methode solche rein humanen monoklonalen Antikörper herzustellen ist die klassische Hybridisierung von B-Zellen, die direkt aus lymphatischem Material von Krebspatienten und gesunden Probanden isoliert werden.

Am Pathologischen Institut der Universität Würzburg wurde in den letzten Jahren ein Verfahrensansatz zur Generierung derartiger humaner monoklonaler Antikörper entwickelt. Durch somatische Hybridisierung der B-Lymphozyten von Krebspatienten mit einer immortalisierten Heteromyelomzelle wurden Zellklone geschaffen, welche humane monoklonale Antikörper produzieren (Faller, 1990, siehe Abbildung 1). Hierzu wird sowohl Tumor- als auch lymphatisches Gewebe (Lymphknoten, Milz) von Karzinompatienten verwendet, welches routinemäßig während der Operation entnommen wurde. Ein Teil des Tumormaterials wird mit Formalin fixiert und in

Paraffin eingebettet. Zusätzlich wird Tumorgewebe kryotechnisch asserviert. Außerdem wird weiteres Tumormaterial zu einer Primärkultur verarbeitet, wenn das gewonnene Material steril vorliegt. Aus dem nativen lymphatischen Gewebe werden durch mechanische Zerkleinerung Einzelzell-Suspensionen gewonnen. Diese Einzelzellen werden im weiteren Verlauf durch somatische Hybridisierung mit einem Heteromyelom verschmolzen (Vollmers, 1989). Ein Teil der entstandenen Triome produziert humane monoklonale Antikörper, die sie in das Zellkulturmedium sezernieren. Zuerst werden die Immunglobulin-Isotypen dieser Antikörper mit Hilfe eines ELISA bestimmt. Im Folgenden werden diese Antikörper zur ersten Orientierung auf dem autologen Tumorgewebe durch immunhistochemische Methoden auf ihre Tumorreaktivität untersucht. Im weiteren Verlauf werden die monoklonalen Antikörper auch auf weiteren Karzinomen des gleichen Tumortyps, anderen Tumortypen sowie auf einer Reihe Normalgewebe einer Spezifitätsanalyse unterzogen. Durch diese selektive Testung werden nur die Antikörper weiter charakterisiert, die mit dem Tumor, nicht aber mit Normalgeweben reagieren.

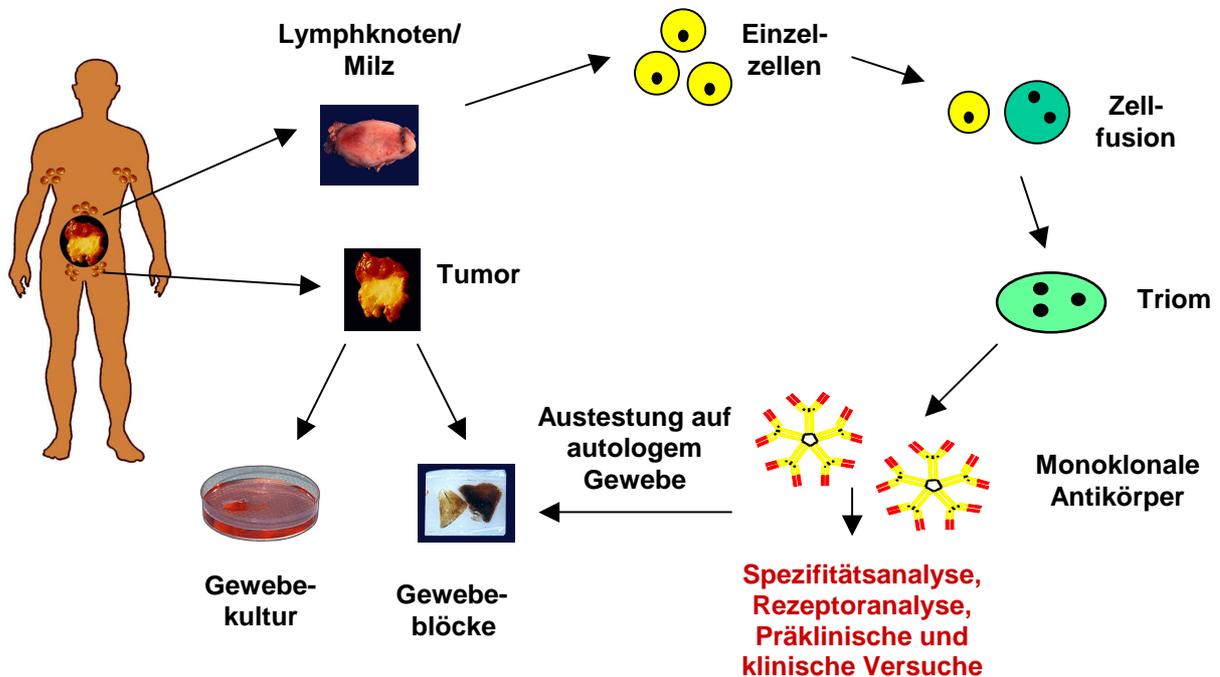


Abb. 1: Humane Hybridoma Technologie

Für solche tumorspezifischen Antikörper werden im Folgenden Rezeptoranalysen durchgeführt. Diese Analysen bieten die Möglichkeit, völlig neue unbekannte Antigene auf Tumorzellen zu charakterisieren. Eine solche Möglichkeit ist bei anderen Verfahren wie der Xenomouse-Technologie und dem Phagen-Display nicht gegeben. Ein weiterer Vorteil der humanen Hybridoma Technologie ist, dass die gewonnenen Antikörper komplette, intakte Immunglobuline darstellen und deshalb ohne weitere Modifikationen direkt präklinischen und klinischen untersucht werden können.

Der entscheidende Vorteil der klassischen Hybridisierungsmethode von B-Zellen aus Tumorpatienten liegt also darin, dass erstens humane und zweitens tumorspezifische Antikörper gefunden werden, welche drittens auch gegen vorher unbekannte Antigene gerichtet sein können. Durch diese Technologie erhält man folglich eine neue Selektion tumorspezifischer Antikörper und Oberflächenantigene, die sowohl für therapeutische und diagnostische Ansätze als auch für Fragen, welche die Tumorgenese und Tumorummunität betreffen, bedeutsam sind.

Durch das beschriebene Verfahren der humanen Hybridoma Technologie konnten mittlerweile mehrere humane monoklonale Antikörper und deren entsprechende Rezeptoren isoliert und charakterisiert werden (Vollmers, 1997, 1998; Hensel, 1999a, 1999b, 2001a, 2001b; Brändlein, 2002; Vollmers, 2002, 2005a). Zudem ist es durch diese Methode auch möglich, neue Einblicke in die humorale Immunität von Krebspatienten zu gewinnen (Hensel, 1999b; Brändlein, 2002).

1.5 Vorstellung der getesteten natürlichen IgM-Antikörper

Mit Hilfe dieser Technik konnten am Pathologischen Institut der Universität Würzburg humane monoklonale natürliche IgM-Antikörper erzeugt werden, die mit verschiedenen Tumorzellen reagieren.

In Tab.1 sind die Antikörper dargestellt, deren Kreuzreaktivität in dieser Arbeit weitergehend untersucht wurde, und aus welchen Patienten bzw. Probanden diese isoliert wurden.

Tab. 1: Verwendete Primär-Antikörper vom IgM-Typ (Zellkulturüberstände)

Name des natürlichen IgM-Ak:	isoliert aus Patient mit:
CM-1	Adeno-Ca. des Colon
CM-2	Adeno-Ca. des Colon
LM-1	Adeno-Ca. der Lunge
M6	Mamma-Ca.
NORM-1	gesunder Proband
NORM-2	gesunder Proband
NORM-3	gesunder Proband
NORM-4	gesunder Proband
PM-1	Adeno-Ca. des Pankreas
PM-2	Adeno-Ca. des Pankreas
PAM-1	Adeno-Ca. des Magens
SAM-1	Magen-Ca.
SAM-2	Magen-Ca.
SAM-3	Magen-Ca.
SAM-4	Magen-Ca.
SAM-5	Magen-Ca.
SAM-6	Magen-Ca.
SC-1	Siegelringzell-Ca. des Magens

1.5.1 Reaktionsmuster der IgM-Antikörper mit Tumorgeweben

Bisherige Forschungsergebnisse sprechen dafür, dass die Immunität gegen aberrante Zellen von einem Set an natürlichen IgM-Antikörpern bewerkstelligt wird, welche der angeborenen Immunität des Menschen entstammen. Der beste Beweis dafür, dass die natürliche Immunität für die Immunosurveillance-Mechanismen gegen entartete Zellen verantwortlich ist, wäre die Existenz tumorspezifischer IgM-Antikörper in gesunden Menschen. Um dies zu untermauern, wurden Antikörper aus Milzzellen von Probanden isoliert, die nicht an einem Tumorleiden erkrankt waren. Mit Hilfe der humanen Hybridoma Technologie wurden Lymphozyten aus normalen Milzen, analog dem

Vorgehen bei Tumorpatienten, mit einem Heteromyelom fusioniert, und die resultierenden Antikörper immunologisch, genetisch und molekularbiologisch charakterisiert. Auch diese Antikörper sind alle vom IgM-Isotyp, zeigen eine tumorspezifische Reaktion in den immunhistochemischen Analysen und weisen keinerlei Reaktionen mit normalen Geweben auf.

Die in Tab.1 aufgeführten Antikörper zeigen ein heterogenes Reaktionsmuster mit Tumorgewebe. Die Reaktion einiger Antikörper wie SC-1, CM-2 und SAM-2 beschränkt sich dabei auf spezifische Karzinome, während andere Antikörper wie PAM-1, LM-1, PM-2, SAM-3, SAM-4, SAM-6, PM-1 und CM-1 mit vielen Tumorgewebe wie Ösophagus-, Magen-, Colon-, Pankreas-, Lungen-, Mamma-, Ovarial-, Uterus- oder Prostata-Ca. reagieren. Zum Teil werden auch Vorläuferläsionen der Karzinome erkannt (Brändlein, 2002, 2003b).

1.5.2 Genetischer Ursprung der IgM-Antikörper

Die getesteten IgM-Antikörper (siehe Tab. 1) wurden zur näheren molekularen Charakterisierung sequenziert, und es erfolgte die Bestimmung der homologen Keimbahn-Gene.

In Tabelle 2a und 2b sind die Daten der Sequenz-Analysen der vorgestellten humanen IgM-Antikörper zusammenfassend dargestellt. Die Aufstellung umfasst die VH- und VL-Familien, die Keimbahn-Gene, die Homologie zum jeweiligen Keimbahn-Gen, sowie die stillen oder Aminosäure-Austausch-Mutationen in den FRs und den CDRs. Das Verhältnis von R- (replacement = Aminosäure-Austausch-Mutation) zu S- (silent = stille Mutation) Mutationen ist ein Maß für die Affinitätsreifung der Antikörper durch somatische Mutation. Liegt das R/S Verhältnis über 2,9 hat der Antikörper eine Reifung durch Antigen-Aktivierung durchgemacht (Shlomchik, 1987; Matsuda, 1998).

Tab. 2a: Sequenz-Analysen der schweren Immunglobulin-Ketten humaner, tumorspezifischer IgM-Antikörper

Schwere Immunglobulin-Kette					
Antikörper	VH-Familie	Keimbahn-Gen	Homologie [%]	R/S FR	R/S CDR
PM-1	VH3	DP-47, (IgHV3-23*01)	100	0/0	0/0
PM-2	VH3	DP-47, (IgHV3-23*01)	100	0/0	0/0
SAM-4	VH3	DP-47 (IgHV3-23)	100	0/0	0/0
SC-1	VH3	DP-49, (IgHV3-30/3-30.5*01)	97	4/2	2/0
PAM-1	VH3	DP-49, (IgHV3-30/3-30.5*01)	100	0/0	0/0
CM-1	VH3	DP-49, (IgHV3-30/3-30.5*01)	100	0/0	0/0
SAM-5	VH3	DP-49 (IgHV3-30)	99,3	0/0	0/2
SAM-3	VH3	DP-49 (IgHV3-30)	100	0/0	0/0
SAM-6	VH4	DP-49 (IgHV3-30)	100	0/0	0/0
SAM-1	VH3	DP-42 (IgHV3-53)	99,6	0/0	0/1
LM-1	VH4	DP-65, (IgHV4-30.1/4-31*01)	99,6	1/0	0/0
CM-2	VH5	DP-73, (IgHV5-51*01)	97,2	2/1	3/2

Tab. 2b: Sequenz-Analysen der leichten Immunglobulin-Ketten humaner tumorspezifischer IgM-Antikörper

Leichte Immunglobulin-Kette					
Antikörper	VL-Familie	Keimbahn-Gen	Homologie [%]	R/S FR	R/S CDR
SAM-1	λ III	DPL-23, (IgLV3-1*01)	100	0/0	0/0
SAM-6	λ III	DPL-23, (IgLV3-1*01)	99,6	1/0	0/0
SAM-5	λ I	DPL-5, (IgLV1-51*01)	94,8	6/3	4/2
SAM-4	λ I	DPL-8, (IgLV1-40*01)	98,6	3/0	0/1
SC-1	λ	DPL-23, (IgLV3-1*01)	96,8	3/2	3/0
PAM-1	λ	LV318, (IgLV3-21*03)	98,7	3/0	0/1
CM-1	λ	IgLV3-25*03	99,3	1/1	0/0
PM-1	λ	IgLV3-10*01	99,0	2/1	0/0
PM-2	λ	IgLV5-45*01	98,2	3/2	0/0
CM-2	λ	DPL-11, (IgLV2-14*01)	97,2	0/2	4/2

Da das R/S-Verhältnis der hier dargestellten Antikörper durchgehend bei unter 2.9 liegt, gehören die Antikörper somit zur Gruppe der nicht affinitätsgereiften, natürlichen Antikörper. Die Sequenzanalysen der Immunglobuline ergaben, dass sowohl die schweren als auch die leichten Ketten der IgM-Antikörper von ganz bestimmten Keimbahn-Gen-Familien codiert werden. Die verwendeten Keimbahn-Gene der schweren Immunglobulin-Ketten gehören hauptsächlich der VH3- und VH4-Familie an. Interessant ist außerdem die Beobachtung, dass die leichten Ketten vorwiegend vom λ -Typ sind. Dies steht im Gegensatz zur Relation von κ und λ , wie es im Repertoire von affinitätsgereiften Antikörpern zu finden ist (72:25). Bei den schweren Immunglobulin-Ketten zeigt sich, wie bereits erwähnt, eine auffällige Häufung der VH3- und VH4-Familie. Innerhalb der VH3-Familie zeigen sich vor allem DP49 und DP47 dominant. Eine Vielzahl der Antikörper weist keinerlei Mutation auf. Betrachtet man die Gesamtzahl der Mutationen der beiden Immunglobulin-Ketten, zeigen die Antikörper SAM-5, CM-2 und SC-1 im Vergleich mit den übrigen Antikörpern die meisten Mutationen.

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass das Reaktionsmuster, d.h. die Reaktionen der Antikörper mit verschiedenen Tumoren, mit dem Grad ihrer Mutation zu korrelieren scheint (Brändlein, 2003b). Je mehr Mutationen ein Antikörper aufweist, desto spezifischer ist seine Reaktion mit nur einem speziellen Tumortyp.

Drei Beispiele sollen dies verdeutlichen:

Der Antikörper SC-1, der mehrere Mutationen in den „Complement Determining Regions“ (CDRs) aufweist, ist beispielsweise hochspezifisch gegen Siegelringzellen bei Magenkarzinomen gerichtet und zeigt keine Kreuzreaktionen mit anderen Geweben. Es handelt sich bei dem SC-1 Antikörper um einen IgM- λ -Antikörper, der von einem leicht mutierten DP-49 Gen der VH3-Familie (IgHV3-30/3.30.5*01) codiert wird (Vollmers, 1998a). Hierbei finden sich in der „Framework“-Region (FR) der schweren Immunglobulin-Kette vier Aminosäure-Austausch-Mutationen und zwei stille Mutationen, sowie in der CDR zwei Aminosäure-Austausch-Mutationen. Die Homologie zum Keimbahn-Gen DP-49 beträgt 97 %. Die leichte λ -Immunglobulin-Kette ist zu 96,8 % homolog zur Sequenz ihres Keimbahn-Gens (DPL-23, V λ III) und weist in der FR drei Aminosäure-Austausch- und zwei stille Mutationen sowie in der CDR drei Aminosäure-Austausch-Mutationen auf.

Auch der Antikörper CM-2, der mehrere Mutationen hat, zeigt nur spezifische, positive Reaktionen mit Adenokarzinomen des Dickdarmes.

Beim Antikörper PAM-1 handelt es sich ebenfalls um einen IgM- λ -Antikörper, der von einem nicht mutierten DP-49 Gen der VH3-Familie (IgHV3-30/3.30.5*01) codiert wird (Hensel, 1999b, 2001a). Die Homologie zur Keimbahnsequenz beträgt im Fall der schweren Immunglobulin-Kette 100 %. Die leichte λ -Immunglobulin-Kette weist drei Aminosäure-Austausch-Mutationen in der FR auf sowie eine stille Mutation in der CDR. Die Homologie zum Keimbahn-Gen (IgLV3-21*03) beträgt damit 98,7 %. PAM-1 reagiert wie schon erwähnt mit fast allen getesteten epithelialen Tumoren und Vorstufen. Ähnliche Phänomene lassen sich bei Antikörpern aus Pankreas, Lungen und Kolonkarzinompatienten beobachten (Brändlein, 2002). Die Gesamtzahl der Mutationen ist offensichtlich reziprok mit dem Grad der Tumor-Reaktivität der Antikörper korreliert. Dies deutet darauf hin, dass auch innerhalb der keimbahncodierten Antikörper durch vereinzelte Mutationen eine höhere Variabilität erzeugt werden kann. Ähnlich wie bei der Affinitätsreifung der erworbenen Immunität, scheint sich auch hier die Spezifität mit der Anzahl der Mutationen zu erhöhen. Interessant wäre nun zu wissen, ob sich diese Tatsache auch bei der Reaktion natürlicher Antikörper mit anderen Antigenen, beispielsweise bakteriellen oder körpereigenen Antigenen feststellen lässt.

Auch die tumorspezifischen IgM-Antikörper aus gesunden Probanden wurden sequenziert und die homologen Keimbahn-Gene bestimmt. Die Analyse zeigte, dass sie ebenfalls nicht oder nur wenig mutiert sind und demnach zur Klasse der nicht affinitäts-gereiften, natürlichen Antikörper gehören (siehe Tab. 3a/b). Es werden die gleichen schweren und leichten Immunglobulin-Ketten verwendet wie bei Antikörpern aus Tumorpatienten (vgl. Tab. 2a/b). Der Antikörper NORM-1 wird z.B. durch das gleiche unmutierte Gen der VH3-Familie determiniert wie die Antikörper PM-1 und PM-2. Nur die verwendeten D- und J-Segmente unterscheiden sich. Auch die gering mutierte leichte λ -Immunglobulin-Kette des Antikörpers NORM-1 ist der von PM-1 homolog. Es wird jedoch wiederum ein unterschiedliches J-Segment verwendet. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die tumorspezifischen Antikörper aus gesunden Probanden *in vitro* Apoptose von Tumorzellen induzieren (Brändlein, 2003b). Das bedeutet, dass sich auch in gesunden Menschen dieselbe Art tumorreaktiver Antikörper finden lässt wie in Karzinompatienten. Diese Ergebnisse erhärten die Beobachtung, dass die Tumorreaktivität der Antikörper nicht das Ergebnis der erworbenen Immunität ist, sondern vielmehr der natürlichen angeborenen Immunität zuzuordnen ist.

Tab. 3a: Sequenz-Analysen der schweren Immunglobulin-Ketten humaner, tumorspezifischer IgM-Antikörper aus gesunden Probanden

Schwere Immunglobulin-Kette					
Antikörper	VH-Familie	Keimbahn-Gen	Homologie [%]	R/S FR	R/S CDR
NORM-1	VH3	DP-47, (IgHV3-23*01)	100	0/0	0/0
NORM-2	VH3	DP-77, (IgHV3-21*01)	100	0/0	0/0
NORM-3	VH3	DP-47, (IgHV3-23*01)	98,6	2/2	0/0
NORM-4	VH3	DP-49, (IgHV3-30/3-30.5*01)	99,6	1/0	0/0

Tab. 3b: Sequenz-Analysen der leichten Immunglobulin-Ketten humaner, tumorspezifischer IgM-Antikörper aus gesunden Probanden

Leichte Immunglobulin-Kette					
Antikörper	VL-Familie	Keimbahn-Gen	Homologie [%]	R/S FR	R/S CDR
NORM-1	λ	IgLV3-10*01	99,3	1/1	0/0
NORM-2	λ	IgLV1-40*01	99,6	1/0	2/0
NORM-3	λ	IgLV3-10*01	98,6	2/2	0/0
NORM-4	λ	IgLV1-47*01	99,6	1/0	2/0

1.6 Auswahl der getesteten Antigene

Wie bereits erwähnt, sagt man, dass die natürlichen Antikörper „unspezifisch“ reagieren. So sind sie nicht nur gegen Pathogene wie Bakterien, Viren und Parasiten (Trypanosoma, Leishmanien und Trichomonaden) gerichtet, die in den menschlichen Organismus eindringen (Konishi, 1993), sondern auch gegen mutierte menschliche Zellen (Pfaff, 1990; Vollmers, 1989, 2002; Vollmers, 2005b), veränderte körpereigene Substanzen (z.B. oxidiertes LDL) und gegen körpereigene intrazelluläre Moleküle (z.B. Zytoskelett-Proteine und nukleäre Antigene), die erst bei Zellnekrose freigesetzt und dem Immunsystem zugänglich gemacht werden (McKnight, 1990; Campbell, 1987). Derartige Kreuzreaktionen der natürlichen Antikörper wurden bereits 1986 beobachtet (Cote, 1986; Campbell, 1987; Lloyd, 1989; McKnight, 1990; Pfaff, 1990). Die meisten

dieser Bindungen sind unspezifische *in vitro* Artefakte, aber bei einigen dieser Bindungen handelt es sich um spezifische Reaktionen, bezogen auf die Funktion der natürlichen Antikörper.

