

II. Medizinische Klinik
Onkologisches Zentrum des Universitätsklinikums Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer

**Untersuchung des Expressionsmusters von
Cancer/Testis-Antigenen im Knochenmark von
Patienten mit Multiplem Myelom**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von:

Julia Arfsten
aus Schleswig
Hamburg 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 18.6.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:
Prof. Dr. Carsten Bokemeyer

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:
Prof. Dr. Klaus Pantel

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:
Prof. Dr. Guido Sauter

Seite

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1. ZIEL DIESER ARBEIT	1
2. EINLEITUNG	2
2.1 Überblick Krankheitsbild Multiples Myelom	2
2.1.1 Definition, Ätiologie und Pathogenese.....	2
2.1.2 Klinik und Diagnostik	6
2.1.3 Therapie und neue Therapieansätze.....	8
2.1.4 Prognose	10
2.2 Tumorimmunologie	11
2.2.1 T-Zellbasierte Immuntherapie	12
2.2.2 Tumorassoziierte Antigene.....	14
3. MATERIAL UND METHODEN	19
3.1 Material	19
3.1.1 Myelomzelllinien.....	19
3.1.2 Knochenmark der Patienten.....	19
3.1.3 Knochenmark der Kontrollgruppe.....	20
3.1.4 Einschlusskriterien bei Patienten und Knochenmarkspendern	20
3.1.5 Studiendesign.....	21
3.2 Methoden	21
3.2.1 Zellseparation	21
3.2.2 RNA-Isolation	22
3.2.3 cDNA-Gewinnung.....	23
3.2.4 qualitative PCR.....	23
3.2.5 Sequenzierung	25
3.2.6 Statistik	26
4. ERGEBNISSE	26
4.1 Patientenkollektiv und Knochenmarkspender	26
4.1.1 Eigenschaften des Patientenkollektivs.....	27
4.1.2 Eigenschaften der Knochenmarkspender und der CD34+Zellen	29

4.2 CT-Antigenexpression in den Multiplen	
Myelomzelllinien	29
4.2.1 Co-Expression in den Myelomzelllinien	32
4.2.1.1 Co-Expression innerhalb einer Genfamilie bei	
Myelomzelllinien.....	32
4.2.1.2 Co-Expression von CT-Antigenen unterschiedlicher	
Genfamilien bei Myelomzelllinien.....	33
4.2.1.3 Einfluss der Abwesenheit von CT-Antigenen auf die	
CT- Genexpression.....	33
4.3 CT-Antigen-Expression im Knochenmark von	
Spendern und in CD34+ Zellen	34
4.4 Expressionsmuster der CT-Antigene in den	
Knochenmark-proben der MM-Patienten	35
4.4.1 Expression von CT-Antigenen in MM-	
Knochenmarkproben	35
4.4.2. Co-Expression von CT-Antigenen	37
4.4.2.1 Co-Expression innerhalb einer Genfamilie	38
4.4.2.2 Co-Expression von CT-Antigenen unterschiedlicher	
Genfamilien	39
4.4.3 Einfluss der Abwesenheit einzelner CT-Antigene auf	
die Genexpression	40
4.4.3.1 Genexpression in Abwesenheit von MAGEA3	41
4.4.3.2 Genexpression in Abwesenheit von MAGEC2	41
4.4.3.3 Genexpression in Abwesenheit von MAGEC1	42
4.4.4 Korrelationen mit klinischen Parametern	44
4.4.4.1 Korrelation des Alters mit der Antigenexpression	45
4.4.4.2 Korrelation Geschlecht und Antigenexpression	46
4.4.4.3 Korrelation Erkrankungsstadium und CT-Antigene.....	46
4.4.4.4 Korrelation Plasmazellinfiltration mit	
Antigenexpression	47
4.4.4.5 Korrelation Ig-Schwerketten- und Leichtkettentyp mit	
der Anzahl an Antigenen.....	47
4.4.4.6 Korrelation Calciumkonzentration und CT-	
Antigenanzahl.....	47

4.4.4.7 Korrelation β_2 -Mikroglobulinwert mit der Antigenexpression	48
4.4.4.8 Korrelation Hämoglobinwert und Antigenexpression.....	48
4.4.4.9 Korrelation des Auftretens einzelner CT-Antigene mit einer Verschlechterung der Überlebensprognose.....	49
5. DISKUSSION.....	51
5.1 Genexpression in den Myelomzelllinien.....	52
5.2 CT-Antigenexpression in gesunden Probanden und CD 34+Zellen.....	53
5.3 Genexpression bei Myelompatienten	54
5.3.1 Co-Expressionen.....	56
5.3.1.1 Co-Expression innerhalb einer CT- Antigenfamilie, zwischen unterschiedlichen Gen-Familien und der Einfluss einzelner Antigene auf die CT- Antigenexpression insgesamt	56
5.3.1.2 Korrelation von CT-Antigenexpression mit klinischen Parametern.....	59
5.3.1.3 Einfluss der CT-Antigenexpression auf das Gesamtüberleben	60
5.4 Kritikpunkte	62
5.5 Ausblick	63
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	64
LITERATURVERZEICHNIS	VI
ANHANG I: TABELLEN.....	XV
ANHANG II: PCR-BILDER	XXIV
ANHANG III: PATIENTENAUFKLÄRUNG UND EINVERSTÄNDNIS- ERKLÄRUNG	XXXVII
1.1 Patienteninformation.....	XXXVIII
1.2 Patienteeinverständniserklärung	XL
DANK XLII	
CURRICULUM VITAE	XLIII
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:	XLIV

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb.1:	Verteilung der Ig-Schwerketten bei 55 Myelompatienten	27
Abb.2	Expressionsmuster von 19 CT-Antigenen in Myelomyelinien	29
Abb.3:	Anzahl der CT Antigene pro Patient	35
Abb.4:	CT-Antigenexpression in KM-Proben der 55 Myelom Patienten	36
Abb.5:	Co-Expression bei MAGEA3-positiven und –negativen KM-Proben	42
Abb.6:	Expressionsmuster bei MAGEC2 – positiven und –negativen KM Proben	42
Abb.7:	Genexpression bei MAGEC1-positiven und negativen Proben	43
Abb.8:	Mittelwerte der Anzahl der CT-Antigene nach Altersgruppen	44
Abb.9:	Mittelwerte CT-Antigenanzahl in Korrelation mit dem Erkrankungsstadium	45
Abb.10:	Korrelation des Hb-Werts mit der Anzahl Antigene bei 52 Myelompatienten	47
Abb.11:	Effekt der MAGEA3-Expression auf das Überleben	48
Abb.12:	Effekt der MAGEC2-Expression auf das Überleben	49
Abb.13:	Effekt der MAGEC1-Expression auf das Überleben	49

Anhang I: Tabellen

Tabelle 1	Stadieneinteilung nach Durie-und-Salmon-Klassifikation und nach Internationalem Stadien Score (ISS)
Tabelle 2	Verwendete Materialien
Tabelle 3	Übersicht CT-Antigenprimer und Annaelngtemperaturen
Tabelle 4	Klinische Merkmale bei Patienten
Tabelle 5	Co-Expression der CT-Antigenfamilienvertreter in Knochenmarkproben von 55 Myelompatienten

Anhang II: PCR-Bilder

PCR-Bilder Myelomzelllinien:

PCR 1: *GAPDH in Myelomzelllinien), Spendern (D) und Patienten (P)*

PCR 2 *MAGEC1 Expression bei Myelomzelllinien*

PCR 3 *MAGEC2 Expression bei Zelllinien*

PCR 4: *MAGEA3 Expression bei Zelllinien*

PCR 5: *MAGEA4 Expression in Myelomzelllinien*

PCR 6: *SYCP1 Expression bei Myelomzelllinien*

PCR 7: *NYESO1 Expression bei Myelomzelllinien*

PCR 8: *SSX1 Expression bei Myelomzelllinien*

PCR 9: *SSX2 Expression bei Myelomzelllinien*

PCR 10: *SSX3 Expression bei Myelomzelllinien*

PCR 11: *SSX4 und 5 Expression bei Myelomzelllinien*

PCR 12: *SSX6 Expression bei Myelomzelllinien*

PCR 13: *SSX7 Expression bei Myelomzelllinien*

PCR 14: *SSX8 Expression bei Myelomzelllinien*

PCR 15: *BAGE Expression bei Myelomzelllinien*

PCR 16: *SPANXb Expression bei Myelomzelllinien*

PCR 17: *LIPI Expression bei Myelomzelllinien*

PCR 18: *ADAM2 Expression bei Myelomzelllinien*

PCR-Bilder Patienten:

PCR 1: *NYESO1 Expression bei Patienten D und A*

PCR 2: *MAGEA3 Expression bei Patienten D und A*

PCR 3: *SSX1 Expression bei Patienten D und A*

PCR 4: *SSX2 Expression bei Patienten D und A*

PCR 5: *SSX3 Expression bei Patienten D und A*

PCR 6: *SSX4 Expression bei Patienten D und A*

PCR 7: *SSX5 Expression bei Patienten D und A*

PCR 8: *BAGE Expression bei Patienten D und A*

PCR 9: *MAGEC2 und 2 Expression bei Patienten D und A*

PCR 10: *LIPI Expression bei Patienten D und A*

PCR-Bilder Spender:**PCR1:** *SSX1 Expression bei Spendern K und R***PCR2:** *MAGEA3 Expression bei Spendern K und R***Anhang III: Patientenaufklärung und Einverständnis**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADAM2	ADAM metallopeptidase domain 2
APC	Antigen presenting cells
BAGE	B melanoma antigen
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CD	Cluster of differentiation
CEA	Carcinoembryonal antigen
cDNA	complementary desoxynuclein acid
CT-Antigen	Cancer/Testis-Antigen
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EP-CAM	Epithelial cellular adhesion molecule
GAPDH	GlycerAldehydePhosphate DeHydrogenase
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
HER	Human epidermal receptor
HER2/neu	Human epidermal receptor 2/neu
HLA	Human leucocyte antigen
LIPI	Membrane asociated phopholipase A1 beta
MAGE	Melanoma antigen expression
MM	Multiples Myelom
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
NYESO1	New York Esophagial-1
PBSC	Peripheral blood stem cells
RNA	Ribonuclein acid
RT- PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
SMM	Smoldering multiple myeloma
SSX	Synovial sarcoma breakpoint X
TAA	Tumorassozierte Antigene
VEGF	Vascular endothelial growth factor

1. ZIEL DIESER ARBEIT

Das Multiple Myelom ist ein nicht heilbarer Plasmazell-Tumor. Chemotherapie und Stammzelltransplantation sind die einzigen Möglichkeiten, um den Krankheitsprogress aufzuhalten. Trotz konventioneller Chemotherapie und neuer Therapieansätze, wie beispielsweise der Proteasomeninhibitor Bortezomib und die Angiogenesehemmer Thalidomid und Lenalidomid beträgt die mediane Überlebenszeit 3-4 Jahre und nicht mehr als 5 Jahre bei Hochdosis-Chemotherapie [1].

Ein neuer diagnostischer und therapeutischer Therapieansatz könnten Cancer/Testis-Antigene darstellen. In zahlreichen Studien wurde die Expression dieser Antigene in soliden Tumoren beschrieben. Das Auftreten der CT-Antigene in nichtsoliden Tumoren wie Leukämien und dem Multiplen Myelom ist hingegen noch nicht näher untersucht. Dabei spielen Cancer/Testis-Antigene eine entscheidende Rolle in der T-Zell-Aktivierung und damit Mobilisation des spezifischen Immunsystems, sodass sie zur Tumorbekämpfung geeignet erscheinen. Gerade bei hämatologischen Erkrankungen sind die malignen Zellen im Blut und Knochenmark wahrscheinlich einer viel stärkeren Überwachung durch das Immunsystem unterworfen, als dies bei soliden Tumoren der Fall sein kann.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Expression einer Anzahl von CT-Antigenen im Genom maligner Plasmazellen zu überprüfen und das Antigenexpressionsmuster mit evtl. Co-Expressionen darzustellen. Es soll in vier Schritten vorgegangen werden:

1. Untersuchung von Myelomzelllinien in Hinblick auf die Expression von CT-Antigenen mittels RT-PCR
2. Analyse des Knochenmarks von 55 Patienten mit Multiplem Myelom auf CT-Antigen-Expression mittels RT-PCR

3. Zum Ausschluss ubiquitären Auftretens der CT-Antigene werden Knochenmarkproben und PBSC von gesunden Knochenmarkspendern auf die Expression von CT-Antigenen hin überprüft
4. Zur möglichen Nutzung der CT-Antigene als diagnostische oder prognostische Hilfsmittel werden die Knochenmarkproben auf mögliche Korrelationen mit klinischen Parametern untersucht.

2. EINLEITUNG

Die Entdeckung von Tumorantigenen, die eine gezielte körpereigene Immunantwort auf Tumorgewebe haben, könnte eine neue diagnostische und therapeutische Option in der Onkologie bedeuten. In dieser Arbeit soll das Expressionsmuster einer Tumorantigenklasse, der Cancer/Testis-Antigene im Knochenmark von Patienten mit Multiplen Myelom untersucht werden. Zunächst wird das Krankheitsbild Multiples Myelom vorgestellt und im Weiteren Tumorantigene und die von ihnen ausgelöste T-zellvermittelten Immunantworten.

2.1 Überblick Krankheitsbild Multiples Myelom

2.1.1 Definition, Ätiologie und Pathogenese

2.1.1.1 Definition und Epidemiologie

Das Multiple Myelom (MM) gehört zu den niedrigmalignen B-Non-Hodgkin-Lymphomen und ist ein Tumor, der durch gesteigerte Proliferation eines immortalen Plasmazell-Klons entsteht. Dieser Klon bildet identische Immunglobuline, welche aufgrund ihrer Spezifität nicht an der normalen Immunabwehr beteiligt sind.

Im Deutschen wird der Begriff Multiples Myelom dem Plasmozytom oder auch M. Kahler gleichgesetzt, obwohl es sich bei dem Plasmozytom per definitionem um

einen „solitären Tumor aus Plasmazellen“ handelt [2], während das Multiple Myelom durch disseminiert vorkommende Plasmazellnester im Knochenmark charakterisiert ist [3]. Es gibt auch eine weitaus seltener auftretende extramedulläre Variante des Multiplen Myeloms, welches häufig das lymphatische Submukosagewebe des Nasopharynx oder der paranasalen Sinus befällt [4].

Die monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) und das „smoldering“ Multiple Myelom (SMM) sind vom Vollbild des Multiplen Myeloms abzugrenzen. Bei der MGUS handelt es sich um einen Anstieg der Antikörper einer bestimmten Klasse (Serumkonzentration < 3g/dl), jedoch kommt es zu keinen zusätzlichen Symptomen wie Osteolysen, und die Plasmazellinfiltration im Knochenmark liegt bei < 10%. Da man bei ca. 3% aller über 70jährigen eine Gammopathie ohne zusätzliche Krankheitszeichen nachweisen kann, ziehen einige Autoren den Begriff „benigne monoklonale Gammopathie“ dem des MGUS vor [3].

Das SMM wird auch als asymptomatisches MM bezeichnet, da es mit einer vermehrten monoklonalen Antikörperbildung und damit mit einer Serumproteinkonzentration von > 3g/dl und einer Plasmazellinfiltration im Knochenmark von > 10% einhergeht, ohne aber weitere Symptome wie Anämie, Osteolysen o. ä. [5] aufzuweisen. Davon abzugrenzen ist das asekretorische Multiple Myelom, welches mit allen Symptomen eines klassischen Myeloms einhergeht, abgesehen von der Sekretion monoklonaler Immunglobuline oder deren Bestandteile. Dadurch sind diese beiden Varianten des MM schwierig zu diagnostizieren.

Die Inzidenz des Multiplen Myeloms variiert aufgrund geografischer und ethnischer Unterschiede. Während in Deutschland und dem übrigen Europa ca. 3 Einwohner/100.000/Jahr am Multiplen Myelom erkranken, liegt die Zahl bei US-Amerikanern kaukasischer Herkunft bei 4/100.000/Jahr und bei US-Afroamerikanern sogar bei 8/100.000/Jahr. Die niedrigste Inzidenz liegt in asiatischen Ländern wie China und den Philippinen (1/100.000/Jahr) vor. Eine Ursache für dieses West-Ost-Gefälle ist nicht bekannt [6].

Das mediane Alter, in dem das Multiple Myelom diagnostiziert wird, ist 65 Jahre, wobei eine Erkrankung vor dem 40 Lebensjahr äußerst selten ist [7]. Weltweit erkranken Männer häufiger als Frauen am Multiplen Myelom [6].

2.1.1.2 Ätiologie

Die Ätiologie des Multiplen Myeloms ist nicht geklärt. Es werden verschiedene Ursachen wie genetische und hormonale Faktoren und Umwelteinflüsse diskutiert. Chromosomale Veränderungen, z.B. Translokation 14q32, Deletion 13q14, -17p13 und 11q- Anomalien werden gehäuft beobachtet und als Ursache diskutiert [4]. Als ein Grund für Chromosomenveränderungen wird ionisierende Strahlung angenommen, da mit einer zeitlichen Latenz bei Überlebenden der Atombombenabwürfe von Nagasaki und Hiroshima eine Häufung an hämatopoetischen Erkrankungen, u.a. auch des MM, beobachtet wurde [8].

Ein erhöhtes Risiko, an einem Multiplen Myelom zu erkranken, wird für Verwandte 1.Grades von Myelompatienten diskutiert [9]. Ob es sich dabei um vererbare disponierende Faktoren wie HLA-Unterschiede, DNA-Veränderungen oder Zytokin/Hormon-Antwortmuster handelt, die zu einer malignen Entartung prädisponieren, ist derzeit nicht geklärt [6].

Die monoklonale Gammopathie unklarerer Signifikanz (MGUS) und das smoldering myeloma können mit unterschiedlicher Wahrscheinlichkeit in ein Multiples Myelom übergehen. Die MGUS geht mit einer Häufigkeit von ca. 1%/Jahr in ein Multiples Myelom über, während die Häufigkeit, dass ein SMM in ein Multiples Myelom übergeht, deutlich höher ist [1, 10, 11].

Als weitere Krankheitsursachen sind berufliche Exposition gegenüber bestimmten Substanzen wie Pestiziden oder auch Krankheitserregern wie Viren in der Diskussion, da gehäufte Erkrankungsraten bei Landwirten, Waldarbeitern, Beschäftigten in Zellstoff- und Papierverarbeitung und Druckereigewerbe beschrieben werden [12].

Als gesichert gilt, dass die maligne Entartung der Plasmazellen multifaktoriell ist. Aus diesem Grunde wurde von der International Myeloma Foundation (IMF) eine

Datenbank angelegt, die Patientendaten ihrer Mitglieder sammelt und hiermit wissenschaftliche Studien ermöglicht, um u.a. epidemiologische Zusammenhänge zu erkennen [6, 13].

2.1.1.3 Pathogenese

Ebenso wie die Ätiologie ist auch die Pathogenese des Multiplen Myeloms weitgehend unbekannt. Strukturelle chromosomale Aberationen wie die des Genlocus 14q32, der die Antikörperschwerketten kodiert, werden bei vielen Myelompatienten beobachtet [14]. Als Folge dieser Translokation mit Partner-Loci wie 11q13, 4p16, 6p21, 16q23 und 20q11 [15], welche Onkogene tragen, wird eine Überexpression derselben im weiteren Verlauf angenommen. Dies könnte zu einer Immortalisierung der malignen Myelomzellen führen [2].

Die Translokation der Schwerkettenloci scheint in einem frühen Krankheitsstadium aufzutreten, da sie auch bei über 50% der Patienten mit monoklonaler Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) und smoldering myeloma (SMM) auftritt. Es wird angenommen, dass diese Aberration beim Wechsel der IG-Schwerkette auftritt, evtl. in Assoziation mit einer Störung der Immunabwehr oder bei Entzündungen [15, 16].

Für den Erhalt des malignen Klons sind Wachstumsfaktoren wichtig wie Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor Alpha (TNF-alpha) und vasoendothelial growthfactor (VEGF). Für VEGF gilt, dass er durch Stimulation von Knochenmarkstromazellen die Produktion von IL-6 unterstützt. Zusammen mit IL-6 gilt er als ein Hauptfaktor für Tumorwachstum, Angiogenese und Schutz der malignen Zellen vor medikamenteninduzierter Apoptose [17]. IL-6 hat bei gesunden Menschen die Aufgabe der Differenzierung von B-Vorläuferzellen zu Plasmazellen, was bei malignen Plasmazellen unterbleibt [18] und lediglich zu einer Proliferation der malignen Zellen führt. Il-6 kann auch von Myelomzellen selbst gebildet werden, so dass von einem zusätzlichen autonomen Proliferationsanreiz ausgegangen werden kann. Dickkopf-1 (DKK-1), ein Inhibitor der Wnt-Signalkaskade, wird von Myelomzellen sezerniert. Dies geht mit einer

direkten Hemmung der Osteoblasten und indirekten Steigerung der Osteoklastenzahl einher [19].

2.1.2 Klinik und Diagnostik

Symptome zu Beginn der Erkrankung sind meist uncharakteristische Symptome wie beispielsweise Knochenschmerzen und treten oft erst im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium auf. Patienten berichten über Müdigkeit, Abgeschlagenheit und Schmerzen in Rücken oder Rippen, die sich in Ruhe bessern. Es treten pathologische Frakturen auf als Folge instabiler Osteolysen. Begleitend wird eine beschleunigte BSG gemessen.

Müdigkeit und Abgeschlagenheit resultieren in 2/3 der Fälle aus einer myelomassozierten Anämie [7]. Zytokine, welche von malignen Plasmazellen sezerniert werden, Verdrängung und zytotoxische T-Zellen bedingen durch Hemmung der Erythropoese diese Anämie [3].

Myelomzellen bilden ein monoklonales Protein, welches ein Immunglobulin oder einen Bestandteil dessen ist [20]. Durch Mutation der Plasmazelle kommt es zu einer abnormen Aminosäuresequenz dieses Immunglobulins oder -fragments, welches mit einem Funktionsverlust des Antikörpers einhergeht. Das Multiple Myelom wird je nach hauptsächlich gebildeter Immunglobulinschwerkettenklasse unterschieden. Eine Ausnahme stellt das sogenannte „Bence-Jones-Myelom“ dar, welches ausschließlich Ig-Leichtketten produziert. Der am häufigsten sezernierte Ig-Schwerkettentyp ist das IgG, welches von ca. 60% der Myelompatienten gebildet wird. In ca. 20% der Fälle wird IgA gebildet. IgD tritt nur in ca. 1-2% auf. In < 1% werden keine Ig-Globuline sezerniert, es handelt sich dann um ein asekretorisches Myelom

Die Ig-Produktion kann als erhöhte Proteinkonzentration im Blut/Urin nachgewiesen werden und imponiert wegen des monoklonalen Proteinanstiegs in der Immunelektrophorese als typische monoklonale Gammopathie, auch M-

Konfiguration genannt. Beim Bence-Jones- oder Leichtketten- Myelom werden ausschließlich Ig-Leichtketten produziert. Diese können im Urin, aber auch mittels neuer Messmethoden im Serum nachgewiesen werden. Bence- Jones-Proteine werden auch vom Multiplen Myelom des Subtyps IgG und IgA gebildet. Bence-Jones-Proteine fallen beim Erhitzen auf 50° Celsius aus und gehen bei weiterem Temperaturanstieg wieder in Lösung.

Insbesondere das IgD- und das Leichtketten-Myelom gehen mit einer sogenannten „Myelomniere“ einher, d.h. aufgrund der Leichtkettenablagerung in der Niere kommt es zu einer progredienten renalen Funktionseinschränkung. Die hohen Immunglobulin-Konzentrationen können zu einem Hyperviskositätssyndrom führen. Vor allem die Augen, Gehirn, Herz und Nieren sind aufgrund einer Zunahme der Blutviskosität von Durchblutungsstörungen bis hin zu Gefäßverschlüssen betroffen.

Obwohl es zu einer gesteigerten Produktion von monoklonalen Antikörpern kommt, sind diese nicht an der Immunabwehr beteiligt. Es kommt Progress der Krankheit zu einem Antikörper-Mangel, der sich in vermehrter Infektanfälligkeit äußert. Fieber ist in diesem Zusammenhang ein Infektzeichen und nicht, wie bei Leukämien oft vorkommend, ein unspezifisches Begleitsymptom [7]

Bei Verdacht auf Vorliegen eines Multiplen Myeloms werden üblicherweise konventionelle Röntgenaufnahmen des Achsenskeletts und der großen Röhrenknochen („Pariser Schema“) angefertigt. Eine alternative Methode ist das Ganzkörper-MRT, welches in jüngerer Zeit häufiger zur Anwendung kommt. Es zeigen sich radiologisch typischerweise herdförmige Osteolysen, welche als entkalkte Löcher in markhaltigen Knochen imponieren („Schrotschussschädel“), auffallen kann aber auch eine diffuse Osteoporose. Ursache für die Knochendestruktion sind Zytokine, welche von malignen Plasmazellen sezerniert werden. Die Zytokine DKK-1, TNF-alpha und IL-1 β fördern die Osteoklastenaktivität, während die Osteoblastenaktivität gehemmt wird [3].

Laborchemisch lässt sich infolge der Knochendestruktion oft eine Hyperkalzämie nachweisen, welche u.a. zu gastrointestinalen Symptomen, Muskelschwäche, Erregungszuständen und einer weiteren Verschlechterung der Nierenfunktion führt. 50% aller Myelompatienten entwickeln aufgrund der gleichzeitig bestehenden exzessiven Filtration von Leichtketten und anderer Proteine und Amyloidablagerungen eine Glomerulonephritis und im Verlauf ihrer Erkrankung ein Nierenversagen [21].

Ein wichtiger prognostischer Parameter für die Tumoraktivität ist das β_2 -Mikroglobulin im Serum, welches die Leichtkette des HLA Klasse I-Komplexes darstellt und auf der Oberfläche jeder Zelle zu finden ist. Hohe Konzentrationen an β_2 -Mikroglobulin gehen mit einem Tumorprogress und demnach auch mit einer schlechten Überlebensprognose einher [4]. Als zunehmend wichtige Diagnostik wird die molekulargenetische Testung angesehen, da chromosomale Anomalien wie eine Deletion 13 als prognostisch negativer Faktor gilt [22].

Erst das Vorliegen mehrerer Befunde wie Osteolysen, eine Gammopathie und eine Plasmazellinfiltration von >10% mit intramedullären oder extramedullären Herden führen zur Diagnose eines Multiplen Myeloms [20]. Anhand der Ergebnisse findet mittels der Durie-Salmon-Klassifikation oder des International Staging Systems (ISS) (siehe Tabelle 1 in Anhang 1) eine Einteilung in ein Erkrankungsstadium I-III statt. Daraufhin können Stadien gerechte therapeutische Maßnahmen eingeleitet und die erwartete Überlebensprognose ermittelt werden (siehe auch Kapitel 1.1.4). Eine eingeschränkte Nierenfunktion ist ein ungünstiger Faktor, so dass die Stadien, je nach Vorliegen einer Nierenbeteiligung, die Zusätze A für normale und B für eingeschränkte Nierenfunktion erhalten.

2.1.3 Therapie und neue Therapieansätze

Im Erkrankungsstadium I nach Durie und Salmon und bei asymptomatischen Patienten wird zunächst keine spezifische Therapie begonnen, sondern engmaschig

kontrolliert. Sobald es zu einem Krankheitsprogress oder einer Nierenbeteiligung kommt, werden therapeutische Maßnahmen eingeleitet. Je nach Alter, Vorerkrankungen und gesundheitlichem Zustand des Patienten werden unterschiedliche Therapieregimes angesetzt.

Grundlegend zu klären ist, ob eine Stammzelltransplantation in Frage kommt, denn danach richtet sich die Auswahl der Chemotherapeutika.

Eine chemotherapeutische Behandlung mit Melphalan in Kombination mit Prednisolon (MP- oder Alexanian-Schema) oder Vincristin, Adriamycin (Doxorubicin) und Dexamethason (VAD-Schema) waren jahrzehntelang die führenden Therapien nichttransplantationfähiger Myelompatienten [23, 24]. Da Melphalan stark stammzelltoxisch ist, wird es vor einer Stammzellentnahme vermieden.

Neuere Medikamente wie der Proteasomen-Inhibitor Bortezomib oder die antiangiogenetischen und immunmodulierenden Thalidomid-Analoga werden heute als Kombinationspartner mit Steroiden und Cyclophosphamid oder zusätzlich z.B. zum Melphalan/Prednisolon-Schema bevorzugt und zeigen z.T. hervorragende Ansprechraten [25, 26].

Bei jungen Patienten und gutem Allgemeinzustand kommt eine Hochdosistherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation in Frage. Eine autologe Stammzelltransplantation ist bei Patienten unter 65 Jahren oder über 65 Jahre bei gutem Allgemeinzustand die Behandlung der Wahl [27].

