Aus der Medizinischen Universitätsklinik
Abteilung Innere Medizin I (Hämatologie und Onkologie)
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

Comparative Analysis of Predicted HLA Binding of
Immunoglobulin Idiotypic Sequences Indicates T-Cell Mediated
Immunosurveillance in Follicular Lymphoma

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg i. Br.

vorgelegt 2011
von Anna-Maria Strothmeyer
geboren in Lohne

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. H. E. Blum

Erster Gutachter: Prof. Dr. H. Veelken

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. P. Fisch

Jahr der Promotion: 2011

Meiner Familie

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	2
2.1	Das Follikuläre Lymphom	2
2.2	Der Aufbau der Immunabwehr	3
2.2.1	<i>Der B-Zell-Rezeptor</i>	3
2.2.2	<i>Der T-Zell-Rezeptor</i>	6
2.2.3	<i>Die Positiv- und Negativselektion</i>	7
2.2.4	<i>Das HLA-System</i>	8
2.3	Die Immuntherapie	9
2.4	Die Fragestellung	11
3	Materialien	13
3.1	Geräte	13
3.2	Materialien & Kits	13
3.3	Enzyme, Medien & sonstige Reagenzien	13
3.4	Computer Software und Databases	14
4	Methoden	15
4.1	Das Patientenkollektiv	15
4.2	Die HLA-Typisierung	16
4.2.1	<i>Die niedrigauflösende HLA-Typisierung</i>	17
4.2.2	<i>Die hochauflösende HLA-Typisierung</i>	17
4.2.2.1	<i>Die Isolierung der MNCs und ihre Kryopreservation</i>	17
4.2.2.2	<i>Die DNS-Extraktion und die photometrische Quantifizierung</i>	18
4.2.2.3	<i>Die PCR und Gelelektrophorese</i>	18
4.3	Der Idiotyp	18
4.3.1	<i>Die Idiotyp-Sequenz</i>	18

4.3.2	<i>Die Alignierung</i>	19
4.4	Die Analyse der Immunogenität mittels Bioinformatiksystemen	20
4.4.1	<i>Analyse des Epitopverteilungsmusters</i>	20
4.4.2	<i>Der Summenscore als Maß für die Immunogenität des Idiotypen</i>	21
4.4.2.1	<i>Die Immunogenität des Idiotypen vor dem Hintergrund eines einzelnen HLA-Allels</i>	21
4.4.2.2	<i>Die globale Immunogenität des Idiotypen auf dem HLA-Typ des betroffenen Patienten („autologer HLA-Typ“)</i>	22
4.4.2.3	<i>Die separate Analyse der Immunogenität definierter Regionen der Idiotypen</i>	22
4.5	Die statistische Auswertung	22
4.5.1	<i>Der Idiotyp versus fremde Idiotypen</i>	23
4.5.2	<i>Die Immunogenität des Ids im Vergleich zu seiner Keimbahnsequenz</i>	23
4.5.3	<i>Der Vergleich der Keimbahnsequenzen</i>	24
4.5.4	<i>Die Immunogenität des Ids im Vergleich zu derjenigen gesunder B-Zellen</i>	24
5	Ergebnisse	25
5.1	Patientencharakteristika	25
5.1.1	<i>Die HLA-Typisierung</i>	25
5.1.2	<i>Der Idiotyp</i>	28
5.1.2.1	<i>Die IgH</i>	28
5.1.2.2	<i>Die IgL</i>	32
5.1.2.3	<i>Vergleich der Mutationsanalysen von IgH und IgL des Idiotypen</i>	37
5.1.2.4	<i>Die Sequenzen gesunder B-Zellen</i>	39
5.2	Die Analyse der Immunogenität mittels Bioinformatiksystemen	41
5.2.1	<i>Die Beschränkung auf die Top 20-Peptidmotive</i>	41
5.2.2	<i>Das Bindungsverhalten einzelner HLA-Allele</i>	42
5.2.2.1	<i>Analyse des Bindungsverhaltens der einzelnen HLA-Allele für die IgH</i>	43

5.2.2.2	<i>Analyse des Bindungsverhaltens der einzelnen HLA-Allele für die IgL</i>	44
5.2.2.3	<i>Vergleich des Bindungsverhaltens der einzelnen HLA-Allele für die beiden Ketten</i>	46
5.2.3	<i>Die Ermittlung des Epitopverteilungsmusters mittels Summenscore</i>	46
5.2.3.1	<i>Die Ermittlung des Epitopverteilungsmusters mittels Summenscore für die IgH</i>	46
5.2.3.2	<i>Die Ermittlung des Epitopverteilungsmusters mittels Summenscore für die IgL</i>	47
5.2.3.3	<i>Die Ermittlung des Epitopverteilungsmusters mittels Summenscore für die kontaminierenden B-Zell-Sequenzen der IgH und IgL</i>	48
5.2.3.4	<i>Der Vergleich des Epitopverteilungsmusters mittels Summenscore für IgH, IgL und die kontaminierenden B-Zell-Sequenzen</i>	49
5.2.4	<i>Das Verteilungsmuster bindungsstarker Peptide</i>	50
5.2.4.1	<i>Das Epitopverteilungsmuster innerhalb der IgH, ihrer unmutierten Keimbahnsequenz und den schweren Ketten gesunder B-Zellen</i>	50
5.2.4.2	<i>Das Epitopverteilungsmuster innerhalb der IgL, ihrer unmutierten Keimbahnsequenz und den leichten Ketten gesunder B-Zellen</i>	52
5.2.4.3	<i>Der Vergleich des Epitopverteilungsmusters von IgH, IgL und gesunden B-Zellen</i>	54
5.3	Der statistische Vergleich	55
5.3.1	<i>Die IgH</i>	55
5.3.1.1	<i>Der Immunogenitätsvergleich der autologen IgH mit den IgHs HLA-differenter Patienten</i>	55
5.3.1.1.1	<i>Vergleich der gesamten IgH</i>	55
5.3.1.1.2	<i>Separate Analyse der einzelnen Regionen innerhalb der IgH</i>	56
5.3.1.1.3	<i>Separate Analyse der gesamten FR- und CDR-Bereiche für die IgH</i>	58
5.3.1.2	<i>Der Immunogenitätsvergleich von IgH und Keimbahnsequenz</i>	59

5.3.1.2.1	<i>Vergleich der gesamten IgH und ihrer Keimbahnsequenz</i>	59
5.3.1.2.2	<i>Separate Analyse der einzelnen Regionen innerhalb der IgH und ihrer Keimbahnsequenz</i>	61
5.3.1.2.3	<i>Separate Analyse des gesamten FR- bzw. CDR-Bereiches der IgH und ihrer Keimbahnsequenz</i>	62
5.3.1.3	<i>Der Immunogenitätsvergleich der IgH-Keimbahnsequenzen</i>	64
5.3.1.4	<i>Der Immunogenitätsvergleich von IgH und gesunden B-Zell-Sequenzen</i>	65
5.3.1.4.1	<i>Vergleich der gesamten IgH mit gesunden B-Zell-Sequenzen</i>	65
5.3.1.4.2	<i>Separate Analyse der einzelnen Regionen innerhalb der IgH und der gesunden B-Zell-Sequenzen</i>	66
5.3.1.4.3	<i>Separater Vergleich des gesamten FR- und CDR-Bereiches für die IgH und die gesunden B-Zell-Sequenzen</i>	68
5.3.2	<i>Die IgL</i>	70
5.3.2.1	<i>Der Immunogenitätsvergleich der autologen IgL mit den IgLs HLA-differenter Patienten</i>	70
5.3.2.1.1	<i>Vergleich der gesamten IgL</i>	70
5.3.2.1.2	<i>Separate Analyse der einzelnen Regionen innerhalb der IgL</i>	71
5.3.2.1.3	<i>Separate Analyse der gesamten FR- und CDR-Bereiche für die IgL</i>	73
5.3.2.2	<i>Der Immunogenitätsvergleich von IgL und Keimbahnsequenz</i>	75
5.3.2.2.1	<i>Vergleich der gesamten IgL und ihrer Keimbahnsequenz</i>	75
5.3.2.2.2	<i>Separate Analyse der einzelnen Regionen innerhalb der IgL und ihrer Keimbahnsequenz</i>	75
5.3.2.2.3	<i>Separate Analyse des gesamten FR- bzw. CDR-Bereiches der IgL und ihrer Keimbahnsequenz</i>	77

5.3.2.3	<i>Der Immunogenitätsvergleich der IgL-Keimbahnsequenzen</i>	78
5.3.2.4	<i>Der Immunogenitätsvergleich von IgL und gesunden B-Zell-Sequenzen</i>	79
5.3.2.4.1	<i>Vergleich der gesamten IgL mit gesunden B-Zell-Sequenzen</i>	79
5.3.2.4.2	<i>Separate Analyse der einzelnen Regionen innerhalb der IgL und der gesunden B-Zell-Sequenzen</i>	80
5.3.2.4.3	<i>Separater Vergleich des gesamten FR- und CDR-Bereiches für die IgL und die gesunden B-Zell-Sequenzen</i>	82
6	Diskussion	84
6.1	Die Idiotyp-Vakzinierung	84
6.2	Die Immunogenitätsanalyse	85
6.2.1	<i>Die reverse Immunogenitätsanalyse und Verwendung der Summe als Maß für die Immunogenität eines Ids</i>	85
6.2.2	<i>Die Wahl des Cut-offs</i>	86
6.3	Das Freiburger Kollektiv	86
6.4	Die Ergebnisse des bioinformatischen Auswertungsverfahrens	87
6.4.1	<i>Der Summenscore</i>	87
6.4.2	<i>Das Epitopverteilungsmuster innerhalb der FR- und CDR-Bereiche</i>	88
6.4.3	<i>Hinweise für eine T-Zell vermittelte aktive Immunosurveillance</i>	89
6.4.4	<i>Die Rolle der somatischen Hypermutation für die Immunogenitätsentwicklung</i>	90
6.5	Die Mean-Median-Diskussion	91
6.5.1	<i>Das HLA-Repertoire</i>	91
6.5.2	<i>Der Idiotyp</i>	92
6.6	Die Schlussfolgerung	94
6.7	Implikationen für die Klinik und Fragen für die Zukunft	95
6.7.1	<i>Mögliche Implikationen für die Immuntherapie</i>	95

6.7.2	<i>Mögliche Implikationen für die allgemeine B-Zellentwicklung</i>	96
6.7.3	<i>Mögliche Implikationen für Autoimmunitätsprozesse</i>	97
7	Literaturverzeichnis	98
8	Abkürzungsverzeichnis	104
9	Abbildungsverzeichnis	105
10	Tabellenverzeichnis	111
11	Anhang	112

1. Zusammenfassung.....

Die aktive Immuntherapie durch Idiotypvakzinierung ist eine vielversprechende und nebenwirkungsarme Therapieoption beim Follikulären Lymphom. Der immunologische Effektormechanismus kann zelluläre und humorale Komponenten umfassen. Es ist unbekannt, ob zelluläre Id-Reaktivität bereits bei unimmunisierten Patienten eine Rolle spielt. Ziel dieser Arbeit war es daher, Hinweise für eine CD8⁺-vermittelte gegen den Idiotyp (Id) follikulärer Lymphomzellen gerichteten Immunsurveillance zu finden.

Methoden: Globaler Vergleich HLA-bindender Epitope von 39 Ids auf autologem und heterologen HLA-Klasse I-Hintergründen mittels BIMAS-Summenscore. Anschließender Vergleich des Ids mit der zugehörigen unmutierten Keimbahnsequenz und den geringfügig mutierten Sequenzen gesunder B-Zellen.

Ergebnisse: Die Lymphom-IgHs HLA-nicht-identer Patienten werden statistisch signifikant besser präsentiert als die Patienten-eigene Sequenz. Dieser Unterschied beruht vor allem auf der schlechteren Präsentation der autologen CDR-Abschnitte, trotz deren insgesamt niedrigeren Scores. Im Falle der IgL zeigt sich dieser Unterschied lediglich für die individuellsten Regionen CDR1 & 3, sowie die FR2-Region:

Vergleich der gesamten **IgHs** ($P=0,0017$)

FR1 ($P=0,0409$), FR2 ($P=0,0010$), FR3 ($P=0,0874$), FR4 ($P=0,0625$), FR_{gesamt} ($P=0,1197$)
 CDR1 ($P=0,0007$), CDR2 ($P=0,0093$), CDR3 ($P=0,0008$), CDR_{gesamt} ($P=0,0001$)

Vergleich der gesamten **IgLs** ($P=0,4553$)

FR1 ($P=0,4553$), FR2 ($P=0,029$), FR3 ($P=0,9166$), FR4 ($P=0,1132$), FR_{gesamt} ($P=0,4064$)
 CDR1 ($P=0,0004$), CDR2 ($P=0,4553$), CDR3 ($P=0,0011$), CDR_{gesamt} ($P=0,1070$)

Beim Vergleich des Ids mit den unmutierten Keimbahnsequenzen (IgH: $P=0,5720$; IgL: $P=0,0594$) bzw. normalen B-Zellsequenzen (IgH: $P=0,4229$; IgL: $P=0,0676$) ließ sich kein Unterschied darstellen. Bei der Untersuchung der einzelnen Abschnitte zeigten sich sowohl für die hypermutierten Lymphom-Ids, die schwach mutierten Normalsequenzen und die unmutierten Keimbahnlinien jeweils die höchsten Scores für Bereiche FR3 und FR1, während CDR-Regionen deutlich niedrigere Scores erzielten.

Schlussfolgerung: Diese bioinformatische Analyse liefert starke Hinweise für die Existenz eines formenden Einflusses des HLA-Klasse I-Komplexes auf das B-Zell-Rezeptorrepertoire des follikulären Lymphoms und evtl. der normalen B-Zellen. Diese vermeintlich CD8⁺-vermittelte aktive Immunsurveillance scheint vornehmlich gegen die individuellen CDR-Bereiche bzw. mutationsreiche Abschnitte gerichtet zu sein. Gegenüber un- oder schwach mutierten Abschnitten zeigte sich hingegen Toleranz.

2. Einleitung.....

2.1 Das Follikuläre Lymphom.....

Die *World Health Organisation* (WHO) definiert das Lymphom als eine vom lymphatischen Gewebe ausgehende Neoplasie. Dabei kommt es durch die klonale Proliferation einer maligne transformierten Zelle sukzessiv zur Verdrängung der gesunden Hämato- und Lymphopoese. Die Einteilung der Lymphome erfolgt entsprechend ihres genetischen und morphologischen Reifegrades, des Immunphänotyps und der Klinik mit den daraus resultierenden therapeutischen und prognostischen Konsequenzen.¹⁶

Das in dieser Arbeit untersuchte *Follikuläre Lymphom* (FL) zählt aufgrund seines geringen mitotischen Indexes und schleichend progredienten Verlaufs zu den indolenten *B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen* (B-NHL). Insgesamt macht das FL ungefähr 13% aller NHL aus, wobei seine Inzidenz derzeit circa 4/100.000 Einwohner/Jahr beträgt.³² Eine typische zytogenetische Veränderung des FLs ist die Translokation t(14;18): Dabei gerät das Gen des antiapoptotisch wirkenden Proteins bcl-2 (*Chromosom 18*) unter den Einfluss des IgH-Gen-Promotors (*Chromosom 14*) mit der Folge einer gesteigerten bcl-2-Produktion.⁵⁰ Histologisch zeichnet es sich durch eine inhomogene Morphologie aus, mit einer Variationsbreite von *Zentrozyten* bis hin zu *Zentroblasten*. Die variablen Bereiche seines Oberflächen-Immunglobulins, *Idiotyp* (Id), weisen eine bereits stattgehabte somatische Hypermutation auf. In sukzessiv gewonnenen Tumorproben ließen sich fortlaufende Mutationen dieses variablen Id-Bereichs nachweisen.³⁰ Diese Merkmale sprechen für eine Keimzentrums-B-Zelle als Ausgangszelle des FL.

Das therapeutische Spektrum umfasst derzeit Strahlentherapie, Chemotherapie sowie verschiedene Ansätze der Immuntherapie. Der jeweilige Behandlungsalgorithmus eines Patienten wird entsprechend des Krankheitsstadiums, seines Allgemeinzustandes und diversen prognostischen Faktoren individuell festgelegt. Im fortgeschrittenen Stadium wird mangels lebensverlängernder Wirkung einer zytoreduktiven Therapie meist ein palliativer watch-and-wait (w&w) - Ansatz verfolgt, solange die Patienten weitgehend beschwerdefrei sind.¹⁴ Im disseminierten Stadium lässt sich durch Chemotherapie initial meist ein gutes Ansprechen erzielen, welches aber häufig von Rezidiven gefolgt wird. Aufgrund dieser Problematik wird nach neuen Strategien zur Beseitigung des

malignen Zell-Klons und insbesondere nach einer Möglichkeit, die körpereigene Immunabwehr dafür zu nutzen, gesucht.

2.2 Der Aufbau der Immunabwehr.....

Im Versuch Infektionen bzw. maligne Erkrankungen zu bekämpfen, bedient sich das Immunsystem sowohl unspezifischer als auch spezifischer Abwehrstrategien. Die postnatal erworbene spezifische Abwehr unterteilt sich unter anderem in das aus *Antikörper* (AK) - sezernierenden B-Zellen bestehende humorale System und das von den *zytotoxischen T-Zellen* (CTL) gebildete zelluläre System.

2.2.1 Der B-Zell-Rezeptor.....

Ab einem gewissen Reifegrad tragen B-Zellen einen individuellen Antigenrezeptor auf ihrer Oberfläche. Im Falle der Stimulation durch ein entsprechendes *Antigen* (AG) wird dieser in sekretorischer Form als *Immunglobulin* (Ig) freigesetzt.

Der in dieser Arbeit untersuchte Idiotyp (Id) definiert sich als Ig auf der Oberfläche follikulärer Lymphomzellen. Wie alle B-Zell-Rezeptoren ist der Id ein Heterodimer, bestehend aus insgesamt vier Polypeptidketten: den zwei schweren (IgH) und den zwei leichten Ketten (IgL), welche über Disulfidbrücken Y-förmig miteinander verbunden sind. Innerhalb der vier Ketten wird zwischen den N-terminalen variablen Regionen (V_H und V_L) und den C-terminalen konstanten Regionen (C_H und C_L) unterschieden. Die variablen Domänen einer schweren und leichten Kette bilden zusammen eine Antigenbindungsstelle, sodass ein Ig zwei identische Antigenbindungsstellen enthält. Die sich hinter dem variablen Anteil befindenden konstanten Regionen (C_{H1} , C_{H2} und C_{H3}) sind vor allem für die Effektormechanismen verantwortlich.

Bei genauerer Betrachtung lassen sich die variablen Anteile eines Igs, V_H und V_L , noch weiter unterteilen: Zum einen in die sogenannten *Framework-Regions* (FR), Abschnitte mit konservierter DNS-Sequenz und wahrscheinlich strukturgebenden Aufgaben: FR1, FR2, FR3 und FR4. Zum anderen in die hypervariablen *Complementarity Determining Regions* (CDR), hochindividuelle Bereiche, die für die spezifische Antigenerkennung verantwortlich sind: CDR1, CDR2 und CDR3. Die CDR-Bereiche von V_H und V_L formen gemeinsam die Bindungsstelle für das entsprechende Antigen:

Abbildung 1: Struktureller Aufbau eines Immunglobulins (Ig) mit Darstellung der Antigenbindungsstelle

Das Spektrum des humanen Antikörper-Repertoires liegt bei mindestens 10^{11} verschiedenen Immunglobulinen mit jeweils einer individuellen Spezifität.³⁴ Die Vielfalt an funktionalen Igs entsteht durch drei genetische Mechanismen:

1. Der kombinatorischen Diversität durch V(D)J-Rekombination
2. Der junktionalen Diversität innerhalb der V(D)J-Rekombination
3. Der somatischen Hypermutation

Die Vielfalt beruht vor allem auf dem ersten Schritt, dem Rearrangement einer limitierten Anzahl an Gensegmenten für den variablen Anteil eines Igs während der B-Zell-Ontogenese: Dabei kommt es im Falle der IgH zur scheinbar willkürlichen Rekombination von drei Genen für die V- (*variable*), die D- (*diversity*) und die J- (*joining*) Region auf Chromosom 14. Zur Verfügung stehen dafür 123 verschiedenartige V_H-Gene, die sich anhand von Sequenzhomologien 7 V_H-Familien zuordnen lassen, circa 27 D- und 6 J_H-Gene²⁹:

Abbildung 2: Schematische Darstellung des IgH-Gen-Locus vor und nach der somatischen Rekombination. Modifiziert nach Küppers et al.²⁷

Allerdings geschieht diese Rekombination von Gensegmenten in den Grenzbereichen der D-Region relativ inakkurat: So kommt es durch die *Exonuklease* zu Kürzungen bzw. durch die *Terminale-desoxynukleotidyl-Transferase* (TdT) zum Neuanbau von Nukleotiden (junktionale Diversität). Die endgültige CDR3-Region entspricht häufig nur mehr in wenigen Aminosäuren (AA) der ursprünglichen D-Sequenz, wodurch CDR3 zur individuellsten Region innerhalb des Ids und für immunologische Fragestellungen besonders interessant wird.

Analog zur IgH beruht die Vielfalt der leichten Kette, IgL, auf der Umlagerung von nur zwei Genabschnitten, den entsprechenden V_L- und J_L-Genen. Grundsätzlich wird dabei zwischen dem κ- und dem λ-Leichtketten-Typus unterschieden, welche normalerweise im Verhältnis von 2:1 vorliegen. Scheitert die Ig_κ-Gen-Rekombination, kommt es zum Rearrangement der λ-Gensegmente.⁵⁵ Dabei unterteilen sich die entsprechenden Abschnitte wiederum in 40 κ-V_L- bzw. 5 κ-J_L-Gensegmente auf Chromosom 2 und 30 λ-V_L-Gene bzw. 4 λ-J_L-Gene auf Chromosom 22. Durch die beliebige Kombination von IgH und IgL vergrößert sich die Diversität des Antikörperrepertoires erneut (*kombinatorische Diversität*).

Im Anschluss an die Gen-Umlagerungen der noch naiven B-Zelle im Knochenmark findet in den sekundär lymphatischen Organ die abschließende Affinitätsreifung des Igs statt: Nach stattgefundenem AG-Kontakt werden durch die *Activation-induzierte Cytidin-Deaminase* (AID) zur Steigerung der Affinität vermehrt Punktmutationen in den für die AG-Bindung entscheidenden variablen Ig-Anteil eingebaut. Dieser als *somatische Hypermutation* bezeichnete Vorgang lässt die Vielfalt des AK-Spektrums auf ein Maß ansteigen, dass nur durch deren Anzahl begrenzt zu sein scheint.³⁵ Die isolierte Analyse der IgH-DNS-Sequenzen von Keimzentrums-Zentroblasten, als zelluläres Korrelat des Hypermutationsprozesses, hat

eine durchschnittliche Mutationslast von 6,5% ergeben. Demgegenüber zeigten die Untersuchungen der *RNS* von Keimzentrums-B-Zellen im Allgemeinen (ohne Differenzierung zwischen Zentrozyten und Zentroblasten) lediglich eine Mutationsrate von 2 bzw. 4% auf. Dies spricht für einen geringeren Mutationsgrad des reiferen Zentrozyten. Generell nimmt man für die IgHs peripherer Gedächtniszellen, als finales Stadium der B-Zell-Entwicklung, einen durchschnittlichen Mutationsgrad von ~5% (2% (IgM), 4% (IgG & IgA), 8% (intestinale Plasmazellen)) an.^{25,41} Bisherige Erklärungsversuche für dieses inverse Verhältnis von Mutations- zu Reifegrad gehen von einer im Zuge der Hypermutation entstehenden Generation nicht-funktionaler Igs im Zentroblasten-Stadium, z. Bsp. durch die Entstehung von Stop-Codons, aus.

Eine Besonderheit des FLs ist, dass die somatische Hypermutation ein anhaltender Prozess ist.²⁸ Frühere Mutationsanalysen des FL-Idiotyps gehen von einem durchschnittlichen Homologiegrad von 89,5% für dessen IgH, bzw. 94% für die IgL aus.^{21,24,25,58} Aufgrund dieser Tendenz zur kontinuierlichen Sequenzalteration können immer neue Idiotypvarianten mit möglicherweise veränderter Immunogenität entstehen.^{30,31}

2.2.2 Der T-Zell-Rezeptor.....

Im Rahmen der zellulären Abwehr interagieren die T-Zell-Rezeptoren zytotoxischer T-Zellen mit HLA-Klasse I-Molekülen samt deren Liganden. Bei entsprechender Kompatibilität kommt es zur Aktivierung der T-Zelle, welche daraufhin der betroffenen Körperzelle Signale zur Einleitung der Apoptose gibt. Wie der B-Zell-Rezeptor besteht auch der T-Zell-Rezeptor aus zwei Polypeptidketten (TCR_{α} und TCR_{β}) mit jeweils einem variablen und einen konstanten Teil. Die Vielfalt von circa 10^{15} individuellen TCR beruht ebenfalls auf der Rekombination von Gensegmenten⁹: Zur Verfügung stehen hierfür ~70 V_{α} - und 61 J_{α} -Gene für TCR_{α} auf Chromosom 14, bzw. 52 V_{β} -, 2 D- und 13 J_{β} -Gene für TCR_{β} auf Chromosom 7.³⁶ Analog zum Ig formen auch hier die hypervariablen CDR-Bereiche eine gemeinsame Antigen-Bindungsstelle, wobei CDR3 als individuellste Region entscheidend für die Interaktion des TCR mit dem HLA-Liganden ist. Im Unterschied zum Ig besitzt CDR3 allerdings keine singuläre Spezifität. Auch fehlt beim TCR die an die V(D)J-Rekombination des BCRs anschließende somatische Hypermutation. Somit sind die CDR1 und CDR2-Regionen Keimbahn-diktirt und weniger individuell als die entsprechenden Ig-Korrelate. Dies lässt sich gut mit der Tatsache in Einklang bringen, dass sie vor allem mit den konstanten HLA-Regionen interagieren: So bindet CDR1 zusätzlich zum Peptidliganden und

CDR2 ausschließlich an die weniger individuellen HLA-Regionen.¹³ Darüberhinaus weist TCR_β eine vierte individuelle Region, CDR4, ohne entsprechendes Korrelat im Ig, auf, welche scheinbar für die Interaktion mit endogenen und exogenen Superantigenen verantwortlich ist.^{20,42}

Abbildung 3: Struktureller Aufbau eines T-Zell-Rezeptors im direkten Vergleich mit dem eines B-Zell-Rezeptors.

2.2.3 Die Positiv- und Negativselektion.....

Grundsätzlich besteht bei der scheinbar willkürlich entstehenden AK- und TCR-Vielfalt die Gefahr der Entstehung eines gegen Auto-Antigene, also körpereigene Strukturen, gerichteten Antikörpers bzw. TCR. Deshalb bedarf es neben der Testung auf Funktionalität (Positivselektion) zur Vermeidung von Autoimmunität eine Testung auf Selbsttoleranz (Negativselektion).