Untersucht wurden im Rahmen dieser Arbeit Kreuzreaktionen der in Tab. 1 genannten tumorspezifischen natürlichen IgM-Antikörper mit Antigenen, die im menschlichen Körper intrazellulär vorkommen, nämlich die Zytoskelettbestandteile Actin und Myosin und die intermediären Filamente Vimentin, Desmin und Keratin, außerdem noch humane Plazenta-DNA. Des Weiteren wurden Kreuzreaktionen mit solchen bakteriellen Antigenen getestet, die auch an Toll-like Rezeptoren binden und somit die innate Immunabwehr aktivieren. Ausgewählt wurden für die Versuche bakterielle Membranbestandteile wie Lipopolysaccharid, Lipoteichonsäure und Peptidoglykan, außerdem Flagellin, Heat Shock Protein 70, die *H. pylori*-Proteine CagA und VacA und letztlich noch bakterielle DNA.

1.7 Ziel der Arbeit

Von den getesteten natürlichen IgM-Antikörpern (Tab. 1) konnte gezeigt werden, dass diese Antikörper Tumorzellen erkennen und deren Apoptose induzieren können. Frühere Untersuchungen ergaben, dass natürliche Antikörper an der Beseitigung verschiedener in den menschlichen Organismus eindringender Pathogene wie Bakterien, Viren und Parasiten beteiligt sind und auch an körpereigene Strukturen binden, die bei Zellnekrose freigesetzt werden und vom Immunsystem entfernt werden müssen. Da natürliche Antikörper nur Muster erkennen, die auf diesen Antigenen wiederholt zu finden sind, spricht man davon, dass sie recht „unspezifisch“ reagieren.

In dieser Arbeit soll gezeigt werden, dass es innerhalb der natürlichen Antikörper verschiedene Pools gibt, die unterschiedliche Aufgaben haben, und dass natürliche Antikörper nicht wahllos irgendwelche Antigene binden, sondern dass sich ihr Reaktionsmuster aus ihrer Aufgabe innerhalb des menschlichen Immunsystems ergibt. So soll gezeigt werden, dass den untersuchten Antikörpern (siehe Tab. 1) hauptsächlich die Aufgabe zukommt, transformierte Zellen zu beseitigen, und dass ihr Bindungsmuster also nicht „unspezifisch“, sondern „oligospezifisch“ innerhalb ihres Aufgabenbereichs ist.

Außerdem soll untersucht werden, ob die Intensität und das Muster der auftretenden Kreuzreaktionen mit dem genetischen Ursprung der natürlichen Antikörper bzw. der Anzahl ihrer Mutationen zusammenhängen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bezugsquellen der verwendeten Verbrauchsmittel

Die Verbrauchsmittel wurden von folgenden Firmen bezogen:

ELISA-96-Well-Platten Falcon®35 3912	Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA
FCS	GIBCO, Karlsruhe
Fico Lite H	Roche, Mannheim
HAT supplement	PAA, Wien
L-Glutamin	PAA, Wien
OPD	Dako, Hamburg
PEG 1500	Roche, Mannheim
Penicillin/Streptomycin	GIBCO, Karlsruhe
RPMI-1640 Medium	PAA, Wien

Alle übrigen Plastikwaren wurden von der Firma Greiner Labortechnik (Frickenhausen) geliefert.

Verwendeter Sekundär-Antikörper

Rabbit anti human IgM, HRP	Dako, Hamburg
----------------------------	---------------

Tab. 4: Bezugsquellen der verwendeten Antigene

Actin of rabbit muscle	Sigma, München
<i>Clostridium perfringens</i> (<i>Cl. welchii</i>)-DNA	Sigma, München
Desmin from chicken stomach	ImmunO™ MP Biomedicals, Aurora, Ohio, USA
<i>Escherichia coli</i> Strain B-DNA	Sigma, München
Flagellin von <i>Salmonella typhimurium</i>	InvivoGen, San Diego, USA
Heat Shock Protein 70 von <i>Mycobacterium smegmatis</i>	Sigma, München
<i>Helicobacter pylori</i> CagA	ibt - immunological & biochemical testsystems, Reutlingen
<i>Helicobacter pylori</i> VacA (Toxin)	ibt - immunological & biochemical testsystems, Reutlingen
Human Placenta DNA	Sigma, München
Keratin from human epidermis	Sigma, München
Lipopolysaccharid von <i>Escherichia coli</i> 055:B5	Sigma, München
Lipoteichonsäure von <i>Staphylococcus aureus</i>	InvivoGen, San Diego, USA
Myosin of rabbit muscle	Sigma, München
Peptidoglykan von <i>Staphylococcus aureus</i>	InvivoGen, San Diego, USA
Vimentin from bovin lens	Sigma, München

Tab. 5: Übersicht über die eingesetzten Antigen-Konzentrationen

	Ausgangskonzentration	Zur Auswertung verwendete 1:100- Verdünnung der Ausgangskonzentration
Actin	1 mg/ml	10 µg/ml
Myosin	5 mg/ml	50 µg/ml
Keratin	1 mg/ml	10 µg/ml
Desmin	0,5 mg/ml	5 µg/ml
Vimentin	0,33 mg/ml	3,33 µg/ml
Humane Plazenta DNA	0,5 mg/ml	5 µg/ml
<i>E. coli</i> DNA	0,5 mg/ml	5 µg/ml
<i>Cl. perfringens</i> DNA	0,5 mg/ml	5 µg/ml
LTS	1 mg/ml	10 µg/ml
PGN	1 mg/ml	10 µg/ml
Flagellin	0,5 mg/ml	5 µg/ml
HSP 70	1 mg/ml	10 µg/ml
LPS	1 mg/ml	10 µg/ml
<i>H. pylori</i> CagA	0,33 mg/ml	3,33 µg/ml
<i>H. pylori</i> VacA	0,33 mg/ml	3,33 µg/ml

2.1.2 Geräte

Für die Arbeit wurden Geräte folgender Firmen verwendet:

Aquabidest-Anlage Milli-Q Plus PF	Millipore, Eschborn
Brutschrank	Heraeus Thermotech, Hanau
ELISA-Reader Modell 550	Bio-Rad, München
Kühl- und Gefrierschrank	Quelle, Fürth
Multipipette	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhelfer accu-jet	Brand, Wertheim/Main
Vortex Mixer NeoLab 7-2020	Bender/Hobein, Zürich
Waage	Sartorius, Göttingen

2.1.3 Software

Die Absorptionsmessungen der ELISA-Platten erfolgten mit Hilfe des Programms Microplate Manager PC Version 4.0 (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA)

Für statistische Auswertungen und graphische Darstellungen wurde das Programm Excel (Microsoft, USA) verwendet.

2.1.4 Medien, Lösungen, Puffer

- Medium zum Blocken freier Bindungsstellen der ELISA-Platten, zur Verdünnung der Antikörper-Konzentrationen und zur Zellkultur

RPMI-1640 mit den Zusätzen:

1 % Penicillin/Streptomycin

1 % Glutamin

10 % FCS

- Selektionsmedium für die somatische Hybridisierung

RPMI-1640 mit den Zusätzen:

1 % Glutamin

1 % Penicillin/Streptomycin

10 % FCS

2 % HAT supplement (50 x) (5 mM Hypoxanthin, 20 µM Aminopterin,
0,8 mM Thymidin)

- Einfriermedium

RPMI-1640 mit den Zusätzen:

1 % Glutamin

1 % Penicillin/Streptomycin

20 % FCS

10 % DMSO

- Wasserstoffperoxid H₂O₂

- PBS, pH 7,4

120 mM NaCl

2 mM KCl

3 mM KH₂PO₄

7 mM Na₂HPO₄

- PBS-Tween

0,05 % Tween-20® ad PBS

- Citratpuffer

7,15 g Citronensäure-Monohydrat

11,85 g NaHPO₄ x 2H₂O

ad 1 l A. dest.

- Schwefelsäure

3 M H₂SO₄

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung humaner monoklonaler Antikörper durch somatische Hybridisierung

2.2.1.1 Gewinnung von Lymphozyten aus Patientenmaterial

Milzen und Lymphknoten wurden während der Operation entfernt und nativ und steril ins Pathologische Institut gebracht. Die Milz bzw. die Lymphknoten wurden in kleine Stückchen geschnitten und anschließend durch ein Gewebesieb (Maschengröße 60 mesh) gedrückt. Die erhaltene Zellsuspension wurde zweimal mit RPMI-1640 gewaschen und bei 1500 rpm 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml RPMI-

1640 aufgenommen und mit einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl der Lymphozyten pro ml bestimmt. Die Zellen wurden entweder sofort fusioniert oder in Einfriermedium (RPMI-1640, 20 % FCS, 10 % DMSO) überführt und je 5×10^6 Zellen pro Einfrierrohrchen portioniert. Die Zellen wurden stufenweise gekühlt und bei -80°C eingefroren. Zur längerfristigen Lagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt und bei Bedarf aufgetaut.

Zur Gewinnung von Lymphozyten aus dem Knochenmark wurde das mit gerinnungshemmenden Substanzen versetzte Patientenmaterial zweimal mit je 20 ml Kulturmedium gewaschen und ein Ficoll-Gradient durchgeführt. Hierzu wurden 20 ml des Trennmediums Fico Lite H in einem sterilen Zentrifugenröhrchen vorgelegt und langsam 20 ml der Knochenmarksuspension derart hinzugefügt, dass zwei Phasen entstanden. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 1500 rpm ohne Bremse konnten dann die entsprechend dem Dichtegradienten (Ficoll-Gradient) aufgetrennten Zellarten in Form verschieden breiter Banden im Trennmedium differenziert werden. Die Bande, welche die Lymphozyten enthielt, wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen erneut zweimal mit je 20 ml Medium gewaschen. Das Lymphozytenpellet wurde je nach Größe in 2 bis 10 ml Medium aufgenommen und die Anzahl der Lymphozyten pro ml bestimmt. Die Zellen wurden entweder sofort fusioniert oder für eine spätere Verwendung eingefroren.

2.2.1.2 Somatische Hybridisierung

Zur Herstellung humaner monoklonaler Antikörper wurde die Methode der humanen Hybridoma Technologie angewandt. Zur Immortalisierung wurden die Lymphozyten mit einem Fusionspartner, dem Heteromyelom HAB-1 (Faller, 1990), nach Standardprotokoll fusioniert und kultiviert (Vollmers, 1989). Dieses Heteromyelom wurde am Pathologischen Institut in Würzburg hergestellt und wird seit über 10 Jahren für die Herstellung stabiler Klone verwendet.

Für die Fusion wurden zunächst die Lymphozyten und die HAB-1 Zellen zweimal mit 10 ml RPMI-1640 Medium gewaschen und ihre genaue Anzahl bestimmt. Pro Fusion wurden ca. 5×10^7 Lymphozyten mit 2×10^7 HAB-1 Zellen verwendet. Das Verhältnis der Gesamtzellzahl von HAB-1 Zellen zu Lymphozyten wurde so gewählt, dass es immer bei 1:2 oder 1:3 lag. Die beiden Zelltypen wurden im Weiteren vermischt und je nach Gesamtzellzahl wurde eine entsprechende Menge an vorgewärmtem PEG 1500

(Polyethylenglycol 1500, Roche) vorsichtig zu dem Zellgemisch getropft. Das Gemisch wurde anschließend für genau 90 sek bei 37°C in einem Wasserbad unter leicht rotierenden Bewegungen inkubiert. Danach wurden 30 ml RPMI-1640 Medium vorsichtig hinzugegossen um das PEG zu entfernen. Die Zellen wurden für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und das Pellet in HAT-Selektionsmedium (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf 24-Loch Zellkulturplatten derart verteilt, dass pro well eine Gesamtzellzahl von 1×10^6 in 2 ml Selektionsmedium vorlag. Die Zellkulturplatten wurden bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach ca. einer Woche starben alle Zellen, die nicht zu einem Triom verschmolzen waren, ab. Einmal pro Woche wurden 50 % des Mediums durch frisches Selektionsmedium ersetzt. Aus erfolgreich fusionierten Zellen wuchsen im Laufe der Zeit Zellklone heran. Das Wachstum der Triome wurde mikroskopisch kontrolliert. Nach 3 bis 4 Wochen wurden die Kulturüberstände der Hybridome durch Antikörper-ELISA auf ihren Immunglobulin-Gehalt getestet. Im weiteren Verlauf wurden die Klone, welche Antikörper produzierten und in das Kulturmedium sezernierten, der weiteren Testung zugeführt. Nachfolgend wurden die Kulturüberstände der ELISA-positiven Hybridoma-Klone einer immunhistochemischen Färbung auf dem autologen Tumor unterzogen. Hybridom-Klone, deren Überstände eine positive Reaktion mit autologen Tumorzellen zeigten, wurden sofort rekloniert, um eine höhere Stabilität der Klone zu erreichen und Monoklonalität zu garantieren.

2.2.1.3 Reklonierung der Antikörper-produzierenden Hybridome

Um eine höhere Stabilität der Hybridoma-Klone zu erreichen und zudem Monoklonalität zu garantieren wurde eine Reklonierung durchgeführt. Als Grundlage hierfür wurden zunächst Feederzellen gewonnen und ausplattiert. Hierzu wurden Mäuse getötet und die Milzen entfernt. Zur mechanischen Zerkleinerung wurden die Milzen durch ein Gewebesieb (Maschengröße 60 mesh) gedrückt. Die erhaltene Feederzellsuspension wurde zweimal mit RPMI-1640 gewaschen und bei 1500 rpm 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml RPMI-1640 aufgenommen und die Zellen für 30 min einer Strahlendosis von 30 gray ausgesetzt um die Proliferation der Milzzellen zu verhindern. Die Bestrahlung erfolgte im Institut für Medizinische Strahlenkunde der Universität Würzburg. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen nochmals mit

Kulturmedium gewaschen und auf 96-Loch Zellkulturplatten ausplattiert (100 µl pro well). Für vier Zellkulturplatten wurden die bestrahlten Zellen einer Maus-Milz verwendet. Die Hybridom-Zellen wurden gewaschen und ihre Zellzahl bestimmt. Danach wurde die Zellzahl so eingestellt, dass eine Zelldichte von 100 oder 10 Zellen pro 10 ml vorlag und die Zellen in 100 µl auf die 96-Loch Zellkulturplatten verteilt. Die Platten wurden mikroskopisch durchmustert und alle Wells, welche nur eine Zelle enthielten, markiert. Einmal pro Woche wurden 50 % des Mediums durch frisches Kulturmedium ersetzt. Es wurden nur solche Klone weiter herangezogen, welche aus einer Ursprungszelle heranwuchsen. Nach ungefähr zwei Wochen wurden die Kulturüberstände der herangewachsenen monoklonalen Hybridome erneut mittels Antikörper-ELISA auf ihren Immunglobulin-Gehalt getestet. Nachfolgend wurden die Kulturüberstände der ELISA-positiven Hybridoma-Klone einer immunhistochemischen Färbung auf dem autologen Tumor unterzogen. Hybridoma-Klone, deren Überstände die beste positive Reaktion mit autologen Tumorzellen zeigten, wurden ausgewählt und weiter kultiviert.

2.2.1.4 Kultivierung von Hybridomen

Die monoklonalen Antikörper wurden mittels der in der Einleitung beschriebenen Trioma-Technik gewonnen. Dazu wurden die durch somatische Hybridisierung von B-Zellen mit immortalisierten Heteromyelomzellen gewonnenen Triome in Kulturmedium (RPMI-1640 Medium) mit 10 % (v/v) FCS und den Supplementen L-Glutamin (20 mM) und Penicillin/Streptomycin (je 1 % v/v) angezüchtet. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen bzw. Gewebekulturschalen bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die Hybridomzellen wurden bis zu einer Zelldichte von 1×10^8 Zellen/ml angezogen, dann in sterile Zentrifugenröhrchen überführt und durch Zentrifugation pelletiert. Die Überstände der Hybridome wurden gesammelt und die Ig-Antikörperkonzentrationen der gesammelten Hybridom-Kulturüberstände durch nephelometrische Messung bestimmt. Die Messungen wurden in einem Speziallabor der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg durchgeführt. Die Kulturüberstände wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. 1/5 der Hybridomzellen wurde für die weitere Kultivierung verwendet. Die Hybridomzellen blieben im Durchschnitt 8 bis 10 Wochen in Kultur, bis die Antikörperproduktion geringer wurde.

2.2.2 Nephelometrie

Die Nephelometrie ist ein optisches Analyseverfahren, mit dem man in Suspensionen und anderen trüben Dispersionen den Feststoff-Anteil bestimmen kann. Sie beruht auf dem Faraday-Tyndall-Effekt. Ein einfallender Lichtstrahl trifft auf die gelösten Partikel in der Probe (in diesem Fall sind es die im Medium befindlichen natürlichen IgM-Antikörper) und die Intensität des Streulichtes, das in einem bestimmten Winkel austritt, wird gemessen (Streulichtmessung = Tyndallometrie/Nephelometrie). So kann die Konzentration der im Medium gelösten Antikörper bestimmt werden: Je größer die Streulichtintensität ist, desto höher ist die Antikörper-Konzentration.

2.2.3 ELISA

Zur Testung aller Antigen-Antikörper-Reaktionen wurde das ELISA-Verfahren angewandt.

Zunächst erfolgte die Durchführung der Versuche mit einer konstanten IgM-Antikörper-Konzentration von 20 µg/ml und einer Verdünnung der Ausgangskonzentration der in Tab. 5 angegebenen Antigene auf 1:100, 1:500, 1:1.000, 1:5.000 und 1:10.000. Anschließend wurde in einer zweiten Versuchsreihe die Konzentration der IgM-Antikörper verändert und deren Reaktion mit einer konstant belassenen Antigen-Konzentration bestimmt, wobei sowohl eine Testung der 1:100-Verdünnung als auch der 1:500-Verdünnung der Antigen-Ausgangskonzentration erfolgte. In grenzwertigen, d. h. nicht eindeutig positiv oder negativ zu wertenden Ergebnissen wurden die entsprechenden Versuche wiederholt.

Zur Durchführung der Versuche wurden 96-Well-ELISA-Platten mit 30 bzw. 50 µl pro Well des zu untersuchenden Antigens beschichtet, anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht im Kühlschrank. Am nächsten Tag wurden die Platten zweimal mit PBS gewaschen und dann mit 100 µl RPMI-1640 mit den Zusätzen 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Glutamin und 10 % FCS pro Well beschichtet. Dieser Arbeitsschritt dient zur Belegung freier, noch nicht antigenbesetzter Bindungsstellen der Kunststoff-Platten. Die Platten wurden dann eine Stunde bei RT abgedeckt stehen gelassen und anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die zu untersuchenden Primär-Antikörper an die Mikrotiterplatten gebunden, indem 50 µl der natürlichen IgM-

Antikörper jeweils als Doppelbestimmung in die Wells pipettiert wurden; als Negativkontrolle diente eine Doppelbestimmung mit RPMI-1640. Die so beschichteten ELISA-Platten wurden eine Stunde bei 37⁰C in den Brutschrank gestellt. Diejenigen Primär-Antikörper, die ein passendes Epitop auf dem Antigen erkennen, können in dieser Zeit daran binden. Nach der Inkubationszeit wurden die Platten zweimal mit PBS, zweimal mit PBS-Tween 0,05 % und nochmals zweimal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden jeweils 50 µl des Sekundär-Antikörpers in der Konzentration 1,3 g/ml (verdünnt mit PBS-Tween 0,05 %) in alle Wells pipettiert. Dabei handelt es sich um einen monoklonalen Rabbit-Anti-Human-IgM-Antikörper, der mit dem Enzym HRP konjugiert ist. Dieser Zweit-Antikörper bindet während der nun folgenden einstündigen Inkubationzeit im Brutschrank mit seinem F_{ab}-Teil an alle an das Antigen gebundenen Primär-IgM-Antikörper. Nach diesem Bindungsvorgang wurden die Mikrotiterplatten wiederum gewaschen: diesmal zweimal mit PBS, einmal mit PBS-Tween 0,05 %, zweimal mit PBS und zuletzt zweimal mit Citratpuffer.

Für den nun folgenden letzten Arbeitsschritt musste eine Färbelösung vorbereitet werden: Dazu wurden in 3 ml Citratpuffer 5 µl H₂O₂ und 1 OPD-Tablette gelöst (entspricht 0,03 % Orthophenyldiamin und 0,02 % Hydrogenperoxid in Citratpuffer). 50 µl dieser Lösung wurden in jedes der 96 Wells der ELISA-Platte pipettiert. Bei positiver Reaktion erfolgte eine Gelbfärbung der Lösung; der Reaktionsvorgang wurde nach drei Minuten mit 3 M H₂SO₄ beendet. Die Auswertung der Reaktionen erfolgte mittels Absorptions-Messung im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 490 nm und Errechnung des Mittelwerts aus den Doppelbestimmungen.

