

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Onkologisches Zentrum

II. Medizinische Klinik und Poliklinik

Onkologie, Hämatologie und Knochenmarktransplantation

mit Sektion Pneumologie

Direktor: Prof. Dr. C. Bokemeyer

Erfassung von Tetanus Toxoid- und Influenza Nukleoprotein- spezifischen Antikörpern bei Patienten mit Multiplem Myelom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Britta Marlen Bartels

aus Bochum

Hamburg 2011

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 09.02.2012**

**Veröffentlicht mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:

Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter:

PD Dr. med. Djordje Atanackovic

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter:

PD Dr. med. Francis Ayuketang Ayuk

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Multiples Myelom.....	5
1.1.1	Definition.....	5
1.1.2	Epidemiologie und Ätiologie.....	6
1.1.3	Pathogenese.....	7
1.1.4	Klinik.....	9
1.1.5	Diagnostik.....	10
1.1.6	Stadieneinteilung und Prognosefaktoren.....	12
1.1.7	Therapie.....	14
1.2	Fragestellung und Ziel dieser Arbeit.....	17
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Material.....	18
2.1.1	Sera von Myelompatienten und gesunden Personen.....	18
2.1.2	ELISA-Proteine.....	18
2.1.3	Chemikalien.....	19
2.1.4	Laborgeräte.....	19
2.1.5	Verbrauchsmaterialien.....	20
2.1.6	Studiendesign.....	20
2.2	Methode.....	21
2.2.1	Versuchsbeschreibung – indirekter ELISA.....	21
2.2.2	Rezepturen der verwendeten Lösungen.....	23
2.2.3	Herstellung der Proteinverdünnungen.....	23
2.2.4	Herstellung der Serumverdünnungen.....	23
2.2.5	Herstellung der sekundären Antikörperlösung.....	24
2.2.6	Versuchsdurchführung – indirekter ELISA.....	24
2.2.7	Statistische Auswertung.....	25
3	Ergebnisse.....	26
3.1	Eigenschaften des Patientenkollektivs.....	26

3.2	Auswirkungen von Stammzelltransplantation und Chemotherapie auf die Immunantwort	27
3.2.1	Einfluss von allogener und autologer Stammzelltransplantation.....	27
3.2.2	Einfluss durch Chemotherapie.....	34
3.3	Zusammenhang von Immunantwort und klinischen Parametern	35
4	Diskussion	43
4.1	Patientenkollektiv	43
4.2	Einfluss von Stammzelltransplantation und Chemotherapie auf die Immunantwort	44
4.3	Zusammenhang von Immunantwort und klinischen Parametern	47
4.4	Kritikpunkte	49
5	Zusammenfassung.....	50
6	Abkürzungsverzeichnis	52
7	Literaturverzeichnis	55
8	Anhang: Patientenaufklärung und -einverständniserklärung	62
9	Danksagung	67
10	Lebenslauf.....	68
11	Eidesstattliche Versicherung.....	69

1 Einleitung

1.1 Multiples Myelom

1.1.1 Definition

Zur Gruppe der niedrigmalignen Non-Hodgkin-Lymphome gehörend handelt es sich beim Multiplen Myelom (MM) um eine neoplastische Proliferation eines Klons plasmazellulär differenzierter B-Lymphozyten. Die Infiltration des Knochenmarks erfolgt dabei entweder diffus oder multilokulär (Kyle et al. 2003). Mit Ausnahme des asekretorischen MM (ca. 1 %) werden komplette monoklonale Immunglobuline produziert (meist vom Typ IgG oder IgA) oder nur deren Leichtketten Kappa und Lambda (Bence-Jones-Typ), welche im Serum und / oder Urin nachweisbar sind (Matzdorff und Fritze 2009).

Erstmals 1873 wurde dieses Krankheitsbild als Multiples Myelom von dem Arzt Rustizky beschrieben (Saltykow 1903). Während man im angloamerikanischen Sprachraum anhand der Anzahl der Tumorherde zwischen der solitären (ossären oder extraskelettären) Erscheinungsform und der disseminierten Plasmazellerkrankung differenziert, wurden im Deutschen die Begriffe Plasmozytom und Multiples Myelom zum Teil synonym verwendet (Matzdorff und Fritze 2009). Gerade im Hinblick auf die unterschiedlichen Prognosen hat sich jedoch die angloamerikanische Nomenklatur weitgehend durchgesetzt. So haben Patienten mit einem solitären Plasmozytom eine höhere mittlere Lebenserwartung von etwa 10 Jahren (Di Micco und Di Micco 2005), während die Lebenserwartung von Patienten mit MM stadienabhängig nur 29 bis 62 Monate im Median beträgt (Greipp et al. 2005).

2 - 4 % der Multiplen Myelome präsentieren sich zudem als Plasmazellenleukämie, welche sowohl primär entstehen kann (pPCL) als auch im Verlauf des immer wieder progredienten Myeloms (sekundäre Plasmazellenleukämie, sPCL). Kennzeichnend für diese aggressive Variante sind > 20 % Plasmazellen im Differentialblutbild und / oder > $2 \times 10^9/l$ Plasmazellen im peripheren Blut (Jimenez-Zepeda und Dominguez-Martinez 2009) sowie eine insgesamt schlechtere Prognose mit einer durchschnittlichen Überlebenszeit von nur 1,3 Monaten bei sPCL bzw. 11,1 Monaten bei pPCL (Tiedemann et al. 2008).

Abzugrenzen vom MM sind Krankheiten mit ebenfalls auffälligem M-Gradienten in der Serumelektrophorese; insbesondere die Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) und das Smoldering multiple Myeloma (SMM). Aber auch der Morbus

Waldenström, die Leichtketten-Amyloidose oder die Leichtketten-Ablagerungs-Krankheit gehören dazu (Leung und Rajkumar 2007).

Die MGUS ist eine prämaligne Plasmazellproliferationsstörung assoziiert mit einem lebenslangen Risiko der Konvertierung in ein Multiples Myelom (1 % pro Jahr). Die Betroffenen weisen jedoch neben der monoklonalen Antikörperproduktion keine Endorganschäden auf und es finden sich charakteristischerweise < 10 % Plasmazellen im Knochenmark sowie < 30 g/l M-Protein im Serum (Kyle und Rajkumar 2007).

Das Smoldering Myeloma (asymptomatisches Myelom) hingegen ist gekennzeichnet durch einen Serumspiegel von ≥ 30 g/l des monoklonalen Proteins und/oder > 10 % atypische Plasmazellen im Knochenmark, zeigt jedoch diesbezüglich keine Progredienz und es liegen wie bei MGUS keine myelomtypischen klinischen Zeichen vor (Kyle und Rajkumar 2007).

1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie

Die Inzidenz des Multiplen Myeloms beträgt in Mitteleuropa altersadjustiert 4/100.000/Jahr und steigt im Alter stark an. Damit gehört es insgesamt zwar zu den eher selteneren Erkrankungen, es ist jedoch das häufigste primär am Knochen lokalisierte Tumorleiden. *Dahlin* gibt die Häufigkeit mit 47 % der primären Knochenmalignome an (Dahlin 1978). Das solitäre Myelom ist mit einer Häufigkeit von < 5 % wesentlich seltener als die multiple Manifestationsform, es geht jedoch innerhalb von 10 Jahren in über 90 % der Fälle in ein solches über (Einsele 2004). Bevorzugtes Manifestationsalter des Multiplen Myeloms ist die 6. und 7. Lebensdekade, eine Erkrankung vor dem 40. Lebensjahr tritt in weniger als 2 % der Fälle auf (Hosten und Liebig 2007). Unterschiede der Inzidenz ergeben sich hinsichtlich des Geschlechts und der geographischen Verteilung. So erkranken Männer häufiger als Frauen und in Nordamerika ist die schwarze Bevölkerungsgruppe annähernd doppelt so oft betroffen wie die weiße. In Asien hingegen finden sich wesentlich niedrigere MM-Raten (Alexander et al. 2007).

Bisher bleibt die Frage zur Entstehung des Multiplen Myeloms weitgehend ungeklärt. Überwiegend ist man auf Vermutungen angewiesen, die sowohl genetische Faktoren als auch Umwelteinflüsse umfassen. Am besten ist wohl die Strahlenexposition belegt mit ihrem potenziell karzinogenen Einfluss auf die DNA. *Ichimaru* und *Mabuchi* fanden bei Atombomben-Überlebenden von Hiroshima und Nagasaki ein signifikant vermehrtes Auftreten von MM nach einer langen Latenzperiode. Mortalitätsuntersuchungen bei

Radiologen und Radium-Uhrenziffernblatt-Malern lieferten weitere Informationen über ein erhöhtes MM-Risiko unter Strahlenbelastung (Ichimaru und Mabuchi 1991). Eine Häufung zeigte sich auch bei Landwirten (Viehzucht und Pestizidverwendung) (Pearce et al. 1986) sowie bei Kontakt mit Asbest und Petroleum (Kagan et al. 1979, Linet et al. 1987). Desweiteren scheint eine genetische Prädisposition vorhanden zu sein (Shoenfeld et al. 1982).

1.1.3 Pathogenese

Für das Multiple Myelom lässt sich ein pathogenetisches Modell (siehe Abbildung (Abb.) 1) postulieren, wonach ausgehend von einer normalen Plasmazelle durch die schrittweise Zunahme molekularer Veränderungen die Entwicklung von MGUS und nachfolgende Progression zum MM stattfindet. Stehen die Myelomzellen zu Beginn noch in enger Assoziation mit den Knochenmarksstromazellen, kann in weiterer Folge das Myelomzellwachstum auch stromaunabhängig und somit extramedullär erfolgen. Im letzten Schritt ist sogar die in vitro-Kultivierung von Myelomzellen möglich.

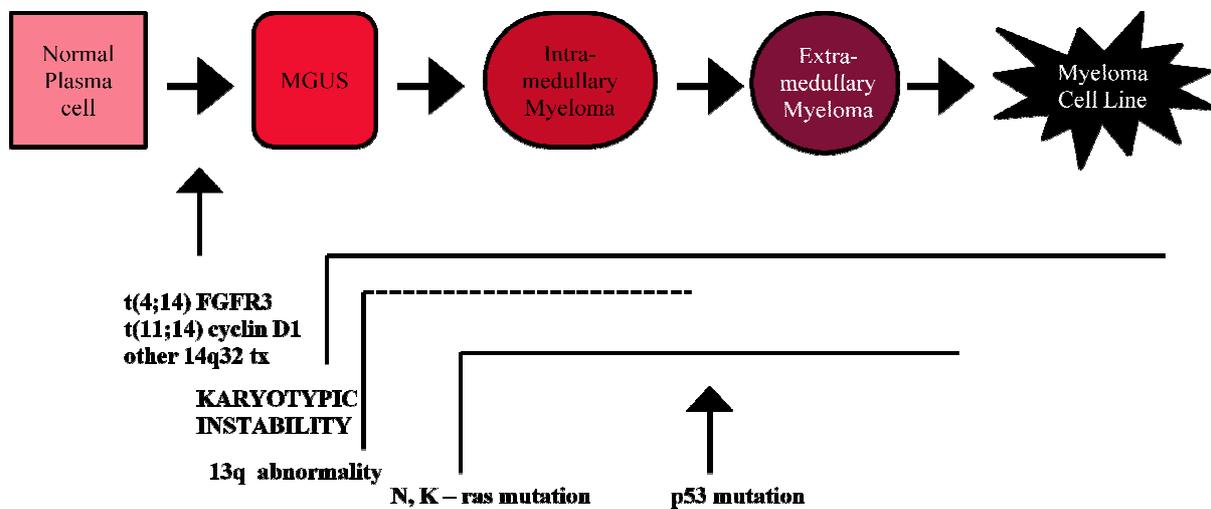


Abb. 1: Genetisches Modell der Myelomgenese nach *Hallek et al.* (Hallek et al. 1998)

Nach *Hallek, Bergsagel* und *Anderson* wird dieser Prozess unterteilt in Immortalisierung, Etablierung und Entkopplung (Hallek et al. 1998).

Immortalisierung

Die wohl wichtigste und frühzeitig genetische Läsion in vielen B-Zell-Neoplasien ist die Dysregulation eines Onkogens als Folge seiner Positionierung in den Einflussbereich eines oder mehrerer Ig-Enhancer (Hallek et al. 1998). So weisen bereits die Plasmazellklone von ungefähr 50 % der Patienten mit MGUS primäre Translokationen im Bereich des Ig-Schwerkettenlokus 14q32 auf (Rafael Fonseca et al. 2004). Bezüglich der Partnerchromosomen sind diese Translokationen zwar sehr heterogen, bevorzugt beteiligt sind jedoch die Regionen 11q13 (BCL-1, Cyclin D1) und 4p16.3 (FGFR3) (Hallek et al. 1998).

Neben diesen strukturellen Aberrationen können zudem numerische Veränderungen auftreten. Mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) konnte eine chromosomale Aneuploidie in mindestens 50 % der Patienten mit MGUS (Drach et al. 1995) und in bis zu 90 % der Patienten mit MM gezeigt werden (Drach et al. 1995). Charakteristische numerische Chromosomenanomalien betreffen vor allem die Trisomien der Chromosomen 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 und 21 sowie die Monosomien 13, 14, 16, und 22 (Fonseca et al. 2004).

Hervorzuheben ist neben dem vollständigen Verlust eines Chromosoms 13 auch die partielle Monosomie, die aus dem Verlust der Sequenz 13q14 resultiert und häufig mit der bereits beschriebenen Translokation t(4; 14) assoziiert ist (Magrangeas et al. 2004).

Etablierung

Wie eingangs erwähnt ist neben den genetischen Veränderungen in den Myelomzellen auch die Interaktion zwischen Myelom- und Knochenmark-Stroma-Zellen von zentraler Bedeutung.

Durch die Kommunikation via Adhäsionsmoleküle werden von den Stromazellen verstärkt Zytokine produziert, die die Lebensdauer, die Zellteilung und die Differenzierung der Myelomzellen unterstützen (Hideshima et al. 2004). Eine zentrale Rolle spielt in diesem Zusammenhang das Interleukin-6 (IL-6), welches neben seinem proliferationsfördernden Effekt auch hemmend auf die Apoptose von Myelomzellen wirkt (Lauta 2001).

Desweiteren ermöglicht es den Tumorzellen auch erst die Anlagerung an die Stromazellen, osteoklastische Zytokine wie Interleukin 1-beta (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) freizusetzen und so zu der für das MM typischen Knochendestruktion beizutragen (Roux und Mariette 2004).

Entkopplung

Damit im weiteren Verlauf das Myelomzellwachstum auch stromaunabhängig erfolgen kann, ist das Eintreten zusätzlicher genetischer Veränderungen notwendig.

Beschrieben sind aktivierende ras (*rat sarcoma*) -Mutationen, deren Häufigkeit mit dem Erkrankungsstadium steigt (Corradini et al. 1993). Sie führen dazu, dass Myelomzellen in Abwesenheit von Il-6 seltener den programmierten Zelltod erleiden und dass durch diese Wachstumsfaktorunabhängigkeit möglicherweise einer Ausbreitung außerhalb des Knochenmarks Vorschub geleistet wird (Billadeau et al. 1995).

Von Bedeutung sind zudem Mutationen des Tumorsuppressorgens p53, welche erst spät im Erkrankungsverlauf auftreten (Neri et al. 1993). Die Veränderungen an diesem zentralen Regulator von Zellzyklus und Apoptose könnten ebenfalls an der Entkopplung vom Knochenmarkstroma beteiligt sein.

1.1.4 Klinik

Die Klinik des Multiplen Myeloms ist zum einen durch die steigende Tumorzellmasse im Knochenmark bedingt - mit konsekutiver Verdrängung der normalen Hämatopoese -, zum anderen durch die Produktion und Ablagerung des monoklonalen Immunglobulins.

Initial manifestiert sich die Erkrankung häufig mit unspezifischen Symptomen wie Leistungsminderung, Schwäche und Kopfschmerzen als Zeichen der Anämie oder auch Inappetenz, Übelkeit, Erbrechen und Gewichtsverlust.

Rezidivierende, schwer therapierbare und überwiegend bakterielle Infekte sind nicht selten wegweisend für die Diagnose. Diese bei etwa 25 % der Erkrankten auftretende erhöhte Anfälligkeit resultiert einerseits aus der humoralen Schwäche (Antikörpermangelsyndrom), andererseits ist sie Folge der Neutropenie. Zudem berichten die Patienten von Knochenschmerzen im Bereich von Wirbelsäule, Becken und Rippen und es treten pathologische Frakturen (Frakturen ohne oder bei nur minimaler Belastung, z.B. Wirbelkörperfrakturen) als Folge der beschriebenen instabilen Osteolysen und diffusen Osteoporose auf (Gassel 2002).

Mit einer Niereninsuffizienz muss bei ca. 20 % aller Myelompatienten gerechnet werden, wobei die pathogenetischen Mechanismen hierfür sehr unterschiedlich sind. Neben der sogenannten „Myelomniere“, einer Tubulusnephropathie infolge Bence-Jones-Proteinurie, kann die Niere auch durch eine länger andauernde Hyperkalzämie (Nephrokalzinose), Amyloidablagerungen oder Infektionen geschädigt werden.

Selten und ebenfalls als Zeichen einer fortgeschrittenen Erkrankung zu werten ist die Entstehung eines Hyperviskositätssyndroms, dessen Auftreten von verschiedenen Paraproteincharakteristika wie Molekülgröße, -form und Konzentration abhängig ist und z.B. nicht bei der Leichtketten-Krankheit auftritt. Neben kardiologischen Symptomen aufgrund der Kreislaufbelastung stehen meist Retinopathien und neurologische Symptome wie Schwindel, Verwirrtheit und Konzentrationsstörungen im Vordergrund. Weitere neurologische Komplikationen können durch Kompression des Rückenmarks oder Schädigung der Nerven in Folge von Amyloidablagerungen oder Hyperkalzämie auftreten (Gassel 2002).

1.1.5 Diagnostik

Die Basisdiagnostik beim Multiplen Myelom umfasst neben der Anamnese bezüglich der häufigsten Symptome (siehe oben) eine klinische Untersuchung, bildgebende Verfahren sowie Labor- und Knochenmarkuntersuchungen.