Nach derzeitigem Wissensstand werden dazu der noch unreifen B-Zelle kurz nach dem Erscheinen des B-Zell-Rezeptors auf deren Oberfläche durch dendritische Zellen solche Moleküle offeriert, die körpereigenen Strukturen entsprechen. Während der junge Lymphozyt auf ein entstehendes starkes Signal die Apoptose einleitet (Negativselektion), wäre ein reifer Lymphozyt dadurch aktiviert worden. So wird durch den programmierten Zelltod verhindert, dass es bei erneutem Kontakt zu einer Stimulation dieser inzwischen reifen B-Zelle mit möglicher Selbstschädigung kommt. Die Entscheidung im Falle eines starken Signals ob körperfremd oder –eigen scheint also auch vom Zeitpunkt der Exposition innerhalb der Lymphozyten-Entwicklung abhängig zu sein. Der T-Zell-Rezeptor unterliegt bezüglich des Erhalts der Funktionalität bei Vermeidung von Autoreaktivität dem gleichen Mechanismus wie die Immunglobuline.^{4,37} Generell gibt es Hinweise darauf, dass bei diesem

Selektionsprozess von $CD8^+$ -T-Zellen insbesondere die Interaktion von deren $CDR2_\beta$ - und/oder $CDR4$ -Abschnitt mit den HLA-Klasse I – Molekülen eine Rolle spielt.¹⁸

2.2.4 Das HLA-System.....

Grundsätzlich wird zwischen dem *Humanen Leukozyten Antigen* (HLA) - Klasse I und II unterschieden. HLA-Klasse I dient der Präsentation von Zell-eigenen, üblicherweise acht bis zehn AA langen Peptidfragmenten. Strukturell gesehen, ist das HLA-Klasse I-Molekül ein Heterodimer, bestehend aus einer α -Glykopeptidkette und dem nicht-poymorphen β_2 -Mikroglobulin, welches nicht kovalent an die α -Kette gebunden ist:

Abbildung 4: Struktureller Aufbau eines HLA Klasse I-Moleküls und seine Interaktion mit dem TCR einer zytotoxischen T-Zelle.

Die Rolle des HLA-Systems bei der Bekämpfung von Infektionen und Malignomen, sowie bei der Entwicklung von Autoimmunkrankheiten (M. Bechterew, RA, M. Behçet) ist seit langem bekannt: So wird die Prognose von Patienten mit chronischen Virusinfektionen wie zum Beispiel HIV und HCV entscheidend von ihrem HLA-Repertoire mitbeeinflusst. Dabei spielen vor allem die HLA-B-Allele, insbesondere *HLA-B27*, *B-57* und *B-58* im Sinne einer Prognoseverbesserung, eine maßgebliche Rolle.^{22,43,48} Demgegenüber waren andere HLA-B-Typen, so zum Beispiel *HLA-B08* und *HLA-B35*, speziell bei vorliegender Homozygotie, mit einem akzelerierten Krankheitsverlauf assoziiert.^{6,17}

Analog dazu präsentieren maligne entartete Zellen ebenfalls veränderte Peptide auf ihren HLA-Molekülen, welche zur Aktivierung von CTLs und so zur Zerstörung der Tumorzelle führen können.⁹ Bestimmte HLA-Typen scheinen darüberhinaus besonderen Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf von Karzinomen der Cervix²⁶ als auch des Nasopharynx auszuüben.⁵⁶ Auch beim malignen Melanom waren einige HLA-Typen in den

fortgeschrittenen Stadien statistisch signifikant unterrepräsentiert, was Raum für Spekulationen über einen möglichen immunoprotektiven Effekt lässt.¹⁰

Eine wesentliche Voraussetzung für die spezifische Abwehr von Krankheitserregern bzw. maligner Erkrankungen liegt also neben dem Vorhandensein bestimmter Gewebemerkmale in einem möglichst breit gefächerten HLA-Repertoire. Inwiefern das Patienten-eigene HLA-Repertoire Einfluss auf die kontinuierlich mutierenden Idiotypen follikulärer Lymphomzellen bzw. die B-Zell-Rezeptoren gesunder B-Zellen generell ausübt, soll hier untersucht werden.

2.3 Die Immuntherapie

Der FL-Id eignet sich aufgrund seines Status als tumorspezifisches Antigen (Ag) und seines hohen Mutationsgrades mit potentiellen Konsequenzen für seine Antigenität besonders für eine aktive Immuntherapie. So hat sich in den letzten Jahren ein möglicher Nutzen dieser selektiv gegen das Lymphom eines Patienten gerichteten Therapie herauskristallisiert. Allerdings herrscht bisher Uneinigkeit darüber, welche Rolle dabei die humorale gegenüber der zellulären Immunantwort spielt:

Levy et al. waren in einer Studie mit 136 FL-Patienten bei 47% in der Lage, durch Id-Vakzinierung eine spezifische Immunantwort zu induzieren. Bei der anschließenden Analyse zeigte sich, dass die bei 48 Patienten (35%) erfolgreich induzierte humorale Immunantwort mit einem statistisch signifikant verlängerten PFS assoziiert war. Bei den 27 Patienten (20%) mit vorwiegend zellulärer Immunantwort war hingegen kein verlängertes PFS zu beobachten, was aber eventuell durch die angewandte Analysemethodik begründet sein könnte.⁵⁴ Neuere Ansätze zeigten deutlich die Wichtigkeit einer polyspezifischen CD8⁺-T-Zell-vermittelten Anti-Tumor-Immunität.⁵² So waren auch Bendandi et al. in der Lage, spezifische CD8⁺-T-Zellen mit nachgewiesenem Anti-Tumor-Effekt zu induzieren.²

Auch bei der Frage, gegen welche Abschnitte des Idiotyps sich die erfolgreich induzierbaren Immunantworten vornehmlich richten, herrscht bisher Uneinigkeit. Ein sich abzeichnendes Muster würde sich dann eventuell auch therapeutisch in Form einer erleichterten Vakzine-Produktion nutzen lassen. Bereits im Jahre 2000 ermittelten Trojan et al. zehn Peptide, die spezifische CTLs in-vitro induzierten. Von diesen zehn Peptiden war lediglich ein einziges im CDR-Bereich (CDR3) und viele der FR-Peptide nicht Patienten-spezifisch, d.h. unmutiert. Daraus schlossen sie, dass sich möglicherweise insbesondere die FR-Bereiche als Ziele einer aktiven Immuntherapie eigneten.⁴⁹ Gricks et al. hingegen fanden bei der Analyse HLA-A-

restringierter Epitope heraus, dass sich die Patienten-spezifischen, mutierten Bereiche ebenfalls als potentielle Ziele für eine Immuntherapie eignen könnten. Diese würden darüberhinaus den Vorteil bieten, dass sie das Problem der Selbsttoleranz gegenüber unmutierten Keimbahnsequenzen, wie sie im FR-Bereich häufig vorkommen, umgehen würden. In ihren ELISPOT-Analysen zeigte sich, dass drei von fünf Patienten mit niedriger Tumorlast und *stable disease* auf ihren autologen Id stärkere Reaktionen demonstrierten als auf Peptide fremder Ids von für dieses Merkmal HLA-identen Patienten. Dagegen demonstrierten sieben Patienten mit *progressive disease* keine bzw. eine schwache Antwort auf eigene Id-Peptide, während sie durchaus in der Lage waren, auf fremde Peptide zu reagieren.¹⁵

In der Idiotypvakzinierungsstudie der Abteilung für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Freiburg konnte trotz eines zum Teil funktionell eingeschränkten Immunstatus bei der Mehrheit der Fälle eine Tumor-spezifische Immunantwort demonstriert werden. Objektive und anhaltende klinische Remissionen wurden bei Patienten in watch-and-wait-Situation beobachtet. Die gelungene Induktion einer zellulären Immunantwort war dabei mit einem besseren PFS (*progression free survival*) assoziiert:

Abbildung 5: Schematische Darstellung der aktiven Immuntherapie.

In der anschließenden ELISPOT-Analyse dieser Patienten konnte demonstriert werden, dass deren Immunreaktion sich vornehmlich gegen die individuelleren Id-Regionen, insbesondere CDR2, richtete. Antigene Determinanten aus den ubiquitär vorkommenden FR-Bereichen erzielten in der Bioinformatischen Analyse zwar höhere Scores, bewirkten aber in den ELISPOT-Analysen deutlich geringere Reaktionen als die Peptide aus den CDR-Regionen.^{3,38}

Zusammenfassend liegen also sowohl in-vitro als auch in-vivo starke Hinweise dafür vor, dass HLA-Klasse I restringierte T-Zellen beim FL vornehmlich gegen die individuellen Id-Bereiche reagieren können.

2.4 Die Fragestellung.....

Ziel dieser Arbeit war es, in einem ausreichend großen Patientenkollektiv Hinweise auf eine natürlich vorkommende, Id-spezifische Immunsurveillance beim follikulären Lymphom zu finden. Der Fokus lag hierbei auf der Frage, inwiefern der FL-Idiotyp, respektive das humane AK-Spektrum generell, einem vom HLA-Klasse I-Repertoire vermittelten formenden Einfluss

durch CTLs unterliegen könnte. Insbesondere sollte dabei die Rolle der individuellen Abschnitte im Vergleich zu den konservierten Bereichen evaluiert werden.

Zum Vergleich der Immunogenitätsentwicklung eines Ids wurden die jeweilige unmutierte Keimbahnsequenz und die mutierten Idiotypen anderer, HLA-nicht-identer Patienten herangezogen. Im Anschluss daran sollte überprüft werden, ob es ähnliche Kontrollmechanismen möglicherweise auch für gesunde B-Zellen geben könnte, wofür kontaminierende B-Zell-Sequenzen aus den initialen Tumorproben herangezogen wurden.

Zusammenfassend stellten sich also folgende Fragen:

1. *Wie kann die "Immunogenität" eines kompletten Idiotyps bioinformatisch sinnvoll erfasst werden?*
2. *Wie ist die Immunogenität von Lymphom-Idiotypen generell einzustufen?*
3. *Gibt es Hinweise für eine aktive Immunsurveillance durch CTLs?*
4. *Welche Rolle spielen dabei die individuellen CDR-Bereiche im Vergleich zu den konservierteren FR-Bereiche?*
5. *Wie verhält sich die Immunogenität des hypermutierten Idiotypen im Vergleich mit seiner zugehörigen Keimbahnsequenz?*
6. *Ist eine mögliche aktive Immunsurveillance auf die stark mutierten FL-Idiotypen beschränkt oder ein globales Geschehen, dass sich möglicherweise auch auf gesunde B-Zellen auswirkt?*

- 3. Materialien.....**
- 3.1 Geräte.....**
- Tischzentrifuge Eppendorf 5415R
 - Gefrierschrank, Siemens –20°C
 - Gelelektrophoresekammer, PeqLab
 - Heizblock Techne Block DB2A
 - Inkubator Heraeus Instruments
 - PCR-Mastercycler gradient, Eppendorf
 - Plastikpipetten Gilson Pipetman P2, P20, P200, P1000
 - Spectrophotometer Gene Quant Pro, Amersham Biosciences
 - Transluminator mit Digitalkamera, PeqLab
 - Vortexer, Vortex-Genie2, Scientific Industries
- 3.2 Materialien & Kits.....**
- Glaskapillarien, Biochrome
 - Olerup SSP HLA-Typisierungskit, QIAGEN
 - Pipettenspitzen
 - Polypropylengefäße 14 ml, 15 ml, 50 ml, Greiner
 - QIAamp DNA Blood Mini Kit, QIAGEN
 - Reaktionsgefäße
- 3.3 Enzyme, Medien & sonstige Reagenzien.....**
- Agarose, Invitrogen
 - Aqua bidest
 - DNA-Leiter: 100 Basenpaarleiter, QIAGEN
 - Ethanol, J.T.Baker
 - Ethidiumbromid, Invitrogen
 - RNase, QIAGEN
 - TAE-Puffer (Tris HCl/Acetate/EDTA)
 - Taq-DNA-Polymerase, 5U/µl, Qiagen
 - PBS (phosphate buffered saline) Dulbecco 1X w/o $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$

3.4 Computer Software und Databases.....

BIMAS (*BioInformetics and Molecular Analysis Section*)

http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/

Excel 2007, Microsoft

GraphPad Prism Volume 5.0, GraphPad Software

IMGT (*ImMunoGeneTics information system*)

<http://imgt.cines.fr>

MacVector, MacVector Inc.

Power Point 2007, Microsoft

Word 2007, Microsoft

4. Methoden.....

4.1 Das Patientenkollektiv.....

Grundsätzlich wurden für diese Arbeit alle Patienten berücksichtigt, die bis zum Dezember 2007 an der „*Rekombinanten Idiotyp-Vakzinierungsstudie in Patienten mit fortgeschrittenem niedrig-malignen B-Zell-Lymphom*“ der Abteilung für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Freiburg teilnahmen ($n = 103$).

Davon eingeschlossen werden konnten all diejenigen, für die bis zum Dezember 2007 ein serologischer HLA-Befund und gegebenenfalls genügend DNS für eine hochauflösende HLA-Typisierung zur Verfügung standen ($n = 43$). Bei vier Patienten war die sichere Typisierung ohne DNS-Sequenzierung nicht möglich, sodass 39 Patienten für die finale statistische Auswertung verblieben:

Nummer	Patient	PIZ	Geschlecht	Alter (bei Diagnose)	Diagnose/Stadium
1	A019	22284576	w	61	FL, IVa
2	A024	11376142	w	57	FL, IIa
3	A027	15078073	m	32	FL, IVb
4	A073	16056235	m	46	FL, IIIa
5	A082	20608323	w	61	FL, Iva
6	A097	24717259	m	40	FL, IVb
7	A103	20780479	m	42	FL, IVae
8	A107	15213124	m	58	FL, IIIa
9	A112	20054700	w	50	FL, Iae
10	A114	21461814	w	71	FL, IVb
11	A118	11737943	m	42	FL, IIIa
12	A119	24489680	m	41	FL, III
13	A120	15307366	w	57	FL, IIa
14	A125	18532182	m	43	FL, IIIa
15	A126	17259512	m	63	FL, IIIa
16	A128	10209196	w	40	FL, IIIa
17	A130	23433460	m	69	FL, IIIa
18	A131	27750567	w	43	FL, IVa
19	A132	24756777	m	51	FL, IVb
20	A135	20899956	m	47	FL, IVb
21	A137	24629805	m	50	FL, IVa
22	A155	18031116	m	30	FL, IVa
23	A161	26267510	m	49	FL, IVa
24	A166	24867838	w	53	FL, IVa
25	A169	25232259	w	46	FL, IIa
26	A170	21688738	m	40	FL, IV
27	A171	25305302	w	59	FL, IVa
28	A173	20014342	m	51	FL, IVa

29	A175	24990540	w	57	FL, IIIa
30	A189	25130510	m	52	FL, IVb
31	A192	20943130	m	48	FL, IVa
32	A200	25594240	w	63	FL, IVa
33	A230	15270551	m	71	FL, IVa
34	A242	25852133	w	40	FL, IVa
35	A278	21260649	w	64	FL, IIIb
36	A293	26755921	w	31	FL, IV
37	A299	24299260	w	57	FL, IVb
38	A306	19385361	m	56	FL, IVb
39	B011	18122537	w	58	FL, IVa

Tabelle 1: Darstellung der eingeschlossenen 39 Patienten dieses Kollektivs mit Angaben zu Geschlecht, Geburtsjahr und Diagnose

Das Durchschnittsalter bei Diagnose lag bei 51 (30–71) Jahren und das Geschlechterverhältnis betrug 1 : 1,2 (♂ : ♀). Die Diagnose „Follikuläres Lymphom“ (FL) wurde bei allen Patienten anhand der WHO-Kriterien getroffen und bestätigt.

4.2 Die HLA-Typisierung.....

Für die spätere Analyse mittels Bioinformatiksystemen (BIMAS) war eine Bestimmung der HLA-Merkmale der Patienten nötig. In dieser Arbeit wurden aufgrund einer limitierten Anzahl zur Analyse angebotener HLA-C-Merkmale und begrenzter DNS-Vorräte nur HLA-A und HLA-B der Klasse I berücksichtigt. BIMAS verlangte bei neun der vorkommenden HLA-Typen eine niedrig auflösende, bei 14 eine hochauflösende Typisierung:

HLA-Klasse I	
HLA-A	HLA-B
HLA-A01	HLA-B07
HLA-A02 <i>HLA-A0201</i>	HLA-B08
<i>HLA-A0205</i>	HLA-B14
HLA-A03	HLA-B27 <i>HLA-B2702</i>
HLA-A11 <i>HLA-A1101</i>	<i>HLA-B2705</i>
HLA-A24	HLA-B35 <i>HLA-B3501</i>
HLA-A31 <i>HLA-A3101</i>	HLA-B37 <i>HLA-B3701</i>
HLA-A33 <i>HLA-A3301</i>	HLA-B39 <i>HLA-B3901</i>
HLA-A68 <i>HLA-A6801</i>	HLA-B40
	HLA-B44 <i>HLA-B4403</i>
	HLA-B51 <i>HLA-B5101</i>
	HLA-B52 <i>HLA-B5201</i>
	HLA-B60
	HLA-B62

Tabelle 2: Darstellung aller von BIMAS zur Analyse angebotenen HLA-A und –B-Merkmale mit dem jeweils geforderten Auflösungsgrad.

4.2.1 Die niedrigauflösende HLA-Typisierung.....

Die niedrigauflösende HLA-Typisierung wurde von der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Freiburg sowie für einige Patienten in heimatnahen Instituten durchgeführt. Dazu verwendet wurden sowohl serologische als auch molekulare Testverfahren. Sofern der geforderte hochauflösende HLA-Befund nicht bereits durch das *Dynal Pattern Matching-Program* der Blutbank Freiburg ausgeschlossen werden konnte, wurde die entsprechende Typisierung im Anschluss umgesetzt.

4.2.2 Die hochauflösende HLA-Typisierung.....

Für die hochauflösende HLA-Bestimmung war je nach HLA-Allel eine variable Menge an DNS nötig. Die fragliche Menge wurde aus mononuklearer Zellen (MNCs) aus dem EDTA-Blut des entsprechenden Patienten gewonnen.

4.2.2.1 Die Isolierung der MNCs und ihre Kryopreservation.....

Alle Experimente mit humanem Material fanden mit Zustimmung des Ethikkomitees des Universitätsklinikums Freiburg statt. Die verwendeten Blutproben wurden in der Medizinischen Klinik I durch ärztliches oder pflegerisches Personal gewonnen und binnen

fünf Stunden verarbeitet. Zur DNS-Gewinnung wurden mononukleare Zellen aus EDTA-Blut isoliert. Dazu wurde das Blut im Verhältnis von 1:2 mit PBS versetzt. Anschließend wurden mit Hilfe von jeweils 12ml Ficoll-Medium nacheinander jeweils 25ml Blut 30 Minuten bei 400g zentrifugiert und somit die mononuklearen Zellen separiert. Die in der Interphase gesammelten MNCs wurden jeweils für 10 Minuten bei 300 und 200g gewaschen. Für die späteren molekularen Analysen wurden jeweils Aliquots von $5-10 \cdot 10^6$ Zellen in 25µl PBS bei -80°C weggefroren.³⁸

4.2.2.2 Die DNS-Extraktion und die photometrische Quantifizierung.....

Aus den gewonnenen MNCs wurde mit Hilfe des QIAamp Blood Mini Kits gemäß den Anweisungen des Herstellers die DNS isoliert. Zur Erhöhung der Reinheit wurde zusätzlich die enthaltene RNS mittels 4µl RNase der Firma QIAGEN aus den Proben entfernt. Anschließend wurde die gewonnene DNS mit TE-Puffer versetzt und mit dem GeneQuantPro-Spektrophotometer (Amersham Biosciences) quantifiziert. Die nicht unmittelbar weiterverarbeiteten Proben wurden bei -20°C gelagert.³⁸

4.2.2.3 Die PCR und Gelelektrophorese.....

Die hochauflösende HLA-Typisierung wurde mit Hilfe des QIAGEN Olerup-SSP-Kits gemäß der Herstellerangaben durchgeführt. Für die anschließende Gelelektrophorese wurde ein 2%iges Agarosegel und 1%iger TAE-Puffer verwendet. Als Molekulargewichtsmarker wurde eine Basenpaarleiter der Firma QIAGEN (100bp Stufen) eingesetzt. Die Laufzeit des Gels bei 100V betrug circa eine halbe Stunde. Zur anschließenden Gelfärbung wurde eine Ethidiumbromidlösung verwendet, die entsprechenden Gele unter UV-Licht photographisch dokumentiert und gemäß den Protokollen des Herstellers ausgewertet.

Bei wenigen Patienten war aufgrund der Kreuzreaktivität der Primer eine sichere Differenzierung zwischen zwei HLA-Typen nicht möglich, sodass ein sicherer Ausschluss des von BIMAS angebotenen Typs genügen musste.

4.3 Der Idiotyp.....

4.3.1 Die Idiotyp-Sequenz.....

Die Id-Sequenzen für diese Arbeit wurden von der CellGenix GmbH (Freiburg, Deutschland) bereitgestellt. Die Gewinnung von Lymphommaterial zur Herstellung des Ids erfolgte durch Lymphknotenbiopsie ($n = 30$), Feinnadelbiopsie eines Lymphknoten ($n = 7$), aus dem

peripheren Blut ($n = 5$) und aus einer Knochenmarkpunktion ($n = 1$). Für die Bestätigung der Id-Sequenz wurde das Vorhandensein mehrerer klonaler Sequenzen in den Proben vorausgesetzt (*Median* = 7,5). Aufgrund der anhaltenden Mutation des Id-Gens konnten die Sequenzen in einzelnen AA variieren. Als Konsensussequenz wurde eine virtuelle Sequenz kreiert, welche in allen Positionen der Mehrzahl der einzelnen Sequenzen eines Patienten entsprach.³

4.3.2 Die Alignierung.....

Die Einteilung in FR- und CDR-Bereiche erfolgte mit Hilfe von ImMunoGeneTics (<http://imgt.cines.fr>), einer online verfügbaren Database: IMGT ermittelt anhand der eingegebenen Nukleotidsequenz die wahrscheinlichste zugrundeliegende Keimbahnsequenz (GL; *Germline*) des jeweiligen Ids. Über den Vergleich mit der jeweiligen GL war dann die genauere Unterteilung in die einzelnen Abschnitte möglich. In dieser Arbeit wurden Peptide mit $\geq$ zwei AA im CDR-Bereich als CDR-Peptide gewertet. Aufgrund dieser Betrachtungsweise dehnten sich die CDR-Regionen jeweils um sieben AA auf die FR-Bereiche aus. Gleichzeitig reichen die FR-Peptide um eine AA in die CDR-Regionen hinein:

Dies führt zu einem annähernd ausgeglichenem Längenverhältnis zwischen FR- und CDR-Bereichen (56 versus 44% für die IgH bzw. 58 versus 42% für die IgL). Bei den Vergleichen des Ids mit der zugehörigen unmutierten Keimbahnsequenz konnte CDR3 als längste der CDR-Regionen nicht berücksichtigt werden. Aufgründdessen verschob sich das Längenverhältnis in diesen Untersuchungen mit 64 versus 36% wieder etwas zugunsten der FR-Bereiche.

Über die Alignierung hinaus ermittelt IMGT den jeweiligen prozentualen Mutationsgrad und erlaubt eine Differenzierung zwischen Austausch-Mutationen (*R-Mutationen*) und stillen Mutationen (*S-Mutationen*). In dieser Arbeit wurde die Analyse aufgrund des Umfangs auf die V_H bis zum TVSS-Motiv im FR4-Bereich bzw. auf die V_L bis zum PKAA/TVAA-Motiv beschränkt.

4.4 Die Analyse der Immunogenität mittels Bioinformatiksystemen.....

Die Stärke einer möglichen Immunreaktion hängt von der Affinität eines Peptids zu einem HLA-Molekül, der Stabilität dieses Komplexes und der Avidität des entsprechenden TCRs ab.^{45,48,51} Zur Berechnung der Immunogenität des Ids wurde die *BioInformatics and Molecular Analysis Section* (www-bimas.cit.nih.gov), eine online verfügbare Datenbank für HLA-restringierte T-Zellepitope verwendet. Die Rohdaten für diese Database stammen aus den Angaben des National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) des National Institute of Health (NIH).

BIMAS ermittelt anhand der eingegebenen Aminosäuresequenz die Lokalisation der 20 nonameren Peptide mit den höchsten Dissoziationshalbwertszeiten für ein ausgewähltes HLA-Merkmal. Für dieses Ranking werden alle angegebenen AA bezüglich ihrer Wichtigkeit für eine etwaige HLA-Bindung evaluiert. Dabei erhält jede AA individuell aufgrund ihrer Ladungseigenschaften und in Abhängigkeit von ihrer Position innerhalb eines möglichen Epitops einen entsprechenden Koeffizienten: So erhalten AA, die aufgrund ihrer Ladungseigenschaften weder von Vor- noch von Nachteil für eine Bindung sind, den Wert 1, günstige AA einen dementsprechend höheren, ungünstige einen niedrigeren Wert. Darüberhinaus erhalten AA, die aufgrund ihrer Position als potentielle Ankerresiduen fungieren (beispielsweise Position 2 und 9 für HLA-A02), ebenfalls einen höheren Koeffizienten als AA, die einen möglichen Nebanker darstellen. Anschließend werden die entsprechenden Koeffizienten miteinander und mit einer Konstanten multipliziert und so die ungefähre Dissoziationshalbwertszeit des vorgeschlagenen Peptids in Minuten bei 37° bestimmt. Aus diesen Schätzwerten für die theoretische Bindungsstabilität des jeweiligen HLA-Ligand-Komplexes lässt sich nach den Ergebnissen von Parker et al. indirekt auf die Immunogenität des entsprechenden Peptids schließen.⁴⁰

4.4.1 Analyse des Epitopverteilungsmusters.....

Potentielle Epitope eines Ids vor seinem autologen HLA-Typ wurden den einzelnen Abschnitten der jeweiligen Ig-Kette (FR1-4, CDR1-3) zugeordnet. Wie bereits erwähnt, wurden Motive mit zwei oder mehr AA im CDR-Bereich aufgrund ihrer möglichen Funktion als Ankeraminoacids als CDR-Peptide gewertet.

Da nicht alle ermittelten Peptide nach gängiger Meinung einen ausreichend hohen Wert für eine mögliche Immunantwort besitzen, wurden für diese Analyse nur Peptide mit einem BIMAS-Score ≥ 50 bzw. ≥ 10 berücksichtigt. Für die Zulässigkeit dieser Grenze sprechen die

Arbeiten von Trojan et al., die bei acht von zehn Peptiden, die in-vitro Peptid-spezifische CTLs induzierten, einen BIMAS-Score ≥ 50 ermitteln konnten.⁴⁹ Gricks et al. fanden bei 13 der 14 in-vitro von HLA-A0201 präsentierten Peptide einen BIMAS-Score ≥ 50 .¹⁵ Nach erfolgter Zuordnung wurde die prozentuale Verteilung der Motive auf die entsprechenden Abschnitte berechnet.

Im Anschluss daran wurde dieses Epitop-Mapping auch für die jeweils zugehörige Keimbahnsequenz durchgeführt. Da CDR3 in der Keimbahnsequenz nicht kodiert ist, beschränkte sich diese Analyse auf die Abschnitte FR1 bis FR3.