Die allogene Stammzelltransplantation bietet die Chance einer Heilung bzw. einer Langzeitremission aufgrund des Graft-versus-myeloma-Effekts. Dieser wird durch die transplantierten Spenderlymphozyten, d.h. eine immunologische Reaktion, die zum Absterben maligner Plasmazellen führt, erreicht [28]. Die Verpflanzung von immunkompetenten Zellen birgt jedoch auch das Risiko einer Graft-versus-host-Erkrankung (GvHD), bei der die Spenderlymphozyten das gesunde Gewebe des Stammzellempfängers angreifen. Neben der GvHD stellen Infektionen ein großes

Problem der allogenen SZ-Transplantation dar. Die behandlungsassoziierten Nebenwirkungen gehen mit einer Mortalität von bis zu 40% einher [29]. Dennoch wird gerade bei jungen Patienten in gutem Allgemeinzustand eine allogene Stammzelltransplantation angestrebt, da die Überlebenschancen bei alleiniger Chemotherapie nach wie vor nicht sehr gut sind. Insgesamt ist allerdings auch durch eine Chemotherapie eine Langzeitremission möglich, das mediane Überleben beträgt 62 Monate bei Hochdosis-Chemotherapie, bei konventioneller Chemotherapie beträgt es 44 Monate [30]. Die HD-Therapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation (SZT) ist derzeit der allogenen SZT vorzuziehen, da die behandlungsassoziierten Nebenwirkungen bei der allogenen SZT die Chance auf eine mögliche Heilung nicht aufwiegen [29].

2.1.4 Prognose

Die Prognose für einen Patienten mit Multiplen Myelom ist sehr unterschiedlich, da sie von mehreren Faktoren abhängig ist. Je nach Risikofaktoren, wie Alter, Chromosomenanomalien, Komorbiditäten u. a. kann mit einer Überlebenszeit von weniger als 6 Monaten bis mehr als 10 Jahren gerechnet werden [31]. Es wird aufgrund verbesserter therapeutischer Ansätze ein Therapieansprechen bei 70-90% der Patienten erzielt und bis zu 50% erreichen eine komplette Remission. Doch kommt es früher oder später bei allen Patienten zu einem Versterben, sei es durch Krankheitsprogression oder Komplikationen der Erkrankung oder Therapie.

Zur Einstufung des Schweregrads der Erkrankung, und um eine Prognose bezüglich der verbleibenden Lebenszeit geben zu können, besteht seit 30 Jahren eine klinische Einteilung der Erkrankung in Stadien nach Durie und Salmon [32]. In Tabelle 1 (in Anhang 1) sind die Faktoren dargestellt, nach denen die Erkrankung eines Patienten in drei Stadien eingeteilt werden. Eine Nierenbeteiligung ist ein prognostisch ungünstiger Faktor [33]. Entsprechend wird

je nach Höhe des Kreatininwerts eine zusätzliche Unterteilung des Stadiums in Untergruppe A und B vorgenommen, was für die Prognose mitentscheidend ist.

In der Praxis erwies sich das für die Klassifikation notwendige Ganzkörperröntgen als schwierig, da es von einer erfahrenen Befundung abhängig ist, um eine eindeutige Aussage treffen zu können. So entschloss sich 2005 die International Myeloma Working Group zu einer Erneuerung der Durie-Salmon-Einteilung, auch um wichtige prognostische Faktoren wie das β_2 -Mikroglobulin und das Serumalbumin in den neuen Internationalen Staging Score (ISS) aufzunehmen und diesen zu vereinfachen [31].

In der vorliegenden Untersuchung erfolgt die Stadieneinteilung nach der Durie- und-Salmon-Klassifikation von 1975.

2.2 Tumorimmunologie

Die Therapie des Multiplen Myeloms erreicht momentan eine mediane Lebensverlängerung von 3 Jahren. Dies zeigt, dass andere Therapieoptionen dringend benötigt werden. Ein vielversprechender Ansatz ist die Aktivierung der körpereigenen Immunabwehr zur Bekämpfung von malignen Zellen. Hierzu wird über eine Aktivierung von T-Zellen eine gezielte Immunreaktion ausgelöst. Wichtige Fragen dabei sind: Wie erreicht man eine Immunantwort des Körpers auf eine entartet proliferierende Zellpopulation? Welche Oberflächenantigene oder intrazellulären Antigene sind tumorspezifisch und könnten als Zielstrukturen für T-Zellen fungieren? Wo werden sie exprimiert? Wichtig ist, zu klären, ob unerwünschte Wirkungen wie Autoimmunreaktionen provoziert werden können, und ob es individuelle Schwankungen in der Expression der T-Zell-aktivierenden Antigene gibt.

2.2.1 T-Zellbasierte Immuntherapie

2.2.1.1 Prinzipien T-Zellbasierter Immunaktivierung

T-Lymphozyten spielen eine Schlüsselrolle in der körpereigenen Immunantwort. Sie werden durch Antigene, die sich auf Zelloberflächen antigenpräsentierender Zellen (APC) befinden, aktiviert. Eine T-Zell-Aktivierung wird durch unterschiedliche Mechanismen ausgelöst. In Abhängigkeit vom Ursprung des Antigens wird es über den Major histocompatibility complex (MHC), auch humanes Leukozytenantigen (HLA) genannt, der Klasse I immunkompetenter Zellen präsentiert. Das HLA-System befindet sich auf Zelloberflächen nahezu aller Zellen und wird auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 kodiert[3].

Zur Präsentation aller intrazellulär produzierten Proteinarten, z.B. intrazellulärer Viren, Bakterien oder mutierte Tumorproteine auf der Zelloberfläche, werden diese kontinuierlich von Proteasomen in Antigenpeptide auf eine Länge von 8 - 10 Aminosäuren verkürzt. Spezifische Transportproteine (Transporters associated with antigen processing = TAP) schleusen die Aminosäureabschnitte in das Endoplasmatische Retikulum (ER). Hier wird mit Hilfe von β_2 -Mikroglobulin das komplexe HLA Klasse I Molekül produziert und mit den passenden Antigenpeptiden beladen und bindet dann an den Zelloberflächen immunkompetenter CD8⁺T-Lymphozyten [34].

Alle Peptide, die über Phago- oder Endozytose internalisiert wurden, z.B. Bakterien, werden in Endosomen aufgenommen und verdaut. Die Endosomen fusionieren mit HLA Klasse II- Molekülen. Diese Komplexe werden an der Zellmembran CD 4⁺ T-Lymphozyten gebunden und lösen eine Aktivierung der T-Lymphozyten aus [3].

Im Zuge der Aktivierung differenzieren sich die T-Lymphozyten in CD4⁺- oder CD8⁺-Zellen. Die CD4⁺-Zellen werden auch T-Helferzellen genannt, da sie über

Hormon- und Interleukinsekretion zu einer Aktivierung von anderen immunkompetenten Zellen wie Makrophagen, zytotoxischen T-Zellen und B-Zellen führen und somit eine Verstärkung der Immunantwort bewirken.

Die CD8⁺- oder zytotoxischen T-Zellen töten als „fremd“ erkannte Zellen direkt durch Perforine, d.h. zellwandauflösende Enzyme, ab [3]. Zur Kontrolle der T-Zellantwort wirkt eine Subpopulation der CD4⁺/CD25⁺-, auch regulatorische T-Zellen (Treg) genannt, limitierend auf die T-Immunreaktion durch Sekretion proliferations-supprimierender Zytokine und über Zell-Zell-Kontakte [35]

2.2.1.2 Prinzipien der T-Zellaktivierung als Therapieoption

Die Aktivierung der spezifischen T-Zellantwort ist über verschiedenen Herangehensweisen untersucht worden. Eine unspezifische Aktivierung erreicht die immunogene Kostimulation durch Bakterien. Hierbei zeigt sich die Instillation von Bacillus Calmette-Guerin (BCG) als effektiv bei Blasenkrebs im Carcinoma in situ-Stadium (CIS), welches wahrscheinlich durch eine unspezifische Entzündungsreaktion eine zusätzliche T-Zell-Aktivierung über antigen-präsentierende Zellen auslöst [42] [3]. Eine weitere therapeutische Option stellt die lokale Instillation von Tumor-Lysaten dar. Unter der Vorstellung, unbekannte Antigene könnten eine Immunantwort in Tumorgewebe auslösen, war sie eingesetzt worden, hat sich jedoch als ineffektiv erwiesen.

Im Zusammenhang mit Tumorrezidiven nach allogener Stammzelltransplantation haben sich Donor-Lymphozyten Infusionen (DLI) über Verstärkung des graft-versus-leukemia-Effekts bei Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie als effektiv erwiesen [36]. Dabei erkennen zytotoxische T-Lymphozyten des Spenders Epitope im Tumorgewebe und lösen die Zerstörung der malignen Zellen aus. Beim Multiplen Myelom beobachtet man nach allogener Stammzelltransplantation (SZT) ebenfalls diesen Effekt („graft-versus-myeloma-Effekt“). Die Gabe von DLI nach allogener SZT führt zu einem graft-versus-myeloma-Effekt, mit dem ein verbessertes overall survival und progression free survival verbunden ist [37].

Neben der dieser Form der Stimulation gibt es weitere Ansätze zur spezifischen T-Zell-Aktivierung. Eine Möglichkeit stellen monoklonale Antikörper (MAK) dar. Catumaxomab, welches ein trifunktionales Anti-CD3-anti-EpCAM MAK ist, erreicht über CD3 eine T-Zellaktivierung. Es wird bei fortgeschrittenem Ovarial-Karzinom in Phase I/II-Studien getestet [40]. Durch aktive Impfung eines Spenders mit von Myelomzellen gebildeten Immunglobulinen oder-Fragmenten können spezifische CD4+-T-Zellen nachgewiesen werden. Diese CD4+-T-Zellen lösen bei einem Myelompatienten gleichen Myelomsubtyps eine spezifische T-Zellantwort aus, die zur Reduktion der Myelomzellen führt [38].

Die Idee der T-Zellaktivierenden tumorassoziierten Antigene ist im Grunde nicht neu. Schon vor 27 Jahren konnte gezeigt werden, dass die Injektion von Moloney sarcoma leukemia virus (MSLV) bei Mäusen zu einem starken Anstieg der zytotoxischen T-Lymphozyten und gleichzeitig einer Schrumpfung des Tumorgewebes führte [39]. Eine neue Herangehensweise ist es, Tumorantigene über eine künstlich produzierte antigenpräsentierende Zelle zu präsentieren, die durch HLA I-Aktivierung eine T-Zellantwort hervorrufen [41]. Dies ist sinnvoll, da Tumorzellen häufig HLA-I-oder kostimulatorische Moleküle fehlen, die für eine T-Zellaktivierung notwendig sind. Wichtig für die T-Zellaktivierung sind die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Bei Fehlen von CD80 und CD86 können diese über Modifikation des Gens B7 Tumorzellen hinzugefügt werden [3]. Im folgenden Kapitel wird detaillierter auf die unterschiedlichen tumorassoziierten Antigene eingegangen.

2.2.2 Tumorassoziierte Antigene

Tumorassoziierte Antigene (TAA) sind Strukturen, die von malignen Zellen über die humanen Leukozytenantigene (HLA) I in Form von Peptiden auf der Zelloberfläche präsentiert und von T-Zellen erkannt werden. Das Besondere an Tumorantigenen ist, dass sie im Gegensatz zu normalem körpereigenen Gewebe in der Lage sind, eine spezifische T-Zellantwort gegen die sie exprimierenden Zellen

auszulösen. Es werden im Folgenden die wichtigsten Klassen von Tumorantigenen vorgestellt:

2.2.2.1 Überexprimierte Antigene

Diese TAA werden von Tumorzellen solider Tumoren sehr viel häufiger und/oder stärker exprimiert als von normalem Gewebe, in denen sie jedoch auch vorkommen. Diese schwache Expression in gesundem Gewebe verhindert eine T-Zell-Aktivierung, während in Tumorgewebe eine aktivierende Konzentration erreicht werden kann [43]. Beispiele für überexprimierte Antigene sind Epidermal growth factor receptor (EGFR), Human epidermal receptor (HER), Human epidermal receptor 2/neu (HER2/neu), HER 3 und 4, Carcinoembryonales Antigen (CEA) und Epithelial cellular adhesion molecule (Ep-CAM).

EGFR ist ein Wachstumsfaktor auf Geweben von Lunge, Kolon und Rektum, Nieren, Brust, Ovarien u.a.. Seine Aufgaben umfassen Proliferation, Differenzierung und Überleben der Zelle. Mit einer Überexpression oder Mutation des Rezeptors sind maligne Entartung und schlechte Überlebensprognose verbunden [44]. EGFR dient auch als Zielstruktur in der Antikörpertherapie. Antagonisierende monoklonale Antikörper gegen EGFR, unter dem Namen Cetuximab in klinischer Anwendung, führen zu einer down-regulation des Rezeptors und somit zur Unterdrückung der Proliferation und Angiogenese und Induktion von Apoptose in den malignen Zellen [45].

HER2/neu ist in ca 30% der invasiven Mamma-Ca-Patientinnen überexprimiert und geht mit einer schlechten Prognose einher [44]. Trastuzumab als Monotherapie, ein monoklonaler Antikörper gegen HER2/neu, führt zur Proliferationsinhibition und damit zu einer Verzögerung der Krankheitsprogression bei 15% der Patientinnen mit metastasiertem Mamma-Ca [46].

Weitere wichtige überexprimierte Antigene sind Vascular endothelial growth factor (VEGF), welches für die Angiogenese in soliden Tumoren notwendig ist

und das CEA, welches in epithelialen Tumoren, wie Kolorektales CA, Lungen-Ca und Ovarial-Ca vorkommt, ebenso wie in normalem Gewebe, wo es luminalseitig des Darms exprimiert wird [44].

2.2.2.2 Tumorspezifische Antigene

Tumorspezifische Antigene oder auch „Neoantigene“ entstehen aufgrund von Punktmutation in normalem Gewebe, z.B. β -Catenin, CDK-4, im Zuge neoplastischer Veränderung. Aufgrund der individuellen Mutation entstehen auch Antigene, die für den Tumor spezifisch sind [43]. Da sie einzig auf Tumorgewebe exprimiert werden, wären sie eigentlich ideale Kandidaten für eine Immuntherapie, jedoch macht sie ihre individuelle Struktur ungeeignet für die standardisierte Anwendung.

2.2.2.3 Differenzierungsantigene

Diese TAA sind sowohl in Tumorgewebe als auch in gesundem Gewebe zu finden. Beispielsweise in Melanozyten und in Melanomen sind sie an der Synthese von Melanin beteiligt, z.B. Tyrosinase, Melan-A/MART-1, gp100 [43]. Für sie konnten spezifische T-Zellrezeptoren gefunden werden. Gut untersucht und therapeutisch genutzt, werden die Oberflächenrezeptoren CD20, CD22 und CD30, welche von Non-Hodgkin-Lymphomen exprimiert werden. So wird Rituximab, ein monoklonaler Antikörper, an den CD20-B-Zellrezeptor gebunden und aktiviert die B-Zelllyse durch Komplement, spezifische Antikörper oder natürliche Killerzellen [47]. Ein weiteres Differenzierungsantigen ist Mesothelin, welches sowohl auf gesundem als auch in überexprimierter Form auf Mesotheliomen, Ovarial-Ca und Pankreasadeno-Ca gefunden wird. Seine biologische Funktion ist bis jetzt nicht bekannt. In ersten klinischen Studien wird ein rekombinantes Mesothelin-Immunotoxin an Patienten mit mesothelinexprimierenden Tumoren überprüft [48].

2.2.2.4 Onkofetale Antigene

Diese TAA werden sowohl in fetalem, als auch in malignem und gesundem Gewebe in unterschiedlicher Stärke exprimiert. Ein Vertreter der onkofetalen Antigene ist das Alpha-Fetoprotein, welches zur Diagnostik und als Verlaufsparmeter bei Hepatozellulärem Karzinom und Keimzelltumoren im Serum bestimmt wird. Onkofetale Antigene werden auch für eine spezifische Immuntherapie in Erwägung gezogen [43].

2.2.2.5 Virale Antigene

Für einige Viren wurde eine Assoziation mit Tumorerkrankungen nachgewiesen, so z.B. für Epstein Barr Virus (EBV) mit Burkitt- Lymphom oder Hepatitis B und C mit dem Hepatozellulären Karzinom. Virale Antigene werden auf assoziierten Tumorzellen exprimiert und könnten als Vakzinierungsantigene fungieren.

2.2.2.6 Cancer/Testis-Antigene

Der Name Cancer/Testis-Antigene leitet sich von den Geweben ab, auf denen diese TAA nachweisbar sind. Diese intrazellulären Proteine werden von Tumor- und Testis- und/oder Plazentagewebe exprimiert und können eine humorale und zelluläre Immunantwort auslösen [49]. Nach der Definition dürfen CT-Antigene in nicht mehr als in zwei gesunden Gewebearten nachweisbar sein [50]. Von den 44 CT-Antigenen werden 22 auf dem X-Chromosom codiert, z.B. MAGE-A, SSX, NY-ESO-1, 18 Antigene werden auf Autosomen codiert, z.B. LIPI, ADAM2, LDHC, BAGE u.a. und bei 4 Antigenen ist der Genort weiterhin unbekannt, z.B. PAGE-5, CT18.

Die Funktion der CT-Antigene ist weitestgehend unbekannt. Im Testisgewebe werden CT-Antigene in allen Phasen der Spermatogenese exprimiert, wobei die einzelnen CT-Antigene phasenspezifisch zu sein scheinen. Für einzelne CT-Antigene sind Aufgaben in der Gametogenese identifiziert worden, z.B. für

SYCP1, welches die Chromosomenpaarung in der Meiose beeinflusst [51]. Im normalen Zellzyklus wird SYCP1 nach der meiotischen Prophase degradiert, wohingegen es in Tumorzellen nicht zellzyklusgebunden exprimiert wird. Bei anderen CT-Antigenen ist die Funktion eher vage bekannt, z.B. spiele MAGEA3 eine wichtige Rolle in Transkriptionsprozessen [52].

Als ein Schlüsselmechanismus für eine CT-Antigenexpression wurde eine Hypo- oder Demethylierung der DNA und insbesondere der Antigen-Promotorregion beschrieben [53]. Methylierung verhindert De Smet et. al. zu Folge die Transkription der Antigen-DNA und damit die Expression von CT-Antigenen [54].

Auf gesundem Hoden- bzw. Plazentagewebe führen CT-Antigene deshalb nicht zu einer Immunreaktion, da diese Gewebe keinerlei HLA I-Expression aufweisen und durch Blut-Hoden- bzw. Plazenta-Schranke diese Gewebe geschützt sind. Gefunden wurden die ersten CT-Antigene durch autologe Typisierung, bei der kulturierte gesunde Zellen und Tumorzellen von einem Patienten mit dessen T-Zellen und Antikörpern konfrontiert wurden [55]. Zunächst wurden nach dem Prinzip der autologen Typisierung weitere CT-Antigene gefunden, bis man dazu überging, mit Hilfe von Antikörpern cDNA-Strukturen von Tumoren zu überprüfen (SEREX). Mittlerweile sind über 40 CT-Antigene identifiziert. Ihre Funktion ist bisher nicht geklärt, es gibt Hinweise, dass sie die Zelldifferenzierung unterdrücken, mit einer erhöhten Resistenz gegenüber Chemotherapeutika wie Doxorubicin und Paclitaxel einhergehen oder wie die MAGE-Antigene apoptoseverhindernd wirken [50].

Da keine Nomenklatur der CT-Antigene nach Funktionen möglich ist, wurden sie nach dem Tumorgewebe, auf dem sie das erste Mal gefunden wurden, benannt, z.B. Melanoma associated antigen (MAGE), oder dem Ort der Erstbeschreibung, z.B. New York esophageal squamous cancer antigen 1 (NYESO1).

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

Bei dem verwendeten Untersuchungsmaterial handelt es sich um Myelomzelllinien, Knochenmarkproben und periphere Stammzellen (PBSC). Sie werden im Folgenden näher erläutert.

3.1.1 Myelomzelllinien

Es werden 11 immortalisierte Zelllinien von Myelompatienten verwendet, die eine Plasmainfiltration von 100% aufweisen. Bei ihnen handelt es sich um die Zelllinien IM9, U-266, EJM, MOLP-8, KMS-12-BM, RPMI-8226, NCI-H929, OPM-2, LP-1 (erhalten vom DSMZ, Braunschweig), SK-007 und Brown, multiple myeloma (erhalten vom Ludwig Institute for Cancer Research, New York, USA).

3.1.2 Knochenmark der Patienten

Für die Untersuchungen wird das Knochenmark von 55 Patienten mit Multiplem Myelom (MM) verwendet. Die Proben sind den Patienten im Knochenmarktransplantationszentrum des Universitätsklinikums Eppendorf (UKE), Hamburg im Rahmen diagnostischer Verlaufsuntersuchungen entnommen worden. Die Proben werden routinemäßig als Knochenmarkaspiration aus dem Beckenkamm entnommen und ohne Zwischenlagerung direkt im Labor weiterverarbeitet.

Es gibt schriftliche Einverständniserklärungen der Patienten zur Entnahme und wissenschaftlichen Nutzung des Knochenmarks und PBSC (Aufklärung und

Einverständniserklärung im Anhang III). Ein positives Votum der Ethikkommission der Hamburger Ärztekammer zur Studie liegt vor.

3.1.3 Knochenmark der Kontrollgruppe

Bei den Proben der gesunden Spender handelt es sich um gesamtes Knochenmark (BMMC) und durch Leukapherese gewonnene periphere Blutstammzellen (PBSC). Diese Proben wurden für Diagnostik und therapeutische Transplantationen im Stammzelltransplantationszentrum des Onkologischen Zentrums des UKE Hamburg entnommen.

Neben den Knochenmarkproben und dem PBSC der 20 Knochenmarkspender dienen 5 Proben mit CD34+Stammzellen (Progenitorzellen) als weitere Negativkontrolle. Die CD34+Progenitorzellen wurden durch Leukapherese aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern gewonnen. Die Proben erhielten wir aus der Klinik für experimentelle Medizin des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg. Schriftliche Einverständniserklärungen der Spender zur Entnahme und wissenschaftlichen Nutzung der Proben liegen vor.

3.1.4 Einschlusskriterien bei Patienten und Knochenmarkspendern

Bei den MM-Patienten waren Einschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie die Diagnose eines Multiplen Myeloms und eine Plasmazellinfiltration von über 10% im Knochenmark zum Zeitpunkt der Knochenmarkpunktion.

Bei den Knochenmarkspendern galt als Einschlusskriterium, dass sie zum Zeitpunkt der Knochenmarkentnahme gesund sein mussten. Sämtliche Knochenmarkspender sind Spender für routinemäßig stattfindende therapeutische Knochenmarktransplantationen.

3.1.5 Studiendesign

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine experimentelle Studie zum Nachweis von CT-Antigenen im Knochenmark von Myelompatienten.

Zur Überprüfung, ob generell eine Genexpression besteht, wurden die CT-Antigene zuerst an Myelomzelllinien getestet. Im zweiten Schritt findet die Testung an Knochenmark von Myelompatienten und Knochenmarkspendern statt.

Knochenmark und CD34+-Stammzellen der Spender werden als Negativkontrollen verwendet. Da es sich bei allen Proben um Knochenmarkproben bzw. PBSC handelt, welche primär zur Diagnostik bzw. Therapie entnommen wurden und nicht für die vorliegende Studie, erfolgt der Einschluss der Spender und Patienten konsekutiv und kann nicht in Bezug auf Alter, Geschlecht oder Krankheitsstadium beeinflusst werden. Das Studiendesign ist aus diesem Grund ausdrücklich nicht auf unmittelbare Vergleichbarkeit der Gruppen ausgelegt.

Zur Untersuchung der CT-Antigenexpression in Myelomzelllinien wurden 19 CT-Antigene ausgewählt. Es stellte sich im Laufe der Untersuchung heraus, dass einzelne Antigene wie beispielsweise SYCP1 gar nicht in den Myelomzelllinien exprimiert werden. Diese Antigene wurden deshalb nicht an den Knochenmarkproben der Patienten überprüft.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellseparation

Ziel des ersten Arbeitsschrittes ist die Auftrennung der mononukleären Zellen aus Knochenmarkproben gemäß ihrer Dichte. Dazu wird das Knochenmark 1:1 mit Ficoll Paque verdünnt, welches aufgrund seines hohen spezifischen Gewichts zu einer Anreicherung und Verklumpung der Erythrozyten und neutrophilen

Granulozyten am Boden des Röhrchens führt. Damit findet eine Dichtezentrifugation statt, wobei mononukleäre Zellen wie Monozyten, Lymphozyten, Progenitorzellen und Blasten nicht durch Ficoll hindurchtreten und als schmaler Ring (Interphase) oberhalb des Ficoll Paque sichtbar werden. Nach Zentrifugation werden die Zellen des Interphaserings vorsichtig abpipettiert und mit Phosphate-buffered saline (PBS-Puffer) gewaschen. Das Waschen ist notwendig, da Ficoll-Paque toxisch auf die Zellen wirkt.

Nachdem das PBS-Zellgemisch zentrifugiert wurde, gibt man das erhaltene Zellpellet unter Zugabe von 2-β-Mercaptoethanol, in einer Verdünnung von 1:100, in den Erythrozyten-Lysis-Puffer, mit dessen Hilfe die verbliebenen Erythrozyten lysiert werden. Dieses Gemisch wird noch einmal mit PBS-Puffer gewaschen. Dann werden 10µl davon abpipettiert, die enthaltenen Zellen mit Trypan blue solution 0,4% angefärbt und unter dem Mikroskop gezählt. Anschließend wird RLT-Puffer zugefügt, um die mononukleären Zellen zu lysieren. Bis zur weiteren Verwendung wird das Lysat bei -80° C eingefroren. (Liste aller verwendeter Materialien im Anhang 1, Tabelle 2)

3.2.2 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation werden die Zellen durch einen QIA-Shredder unter Zufügen von 70%-igem Ethanol zerstört. Mittels des kommerziell erhältlichen RNAeasy Mini Kit wird die RNA isoliert. Hierzu wird das erhaltene Gemisch aus mRNA und Alkohol auf eine Membran gegeben und in mehreren Schritten gewaschen, um den Alkohol zu entfernen. Die gewonnene RNA bindet an die Membran und wird durch Ribonuklease- (RNAse) und Desoxynuklease- (DNAse)freies Wasser gelöst und nach Zentrifugation in ein Eppendorf-Röhrchen pipettiert. Die Menge der gewonnenen RNA wird mittels Spektrometer gemessen.

3.2.3 cDNA-Gewinnung

Da RNA weniger stabil ist und anfälliger für enzymatischen Abbau als Doppelstrang-DNA, wird die gewonnene RNA unmittelbar in cDNA umgeschrieben. Dazu werden 2µg der isolierten RNA einem Ansatz aus Puffer (10xPuffer), MgCl² (beide Promega, Mannheim), Random-Primer, dNTP (dATP,dGTP,dUTP,dCTP), RNAsin und AMV-reverse transkriptase zugegeben. Das reverse transkriptions (RT-) Programm des Eppendorf master cyler gradient läuft 45 Minuten bei 42° C und für 5 Minuten bei der Enzymaktivierungstemperatur von 95° C. Der Random-Primer gibt durch Anlagerung am 3`-Ende der Matrize (mRNA) das Startsignal zur Transkription. Die DNA-Polymerase (reverse transkriptase) synthetisiert aus dem mRNA-Einzelstrang eine komplementäre Doppelstrang-cDNA.

3.2.4 qualitative PCR

Für die qualitative (RT-) PCR werden kommerziell erhältliche Primer für 15 verschiedene Cancer/Testis-Antigene verwandt (siehe Tabelle 3 in Anhang 1). Die Anlagerungs- oder Annealingtemperatur in der Tabelle entspricht in einigen Fällen nicht der Temperatur, die in den entsprechenden Originalarbeiten angegeben wurde, da sich diese in der vorliegenden Studie als nicht effektiv herausstellten wie z.B. bei SSX3, bei dem eine Temperatur von 60° C besser war als 65° C [56].