Es zeigte sich, dass einige der getesteten natürlichen Antikörper auch mit unbeschichteten ELISA-Platten reagierten. In diesen Fällen konnte die Intensität der Gelbfärbung also nicht allein auf die Reaktion der Antikörper mit dem Antigen zurückgeführt werden. Zudem waren die Background-Werte der Antikörper nicht konstant, sondern variierten je nach äußeren Bedingung (Raumtemperatur, Luftfeuchtigkeit etc.). Deshalb wurde bei jedem Versuch parallel dazu der Background-Mittelwert jedes Antikörpers bestimmt. Dazu wurde eine unbeschichtete, aber mit RPMI-1640 geblockte ELISA-Platte mit allen Antikörper-Konzentrationen jeweils wieder als Doppelbestimmung inkubiert. Das weitere Vorgehen war analog zu den oben

beschriebenen Versuchen. Der ermittelte Background-Mittelwert wurde vom gemessenen Ergebnis der Antigen-Antikörper-Reaktion abgezogen.

Eine beginnende Gelbfärbung eines Wells entsprach einer mit dem ELISA-Reader gemessenen Absorption von 0,1 OD. Von diesem Wert wurde der Absorptionswert der Negativ-Kontrolle, dessen Mittelwert bei 0,06 OD lag, abgezogen, so dass also dann der Grenzwert für eine positiv zu wertende Reaktion 0,04 OD betrug. Eine Antigen-Antikörper-Reaktion wurde dann als positiv gewertet, wenn dieser Wert nach Abzug des Background-Mittelwertes bei einer Antikörper-Konzentration von 20 µg/ml erreicht wurde und zudem eine Abhängigkeit des gemessenen Absorptionswertes von der eingesetzten Antikörper-Konzentration erkennbar war. Denn eine Antigen-Antikörper-Reaktion ist nur dann spezifisch, wenn sie titrierbar ist. Andernfalls könnte z. B. eine unspezifische Bindung über den F_c-Teil erfolgt sein.

3 Ergebnisse

3.1 Kreuzreaktionen der natürlichen IgM-Antikörper mit körpereigenen

Antigenen

Zunächst wurden die Reaktionen der in Tab. 1 genannten natürlichen IgM-Antikörper mit körpereigenen Antigenen getestet, die in menschlichen Zellen physiologischerweise vorkommen. Ausgewählt wurden hierfür die Cytoskelettbestandteile Actin und Myosin, die intermediären Filamente Vimentin, Desmin und Keratin und zudem noch humane Plazenta-DNA. Diese Antigene liegen normalerweise intrazellulär geschützt vor und kommen erst bei Zellnekrose mit dem Immunsystem in Kontakt. Sie werden dann als Nicht-Selbst-Strukturen erkannt und bekämpft.

3.1.1 Actin

Zuerst wurde getestet, ob die natürlichen Antikörper Actin erkennen. Actinfilamente finden sich zum einen in Muskelzellen, wo sie im Zusammenspiel mit Myosin zur Muskelkontraktion führen. Des Weiteren kommen Actinfilamente auch in vielen Nicht-Muskelzellen vor. Hier vermitteln sie ebenso durch ihre Wechselwirkung mit Myosin das Phänomen der Motilität (z. B. Formveränderung der Thrombozyten bei deren Aggregation, Phagozytose, amöboide Fortbewegung vieler Zellen, Bildung des kontraktilen Rings, der für die Abschnürung der Tochterzelle bei der Zellteilung nötig ist) (Löffler, 1998a). Außerdem dienen Actinfilamente in vielen Zellen in Form von Faserbündeln der Gewährleistung einer gewissen mechanischen Stabilität: So sind sie an der Ausbildung der Zonula adhaerens sowie der TypII-Desmosomen beteiligt.

Die Auswertung der Versuche erfolgte bei einer Actin-Konzentration von 10 µg/ml und die Antikörper wurden ausgehend von ihrer Maximalkonzentration bis auf 1 µg/ml verdünnt. Es zeigte sich, dass neun von 17 Antikörpern, also mehr als die Hälfte, dieses Antigen binden. Eine positive Reaktion ergab sich mit allen aus Magen-Ca.-Patienten gewonnenen Antikörpern SAM-1, SAM-3, SAM-4, SAM-5, SAM-6, PAM-1 und SC-1. Außerdem erkannten die Antikörper CM-1 (gewonnen aus einem Colon-Ca.-Patienten) und LM-1 (isoliert aus einem Lungen-Ca.-Patienten) das Antigen Actin (Abb. 3).

Nicht gebunden haben die beiden aus Pankreas-Ca.-Patienten isolierten Antikörper PM-1 und PM-2, und auch die aus gesunden Probanden gewonnenen Antikörper NORM-1, NORM-2, NORM-3 und NORM-4 blieben negativ. Ebenso ergab sich eine negative Reaktion mit dem Antikörper CM-2, der aus einem Colon-Ca.-Patienten stammt, und mit dem Antikörper M6, der aus einer Mamma-Ca.-Patientin isoliert wurde und der in bisherigen Versuchen auch mit Tumorgewebe noch nie eine positive Reaktion zeigte.

Die eindeutig stärkste Reaktion zeigte dabei der Antikörper SAM-5. Ein Sättigungseffekt trat schon bei einer Antikörper-Konzentration von 5 µg/ml auf. Etwas schwächer als SAM-5 reagierten die IgMs SAM-4 und SAM-6, die beide ähnliche Absorptionswerte erreichten.

Eine Zwischenstellung nahm der Antikörper LM-1 ein: Dieser zeigte schon in niedrigen Konzentrationen unter 5 µg/ml wie die Antikörper SAM-4 und SAM-6 eine deutlich positive Reaktion, dann aber erfolgte bei einer Erhöhung der Antikörper-Konzentration keine weitere Zunahme der Reaktion mit Actin. SAM-1 und SAM-3 haben Actin anfangs nicht so deutlich wie der Antikörper LM-1 gebunden, bei einer Konzentration von 20 µg/ml erreichten beide aber fast dessen Reaktionsstärke. Eine vergleichbar schwache Bindungsreaktion mit Actin ergab die Testung der Antikörper PAM-1, SC-1 und CM-1 (siehe Abb. 2).

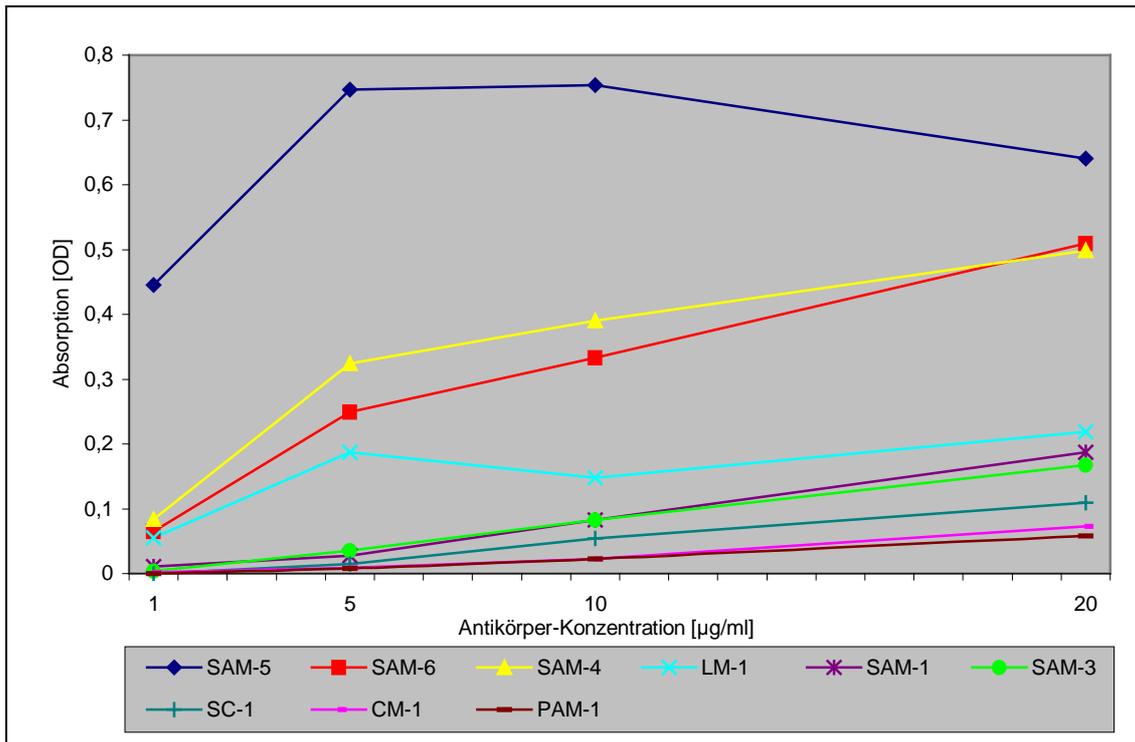


Abb. 2: Absorptionswerte der Antikörper-Kreuzreaktionen mit Actin 10 µg/ml.

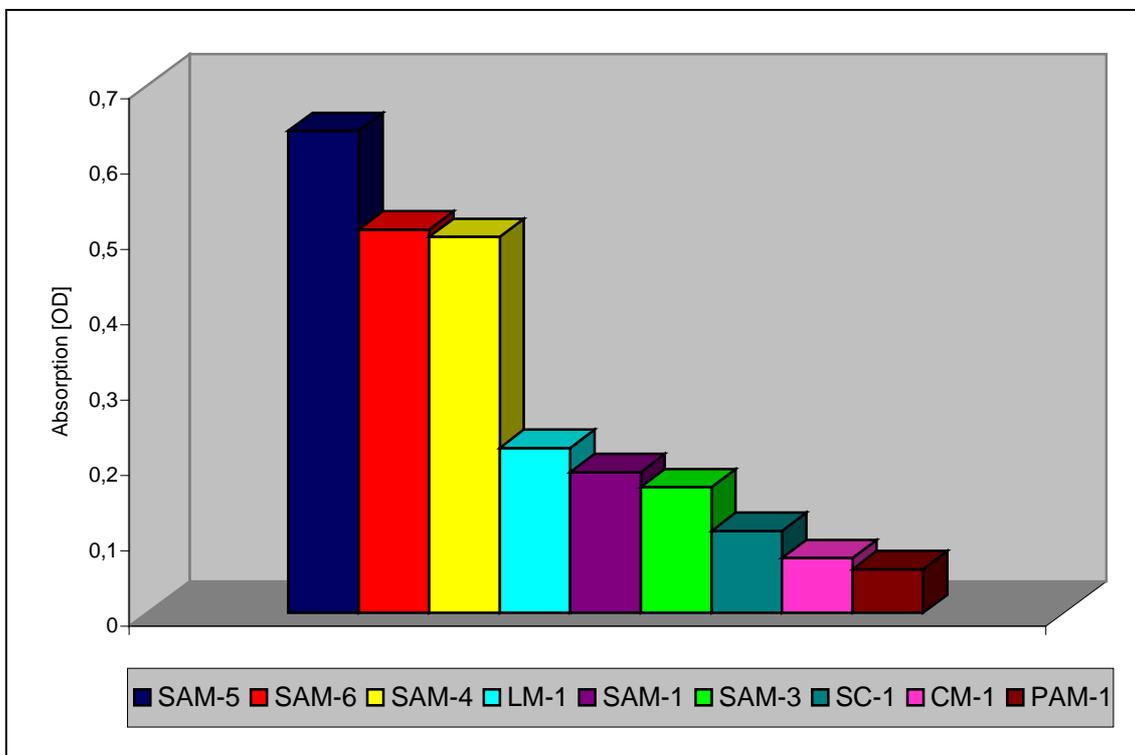


Abb. 3: Absorptionswerte der Antikörper-Kreuzreaktionen mit Actin 10 µg/ml bei einer Antikörperkonzentration von 20 µg/ml.

3.1.2 Myosin

Als nächstes wurde getestet, ob die natürlichen Antikörper mit Myosin reagieren. Die Beurteilung der Reaktion erfolgte dazu bei einer Myosin-Konzentration von 50 µg/ml. Die Antikörper wurden wiederum ausgehend von ihrer Maximalkonzentration verdünnt. Eine positive Reaktion mit dem Muskelprotein Myosin ergab sich in den Versuchen mit den Antikörpern CM-1, PAM-1, SC-1, LM-1, SAM-4, SAM-5 und SAM-6 (Abb. 5). Alle diese IgM-Antikörper hatten bereits mit Actin reagiert. Nur die Antikörper SAM-1 und SAM-3, welche mit Actin noch positiv reagierten, zeigten bei der Inkubation mit Myosin keine Gelbfärbung im ELISA. Außerdem waren wie schon im Actin-Versuch die Antikörper NORM-1, NORM-2, NORM-3, NORM-4, PM-1, PM-2, CM-2 und M6 negativ.

In niedrigen Antikörper-Konzentrationen unter 10 µg/ml konnte PAM-1 das Myosin-Molekül am stärksten binden. Bereits bei der Konzentration 5 µg/ml hatte die Reaktion mit diesem Antikörper ihren Sättigungswert erreicht. Bei einer Konzentration von 20 µg/ml reagierte PAM-1 etwa gleich stark mit Myosin wie SAM-4 und SAM-6. SAM-5 reagierte in niedrigen Konzentrationen noch am zweitstärksten mit dem getesteten Antigen, die Reaktion erreichte bei 10 µg/ml ihren Höhepunkt und nahm dann wieder ab. Die Reaktion zwischen Myosin und SAM-5 war bei einer Antikörper-Konzentration von 10 µg/ml gesättigt. Und bei der Konzentration 20 µg/ml hat SAM-5 Myosin schließlich genauso stark gebunden wie der Antikörper CM-1, der anfangs eher nur ein schwaches Bindungsmuster zeigte.

Bei Betrachtung der Reaktionskurve des Antikörpers LM-1 mit dem Antigen Myosin fällt auf, dass erneut wie im Actin-Versuch ein Sättigungseffekt bereits bei einer Antikörper-Konzentration von 5 µg/ml auftrat und sich der Absorptionwert bei höheren Antikörper-Konzentrationen nur noch geringfügig erhöhte. SC-1 zeigte auch in höheren Konzentrationen nur eine schwache Reaktion mit Myosin (Abb. 4).

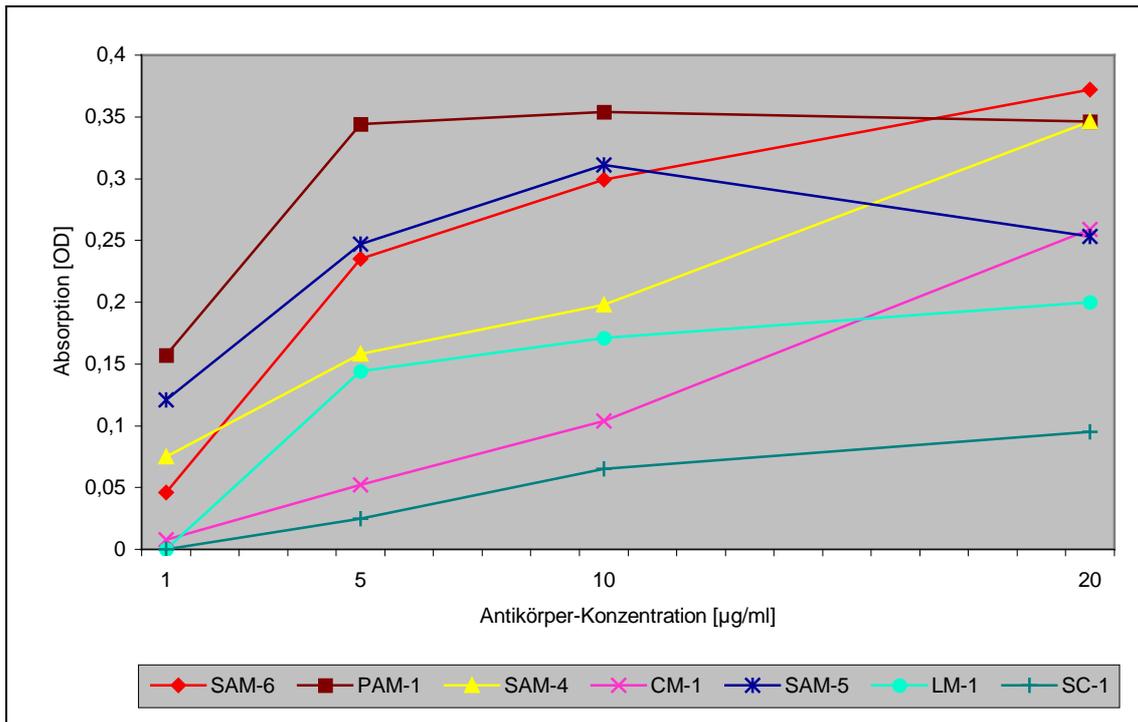


Abb. 4: Absorptionswerte der Antikörper-Kreuzreaktionen mit Myosin 50 µg/ml.

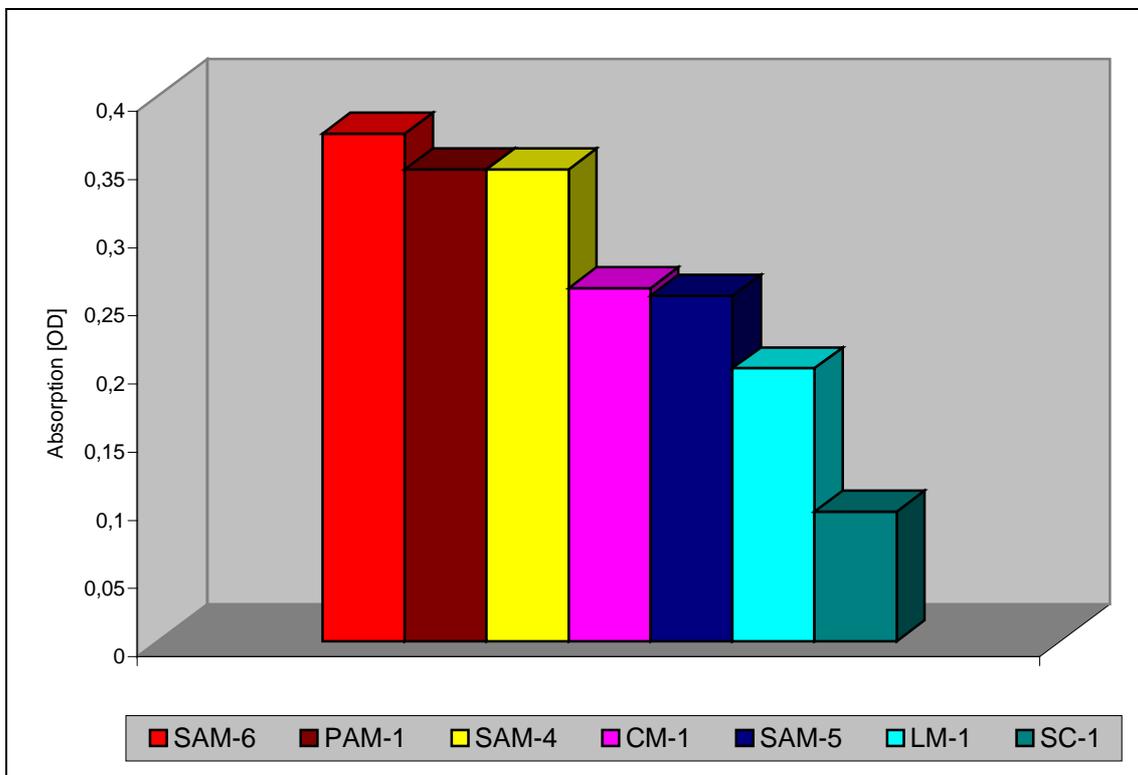


Abb.5: Absorptionswerte der Antikörper-Kreuzreaktionen mit Myosin 50 µg/ml bei einer Antikörperkonzentration von 20 µg/ml.

3.1.3 Keratin

Zudem wurde die Kreuzreaktion zwischen den in Tab. 1 genannten Antikörpern und dem Intermediärfilament Keratin getestet. Intermediärfilamente sind Polymere aus monomeren Untereinheiten, die jeweils für einen gegebenen Zelltyp spezifisch sind. Hauptaufgabe der Intermediärfilamente ist die Vermittlung der Stabilität gegenüber mechanischem Stress. Keratinfilamente sind in epithelialen Zellen zu finden und dienen dort der „Vernietung“ epithelialer Schichten durch Desmosomen (Löffler, 1998a).

Die Auswertung der Antigen-Antikörper-Bindung geschah bei einer Keratin-Konzentration von 10 µg/ml. Wieder wurden die Antikörper bis auf 1 µg/ml verdünnt und erneut ergab sich wie schon in den beiden vorigen Versuchen eine positive Reaktion der Antikörper PAM-1, SAM-4, SAM-5, SAM-6 und LM-1. Zusätzlich reagierten SAM-1 und SAM-3 positiv, die beide schon Actin gebunden haben, jedoch im Myosin-Versuch keine Gelbfärbung zeigten (Abb. 7). Die Antikörper SC-1 und CM-1, welche beide sowohl mit Actin als auch mit Myosin positiv reagierten, waren diesmal negativ. Wie zuvor haben alle übrigen Antikörper, also NORM-1, NORM-2, NORM-3, NORM-4, PM-1, PM-2, CM-2 und M6 das Keratin-Antigen nicht gebunden.