Abschließend wurde das Verteilungsmuster innerhalb gesunder B-Zellsequenzen untersucht. Diese Sequenzen stammten von kontaminierenden B-Zellen aus den initialen Tumorproben und wurden ebenfalls von der CellGenix GmbH bereitgestellt. Bei 16 der 39 in Patienten lagen solche IgH-, bei 14 Patienten entsprechende IgL-Sequenzen gesunder B-Zellen vor. Anschließend wurde das resultierende Verteilungsmuster dem der entsprechenden Ids gegenüber gestellt. Besonderes Augenmerk lag bei all diesen Analysen immer auf CDR3, dem individuellstem Abschnitt des Ids.

4.4.2 *Der Summenscore als Maß für die Immunogenität des Idiotypen*

Als Maß für die globale Immunogenität der gesamten IgH bzw. der gesamten IgL im Hinblick auf ein einzelnes HLA-Merkmal wurden die von BIMAS als die Top 20 gerankten Peptide aufaddiert. Die resultierende Summe ("Summenscore₂₀") berücksichtigt dabei immer die gleiche Anzahl an Werten und gewichtet sie rein nach der jeweiligen Scorehöhe. Sie spiegelt somit die Immunogenität der untersuchten Peptidsequenz für das untersuchte HLA-Allel wieder und kann für statistische Vergleiche verwendet werden.

4.4.2.1 *Die Immunogenität des Idiotypen vor dem Hintergrund eines einzelnen HLA-Allels*.....

Um zu ermitteln, wie ausgeprägt die generellen Unterschiede in den Summenscores₂₀ zwischen den unterschiedlichen HLA-Allelen sind, wurden die schweren und leichten Ketten aller 39 Ids einzeln auf allen 22 in diesem Kollektiv vorkommenden HLA-Allele untersucht, d. h. unabhängig vom tatsächlichen HLA-Typ des jeweiligen Patienten. Aus den jeweils resultierenden 20 Peptiden wurde gemäß *Abschnitt 4.4.2* der Summenscore₂₀ für alle 39 Ids auf allen 22 vorkommenden HLA-Allelen gebildet. Für die schweren und leichten Ig-Kette

wurden somit jeweils $39 \times 22 = 858$ Summenscores₂₀ berechnet und standen für statistische Analysen zur Verfügung.

4.4.2.2 Die globale Immunogenität des Idiotypen auf dem HLA-Typ des betroffenen Patienten ("autologer" HLA-Typ).....

Zwischen ein und vier (median: 3) HLA-A- und B-Allele konnten für jeden Patienten in BIMAS analysiert werden (*Tabelle 14*: siehe Anhang). Zunächst wurde der gesamte Id eines Patienten auf allen offerierten autologen HLA-Typen analysiert. Die einzelnen Summenscores₂₀ wurden miteinander addiert. Somit entstand ein einzelner Wert (Summenscore_{gesamt}), welcher die globale Antigenität eines jeden Ids, bzw. seiner zwei Ketten, vor seinem eigenen HLA-Hintergrund widerspiegelt und für statistische Vergleiche herangezogen werden konnte. Bei Homozygotie eines HLA-Allels wurde der betreffende Summenscore₂₀ doppelt berücksichtigt.

In Folge der unvollständigen Abdeckung des in diesem Kollektiv vorkommenden HLA-Repertoires durch BIMAS standen somit zwischen 20 und 80 Peptide pro Id und HLA-Typ zur Verfügung. Aufgrund dieser Varianz verbot sich ein direkter interindividueller Vergleich der Immunogenität der Idiotypen bzw. der einzelnen Abschnitte vor ihrem jeweiligen autologem HLA-Hintergrund.

4.4.2.3. Die separate Analyse der Immunogenität definierter Regionen der Idiotypen.....

Nach demselben Modell wurden die sieben einzelnen FR- und CDR-Regionen innerhalb des Ids separat von einander untersucht: Der Wert eines jeden Abschnittes berechnete sich somit aus dem für ihn individuell auf allen analysierbaren HLA-Merkmalen ermittelten Summenscore₂₀.

Zum Schluss wurden die Werte für die vier FR-Regionen zu einem FR_{gesamt}-Wert, bzw. die drei CDR-Regionen zu einem CDR_{gesamt}-Wert addiert und dem Wert für den gesamten Id gegenübergestellt.

4.5 Die statistische Auswertung.....

Um statistische Hinweise für eine mögliche aktive Immunsurveillance gegen die Id zu finden, wurden die Summenscores_{gesamt} eines Ids mit den Scores fremder Ids verglichen. Die schweren und leichten Ketten wurden jeweils separat voneinander untersucht. Für den

statistischen Vergleich wurde der Wilcoxon-Rangreihentest, ein nicht parametrischer Test für die Analyse zweier verbundener Stichproben, verwendet.

4.5.1 *Der Idiotyp versus fremde Idiotypen.....*

Da der Vergleich der Immunogenität eines Ids auf seinem autologen HLA-Typ nicht direkt mit seiner Immunogenität auf allogenen HLA-Typen verglichen werden kann, wurden stattdessen statistische Vergleich stets innerhalb eines einzelnen HLA-Typen durchgeführt. Dies bedeutet somit, daß die Immunogenität jedes Ids mit der durchschnittlichen Immunogenität aller anderen ("allogenen") Ids auf dem autologen HLA-Typ verglichen wurde. Somit war sicher gestellt, dass die betrachteten Id-Sequenzen immer auf der gleichen Kombination und Anzahl an HLA-Allelen analysiert wurden.

Nach diesem Vorgehensprinzip wurde für den HLA-Typ eines einzelnen Patienten aus dem Pool von 858 Summenscores₂₀ (s.4.4.2.1) für jeden einzelnen der 38 allogenen Id ein eigener Summenscore_{gesamt} gebildet. Diese 38 resultierenden allogenen Summenscores_{gesamt} setzten sich somit wie der autologe Summenscore_{gesamt} aus einer identischen Anzahl an Peptiden, ermittelt auf den gleichen HLA-Allelen zusammen. Aus den Summenscore_{gesamt} der 38 fremden Ids wurden Mittelwert und Median bestimmt und diese mit dem Summenscore_{gesamt} des Patienten-eigenen Ids statistisch verglichen. Dieser Vergleich wurde für jeden HLA-Typ aller 39 Patienten und für schwere und leichte Id-Ketten separat durchgeführt.

Anschließend wurden analoge Vergleiche separat für die einzelnen FR-Abschnitte (FR1, FR2, FR3 und FR4) durchgeführt. Die für die einzelnen FR-Abschnitte ermittelten Werte wurden zusätzlich miteinander addiert, um einen Wert für die Framework-Regionen in ihrer Gesamtheit zu erhalten. Analog dazu erfolgte eine Untersuchung der CDR-Bereiche. Zum Schluss wurden noch die für alle sieben Einzelregionen ermittelten Werte zu einem einzigen Wert aufsummiert. Dieser umfasst dabei bis zu 120 Peptide pro HLA-Allel, also bei vier analysierbaren HLA-Typen bis zu 480 Peptide pro Patient.

In Ergänzung zu *Abschnitt 4.4.1* konnten bei der Betrachtung der durchschnittlich für die einzelnen Abschnitte erzielten Scores Erkenntnisse über generelle Unterschiede in der Art der Präsentation der einzelnen Regionen gewonnen werden.

4.5.2 *Die Immunogenität des Ids im Vergleich zu seiner Keimbahnsequenz.....*

Um den Einfluss der Mutationen auf die Antigenitätsentwicklung eines Ids zu bestimmen, wurde dessen Antigenität mit derjenigen der zugehörigen GL verglichen: Dazu wurde für die

GL analog zum Id eines Patienten auf seinen Gewebemerkmale der Summscore_{gesamt} gebildet und die Resultate statistisch miteinander verglichen. Da CDR3 in der GL nicht kodiert sind und gleich lange Sequenzen einander gegenüber gestellt werden sollten, wurden nur die Abschnitte FR1 bis einschließlich FR3 berücksichtigt. Anschließend wurden nach dem Vorbild von *Abschnitt 4.5.1* auch hier die einzelnen Abschnitte miteinander verglichen.

4.5.3 *Der Vergleich der Keimbahnsequenzen.....*

Um sicherzustellen, dass mögliche Unterschiede in der Präsentation autologer und allogener Ids vor demselben HLA-Hintergrund auf den Mutationen beruhen, wurden die zugehörigen GLs einander gegenübergestellt. So konnte sicher gestellt werden, dass die Ursache etwaiger Unterschiede nicht bereits in der differentiellen Immunogenität der zugrunde liegenden unterschiedlichen GLs zu finden ist. Für diese Untersuchung wurde nach dem Vorbild des Vergleichs der Ids in *Abschnitt 4.5.1*, nach der Ermittlung der Antigenität der GL eines Ids, diese mit derjenigen der 38 allogenen GLs auf seinem HLA-Hintergrund verglichen. Aus den für die allogenen GLs ermittelten Summscores_{gesamt} wurden wiederum *Mean* und *Median* bestimmt und dem Wert der eigenen GL eines Patienten gegenübergestellt.

4.5.4 *Die Immunogenität des Ids im Vergleich zu derjenigen gesunder B-Zellen.....*

Für den Vergleich der Antigenität von Lymphom-Idiotypen mit derjenigen gesunder B-Zellen, wurden kontaminierende B-Zellsequenzen aus den initialen Tumorproben herangezogen. Bei 16 (*IgH*) bzw. 14 (*IgL*) der 39 Patienten lagen zwischen einer und sechs solcher Sequenzen vor. Aufgrund dieser Variabilität wurde deren durchschnittliche (*Mean*) Antigenität für jeden Patienten individuell ermittelt und der seines Ids gegenübergestellt. Nach demselben Muster erfolgte die Analyse der einzelnen V_H- bzw. V_L-Abschnitte.

5. Ergebnisse.....

5.1 Patientencharakteristika.....

5.1.1 Die HLA-Typisierung.....

Um die Berechnung der Antigenität durchführen zu können, war eine HLA-Typisierung nötig. Die Daten der serologischen Untersuchung für dieses Kollektiv sind dabei in *Tabelle 3* empirisch ermittelten Durchschnittswerten gegenübergestellt.

HLA Klasse I	niedrig auflösende Typisierung von HLA-A	Freiburger Kollektiv (n = 43 Patienten)	demographische Erhebung (n = 13.386 gesunde Probanden) [95%-Konfidenzintervall]
		Anzahl n	Anzahl n
	HLA-A01	14 (16,28%)	3.874 (15,68%) [15,24; 16,12]
	HLA-A02	20 (23,26%)	6.844 (29,86%) [29,30; 30,43]
	HLA-A03	08 (09,30%)	3.762 (15,15%) [14,74; 15,55]
	HLA-A11	03 (03,49%)	1.400 (05,36%) [05,08; 05,63]
	HLA-A19	01 (01,16%)	34 (<0,50%)
	HLA-A23	03 (03,49%)	522 (02,01%) [01,84; 02,17]
	HLA-A24	06 (06,98%)	2.310 (09,21%) [08,86; 09,55]
	HLA-A25	02 (02,33%)	751 (02,92%) [02,71; 03,11]
	HLA-A26	04 (04,65%)	934 (03,61%) [03,39; 03,85]
	HLA-A29	02 (02,33%)	605 (02,31%) [02,13; 02,49]
	HLA-A30	02 (02,33%)	533 (02,04%) [01,87; 02,22]
	HLA-A31	06 (06,98%)	586 (02,24%) [02,06; 02,42]
	HLA-A32	02 (02,33%)	895 (03,44%) [03,23; 03,67]
	HLA-A33	02 (02,33%)	257 (00,97%) [00,86; 01,09]
	HLA-A68	03 (03,49%)	53 (<0,50%)
	fragliche Homozygotie	08 (09,30%)	
	Sonstige Allele		1.202 (04,89%)

HLA Klasse I	niedrig auflösende Typisierung von HLA-B	Freiburger Kollektiv (n = 43 Patienten)	demographische Erhebung (n = 13.386 gesunde Probanden) [95%-Konfidenzintervall]
		Anzahl n	Anzahl n
	HLA-B07	07 (08,14%)	3.392 (13,62%) [13,21; 14,02]
	HLA-B08	08 (09,30%)	2.722 (10,74%) [10,37; 11,11]
	HLA-B13	05 (05,81%)	931 (03,55%) [03,32; 03,76]

HLA-B14	05	(05,81%)	463	(02,37%)	[02,20; 02,55]
HLA-B15	02	(02,33%)	78	(<0,50%)	
HLA-B17	01	(01,16%)	141	(<0,50%)	
HLA-B18	02	(02,33%)	1.310	(04,98%)	[04,72; 05,25]
HLA-B27	03	(03,49%)	1.169	(04,45%)	[04,21; 04,71]
HLA-B35	13	(15,12%)	2.480	(09,39%)	[09,36; 10,09]
HLA-B37	01	(01,16%)	343	(01,29%)	[01,16; 01,43]
HLA-B38	01	(01,16%)	551	(02,10%)	[01,93; 02,28]
HLA-B40	03	(03,49%)	139	(<0,50%)	
HLA-B41	01	(01,16%)	236	(00,88%)	[00,77; 01,00]
HLA-B44	16	(16,28%)	3.055	(12,21%)	[11,85; 12,58]
HLA-B45	02	(02,33%)	98	(<0,50%)	[00,30; 00,44]
HLA-B49	01	(01,16%)	353	(01,43%)	[01,28; 01,57]
HLA-B51	03	(03,49%)	1.411	(05,58%)	[05,28; 05,87]
HLA-B52	01	(01,16%)	222	(00,86%)	[00,75; 00,98]
HLA-B55	01	(01,16%)	346	(01,38%)	[01,24; 01,52]
HLA-B56	01	(01,16%)	217	(00,86%)	[00,75; 00,98]
HLA-B57	02	(02,33%)	756	(03,33%)	[03,09; 03,56]
HLA-B60	02	(02,33%)	1.381	(05,72%)	[05,44; 05,99]
HLA-B62	03	(03,49%)	1.927	(07,79%)	[07,45; 08,12]
fragliche Homozygotie	02	(02,33%)			
Sonstige Allele			1.877	(07,33%)	

Tabelle 3: Gegenüberstellung der niedrig aufgelösten HLA-A- und HLA-B-Allelfrequenzen innerhalb des Freiburger Kollektives und für Mitteleuropa empirisch ermittelten Durchschnittswerten. Angaben über die Allelfrequenzen als Anzahl - n und Prozent - (%), sowie als 95%-Konfidenzintervall - $[x]$.

Generell entsprach das HLA-Vorkommen in diesem Kollektiv ($n = 43$ Patienten) den für Deutschland empirisch ermittelten Durchschnittswerten. Als Referenzgruppe dafür wurden die Daten von 13.386 volltypisierten Knochenmarkspendern genutzt.³³ Bei acht HLA-A- bzw. zwei HLA-B-Typen konnte durch die serologische Typisierung nicht zwischen einem für dieses Merkmal homozygoten Patienten und einem heterozygoten HLA-Null-Allel-Träger unterschieden werden. Für die weiteren Analysen wurden diese Patienten bei einer HLA-Null-Allel-Häufigkeit von jeweils 0,7% für HLA-A und HLA-B als homozygot betrachtet. Unter „sonstige Allele“ wurden sämtliche HLA-Typen der Referenzgruppe zusammengefasst, die im Freiburger Kollektiv nicht vorkamen.

Bei der im Anschluss durchgeführten hochauflösenden HLA-Typisierung war es aufgrund einer möglichen Primer-Kreuzreaktivität bei vier der 43 Patienten nicht möglich, einen definitiven Befund mittels PCR-basierender Verfahren zu erheben. So verblieben

abschließend 39 der 43 Patienten für die weitere Analyse. Die Ergebnisse der gemäß den BIMAS-Anforderungen durchgeführten hochauflösenden HLA-Typisierung sind in *Tabelle 4* dargestellt:

HLA Klasse I	abschließende Typisierung von HLA-A	Freiburger Kollektiv (n = 39 Patienten)	HLA Klasse I	abschließende Typisierung von HLA-B	Freiburger Kollektiv (n = 39 Patienten)
	HLA-A01	13		HLA-B07	07
	HLA-A02	18		HLA-B08	08
	<i>HLA-A0201</i>	<i>17</i>		HLA-B14	05
	<i>HLA-A0205</i>	<i>01</i>		HLA-B27	03
	HLA-A03	06		<i>HLA-B2702</i>	<i>01</i>
	HLA-A11	03		<i>HLA-B2705</i>	<i>02</i>
	<i>HLA-A1101</i>	<i>03</i>		HLA-B35	09
	HLA-A24	05		<i>HLA-B3501</i>	<i>05</i>
	HLA-A31	06		<i>andere</i>	<i>04</i>
	<i>HLA-A3101</i>	<i>06</i>		HLA-B37	01
	HLA-A68	03		<i>HLA-B3701</i>	<i>01</i>
	<i>HLA-A6801</i>	<i>02</i>		HLA-B38	01
	<i>HLA-A6802</i>	<i>01</i>		<i>HLA-B3801</i>	<i>01</i>
	Fragliche Homozygotie	08		HLA-B40	03
	Sonstige Allele	16		HLA-B44	14
				<i>HLA-B4403</i>	<i>03</i>
				<i>andere</i>	<i>11</i>
				HLA-B51	01
				<i>HLA-B5101</i>	<i>01</i>
				HLA-B52	01
				<i>HLA-B5201</i>	<i>01</i>
				HLA-B60	02
				HLA-B62	03
				Fragliche Homozygotie	02
				Sonstige Allele	18

Tabelle 4: Ergebnisse der hochauflösenden HLA-Typisierung (n = 39 Patienten). Der hochauflösende HLA-Befund ist jeweils in kursiv als Anzahl - n aufgeführt.

Unter „sonstige Allele“ wurden sämtliche von BIMAS nicht zur Analyse angebotenen HLA-Typen des Freiburger Kollektivs zusammengefasst.

5.1.2 Der Idiotyp.....

Die Vielfältigkeit des Immunglobulinspektrums auf den Oberflächen von B-Zellen resultiert vor allem aus den V(D)J-Kombinationsmöglichkeiten sowie der anschließend stattfindenden somatischen Hypermutation. Nach der Alignierung mittels IMGT konnten die entsprechenden zugrunde liegenden Gen-Familien der einzelnen Abschnitte des Ids und der jeweilige Mutationsgrad ermittelt werden:

5.1.2.1 Die IgH.....

Die V_H-, D- und J_H-Segmente wurden anhand von Sequenzhomologien den einzelnen Gen-Familien zugeordnet:

Patient	V _H -Gen	Homologie zur GL	D-Gen	J _H -Gen	Homologie zur GL
	(IGHV)	(in Prozent)	(IGHD)	(IGHJ)	(in Prozent)
A019	IGHV3-23*01	87,15%	IGHD3-16*02	IGHJ4*02	85,11%
A024	IGHV3-48*03	61,46%	IGHD3-10*01	IGHJ4*02	81,25%
A027	IGHV4-34*01	89,82%	IGHD3-10*01	IGHJ5*02	88,24%
A073	IGHV3-23*05	85,76%	IGHD1-07*01	IGHJ4*02	83,33%
A082	IGHV4-39*02	87,29%	IGHD3-10*01	IGHJ5*02	94,12%
A097	IGHV4-34*01	93,33%	IGHD6-13*01	IGHJ6*02	82,26%
A103	IGHV4-39*01	89,69%	IGHD3-10*01	IGHJ4*02	87,50%
A107	IGHV3-48*02	90,62%	IGHD1-26*01	IGHJ6*02	85,48%
A112	IGHV3-23*01	89,24%	IGHD4-17*01	IGHJ6*02	85,48%
A114	IGHV1-08*01	94,79%	IGHD3-16*02	IGHJ6*02	87,10%
A118	IGHV4-39*01	83,51%	IGHD2-21*01	IGHJ4*02	85,42%
A119	IGHV3-11*01	79,51%	IGHD3-16*01	IGHJ1*01	75,00%
A120	IGHV3-30*03	85,42%	IGHD2-02*03	IGHJ6*02	80,65%
A125	IGHV3-23*01	81,75%	IGHD1-01*01	IGHJ5*02	72,00%
A126	IGHV3-23*01	88,54%	IGHD3-03*01	IGHJ4*02	79,17%
A128	IGHV4-34*01	88,07%	IGHD4-23*01	IGHJ6*02	87,10%
A130	IGHV4-34*01	91,93%	IGHD3-22*01	IGHJ3*02	88,00%
A131	IGHV4-39*01	85,57%	IGHD1-01*01	IGHJ5*02	88,24%
A132	IGHV4-59*01	86,32%	IGHD5-24*01	IGHJ1*01	75,00%
A135	IGHV3-07*01	88,89%	IGHD1-14*01	IGHJ4*02	83,33%
A137	IGHV4-34*02	94,04%	IGHD3-10*02	IGHJ3*02	88,00%
A155	IGHV2-05*10	93,81%	IGHD3-10*01	IGHJ4*02	81,25%
A161	IGHV3-74*01	92,36%	IGHD2-02*01	IGHJ4*02	87,50%
A166	IGHV3-23*04	90,97%	IGHD4-04*01	IGHJ4*02	81,25%

A169	IGHV3-15*02	86,05%	IGHD5-24*01	IGHJ4*02	91,67%
A170	IGHV3-23*01	87,85%	IGHD4-17*01	IGHJ4*02	81,25%
A171	IGHV3-15*05	89,46%	IGHD1-01*01	IGHJ6*01	79,37%
A173	IGHV3-23*01	80,56%	IGHD3-09*01	IGHJ5*01	72,55%
A175	IGHV1-69*01	82,64%	IGHD3-16*01	IGHJ4*02	85,42%
A189	IGHV3-23*01	84,38%	IGHD3-22*01	IGHJ4*02	85,42%
A192	IGHV3-23*01	90,62%	IGHD2-02*02	IGHJ3*01	92,00%
A200	IGHV3-07*01	90,97%	IGHD2-15*01	IGHJ4*02	85,42%
A230	IGHV4-34*12	95,44%	IGHD2-02*01	IGHJ5*02	78,43%
A242	IGHV4-34*02	87,37%	IGHD2-15*01	IGHJ4*02	83,33%
A278	IGHV3-21*01	91,32%	IGHD3-16*01	IGHJ6*02	83,87%
A293	IGHV3-48*03	92,36%	IGHD5-24*01	IGHJ4*02	79,17%
A299	IGHV3-23*01	82,29%	IGHD6-13*01	IGHJ5*01	84,31%
A306	IGHV3-07*01	88,89%	IGHD6-13*01	IGHJ4*02	81,25%
B011	IGHV4-31*03	90,72%	IGHD3-10*01	IGHJ5*02	88,24%

Tabelle 5: Darstellung der Zugehörigkeit der Abschnitte der IgH zu den einzelnen Gen-Familien und ihres jeweiligen Homologie-Grades.

Allgemein auffällig ist die relative Häufung bestimmter V_H-Genfamilien und einzelner V_H-Gene. Wie bereits aus Untersuchungen des V_H-Spektrums gesunder B-Zellen als auch follikulärer Lymphomzellen bekannt, zeigt sich mit 59% ($n = 23$) eine deutliche Präferenz der V_H3-Familie, der größten aller V_H-Familien.^{1,5,29,31} Elf der 39 untersuchten Idiotypen benutzen die V_H3-23- und sieben die V_H4-34-Gene an; neun Ids weisen eine identischen Keimbahnsequenz (V_H3-23-01) auf. Insgesamt kamen 22 individuelle IgH-Keimbahnsequenzen in diesem Kollektiv vor.

Tabelle 6: Darstellung der IgH-Verteilung auf die einzelnen V_H -Familien. Angaben dabei als Anzahl n ($n = x$). IGHV = Immunoglobulin variable heavy-chain

Die Zuordnung des D-Segmentes wurde dadurch erschwert, dass aufgrund von Nukleotid-Deletionen bzw. Additionen im Rahmen der V(D)J-Rekombination oft nur wenige AA der ursprünglichen D-Sequenz verblieben waren.

Mit Hilfe der von IMGT ermittelten Keimbahnsequenz war eine Analyse des Mutationsschemas des Ids möglich. Wie aus *Tabelle 5* ersichtlich lag die mediane Homologie der IgH zur Keimbahnsequenz in diesem Kollektiv bei 88,89% [Range 61,46 – 95,44%]. Der mit 61,46% deutlich abweichende Mutationsgrad von Patient A24 beruht allein auf dem Abschnitt FR3, wobei kein Verschieben des Leserasters erkennbar war. Analysen anderer Arbeitsgruppen ermittelten ebenfalls einen medianen Homologiegrad von 88% bis 89,5% für die IgH von FL-Zellen.^{25,58} Die Mutationslast der FL-IgH liegt somit deutlich über derjenigen normaler peripherer B-Zellen, deren Homologiegrad durchschnittlich ~95% beträgt.^{5,25}

Nach dieser allgemeinen Mutationsanalyse musste darüberhinaus grundsätzlich zwischen *R-Mutationen* und *S-Mutationen* unterschieden und deren Verteilung auf die einzelnen Id-Abschnitte untersucht werden.

Abbildung 6: Graphische Darstellung der Austauschmutationen (*R-Mutationen*) und der stillen Mutationen (*S-Mutationen*) innerhalb der IgH ($n = 39$). Angaben als Anzahl n . Modifiziert nach Molinier-Frenkel et al.³¹

Abbildung 7: Graphische Darstellung der Austauschmutationen (rechts) und stillen Mutationen (links) separat innerhalb der IgH ($n = 39$). Angaben als Anzahl n . Modifiziert nach Molinier-Frenkel et al.³¹

Insgesamt zeigt sich in diesem Kollektiv eine hohe Anzahl an R-Mutationen, welche sich relativ gleichmäßig, mit leichter Präferenz der CDR-Bereiche, über die gesamte IgH verteilen. Auffällig war dabei die hohe Anzahl an R-Mutationen in Position 40 in der FR2-Region, welche bei 28 der insgesamt 39 Patienten verändert war. *Tabelle 7* demonstriert die Distribution von R- und S- Mutationen auf die einzelnen Abschnitte, sowie ihr Verhältnis zueinander:

	Austauschmutationen (R-Mutationen)	Stille Mutationen (S-Mutationen)	R/S
FR1	80	85	0,94
CDR1	108	41	2,63
FR2	99	50	1,98
CDR2	105	37	2,84
FR3	283	181	1,56
gesamter FR-Bereich	462	316	1,46
gesamter CDR-Bereich	213	78	2,73
gesamter Idiotyp	675	394	1,71

Tabelle 7: Verteilung von R- und S-Mutationen auf die einzelnen Abschnitte der IgH als Anzahl n.