Als Zeichen der KM-Insuffizienz kann im Blutbild häufig eine Anämie nachgewiesen werden, seltener eine Leuko- und / oder Thrombozytopenie. Zudem sollten Kalzium, Kreatinin, LDH, CRP, BSG und β 2-Mikroglobulin als weitere wichtige Labor- und Prognoseparameter erfasst werden (Herold et al. 2011). Zur Eiweißdiagnostik gehört neben der Bestimmung von Gesamtprotein und Albumin die Serumelektrophorese und die Immunfixation in Serum und Urin, mittels derer sich das monoklonale Protein sowohl qualitativ als auch quantitativ nachweisen lässt (Herold et al. 2011).

Laut dem „Pariser Schema“ sind die proximalen langen Röhrenknochen, das Achsenskelett, das Becken, die Rippen und der Schädel zu röntgen. Typisch für das MM ist hierbei der sog. „Schrotschussschädel“, hervorgerufen durch zahlreiche Osteolyseherde im Schädelknochen.

Durch eine Beckenkamm-Punktion lässt sich Knochenmark für die zytologische und histologische Diagnostik gewinnen. Zwar können die Plasmazellen manchmal auch eine atypische Form aufweisen, häufig gibt aber nur ihr gesteigerter Anteil einen Hinweis auf die Myelomerkrankung (Goldschmidt et al. 2004).

Zur erweiterten Diagnostik zählen Kernspin- und Computertomographie bei unauffälligem röntgenologischem Befund, der Nachweis von Chromosomenaberrationen mittels molekularzytogenetischer FISH-Analyse und auch der sehr sensitive „Freelite-Test“ (Goldschmidt et al. 2004). Dieser bestimmt das Verhältnis von freien κ - und λ -Leichtketten im Serum und wird angewendet, wenn bei der Verdachtsdiagnose MM in der Standarddiagnostik kein monoklonales Protein nachweisbar ist (Drayson et al. 2001).

Kriterien der International Myeloma Working Group zur Diagnosesicherung sind in Tabelle (Tab.)1 dargestellt.

Tab. 1: Kriterien zur Diagnosesicherung des Multiplen Myeloms

- alle 3 Kriterien müssen erfüllt sein

1. Monoklonale Plasmazellen im Knochenmark > 10% und / oder ein durch Biopsie gesicherter Plasmazytomherd
2. Nachweis eines monoklonalen Proteins im Serum und / oder Urin ^{a)}
3. Myelomassoziierte Organdysfunktionen (mindestens eine) ^{b)} [C] Kalziumerhöhung im Blut (Serumkalzium > 10,5 mg/l oder oberhalb des Referenzbereiches) [R] Niereninsuffizienz (Serumkreatinin > 2 mg/dl) [A] Anämie (Hämoglobin < 10 g/dl oder 2 g unterhalb des Referenzbereichs) [B] Osteolysen oder Osteoporose ^{c)}
^{a)} Falls kein monoklonales Protein nachweisbar ist (asekretorisches MM), müssen $\geq 30\%$ (monoklonale) Plasmazellen im Knochenmark vorhanden sein und/oder ein durch Biopsie gesicherter Plasmazytomherd. ^{b)} Weitere Organdysfunktionen sind möglich. Diese können verwendet werden, wenn gesichert ist, dass sie durch das Myelom bedingt sind. ^{c)} Falls ein solitäres (biopsiegesichertes) Plasmazytom oder eine Osteoporose allein vorliegt, müssen $\geq 30\%$ Plasmazellen in der Knochenmarkbiopsie nachweisbar sein.

nach: Palumbo et al. 2009

1.1.6 Stadieneinteilung und Prognosefaktoren

Wesentlich für die Entwicklung eines effektiven Behandlungsplans sind die Ermittlung von prognostischen Faktoren und die damit einhergehende Zuordnung zu einem Stadium. Die seit 1975 am weitesten verbreitete Stadieneinteilung ist das Durie-Salmon-System (siehe Tab. 2), in dem das klinische Stadium der Erkrankung auf der Bestimmung von vier Parametern beruht: Hämoglobin, Serumkalzium, Ausmaß der Knochenläsionen und Paraproteinkonzentration. Eine Subklassifikation in A und B erfolgt entsprechend der Nierenfunktion.

Tab. 2: Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms nach Salmon und Durie
- mit Angabe der Tumorzellmasse: Zellen x $10^{12}/m^2$ Körperoberfläche

<u>Stadium</u>	<u>Kriterien</u>	<u>Medianes Überleben</u>
I: (niedrige Tumorzellmasse: < 0,6)	Erfüllung aller 4 Kriterien: 1. Hb-Wert > 10 g/dl 2. Serum-Ca-Wert normal 3. Röntgenologisch normales Skelett oder nur eine solitäre Osteolyse 4. Geringe Konzentrationen monoklonaler Immunglobuline: a) IgG < 5 g/dl b) IgA < 3 g/dl c) Leichte Ketten im Urin: < 4 g/24h	IA: 62 Monate IB: 22 Monate
II:	Weder zu Stadium I noch zu Stadium III Passend	IIA: 58 Monate IIB: 34 Monate
III: (hohe Tumorzellmasse: > 1,2)	Eines oder mehrere der folgenden Zeichen: 1. Hb-Wert < 8,5 g/dl 2. Serum-Ca-Wert erhöht 3. Fortgeschrittene osteolytische Knochenveränderungen 4. Hohe Konzentrationen monoklonaler Immunglobuline: a) IgG > 7 g/dl b) IgA > 5 g/dl c) Leichte Ketten im Urin: > 12 g/24h	IIIA: 45 Monate IIIB: 24 Monate
	A: Serumkreatinin < 2 mg/dl; B: Serumkreatinin \geq 2 mg/dl	

nach: Greipp et al. 2005, Herold et al. 2011

Zwecks besserer Charakterisierung und Quantifizierung von Knochenveränderungen wurde dieses System durch die Einbeziehung bildgebender Verfahren wie MRT, Ganzkörper-FDG-PET und Ganzkörper-CT erweitert (Durie/Salmon PLUS myeloma staging system); es konnte sich bisher jedoch nicht etablieren (Durie 2006). Hingegen wird das etwas später formulierte International Staging System (ISS, siehe Tab. 3), welches aus der retrospektiven

Datenauswertung von über 10 000 Patienten entstand und auf dem β 2-Mikroglobulin- und Albuminspiegel im Serum basiert, immer häufiger angewendet (Greipp et al. 2005).

Tab. 3: International Staging System (ISS)

<u>Stadium</u>	<u>Kriterien</u>	<u>Medianes Überleben</u>
I	β 2-Mikroglobulin i. S. < 3,5 mg/l Albumin i.S. > 3,5 g/dl	62 Monate
II	Weder Stadium I noch Stadium III	44 Monate
III	β 2-Mikroglobulin i. S. > 5,5 mg/l	29 Monate

nach: Greipp et al. 2005

Neben den in den obigen Stadieneinteilungen bereits beschriebenen Parametern gibt es beim Multiplen Myelom eine Reihe weiterer prognostisch relevanter Faktoren.

Zum einen sind das Alter des Patienten und sein allgemeiner Gesundheitszustand von Bedeutung. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass das mediane Überleben mit zunehmendem Alter bei Erkrankungsbeginn abnimmt (Bladé et al. 1996).

Desweiteren sind Erhöhungen der Laktatdehydrogenase (LDH) und des C-reaktiven Proteins (CRP) sowie ein hoher Plasmazell-Labeling-Index (PLI) mit einer ungünstigeren Prognose assoziiert (Terpos et al. 2010, Greipp et al. 1993). Letzterer definiert die Proliferationskapazität der Plasmazellen und steigt bei einer Erkrankungsprogression an.

Die höchste prognostische Relevanz besitzt jedoch der Nachweis zytogenetischer Aberrationen. Patienten mit Hyperdiploidie haben im Allgemeinen eine bessere Prognose als solche mit Hypodiploidie (Bladé et al. 2008), insbesondere Deletionen des Chromosoms 13q14 und 17p13 sind mit einer kürzeren Überlebenszeit vergesellschaftet (Königsberg et al. 2000). Weitere ungünstige chromosomale Veränderungen betreffen die Translokationen t(4; 14) und t(14; 16) (Fonseca et al. 2003).

1.1.7 Therapie

Bei asymptomatischen Patienten mit einem Multiplen Myelom im Stadium I nach Durie und Salmon besteht bisher kein Behandlungsbedarf, sie werden lediglich regelmäßig untersucht, um eine Krankheitsprogression rechtzeitig festzustellen (watch & wait). Gegenwärtig wird jedoch in einer gemeinsamen multizentrischen Phase III Studie der Deutschen Studiengruppe Multiples Myelom (DSMM) und der Ostdeutschen Studiengruppe Hämatologie und Onkologie (OSHO) untersucht, ob durch den frühzeitigen Einsatz von Zoledronat im Stadium I das progressionsfreie Intervall verlängert werden kann.

Ab Stadium II kommen für die Patienten verschiedene, im Folgenden aufgeführte Therapieansätze in Frage.

Konventionelle Chemotherapie

Die konventionelle Chemotherapie ist bei Patienten indiziert, die aufgrund ihres Alters oder aufgrund von Begleiterkrankungen für intensivere Therapieformen nicht geeignet sind. Bewährt hat sich die bereits 1969 von *Alexanian* eingeführte Kombination der alkylierenden Substanz Melphalan mit Prednison (MP-Schema) (Alexanian und Dimopoulos 1994). Zwar sprechen etwa 50 % der mit MP behandelten Patienten auf die Therapie an, komplette Remissionen sind jedoch selten.

Hingegen führt die Integration von Thalidomid oder auch Bortezomib in das MP-Behandlungsschema (MPT bzw. MPV) zu einer deutlich höheren Remissionsrate, einer Verlängerung der progressionsfreien Überlebenszeit sowie der Gesamtüberlebenszeit (Minnema et al. 2010).

Induktionstherapie vor geplanter autologer Stammzelltransplantation

Aufgrund der Stammzelltoxizität von Melphalan darf das obige Schema als Initialtherapie bei Patienten, die potentiell einer autologen Stammzelltransplantation (SZT) zugeführt werden sollen, nicht angewandt werden, da sonst ggf. eine spätere Stammzellapherese (siehe „Methoden der Stammzellgewinnung“ auf Seite 16) nicht mehr möglich ist. Stattdessen kann bei diesem Patientenkollektiv eine rasche Krankheitskontrolle durch den Einsatz von Thalidomid, Bortezomib und Lenalidomid erreicht werden (Palumbo und Anderson 2011).

Die Kombination dieser neueren Substanzen mit Dexamethason in der Induktionstherapie verbessert die Ansprechraten vor und nach Stammzelltransplantation im Vergleich zur klassischen, jetzt nicht mehr empfohlenen vincristinhaltigen Induktionstherapie (VAD: Vincristin/Adriamycin/Dexamethason) (Harousseau 2008). In welchem Ausmaß dies auch zu

einem längeren krankheitsfreien Überleben und vor allem auch zu einem längeren Gesamtüberleben führt, kann allerdings noch nicht abschließend bewertet werden.

Hochdosis-Chemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation

Eine Hochdosistherapie (HDT) mit Melphalan und anschließender Rückgabe von eigenen zuvor gewonnenen Blutstammzellen (autologe SZT) wird bei Patienten < 70 Jahren mit guter Organfunktion empfohlen. 1996 beschrieben *Attal et al.* eine höhere Effektivität dieses neuen Therapieansatzes im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie, da er sowohl zu einer Verlängerung des krankheitsfreien Intervalls als auch des Gesamtüberlebens führte (*Attal et al. 1996*). Patienten, die nach der ersten Transplantation keine sehr gute partielle Remission (very good partial remission, VGPR) erreichen, profitieren zudem von der Durchführung einer Tandemtransplantation (*Cavo et al. 2007*).

Allogene Stammzelltransplantation (myeloablativ / nicht-myeloablativ)

Die allogene Stammzelltransplantation wird weiterhin als die einzige potentiell kurative Therapieoption in der Behandlung des MM angesehen. Im Gegensatz zur autologen Transplantation sind die von einer gesunden Person gespendeten Stammzellen nicht mit Tumorzellen kontaminiert und es kann über die transplantierten immunkompetenten Donorzellen ein Graft-versus-Myeloma (GvM)-Effekt induziert werden (*Lokhorst et al. 2010*). Durch diesen GvM-Effekt ist die Rezidivwahrscheinlichkeit nach allogener Stammzelltransplantation deutlich niedriger als nach autologer SZT. Nicht zu unterschätzen ist jedoch die nach konventioneller (=myeloablativer) allogener SZT wesentlich höhere therapiebedingte Mortalität (41 % vs. 13 %) durch die „Graft-versus-Host-Disease“ (GvHD), Organtoxizität und Infektionen (*Björkstrand et al. 1996*).

Eine Reduktion dieser therapiebedingten Morbidität und Mortalität gelang durch die Einführung dosisreduzierter Konditionierungsschemata (*Crawley et al. 2007*). Da hierbei jedoch die Rezidivrate im Vergleich zur konventionellen Konditionierung wiederum anstieg, wurde das Auto-Allo-Tandem-Konzept entwickelt, um auf diese Weise zusätzlich zu dem gewünschten GvM-Effekt bei geringer Mortalität eine effektive vorherige Reduktion der Tumorlast zu erreichen. Ein Vergleich dieses Therapiekonzeptes mit der autologen Tandem-SZT erbrachte zwar in einer prospektiven Studie von 2007 eine längere Überlebenszeit sowie ein längeres progressionsfreies Intervall bei den Patienten in der Auto-Allo-Gruppe (*Bruno et al. 2007*), hingegen konnte in einer anderen zeitnah publizierten Studie kein Vorteil gegenüber der autologen Tandem-SZT gezeigt werden (*Garban et al. 2006*).

Methoden der Stammzellgewinnung

Grundsätzlich gibt es zwei Methoden zur Gewinnung von Stammzellen.

Bei der klassischen Knochenmarkentnahme erfolgt die Übertragung von rotem Knochenmark. Dem Spender wird in Vollnarkose etwa ein Liter Knochenmarkblut aus dem Beckenkamm entnommen und die hieraus isolierten Stammzellen aufgereinigt und dem Empfänger anschließend transfundiert.

Die heutzutage bevorzugte Methode der Stammzellgewinnung ist jedoch die sogenannte periphere Stammzellapherese. Die hierdurch gewonnenen Stammzellpräparate enthalten im Vergleich zum Knochenmark neben einer erhöhten Anzahl der CD34 positiven unreifen Progenitorzellen auch ein Vielfaches an Gesamtleukozyten sowie immunkompetenten Lymphozyten und begünstigen dadurch in der Anwendung nach Hochdosistherapie klinisch eine schnellere hämatopoetische Rekonstitution. Ein weiterer Vorteil ist in der deutlich geringeren Invasivität des Eingriffs zu sehen (Klinker und Weißinger 2004).

Da unter physiologischen Bedingungen allerdings nur eine geringe Anzahl an hämatopoetischen Stammzellen im peripheren Blut zirkuliert, ist eine verstärkte Mobilisierung dieser Zellen aus dem Knochenmark Voraussetzung für die periphere Stammzellapherese. Ermöglicht wird dies durch die Gabe von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) (Klinker und Weißinger 2004).

1.2 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit

Das Multiple Myelom ist eine Erkrankung, bei der häufig schwere Infektionen das Krankheitsbild prägen und zur Diagnosestellung führen. Diese erhöhte Infektanfälligkeit beruht neben einer Neutropenie auch auf einer Schwäche des humoralen Immunsystems, da durch die Monoklonalität der Immunglobuline kein ausreichender Schutz gegenüber einer Vielzahl von Erregern gegeben ist. Ebenso liegen die Hauptursachen der therapieassoziierten Mortalität nach allogener SZT entweder in einer zu schwachen Immunantwort (Infektionen) oder aber in einer zu starken (GvHD).

Aufgrund der Bedeutung einer effektiven Antikörperproduktion für den Krankheitsverlauf soll im Rahmen dieser Arbeit daher das Vorkommen von (vakzininduzierten bzw. erworbenen) Antikörperantworten gegen Tetanus Toxoid (TT) und Influenza Nukleoprotein (NP) bei Patienten mit Multiplem Myelom analysiert werden. Als Kontrolle dient dabei das Serum gesunder Blutspender. Die Proben werden im ersten Schritt über den Verlauf der Erkrankung und über die verschiedenen Phasen der Therapie hinweg untersucht. Da bereits nachgewiesen werden konnte, dass bei bestimmten Tumorantigenen die gezielte Aktivierung einer gegen den Tumor gerichteten Antikörper-vermittelten Immunantwort besonders häufig nach allogener SZT stattfindet (Kobold et al. 2010), wird in dieser Arbeit ebenfalls besonderes Augenmerk auf die Auswirkung einer allogenen Stammzelltransplantation auf die Immunantwort gelegt. Daneben ist von Interesse, inwieweit diese Immunreaktionen gegen mikrobielle Erreger auch durch Chemotherapie und autologe SZT beeinflusst werden.

Im zweiten Schritt soll die Antikörperantwort auf einen möglichen Zusammenhang mit prognostisch relevanten klinischen Daten der Myelompatienten überprüft werden, um beurteilen zu können, ob auch für die Immunantwort auf Influenza Nukleoprotein und Tetanus Toxoid eine prognostische Aussagefähigkeit besteht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Sera von Myelompatienten und gesunden Personen

Zur Durchführung der Versuche wurden zum einen 1069 Serumproben von 190 Patienten verwendet, die im Rahmen ihrer MM-Erkrankung im Universitätsklinikum Eppendorf in Hamburg behandelt wurden bzw. werden. Die Proben werden bei -80°C gelagert. Beginnend im Dezember 2004 umfasste der Beobachtungszeitraum hierbei insgesamt 4 Jahre.

Außerdem wurden als Vergleichsgruppe zu den am Multiplen Myelom erkrankten Patienten Serumproben von 100 gesunden Blutspendern untersucht.

Schriftliche Einverständniserklärungen der Patienten zur Entnahme und wissenschaftlichen Nutzung der Proben liegen vor (siehe „Patientenaufklärung und –einverständniserklärung“ im Anhang); ebenso die Genehmigung der Ethikkommission der Hamburger Ärztekammer.