Zur weitaus stärksten Reaktion kam es bei der Inkubation von Keratin mit dem SAM-4-Antikörper. Ebenso führte auch der Antikörper SAM-5 zu einer starken Reaktion. Mit großem Abstand in der Stärke der Antigen-Bindung folgten die Antikörper SAM-1, SAM-3, SAM-6, LM-1 und PAM-1. Ihre Reaktion mit Keratin war nicht so stark wie die Reaktion der Antikörper SAM-4 und SAM-5, aber dennoch deutlich ausgeprägt. LM-1 und SAM-6 konnten sich von den anderen Antikörpern SAM-1, SAM-3 und PAM-1 nur in niedrigen Konzentrationen absetzen; bei 20 µg/ml war der Unterschied nicht mehr so deutlich (Abb. 6). Auffällig war, dass sich die Absorptionen aller Antikörper bei einer Konzentration von 20 µg/ml praktisch nicht von den Absorptionen bei der Antikörper-Konzentration 5 µg/ml unterschieden. In diesem Versuch konnte also durch Steigerung der Antikörper-Konzentration keine wesentliche Erhöhung der Antikörper-Antigen-Bindung erreicht werden - die Reaktionen waren frühzeitig gesättigt.

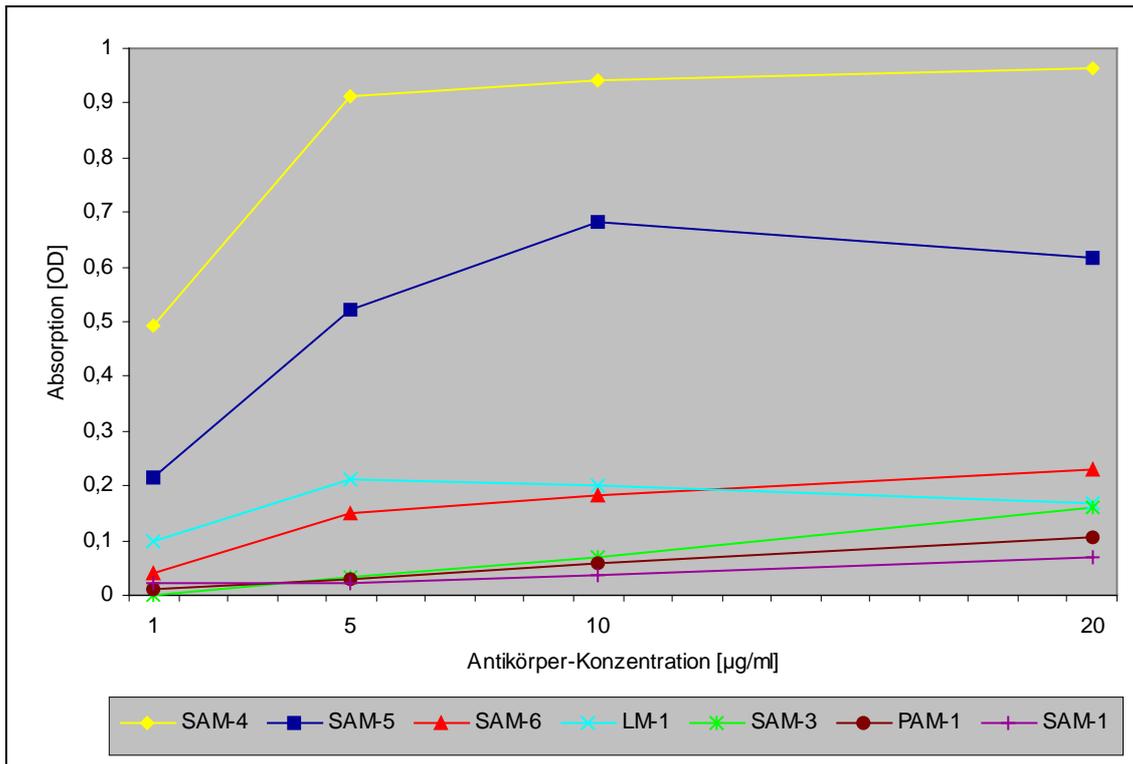


Abb. 6: Absorptionswerte der Antikörper-Kreuzreaktionen mit Keratin 10 µg/ml.

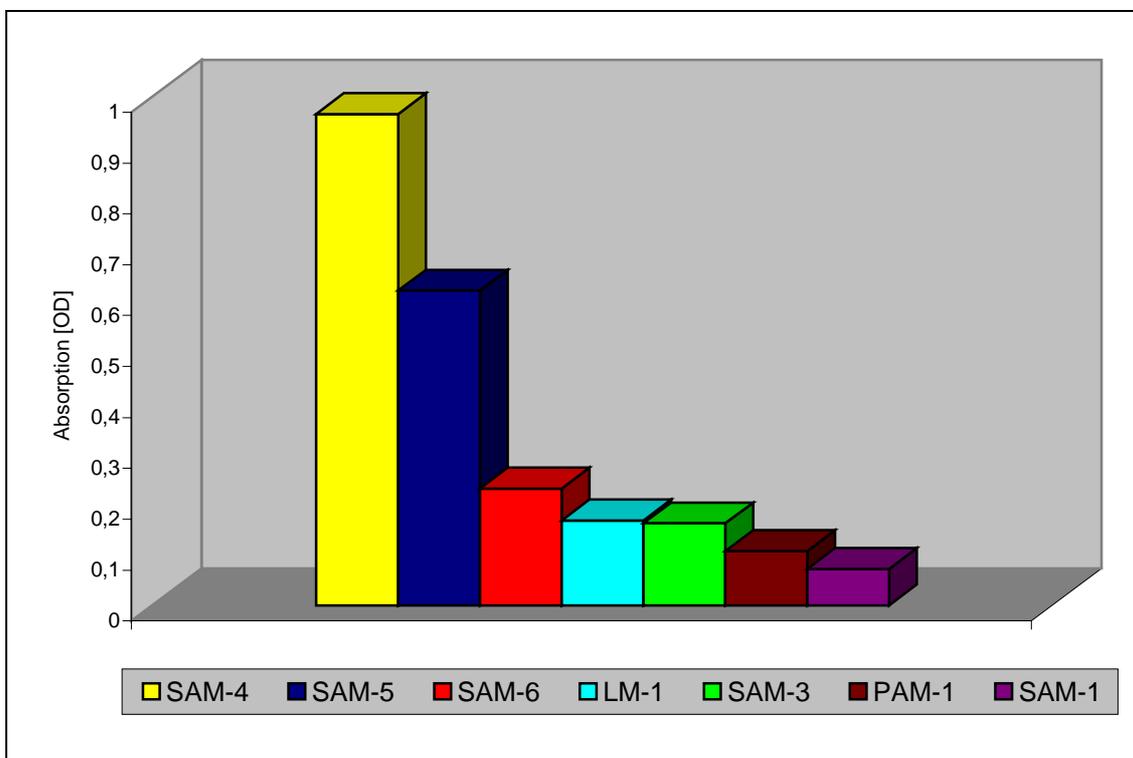


Abb. 7: Absorptionswerte der Antikörper-Kreuzreaktionen mit Keratin 10 µg/ml bei einer Antikörperkonzentration von 20 µg/ml.

3.1.4 Vimentin und Desmin

Zur Auswertung der Kreuzreaktion der natürlichen IgM-Antikörper mit dem Intermediärfilament Vimentin, welches in mesenchymalen Zellen, Endothelzellen und im Fettgewebe vorkommt, wurde eine Antigen-Konzentration von 3,33 µg/ml gewählt. Beim Versuch mit Desmin, das sich in den Z(wischen)-Scheiben der Muskulatur findet und somit die Begrenzung eines Sarkomers darstellt, betrug die Antigen-Konzentration 5 µg/ml. Allerdings war mit keinem der 17 getesteten natürlichen Antikörper eine positive Reaktion mit diesen beiden Intermediärfilamenten zu verzeichnen.

3.1.5 Humane Plazenta-DNA

Zur Beurteilung der Reaktion der Antikörper mit menschlicher Plazenta-DNA wurde diese in der Konzentration 5 µg/ml eingesetzt. Auch hier wurden die Antikörper ausgehend von ihrer Maximalkonzentration schrittweise bis zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml verdünnt. Lediglich drei Antikörper zeigten eine positive Reaktion mit dem Antigen: Neben den beiden aus Magen-Ca.-Patienten gewonnenen Antikörpern SAM-5 und SC-1 reagierte erstmals auch der aus einem Patienten mit Pankreas-Ca. isolierte Antikörper PM-2 positiv, nachdem dieser bisher keinerlei Reaktionen mit körpereigenen Antigenen zeigte (Abb. 9).

Die stärkste Reaktion wurde bei der Inkubation der humanen Plazenta-DNA mit PM-2 registriert, mit großem Abstand gefolgt vom Antikörper SAM-5. SC-1 zeigte lediglich eine schwache Bindung, die erst bei einer Konzentration von 20 µg/ml sichtbar wird (Abb. 8).

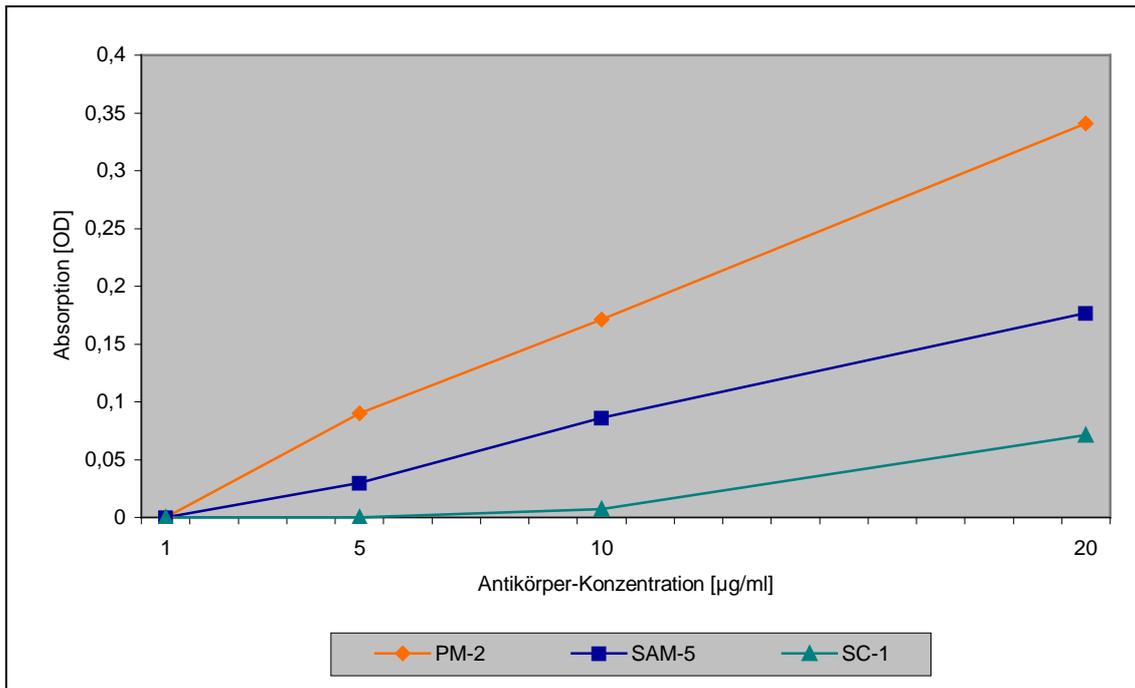


Abb. 8: Absorptionswerte der Antikörper-Kreuzreaktionen mit humaner Plazenta DNA
5 µg/ml.

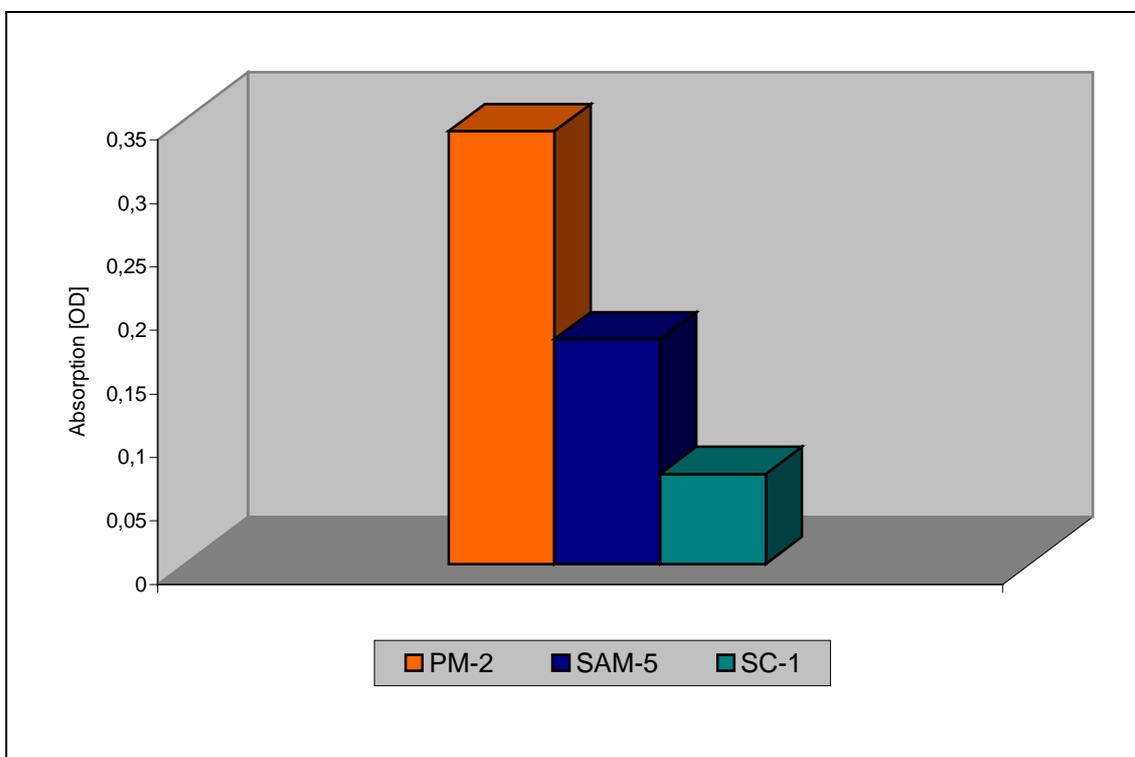


Abb. 9: Absorptionswerte der Antikörper-Kreuzreaktionen mit humaner Plazenta-DNA
5 µg/ml bei einer Antikörperkonzentration von 20 µg/ml.

3.2 Kreuzreaktionen der natürlichen IgM-Antikörper mit bakteriellen Antigenen

Zur Untersuchung, ob die natürlichen IgM-Antikörper mit bakteriellen Bestandteilen reagieren, wurden solche Antigene ausgewählt, die die innate Immunabwehr über Toll-like Rezeptoren in Gang setzen können (siehe Kap. 1.3.1).

3.2.1 Lipopolysaccharid (LPS)

Es wurde zunächst untersucht, ob eine Reaktion der natürlichen IgM-Antikörper aus Tab. 1 mit dem bakteriellen Antigen Lipopolysaccharid nachzuweisen ist. Lipopolysaccharide sind hochmolekulare Komplexe aus Lipid A, einer Kernregion und Polysacchariden (Valvano, 1992; Trent, 2004). Es handelt sich um charakteristische Zellwandbestandteile gram-negativer Bakterien, v. a. Enterobakterien. Das Lipid A ist ein Phospholipid, das als hydrophober Anker des LPS dient und das die bioaktive, toxische Komponente des Moleküls darstellt. Durch verschiedene Umgebungseinflüsse kann das Lipid A modifiziert werden, was einen wichtigen Virulenzfaktor der Bakterien darstellt (Trent, 2004; Miller, 2005). Die Polysaccharide (entsprechend dem O-Antigen) repräsentieren den immunogenen Bestandteil des LPS und variieren (Pschyrembel, 1998; Valvano, 1992) ebenso wie Lipid A (Miller, 2005) stark unter den verschiedenen Bakterienarten. Das LPS wurde für die Versuche in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. Das Ergebnis der Inkubation blieb bei allen getesteten Antikörpern negativ.

3.2.2 Lipoteichonsäure (LTS)

Lipoteichonsäure stellt eine Polyglycerolphosphatkette dar, die ein funktionell wichtiger Bestandteil der Zellwand gram-positiver Bakterien ist. Sie ist über ein Glykolipid in der Außenseite der Zytoplasmamembran verankert (Schwandner, 1999). Eine wichtige Rolle spielt die LTS bei der Adhärenz. Durch Komplementaktivierung kann sie eine Entzündungsreaktion induzieren (Hahn, 2001), und sie wird, wie anfangs beschrieben (Kapitel 1.3), zusätzlich durch den TLR-2 erkannt. Die natürlichen Antikörper wurden mit LTS (Konzentration 10 µg/ml) inkubiert, es ergab sich jedoch im ELISA keine positive Reaktion. Selbst bei unverdünnter Anwendung der LTS (entsprechend 1.000 µg/ml) blieb das Ergebnis der Reaktion mit allen Antikörpern negativ.

3.2.3 Peptidoglykan (PGN)

Peptidoglykane sind Heteroglykane, bestehend aus einem Kohlenhydratanteil (Disaccharid aus N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure), der kovalent mit einem Nicht-Kohlenhydratanteil (Peptide aus 4-5 Aminosäuren) verknüpft ist. Über Querverbindungen zwischen den Polysaccharidketten wird ein netzförmiges Riesenmolekül gebildet. Peptidoglykane kommen wie auch die LTS in der Zellwand gram-positiver Bakterien vor. Das wichtigste Peptidoglykan für das Überleben der Bakterien ist das Murein (Löffler, 1998b).

Für das Membran-Antigen PGN wurde zur Auswertung die Konzentration 10 µg/ml gewählt. Die natürlichen Antikörper wurden wiederum ausgehend von ihrer Maximalkonzentration schrittweise verdünnt und mit dem Antigen inkubiert. Sämtliche Versuche zeigten keinerlei positive Reaktion. Auch bei unverdünnter Anwendung des Antigens PGN (entsprechend 1.000 µg/ml) zeigte sich kein Farbumschlag der Wells der ELISA-Platten.

3.2.4 Flagellin

Ferner wurde die Reaktion der natürlichen IgM-Antikörper mit bakteriellem Flagellin getestet, welches den Hauptanteil des Flagellen(=Geißel)-filaments darstellt: Dieses wird von ungefähr 20.000 Flagellin-Monomeren gebildet. Geißeln sind komplexe bakterielle Oberflächenorganellen, die durch chemotaktische Faktoren aktiviert werden und die der Fortbewegung, Adhäsion, Invasion und als Sekretionssystem für Toxine dienen (Ramos, 2004). Die Konzentration des Flagellins betrug für die Inkubationsversuche mit den getesteten natürlichen Antikörpern 5 µg/ml. Im ELISA ergab sich keinerlei positive Reaktion der natürlichen Antikörper mit Flagellin.

3.2.5 Heat Shock Protein 70 (HSP 70)

Auch die bei Pro- und Eukaryonten vorkommenden Hitzeschock-Proteine stellen einen Aktivator der natürlichen Immunabwehr dar. Hitzeschock-Proteine werden auch unter normalen Temperaturbedingungen gebildet und haben physiologischerweise die Funktion, die Erreichung des nativen, korrekt gefalteten Zustands von Proteinen zu beschleunigen. Bei Hitzeschock oder vielen anderen Noxen steigt in einer Zelle die Zahl

nicht oder fehlerhaft gefalteter Proteine an. Dies löst die Bildung weiterer Hitzeschock-Proteine aus. Sie hemmen die Proteinaggregation während der Proteinfaltung, hemmen die Aggregation während der Entfaltung eines Proteins und beeinflussen zudem die Kinetik der Proteinfaltung. Heat Shock Proteine verhindern also unerwünschte, zur Aggregation führende Wechselbeziehungen zwischen Proteinen und werden daher auch als molekulare Chaperone (=„Anstandsdamen“) bezeichnet. Eine weitere Aufgabe besteht im Proteinexport (Löffler, 1998c). Die Heat Shock Protein-Superfamilie setzt sich aus Heat Shock Proteinen unterschiedlichen Molekulargewichts zusammen. Dazu gehören beispielsweise HSP 60, HSP 70 und HSP 90. Das in dieser Arbeit verwendete HSP 70 stellt das am höchsten konservierte Protein der HSP-Familie dar (Rohde, 2005; Bonorino, 1998).

Die humane HSP 70-Familie besteht aus mindestens acht homologen Proteinen, die sich durch die intrazelluläre Lokalisation und das Expressionsmuster unterscheiden (Rohde, 2005). In normalen Zellen und Geweben wird HSP 70 nur in geringem Maße exprimiert oder ist nicht nachweisbar, durch physikalischen oder chemischen Stress steigt seine Expression aber rasch an. Zudem wird es in hoher Konzentration in Tumorzellen verschiedenen Ursprungs exprimiert (Rohde, 2005).

Für die Auswertung der Inkubationsversuche der natürlichen Antikörper (Tab. 1) mit HSP 70 wurden die Reaktionsergebnisse bei einer Antigen-Konzentration von 10 µg/ml betrachtet. Von den getesteten Antikörpern stellte sich nur bei einem einzigen von diesen eine positive Reaktion ein. Es handelte sich dabei um den aus einem Magen-Ca.-Patienten isolierten IgM-Antikörper SAM-5. Die Reaktion war in den Antikörper-Konzentrationen bis 20 µg/ml nur sehr schwach ausgeprägt, erst bei einer höheren Antikörper-Konzentration von 30 µg/ml wurde die Antigenbindung durch den Antikörper stärker und deutlicher (Abb. 10).