Bei der Betrachtung des gesamten Ids ergab sich ein Verhältnis von 1,71:1 von Austauschmutationen zu stillen Mutationen. In der Einzelanalyse zeigte sich mit einem Verhältnis von durchschnittlich 2,73:1 ein leichtes Überwiegen der R-Mutationen innerhalb der CDR-Bereiche. Demgegenüber wiesen die FR-Regionen ein annähernd ausgeglichenes Verhältnis von R- zu S-Mutationen auf (1,46:1) auf. Dies korreliert in etwa mit den von Klein et al. ermittelten Werten von 3:1 für die CDR- bzw. 1:1 in den FR-Bereichen.²⁵

5.1.2.2 Die IgL.....

Analog zur IgH (siehe Abschnitt 5.1.2.1) wurde die IgL mittels IMGT analysiert:

Patient	V _L -Familie	Grad der	J _H -Familie	Grad der
		Homologie zur GL		Homologie zur GL
	(IGLV)	(in Prozent)	(IGLJ)	(in Prozent)
A019	IGKV04-01*01	95,28%	IGKJ03*01	94,59%
A024	IGKV03-11*01	92,83%	IGKJ05*01	100,00%
A027	IGLV03-19*01	91,04%	IGLJ02*01	86,84%
A073	IGKV03-20*01	95,39%	IGKJ02*01	100,00%
A082	IGLV01-51*01	96,84%	IGLJ07*01	97,22%
A097	IGKV04-01*01	93,27%	IGKJ02*01	100,00%
A103	IGLV01-51*01	95,79%	IGLJ02*01	91,67%
A107	IGKV01-39*01	93,19%	IGKJ01*01	92,11%
A112	IGLV01-40*01	94,79%	IGLJ02*01	100,00%
A114	IGKV01-39*01	91,40%	IGKJ02*01	94,74%
A118	IGLV02-14*01	90,97%	IGLJ03*02	91,89%
A119	IGKV03-15*01	86,02%	IGKJ01*01	89,19%
A120	IGKV03-15*01	98,21%	IGKJ04*01	94,74%
A125	IGLV03-19*01	91,76%	IGLJ03*02	89,19%
A126	IGKV01-27*01	88,89%	IGKJ01*01	91,67%
A128	IGLV01-40*01	92,36%	IGLJ03*02	88,89%
A130	IGKV01-33*01	97,49%	IGKJ03*01	94,29%
A131	IGLV01-44*01	90,53%	IGLJ03*02	97,37%
A132	IGKV04-01*01	98,99%	IGKJ01*01	100,00%
A135	IGLV05-37*01	94,12%	IGLJ03*02	94,74%
A137	IGLV03-19*01	96,42%	IGLJ02*01	92,11%
A155	IGLV03-25*03	93,91%	IGLJ03*02	94,74%
A161	IGLV02-14*01	89,24%	IGLJ02*01	84,21%
A166	IGKV03-20*01	95,04%	IGKJ01*01	100,00%
A169	IGKV02-28*01	94,90%	IGKJ01*01	91,67%
A170	IGLV01-40*01	93,06%	IGLJ03*02	94,29%
A171	IGKV01-05*03	93,19%	IGKJ01*01	97,22%
A173	IGLV02-08*01	93,75%	IGLJ01*01	100,00%
A175	IGKV03-20*01	99,65%	IGKJ01*01	100,00%
A189	IGKV01-05*03	92,47%	IGKJ01*01	100,00%
A192	IGKV03-20*01	94,68%	IGKJ02*01	97,37%
A200	IGKV01-39*01	90,32%	IGKJ02*01	83,33%
A230	IGKV01-27*01	97,49%	IGKJ01*01	97,22%
A242	IGLV02-08*01	93,06%	IGLJ02*01	84,21%
A278	IGLV02-08*01	95,14%	IGLJ02*01	88,57%

A293	IGKV01-17*01	93,55%	IGKJ04*01	97,22%
A299	IGLV01-40*01	92,01%	IGLJ03*02	91,67%
A306	IGKV04-01*01	95,29%	IGKJ02*01	94,74%
B011	IGKV03-11*01	94,62%	IGKJ04*01	97,37%

Tabelle 8: Darstellung der Zugehörigkeit der einzelnen Abschnitte der IgL zu den einzelnen Gen-Familien und ihres jeweiligen Homologie-Grades.

Das Verhältnis von IgL_{κ} zu IgL_{λ} betrug 1,4:1. Allgemein auffällig war auch hier die geringe Variabilität in den weiteren Unterteilungen der V_L -Familien:

IGLV	IGKV 01 (n = 9)	IGKV 01-05 (n = 2) IGKV 01-17 (n = 1) IGKV 01-27 (n = 2) IGKV 01-33 (n = 1) IGKV 01-39 (n = 3)	IGKV 01-05*03 (n = 2) IGKV 01-17*01 (n = 1) IGKV 01-27*01 (n = 2) IGKV 01-33*01 (n = 1) IGKV 01-39*01 (n = 3)
	IGKV 02 (n = 2)	IGKV 02-28 (n = 1)	IGKV 02-28*01 (n = 1)
	IGKV 03 (n = 8)	IGKV 03-11 (n = 2) IGKV 03-15 (n = 2) IGKV 03-20 (n = 4)	IGKV 03-11*01 (n = 2) IGKV 03-15*01 (n = 2) IGKV 03-20*01 (n = 4)
	IGKV 04 (n = 4)	IGKV 04-01 (n = 4)	IGKV 04-01*01 (n = 4)
	IGLV 01 (n = 7)	IGLV 01-40 (n = 4) IGLV 01-44 (n = 1) IGLV 01-51 (n = 2)	IGLV 01-40*01 (n = 4) IGLV 01-44*01 (n = 1) IGLV 01-51*01 (n = 2)
	IGLV 02 (n = 5)	IGLV 02-08 (n = 3) IGLV 02-14 (n = 1)	IGLV 02-08*01 (n = 3) IGLV 02-14*01 (n = 1)
	IGLV 03 (n = 4)	IGLV 03-19 (n = 3) IGLV 03-25 (n = 1)	IGLV 03-19*01 (n = 3) IGLV 03-25*03 (n = 1)
	IGLV 05 (n = 1)	IGLV 05-37 (n = 1)	IGLV 05-37*01 (n = 1)

Tabelle 9: Unterteilung der einzelnen IgL-Abschnitte in die einzelnen V_L -Familien. Angaben dabei als Anzahl (n = x). IGLV = Immunoglobulin light chain variable region gene

In dieser Analyse fanden sich sogar nur 18 verschiedene Keimbahnsequenzen, während es bei der IgH immerhin 22 individuelle Sequenzen waren. Allerdings zeigte sich hier ein breiteres Spektrum an unterschiedlichen V_L s ohne Präferenz einer bestimmten Leicht-Kettenfamilie, wie dies in früheren Arbeiten und bei der IgH der Fall war.⁴⁶

Mit Hilfe der ermittelten Keimbahnsequenz war eine Analyse des Mutationsmusters der IgL möglich: Dabei lag die mediane Homologie zur GL bei 93,75% [Range 86,02 – 99,65%]. Frühere Arbeiten hatten einen Wert von 94% [Range 1 – 14%] für IgL_k von FL-Zellen bzw. von 95 bis 98% für IgLs gesunder peripherer Blutzellen ergeben.^{21,24,58}

Abbildung 8: Graphische Darstellung der Austauschmutationen (R-Mutationen) und der stillen Mutationen (S-Mutationen) innerhalb der IgL ($n = 39$). Angaben als Anzahl n . Modifiziert nach Molinier-Frenkel et al.³¹

Abbildung 9: Graphische Darstellung der Austauschmutationen und stillen Mutationen separat innerhalb der IgL. Angaben als Anzahl *n*. Modifiziert nach Molinier-Frenkel et al.³¹

In der graphischen Darstellung ließ sich insgesamt eine relativ gleichmäßige Distribution der Mutationen mit einer leichten Betonung von CDR1 darstellen. FR2 wies in Anbetracht des insgesamt geringen Mutationsgrad ein überraschend hohes Maß an R- und S-Mutationen auf. CDR2 bestand bei 37 der 39 betrachteten leichten Ketten aus lediglich 3 AA.

Anschließend wurde das Verhältnis von R- zu S-Mutationen untersucht:

	Austauschmutationen (<i>R</i> -Mutationen)	Stille Mutationen (<i>S</i> -Mutationen)	<i>R/S</i>
FR1	52	37	1,41
CDR1	90	21	4,29
FR2	62	67	0,93
CDR2	35	6	5,83
FR3	102	73	1,40
gesamter FR-Bereich	216	177	1,22
gesamter CDR-Bereich	125	27	4,63
gesamter Idiotyp	341	204	1,67

Tabelle 10: Darstellung der Verteilung von R- und S-Mutationen auf die einzelnen Abschnitte der IgL als Anzahl *n*.

Dabei zeigte sich ein deutliches Überwiegen der R-Mutationen innerhalb der CDR-Bereiche (4,63:1), während in der FR-Regionen (1,22) ein in etwa ausgeglichenes Verhältnis von R- zu S-Mutationen vorlag.

5.1.2.3 Der Vergleich der Mutationsanalysen von IgH und IgL des Idiotypen.....

Bei der Untersuchung von IgH und IgL ergab sich im Einklang mit früheren Arbeiten ein insgesamt höherer Mutationsgrad der IgH (89%-GL-Homologie) gegen über der IgL (94%-GL-Homologie).⁵⁸

Bei der anschließenden Betrachtung der R/S-Distribution fiel auf, dass deren Verhältnis innerhalb der beiden gesamten Ketten (1,71:1 bzw. 1,67:1) bzw. der FR-Bereiche (1,46:1 bzw. 1,22:1) in etwa gleich:

	R/S-Quotient innerhalb der IgH	R/S-Quotient innerhalb der IgL
FR1	0,94	1,41
CDR1	2,63	4,29
FR2	1,98	0,93
CDR2	2,84	5,83
FR3	1,56	1,40
gesamter FR-Bereich	1,46	1,22
gesamter CDR-Bereich	2,73	4,63
gesamter Idiotyp	1,71	1,67

Tabelle 11: Gegenüberstellung der R/S-Quotienten von IgH und IgL.

Lediglich innerhalb der CDR-Bereiche der IgL zeigte sich, trotz deren insgesamt geringerer Anzahl an Mutationen, eine etwas stärkere Präferenz der R- gegenüber den S-Mutationen im Vergleich zur IgH (4,63:1 bzw. 2,73:1).

Aus der beschriebenen Differenz in der Gesamtheit des Mutationsgrades, bei gleichzeitig in etwa ähnlichem Verhältnis von R- zu S-Mutationen, resultiert zwangsläufig eine insgesamt verminderte Anzahl an R-Mutationen innerhalb der IgL:

Abbildung 10: Graphische Darstellung der direkten Gegenüberstellung der Austauschmutationen (R-Mutationen) innerhalb der schweren und der leichten Kette. Angaben als Anzahl *n*. Modifiziert nach Molinier-Frenkel et al.³¹

	Austauschmutationen innerhalb der <i>IgH</i>	Austauschmutationen innerhalb der <i>IgL</i>
FR1	80	52
CDR1	108	90
FR2	99	62
CDR2	105	35
FR3	283	102
gesamter FR-Bereich	462	216
gesamter CDR-Bereich	213	125
gesamter Idiotyp	675	341

Tabelle 12: Darstellung der Verteilung von R-Mutationen auf die schwere und leichte Kette des Ids als Anzahl *n*.

Während sich deren netto-Anzahl innerhalb der CDR1-Region der beiden Ketten in etwa gleich, fiel die Diskrepanz in den übrigen Abschnitten, insbesondere innerhalb von CDR2 und FR3, deutlich größer aus.

Zusammengefasst enthielt die IgH neben einem höheren absoluten Mutationsgrad auch ein größeres Volumen an R-Mutationen als dies in der IgL der Fall war.

5.1.2.4 Die Sequenzen gesunder B-Zellen.....

Im Rahmen des Vergleiches zwischen Idiotyp und den für die gesunden B-Zellen ermittelten Sequenzen, wurde auch deren Mutationsgrad und –muster untersucht. Dabei ergab sich für beide Ketten der kontaminierenden B-Zellen jeweils ein durchschnittlicher Homologiegrad zur Keimbahnsequenz von ~96%, was in etwa mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen korreliert.^{21,29,41} In *Abbildung 11* und *Tabelle 13* wurde ihr Mutationsmuster dargestellt:

Abbildung 11: Graphische Darstellung der Verteilung von R- und S-Mutationen innerhalb der schweren ($n = 29$) und der leichten Ketten ($n = 30$) gesunder B-Zellen. Angaben als Anzahl n . Modifiziert nach Molinier-Frenkel et al.³¹

<i>IgH</i>	Austauschmutationen (<i>R-Mutationen</i>)	Stille Mutationen (<i>S-Mutationen</i>)	<i>R/S</i>
FR1	29	27	1,07
CDR1	39	9	4,33
FR2	34	15	2,27
CDR2	38	7	5,43
FR3	94	61	1,54
gesamter FR-Bereich	157	103	1,52
gesamter CDR-Bereich	77	16	4,81
gesamter Idiotyp	234	119	1,97

<i>IgL</i>	Austauschmutationen (<i>R-Mutationen</i>)	Stille Mutationen (<i>S-Mutationen</i>)	<i>R/S</i>
FR1	45	24	1,88
CDR1	37	15	2,47
FR2	46	27	1,70
CDR2	18	7	2,57
FR3	69	41	1,68
gesamter FR-Bereich	160	92	1,74
gesamter CDR-Bereich	55	22	2,50
gesamter Idiotyp	215	114	1,89

Tabelle 13: Darstellung der Verteilung von R- und S-Mutationen innerhalb der schweren und leichten Ketten kontaminierender gesunder B-Zellen als Anzahl n.

Auch hierbei ergab sich eine relativ ebene Distribution der gesamten Mutationslast. In den CDR-Bereichen befanden sich vermehrt R-Mutationen, während das Verhältnis von R- zu S in den Framework Regions annähernd ausgeglichen war. Wie zuvor im Id beobachtet, ergab sich auch hier ein etwas größerer R/S-Quotient für die CDRs der IgL (4,81:1) im Vergleich zu den korrespondierenden Abschnitten der IgH (2,50:1).

5.2 Die Analyse der Immunogenität mittels Bioinformatiksystemen.....

5.2.1 Die Beschränkung auf die Top 20-Peptidmotive.....

Um sicher zu stellen, dass bei der Beschränkung auf die Top 20-Peptide keine immunogenen Epitope übersehen wurden, musste der Id eines Patienten zunächst vor seinem eigenen HLA-Hintergrund untersucht werden. So konnten zwischen 20 (*nur ein HLA-Typ zu untersuchen*) und 80 (*alle vier analysierbar*) Peptide pro Patient für die schwere bzw. leichte Kette bestimmt werden. Aus diesen ermittelten Werten erfolgte wiederum für jeden Patienten individuelles Ranking seiner Top 20-Peptide. Die auf diese Art ermittelten Epitope waren somit unabhängig vom HLA-Allel und rein nach ihrer Bindungsstärke geordnet. Die durchschnittlichen Werte für alle 39 Patienten wurden in *Abbildung 12* dargestellt:

Abbildung 12: Darstellung des Rankings nach Bindungsstärke der Top 20 Motive für die gesamte IgH und IgL, arithmetisches Mittel (Mean) und Median samt Standardabweichung.

Links: Darstellung der IgH

Rechts: Darstellung der IgL

Dabei war ein rascher Abfall der Scores deutlich erkennbar. So lag das statistische Mittel innerhalb beider Ketten bereits ab Position drei unter dem für Antigenität geforderten Score von ≥ 50 .^{15,31,49} Damit lässt sich festhalten, dass, wie bereits vermutet, die Immunogenität des Ids als generell eher niedrig einzustufen ist und meist nur von den drei am höchsten gerankten Motiven bestimmt wird. Darüberhinaus konnte sicher gestellt werden, dass bei der angewandten Beschränkung auf die Top 20-Motive pro HLA-Typ und Abschnitt mit keinem Verlust an möglichen Zielen zu rechnen ist.

Da in den durchgeführten Analysen FR- und CDR-Regionen separat von einander analysiert wurden, ermittelten wir anschließend die jeweiligen Top 20-Peptide des FR- und des CDR-Bereiches separat für beide Ketten:

Abbildung 13: Graphische Darstellung des Means und Medians der für alle 39 Idiotypen ermittelten Top 20-Peptidmotive getrennt für den FR- und den CDR-Bereich.

Links: Darstellung des Rankings der Top 20-Motive der **IgH** jeweils für die CDR und FR-Bereiche.

Rechts: Darstellung des Rankings der Top 20-Motive der **IgL** jeweils für die CDR und FR-Bereiche.

Die vorgeschlagene Grenze von 50 wurde bei Betrachtung des *arithmetischen Mittels* der FR-Peptide ab Position drei unterschritten. Der mediane Durchschnitt der FR-Motive bzw. sowohl der *Mean* als auch der *Median* der CDR-Epitope liegen bereits auf Rang 1 unterhalb dieser Grenze. Auch hier zeigte sich, dass FR-Peptide durchschnittlich höhere Scores erzielen als CDR-Motive. Somit konnten wir, analog zur IgH und unabhängig vom jeweiligen HLA-Typ, dieses Phänomen auch für die leichte Kette darstellen.

5.2.2 Das Bindungsverhalten einzelner HLA-Allele.....

Um generelle Unterschiede im Bindungsverhalten zwischen einzelnen HLA-Allelen zu entdecken, wurden alle 39 Idiotypen separat auf allen vorkommenden und angebotenen HLA-Allelen analysiert. Dies erfolgte mittels Summenscore und unabhängig vom jeweiligen tatsächlichen HLA-Hintergrund des untersuchten Ids.

5.2.2.1 Analyse des Bindungsverhaltens der einzelnen HLA-Allele für die IgH.....

In *Abbildung 14* und *15* wurden die Summenscores der Top 20-gerankten Peptide aller 39 Ids auf einem einzelnen HLA-A- und HLA-B-Allelen und der resultierende *Median* graphisch dargestellt.

Abbildung 14: Darstellung des Summenscores aller 39 IgHs auf den einzelnen HLA-A-Allelen.

Abbildung 15: Darstellung des Summenscores aller 39 IgHs auf den einzelnen HLA-B-Allelen. Die Skalierung erfolgt aufgrund der größeren Unterschiede logarithmisch.

Auf diese Art konnten generelle Unterschiede in der Art der Präsentation der schweren Kette durch die einzelnen HLA-Allele aufgezeigt werden. Besonders auffällig war dabei das universell gute Bindungsverhalten von *HLA-B2705* und *HLA-B5101*, welches bis zu 1.000fach über dem Niveau anderer HLA-Allele, wie zum Beispiel *HLA-B08*, lag.

5.2.2.2 Analyse des Bindungsverhaltens der einzelnen HLA-Typen für die IgL.....

Analog wurden die HLA-A- und HLA-B-Allele bezüglich ihres Bindungsverhaltens der leichten Kette analysiert und graphisch dargestellt:

Abbildung 16: Darstellung des Summenscores aller 39 IgLs auf den einzelnen HLA-A-Allelen.

Abbildung 17: Darstellung des Summenscores aller 39 IgLs auf den einzelnen HLA-B-Allelen. Die Skalierung erfolgt aufgrund der größeren Unterschiede logarithmisch.

Auch hier präsentiert *HLA-B2705* und *B5101* die angebotenen Sequenzen durchschnittlich deutlich besser als andere HLA-Allele.

5.2.2.3 Vergleich des Bindungsverhaltens der einzelnen HLA-Allele für die beiden Ketten.....

Beim Vergleich der Präsentation von IgH und IgL auf den einzelnen HLA-Merkmalen zeigte sich ein grundsätzlich sehr ähnliches Bindungsverhalten für die beiden unterschiedlichen Ketten. Beide Ketten erzielten auf HLA-B2705 bzw. HLA-B5101 jeweils die höchsten Scores, bzw. auf HLA-A1101 oder HLA-B08 die niedrigsten. Nur im Falle von *HLA-A6801* erzielten die IgHs durchschnittlich einen höheren Summenscore als die IgLs.

Diese Ähnlichkeiten im Bindungsverhalten könnten an eventuellen Sequenzhomologien zwischen IgH und IgL innerhalb der FR-Bereiche liegen. Demgegenüber wiesen die CDR-Bereiche keinerlei Ähnlichkeiten auf und müssten folglich nur eine untergeordnete Rolle für die Höhe des entstandenen Score spielen.

5.2.3 Die Ermittlung des Epitopverteilungsmusters mittels Summenscore.....

5.2.3.1 Die Ermittlung des Epitopverteilungsmusters mittels Summenscore für die IgH.....

Nach der Analyse des generellen HLA-Bindungsverhaltens in *Abschnitt 5.2.1* wurden die Ids auf ihren *autologen* HLA-Hintergründen analysiert und so der individuelle Patienten-eigene Summenscore eines jeden gesamten Ids ermittelt.

Anschließend erfolgte die gleiche Analyse für die einzelnen FR- und CDR-Abschnitte, bzw. für FR_{gesamt} und CDR_{gesamt} :

Abbildung 18: Graphische Darstellung der Summenscores für die gesamte IgH, den FR- und den CDR-Bereich für alle 39 Patienten. Die Untersuchung erfolgte jeweils auf dem autologen HLA-Hintergrund.

Abbildung 19: Graphische Darstellung des medianen Summenscores der 39 einzelnen IgH-Abschnitte, analysiert auf dem jeweiligen autologen HLA-Hintergrund.

Dabei zeigt sich deutlich, dass die FR-Bereiche, abgesehen von FR2, durchschnittlich höhere Scores erzielen, als die CDR-Bereiche.

5.2.3.2 Die Ermittlung des Epitopverteilungsmusters mittels Summencore für die IgL.....

Anschließend wurde dieselbe Analyse für die IgL durchgeführt:

Abbildung 20: Graphische Darstellung der Summenscores für die gesamte IgL, den FR- und den CDR-Bereich für alle 39 Patienten.

Abbildung 21: Graphische Darstellung des medianen Summenscores der einzelnen IgL-Abschnitte.

5.2.3.3 Die Ermittlung des Epitopverteilungsmusters mittels Summencore für die kontaminierenden Sequenzen der IgH und der IgL.....

Bei der Bestimmung des Summenscores für die von gesunden Zellen stammenden schweren und leichten Ketten auf ihrem autologen HLA-Repertoire zeigte sich:

Abbildung 22: Graphische Darstellung der Summenscores für die gesamte IgL, den FR- und den CDR-Bereich für alle Patienten mit verfügbaren schweren ($n = 16$) und leichten ($n = 14$) Ketten gesunder B-Zellen.

Abbildung 23: Graphische Darstellung des medianen Summenscores der einzelnen Abschnitte.

Dabei lässt sich auch für die von gesunden B-Zellen stammenden schweren und leichten Ketten demonstrieren, dass die FR3 durchschnittlich die höchsten Scores erzielt. Darüberhinaus zeigt sich, dass die einzelnen CDR-Regionen der IgL im Durchschnitt zwar niedrigere Scores als die Framework Regionen erreichen, bei der Betrachtung von CDR_{gesamt} hingegen liegen sie annähernd gleich auf (Median FR_{gesamt}: 144,338 versus CDR_{gesamt}: 110,599).

5.2.3.4 Der Vergleich des Epitopverteilungsmusters mittels Summencore für die IgH, IgL und die kontaminierenden B-Zell-Sequenzen.....

Zusammenfassend konnte jeweils für beide Ketten der hypermutierten Lymphom-Ids, der schwach mutierten normalen Igs und für die unmutierte GL-Sequenzen demonstriert werden,

dass die FR-Bereiche, insbesondere FR3, durchschnittlich die höchsten Scores erzielen. Somit scheint dieser Unterschied unabhängig vom jeweiligen Mutationsgrad zu bestehen, bzw. wird durch diesen nicht alteriert.

5.2.4 Das Verteilungsmuster bindungsstarker Peptide.....

Grundsätzlich haben nach gängiger Meinung nicht alle von BIMAS ermittelten Peptidmotive Aussicht, in-vivo auch tatsächlich immunogen zu wirken. Um ein mögliches Verteilungsmuster derjenigen Peptide zu erkennen, die diese Voraussetzungen erfüllen, wurden alle Ids auf ihrem autologen HLA-Hintergrund untersucht. Berücksichtigt wurden für diese Darstellung nur Epitope mit entsprechend hohen BIMAS-Scores ≥ 50 bzw. ≥ 10 . Anschließend erfolgte die Zuordnung zu den einzelnen Abschnitten.

5.2.4.1 Das Epitopverteilungsmuster innerhalb der IgH, ihrer unmutierten Keimbahnsequenz und den schweren Ketten gesunder B-Zellen.....

Ziel dabei war es, ein mögliches Verteilungsmuster potentiell immunogener Epitope, also Peptide ab einer bestimmten Score-Höhe, innerhalb der IgH zu ermitteln:

Abbildung 24: Prozentuale Verteilung der Epitope mit einem BIMAS-Score ≥ 10 bzw. ≥ 50 innerhalb der gesamten IgH. Darstellung als Anzahl n und als Prozent.

Dabei ergab sich mit 110 Peptiden (65%) respektive 34 Peptiden (75%) innerhalb der FR-Bereiche ein deutliches Überwiegen der konstanten gegenüber den individuellen Regionen. Darüberhinaus zeigte sich, dass nur 16 (9%) bzw. 4 Peptide (9%) innerhalb von CDR3, der individuellsten Region innerhalb des Ids liegen.

Um die grundsätzliche Rolle der Mutationen innerhalb des Ids zu klären, wurde dieses Epitop-Mapping gleichermaßen für die jeweils zugehörige GL durchgeführt. Berücksichtigt wurden hierbei nur die Abschnitte FR1 bis FR3:

Abbildung 25: Prozentuale Verteilung der Epitope mit einem BIMAS-Score ≥ 10 bzw. ≥ 50 innerhalb der Keimbahnsequenz und der korrespondierenden FR1 bis FR3 Abschnitte der IgH. Darstellung als Anzahl n und als Prozent.

Auch hierbei zeigt sich mit 126 (79%) bzw. 34 (89%) Peptiden ein Überwiegen der FR-Bereiche. In den korrespondierenden mutierten Id-Abschnitten der schweren Kette ergab sich ein mit 108 (71%) bzw. 34 (83%) Peptiden im FR-Bereich und somit ein annähernd identisches Verteilungsmuster.

Um zu festzustellen, inwiefern dieses Verteilungsmuster eventuell Lymphom-spezifisch sein könnte, wurden abschließend noch die schweren Ketten kontaminierender, gesunder B-Zellen untersucht. Bei 16 Patienten lagen zwischen einer und 6 solcher Sequenzen pro Patient vor. Insgesamt konnten hier also 16 Idiotypen und 30 kontaminierende Sequenzen gegenübergestellt werden.

Abbildung 26: Prozentuale Verteilung aller Epitope mit einem BIMAS-Score ≥ 10 bzw. ≥ 50 innerhalb der kontaminierenden B-Zell-Sequenzen ($n=30$) und der IgH. Darstellung als Anzahl n und als Prozent.

Analog zu den Ergebnissen der Analysen aller 39 Id-IgH-Sequenzen und den korrespondierenden Keimbahnsequenzen zeigte sich auch bei der Untersuchung dieser gesunden B-Zell-Sequenzen ein ähnliches Verteilungsmuster: Mit 70% bzw. 68% lagen auch hier die Mehrzahl der Epitope im FR-Bereich. Bei der Analyse speziell der IgH-Sequenzen dieser 16 Patienten lagen die Anteile der FR-Peptide bei 65% bzw. 80%. Auch in den gesunden B-Zell-Sequenzen lagen lediglich 17 bzw. 14% aller Peptide im CDR3-Bereich, während es in den korrespondierenden IgHs mit 12 bzw. 4% ähnlich wenige waren.