2.1.2 ELISA-Proteine

Protein	Hersteller
NP	Imgenex, San Diego (USA)
TT	Chiron Behring, Marburg (Deutschland)
GST	Abnova, Heidelberg (Deutschland)

2.1.3 Chemikalien

Material	Hersteller
Diethanolamin	Sigma-Aldrich®, Hamburg (Deutschland)
Dulbecco´s Phosphate-Buffered Saline (D-PBS) 1x	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
Dulbecco´s Phosphate-Buffered Saline (D-PBS) 10x	Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)
Goat-Anti-human-IgG-Ap	Southern Biotech, Birmingham (USA)
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich®, Hamburg (Deutschland)
Magermilchpulver	Spinnrad®, Bad Segeberg (Deutschland)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Fluka, Basel (Schweiz)
Para-Nitrophenylphosphat (PNPP)	Southern Biotech, Birmingham (USA)
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe (Deutschland)
Tween 20	Sigma-Aldrich®, Hamburg (Deutschland)

2.1.4 Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller
ELISA-Reader	Sunrise	Tecan, Männedorf (Schweiz)
Mikroplatten Washer	Columbus Pro	Tecan, Männedorf (Schweiz)
pH-Meter	CG 811	Schott. Mainz (Deutschland)
Schüttler	IKA-Vibrax-VXR Typ VX7	Janke & Kunkel, Staufen (Deutschland)
Vortex	Lab Dancer S40	VWR, Darmstadt (Deutschland)
Waagen	PB 300 AT 261 Delta Range®	Mettler, Bergisch-Gladbach (Deutschland)

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Material	Modell	Hersteller
Multikanalpipette	10 – 100 µl	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Parafilm	PM-996	Brand, Wertheim (Deutschland)
Pipetten	0,5 – 10 µl 10 – 100 µl 100 – 1000 µl	Eppendorf, Hamburg (Deutschland)
Pipetten für Pipettierhilfe	Falcon® 5 ml, 25 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
Pipettenspitzen	20 µl, farblos 200 µl, gelb	Sarstedt, Nümbrecht (Deutschland)
Pipettierhilfe	Pipetus®	Hirschmann, Eberstadt (Deutschland)
PP-Test Tubes	Cellstar® 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One Frickenhausen (Deutschland)
Reagenzienreservoir	4873	Costar, Cambridge (USA)

2.1.6 Studiendesign

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine retrospektiv angelegte, nicht-randomisierte Studie zur experimentellen Erfassung von NP- und TT-spezifischen Antikörpern bei Patienten mit Multiplem Myelom.

2.2 Methode

2.2.1 Versuchsbeschreibung – ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Zur Gruppe der Immunassay-Verfahren gehörend handelt es sich beim enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (EIA) bzw. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) um eine Methode, deren Grundprinzip die spezifische Bindung eines Antikörpers an ein Antigen ist. Dieses immunologische Nachweisverfahren basiert im Gegensatz zum Radioimmunassay nicht auf einer Radioaktivitätsmessung, sondern auf einer enzymatischen Farbreaktion und erfährt aufgrund seiner hohen Sensitivität bei einfacher Durchführbarkeit eine weit verbreitete Anwendung in der Bioanalytik.

Voraussetzung für ELISA ist die Eigenschaft bestimmter Kunststoffe, bereits geringe Mengen der meisten Proteine durch unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen fest binden zu können (Kemeny 1994). Pipettiert man in eine Mikrotiterplatte aus geeignetem Material eine Antigenlösung, so wird ein Teil des Proteins adsorbiert und der nicht gebundene Anteil durch Waschen der Platte entfernt. Um Kreuzreaktionen im weiteren Verlauf zu vermeiden, die durch noch nicht besetzte, reaktive Bindungsstellen der Kunststoffoberfläche möglich sind, wird ein sog. Blockpuffer zu deren Sättigung aufgetragen. In die so vorbehandelte Mikrotiterplatte wird anschließend das zu testende Blutserum einpipettiert. Falls in der Probe antigenspezifische Antikörper vorhanden sind, binden diese an das an die Festphase fixierte Antigen. Alles nicht gebundene Material wird wiederum in einem anschließenden Waschvorgang entfernt. Um den gebundenen Antikörper nun detektieren zu können, wird die Platte zunächst mit einer Lösung von enzymgekoppeltem Anti-Antikörper (= sekundärer Antikörper) und nach erneutem Waschgang mit Substratlösung behandelt. Hierdurch wird eine enzymatisch katalysierte Farbreaktion in Gang gesetzt, die nach definiertem Zeitabstand durch Zugabe einer Stopp-Lösung beendet wird (Trommer 2009). Je nach Farbtintensität und daraus resultierender Absorptionswerte im ELISA-Reader kann schließlich nicht nur eine qualitative, sondern auch eine quantitative Beurteilung der Antikörper in den Blutseren erfolgen. In Abb. 2 ist das Prinzip des indirekten ELISA dargestellt.

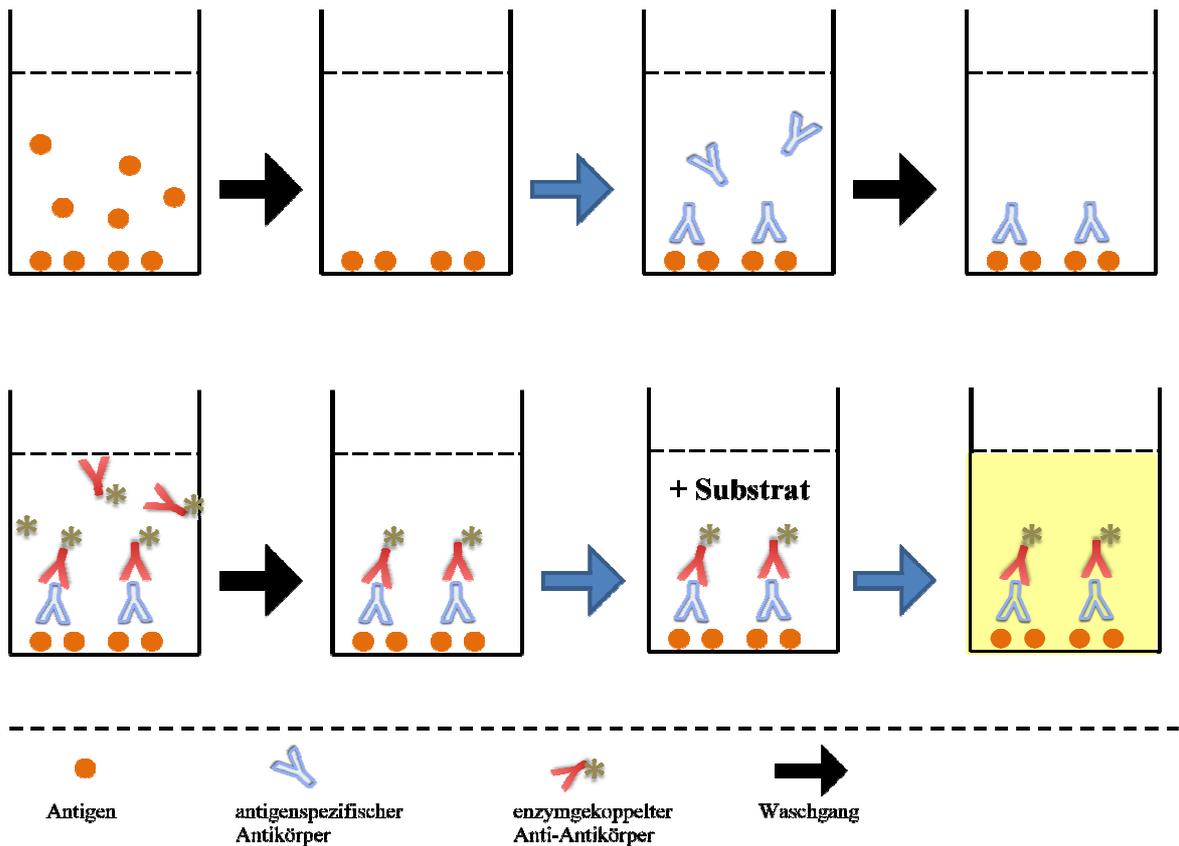


Abb. 2: Prinzip des indirekten ELISA

Es sind die Einzelschritte des Testes inklusive Waschgänge (→) dargestellt.

Die für den Versuch verwendeten Antigenlösungen NP, TT und GST sowie die Blutseren wurden vor ihrer Verwendung aufgetaut und bis zum erneuten Einfrieren auf Eis kaltgestellt. Desweiteren wurden sämtliche zu pipettierende Lösungen unmittelbar vor Gebrauch auf dem Vortexer vermischt und soweit nicht anders beschrieben in ein Reagenzienreservoir gegeben, welches nach dem Pipettiervorgang mit destilliertem Wasser gereinigt wurde.

2.2.2 Rezepturen der verwendeten Lösungen

Waschpuffer PBS-T: 2 ml Tween-20 in 1000 ml D-PBS

Blockpuffer: 25 g Magermilchpulver in 500 ml D-PBS lösen und Hinzugabe von 1,5 ml 10 % NaN₃

Substratpuffer für PNPP: zu 400 ml destilliertem Wasser wurden 24,5 mg MgCl₂ und 48 ml Diethanolamin hinzugefügt; mittels 5molarer HCl wurde der pH-Wert auf 9,8 adjustiert und anschließend der Lösungsansatz mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt

3molare NaOH-Lösung: 30 g NaOH in 250 ml destilliertem Wasser lösen

2.2.3 Herstellung der Proteinverdünnungen

Um eine einheitliche Endkonzentration von 1 µg/ml zu erreichen, wurden die Antigene vorab mit D-PBS verdünnt. Die im Folgenden genannten Mengenangaben beziehen sich dabei auf die Beschichtung von insgesamt 4 EIA-Platten à 96 Näpfe.

NP-Lösung (1 mg/ml): 1 µl NP + 999 µl D-PBS

TT-Lösung (4100 Lf/ml): 1.) 2 µl TT + 1394 µl D-PBS
2.) davon 500 µl + 3500 µl D-PBS

GST-Lösung (0,135 mg/ml): 40 µl GST + 5360 µl D-PBS

2.2.4 Herstellung der Serumverdünnungen

Die Verdünnung der Seren erfolgte auf Mikrotiterplatten, wobei zunächst jeder zweite Napf mit 399 µl Blockpuffer gefüllt wurde und anschließend 1 µl des entsprechenden Serums hinzugegeben wurde. Auf diese Weise konnte die gewünschte Verdünnung von 1:400 erreicht werden.

2.2.5 Herstellung der sekundären Antikörperlösung

Zur Verdünnung des sekundären Antikörpers auf 1:3000 wurde dieser mit Blockpuffer gemischt. Für 4 Platten wurden beispielsweise 13,5 ml Blockpuffer in ein 15 ml PP-Test Tube pipettiert und anschließend 4,5 µl Antikörper hinzugefügt.

2.2.6 Versuchsdurchführung – ELISA

Zunächst wurden mit einer Multikanalpipette 25 µl der verdünnten Antigenlösungen (siehe 2.2.3) in die Näpfe der EIA-Platte eingebracht. Hierbei wurden die Zeilen A, C, E und G mit dem Testprotein NP bzw. TT, die Zeilen B, D, F und H mit GST beschichtet. Anschließend wurden die Platten mit Parafilm abgedichtet und bei 4° Celsius im Kühlschrank über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Näpfe der Platten durch Ausschlagen geleert, mit PBS-T 2x sowie mit D-PBS 1x im Mikroplatten Washer gewaschen und dann mit 30 µl Blockpuffer pro Napf gefüllt. Die Inkubation erfolgte nun bei Raumtemperatur für etwa 90 Minuten.

Nach dem erneuten Ausschlagen und Waschen der Näpfe nach obigem Schema wurden die in der Zwischenzeit hergestellten Serumverdünnungen (siehe 2.2.4) in die Näpfe eingebracht (30 µl/Napf). Hierfür wurde an die Multikanalpipette nur jede zweite Spitze gesteckt und die einzelnen Seren insgesamt 4x pro EIA-Platte pipettiert:

z.B. Mikrotiterplatte A1 → EIA-Platte A1, A2, B1 und B2

Mikrotiterplatte A3 → EIA-Platte A3, A4, B3 und B4

usw.

Zur späteren Kontrolle des gesamten Versuchs wurden in die Näpfe G11, G12 und H11, H12 eine als positiv bekannte Serumprobe bzw. eine Negativkontrolle aus Blockpuffer gegeben.

Die Inkubationszeit der mit Serumlösung beschichteten Platten betrug daraufhin 2 Stunden bei Raumtemperatur, anschließend wurden die Platten erneut ausgeschüttelt und gewaschen.

Die nächsten Arbeitsschritte umfassten zum einen die Eingabe von 30 µl sekundärer Antikörperlösung (siehe 2.2.5) pro Napf mit nachfolgender Inkubation für 1 Stunde bei Raumtemperatur, zum anderen das nach 30 Minuten stattfindende Lösen von PNPP in Substratpuffer. Für 4 Platten wurden hierbei 8 PNPP-Tabletten in 40 ml Pufferlösung

gegeben, der 50 ml PP-Test-Tube in Alufolie gewickelt und für 30 Minuten auf den Schüttler gelegt.

Nachdem die EIA-Platten nach erfolgter Inkubationszeit durch Ausschlagen geleert und im Washer wiederum mit 2x PBS-T und 1x D-PBS gewaschen wurden, erfolgte dann das Befüllen der Nöpfe mit jeweils 100µl Substratlösung und die Inkubation für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur.

Anschließend wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 15 µl 3molarem NaOH in jeden Napf beendet und die Platten mit Hilfe des ELISA-Readers ausgewertet.

2.2.7 Statistische Auswertung

Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe von IBM SPSS Statistics 19.0 (IBM Corporation, Somers, NY, USA) durchgeführt. Zur Hintergrundkorrektur wurden die OD-Werte der GST-Bedingung von den NP- und TT-Werten abgezogen. Nicht berücksichtigt wurden Proben, deren GST-Wert mehr als das Zweifache seines Gesamtdurchschnitts betrug, da bei einer derart starken Abweichung eine reduzierte Spezifität des Gesamtsignals nicht auszuschließen ist.

Aufgrund einer unzureichenden Normalverteilung der gemessenen OD-Werte wurden nicht-parametrische Signifikanz-Tests verwendet. Für Unterschiede im Rahmen des zeitlichen Verlaufs wurde der Wilcoxon Test für verbundene Stichproben, für den Zusammenhang zwischen Immunantwort und klinischen Parametern der Mann-Whitney U Test sowie die Korrelationsanalyse nach Pearson angewandt. Wenn hierbei mehrere Werte pro untersuchter Bedingung und Patient vorlagen, ist den weiteren Berechnungen das arithmetische Mittel der betroffenen Proben zugrunde gelegt worden.

3 Ergebnisse

3.1 Eigenschaften des Patientenkollektivs

Die Analyse der insgesamt 190 Myelompatienten bezüglich ihrer klinischen Daten erbrachte eine Prädominanz des männlichen Geschlechts mit einem Anteil von 60,5 % sowie ein Durchschnittsalter von 55 Jahren.

Die Mehrzahl der Patienten wies ein IgG-Myelom auf und befand sich bei Erstdiagnose (ED) nach der in dieser Arbeit verwendeten Durie und Salmon-Klassifikation im Stadium III. Während knapp 43 % der Patienten im Rahmen ihrer Krankheitsprogression eine allogene Stammzelltransplantation erhalten haben, betrug der Anteil derer mit alleiniger autologer SZT 14 % bzw. derer mit alleiniger konventioneller Chemotherapie 4 %. Den übrigen Patienten ließ sich mit den vorhandenen Daten keines dieser Therapieregime zuordnen.

Diese und weitere für das Multiple Myelom klinisch und prognostisch relevante Patientencharakteristika sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tab. 4: Übersicht der Patientencharakteristika

Charakteristika	Anzahl Patienten (%) [*]	Charakteristika	Mittelwert (SD)
Geschlecht		Alter (Jahre)	55 (10,78)
männlich	115 (61%)	Hämoglobin (g/l)	11,39 (1,7)
weiblich	75 (39%)	Albumin (g/l)	40,88 (6,68)
Isotypen		LDH (U/l)	196,82 (94,2)
IgG	86 (45 %)	Kalzium (mmol/l)	2,31 (0,17)
IgA	43 (23 %)	Kreatinin (mg/dl)	1,25 (1,09)
Kappa-Leichtketten	16 (8 %)		
Lambda-Leichtketten	13 (7 %)		
asekretorisch	2 (1 %)		

Fortsetzung Tab. 4: Übersicht der Patientencharakteristika.

Stadium ED		β2-Mikroglobulin (mg/l)	3,25 (2,63)
I	31 (16 %)	IgG (g/l)	15,1 (16,34)
II	51 (27 %)	IgA (g/l)	4,42 (10,59)
III	95 (50 %)	IgM (g/l)	0,59 (0,65)
Chromosomenaberration		IgKappa (g/l)	4,39 (5,34)
Deletion 13q14	46 (24 %)	IgLambda (g/l)	1,72 (2,35)
Deletion 17p13	12 (6 %)	Plasmazellanteil im Knochenmark (%)	21,13 (27,2)
Translokation t (4;14)	9 (5 %)		
Therapie			
nur Chemotherapie	8 (4 %)		
Autologe SZT	26 (14 %)		
Allogene SZT	81 (43 %)		

* Die Prozentangabe bezieht sich auf das gesamte Patientenkollektiv von 190 Personen.
SD = Standardabweichung

3.2 Auswirkungen von Stammzelltransplantation und Chemotherapie auf die Immunantwort

3.2.1 Einfluss von allogener und autologer Stammzelltransplantation

Da sowohl die autologe als auch die allogene Stammzelltransplantation wichtige mögliche Behandlungsansätze des Multiplen Myeloms darstellen, wurde zunächst untersucht, inwiefern sie sich tendenziell auf die Antikörperantworten auswirken. Hierfür wurde eine Einteilung der Patientenserien vorgenommen, welche die zeitliche Relation zur allogenen bzw. zur autologen SZT berücksichtigt. Für die nach der SZT entnommenen Blutproben wurden zudem folgende Zeitfenster festgelegt: „0 - 3 Monate“, „3 - 6 Monate“, „6 - 9 Monate“, „9 - 12 Monate“, „1 - 3 Jahre“, „3 - 5 Jahre“ und „> 5 Jahre“ post-SZT. Ließen sich hier bei bestimmten Patienten mehrere Proben einer Kategorie zuordnen, wurde lediglich die erste dieser Blutentnahmen in die Auswertung mit einbezogen.