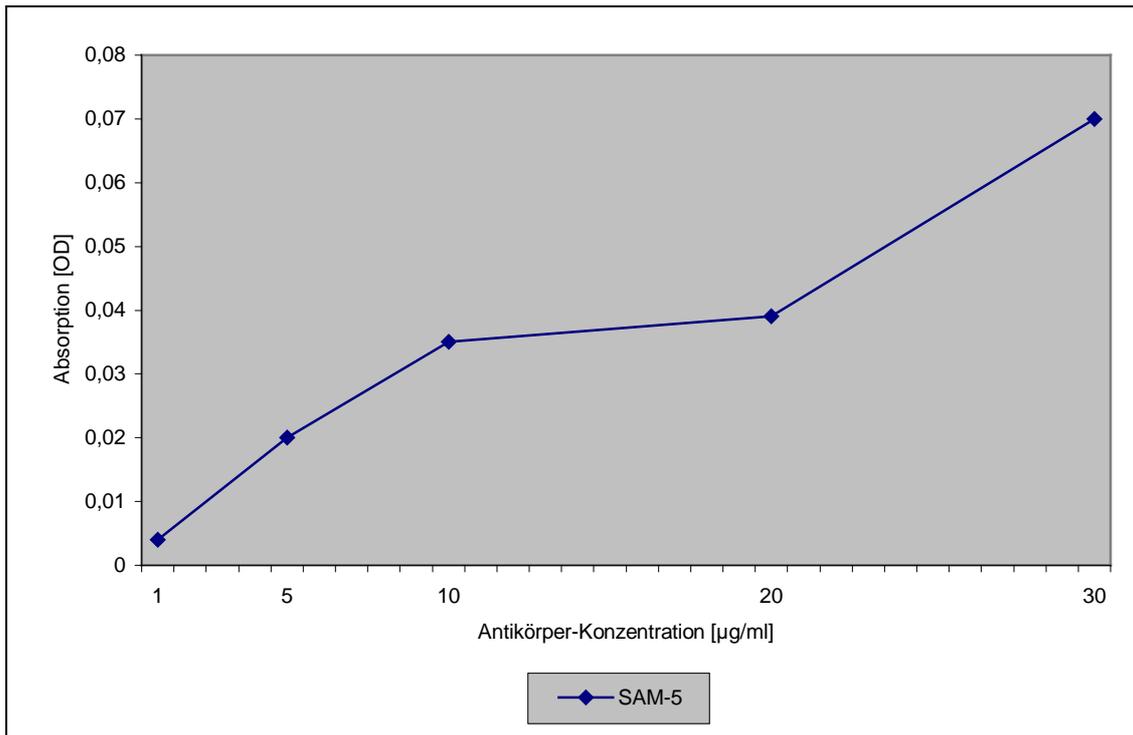


Abb. 10: Absorptionswerte der Antikörper-Kreuzreaktionen mit Heat Shock Protein 70 10 µg/ml.

3.2.6 *Helicobacter pylori*-Bestandteile

Weiterhin wurde untersucht, ob die natürlichen Antikörper aus Tab. 1 eine Reaktion mit den *Helicobacter pylori*-Antigenen CagA (cytotoxin-associated gene) und VacA (vacuolating cytotoxin) zeigen. Das weltweit vorkommende gram-negative Bakterium *Helicobacter pylori* wird iatrogen, fäkal-oral oder oral-oral übertragen und besiedelt den Magen (Dunn, 1997). Das Bakterium persistiert nach einer Infektion meist asymptomatisch in der Magenschleimhaut, eventuell sogar lebenslang (Cover, 1999; Blaser, 2004); es kann aber auch eine chronische Gastritis verursachen und gilt als prädisponierender Faktor für die Entstehung von Magenkarzinomen, MALT-Lymphomen und Magen- und Duodenalulzera (Cover, 1997, 1999; Dunn, 1997; Figueiredo, 2001; Odenbreit, 2000; Montecucco, 2003). Allerdings entwickelt nur ein kleiner Teil der infizierten Personen gastroduodenale Krankheiten (Montecucco, 2003). Es zeigte sich auch, dass eine *H. pylori*-Kolonisation des Magens vor Entstehung einer gastroösophagealen Refluxkrankheit und deren Folgeerkrankungen Barrett-Ösophagus und Ösophagus-Karzinom schützt (Blaser, 2004).

Einige von *H. pylori* produzierte Proteine überqueren die Epithelbarriere und aktivieren sowohl die innate als auch die erworbene Immunabwehr. Daneben hat *H. pylori* aber auch vielfältige Strategien entwickelt, um den Sensoren des Immunsystems möglichst zu entgehen: Auf der Seite der erworbenen Immunabwehr kann beispielsweise durch das *H. pylori*-Toxin VacA neben der T-Zell-Aktivierung und -Proliferation und auch die Antigen-Präsentation gehemmt werden. Zudem kann das Bakterium durch Mutation und intragenomische Rekombination zwischen homologen Sequenzen seine Oberflächen variieren und somit die Erkennung durch die erworbene Immunabwehr erschweren (Blaser, 2004). Auch die innate Immunabwehr kann z. T. umgangen werden: Der TLR-5 bindet kein *H. pylori*-Flagellin, die stark methylierte *H. pylori*-DNA wird durch den TLR-9 weniger erkannt als die weitgehend unmethylierte DNA der meisten Bakterien und das LPS ist modifiziert und stimuliert zwar den TLR-4 auf Makrophagen, aber nicht den TLR-4 auf Magen-Epithelzellen. *H. pylori* kann außerdem weniger spezifische Immunmechanismen wie die Phagozytose unterdrücken (Blaser, 2004).

3.2.6.1 CagA-Antigen

Das CagA-Protein wird von der Mehrheit der *cagA*-(*Gen*)-positiven *H. pylori*-Stämme produziert. Es wird über ein TypIV-Sekretionssystem, das von der sogenannten *cag*-Pathogenitätsinsel kodiert wird, in Magen-Epithelzellen eingeschleust, wird dann Tyrosin-phosphoryliert und verursacht anschließend Veränderungen im Tyrosin-Phosphorylierungszustand bestimmter zellulärer Proteine (Odenbreit, 2000; Blaser, 2004). Eine Infektion mit einem *cagA*-positiven Stamm führt zu einer höheren Prävalenz und Intensität einer Schleimhautatrophie und intestinalen Metaplasie (Sozzi, 1998; Odenbreit, 2000), wohingegen peptische Ulzera eher bei Patienten auftreten, die mit *cagA*-negativen Stämmen infiziert sind (Cover, 1999).

Zur Beurteilung der Reaktion der IgM-Antikörper mit dem CagA-Protein wurde dieses in einer Konzentration von 3,33 µg/ml eingesetzt. Insbesondere richtete sich das Interesse darauf, ob die aus Magen-Ca.-Patienten isolierten tumorspezifischen natürlichen Antikörper SAM-1, SAM-3, SAM-4, SAM-5, SAM-6, PAM-1 und SC-1 mit diesem *H. pylori*-Bestandteil reagieren, denn eine *H. pylori*-Besiedlung des Magens gilt als Präkanzerose für die Entstehung eines Magenkarzinoms.

Nach Durchführung der Versuche mit dem CagA-Antigen zeigte sich, dass kein einziger der natürlichen Antikörper dieses Antigen bindet. Das Ergebnis ist also analog zu allen bisher getesteten bakteriellen Membranbestandteilen.

3.2.6.2 VacA-Toxin

VacA ist ein Zytotoxin, das von vielen *H. pylori*-Stämmen produziert und in den Extrazellulärraum abgegeben wird (Cover, 1997; Papini, 2001; Montecucco, 2003; Blaser, 2004). Teilweise ist es auch an der Bakterienoberfläche zu finden (Papini, 2001; Montecucco, 2003; Pagliaccia, 2000). Das *vacA*-Gen enthält zwei variable Regionen, eine s- und eine m-Region mit jeweils zwei verschiedenen Allelen (Blaser, 2004). Deren Kombinationsweise korreliert mit der VacA-Produktion und ist dadurch mit der Virulenz des Bakterienstammes assoziiert. In der Magenschleimhaut ist *H. pylori* verschiedenen pH-Werten ausgesetzt, die von pH 2 an der luminalen Seite der Schleimoberfläche bis zu einem pH-Wert 7 in der Tiefe der Schleimschicht auf der Oberfläche der Epithelzellen variieren. Durch einen sauren pH-Wert verliert VacA seine oligomere Struktur, wodurch vorher versteckte hydrophobe VacA-Domänen zum Vorschein kommen, die besser an Membranen binden können und zu einer besseren Membranpenetration führen können (Cover, 1997; Pagliaccia, 2000). Die Fähigkeit von VacA, bei niedrigem pH zu zerfallen, ist wahrscheinlich ein wichtiges Charakteristikum seiner Aktivierung und seines Wirkmechanismus. Durch VacA werden die Magen-Epithelzellen geschädigt (Figueiredo, 2001): Zelluläre Effekte sind beispielsweise Vakuolisierung, Veränderung der endolysosomalen Funktion, Bildung von Anionenkanälen in der Plasmamembran, Apoptose-Induktion und Erhöhung der Permeabilität des Epithels (Papini, 2001; Montecucco, 2003; Pagliaccia, 2000). Angriffspunkte für das VacA-Protein stellen dabei Endozytosevesikel, Mitochondrien, das Zytoskelett und epitheliale Zell-Zell-Kontakte dar (Papini, 2001; Blaser, 2004). Außerdem soll VacA, je nachdem, an welche Zielzelle es bindet, eine proinflammatorische Wirkung haben (Montecucco, 2003) und zugleich auch immunsuppressiv wirksam sein, indem es die T-Zell-Aktivierung und Proliferation inhibiert (Boncristiano, 2003; Gebert, 2003; Montecucco, 2003). Die Inkubation der IgM-Antikörper mit dem Toxin VacA (Konzentration 3,33 µg/ml) führte im Gegensatz zu den Versuchen mit dem CagA-Antigen zu einigen positiven Reaktionen. Interessanterweise reagierten dabei vor allem die aus Magen-Ca.-Patienten

gewonnenen Antikörper. Lediglich SAM-3 blieb auch in seiner Maximalkonzentration (es stand maximal eine Konzentration von 25,9 µg/ml zur Verfügung) negativ. Die stärkste Gelbfärbung der Wells entstand bei der Inkubation von VacA mit dem Antikörper SAM-6, die zweitstärkste mit dem Antikörper PAM-1. Nur zwei Antikörper, die nicht aus Magen-Ca.-Patienten isoliert wurden, zeigten eine positive Reaktion: Dazu gehörte der aus einem Lungen-Ca.-Patienten gewonnene Antikörper LM-1, der bereits in sehr niedrigen Konzentrationen stark mit dem Antigen reagierte. Der andere Antikörper war der aus einem Patienten mit Colon-Ca. gewonnene Antikörper CM-1, der in niedrigen Konzentrationen nur schwach an VacA gebunden hat, der dann aber in einer Konzentration von 20 µg/ml etwa gleich stark mit dem Antigen reagierte wie die Antikörper SC-1 und SAM-4; diese beiden Antikörper haben in niedrigen Konzentrationen VacA noch wesentlich stärker als CM-1 gebunden. Eine nur schwache, aber dennoch positive Reaktion ergab sich aus der Reaktion des Antikörpers SAM-5 mit dem VacA-Toxin (Abb. 11 und 13).

Wie bei allen vorherigen Versuchen blieben die aus gesunden Probanden gewonnenen Antikörper NORM-1, NORM-2, NORM-3 und NORM-4 auch bei der Inkubation mit VacA negativ. Zudem zeigten die Antikörper CM-2, PM-1, PM-2 und M6 keine positive Reaktion.

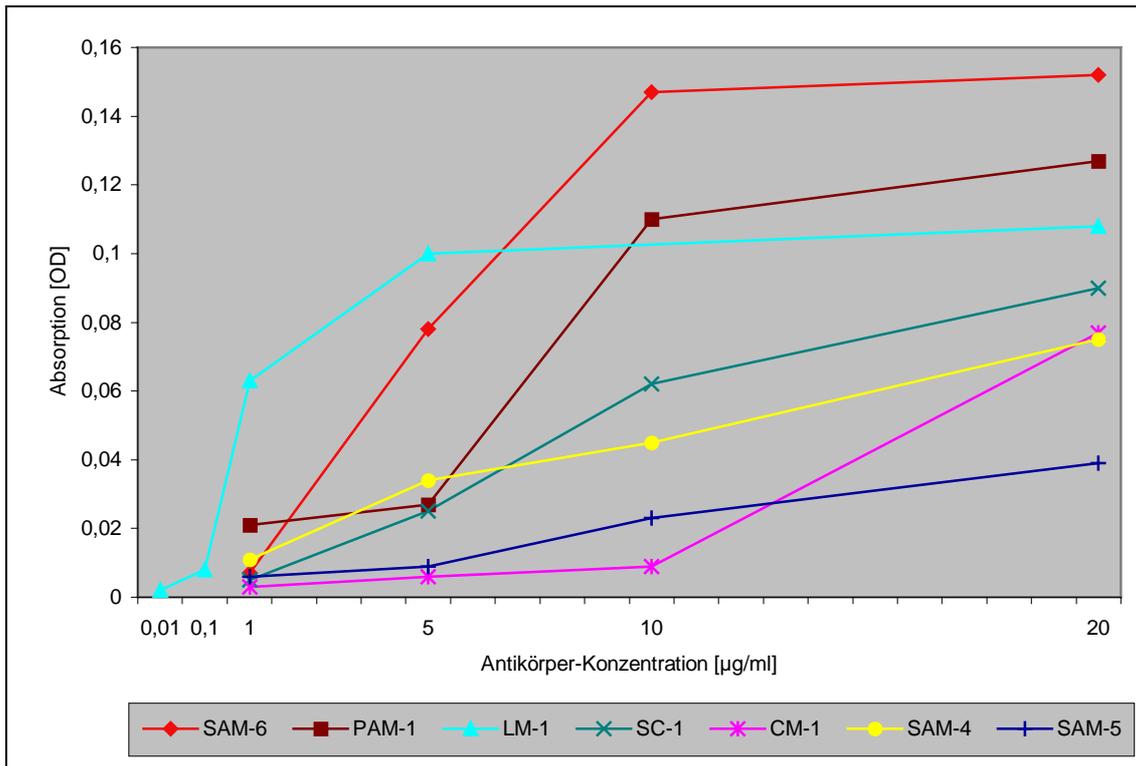


Abb. 11: Absorptionswerte der Antikörper-Kreuzreaktionen mit *H. pylori* VacA
3,33 µg/ml.

Beim Antikörper SAM-1 fiel auf, dass dieser in niedrigen Konzentrationen praktisch nicht mit dem VacA-Antigen reagierte. Erst bei einer Steigerung der Antikörper-Konzentration wurde deutlich, dass auch diese Antigen-Antikörper-Reaktion als positiv gewertet werden muss. Zur Verdeutlichung dieser Tatsache wurde die Reaktion zwischen SAM-1 und VacA in einem eigenen Diagramm (Abb. 12) dargestellt.

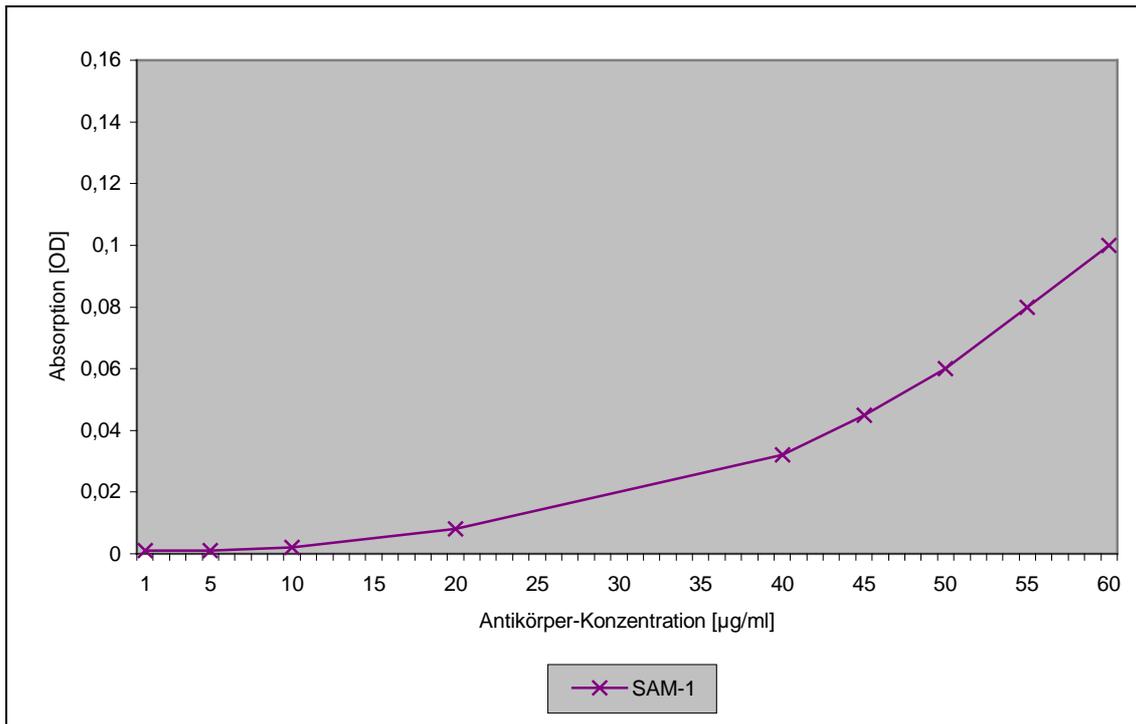


Abb. 12: Absorptionswert der Antikörper-Kreuzreaktion von SAM-1 mit *H. pylori* VacA 3,33 µg/ml.

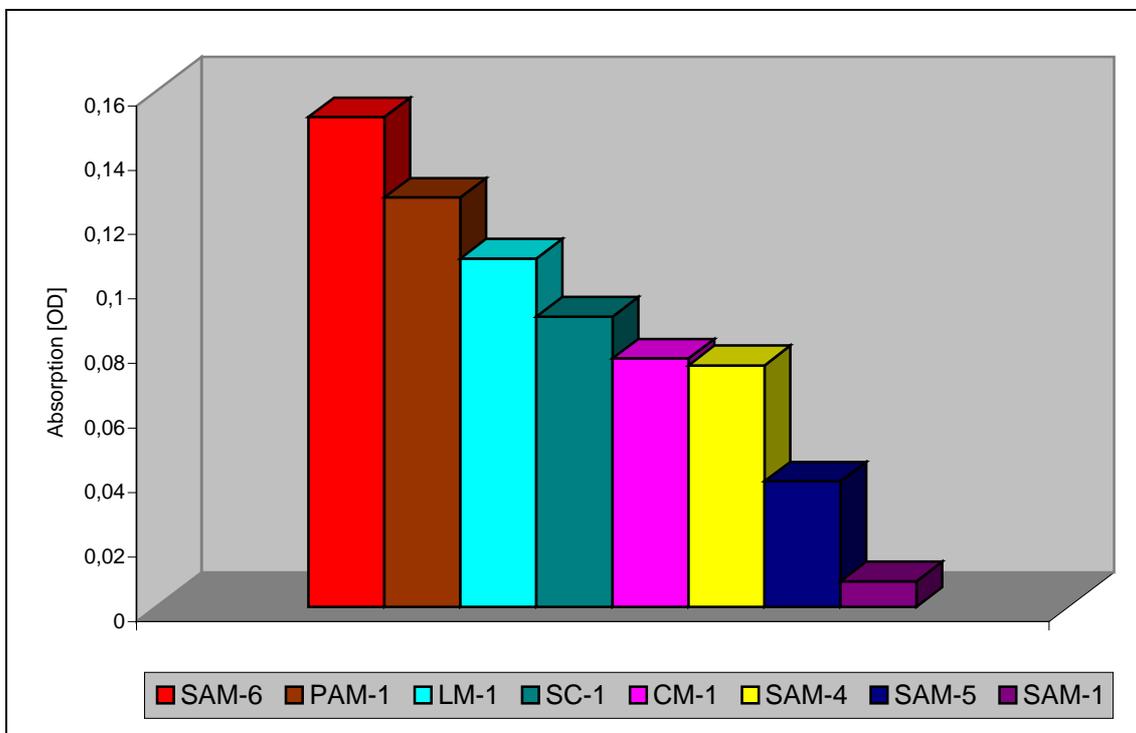


Abb. 13: Absorptionswerte der Antikörper-Kreuzreaktionen mit *H. pylori* VacA 3,33 µg/ml bei einer Antikörper-Konzentration von 20 µg/ml.