5.2.4.2 Das Epitopverteilungsmuster innerhalb der IgL, ihrer unmutierten Keimbahnsequenz und den schweren Ketten gesunder B-Zellen.....

Anschließend erfolgte die Analyse der Peptide mit einem BIMAS-Score ≥ 50 bzw. 10 auch für die IgL, deren zugehörige Keimbahnsequenz und kontaminierenden Sequenzen:

Abbildung 27: Prozentuale Verteilung der Epitope mit einem BIMAS-Score ≥ 10 bzw. ≥ 50 innerhalb der gesamten IgL. Darstellung als Anzahl n und als Prozent.

Dabei ergab sich, genau wie in der IgH beobachtet, mit 117 Peptiden (60%) bzw. 37 Peptiden (63%) ein Überwiegen der FR- gegenüber der CDR-Region. Darüberhinaus zeigte sich, dass 34 (18%) bzw. neun Peptide (15%) innerhalb von CDR3 liegen.

Im Anschluss an die Analyse der gesamten IgL wurde die zugehörige Keimbahnsequenz den Abschnitten FR1 bis FR3 der leichten Kette gegenübergestellt:

Abbildung 28: Prozentuale Verteilung aller Epitope mit einem BIMAS-Score ≥ 10 bzw. ≥ 50 innerhalb der Keimbahnsequenz und der korrespondierenden FR1-FR3-Abschnitte der IgL. Darstellung als Anzahl n und als Prozent.

Auch in der IgL zeigte die Analyse der Keimbahnsequenz mit 102 (72%) bzw. 30 (68%) Peptiden ein anteilmäßiges Überwiegen der FR-Bereiche. Zum Vergleich wurde der entsprechende Abschnitt, FR1 bis FR3, der zugehörigen mutierten IgL untersucht, wo sich mit 105 (71%) bzw. 34 (73%) Motiven ebenfalls eine eindeutige Präferenz der FR-Regionen ergab. Anschließend erfolgte die Untersuchung der leichten Ketten von gesunden B-Zellen stammender Igs:

Abbildung 29: Prozentuale Verteilung aller Epitope mit einem BIMAS-Score ≥ 10 bzw. ≥ 50 innerhalb der kontaminierenden B-Zell-Sequenzen (n=29) und der IgL. Darstellung als Anzahl n und als Prozent.

Auch bei diesem Vergleich ergab sich mit 53 bzw. 74% innerhalb der normalen Sequenzen gegenüber 70 bzw. 65% in den korrespondierenden IgLs des Ids erneut ein Überwiegen der FR-Peptide.

5.2.4.3 Der Vergleich des Epitopverteilungsmusters von IgH, IgL und gesunden B-Zellen.....

Grundsätzlich zeigte sich bei allen untersuchten Sequenzen eine ähnliche Epitopdistribution. Dabei überstieg die Anzahl der Peptide in den FR-Bereichen mit meist deutlich die Anzahl der CDR-Motive. Epitope aus dem CDR3-Bereich waren bei einem durchschnittlichen Anteil von 16% am gesamten Idiotyp in adäquater Anzahl vorhanden.

5.3 Der statistische Vergleich.....

5.3.1 Die IgH.....

5.3.1.1 Der Immunogenitätsvergleich der autologen IgH mit den IgHs HLA-differenter Patienten.....

Um Hinweise für eine grundsätzliche CD8⁺-vermittelte Immunsurveillance zu finden, wurde die Immunogenität des eigenen Ids auf dem autologen HLA-Hintergrund mit derjenigen fremder Ids verglichen.

5.3.1.1.1 Vergleich der gesamten IgH.....

Zunächst wurde die gesamte eigene IgH mittels Summscore_{gesamt} auf dem jeweils autologen HLA-Hintergrund untersucht. Anschließend folgte die Untersuchung der 38 allogenen Ids, die von HLA-differenter Patienten stammen, vor demselben HLA-Hintergrund. Aus den Werten der 38 allogenen Ids wurde der Mittelwert gebildet und dem Wert des autologen Ids gegenübergestellt. Da man sich in dieser Analyse mit dem Summscore_{gesamt} auf die jeweils Top 20 ermittelten Peptide beschränkt hat, wurden anschließend jeweils die Top 20-Peptide separat für die einzelnen sieben Id-Abschnitte (*FR1*, *CDR1*, *FR2*, *CDR2*, *FR3*, *CDR3*, *FR4*) ermittelt. Der resultierende Wert für die einzelnen Abschnitte wurden ebenfalls zu einem maximalen Summscore für alle ermittelbaren Peptide eines Ids aufsummiert und dem der fremden Ids gegenübergestellt. Dadurch wurden pro HLA-Allel zusätzlich zu den Top 20-Motiven ungefähr 100 weitere Peptide in die Analyse eingeschlossen:

Abbildung 30: Darstellung der Summscores der IgHs auf dem jeweils autologem HLA-Hintergrund gegenüber dem durchschnittlichen Summscore (Mean) der 38 anderen IgHs auf demselben HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Analyse mittels Wilcoxon-Rangreihentest. **Link:** Vergleich der Top 20-Peptide. **Rechts:** Vergleich aller ermittelbaren Peptide.

Dabei erzielten die schwere Kette vor ihrem autologen HLA-Hintergrund einen statistisch signifikant niedrigeren Wert (*Median der Mittelwerte: 212,736 versus 258,629 ($P=0,0017$) bzw. Median: 218,470 versus 268,893 ($P=0,0019$)*) als der Durchschnitt der IgHs HLA-differenter Patienten. Auffällig war darüberhinaus, dass durch die Berücksichtigung aller ermittelbaren Peptide kein wesentlicher weiterer Score-Anstieg zu verzeichnen war (*Median 212,736 versus 218,470*).

5.3.1.1.2 Separate Analyse der einzelnen Regionen innerhalb der IgH.....

Auch bei der Einzelanalyse zeigte sich jeweils ein niedrigerer Wert für die eigene IgH im Vergleich zu dem für die allogenen Sequenzen ermittelten Wert:

Abbildung 31: Vergleich der Präsentation von FR1, FR2, FR3 und FR4 mit dem durchschnittlichen Summenscore (Mean) der entsprechenden FR-Regionen fremder Ids. Graphische Darstellung des Medians. Statistischer Vergleich mittels Wilcoxon-Rangreihentest.

Im Falle von FR1 (Median: 32,734 versus 47,939 ($P=0,0409$)) und FR2 (Median der Mittelwerte: 6,486 versus 17,068 ($P=0,0010$)) erreichte dieser Unterschied statistische Signifikanz, FR3 (Median: 67,498 versus 149,947 ($P=0,0874$)) und FR4 (Median: 1,977 versus 3,967 ($P=0,0625$)) verfehlten das Signifikanzniveau knapp.

Im Falle der CDR-Bereiche war der Unterschied, analog zum höheren Mutationsgrad, deutlich größer:

Abbildung 32: Vergleich der Präsentation von CDR1, CDR2 und CDR3 mit dem durchschnittlichen Summenscore (Mean) der entsprechenden CDR-Regionen fremder IgHs. Graphische Darstellung des Medians. Statistischer Vergleich mittels Wilcoxon-Rangreihentest.

Auch bei diesen Einzelanalysen zeigte sich jeweils ein deutlich niedrigerer Wert für die autologen CDR-Bereiche im Vergleich zu dem für die fremden CDR-Abschnitte ermittelten

Wert. In allen Fällen erreichte dieser Unterschied statistische Signifikanz: CDR1 (*Median der Mittelwerte: 20,620 versus 51,517* ($P=0,0007$)), CDR2 (*Median: 7,612 versus 30,660* ($P=0,0093$)) und CDR3 (*Median: 15,879 versus 37,297* ($P=0,0008$)).

5.3.1.1.3 Separate Analyse der gesamten FR- und CDR-Bereiche für die IgH.....

Anschließend erfolgte die gesammelte Analyse des gesamten FR- bzw. CDR-Bereiches der IgH mittels Aufsummierung der Scores der einzelnen Abschnitte:

Abbildung 33: Vergleich der autologen IgH mit dem durchschnittlichen Summenscores (Mean) fremder IgHs auf autologem HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests. **Links:** Vergleich des gesamten FR-Bereiches. **Rechts:** Vergleich des gesamten CDR-Bereiches.

Der Vergleich der FR-Bereiche zeigte einen geringen Unterschied zwischen den durchschnittlichen Präsentationsniveaus (*Median der Mittelwerte: 157,087 versus 204,416*) und verfehlte statistische Signifikanz ($P=0,1197$).

Die Analyse der gesamten CDR-Region hingegen zeigte einen größeren (*Median der Mittelwerte: 74,375 versus 179,464*) und statistisch hoch signifikanten Unterschied ($P=0,0001$) zugunsten der Präsentation der fremden IgHs auf. Dieser Unterschied bestand trotz insgesamt niedrigerer Scores für die CDR-Region.

Zusammenfassend zeigte die Untersuchung der Top 20-Peptide bzw. aller ermittelbaren Peptide innerhalb des Ids eine statistisch signifikant bessere Präsentation der fremden Peptide gegenüber der autologen IgH auf. Aus den Analysen der einzelnen Abschnitte ergab sich, dass sämtliche fremden IgH-Regionen, bis auf FR3 und FR4, statistisch signifikant besser präsentiert werden als die der autologen IgH. Darüberhinaus zeigte sich, dass der Unterschied

im Vergleich der gesamten schweren Ketten vorrangig durch die individuellen CDR-Bereiche, trotz deren insgesamt niedrigeren Scores, zustande kommt:

Auto-Idiotyp versus Allo-Idiotypen für die IgH

Abbildung 34: Übersicht der statistischen Vergleiche zwischen Auto- und Allo-IgHs.

Bei Verwendung des Medians erreichte weder der Vergleich der gesamten IgH noch die Analyse der einzelnen oder gesamten FR- oder CDR-Bereiche einen statistisch signifikanten Unterschied. (Die Daten wurden im Anhang dargestellt.)

5.3.1.2 Der Immunogenitätsvergleich von IgH und Keimbahnsequenz.....

5.3.1.2.1 Vergleich der gesamten IgH und ihrer Keimbahnsequenz.....

Um den Einfluss der Mutationen auf die Immunogenität der IgH zu untersuchen, musste deren Antigenität mit der der dazugehörigen Keimbahnsequenz (GL) verglichen werden. Dazu wurde die IgH_{FR1 bis FR3} und deren von IMGT ermittelten Keimbahnsequenz auf autologem HLA-Hintergrund mittels Summenscore_{gesamt} untersucht. Verwendet wurden jeweils die für die gesamte Sequenz ermittelten Top 20 Peptide, sowie die Summe aus allen für die Einzelabschnitte ermittelten Peptiden:

Abbildung 35: Statistischer Vergleich der IgH und ihrer jeweils zugehörigen Keimbahnsequenz auf autologem HLA-Hintergrund mittels Summenscore. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests.

Links: Vergleich der Top 20-Peptide.

Rechts: Vergleich aller ermittelbaren Peptide.

Dabei zeigte sich kein Unterschied in der Art der Präsentation der gesamten IgH im Vergleich mit der jeweils zugehörigen Keimbahnsequenz (*Median der Mittelwerte: 171,744 versus 193,975 ($P=0,5720$) bzw. 181,503 versus 241,789 ($P=0,4638$)*). Auch hier kam es durch die Berücksichtigung aller ermittelbaren Peptide zu keinem weiteren deutlichen Score-Anstieg (*Median: 171,744 versus 181,503*).

5.3.1.2.2 *Separate Analyse der einzelnen Regionen innerhalb der IgH und ihre Keimbahnsequenz.....*

Anschließend erfolgte wieder eine Untersuchung der Art der Präsentation der einzelnen IgH- bzw. Keimbahnsequenz-Abschnitte:

Abbildung 36: Statistischer Vergleich der einzelnen FR-IgH-Regionen mit den korrespondierenden Keimbahnsequenzen auf autologem HLA-Hintergrund mittels Summenscore. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests.

Dabei ergab sich für keine der FR-Regionen ein statistisch signifikanter Unterschied: FR1 (Median der Mittelwerte: 32,734 versus 35,940 ($P=0,4967$)), FR2 (Median der Mittelwerte: 6,486 versus 11,238 ($P=0,0927$)) und FR3 (Median der Mittelwerte: 67,498 versus 99,653 ($P=0,9610$)).

Anschließend erfolgte die Untersuchung der CDR1- und CDR2-Bereiche:

Abbildung 37: Statistischer Vergleich der einzelnen CDR-IgH-Regionen mit den korrespondierenden Keimbahnsequenzen auf autologem HLA-Hintergrund mittels Summenscore. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests.

Weder für CDR1 (Median der Mittelwerte: 20,620 versus 18,348 ($P=0,0550$)), noch für die CDR2-Region (Median der Mittelwerte: 7,612 versus 11,083 ($P=0,4153$)) zeigte der Vergleich mit der jeweils zugehörigen Keimbahnsequenz einen Unterschied.

5.3.1.2.3 Separate Analyse des gesamten FR- bzw. CDR-Bereiches der IgH und ihrer Keimbahnsequenz.....

Anschließend erfolgte die Analyse des gesamten FR- bzw. CDR-Bereiches der IgH mittels Aufsummierung der Scores für die einzelnen Abschnitte:

Abbildung 38: Vergleich des gesamten FR- bzw. CDR-Bereiches der IgH mit dem Summenscore (Mean) der zugehörigen Keimbahnsequenz auf dem autologem HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests.

Links: Vergleich des gesamten FR-Bereiches.

Rechts: Vergleich des gesamten CDR-Bereiches.

Bei der Zusammenschau ergab sich weder für den gesamten FR- noch für den gesamten CDR-Bereich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der IgH und der jeweiligen Keimbahnsequenz. Auffällig war auch hier der deutlich niedrigere Score für die gesamte CDR-Region (*Median der Mittelwerte: 37,556 versus 37,704 ($P=0,2274$)*) im Vergleich zur Framework Region (*Median der Mittelwerte: 155,365 versus 156,065 ($P=0,5815$)*).

Weder für die gesamte IgH-Sequenz noch für die Einzelabschnitte ließ sich im direkten Vergleich mit der jeweils zugehörigen Keimbahnsequenz ein signifikanter Unterschied im durchschnittlichen Summenscore demonstrieren.

Idiotyp versus Keimbahnsequenz für die IgH

Abbildung 39: Übersicht der statistischen Vergleiche zwischen IgH und korrespondierender Keimbahnsequenz.

Wie zuvor für den Id beobachtet, erzielten auch innerhalb der Keimbahnsequenz FR1 und FR3 jeweils die höchsten Scores. Bei Verwendung des Medians erreichte ebenfalls weder der Vergleich der gesamten IgH noch die Analyse der einzelnen oder gesamten FR- oder CDR-Bereiche einen statistisch signifikanten Unterschied. (Die Daten wurden im Anhang dargestellt.)

5.3.1.3 Der Immunogenitätsvergleich der IgH-Keimbahnsequenzen.....

Zur Ermittlung der Rolle der Mutationen innerhalb der IgH wurde die Keimbahnsequenz der autologen IgH mit dem Mittelwert der Summenscores_{gesamt} der fremden GL-Sequenzen verglichen:

Abbildung 40: Darstellung des Summenscores der IgH-Keimbahnsequenz, auf autologem HLA-Hintergrund gegenüber dem gemittelten Summenscore der 38 allo genen Keimbahnsequenzen auf demselben HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Analyse mittels Wilcoxon-Rangreihentest. [GL: Germline/Keimbahnsequenz]

Dabei ließ sich kein Unterschied in der Art der Präsentation demonstrieren (*Median der Mittelwerte: 192,800 versus 242,569 ($P=0,9056$)*).

5.3.1.4 Der Immunogenitätsvergleich von IgH und gesunden B-Zell-Sequenzen.....

Bei 16 der 39 Patienten dieser Arbeit lagen die Sequenzen kontaminierender, gesunder B-Zellen vor, deren Anzahl zwischen einer und sechs Sequenzen pro Patient variierte.

5.3.1.4.1 Vergleich der gesamten IgH mit ihren kontaminierenden B-Zell-Sequenzen.....

Analog zum Vergleich der IgH mit ihrer Keimbahnsequenz, wurden die Sequenzen dieser gesunden B-Zellen auf dem autologen HLA-Hintergrund mittels Summenscore untersucht. Aus den resultierenden einem bis fünf Werten wurde der Durchschnitt (*Mean*) gebildet und dem Wert des Ids gegenübergestellt. Anschließend erfolgte die Analyse der Einzelabschnitte und deren Aufsummierung:

Abbildung 41: Vergleich der IgH ($n = 16$ Patienten) mit dem durchschnittlichen Summenscore der IgHs gesunder B-Zellen auf dem autologen HLA-Hintergrund eines Patienten ($n=29$ kontaminierende Sequenzen). Graphische Darstellung des Medians. Statistische Analyse mittels Wilcoxon-Rangreihentest.

Dabei ergab sich weder bei der Berücksichtigung der Top 20-Peptide (Median der Mittelwerte: 203,744 versus 293,713) noch für die Summe aller ermittelbaren Peptide (Median der Mittelwerte: 208,849 versus 296,929) ein statistisch signifikanter Unterschied ($P=0,4229$) zwischen gesunden B-Zellen und den Lymphom-Idiotypen.

5.3.1.4.2 Separate Analyse der einzelnen Regionen innerhalb der IgH und der gesunden B-Zell-Sequenzen.....

Anschließend folgte der Vergleich der separaten Abschnitte der gesunden B-Zellsequenzen und der IgH des Ids:

Abbildung 42: Vergleich der einzelnen Framework Regionen der IgH des Idiotypen mit den korrespondierenden Abschnitten IgHs gesunder B-Zellen auf autologem HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests.

Dabei ergab sich kein Unterschied zwischen den FR-Abschnitten der IgHs follikulärer Lymphomzellen und derjenigen gesunder B-Zellen:

FR1: 31,557 versus 38,977 ($P=0,8971$); FR2: 6,264 versus 13,747 ($P=0,9780$); FR3: 69,900 versus 121,424 ($P=0,4851$); FR4: 1,886 versus 3,543 ($P=0,5614$)

Abbildung 43: Vergleich der einzelnen CDR-Regionen der IgH des Idiotypen mit den korrespondierenden Abschnitten IgHs gesunder B-Zellen auf autologem HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests.

Auch für die CDR-Regionen ließ sich kein Unterschied in der Präsentation von Lymphom- und Normalsequenzen ermitteln: CDR1: 15,215 versus 23,053 ($P=0,8160$); CDR2: 7,030 versus 6,723 ($P=0,9382$); CDR3: 10,224 versus 31,019 ($P=0,1873$).

5.3.1.4.3 Separater Vergleich des gesamten FR- und CDR-Bereiches für die IgH und die gesunden B-Zell-Sequenzen.....

Anschließend erfolgte die Analyse des gesamten FR- bzw. CDR-Bereiches der FL-IgHs und der IgHs gesunder B-Zellen mittels Aufsummierung der Scores für die einzelnen Abschnitte:

Abbildung 44: Vergleich der gesamten FR- und CDR-Regionen der IgH des Idiotypen mit den korrespondierenden Abschnitten IgHs gesunder B-Zellen auf autologem HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests.

Analog zur Betrachtung der gesamten IgH und ihrer einzelnen Abschnitte konnte weder für die gesamten FR- (*Median der Mittelwerte: 157,702 versus 194,830 ($P=0,5180$)*) noch für die gesamten CDR-Bereiche (*Median der Mittelwerte: 42,613 versus 71,832 ($P=0,6603$)*) ein Unterschied in der durchschnittlichen Scorehöhe ermittelt werden.

Zusammenfassend zeigte sich in keinem der Vergleiche zwischen der IgH des Ids und den IgHs gesunder B-Zellen ein Unterschied ihrer Immunogenitäten. Darüberhinaus ließ sich, wie bereits für den hypermutierten Id und seine unmutierte Keimbahnsequenz, auch für die gesunden B-Zellen eine höhere HLA-Bindung von Peptiden der FR1- und FR3-Regionen gegenüber den CDR-Bereichen demonstrieren.

Die IgH des Ids versus IgHs gesunder B-Zellen

Abbildung 45: Zusammentragung der statistischen Vergleiche zwischen IgH und kontaminierenden B-Zellsequenzen.

5.3.2 Die IgL.....

5.3.2.1 Der Immunogenitätsvergleich der IgL des Idiotypen mit den IgL-Idiotypen aller anderen Patienten.....

Analog zur IgH in Abschnitt 5.3.1 wurde anschließend die IgL analysiert.

5.3.2.1.1 Vergleich der gesamten IgL.....

Zunächst wurde die gesamte IgL analysiert. Anschließend folgte die Untersuchung der fremden IgLs vor seinem HLA-Hintergrund. Berücksichtigt wurden dabei jeweils die Top 20-Peptide, sowie die Summe aller ermittelbaren Peptide aus der Einzelabschnittsanalyse (FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4):

Abbildung 46: Darstellung des Summenscores der IgL auf autologem HLA-Hintergrund gegenüber dem durchschnittlichen Summenscore (Mean) der 38 fremden IgLs auf demselben HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Analyse mittels Wilcoxon-Rangreihentest.

Link: Vergleich der Top 20-Peptide.

Rechts: Vergleich aller ermittelbaren Peptide.

Hierbei war zwar ein leichter verminderter Summenscore_{gesamt} (Median der Mittelwerte: 212,736 versus 258,629 bzw. Median der Mittelwerte: 218,470 versus 269,893) der autologen Ids erkennbar, welcher aber statistische Signifikanz klar verfehlte ($P=0,4553$).

5.3.2.1.2 Separate Analyse der einzelnen FR- und CDR-Bereiche für die IgL.....

Anschließend erfolgte der Vergleich der einzelnen IgL-Regionen:

Abbildung 47: Vergleich der Präsentation von FR1, FR2, FR3 und FR4 mit dem Mittelwert der durchschnittlichen Summenscore (Mean) der entsprechenden FR-Regionen fremder IgLs. Graphische Darstellung des Medians. Statistischer Vergleich mittels Wilcoxon-Rangreihentest.

Abbildung 48: Vergleich der Präsentation von CDR1, CDR2 und CDR3 mit dem durchschnittlichen Summenscore (Mean) der entsprechenden CDR-Regionen fremder IgLs. Graphische Darstellung des Medians. Statistischer Vergleich mittels Wilcoxon-Rangreihentest.

Bei den Einzelanalysen der FR-Regionen zeigte sich, mit Ausnahme von FR2 (*Median: 13,550 versus 27,645; $P=0,029$*), kein signifikanter Unterschied zwischen dem Wert der Patienten-eigenen IgL und den IgL-Sequenzen HLA-nicht-identer Patienten:

FR1 (*Median der Mittelwerte: 23,441 versus 24,729 ($P=0,4553$)*), FR3 (*Median der Mittelwerte: 67,179 versus 77,899 ($P=0,9166$)*) und FR4 (*Median der Mittelwerte: 6,735 versus 6,609 ($P=0,1132$)*).

Für die individuelleren CDR-Bereiche ergab sich, analog zur IgH, jeweils ein deutlich niedrigerer Wert für die CDR-Bereiche der Patienten-eigenen IgL im Vergleich zu dem für die fremden CDR-Abschnitte ermittelten Wert. Im Falle von CDR1 und CDR3 erreichte dieser Unterschied statistische Signifikanz:

CDR1 (*Median der Mittelwerte: 7,775 versus 17,406 ($P=0,0004$)*), CDR2 (*Median der Mittelwerte: 9,495 versus 36,274 ($P=0,4553$)*) und CDR3 (*Median der Mittelwerte: 17,925 versus 52,141 ($P=0,0011$)*).

5.3.2.1.3 Separate Analyse der gesamten FR- und CDR-Bereiche für die IgL.....

Anschließend erfolgte die gesammelte Analyse des gesamten FR- bzw. CDR-Bereiches der IgL mittels Aufsummierung der Scores für die einzelnen Abschnitte:

Abbildung 49: Vergleich der autologen IgL mit dem durchschnittlichen Summenscores (Mean) fremder IgLs auf autologem HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests. **Links:** Vergleich des gesamten FR-Bereiches. **Rechts:** Vergleich des gesamten CDR-Bereiches.

Der Vergleich der FR-Bereiche verfehlte deutlich ($P=0,4064$), die der gesamten CDR-Region ($P=0,1070$) knapp statistische Signifikanz. Auch hier ließ sich ein weiteres Mal

demonstrieren, dass FR-Peptide in der Summe höhere Scores erzielen (*Median: 133,175 versus 145,485*), als Motive aus der CDR-Region (*Median: 54,550 versus 107,993*).

Zusammenfassend ließ sich beim Vergleich der für die gesamten IgL-Sequenzen ermittelten Summenscores kein Unterschied in der Präsentation zwischen Patienten-eigenen und fremden IgLs feststellen. Aus den Einzelanalysen war hingegen ersichtlich, dass besonders die individuellen CDR-Abschnitte fremder IgLs statistisch signifikant besser präsentiert wurden als Peptide autologer IgLs. Dieser Unterschied bestand trotz deren insgesamt niedrigeren Scores. Wie zuvor für die schwere Kette beschrieben, erzielten auch innerhalb der leichten Kette die FR1- und FR3-Region durchschnittlich die höchsten Scores:

Auto-Idiotyp versus Allo-Idiotypen für die IgL

Abbildung 50: Zusammentragung der statistischen Vergleiche zwischen Auto- und Allo-IgLs.

Bei Verwendung des Medians erreichte weder der Vergleich der gesamten IgL noch die Analyse der einzelnen oder gesamten FR- oder CDR-Bereiche einen statistisch signifikanten Unterschied. (Die Daten wurden im Anhang dargestellt.)

5.3.2.2 Der Immunogenitätsvergleich von IgL und Keimbahnsequenz.....

5.3.2.2.1 Vergleich der gesamten IgL und ihrer Keimbahnsequenz.....

Analog zu Abschnitt 5.3.1.2 wurde die Art der Präsentation der IgLs sowie ihre einzelnen Regionen mit der der korrespondierenden Keimbahnsequenz verglichen:

Abbildung 51: Statistischer Vergleich der IgL und ihrer korrespondierenden Keimbahnsequenz auf autologem HLA-Hintergrund mittels Summenscore. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests.

Dabei zeigte sich ein minimaler (Median der Mittelwerte: 181,884 versus 153,874 bzw. Median der Mittelwerte: 184,096 versus 156,198), aber bei der Betrachtung aller ermittelbaren Peptide statistisch signifikanter Unterschied zugunsten der mutierten Sequenz ($P=0,0594$ bzw. $P=0,0395$).

5.3.2.2.2 Separate Analyse der einzelnen Regionen innerhalb der IgL und ihrer Keimbahnsequenz.....

Anschließend erfolgte die Untersuchung auf Unterschiede in der Präsentation der einzelnen IgL- bzw. Keimbahnsequenz-Abschnitte:

Abbildung 52: Statistischer Vergleich der einzelnen IgL-Regionen mit den korrespondierenden Keimbahnsequenzen auf autologem HLA-Hintergrund mittels Summenscore. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests.