Wie aus den Abbildungen 3 und 4 hervorgeht, spricht die zunächst starke Erhöhung der OD-Mediane für ein vermehrtes Auftreten von Antikörpern (AK) gegen NP und TT nach allogener SZT. Sind die OD-Mediane in den ersten 6 Monaten mit denen der gesunden Kontrollgruppe vergleichbar, ist im Verlauf allerdings eine Erniedrigung zu erkennen, so dass sie nach 1 - 3 Jahren wieder unterhalb der OD-Mediane der prä-allo-Gruppe liegen. Während die Antikörperantwort gegen TT dauerhaft niedrig bleibt, nimmt sie gegen NP in den folgenden Jahren hingegen erneut zu.

Erläuternd hinzuzufügen ist, dass es sich bei den Patienten der prä-allo-Gruppe um ein Kollektiv handelt, das zuvor bereits eine autologe Stammzelltransplantation erhalten hat und somit vortherapiert ist.

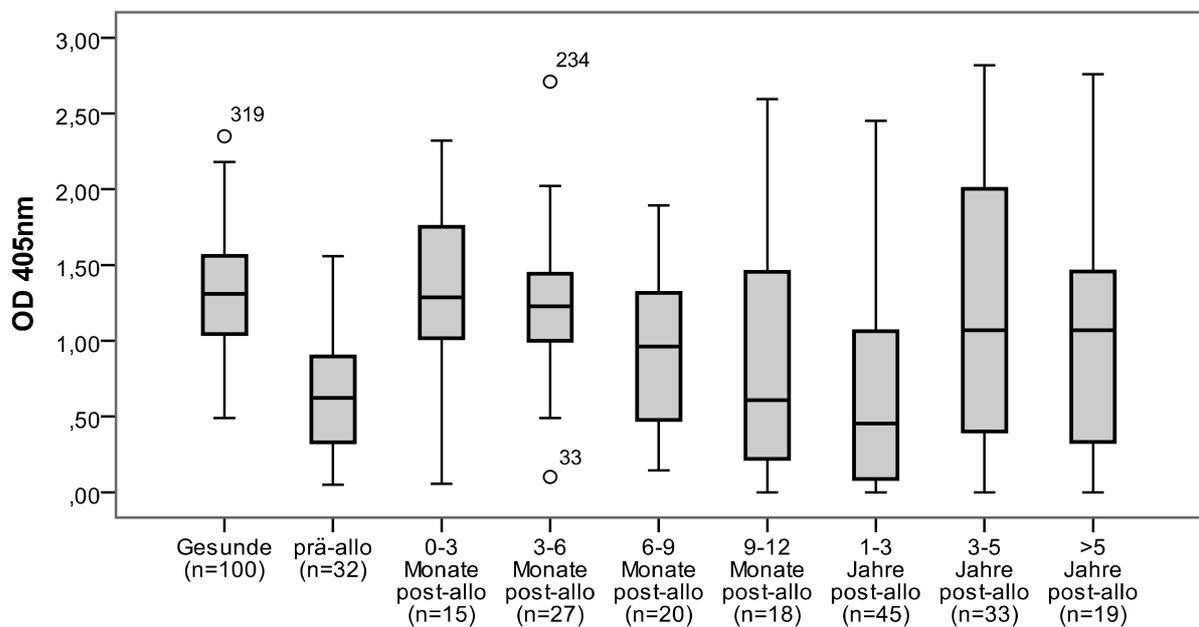


Abb. 3: Boxplots der OD bei Testung auf NP-AK über einen Zeitraum von > 5 Jahren bei allogener Stammzelltransplantation

Als Vergleichsgruppe sind die gesunden Spender mit dargestellt.

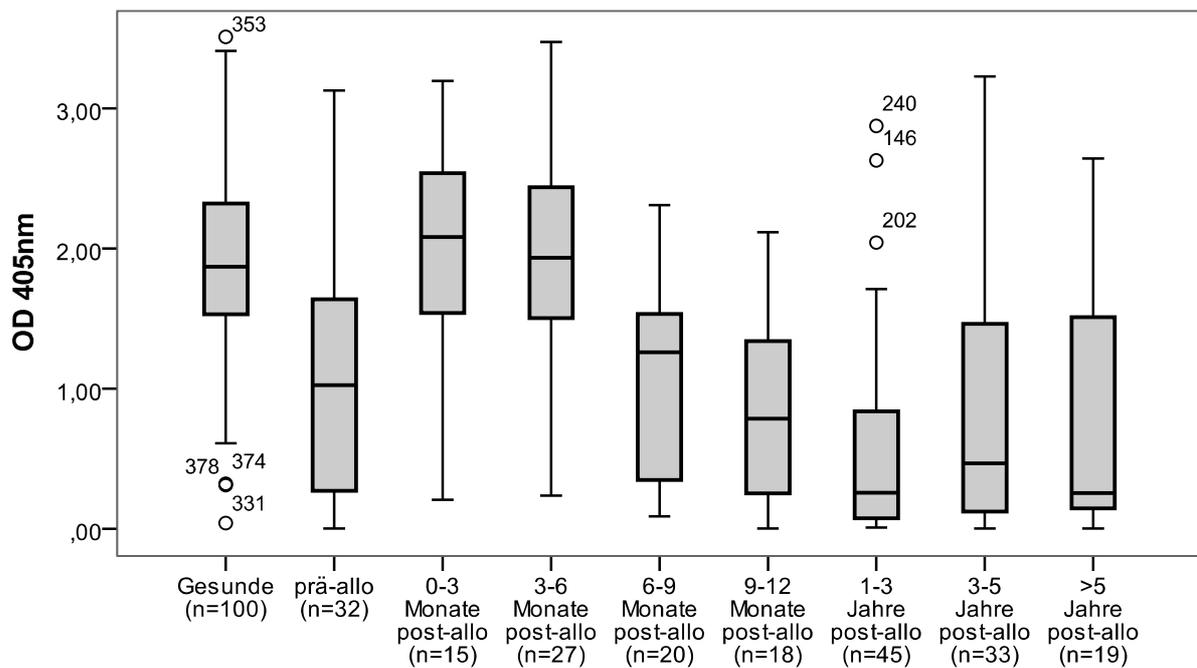


Abb. 4: Boxplots der OD bei Testung auf TT-AK über einen Zeitraum von > 5 Jahren bei allogener Stammzelltransplantation

Als Vergleichsgruppe sind die gesunden Spender mit dargestellt.

Zur Betrachtung der Auswirkung einer autologen Stammzelltransplantation auf die Immunantwort wurden nur Proben von Erkrankten berücksichtigt, die zum entsprechenden Zeitpunkt noch keine allogene SZT erhalten hatten. Da die Mehrzahl des untersuchten Patientenkollektivs im Verlauf ihrer Krankheit jedoch auch allogener therapiert wurde, ging dieses Vorgehen mit einer Abnahme der Gruppengrößen einher, welche insbesondere die Kategorien „9 - 12 Monate“, „3 - 5 Jahre“ sowie „> 5 Jahre“ nach autologer SZT betrifft.

In den Abbildungen 5 und 6 sind die OD-Werte für die Antikörper gegen NP und TT dargestellt. Steigt der Median bei beiden getesteten Antikörpern in den ersten 3 Monaten nach autologer SZT leicht an, findet sich für NP bereits in den folgenden Monaten eine abnehmende Antikörperantwort, während die Immunantwort gegen TT erst nach 9 Monaten abnimmt.

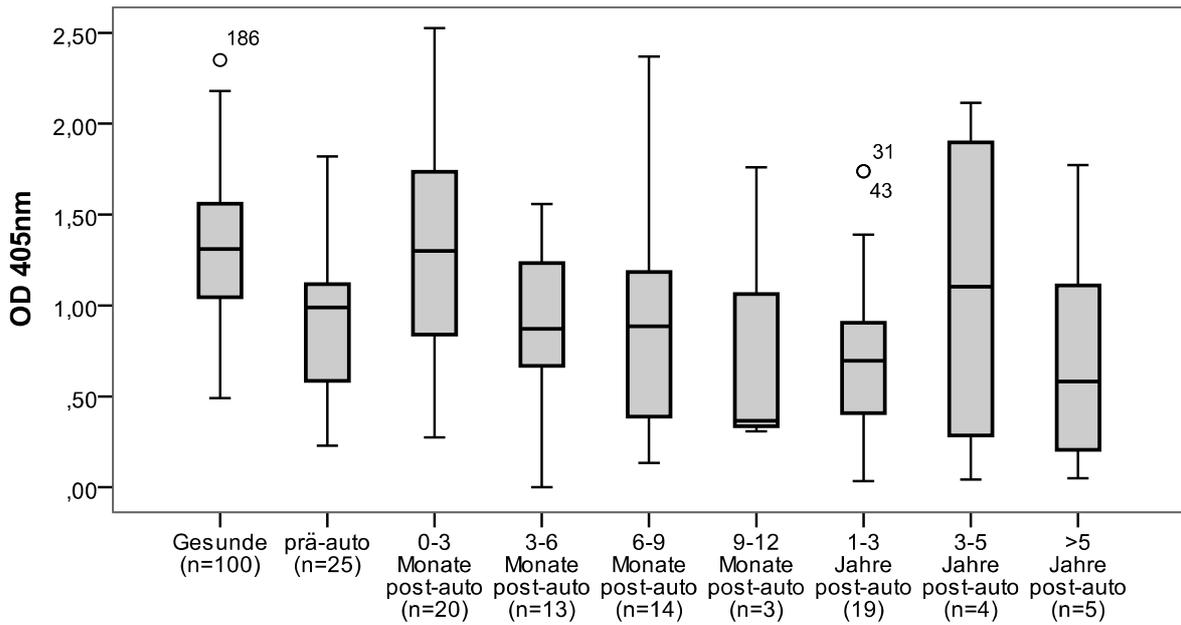


Abb. 5: Boxplots der OD bei Testung auf NP-AK über einen Zeitraum von > 5 Jahren bei autologer Stammzelltransplantation

Als Vergleichsgruppe sind die gesunden Spender mit dargestellt.

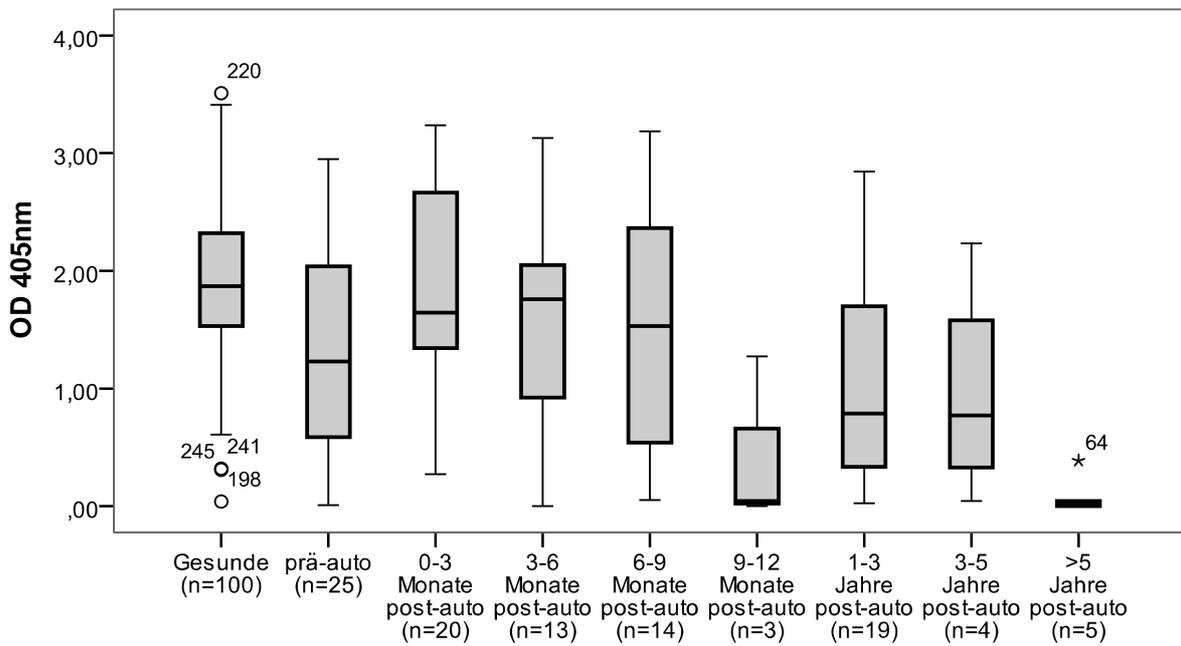


Abb. 6: Boxplots der OD bei Testung auf TT-AK über einen Zeitraum von > 5 Jahren bei autologer Stammzelltransplantation

Als Vergleichsgruppe sind die gesunden Spender mit dargestellt.

Um die dargestellten tendenziellen Verläufe der Immunantworten nach allogener bzw. autologer SZT zu spezifizieren, wurde im Folgenden der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben angewandt und auf diese Weise untersucht, ob die Stammzelltransplantationen signifikanten Einfluss auf die Höhe der Antikörperantworten haben. Dazu wurden von den einzelnen Patienten jeweils eine Blutprobe vor bzw. in den ersten sechs Monaten nach SZT verwendet. Außerdem wurde getestet, ob sich signifikante Unterschiede zwischen den Immunantworten in den ersten 6 Monaten nach SZT und den Antikörperantworten zu einem späteren Zeitpunkt finden lassen. Diese Zeitpunkte wurden gewählt, da sich im Verlauf der Untersuchung ein Abfall der TT- und NP-AK 6 Monate nach allogener SZT abzeichnete.

Es zeigte sich, dass sowohl gegen NP als auch gegen TT nach allogener SZT signifikant höhere Antikörperantworten vorhanden waren als unmittelbar davor. Von insgesamt 21 Patienten fand sich ein Anstieg des OD-Wertes für NP-Antikörper bei 17 Patienten ($p = 0,000$), für TT-Antikörper sogar bei 18 Erkrankten ($p = 0,001$).

Im Vergleich dazu lässt sich bei der autologen Stammzelltransplantation kein signifikanter Unterschied der Immunantwort zwischen den Blutproben vor und nach der Behandlung feststellen. Stieg sowohl bei NP ($p = 0,472$) als auch bei TT ($p = 0,586$) bei 10 Patienten der OD-Wert nach der autologen SZT an, nahm er hingegen bei den übrigen 8 Patienten ab.

In den Abbildungen 7 und 8 sind die hierzu gehörigen Verläufe der OD-Werte als Liniendiagramme dargestellt.

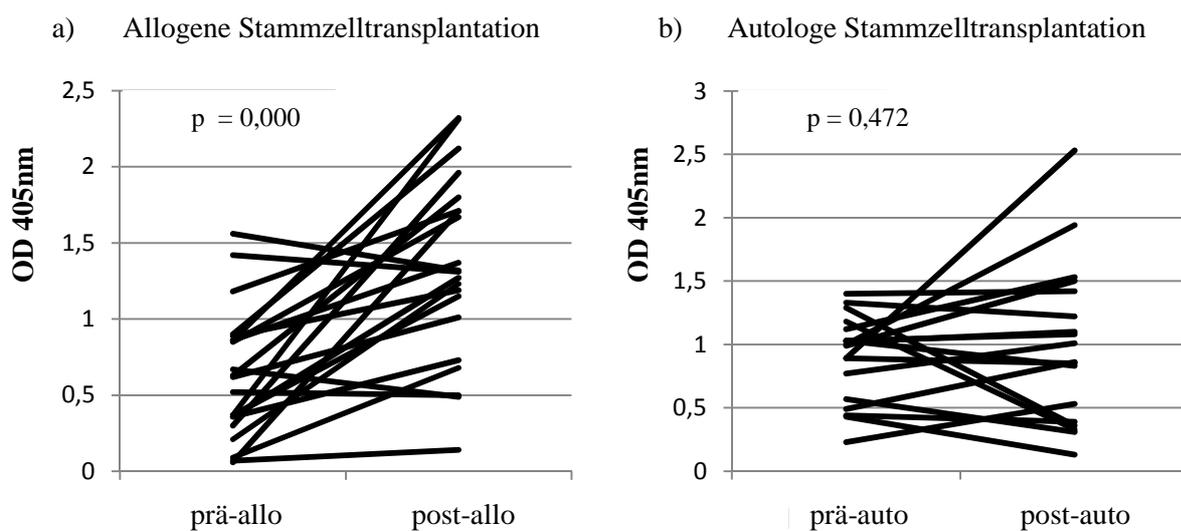
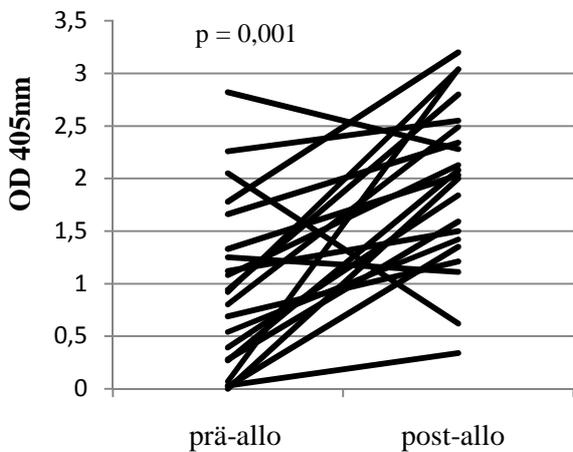


Abb. 7 a und b: Liniendiagramme für den Vergleich der OD bei Testung auf NP-AK vor und nach Stammzelltransplantation

a) Allogene Stammzelltransplantation



b) Autologe Stammzelltransplantation

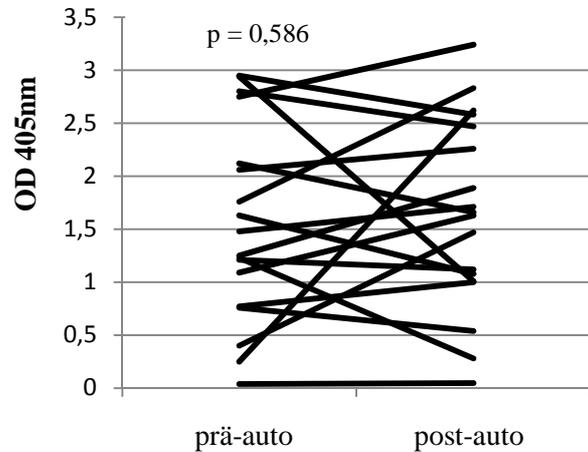
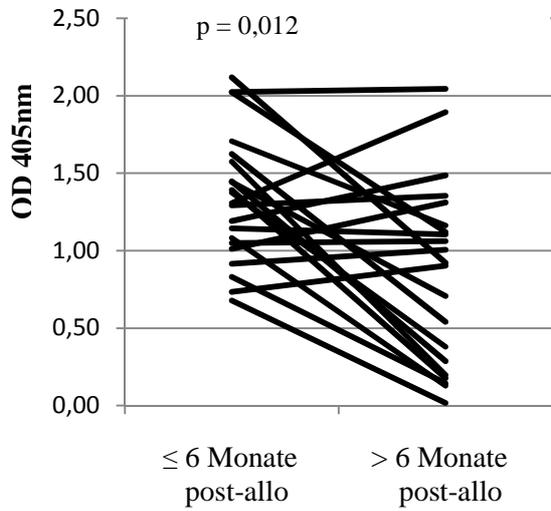


Abb. 8 a und b: Liniendiagramme für den Vergleich der OD bei Testung auf TT-AK vor und nach Stammzelltransplantation

Es war außerdem festzustellen, dass nach allogener SZT die Antikörperantworten im Verlauf wiederum signifikant abfielen. Beim Vergleich der Proben, welche innerhalb der ersten 6 Monate nach allogener SZT abgenommen wurden, mit denen, die von einem späteren Zeitpunkt stammten, zeigte der OD-Wert für NP-AK bei 13 von 21 Patienten einen Abfall ($p = 0,012$), für TT-AK bei 19 der 21 Erkrankten ($p = 0,000$) (Abb. 9a und 10a).