3.2.7 Bakterielle DNA: *E. coli*-DNA und *Cl. perfringens*-DNA

Zur Untersuchung der Kreuzreaktion der natürlichen Antikörper mit bakterieller DNA wurde sowohl von der *E. coli*-DNA als auch von der *Cl. perfringens*-DNA die Konzentration 5 µg/ml herangezogen. Während sich bei der Inkubation der natürlichen Antikörper mit *Cl. perfringens*-DNA bei keinem IgM-Antikörper eine Gelbfärbung im ELISA feststellen ließ, reagierten einige Antikörper positiv mit *E. coli*-DNA. Im einzelnen waren dies der Antikörper PM-2, der bereits eine positive Reaktion mit humaner DNA zeigte, außerdem die aus Magen-Ca.-Patienten gewonnenen Antikörper SAM-4, SAM-5, SAM-6 und SC-1 und der aus einem am Lungen-Ca. erkrankten Patienten isolierte Antikörper LM-1 (Abb. 15). Alle anderen Antikörper reagierten mit bakterieller DNA negativ. Mit Ausnahme des SC-1, der erst bei einer Konzentration von 20 µg/ml eine schwach-positive Reaktion zeigte, reagierten die übrigen Antikörper bis zur Konzentration 5 µg/ml etwa gleich stark. Ein Unterschied wurde erst ab einer Antikörper-Konzentration von 10 µg/ml deutlich: Hier setzten sich die Antikörper PM-2 und SAM-5 klar von den drei Antikörpern SAM-4, SAM-6 und LM-1 ab (Abb. 14).

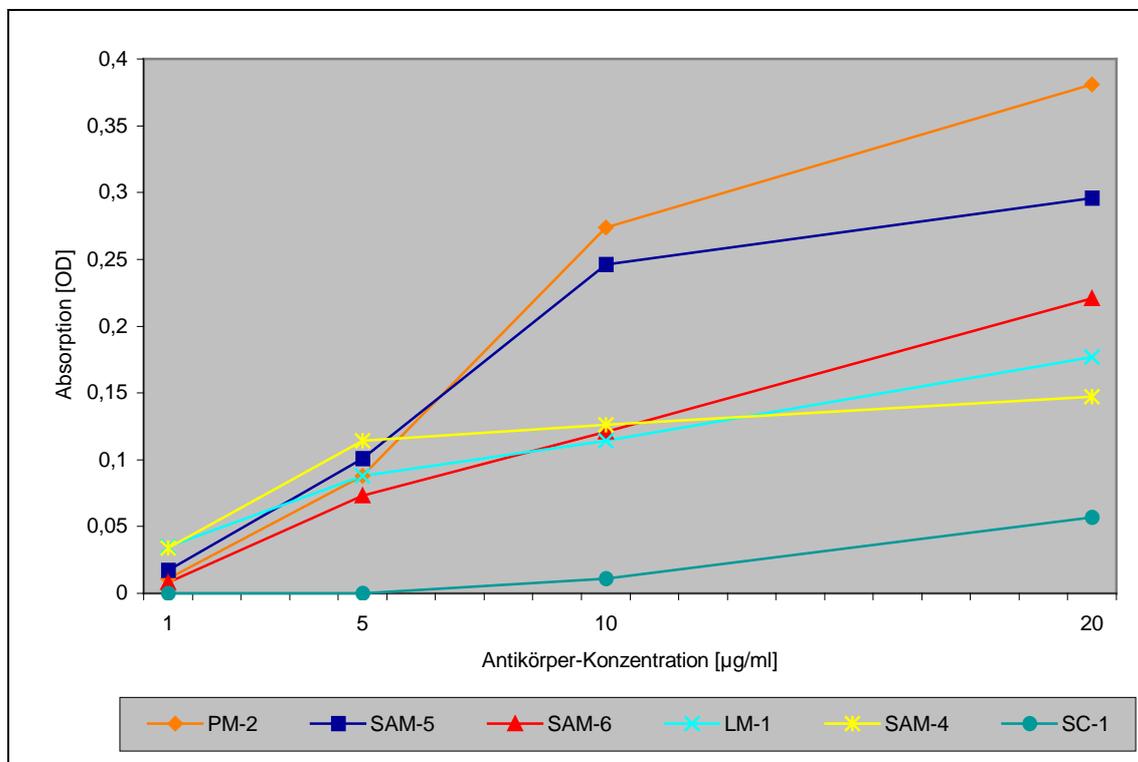


Abb. 14: Absorptionswerte der Antikörper-Kreuzreaktionen mit *E. coli*-DNA 5 µg/ml.

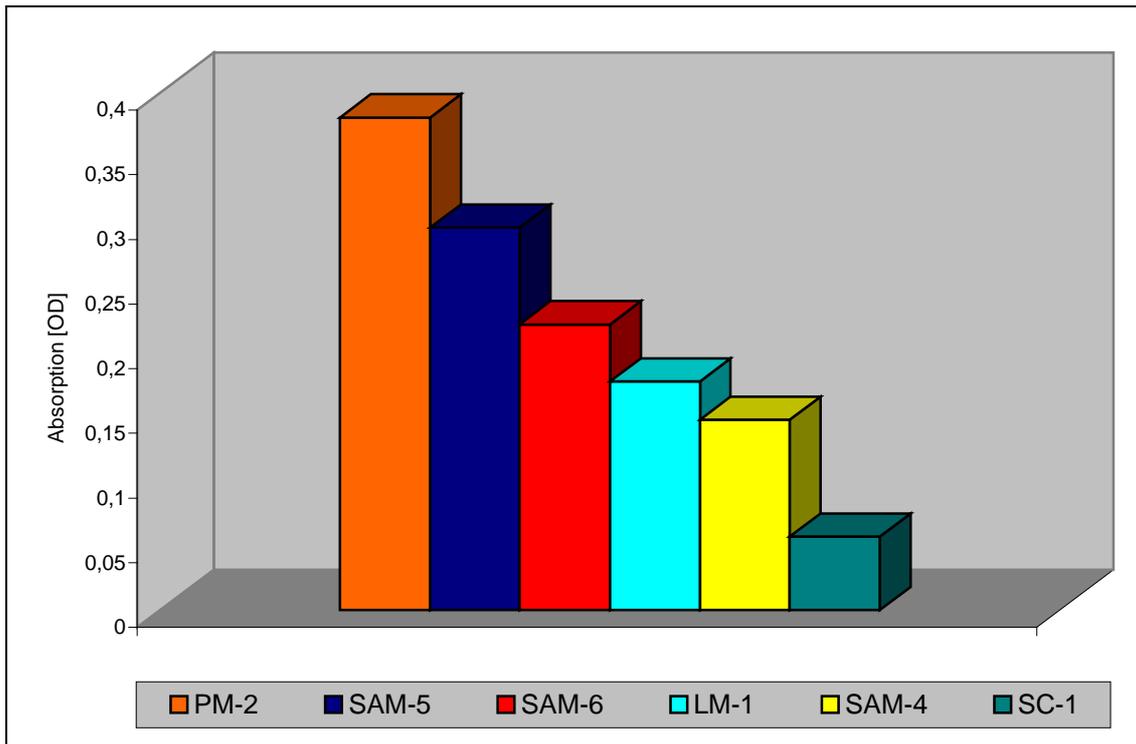


Abb. 15: Absorptionswerte der Antikörper-Kreuzreaktionen mit *E. coli*-DNA 5 µg/ml bei einer Antikörper-Konzentration von 20 µg/ml.

3.3 Gesamtübersicht über alle Kreuzreaktionen

Eine Gesamtübersicht aller positiven und negativen Reaktionen der tumorspezifischen natürlichen IgM-Antikörper mit den getesteten Antigenen ist in der Tabelle 6 dargestellt:

Tab. 6: Gesamtübersicht über die Reaktionen der natürlichen IgM-Antikörper mit den getesteten Antigenen.

	Actin	Myo- sin	Kera- tin	Des- min	Vimen- tin	Humane Plazenta- DNA	<i>E. coli</i> - DNA	<i>Cl.</i> <i>perfringens</i> - DNA	LTS	PGN	Fla- gellin	HSP 70	LPS	<i>H.</i> <i>pylori</i> CagA	<i>H.</i> <i>pylori</i> VacA
CM-2															
M6															
NORM-1															
NORM-2															
NORM-3															
NORM-4															
PM-1															
PM-2						+	+								
CM-1	+	+													+
LM-1	+	+	+				+								+
SAM-1	+		+												+
SAM-3	+		+												
PAM-1	+	+	+												+
SC-1	+	+				+	+								+
SAM-4	+	+	+				+								+
SAM-5	+	+	+			+	+					+			+
SAM-6	+	+	+				+								+

4 Diskussion

Am Pathologischen Institut der Universität Würzburg wurden mit Hilfe der humanen Hybridomatechnologie aus Krebspatienten und aus gesunden Probanden IgM-Antikörper isoliert, die mit verschiedenen Tumorarten und teilweise deren Vorläuferläsionen reagieren (Brändlein, 2004; Brändlein, 2003b).

Bei natürlichen Antikörpern handelt es sich um Bestandteile der natürlichen Immunabwehr, die im menschlichen Körper eine Wächterfunktion übernehmen, indem sie eindringende Bakterien, Viren, Parasiten, usw. entweder direkt beseitigen oder aber die erworbene Immunabwehr zur spezifischen Bekämpfung in Gang setzen. Doch nicht nur „Eindringlinge“, sondern auch transformierte Zellen werden (neben anderen Mechanismen) von den natürlichen Antikörpern erkannt und vernichtet. Andernfalls könnten die aberranten Zellen innerhalb kürzester Zeit den Organismus überschwemmen. Die hohe Anzahl zirkulierender IgM-Antikörper bildet also die permanent existierende Immunpatrouille, die im Körper nach fremden Strukturen wie Bakterien und malignen Zellen Ausschau hält (Brändlein, 2004; Vollmers, 2005a, 2005b). Die Tumor-Immunität wird demnach nicht durch maligne Zellen induziert, sondern ist ein Ergebnis der innaten Immunität. Die Antikörper sind schon vor der Tumorentstehung (=Antigenkontakt) vorhanden und beseitigen gegebenenfalls entstehende Tumorzellen.

In früheren Studien erkannte man, dass natürliche Antikörper nicht spezifisch ein Antigen binden, sondern dass nur bestimmte häufig vorkommende Antigen-Muster (sog. *patterns*) erkannt werden (Hensel, 1999a, 2001a; Janeway, 2002). Daraus folgerte man, dass die Bindung von Antigenen durch natürliche Antikörper „unspezifisch“ erfolgt. Tests ergaben, dass diese Antikörper mit vielen verschiedenen Antigenen kreuzreagieren (Cote, 1986; Campbell, 1987).

Doch reagieren die natürlichen Antikörper wahllos mit verschiedenen Antigenen oder ist ihr Reaktionsmuster Folge ihrer Aufgabe innerhalb der Immunabwehr?

17 tumorspezifische natürliche IgM-Antikörper, die in der Arbeitsgruppe um Professor Dr. H. P. Vollmers isoliert und kloniert wurden, wurden auf ihre Kreuzreaktivität getestet. Zu den untersuchten Antikörpern gehörten zwei Antikörper, die aus Pankreas-Ca.-Patienten gewonnen wurden (PM-1 und PM-2), zwei Antikörper aus Colon-Ca.-

Patienten (CM-1 und CM-2), ein Antikörper aus einer Brustkrebs-Patientin (M6), ein Antikörper aus einem Lungen-Ca.-Patienten (LM-1), sieben Antikörper aus Magen-Ca.-Patienten (SAM-1, SAM-3, SAM-4, SAM-5, SAM-6, SC-1 und PAM-1) und schließlich noch vier Antikörper, die aus gesunden Patienten isoliert wurden (NORM-1, NORM-2, NORM-3, NORM-4).

Das Ziel war herauszufinden, ob bei diesen Antikörpern, die alle (mit Ausnahme des M6) ein spezielles oder verschiedene Tumorgewebe erkennen können, Kreuzreaktionen mit anderen Antigenen nachzuweisen sind. Deshalb wurde getestet, ob die IgMs mit bakteriellen Antigenen wie LPS, PGN, LTS, Flagellin, HSP 70, bakterieller DNA von *E. coli* und *Cl. perfringens* oder mit den *H. pylori*-Antigenen CagA und VacA reagieren. Es handelt sich dabei um solche Moleküle, die, wie nachgewiesen wurde, die innate Immunabwehr über Toll-like-Rezeptoren aktivieren können (Takeda, 2005; Medzhitov, 2001; Pasare, 2004; Takeuchi, 1999; Beutler, 2004; Schwandner, 1999; Ramos, 2004; Jurk, 2002; Akira, 2004; Hemmi, 2000). Außerdem sollte gezeigt werden, ob Kreuzreaktionen mit körpereigenen Substanzen, und zwar Actin, Myosin, den Intermediärfilamenten Keratin, Desmin und Vimentin oder humaner DNA bestehen. Dies sind Antigene, die normalerweise geschützt in menschlichen Zellen vorliegen und die bei Zellnekrose freigesetzt werden und so mit dem Immunsystem in Kontakt geraten.

Selbstverständlich kann aus der großen Anzahl möglicher Antigene, die man sich als in den Organismus eindringende fremde Strukturen und als körpereigene Substanzen vorstellen kann, immer nur eine kleine Anzahl beispielhaft getestet werden.

Bei der Untersuchung der Reaktivität der Antikörper mit Tumorgewebe wurde in früheren Versuchen festgestellt, dass je nach Grad der Homologie der Antikörper zum kodierenden Keimbahn-Gen mehr oder weniger unterschiedliche Tumorgewebe erkannt werden. Es scheint also auf die Anzahl der Mutationen anzukommen, die ein natürlicher Antikörper durchgemacht hat, ob er nur mit einer Tumorart oder mit verschiedenen Tumoren oder sogar Vorläuferläsionen reagiert (Brändlein, 2003b). Es sollte deswegen untersucht werden, ob diese Tatsache auch bei Kreuzreaktionen der natürlichen Antikörper mit den getesteten Antigenen erkennbar ist und ob man allein anhand der Anzahl erfolgter Mutationen auf die Spezifität der Antikörper Rückschlüsse ziehen kann.

Des Weiteren bestand Interesse herauszufinden, ob die aus Magen-Ca.-Patienten gewonnenen Antikörper mit Bestandteilen des Bakteriums *Helicobacter pylori* kreuzreagieren, denn eine Infektion mit diesem Bakterium stellt eine Präkanzerose für die Entstehung eines Magenkarzinoms dar.

4.1 Auswertung der Versuche nach der Genetik der natürlichen Antikörper

4.1.1 Auswertung nach dem gemeinsamen Keimbahn-Gen

Wenn man sich die Genetik der getesteten natürlichen Antikörper genauer betrachtet (siehe Tab. 2a/b und 3a/b), kann man einige Antikörper jeweils zu Gruppen zusammenfassen und daraufhin untersuchen, ob eventuell Gemeinsamkeiten im Bindungsverhalten bestehen und diese auf den gemeinsamen Ursprung zurückzuführen sind.

Zunächst soll die Aufmerksamkeit auf die kodierenden Keimbahn-Gene gelenkt werden:

4.1.1.1 Ursprung der schweren Ketten

• Keimbahn-Gen DP-47

Die schweren Ketten der Antikörper PM-1, PM-2, SAM-4 und NORM-1 werden gemeinsam vom Keimbahn-Gen DP-47 kodiert, wobei alle der VH3-Familie angehören. Zudem sind alle schweren Ketten dieser vier Antikörper zu 100 % zum Keimbahn-Gen homolog, sie haben also keine Mutationen durchgemacht (Brändlein, 2002, 2003b). Die einzigen Auffälligkeiten, die sich im Reaktionsmuster dieser Antikörper-Gruppe mit den getesteten Antigenen feststellen lassen, sind folgende:

Die Antikörper PM-1 und NORM-1 reagieren beide mit keinem einzigen der getesteten Antigene. Der Antikörper PM-2 reagiert dagegen ausschließlich mit DNA und hat mit SAM-4 gemeinsam, dass beide *E. coli*-DNA binden. SAM-4 zeigt vielerlei Kreuzreaktionen, er bindet nämlich neben *E. coli*-DNA die körpereigenen Antigene Actin, Myosin und Keratin und das *H. pylori*-Toxin VacA.

Diese Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten lassen sich weder auf den gemeinsamen Ursprung der schweren Kette vom Keimbahn-Gen DP-47 zurückführen noch auf die Tatsache, dass die schweren Ketten aller Antikörper dieser Gruppe zu 100 % homolog zum Keimbahn-Gen sind.

• Keimbahn-Gen DP-49

Die schweren Ketten einer größeren Gruppe von Antikörpern stammen vom Keimbahn-Gen DP-49 ab. Im einzelnen handelt es sich dabei um die Antikörper SC-1, PAM-1, CM-1, SAM-3, SAM-5, NORM-4 und SAM-6. Die schweren Ketten der ersten sechs Antikörper gehören der VH3-Familie an, die schwere Kette von SAM-6 der VH4-Familie (Brändlein, 2003b). Diese Antikörper haben alle eine unterschiedliche Anzahl von Mutationen gegenüber dem Keimbahn-Gen durchgemacht:

Während die IgM-Antikörper PAM-1, CM-1, SAM-3 und SAM-6 keinerlei Mutationen der schweren Kette zum Keimbahn-Gen aufweisen (diese sind also zu 100 % homolog), verfügt der Antikörper SAM-5 über zwei S-Mutationen in der CDR (99,3 % Homologie zum Keimbahn-Gen). S-Mutationen dürften aber im Gegensatz zu R-Mutationen für das Bindungsverhalten der Antikörper keine Rolle spielen, weil sich die kodierte Aminosäure-Sequenz des Antikörpers und damit dessen Struktur nicht verändert. Die schwere Kette von NORM-4 hat eine R-Mutation in der FR (99,6 % Homologie zum Keimbahn-Gen) und bei der schweren Kette des Antikörpers SC-1 handelt es sich um die am stärksten mutierte schwere Kette dieser Gruppe: Sie verfügt über vier R- und zwei S-Mutationen in der FR und zudem noch zwei R-Mutationen in der CDR (zu 97 % homolog zum Keimbahn-Gen).

Die nicht mutierten Antikörper dieser Gruppe (SAM-3, SAM-6, PAM-1 und CM-1) zeigen relativ viele Kreuzreaktionen mit den getesteten Antigenen:

Alle vier Antikörper binden zumindest einige körpereigenen Antigene, wobei PAM-1 und SAM-6 jeweils die drei gleichen Antigene (Actin, Myosin und Keratin) erkennen und SAM-3 und CM-1 jeweils zwei körpereigene Antigene binden, wenn auch nur eines davon (nämlich Actin) von beiden gemeinsam erkannt wird. Lediglich SAM-6 bindet *E. coli*-DNA und alle Antikörper außer SAM-3 binden an das *H. pylori*-Toxin VacA.

Wenn man die stillen Mutationen in der schweren Kette von SAM-5 außer Acht lässt (da sie am Erkennungsmuster des Antikörpers wahrscheinlich nichts ändern), kann man ihn auch zur Gruppe der nicht-mutierten Antikörper rechnen. SAM-5 zeigt insgesamt in allen Versuchen die meisten Kreuzreaktionen: Er bindet die drei Antigene Actin, Myosin und Keratin, bakterielle und humane DNA, das *H. pylori*-Toxin VacA, und als einziger Antikörper im Test zeigt er eine schwache Reaktion mit HSP 70.

NORM-4, der über eine R-Mutation in der CDR verfügt, bindet keines der untersuchten Antigene.

Der stärker mutierte Antikörper SC-1 zeigte in früheren Untersuchungen mit Tumorgewebe ein sehr spezifisches Bindungsmuster ausschließlich mit Magen-Ca.-Zellen. Theoretisch müsste er wegen seiner höheren Mutationsrate auch mit den getesteten Antigenen weniger Kreuzreaktionen zeigen, allerdings bindet er wie die meisten anderen vom Keimbahn-Gen DP-49 kodierten Antikörper ebenfalls zwei der getesteten körpereigenen Antigene (nämlich Actin und Myosin), zudem bakterielle und humane DNA und auch VacA.

Insgesamt fällt auf, dass die Antikörper, deren schwere Kette vom Keimbahn-Gen DP-49 kodiert wird, mit Ausnahme des Antikörpers NORM-4 eher Kreuzreaktionen zeigen als die Gruppe der Antikörper, deren schwere Kette vom Keimbahn-Gen DP-47 kodiert wird, und zwar unabhängig von der Anzahl der erfolgten Mutationen.

• **Übrige Keimbahn-Gene**

Die schweren Ketten der Antikörper SAM-1, LM-1 und CM-2 stammen jeweils von anderen Keimbahn-Genen ab (siehe Tab. 2a in der Einleitung) und können deshalb keiner Gruppe zugeordnet werden (Brändlein, 2002, 2003b).

4.1.1.2 Ursprung der leichten Ketten

Die leichten Ketten der untersuchten natürlichen IgM-Antikörper stammen alle mit Ausnahme der beiden Paare NORM-1 / NORM-3 und SAM-1 / SAM-6 von unterschiedlichen Keimbahn-Genen ab (Brändlein, 2003b). Deshalb lässt sich über Gemeinsamkeiten oder Unterschiede im Bindungsverhalten, die auf das Ursprungs-Gen der leichten Kette zurückzuführen sein könnten, nur wenig sagen. Sowohl NORM-1 (1R/1S-Mutation in FR) als auch NORM-3 (2R/2S-Mutationen in FR), deren leichte Kette vom Keimbahn-Gen IgLV3-10 abstammt, zeigten in den Versuchen keine Kreuzreaktionen mit den getesteten Antigenen.

SAM-1 (keine Mutationen) und SAM-6 (1R-Mutation in FR) erkennen beide Actin, Keratin und VacA. Beim SAM-6 kommen noch Myosin und *E. coli*-DNA hinzu.

Auch hier lassen sich aber keine Rückschlüsse ziehen, ob das Reaktionsmuster der Antikörper in irgendeiner Weise etwas mit der Herkunft der leichten Ketten oder der Anzahl der Mutationen in der leichten Kette zu tun hat.