Dabei ergab sich für keine der FR-Regionen ein statistisch signifikanter Unterschied: FR1 (*Median der Mittelwerte: 23,441 versus 19,887 ($P=0,2020$)*), FR2 (*Median der Mittelwerte: 13,550 versus 17,658 ($P=0,5283$)*) und FR3 (*Median der Mittelwerte: 67,179 versus 60,687 ($P=0,1118$)*).

Auch für die CDR-Bereiche zeigte sich keine signifikante Differenz zur Keimbahnsequenz: CDR1 (*Median der Mittelwerte: 7,775 versus 10,071 ($P=0,1207$)*) und CDR2 (*Median der Mittelwerte: 9,495 versus 8,245 ($P=0,2425$)*).

5.3.2.2.3 *Separate Analyse des gesamten FR- bzw. CDR-Bereiches der IgL und ihrer Keimbahnsequenz.....*

Anschließend erfolgte die gesammelte Analyse des gesamten FR- bzw. CDR-Bereiches der IgL mittels Aufsummierung der Scores für die einzelnen Abschnitte:

Abbildung 53: Vergleich des gesamten FR-Bereiches bzw. CDR-Bereiches der IgL mit dem Summenscore (Mean) der zugehörigen Keimbahnsequenz auf dem autologem HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests. **Links:** Vergleich des gesamten FR-Bereiches. **Rechts:** Vergleich des gesamten CDR-Bereiches.

Bei der Zusammentragung ergibt sich für den gesamten FR-Bereich ein geringer, aber statistisch signifikanter Unterschied zwischen der IgL und zugehöriger Keimbahnsequenz (*Median der Mittelwerte: 91,994 versus 114,302 ($P=0,0118$)*). Die CDR-Region verpasst das Signifikanzniveau (*Median der Mittelwerte: 33,437 versus 27,303 ($P=0,0677$)*).

Zusammenfassend ergab sich im Vergleich der gesamten IgL-Sequenz mit der zugehörigen Keimbahnsequenz ein geringer Unterschied zugunsten der mutierten IgLs. Bei Berücksichtigung aller ermittelbaren Peptide erreicht dieser statistische Signifikanz

($P=0,0594$ bzw. $P=0,0395$). In der Analyse der einzelnen Abschnitte wies hingegen keine der untersuchten Regionen einen Unterschied in der Art der Präsentation der IgL und ihrer Keimbahnsequenz auf. Erneut ließen sich die höchsten Scores für die Abschnitte FR1 und FR3 in der unmutierten IgL demonstrieren.

Abbildung 54: Zusammentragung der statistischen Vergleiche zwischen IgH und korrespondierender Keimbahnsequenz.

Lediglich bei der Betrachtung der gesamten FR- bzw. CDR-Regionen ergab sich für erstere ein niedrigerer Score für die mutierte IgL als für die zugehörige Keimbahnsequenz: FR_{gesamt} ($P=0,0118$) und CDR_{gesamt} ($P=0,0677$).

Bei Verwendung des Medians erreichte weder der Vergleich der gesamten IgL noch die Analyse der einzelnen oder gesamten FR- oder CDR-Bereiche einen statistisch signifikanten Unterschied. (Daten im Anhang dargestellt)

5.3.2.3 Der Immunogenitätsvergleich der IgL-Keimbahnsequenzen.....

Zur Ermittlung der Rolle der Mutationen innerhalb der IgL wurde die autologe IgL-Keimbahnsequenz mit dem durchschnittlichen Summenscore (*Mean*) der fremden GLs verglichen:

Abbildung 55: Darstellung des durchschnittlichen Summenscores der IgL-Keimbahnsequenz auf autologem HLA-Hintergrund gegenüber dem durchschnittlichen Summenscore (Mean) der 38 fremden Keimbahnsequenzen auf demselben HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Analyse mittels Wilcoxon-Rangreihentest. [GL: Germline/Keimbahnsequenz]

Bei diesem Vergleich zeigte sich kein Unterschied in der HLA-Bindungskapazität (*Median der Mittelwerte: 153,874 versus 214,091 ($P=0,3050$)*).

5.3.2.4 Der Immunogenitätsvergleich von IgL und gesunden B-Zell-Sequenzen.....

Bei 14 der 39 Patienten dieser Arbeit lagen die IgL-Sequenzen kontaminierender B-Zellen ($n = 30$) vor, deren Anzahl zwischen einer und sechs pro Patient variierte. Nach dem Vorbild des Vergleichs zwischen den schweren Ketten von FL-Zellen und gesunden B-Zellen, wurden die IgL-Sequenzen gesunder B-Zellen mit dem Summenscore der zugehörigen Id-IgL verglichen:

5.3.2.4.1 Vergleich der gesamten IgL mit gesunden B-Zell-Sequenzen.....

Zunächst wurde die ganze IgL-Sequenz berücksichtigt:

Abbildung 56: Vergleich der IgL ($n = 14$ Patienten) mit dem durchschnittlichen Summenscore der IgLs gesunder B-Zellen auf dem autologen HLA-Hintergrund eines Patienten ($n=30$ kontaminierende Sequenzen). Graphische Darstellung des Medians. Statistische Analyse mittels Wilcoxon-Rangreihentest.

Hierbei zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($P=0,0676$). Allerdings ließ sich aufgrund der sehr begrenzten Anzahl zur Verfügung stehender Sequenzen hierbei keine abschließende Aussage machen.

5.3.2.4.2 Separate Analyse der einzelnen Regionen innerhalb der IgL und der gesunden B-Zell-Sequenzen.....

Es folgte der Vergleich der einzelnen Regionen der leichten Ketten:

Abbildung 57: Vergleich der einzelnen Regionen der IgL des Idiotypen mit den korrespondierenden IgL-Abschnitten gesunder B-Zellen auf autologem HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests.

Dabei zeigte sich ein annähernd ausgeglichenes Verhältnis zwischen den Abschnitten des Lymphom-Oberflächenrezeptors und den Normalsequenzen:

FR1: 27,723 versus 25,838 ($P=0,2958$); FR2: 18,339 versus 32,426 ($P=0,5830$); FR3: 63,430 versus 52,889 ($P=0,5416$); FR4: 10,448 versus 6,916 ($P=1,000$); CDR1: 9,970 versus 14,104 ($P=0,4631$); CDR2: 12,212 versus 15,459 ($P=0,8077$); CDR3: 19,093 versus 25,203 ($P=0,3575$)

Für keinen der untersuchten Abschnitte ergab sich dabei statistische Signifikanz.

5.3.2.4.3 Separater Vergleich des gesamten FR- und CDR-Bereiches für die IgL und die gesunden B-Zell-Sequenzen.....

Abschließend erfolgte die Untersuchung der gesamten FR- und CDR-Bereiche der IgLs normaler B-Zellen:

Abbildung 58: Vergleich der gesamten FR- und CDR-Regionen der IgL des Idiotypen mit den entsprechenden Abschnitten der IgLs gesunder B-Zellen auf autologem HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests.

Auch dieser Vergleich verfehlte klar statistische Signifikanz ($Median_{FR}$ der Mittelwerte: 125.624 versus 199,992 ($P=0,5016$) und $Median_{CDR}$ der Mittelwerte: 65.500 versus 110.599).

Zusammengefasst ergaben sich sowohl im Vergleich der gesamten leichten Ketten als auch in der Gegenüberstellung der einzelnen Regionen keine Unterschiede zwischen Idiotyp und gesunden B-Zell-Sequenzen:

Die IgL des Ids versus IgLs gesunder B-Zellen

Abbildung 59: Vergleich der gesamten FR- und CDR-Regionen der IgL des Idiotypen mit den korrespondierenden Abschnitten IgLs gesunder B-Zellen auf autologem HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests.

6. Diskussion.....

6.1 Die Idiotyp-Vakzinierung.....

In den letzten Jahrzehnten haben verschiedene Studien Hinweise auf einen möglichen Nutzen einer aktiven, gegen das Oberflächenimmunglobulin (sIg) von Lymphomzellen gerichteten Immuntherapie ergeben. In den bisher veröffentlichten Arbeiten lagen bezüglich der Wichtigkeit einer zellulären gegenüber einer humoralen Immunantwort widersprüchliche Erkenntnisse vor. Bei passiver Immuntherapie durch Infusion von ex vivo-hergestellten individuellen anti-Idiotyp-Antikörpern konnten komplette klinische Remissionen erzielt werden. In Einzelfällen kam es allerdings zu einem Relaps durch einen CDR-Sequenz-alterierten Subklon.³⁰ Bei aktiver Immuntherapie durch Idiotypvakzinierung konnte die Levy-Gruppe durch erfolgreiche Induktion einer vorrangig humoralen Immunantwort eine Verlängerung im PFS beobachten.^{19,54} Demgegenüber sprachen andere Studienergebnisse vor allem für einen CD8⁺-vermittelten Antitumoreffekt.^{2,3,38,52} Auch über die genauen Zielstrukturen einer Immunantwort herrschte bisher Uneinigkeit: Einige Arbeitsgruppen fanden in in vitro-Untersuchungen einen vorrangig gegen die FR-Bereiche gerichtete Immunantwort.⁴⁹ Andere sowie unsere eigenen in-vitro Testungen hingegen wiesen auf einem vornehmlich gegen die individuellen bzw. CDR-Regionen gerichteten Effekt hin.^{3,15,38} Zusammenfassend gibt es also sowohl in-vitro als auch in-vivo starke Hinweise auf eine Vakzinierungs-induzierte T-Zell-Aktivität gegen den Id beim Follikulären Lymphom. Unsere Arbeitsgruppe konnte zudem zeigen, dass in unimmunisierten Patienten mit follikulären Lymphomen Id-spezifische CD8⁺ T-Zellen zirkulieren.³⁹ Es ist jedoch nicht bekannt, ob solche T-Zellen auch spontan in vivo spezifische Aktivität ausüben.

Ziel dieser Arbeit war es daher, durch reverse Immunogenitätsanalysen Hinweise dafür zu finden, dass es durch eine gezielte CD8-vermittelten Selektion eines hypermutierten Ids lediglich bei niedriger Immunogenität vor dem eigenen HLA-Klasse I-Hintergrund zum Lymphomwachstum kommen kann. Darüberhinaus sollte untersucht werden, welche Rolle dabei die individuellen CDR- gegenüber den konservierten FR-Bereichen spielen. Zum Schluss sollte noch ein Immunogenitätsvergleich zwischen den hypermutierten Ids, den unmutierten Keimbahnsequenzen und den schwach mutierten B-Zell-Rezeptoren gesunder Zellen angestellt werden, um einen möglichen globalen Einfluss zu ermitteln.

6.2 Die Immunogenitätsanalyse.....

Bisherige Versuche einen immunogenen Selektionsdruck durch CD8⁺-Zellen zu demonstrieren, berücksichtigten meist nur einen einzelnen oder einige wenige HLA-A-Typen.^{15,31,49} Dabei berücksichtigt nach unserem Wissen keine der bisher veröffentlichten Arbeiten ein mögliches Zusammenspiel von verschiedenen HLA-Merkmalen, insbesondere keinen gemeinsam ausgeübten Einfluss von HLA-A und HLA-B. In dem hier angewandten Ansatz wurden sämtliche derzeit mögliche, d. h. zur Analyse angebotenen HLA-A und -B-Typen verwendet. Auf diese Art konnten 108 der 156 HLA-A- und HLA-B-Allele berechnet werden (*Median: 3 von 4 Allelen pro Patient*). Dies erlaubt eine weitreichendere Aussage über das komplexe Zusammenspiel verschiedener HLA-Merkmale in Bezug auf die Immunogenitätsentwicklung des Ids. HLA-C-Allele sowie HLA-Klasse II wurden aufgrund der derzeit noch stark limitierten Anzahl zur Analyse angebotener HLA-Merkmale und dem damit verbundenen Aufwand nicht berücksichtigt.

6.2.1 Die reverse Immunogenitätsanalyse und Verwendung der Summe als Maß für die Immunogenität eines Ids.....

Grundsätzlich sah der hier verwendete Ansatz vor, fremde Ids auf dem HLA-Hintergrund eines einzelnen realen Patienten zu untersuchen und deren durchschnittliche Immunogenität der des autologen Ids gegenüber zu stellen. Auf diese Art sollte ermittelt werden, ob ein Lymphom vor einem fremden HLA-Hintergrund bestehen könnte oder aber als fremd erkannt und folglich immunologisch supprimiert werden würde. Da hierbei immer gleichlange Sequenzen auf den gleichen HLA-Merkmalen untersucht wurden, konnten die resultierenden Werte statistisch miteinander verglichen werden.

Im Versuch einen Einzelwert für die Immunogenität eines Abschnittes zu kreieren, wurden die von einem Bioinformatiksystem als potentiell immunogen gerankten Peptidmotive aufsummiert. Die Verwendung der Summe bot den Vorteil, dass sie pro HLA-Allel und analysiertem Abschnitt eine immer gleiche Anzahl an Peptiden berücksichtigt und diese rein nach der Höhe ihrer Bindungsstärke wertet. Die nochmalige Addierung der resultierenden bis zu vier Summen ergab somit einen einzelnen Wert für die globale Immunogenität des untersuchten Id-Abschnittes vor einem gesamten HLA-Hintergrund eines realen Patienten.

Dabei wurden nicht nur 20 Epitope, sondern bis zu circa 120 Peptide pro HLA-Merkmal (*sieben Abschnitte innerhalb des Ids mit einer Gesamtlänge von circa 130 AA*) und bis zu 480 Peptide pro Patient (*alle vier Allele analysierbar*) berücksichtigt. Allerdings zeigte sich in

allen durchgeführten Analysen, dass im Vergleich zur Beschränkung auf die Top 20-Motive, durch die Berücksichtigung aller ermittelbaren Peptide kein wesentlicher zusätzlicher Score-Anstieg zu verzeichnen war.

6.2.2 Die Wahl des Cut-offs.....

Die Beobachtung der niedrigeren Scores der CDR-Peptide warf die Frage auf, inwiefern dies an deren geringeren Anteil am gesamten Id liegen könnte (28% vs. 72% innerhalb der IgH bzw. 24% vs. 76% in der IgL). Allerdings führte die hier angewandte Betrachtungsweise, dass Peptide mit zwei oder mehr AA zum CDR-Bereich zählen, zu einem beinahe ausgeglichenen Längenverhältnis zwischen FR und CDR (54% vs. 46% für die IgH bzw. 58% versus 42% für die IgL). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Längendifferenz nicht die alleinige Ursache für deren niedrigere Scores sein kann. Hinzukommt, dass die Höhe des Summenscores meist nur durch die ersten drei Peptide bestimmt wird und durch die weiteren 17 Peptide kaum mehr ansteigt (siehe Abbildung 12 & 13).

6.3 Das Freiburger Kollektiv.....

Bei der Analyse des Freiburger Kollektivs zeigten sich keinerlei Auffälligkeiten, welche zu einer möglichen Verzerrung in den durchgeführten Analysen geführt haben könnten: So entsprachen die Patientencharakteristika bezüglich Alter und Geschlecht ungefähr den in früheren Arbeiten beschriebenen Normen.³² Grundsätzlich wurden alle Patienten berücksichtigt, die in der Idiovax-Studie biopsiert worden waren. Vier Patienten mussten aufgrund einer nicht eindeutigen Bestimmbarkeit ihrer HLA-Merkmale mittels PCR-basierender Verfahren ausgeschlossen werden. Die verbliebenen 39 Patienten entsprachen bezüglich ihres HLA-Repertoires den für die Normalbevölkerung Mitteleuropas ermittelten Normwerten.³³

Sowohl bei der Betrachtung der V_H- als auch der V_L-Genfamilien zeigte sich ein Verteilungsmuster, wie es zuvor für gesunde B-Zellen und Follikuläre Lymphomzellen beschrieben wurde.^{1,58} Es ließ sich somit keine davon abweichende Präferenz einer bestimmten Genfamilie für das FL entdecken.

Analog zu den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen ergab sich bei der Bestimmung des Mutationsgrades des Ids eine mediane Homologie zur jeweiligen GL von 89% für die IgH bzw. 94% für die IgL.^{21,24,58} Der Mutationsgrad der IgLs entsprach somit in etwa dem für gesunde B-Gedächtniszellen (~4-5%) ermittelten Wert, bzw. überragte ihn nur leicht.

Demgegenüber wiesen die V_{HS} ein deutlich über das für normale periphere Gedächtniszellen ermittelte Maß (~5%) an Mutationen auf.^{5,23,24} Der Homologiegrad der zusätzlich untersuchten vermeintlich gesunden B-Zellsequenzen betrug durchschnittlich sowohl für die leichte als auch die schwere Kette in etwa 96%.

Neben der Divergenz in der Gesamtheit der Mutationen unterscheiden sich die IgH und IgL des FL-Idiotyps auch bezüglich der Distribution der R- und S-Mutationen. Die R-Mutationen konzentrierten sich innerhalb der V_L stärker auf die CDR-Bereiche und FR2. Da die CDR2-Region der IgL in 37 der 39 Ids nur aus drei AA besteht, kam fast jede CDR2-Sequenz trotz stattgehabter somatischer Hypermutation mehrfach innerhalb dieses Kollektivs vor. So enthielt bei 18 Patienten die CDR2-Region die Endung –AS auf. Folglich ist CDR2_{IgL} im Vergleich mit den übrigen CDR-Regionen als weniger individuell zu betrachten. Demgegenüber wies die V_H eine ungleichmäßige Distribution von R- und S-Mutationen über den gesamten Id mit deutlicher Präferenz der CDR-Bereiche auf.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die IgH aufgrund ihres höheren Mutationsgrads als individueller als die IgL zu betrachten ist. Die IgL entspricht in ihrem Mutationsgrad und -muster in etwa demjenigen gesunder leichter Ketten nach stattgefundenem Antigenkontakt. Als individuelle Abschnitte innerhalb der leichten Kette sind insbesondere CDR1, CDR3 und FR2 zu betrachten, während die FR-Bereiche eher konserviert erscheinen.

6.4 Die Ergebnisse des bioinformatischen Auswertungsverfahrens.....

6.4.1 Der Summenscore.....

Bei der Untersuchung der IgH und IgL mittels Summenscore fiel auf, dass beide Ketten trotz unterschiedlicher Sequenzen und bestehender Unterschiede im Mutationsgrad und -muster fast identische Summenscores vor auto- und heterologen HLA-Hintergründen erzielten. So stimmten sowohl in der Untersuchung des Bindungsverhaltens einzelner HLA-Typen als auch bei der Betrachtung des Summenscores vor dem gesamten eigenen HLA-Hintergrund die Resultate für IgH und IgL annähernd überein.

Nur im Falle von *HLA-A6801* ergab sich eine etwas bessere Präsentation der IgH. Diese Ähnlichkeiten in der Art der Präsentation könnten an eventuellen Sequenzhomologien im FR-Bereich liegen. Da die CDR-Regionen der beiden Ketten keinerlei Übereinstimmung aufweisen, unterstreicht dies nochmals ihre eher untergeordnete Rolle für die Höhe des Gesamtscores.

Interessanterweise lieferten darüberhinaus *HLA-B2705* und *HLA-B5101*, zwei häufig mit Autoimmunkrankheiten assoziierte, aber auch mit besseren Prognosen bei viralen Erkrankungen einhergehende HLA-Typen, durchschnittlich bis zu 1.000fach höhere Scores als andere HLA-Allele.

6.4.2 Das Epitopverteilungsmuster innerhalb der FR- und CDR-Bereiche.....

Wie bereits mehrfach in dieser Arbeit demonstriert, erzielen FR-Motive durchschnittlich höhere Scores als CDR-Epitope. Dies konnte durch das Ranking der Top 20-Peptide für den gesamten CDR- bzw. FR-Bereich (*siehe Abbildung 13*) sowohl für die schwere wie auch erstmals für die leichte Kette gezeigt werden.

Neben der Betrachtung der Top 20-Epitope für den gesamten FR- bzw. CDR-Bereich ergab auch die Analyse aller in einem isolierten Id-Abschnitt enthaltenen Peptide mittels Summenscore innerhalb beider Ketten jeweils die höchsten Werte für FR1 und FR3 (*siehe Abbildung 19 und 21*). Dies konnte neben den beiden Lymphom-Id-Ketten auch für gesunde B-Zellen (*siehe Abbildung 23*) und unmutierte Keimbahnsequenzen (*siehe Abbildung 39 und 54*) demonstriert werden.

Zusätzlich bewies die Betrachtung einzelner Epitope ab einem bestimmten Bindungsscore ($\text{BIMAS} \geq 50$ bzw. 10) auch deren zahlenmäßige Überlegenheit von über 75 bzw. 65% (IgH) und 63 bzw. 60% (IgL).

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass FR-Epitope anteilig überrepräsentiert sind und dabei gleichzeitig durchschnittlich höhere Scores erzielen als CDR-Peptide. Dies konnte sowohl für stark mutierte Lymphom-Idiotypen, schwach mutierte Normalsequenzen und unmutierte Keimbahnsequenzen gezeigt werden. Dabei lässt sich der beschriebene Unterschied nicht allein durch das Überwiegen der Längen der FR-Abschnitte erklären (54% vs. 46% bzw. 58% vs. 42%). Darüberhinaus wurde in den hier durchgeführten Untersuchungen jeweils der gesamte HLA-Hintergrund eines Patienten berücksichtigt und nicht einzelnen HLA-Merkmale isoliert betrachtet. Somit ergibt sich, dass diese unterschiedliche Präsentation der einzelnen Abschnitte des Ids nicht auf bestimmte HLA-Merkmale begrenzt ist, sondern ein durchgängig für alle HLA-Merkmale gültiges Phänomen ist.

Trotz dieser Überlegenheit der Score lassen sich gegen FR-Peptide häufig keine spezifischen CTLs nachweisen. Bereits Trojan et al. wiesen darauf hin, dass das tatsächliche Bindungsverhalten der getesteten CDR-Motive besser mit den in-vitro gemachten

Beobachtungen korrelierte als das der FR-Epitope.⁴⁹ Darüberhinaus zeigte die Arbeit von Warncke et al., dass regulatorische T-Zellen eine mögliche Immunantwort gegen diese ubiquitär vorkommenden Sequenzen in vivo verhindern.⁵³ Dies würde deren herabgesetzte Immunogenität trotz bioinformatisch vorhergesagter starker HLA-Bindung und Immunogenität erklären.

6.4.3 Hinweise für eine T-Zell vermittelte aktive Immunsurveillance

Wir haben in dieser Arbeit starke statistische Hinweise dafür finden können, dass die Patienten-eigene IgH vor ihrem autologen HLA-Hintergrund signifikant schlechter präsentiert wird als fremde IgHs HLA-nicht-identer Patienten. Die Tatsache, dass der eigene Id weniger immunogen zu sein scheint als fremde Ids, lässt einen T-Zell-vermittelten formenden Einfluss auf das Lymphomwachstum vermuten. Dabei würden im Zuge der somatischen Hypermutation nur solche Tumorvarianten bestehen bleiben, deren Antigenität vor dem eigenen HLA-Hintergrund eher gering ist, während sie vor einem fremden HLA-Hintergrund vermutlich nicht existieren könnten.

Für die Korrektheit dieser These spricht, dass dieser immunogene Selektionsdruck direkt mit dem jeweiligen Mutationsgrad bzw. mit dem Grad an Individualität des entsprechenden Abschnitts zu korrelieren scheint: So wurden alle drei autologen CDR-Regionen der IgH, insbesondere CDR3 als individuellster Abschnitt, statistisch signifikant schlechter präsentiert. Demgegenüber wiesen die etwas schwächer mutierten FR-Bereiche, trotz ihrer insgesamt höheren Scores, einen geringeren Unterschied zwischen den Präsentationsniveaus auf.

Ein weiteres Argument für diese These liefert die bei der Analyse der leichten Ketten: Der Mutationsgrad der IgLs entspricht in etwa dem gesunder peripherer B-Zellen mit stattgehabtem Antigenkontakt. Dabei konzentrierten sich die R-Mutationen vor allem auf die CDR-Bereiche, während die FR-Bereiche weit weniger davon aufwiesen. Während sich beim Vergleich der gesamten IgLs kein Unterschied darstellen ließ, zeigte sich bei der Analyse von CDR1 und CDR3 analog zur IgH eine signifikant bessere Präsentation der fremden Sequenzen. Der fehlende Unterschied in der Betrachtung der IgL als ganzes liegt somit vermutlich am überlagernden Effekt der FR-Peptide und wäre somit methodisch begründet (*siehe Abschnitt 6.5*). Passend dazu zeigte die Einzelanalyse für FR1 und FR3, den am schwächsten mutierten Bereichen der IgL mit den gleichzeitig höchsten Scores, keinen Unterschied in der Präsentation von autolog und heterolog. Die Tatsache, dass CDR2_{IgL} ebenfalls statistische Signifikanz verfehlte, mag, wie bereits zuvor beschrieben, an deren

kurzer Länge und der daraus trotz Mutationen resultierenden geringer Variabilität gelegen haben. Demgegenüber wies die Patienten-eigene FR2-Region ebenfalls eine, bezogen auf die Länge, hohe Anzahl an Mutationen ohne solche Sequenzhomologien auf. Konsequenterweise wurde auch hier die Patienten-eigene Sequenz statistisch signifikant schlechter präsentiert. All dies spricht für das Vorhandensein einer vornehmlich gegen die individuellen Bereiche und weniger gegen die ubiquitär vorkommenden FR-Bereiche gerichteten aktiven Immunsurveillance innerhalb beider Ketten.

6.4.4 Die Rolle der somatischen Hypermutation für die Immunogenitätsentwicklung.....

Um die Rolle der Mutationen weiter zu untersuchen, wurde die Antigenität der beiden Ketten mit der der zugehörigen Keimbahnlinien verglichen, wobei für die schwere Kette kein Unterschied ermittelt werden konnte. Diese gleichbleibende Antigenität spricht für eine T-Zell-vermittelten Selektion von IgHs, die trotz hohem Mutationsgrad auf dem Antigenitätsniveau von Keimbahnsequenzen verblieben sind. Auch bei der Gegenüberstellung aller IgH-Einzelabschnitte und ihrer jeweils zugehörigen GL ergab sich kein signifikanter Unterschied zum durchschnittlichen Summenscore.

Bei der Betrachtung der Top 20-Peptide der IgL und ihrer GL konnte kein Unterschied dargestellt werden ($Median_{Top20}$: 181,884 vs. 153,874 - $P_{Top20}=0,0594$). Die Gegenüberstellung aller ermittelbaren Peptide zeigte einen minimalen, aber signifikanten Unterschied zugunsten der mutierten Sequenz auf ($Median$: 184,096 vs. 156,198 - $P=0,0395$). Allerdings erzielte in der folgenden Einzelabschnittanalyse keiner der Vergleiche auch nur annähernd statistische Signifikanz. Aufgrund des geringen Unterschieds im gesamten Präsentationsniveau, dem fehlenden Nachweise der Präferenz einer bestimmten IgL-Region und der nur in der Betrachtung aller ermittelbaren Peptide entstehenden Signifikanz stellt sich die Frage, inwiefern dies wirklich zu einer verbesserten Präsentation in-vivo führen würde. Auffällig ist darüberhinaus, dass die stärker mutierten und somit als potentiell immunogener geltenden IgHs diesen Unterschied nicht (mehr) aufweisen.