Zur Untersuchung auf CT-Antigenexpression wird 1 µl cDNA amplifiziert mit einem Mix aus 2 mM MgCl², 10x Puffer, 10nM dNTP (dATP, dTTP, dCTP,dGTP), 2 µM Primer (Vorwärts- und Rückwärtsprimer), 2U AmpliTaqGold und RNase, DNasefreies Wasser. Dies wird in eine 0,2ml-Tube-Kette pipettiert und im Eppendorf Mastercycler gradient amplifiziert:

Zuerst werden einmalig für 10 Minuten bei 95° C die Proteine denaturiert. Im nächsten Schritt wird für 1 Minute bei 95° C der DNA-Doppelstrang

aufgeschmolzen, und die beiden komplementären Stränge weichen auseinander. Beim darauf folgenden Schritt lagern sich die spezifischen Primer am 3`-Ende an die Einzelstränge des abzulesenden Abschnitts und bilden somit das Startsignal für die Taq-Polymerase und andere Enzyme. DNA-Polymerasen lesen die DNA-Sequenz ab und sorgen für die Anlagerung von entsprechenden Nukleotiden (dNTP). Dieser Anlagerungsschritt dauert 1 Minute und benötigt die für die Primer notwendige Anlagerungstemperatur (Annealingtemperatur). Anschließend werden bei 72° C in der Elongationszeit die neuangelagerten Basentriplets verknüpft, und es kommt zu einer Verlängerung des abgelesenen Abschnitts. Diese drei Schritte werden 35 Mal wiederholt, und in der letzten Phase wird 6 Minuten bei 72° C der Vorgang abgeschlossen (Termination und Freisetzung).

1x TAE-Puffer wird in einer Verdünnung 1: 50 mit 50x TAE-Puffer hergestellt. Zur Herstellung von 500ml 50x TAE-Puffer benötigt man 121 g Trisbase, welche mit Aqua dest. auf 200 ml aufgefüllt wird. 28,55 ml Essigsäure und 50 ml EDTA (0,5M EDTA, pH 8) werden dazugegeben und auf 500ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

Das PCR-Amplifikat wird auf 1,5%-Tris-Acid-EDTA-(TAE-)Agarose-Gel aufgetragen und bei 120 Volt Spannung in einer Gelelektrophorese-Kammer (Bio-Rad DNA-Subcell und Model 1000/500 power supply) separiert. Als Laufpuffer dient 1x TAE-Puffer. Mittels eines Ethidiumbromid-Bads (Invitrogen) wird das Gel gefärbt und mit Hilfe von UV-Licht die Banden sichtbar gemacht. Mit einer charge-coupled device-Kamera (Appogene imager) wird das Ergebnis fotografiert und archiviert.

Alle verwendeten cDNA-Proben wurden mit Hilfe des Haushälter-Gens GAPDH auf ihre Qualität überprüft. Als Positivkontrolle dient cDNA von humanem Testisgewebe (Ambion, Austin, USA), die aus RNA gewonnen wurde. Als Negativkontrolle wird RNase- und DNasefreies Wasser (Sigma, Steinheim) verwendet.

Es wird eine deutlich sichtbare Bande mit der dem Antigen entsprechenden Produktlänge bei negativer Wasserkontrolle als positiv gewertet. Keine sichtbare

Bande bedeutet ein negatives Ergebnis. Im Falle eines schwachen PCR-Produkts wird die PCR unter den gleichen technischen Bedingungen wiederholt. Weicht im zweiten Versuch das Ergebnis ab, wird die PCR noch einmal wiederholt, und bei einer Konstellation von zuerst einem positiven und im zweiten und dritten Durchlauf negativen Ergebnis wird das negative Ergebnis anerkannt. Ein eindeutig positives bzw. negatives Ergebnis wird als solches anerkannt.

3.2.5 Sequenzierung

Das unter dem UV-Licht fluoreszierende PCR-Produkt wird aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) das PCR-Produkt aufgereinigt. Zur Herstellung des Markierungsansatzes wird Folgendes benötigt: Das kommerziell erhältliche BigDyeKit V.1.1, darin enthalten 2,5%-Puffer, dNTP, BigDye, Taq und Vorwärts- und Rückwärtsprimer, die auf 1:10 mit RNase- und DNasefreiem Wasser verdünnt wurden. Der Mix wird mit 6µl des aufgereinigten PCR-Produkts im Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg) amplifiziert. Zum Ausfällen gibt man dem Sequenzier-Ansatz 2µl Natrium-Acetat und 60µl 100%- Ethanol (J.T. Baker, Deventer, Niederlande) zu. Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm (Biofuge 13 R, Heraeus Sepatech) für 30 Minuten wird der Überstand abpipettiert und 70%-Ethanol zugefügt. Durch weitere Zentrifugation wird das Produkt in der Speedvac (Hetovac, Intermed CT60 e) getrocknet und im ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) auf Glaskapillaren aufgetragen. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung wandern die Moleküle von der Kathode zur Anode. Aufgrund der Größenunterschiede legen die Moleküle unterschiedlich weite Strecken zurück und ergeben die spezifische DNA-Sequenz, welche mit Hilfe von Laserlicht sichtbar gemacht wird.

3.2.6 Statistik

Mit Hilfe von SPSS 11 werden die statistischen Berechnungen durchgeführt. Die Korrelation zwischen dem Geschlecht und Antigen-Anzahl wird mit dem T-Test berechnet. Zur Berechnung des Zusammenhangs zwischen nichtparametrischen Faktoren wie der Knochenmarkinfiltration, Schwerketten-Isotyp, Alter, Stadium und Laborparametern mit der Anzahl an CT-Antigenen wird der Spearman-Rho-Test angewandt. Der mögliche Zusammenhang zwischen Überleben und Auftreten bestimmter CT-Antigene wird mit Hilfe des log-rank- Tests überprüft und anhand der Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Co-Expressionen werden mittels Kendall-Tau-b-Test auf ihren Zusammenhang überprüft.

Eine Korrelation wird als signifikant angesehen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p=.05$ und als hochsignifikant bei $p=.001$. Standardabweichungen (SD) sind in Klammern angegeben.

4. ERGEBNISSE

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Untersuchung an den elf Myelomzelllinien, Knochenmarkproben von 55 Myelompatienten und 25 gesunden Spendern dargestellt. Zunächst werde ich das Patientenkollektiv und das gesunde Kollektiv bezüglich Alter, Geschlecht und der klinischen Parameter darstellen. Zur Charakterisierung des Expressionsmusters wird die CT-Antigenexpression insgesamt dargestellt und hinsichtlich Co-Expressionen und Korrelationen mit klinischen Parametern analysiert.

4.1 Patientenkollektiv und Knochenmarkspender

Zunächst werden sowohl das Patientenmaterial, bestehend aus Knochenmarkproben von 55 Myelompatienten, als auch die Kontrollgruppe, bestehend aus Knochenmarkproben und CD34+Zellen, bezüglich ihrer

Eigenschaften vorgestellt. Zur besseren Interpretation der Ergebnisse, auch im Hinblick auf eine mögliche Korrelation zwischen der Expression der CT-Antigene mit klinischen Parametern, erscheint dieser Schritt sinnvoll.

4.1.1 Eigenschaften des Patientenkollektivs

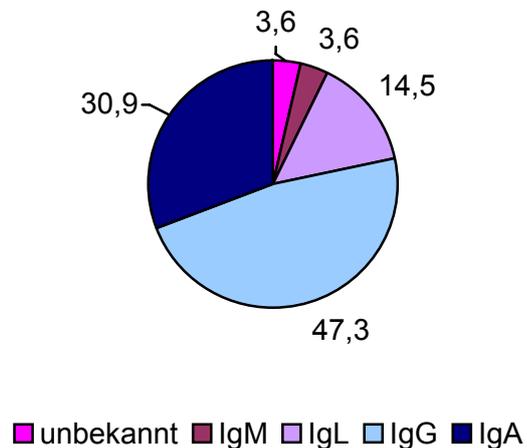
Das Alter der Patienten liegt zwischen 36-81 Jahren (Median 63 Jahre). Von den 55 Patienten sind 37 Männer und 18 Frauen.

In der vorliegenden Arbeit wird die Durie und Salmon Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms verwendet, da sie zum Zeitpunkt der Datenerhebung die übliche Klassifikation darstellte. Gemäß dieser Einteilung befindet sich nahezu die Hälfte der Patienten im Stadium III (siehe Tabelle 4 in Anhang 1).

Im untersuchten Patientenkollektiv liegt die Infiltration des Knochenmarks mit Plasmazellen pro Patient im Mittelwert bei 60% (SD $\pm 29,8$). Die Patienten wurden gemäß ihrer Plasmazellinfiltration in zwei Gruppen eingeteilt. Die International Myeloma Working Group hat als ein Kriterium zur Diagnosestellung eines Multiplen Myeloms eine Plasmazellinfiltration des Knochenmarks von mindestens 10% festgelegt. So gibt es eine Patientengruppe mit 10-55% Plasmazellinfiltration und eine Gruppe mit 56-100% Plasmazellanteil.

Wichtig für Verlauf und Prognose der Erkrankung ist die Kenntnis über den monoklonal gebildeten Antikörper, auch „Paraprotein“ genannt. Unterteilt nach diesen hauptsächlich gebildeten Ig-Schwerkettentypen des Paraproteins wies die Mehrzahl der Patienten ein IgG-Plasmozytom auf, nur ein Drittel ein IgA- und weniger als ein Fünftel ein IgM- oder Leichtketten-Plasmozytom (siehe Abb.1). Unterteilt nach produzierten Leichtketten-Isotypen bilden über die Hälfte der Patienten Kappa-Leichtketten (siehe Tabelle 4 in Anhang 1).

**Abb.1: Verteilung der Ig-Schwerketten
bei 55 Myelompatienten**



Anmerkung: Angaben in Prozent

Neben dem Ausmaß der „Paraprotein“-Produktion ist beim Multiplen Myelom eine Chromosomenaberration für die Prognose wichtig. Zu 39 der 55 Patienten lag eine Genanalyse in Form einer Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) der Knochenmarkprobe vor. Bei 16 der 55 Patienten bestand kein FISH-Untersuchungsbefund. Die Mehrzahl der untersuchten Knochenmarkproben wies eine Deletion 13q14 auf (siehe Tabelle 4 in Anhang 1).

Um eine Aussage zum Einfluss der Behandlung auf das Auftreten von CT-Antigenen treffen zu können, werden die Patienten je nach vorangegangenen Therapien unterteilt. Zum Zeitpunkt der Knochenmarkentnahme hatte die Mehrzahl der 55 Patienten eine alleinige Chemotherapie erhalten, fast ein Viertel eine autologe Stammzelltransplantation (SZT) und nur ein geringer Anteil eine allogene SZT.

4.1.2 Eigenschaften der Knochenmarkspender und der CD34+Zellen

Die Gruppe umfasst 20 Knochenmarkspender. Die Altersverteilung liegt zwischen 23 und 52 Jahren, im Median bei 35 Jahren. Es überwiegt das männliche Geschlecht (15:5). Zu den Spendern ist bekannt, dass sie vor und zum Zeitpunkt der Knochenmarkentnahme an keiner malignen Erkrankung leiden. Ansonsten liegen keine klinischen oder laborchemischen Parameter vor.

Die 5 Proben mit CD34+Progenitorzellen stammen aus Knochenmark von gesunden Knochenmarkspendern. Zu ihnen liegen keinerlei Daten hinsichtlich Geschlecht und Alter vor.

4.2 CT-Antigenexpression in den Multiplen Myelomzelllinien

In diesem Kapitel wird die Expression von 19 CT-Antigenen in 11 Myelomzelllinien dargestellt. Im Weiteren wird das Expressionsverhalten der Zelllinien in Bezug auf Anzahl an Antigenen beschrieben, ebenso wie die Expression der einzelnen CT-Antigene und ihre Co-Expression. Am Ende des Kapitels wird auf das Expressionsmuster von CT-Antigenen in Abhängigkeit von der Abwesenheit eventueller "Gatekeeper"-Gene eingegangen.

Insgesamt weisen die Myelomzelllinien eine bemerkenswert häufige CT-Antigenexpression auf (siehe Abb.2). Alle Zelllinien exprimieren zumindest ein CT-Antigen. 90% exprimieren mindestens 8 Antigene gleichzeitig, der Mittelwert liegt bei 10,5 (SD $\pm 3,8$) gleichzeitig exprimierten Antigenen. Fünfzehn CT-Antigene sind die maximale Antigenanzahl, die von einer Zelllinie exprimiert werden. Die einzelnen CT-Antigene sind in unterschiedlicher Häufigkeit in den Myelomzelllinien exprimiert.

Abhängig von der Expression in den Myelomzelllinien werden die CT-Antigene in Gruppen eingeteilt, die in den Zelllinien sehr häufig (von 67-100% der Linien exprimiert), häufig (34-66%), selten (1-33%) oder gar nicht (0%) exprimiert sind.

MAGE-C1(CT7), MAGE-A3, MAGE-C2 (syn. CT10/MAGE-E1), SSX-4 und BAGE werden von 90% (10/11) der Myelomzelllinien exprimiert (siehe Abb.2). Sie sind die am häufigsten exprimierten CT-Antigene. Darauf folgen NY-ESO-1 und MAGE-A4, welche von über 80% der Zelllinien exprimiert werden. Aufgrund dieser ausgeprägten Expression in den Zelllinien werden sie der Gruppe der sehr häufig exprimierten (67-100%) CT-Antigene zugeordnet, ebenso wie SSX 2 und -5, welche von über 70% der Zelllinien exprimiert werden. (siehe Abb. 2).

In die Gruppe der häufig exprimierten (34-66%) CT-Antigene gehören SSX-1 und SSX-8, beide von über 50% der Zelllinien exprimiert. Ebenso in diese Gruppe gehört ADAM2 (CT15), das von knapp der Hälfte der Zelllinien exprimiert wird.

Eine Genexpression in weniger als 30% der Myelomzelllinien weisen SSX-6 und 7, LDHC, LIPI(CT17) und SPANXb auf. Sie alle gehören in die Gruppe der selten exprimierten (1-33%) CT-Antigene.

Einzig SSX3 und SYCP1 haben keine Expression (0%) in den Zelllinien.

Abb.2: Expressionsmuster von 19 CT-Antigenen in Myelomzelllinien

Antigen		Zelllinien											
		IM9	RPMI-8226	EJM	U-266	Brown	KMS-12-BM	MOL P-8	NCI-H929	LP-1	OPM-2	SK-007	
Sehr häufige Expression 67-100%	MAGEC1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	MAGEC2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	MAGEA3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	BAGE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SSX4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	MAGEA4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	NYESO1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SSX2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	SSX5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Häufige Expression 34-66%	SSX1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	SSX8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	ADAM2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	LIPI	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Wenig Expression 1-33%	SSX6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	SPANXb	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	LDHC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	SSX7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Keine 0%	SSX3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	SYCP1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Legende: rotes Kästchen = positiv, leeres Kästchen = negativ

4.2.1 Co-Expression in den Myelomzelllinien

Aufgrund der insgesamt starken Genexpression in den Myelomzelllinien wurden die CT-Antigene auf gehäufte Co-Expressionen untersucht. Zuerst wurde die Korrelation innerhalb einer Genfamilie und im Folgenden unter Vertretern verschiedener Genfamilien untersucht. In einem weiteren Schritt wurde geprüft, ob die Abwesenheit bestimmter CT-Antigene einen Einfluss auf die gleichzeitige Expression anderer Antigene in den Zelllinien hat.

4.2.1.1 Co-Expression innerhalb einer Genfamilie bei Myelomzelllinien

In der vorliegenden Untersuchung sind unter den 19 CT-Antigenen Vertreter dreier Genfamilien, der MAGEA-, MAGEC- und der SSX-Familie. MAGEA3 und MAGEA4 sind Mitglieder der MAGEA-Familie. Bei 80% (8/10) der MAGEA3-positiven Zelllinien wird MAGEA4 gleichzeitig exprimiert. Umgekehrt exprimieren 88% (8/9) der MAGEA4-positiven Myelomzelllinien MAGEA3.

Als Vertreter der MAGEC-Familie wurden MAGEC1(CT7) und MAGEC2(CT10) auf eine gemeinsame Expression hin überprüft. Allen 10 MAGEC2-positiven Zelllinien exprimieren gleichzeitig MAGEC1, diese Korrelation ist hochsignifikant ($p < .001$).

Die Vertreter der SSX-Familie sind hier SSX 1-8. Kombinationen aus zwei Antigenen sind sehr häufig, so exprimieren alle SSX5-positiven Zelllinien (8/11) auch SSX4 und 80% (8/10) der SSX4-positiven Zelllinien SSX5. Kombinationen aus drei CT-Antigenen werden ebenfalls sehr häufig exprimiert, so exprimieren 87,5% (7/8) der Zelllinien, die SSX4 und 5 exprimieren, zusätzlich SSX2. Kombinationen aus 4 CT-Antigenen werden häufig exprimiert. Die Co-Expression SSX 1, -2, -4 und -8 ist auf 36% (4/11) der Zelllinien zu finden. Eine Konstellation von 6 Antigenen, hier SSX1-6 und 8 ohne SSX3, wird von 18% (2/11) der Myelomzelllinien exprimiert.

Insgesamt zeigt sich, dass es bei den untersuchten Myelomzelllinien Co-Expressionen einer CT-Antigenfamilie von bis zu vier CT-Antigenen gleichzeitig häufig, Kombinationen aus bis zu 3 Antigenen sogar sehr häufig vertreten sind.

4.2.1.2 Co-Expression von CT-Antigenen unterschiedlicher Genfamilien bei Myelomzelllinien

Nach Untersuchung des Expressionsmusters innerhalb einer Genfamilie wurden anschließend Co-Expressionen zwischen Vertretern unterschiedlicher Familien überprüft.

Es zeigt sich, dass Gene, die innerhalb einer Familie häufig exprimiert sind, auch in Kombination mit Vertretern anderer Genfamilien häufig exprimiert werden. 90% der MAGEA-3 positiven Linien exprimieren gleichzeitig SSX4, umgekehrt 81% (9/11) der SSX4-positiven Zelllinien exprimieren gleichzeitig MAGEA-3. Co-Expressionen mit mehr als einem Vertreter verschiedener Genfamilien treten ebenfalls sehr häufig auf. So weisen MAGEC1 und -C2 mit MAGEA3 und -A4 eine gleichzeitige Expression in über 70% (8/11) der Zelllinien auf.

MAGEC1 und -C2 werden einzeln und zusammen sehr häufig exprimiert. Die Co-Expression MAGEA4 mit MAGEC1 und -C2 ist signifikant ($p < .05$). Zusammenfassend ist zu sagen, dass es häufig bis sehr häufig Co-Expression unterschiedlicher CT-Genfamilien in den Myelomzelllinien gibt.

4.2.1.3 Einfluss der Abwesenheit von CT-Antigenen auf die CT-Genexpression

Es besteht zwar ein begründeter Verdacht, dass es bei häufigen CT-Antigenkombinationen einzelne Antigene gibt, die wie Torwächter („gatekeeper“) die Expression anderer CT-Antigene erst ermöglichen. Aufgrund der sehr häufigen Co-Expressionen in den Myelomzelllinien ist es jedoch schwer, „Torwächter“-

Antigene zu identifizieren, da in allen Fällen, bis auf die Ausnahme LP-1, mindestens acht Antigene gleichzeitig exprimiert werden.

4.3 CT-Antigen-Expression im Knochenmark von Spendern und in CD34+Zellen

In Hinblick auf eine therapiebegleitende Myelotoxizität und andere Nebenwirkungen unter Anwendung von Cancer/Testis-Antigenen bei möglicherweise ubiquitärer Expression wurde deren Vorkommen auch im gesunden Knochenmark untersucht.

Zur Überprüfung an gesunden Zellen dienten 20 Proben von Knochenmarkspendern, welche mittels RT-PCR auf 18 CT-Antigene untersucht wurden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression von MAGEC1, MAGEC2, MAGEA3, MAGE4, SSX1-3, SSX5, SSX6-8, BAGE, LIP1, SPANXb, ADAM2, SCP1, NYESO1 auf der mRNA in keiner der Proben nachgewiesen werden konnte. Ein Spender weist die Expression von SSX4 auf, die anhand einer Sequenzierung bestätigt wurde

Zusätzlich wurden fünf Proben mit Progenitorzellen (CD34+-Zellen) auf die Expression der Antigene analysiert, da in Keimzellen mit Stammzellcharakter (Testis, Plazenta) CT-Antigene nachweisbar sind. Die CD34+-Zellen wurden als Negativkontrolle wie Zelllinien, Patienten und Knochenmarkspender mittels RT-PCR auf ihre CT-Antigenexpression an elf Antigenen überprüft. Bei den hier untersuchten Antigenen handelte es sich um MAGEC2, MAGEA3, SSX1-5, NY-ESO-1, BAGE, ADAM2, LIP1.

Als Ergebnis ist feststellbar, dass keine der gesunden Proben eine CT-Antigenexpression aufwies.

4.4 Expressionsmuster der CT-Antigene in den Knochenmarkproben der MM-Patienten

Aufgrund der deutlichen Cancer/Testis-Antigenexpression in den Myelomzelllinien wurden die Knochenmarkproben von 55 Myelompatienten auf die Expression von 15 Antigenen untersucht. Bei der Auswahl der CT-Antigene orientierte man sich am Expressionsmuster der Zelllinien, d.h. die CT-Antigene, die in den Myelomzelllinien häufig exprimiert waren, wurden in die Untersuchung der Myelompatienten einbezogen.

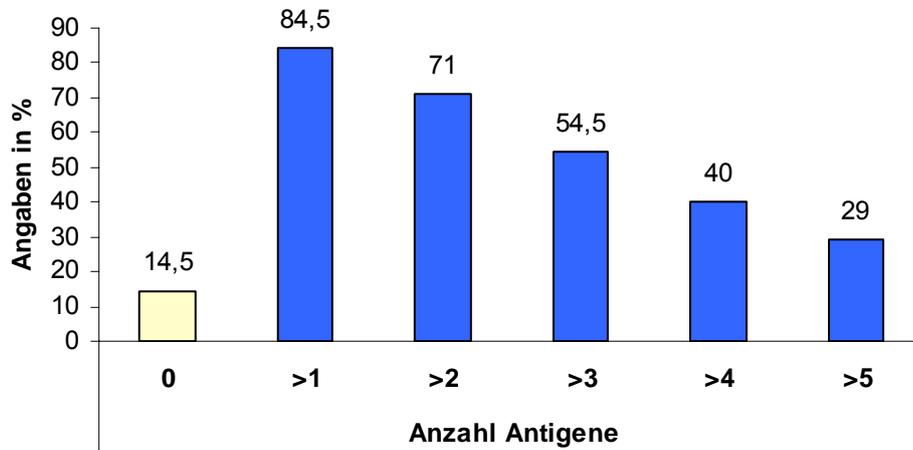
4.4.1 Expression von CT-Antigenen in MM-Knochenmarkproben

Die Untersuchung der Knochenmarkproben der 55 Myelom-Patienten auf die Expression von 15 Cancer-Testis-Antigenen ergibt folgende Ergebnisse:

Weit über 2/3 der Patienten weist eine Expression zumindest eines CT-Antigens auf. Über die Hälfte der Patienten exprimieren drei CT-Antigene oder mehr gleichzeitig. Somit liegt insgesamt eine sehr häufige CT-Antigenexpression vor (siehe Abb.3). Die Anzahl an maximal gleichzeitig exprimierten CT-Antigenen beträgt acht Antigene pro Patient. Diese häufige Co-Expression weisen drei Patienten auf.

Wie im vorangegangenen Kapitel werden die CT-Antigene gemäß der Häufigkeit ihrer Expression in den Knochenmarkproben der Patienten in sehr häufig exprimierte (67-100% der Proben), häufig (33-66%) und wenig (1-33%) exprimierte CT-Antigene eingeteilt (Abb. 4):

Abb.3: Anzahl CT-Antigene pro Patient

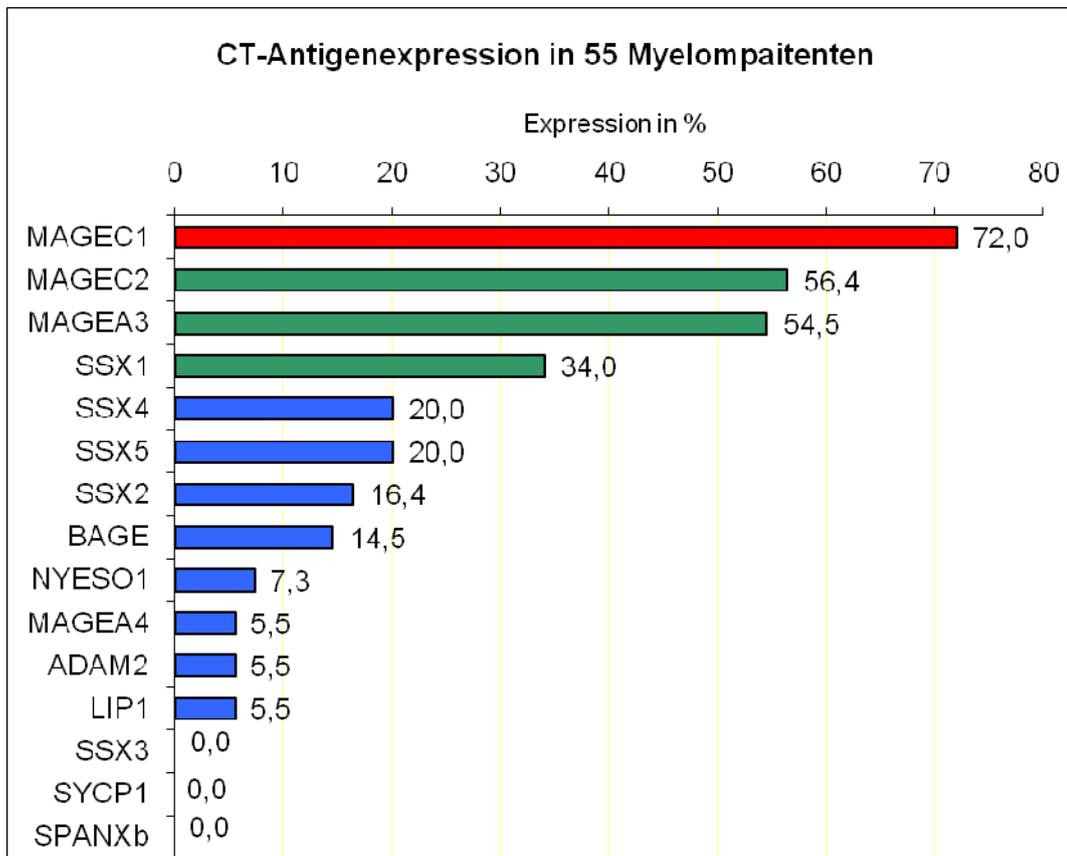


Anmerkung: Säulen repräsentieren Knochenmarkproben, die ein oder mehrere CT-Antigene exprimieren, Angaben in % der gesamten Patientenproben, (n=55)

Mit einer Expression von über 70% in den Patientenproben (40/55) ist MAGEC1(CT7) das am häufigsten exprimierte CT-Antigen und wird in die Gruppe der stark exprimierten CT-Antigene eingeordnet. Über 50% der Myelom-Patienten exprimieren MAGEC2 bzw. MAGEA3. Damit gehören diese ebenfalls in die Gruppe der häufig exprimierten Antigene. Mit einer Expression in mehr als einem Drittel der Knochenmarkproben ist SSX1 außerdem ein häufig exprimiertes Antigen.

NYESO1, MAGEA4, ADAM2, LIP1, BAGE, SSX2, 4 und 5 werden von 5,5 - 20% der Knochenmarkproben exprimiert und sind somit selten exprimierte CT-Antigene.

SSX3, SPANXb und SYCP1 werden von den Myelompatienten gar nicht exprimiert.



Anmerkung: Balken zeigen die Expression von CT-Antigenen in den Knochenmarkproben(KM-Proben) nach einzelnen CT-Antigenen aufgeschlüsselt, Angaben in %, rot: sehr häufig exprimiertes CT-Antigen, grün: häufig exprimiert, blau: selten exprimiert, gelb: keine Expression

4.4.2. Co-Expression von CT-Antigenen

Im Hinblick auf eine Vakzinierung mit Cancer/Testis-Antigenen als eine Option der therapeutischen Nutzung, ist es dringend notwendig, die Voraussetzungen für eine Antigenexpression besser zu verstehen und häufige Antigenkombinationen zu untersuchen. So gilt es zu klären, ob der Genlocus eines CT-Antigens Auswirkungen auf dessen Expression hat, da beispielsweise nicht alle CT-Antigene auf dem X-Chromosom kodiert sind. Wenn eine gemeinsame Expression

von CT-Antigenen beobachtet wird, so ist es eine wichtige Frage, ob sie alle in unmittelbarer Nähe zueinander codiert sind.

Aufgrund der Tatsache, dass über 70% der Myelompatienten mindestens zwei CT-Antigene exprimieren und da in den Myelomzelllinien häufige Co-Expressionen vorkommen, wurden die Patienten auf ihr Expressionsmuster hin untersucht. Hierzu wurden die Knochenmarkproben auf die Co-Expression innerhalb einer Genfamilie und auf Kombinationen unterschiedlicher Genfamilien überprüft.