Im Gegensatz hierzu konnten nach autologer SZT keine signifikanten Änderungen der Immunantworten gegen NP ($p = 0,500$) bzw. TT ($p = 0,686$) beobachtet werden. Wie in den Abbildungen 9b und 10b dargestellt, zeigten 3 von 5 Patienten im Verlauf für NP-AK einen Abfall des OD-Wertes, für TT-AK stieg der Wert hingegen bei 3 Personen an und nahm bei 2 Patienten ab. Aufgrund dieser geringen Datenlage ist jedoch keine abschließende Beurteilung möglich.

a) Allogene Stammzelltransplantation



b) Autologe Stammzelltransplantation

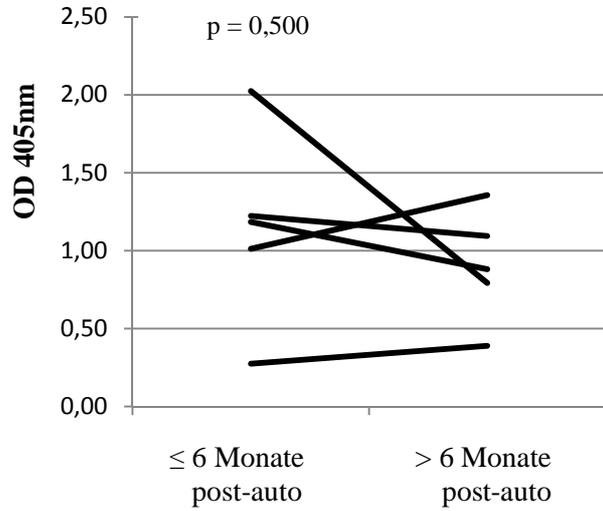
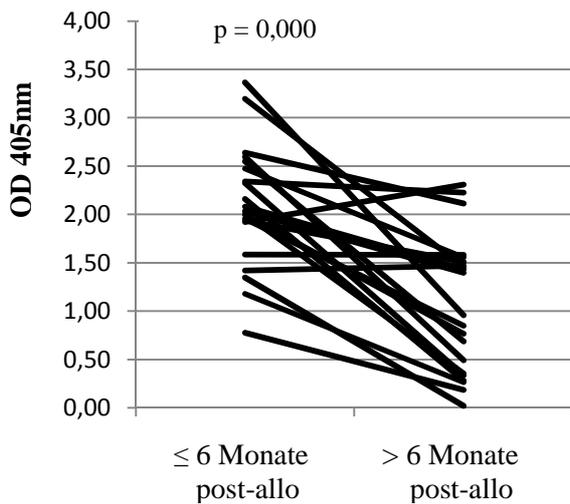


Abb. 9 a und b: Liniendiagramme für die Entwicklung der OD bei Testung auf NP-AK nach Stammzelltransplantation

a) Allogene Stammzelltransplantation



b) Autologe Stammzelltransplantation

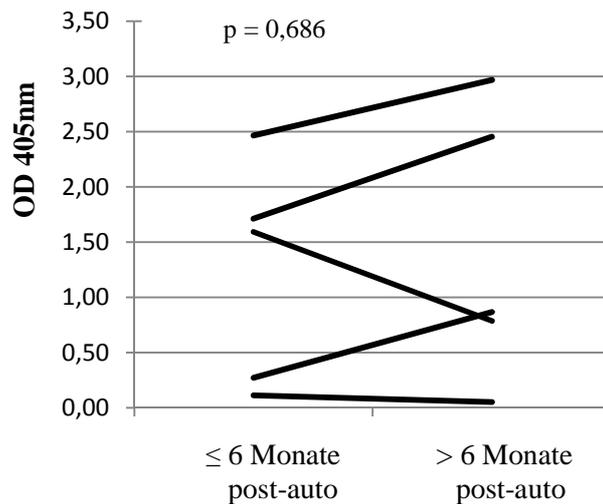


Abb. 10a und b: Liniendiagramme für die Entwicklung der OD bei Testung auf TT-AK nach Stammzelltransplantation

3.2.2 Einfluss durch Chemotherapie

Zusätzlich zu den Stammzelltransplantationen wurde auch der Einfluss einer Chemotherapie auf die Immunantwort untersucht. Bei 4 Patienten wurden Blutproben sowohl vor als auch nach der Chemotherapie entnommen (siehe Abb.11). Für NP-AK war bei diesen Patienten eine tendentielle Reduktion des mittleren OD-Wertes zu erkennen. Jedoch waren aufgrund der geringen Fallzahl weder bei den NP-AK ($p = 0,144$) noch bei den TT-AK ($p = 0,715$) signifikante Unterschiede zu verzeichnen.

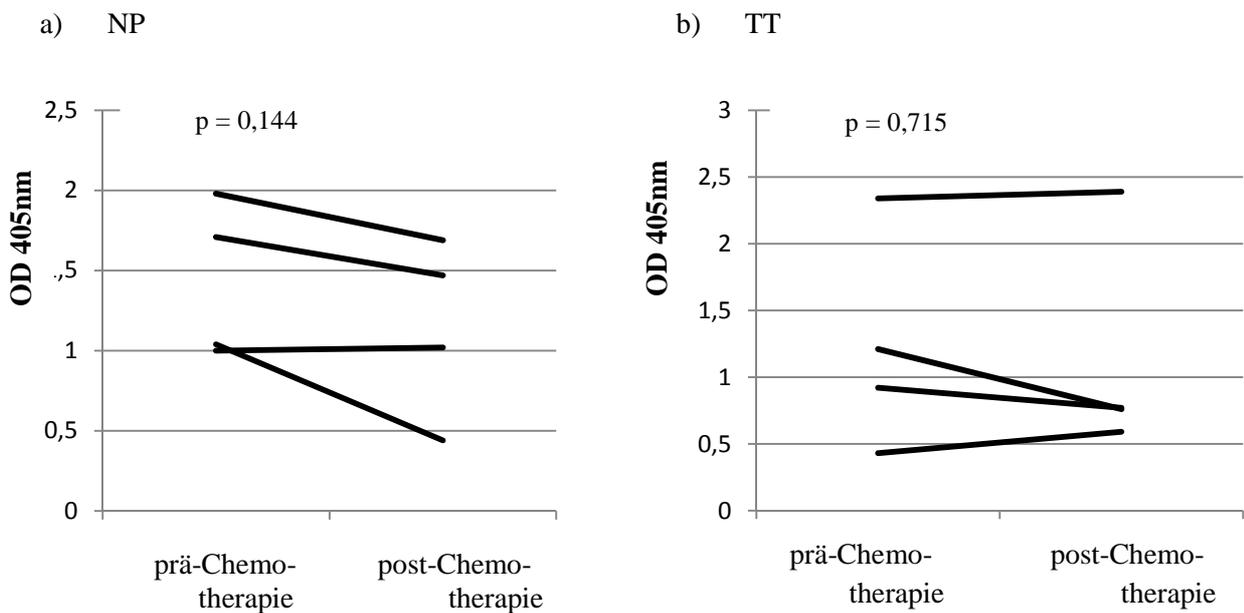


Abb. 11a und b: Liniendiagramme für den Vergleich der OD bei Testung auf NP- und TT-AK vor und nach Chemotherapie

3.3 Zusammenhang von Immunantwort und klinischen Parametern

Neben dem Einfluss der verschiedenen Therapieregime wurde untersucht, inwieweit ein Zusammenhang zwischen der Immunantwort auf NP bzw. TT und verschiedenen klinischen und laborchemischen Daten der Patienten besteht. Als Parameter dienten hierbei allgemeine Faktoren wie Alter und Geschlecht sowie krankheitsspezifische und prognostisch relevante Kriterien (siehe Tab. 5 und 6). Außerdem wurde das Patientenkollektiv mit den gesunden Knochenmarkspendern der Kontrollgruppe verglichen.

Zunächst wurde der Durchschnitt der OD- sowie der Laborwerte jedes Patienten ermittelt. Die anschließend mithilfe des Mann-Whitney-U-Testes erbrachten Signifikanzen beim Vergleich der Immunantworten in den jeweiligen Untergruppen sind ebenso wie die Mittelwerte und die dazugehörigen Standardabweichungen (SD) der OD-Werte der NP- und TT-AK als Übersicht in den Tabellen 5 und 6 dargestellt.

Es zeigte sich, dass sowohl die Immunantwort auf NP als auch auf TT innerhalb der Gruppe der Myelompatienten signifikant schwächer war als bei der gesunden Kontrollgruppe ($p = 0,000$). Ein weiterer statistisch signifikanter Unterschied der OD-Werte für NP-AK ($p = 0,013$) und TT-AK ($p = 0,045$) konnte für den Parameter IgG beim IgG-Myelom festgestellt werden, wobei die Immunantwort jeweils in der Gruppe mit den pathologisch erhöhten Laborwerten geringer ausgeprägt war. Jedoch ließ sich ein entsprechender Zusammenhang zwischen Paraprotein und Antikörperantwort bei den Patienten mit IgA- und Leichtkettenmyelom weder für NP noch für TT finden.

Bei den OD-Werten für TT-AK ergaben sich zudem signifikante Unterschiede bei den Untergruppen für die Parameter Alter und Albumin. So haben Patienten < 60 Jahre eine stärkere Immunantwort als solche > 60 Jahre ($p = 0,041$), während bei Erkrankten mit Albuminwerten unterhalb des Referenzwertes die OD niedriger war als in ihrer Vergleichsgruppe ($p = 0,002$).

Tab. 5: Beziehung zwischen der OD bei Testung auf NP-AK und klinischen Parametern

Es sind die Signifikanzen beim Vergleich der Parameter-Untergruppen dargestellt sowie deren OD-Mittelwerte und Standardabweichungen.

Parameter	Einteilung ^{a)}	N	Mittelwert/SD	p -Wert
Gruppe	Spender	100	1,328 / 0,389	0,000 *
	MM-Patient	190	0,920 / 0,710	
Geschlecht	männlich	115	1,042 / 0,556	0,161
	weiblich	75	0,918 / 0,523	
Alter	≤ 60 Jahre	122	0,969 / 0,543	0,495
	> 60 Jahre	67	1,034 / 0,555	
Hämoglobin	zu niedrig	157	1,022 / 0,540	0,126
	normal	30	0,859 / 0,550	
Albumin	< 35 g/l	27	0,877 / 0,566	0,197
	≥ 35 g/l	158	1,015 / 0,540	
LDH	≤ 225 U/l	137	1,007 / 0,566	0,803
	> 225 U/l	49	0,972 / 0,485	
Kalzium	≤ 2,63 mmol/l	182	0,995 / 0,540	0,883
	> 2,63 mmol/l	2	1,040 / 0,028	
Kreatinin	≤ 1,3 mg/dl	146	0,990 / 0,551	0,481
	> 1,3 mg/dl	37	1,035 / 0,536	
IgG beim IgG-Myelom	≤ 16 g/l	44	1,018 / 0,535	0,013 *
	> 16 g/l	41	0,746 / 0,420	
IgG beim IgA-Myelom	≤ 16 g/l	39	0,994 / 0,509	0,738
	> 16 g/l	4	0,883 / 0,817	
IgA beim IgA-Myelom	≤ 4 g/l	17	0,986 / 0,527	0,911
	> 4 g/l	26	0,982 / 0,546	
Kappa-Leichtketten	≤ 3,7 g/l	14	1,116 / 0,584	---
	> 3,7 g/l	0	---	
Lambda-Leichtketten	≤ 2 g/l	12	1,164 / 0,443	0,109
	> 2 g/l	1	0,210 / ---	
Deletion 13q14	vorhanden	46	0,900 / 0,488	0,137
	nicht vorhanden	117	1,038 / 0,539	
Deletion 17p13	vorhanden	13	1,058 / 0,331	0,670
	nicht vorhanden	150	0,989 / 0,540	
Translokation t (4;14)	vorhanden	9	0,933 / 0,419	0,658
	nicht vorhanden	153	0,998 / 0,534	
β2-Mikroglobulin	≤ 3 mg/l	60	0,970 / 0,482	0,136
	> 3 mg/l	32	0,807 / 0,538	
GvHD	vorhanden	42	0,885 / 0,476	0,983
	nicht vorhanden	21	0,893 / 0,491	
Plasmazellanteil im Knochenmark	≤ 10 %	68	0,978 / 0,520	0,755
	> 10 %	37	0,949 / 0,471	

^{a)} Die Einteilung der nicht nominalen Laborparameter erfolgte anhand der jeweiligen Grenzwerte, die spezifisch für das MM über- bzw. unterschritten werden.

* auf dem Niveau von 0,05 statistisch signifikant

Tab. 6: Beziehung zwischen der OD bei Testung auf TT-AK und klinischen Parametern

Es sind die Signifikanzen beim Vergleich der Parameter-Untergruppen dargestellt sowie deren OD-Mittelwerte und Standardabweichungen.

Parameter	Einteilung ^{a)}	N	Mittelwert/SD	p -Wert
Gruppe	Spender	100	1,894 / 0,666	0,000 *
	MM-Patient	190	1,026 / 0,973	
Geschlecht	männlich	115	1,202 / 0,831	0,522
	weiblich	75	1,133 / 0,897	
Alter	≤ 60 Jahre	122	1,253 / 0,837	0,041 *
	> 60 Jahre	67	1,023 / 0,880	
Hämoglobin	zu niedrig	157	1,181 / 0,821	0,352
	normal	30	1,087 / 1,040	
Albumin	< 35 g/l	27	0,699 / 0,649	0,002 *
	≥ 35 g/l	158	1,247 / 0,870	
LDH	≤ 225 U/l	137	1,156 / 0,861	0,887
	> 225 U/l	49	1,194 / 0,866	
Kalzium	≤ 2,63 mmol/l	182	1,145 / 0,854	0,045 *
	> 2,63 mmol/l	2	2,470 / 0,042	
Kreatinin	≤ 1,3 mg/dl	146	1,123 / 0,871	0,122
	> 1,3 mg/dl	37	1,355 / 0,821	
IgG beim IgG-Myelom	≤ 16 g/l	44	1,248 / 0,843	0,045 *
	> 16 g/l	41	0,874 / 0,706	
IgG beim IgA-Myelom	≤ 16 g/l	39	1,103 / 0,667	0,490
	> 16 g/l	4	0,870 / 1,010	
IgA beim IgA-Myelom	≤ 4 g/l	17	1,151 / 0,571	0,637
	> 4 g/l	26	1,034 / 0,769	
Kappa-Leichtketten	≤ 3,7 g/l	14	1,557 / 1,128	---
	> 3,7 g/l	0	---	
Lambda-Leichtketten	≤ 2 g/l	12	1,007 / 0,824	0,109
	> 2 g/l	1	0,030 / ---	
Deletion 13q14	vorhanden	46	1,014 / 0,782	0,165
	nicht vorhanden	117	1,218 / 0,862	
Deletion 17p13	vorhanden	13	1,350 / 0,773	0,675
	nicht vorhanden	150	1,142 / 0,848	
Translokation t (4;14)	vorhanden	9	0,793 / 0,829	0,125
	nicht vorhanden	153	1,178 / 0,840	
β2-Mikroglobulin	≤ 3 mg/l	60	1,200 / 0,817	0,149
	> 3 mg/l	32	0,942 / 0,691	
GvHD	vorhanden	42	0,965 / 0,660	0,284
	nicht vorhanden	21	1,172 / 0,745	
Plasmazellanteil im Knochenmark	≤ 10 %	68	1,241 / 0,789	0,137
	> 10 %	37	1,006 / 0,759	

^{a)} Die Einteilung der nicht nominalen Laborparameter erfolgte anhand der jeweiligen Grenzwerte, die spezifisch für das MM über- bzw. unterschritten werden.