Die im Anschluss erfolgte Gegenüberstellung von autologer und heterologer Keimbahnsequenzen zeigte weder für die IgH noch für die IgL einen Unterschied in der Stärke der Präsentation. Dies korreliert sehr gut mit der Beobachtung, dass bei keiner der beiden Ketten eine von gesunden B-Zellen abweichende Präferenz oder Unterrepräsentation

einer bestimmten Genfamilie zu entdecken ist. Darüberhinaus muss somit der Unterschied in der Präsentation von autologen und fremden Ids in den Mutationen begründet sein.

Um zu ermitteln, inwiefern es sich bei diesen Beobachtungen um ein globales, sich auch auf gesunde B-Zellen erstreckendes Phänomen ist, wurden die B-Zell-Rezeptoren von kontaminierenden B-Zellen untersucht. Dabei zeigte sich weder in der Betrachtung der gesamten Kette bzw. ihrer einzelnen Abschnitte noch in der Analyse der Peptide mit den höchsten Scores ($\text{BIMAS} \geq 50$ bzw. 10) ein abweichendes Muster. Dies spricht am ehesten für das Vorhandensein einer globalen Überwachung der hypermutierten Abschnitte von Antikörpern durch CD8^+ -T-Zellen. Allerdings ist aufgrund der sehr begrenzten Anzahl an Sequenzen (16 bzw. 14) derzeit keine abschließende Aussage möglich. Einen weiteren Hinweis in diese Richtung liefert in jedem Fall die Analyse der leichten Kette, die dem Mutationsmuster und dem Mutationsgrad gesunder BZRen entsprechen und deren individuelle Bereiche ebenfalls einem immunogenen Selektionsdruck zu unterliegen scheinen.

6.5 Die Mean-Median-Diskussion.....

Bei den durchgeführten Analysen wurde grundsätzlich das *arithmetische Mittel (Mean)* verwendet, während sich bei Verwendung des *Medians* kein signifikanter Unterschied in der Art der Präsentation darstellen ließ. Dies war bei dem beobachteten zum Teil hohen Signifikanzniveau des *Means* verwunderlich, lässt sich aber anhand der hier angewandten Methodik möglicherweise erklären.

6.5.1 Das HLA-Repertoire.....

BIMAS bietet ein begrenztes Repertoire (*siehe Abschnitt 3.1.1, Tabelle 3 und 4*) der am häufigsten vorkommenden HLA-Typen zur Analyse an. Im Median konnten so drei von vier HLA-Allelen pro Patient analysiert werden. Neben dieser limitierten Anzahl an verfügbaren HLAs zeigte sich insbesondere im HLA-A-Bereich innerhalb dieses Kollektivs eine deutliche Dominanz einzelner Allele: So wiesen insgesamt 36 (92,3%) der 39 hier untersuchten Patienten *HLA-A01*, *HLA-A0201*, *HLA-A03* oder *HLA-24* auf, 15 (38,5%) sogar zwei dieser Allele. Im HLA-B-Bereich war die Variabilität zwar etwas größer, dennoch besaßen 14 Patienten (36%) das Gewebemerkmale *HLA-B44*, 10 Patienten (26%) *HLA-B35*. Eine weitere Einschränkung dieser ohnehin schon geringen Variabilität kommt durch das *linkage disequilibrium*, die oftmalig gemeinsame Vererbung bestimmter HLA-Merkmale, zustande: So kam der häufigste HLA-Haplotyp *HLA-A01 – HLA-B08* allein siebenfach, die

Kombination *HLA-A02 - B44* fünffach in diesem Kollektiv vor. Zwei Patienten stimmten sogar in allen vier HLA-A und –B-Allelen überein.

Neben der geringen Variabilität an vorkommenden und analysierbaren HLA-Merkmalen, spielt für die Erklärung des *Median*-Phänomens mit Sicherheit das Erkennen der gleichen Motive durch unterschiedliche HLA-Typen eine Rolle:

So gehören beispielsweise *HLA-B0702*, *HLA-B3501*, *HLA-B5301* und *HLA-B5101* alle der *HLA-B07*-Superfamilie an. Dabei ist bekannt, dass die verschiedenen Mitglieder derselben HLA-Superfamilie häufig identische Epitope präsentieren.¹² Dieses als *degenerate Immunogenität* bezeichnete Verhalten ist dabei nicht auf Mitglieder des gleichen HLA-Locus begrenzt, sondern kommt auch HLA-Loci-übergreifend vor (*HLA-A02* und *HLA-B07*). Es wird vermutet, dass dieses Phänomen die Chance auf eine effektive Immunantwort erhöhen soll.⁴⁷

6.5.2 *Der Idiotyp*.....

Neben der beschriebenen Präsentation identischer Motive durch differente HLA-Typen, enthalten auch differente Ids identische Motive:

So weist auch das zu untersuchende Substrat, der Id, nur eine geringe Variabilität auf: Das hier vorkommende V_H-Spektrum umfasst lediglich 22 individuelle Keimbahnsequenzen. Elf der 39 untersuchten Idiotypen gehören der V_H3-23- und sieben der V_H4-34-Familie an; neun Ids (23%) weisen sogar eine identischen Keimbahnsequenz (V_H3-23-01) auf. Diese geringe Anzahl an zugrundeliegenden Sequenzen bei einem beschriebenen durchschnittlichen Homologiegrad zur GL von 89% führt somit zu einer insgesamt geringen Variabilität an schweren Ketten. Einen weiteren Hinweis auf die Korrektheit dieser Theorie liefert die Betrachtung der IgL, wo neben der noch geringeren Anzahl an unterschiedlichen V_L-Genfamilien (*insgesamt 18 differente Sequenzen*), mit 94%-GL-Homologie ein noch geringerer Mutationsgrad vorliegt. Konsekutiv ist neben einem fehlenden signifikanten Unterschied in der Betrachtung des *Medians* auch beim *Mean* keine Differenz mehr zu erkennen.

Durch die Arbeit von Trojan und Molinier et al. ist darüberhinaus bekannt, dass die IgHs *HLA-A0201*⁺ wie auch *HLA-A0201*⁻-Patienten dieselben Motive mit hohen Scores im FR1 und FR3-Bereich bei der Analyse auf *HLA-A0201* aufweisen.^{31,49} Diese Ergebnisse implizieren, analog zu unseren Ergebnissen, dass diese FR-Peptide trotz ihrer hohen Scores

keinem immunogenen Selektionsdruck durch *HLA-A0201* zu unterliegen scheinen. In dem hier untersuchten Kollektiv wiesen 46,1% Patienten (18/39) dieses Gewebemerkmale auf. Dadurch, dass die hier angewandte Methodik vorsieht, fremde Ids auf den realen HLA-Hintergründen dieser 39 Patienten zu untersuchen, entstammen knapp die Hälfte der gegenübergestellten Werte den Analysen auf *HLA-A0201*. Dabei würden die beschriebenen ubiquitär vorkommenden FR-Epitope mit ihren hohen Scores Unterschiede in der Präsentation von CDR-Peptiden mit niedrigeren Scores überlagern. Dadurch kann jedoch nicht die Tatsache erklärt werden, dass auch bei der isolierten Analyse der CDR-Regionen kein statistisch signifikanter Unterschied bei Verwendung des Medians zu beobachten ist. Allerdings fiel bei der Analyse der Peptide mit einem Score ≥ 10 analog zu den von Molinier für die FR-Regionen gemachten Beobachtungen auf, dass sich auch innerhalb der CDR-Bereiche bestimmte Peptide mehrfach wiederholten: So wiesen beispielsweise fast alle Idiotypen, unabhängig vom HLA-Befund und der zugrunde liegenden V_H -Familie, ein *HLA-A0201*-restringiertes Epitop mit überdurchschnittlich hohem Score in Position 34 im CDR1-Bereich auf. Bei 21 der 39 Patienten erreichte es bei der Analyse auf *HLA-A0201* einen Score ≥ 10 , 11mal den identischen Score von 26,419. Somit scheint es auch in den CDR-Regionen Peptide zu geben, die als "weniger individuell" zu betrachten sind als andere. Durch die hohe Anzahl an *HLA-A0201*⁺-Patienten in diesem Kollektiv und die folglich häufige Analyse der CDR1-Sequenzen auf diesem HLA-Typ, würden dessen hohe Scores mögliche Effekte wirklich individueller Peptide überlagern. Dies könnte, zusammen mit der bereits mehrfach erwähnten geringen Varianz an vorkommenden und analysierbaren HLA-Typen, eine Erklärung dafür sein, warum auch bei der isolierten Analyse des CDR-Bereiche mittels *Median* keine statistische Signifikanz erreicht wird.

Zusammengefasst liegt also sowohl bei der angewandten Analysemethode als auch bei dem zu untersuchenden Substrat eine insgesamt relativ geringe Variabilität vor: Eine limitierte Anzahl an sowohl vorkommenden als auch analysierbaren HLA-Typen mit bekanntermaßen ähnlichem Bindungsverhalten wird verwendet, um die Immunogenität von Sequenzen mit relativ hohem Homologiegrad zu untersuchen. Sollte also die hier zugrunde liegende Theorie eines HLA-Klasse I vermittelten formenden Einflusses richtig sein, müssten die Ids auf sich überschneidenden HLA-Hintergründen folglich auch ähnlich präsentiert werden. Demnach würde man bei Betrachtung des *Medians* keinen Unterschied erwarten dürfen. Der beim *Mean* beobachtete Unterschied käme durch dessen stärkere Betonung von wirklich

individuellen Peptiden mit von der Masse abweichenden Scores zustande, die in-vivo auch die größte Chance hätten tatsächlich eine Reaktion hervorzurufen.

6.6 Die Schlussfolgerung.....

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass vor einem fremden HLA-Hintergrund entstandene Ids statistisch signifikant besser präsentiert werden als der autologe Id (*Idiotyp vs. Idiotyp*). Dieser Unterschied ist umso größer, je höher der Mutationsgrad bzw. je individueller der Abschnitt ist (*CDR versus CDR bzw. FR versus FR*) und besteht trotz insgesamt deutlich niedriger Scores der CDR-Regionen. Am deutlichsten wird dieser Unterschied in der Betrachtung von CDR3, der individuellsten Region innerhalb des Ids.

Dennoch befindet sich die globale Immunogenität des Ids trotz des zum Teil hohen Mutationsgrades vor autologem HLA-Hintergrund in etwa auf Keimbahnniveau (*Idiotyp vs. Keimbahnlinie*). Da in der Präsentation der fremden Keimbahnlinien kein Unterschied zur eigenen, dem Id-zugrunde liegenden Keimbahnsequenz (*Keimbahnlinie vs. Keimbahnlinie*) zu beobachten ist, kann die Ursache zwischen autologem und heterologem Id nur in den Mutationen begründet sein. Dabei bleiben diese Sequenzalterationen vor dem eigenen HLA-Hintergrund (*Idiotyp vs. Keimbahnlinie*) in Bezug auf die Immunogenität scheinbar folgenlos. Bei der Analyse auf einem fremden HLA-Hintergrund würden sie hingegen zu einer Immunogenitätssteigerung des Ids und vermutlich zum gezielten Erkennen und Suppression der Tumorzellen durch das Immunsystem führen.

Abbildung 60: Schematische Darstellung des Einflusses der Mutationen auf die Immunogenitätsentwicklung von autologen und heterologen Idiotypen im Vergleich zu den Keimbahnlinien.

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit für eine aktive Immunsurveillance im follikulären Lymphom, vermittelt durch zytotoxische T-Zellen.

6.7 Implikationen für die Klinik und Fragen für die Zukunft.....

6.7.1 Mögliche Implikationen für die Immuntherapie.....

Die aktive Immuntherapie hat sich in den letzten Jahren als vielversprechende und nebenwirkungsarme Therapieoption für Patienten mit follikulärem Lymphom erwiesen. Dabei konnten anhaltende klinische und objektive Remissionen beobachtet werden.³⁸

In dem hier gewählten Ansatz wurden durch reverse Immunogenitätsanalysen autologe Sequenzen mit fremden Ids HLA-nicht-identer Patienten verglichen. Dabei ergaben sich starke Hinweise für eine sich sowohl auf hypermutierte Ids follikulärer Lymphomzellen als

auch auf gesunde B-Zellen erstreckende aktive Immunsurveillance durch CTLs. Diese richtet sich dabei vorwiegend gegen die individuellen Bereiche des Idiotyps und scheint direkt mit dem jeweiligen Mutationsgrad bzw. Grad an Individualität zu korrelieren.

Mögliche Implikationen für den zu erwartenden Erfolg einer Immuntherapie eines individuellen Patienten sind derzeit noch nicht abschätzbar. Allerdings korrelieren diese Beobachtungen mit der generell vorherrschenden Meinung, dass die Immunogenität des Ids als eher niedrig einzustufen ist und es für die erfolgreiche Induktion einer Immunantwort eines Adjuvans bedarf. In der Idiotypvaksinierungsstudie der Universität Freiburg gelang bei einem großen Teil der Fälle (69%) eine solche Induktion von Id-reaktiver T-Zellen.³⁸

Über diese Aussage zur generellen Immunogenität des Ids hinaus liefern diese Ergebnisse weitere Argumente für die These, dass sich vor allem die CDR-Bereiche der beiden Ketten für eine mögliche Immuntherapie eignen. Demgegenüber kann für die weniger individuellen FR-Regionen nur ein schwächerer bzw. kein immunogener Selektionsdruck vermutet werden.

Inwiefern die hier gemachten Beobachtungen einer CD8-vermittelten Immunsurveillance tatsächlich reale Vorgänge in-vivo widerspiegeln, müssen zukünftige funktionelle Untersuchungen zeigen.

6.7.2 Mögliche Implikationen für die allgemeine B-Zellentwicklung.....

Derzeit lässt sich nicht klar sagen, auf welcher Ebene der B-Zellentwicklung die hier gemachte Beobachtung einer immunologischen Einflussnahme stattfinden könnte. Auch die Frage, ob es sich hierbei um ein globales, sich auf alle B-Zellen erstreckendes Phänomen im Vergleich zu einem auf hypermutierte Ids beschränkten Geschehen handelt, lässt sich derzeit vermuten, aber nicht abschließend beantworten. Einen weiteren Hinweis liefert die Arbeit von Klein et al.: Sie hatten zeigen können, dass Mutations- und Reifegrad gesunder B-Zellen invers miteinander korrelieren. So wies die DNS von Zentroblasten einen Mutationsgrad von 6,5% auf, während der der RNS reifer Gedächtniszellen zwischen 2% (IgM) bzw. 4% (IgG & IgA) lag.²⁵ Bisherige Erklärungsversuche gehen von einer im Zuge der Hypermutation entstehenden Generation nicht-funktionaler Igs im Zentroblasten-Stadium, z. Bsp. durch die Entstehung von Stop-Codons, aus. Diese würden folglich nicht auf dem RNS-Level der untersuchten Gedächtniszellen erscheinen. Allerdings könnte nach den hier gemachten Beobachtungen auch ein immunologisch bedingter Selektionsprozess daran beteiligt sein, der bestimmte Ergebnisse der VDJ-Rekombination und somatischen Hypermutation aufgrund des gegebenen HLA-Repertoires nicht bestehen lässt. Ein Argument für die Richtigkeit dieser

Annahme ist, dass besonders die autologe CDR3-Region, ein in der Keimbahnsequenz in dieser Form noch nicht enthaltender Abschnitt, im Vergleich zu den fremden CDR3-Sequenzen deutlich schlechter präsentiert wurde.

6.7.3 Mögliche Implikationen für Autoimmunitätsprozesse.....

Wie bereits erwähnt fielen bei der Analyse des Bindungsverhaltens einzelner HLA-Typen bestimmte Gewebemerkmale besonders auf. So erzielten *HLA-B2705* und *HLA-B5101* bis zu 5000fach höhere Scores als andere HLA-Typen.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben die protektive Wirkung von *HLA-B2705* für die Prognose von viralen Erkrankungen wie HIV und HCV darstellen können. Dabei konnte gezeigt werden, dass *HLA-B27* bestimmte für die Virus-Ausbreitung essentielle Peptide besonders gut präsentierte und somit einen Vorteil in deren Bekämpfung vermittelte.^{35,44,48} Gleichzeitig sind gerade diese HLA-Typen mit dem Auftreten von Autoimmunphänomenen assoziiert (M. Bechterew, M. Reiter, CED, Psoriasis Arthritis, *HLA-B27* assoziierte Uveitis, M. Behçet etc.).

Die hier durchgeführten Analysen von ubiquitär vorkommenden Ig-Sequenzen legen nahe, dass deren besonders starkes Bindungsverhalten evt. nicht auf einzelne virale Peptide beschränkt, sondern ein generelles Merkmal sein könnte. Dadurch stellt sich die Frage, inwiefern dies auch mit der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen zusammenhängen könnte: Aus den hier gemachten Beobachtungen wäre eine (zu) gute Präsentation von Epitopen autologer Strukturen mit nachfolgender Stimulation zytotoxischer T-Zellen als mögliche Ätiologie denkbar. Abgesehen von diesem globalen Ansatz würde auch eine auf Ig-ähnliche Strukturen begrenzte besonders effektive Präsentation durch diese HLA-Merkmale eine mögliche Erklärung von Autoimmunphänomenen darstellen: So ist bekannt, dass auch nicht-B-Zellen, wie z. Bsp. gesunde Epithelzellen sowie eine Vielzahl an epithelialen Krebsarten (Carcinome des Colons etc.), Igs bzw. Ig-ähnliche Strukturen auf ihren Oberflächen aufweisen können.⁵⁷ Ob und inwiefern die hier gemachten Beobachtungen, tatsächlich mit der Entwicklung von Autoimmunkrankheiten in Verbindung steht, wird die Zukunft zeigen müssen.

7. Literaturverzeichnis.....

- 1 Bahler, D.W., Campbell, M. J., Hart, S., Miller, R. A., Levy, S. und Levy R. (1991) Ig VH gene expression among human follicular lymphomas. *Blood* 78 (6): 1561 – 1568
- 2 Bendandi, M., Gocke, C. D., Kobrin, C. B., Benko, F. A., Sternas, L. A., Pennington, R., Watson, T. M. Reynolds, C. W., Gause, B. L., Duffey, P. L., Jaffe, E. S., Creekmore, S. P., Longo, D. L. und Kwak, L. W. (1999) Complete molecular remissions induced by patient-specific vaccination plus granulocyte–monocyte colony-stimulating factor against lymphoma. *Nature Medicine* 5 (10): 1171-1177
- 3 Bertinetti, C., Zirlik, K., Heinig-Mikesch, K., Ihorst, G., Dierbach, H., Waller, C. F. und Veelken, H. (2006) Phase I Trial of a Novel Intradermal Idiotypic Vaccine in Patients with Advanced B-Cell Lymphoma: Specific Immune Responses despite Profound Immunosuppression. *Cancer Research* 66 (8): 4496-4502
- 4 Bevan, M. J. (1997) In thymic selection, peptide diversity gives and takes away. *Immunity* (7): 175-178
- 5 Brezinschek, H.P., Brezinschek, R. I. und Lipsky, P. E. (1995) Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction. *J. Immunol.* 155 (1): 190-202
- 6 Carrington, M., Nelson, G. W., Martin, M. P., Kissner, T., Vlahov, D., Goedert, J. J., Kaslow, R., Buchbinder, S., Hoots, K. und O'Brien, S. J. (1999) HLA and HIV-1: heterozygosity advantage and B*35-Cw*04 disadvantage. *Science* (283): 1748 – 1752
- 7 Cleary, M. L., Meeker, T. C., Levy, S., Lee, E., Trela, M., Sklar, J. und Levy, R. (1986) Clustering of extensive somatic mutations in the variable region of an immunoglobulin heavy chain gene from a human B cell lymphoma. *Cell* 44 (1): 97-106
- 8 Davis, M. M. und Bjorkman, P. J. (1988) T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* (334): 395-402
- 9 Dudley, M. E. et al. (2005) Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J. Clin Oncol.* (23): 2346-2357
- 10 Fensterle, J., Trefzer, U., Berger, T., Andersen, M. H., Ugurel, S. und Becker, J. C. (2006) HLA-B8 association with late-stage melanoma – an immunological lesson? *BMC Medicine*. 4 (5): 1-6

- 12 Frahm, N., Adams, S., Kiepiela, P., Linde, C. H., Hewitt, H. S., Lichterfeld, M., Sango, K., Brown, N. V., Pae, E., Wurcel, A. G., Altfeld, M., Feeney, M. E., Allen, T. M., Roach, T., St. John, M. A., Daar, E. S., Rosenberg, E., Korber, B., Marincola, F., Walker, B. D. Goulder, P. J. und Brander, C. (2005) HLA-B63 Presents HLA-B57/B58-Restricted Cytotoxic T-Lymphocyte Epitopes and Is Associated with Low Human Immunodeficiency Virus Load. *J. Virol.* 79 (16): 10218–10225
- 13 Garcia, K. C., Degano, M. Pease, L. R., Huang, M. , Peterson, P. A., Teyton, L. und Wilson, I. A. (1998) Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. *Science* (279): 1166-1172
- 14 Gribben, J. G. (2007) How I treat indolent Lymphoma. *Blood* 109 (11): 4617-4626
- 15 Gricks, C. S., Rawlings, E., Foroni, L., Madrigal, A. und Amlot, P. L. (2001) Somatic Mutated Regions of Immunoglobulin on Human B-Cell Lymphomas Code for Peptides That Bind to Autologous Major Histocompatibility Complex Class I, Providing a Potential Target for Cytotoxic T Cells. *Cancer Research* (61): 5145–5152
- 16 Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H. K., Vardiman, J., Lister, T. A. und Bloomfield, C. D. (2000) The World Health Organization classification of hematological malignancies report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Modern Pathology* 13 (2): 193-207
- 17 Hendel, H., Caillat-Zucman, S., Lebuanec, H., Carrington, M., O'Brien, S., Andrieu, J. M., Schächter, F., Zagury, D. Rappaport, J., Winkler, C., Nelson, G. W. und Zagury, J. F. (1999) New class I and II HLA alleles strongly associated with opposite patterns of progression to AIDS. *J. Immunol.* (162): 6942 – 6946
- 18 Herrmann, T., Hofmann, K., Torres Nagle, N. E., Asmuß, A., Hünig, T. und Wonigeit, K. (1998) Differential CD4/CD8 subset-specific expression of highly homologous rat Tcrb-V8 family members suggest a role of CDR2 and/or CDR4 (HV4) in MHC class-specific thymic selection. *International Immunology* 11 (3): 435-444
- 19 Hsu, F. J., Caspar, C. B., Czerwinski, D., Kwak, L. W., Liles, T. M., Syrengelas, A., Taidi-Laskowski, B. und Levy, R. (1997) Tumor-Specific Idiotypic Vaccines in the Treatment of Patients with B-Cell Lymphoma — Long-Term Results of a Clinical Trial. *Blood* 89 (9): 3129-3135
- 20 Irwin, M. J., Huddson, K. R., Ames, K. T., Fraser, J. D. und Gascoigne, N. R. (1993) T-cell receptor beta-chain binding to enterotoxin superantigens. *Immunol. Rev.* (131): 61-78

- 21 Juul, L., Hougs, L., Andersen, V., Svejgaard, A. und Barington, T. (1997) The normally expressed κ immunoglobulin light chain gene repertoire and somatic mutations studied by single-sided specific polymerase chain reaction (PCR); frequent I of features often assigned to autoimmunity. *Clin Exp. Immunol.* 109: 194 – 203
- 22 Kaslow, R. et al. (2001) Polymorphisms in HLA Class I Genes Associated with both Favorable Prognosis of Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 Infection and Positive Cytotoxic T-Lymphocyte Responses to ALVAC-HIV Recombinant Canarypox Vaccines. *J. of Virology* 75 (18): 8681 – 8689
- 23 Klein, R., Rajewsky, K. und Küppers, R. (1998) Human Immunoglobulin (Ig)M⁺IgD⁺ Peripheral Blood B Cells Expressing the CD27 Cell Surface Antigen Carry Somatic Mutated Variable Region Genes: CD27 as a General Marker for Somatic Mutated (Memory) B Cells. *J. Exp. Med.* 188 (9): 1679-1689
- 24 Klein, U., Küppers, R. und Rajewsky, K. (1993) Human IgM⁺ IgD⁺ B cells, the major B cell subset in the peripheral blood, express V kappa genes with no or little somatic mutation throughout life. *Eur. J. Immunol.* 23: 3272 – 3277
- 25 Klein, U., Goossens, T. und Küppers, R. (1998) Somatic hypermutation in normal and transformed human B cells. *Immunological Reviews.* (162): 261 – 280
- 26 Krul, E. J. T., Schipper, R. F., Schreuder, G. M. Th., Fleuren, G. J., Kenter, G. G. und Melief, C. J. M. (1999) HLA and susceptibility to cervical neoplasia. *Hum. Immunol.* 60 (4): 337-342
- 27 Küppers, R., Zhao, M., Rajewsky, K. und Hansmann, M. L. (1993) Detection of clonal B cell populations in paraffin-embedded tissues by polymerase chain reaction. *Am. J. Pathol.* (143): 230-239
- 28 Lossos, I. S., Tibshirani, R., Narasimhan und Levy, R. (2000) The Inference of Antigen Selection on Ig Genes. *Journal of Immunology* (165): 5122-5126
- 29 Matsuda, F., Ishii, K., Bourvagnet, P., Kuma, K.-I., Hayashida, H., Miyata, T. und Honjo, T. (1998) The Complete Nucleotide Sequence of the Human Immunoglobulin Heavy Chain Variable Region Locus. *J. Exp. Med.* 188 (11): 2151-2162.
- 30 Meeker, T., Lowder, J., Cleary, M. L., Stewart, S., Warncke, R. Sklar, J. und Levy, R. (1985) Emergence of idiotype variants during therapy of B cell lymphoma with antiidiotype antibodies. *N. Engl. J. Med.* (312): 1658-1665
- 31 Molinier-Frenkel, V., Popa, N., Poulot, V., Chaise, C., Marquet, J., Haioun, C., Gaulard, P., Farcet, J. P. und Delfau-Larue, M.-H. (2006) Analysis of the intracлонаl diversity of HLA-A0201-restricted T-lymphocyte epitopes in follicular lymphoma idiotype. *BJH* (132): 459-468