4.4.2.1 Co-Expression innerhalb einer Genfamilie

Wie bereits in Kapitel 4.2.1.1 beschrieben, sind unter den untersuchten CT-Antigenen drei Genfamilien vertreten: die MAGEA-Familien mit ihren Vertretern MAGEA3 und -A4, die MAGEC-Familie mit MAGEC1 und -C2 und die SSX-Familie mit ihren Vertretern SSX1-5. Die beiden Vertreter der MAGEA-Familie, MAGEA3 und A4 werden in den Patientenknorpelmarkproben unterschiedlich häufig exprimiert. MAGEA3 ist in den Patientenproben ein häufig exprimiertes CT-Antigen, wohingegen MAGEA4 hier zu den selten exprimierten Antigenen zählt. MAGEA4 wird von 7% (2/30) der MAGEA3-positiven Knochenmarkproben exprimiert. Im Gegensatz dazu wird MAGEA3 von 66,6% (2/3) der MAGEA4-positiven Proben exprimiert. MAGEC1 ist ein sehr häufig und MAGEC2 ein häufig exprimiertes CT-Antigen in den Knochenmarkproben. 70% der MAGEC1-positiven Proben exprimieren gleichzeitig MAGEC2. Umgekehrt exprimieren 90% der MAGEC2-positiven ebenfalls MAGEC1. Beide Korrelationen sind hochsignifikant ($p < .001$). Die Kombination aus MAGEC1, -C2 und MAGEA3 wird von 34,5% (19/55) der Patienten exprimiert.

Für die Vertreter der SSX-Familie, SSX1, 2, 4 und 5 gilt, dass sie mit Ausnahme von SSX1, welches ein häufig exprimiertes CT-Antigen ist, zur Gruppe der selten exprimierten Antigene gezählt werden. SSX3 wird von den Knochenmarkproben nicht exprimiert und aus diesem Grund nicht in die Untersuchung auf Co-Expressionen aufgenommen. Die Konstellation SSX-1,-2,-4 und -5 wird von 3,6%

(2/55) der Patienten exprimiert, wohingegen Kombinationen aus zwei Vertretern der SSX-Familie weitaus häufiger exprimiert werden. So ist SSX1 bei 90% der SSX4-positiven Knochenmarkproben co-exprimiert, umgekehrt wird SSX4 von 52% der SSX1-positiven Proben gleichzeitig exprimiert, wobei es sich um hochsignifikante Korrelationen handelt. SSX5 ist bei 37% der SSX1-positiven Proben nachgewiesen und umkehrt wird SSX1 von allen SSX5-positiven Proben gleichzeitig exprimiert, wobei auch diese Korrelationen signifikant sind. (Tabelle 5 in Anhang 1).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Co-Expressionen innerhalb einer Genfamilie häufig bis sehr häufig auftreten und eine wichtige Information in Hinblick auf eine polyvalente Vakzinierung mit CT-Antigenen darstellt.

4.4.2.2 Co-Expression von CT-Antigenen unterschiedlicher Genfamilien

Es werden im Folgenden die Ergebnisse der Proben der 55 Myelompatienten auf gehäufte Co-Expressionen unterschiedlicher Genfamilien dargestellt:

Die Kombination aus MAGEA3 als Vertreter der MAGEA-Familie und MAGEC-1 als Vertreter der MAGEC-Familie bilden eine signifikante Korrelation ($p < 0.05$). 65% der MAGEC-1-positiven Proben exprimieren gleichzeitig MAGEA-3. Umgekehrt wird MAGEC1 bei allen MAGEA-3-positiven Proben co-exprimiert. Bei SSX1-positiven Proben wird MAGEC-1 in 89% der Fälle co-exprimiert, bei allen SSX2-, 4- und 5-positiven Proben wird MAGEC-1 co-exprimiert. Es handelt sich jeweils um signifikante positive Korrelationen ($p < 0.05$).

Auch die CT-Antigene MAGEA-3 und MAGEC2 werden bei nahezu allen übrigen Antigenen zu über 60% co-exprimiert (siehe Tabelle 5 in Anhang 1), was einer sehr häufigen Co-Expression entspricht. Es fällt auf, dass insbesondere MAGEC1 in den Knochenmarkproben der Patienten fast immer anwesend ist, was die Frage aufwirft, ob in Abwesenheit eines häufig exprimierten Antigens überhaupt andere CT-Antigene exprimiert werden und wenn ja, wie häufig dies der Fall ist. Diese Frage wird im Kapitel 3.3.3 näher beleuchtet.

Die bei fast allen übrigen Antigenen beobachtete Co-Expression mit MAGEC1, -C2 und -A3 trifft auf das Antigen LIP1 nicht zu, denn nur bei 25% der LIP1-positiven Proben wird ebenfalls MAGEC1, MAGEC2 oder MAGEA3 exprimiert. LIP1 weist auch nahezu keine Co-Expression mit anderen CT-Antigenen auf (siehe Tab.3). Für ADAM2 kann dies in abgeschwächter Form gelten. Ein möglicher Grund für dieses Expressionsmuster könnte in der Genlokalisierung von LIP1 und ADAM2 liegen. Da ADAM2 und LIP1 nicht auf dem X-Chromosom lokalisiert sind sondern auf verschiedenen Autosomen, könnte das dazu führen, dass sie nicht mit den auf dem X-Chromosom codierten CT-Antigenen abgelesen werden.

Insgesamt kann von einer sehr häufigen Co-Expressionen ausgegangen werden, insbesondere MAGEC1 ist hierbei hervorzuheben und es ist festzustellen, dass es bei allen exprimierten CT-Antigenen co-exprimiert wird.

4.4.3 Einfluss der Abwesenheit einzelner CT-Antigene auf die Genexpression

In diesem Kapitel wird die im Vorangegangenen aufgeworfene Frage, ob es in Abwesenheit einzelner viel exprimierter Cancer/Testis-Antigene zu einer verminderten Antigenexpression insgesamt kommt, anhand von Untersuchungsergebnissen näher erörtert. Bei Überprüfung der Zelllinien konnte hierzu keine Aussage getroffen werden, da mindestens 8 CT-Antigene gleichzeitig exprimiert wurden und man daher keine wirklichen „Gatekeeper“-Antigene identifizieren konnte.

Bei den Knochenmarkproben der Patienten wurden MAGEA3, MAGEC2 und MAGEC1 auf die sogenannte „Gatekeeper“-Funktion überprüft, da sie bei über 60% der anderen CT-Antigene co-exprimiert waren (siehe Tabelle 5 in Anhang 1). Die „Gatekeeper“-Funktion bedeutet, dass es der Anwesenheit einzelner Antigene bedarf, um die Expression weiterer CT-Antigene zu gewährleisten.

4.4.3.1 Genexpression in Abwesenheit von MAGEA3

Die Untersuchungsergebnisse zeigen, dass MAGEA3 von 30 Knochenmarkproben exprimiert wird, 25 der 55 Proben bilden es nicht aus. Die CT-Antigenexpression insgesamt in Abwesenheit von MAGEA3 liegt bei 30% (17/55) in den Knochenmarkproben, während sie bei 98% (54/55) in Anwesenheit von MAGEA3 liegt.

Bei Betrachtung der Antigenkonstellationen bei MAGEA3-negativen Patienten zeigt sich weiter, dass 56%(14/25) der Patienten MAGEC1 exprimieren. Im Vergleich liegt die Expression bei MAGEA3-positiven Knochenmarkproben im Falle von MAGEC1 bei über 80%. Bei der Expression von MAGEC2 ist dies noch stärker zu beobachten. Während in Abwesenheit von MAGEA3 die Expression von MAGEC2 bei 40%(10/25) liegt, sind es 100% in Anwesenheit von MAGEA3 (siehe Abb.5). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die Anwesenheit von MAGEA- für die Expression weiterer CT-Antigene eine wichtige Rolle spielt.

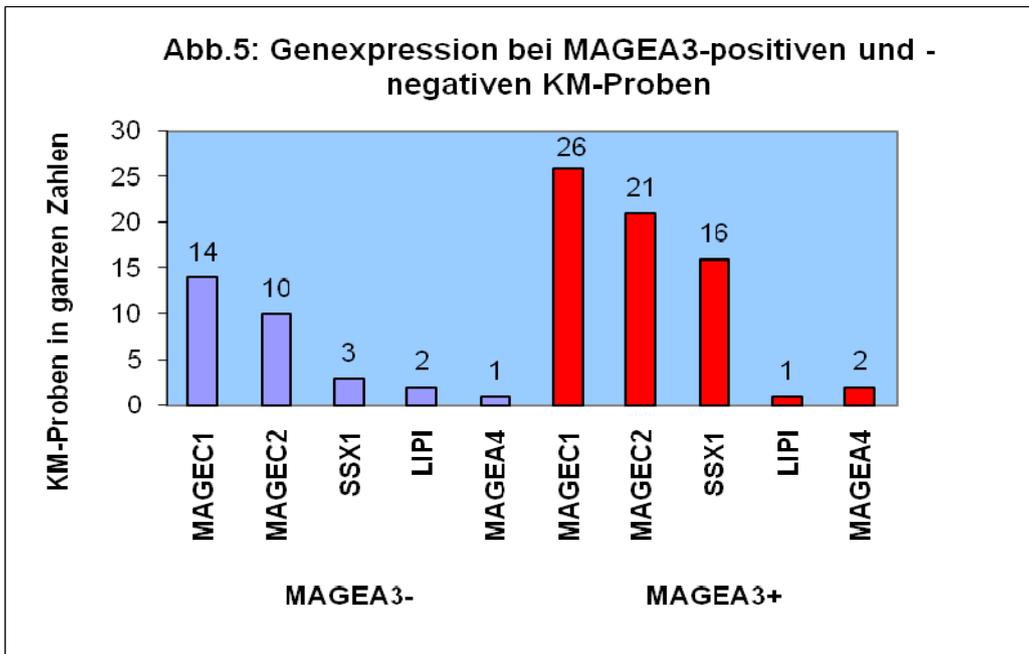
4.4.3.2 Genexpression in Abwesenheit von MAGEC2

Es zeigt sich weiter, dass fast die Hälfte(24/55) der Knochenmarkproben kein MAGEC2 exprimieren. In Abwesenheit von MAGEC2 werden von 29%(16/55) der Proben CT-Antigene exprimiert. Hingegen werden in Anwesenheit von MAGEC2 von 98% (54/55) der Proben CT-Antigene exprimiert. Wie bei MAGEA3 dargestellt, so werden in Anwesenheit von MAGEC2 andere CT-Antigene mindestens doppelt so häufig exprimiert wie in Abwesenheit von MAGEC2, z. B. ist SSX1 von über einem Drittel der MAGEC2-positiven Knochenmarkproben exprimiert. Bemerkenswerterweise ist, wie in Abb.6 dargestellt, die Genexpression bei MAGEC2-positiven Proben für LIPI und NY-ESO1 seltener als bei Abwesenheit von MAGEC2.

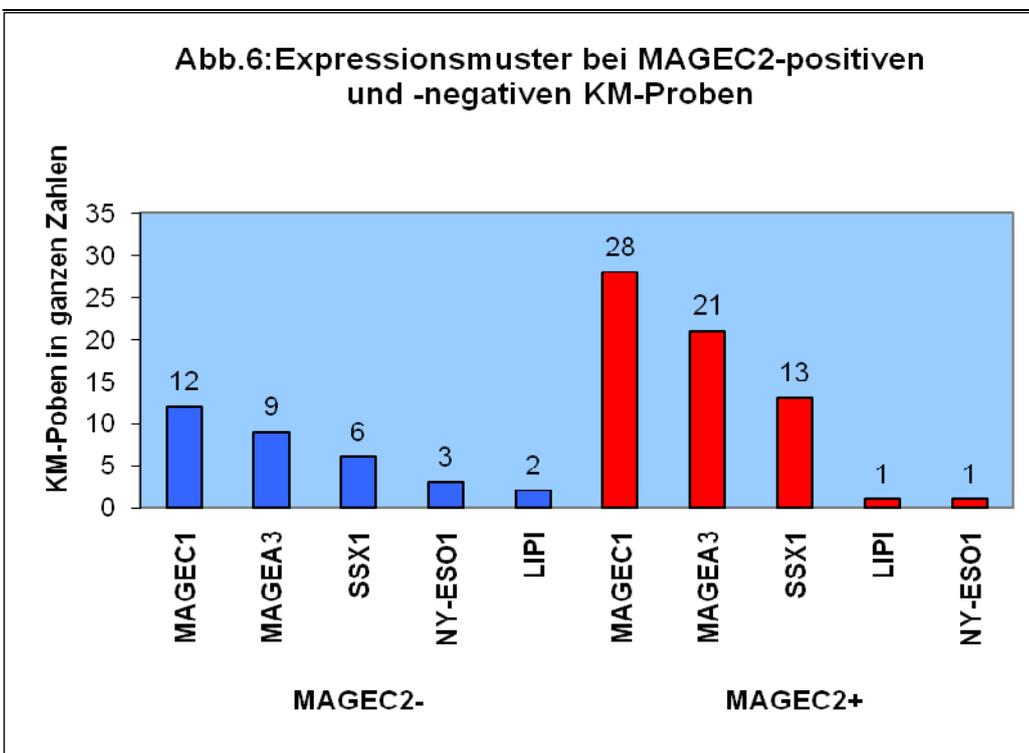
4.4.3.3 Genexpression in Abwesenheit von MAGEC1

MAGEC1 wird von 27%(15/55) der Myelompatienten nicht exprimiert. Von diesen 15 MAGEC1-negativen Knochenmarkproben exprimiert die Hälfte CT-Antigene. Dagegen liegt die Expression bei MAGEC1-positiven Knochenmarkproben für MAGEA3 bei über 60% und für MAGEC2 (CT10) bei 70%. Auch für SSX1 und NY-ESO1 gilt, dass sie in Anwesenheit von MAGEC1 mindestens doppelt so häufig exprimiert werden wie bei Abwesenheit von MAGEC1(CT7). Die Anzahl an CT-Antigenen korreliert mit MAGEC1 hochsignifikant ($<.001$). Für das CT-Antigen LIPI scheint ein gegenläufiger Trend vorzuliegen, denn es wird in MAGEC1-negativen Proben häufiger exprimiert als bei Anwesenheit von MAGEC1 (siehe Abb.7). Die hier untersuchten CT-Antigene sind bis auf 4 Antigene (BAGE, SCP1, ADAM2, LIPI) X-chromosomal-kodierte Antigene. Ob der Umstand, dass LIPI ein Non-X-Antigen ist und somit nicht auf dem gleichen Gen wie MAGEC1 kodiert ist die Ursache für die tendenziell häufigere Expression in Abwesenheit von MAGEC1 ist, bleibt zu klären.

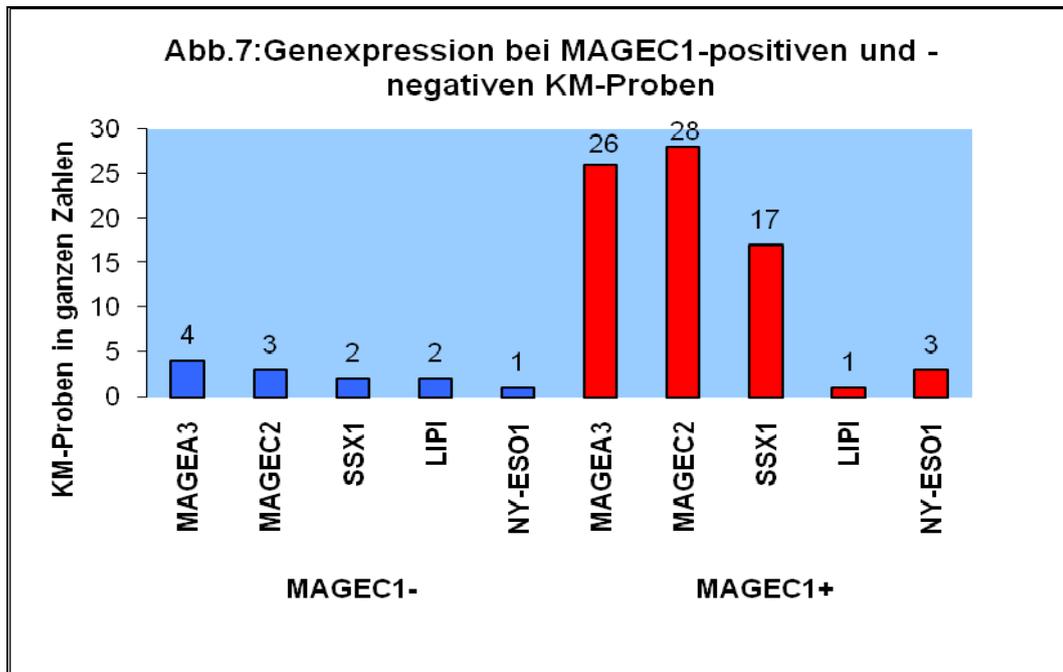
Es wird deutlich, dass in Abwesenheit von MAGEA3 und MAGEC2 die Antigenexpression um die Hälfte reduziert ist, was auf einen Einfluss der beiden Antigene hindeuten könnte. Am auffälligsten wird dieser mögliche Einfluss jedoch bei MAGEC1, in dessen Abwesenheit lediglich MAGEA3 eine Antigenexpression von über 20% in den Knochenmarkproben erreicht (siehe Abb. 7). Diese schwache Antigenexpression in Abwesenheit von MAGEC1 könnte mit seiner Funktion als „gatekeeper“ zusammenhängen.



Anmerkung: MAGEA3- negative KM-Proben n=25, MAGEA3-positive KM-Proben n=30



Anmerkung: MAGEC2-KM-Proben n=24, MAGEC2+KM-Proben n=31



Anmerkung: MAGEC1-KM-Proben n=15, MAGEC1+KM-Proben n=40

4.4.4 Korrelationen mit klinischen Parametern

Die Expression von Cancer/Testis-Antigenen ist in Bezug auf das Multiple Myelom noch wenig untersucht, z.B. ab welchem Krankheitsstadium genau CT-Antigene auftreten. Ebenso sind die Voraussetzungen und Mechanismen für eine plötzliche Expression unklar, da - wie auch in der vorliegenden Stichprobe -, nicht alle MM-Patienten CT-Antigene exprimieren.

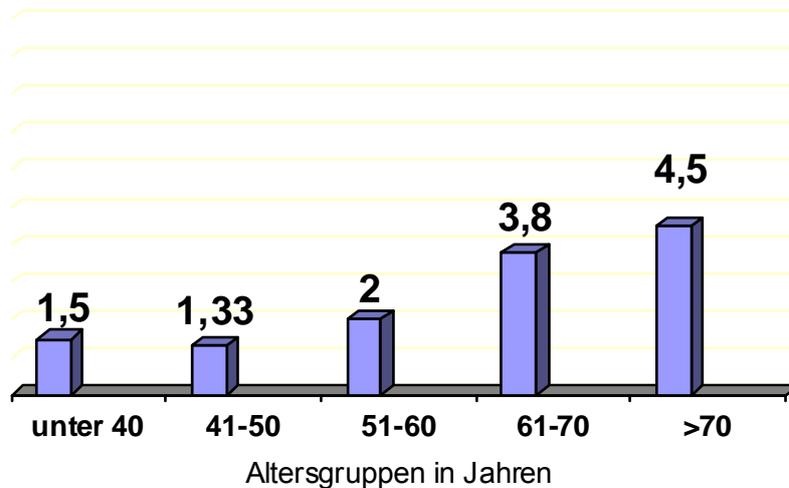
Daher wurde anhand klinischer und laborchemischer Daten die quantitative Antigenexpression der vorliegenden Patientengruppe untersucht. Als Parameter dienen allgemeine Faktoren wie Alter und Geschlecht, krankheitsspezifische Parameter wie Erkrankungsstadium, Plasmazellinfiltration des Knochenmarks, Ig-Schwer- und Leichtkettentyp ebenso wie Laborparameter, die prognostische Kriterien nach der Durie-und-Salmon-Klassifikation und ISS darstellen. Zur Übersicht aller Korrelationen mit klinischen Parametern siehe Tabelle 5 in Anhang1. Des Weiteren wurde der Einfluss einzelner CT-Antigene auf die Überlebensprognose der Patienten untersucht.

4.4.4.1 Korrelation des Alters mit der Antigenexpression

Das Multiple Myelom ist eine Erkrankung, die bevorzugt ab einem Alter von 60 Jahren auftritt. Es zeigt sich, dass zwischen dem Alter der Patienten und der Anzahl der Antigene eine hochsignifikante positive Korrelation ($Rho = .058$, $p < .001$) besteht, d.h. mit zunehmendem Alter nimmt in dem untersuchten Patientenkollektiv auch die Anzahl an CT-Antigenen zu.

Abb. 8 zeigt das Patientenkollektiv, in Altersgruppen untergliedert, mit den jeweiligen Mittelwerten der CT-Antigenanzahl. Ein Patient ist allerdings über 80 Jahre alt und in seinem Knochenmark sind 6 Antigene nachweisbar. Da es sich hier um einen Einzelfall handelt, wurden die Daten des Patienten nicht in der Abb. 8 dargestellt.

Abb.8: Mittelwerte der Anzahl der CT-Antigene nach Altersgruppen



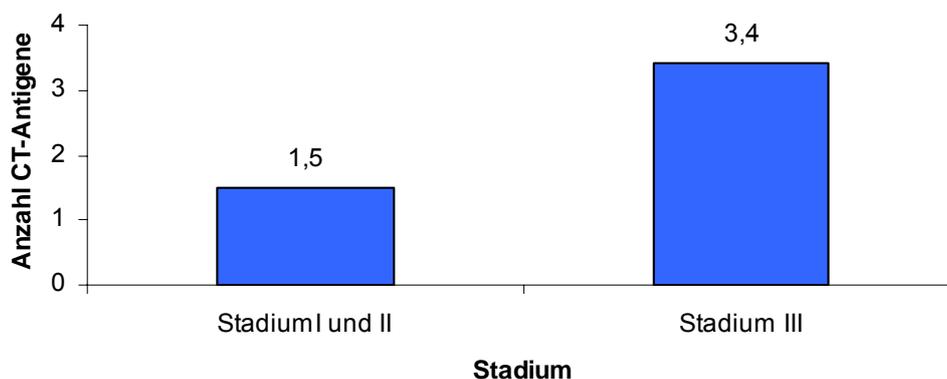
4.4.4.2 Korrelation Geschlecht und Antigenexpression

Untersucht auf einen Geschlechterunterschied in der CT-Antigenexpression der untersuchten Stichprobe, unterscheiden sich Frauen und Männer bezüglich der Antigenexpression nicht ($t=0.28$, $df=53$, $p(t)=.780$).

4.4.4.3 Korrelation Erkrankungsstadium und CT-Antigene

Bei Untersuchung eines möglichen Zusammenhangs zwischen den Merkmalen Erkrankungsstadium nach Durie und Salmon und Anzahl an CT-Antigenen, ergibt die Berechnung nach Spearman-Rho eine positive Korrelation bezüglich des Erkrankungsstadiums und des Auftretens von CT-Antigenen ($Rho=.029$, $p < .05$), d.h. Patienten im Stadium III haben eine signifikant erhöhte Anzahl an CT-Antigenen als in früheren Stadien. Hervorzuheben ist, dass über 70% der Patienten im Stadium III mindestens zwei CT-Antigene exprimieren und über die Hälfte dieser Gruppe mindestens 3 Antigene exprimieren (siehe Abb.9).

Abb.9: Mittelwerte CT-Antigenanzahl in Korrelation mit dem Erkrankungsstadium



Anmerkung: Anzahl Patienten: Stadium I $n=3$, Stadium II $n=5$, Stadium III, $n=47$

4.4.4.4 Korrelation Plasmazellinfiltration mit Antigenexpression

Die Knochenmarkinfiltration mit Plasmazellen von mindestens 10% ist ein Hauptkriterium zur Diagnosestellung des Multiplen Myeloms [5]. Die Berechnung nach Spearman-Rho ergibt keinen Zusammenhang zwischen der Infiltration des Knochenmarks an Plasmazellen, in Prozent angegeben, und der Anzahl an Antigenen ($Rho = .178, p > .05$).

4.4.4.5 Korrelation Ig-Schwerketten- und Leichtkettentyp mit der Anzahl an Antigenen

Der Nachweis eines monoklonalen Ig-Schwerketten- und Leichtkettentyps ist für die Diagnosestellung des Multiplen Myeloms ein wichtiges Kriterium, aber auch ein prognostischer Parameter, insbesondere im Hinblick auf eine renale Beteiligung der Erkrankung. In der vorliegenden Studie konnte kein Zusammenhang bezüglich Antigenexpression und Schwerkettensubtyp nachgewiesen werden ($Rho = -.039, p > .05$). Auch ein möglicher, mittels T-Test untersuchter Zusammenhang zwischen Auftreten eines der beiden Leichtkettentypen und der Anzahl an CT-Antigenen konnte nicht nachgewiesen werden ($t = 1.40, df = 49, p(t) = .168$).

4.4.4.6 Korrelation Calciumkonzentration und CT-Antigenanzahl

Ein entscheidender diagnostischer Faktor ist die Höhe der Calciumkonzentration im Serum. Eine Korrelation zwischen der Höhe der Calcium-Konzentration und der Anzahl an CT-Antigenen konnte im Rahmen der vorliegenden Studie jedoch nicht gezeigt werden. ($r = -.144, p > .05$).

4.4.4.7 Korrelation β_2 -Mikroglobulinwert mit der Antigenexpression

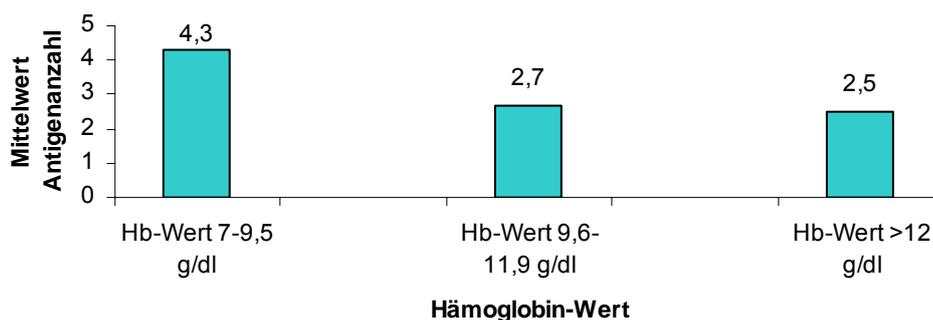
Wichtiger unabhängiger Risikofaktor und auch Verlaufsparemeter für das Multiple Myelom ist die Konzentration des β_2 -Mikroglobulins. Eine Korrelation zwischen der Konzentration des β_2 -Mikroglobulins und der Anzahl an CT-Antigenen konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden ($r=.115$, $p>.05$).

4.4.4.8 Korrelation Hämoglobinwert und Antigenexpression

Der Hb-Wert ist ein diagnostisches Kriterium zur Stadieneinteilung nach der Durie und Salmon Klassifikation und dem ISS. Mit Zunahme des Krankheitsstadiums geht ein Hb-Abfall einher, welches den Untersuchungsergebnissen zufolge von einer Zunahme an CT-Antigenen begleitet sein könnte.

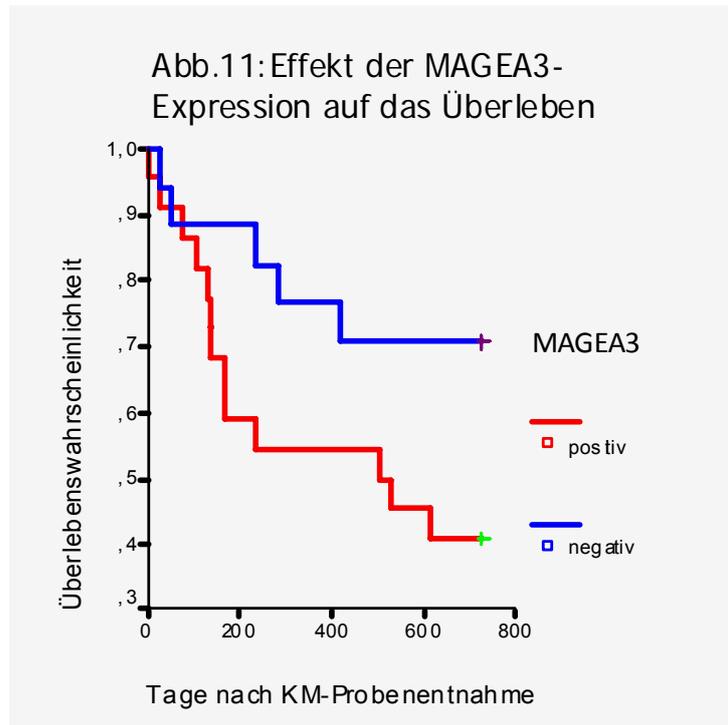
Zwischen dem Hämoglobin-Wert (Hb-Wert) und der Antigenexpression besteht nach Berechnung der Pearson-Korrelation in der Tat eine negative Korrelation, die knapp die Signifikanzgrenze verfehlt ($r= -.263$, $p=.06$), d.h. je niedriger der Hb-Wert, desto mehr CT-Antigene werden exprimiert (siehe Abb.10).