* auf dem Niveau von 0,05 statistisch signifikant

Desweiteren wurde die Korrelation der OD-Werte von NP- und TT-AK mit dem Alter der Patienten und ihren Laborwerten untersucht. Hierbei zeigte sich in der Korrelationsanalyse nach Pearson für die Antikörper gegen NP ein signifikanter Zusammenhang mit Kalzium ($p = 0,049$; $r = 0,145$) sowie mit IgG beim IgG-Myelom ($p = 0,039$; $r = -0,225$). Für die Antikörper gegen TT konnte eine signifikante Assoziation zum Alter ($p = 0,008$; $r = -0,193$), zur Albumin- ($p = 0,002$; $r = 0,225$) und zur Kalziumkonzentration ($p = 0,028$; $r = 0,162$) gefunden werden. In den Abbildungen 12 – 16 sind die genannten Korrelationen dargestellt.

Kalziumkonzentration in mmol/l

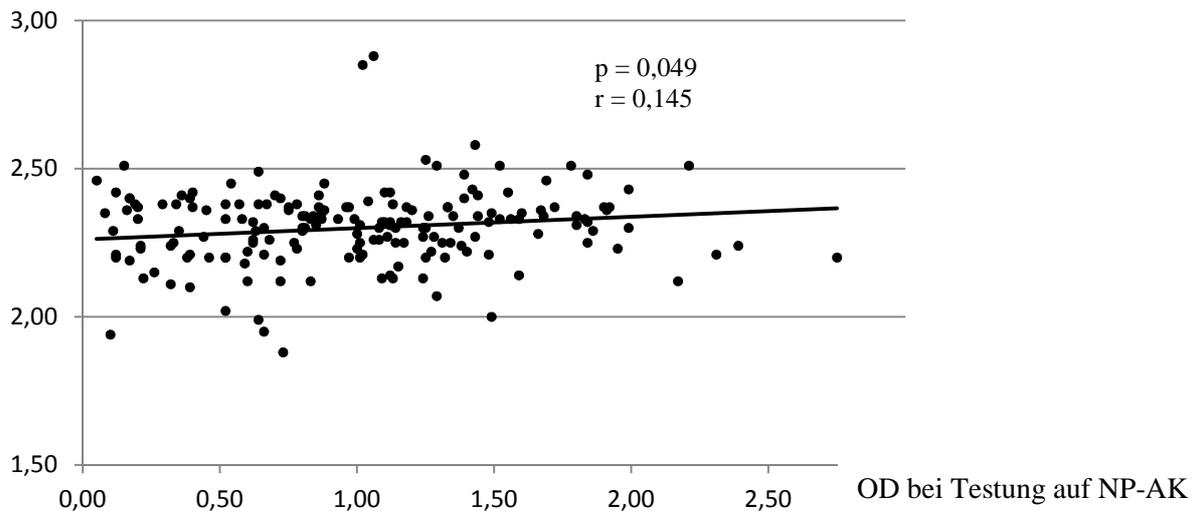


Abb. 12: Positive Korrelation zwischen der OD bei Testung auf NP-AK und der Kalziumkonzentration

IgG-Konzentration in g/l

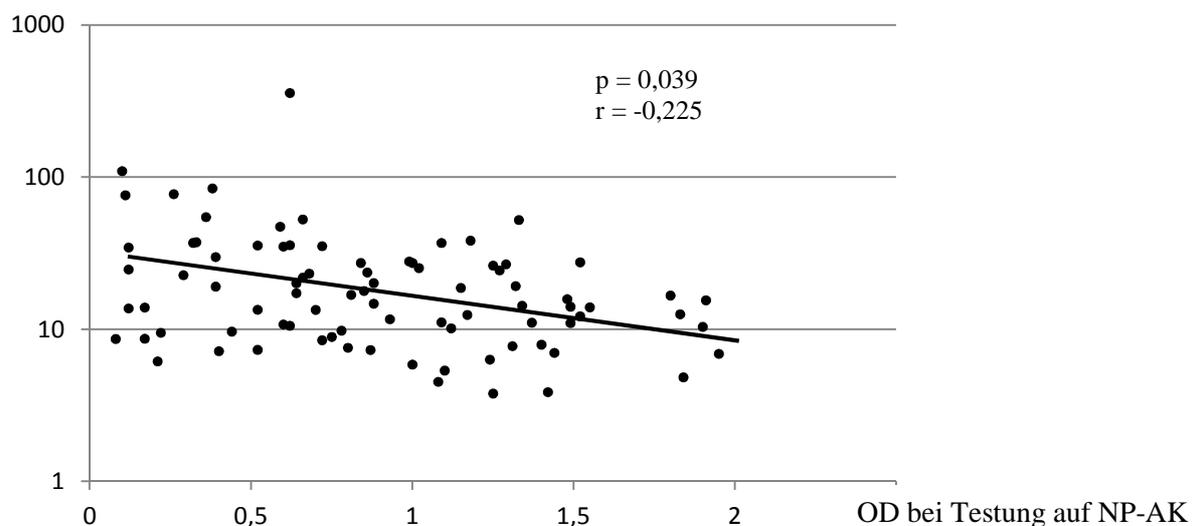


Abb. 13: Negative Korrelation zwischen der OD bei Testung auf NP-AK und der IgG-Konzentration

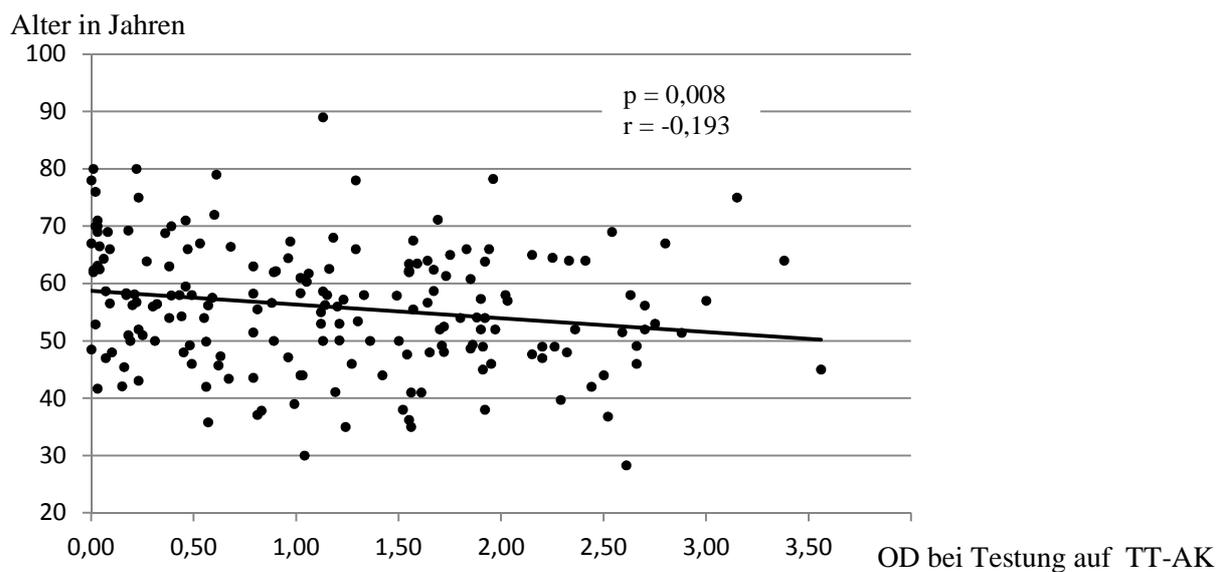


Abb. 14: Negative Korrelation zwischen der OD bei Testung auf TT-AK und dem Alter

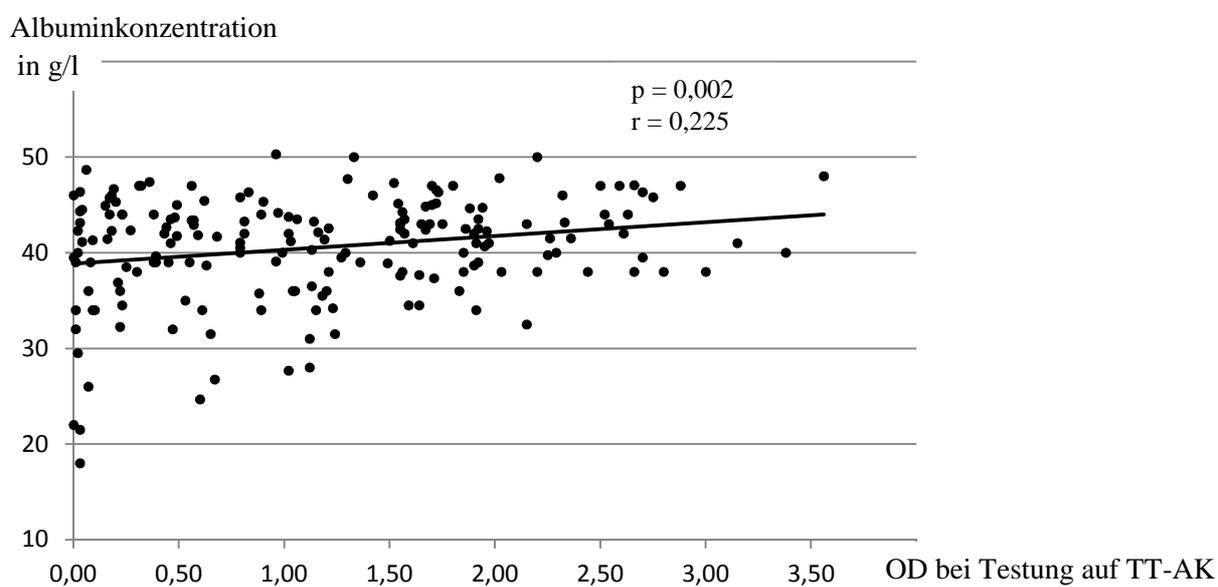


Abb. 15: Positive Korrelation zwischen der OD bei Testung auf TT-AK und der Albuminkonzentration

Kalziumkonzentration in mmol/l

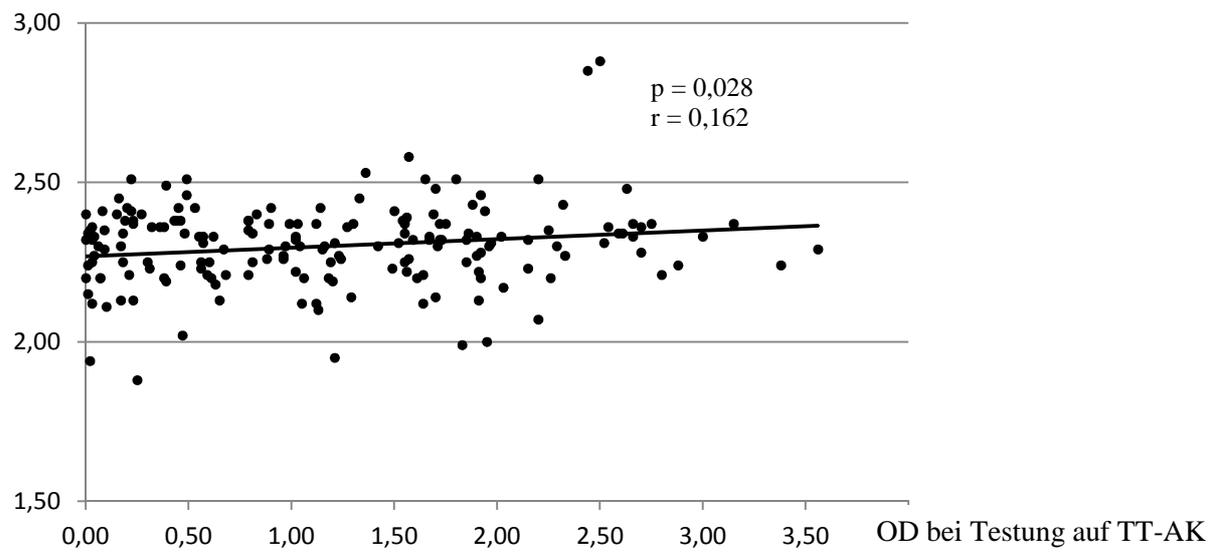


Abb. 16: Positive Korrelation zwischen der OD bei Testung auf TT-AK und der Kalziumkonzentration

Zu den übrigen getesteten Parametern ließ sich weder für die Antikörper gegen NP noch gegen TT ein signifikanter Zusammenhang finden. Eine Übersicht der jeweiligen Signifikanzen und Korrelationskoeffizienten findet sich in den Tabellen 7 und 8.

Tab. 7: Korrelation der OD bei Testung auf NP-AK mit klinischen Parametern

Parameter	OD (NP-AK)	
	p - Wert	r
Alter	0,732	0,025
Hämoglobin	0,523	-0,047
Albumin	0,208	0,093
LDH	0,755	-0,023
Kalzium	0,049 *	0,145
Kreatinin	0,597	-0,039
IgG beim IgG-Myelom	0,039 *	-0,225
IgG beim IgA-Myelom	0,343	-0,148
IgA beim IgA-Myelom	0,087	0,264
Kappa-Leichtketten	0,333	0,280
Lambda-Leichtketten	0,090	-0,489
β2-Mikroglobulin	0,089	-0,178
Plasmazellanteil im Knochenmark	0,710	0,037

p-Wert = statistische Signifikanz

r = Korrelationskoeffizient nach Pearson

Tab. 8: Korrelation der OD bei Testung auf TT-AK mit klinischen Parametern

Parameter	OD (TT-AK)	
	p – Wert	r
Alter	0,008 *	-0,193
Hämoglobin	0,642	-0,034
Albumin	0,002 *	0,225
LDH	0,566	0,042
Kalzium	0,028 *	0,162
Kreatinin	0,441	-0,057
IgG beim IgG-Myelom	0,801	-0,028
IgG beim IgA-Myelom	0,314	-0,157
IgA beim IgA-Myelom	0,250	-0,179
Kappa-Leichtketten	0,896	0,039
Lambda-Leichtketten	0,129	-0,444
β2-Mikroglobulin	0,270	-0,116
Plasmazellanteil im Knochenmark	0,259	0,111

p-Wert = statistische Signifikanz

r = Korrelationskoeffizient nach Pearson

4 Diskussion

Das Multiple Myelom ist eine Erkrankung, bei der neben einer Neutropenie insbesondere die humorale Schwäche des Immunsystems zu einer erhöhten Infektanfälligkeit führt (Kalambokis et al. 2009). Zudem ist die therapieassoziierte Mortalität bei allogener SZT zu einem beträchtlichen Anteil durch Infektionen bedingt, wenngleich diese in den vergangenen Jahren durch dosisreduzierte Konditionierung, den Einsatz neuer antimikrobieller Therapeutika und die verbesserte Prävention nosokomialer Infektionen deutlich reduziert werden konnten (Kortüm et al. 2011). Da eine effektive Antikörperproduktion somit entscheidend für den Krankheitsverlauf ist, jedoch bisher wenige Untersuchungen zum Vorkommen von Antikörperantworten gegen mikrobielle Erreger vorliegen, fand im Rahmen dieser Arbeit eine Analyse von Tetanus Toxoid- und Influenza Nukleoprotein-spezifischen Antikörpern bei MM-Patienten statt. Diese fallen vakzininduziert bzw. erworben in der gesunden erwachsenen Bevölkerung zu einem hohen Prozentsatz positiv aus und eignen sich aus diesem Grund zum Vergleich der Patientenseren mit der Gruppe der Blutspender sowie zur Beurteilung etwaiger Änderungen der Immunantwort im Verlauf der Erkrankung. Da erst vor wenigen Monaten festgestellt werden konnte, dass bei bestimmten Tumorantigenen die gezielte Aktivierung einer gegen den Tumor gerichteten Antikörper-vermittelten Immunantwort besonders häufig nach allogener SZT stattfindet (Kobold u.a. 2010), ist der Fokus in dieser Arbeit ebenfalls auf die Beeinflussung der Immunreaktion gegen NP und TT durch eine allogene SZT gerichtet

4.1 Patientenkollektiv

Da die vorliegende Studie retrospektiv angelegt worden ist, wurden zunächst die Eigenschaften dieses somit nicht selektionierten Patientenguts untersucht, um zu überprüfen, ob es sich um ein repräsentatives Kollektiv handelt. Die vorhandene Prädominanz des männlichen Geschlechts (61 %) sowie der Isotypen IgG (45 %) und IgA (23 %) ist auch in der Literatur beschrieben (Alexander et al. 2007). Ebenso befand sich die Mehrzahl der von mir untersuchten Patienten bei Erstdiagnose bereits in einem fortgeschrittenen und somit therapiebedürftigen Stadium (16 % Stadium I versus 27 % Stadium II und 50 % Stadium III). Konsekutiv und auch infolge eines eher niedrig einzustufenden Altersdurchschnitts von 55 Jahren wurde bei den meisten Erkrankten das Auto-Allo-Konzept angewandt.

Zusammenfassend liegt daher ein repräsentatives Kollektiv vor, womit eine der Grundvoraussetzungen valider Datenerhebung erfüllt wird.

4.2 Einfluss von Stammzelltransplantation und Chemotherapie auf die Immunantwort

Die Therapie des Multiplen Myeloms hat in den vergangenen Jahrzehnten eine starke Wandlung erfahren, die mit einer Verlängerung des Gesamtüberlebens und einer Verbesserung der Lebensqualität einherging. War bis in die 90er Jahre die von *Alexanian* eingeführte konventionelle Chemotherapie die im Wesentlichen einzige Therapieoption, konnten mit der Entwicklung der Hochdosischemotherapie mit nachfolgender autologer Blutstammzelltransplantation sowie mit dem Einsatz neuer Medikamente wie Thalidomid, Lenalidomid und Bortezomib die Behandlungsmöglichkeiten des Multiplen Myeloms deutlich verbessert werden. Kontrovers diskutiert wird hingegen weiterhin der Stellenwert der allogenen Blutstammzelltransplantation, da dieser wahrscheinlich einzige potentiell kurative Therapieansatz auch heute noch eine hohe therapieassoziierte Morbidität und Mortalität beinhaltet (Katzel et al. 2007).

Während nur ein sehr geringer Anteil der von mir untersuchten Patienten (4 %) ausschließlich chemotherapeutisch behandelt worden ist, erhielt die Mehrzahl im Verlauf ihrer Krankheit eine zusätzliche Stammzelltransplantation. Mit der peripheren Stammzellapherese wurde die inzwischen bevorzugte Methode zur Stammzellgewinnung angewandt, da sie gegenüber der konventionellen Knochenmarkentnahme eine klinisch schnellere hämatopoetische Rekonstitution verspricht (Ottinger et al. 1996).