4.1.2 Auswertung der Ergebnisse nach der Gesamtzahl der Antikörper-Mutationen

Zudem kann noch betrachtet werden, ob die Gesamtzahl der Mutationen das Bindungsverhalten der Antikörper beeinflusst.

Das Reaktionsmuster der humanen natürlichen IgM-Antikörper mit Tumorgewebe wurde in früheren Studien mit der Mutationsrate verglichen. Dabei fiel auf, dass es eine deutliche Korrelation zwischen der Anzahl von Mutationen und dem Reaktionsmuster gab. Keimbahncodierte Antikörper ohne Mutationen (PAM-1, PM-2, SAM-4 und SAM-3) reagierten immer mit einem breiten Spektrum verschiedener Tumore, wohingegen das Spektrum der Reaktionen mit steigender Zahl von Mutationen abnahm (SC-1, CM-2, SAM-5) (Brändlein, 2003b). PAM-1 (100 % homolog zum Keimbahn-Gen) hat z.B. mit fast allen getesteten Tumorgewebe reagiert, während SC-1 (97 % homolog zum Keimbahn-Gen) nur an Magen-Ca.-Siegelringzellen gebunden hat. Dies führte zur Annahme, dass wenige Mutationsereignisse das Reaktionsmuster bestimmen könnten. Je nach Grad der Homologie der Antikörper zum kodierenden Keimbahn-Gen und somit der Zahl durchgemachter Mutationen sollten die Antikörper also mehr oder weniger unterschiedliche Tumorgewebe erkennen (Brändlein, 2003b).

Nach den Ergebnissen der Versuche mit körpereigenen Antigenen und bakteriellen Antigenen ist es aber nicht möglich, diese Feststellung, die aufgrund der Bindung von Tumorgewebe getroffen wurde, einfach auf das Reaktionsmuster der natürlichen Antikörper mit anderen Antigenen zu übertragen:

Nimmt man nur auf die R-Mutationen in den CDRs Rücksicht, so hat der Antikörper CM-2 die meisten Mutationen (sieben) vorzuweisen. Insofern würde die Behauptung auf diesen Antikörper gut zutreffen, denn in sämtlichen Versuchen reagierte der CM-2-Antikörper negativ. Die Antikörper SC-1 (fünf R-Mutationen) und SAM-5 (vier R-Mutationen) müssten aber der Theorie nach auch relativ spezifisch binden und nur wenige Kreuzreaktionen zeigen, jedoch ist genau das Gegenteil der Fall: Denn SAM-5

ist derjenige Antikörper, der die meisten Kreuzreaktionen aller getesteten natürlichen IgM-Antikörper an den Tag legt.

Antikörper, die keine Mutationen in den CDRs haben, müssten mit sehr vielen Antigenen kreuzreagieren. Das wird beispielsweise durch die Antikörper SAM-6, PAM-1 oder LM-1 bestätigt. Andere Beobachtungen, z. B. das Reaktionsverhalten der Antikörper PM-1 oder NORM-1, die beide keinerlei Kreuzreaktionen zeigen, sprechen dagegen.

Auch wenn nicht nur die Zahl der R-Mutationen in den CDR, sondern die Gesamtzahl aller R- und S-Mutationen in den CDRs und FRs betrachtet wird, lassen sich ähnliche Feststellungen treffen:

Denn SC-1, SAM-5 und CM-2 weisen nicht nur viele R-Mutationen in den CDRs auf, sondern haben alle drei insgesamt 16 R- und S-Mutationen in den CDRs und FRs. Die Anzahl der Kreuzreaktionen ist aber wie oben beschrieben sehr unterschiedlich und reicht von keiner Kreuzreaktion bis hin zu sieben Kreuzreaktionen mit den getesteten Antigenen.

Andere Antikörper, die nur eine oder gar keine Mutation aufweisen (z. B. SAM-6, LM-1, SAM-1, SAM-3), müssten theoretisch viele Kreuzreaktionen zeigen, was wiederum in den meisten Versuchen bestätigt wird.

Die weiteren Antikörper, die in den Versuchen keine Kreuzreaktionen zeigten (alle NORMs und PM-1) weisen eine große Variationsbreite an Mutationen auf: Sie reicht von insgesamt zwei Mutationen (NORM-1) über drei (NORM-2, PM-1) und vier (NORM-4) bis hin zu acht Mutationen (NORM-3).

4.2 Gegenüberstellung: Antikörper aus Magen-Ca.-Patienten vs. Antikörper aus Patienten mit anderen Tumoren

Die Antikörper aus Tab. 1 lassen sich auch nach ihrer Herkunft aus verschiedenen Tumor-Patienten einteilen. Eine große Anzahl von Antikörpern stammt aus Patienten, die an einem Magenkarzinom erkrankt waren. Es handelt sich dabei um die Antikörper SAM-1, SAM-3, SAM-4, SAM-5, SAM-6, PAM-1 und SC-1. Diese kann man der Gruppe von Antikörpern gegenüber stellen, die aus gesunden Probanden oder an anderen Tumoren erkrankten Patienten isoliert wurden. Diese Gruppe wird gebildet von

den Antikörpern PM-1, PM-2, LM-1, CM-1, CM-2, M6, NORM-1, NORM-2, NORM-3 und NORM-4.

Auffällig ist, dass alle Antikörper, die mit keinem der getesteten Antigene kreuzreagieren, zur Gruppe der Antikörper gehören, die aus Nicht-Magen-Ca.-Patienten gewonnen wurden.

Alle aus Magen-Ca.-Patienten isolierten Antikörper mit Ausnahme des IgM SAM-3 zeigen eine Kreuzreaktion mit dem *Helicobacter pylori*-Toxin VacA. Und alle Antikörper, die eine positive Reaktion bei der Inkubation mit VacA zeigen, reagieren immer auch mit Actin positiv und dazu noch mit mindestens einem der beiden Antigene Myosin und Keratin. Von allen aus Magen-Ca.-Patienten isolierten natürlichen Antikörpern werden also wenigstens zwei körpereigene Antigene gebunden.

VacA schädigt die Epithelzellen des Magens und soll für die dauerhafte Entzündungsreaktion im Magen verantwortlich sein. Zudem soll es gleichzeitig immunsuppressiv wirksam sein, indem es die T-Zell-Aktivierung, T-Zell-Proliferation und Antigen-Präsentation und damit die erworbene Immunabwehr hemmt (Boncristiano, 2003; Gebert, 2003; Montecucco, 2003; Blaser, 2004). Die Erkennung des Toxins VacA durch natürliche Antikörper könnte also eine alternative Möglichkeit des Organismus zur Erkennung und Bekämpfung einer *H. pylori*-Infektion darstellen, zumal da VacA so gut wie von allen *H. pylori*-Stämmen gebildet wird.

Als einzige Antikörper, die nicht aus Magen-Ca.-Patienten isoliert wurden, reagierten LM-1 und CM-1 mit VacA positiv.

Keine Kreuzreaktionen entstehen hingegen bei der Inkubation aller Antikörper mit dem *H. pylori*-Antigen CagA, das von besonders pathogenen Stämmen exprimiert wird, die zu einer höheren Prävalenz und Intensität einer Schleimhautatrophie und intestinalen Metaplasie führen, wodurch das Risiko einer Magenkarzinom-Entstehung deutlich erhöht wird.

4.3 Diskussion der Kreuzreaktionen der natürlichen Antikörper mit körpereigenen Antigenen

Während mehr als die Hälfte der Antikörper mit Actin und zusätzlich mit mindestens einem der beiden Antigene Myosin und Keratin positiv reagierten, führte die Inkubation aller Antikörper mit den Intermediärfilamenten Vimentin und Desmin zu einer negativen Reaktion. Dies bedeutet jedoch nicht, dass diese Moleküle grundsätzlich nicht

von natürlichen IgM-Antikörpern gebunden werden, denn vielleicht ist dies die Aufgabe eines anderen Pools natürlicher Antikörper.

Die IgM-Antikörper CM-1 und SC-1 erkannten in den Versuchen die Antigene Actin und Myosin; Actin und Keratin wurde dagegen von den Antikörpern SAM-1 und SAM-3 gebunden. Bei PAM-1, SAM-4, SAM-5, SAM-6 und LM-1 kam mit all diesen drei körpereigenen Antigenen eine positive Reaktion zustande.

4.4 Diskussion der Kreuzreaktionen der natürlichen Antikörper mit bakteriellen Antigenen

Bei den Versuchen stellte sich auch heraus, dass von den getesteten natürlichen Antikörpern keine der bakteriellen Antigene erkannt werden, die als Aktivatoren der natürlichen Immunabwehr durch Toll-like-Rezeptoren identifiziert wurden. So konnte weder Lipopolysaccharid gram-negativer Bakterien, noch Lipoteichonsäure oder Peptidoglykan gram-positiver Bakterien von den natürlichen Antikörpern gebunden werden. Auch die Inkubation der Antikörper mit Flagellin blieb in allen Fällen negativ. Lediglich Heat Shock Protein 70 wurde von SAM-5, wenn auch nur sehr schwach, erkannt. Es zeigte sich also, dass die getesteten natürlichen Antikörper nicht mit diesen bakteriellen Antigenen kreuzreagieren, wie man dies aufgrund früherer Forschungsergebnisse hätte erwarten können (Cote, 1986; Campbell, 1987; Lloyd, 1989; McKnight, 1990; Pfaff, 1990; Konishi, 1993; Fearon, 1996; Boes, 1998, 2000; Ochsenbein, 1999). Vielleicht handelte es sich bei einem großen Teil dieser damals festgestellten Kreuzreaktionen von natürlichen Antikörpern nur um unspezifische *in vitro* Artefakte, die im hier durchgeführten ELISA nicht auftraten, und nicht um spezifische Bindungsreaktionen. Selbstverständlich wäre aber auch vorstellbar, dass die getesteten IgM-Antikörper aus Tab. 1 eher tumorspezifisch reagieren und damit nur wenige Kreuzreaktionen mit bakteriellen Antigenen zeigen.

4.5 Auswertung der Kreuzreaktionen der natürlichen Antikörper mit DNA

Bei den Inkubationsversuchen der natürlichen Antikörper mit DNA zeigte erstmals der Antikörper PM-2 Kreuzreaktionen. Mit allen getesteten Antigenen zeigte dieser natürliche Antikörper keine Reaktionen, nur die Testung mit humaner Plazenta-DNA und *E. coli*-DNA ergab ein positives Ergebnis. Es handelte sich dabei nicht nur um ein positives Ergebnis, sondern um die stärksten Reaktionen aller Antikörper mit DNA

überhaupt. Wie PM-2 reagierten auch SAM-5 und SC-1 sowohl mit humaner Plazenta-DNA als auch mit *E. coli*-DNA positiv. Die Antikörper LM-1, SAM-4 und SAM-6 haben nur *E. coli*-DNA, jedoch keine humane DNA gebunden. Und alle anderen getesteten IgM-Antikörper erkannten gar keine DNA. Besonders auffällig war, dass bei den beiden Versuchen mit bakterieller DNA kein Antikörper mit *Cl. perfringens*-DNA reagierte, während immerhin sechs der 17 Antikörper *E. coli*-DNA gebunden haben. Ein Grund dafür könnte die unterschiedliche Durchschnittsgröße der eingesetzten DNA-Fragmente sein. Die Durchschnittsgröße der *E. coli*-DNA-Bruchstücke betrug ungefähr 16 kb und war damit genauso groß wie die verwendeten Fragmente der humanen Plazenta-DNA. Die Moleküle der *Cl. perfringens*-DNA waren dagegen auf eine Durchschnittsgröße von annäherungsweise 24kb festgelegt. Es könnte also sein, dass die räumlichen Strukturen der größeren DNA-Bruchstücke von den natürlichen Antikörpern nicht erkannt werden. Als weiterer Grund wären z. B. unterschiedliche Methylierungszustände der verwendeten Desoxyribonucleinsäuren denkbar.

4.6 Antikörper ohne Kreuzreaktionen

Bei Betrachtung der Übersichtstabellen (Tab. 6a/b) über die Kreuzreaktionen aller natürlichen Antikörper (Tab. 1) mit den getesteten Antigenen fällt auf, dass einige Antikörper überhaupt keine Kreuzreaktionen mit diesen Antigenen zeigen. Dazu gehört zum einen der aus einer Brustkrebspatientin gewonnene IgM-Antikörper M6, der nicht nur mit den untersuchten körpereigenen und bakteriellen Antigenen keine Reaktion zeigte, sondern auch in früheren Versuchen mit Tumorgewebe immer negativ reagierte. Ebenso ergibt sich aus der Inkubation der Antikörper CM-2 und PM-1 mit den untersuchten Antigenen keine Bindungsreaktion. Zu den natürlichen Antikörpern, die keine Kreuzreaktionen zeigen, gehören außerdem alle aus gesunden Probanden isolierten NORM-Antikörper.

Die genannten natürlichen Antikörper scheinen sehr tumorspezifisch zu reagieren. Vielleicht erkennen sie keine in der Evolution konservierten Strukturen mehr, sondern binden an andere Moleküle oder modifizierte Kohlenhydratreste auf Rezeptoren, die spezifisch auf Tumorzellen vorkommen. Die Antikörper PM-1, NORM-1 und NORM-2 bindet zwar keine der getesteten Antigene, aber sie reagieren mit vielerlei verschiedenen Tumorgewebe. Es muss sich also bei den jeweiligen Zielantigenen um Rezeptoren handeln, die auf vielen Tumorzellen vorhanden sind und deren räumliche Strukturen

keine Ähnlichkeiten mit den getesteten Antigenen aufweisen. Außerdem müssen die entsprechenden Rezeptoren spezifisch auf Tumorgewebe zu finden sein, denn an Normalgewebe binden die Antikörper ebenso wie an die getesteten Antigene nicht. Der Antikörper CM-2 hingegen scheint nur einen speziellen Rezeptor zu erkennen, der alleine auf Tumorzellen kolorektaler Adenokarzinome vorkommt. Denn nur hier ergibt sich eine positive Reaktion mit CM-2, andere Tumore oder gesundes Gewebe werden wie die untersuchten Antigene nicht gebunden.

4.7 Bisher bekannte Rezeptoren für tumorspezifische natürliche IgM-Antikörper

Bisher erforscht wurde z. B. der Rezeptor des natürlichen IgM-Antikörpers SC-1. Es handelt sich hierbei um eine 82 kD-Isoform von CD55 (DAF, decay-accelerating factor), die über einen GPI-Anker in der Membran gebunden ist und die zusammen mit der „normalen“ 70 kD-Isoform spezifisch auf Magenkarzinom-Zellen überexprimiert wird. Die Bindung von SC-1 an seinen Rezeptor induziert schließlich die Tumorzell-Apoptose (Hensel, 2001b; Brändlein, 2002; Vollmers, 2005a). Da der SC-1-Rezeptor spezifisch auf Magenkarzinom-Zellen zu finden ist, erklärt sich die Tatsache, dass SC-1 mit keinen anderen Tumor- und Normal-Geweben reagiert. Die von SC-1 erkannten Kohlenhydrat-Strukturen der 82 kD-Isoform von CD55 müssen Ähnlichkeit mit räumlichen Strukturen von Actin, Myosin, DNA und VacA haben, mit denen SC-1 kreuzreagiert.

Ein weiterer bisher bekannter Rezeptor eines der untersuchten natürlichen Antikörper ist der Rezeptor für PAM-1. Dieser Antikörper bindet an eine post-transkriptionell modifizierte 130 kD-Isoform von CFR-1. Der CFR-1/PAM-1-Rezeptor ist auf der Membran fast jeder epithelialer Tumoren/Karzinomen jeden Typs und Ursprungs exprimiert. Dagegen ist er auf gesundem Gewebe nicht nachweisbar (Hensel, 2001a; Brändlein, 2002, 2003c; Vollmers, 2005a, 2005b). Ebenso konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor auf Präkanzerosen verschiedener Tumore exprimiert wird. Dies erklärt, warum PAM-1 mit zahlreichen verschiedenen Tumorgeweben und Präkanzerosen reagiert. Die Kohlenhydrat-Strukturen auf der von PAM-1 erkannten CFR-1-Isoform müssen Ähnlichkeiten mit den Actin-, Myosin-, Keratin-Molekülen und VacA haben, mit denen der Antikörper kreuzreagiert.

Das Reaktionsmuster der natürlichen Antikörper mit Tumorzellen ist also abhängig von der Lokalisation der erkannten Rezeptoren und könnte, wie Beobachtungen vermuten

lassen, außerdem von der Zahl durchgemachter Mutationen bestimmt werden. Ob weitere Kreuzreaktionen auftreten, hängt davon ab, ob die jeweiligen Antigene strukturelle Ähnlichkeiten mit den entsprechenden Zellrezeptoren aufweisen. Es konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, dass die Kreuzreaktivität der Antikörper mit anderen Antigenen vom Homologie-Grad zum Keimbahn-Gen abhängig ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei den getesteten natürlichen IgM-Antikörpern um recht tumorspezifische Antikörper handelt, da weit weniger Kreuzreaktionen auftreten, als man aus früheren Studien hätte schließen können. Bei einigen Antikörpern ergeben sich keinerlei Kreuzreaktionen mit den untersuchten Antigenen. Antikörper, bei denen sich Kreuzreaktionen feststellen lassen, stammen überwiegend aus Patienten, die an einem Magenkarzinom erkrankt waren. Alle positiv reagierenden Antikörper erkennen zumindest zwei körpereigene Antigene und mit einer Ausnahme zugleich das *H. pylori*-Toxin VacA. Nur wenige Kreuzreaktionen folgen aus der Inkubation der Antikörper mit humaner oder bakterieller DNA. Mit den übrigen getesteten bakteriellen Antigenen ergeben sich - von einer Ausnahme abgesehen - keine Kreuzreaktionen, woraus man schließen kann, dass innerhalb der Familie der natürlichen Antikörper verschiedene Pools an Antikörpern existieren müssen, denen verschiedene Aufgaben zuteil werden. Es gibt, wie aus früheren Forschungsergebnissen bekannt ist, natürliche Antikörper, die den Organismus im Kampf gegen eindringende Pathogene unterstützen und zudem andere natürliche Antikörper, die eher die Aufgabe haben, transformierte Zellen zu beseitigen.

5 Zusammenfassung

Am Pathologischen Institut der Universität Würzburg wurden aus Tumorpatienten und gesunden Probanden mit Hilfe der humanen Hybridoma Technologie (Trioma Technik) natürliche IgM-Antikörper gewonnen, die Rezeptoren auf Tumorzellen erkennen. Natürliche Antikörper bilden innerhalb der innate Immunabwehr eine Immunpatrouille auf der Suche nach eindringenden Pathogenen und transformierten Zellen. Aufgrund früherer Forschungsergebnisse ging man davon aus, dass natürliche Antikörper „unspezifisch“ reagieren, da sie lediglich sich wiederholende, in der Evolution konservierte Antigen-Muster von Pathogenen erkennen. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass natürliche Antikörper nicht „unspezifisch“ reagieren, sondern dass verschiedene Pools natürlicher Antikörper existieren und in Abhängigkeit von ihren Aufgaben verschiedene Antigene „oligospezifisch“ erkannt werden. Dazu wurden zum einen Kreuzreaktionen der isolierten natürlichen Antikörper mit den körpereigenen Antigenen Actin, Myosin, Keratin, Desmin, Vimentin und humane Plazenta-DNA untersucht, und zum anderen getestet, ob bakterielle Antigene wie LPS, LTS, PGN, Flagellin, HSP 70, *E. coli*- und *Cl. perfringens*-DNA und die *H. pylori*-Antigene CagA und VacA erkannt werden.

Insgesamt ergeben sich aus der Inkubation der Antikörper mit den getesteten Antigenen weit weniger Kreuzreaktionen als man nach bisherigen Untersuchungen mit natürlichen Antikörper hätte erwarten können. Die isolierten Antikörper reagieren recht tumorspezifisch; nur wenige erkennen DNA, und bakterielle Antigene werden mit Ausnahme des getesteten VacA praktisch nicht gebunden. Die überwiegende Zahl an Kreuzreaktionen ergibt sich mit einigen normalerweise intrazellulär vorliegenden Antigenen. Einige der natürlichen IgM-Antikörper zeigen sogar keinerlei Kreuzreaktionen mit den getesteten Antigenen. Ein Zusammenhang der Reaktionsweise der Antikörper mit dem genetischen Ursprung oder der Anzahl durchgemachter Mutationen konnte nicht hergestellt werden. Die tumorspezifische Reaktionsweise der getesteten Antikörper unterstreicht deren Eignung als potentielle Immuntherapeutika für die Behandlung von Tumorerkrankungen.