Abb.10: Korrelation des Hb-Werts mit der Anzahl Antigene bei 52 Myelompatienten, eingeteilt in drei Gruppen entsprechend dem Hb-Wert

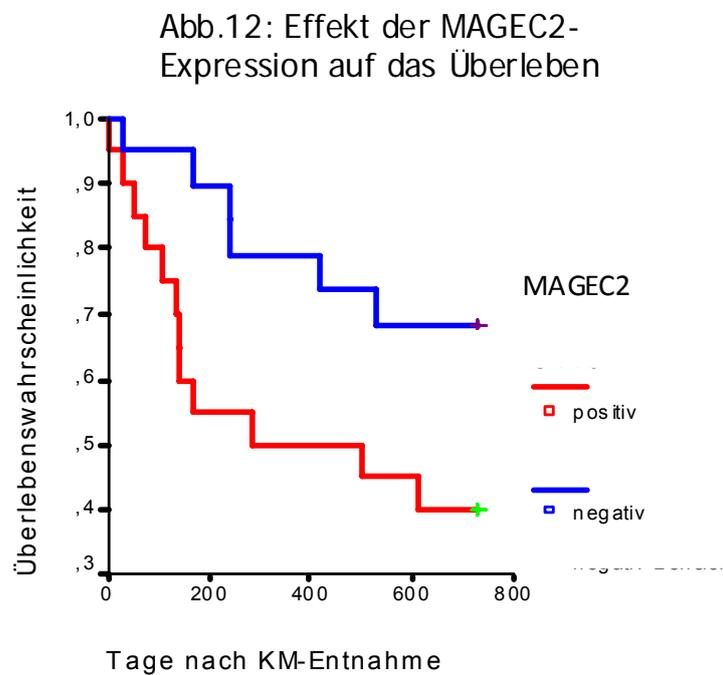


4.4.4.9 Korrelation des Auftretens einzelner CT-Antigene mit einer Verschlechterung der Überlebensprognose

Es wurde weiter überprüft, ob das Auftreten von CT-Antigenen, hier MAGEA3, MAGEC1 und MAGEC2 mit einer Verschlechterung der Überlebensprognose einhergeht. Für 39 Patienten liegen Daten über Tod bzw. Überleben in einem Zeitraum von zwei Jahren vor. Beginn des beobachteten Zeitraums ist das Datum der Knochenmarkentnahme und Ende des Beobachtungszeitraums datiert genau zwei Jahre später. Abhängig vom Vorliegen der einzelnen Antigene wurde das Patientenkollektiv in zwei Gruppen unterteilt. In Abb. 11 wird für MAGEA3, in Abb.12 für MAGEC2 und in Abb.13 für MAGEC1 der Verlauf anhand der Kaplan-Meier-Schätzung dargestellt. Der mögliche Zusammenhang zwischen Auftreten einzelner CT-Antigene und einer schlechteren Überlebensprognose wird mittels log-rank-Tests verglichen. Die Korrelation zwischen dem Überleben der Patienten innerhalb des Beobachtungszeitraumes und dem Faktor MAGEA3 verfehlt knapp die Signifikanzgrenze ($p=.07$), wohingegen die Korrelation zwischen dem Faktor Überleben und dem Faktor MAGEC2 signifikant ist ($p=.05$). Ebenso korreliert eine Verschlechterung der Überlebensprognose signifikant mit dem Vorliegen des Antigens MAGEC1 ($p=.02$). Auch für die Überlebensprognose in Abhängigkeit von SSX2 kann eine hochsignifikante Korrelation zwischen der Expression von SSX2 und einer verkürzten Lebensdauer gezeigt werden ($p=.001$).

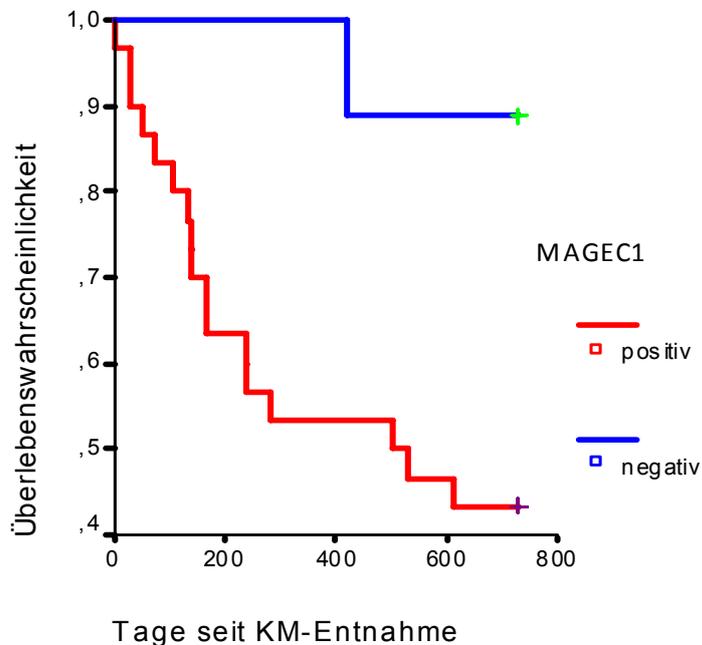


Anmerkung: Patientenkollektiv: MAGEA3-positiv: n=22, MAGEA3-negativ: n=17, p=.07



Anmerkung: Patientenkollektiv: MAGEC2-positiv: n=20, MAGEC2-negativ: n=19, p=.05

Abb.13: Effekt der MAGEC1-Expression auf das Überleben



Anmerkung: Patientenkollektiv: MAGEC1-positiv: n=30, MAGEC1-negativ: n= 9, p= .02

5. DISKUSSION

Cancer/Testis-Antigene bieten ideale Bedingungen für eine immuntherapeutische Anwendung, denn sie erfüllen wichtige Kriterien für die therapeutische Nutzung: mit Ausnahme von Hoden- und Plazentagewebe, welche keine HLA-Klasse I-Moleküle aufweisen und zusätzlich durch eine Blut-Hoden- bzw. Plazenta-Schranke geschützt sind, werden Cancer/Testis-Antigene nur von Tumorgewebe exprimiert und sind somit hochspezifisch. Aufgrund ihres immunogenen Effekts auf CD4+ als auch CD8+ T-Zellen [57-59] bieten sie therapeutische Einsatzmöglichkeiten zur Aktivierung der zellulären und auch humoralen spezifischen Abwehr. Cancer/Testis-Antigene könnten von daher zur Behandlung des Multiplen Myeloms eingesetzt werden, jedoch ist derzeit zum Expressionsmuster in den betreffenden Patienten zu wenig bekannt.

Bei Untersuchungen an soliden Tumoren zeigt sich ein höchst heterogenes Bild. Die Frage ist nun, ob in malignen Plasmazellen überhaupt CT-Antigene exprimiert sind und wenn ja, wie das Expressionsmuster aussieht.

5.1 Genexpression in den Myelomzelllinien

Zur Darstellung der Cancer/Testis-Antigenexpression in Patienten mit Multiplen Myelom wurden zunächst Myelomzelllinien auf ihre CT-Antigenexpression untersucht, da bei Genexpression von Cancer/Testis-Antigenen in Myelomzelllinien davon ausgegangen werden kann, dass diese in oder auf malignen Plasmazellen exprimiert sind und nicht auf anderen mononukleären Zellen.

Im ersten Schritt der Arbeit wurden 11 Myelomzelllinien auf die Genexpression von 19 CT-Antigenen mittels RT-PCR untersucht. Es zeigte sich, dass CT-Antigene in Myelomzelllinien häufig exprimiert waren. Am häufigsten wurden MAGEC1, -C2, MAGEA3, BAGE und SSX4 exprimiert. Besonders hervorzuheben ist die Expression von MAGEC2, welche in der vorliegenden Arbeit erstmals für Myelomzelllinien beschrieben wurde.

Alle 11 untersuchten Zelllinien wiesen eine häufige Co-Expression auf (siehe Abb. 2, Kap. 4.2). Es konnte durch die vorliegende Untersuchung also nicht nur gezeigt werden, dass Myelomzelllinien Cancer/Testis-Antigene exprimieren, sondern auch, dass es sich überwiegend um Co-Expression von mehreren Antigenen gleichzeitig handelt. Dieses Ergebnis ist sehr interessant, da in einigen zuvor durchgeführten Studien hinsichtlich hämatologischer Erkrankungen, wie z.B. von Chambost et. al. oder Türeci et. al., keine CT-Antigenexpression gefunden werden konnte [60, 61]. Übereinstimmende Ergebnisse gibt es hingegen mit Taylor et al.[62], die bei der Untersuchung von Myelomzelllinien auf die Expression von SSX-Genfamilienvertretern ein ähnliches Ergebnis wie in der vorliegenden Arbeit fanden. Auch Pellat-Deceunynck et. al. [63] haben für CT-Antigene der MAGEA-

Familie und BAGE eine vergleichbar häufige Genexpression in Myelomzellen gefunden.

Zusammenfassend ist in Bezug auf die vorliegende Untersuchung herauszustellen, dass die untersuchten CT-Antigene sehr häufig in den 11 Myelomzelllinien exprimiert wurden, und dass es gehäuft zu Co-Expressionen von im Mittel 10,5 CT-Antigenen gleichzeitig gekommen ist.

5.2 CT-Antigenexpression in gesunden Probanden und CD34+Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden 25 Proben von Knochenmarkspendern auf die Expression von 18 CT-Antigenen überprüft. Dies sollte der Sicherstellung dienen, dass es sich bei den untersuchten CT-Antigenen um tumorspezifische Antigene handelt. Im Falle, dass ihre Expression überall im Gewebe verbreitet wäre, träten bei therapeutischer Nutzung möglicherweise Nebenwirkungen wie toxische Effekte auf das Knochenmark auf. Ebenso könnte aber auch eine immunologische Toleranz vorhanden sein, so dass es zu keiner T-Zellaktivierung durch CT-Antigene käme.

Fünf der 25 Proben von gesunden Knochenmarkspendern waren Proben mit aufgereinigten CD34+Progenitorzellen. Keine dieser 5 Proben zeigten eine CT-Antigenexpression. Die übrigen 20 Proben bestanden aus komplettem Knochenmark von gesunden Spendern. Es konnte auch für diese 20 Knochenmarkproben bis auf eine Ausnahme keine CT-Antigenexpression gezeigt werden. Andere Publikationen bestätigen die vorliegenden Ergebnisse [64, 65].

Cronwright et. al. [66] stellen die Hypothese auf, dass CT-Antigene in CD34+Zellen exprimiert seien. In Cronwrights et. al. Untersuchung wurden CD34+ Zellen aus drei Knochenmarkproben überprüft. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurden die Proben mittels Genarrays auf Genfamilien nicht

auf einzelne CT-Antigene überprüft. Dies könnte dazu führen, dass eine ganze Genfamilie tumorgewebeunspezifisch erscheint, obwohl in Wirklichkeit nur ein einzelner Vertreter sowohl in gesunden wie in Tumorgewebe exprimiert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem Fall SSX4 von einem Spender exprimiert und mittels Sequenzierung verifiziert. Es wäre möglich, dass SSX4 unspezifisch in gesundem als auch in Tumorgewebe exprimiert wird. Dies könnte erklären, warum Cronwright et. al. SSX-DNA in CD34+Zellen von gesunden Spendern nachweisen konnten. Die Ursache für die Expression in einer einzelnen Spenderprobe bleibt unklar, die übrigen Spenderproben zeigten keinerlei CT-Antigenexpression.

5.3 Genexpression bei Myelompatienten

Basierend auf den Ergebnissen zu den Myelomzelllinien wurden Knochenmarkproben von 55 Myelompatienten auf ihre CT-Antigenexpression untersucht. Wie in den Myelomzelllinien war die Expression der 15 untersuchten CT-Antigene in den Knochenmarkproben gehäuft. Das am häufigsten exprimierte CT-Antigen war MAGEC1. Dies ist ein bemerkenswertes Ergebnis, denn es wurde erstmals in einem großen Kollektiv diese häufige Expression von MAGEC1 gezeigt. Jungbluth et. al. [67] bestätigen in ihrer Untersuchung dieses Ergebnis.

Zu den häufig exprimierten CT-Antigenen gehörten außerdem MAGEC2 und MAGEA3 (siehe Kapitel 4.3.1 Abb.4). Auch hier ist hervorzuheben, dass in der vorliegenden Untersuchung erstmals die Expression von MAGEC2 bei Patienten mit Multiplen Myelom nachgewiesen wurde. Für den MAGE-A-Familienvertreter MAGEA3 wurde erstmals in einem großen Kollektiv eine häufige Genexpression belegt.

Die SSX-Familie war in den Knochenmarkproben selten exprimiert, einzig SSX1 konnte als häufig exprimiertes CT-Antigen identifiziert werden (siehe Abb.4,

Kapitel 4). Dieses Ergebnis wird von einer Studie Taylors et. al. [62]. bestätigt. Allerdings wurden in dieser Untersuchung häufigere Einzelexpression von SSX1, 2, 4 und 5 beschrieben als in der vorliegenden Arbeit gefunden werden konnte (siehe Abb.4, Kapitel 4). Die PCR-Protokolle oder Patienteneigenschaften der beiden Untersuchungen weisen keine Unterschiede auf, allerdings verwenden Taylor et.al als zusätzliche Methode die nested-PCR, während in dieser Arbeit mit einer konventionellen RT-PCR gearbeitet wurde.

Das CT-Antigen NYESO1 wurde im Knochenmark des Patientenkollektivs selten exprimiert (siehe Abb.4, Kapitel 4). Dieses Ergebnis wurde in einer Untersuchung von Jungbluth et. al. [67] bestätigt, während van Rhee et. al. [64] Daten diesem Ergebnis widersprechen. Van Rhee et. al. beschreiben, dass NYESO1 in ihrem Kollektiv sehr häufig exprimiert wurde. Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten sich aufgrund unterschiedlicher Methodenwahl erklären. Van Rhee et. al. verwenden Microarrays zur Analyse der CT-Antigenexpression, während von Taylor et. al. und in der vorliegenden Arbeit jedes Antigen einzeln mittels RT-PCR überprüft wurde. Ebenfalls wenig exprimiert wurde SPANXb in den Knochenmarkproben, obwohl es von Wang et. al. [65] als häufig exprimiertes CT-Antigen in Knochenmark von Myelompatienten beschrieben wurde. Das PCR-Protokoll dieser Studie und der von Wang et. al. stimmen überein. Das Patientenkollektiv war in dieser Untersuchung jedoch größer. Ob sich die Patienten beider Studien bezüglich klinischer Parameter wie Stadium oder Plasmazellinfiltration unterscheiden, lässt sich nicht feststellen, da Wang et. al. in ihrer Studie keine Angaben hierzu gemacht haben.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse stellen NY-ESO-1 und SPANXb keine geeigneten Kandidaten für eine Vakzinierungstherapie bei Multiplen Myelom dar. Hingegen repräsentieren aufgrund der hier gezeigten Ergebnisse MAGEA-3, MAGEC2 (CT10) und MAGEC1 ideale Kandidaten für eine Vakzinierungstherapie, da sie im Knochenmark von Myelompatienten häufig bis sehr häufig exprimiert werden, bei gleichzeitig fehlender Expression im gesunden Gewebe.

5.3.1 Co-Expressionen

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals das Expressionsmuster einer großen Anzahl CT-Antigene überprüft. Bei Untersuchung des Expressionsmusters der 15 untersuchten CT-Antigene in den 55 Knochenmarkproben von Myelompatienten wurde eine starke Co-Expression innerhalb von CT-Antigenfamilien und zwischen Vertretern unterschiedlicher Antigenfamilien deutlich. So exprimierten über die Hälfte der Proben mindestens drei CT-Antigene. (siehe Abb.3, Kapitel 4.). Dieses Ergebnis ist interessant im Hinblick auf eine therapeutische Nutzung der CT-Antigene als polyvalente Vakzinierung, um Tumor-„Escape“-Mechanismen zu verhindern. Als „Escape“-Mechanismus könnten Tumorzellen die Produktion einzelner Antigenen einstellen oder Veränderungen in Anzahl oder Peptidlänge der MHC-präsentierten Antigenmoleküle vornehmen, sodass die Immunüberwachung diese nicht mehr erkennen und bekämpfen kann.

5.3.1.1 Co-Expression innerhalb einer CT- Antigenfamilie, zwischen unterschiedlichen Gen-Familien und der Einfluss einzelner Antigene auf die CT-Antigenexpression insgesamt

Nach der häufigen Antigenexpression war die ausgeprägte Co-Expression verschiedener CT-Antigene in den Knochenmarkproben der Myelompatienten ein überraschendes Ergebnis dieser Arbeit. So wurden von knapp 30% der Patienten mindestens 5 CT-Antigene gleichzeitig exprimiert.

Es zeigte sich, dass bestimmte Antigene gehäuft zusammen exprimiert werden: Co-Expressionen zwischen Familienvertretern der SSX-Genfamilie waren häufig und weisen signifikante bis hochsignifikante Korrelationen auf (siehe Tabelle 5 in Anhang 1). Dies bestätigen Taylor [62]. et. al. in ihrer Untersuchung zur Expression von SSX-Antigenen im Knochenmark von Myelompatienten.

Vertreter der MAGE- Familie MAGEC1 und-C2 wurden ebenfalls häufig co-exprimiert und die Co-Expression weist eine hochsignifikante Korrelation auf.

Auch Co-Expressionen von Vertretern unterschiedlicher Genfamilien konnten vielfach beobachtet werden. Dabei zeigte sich, dass Kombinationen aus MAGEA3, MAGEC2 und MAGEC1 mit SSX- Familienvertretern gehäuft exprimiert wurden und signifikante Korrelationen aufwiesen.

Zum Expressionsmuster von CT-Antigenen gibt es keine gesicherten Daten. Als ein Ansatz kann die Tatsache betrachtet werden, dass sowohl die MAGE- als auch SSX-Genfamilie auf dem X-Chromosom kodiert ist und so häufig miteinander abgelesen werden. Entsprechend konnten Cho et. al. [68] mittels Immunpräzipitation eine Interaktion zwischen der MAGE homology domain (MHD) von MAGEC1(CT7) mit dem Bindungspartner NY-ESO1 nachweisen. Dabei scheinen beide Antigene im Zytoplasma der untersuchten Zellen über diese spezifische Protein-Proteinverbindungen miteinander zu interagieren und evtl. deshalb zusammen exprimiert zu werden.

Eine häufige Co-Expression für NY-ESO1 und MAGEC1 konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden, da NY-ESO1 ein wenig exprimiertes und MAGEC1 ein viel exprimiertes Antigen (siehe Abb. 4, Kapitel 4.4.1) ist. Dennoch wurde auch hier, wie schon beschrieben, eine gehäufte Co-Expression von CT-Antigenen, die auf dem X-Chromosom exprimiert werden, beobachtet.

Simpson et al. [50] sprechen von einem Gen-Expressionsprogramm als alternatives Modell der CT-Antigenexpression, welches koordiniert abläuft, im Gegensatz zu einzelnen zufälligen Gen-Expressionen z.B. infolge fortschreitender Demethylierung im Rahmen des Tumorprogresses. Old [68] unterstützt die Theorie eines Expressionsprogramms und spricht von einem „Aktivierungsprogramm“ analog der Gametogenese, in welcher CT-Antigene physiologisch in den verschiedenen Entwicklungsstadien exprimiert werden.

Dieses Aktivierungsprogramm könnte gerade die nah beieinander liegenden X-chromosomal lokalisierten CT-Antigene betreffen. Dabei wird von der

Demethylierung eines „Gatekeeper-Antigens“ ausgegangen, welche wiederum die Aktivierung anderer CT-Antigene in Gang setzt. Diese Theorie scheint anhand der in dieser Untersuchung gewonnenen Ergebnisse wahrscheinlich, da in Anwesenheit einzelner X-chromosomaler CT-Antigene wie MAGEA3, MAGEC2 und MAGEC1 eine deutlich häufigere CT-Antigenexpression insgesamt beobachtet werden konnte, als in Abwesenheit dieser Antigene. Im Gegenzug scheint kein anderes CT-Antigen Einfluss auf die Expression von MAGEA3, MAGEC2 und MAGEC1 zu haben (siehe Kapitel 4.3.3, Abb. 8, 9 und 10). So wurde im Kapitel 4.3.3 beschrieben, dass in Abwesenheit von MAGEA3, MAGEC2 oder MAGEC1, als Vertreter von X-CT-Antigenen, die Expression anderer X-Chromosomal-kodierter CT-Antigene vermindert zu beobachten war, während CT-Antigene, die auf Autosomen kodiert sind, wie z.B. ADAM2 oder LIPI unabhängig von der Expression von MAGEA3, MAGEC2 oder MAGEC1 zu sein scheinen.

In Untersuchungen zur Aktivierung von CT-Antigenen konnte als ein entscheidender Prozess die Demethylierung des DNA-Locus und insbesondere der Promoterregion von CT-Antigenen identifiziert werden [69]. Dabei wird ein Gen, welches durch Methylierung inaktiv war, mittels Abspaltung von Methylgruppen („Demethylierung“) wieder in die Lage versetzt, repliziert zu werden und somit aktiv am Zellzyklus teilzunehmen. Dies trifft auf Gene zu, die in der Embryogenese aktiv waren und im Zuge der weiteren Entwicklung „abgeschaltet“ wurden. Wischnewski et. al. [70] zufolge, führt der DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5'-Aza-Deoxycytidine in Kombination mit dem Histone-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A zu einer universellen Expression von MAGE A3 in Zelllinien. Dabei ist der Histone Deacetylase-Inhibitor in der Lage, bei methylierten wie demethylierten MAGE-Antigenen eine Transkriptionsaktivierung auszulösen. So ist die Information von Wischnewski et. al. insofern interessant, da nun mittels 5'-Aza-Deoxycytidine und Trichostatin A eine homogene Expression erreicht und einem Abschalten von MAGEA3 als einem Tumor-escape-Mechanismus entgegengewirkt werden kann.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in Myelompatienten häufige Co-Expressionen von CT-Antigenen vorkommen, sowohl innerhalb einer als auch zwischen verschiedenen Genfamilien. Für die therapeutische Nutzung von CT-Antigenen als polyvalente Vakzine ist dies eine wichtige Information, da so dem Tumor-escape-Versuch durch Supprimierung von einzelnen CT-Antigenen vorgebeugt werden kann. Herauszustellen ist die besondere Stellung von MAGEA3, MAGEC1 und MAGEC2, die eine Schlüsselrolle als „Gatekeeper“ auf die Expression weiterer X-chromosomaler CT-Antigene zu haben scheinen.

5.3.1.2 Korrelation von CT-Antigenexpression mit klinischen Parametern

Das Expressionsmuster von Cancer/Testis-Antigenen in soliden Tumoren ist zu großen Teilen bekannt, bei hämatologischen Erkrankungen ist dies noch nicht der Fall. Auch die Funktion der Antigene ist weitgehend unklar. Zur Erforschung von Aktivierung und Aufgaben von CT-Antigenen wurde im Rahmen der vorliegenden Studie versucht, Begleitfaktoren zu ermitteln, die die Expression womöglich bedingen oder zumindest mit ihrer Expression einhergehen.

Es konnte hier eine signifikante Zunahme an CT-Antigenen im höheren Lebensalter gezeigt werden (Abb.8, Kapitel 4).

Es spricht einiges dafür, dass CT-Antigene in frühen Erkrankungsstadien exprimiert werden. So konnten Andrade et. al. [71] und Jungbluth et. al. [67] CT-Antigene im MGUS-Stadium nachweisen. Diese Beobachtung konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden, da keine Patienten mit MGUS untersucht wurden, jedoch exprimierten auch alle drei Patienten der hier untersuchten Stichprobe im Stadium I CT-Antigene. Es wäre möglich, dass CT-Antigene als „Onkogene“ fungieren, indem sie den Krankheitsprogress vorantreiben. Dafür spricht die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit eine Beziehung zwischen Antigenexpression und progredientem Krankheitsverlauf gefunden wurde (Abb.5, Kapitel 4): So nimmt die Anzahl an CT-Antigenen signifikant mit Progredienz der Erkrankung zu. Gleichzeitig kommt es zu einem Abfall des Serum-

Hämoglobinwerts synchron mit einem Anstieg der CT-Antigenanzahl (Abb.7, Kapitel 4). Van Baren et. al. [72], Taylor et. al. [62] und Dhodapkar et. al. [73]. bestätigen eine Korrelation zwischen Stadium der Erkrankung und der Expression von Cancer/Testis-Antigenen in Myelompatienten.

Es konnte durch die vorliegende Untersuchung kein Zusammenhang zwischen einer chromosomalen Anomalie wie beispielsweise Deletion 13q14 und einer CT-Antigenexpression belegt werden, wie von van Rhee et. al. [64] berichtet. Die übrigen Parameter wie Plasmazellinfiltrationsgrad, Höhe des β^2 -Mikroglobulinwerts oder LDH-Konzentration zeigten ebenfalls keinerlei Korrelation mit der Expression von CT-Antigenen. So konnte ferner keine Korrelation zwischen Erkrankungsstadium und Höhe der CT-Antigenanzahl festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit zunehmendem Alter und Krankheitsprogress die Anzahl an CT-Antigenen ansteigt, jedoch schon in frühen Stadien die Expression nachweisbar ist. Hieraus ergibt sich zum einen die Option eines Screenings nach CT-Antigenen zur Früherkennung eines Krankheitsprogresses, zum anderen die Option zur Evaluierung eines Therapieerfolges mittels Erfassung der CT-Antigenexpression im Knochenmark der Myelompatienten.

5.3.1.3 Einfluss der CT-Antigenexpression auf das Gesamtüberleben

Im Kapitel 4.3.4. konnte gezeigt werden, dass die Expression von MAGEC1, SSX2 und MAGEC2 mit einer signifikanten Verschlechterung des Überlebens einhergeht, für MAGEA3 wird diesbezüglich knapp die Signifikanzgrenze verfehlt. Dieser Befund wird durch vorausgehende Beobachtung gestützt, dass die Antigenanzahl mit Fortschreiten der Erkrankung, also in höherem Stadium und bei niedrigen Hämoglobin-Werten, signifikant ansteigt.

Taylor et. al. [62] kommen für SSX2 und Jungbluth et. al. [67] für MAGEA-3 und MAGEC1 und Andrade et. al. [71] für MAGEC1 in Myelompatienten zu einem

ähnlichen Ergebnis. An soliden Tumoren konnte eine schlechtere Prognose im Zusammenhang mit der Expression von CT-X-Antigenen, insbesondere MAGEA3 und NY-ESO1 gezeigt werden [74-76]. Der Schluss liegt also nahe, dass CT-Antigene in hämatologischen Erkrankungen und soliden Tumoren eine möglicherweise funktionelle Rolle im Krankheitsprozess zu spielen.

So haben CT-Antigene eine Funktion in Transkriptionsprozessen: Wie Barker et. al. [77] berichten, hat MAGE-D1 als Bindungspartner für das Protein XIAP, DIX/MSX und den p75Neutrophin-Rezeptor antiapoptotische und Zellzyklus modellierende Aufgaben. Für MAGE-1 wurde von Laduron et. al. [78] beschrieben, dass es durch Unterdrückung von Transkriptionsprozessen die Zelldifferenzierung blockiert, so dass es zur vermehrten Bildung von Zellvorstufen kommt. Nach Duan et. al. [79] kann für MAGE-A3, -6 und -11 und GAGE die Expression von CT-Antigenen mit einem schlechten Therapieansprechen assoziiert werden. Sie haben eine erhöhte Expression dieser CT-Antigene in Zelllinien mit Resistenzen gegen die Chemotherapeutika Doxorubicin und Paclitaxel beobachtet.

Eine Theorie ist, dass die Antigenexpression mit dem Hypomethylierungsgrad zusammenhängt, da die im Krankheitsverlauf zunehmende Demethylierung mit einem Anstieg der CT-Antigenanzahl korreliert, wie auch Taylor et. al. [62] und Güre et. al. [50] dies im Falle der Expression von SSX- Antigenen berichten.

Insgesamt kann demnach zusammenfassend festgestellt werden, dass die Expression im Falle von MAGEC2 und MAGEC1 mit einer signifikanten, und im Falle von SSX2 mit einer hochsignifikanten Verschlechterung der Überlebensprognose bei Patienten mit Multiplen Myelom einhergeht, und diese CT-Antigene als Parameter zur Prognoseeinschätzung beim Multiplen Myelom geeignet sein könnten.