- 32 Morton, L. M., Wang, S. S., Devesa, S. S., Hartge, P., Weisenburger, D. D. und Linet, M. S. (2006) Lymphoma incidence patterns by WHO subtype in the United States, 1992-2001. *Blood* 107 (1): 265-276
- 33 Müller, C. R. (2000) Populationsgenetische Parameter der Gewebemerkmale der deutschen Bevölkerung und ihre Anwendung bei der Suche nach nicht-verwandten Blutstammzellspendern. Medizinische Dissertation, Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Ulm
- 34 Murphy, K. M., Travers, P. und Walport, M. (2008) Janeway's Immunobiology (7. Edition): 144
- 35 Murphy, K. M., Travers, P. und Walport, M. (2008) Janeway's Immunobiology (7. Edition): 147-154
- 36 Murphy, K. M., Travers, P. und Walport, M. (2008) Janeway's Immunobiology (7. Edition): 156
- 37 Murphy, K. M., Travers, P. und Walport, M. (2008) Janeway's Immunobiology (7. Edition): 295-296; 600-601
- 38 Navarette, M. A. (2009) Analysis of Immune Responses to a Rekombinant Idiotypic Vaccination in Indolent B-Cell Lymphoma. Medizinische Dissertation, Abteilung für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Freiburg
- 39 Osterroth, F., Garbe, A., Fisch, P. und Veelken, H. (2000) Stimulation of cytotoxic T cells against idiotype immunoglobulin of malignant lymphoma with protein-pulsed or idiotype-transduced dendritic cells. *Blood* 95 (4): 1342-1349.
- 40 Parker, K. C. et al. (1994) Scheme for Ranking Potential HLA-A2 Binding Peptides Based on Independent Binding of Individual Peptide Side-Chains. *J. Immunol.* (152): 163-175
- 41 Pascual, V., Liu, Y.J., Magalski, A., de Bouteiller, O., Banchereau, J., Capra, J.D. (1994) Analysis of somatic mutation in five B cell subsets of human tonsil. *J. Exp. Med.* 180 (1): 329-339
- 42 Pullen, A. M., Wate, T., Marrack P. und Kappler, J. W. (1990) Identification of the region of T cell receptor beta chain that interacts with the self-superantigen mls-1a. *Cell* (61): 1365-1374
- 43 Savage, P.A., Boniface, J.J. und Davis, M.M. (1999) A kinetic basis for T cell receptor repertoire selection during an immune response. *Immunity* (10): 485-492

- 44 Schuchardt, F. (2008) Rolle der HLA-Allele B57 und B58 bei der chronischen Hepatitis C Virusinfektion. Medizinische Dissertation, Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie, Endokrinologie und Infektiologie des Universitätsklinikums Freiburg
- 45 Sette, A., Vitiello, A., Rehman, B., Fowler, P., Nayarsina, R., Kast, W. M., Melief, C. J., Oseroff, C., Yuan, L. Ruppert, J., Sidney, J., del Guercio, M. F. Southwood, S., Kubo, R. T., Chesnut, R. W. Grey, H. M. und Chisari F. V. (1994) The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J. Immunol.* (153): 5586–5592
- 46 Smilevska, T., Tsakou, E., Hadzidimitriou, A., Bikos, V., Stavroyianni, N., Laoutaris, N., Fassas, A., Anagnostopoulos, A., Papadaki, T., Belessi, C. und Stamatopoulos, K. (2008) Immunoglobulin kappa gene repertoire and somatic hypermutation patterns in follicular lymphoma. *Blood cells, Molecules & Diseases.* 41 (2): 215-218
- 47 Thimme, R., Chang, K.-M., Pemberton, J., Sette, A. und Chisari, F. V (2001) Degenerate Immunogenicity of an HLA-A2-restricted Hepatitis B Virus Nucleocapsid cytotoxic T-Lymphocyte epitope that is also presented by HLA-B51. *J. Virol.* 75 (8): 3984–3987
- 48 Trachtenberg, E., Korber, B., Sollars, C., Kepler, T. B., Hraber, P.T., Hayes, E., Funkhouser, R., Fugate, M., Theiler, J., Hsu, Y. S., Kunstman, K., Wu, S., Phair, J., Erlich, H. und Wolinsky, S. (2003) Advantage of rare HLA supertype in HIV disease progression. *Nature Medicine* (9): 928-935
- 49 Trojan, A., Schultze, J. L., Witzens, M., Vonderheide, R. H., Ladetto, M., Donovan, J. W. und Gribben, J. G. (2000) Immunoglobulin framework-derived peptides function as cytotoxic T-cell epitopes commonly expressed in B-cell malignancies. *Nature Medicine* (6): 667-672
- 50 Tsujimoto, Y. Ikegaki, N. und Croce, C. M. (1987) Characterization of the protein product of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma. *Onkogene* 2 (1): 3-7
- 51 van der Burg, S.H., Visseren, M.J., Brandt, R.M., Kast, W.M. und Melief, C.J. (1996) Immunogenicity of peptides bound to MHC class I molecules depends on the MHC-peptide complex stability. *J. Immunol.* (156): 3308–3314
- 52 Varghese, B., Widman, A., Do, J., Taidi, Behnaz, Czerwinski, D. K., Timmerman, J., Levy, S. und Levy R. (2009) Generation of CD8⁺ T cell-mediated immunity against idiotype-negative lymphoma escapees. *Blood* 114 (20): 4477-4485
- 53 Warncke, M., Buchner, M., Bertinetti, C. und Veelken, H. (2006) Coimmunization with Antigens shared between neoplastic and normal B Cells suppresses induction of strictly Tumor-Specific cytotoxic T Cells through in situ activation of regulatory T Cells. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 108: 2491.

- 54 Weng, W.-K., Czerwinski, D., Timmerman, J., Hsu, F. J. und Levy, R. (2004) Clinical Outcome of Lymphoma Patients after Idiotypic Vaccination is correlated with humoral immune response and immunoglobulin G Fc Receptor Genotype. *Journal of Clinical Oncology* 22 (23): 4717-4724
- 55 Yancopoulos, G. D. und Alt, F. W. (1986) Regulation of the assembly and expression of variable-region genes. *Annu. Rev. Immunol.* (4): 339-368
- 56 Yu, K. J., Gao, X., Chen, C. J., Yang, X. R., Diehl, S. R., Goldstein, A., Hsu, W. L., Liang, X. S., Marti, D., Liu, M. Y., Chen, J. Y., Carrington, M. und Hildesheim, A. (2009) Association of human leukocyte antigens with nasopharyngeal carcinoma in high-risk multiplex families in Taiwan. *Hum. Immunol.* 70 (11): 910-914
- 57 Zheng, J., Huang, J., Mao, Y., Liu, S., Sun, X., Zhu, X., Ma, T., Zhang, L., Ji, J., Zhang, Y., Yin, C. C. und Qiu, X. (2009) Immunoglobulin Gene Transcripts Have Distinct V_HDJ_H Recombination Characteristics in Human Epithelial Cancer Cells. *Journal of Biological chemistry.* 284 (20): 13610 – 13619
- 58 Zhu, D. McCarthy, H., Ottensmeier, C. H., Johnson, P., Hamblin, T. J. und Stevenson, F. K. (2002) Acquisition of potential N-glycosylation sites in the immunoglobulin variable region by somatic mutation is a distinctive feature of follicular lymphoma. *Blood* 99 (7): 2562-2568

8. Abkürzungsverzeichnis.....

AA	Aminosäure (<i>amino acid</i>)
Alignment	Zuordnung von Entsprechungen zwischen den Bausteinen von Sequenzen
BIMAS	BioInformatics and Molecular Analysis Section (www-bimas.cit.nih.gov)
CDR	Complementary Determining Region
Epitop	Antigene Determinante; Bindungsmotiv von HLA-Molekülen
ELISPOT	Enzyme Linked Immuno Spot Technique
Fc	Fragment crystalizable
FL	Follikuläres Lymphom
FR	Framework Region
GL	Keimbahnlinie (<i>Germline</i>)
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
Id	Idiotyp
Ig	Immunglobulin
IgH	Schwere Kette eines Immunglobulin (<i>heavy</i>)
IgL	Leichte Kette eines Immunglobulin (<i>light</i>)
IMGT	ImMunoGeneTics (http://imgt.cines.fr)
MNC	Mononukleare Zellen (<i>mononuclear cells</i>)
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
PFS	Progressionsfreies Überleben (<i>progression free survival</i>)
R-Mutation	Austauschmutation (<i>replacement mutation</i>)
sIg	Oberflächen-Immunglobulin (<i>surface immunoglobulin</i>)
S-Mutation	stille Mutation (<i>silent mutation</i>)
V _H	variabler Anteil der schweren Kette (<i>heavy</i>)
V _L	variabler Anteil der leichten Kette (<i>light</i>)
w&w	abwartende Haltung in der Situation einer fortgeschrittenen Lymphomerkrankung (<i>watch and wait</i>)

9. Abbildungsverzeichnis.....

Abbildung 1: Struktureller Aufbau eines Immunglobulins (Ig) mit Darstellung der Antigenbindungsstelle	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung des IgH-Gen-Locus vor und nach der somatischen Rekombination. Modifiziert nach Küppers et al. ²⁷	5
Abbildung 3: Struktureller Aufbau eines T-Zell-Rezeptors im direkten Vergleich mit dem eines B-Zell-Rezeptors.	7
Abbildung 4: Struktureller Aufbau eines HLA Klasse I-Moleküls und seine Interaktion mit dem TCR einer zytotoxischen T-Zelle.	8
Abbildung 5: Schematische Darstellung der aktiven Immuntherapie.	11
Abbildung 6: Graphische Darstellung der Austauschmutationen (R-Mutationen) und der stillen Mutationen (S-Mutationen) innerhalb der IgH (n = 39). Angaben als Anzahl n. Modifiziert nach Molinier-Frenkel et al. ³¹	31
Abbildung 7: Graphische Darstellung der Austauschmutationen (rechts) und stillen Mutationen (links) separat innerhalb der IgH (n = 39). Angaben als Anzahl n. Modifiziert nach Molinier-Frenkel et al. ³¹	31
Abbildung 8: Graphische Darstellung der Austauschmutationen (R-Mutationen) und der stillen Mutationen (S-Mutationen) innerhalb der IgL (n = 39). Angaben als Anzahl n. Modifiziert nach Molinier-Frenkel et al. ³¹	35
Abbildung 9: Graphische Darstellung der Austauschmutationen und stillen Mutationen separat innerhalb der IgL. Angaben als Anzahl n. Modifiziert nach Molinier-Frenkel et al. ³¹	36
Abbildung 10: Graphische Darstellung der direkten Gegenüberstellung der Austauschmutationen (R-Mutationen) innerhalb der schweren und der leichten Kette. Angaben als Anzahl n. Modifiziert nach Molinier-Frenkel et al. ³¹	38
Abbildung 11: Graphische Darstellung der Verteilung von R- und S-Mutationen innerhalb der schweren (n = 29) und der leichten Ketten (n = 30) gesunder B-Zellen. Angaben als Anzahl n. Modifiziert nach Molinier-Frenkel et al. ³¹	39
Abbildung 12: Darstellung des Rankings nach Bindungsstärke der Top 20 Motive für die gesamte IgH und IgL, arithmetisches Mittel (Mean) und Median samt Standardabweichung.	41
Abbildung 13: Graphische Darstellung des Means und Medians der für alle 39 Idiotypen ermittelten Top 20-Peptidmotive getrennt für den FR- und den CDR-Bereich.	42
Abbildung 14: Darstellung des Summenscores aller 39 IgHs auf den einzelnen HLA-A-Allelen.	43

Abbildung 15: Darstellung des Summscores aller 39 IgHs auf den einzelnen HLA-B-Allelen. Die Skalierung erfolgt aufgrund der größeren Unterschiede logarithmisch.....	44
Abbildung 16: Darstellung des Summscores aller 39 IgLs auf den einzelnen HLA-A-Allelen.	45
Abbildung 17: Darstellung des Summscores aller 39 IgLs auf den einzelnen HLA-B-Allelen. Die Skalierung erfolgt aufgrund der größeren Unterschiede logarithmisch.....	45
Abbildung 18: Graphische Darstellung der Summscores für die gesamte IgH, den FR- und den CDR-Bereich für alle 39 Patienten. Die Untersuchung erfolgte jeweils auf dem autologen HLA-Hintergrund.	46
Abbildung 19: Graphische Darstellung des medianen Summscores der 39 einzelnen IgH-Abschnitte, analysiert auf dem jeweiligen autologen HLA-Hintergrund.....	47
Abbildung 20: Graphische Darstellung der Summscores für die gesamte IgL, den FR- und den CDR-Bereich für alle 39 Patienten.	47
Abbildung 21: Graphische Darstellung des medianen Summscores der einzelnen IgL-Abschnitte.....	48
Abbildung 22: Graphische Darstellung der Summscores für die gesamte IgL, den FR- und den CDR-Bereich für alle Patienten mit verfügbaren schweren (n = 16) und leichten (n = 14) Ketten gesunder B-Zellen.....	48
Abbildung 23: Graphische Darstellung des medianen Summscores der einzelnen Abschnitte.....	49
Abbildung 24: Prozentuale Verteilung der Epitope mit einem BIMAS-Score ≥ 10 bzw. ≥ 50 innerhalb der gesamten IgH . Darstellung als Anzahl n und als Prozent.	50
Abbildung 25: Prozentuale Verteilung der Epitope mit einem BIMAS-Score ≥ 10 bzw. ≥ 50 innerhalb der Keimbahnsequenz und der korrespondierenden FR1 bis FR3 Abschnitte der IgH . Darstellung als Anzahl n und als Prozent.....	51
Abbildung 26: Prozentuale Verteilung aller Epitope mit einem BIMAS-Score ≥ 10 bzw. ≥ 50 innerhalb der kontaminierenden B-Zell-Sequenzen (n=30) und der IgH . Darstellung als Anzahl n und als Prozent.	52
Abbildung 27: Prozentuale Verteilung der Epitope mit einem BIMAS-Score ≥ 10 bzw. ≥ 50 innerhalb der gesamten IgL . Darstellung als Anzahl n und als Prozent.....	53
Abbildung 28: Prozentuale Verteilung aller Epitope mit einem BIMAS-Score ≥ 10 bzw. ≥ 50 innerhalb der Keimbahnsequenz und der korrespondierenden FR1-FR3-Abschnitte der IgL . Darstellung als Anzahl n und als Prozent.....	53

Abbildung 29: Prozentuale Verteilung aller Epitope mit einem BIMAS-Score ≥ 10 bzw. ≥ 50 innerhalb der kontaminierenden B-Zell-Sequenzen (n=29) und der IgL . Darstellung als Anzahl n und als Prozent. 54

Abbildung 30: Darstellung der Summenscores der IgHs auf dem jeweils autologem HLA-Hintergrund gegenüber dem durchschnittlichen Summenscore (Mean) der 38 anderen IgHs auf demselben HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Analyse mittels Wilcoxon-Rangreihentest. **Link:** Vergleich der Top 20-Peptide. **Rechts:** Vergleich aller ermittelbaren Peptide. 55

Abbildung 31: Vergleich der Präsentation von FR1, FR2, FR3 und FR4 mit dem durchschnittlichen Summenscore (Mean) der entsprechenden FR-Regionen fremder Ids. Graphische Darstellung des Medians. Statistischer Vergleich mittels Wilcoxon-Rangreihentest. 56

Abbildung 32: Vergleich der Präsentation von CDR1, CDR2 und CDR3 mit dem durchschnittlichen Summenscore (Mean) der entsprechenden CDR-Regionen fremder IgHs. Graphische Darstellung des Medians. Statistischer Vergleich mittels Wilcoxon-Rangreihentest. 57

Abbildung 33: Vergleich der autologen IgH mit dem durchschnittlichen Summenscores (Mean) fremder IgHs auf autologem HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests. **Links:** Vergleich des gesamten FR-Bereiches. **Rechts:** Vergleich des gesamten CDR-Bereiches..... 58

Abbildung 34: Übersicht der statistischen Vergleiche zwischen Auto- und Allo-IgHs. 59

Abbildung 35: Statistischer Vergleich der IgH und ihrer jeweils zugehörigen Keimbahnsequenz auf autologem HLA-Hintergrund mittels Summenscore. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests. 60

Abbildung 36: Statistischer Vergleich der einzelnen FR-IgH-Regionen mit den korrespondierenden Keimbahnsequenzen auf autologem HLA-Hintergrund mittels Summenscore. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests. 61

Abbildung 37: Statistischer Vergleich der einzelnen CDR-IgH-Regionen mit den korrespondierenden Keimbahnsequenzen auf autologem HLA-Hintergrund mittels Summenscore. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests. 62

Abbildung 38: Vergleich des gesamten FR- bzw. CDR-Bereiches der IgH mit dem Summenscore (Mean) der zugehörigen Keimbahnsequenz auf dem autologem HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests. 63

Abbildung 39: Übersicht der statistischen Vergleiche zwischen IgH und korrespondierender Keimbahnsequenz..... 64

Abbildung 40: Darstellung des Summenscores der IgH-Keimbahnsequenz auf autologem HLA-Hintergrund gegenüber dem gemittelten Summscore der 38 alloge-
nen Keimbahnsequenzen auf demselben HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians.
Statistische Analyse mittels Wilcoxon-Rangreihentest. [GL: Germline/Keimbahnsequenz]

..... 65

Abbildung 41: Vergleich der IgH (n = 16 Patienten) mit dem durchschnittlichen Summscore der IgHs gesunder B-Zellen auf dem autologen HLA-Hintergrund eines Patienten (n=29 kontaminierende Sequenzen). Graphische Darstellung des Medians.
Statistische Analyse mittels Wilcoxon-Rangreihentest. 66

Abbildung 42: Vergleich der einzelnen Framework Regionen der IgH des Idiotypen mit den korrespondierenden Abschnitten IgHs gesunder B-Zellen auf autologem HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests..... 67

Abbildung 43: Vergleich der einzelnen CDR-Regionen der IgH des Idiotypen mit den korrespondierenden Abschnitten IgHs gesunder B-Zellen auf autologem HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests..... 68

Abbildung 44: Vergleich der gesamten FR- und CDR-Regionen der IgH des Idiotypen mit den korrespondierenden Abschnitten IgHs gesunder B-Zellen auf autologem HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests. 69

Abbildung 45: Zusammentragung der statistischen Vergleiche zwischen IgH und kontaminierenden B-Zellsequenzen. 70

Abbildung 46: Darstellung des Summenscores der IgL auf autologem HLA-Hintergrund gegenüber dem durchschnittlichen Summscore (Mean) der 38 fremden IgLs auf demselben HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Analyse mittels Wilcoxon-Rangreihentest. 71

Abbildung 47: Vergleich der Präsentation von FR1, FR2, FR3 und FR4 mit dem Mittelwert der durchschnittlichen Summscore (Mean) der entsprechenden FR-Regionen fremder IgLs. Graphische Darstellung des Medians. Statistischer Vergleich mittels Wilcoxon-Rangreihentest. 72

Abbildung 48: Vergleich der Präsentation von CDR1, CDR2 und CDR3 mit dem durchschnittlichen Summscore (Mean) der entsprechenden CDR-Regionen fremder IgLs. Graphische Darstellung des Medians. Statistischer Vergleich mittels Wilcoxon-Rangreihentest. 72

Abbildung 49: Vergleich der autologen IgL mit dem durchschnittlichen Summenscores (Mean) fremder IgLs auf autologem HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests. **Links:** Vergleich des gesamten FR-Bereiches. **Rechts:** Vergleich des gesamten CDR-Bereiches..... 73

Abbildung 50: Zusammentragung der statistischen Vergleiche zwischen Auto- und Allo-IgLs.....	74
Abbildung 51: Statistischer Vergleich der IgL und ihrer korrespondierenden Keimbahnsequenz auf autologem HLA-Hintergrund mittels Summenscore. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests.	75
Abbildung 52: Statistischer Vergleich der einzelnen IgL-Regionen mit den korrespondierenden Keimbahnsequenzen auf autologem HLA-Hintergrund mittels Summenscore. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests.	76
Abbildung 53: Vergleich des gesamten FR-Bereiches bzw. CDR-Bereiches der IgL mit dem Summenscore (Mean) der zugehörigen Keimbahnsequenz auf dem autologem HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests. Links: Vergleich des gesamten FR-Bereiches. Rechts: Vergleich des gesamten CDR-Bereiches.	77
Abbildung 54: Zusammentragung der statistischen Vergleiche zwischen IgH und korrespondierender Keimbahnsequenz.....	78
Abbildung 55: Darstellung des durchschnittlichen Summenscores der IgL-Keimbahnsequenz auf autologem HLA-Hintergrund gegenüber dem durchschnittlichen Summenscore (Mean) der 38 fremden Keimbahnsequenzen auf demselben HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Analyse mittels Wilcoxon-Rangreihentest. [GL: Germline/Keimbahnsequenz]	79
Abbildung 56: Vergleich der IgL (n = 14 Patienten) mit dem durchschnittlichen Summenscore der IgLs gesunder B-Zellen auf dem autologen HLA-Hintergrund eines Patienten (n=30 kontaminierende Sequenzen). Graphische Darstellung des Medians. Statistische Analyse mittels Wilcoxon-Rangreihentest.	80
Abbildung 57: Vergleich der einzelnen Regionen der IgL des Idiotypen mit den korrespondierenden IgL-Abschnitten gesunder B-Zellen auf autologem HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests.....	81
Abbildung 58: Vergleich der gesamten FR- und CDR-Regionen der IgL des Idiotypen mit den entsprechenden Abschnitten der IgLs gesunder B-Zellen auf autologem HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests.	82
Abbildung 59: Vergleich der gesamten FR- und CDR-Regionen der IgL des Idiotypen mit den korrespondierenden Abschnitten IgLs gesunder B-Zellen auf autologem HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Auswertung mittels Wilcoxon-Rangreihentests.	83

Abbildung 60: Schematische Darstellung des Einflusses der Mutationen auf die Immunogenitätsentwicklung von autologen und heterologen Idiotypen im Vergleich zu den Keimbahnlinien. 95

Abbildung 61: Darstellung der Summscores der IgHs auf dem jeweils autologem HLA-Hintergrund gegenüber dem durchschnittlichen Summscore (Median) der 38 anderen IgHs auf demselben HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Analyse mittels Wilcoxon-Rangreihentest. **Link:** Vergleich der Top 20-Peptide. **Rechts:** Vergleich aller ermittelbaren Peptide. 113

Abbildung 62: Darstellung der Summscores der IgLs auf dem jeweils autologem HLA-Hintergrund gegenüber dem durchschnittlichen Summscore (Median) der 38 anderen IgLs auf demselben HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Analyse mittels Wilcoxon-Rangreihentest. **Link:** Vergleich der Top 20-Peptide. **Rechts:** Vergleich aller ermittelbaren Peptide. 114

10. Tabellenverzeichnis.....

Tabelle 1: Darstellung der eingeschlossenen 39 Patienten dieses Kollektivs mit Angaben zu Geschlecht, Geburtsjahr und Diagnose	16
Tabelle 2: Darstellung aller von BIMAS zur Analyse angebotenen HLA-A und -B-Merkmale mit dem jeweils geforderten Auflösungsgrad.	17
Tabelle 3: Gegenüberstellung der niedrigaufgelösten HLA-A- und HLA-B-Allelfrequenzen innerhalb des Freiburger Kollektivs und für Mitteleuropa empirisch ermittelten Durchschnittswerten. Angaben über die Allelfrequenzen als Anzahl - n und Prozent - (%), sowie als 95%-Konfidenzintervall - [x].	26
Tabelle 4: Ergebnisse der hochauflösenden HLA-Typisierung (n = 39 Patienten). Der hochauflösende HLA-Befund ist jeweils in kursiv als Anzahl - n aufgeführt.	27
Tabelle 5: Darstellung der Zugehörigkeit der Abschnitte der IgH zu den einzelnen Gen-Familien und ihres jeweiligen Homologie-Grades.....	29
Tabelle 6: Darstellung der IgH-Verteilung auf die einzelnen V _H -Familien. Angaben dabei als Anzahl n.....	30
Tabelle 7: Verteilung von R- und S-Mutationen auf die einzelnen Abschnitte der IgH als Anzahl n.....	32
Tabelle 8: Darstellung der Zugehörigkeit der einzelnen Abschnitte der IgL zu den einzelnen Gen-Familien und ihres jeweiligen Homologie-Grades.....	34
Tabelle 9: Unterteilung der einzelnen IgL-Abschnitte in die einzelnen V _L -Familien. Angaben dabei als Anzahl.....	34
Tabelle 10: Darstellung der Verteilung von R- und S-Mutationen auf die einzelnen Abschnitte der IgL als Anzahl n.....	36
Tabelle 11: Gegenüberstellung der R/S-Quotienten von IgH und IgL.....	37
Tabelle 12: Darstellung der Verteilung von R-Mutationen auf die schwere und leichte Kette des Ids als Anzahl n.....	38
Tabelle 13: Darstellung der Verteilung von R- und S-Mutationen innerhalb der schweren und leichten Ketten kontaminierender gesunder B-Zellen als Anzahl n.....	40
Tabelle 14: HLA-Befunde der 39 eingeschlossenen Patienten.	113

11. Anhang.....

Code	HLA-A		HLA-B	
A019	1	0201	7	57
A024	0205	310102	4901	4002
A027	0201	0201	3701	44 (4403 excluded)
A073	26(10)	3301	44 (4403 excluded)	14
A082	3	3	7	3501
A097	0201	25(10)	4427 o 4402	60(40)
A103	0201	1101	56(22)	60(40)
A107	3	29	4403	62
A112	3	25(10)	18	3501
A114	1	1	7	57
A118	1	1	829	3503
A119	3	30(19)	5101	62(15)
A120	0201	3	7	5201
A125	0201	26(10)	7	55(22)
A126	1	0201	15	18
A128	1	24	8	35 (3501 excluded)
A130	1	0201	13	57(17)
A131	1	310102	8	13
A132	0201	24(9)	13	2702
A135	0201	3101	2705	40
A137	0201	0201	8	44 (4403 excluded)
A155	0201	0201	3506	45(12)
A161	3	310102	15	4402
A166	1	30	8	13
A169	0201	23(9)	44 (4403 excluded)	45(12)
A170	0201	1101	13	3501
A171	6801	6802	4440	1402(65)
A173	20101	310102	270502	350101
A175	1101	2301	3501	4403
A189	1	0201	1401	55
A192	26	29	1401	4403
A200	1	32	7	3801
A230	1	1	8	8
A242	0101	0101	0801	0801
A278	0201	23	4001	44 (4403 excluded)

A293	24	310102	7	35 (3501 excluded)
A299	24	32	44 (4403 excluded)	62
A306	24(9)	3301	44 (4403 excluded)	1402
B011	1	6801	8	4402

Tabelle 14: HLA-Befunde der 39 eingeschlossenen Patienten.

Abbildung 61: Darstellung der Summenscores der IgHs auf dem jeweils autologem HLA-Hintergrund gegenüber dem durchschnittlichen Summenscore (Median) der 38 anderen IgHs auf demselben HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Analyse mittels Wilcoxon-Rangreihentest. **Links:** Vergleich der Top 20-Peptide. **Rechts:** Vergleich aller ermittelbaren Peptide. **Unten:** Zusammenfassung der statistischen Vergleiche zwischen Auto- und Allo-IgHs.

Abbildung 62: Darstellung der Summenscores der IgLs auf dem jeweils autologem HLA-Hintergrund gegenüber dem durchschnittlichen Summenscore (Median) der 38 anderen IgLs auf demselben HLA-Hintergrund. Graphische Darstellung des Medians. Statistische Analyse mittels Wilcoxon-Rangreihentest. **Link:** Vergleich der Top 20-Peptide. **Rechts:** Vergleich aller ermittelbaren Peptide. **Unten:** Zusammenfassung der statistischen Vergleiche zwischen Auto- und Allo-IgLs.