Wie sich bei meinen Untersuchungen herausstellte, fand durch die allogene SZT eine Beeinflussung der Immunantwort auf NP und TT statt. Hier stieg der OD-Wert in den ersten Monaten nach der Behandlung signifikant an und zeigte im weiteren Verlauf wiederum eine Abnahme. Bei der autologen Stammzelltransplantation sowie bei den chemotherapeutisch behandelten Patienten ließen sich bei mitunter geringeren Fallzahlen hingegen keine Änderungen der Antikörperantworten feststellen.

Umso interessanter sind diese Ergebnisse vor dem Hintergrund, dass Patienten nach allogener SZT Immunsuppressiva erhalten, um eine durch das Spendertransplantat ausgelöste GvHD besser kontrollieren zu können.

In der Literatur liegen insgesamt unterschiedliche Ergebnisse über das Persistieren der Immunität gegenüber Tetanus nach allogener und autologer SZT vor.

Bereits 1986 zeigten *Lum et al.*, dass die spezifische humorale Immunität gegen Tetanus vom Spender auf den Empfänger übertragen werden kann (Lum et al. 1986), wodurch die grundsätzliche Notwendigkeit einer Revakzinierung gegen Tetanus nach SZT in Frage gestellt wurde. Jedoch sprachen sich *Ljungman et al.* für ein Impfschema mit dreimaliger Verabreichung des Tetanus Toxoids aus, da in ihrer Studie bei etwa der Hälfte der vor Transplantation seropositiven Patienten der Impfschutz ein Jahr nach allogener SZT nicht mehr sicher vorhanden war. Zudem stellten sie fest, dass die posttransplantäre Immunantwort der Patienten zwar von deren Immunstatus vor der SZT abhing, nicht jedoch durch die Antikörperkonzentration der Spender beeinflusst worden war (Ljungman et al. 1990).

Übereinstimmungen zu den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen fanden sich in der Publikation von *Storek et al.* 2004. Hier konnte ebenfalls ein Anstieg der Serumkonzentration von Tetanus Toxoid-spezifischen Antikörpern nach allogener Stammzelltransplantation nachgewiesen werden (Storek et al. 2004). Ihre Untersuchungen zeigten die stärkste posttransplantäre Immunantwort in der Gruppe, in der sowohl die Patienten als auch die Spender vor der Transplantation gegen Tetanus geimpft worden waren. Schwächer, aber immer noch ansteigend war die Immunantwort bei den geimpften Empfängern und ungeimpften Spendern, während die Antikörperkonzentration nur in der Gruppe der prätransplantär ungeimpften Spender und Empfänger nach der SZT kontinuierlich abfiel.

Hammarström et al. untersuchten die Immunität gegenüber Tetanus bei Patienten mit Erhalt einer autologen Knochenmark- bzw. peripheren Stammzelltransplantation. Bei beiden Methoden konnten sie ein Jahr nach der Transplantation eine abnehmende Zahl an seropositiven Patienten feststellen (Hammarström et al. 1998). Dies ist mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie vereinbar, da auch hier bei etwa der Hälfte der Patienten eine Abschwächung der Immunantwort nach der autologen SZT zu verzeichnen war.

Aufgrund dieser vorliegenden Daten spricht die *European Group for Blood and Marrow Transplantation* (EBMT) sich für eine Impfung gegen Tetanus bei Empfängern einer allogenen oder autologen Stammzelltransplantation aus. Durch Verabreichung einer dreimaligen Dosis 6 – 12 Monate nach Transplantation sowie durch eine vorherige Impfung des Spenders soll die Ansprechrate bei den Patienten verbessert werden (Ljungman et al. 2005).

Bezüglich Influenza ließen sich in der Literatur keine Studien finden, die sich mit dem direkten Einfluss einer SZT auf die Antikörperlevel auseinandersetzen und somit zum Vergleich mit der vorliegenden Arbeit herangezogen werden konnten. Es sind jedoch viele Untersuchungen zur Wirksamkeit einer posttransplantären Impfung beschrieben, da Infektionen insbesondere bei immunsupprimierten Menschen eine hohe Rate an Komplikationen aufweisen und die mit ihnen assoziierte Mortalität nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation etwa 15 % beträgt (Ljungman et al. 2001). Es konnte im Vergleich zur gesunden Bevölkerung ein schlechteres Impfansprechen mit einer niedrigeren Rate an seroprotektiven Titern bei Patienten nach Erhalt einer SZT gezeigt werden (Ljungman und Avetisyan 2008). Außerdem wurde festgestellt, dass der Zeitpunkt der Vakzinierung Einfluss auf die Antikörperantwort hat. Ein höherer Prozentsatz der Patienten wies eine Serokonversion auf, wenn das Intervall zwischen Stammzelltransplantation und Impfung > 6 Monate betrug (Issa et al. 2011). Empfehlungen der EBMT sehen daher ähnlich wie bei Tetanus auch bei Influenza die Einhaltung eines Intervalls von 4 – 6 Monaten nach Transplantation vor, bevor die erste der jährlich angeratenen Impfungen stattfinden soll (Ljungman et al. 2005).

Insgesamt zeigten die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen, dass in den ersten Monaten nach allogener Stammzelltransplantation die Antikörperantworten gegen NP und TT trotz Immunsuppression signifikant angestiegen sind, während durch die autologe SZT keine Beeinflussung stattfand.

Da bei beiden Transplantationsformen zuvor dieselben zytoreduktiven Therapeutika eingesetzt worden sind und somit ein einheitliches Behandlungsschema angewandt wurde, scheint dieses Ergebnis in der Herkunft der transplantierten Zellen begründet zu sein. Welche genauen Mechanismen zu dem Anstieg geführt haben, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht abschließend beurteilt werden. Vorstellbar wäre zum einen, dass die transplantierten Zellen des gesunden Spenders für die zunehmende Antikörperproduktion verantwortlich sind. Aber auch eine unspezifische Aktivierung von im Empfänger verbliebenen Immunzellen durch das fremde Gewebe erscheint möglich.

Dass trotz der Antikörperzunahme klinisch jedoch noch kein ausreichend protektives Level erreicht wird, zeigt sich an den häufig auftretenden schweren Infektionen nach allogener SZT. Diese sind außerdem durch eine deutlich reduzierte zelluläre Immunität in den ersten Monaten nach Transplantation bedingt, so dass die Notwendigkeit der empfohlenen Revakzinierung nicht in Frage gestellt werden sollte.

Abschließend ist festzuhalten, dass sich an einer Zunahme der Immunantwort das kurative Potential der allogenen Stammzelltransplantation erkennen lässt und es wäre wünschenswert, wenn zukünftige Studien die zugrunde liegenden Mechanismen für die in dieser Arbeit festgestellten Ergebnisse als Forschungsgegenstand behandeln. Dies könnte Möglichkeiten eröffnen, aktiv in den Prozess der Antikörperproduktion nach SZT einzugreifen und auf diese Weise die therapieassoziierte Mortalität weiter zu reduzieren.

Ebenso wären Untersuchungen zur Entwicklung der Immunantwort auf weitere für MM-Patienten relevante Krankheitserreger sehr interessant.

4.3 Zusammenhang von Immunantwort und klinischen Parametern

Für das Multiple Myelom ist bereits eine Vielzahl an prognostisch relevanten Faktoren bekannt. Neben dem Alter zählen hierzu laborchemische Parameter wie Hb, Albumin, LDH, Kalzium, Kreatinin, B2-Mikroglobulin und die Höhe des monoklonalen Proteins. Desweiteren sind das Vorhandensein zytogenetischer Aberrationen sowie das Eintreten einer GvHD von Bedeutung (siehe 1.1.6). Um zu beurteilen, inwieweit für die Immunantwort auf NP und TT ebenfalls eine prognostische Aussagefähigkeit beim Multiplen Myelom besteht, wurden die ermittelten OD-Werte auf einen Zusammenhang mit diesen Parametern überprüft.

Da die Anzahl der entnommenen Blutproben interindividuell unterschiedlich war, wurde die statistische Auswertung mit der von *Bland* und *Altman* empfohlenen Vorgehensweise für Analysen bei heterogenen Datensätzen durchgeführt. Danach werden zwei Parameter innerhalb eines Kollektivs mit den jeweiligen Mittelwerten der einzelnen Patienten auf einen möglichen Zusammenhang untersucht (Bland und Altman 1995).

Insgesamt ergaben der Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich der Parameter-Untergruppen bezüglich ihrer OD-Werte sowie die Korrelationsanalyse nach Pearson unterschiedliche signifikante Ergebnisse für NP und TT. Ersterer zeigte allerdings folgende Übereinstimmungen bezüglich der beiden Antikörperantworten: Beim Vergleich der Myelompatienten mit der gesunden Kontrollgruppe konnte eine signifikant schwächere Immunantwort bei dem erkrankten Kollektiv festgestellt werden, wodurch sich dessen humorales Immundefizit bestätigen ließ. Außerdem ergaben sich signifikante Ergebnisse hinsichtlich der IgG-Konzentration bei Patienten mit IgG-Myelom. Interessant hierbei ist, dass die schwächere Antwort auf NP und TT in der Gruppe mit der pathologisch erhöhten

IgG-Konzentration zu beobachten war. Dieses Ergebnis lässt sich darauf zurückführen, dass bei Krankheitsprogression mit steigender Tumorzellmasse zwar vermehrt das monoklonale Protein gebildet wird, infolge der Verdrängung der normalen Hämatopoese jedoch klinisch ein Antikörpermangelsyndrom besteht. Dass bei den Patienten mit IgA-Myelom dagegen kein signifikanter Unterschied zwischen den IgG-Untergruppen bestand, unterstützt diese These zusätzlich.

Für Tetanus Toxoid konnte desweiteren eine signifikante Abnahme der OD-Werte mit zunehmendem Alter festgestellt werden, was mit einer insgesamt reduzierten humoralen Immunantwort bei älteren Menschen zu vereinbaren ist (Weiskopf et al. 2009). Sowohl diese Beziehung als auch der ermittelte positive Zusammenhang zwischen TT-AK und der Albuminkonzentration konnten jedoch für Antikörper gegen NP nicht bestätigt werden.

Die signifikant positive Korrelation in der Analyse nach Pearson, die sich bei beiden Antikörpern in Bezug auf die Kalziumkonzentration feststellen ließ, erscheint zunächst widersprüchlich, da erhöhte Kalziumwerte auf ein fortgeschrittenes Stadium hinweisen, bei der eine zunehmende Schwächung des Immunsystems zu erwarten wäre. Jedoch lagen die Kalziumkonzentrationen bei 182 der 184 untersuchten Patienten im Normbereich. Folglich steht eine höhere, aber noch normwertige Kalziumkonzentration nicht unmittelbar mit einer Krankheitsprogression in Verbindung.

Besonderes Interesse galt der Frage, ob bei Patienten mit bzw. ohne GvHD die Antikörperantworten signifikant differieren, da diese Krankheit durch eine zu starke Immunantwort der transplantierten Zellen gegen das Gewebe des Empfängers ausgelöst und mit Immunsuppressiva behandelt wird. *Parkkali et al* konnten bei ihren Untersuchungen keine Beeinflussung der Tetanus-Antikörperkonzentration durch eine GvHD feststellen (Parkkali et al. 2007) und auch in der vorliegenden Arbeit war für diesen getesteten Parameter kein signifikantes Resultat zu verzeichnen.

Zusammenfassend wurden für die Antikörperantworten auf NP und TT Zusammenhänge zu bereits bekannten prognostisch relevanten Faktoren des Multiplen Myeloms aufgezeigt. Für einige Parameter ließen sich die beschriebenen signifikanten Ergebnisse feststellen, welche in Bezug auf die beiden untersuchten Antikörper nicht alle einheitlich waren. Ausgehend von diesen Resultaten scheint die Bestimmung von Antikörpern somit bedingt zur Einschätzung der Prognose von an MM erkrankten Patienten geeignet zu sein. Für eine abschließende Beurteilung der prognostischen Aussagefähigkeit der Antikörperlevel sind weitere Arbeiten zu diesem Thema notwendig.

4.4 Kritikpunkte

Kritische Aspekte der vorliegenden Studie ergeben sich zum einen aus ihrem retrospektiven Charakter. Dadurch, dass die zur Durchführung der Versuche verwendeten Seren primär nicht zum Anfertigen dieser Arbeit entnommen wurden, waren sie interindividuell in Bezug auf Anzahl und Zeitpunkte vor und nach erfolgter Therapie sehr heterogen. Es stellte sich im Verlauf der Studie heraus, dass infolge dieser Heterogenität innerhalb des Patientenkollektivs viele der untersuchten Proben bei bestimmten Fragestellungen keine Berücksichtigung finden konnten. Zudem konnten bei einigen Patienten die klinischen Daten nicht vollständig erhoben werden, was zwar mitunter zu verminderten, aber aufgrund des insgesamt großen Kollektivs zu ausreichenden Gruppengrößen bei der statistischen Auswertung führte. Desweiteren waren die Zeitpunkte eventuell stattgefundenener Impfungen gegen Tetanus Toxoid und Influenza nicht bekannt, so dass diese Einflussgröße in der Studie keine Berücksichtigung finden konnte.

Ein die Methodik betreffender Kritikpunkt ist durch die Größe des Patientenkollektivs bedingt. Da mit mehr als 1000 Blutproben von insgesamt 190 Erkrankten ein im Vergleich zu anderen Studien sehr großer Datensatz vorlag, erfolgte dessen Analyse mit der Bestimmung von OD-Werten nur semiquantitativ. Eine genauere Beurteilung der Immunität durch Titerbestimmung wäre daher bei kleineren Stichproben empfehlenswert.

5 Zusammenfassung

Das Multiple Myelom ist eine Erkrankung, bei der insbesondere eine Schwäche des humoralen Immunsystems zu einer erhöhten Infektanfälligkeit bei den Betroffenen führt. Zudem ist die therapieassoziierte Mortalität nach allogener Stammzelltransplantation auch heute noch häufig durch Infektionen bedingt. In der vorliegenden Arbeit wurden daher mithilfe des enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA) die Antikörperantworten auf Tetanus Toxoid (TT) und Influenza Nukleoprotein (NP) bei Patienten mit Multiplem Myelom erfasst und auf ihre Entwicklung im Rahmen der Krankheitsprogression analysiert. Hierzu wurden Blutproben von 190 Patienten über den Verlauf der Erkrankung und über die verschiedenen Phasen der Therapie hinweg untersucht, wobei als Kontrolle das Blut von 100 gesunden Spendern diente.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen erbrachten zum einen eine eindeutig verminderte Immunantwort in der Gruppe der Patienten mit Multiplem Myelom im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, wodurch sich das humorale Immundefizit der Erkrankten bestätigen ließ.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch die allogene Stammzelltransplantation eine Beeinflussung der Immunantwort auf NP und TT stattfand. Hier stiegen die Antikörper in den ersten sechs Monaten nach der Behandlung zunächst signifikant an und zeigten im weiteren Verlauf dann wiederum eine Abnahme. Bei der autologen Stammzelltransplantation sowie bei den mit alleiniger Chemotherapie behandelten Patienten ließen sich hingegen keine Änderungen der Antikörperantworten feststellen. Da bei beiden Transplantationsformen zuvor dieselben zytoreduktiven Therapeutika eingesetzt worden sind und somit ein einheitliches Behandlungsschema angewandt wurde, scheint dieses Ergebnis in der Herkunft der transplantierten Zellen begründet zu sein. Ob jedoch die transplantierten Zellen des gesunden Spenders ausschließlich selber für die Antikörperproduktion verantwortlich sind oder ob eventuell noch im Empfänger verbliebene Immunzellen durch das fremde Gewebe unspezifisch aktiviert werden, ist bisher nicht bekannt. Eine tiefere Erforschung der hier stattfindenden Mechanismen könnte Möglichkeiten eröffnen, aktiv in die entsprechenden Prozesse einzugreifen und auf diese Weise die therapieassoziierte Mortalität weiter zu reduzieren.

Die durchgeführte Analyse der Immunantworten auf einen möglichen Zusammenhang mit bereits bekannten, prognostisch relevanten klinischen Parametern erbrachte mehrere signifikante Resultate. Insbesondere bei Patienten mit pathologisch erhöhtem IgG-Paraprotein wurde ein Abfall der Antikörperantworten nachgewiesen. Für eine abschließende Beurteilung der prognostischen Aussagefähigkeit der Antikörperlevel sind weitere Arbeiten zu diesem Thema notwendig.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
BCL-1	B-Cell-Lymphoma
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bzw.	beziehungsweise
Ca	Kalzium
ca.	zirka
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D-PBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DSMM	Deutsche Studiengruppe Multiples Myelom
EBMT	European Group for Blood and Marrow Transplantation
ED	Erstdiagnose
EIA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FDG-PET	Fluor-18-Deoxyglukose-Positronenemissionstomographie
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
g	Gramm
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
ggf.	gegebenenfalls
GST	Glutathion-S-Transferase
GvHD	Graft-versus-Host-Disease

GvM	Graft-versus-Myeloma
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HDT	Hochdosistherapie
Ig	Immunglobulin
Il-1 β	Interleukin 1-beta
Il-6	Interleukin 6
ISS	International Staging System
i. S.	im Serum
KM	Knochenmark
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
Lf	Limes flocculationis, spezifische Aktivität des Tetanus Toxoids
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGUS	Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz
μ l	Mikroliter
MM	Multiple Myelom
MP	Melphalan/Prednison
MPT	Melphalan/Prednison/Thalidomid
MPV	Melphalan/Prednison/Velcade
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NP	(Influenza) Nukleoprotein

OD	optische Dichte = Extinktion
OSHO	Ostdeutsche Studiengruppe Hämatologie und Onkologie
PBS-T	phosphate-buffered saline-Tween (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PLI	Plasmazell-Labeling-Index
PNPP	Para-Nitrophenylphosphat
pPCL	primäre Plasmazellenleukämie
ras	rat sarcoma
SD	Standardabweichung
SMM	Smoldering multiple Myeloma (indolentes Myelom)
sog.	sogenannt
sPCL	sekundäre Plasmazellenleukämie
SZT	Stammzelltransplantation
t	Translokation
Tab.	Tabelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TT	Tetanus Toxoid
U	Einheit
VAD	Vincristin/Adriamycin/Dexamethason
VGPR	very good partial remission (sehr gute Partialremission)
z.B.	zum Beispiel

7 Literaturverzeichnis

Alexander DD, Mink PJ, Adami HO, Cole P, Mandel JS, Oken MM, Trichopoulos D (2007) Multiple myeloma: a review of the epidemiologic literature. *International Journal of Cancer*, 120 Suppl 12: 40-61.

Alexanian R, Dimopoulos M (1994) The treatment of multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine*, 330(7): 484-489.

Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, Casassus P, Maisonneuve H, Facon T, Ifrah N, Payen C, Bataille R (1996) A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Français du Myélome. *The New England Journal of Medicine*, 335(2): 91-97.

Billadeau D, Jelinek DF, Shah N, LeBien TW, Van Ness B (1995) Introduction of an activated N-ras oncogene alters the growth characteristics of the interleukin 6-dependent myeloma cell line ANBL6. *Cancer Research*, 55(16): 3640-3646.

Björkstrand BB, Ljungman P, Svensson H, Hermans J, Alegre A, Apperley J, Bladé J, Carlson K, Cavo M, Ferrant A, Goldstone AH, de Laurenti A, Majolino I, Marcus R, Prentice HG, Remes K, Samson D, Sureda A, Verdonck LF, Volin L, Gahrton G (1996) 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*, 88(12): 4711-4718.

Bladé J, Muñoz M, Fontanillas M, San Miguel J, Alcalá A, Maldonado J, Besses C, Moro MJ, Garcia-Conde J, Rozman C, Montserrat E, Estapé J (1996) Treatment of multiple myeloma in elderly people: long-term results in 178 patients. *Age and Ageing*, 25(5): 357-361.

Bladé J, Rosiñol L, Cibeira MT (2008) Prognostic factors for multiple myeloma in the era of novel agents. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 19 Suppl 7: vii117-120.

Bland JM, Altman DG (1995) Statistics notes: Calculating correlation coefficients with repeated observations: Part 1—correlation within subjects. *BMJ*, 310(6977): 446.

Bruno B, Rotta M, Patriarca F, Mordini N, Allione B, Carnevale-Schianca F, Giaccone L, Sorasio R, Omedè P, Baldi I, Bringhen S, Massaia M, Aglietta M, Levis A, Gallamini A, Fanin R, Palumbo A, Storb R, Ciccone G, Boccadoro M (2007) A comparison of allografting with autografting for newly diagnosed myeloma. *The New England Journal of Medicine*, 356(11): 1110-1120.

Cavo M, Tosi P, Zamagni E, Cellini C, Tacchetti P, Patriarca F, Di Raimondo F, Volpe E, Ronconi S, Cangini D, Narni F, Carubelli A, Masini L, Catalano L, Fiacchini M, de Vivo A, Gozzetti A, Lazzaro A, Tura S, Baccarani M (2007) Prospective, randomized study of single compared with double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma: Bologna 96 clinical study. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(17): 2434-2441.

Corradini P, Ladetto M, Voena C, Palumbo A, Inghirami G, Knowles DM, Boccadoro M, Pileri A (1993) Mutational activation of N- and K-ras oncogenes in plasma cell dyscrasias. *Blood*, 81(10): 2708-2713.

Crawley C, Iacobelli S, Björkstrand B, Apperley JF, Niederwieser D, Gahrton G (2007) Reduced-intensity conditioning for myeloma: lower nonrelapse mortality but higher relapse rates compared with myeloablative conditioning. *Blood*, 109(8): 3588-3594.

Di Micco P, Di Micco B (2005) Up-date on solitary plasmacytoma and its main differences with multiple myeloma. *Experimental Oncology*, 27(1): 7-12.

Drach J, Angerler J, Schuster J, Rothermundt C, Thalhammer R, Haas OA, Jäger U, Fiegl M, Geissler K, Ludwig H, Huber H (1995) Interphase fluorescence in situ hybridization identifies chromosomal abnormalities in plasma cells from patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*, 86(10): 3915-3921.

Drach J, Schuster J, Nowotny H, Angerler J, Rosenthal F, Fiegl M, Rothermundt C, Gsur A, Jäger U, Heinz R (1995) Multiple myeloma: high incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Research*, 55(17): 3854-3859.

Drayson M, Tang LX, Drew R, Mead GP, Carr-Smith H, Bradwell AR (2001) Serum free light-chain measurements for identifying and monitoring patients with nonsecretory multiple myeloma. *Blood*, 97(9): 2900-2902.

Durie BGM (2006) The role of anatomic and functional staging in myeloma: description of Durie/Salmon plus staging system. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 42(11): 1539-1543.

Einsele H (2004) Wichtige Fragen zur Krankheit Multiples Myelom. Myelom- und Lymphomhilfe Österreich. Würzburg
[Online im Internet.] URL:
<http://www.myelom.at/de/krankheit/plasmozytom/epidemiologie.htm>
[Stand: 29.03.2011, 19:30].

Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, Bastard C, Bergsagel PL, Chesi M, Davies FE, Drach J, Greipp PR, Kirsch IR, Kuehl WM, Hernandez JM, Minvielle S, Pilarski LM, Shaughnessy JD, Stewart AK, Avet-Loiseau H (2004) Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Research*, 64(4): 1546-1558.

Fonseca R, Blood E, Rue M, Harrington D, Oken MM, Kyle RA, Dewald GW, Van Ness B, Van Wier SA, Henderson KJ, Bailey RJ, Greipp PR (2003) Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood*, 101(11): 4569-4575.

Garban F, Attal M, Michallet M, Hulin C, Bourhis JH, Yakoub-Agha I, Lamy T, Marit G, Maloisel F, Berthou C, Dib M, Caillot D, Deprijck B, Ketterer N, Harousseau JL, Sotto JJ, Moreau P (2006) Prospective comparison of autologous stem cell transplantation followed by dose-reduced allograft (IFM99-03 trial) with tandem autologous stem cell transplantation (IFM99-04 trial) in high-risk de novo multiple myeloma. *Blood*, 107(9): 3474-3480.

Gassel WD (2002) Klinik. In: Manual Multiples Myelom. R. Bartl, H. Dietzfelbinger (Hrg.) W. Zuckschwerdt Verlag, München, 28-34.

Goldschmidt H, Cremer FW, Möhler TM (2004) Multiples Myelom. *Der Onkologe*, 10(8).

Greipp PR, Lust JA, O'Fallon WM, Katzmann JA, Witzig TE, Kyle RA (1993) Plasma cell labeling index and beta 2-microglobulin predict survival independent of thymidine kinase and C-reactive protein in multiple myeloma. *Blood*, 81(12): 3382-3387.

Greipp PR, San Miguel J, Durie BGM, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin J (2005) International staging system for multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(15): 3412-3420.

Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC (1998) Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood*, 91(1): 3-21.

Hammarström V, Pauksen K, Björkstrand B, Simonsson B, Oberg G, Ljungman P (1998) Tetanus immunity in autologous bone marrow and blood stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplantation*, 22(1): 67-71.

Harousseau JL (2008) Induction therapy in multiple myeloma. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program*: 306-312.

Herold G (2011) *Innere Medizin. Auflage 2011, Köln*, 74-78.

Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC (2004) Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood*, 104(3): 607-618.

Hosten N, Liebig T (2007) *Computertomographie von Kopf und Wirbelsäule 2nd Aufl., Stuttgart: Georg Thieme Verlag*.

Ichimaru M, Mabuchi K (1991) Multiple myeloma among atomic bomb survivors. *Journal of Radiation Research*, 32 Suppl: 168-171.

Issa NC, Marty FM, Gagne LS, Koo S, Verrill KA, Alyea EP, Cutler CS, Koreth J, Armand P, Ho VT, Antin JH, Soiffer RJ, Baden LR (2011) Seroprotective titers against 2009 H1N1 influenza A virus after vaccination in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 17(3): 434-438.

Jimenez-Zepeda VH, Dominguez-Martinez VJ (2009) Plasma cell leukemia: a highly aggressive monoclonal gammopathy with a very poor prognosis. *International Journal of Hematology*, 89(3): 259-268.

Königsberg R, Zojer N, Ackermann J, Krömer E, Kittler H, Fritz E, Kaufmann H, Nösslinger T, Riedl L, Gisslinger H, Jäger U, Simonitsch I, Heinz R, Ludwig H, Huber H, Drach J (2000) Predictive role of interphase cytogenetics for survival of patients with multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 18(4): 804-812.

Kagan E, Jacobson RJ, Yeung KY, Haidak DJ, Nachnani GH (1979) Asbestos-associated neoplasms of B cell lineage. *The American Journal of Medicine*, 67(2): 325-330.

Kalambokis GN, Christou L, Tsianos EV (2009) Multiple myeloma presenting with an acute bacterial infection. *International Journal of Laboratory Hematology*, 31(4): 375-383.

Katzel JA, Hari P, Vesole DH (2007) Multiple myeloma: charging toward a bright future. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 57(5): 301-318.

Kemeny DM (1994) ELISA. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York.

Klinker E, Weißinger F (2004) Autologe Stammzelltransplantation. *Bayerisches Ärzteblatt* Nr. 2/2004, München, 118.

Kobold S, Luetkens T, Yanran C, Eberhardt C, Tams S, Bartels BM, Bartels K, Meyer S, Haag F, Bokemeyer C, Zander AR, Kröger N, Atanackovic D (2010) Strong antibody responses against a unique region of CT-Antigen SSX-2 are induced after allogeneic stem cell transplantation and correlate with clinical remission in patients with multiple myeloma. Poster Session: Myeloma – Biology and Pathophysiology, excluding Therapy: Poster I, 52nd ASH Annual Meeting and Exposition, Orange County Convention Center, Orlando, FL.

Kortüm M, Knop S, Einsele H (2011) Novel agents to improve outcome of allogeneic transplantation for patients with multiple myeloma. *Future Oncology (London, England)*, 7(1): 135-143.

Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Fonseca R, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak ME, Therneau TM, Greipp PR (2003) Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clinic Proceedings*. Mayo Clinic, 78(1): 21-33.

Kyle RA, Rajkumar SV (2007) Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smouldering multiple myeloma: emphasis on risk factors for progression. *British Journal of Haematology*, 139(5): 730-743.

Lauta VM (2001) Interleukin-6 and the network of several cytokines in multiple myeloma: an overview of clinical and experimental data. *Cytokine*, 16(3): 79-86.

Leung N, Rajkumar SV (2007) Renal manifestations of plasma cell disorders. *American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation*, 50(1): 155-165.

Linnet MS, Harlow, SD, McLaughlin JK (1987) A case-control study of multiple myeloma in whites: chronic antigenic stimulation, occupation, and drug use. *Cancer Research*, 47(11): 2978-2981.

Ljungman P, Avetisyan G (2008) Influenza vaccination in hematopoietic SCT recipients. *Bone Marrow Transplantation*, 42(10): 637-641.

Ljungman P, Engelhardt D, de la Camara R, Einsele H, Locasciulli A, Martino R, Ribaud P, Ward K, Cordonnier C (2005) Vaccination of stem cell transplant recipients: recommendations of the Infectious Diseases Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant*, 35(8): 737-746.

Ljungman P u. a., (2001) Respiratory virus infections after stem cell transplantation: a prospective study from the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 28(5): 479-484.

Ljungman P, Wiklund-Hammarsten M, Duraj V, Hammarström L, Lönnqvist B, Paulin T, Ringdén O, Pepe MS, Gahrton G (1990) Response to tetanus toxoid immunization after allogeneic bone marrow transplantation. *The Journal of Infectious Diseases*, 162(2): 496-500.

Lokhorst H, Einsele H, Vesole D, Bruno B, San Miguel J, Pérez-Simon JA, Kröger N, Moreau P, Gahrton G, Gasparetto C, Giralt S, Bensinger W (2010) International Myeloma Working Group consensus statement regarding the current status of allogeneic stem-cell transplantation for multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(29): 4521-4530.

Lum LG, Seigneuret MC, Storb R (1986) The transfer of antigen-specific humoral immunity from marrow donors to marrow recipients. *Journal of Clinical Immunology*, 6(5): 389-396.

Magrangeas F, Lode L, Wuilleme S, Minvielle S, Avet-Loiseau H (2004) Genetic heterogeneity in multiple myeloma. *Leukemia*, 19(2): 191-194.

Matzdorff A, Fritze D (2009) *Innere Medizin*. 2. Auflage , Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1244-1250.

Minnema MC, van der Spek E, Van de Donk NWCJ, Lokhorst HM (2010) New developments in the treatment of patients with multiple myeloma. *The Netherlands Journal of Medicine*, 68(1): 24-32.

Neri A, Baldini L, Trecca D, Cro L, Polli E, Maiolo AT (1993) p53 gene mutations in multiple myeloma are associated with advanced forms of malignancy. *Blood*, 81(1): 128-135.

Ottinger HD, Beelen DW, Scheulen B, Schaefer UW, Grosse-Wilde H (1996) Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. *Blood*, 88(7): 2775-2779.

Palumbo A, Anderson K (2011) Multiple myeloma. *The New England Journal of Medicine*, 364(11): 1046-1060.

Palumbo A, Sezer O, Kyle R, Miguel JS, Orlowski RZ, Moreau P, Niesvizky R, Morgan G, Comenzo R, Sonneveld P, Kumar S, Hajek R, Giralt S, Bringhen S, Anderson KC, Richardson PG, Cavo M, Davies F, Bladé J, Einsele H, Dimopoulos MA, Spencer A, Dispenzieri A, Reiman T, Shimizu K, Lee JH, Attal M, Boccadoro M, Mateos M, Chen W, Ludwig H, Joshua D, Chim J, Hungria V, Turesson I, Durie BGM, Lonial S (2009) International Myeloma Working Group guidelines for the management of multiple myeloma patients ineligible for standard high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation. *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 23(10): 1716-1730.

Parkkali T, Käyhty H, Hovi T, Olander RM, Roivainen M, Volin L, Ruutu T, Lahdenkari M, Ruutu P (2007) A randomized study on donor immunization with tetanus-diphtheria, *Haemophilus influenzae* type b and inactivated poliovirus vaccines to improve the recipient responses to the same vaccines after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 39(3): 179-188.

Pearce NE, Smith AH, Howard JK, Sheppard RA, Giles HJ, Teague CA (1986) Case-control study of multiple myeloma and farming. *British Journal of Cancer*, 54(3): 493-500.

Roux S, Mariette X (2004) The high rate of bone resorption in multiple myeloma is due to RANK (receptor activator of nuclear factor-kappaB) and RANK Ligand expression. *Leukemia & Lymphoma*, 45(6): 1111-1118.

Saltykow S (1903) Beitrag zur Kenntnis des Myeloms. *Virchows Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin*, 173(3): 531-538.

Shoenfeld Y, Berliner S, Shaklai M, Gallant LA, Pinkhas J (1982) Familial multiple myeloma. A review of thirty-seven families. *Postgraduate Medical Journal*, 58(675): 12-16.

Storek J, Dawson MA, Lim LCL, Burman BE, Stevens-Ayers T, Viganego F, Herremans MMPT, Flowers MED, Witherspoon RP, Maloney DG, Boeckh M (2004) Efficacy of donor vaccination before hematopoietic cell transplantation and recipient vaccination both before and early after transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, 33(3): 337-346.

Terpos E, Katodritou E, Roussou M, Pouli A, Michalis E, Delimpasi S, Parcharidou A, Kartasis Z, Zomas A, Symeonidis A, Viniou NA, Anagnostopoulos N, Economopoulos T, Zervas K, Dimopoulos MA (2010) High serum lactate dehydrogenase adds prognostic value to the international myeloma staging system even in the era of novel agents. *European Journal of Haematology*, 85(2): 114-119.

Tiedemann RE, Gonzalez-Paz N, Kyle RA, Santana-Davila R, Price-Troska T, Van Wier SA, Chng WJ, Ketterling RP, Gertz MA, Henderson K, Greipp PR, Dispenzieri A, Lacy MQ, Rajkumar SV, Bergsagel PL, Stewart Ak, Fonseca R (2008) Genetic aberrations and survival in plasma cell leukemia. *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 22(5): 1044-1052.

Trommer WE (2009) Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Biochemisches Praktikum für Chemiker und Wirtschaftsingenieure. Kaiserslautern
[Online im Internet.] URL:
http://www.chemie.uni-kl.de/wcms/fileadmin/chemie/Dokumente/Dokumente_BC/fuer_stud/bc-skript200910CWI.pdf [Stand: 29.03.2011, 10:50].

Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstein B (2009) The aging of the immune system. Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation, 22(11): 1041-1050.

8 Anhang: Patientenaufklärung und -einverständniserklärung

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 Tumorstabilisierung 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 bestimmbaren 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 bestimmbaren 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.

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

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

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer, Direktor der Medizinischen Klinik II am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, danke ich für die Überlassung dieses interessanten Dissertationsthemas.

Herrn PD Dr. med. Djordje Atanackovic, Oberarzt der Medizinischen Klinik II am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf und Leiter des Tumormunologischen Labors, möchte ich für die ständige Begleitung und Unterstützung bei der Ausarbeitung danken.

Besonderer Dank gilt Dr. med. Tim Lütken, wissenschaftlicher Mitarbeiter des Tumormunologischen Labors, für seine große Hilfe und Anregungen bei der statistischen Auswertung und der graphischen Darstellung der Ergebnisse.

Ebenso möchte ich mich bei Tanja Stahl für die Einarbeitung im Labor bedanken sowie bei Dr. med. Sebastian Kobold, der mir insbesondere zu Beginn meiner Auswertung viele Hilfestellungen gegeben hat.

Lorenz danke ich für die Beantwortung aller meiner Fragen rund um das Thema Doktorarbeit und seine Computerkompetenz. Ohne dich und deine „superguten“ Tipps wäre die Fertigstellung um einiges mühsamer gewesen!

Und auch meiner Familie möchte ich ganz besonders danken: Dafür, dass ihr immer für mich da seid und ich zu jeder Zeit um eure Unterstützung weiß!

10 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der digitalen Version nicht enthalten.

11 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:

Britta Marlen Bartels