5.4 Kritikpunkte

Ein kritischer Aspekt der vorliegenden Arbeit mag die Größe der Stichprobe sein, d.h. die Anzahl untersuchter Patienten. Gleiches gilt für die Kontrollgruppe der Knochenmarkspender. Im Vergleich zu anderen Untersuchungen, die das Multiple Myelom fokussieren, hat diese Arbeit dennoch die größte Patienten- bzw. Spenderanzahl. Der Grund für die häufig recht geringe Anzahl untersuchter Patienten bzw. Spender in entsprechenden Studien liegt zum einen an der Tatsache, dass das Multiple Myelom auch in Schwerpunktzentren eine, im Vergleich zu anderen Tumoren, eher seltene Erkrankung ist und zum anderen in den in dieser Arbeit angewandten strengen Auswahlkriterien der Studienteilnehmer. So musste für die Patienten die Diagnose Multiples Myelom gesichert sein und eine Knochenmarkinfiltration von >10% in der untersuchten Knochenmarkprobe vorliegen. Ebenso durften nicht mehrere Proben eines Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten einfließen, was aufgrund der Pseudomyelisierung der Knochenmarkproben z. T. erst zum Ende des Untersuchungszeitraums gelang. Im Falle der Knochenmarkspender war die Abhängigkeit von der Entnahmefrequenz der entsprechenden Präparate und die Frage, ob eine ausreichende Menge PBSC gewonnen wurden, um für die Studie etwas erübrigen zu können, maßgeblich für die kleine Kontrollgruppe.

Weiter ergab sich aufgrund der Auswahlkriterien wie z.B. der Knochenmarkinfiltration im Hinblick auf das Erkrankungsstadium eine relative Inhomogenität bezüglich der Gruppengröße. Der überwiegende Teil der Patienten befand sich im Stadium III. In die Überlebensanalyse konnten ferner aufgrund mangelnder Daten nur 39 Patienten einbezogen werden.

Insgesamt führten die Kollektivgröße und die relative Inhomogenität der Untergruppen dazu, dass keine multivariaten Analyseverfahren als statistisches Mittel eingesetzt werden konnten.

5.5 Ausblick

Das Multiple Myelom ist trotz großer Fortschritte im Hinblick auf Stammzelltransplantation und medikamentöse Therapie nach wie vor eine unheilbare Krankheit. Aus diesem Grund sind die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung für die Diagnostik und Therapie des Multiplen Myeloms sehr ermutigend. Es wäre beispielsweise ein Einsatz von CT-Antigenen als Parameter in der Früherkennung denkbar, da CT-Antigene schon in frühen Erkrankungsstadien nachweisbar sind. Qui et. al. [80] sehen beispielsweise in der hypomethylierten MAGE-A-Promoterregion einen Marker zur Früherkennung des hepatozellären Karzinoms. Dieser Ansatz wäre für die Erkennung des Multiplen Myeloms ebenfalls denkbar, so könnte die Expression von CT-Antigenen bei Patienten mit MGUS zur Einschätzung der Prognose hilfreich sein. Auch für den Erkrankungsverlauf des Multiplen Myeloms wären sie als prognostischer Parameter einsetzbar, da die CT-Antigenanzahl mit Progredienz der Erkrankung ansteigt, und bei Entscheidungen zur Therapiestrategie das Expressionsmuster eine wichtige Information sein kann.

Cancer/Testis-Antigene sind grundsätzlich aufgrund ihrer immunaktivierenden Eigenschaften für die Immuntherapie vielversprechende Antigene [64, 81]. Aufgrund der im Rahmen der vorliegenden Studie gezeigten starken Co-Expression wäre eine polyvalente Vakzinierung ebenso wie eine Monotherapie mit einzelnen CT-Antigenen denkbar. In diesem Zusammenhang gibt es bereits erste Studien zur monovalenten Immuntherapie: So haben Davis et. al. [82] Melanompatienten mit NYESO-1 geimpft und hohe NYESO-1 spezifische CD4+ und CD8+-Titer gemessen. In einer weiteren Studie von Atanackovic et. al. [83] wurden Patienten mit Nichtkleinzelligem Bronchial-Ca (NSCLC) im Stadium I/II mit MAGE-A3 vakziniert. Nach einem dreijährigen Follow-up befanden sich 14 der 18 Patienten in kompletter Remission und es konnte nach einer Auffrischimpfung mit MAGE-A3 hohe CD4+ und CD8- Titer gegen MAGE-A3 Epitope gemessen werden [84].

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsmuster von Cancer/Testis-Antigenen an Zelllinien des Multiplen Myeloms und im Knochenmark von Patienten untersucht. Es konnte mittels RT-PCR eine sehr häufige Expression von 19 Cancer/Testis-Antigenen in den 11 untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. 10 der 11 Zelllinien exprimierten 8 CT-Antigene gleichzeitig. Am häufigsten wurden MAGEC1(90%), MAGEC2(90%), MAGEA3(90%), SSX4(90%) und BAGE(90%) exprimiert.

Auch im Knochenmark von 55 Patienten wurde eine häufige Expression von 15 untersuchten CT-Antigenen beobachtet. 50% der Patienten exprimierten mindestens 3 CT-Antigene gleichzeitig. Am häufigsten wurden in den Knochenmarkproben MAGEC1(72%), MAGEC2(56%) und MAGEA3(54,5%) gefunden. Das CT-Antigen MAGEC2 konnte hier zum ersten Mal in Myelomzelllinien und Knochenmarkproben von Patienten nachgewiesen werden.

Co-Expressionen innerhalb von Genfamilien, beispielsweise MAGEC1, MAGEC2 und MAGEA3 wurden von 34% (19/55) der Proben exprimiert. Ebenfalls häufig wurden CT-Antigene unterschiedlicher Genfamilien co-exprimiert.

Dahingegen konnte keinerlei CT-Antigenexpression im Knochenmark von 20 gesunden Knochenmarkspendern und 5 Proben von Gesunden mit CD34+Zellen nachgewiesen werden. Damit ist eine Co-Reaktion von unspezifischen Antikörpern gegen Knochenmarkzellen im Rahmen möglicher Vakzinierungsstrategien nicht zu befürchten.

Es fiel auf, dass die CT-Antigenexpression in den Patientenproben in Abwesenheit von MAGEC1, -C2 oder MAGEA3 stark vermindert war, während es in Anwesenheit von einem der drei Antigene zu einer häufigen Antigenexpression insgesamt kam. Dies ist ein Hinweis auf eine mögliche „Gatekeeper“-Funktion von MAGEC1, C2 und MAGEA3. Die „Gatekeeper“-Antigene könnten aktivierenden Einfluss auf die Expression weiterer CT-Antigene haben. Diese

Ergebnisse sind im Hinblick auf eine neue Therapiestrategie der Vakzinierung mit CT-Antigenen sehr interessant.

Schließlich konnte gezeigt werden, dass das Auftreten von den CT-Antigenen MAGEC1, MAGEC2 und SSX2 mit einer signifikanten bis hochsignifikanten Verschlechterung der Überlebensprognose von Myelompatienten einhergeht. Als weiterer Hinweis für diesen prognostischen Wert von CT-Antigenen ist der Zusammenhang zwischen Krankheitsprogression und Abnahme des Hämoglobinwertes mit dem Anstieg der Anzahl an CT-Antigenen zu sehen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Liebsch, P., Peest, D., Kröger, N., Einsele, H., DGHO-Leitlinie Multiples Myelom. DGHO, 2007: p. 1-11.
2. Goldschmidt, H., Cremer, Friedrich, Das Multiple Myelom. 1 ed. Uni-Med. Vol. 1. 2002, Bremen: Uni-Med Verlag. 123.
3. Pezzutto, A., Ulrichs, T; Burmester, G-R, Taschenatlas der Immunologie. 2007. 2.Auflage.
4. Longo, D.L., Schulze-Motel, A, Dörken, B., Erkrankungen der Plasmazellen, in Harrisons Innere Medizin Teil 1. 2002, ABW Wissenschaftsverlag. p. 805-809.
5. Int. myeloma working group, International uniform response criteria for multiple myeloma. Leukemia, 2006. 20.
6. Durie, B.G.M., Epidemiology of Multiple Myeloma and Related Diseases, in Biology and Management of Multiple Myeloma, J.R. Berenson, Editor. 2004, Humana Press. p. 13-37.
7. Kyle, R.A., Bergsagel, D., Diagnosis of Multiple Myeloma, in Biology and Management of Multiple Mylemoma, J.R. Berenson, Editor. 2004, Humana Press: Totowa, New Jersey. p. 1-13.
8. Stewart, A., Delayed effects of A-bomb radiation: a review of recent mortality rates and risk estimates for five-year survivors. Journal of Epidemiology and Community Health, 1982. 36: p. 80-86.
9. Chang, E., Smedby KE, Hjalgrim H, Porwit-MacDonald A, Roos G, Glimelius B, Adami HO., Family history of hematopoietic malignancy and risk of lymphoma. Journal of the National Cancer Institut, 2005. 97(19): p. 1466-74.
10. Rajkumar, S., MGUS and Smoldering Multiple Myeloma: Update on Pathogenesis, Natural History, and Management. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program), 2005: p. 340-5.
11. Kyle, R.A., Remstein, E., Therneau, T., Clinical course and prognosis of smoldering multiple myeloma. New England Journal of Medicine, 2007. 356(25): p. 2582-2590.

12. Mester, B., Nieters A, Deeg E, Elsner G, Becker N, Seidler A., Occupation and malignant lymphoma: a population based case control study in Germany. *Occupation and Environment Medicine*, 2006. 63(1): p. 17-26.
13. Durie, B.G.M. International Myeloma Foundation. [Homepage] 2007; Available from: www.myeloma.org.
14. Friedrich, B., Zytogenetische Veränderungen beim Multiplen Myelom und der Plasmazelleukämie, in *Onkologie und Hämatologie*, Universitätskrankenhaus Eppendorf. 1998, Universität Hamburg: Hamburg. p. 95.
15. Fonseca, R., Barlogie, Bart, Bataille, Regis, Bastard, Christian, Bergsagel, P. Leif, Chesi, Marta, Davies Faith, Drach, Johannes, Greipp, Phillip, Kirsch, Ilan, Kuehl, Michael, Hernandez, Jesus, Minville, Stephane, Pilarski, Linda, Shaughnessy, John, Stewart and Avet-Loiseau, Herve, *Genetics and cytogenetics of Multiple myeloma: a workshop report. cancer research*, 2004. 64: p. 1546-58.
16. Rajkumar, S., ed. *MGUS and smoldering multiple myeloma: Update on pathogenesis, natural history and management. Education program book 2005*, ed. A.e.p. book. 2005, American Society of hematology: Atlanta. 340-45.
17. Dankbar, B., Padro T, Leo R, Feldmann B, Kropff M, Mesters RM, Serve H, Berdel WE, Kienast J., *Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. Blood*, 2000. 95(8): p. 2630-6.
18. Klein, B., Zhang, X-G, Zhao-Yang, L, Bataille, Régis, *Interleukin-6 in Human Multiple Myeloma. Blood*, 1995. 85(4): p. 863-872.
19. Qiang YW, C.Y., Stephens O, Brown N, Chen B, Epstein J, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr, *Myeloma-derived Dickkopf-1 disrupts Wnt-regulated osteoprotegerin and RANKL production by osteoblasts: a potential mechanism underlying osteolytic bone lesions in multiple myeloma. Blood*, 2008. 112(1): p. 196-207.
20. Herold, G., *Innere Medizin*. 2006.
21. Clark AD, S.A., Soutar R, *Renal failure and multiple myeloma: pathogenesis and treatment of renal failure and management of underlying myeloma. Blood Review*, 1999. 13(2): p. 70-90.

22. Stewart, A., Bergsagel, PL, Greipp, R, Dispenzier, A, Gertz, MA, Hayman, SR, Kumar, S, Lacy, MQ, Lust, JA, Russel, SJ, Witzig, TE, Zeldenrust, SR, Dingli, D, Reeder, CB, Roy, V, Kyle, R, Rajkumar, SV, Fonseca, R, A practical guide to define high-risk myeloma for clinical trials, patient counseling and choice of therapy. *Leukemia*, 2007. 21: p. 529-534.
23. Group, M.T.s.C., Combination chemotherapy vs melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma. *Journal of clinical oncology*, 1998. 16: p. 3832-42.
24. Kyle, R., Rajkumar, SV., Multiple Myeloma. *Blood*, 2008. 111(6): p. 2962-72.
25. Dimopoulos, M., Anagnostopoulos, A, Weber, D, Treatment of plasma cell dyscrasias with thalidomide and its derivatives. *Journal of clinical oncology*, 2003. 21(23): p. 4444-54.
26. Dicato, M., Boccadoro, M, Cavenagh, J, Harousseau, JL, Ludwig, H, San Miguel, J, Sonneveld, P, Management of multiple myeloma with bortezomib: experts review the data and debate the issues. *Oncology*, 2006. 70(6): p. 474-82.
27. Ludwig, H., Advances in biology and treatment of multiple myeloma. *Annals of oncology*, 2005. 16(supplement 2): p. ii106-ii112.
28. Tricot, G., Vesole, DH, Jagannath, S, Graft versus myeloma effect: proof of a principle. *Blood*, 1996. 87: p. 1196-98.
29. Björkstrand, B., Ljungman, P, Svensson, H, Hermans, J, Alegre, A, Apperley, J, Bladé, J, Carlson, K, Cavo, M, Ferrant, A, Goldstone, AH, de Laurenzi, A, Majolino, I, Marcus, R, Prentice, HG, Remes, K, Samson, D, Sureda, A, Verdonck, LF, Volin, L, Gahrton, G., Allogeneic bone marrow transplantation versus autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: a retrospective case-matched study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*, 1996. 12: p. 4711-8.
30. Lenhoff, S., Hjorth, M, Holmberg, E, Turesson, I, Westin, J, Lanng Nielsen, J, Wisloff, F, Brinch, L, Carlson, K, Carlsson, M, Dahl, I-M, Gimsing, P, Hippe, E, Johnsen, H, Lamvik, J, Löfvenberg, E, Nesthus, I, and Rødder, S, for the Nordic Myeloma Study Group, Impact on survival of high-dose therapy with autologous stem cell support in patients younger than 60 years with newly diagnosed multiple myeloma: a population-based study. *Blood*, 2000. 95(1): p. 7-11.

31. Greipp, R., San Miguel, J, Durie, B G M, Crowley, J J, Barlogie, B, Bladé, J, Boccadoro, M, Child, J A, Avet-Loiseau, H, Kyle, R A, Lahuerta, J J, Ludwig, H, Morgan, G, Powles, R, Shimizu, K, Shustik, C, Sonneveld, P, Tosi, P, Turesson, I, Westin, J, International Staging System for Multiple Myeloma. *Journal of clinical oncology*, 2005. 23(15): p. 3412-3420.
32. Durie, B., Salmon, SE, A clinical staging system for multiple myeloma. *Cancer*, 1975. 36: p. 842-854.
33. Clark, W., Stewart, Ak, Rock, GA, Sternbach, M, Sutton DM, Brendan J, Barrett, BJ, Heldenheim, AP, Garg, AX, Churchill, DN and the Canadian Apheresis Group, Plasma Exchange When Myeloma Presents as Acute Renal Failure. *Annals of Internal Medicine*, 2005. 143: p. 777-784.
34. Beverley, P., Carroll, M.; Stern, P, Immunity and cancer, in *Cancer vaccines and immunotherapy*, P.C. Beverley, M.; Stern, P, Editor. 2000, Cambridge university press. p. 1-18.
35. Beyer, M., Schultze, J L, Regulatory T cells in cancer. *Blood*, 2006. 108(3): p. 804-809.
36. Dazzi, F., Szydlo RM, Cross, NC, Craddock, JK, Kanfer, E, Cwynarski, K, Olavarria, E, Yong, A, Apperley, JF, Goldman, JM, Durability of responses following donor lymphocyte infusions for patients who relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukemia. *Blood*, 2000. 96(8): p. 2712-6.
37. Alyea E, W.E., Schlossman R, Canning C, Webb I, Doss D, Mauch P, Marcus K, Fisher D, Freeman A, Parikh B, Gribben J, Soiffer R, Ritz J, Anderson K, T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation followed by donor lymphocyte infusion in patients with multiple myeloma: induction of graft-versus-myeloma effect. *Blood*, 2001. 98(4): p. 934-9.
38. Kwak LW, T.D., Duffey PL, Bensinger WI, Bryant EM, Reynolds CW, Longo DL, Transfer of myeloma idiotype-specific immunity from an actively immunised marrow donor. *Lancet*, 1995. 345(8956): p. 1016-20.
39. Brunner, K., MacDonald, HR, Cerottini, JC, Quantitation and clonal isolation of cytolytic T lymphocyte precursors selectively infiltrating murine sarcoma virus-induced tumors. *Journal of Experimental Medicine*, 1981. 154(2): p. 36273.
40. Burges A, W.P., Kümper C, Gorbounova V, Sommer H, Schmalfeldt B, Pfisterer J, Lichinitser M, Makhson A, Moiseyenko V, Lahr A, Schulze E, Jäger M, Ströhlein MA, Heiss MM, Gottwald T, Lindhofer H, Kimmig R.,

Effective relief of malignant ascites in patients with advanced ovarian cancer by a trifunctional anti-EpCAM x anti-CD3 antibody: a phase I/II study. *Clinical cancer research*, 2007. 13(13): p. 3899-905.

41. Butler, M., Lee, J-S, Ansén, S, Neuberger, D, Hodi, FS, Murray, AP, Drury, L, Berezovskaya, A, Mulligan, RC, Nadler, LM, Hirano, N, Long-lived antitumor CD8⁺ lymphocytes for adoptive therapy generated using an artificial antigen-presenting cell. *Clinical cancer research*, 2007. 13(6): p. 1857-67.
42. Takenaka A, Y.Y., Miyake H, Hara I, Fujisawa M, Clinical outcomes of bacillus Calmette-Guérin instillation therapy for carcinoma in situ of urinary bladder. *International journal of urology*, 2008. 15(4): p. 309-13.
43. Maio, M., Sigalotti, L, Coral, S; Di Giacomo, AM; Altomonte, M; Lamaj, E; Fonsatti, E, Targeting the Immune System to Tumor-associated Antigens, in *Cancer therapy- molecular targets in tumor-host interactions*, G.F. Weber, Editor. 2005, horizon bioscience. p. 247-264.
44. Zafir- Lavie, I., Michaeli, Y, Reiter, Y, Novel antibodies as anticancer agents. *Oncogene*, 2007. 26: p. 3714-3733.
45. Harding, J., Burtness, B., Cetuximab: an epidermal growth factor receptor chimeric human-murine monoclonal antibody. *Drugs today*, 2005. 41(2): p. 107-127.
46. McKeage, K., Perry, CM., Trastuzumab: a review of its use in the treatment of metastatic breast cancer overexpressing HER2. *Drugs today*, 2002. 62(1): p. 209-243.
47. Marcus, R., Hagenbeek, A, The therapeutic use of rituximab in non-Hodgkin's lymphoma. *European Journal of Haematology Suppl.*, 2007. 67: p. 5-14.
48. Hassan, R., Bera, T, Pastan, I, Mesothelin: a new target for immunotherapy. *Clinical cancer research*, 2004. 10: p. 3937-3942.
49. Old, L., Chen, Y-T, New paths in human cancer serology. *Journal of experimental medicine*, 1998. 187(8): p. 1163-1167.
50. Simpson, A., Caballero, O. L., Jungbluth, A, Chen, Y-T, Old, L. J., Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nature reviews*, 2005: p. 1-11.
51. Tureci O, S.U., Zwick C, Koslowski M, Seitz G, Pfreundschuh M, Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of

- cancer/testis antigens. *Proc of the Nat Acad Sciences USA*, 1998. 95(9): p. 5211-6.
52. Kalejs, M., Erenpreisa, J, Cancer/testis antigens and gametogenesis: a review and "brain-storming" session. *Cancer cell international*, 2005. 5(4).
 53. Baylin, S.B., Herman, J. G., hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends in Genetics*, 2000. 16: p. 168-74.
 54. De Smet, C., de Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F., Boon, T., the activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proceedings National Academy of Sciences (PNAS)*, 1996. 93: p. 7149-7153.
 55. Knuth, A., Danowski, B., Oettgen, H. F. & Old, L. J., T-cell mediated cytotoxicity against autologous malignant melanoma: analysis with interleukin 2-dependent T-cell cultures. *Proc. Natl Acad. Sci.*, 1984. 81: p. 3511–3515.
 56. Güre, A., Wei, I.J., Old, L. J., Chen, Y-T, The SSX gene family: Characterization of 9 complete genes. *International journal of cancer*, 2002. 101: p. 448-453.
 57. Stockert, E., Jäger, E, Chen, Y-T, Scanlan, M.J., Gout, I, Karbach, J, Arand, M, Knuth, A, Old, L.J., A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *Journal of experimental medicine*, 1998. 187(8): p. 1349-54.
 58. Gnjatic, S., Atanackovic, D, Jäger, E, Matsuo, M, Selvakumar, A, Altorki, N.K, Maki, R. G, Dupont, B, Ritter, G, Chen, Y-T, Knuth, A, and Old, L J. , Survey of naturally occurring CD4 T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: Correlation with antibody responses. *PNAS*, 2003. 100(15): p. 8862-67.
 59. Jäger E, N.Y., Gnjatic S, Wada H, Stockert E, Karbach J, Dunbar PR, Lee SY, Jungbluth A, Jäger D, Arand M, Ritter G, Cerundolo V, Dupont B, Chen YT, Old LJ, Knuth A., Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *PNAS*, 2000. 97(9): p. 4760-5.
 60. Chambost, H., Baren, N. van, Brasseur, F., Olive, D., MAGE-A genes are not expressed in human leukemias. *Leukemia*, 2001. 15: p. 1769-71.

61. Türeci, Ö., Chen, Y-T, Sahin, U, Güre, A O, Zwick, C, Villena, C, Tsang, S, Seitz, G, Old, L J., Pfreundschuh, M., Expression of SSX genes in human tumors. *International journal of cancer*, 1998. 77: p. 19-23.
62. Taylor, B., Reiman, Tony; Pittman, J. A., Keats, J. J. ; de Bruijn, D, Mant, M.J., Belch, A.R., Pilarski, L. M., SSX Cancer Testis Antigens are Expressed in most Multiple Myeloma patients. *Immunotherapy*, 2005. 28(6): p. 564-575.
63. Pellat-Deceunynck, C., Mellerin MP, Labarrière N, Gaetan J, Moreau-Aubry A, Harousseau J-L, Jotereau F, Bataille R, The cancer germi-line genes MAGEA-1, MAGEA-3 and PRAME are commonly expressed in myeloma cells. *European Journal of Immunology*, 2000. 30: p. 803-809.
64. van Rhee, F., Szmania SM, Zhan F, Gupta SK, Pomtree M, Lin P, Batchu RB, Moreno A, Spagnoli G, Shaughnessy J, Tricot G., NY-ESO-1 is highly expressed in poor-prognosis multiple myeloma and induces spontaneous humoral and cellular immune responses. *Blood*, 2005. 105(10): p. 3939-44.
65. Wang, Z., Zhang, Y., Liu, H., Salati, E., Chriiva- Internati, M., Lim, S H, Gene expression and immunologic consequence of SPAN-Xb in myeloma and other hematologic malignancies. *Blood*, 2003. 101: p. 955-960.
66. Crownwright , G., Le Blanc, K, Götherström, C, Darcy, P, Ehnman, M., Brodin, B., Cancer/testis antigen expression in human mesenchymal stem cells: Down-regulation of SSX impairs cell migration and matrix metalloproteinase 2 expression. *cancer research*, 2005. 65: p. 2207-2215.
67. Jungbluth, A., Ely, S, DiLiberto, M, Niesvizky, R, Williamson, B, Frosina, D, Chen, Yao-T, Bhardwaj, N, Chen-Kiang, S, Old, L.J., Cho, H.J., The cancer/testis antigens CT7 (MAGE-C1) and MAGE-A3/6 are commonly expressed in multiple myeloma and correlate with plasma-cell proliferation. *Blood*, 2005. 106(1): p. 167-174.
68. Old, L.J., Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer immunology*, 2001. 1(1).
69. Sigalotti, L., Fratta, E, Coral, S, Tanzarella, S, Danielli, R, Colizzi, F, Fonsatti, E, Traversari, C, Altomonte, M, Maio, M, Intratumor heterogeneity of cancer/testis antigens expression in human cutaneous melanoma is methylation-regulated and functionally reverted by 5-aza-2'-desoxycytidine. *Cancer Research*, 2004. 64: p. 9167-9171.
70. Wischnewski, F., Pantel, K, Schwarzenbach, H, Promoter Demethylation and Histone Acetylation Mediate Gene Expression of MAGE-A1, -A2, -

A3, and -A12 in Human Cancer Cells. *Molecular cancer research*, 2006. 4(5): p. 339-49.

71. Andrade, V., Vettore, A, Felix, R. Almeida, M, de Carvalho, F, de Oliveira, J, de Lourdes, M, Chauffaille, L, Andriolo, A, Caballero, O, Zago, M, and Colleoni, G Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients *Cancer immunity*, 2008. 8: p. 1-8.
72. van Baren, N., Brasseur F, Godelaine D, Hames G, Ferrant A, Lehmann F, Andre M, Ravoet C, Doyen C, Spagnoli GC, Bakkus M, Thielemans K, Boon T., Genes encoding tumor-specific antigens are expressed in human myeloma cells. *Blood*, 1999. 94(4): p. 1156-64.
73. Dhodapkar, M.V., Osman, K., Teruya-Feldstein, J, Fillippa, D, Hedvat, C. V., Iversen, K, Kolb, D., Geller, M: D., Hassoun, H., Kewalramani, T., Comenzo, R. L., Coplan, K., Chen, Y-T., Jungbluth, A. A., Expression of cancer/testis antigens MAGE.A1, MAGE-A3, MAGE-A4, CT-7, and NY-ESO-1 in malignant gammopathies is heterogeneous and correlates with site, stage and risk status of disease. *cancer immunity*, 2003. 3: p. 1-8.
74. Güre, A., Chua, R, Williamson, B, Gonen, M, Ferrera, CA, Gnjatic, S, Ritter, G, Simpson, AJG, Chen, Y-T, Old, LJ, Altorki, NK, cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 2005. 11(22): p. 8055-8061.
75. Honda, T., Tamura, G, Waki, T, Kawata, S, Terashima, M, Nishizuka, S, Motoyama, T., Demethylation of MAGE promoters during gastric cancer progression. *British Journal of Cancer*, 2004. 90(4): p. 838-43.
76. Yakirevich, E., Sabo, E, Lavie, O, Mazareb, S, Spagnoli, GC, Resnick, MB., Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in serous ovarian neoplasms. *Clinical cancer research*, 2003. 9(17): p. 6453-60.
77. Barker, P., Salehi, A, The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease. *Journal of neuroscience research*, 2002. 67(6): p. 705-12.
78. Laduron, S., Deplus, R, Zhou, S, Kholmanskikh, O, Godelaine, D, De Smet, C, Hayward, S. D, Fuks, F, Boon, T, and De Plaen, E, MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription. *Nucleic Acids Research*, 2004. 32(14): p. 4340-50.

79. Duan Z, D.Y., Lamendola DE, Yusuf RZ, Naeem R, Penson RT, Seiden MV, Overexpression of MAGE/GAGE genes in paclitaxel/doxorubicin-resistant human cancer cell lines. *Clinical cancer research*, 2003. 9(7): p. 2778-85.
80. Qiu, G., Fang, J, He, Y, 5' CpG island methylation analysis identifies the MAGE-A1 and MAGE-A3 genes as potential markers of HCC. *Clinical Biochemistry*, 2006. 39: p. 259-66.
81. Goodyear, O., Piper, K, Khan, N, Starcynski, J, Mahendra, P, Pratt, G, Moss, P, CD8+T cells specific for cancer germline gene antigens are found in many patients with multiple myeloma and their frequency correlates with disease burden. *Blood*, 2005. 106(13): p. 4217-4224.
82. Davis ID, C.W., Jackson H, Parente P, Shackleton M, Hopkins W, Chen Q, Dimopoulos N, Luke T, Murphy R, Scott AM, Maraskovsky E, McArthur G, MacGregor D, Sturrock S, Tai TY, Green S, Cuthbertson A, Maher D, Miloradovic L, Mitchell SV, Ritter G, Jungbluth AA, Chen YT, Gnjatic S, Hoffman EW, Old LJ, Cebon JS., Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans. *PNAS*, 2004. 101(29): p. 10697-702.
83. Atanackovic, D., Altorki, NK, Stockert, E, Williamson, B, Jungbluth, AA, Ritter, E, Santiago, D, Ferrara, CA, Matsuo, M, Selvakumar, A, Dupont, B, Chen, YT, Hoffman, GW, Ritter, G, Old, LJ; and Gnjatic, S, Vaccine induced CD4+ T cell responses to MAGE-A3 in lung cancer patients. *Journal of immunology*, 2004. 172(5): p. 3289–3296.
84. Atanackovic, D., Altorki, NK, Cao, Y, Ritter, E, Ferrara, CA, Ritter, G, Hoffman, GW, Bokemeyer, C, Old, LJ; and Gnjatic, S, Booster vaccination of cancer patients with MAGE-A3 protein reveals long-term immunological memory or tolerance depending on priming. *PNAS*, 2008. 105(5): p. 1650-55.