6 Literaturverzeichnis

Beutler B. (2004), Innate immunity: an overview, *Mol. Immunol.* 40, 845-859

Blaser M. J., Atherton J. C. (2004), *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease, *J. Clin. Invest.* 113, 321-333

Boes M., Prodeus A. P., Schmidt T., Carroll M. C., Chen J. (1998), A critical role of natural immunoglobulin M in immediate defense against systemic bacterial infection, *J. Exp. Med.* 188, 2381-2386

Boes M. (2000), Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses, *Mol. Immunol.* 37, 1141-1149

Bohn J. (1999), Are natural antibodies involved in tumor defence, *Immunol. Lett.* 69, 317-320

Boncristiano M., Rossi Paccani S., Barone S., Ulivieri C., Patrussi L., Ilver D., Amedei A., D'Elis M. M., Telford J. L., Baldari C. T. (2003), The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T-cell activation by two independent mechanisms, *J. Exp. Med.* 198, 1887-1897

Bonorino C., Nardi N.B., Zhang X., Wysocki L. (1998), Characteristics of the Strong Antibody Response to Mycobacterial Hsp70: A Primary, T Cell-Dependent IgG Response with no Evidence of Natural Priming or $\gamma\delta$ T Cell Involvement, *J. Immunol.* 161, 5210-5216

Brändlein S., Lorenz J., Ruoff N., Hensel F., Beyer I., Müller J., Neukam K., Eck M., Müller-Hermelink H. K., Vollmers H. P. (2002), Human monoclonal IgM antibodies with apoptotic activity isolated from cancer patients, *Hum. Antibodies* 11, 107-119

Brändlein S., Pohle T., Vollmers C., Wozniak E., Müller-Hermelink H. K., Vollmers H. P. (2003a), CFR-1 receptor as target for tumor-specific apoptosis induced by the natural human monoclonal antibody PAM-1, *Oncol. Rep.* 11, 777-784

Brändlein S., Pohle T., Ruoff N., Wozniak E., Müller-Hermelink H. K., Vollmers H. P. (2003b), Natural IgM Antibodies and Immunosurveillance Mechanisms against Epithelial Cancer Cells in Humans, *Cancer Res.* 63, 7995-8005

- Brändlein S., Beyer I., Eck M., Bernhardt W., Hensel F., Müller-Hermelink H. K., Vollmers H. P.** (2003c), CFR-1, a new marker for precancerous epithelial lesions defined by the human monoclonal antibody PAM-1, *Cancer Res.* 63, 2052-2061
- Brändlein S., Vollmers H. P.** (2004), Natural IgM antibodies, the ignored weapons in tumor immunity, *Histol. Histopathol.* 19, 897-905
- Campbell A. M., Whitford P., Leake R. E.** (1987), Human monoclonal antibodies and monoclonal antibody multispecificity, *Br. J. Cancer* 56, 709-713
- Casali P., Notkins A. L.** (1989), CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire, *Immunol. Today* 10, 364-368
- Cote R. J., Morrissey D. M., Houghton A. N., Thomson T. M., Daly M. E., Oettgen H. F., Old L. J.** (1986), Specificity analysis of human monoclonal antibodies reactive with cell surface and intracellular antigens, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2959-2963
- Cover T. L., Hanson P. I., Heuser J. E.** (1997), Acid-induced Dissociation of VacA, the *Helicobacter pylori* Vacuolating Cytotoxin, Reveals Its Pattern of Assembly, *J. Cell Biol.* 138, 759-769
- Cover T. L., Blaser M. J.** (1999), *Helicobacter pylori* factors associated with disease, *Gastroenterology* 117, 257-261
- David K., Ollert M. W., Vollmert C., Heiligtag S., Eickhoff B., Erttmann R., Bredehorst R., Vogel C.W.** (1999), Human natural immunoglobulin M antibodies induce apoptosis of human neuroblastoma cells by binding to a Mr 260,000 antigen, *Cancer Res.* 59, 3768-3775
- Dono M., Cerruti G., Zupo S.** (2004), The CD5+ B-cell, *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 36, 2105-2111
- Dunn B. E., Cohen H., Blaser M. J.** (1997), *Helicobacter pylori*, *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 720-741
- Du Pasquier L.** (2001), The immune system of invertebrates and vertebrates, *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 129, 1-15
- Faller G., Vollmers H. P., Weiglein I., Marx A., Zink C., Pfaff M., Müller-Hermelink H. K.** (1990), HAB-1, A new heteromyeloma for continuous production of human monoclonal antibodies, *Br. J. Cancer* 62, 595-598

Fearon D. T., Locksley R. (1996), The instructive role of innate immunity in the acquired immune response, *Science* 272, 50-53

Figueiredo C., Quint W., Nouhan N., van den Munckhof H., Herbrink P., Scherpenisse J., de Boer W., Schneeberger P., Perez-Perez G., Blaser M.J., van Doorn L. J. (2001), Assessment of *Helicobacter pylori* vacA and cagA Genotypes and Host Serological Response, *J. Clin. Microbiol.* 39, 1339-1344

Gebert B., Fischer W., Weiss E., Hoffmann R., Haas R. (2003), *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T-lymphocyte activation, *Science* 301, 1099-1102

Hahn H., Klein P., Giesbrecht P. (2001), Bakterien: Definition und Morphologie. In: Hahn H., Falke D., Kaufmann S.H.E., Ullmann U. (Hrsg.) Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, 4. korr. Aufl., Berlin/Heidelberg/New York, Springer Verlag, S.178

Hayakawa K., Hardy R.R. (2000), Development and function of B-1 cells, *Curr. Opin. Immunol.* 12, 346-353

Hayashi F., Smith K. D., Ozinsky A., Hawn T. R., Yi E. C., Goodlett D. R., Eng J. K., Akira S., Underhill D. M., Aderem A. (2001), The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5, *Nature* 410, 1099-1103

Hemmi H., Takeuchi O., Kawai T., Kaisho T., Sato S., Sanjo H., Matsumoto M., Hoshino K., Wagner H., Takeda K., Akira S. (2000), A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA, *Nature* 408, 740-745

Hensel F., Hermann R., Schubert C., Abé N., Schmidt K., Franke A., Shevchenko A., Mann M., Müller-Hermelink H. K., Vollmers H. P. (1999a), Characterisation of glycosylphosphatidylinositol-linked molecule CD55/Decay-accelerating factor as the receptor for antibody SC-1-induced apoptosis, *Cancer Res.* 59, 5299-5306

Hensel F., Knörr C., Hermann R., Krenn V., Müller-Hermelink H. K., Vollmers H. P. (1999b), Mitogenic autoantibodies in *Helicobacter pylori*-associated stomach cancerogenesis, *Int. J. Cancer* 81, 229-235

Hensel F., Brändlein S., Eck M., Schmidt K., Krenn V., Kloetzer A., Bachi A., Mann M., Müller-Hermelink H. K., Vollmers H. P. (2001a), A novel proliferation-associated variant of CFR-1 defined by a human monoclonal antibody, *Lab. Invest.* 81, 1097-1108

Hensel F., Hermann R., Brändlein S., Krenn V., Schmausser B., Geis S., Müller-Hermelink H. K., Vollmers H. P. (2001b), Regulation of the New Coexpressed CD55 (Decay-Accelerating Factor) Receptor of Stomach Carcinoma Cells Involved in Antibody SC-1-Induced Apoptosis, *Lab. Invest.* 81, 1553-1563

Herzenberg L. A. (2000), B-1 cells: the lineage question revisited, *Immunol. Rev.* 175, 9-22

Janeway C. A. (2001), How the immune system works to protect the host from infection: a personal view, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 7461-7468

Janeway C. A. (2002), Die angeborene Immunität. In: Janeway C.A., Travers P., Walport M., Shlomchik M., Immunologie, 5.Auflage, Heidelberg/Berlin, Spektrum Akad. Verlag., S.37-98

Jurk M., Heil F., Vollmer J., Schetter C., Krieg A. M., Wagner H., Lipford G., Bauer S. (2002), Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848, *Nat. Immunol.* 3, 499

Kipps T.J. (1989), The CD5 B cell, *Adv. Immunol.* 47, 117-185

Konishi E. (1993), Naturally Occurring Antibodies that React with Protozoan Parasites, *Parasitology Today* 9, 361-364

Lloyd K. O., Old L. J. (1989), Human monoclonal antibodies to glycolipids and other carbohydrate antigens: dissection of the humoral immune response in cancer patients, *Cancer Res.* 49, 3445-3451

Löffler G. (1998a), Zelluläre Organellen und Strukturen. In: Löffler G., Petrides P.E., Biochemie und Pathobiochemie, 6. korr. Aufl., Berlin/Heidelberg/New York, Springer Verlag, S.198-199

Löffler G. (1998b), Kohlenhydrate. In: Löffler G., Petrides P.E., Biochemie und Pathobiochemie, 6. korr. Aufl., Berlin/Heidelberg/New York, Springer Verlag, S.131

Löffler G. (1998c) Proteinbiosynthese, Proteinmodifizierung und Proteinabbau. In: Löffler G., Petrides P.E., Biochemie und Pathobiochemie, 6. korr. Aufl., Berlin/Heidelberg/New York, Springer Verlag, S.280-281

Martin F., Kearney J. F. (2001), B1 cells: similarities and differences with other B cell subsets, *Curr. Opin. Immunol.* 13, 195-201

- Matsuda F., Ishii K., Bourvagnet P., Kurna K., Hayashida H., Miyata T., Honjo T.** (1998), The complete nucleotide sequence of the human immunoglobulin heavy chain variable region locus, *J. Exp. Med.* 188, 2151-2162
- McKnight M. E., Koda K., DeBoer K., Glassy M. C.** (1990), Human monoclonal antibodies to nuclear antigens, *Hum. Antibodies Hybridomas* 1, 77-82
- Medzhitov R.** (2001), Toll-like receptors and innate immunity, *Nature Reviews Immunology* 1, 135-145
- Miller S. I., Ernst R. K., Bader M. W.** (2005), LPS, TLR4 and infectious disease diversity, *Nature Reviews Microbiology* 3, 36-46
- Miyake K.** (2003), Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4 - MD-2: unique roles for MD-2, *Int. Immunopharmacol.* 3, 119-128
- Montecucco C., De Bernard M.** (2003), Immunosuppressive and Proinflammatory Activities of the VacA Toxin of *Helicobacter pylori*, *J. Exp. Med.* 198, 1767-1771
- Ochsenbein A. F., Fehr T., Lutz C., Suter M., Brombacher F., Hengartner H., Zinkernagel R. M.** (1999), Control of early viral and bacterial distribution and disease by natural antibodies, *Science* 10, 2156-2159
- Odenbreit S., Puls J., Sedlmaier B., Gerland E., Fischer W., Haas R.** (2000), Translocation of *Helicobacter pylori* CagA into gastric epithelial cells by type IV secretion, *Science* 287, 1497-1500
- Ollert M. W., David K., Schmitt C., Hauenschild A., Bredehorst R., Erttmann R., Vogel C. W.** (1996), Normal human serum contains a natural IgM antibody cytotoxic for human neuroblastoma cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 4498-4503
- Ozinsky A., Underhill D. M., Fontenot J. D., Hajjar A. M., Smith K. D., Wilson C. B., Schroeder L., Aderem A.** (2000), The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by the cooperation between toll-like receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 13766-13771
- Pagliaccia C., Wang X. M., Tardy F., Telford J., Ruyschaert J. M., Cabiaux V.** (2000), Structure and interaction of VacA of *Helicobacter pylori* with a lipid membrane, *Eur. J. Biochem.* 267, 104-109
- Papini E., Zoratti M., Cover T. L.** (2001), In search of the *Helicobacter pylori* VacA mechanism of action, *Toxicon* 39, 1757-1767

Pasare C., Medzhitov R. (2004), Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity, *Microbes and Infection* 6, 1382-1387

Pfaff M., O'Connor R., Vollmers H. P., Müller-Hermelink H. K. (1990), Human monoclonal antibody against a tissue polypeptide antigen-related protein from a patient with a signet-ring cell carcinoma of the stomach, *Cancer Res.* 50, 5192-5198

Pohle T., Brändlein S., Ruoff N., Müller-Hermelink H. K., Vollmers H. P. (2004), Lipoptosis: Tumor-Specific Cell Death by Antibody-Induced Intracellular Lipid Accumulation, *Cancer Res.* 64, 3900-3906

Pschyrembel W. (Hrsg.) (1998), Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 258. Aufl., Berlin, de Gruyter, S.933-934

Ramos H. C., Rumbo M., Sirard J. C. (2004), Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa, *Trends in Microbiology* 12, 509-517

Rinkevich B. (1999), Invertebrates versus vertebrates innate immunity: In the light of evolution, *Scand. J. Immunol.* 50, 456-460

Rohde M., Daugaard M., Jensen M. H., Helin K., Nylandsted J., Jäättelä M. (2005), Members of the heat shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms, *Genes & Development* 19, 570-582

Rothstein T. L. (2002), Cutting edge commentary: two B-1 or not to be one, *J. Immunol.* 168, 4257-4261

Schröder N. W. J., Morath S., Alexander C., Hamann L., Hartung T., Zähringer U., Göbel U., Weber J. R., Schumann R. R. (2003), Lipoteichoic Acid (LTA) of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* Activates Immune Cells via Toll-like Receptor (TLR)-2, Lipopolysaccharide-binding Protein (LBP), and CD14, whereas TLR-4 and MD-2 Are Not Involved, *J. Biol. Chem.* 278, 15587-15594

Schwandner R., Dziarski R., Wesche H., Rothe M., Kirschning C. J. (1999), Peptidoglycan- and Lipoteichoic Acid-induced Cell Activation Is Mediated by Toll-like Receptor 2, *J. Biol. Chem.* 274, 17406-17409

Shlomchik M. J., Marshak-Rothstein A., Wolfowicz C. B., Rothstein T. L., Weigert M. G. (1987), The role of clonal selection and somatic mutation in autoimmunity, *Nature* 328, 805-811

- Sozzi M., Valentini M., Figura N., De Paoli P., Tedeschi R. M., Gloghini A., Serraino D., Poletti M., Carbone A.** (1998), Atrophic Gastritis and Intestinal Metaplasia in *Helicobacter pylori* Infection: The role of CagA status, *Am. J. Gastroenterol.* 93, 375-379
- Takeda K., Akira S.** (2005), Toll-like receptors in innate immunity, *Int. Immunol.* 17, 1-14
- Takeuchi O., Hoshino K., Kawai T., Sanjo H., Takada H., Ogawa T., Takeda K., Akira S.** (1999), Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components, *Immunity* 11, 443-451
- Trent M. S.** (2004), Biosynthesis, transport and modification of lipid A, *Biochem. Cell. Biol.* 82, 71-86
- Underhill D. M., Ozinsky A.** (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection, *Curr. Opin. Immunol.* 14, 103-110
- Valvano M. A.** (1992), Pathogenicity and molecular genetics of O-specific side-chain lipopolysaccharides of *Escherichia coli*, *Can. J. Microbiol.* 38, 711-719
- Vollmers H. P., O'Connor R., Müller J., Kirchner T., Müller-Hermelink H. K.** (1989), SC-1, a functional human monoclonal antibody against autologous stomach carcinoma cells, *Cancer Res.* 49, 2471-2476
- Vollmers H. P., Dämmrich J., Ribbert H., Wozniak E., Müller-Hermelink H. K.** (1995), Apoptosis of stomach carcinoma cells induced by a human monoclonal antibody, *Cancer* 76, 550-558
- Vollmers H. P., Dämmrich J., Hensel F., Ribbert H., Meyer-Bahlburg A., Ufken-Gaul G., v. Korff M., Müller-Hermelink H. K.** (1997), Differential expression of apoptosis receptors on diffuse and intestinal type stomach carcinoma, *Cancer* 79, 433-440
- Vollmers H. P., Hensel F., Hermann R., Dämmrich J., Wozniak E., Gessner P., Herrmann B., Zimmermann U., Müller-Hermelink H. K.** (1998a), Tumor-specific apoptosis by the human monoclonal antibody SC-1: A new therapeutical approach for stomach cancer, *Oncology Reports* 5, 35-40
- Vollmers H. P., Zimmermann U., Krenn V., Timmermann W., Illert B., Hensel F., Hermann R., Thiede A., Wilhelm M., Rückle-Lanz H., Reindl L., Müller-Hermelink H. K.** (1998b), Adjuvant therapy for gastric adenocarcinoma with the apoptosis-inducing human monoclonal antibody SC-1: first clinical and histopathological results, *Oncology Reports* 5, 549-552

Vollmers H. P., Brändlein S. (2002), Nature's best weapons to fight cancer: Revival of human monoclonal IgM antibodies, *Human Antibodies* 11, 131-142

Vollmers H. P., Brändlein S. (2005a), Death by Stress: Natural IgM-Induced Apoptosis, *Exp. Clin. Pharmacol.* 27, 1-7

Vollmers H. P., Brändlein S. (2005b), The "early birds": natural IgM antibodies and immune surveillance, *Histol. Histopathol.* 20, 927-937

Weiss D. S., Raupach B., Takeda K., Akira S., Zychlinsky A. (2004), Toll-like Receptors Are Temporally Involved in Host Defense, *J. Immunol.* 172, 4463-4469

Williams M. J. (2001), Regulation of antibacterial and antifungal innate immunity in fruitflies and humans, *Adv. Immunol.* 79, 225-259

Wortis H. H., Berland R. (2001), Cutting edge commentary: origins of B-1 cells, *J. Immunol.* 166, 2163-2166

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A _{xxx}	Absorption bei xxx nm
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Ca.	Carcinom
CDR	Complement Determining Region
<i>Cl. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetal Calf Serum (Fötales Kälberserum)
FR	Framework Region
g	Gramm
h	Stunde
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HSP 70	Heat Shock Protein 70
Ig	Immunglobulin
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
LTS	Lipoteichonsäure
μ	Mikro
m	Milli
M	Molar
MALT	Mucosa-associated lymphoid tissue
min	Minute
nm	Nanometer

OD	Optical Density
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PEG	Polyethylenglykol
PGN	Peptidoglykan
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
Tab.	Tabelle
U	Unit (Einheit)
VH	Variable Region der Immunglobulin schweren Kette
VL	Variable Region der Immunglobulin leichten Kette

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei all denen bedanken, die am Entstehen dieser Arbeit Anteil hatten:

An erster Stelle danke ich Herrn Professor Dr. H. P. Vollmers für die Überlassung des interessanten Themas, für die gute Betreuung und kompetente Unterstützung und selbstverständlich auch dafür, dass er sich bei jeglichen Problemen immer Zeit genommen hat, auch für manch längeres Gespräch.

Mein Dank gilt außerdem Frau Professor Dr. K. Ulrichs für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Bei Herrn Professor Dr. H. K. Müller-Hermelink, Direktor des Pathologischen Instituts der Universität Würzburg, bedanke ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Ganz besonders möchte ich Dr. Stephanie Brändlein danken: Dafür, dass sie mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Dafür, dass sie meine erste Anlaufstelle bei allen Problemen war und wir immer gemeinsam eine Lösung fanden. Und natürlich auch ein „Dankeschön“ für die Erstkorrektur meines Manuskripts.

Den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe Nicole Rauschert, Ewa Wozniak und Magdalena Pawlas danke ich für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die Teilung des Arbeitsplatzes.

Nicht zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meinen Eltern bedanken, die mich immer und überall unterstützen und an mich glauben.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Erk, Steffen Jürgen
Geburtsdatum: 03.09.1979
Geburtsort: Aschaffenburg
Anschrift: Corneliensstraße 23, 63739 Aschaffenburg, Deutschland
Tel.: 0178/1467796
E-Mail: steffenerk@web.de
Familienstand: ledig
Konfession: röm.-kath.
Nationalität: deutsch

SCHULLAUFBAHN

09/86 - 08/90 Grünewald-Grundschule, Aschaffenburg
09/90 - 07/99 Karl-Theodor-von-Dalberg-Gymnasium, Aschaffenburg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

ZIVILDIENTST

10/99 - 08/00 Klinikum Aschaffenburg (Anästhesie-OP)

STUDIUM DER HUMANMEDIZIN

10/00 - 09/02 Universität des Saarlandes, Saarbrücken/Homburg (Saar)
11.09.02 Ärztliche Vorprüfung
10/02 - 12/06 Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
28.08.03 Erstes Staatsexamen
12.09.05 Zweites Staatsexamen
21.11.06 Drittes Staatsexamen
22.11.06 Approbation als Arzt

FAMULATUREN

02/03 - 03/03	Anästhesie und operative Intensivmedizin	Klinikum Aschaffenburg
07/03 - 08/03	Innere Medizin	Praxis Dr.Baldus, Aschaffenburg
02/04 - 03/04	Innere Medizin (Gastroenterologie, Onkologie)	Klinikum Aschaffenburg
03/04 - 04/04	Urologie	Universitätsklinik Würzburg

PRAKTISCHES JAHR

10/05 - 02/06	Radiologie	Universitätsklinik Würzburg
02/06 - 05/06	Allgemein- und Unfallchirurgie	Juliusspital, Würzburg
05/06 - 09/06	Innere Medizin (Hämato-/Onkologie, Kardiologie)	Universitätsklinik Würzburg

BERUFLICHER WERDEGANG

seit 01/07	Assistenzarzt in Weiterbildung zum Internisten an der Medizinischen Klinik I (Kardiologie, Pulmologie, Intensivmedizin) des Klinikums Fulda
------------	---

DISSERTATION

06/04 - 05/05	Erstellung der Dissertation am Pathologischen Institut der Universität Würzburg (Professor Dr. H. P. Vollmers) zum Thema: Angeborene Immunität des Menschen: Kreuzreaktionen tumorspezifischer monoklonaler IgM-Antikörper
---------------	---

SONSTIGE KENNTNISSE und TÄTIGKEITEN

Fortbildungen:	EKG-Kurs Klinische Röntgendiagnostik von Thoraxerkrankungen Röntgenologisches Kolloquium
Fremdsprachen:	Englisch Französisch Latein
Nebentätigkeit:	Studentische Hilfskraft am Pathologischen Institut der Universität Würzburg (07/04 - 06/05)

Aschaffenburg, 26.04.2007