ANHANG I: TABELLEN

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach Durie und Salmon und nach Internationalem Stadien Score (ISS):

Durie und Salmon (1975)		ISS (2005)	
	<i>Definition</i>		<i>Definition</i>
Stadium I	Hb > 10g/dl	Stadium I	Serum β^2 -Mikroglobulin < 3,5 mg/l
	Kalzium < 12mg/dl		Serumalbumin > 3,5g/dl
	Keine oder eine Osteolyse		
	Paraproteinsynthese:		
	IgG: < 5 g/dl		
	IgA: < 3g/dl		
	Leichtketten im Urin < 4 g/ 24h		
<i>Mediane Überlebenszeit</i>	> 5 Jahre		> 62 Monate
Stadium II	Weder Stadium I noch III	Stadium II	Weder Stadium I noch III*
<i>Mediane Überlebenszeit</i>	2,5- 4 Jahre		44 Monate
Stadium III	Hb < 8,5g/dl	Stadium III	Serum β^2 -Mikroglobulin > 5,5 mg/l
	Kalzium > 12mg/dl		
	Paraproteinsynthese:		
	IgG: > 7g/dl		
	IgA: > 5g/dl o		
	Leichtketten im Urin > 12g/ 24h		
<i>Mediane</i>			

<i>Überlebenszeit</i>	1-2 Jahre		29 Monate
A	Serumkreatinin < 2 mg/dl		
B	Serumkreatinin > 2 mg/dl		
<i>Mediane Überlebenszeit</i>	< 1 Jahr		

*Anmerkung: * Stadium II ist in zwei Untergruppen aufgeteilt: Serum β^2 -Mikroglobulin < 3,5 mg/l, aber Serumalbumin < 3,5 g/dl, oder Serum- β^2 -Mikroglobulin 3,5-<5,5 mg/l unabhängig vom Serumalbumin*

Tabelle 2: Verwendete Materialien

<u>Versorgung der Zelllinien:</u>
RPMI 1640, Summit Biotechnology, Fort Collins ,USA
10% FCS, Summit Biotechnology, Fort Collins ,USA
<u>Zellseparation:</u>
Ficoll Paque, Biochrom AG, Berlin
Phosphate-buffered salin (PBS), Gibcoll, Paisley, GB
Zentrifuge Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau
2-β-Mercaptoethanol
Tryptan blue solution 0,4%, Sigma, St. Louis, USA
Mikroskop Telaval 31, Zeiss, Jena
RLT-Puffer, Qiagen, Hilden
<u>RNA-Isolation:</u>
Qiashredder, Qiagen, Hilden
70%-Ethanol, J.T.Baker, Deventer, Niederlande
RNA- und DANN freies Wasser, Sigma, Steinheim
Röhrchen, Eppendorf, Hamburg
<u>cDNA:</u>
10xPuffer, Promega, Mannheim
MgCl ² , Promega, Mannheim
Random Primer, Invitrogen, Karlsruhe
dNTP (dATP, dGTP, dUTP, dCTP), Invitrogen, Karlsruhe
RNAsin, Promega, Mannheim
AMV-reverse transkriptase, Promega, Mannheim
Master cycler gradient, Eppendorf, Hamburg
<u>RT-PCR:</u>
MgCl ² , Perkin-Elmer Applied Biosystems
10xPuffer, Perkin-Elmer Applied Biosystems
dNTP(dATP, dGTP, dTTP, dCTP), Invitrogen, Karlsruhe
Primer, MWG-Biotech, Ebersberg
AmpliTaqGold, Perkin-Elmer Applied Biosystems

RNAse, DNase freies Wasser, Sigma, Steinheim
0,2ml-Röhrchen-Kette, Sarstedt
Humane Testis RNA, Ambion, Austin, USA
Master cycler gradient, Eppendorf, Hamburg
<u>Gelelektrophorese:</u>
Trisbase
Aqua bidest., Th.Geyer, Berlin
Essigsäure
EDTA (0,5M EDTA, pH 8)
RNA,DANN freies Wasser, Sigma, Steinheim
Gelelektrophorese-Kammer, Biorad DANN-Subcell und 1000/500 power supply
Ethidiumbromid, Invitrogen, Karlsruhe
CCD-Kamera, Appogene imager
<u>Sequenzierung:</u>
Qiaquick GelExtractionkit, Qiagen, Hilden
BigDyeKit V.1.1, Applied Biosystems
Primer, MWG Biotech, Ebersberg
RNAse und DNase freies Wasser, Sigma, Steinheim
Master cycler gradient, Eppendorf, Hamburg
100%-Ethanol, J.T.Baker, Deventer, Niederlande
70-Ethanol, J.T.Baker, Deventer, Niederlande
Zentrifuge, Biofuge 13R, Heaeus Sepatech, Hanau
Speedvac, Hetovac, Intermed CT60 e
ABI Prism 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems

Tabelle 3: Übersicht CT-Antigenprimer und Annaelngtemperaturen

Gene	Primersequenz		Temp. (°C)	Länge (bp)
MAGEC2/CT10	For:	5'-CGG ATC GAA GGC ATT TGT GAG-3'	55	884
	Rev:	5'- GTG AAC TCA CGG GCT CTC TTG AG-3'		
MAGEA3/CT1.3	For:	5'- GAA GCC GGC CCA GGC TCG-3'	60	423
	Rev:	5'- GAA GTC CTC ATA GGA TTG GCT-3'		
MAGEA4/CT1.4	For:	5'-GAG CAG ACA GGC CAA CCG-3'	60	420
	Rev:	5'-AAG GAC TCT GCG TCA GGC-3'		
MAGEC1/CT7	For:	5' -GACGAGGATCGTCTCAGGTCAGC- 3'	60	631
	Rev:	5'-ACATCCTCACCCCTCAGGAGGG-3'		
NY-ESO-1/CT6	For:	5`-CAG GGC TGA ATG GAT GCT GCA GA-3'	60	332
	Rev:	5`-GCG CCT CTG CCC TGA GGG AGG-3'		
SSX1/CT5.1	For:	5`-CTA AAG CAT CAG AGA AGA GAA GC-3`	60	421
	Rev:	5`-AGA TCT CTT ATT AAT CTT AGA AA-3`		
SSX2/CT5.2	For:	5`-GTG CTC AAA TAC CAG AGA AGA TC-3`	60	434
	Rev:	5`-TTT TGG GTC CAG ATC TCT CGT G-3`		
SSX3/CT5.3	For:	5`-GGA AGA GTG GGA AAA GAT GAA AGT-3`	60	381
	Rev:	5`-CCC CTT TTG GGT CCA GAT ATC A-3`		
SSX4/CT5.4	For:	5`-AAA TCG TCT ATG TGT ATA TGA AGC T-3`	60	413
	Rev:	5`-GGG TCG CTG ATC TCT TCA TAA AC-3`		
SSX5/CT5.5	For:	5`-GTT CTC AAA TAC CAC AGA AGA-3`	60	325
	Rev:	5`-CTC TGC TGG CTT CTC GGG CG-3`		
SSX6/CT5.6	For:	5`-CTA AAG CAT CAG AGA AGA GAA GC-3`	60	433
	Rev:	5`-TTT TGG GTC CAG ATC TCT CGT G-3`		
SSX7	For:	5`-TTT GCA AGG AGA CCT AGG GC-3`	60	555
	Rev:	5`-GGG GAG TTA CTC GTC GTC TTC T-3`		
SSX8	For:	5`-AAA GAG ACC CAG GGA TGA TGA-3`	65	515
	Rev:	5`-CTC TTC ATA AAT CAC CAG CTG G-3`		
BAGE/CT2	For:	5`-TGG CTC GTC TCA CTC TGG-3`	60	285
	Rev:	5`-CCT CCT ATT GCT CCT GTT G-3`		
ADAM2/CT15	For:	5`-AGG AAT TAT GAA ACC ACT TG-3`	60	369
	Rev:	5`-GAC AAC AGT TGT ATC AGA CC-3`		

LIP1/CT17	For:	5'-ACA AGA CTA GCT TAT GTG TGG-3'	60	325
	Rev:	5'-TTG AGC AAG AAT CTT TGA CTT C-3'		
LDHC/CT32	For:	5'-TGC CGT AGG CAT GGC TTG TGC-3'	60	823
	Rev:	5'-CAA CAT CTG AGA CAC CAT TCC-3'		
SPANXb/CT11.2	For:	5'-GCG GAT CCA TGG GCC AAC AAT CC-3'	55	328
	Rev:	5'-GCA AGC TTT TGC TAC TTT TTA GG-3'		
SYCP1/CT8	For:	5'-GTA CAG CAG AAA GCA AGC AAC TGA ATG-3'	55	564
	Rev:	5'-GAA GGA ACT GCT TTA GAA TCC AAT TTC C-3'		
GAPDH	For:	5'-TGA TGA CAT CAA GAA GGT GG-3'	60	246
	Rev:	5'-TTT CTT ACT CCT TGG AGG CC-3'		

Tabelle 4: Klinische Merkmale bei Patienten

Merkmale	Patientenanzahl	CT-Ag-Anzahl pro Patient (SA)	<i>p</i>
Gesamt	55	3.1 (2.3)	
Alter			.001
≤60 J	22	1.2 (1.5)	
>60 J	33	3.1 (2.0)	
Geschlecht			.69
männlich	38	2.4 (2.5)	
weiblich	17	2.2 (2.0)	
Knochenmarkinfiltration mit Plasmazellen (%)			.19
10-55%	26	2.8 (2.3)	
56-100%	29	3.4 (2.3)	
Schwerketten-Isotyp			.77
IgG	26	2.2 (1.9)	
IgA	16	2.7 (2.2)	
IgA+IgG	1	5.0	
IgM	2	3.0 (0.0)	
Leichtketten	8	3.6 (2.6)	
Nicht bekannt	2	7(1)	
Leichtketten- Isotyp			.28
Kappa	34	3.4 (2.4)	
Lambda	17	2.5 (1.7)	
Nicht bekannt	4		
Stadium			.03
I	3	1.7 (0.6)	
II	5	0.4 (0.9)	
III	47	2.6 (2.1)	
Serum β²-Mikroglobulin			.51
3.5 mg/L	19	1.6 (1.5)	
3.5 – 5.5 mg/L	4	1.5 (1.3)	
> 5.5 mg/L	12	3.2 (2.1)	
Serum-Calcium			

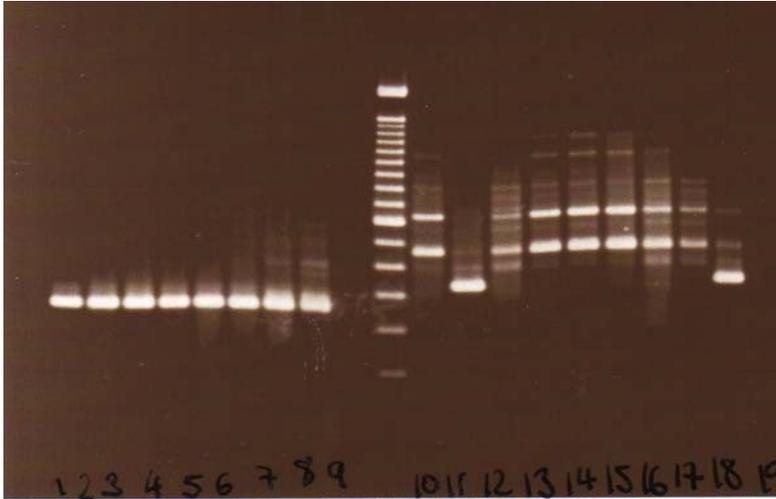
≤2,65mmol/l	41	3 (2.1)	
>2,65 mmol/l	7	3.8 (2.5)	
Nicht bekannt	7		
Serum –Albumin			.99
≤3.5 g/L	20	2.4 (2.0)	
>3.5 g/L	21	2.4 (2.1)	
Serum LDH			.07
≤ 210 U/L	36	1.9 (1.7)	
>210U/L	14	3.4 (2.7)	
Serum Hämoglobin(g/dl)			.06
Hb-Wert 7-9.5 g/dl	15	4.3 (1.9)	
Hb-Wert 9.6-11.9 g/dl	23	2.7 (2.6)	
Hb-Wert >12 g/dl	14	2.6 (1.6)	
Chromosomenanalyse			.85
Deletion 13q14	18	3.0(2.4)	
Keine Deletion 13q14	21	3.1(2.3)	
Keine Analyse	16		
bisherige Therapie			.78
Keine	5	3.0 (2.9)	
Nur Chemotherapie	30	2.3 (1.8)	
Autologe Knochenmarktransplantation	13	2.2 (2.0)	
Allogene Knochenmarktransplantation	7	2.4 (2.0)	

Tabelle 5: Co-Expression der CT-Antigenfamilienvertreter in Knochenmarkproben von 55 Myelompatienten

Exprimiertes Antigen	Coexprimiertes Antigen											
	SSX1	SSX2	SSX4	SSX5	MAGEA3	MAGEA4	CT7	CT10	BAGE	NYESO1	ADAM2	LIPI
SSX1	100%	26%	53%**	37%*	84%**	10,50%	89%*	68%	26%	10%	10%	0%
SSX2	55,50%	100%	44%*	55,5%**	100%**	0%	100%*	78%	55,5%	22%	11%	0%
SSX4	91%*	36%*	100%	45%*	100%**	9%	100%*	73%	45%	0%	8%	0%
SSX5	64%*	45%**	45%*	100%	91%**	9%	100%*	91%*	36%	18%	9%	0%
MAGEA3	53%*	30%**	37%**	33%**	100%	7%	87%*	70%*	27%**	10%	10%	3,3%
MAGEA4	67%	0%	33%	33%	67%	100%	100%	100%	33%	0%	0%	0%
CT7	42,5%*	22,5%*	25%*	25%*	65%*	7,50%	100%	70%**	20%	7,5%	7,5%	2,50%
CT10	42%	22,50%	26%	32%*	68%*	10%	90%**	100%	16%	3%	6%	3%
BAGE	63%	63%	63%	50%*	100%**	12,50%	100%	63%	100%	25%	0%	12,5%
NYESO1	33%	67%	0%	67%	100%	0%	67%	33%	67%	100%	0%	0%
ADAM2	67%	33%	33%	33%	100%	0%	100%	67%	0%	0%	100%	0%
LIPI	0%	25%	0%	0%	25%	0%	25%	25%	25%	0%	0%	100%

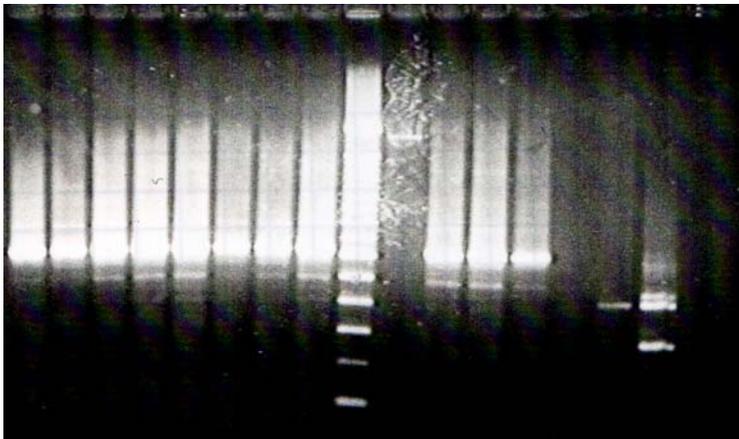
Anmerkung: * Korrelation ist signifikant ($p < .05$), ** Korrelation ist hochsignifikant ($p < .001$), Gruppe mit rotem Hintergrund: starke Expression (61-100%), grüner Hintergrund: häufige Expression (31-60%), blauer Hintergrund: seltene Expression (1-30%), gelber Hintergrund: keine Expression (0%)

ANHANG II: PCR-BILDER



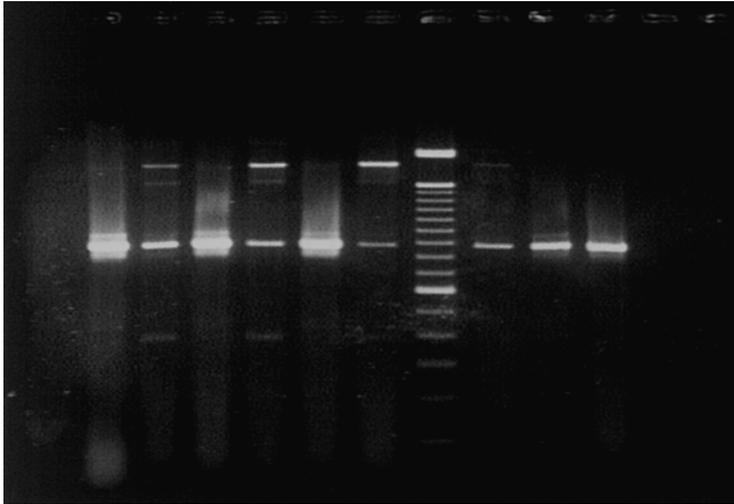
PCR 1: *GAPDH* in Myelomzelllinien (ZL), Spendern (D) und Patienten (P)

1 MOLP8,ZL, 2 NCI- H929,ZL, 3 LP1,ZL, 4 OPM2,ZL, 5 SK-007,ZL, 6 UMSCC,ZL, 7 R,D, 8 R, P, 9 Wasserkontrolle, 10 S,P, 11 N,P, 12 H,P, 13 K, D, 14 Krü,D, 15 H,P, 16 Th,D, 17 LP1,ZL, 18 OPM2,ZL, 19 Wasserkontrolle



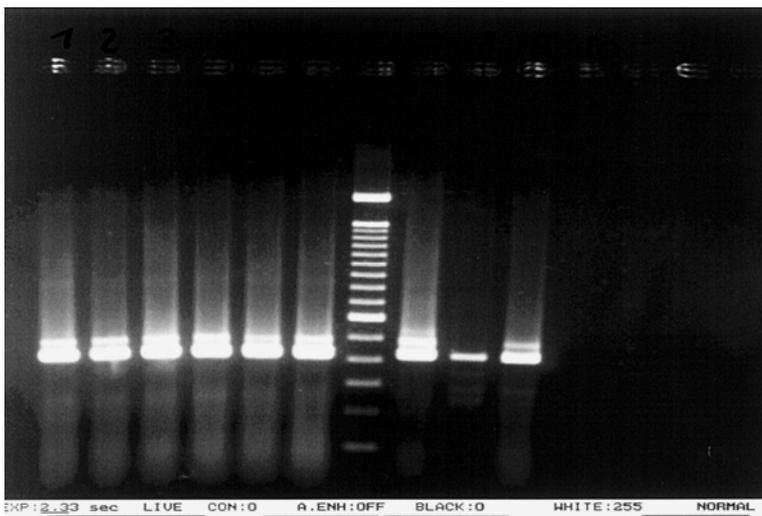
PCR 2: *MAGEC1* Expression in Myelomzelllinien

1 IM9, 2 RPMI-8226, 3 EJM, 4 U-266, 5 Brown, 6 KMS-12-BM, 7 MOLP-8, 8 NCI-H929, 9 LP-1, 10 OPM2, 11SK-007, 12 humane testis, 13 Wasserkontrolle



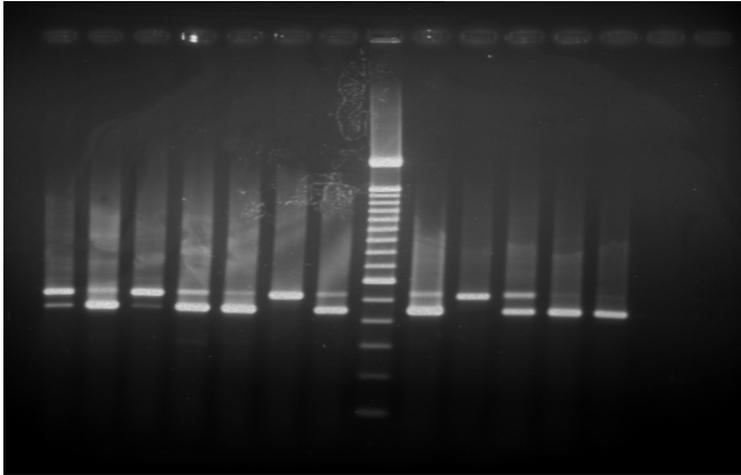
PCR 3: *MAGEC2* Expression bei Zelllinien

1 EJM, 2 U-266, 3 Brown, 4 KMS-12-BM, 5 MOLP-8, 6 NCI-H929, 7 RPMI- 8226, 8 IM-9, 9 humane Testis, 10 Wasserkontrolle



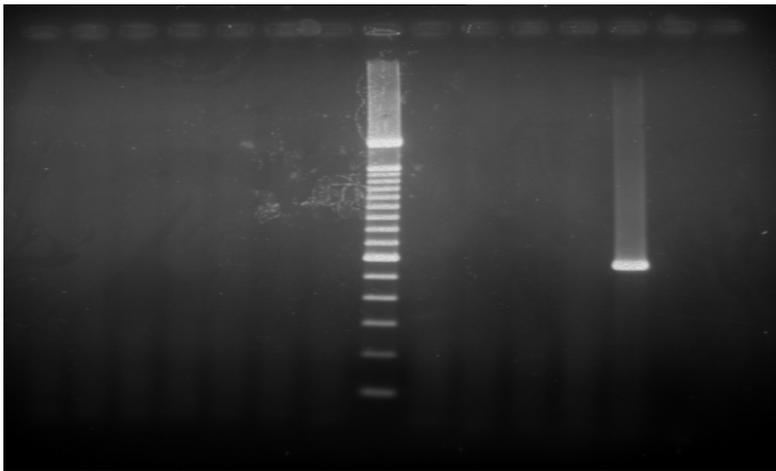
PCR 4: *MAGEA3* bei Zelllinien

1 EJM, 2 U-266, 3 Brown, 4 KMS-12-BM, 5 MOLP-8, 6 NCI-H929, 7 RPMI- 8226, 8 IM-9, 9 humane Testis, 10 Wasserkontrolle



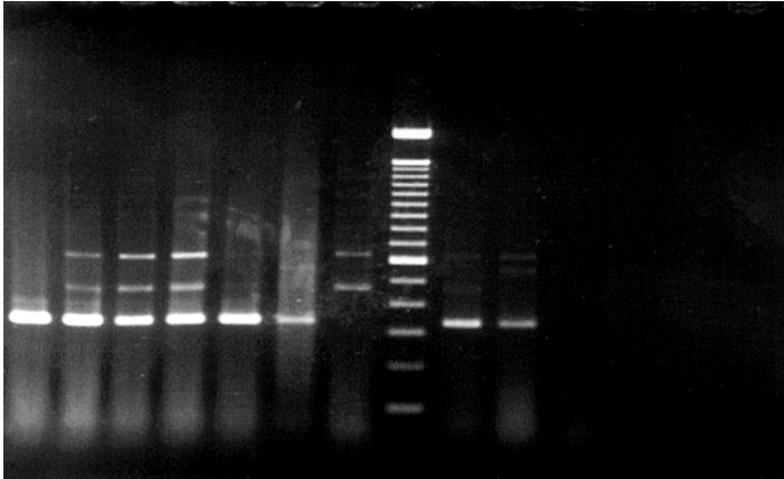
PCR 5: *MAGEA4* Expression in Myelomzelllinien

1 IM9, 2 RPMI-8226, 3 EJM, 4 U-266, 5 Brown, 6 KMS-12-BM, 7 MOLP-8, 8 NCI-H929, 9 LP-1, 10 OPM2, 11SK-007, 12 humane testis, 13 Wasserkontrolle



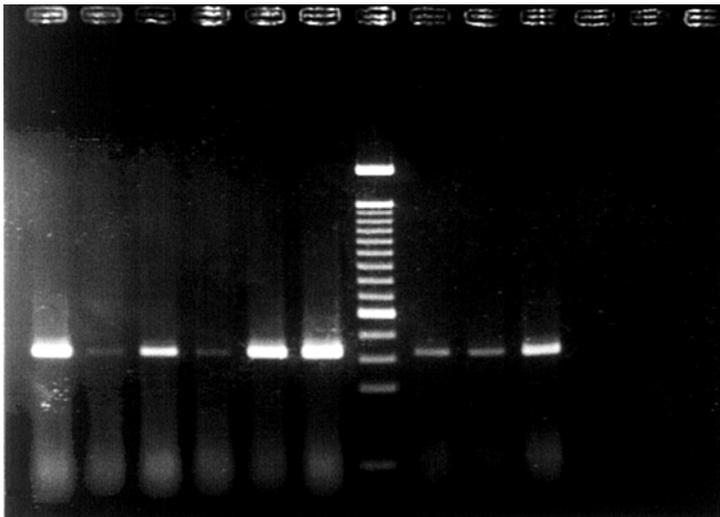
PCR 6: *SYCP1* Expression bei Myelomzelllinien

1 IM9, 2 RPMI-8226, 3 EJM, 4 U-266, 5 Brown, 6 KMS-12-BM, 7 MOLP-8, 8 NCI-H929, 9 LP-1, 10 OPM2, 11SK-007, 12 humane testis, 13 Wasserkontrolle



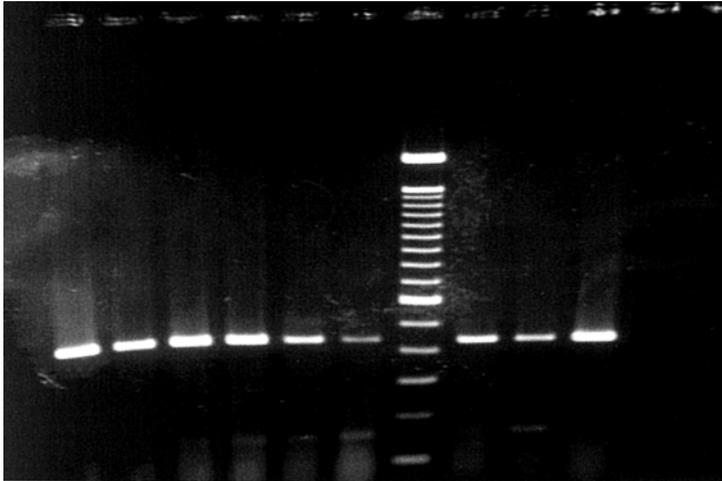
PCR 7: NYESO1 Expression bei Myelomzelllinien

1 EJM, 2 U-266, 3 Brown h m, 4 KMS-12-BM, 5 MOLP-8, 6 NCI-H929, 7 RPMI 8226, 8 IM-9, 9 humane Testis, 10 Wasserkontrolle



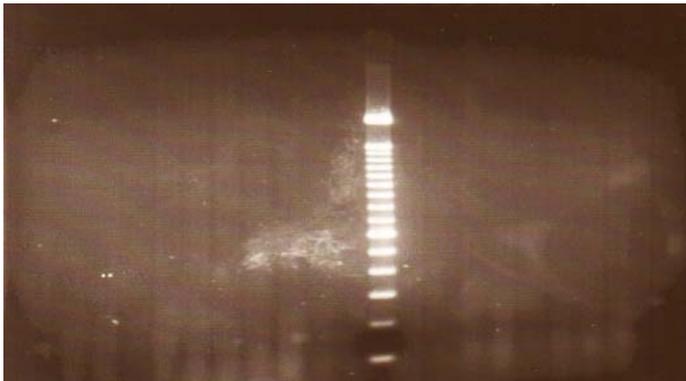
PCR 8: SSX1 Expression bei Myelomzelllinien

1 EJM, 2 U-266, 3 Brown h m, 4 KMS-12-BM, 5 MOLP-8, 6 NCI-H929, 7 RPMI 8226, 8 IM-9, 9 humane Testis, 10 Wasserkontrolle



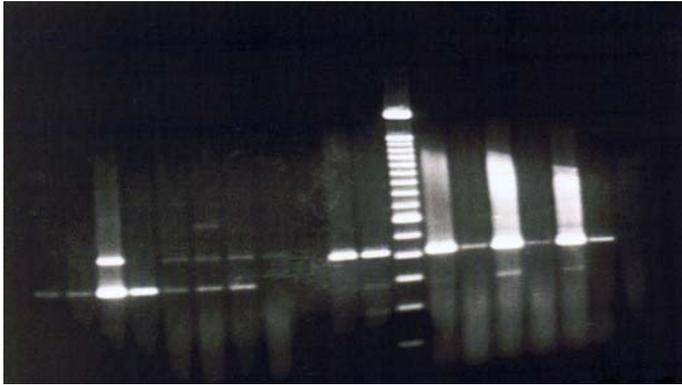
PCR 9: *SSX2 Expression bei Myelomzelllinien*

1 EJM, 2 U-266, 3 Brown h m, 4 KMS-12-BM, 5 MOLP-8, 6 NCI-H929, 7 RPMI 8226, 8 IM-9, 9 humane Testis, 10 Wasserkontrolle



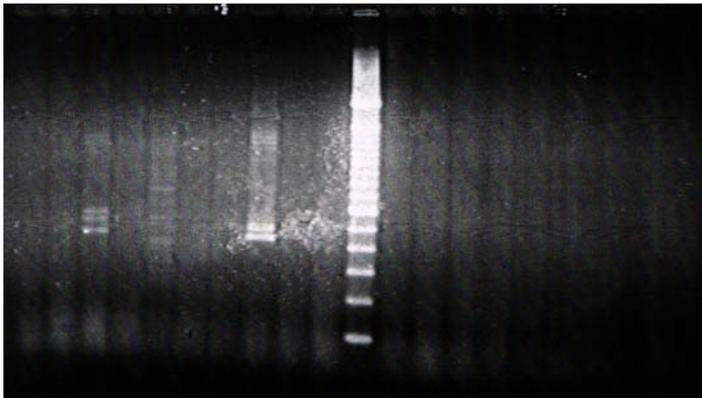
PCR 10: *SSX3 Expression bei Myelomzelllinien*

1 IM-9, 2RPMI- 8226, 3 EJM, 4 U-266, 5 Brown h m, 6 KMS-12-BM, 7 MOLP-8, 8 NCI-H929



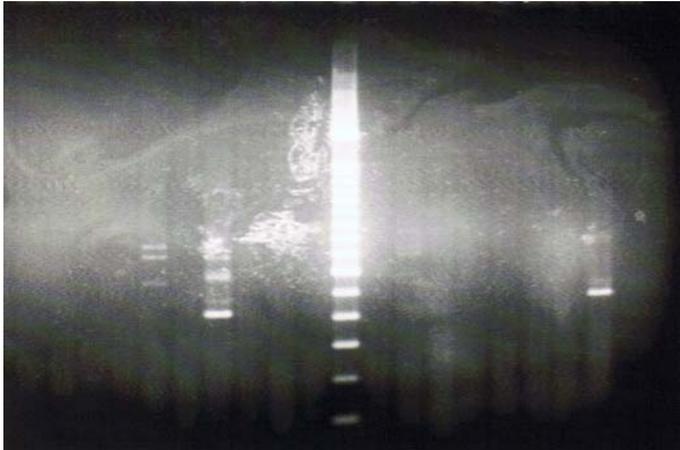
PCR 11: SSX5 und 4 Expression bei Myelomzelllinien

SSX5: 1 IM9, 2 RPMI-8226, 3 EJM, 4 U-266, 5 Brown h m, 6 KMS-12-BM, 7 MOLP-8, 8 NCI-H929, 9 Wasserkontrolle, SSX4: 10 IM9, 11 RPMI-8226, 12 EJM, 13 U-266, 14 Brown h.m., 15 KMS-12-BM, 16 MOLP 8, 17 NCI-H929, 18 Patient, 19 Wasserkontrolle



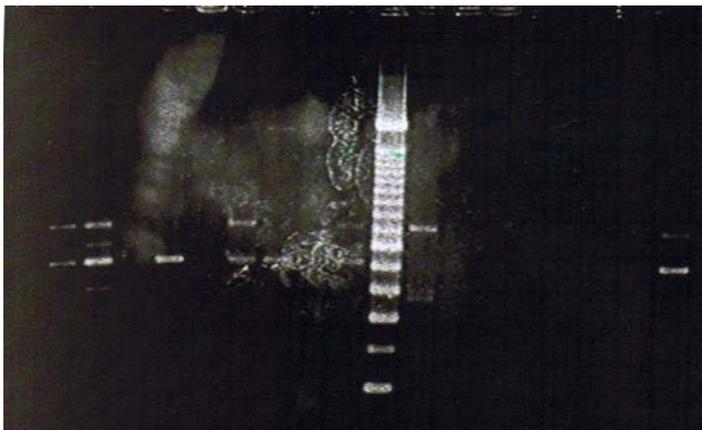
PCR 12: SSX6 Expression bei Myelomzelllinien

1 IM9, 2 RPMI-8226, 3 EJM, 4 U-266, 5 Brown h m, 6 KMS-12-BM, 7 MOLP-8, 8 NCI-H929, 9 OPM2, 10 UMSCC, 11 SK-007, 12 RPMI 2650, 13 FADU, 14 BHY, 15 HN, 16 AL27, 17 humane testis, 18 Wasserkontrolle, 19 LP1



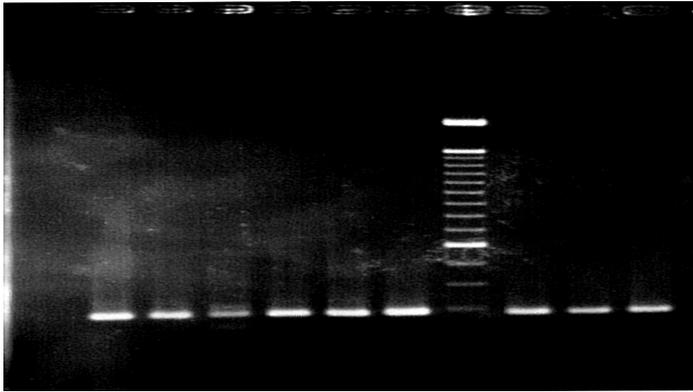
PCR 13: SSX 7 Expression bei Myelomzelllinien

1 IM9, 2 RPMI-8226, 3 EJM, 4 U-266, 5 Brown h m, 6 KMS-12-BM, 7 MOLP-8, 8 NCI-H929, 9 LP1, 10 OPM2, 11 UMSCC, 12 RPMI 2650, 13 SK-007 14 FADU, 15 BHY, 16 HN, 17 CAL27, 18 humane testis, 19 Wasserkontrolle,



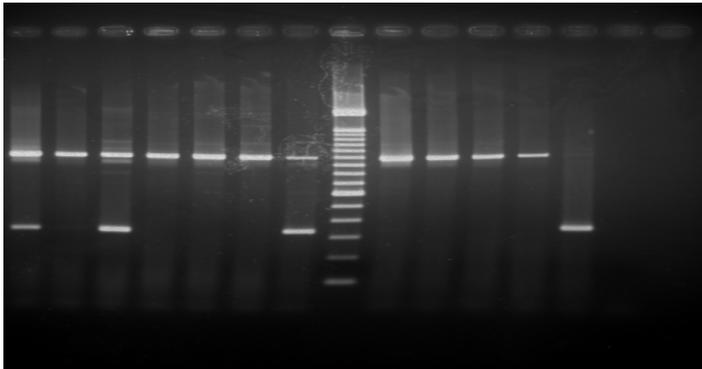
PCR 14: SSX8 Expression bei Myelomzelllinien

1 IM9, 2 RPMI-8226, 3 EJM, 4 U-266, 5 Brown h m, 6 KMS-12-BM, 7 MOLP-8, 8 NCI-H929, 9 LP1, 10 OPM2, 11 UMSCC, 12 SK-007, 13 RPMI 2650 14 FADU, 15 BHY, 16 HN, 17 CAL27, 18 humane testis, 19 Wasserkontrolle



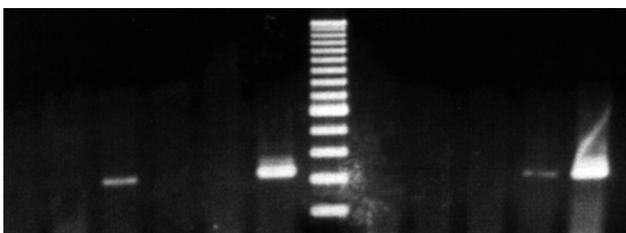
PCR 15: BAGE Expression bei Myelomzelllinien

1 EJM, 2 U-266, 3 Brown h m, 4 KMS-12-BM, 5 MOLP-8, 6 NCI-H929, 7 RPMI 8226, 8 IM-9, 9 humane Testis, 10 Wasserkontrolle



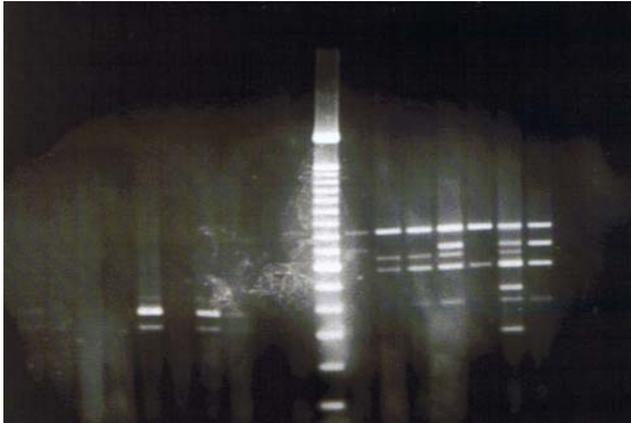
PCR 16: SPANXb Expression bei Myelomzelllinien

1 IM9, 2 RPMI-8226, 3 EJM, 4 U-266, 5 Brown, 6 KMS-12-BM, 7 MOLP-8, 8 NCI-H929, 9 LP-1, 10 OPM2, 11SK-007, 12 humane testis, 13 Wasserkontrolle



PCR 17: LIPI Expression bei Myelomzelllinien

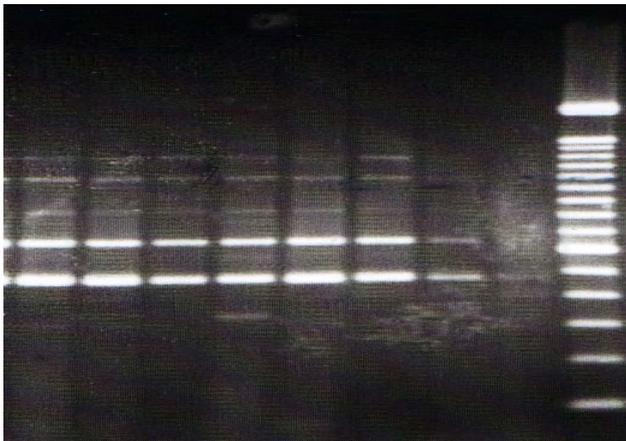
1 Brown h m, 2 EJM, 3 U-266, 4 KMS-12-BM, 5 MOLP-8, 6 NCI-H929, 7 RPMI 8226, 8 IM-9, 9 humane Testis, 10 Wasserkontrolle (nicht im Bild)



PCR 18: ADAM2 und LDHC Expression bei Myelomzelllinien

1 IM9, 2 RPMI-8226, 3 EJM, 4 U-266, 5 Brown, 6 KMS-12-BM, 7 MOLP-8, 8 NCI-H929, 9
Wasser mit ADAM2
10 IM9, 11 RPMI-8226, 12 EJM, 13 U-266, 14 Brown, 15 KMS-12-BM, 16 MOLP-8, 17 NCI-
H929, 18 Wasser mit LDHC

PCR-Bilder von CT-Antigenexpression in Myelompatienten:



PCR 1: NYESO1 Expression bei Myelompatienten D und A
D ist Nr.1 u A Nr.4



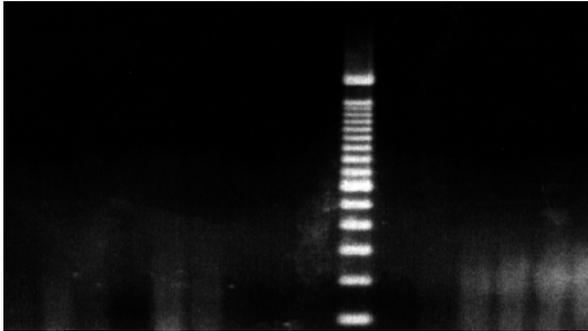
PCR 2: MAGEA3 Expression bei Patienten D und A
D ist Nr.1 u A Nr.4



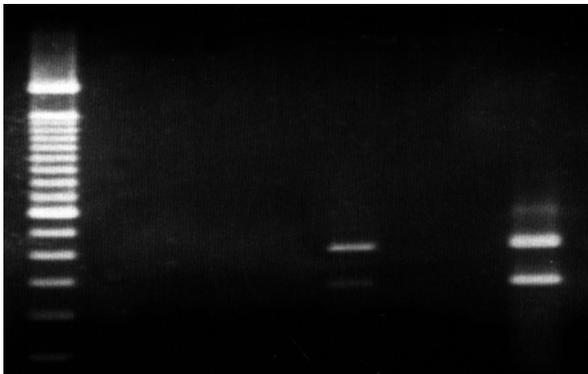
PCR 3: SSX1 Expression bei Patienten D und A
D ist Nr.1 u A Nr.4



PCR 4: SSX2 Expression bei Patienten D und A
D ist Nr.1 u A Nr.4



PCR 5: SSX3 bei Patienten D und A
D ist Nr.1 u A Nr.4



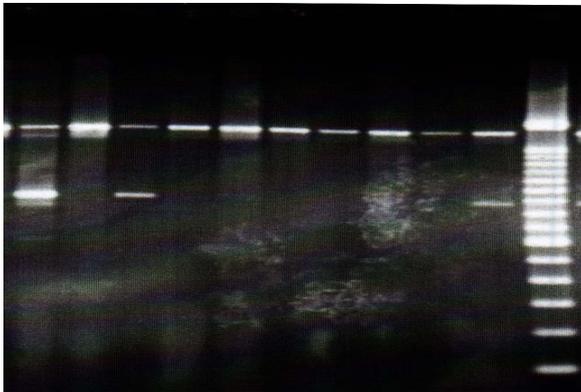
PCR 6: SSX4 Expression bei Patient P
P ist Nr.5, humane Testis ist Nr.7



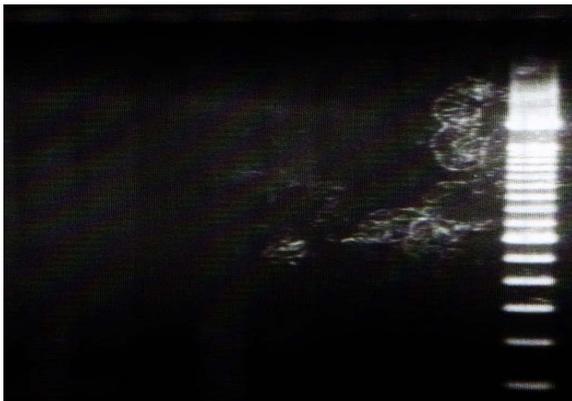
PCR 7: SSX5 Expression bei Patienten D und A
D ist Nr.1 u A Nr.4



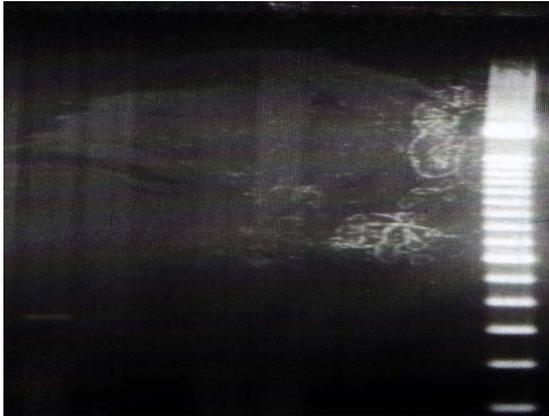
PCR 8: BAGE Expression bei Patienten D und A
D ist Nr.1 u A Nr.4



PCR 9: MAGEC2 Expression bei Patienten D und A
D ist Nr.1 u A Nr.4

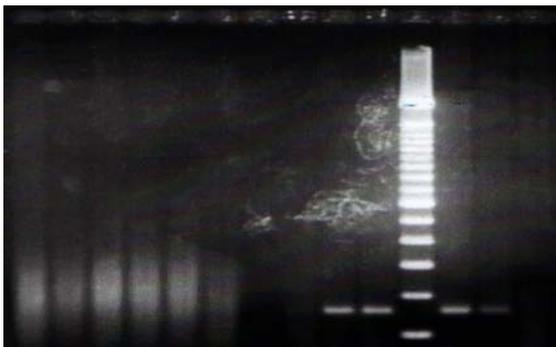


PCR 10: ADAM2 Expression bei Patienten D und A
D ist Nr.1 u A Nr.4



PCR 11: *LIPI Expression bei Patienten D und A*
 D ist Nr.1 u A Nr.4

CT-Antigenexpression bei Spendern



PCR 1: *SSX1 und 2 Expression bei Spendern K und R*
 SSX1:R ist Nr.1, K ist Nr. Nr.9 und SSX-2: R Nr. 13



PCR 2: *MAGEA3 Expression bei Spendern K und R*
 K ist Nr.1 und R Nr.5

**ANHANG III: PATIENTENAUFKLÄRUNG UND EINVERSTÄNDNIS-
ERKLÄRUNG**

Patientenaufklärung und einverständniserklärung

**Untersuchung von Blut und Knochenmark
(einschl. genetischer Untersuchung)**

Forschungsprojekt

**Untersuchung von Expressionsmuster und immunologischer
Relevanz von Cancer-Testis-Antigenen als möglichen Zielstrukturen
für Tumorstimmimpfung nach allogener Stammzelltransplantation
bei Patienten mit Multiplem Myelom**

**Vorname, Name und Geburtsdatum des
Patienten bzw. Patientenaufkleber**

1.1 Patienteninformation

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

bei Ihnen besteht der Verdacht auf das Vorliegen einer Erkrankung des blutbildenden Systems, des Multiplen Myeloms, oder die Erkrankung konnte bereits zu einem früheren Zeitpunkt diagnostiziert werden.

Zur Diagnosestellung sind die Durchführung einer Knochenmarkentnahme und auch die Entnahme von peripherem Blut nötig. Auch im Rahmen einer möglicherweise durchzuführenden Behandlung werden bei Ihnen gegebenenfalls regelmäßig Blutuntersuchungen, aber auch Knochenmarkuntersuchungen durchgeführt werden. Die dabei anfallenden Untersuchungen erfolgen, um bei Ihnen rechtzeitig Komplikationen erkennen zu können, aber auch, um den Krankheitsverlauf und den Therapieerfolg beurteilen zu können. Diese Untersuchungen sind für Ihre Behandlung dringend erforderlich und gehören zum standardisierten Ablauf der Behandlung. Das nach einer solchen Untersuchung verbliebene Knochenmark bzw. Blut wird in der Regel entsorgt.

Es steht mittlerweile fest, dass das Immunsystem einen Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf vieler Erkrankungen, einschließlich bösartiger Tumoren, hat. Wir möchten anhand der Ihnen entnommenen Knochenmarkproben untersuchen, ob das Gewebe genetische Merkmale aufweist, die vom Immunsystem als „fremd“ erkannt werden. Außerdem möchten wir ermitteln, ob Ihr Immunsystem bereits auf das mögliche Vorhandensein „fremder“ Strukturen aufmerksam geworden ist. Hierzu möchten wir Sie um eine zusätzliche Blutprobe (20 ml) bitten, die im Rahmen der routinemäßig entnommenen Blutproben mit gewonnen werden kann.

Um künftig bei Patienten, die an einem ähnlichen Leiden wie Sie erkrankt sind, Therapieentscheidungen noch besser treffen zu können, aber auch, um an Ihrem Material vielleicht später neue Erkenntnisse zu gewinnen, möchten wir Sie um Zustimmung bitten, dass dieses Knochenmark- und Blutmaterial asserviert, d. h. aufbewahrt, und später gesondert untersucht werden kann. Das während der Diagnostik bzw. während der Transplantation und im nachfolgenden Verlauf Ihrer Erkrankung gewonnene Material (Blut / Knochenmark) wird im Forschungslabor der II. Medizinischen Klinik des UKE in Hamburg aufbewahrt. Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung werden Knochenmark und Blut dann im Verlauf auf das Vorliegen bestimmter Gene hin untersucht werden, die Tumoren für das menschliche Immunsystem erkennbar und damit angreifbar machen. Weiterhin sollen die Proben daraufhin untersucht werden, ob eine solche durch Antikörper- oder Immunzellen vermittelte Anti-Tumor-Antwort bereits vorliegt.

Durch diese zusätzlichen Untersuchungen entstehen für Sie keine Unannehmlichkeiten bzw. Aufwendungen, weil keine zusätzliche Knochenmark- bzw. Venenpunktion notwendig ist. Außerdem birgt die zusätzliche Entnahme von maximal 10 ml Knochenmark keinerlei spezielle Risiken. Es handelt sich bei dem hier beschriebenen Projekt um ein reines Forschungsprojekt und nicht um eine klinische Studie. Falls im Rahmen eines späteren Forschungsprojekts anhand Ihres Blutes bzw. Ihres Knochenmarks klinische Daten notwendig sind, bitten wir schon jetzt um Ihre Zustimmung, die klinischen Daten Ihres Krankheitsverlaufs zu erheben. Diese Daten werden pseudonymisiert, d. h. es erfolgt durch Ersetzen des Namens und andere Identifikationsmerkmale (z. B. Geschlecht) durch eine spezielle Kennzeichnung zu dem Zweck, die Bestimmung des Betroffenen auszuschließen oder wesentlich zu erschweren. Diese Maßnahme dient dazu, die Kenntnisnahme der klinischen Daten und der Materialdaten durch Dritte ohne Ihre Einwilligung auszuschließen. Die Untersuchungsergebnisse können in medizinischen Fachzeitschriften veröffentlicht werden, allerdings ohne Offenlegung Ihrer persönlichen Daten. Bei der Verarbeitung Ihrer personenbezogenen Daten werden die Bestimmungen des Bundesdatenschutzgesetzes eingehalten werden.

Die geplanten Untersuchungen werden ausschließlich in der II. Medizinischen Klinik des UKE durchgeführt. Eine Weitergabe an Dritte ist nur in Ausnahmefällen vorgesehen. Diese Ausnahmefälle liegen vor, wenn bestimmte wissenschaftliche Methoden nur in entsprechenden Speziallabors durchgeführt werden können. In diesem Fall werden die Daten pseudonymisiert, d. h. die personenbezogenen Daten werden so verändert, dass die Einzelangaben über persönliche und sachliche Verhältnisse nicht mehr oder nur mit einem unverhältnismäßig großen Aufwand an Zeit, Kosten, Arbeitskraft einer bestimmten oder bestimmaren natürlichen Personen zugeordnet werden können.

Sollten andere Forschungslaboratorien oder Universitätsklinika sich an gemeinsamen Forschungsprojekten beteiligen, so werden die von uns bei Ihnen erhobenen Daten, insbesondere die klinischen Daten, ebenfalls nur in pseudonymisierter Form weitergegeben, d. h. in einem solchen Fall sind Ihre persönlichen Daten derart verändert, dass Einzelangaben über persönliche und sachliche Verhältnisse nicht mehr oder nur mit einem enormen, unverhältnismäßig großen Aufwand an Zeit, Kosten und Arbeitskraft einer bestimmten oder bestimmaren natürlichen Person zugeordnet werden können.

Aus diesem Grunde bitten wir Sie, diese Aufklärung durch Ihre Unterschrift zu bestätigen. Für eine ggf. sich ergebende Fragestellung, die nicht im Zusammenhang mit Ihrer derzeitigen Grunderkrankung steht, würden wir Sie gesondert kontaktieren und um Ihre Zustimmung bitten.

Über die konkreten Ergebnisse der jeweiligen Begleituntersuchungen werden Sie nicht gesondert informiert. Die Informationen aus diesen Untersuchungen werden erst bei künftig zu behandelnden Patienten, die an der gleichen Erkrankung wie Sie leiden, verwendet werden können.

Selbstverständlich besteht jedoch die Möglichkeit, dass Ihnen auf Anfrage die Ergebnisse der Untersuchung mitgeteilt werden. Sollten die Daten jedoch vollständig anonymisiert werden, schließt das auch eine Information über Untersuchungsergebnisse Ihnen gegenüber aus. Die gesammelten Untersuchungsergebnisse werden getrennt von Ihrer Patientenakte aufbewahrt.

Ihre Zustimmung zur Untersuchung des Blut- bzw. Knochenmarkmaterials ist vollkommen freiwillig und kann von Ihnen jederzeit widerrufen werden. In diesem Falle erfolgt die Löschung all Ihrer gespeicherten Daten und die Vernichtung vorhandenen Blut- und Knochenmarkmaterials. Dieser Widerruf muss schriftlich erfolgen.

Ihre Zustimmung zur Untersuchung Ihres Bluts und Ihres Knochenmarks ist unabhängig von Ihrer ggf. vorliegenden Zustimmung zur Teilnahme an einer Therapiestudie.

Patientenaufklärung und -einverständniserklärung

Untersuchung von Blut und Knochenmark

(einschl. genetischer Untersuchung)

Forschungsprojekt

Untersuchung von Expressionsmuster und immunologischer Relevanz von Cancer-Testis-Antigenen als möglichen Zielstrukturen für Tumorstimmungsreaktion nach allogener Stammzelltransplantation bei Patienten mit Multiplem Myelom

**Vorname, Name und Geburtsdatum des
Patienten bzw. Patientenaufkleber**

1.2 Patienteneinverständniserklärung

Ich willige ein, dass mein Blut- und/oder Knochenmarkmaterial zu Forschungszwecken verwendet wird, die ausschließlich im Zusammenhang mit meiner o. g. Erkrankung bzw. mit Erkenntnissen über die Stammzelltransplantation stehen.

Ich weiß, dass die Im Rahmen dieser Studie erhobenen Daten und persönlichen Mitteilungen der ärztlichen Schweigepflicht unterliegen und zur Verarbeitung und Auswertung nur ohne meinen Namen (pseudonymisiert) zusammengeführt werden dürfen. Ich weiß, dass die Untersuchungsergebnisse in medizinischen Fachzeitschriften veröffentlicht werden können, allerdings ohne Offenlegung meiner persönlichen Daten. Ich wurde darüber aufgeklärt, dass bei der Verarbeitung meiner personenbezogenen Daten die Bestimmungen des Bundesdatenschutzgesetzes eingehalten werden.

Ich wurde über den Inhalt der geplanten Untersuchungen detailliert aufgeklärt; mir wurden alle Fragen vollständig beantwortet. Eine Kopie der unterschriebenen Einverständniserklärung wurde mir ausgehändigt. Ich versichere, dass ich die Patientenaufklärung sorgfältig gelesen und sie verstanden habe und dass ich keine weiteren Fragen habe.

Ort	/	(Eigenhändig unterzeichnet: Name, Datum und	Patientin/Patient
Datum		Unterschrift)	

Ort	/	(Eigenhändig unterzeichnet: Name, Datum und	Aufklärende(r) Ärztin/Arzt
Datum		Unterschrift)	

DANK

Sehr dankbar bin ich Dr. Djordje Atanackovic, der ausgesprochen kompetent, engagiert und geduldig diese Arbeit betreut hat.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. C. Bokemyer danke ich für das Promotionsthema.

Prof. Dr. N.Kröger danke ich für die Diskussion und das interessierte Begleiten des Prozesses

Katrin Bartels danke ich für die Anleitung und die vielen Ratschläge im Labor.

Dr. Kai Petersen bin ich dankbar für die Hilfe in Fragen zur Statistik.

Für das Korrekturlesen möchte ich Dr. Susanne Winkelmann danken.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung und Rückhalt in diesem Prozess.

Dr. Karsten Neuhoff bin ich dankbar für das Layout dieser Arbeit und seine Geduld mit mir.

CURRICULUM VITAE

Name: Arfsten

Vornamen: Julia Gabriele Andrée

Geburtsdatum: 24.10.1978

Geburtsort: Schleswig

Schulbildung: 1985 -1998 an der Freien Waldorfschule Flensburg
1998 Abitur

Studium: 1998/99 ein Semester Energie- und
Umweltmanagement an der Universität Flensburg
1999 ein Semester Humanmedizin an der Universität
Göttingen
2000 - 2007 Studium der Humanmedizin an der
Universität Witten/Herdecke
April 2005 2.Staatsexamen
PJ-Tertial Innere Medizin am Gemeinschafts-
krankenhaus Herdecke
PJ-Tertial in der Neurologie am Helios-Klinikum
Wuppertal
PJ-Tertial Chirurgie am Hôpital civil, Strasbourg,
Frankreich
Mai 2007 3. Staatsexamen

Seit Okt/07 Assistenzärztin in der Hämato-Onkologie bei Prof. L.
Trümper, Uniklinikum Göttingen

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: