# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

# Interdisziplinäre Klinik für Stammzelltransplantation

Direktor: Prof. Dr. med. N. Kröger

Funktionale Studien zu den Cancer-Testis Antigenen MAGE-C1/CT7 und MAGE-A3 mittels RNA Interferenzen beim Multiplen Myelom

Dissertation zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

> vorgelegt von: Adam Jadczak aus Nowa Sól

Hamburg 2011

(wird von der Medizinischen Fakultät ausgefüllt)

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 22.05.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. med. N. Kröger

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. med. D. Atanackovic

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:

1.0	EINLEITUNG	5
1.1.	DAS MULTIPLE MYELOM	5
1.2.	ÄTIOLOGIE	6
1.3.	PATHOGENESE	7
1.4.	KLINIK & DIAGNOSTIK	8
1.5.	THERAPIE & NEUE THERAPIEANSÄTZE	12
1.6.	DAS KONZEPT DER CANCER-TESTIS-ANTIGENES	18
1.7.	DAS KONZEPT DER SIRNA	20
1.8.	CASPASENASSOZIIERTE APOPTOSEMECHANISMEN	22
2.0	ZIELSETZUNG	31
3.0	MATERIAL & METHODEN (ALLGEMEINER TEIL)	33
3.1.	ALLGEMEIN BENÖTIGTE GERÄTE	33
3.2.	ALLGEMEIN BENÖTIGTE PROGRAMME	33
<b>4.</b> 0	MATERIAL & METHODEN (SPEZIELLER TEIL)	34
4.1.	ZELLKULTUR	34
4.2.	RNAI	36
4.3.	WESTERNBLOT/PROTEINIMMUNOBLOT	38
4.4.	MTT CELL VIABILITY ASSAY	42
4.5.	TUNEL ASSAY	43
4.7.	COLONY FORMATION ASSAY	45
4.8.	BRDU-ASSAY	46
4.9.	CFSE-ASSAY	47
4.10	. ADHESION ASSAY	47
4.11	. STATISTISCHE ANALYSE	48

5.0	ERGEBNISSE	49
5.1.	"GENE-SILENCING" VON MAGE-A3 UND MAGE-C1/CT7	49
5.2.	EFFEKTE AUF DIE APOPTOSE	54
5.3.	"Gene-silencing" bei CD138-negativen Zellen des Multiplen	
	Myeloms	59
5.4.	EFFEKTE AUF DIE PROLIFERATION	62
5.5.	EFFEKTE AUF DIE ADHÄSION	64
	EFFEKTE AUF DIE CHEMOSENSIBILITÄT	66
6.0	INTERPRETATION&DISKUSSION	68
6.1.	CANCER TESTIS ANTIGENE UND ADDITIVE EFFEKTE	68
6.2.	CANCER TESTIS ANTIGENE UND APOPTOSE	68
6.3.	CANCER TESTIS ANTIGENE UND PROLIFERATION	70
6.4.	CANCER TESTIS ANTIGENE UND CD138-NEGATIVE MYELOMZELLEN	70
6.5.	CANCER TESTIS ANTIGENE UND CHEMOTHERAPIE	72
6.6.	CANCER TESTIS ANTIGENE UND NEUE THERAPIEANSÄTZE	72
7.0	ZUSAMMENFASSUNG	74
8.0	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	75
9.0	LITERATURVERZEICHNIS	78
10.0	DANKSAGUNG	89
11.0	LEBENSLAUF	90
12.0	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	91

#### 1.0 EINLEITUNG

# 1.1. Das Multiple Myelom

Das Multiple Myelom (*MM*) ist eine maligne, lymphatische B-Zell-Neoplasie (nach WHO-Klassifikation zugehörig den B-Zell-Lymphomen) und mit einer altersadjustierten Inzidenz von 4/100.000/Jahr in Mitteleuropa die zweithäufigste hämatologische Krebserkrankung (Sirohi and Powles, 2004). Die Inzidenz steigt im Alter stark an, so dass 75% der Patienten bei Erstdiagnose über 60 Jahre alt sind. Die mediane Überlebenszeit für am MM erkrankte Personen beträgt etwa 3-4 Jahre bzw. bei einer Hochdosis-Chemotherapie etwa 5 Jahre (Kyle and Rajkumar, 2004). Die Kombination aus Hochdosis-Chemotherapie und autologer Stammzellentransplantation verbessert das "Gesamt-Überleben" (overall survival) im Patientenkollektiv zusätzlich (Child et al., 2003).

Charakteristisch kommt es durch eine diffuse oder multilokuläre Infiltration des Knochenmarks durch klonale Plasmazellen zu einer Insuffizienz der Hämatopoese und zu Osteolysen. Die meisten Plasmazellklone produzieren im Serum und/oder Urin nachweisbare monoklonale Immunglobuline (komplette Immunglobulinmoleküle, meist vom Typ IgG oder IgA, und/oder Immunglobulin-Leichtketten). Eine Ausnahme bildet das sogenannte asekretorische multiple Myelom (2-3% der Fälle).

Abzugrenzen sind die "monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz" (*MGUS*) und das "smoldering myeloma". Mit dem Begriff "monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz" wird eine in der Regel zum Zeitpunkt der Feststellung asymptomatische Plasmazelldyskrasie bezeichnet, charakterisiert durch einen Konzentrationsanstieg eines monoklonalen Immunglobulins (auch Paraprotein/M-Protein genannt) (< 30g/L), jedoch ohne eine zusätzlichen Symptomatik wie Osteolysen (International Myeloma Working Group, 2003). Diese MGUS hat eine Prävalenz von ca. 3,2% bei den über 50 Jährigen und geht mit einer Häufigkeit von etwa 1% pro Jahr in eine maligne B-Zell- Erkrankung (meist ein multiples Myelom) über (Kyle, 1978).

Das "smoldering myeloma", manchmal auch als asymptomatisches MM bezeichnet, geht mit einem Immunglobulinanstieg von >3g/dl und einer Plasmazellinfiltration im

Knochenmark von >10% einher, jedoch unter Ausbleiben weiterer Symptomatik wie Anämie, Osteolysen u.ä. (Durie et al., 2006).

Zu den Sonderformen des MM zählen das solitäre Plasmozytom (medullär/extramedullär), das indolente Myelom, die Plasmazell-Leukämie, das osteosklerotische Myelom (*POEMS-Syndrom*) sowie die sogenannte Schwerkettenkrankheit.

Trotz neuer Therapiekonzepte, wie z.B. die dosisreduzierte, allogene Stammzelltransplantation von Knochenmarksstammzellen, die es ermöglicht, die therapiebedingte Morbidität und Mortalität deutlich und nachhaltig zu senken sowie das remissionsfreie Überleben der Patienten zu verlängern, sind die Behandlungen des MM weiterhin verbesserungswürdig (Kroger et al., 2002b, Kroger et al., 2002a, Kroger et al., 2004).

# 1.2. Ätiologie

Die ätiologischen Grundlagen des Multiplen Myeloms konnten bisher nicht eindeutig geklärt werden. Eine familiäre Häufung wird beschrieben (Chang et al., 2005), wobei noch nicht geklärt werden konnte, inwieweit erbliche Faktoren wie HLA-Merkmalsdifferenzen, Veränderungen in der Erbinformation oder spezielle Zytokin-/Hormon-Antworten zur Entstehung der Pathologie des MM beitragen (Durie, 2004).

Eine höhere Inzidenz unter den Berufsgruppen der Waldarbeiter sowie bei Beschäftigten in der Zellstoff- und Papierverarbeitung und im Druckereigewerbe lassen zudem an Ursachen bzgl. spezifischer beruflicher Exposition gegenüber unklarer Noxen denken (Mester, 2006) Als sichere Risikofaktoren sind eine vorbestehende "monoklonale Gammopathie unklarerer Signifikanz" sowie ein "smoldering myeloma" zu betrachten (Rajkumar, 2005, Kyle, 2007).

Hohe Strahlenbelastung in jungen Jahren, wie sie im Zusammenhang mit Atombombentests beobachtet wurden, scheinen das Risiko der Entstehung einer MGUS zu erhöhen (Kyle and Kumar, 2009).

Auch Pestizide sollen eine ätiologische Bedeutung bei der Entstehung einer MGUS haben. Eine Studie konnte eine erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit bei entsprechend beruflich exponierten Personen nachweisen (Landgren et al., 2009).

Die offensichtlich multifaktorielle Genese der Ätiologie des MM veranlasste die International Myeloma Foundation (*IMF*) zur Anlage einer Datenbank, welche Patientendaten zentral speichert und diese u.a. für epidemiologische Studien der Forschung zur Verfügung stellt (Durie, 2004, Durie, 2007).

### 1.3. Pathogenese

Auch die Pathogenese des MM ist weitgehend ungeklärt. Als einer der ersten Schritte in der Entwicklung zum MM wird das Aufkommen einer beschränkten Anzahl von klonalen Plasmazellen, klinisch unter dem Begriff MGUS geführt, diskutiert (Kyle et al., 2002). Patienten mit MGUS haben weder Symptome noch Zeichen einer Organschädigung, jedoch zeigt sich ein kumulatives, jährliches Risiko von 1% für eine Progression zum MM oder einer verwandten, malignen Entartung (Kyle et al., 2002).

Es zeigt sich, dass etwa 50 % dieser Patienten Translokationen in ihrem Genom aufweisen, die im codierenden Bereich der schweren Ketten der Immunglobuline liegen. Insbesondere bezogen auf Chromosom 14q32 sowie optional bei einem von fünf Partnerchromosomen, namentlich 11q13 (CCND1), 4p16.3 (FGFR und MMSET), 6p21 (CCND3) 16q23 (cmaf), und 20q11 (mafB) (Kuehl and Bergsagel, 2002) (Seidl et al., 2003).

Der Progression der MGUS zum MM sollen dabei komplexe, genetische Prozesse in den neoplastischen Plasmazellen zugrunde liegen (Kuehl and Bergsagel, 2002).

Zusätzlich kommt es zu Veränderungen im Knochenmarksmilieu, zu einer Induktion der Angiogenese und einer Suppression zellvermittelter Immunität sowie Veränderungen bei der Zytokinexkretion, u.a. Interleukin 6 und "vascular endothelial growth factor" (*VEGF*) betreffend (Hideshima and Anderson, 2002) (Rajkumar et al., 2002b). VEGF z.B. führt zu einer Stimulation der IL-6-Produktion in den Stromazellen des Knochenmarks. In Kombination mit IL-6 wird VEGF eine wesentliche Beteiligung an Förderung und Aufrechterhaltung von Tumorwachstum, Angiogenese sowie bei der Unterdrückung medikamenteninduzierter Apoptose zugesprochen (Dankbar, 2000). Während IL-6 bei gesunden Probanden zur Enddifferenzierung von B-Vorläuferzellen dient, hat dieser Faktor bei am MM erkrankten Patienten einen proliferationsfördernden Effekt auf die maligne Zelle (Klein, 1995).

# 1.4. Klinik & Diagnostik

Die Diagnose des Multiplen Myeloms ist erschwert durch eine verhältnismäßig unspezifische Frühsymptomatik. Müdigkeit, Rückenschmerzen und wiederkehrende Infektionen zählen dazu (Kyle et al., 2003).

Rückenschmerzen bei Infiltration der Wirbelkörper und pathologische Frakturen gehören zu den häufig anzutreffenden Symptomen. Radiologisch imponieren dabei herdförmige Osteolysen, im Sinne entkalzifizierter Regionen/Herde an markhaltigen Knochen, gelegentlich auch am Schädelknochen, was dem sogenannten "Schrotschussschädel" entspricht. Auch Zeichen einer Osteoporose mit entsprechenden Frakturen sind radiologisch nachweisbar.

Als Ursache für die Knochenläsionen wird eine Zunahme der Expression von "receptor activator of nuclear factor kB (NFkB) ligand" (RANKL) und einer Expressionsminderung des antagonistisch wirkenden Rezeptors "Osteoprotegerin" diskutiert (Roodman, 2002). Diese Verschiebung im Expressionsverhältnis von RANKL zu Osteoprotegerin führt zu einer Aktivierung der Osteoklasten und konsekutiv zu einem vermehrten Knochenabbau. Diese Überexpression von RANKL wird zu einem Teil auf die Freisetzung von "macrophage inflammatory protein  $1\alpha$ " aus Myelomzellen zurückgeführt (Abe et al., 2002). Diese Störung des Knochenstoffwechsels kann zusätzlich eine Hyperkalzämie mit einer daraus resultierenden Symptomatik begründen.

Auch Anämien sind gehäuft zu beobachten. Typische Symptome einer Begleitsymptomatik wie z.B. Müdigkeit und Abgeschlagenheit sind häufig in einer Anämie begründet (Kyle, 2002).

Anzutreffen sind auch Zeichen einer Niereninsuffizienz, präferenziell Multiple Myelome mit einer Sekretion von IgD- oder den Ig-Leichtketten (die sogenannten "Bence Jonce Proteine") korrelieren mit einem erhöhten Risiko für eine "Myelomniere", bei der es zu einer fortschreitenden Nierenfunktionsstörung kommt. Hyperkalzämie und das Hyperviskositätssyndrom können die Nieren zusätzlich schädigen. Das Hyperviskositätssyndrom basiert auf einer gesteigerten Immunglobulinproduktion monoklonaler und somit nicht funktionaler Immunglobuline. Diese erhöhten

Konzentrationen von Immunglobulinen können über eine Zunahme der Blutviskosität zu Perfusionsstörungen bis hin zu Gefäßverschlüssen führen. Besonders häufige, organische Manifestationen dessen zeigen sich am Auge, Gehirn, Herz und Nieren.

Der gesteigerten Infektanfälligkeit liegt eine relative Hypogammaglobulinämie der Gesamtimmunglobuline zugrunde (Kyle, 2002).

Sowohl bei asymptomatischen als auch symptomatischen Patienten können sich in der Labordiagnostik eine erhebliche Steigerung der Blutsenkungsgeschwindigkeit, eine unklare Anämie und/oder ein sogenannter M-Gradient, der einer Überexpression eines monoklonalen Immunglobulins (Ig) entspricht, sowie bei Vorliegen eines leichtkettenproduzierenden Multiplen Myeloms eine Proteinurie zeigen. Dieses monoklonale Ig kann in der Serumeiweißelektrophorese lediglich bei 82% der Erkrankten nachgewiesen werden, mittels Serumimmunfixation bei 93%; eine Kombination von Serum- und Urin-Proteinimmunfixation erhöht die Sensitivität auf 97% (Kyle et al., 2003).

Als diagnostische Kriterien für ein Multiples Myelom sind zu betrachten (Durie et al., 2003):

- Mehr als 10% Plasmazellen im Knochenmark (in der Knochenmarkaspirationszytologie) und/oder Nachweis eines Plasmozytoms (in histologisch aufgearbeitetem Biopsat). Bei asekretorischer Erkrankung sind mehr als 30% Plasmazellen im Knochenmark gefordert
- im Serum und/oder Urin nachweisbares monoklonales Protein (nachgewiesen mit der Immunfixations-Elektrophorese)
- Das Vorliegen einer/von:
  - Hyperkalzämie und/oder
- Niereninsuffizienz (ein Kreatininwert von mehr als 173 mmol/l bzw. mehr als 2 mg/dl) und/oder
  - Anämie (Hb-Wert kleiner als 10 g/dl oder 2 g/dl unter der Norm) und/oder
  - Knochenläsionen (bei solitärer Osteolyse sind mehr als 30% Plasmazellen im Knochenmark gefordert, bei Osteoporose ist der Nachweis von Wirbelkörperfrakturen gefordert)

Zur Stadieneinteilung wird das Schema nach Durie und Salmon verwendet (Durie and Salmon, 1975).

Stadium I: Alle folgenden Kriterien sind erfüllt:

- Hämoglobin >10 g/dl
- Serumkalzium normal
- normale Knochenstruktur oder nur ein solitärer Herd (Röntgen)
- niedrige Myelomproteinkonzentration:

a) 
$$IgG < 50 g/l$$
 (Serum)

b) 
$$IgA < 30 g/l$$
 (Serum)

c) Bence-Jones-Protein < 4 g/24 h (Urin)

Stadium II: Weder Stadium I noch Stadium III

Stadium III: Mindestens eines der folgenden Kriterien ist erfüllt:

- Hämoglobin <8,5 g/dl
- Serumkalzium erhöht
- fortgeschrittene Knochenläsionen
- hohe Myelomproteinkonzentration:

a) 
$$IgG > 70 g/l$$
 (Serum)

b) 
$$IgA > 50 g/l$$
 (Serum)

c) Bence-Jones-Protein > 12 g/24 h (Urin)

Zusatz: ,A" = normale Nierenfunktion

"B" = eingeschränkte Nierenfunktion (Kreatinin > 173 mmol/l)

Diese Einteilung soll eine grobe Abschätzung der Tumormasse zum Diagnosezeitpunkt gestatten und besitzt gleichfalls eine prognostische Wertigkeit.

Ebenso zur prognostischen Einschätzung dient das "International Staging System" (*ISS*), welches eine einfache, valide und reproduzierbare 3-Stufen-Klassifizierung erlaubt. Stadium I ist definiert als eine β2- Mikroglobulinkonzentration kleiner als 3,5 mg/l und einem Serumalbumin größer 3,5 g pro 100 ml und zeigt ein medianes Überleben von 62 Monaten, Stadium II ist per Definition weder Stufe I noch Stufe III und zeigt ein medianes Überleben von 44 Monaten, Stufe III ist definiert als eine β2- Mikroglobulinkonzentration größer 5,5 mg/l und entspricht einem medianen Überleben von 29 Monaten (Greipp et al., 2005).

Erworbene chromosomale Veränderungen zeigten zusätzlich signifikante Auswirkungen auf die Überlebenszeit von Patienten, die am MM erkrankten. Eine schlechte Prognose z.B. zeigt sich bei Translokationen sowie Deletionen, die für die schweren Ketten der Ig kodieren. Namentlich sind dies t(4;14), t(14;16), t(14;20) sowie Deletion 17p13 oder Deletion 13. Im Gegensatz dazu zeigen sich eine deutlich bessere Prognose bei Anwesenheit von t(11;14) und t(6;14) sowie bei einer Hyperdiploidie (Gertz et al., 2005) (Zhan et al., 2006) (Avet-Loiseau et al., 2007). In einer großen Studie zeigte sich die prognostische Wertigkeit von der Deletion 13 in einer deutlichen Assoziation mit t(4;14) und Deletion 17p13. Patienten ohne eine t(4;14) und Deletion 17p13 und einer niedrigen β2- Mikroglobulinkonzentration hatten eine ausgezeichnete Prognose mit einem 4-Jahresgesamtüberleben von 83%; Patienten mit nur einer Veränderung entweder bei t(4;14) oder Deletion 17p13 oder einer hohen β2-Mikroglobulinkonzentration hatten eine mäßige Prognose; während Patienten, die Veränderungen bei t(4;14) als auch Deletion 17p13 sowie eine hohe β2-Mikroglobulinkonzentration aufwiesen, lediglich eine mediane Überlebenszeit von 19 Monaten zeigten (Avet-Loiseau et al., 2007).

Unter differentialdiagnostischen Gesichtspunkten sollte an MGUS, andere Lymphome mit monoklonalen Proteinen (z.B. Morbus Waldenström) sowie andere Tumore mit Osteolysen bei monoklonaler Gammopathie gedacht werden.

# 1.5. Therapie & neue Therapieansätze

Die Behandlungsindikation beim Multiplen Myelom ist sowohl stadien- (nach Durie und Salmon, s.o.), verlaufs- als auch symptomabhängig. Eine Therapieindikation wird in diesem Kontext bei symptomatischer Erkrankung gestellt mit z.B. symptomatischer Knochendestruktion, Anämie, renaler Insuffizienz und Hyperkalzämie (*CRAB-Kriterien*) (Palumbo and Rajkumar, 2009).

Sowohl bei asymptomatischem jedoch rasch progredienten Verlauf als auch bei drohenden Komplikationen besteht eine Behandlungsindikation. Als Stadium I klassifizierte Patienten sind nicht behandlungsbedürftig, sofern Niereninsuffizienz, Hyperviskositätssyndrom, Amyloidose sowie Neuropathie ausgeschlossen sind, bedürfen jedoch regelmäßiger Beobachtung. Ab Stadium II+ besteht dagegen eine Behandlungsindikation.

Es gibt keine Beweise für den Nutzen einer frühen Therapie eines asymptomatischen (smoldering) MM (Hjorth et al., 1993) (Grignani et al., 1996).

Es sind Behandlungsziele zu formulieren, dabei soll zwischen dem Ziel einer kompletten Remission (*CR*) mit Blick auf eine Langzeitremission der Erkrankung sowie einer partiellen Remission (*PR*) mit einer palliativen Zielsetzung (Verbesserung/Erhalt der Lebensqualität/Verlängerung der Lebenszeit u.ä.) differenziert werden.

Die Response-Kriterien der International Myeloma Working Group (IMWG) von 2006 sind wie folgt festgelegt worden:

#### *Kriterien einer Komplettremission (CR):*

- negative Immunfixation im Urin und Serum
- keine nachweisbaren Weichteilmanifestationen
- weniger als 5% klonale Plasmazellen im Blut.

#### *Kriterien einer stringenten Komplettremission (sCR):*

- Erfüllung aller CR Kriterien
- normalisierter FLC-Quotient ("free light chains")
- immunhistochemisch kein Nachweis klonaler Plasmazellen im Knochenmark.

Kriterien einer sehr guten partiellen Remission (VGPR):

• Reduktion des Serum-M-Gradienten um  $\geq 90\%$  und Urin-M-Proteins < 100 mg/24 h

oder

• negative Serum-/Urin-Elektrophorese bei positiver Immunfixation.

Kriterien einer partiellen Remission (PR):

- Reduktion des Serum-M-Gradienten um ≥ 50% und Reduktion des Urin-M-Proteins ≥ 90% oder < 200 mg/24 h. Ist kein M-Gradient bestimmbar, so kann eine PR durch eine ≥ 50% Reduktion der Differenz zwischen der beteiligten und der unbeteiligten Leichtkette bestimmt werden. Ist weder M-Gradient noch FLC-Test bestimmbar, so kann die PR durch eine ≥ 50%-Reduktion der Plasmazellen im Knochenmark bestimmt werden, sofern der Anteil der Plasmazellen im Knochenmark vor Therapie > 30% gelegen war,
- Größenreduktion von Weichteilmanifestationen  $\geq 50\%$ .

*Kriterien einer progredienten Erkrankung (PD):* 

In Relation zum niedrigsten Wert nach Therapie besteht eine progrediente Erkrankung bei Anstieg um 25%

- des Serum-M-Gradienten (Anstieg abs.  $\geq 0.5$  g/100ml) und/oder
- des Urin-M-Gradienten (Anstieg abs. ≥ 200 mg/24h) und/oder
- der Differenz zwischen der beteiligten und der unbeteiligten Leichtkette und/oder
- der Plasmazellen im Knochenmark sowie bei
- Auftreten neuer Knochenläsionen/Weichteiltumoren oder deren signifikante Vergrößerung
- Auftreten einer Myelom-bedingten Hyperkalzämie.

Kriterien einer stabilen Erkrankung (SD):

• weder sCR, CR, VGPR, PR oder PD.

Weiterhin wurden folgende Definitionen festgelegt:

Refraktäres Myelom:

- Fortschreiten der Erkrankung unter Therapie oder
- innerhalb von 60 Tagen nach Therapie.

Minor response (MR) bei rezidivierten, refraktären Myelomerkrankungen

- Reduktion des Serum-M-Gradienten ≥25%, aber < 49% UND
- Reduktion des Urin-M-Gradienten um 50-89% (>200mg/24h)
- Größenreduktion von Weichteilmanifestationen um 24-49%
- keine Zunahme in Anzahl und Größen von Osteolysen.

Übergang in ein aktives Myelom bei bestehendem smoldering myeloma

• Kriterien der PD nach IMWG

oder

- positive CRAB-Kriterien oder
- Entwicklung extramedullärer Weichteilmanifestationen.

In diesem Zusammenhang sind auch die Therapiekonzepte zu sehen. So besteht zum einen ein intensives Therapiekonzept, welches sich aus einer Initialtherapie und autologer bzw. allogener Stammzellentransplantation zusammensetzt. Dem gegenüber steht ein palliatives Therapiekonzept, welches auf Chemotherapie (+ supportive Therapie) aufbaut.

Die Einführung neuer Substanzen wie Thalidomide, Bortezomib and Lenalidomid führten zu Änderungen in den Empfehlungen bezüglich der Therapieregime des MM, da sie eine hinreichende Effektivität aufweisen konnten (Palumbo and Rajkumar, 2009). Thalidomid und Lenalidomid haben antiangiogene Eigenschaften, stimulieren T-Zellen wie natürliche Killerzellen und interferieren mit diversen Zytokinen, z.B. unterdrücken Wachstumsfaktoren wie Interleukin-6 (*IL-6*), Tumornekrosefaktor-a (*TNF-a*), inhibieren die Zelladhäsion beim MM und unterdrücken VEGF, einen proangiogenetischen Faktor (Corral et al., 1999) (Dredge et al., 2002).

Bortezomib, der erste Proteasomeninhibitor seiner Klasse, interferiert spezifisch mit den 26S Proteasomen, die verantwortlich sind für den Abbau von Proteinen, welche Funktionen in der Kontrolle der Transkription, des Zellzyklus und des Zellmetabolismus haben (Mitra-Kaushik et al., 2004).

Kombinationen dieser Wirkstoffe mit Steroiden, Alkylatien und Anthrazyklinen haben signifikant sowohl das Therapieansprechen als auch das progressionsfreie Überleben

verbessert. In einer großen Gruppe neu diagnostizierter MM-Patienten zeigten sich keine Verbesserungen des Gesamtüberlebensrate in der Periode 1971 bis 1994, eine tendenzielle Verbesserung in dem Zeitraum 1995–2000 und eine statistisch signifikante Verbesserung in den 6 Jahren von 2001 bis 2006 (Kumar et al., 2008). Diese Daten suggerieren, dass die autologe Stammzelltransplatation (*ASCT*) für die Trendwende von 1995–2000 verantwortlich war, während die neuen Substanzen zur deutlichen Verbesserung seit 2001 beitrugen.

Grundsätzlich lässt sich die Therapie des MM in eine Initial- und eine Erhaltungstherapie aufteilen. Die Art und Weise der Initialtherapie ist dabei zusätzlich abhängig von der Eignung des Patienten für eine ASCT. Diese Eignung beruht primär auf den Faktoren Alter, gesundheitlicher Status und Begleiterkrankungen.

Transplantationskanditaten bekommen typischerweise 2-4 Zyklen einer Initialtherapie vor der Stammzellengewinnung. Die neueren Empfehlungen sehen als Initialtherapie eine Kombination der bereits benannten neuen Substanzen vor (Cavo et al., 2005) (Rajkumar et al., 2006), Bortezomib/Dexamethason (*Bort/Dex*) (Harousseau et al., 2006) und Lenalidomide/Dexamethasone (*Rev/Dex*) vor (Rajkumar et al., 2005).

Nach 2-4 Zyklen werden Stammzellen des Patienten gewonnen und im Anschluss daran eine Hochdosischemotherapie mit Melphalan (200 mg/m²) durchgeführt, gefolgt von einer "Rückführung" der autologen Stammzellen, die ASCT im eigentlichen Sinne. Dieses Procedere erhöht die Rate an kompletten Remissionen und verlängert die "rückfallfreie" Überlebenszeit (Koreth et al., 2007).

Zusätzlich gibt es noch eine sogenannte Tandem-ASCT. Diese beinhaltet eine zweite geplante ASCT, nachdem sich der Patient von der ersten ASCT erholt hat. Eingeführt wurde sie von Barlogie und Kollegen zur Verbesserung der Rate der kompletten Remissionen (Barlogie et al., 1997) (Barlogie et al., 1999). Die Rolle der Tandem-Transplantation zeigt im randomisierten Vergleich keine einheitlichen Ergebnisse (Attal et al., 2003).

Patienten, die für eine ASCT aufgrund ihres Alters, eines schlechten Allgemeinzustandes und diverser Begleiterkrankungen ungeeignet sind, erhalten eine Standardchemotherapie mit alkylierenden Substanzen (Rajkumar et al., 2002a). Alternativ werden auch Schemata

mit Melphalan/Prednison/Thalidomide sowie Melphalan/Prednison/Bortezomib bei älteren Patienten zunehmend angewandt (Palumbo and Rajkumar, 2009).

Die Frage nach der Notwendigkeit einer Erhaltungstherapie ist noch nicht abschließend geklärt. In einer großen Studie wurden Patienten, die jünger waren als 65 Jahre, bzgl. des Erhalts keiner Erhaltungstherapie, Erhaltungstherapie mit Pamidronaten oder Erhaltungstherapie mit Pamidronaten und Thalidomide miteinander verglichen. Die 4 Jahres Gesamtüberlebensrate und die 3 Jahre rückfallfreie Zeit waren in der Thalidomidgruppe signifikant länger (Attal et al., 2007, Spencer et al., 2009)

Nahezu alle am MM erkrankten Patienten tragen das Risiko eines Krankheitsrezidives. Sofern dieses länger als 6 Monate nach konventioneller Therapie auftritt, sollte die initiale Therapie wieder aufgegriffen werden. Sollten autologe Stammzellen zu einem früheren Zeitpunkt konserviert worden sein, stellt auch eine ASCT eine adäquate Option dar (Gertz et al., 1999). Hohe Ansprechraten bei Rezidiverkrankungen haben die Therapeutika Vincristin, Doxorubicin und Dexamethason (Alexanian et al., 1992). Auch in der Behandlung des Rezidives sind die neuen Substanzen zunehmend im Gebrauch.

Ebenfalls Anwendung in der Behandlung des MM findet die allogene Stammzellentransplantation (*AlloSCT*). Hierbei werden Stammzellen eines HLAgeeigneten Fremdspenders übertragen. Die AlloSCT zeigt im Vergleich zu allen anderen Therapieformen die höchste Remissionsrate, inklusive Remission auf molekularer Ebene, sowie das längste rezidivfreie Überleben bei mehr als 30% der so Behandelten (Rabitsch et al., 2004, Kroger et al., 2010, Corradini et al., 1999, Bensinger, 2004).

Bedauerlicherweise ist die AlloSCT auch mit der höchsten behandlungsassoziierten Mortalität verbunden, aufgrund der behandlungsassoziierten Endorganschäden sowie der ungewollten "graft versus host disease" (*GVHD*), eine immunologische Reaktion der Spenderzellen gegen den Empfängerorganismus (Gahrton et al., 2001). Die Effizienz der AlloSCT beruht auf der Kombination von einer Hochdosischemotherapie und des "adoptierten" immuntherapeutischen Effekts der immunkompetenten Spenderzellen gegen die Zellen des MM, der sogenannte "graft-versus-myeloma-effect" (*GvM*) (Gahrton et al., 2001, Mehta and Singhal, 1998).

T-Lymphozyten-Depletion, d.h. eine Reduktion der Spenderlymphozytenanzahl senkt nachweislich die Inzidenz einer GvHD bei gleichzeitig erhöhtem Risiko einer Rezidiverkrankung. Diese erhöhte Rezidivrate erklärt man sich mit einem abgeschwächten Graft-versus-myeloma-Effekt, welcher ebenfalls eine Immunreaktion der Spender-T-Lymphozyten darstellt (Kröger, 2007).

Patienten mit der Option einer allogenen Stammzelltransplantation sollten frühzeitig in einem Transplantationszentrum vorgestellt werden. Eine europäische Konsensuskonferenz empfiehlt bei jüngeren Patienten < 60 Jahre, fehlender Komorbidität und gutem Ansprechen auf Salvagetherapie beim Frührezidiv nach autologer SCT (< 3 Jahre) die allogene SCT (Dimopoulos et al., 2009, San-Miguel and Mateos, 2009).

An Begleittherapeutika sind vorrangig Bisphosphonate (zur Reduktion von Wirbelkörperfrakturen als auch osteolysebedingter Knochenschmerzen) (Seidl et al., 2003), Erytropoetin (bei Anämie, besonders in Folge einer chronischen Niereninsuffizienz) sowie ά-Interferone (umstrittene Remissionserhaltung) zu nennen.

Neuerdings zeigt sich für Bortezomib neben der Aktivität gegen das MM auch ein positiver Effekt auf die knöchernen Strukturen (Terpos et al., 2007) (Giuliani et al., 2007) (von Metzler et al., 2007).

Indikation zur Strahlenbehandlung besteht bei frakturgefährdeten Osteolysen, chirurgisch versorgten pathologischen Frakturen, primär operativ versorgten Querschnittssyndromen, extramedullären Plasmazelltumoren sowie Skelettschmerzen. Die übliche Bestrahlungsintensität zur Schmerzbehandlung beträgt 10-20 Gy.

Operationsindikationen stellen sich bei Frakturgefährdung langer Röhrenknochen, pathologischen Frakturen sowie drohenden bzw. beginnenden Querschnittssyndrom.

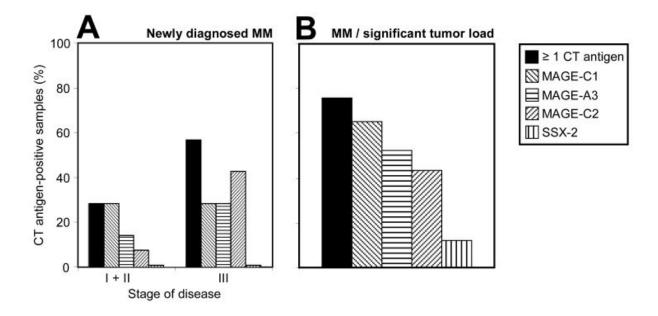
Eine supportive Behandlung erfolgt im Rahmen der üblichen internistischen Behandlungsansätze: Schmerztherapie, Blutersatz, Hyperkalzämiebehandlung, Behandlung einer Niereninsuffizienz, Immunglobulinsubstitution bei sekundärem Antikörpermangelsyndrom mit Infektneigung, Therapie von Infektionen sowie gegebenenfalls Plasmapherese bei Hyperviskositätssyndrom.

# 1.6. Das Konzept der Cancer-Testis-Antigenes

Die Klasse der "Cancer-Testis-antigenes" (*CT-Ag*) ist eine Gruppe von gegenwärtig 44 Proteinen, deren Expression charakteristischerweise auf maligne Tumoren und humane Keimzelllinien beschränkt ist (Scanlan et al., 2004).

Einige CT-Ag weisen eine vergleichsweise hohe Immunogenität auf. Es wurde beobachtet, dass sowohl eine humorale als auch eine T-Zell-vermittelte Immunantwort durch CT-Ag auszulösen ist. Das spezifische Expressionsmuster der CT-Ag führte zudem zu Versuchen im Sinne einer therapeutischen Tumorvakzinierung und anderen Formen antigenspezifischer Immuntherapien (Scanlan et al., 2002).

Weiterhin besteht auch eine prognostische und diagnostische Wertigkeit der CT-Ag bei vielen malignen Erkrankungen. CT-Ag wurden in Myelomzelllinien und in Primärmaterialien bereits mehrfach mithilfe der Reversen Transkriptase Polymerase Ketten Reaktion (*RT-PCR*) und immunhistochemischen Analysen nachgewiesen (van Baren et al., 1999, Lim et al., 1999, Pellat-Deceunynck et al., 2000, Dhodapkar et al., 2003, Lim et al., 2001).



### **Abb. 1: CT-Ag Expression im Multiplen Myelom**

- (A) Die Balken präsentieren die prozentuale Expression von CT-Ag in Proben neu diagnostizierter Myelompatienten in Abhängigkeit vom Krankheitsstadium (Stage of disease) (n = 21)
- (B) sowie den Prozentsatz der Expression beschriebener CT-Ag in retrospektiv untersuchtem Patientengut mit einer Plasmazellinfiltration im Knochenmark > 10% (n = 71) (Atanackovic et al., 2009)

Immunhistochemisch konnte demonstriert werden, dass 82% der getesteten MM Proben MAGE-C1/CT7 positiv waren und 70% eine MAGE-A3/6 Expression zeigten (Jungbluth et al., 2005). Die MAGE-C1/CT7 Proteinexpression nahm dabei mit Fortschreiten der Krankheit zu, während die MAGE-A3/6 Expression gleichbleibend zwischen MGUS (monoclonal gammopathies of undetermined significance), einem potenziellen "Vorläufer" des MM, und dem manifesten MM verblieb, weshalb diskutiert wurde, dass MAGE-A-Familienmitglieder schon in die frühen Pathogenesemechanismen involviert sein könnten. Außerdem wird berichtet, dass die Konzentration der MAGE-C1/CT7 und MAGE-A3/6 Proteine mit einer erhöhten Proliferationsrate der Plasmazellen korrelieren, folglich große Bedeutung bezüglich der Malignität des MM haben (Atanackovic et al., 2009).

In neueren Studien wurde gezeigt, dass CT-Ag (MAGE-C1/CT7, MAGE-C2/CT10, MAGE-A3, SSX-2) nicht nur regelhaft im MM exprimiert werden, sondern die Expression der CT-Ag stark mit klinischen Erkrankungsparametern (Anzahl Plasmazellen im Knochenmark, Level der Paraproteinämie) sowie mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung korreliert. 50% der Patienten in partieller Remission und fast alle Patienten mit Krankheitsprogression zeigten eine CT-Antigensexpression (Atanackovic et al., 2009). Zudem wurde in derselben Arbeit darauf verwiesen, dass z.B. die Expression von MAGE-C1/CT7 einen hochsignifikanten, unabhängigen und prognostisch negativen Faktor im MM darstellt.

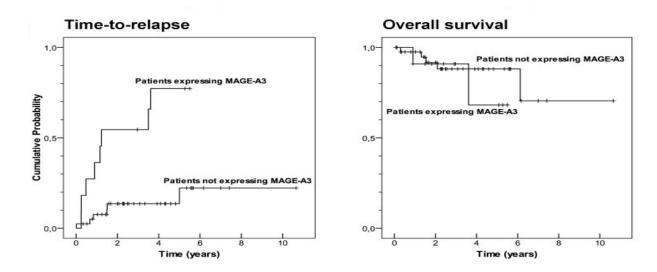


Abb. 2: MAGE-A3 Expression korreliert mit einem früheren Krankheitsrückfall und kürzerer Überlebenszeit nach allogener Stammzelltransplantation

Die Kurve zeigt den Prozentsatz von Patienten, die in Abhängigkeit von der MAGE-A3 Expression (+/-) und der Zeit einen Rückfall erlebten (Time-to-relapse) bzw. verstarben (Overall survival) (Atanackovic et al., 2009)

CT-Ag sind des Weiteren beteiligt an Vorgängen der malignen Transformierung, wie Regulation der Transkription (Laduron et al., 2004, Tureci et al., 1996, Tureci et al., 2002), Translation (Herold et al., 2000, van der Bruggen et al., 2007), Apoptose (Cilensek et al., 2002) und verringerter Chemotherapiesensibilität (Duan et al., 2003).

# 1.7. Das Konzept der siRNA

Die RNA interference (*RNAi*) ist ein zelleigener, molekulargenetischer Mechanismus, der Einfluss auf die Genaktivität lebender Zellen nehmen kann. Dabei sind zwei Typen der sogenannten kleinen DNA (engl.: small DNA) für den Mechanismus der RNAi besonders

hervorzuheben: Die "zelleigene" microRNA (*miRNA*) und die "exogene" small interfering RNA (*siRNA*).

Von außen in die Zelle zugeführte Doppelstrang-RNA (*dsRNA*) initiiert die RNAi durch Bindung an den Enzym Dicer, ein Protein vom Typ einer Ribonuklease (Siomi and Siomi, 2009). Dieses Enzym bindet und spaltet die dsRNA in Fragmente von 21-25 Basenpaaren mit einigen wenigen unpaarigen "Überhängen" am jeweiligen Fragmentende (Zamore et al., 2000, Vermeulen et al., 2005, Castanotto and Rossi, 2009, Qiu et al., 2005).

Untersuchungen suggerieren, dass die besagte Länge der dsRNA zu einem Maximum an Zielgenspezifität und einem Minimum an unspezifischen Effekten führt (Ahlquist, 2002). Diese kurzen dsRNA werden als siRNA bezeichnet. Nach Spaltung der siRNA in Einzelstränge erfolgt eine Assoziation mit dem RISC (RNA induced silencing complex), einem Proteinkomplex, dessen aktive Komponenten Proteine der Argonautfamilie bilden, eine Endonuclease, welche die zur siRNA komplementäre mRNA (messengerRNA) spaltet (Fire et al., 1998). Zusätzlich unterbindet die Assoziation der siRNA mit RISC die Nutzung der einzelsträngigen siRNA als Matrize im Prozess der Translation (Parker et al., 2006).

Zusätzliche Regulationsmechanismen im Genom eukaryonter Zellen durch die RNAi führen wahrscheinlich über Modifizierung von Histonen und damit assoziierter Induktion von Heterochromatinformationen zu einer prätranskriptioneller Herabregulierung von Genen (Holmquist and Ashley, 2006). Dies wird auch als "RNA-induced transcriptional silencing" (*RITS*) bezeichnet und wird von einem Proteinkomplex gleichen Namens ausgeführt.

RNA-Sequenzen (siRNA und miRNA), die komplementär zu Teilen von Promotorregionen sind, können zudem die Transkription der angeschlossenen Gene steigern. An diesem noch nicht ganz verstandenen Mechanismus der Hochregulierung sind die Enzyme "dicer" und "argonaut" beteiligt, außerdem wird regelhaft eine Demethylierung von Histonen beobachtet (Check, 2007, Li et al., 2006)

Die Funktionen der RNAi sind vielfältig. So haben sie großen Anteil an der Abwehr viraler DNA/RNA sowie von anderem genetischen Fremdmaterial, insbesondere bei Pflanzen

scheint zudem mithilfe der RNAi die übermäßigen Transposonausbreitung unterbunden zu werden (Stram and Kuzntzova, 2006).

Die endogen exprimierte miRNA hat große Bedeutung bei Prozessen, die der Hemmung der Translationsvorganges dienen (Saumet and Lecellier, 2006) sowie in der Regulation der Zellentwicklung, insbesondere bei der Morphogenese und der Aufrechterhaltung von undifferenzierten bzw. unvollständig differenzierten Zelltypen, wie es z.B. bei Stammzellen der Fall ist (Carrington and Ambros, 2003).

Experimentell kann und wird der Mechanismus der RNAi zur Funktionsanalyse von Genen sowohl in Zellkulturen als auch in vivo in Modelorganismen verwendet (Fire et al., 1998). Dabei wird, vereinfacht dargestellt, dsRNA hergestellt, die eine Sequenzhomologie zum zu untersuchenden Gen aufweist und im Anschluss unter Zuhilfenahme unterschiedlichster Prozeduren in die Zelle/den Zellverband bzw. in den Organismus importiert. Über die weiter oben genannten Prozesse kommt es dann zum sogenannten "expression/gene silencing" des jeweiligen Gens, d.h. einer temporären Expressionsminderung des Gens, welche wiederum weitere funktionelle Analysen erlaubt. Gelegentlich wird diese Technik auch als "knockdown" bezeichnet, um von dem Vorgang des "knockout" abzugrenzen, bei dem die Genexpression dauerhaft unterbunden wird (Naito et al., 2005).

## 1.8. Caspasenassoziierte Apoptosemechanismen

Apoptose ist ein morphologisch und biochemisch sehr heterogener Zellmechanismus in eukaryonten Zellen, der unter einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Gegebenheiten zum Zelltod führt (Arends and Wyllie, 1991).

Verantwortlich für die Mehrzahl der Veränderungen während einer Apoptose sind die Mitglieder der Enzymgruppe der Caspasen (aspartatspezifische Cysteinyl-Proteasen). Diese Proteasen werden im Apoptoseprozess kaskadenartig aktiviert und initiieren durch die Spaltung von Zellsubstraten die Apoptose (Fischer et al., 2003, Janicke et al., 1998).

Die sogenannte Caspase-1 wurde anhand der Funktion, der Spaltung und Aktivierung des Entzündungsmediators Interleukin-1 $\beta$  (*IL-1* $\beta$ ), ICE (*Interleukin-1\beta-Converting Enzyme*) genannt (Cerretti et al., 1992, Thornberry et al., 1992).

Im Verlauf wurden mehrere Proteine mit Sequenzhomologien zu ICE entdeckt, die letztlich die Familie der Caspasen bildeten (Degterev et al., 2003, Reed et al., 2004).

Insgesamt wurden 15 Mitglieder dieser Protein-Familie identifiziert, von denen elf im Menschen exprimiert werden (Reed et al., 2003). Diese können nach Funktion und Sequenzhomologien in inflammatorische und apoptotische Subgruppen aufgeteilt werden.

Die Caspasen lassen sich weiterhin in zwei funktionale Untergruppen einteilen: die Initiatorcaspasen und die Effektorcaspasen. Zu der Gruppe der initiierenden Caspasen zählen u.a. Caspase 2/8/9/10. Diese spalten inaktive Pro-Formen der Effektorcaspasen und initiieren dadurch deren Aktivierung. Die aktivierten Effektorcaspasen (z.B. Caspase 3/6/7) ihrerseits spalten weitere Proteinprodukte, aktivieren weitere Proteasen und Endonukleasen und spalten regulatorische Proteine der Zelle und triggern auf diesen Weg den Apoptoseprozess (Nicholson, 1999)

Caspase 4 und Caspase 5, die u.a. eine Überexpression bei einigen Patienten mit Vitiligo und anderen assoziierten Erkrankungen zeigen, lassen sich nicht der oben genannten Kategorien zuordnen, da es sich um inflammatorische Enzyme handelt, die bei der Cytokinproduktion partizipieren (Gregersen, 2007).

Caspase 14 wiederum hat keine bekannte Funktion bei Apoptose und/oder inflammatorischen Mechanismen, sondern ist in der Hautzellentwicklung beteiligt (White et al., 2009).

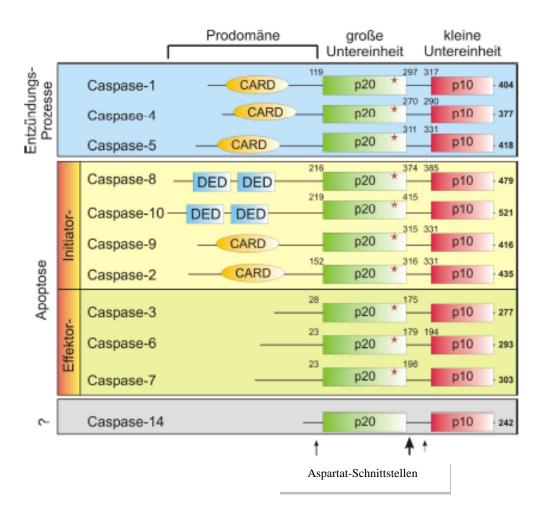


Abb. 3 Einteilung und struktureller Aufbau der menschlichen Caspasen

Tabellarische Darstellung der humanen Caspasen nach Funktion. Während alle Caspasen eine große (p20) und eine kleine (p10) Untereinheit besitzen, zeichnen sich nur einige Caspasen durch zusätzliche Oligomerisierungs-Domänen (DED [Death Effector Domain] und CARD [Caspase Recruiting Domain]) in der N-terminal gelegenen Prodomäne aus. Die Spaltstellen der Caspasen sind mit Pfeilen gekennzeichnet, wobei die erste und wichtigste Spaltung mit dem großen Pfeil angedeutet wird.

Die Nummern entsprechen der Position des Aspartats im Protein, an dem diese Spaltung stattfindet. Die Position des katalytisch aktiven Cystein-Rests ist mit einem Stern gekennzeichnet.

Caspase-14 wird nicht an einem Aspartat-Rest aktiviert, daher ist keine Spaltstelle angegeben. Die fett gedruckten Nummern am Ende entsprechen der Anzahl der

Aminosäuren des dargestellten Proteins. Die Größenverhältnisse sind nur schematisch dargestellt (Sohn, 2007).

Zusätzlich existiert im Menschen noch Caspase-12, die aber bisher nicht in die Liste der aktiven humanen Caspasen aufgenommen wurde (Fischer et al., 2002, Lamkanfi et al., 2004). In murinen Zelllinien ist Caspase-12 nachgewiesenermaßen aktiv und wird der inflammatorischen Subgruppe zugerechnet. Zusätzlich wird eine Rolle als Initiator-Caspase in der durch Schädigung am endoplasmatischen Retikulum ausgelösten Apoptose diskutiert (Szegezdi et al., 2003).

Die Apoptose wird vorwiegend durch zwei zelluläre "pathways" vermittelt, die beide zur Aktivierung von Caspasen führen: der "death receptor (DR) pathway" und der "mitochiondrale pathway" (Danial and Korsmeyer, 2004)

Der "DR pathway" wird durch Mitglieder der Proteinfamilie des Tumor Nekrose Faktors (*TNF*) vermittelt. Dazu gehören z.b. der CD95L (*CD95Ligand*), "Fas ligand" (*FasL*; *Synonym: Apo1*), TNF-α, und "Apo2 ligand" (*Apo2L*; *Synonym: TNF-related apoptosis-inducing factor [TRAIL]*). Diese binden an dem DR der Zellmembran.

Diese Liganden binden an Rezeptoren wie Fas, TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) und DR4/DR5, die Mitglieder der TNF-Rezeptor-Proteinfamilie sind. Gemeinsam sind ihnen identische, cysteinreiche, extrazelluläre Domänen sowie homologe, zytoplasmatische "Todes-Domänen" (DeathDomain = DD) (Almasan and Ashkenazi, 2003).

CD95 (Fas/Apo-1) sowie die Apoptose induzierenden TRAIL (TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand)-Rezeptoren bewirken eine Oligomerisierung des Rezeptors im Zytoplasma und dienen der Rekrutierung des Adapterproteins FADD (Fas-Associating Death Domain-containing protein).

Über FADD werden durch Interaktionen der DEDs die Initiator-Procaspasen 8 und 10 aktiviert. Dieser Signalkomplex wird als DISC (*Death-Inducing Signaling Complex*) bezeichnet (Debatin and Krammer, 2004).

In der CD95L-vermittelten Apoptose unterscheidet man Typ I- und Typ II-Zellen, die unterschiedliche Signalwege benutzen.

In Typ-I-Zellen wird Procaspase 8 am DISC aktiviert. Das aktive Caspase-8-Heterotetramer aktiviert die Effektorcaspase 3.

In Typ-II-Zellen dagegen werden, aus unklarer Ursache, eine unzureichende Anzahl an DISC gebildet. Dies hat eine eingeschränkte Caspase-8-Aktivität zur Folge, welche einer Verstärkung bedarf. Hierbei spielt das Caspase-8-Substrat BID (*Bcl-2 Interacting domain Death agonist*), ein Mitglied der BH3-only Untergruppe der Bcl-2-Familie, eine wichtige Rolle. Nach der Caspase-8-vermittelten Spaltung von BID transloziert dessen C-terminales Fragment tBID (*Truncated BID*) zu den Mitochondrien und aktiviert dort den intrinsischen Signalweg der Apoptose (Sohn, 2007).

Abschließend werden Caspase 3 sowie die restlichen Effektorcaspasen 6 und 7 aktiviert. Im Endresultat kommt es zu Proteolysen von Schlüsselproteinen der Zellzyklusregulierung und Apoptosesteuerung, wie z.B. Bcl-2 (Chen et al., 2000) und Cyclin E (Mazumder et al., 2002) und folglich zur Apoptose.

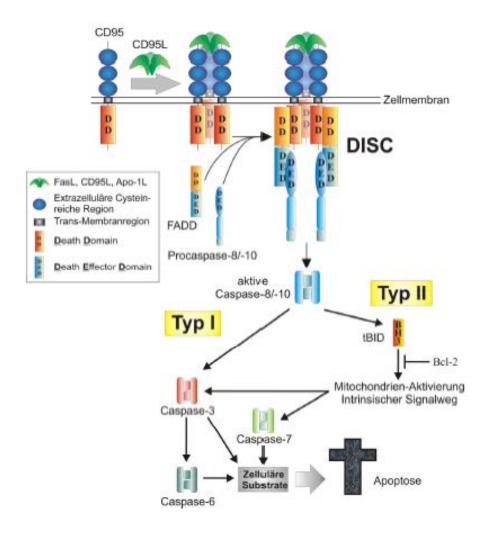


Abb. 4: Typ I und II der CD95-induzierten Apoptose

Nach der durch den CD95-Liganden (CD95L) induzierten Oligomerisierung des CD95-Rezeptors wird der DISC über die Rekrutierung von FADD und Procaspase 8/10 gebildet. In Typ-I-Zellen wird dadurch genügend Caspase 8/10 aktiviert, um über eine direkte Prozessierung von Caspase 3 die Apoptose auszulösen. Typ-II-Zellen dagegen benötigen eine Signalverstärkung über die Caspase-8-vermittelte Spaltung von BID, welches den intrinsischen Signalweg aktiviert, der wiederum durch Bcl-2 inhibiert werden kann (Sohn, 2007)

Der "mitochondriale pathway" wird primär von Proteinen der Bcl-2-Proteinfamilie vermittelt, diese beinhalten sowohl proapoptotische als auch antiapoptotische Proteine. Das Verhältnis dieser beiden konträr agierenden Proteingruppen bestimmt die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber diversen apoptoseinduzierenden/fördernden Signalen (Danial and Korsmeyer, 2004). Allen gemein ist das Vorhandensein von mindestens einer von vier stark konservierten "Bcl-2 homology (BH) domains" (Cory and Adams, 2002).

Die antiapoptotischen Proteine dieser Gruppierung wie Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 und Bfl-1/A1 sind charakterisiert durch das Vorhandensein aller vier der vier möglichen BH-Domänen (BH1-BH4). Diese Proteine verhindern den Zelltod durch Bindung und Inaktivierung von proapoptotischen Faktoren.

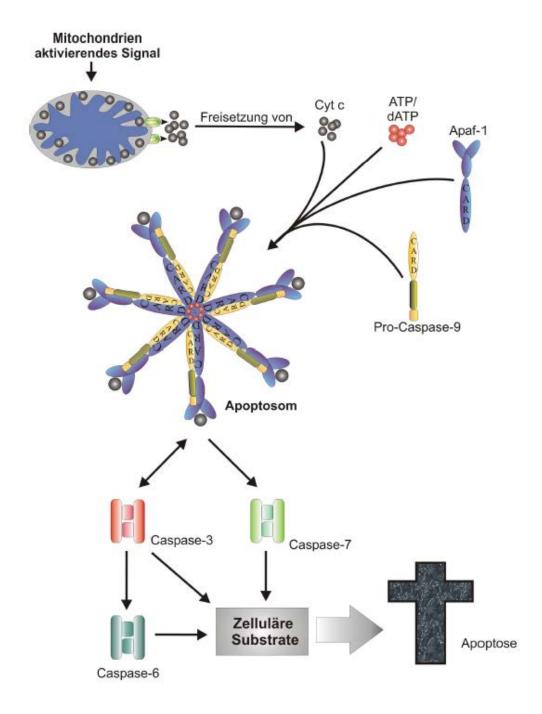
Die Gruppe der proapoptotischen Faktoren unterteilen sich, bzgl. ihrer Funktion und der biochemischen Struktur, zusätzlich in zwei Subgruppen. Die erste Gruppe sind sogenannte "multidomain" Proteine wie Bax und Bak, die eine starke Ähnlichkeit zu Bcl-2 aufweisen, bei jedoch fehlender N-terminaler BH4-Domäne. Die andere Untergruppe wird von Proteinen repräsentiert, die ausschließlich eine BH3-Domäne tragen. Beispiele hierfür sind Bik, Bid, Puma/BBC3 und Noxa/APR, die alle für die Transduktion eines spezifischen zellapoptose-induzierenden Signals verantwortlich gemacht werden (Huang and Strasser, 2000).

Bax und Bak erfahren bei Aktivierung strukturelle Veränderungen, die zur Porenbildung in der äußeren, mitochondralen Membran und somit zur Permeabilitätssteigerung führen. Zusätzlich wird die Freigabe von Cytochrome c (*cyto c*) erleichtert und selektive Caspasenkaskaden aktiviert (Desagher and Martinou, 2000).

Freigegebenes cyto c bindet sein Adaptermolekül apoptotic protease activating factor 1 (*APAF-1*) und Caspase 9, die gemeinsam einen makromolekularen Komplex bilden, das Apoptosom. Dies führt zu einer Signalkaskade über Caspase 9 und Caspase 3 zu den Effektorcaspasen 6 und 7 (Strasser et al., 2000).

Mitochondral freigegebene Faktoren wie apoptosis-inducing factor (Joza et al., 2001) und endonuclease G (Li et al., 2001) weiten die apoptoseinduzierenden sowie autolytischen Prozesse auf den Zellkern aus.

Smac/Diablo (Du et al., 2000, Srinivasula et al., 2001) und Omi/HtrA2 (Hegde et al., 2002, Martins et al., 2002) erleichtern die Caspaseaktivierung durch antagonistische Effekte an sogenannten Inhibitoren der Apoptose (*inhibitor of apoptosis (IAP*)).



### Abb. 5: Der intrinsische Signalweg der Apoptose

Durch die Freisetzung von Cytochrom C in das Zytoplasma wird die Bildung des Apoptosoms induziert. Cytochrom C und ATP/dATP binden an APAF-1 und führen zu dessen Heptamerisierung. Dadurch kann Procaspase 9 an APAF-1 binden und wird aktiviert. Am Apoptosom werden anschließend die Effektorcaspasen 3 und 7 direkt und Caspase 6 indirekt aktiviert, was letztlich zur Apoptose führt (Sohn, 2007).

Gegenwärtige Studien suggerieren einen zusätzlich apoptoseinduzierenden "pathway", der auf der Grundlage von Caspase 12 als Initiatorcaspase als zelluläre Antwort auf toxische Schädigung am endoplasmatischen Retikulum (ER), wie bei Tunicamycinbehandlung vorzufinden, beruht (Nakagawa et al., 2000). Es konnte gezeigt werden, dass Caspase 12 Cytochrom-C-unabhängig Caspase 9 aktivieren kann, die wiederum Caspase 3 aktiviert und dadurch die Apoptose induzieren kann (Morishima et al., 2002).

In derselben Studie konnte auch gezeigt werden, dass eine Überexpression von MAGE-A3 die Aktivität von Caspase 12 supprimieren kann und dadurch einen antiapoptotischen Effekt bei ER Stress aufweist.

#### 2.0 ZIELSETZUNG

Das Multiple Myelom (MM) lebensbedrohliche, ist eine hämatologische Systemerkrankung, die trotz Entwicklung neuer Therapieansätze, z.B die der Stammzelltransplantation, sowie der Etablierung neuer therapeutischer Substanzen wie Thalidomid, Lenalidomid und Bortezomib nach wie vor hohe Rückfallquoten im Patientenkollektiv im Zusammenhang mit der Tendenz Entwicklung zur chemotherapieresistenter Erkrankungsentitäten aufweist.

Unter diesen Gesichtspunkten werden die CT-Ag wie MAGE-C1/CT7 und MAGE-A3, Vertreter einer Klasse tumorspezifischer Proteine, als mögliche therapeutische Zielproteine im Zusammenhang mit immuntherapeutischen Ansätzen betrachtet. Bisher waren Erkenntnisse zu biologischen Funktionen der oben genannten CT-Ag im MM kaum vorhanden.

In dieser Arbeit soll erstmals die Funktion der zwei im MM regelhaft exprimierten als auch prognostisch relevanten CT-Ag MAGE-C1/CT7 und MAGE-A3 untersucht werden (Atanackovic et al., 2009, Lim et al., 2001, Dhodapkar et al., 2003, Jungbluth et al., 2005). Dies soll durch Nutzung des sogenannten "genesilencing" bzw. "knockdown" mit RNAi-Technik in entsprechenden Myelomzelllinien untersucht werden. Das heißt es wird angestrebt, die Expression der CT-Ag MAGE-C1/CT7 und MAGE-A3 mittels RNAi-Technik in humanen Zelllinien des Multiplen Myeloms temporär zu unterbinden, um daraus resultierende, funktionale Effekte der CT-Ag beim Multiplen Myeloms untersuchen und ableiten zu können.

Daher muss die Technik des "genesilencing" in diesen Zelllinien bzgl. Transfektionsmethodik, "genesilencing" Effektivität sowie Zytotoxizität etabliert werden und die entsprechenden "genesilencing" Effekte auf Proteinebene im Westernblot dargestellt werden.

Zusätzlich sollen Wechselwirkungen des "genesilencing" in der Expression der anderen CT-Ag untersucht werden, sogenannte additionale Effekte, wie sie bei MAGE-A3/A6 aufgrund erheblicher Sequenzhomologien z.B. auftreten.

Vorrangig sollen weitere Versuchsreihen die Beteiligung der zu untersuchenden CT-Ag an grundlegenden Zellmechanismen veranschaulichen. Dabei sollen Effekte auf Proliferationsverhalten, Zelladhäsion, Chemosensibilität, Klonogenität und Apoptose in Bezug auf das spezifisches "genesilencing" untersucht werden.

Ferner sollen in diesen Untersuchungen auch die CD-138-negativen Myelomzellen, mögliche Vorläuferzellen des MM, einbezogen werden (Matsui et al., 2004).

# 3.0 MATERIAL & METHODEN (ALLGEMEINER TEIL)

# 3.1. Allgemein benötigte Geräte

Geräte Hersteller/Ort/Land

Brutschrank, TYP 1705309900 312 WTB binder, Tuttlingen, Deutschland

Eismaschine Hoshizaki, Tokio, Japan

Kühlschrank mit Gefrierfach Liebherr, Biberach, Deutschland

Kühltruhe, -80 °C Kryotech, Donat, Schweiz

Laborpipetten Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Mikrowelle SHARP R-210A Sharp, Osaka, Japan

Tischzentrifuge Thermo Fischer Scientific, USA
Zentrifuge, 6K10 Thermo Fischer Scientific, USA
Mikroskop Olympus, Hamburg, Deutschland
Wasserbad: Köttermann Ebel Labor, Hamburg, Deutschland

Vortex-Genie 2 Scientific-Industries, New York, USA
Rüttler Scientific-Industries, New York, USA

FACS Aria cell-sortig system BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

# 3.2. Allgemein benötigte Programme

Excel 2003 Microsoft, Unterschleißheim,

Deutschland

Word 2003 Microsoft, Unterschleißheim,

Deutschland

Corel Draw X4 Corel, Ontario, Kanada

Quantaty One Biorad, Hercules, USA

Photoshop CS3 imaging software Microsoft, Unterschleißheim,

Deutschland

SPSS IBM Company, USA

# 4.0 MATERIAL & METHODEN (SPEZIELLER TEIL)

#### 4.1. Zellkultur

#### Zelllinien:

MOLP-8 DSMZ, Braunschweig, Deutschland KMS-12-BM DSMZ, Braunschweig, Deutschland EJM DSMZ, Braunschweig, Deutschland IM-9 DSMZ, Braunschweig, Deutschland RPMI-8226 DSMZ, Braunschweig, Deutschland NCI-H929 DSMZ, Braunschweig, Deutschland OPM-2 DSMZ, Braunschweig, Deutschland LP-1 DSMZ, Braunschweig, Deutschland

Brown Ludwig Institute for Cancer

Research, New York, USA

SK-007 Ludwig Institute for Cancer

Research, New York, USA

#### Chemikalien:

RPMI 1640 Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DMEM Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Fetales Bovines Serum (FBS)

Lonza, Basel, Schweiz

Penicillin 10.000 U/ml Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland Streptomycin 10.000 µg/ml Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

0,05% Trypsin-EDTA

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

#### Material:

Zellkulturpipetten steril (5 ml, 10 ml, 25 ml)

15 mL, 25 mL steril Gefäße

Zellkulturflaschen (25 cm², 75 cm²)

6-Well-Platten

Greiner, Kremsmünster, Österreich Greiner, Kremsmünster, Österreich TPP, Trasadingen, Schweiz Nunc, Roskilde, Dänemark

#### Zusammensetzung der Medien:

RPMI 1640 (für KMS-12-BM/RPMI-8226) + 1% Penicillin/Streptomycin +10% FBS

DMEM (für Zelllinien MOLP 8) + 1% Penicillin/Streptomycin +10% FBS

Alle Zelllinien wurden in einem 37°C warmen Inkubator bei 5% CO2 und Wasserdampfsättigung gehalten. Der Inkubator wurde alle zwei Wochen mit Ethanol (70%) gereinigt. Alle Arbeiten erfolgten unter einer Reinluftbank. Bei allen Zelllinien handelt es sich um Suspensionszelllinien, die alle 2-3 Tage geteilt/ "gesplittet" wurden. Voraussetzung für die Teilung der Zellkultur ist eine optische Konfluenz/Dichte von 60-70% (unter dem Mikroskop zu bestimmen).

Die Myelomzelllinien KMS-12-BM und RPMI-8226 wurden in RPMI mit Penicillin/Streptomycinzusatz (je 1%ig) sowie aktivierten FCS (fetales Kälberserum) kultiviert. Bei der Teilung wurde das halbe Zellflaschenvolumen entnommen, in ein entsprechendes Falcon überführt, zweimalig mit DPBS gewaschen sowie in Zwischenschritten bei 1400Rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet (Zellmasse am Gefäßboden) wurde im Anschluss in 20 ml RPMI aufgenommen. Es erfolgte die Weiterverwendung in den entsprechenden Experimenten.

Die Zellkulturen der Zelllinie MOLP-8 wurden zunächst mit Trypsin vorbehandelt. Die "Trypsinierung" wurde nach 5 min bei 37° C gestoppt. Das weitere Vorgehen entspricht dem oben genannten. Alle benutzten Lösungen wurden auf 37° C vorgewärmt.

#### 4.2. RNAi

#### Material:

BLOCK-iT<sup>TM</sup> Fluorescent Oligo Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 Reagenz Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland RNA Stealth<sup>TM</sup> Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland Optimem I/II medium Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Optimem I/II medium Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland 24-well plate Greiner, Kremsmünster, Österreich

RNAi Basic Control Kit-Human Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Kamera Canon, Krefeld, Deutschland

# Programme:

BLOCK-iT<sup>TM</sup> RNAi Designer Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

# Materialbeschreibung:

"BLOCK-iT<sup>TM</sup> Fluorescent Oligo" sind fluoreszenzmarkierte, doppelsträngige RNA ohne bekannte Sequenzhomologien im menschlichen Genom, die der einfachen und schnellen optischen Kontrolle der Aufnahme der Transfektionsprodukte dienen. Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 Reagenz ist eine gebräuchliche, kationische, auf Lipiden basierende Reaganz, die dem Transport von "BLOCK-iT<sup>TM</sup> Fluorescent Oligo" und "Stealth<sup>TM</sup> RNA" oder Standard siRNA Oligomeren in eukaryonte Zellen zwecks RNAi-Analyse dient (Gitlin et al., 2002, Yuan et al., 2002)

Zur temporären Herabregulation der Expression der Zielproteine nutzten wir die "RNAi stealth-Technologie" von Invitrogen, da sie im Vergleich zur herkömmlichen siRNA-Methodik eine höhere Spezifität aufweisen, geringen Zellstress verursachen und ein längere Haltbarkeit haben soll (Webpage, 2007)

Bei Kenntnis der Sequenz des Zielgenes wurde entsprechende RNAi (Basenlänge 25 n) sowie eine entsprechende negative Kontroll-RNAi mittels des "BLOCK IT RNAi

Designer" von Invitrogen™ generiert und validiert. Die jeweiligen Zielsequenzen befanden sich in dem ORF (Open Reading Frame) des jeweiligen Zielgenes, aber außerhalb der MAGE-Common-Region. Die entsprechenden Sequenzen waren für MAGE-A3

- 5'-UCG UCG GAA AUU GGC AGU AUU UCU U-3';
- 5'-AAG AAA UAC UGC CAA UUU CCG ACG A-3';
- 5'-GAG GAG CUG AGU GUG UUA GAG GUG U-3';
- 5'-ACA CCU CUA ACA CAC UCA GCU CCU C-3'

und für MAGE-C1/CT7

- 5'-CAC CUU GCU AGA GAG UGA UUC CUU G-3';
- 5'-CAA GGA AUC ACU CUC UAG CAA GGU G-3';
- 5'-AAA GUA GCC CGU GUA CCU GCU GAU G-3':
- 5'-CAU CAG CAG GUA CAC GGG CUA CUU U-3'

# **Transfektionsvorgang:**

Die Zellen der Zelllinien KMS-12-BM/Molp8 wurden bei 60% Konfluenz im Optimem-I-Medium ohne Serum überführt und mit einer Konzentration von 3x10<sup>5</sup>/ml in einem Gesamtvolumen von 350 μl in eine 24-well Platte ausplattiert. Lipofectamine 2000, eine auf der Methode der kationischen Lipofektion basierende Reagenz, sollte vor Gebrauch gut gemischt werden, anschließend wurde je 1 μl der Lipofectaminereagenz im 50 μl Optimem-I-Medium ohne Serum aufgelöst. Nach erneutem gründlichem Mischen sollte die Lösung für 5 min. bei Raumtemperatur inkubieren. Währenddessen werden 50 pmol der Stealth RNAi in 50 μl Optimem-I-Medium ohne Serum in einem "Well" einer Gewebskulturplatte oder einem anderen sterilem "Mischgefäß" aufgelöst. Zu der RNAi/Medium-Lösung wurden im weiteren Verlauf 1 μl "Fluorescent Control" zugefügt. Nach fünfminütiger Inkubationszeit wurde die angesetzte "Lipofectamine 2000-Reagenz" vollständig der RNAi/Medium-Lösung zugeführt und vermischt. Die gesamte Lösung wurde für weitere 20 min. bei Raumtemperatur belassen. Danach wurden die vorbereiteten Zellen in den RNAi-Lipofectamine-2000-Komplex überführt und bei 37° C für 4 Stunden inkubiert. Nach diesen 4 Stunden Inkubation wurde

1 ml RPMI-1640 mit 10 % FCS sowie 10,000 units/ml Penicillin und 10,000  $\mu g$  Streptomycin dem RNAi-Lipofectamine-2000-Zellkomplex zugeführt. Das Endvolumen sollte demzufolge 1,5 ml betragen. Nach 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 7 d und 10 d erfolgten jeweils "Zellernten" zur Herstellung entsprechender Lysate.

Zur Evaluation der Effektivität des Transfektionsvorganges wurden die Zellen der entsprechenden Zelllinien mit 50 pmol spezifischer RNAi, 2,5 mg/ml "Lipofectamine 2000" und 100 nM "Block-it Fluorescent Oligo" transfiziert. Die so behandelten Zellen wurden unter 40-facher Vergrößerung unter dem Breitlichtmikroskop betrachtet und die Transfektionseffektivität optisch begutachtet. Die Bilddokumentation erfolgte mithilfe einer handelsüblichen Digitalkamer, die Bildbearbeitung mit Adobe Photoshop CS3 imaging software. Dabei ergab sich eine Transfektionseffizienz von 70-80% (Anteil der fluoreszenzhaltigen Zellen bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen) und eine Apoptoserate von weniger als 5% 24 Stunden nach Transfektion.

#### 4.3. WesternBlot/Proteinimmunoblot

#### Material:

XCell SureLock<sup>TM</sup> Mini-Cell
XCell II<sup>TM</sup> Blot Module Kit CE Mark
NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gel 1.0mm12well
Top-Block<sup>TM</sup>
Sponge Pad for XCell II<sup>TM</sup> Blotting
Chromatography paper 3mm chr 15x20cm
Hybond<sup>TM</sup>-ECL<sup>TM</sup>-Nitrocellulose membrane
Amersham Hyperfilm<sup>TM</sup> MP (18 × 24 cm)
Entwicklungkammer 18 x 24cm
Power Supply Model 250 / 2,5
Falcons 15 ml/50 ml
E-Cups/Eppendorf tubes 1,5 ml

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Sigma Aldrich, Buchs, Schweiz
Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Whatman, Maidstone, UK
GE Healthcare, NY, USA
GE Healthcare, NY, USA
Rego, Augsburg, Deutschland
Biorad, Hercules, USA
Greiner, Kremsmünster, Österreich
Eppendorf; Hamburg, Deutschland

Entwickler

Rego, Augsburg, Deutschland

Chemikalien:

NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20x)

NuPAGE® Transfer Buffer (20x)

NuPAGE® LDS Sample Buffer(4x)

NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x)

NuPAGE® Antioxidant

Proteaseinhibitoren

SOV

TBS-Tween® Puffer

ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Analysis System

RIPA Lyse Puffer

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Sigma Aldrich, Buchs, Schweiz

Sigma Aldrich, Buchs, Schweiz

Sigma Aldrich, Buchs, Schweiz

GE Healthcare, NY, USA

Sigma Aldrich, Buchs, Schweiz

Antikörper:

Primäre monoklonale Antikörper (mAb):

mAb CT7-33 für MAGE-C1/CT7

Ludwig Institute for Cancer

Research, New York, USA

mAb M3H67 for MAGE-A3

Ludwig Institute for Cancer

Research, New York, USA

Sekundäre monoklonale Antikörper (mAb):

HRP-labeled anti-mouse mAb

R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland

Andere Antikörper:

mAb ACTB

Santa Cruz, Santa Cruz, USA

Der Westernblot bzw. Proteinimmunoblot ist eine Untersuchungstechnik, die zum Nachweis spezifischer Proteine in einer entsprechenden Probe genutzt wird. Mithilfe der Gelelektrophorese werden die Proteine nach Länge (bei denaturierten Proteinen) oder nach ihrer Tertiärstruktur (native/nicht denaturierte Proteine) separiert. Dieser Separation folgt ein Transfer der Proteine auf eine geeignete Membran (z.B. Nitrozellulose), die Inkubation und folglich Markierung mit für das Zielprotein spezifischen Antikörpern und einem weiteren reagenztragenden Anti-Antikörper zur optischen Ergebnisdarstellung (Towbin et al., 1979, Renart et al., 1979).

## WesternBlotlysate/Proteinlysate:

Die Zellen (näherungsweise 3x10^5) wurden in 15 ml Falcons überführt und zentrifugiert (Einstellungen: 20° C, 8 min, 1300/min) (Zentrifuge: 6K10/Sigma®). Der Überstand wurde verworfen und die konzentrierte Zellmasse vom Gefäßboden mobilisiert. Daraufhin wurden 500 μl RIPA Lyse Puffer (PBS mit 1% Igepal CA-630, 0,5% Sodiumdeoxycholate und 0,1% SDS) sowie je 15 μl Proteaseinhibitor und SOV hinzugegeben und bei 4° C in schrägliegende 15 ml Falcons für 40min "gerüttelt". Dies führte zur Auflösung der Zellstruktur insbesondere der Zellwände und einer Verfügbarkeit des Zytoplasmas inklusive der zelleigenen Proteine. Im Anschluss erfolgte der vollständiger Transfer in 1,5 ml E-Cups (Eppendorf tubes) sowie ein erneutes Zentrifugieren der Proben (4° C, 30 min, 13000/min; Biofuge Fresco/Heraeus). Der proteinhaltige Überstand wurde unter Auslassung des Pellets (am Gefäßboden befindliches Zellrestmaterial) in neue 1,5 ml E-Cups überführt. Die hergestellten Protein-Lysate konnten anschließend direkt weiterverwendet werden oder gegebenenfalls bei -80° C eingelagert werden. Kommerzielle Gewebelysate von menschlichen Hoden dienten der positiven Kontrolle (Abcam Cambridge, UK).

#### WesternBlot:

Die Proben wurden wie folgt vorbereitet: x μl Proteinlysat (angestrebt wurde eine Zielproteinkonzentration von 30 μg) mit 5 μl NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x) und 2 μl NuPAGE® Sample Reducing Agent (10x) mischen, vortexen, zentrifugieren (4-22° C, 15 s, max./min) und für 10 min bei 70° C im Wasserbad denaturieren (Wasserbad Köttermann/Walter F.C. Ebel Laboratoriumbedarf), d.h. die Tertiärstruktur der Proteine

wurde aufgelöst, sodass unterschiedlich lange Polypeptidketten zur Verfügung standen. Zwischenzeitlich wurden für die Gelelektrophorese die XCell SureLock<sup>TM</sup> Mini-Cell und NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gele 1,0 mm vorbereitet sowie ein Puffer aus NuPAGE® MES SDS Running Buffer (20x) angesetzt und hinzugegeben. Die Proben wurden nach erfolgtem Wasserbad abermals zentrifugiert (Biofuge Fresco/Heraeus) und je 30 µl denaturiertes Proteinlysat in die entsprechenden Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 195 V gestartet. Diese wurde für 1 h durch den Powersupplier: Power Supply Model 250/2,5 von Biorad aufrechterhalten. Die notwendige Kühlung der Elektrophorese-Apparatur erfolgte, indem die Versuchsanordnung im Eiswasserbad aufgebaut wurde. Anschließend wurden die NuPAGE® 4-12% Bis-Tris Gele 1,0 mm aus der Verkleidung gelöst und zurechtgeschnitten. Die Gele wurden dann zwischen (Reihenfolge von außen nach innen) je 2-3x Sponge Pads, 2x feuchte handelsübliche Pappe mit direkter Auflage auf die aktivierte Amersham  $Hybond^{TM}$ - $ECL^{TM}$ Nitrocellulosemenbrane gelegt und in das XCell II<sup>TM</sup> Blot Module Kit eingefügt und in die XCell SureLock<sup>TM</sup> Mini-Cell eingebaut. Das XCell II<sup>TM</sup> Blot Module Kit wurde mit angesetztem Puffer aus NuPAGE® Transfer Buffer (20x) aufgefüllt, die Außenkammer mit herkömmlichen Wasser. Der Blotvorgang, d.h. der Transfer der zuvor separierten Proteine von dem Elektrophoresegel auf die Nitrocellulosemembran, erfolgte bei konstant 25 V für 1 h. Die Kühlung erfolgte mittels Eiswasserbad. Anschließend wurde die Amersham Hybond<sup>TM</sup>-ECL<sup>TM</sup> Nitrocellulosemenbrane in 25 ml Top-Block<sup>TM</sup> inkubiert (für mind. 12 h bei 4° C). Dieses sogenannte "Blocking" soll unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran blockieren, um falsch-positive Bindungsreaktion der spezifischen Antikörper zu vermeiden. Die Top-Block<sup>TM</sup> Lösung wurde im weiteren Verlauf verworfen und die Amersham Hybond<sup>TM</sup>-ECL<sup>TM</sup> Nitrocellulosemenbran mit 10 ml Top-Block<sup>TM</sup> und 6 µl des jeweiligen primären Antikörpers (siehe Material) für 3-4 h unter Schütteln bei Lichtausschluss inkubiert. Der Top-Block<sup>TM</sup> /Antikörper-Mix wurde verworfen und die Amersham Hybond<sup>TM</sup>-ECL<sup>TM</sup> Nitrocellulosemenbrane ingesamt 4-mal 10min mit 25 ml TBS-Tween® Puffer (Waschpuffer) unter Schütteln gewaschen, um unspezifisch gebunden Primärantikörper nach Möglichkeit zu vermeiden. Dann wurde erneut 10 ml Top-Block<sup>TM</sup> + 1,5 μl sekundär

Antikörper (siehe Material 2.1.3.) wie bei der Erstinkubation hinzufügt und 1 h unter Schütteln abgedeckt inkubiert. Der Top-Block<sup>TM</sup>/Ak-Mix wurde verworfen und die Amersham Hybond<sup>TM</sup>-ECL<sup>TM</sup> Nitrocellulosemenbrane 4-mal 10 min mit 25 ml TBS-Tween® Puffer (Waschpuffer) unter Schütteln gewaschen. Daraufhin wurde die Amersham Hybond<sup>TM</sup>-ECL<sup>TM</sup> Nitrocellulosemenbrane in 6 μl ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Analysis System (je 3 μl Detektionreagenz 1&2) 1 min unter Schütteln inkubiert. Dabei sollte nach Möglichkeit unter möglichst geringer Lichtexposition gearbeitet werden. Die Amersham Hybond<sup>TM</sup>-ECL<sup>TM</sup> Nitrocellulosemenbrane wurde dann mit handelsüblichem Löschpapier leicht getrocknet und in die rego 18x24cm Entwicklungskammer überführt. Die Ergebnisse wurden in der Dunkelkammer auf Amersham Hyperfilm<sup>TM</sup> MP (18×24 cm) mittels Entwickler Curix 60 Agfa optisch dargestellt. Die Quantifizierung erfolgte über die Quantifizierungssoftware Quantity One von BioRad.

# 4.4. MTT Cell Viability Assay

Material:

MTT Cell Proliferation Assay ATCC, Manassas, USA

96-well Platte Sigma Aldrich, Buchs, Schweiz

Spectrophotometer Tecan, Männedorf, Schweiz

Der MTT-Assay wird im angloamerikanischen Sprachbereich den "colorimetric assays" zugeordnet, dies sind Experimente, die qualitative und/oder quantitative Unterschiede durch Farbwechsel darstellen. Gelbes MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromid, ein Tetrazol) wird in lebenden Zellen zu violettem Formazan reduziert. Die Quantifizierung erfolgt durch vergleichende Lichtabsorbtionsmessung bei einer vorgegebenen Wellenlänge im Spectrophotometer. Häufig wird dieses Art der Versuchsanordnung zur Verifizierung der Zytotoxizität von diversen Substanzen verwendet, da diese zu metabolischen Disbalancen in den Zellen führen sollen und auf

42

diesem Weg die enzymatische Aktivität der Zellen senkt und folglich die Intensität des Farbwechsels vermindert (Mosmann, 1983, Cory et al., 1991, Bernas and Dobrucki, 2002). Die mit der jeweiligen CT-Ag spezifischen/unspezifischen RNAi transfizierten Myelomzelllinien als auch nicht transfizierte Zellen derselben Zelllinie wurden in einer Konzentration von 3000 Zellen je Well auf eine 96-well Platte mit einem Endvolumen von 100 μl ausplattiert und über Nacht bei bei 37° C und 5% CO2 inkubiert. Zur Nullwertermittlung wurden zusätzlich 100 μl Medium (RPMI s.o.) ausplattiert. Im Folgenden wurden 10 μl MTT-Reagenz jedem Well, auch den Kontrollen, zugeführt und für weitere 4 h im Brutschrank bei 37° C und 5% CO2 inkubiert. Wenn nach vier Stunden die Lilafärbung des Präzipitates deutlich unter dem Mikroskop zu erkennen war, wurden 100 μl "Detergent Reagenz" allen Wells zugeführt und dabei sorgsam mit der Pipette durchmischt. Die Absorption wurde bei 465/540 nm in einem "Spectrophotometer" gemessen und ausgewertet. Die lediglich mit Medium (RPMI s.o.) gefüllten Wells sollten dabei Werte nahe Null (+/- 0,1) aufweisen.

Bei einigen Versuchsanordnungen erfolgte eine Vorbehandlung der Zelllinien mit 10 nM Bortezomib oder 20 µM Melphalan für 12 Stunden vor Beginn des MTT-Assays.

#### 4.5. Tunel Assay

#### Material:

TUNEL technique APT110 Kit

1% Paraformaldehyde

**PBS** 

Fluoreszenzmikroskop Axioskop 2

Millipore, Billerica, USA

Sigma Aldrich, Buchs, Schweiz

Sigma Aldrich, Buchs, Schweiz

Zeiss, Jena, Deutschland

"Terminal desoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling" (TUNEL) stellt eine Methodik zum Nachweis von DNA-Fragmenten, wie sie häufig nach einem Zelluntergang vorzufinden sind, durch eine terminale Markierung eben dieser dar. Mit einem

Fluoreszenzfarbstoff markierte dUTP-Nukleotide werden durch das Enzym Terminal-Transferase an die DNA-Bruchstücke gebunden. Die so markierten Fragmente lassen sich u.a. mittels Fluoreszenzmikrospkopie darstellen. Auf diese Weise lassen sich neben apoptotischen Zellen auch solche mit schwerwiegenden DNA-Schädigungen darstellen (Gavrieli et al., 1992).

Es wurde "Terminal desoxynucleotidyl transferase" zur DNA-Markierung mit "Fluorescein-dUTP" genutzt (TUNEL technique; APT110 Kit, Millipore). Die entsprechend vorbehandelten Myelomzelllinien wurden für eine Stunde in 1% Paraformaldehyd fixiert. Darauf folgte eine zweimalige Waschung in PBS, ein einstündiges Abkühlen auf Eis und unter Zugabe der vorgegebenen Menge von 70% Ethanol eine 18-stündige Lagerung bei -20° C. Es folgte eine erneute Waschung mit PBS, dann wurden die Zellen in der vorgegebenen Lösung (10 μ1 TdT Reaction Buffer, 0,75 μ1 TdT Enzym, 8 μ1 Fluorescein-dUTP, 32,25 μ1 destilliertes Wasser) für eine Stunde bei 37° C inkubiert. Erneutes Waschen mit PBS und Zugabe von PI/RNAse-A-Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Analyse mit der Durchflusszytometrie als auch mit dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte innerhalb von 3 Stunde.

#### 4.6. Annexin A5 affinity assay

Material:

Annexin A5 affinity assay

BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

Annexin A5 findet Verwendung bei der Darstellung von an der äußeren Zellmembran Phosphatidylserin exprimierenden Zellen. Diese "äußere" Phosphatidylserinexpression deutet auf apoptotische zelluläre Ereignisse hin (Koopman et al., 1994, Vermes et al., 1995)

Die Zellseperation anhand von Annexin A5-markierten Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie 72 Studen nach Transfektion und somit nach dem jeweiligen

44

spezifischen "genesilencing" entsprechend der Herstellerempfehlungen durchgeführt (hier BD Biosciences, San Jose)

## 4.7. Colony formation Assay

Material:

Methocult Medium StemCell Technologies, Köln,

Deutschland

6 Well Platten Nunc, Roskilde, Dänemark

Kamera Canon, Krefeld, Deutschland

In dieser Versuchsanordnung erfolgt das Zellwachstum in viskösem Medium, zumeist basiert dieses auf einer gelierenden Agarkomponente oder anderen hochviskösen Zusätzen, wie z.B. der von uns benutzten Methylzellulose. Dieses "halbfeste" Medium reduziert die Zellbewegung drastisch und erlaubt einzelnen Zellen somit die stationäre Entwicklung von Zellklonen, die im Verlauf zu einzelnen Zellkolonien anwachsen. Durch einfaches Auszählen der Kolonien lassen sich vergleichende Aussagen bezüglich der Zellvitalität in den jeweiligen Zelllinien machen. Im angloamerikanischen Raum ordnet man dieses Experiment den sogenannten "clonogenic assays" zu. (Barr et al., 1985, Bradley and Metcalf, 1966, Broxmeyer, 1984, Dainiak et al., 1985, Dresch et al., 1977, Iscove and Sieber, 1975, Metcalf, 1977, Pike and Robinson, 1970, Rosendaal et al., 1986)

Die jeweils spezifisch sowie unspezifisch transfizierten Myelomzelllinien als auch die nicht transfizierten Zellen derselben Zelllinie wurden in einer Dichte von 1000 Zellen/ml in 1 ml Methylcellulose Medium (StemCell Technologies) in einem 6 Well Zellkulturschale ausplattiert. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank bei 37° C und 5% CO2 inkubiert. Die Auszählung der Kolonien mit einer Zellzahl > 40 Zellen erfolgte zwischen dem Tag 7 und dem Tag 10 nach Kulturbeginn. Die photographische Dokumentation erfolgte mit einer handelsüblichen Digitalkamera.

45

## 4.8. BrdU-Assay

Material:

Biotrak<sup>TM</sup> ELISA proliferation assay

microtiter plate spectrophotometer

GE Healthcare, NY, USA

SLT Lab., Achterwehr, Deutschland

Bromodeoxyuridin (5-bromo-2-deoxyuridin, BrdU) ist ein synthetisches Nukleosid, das sich analog zu Thymidin verhält. BrdU wird im wissenschaftlichen Umfeld zumeist zur Detektion von proliferierenden Zellen verwandt (Pike and Robinson, 1970).

Dies basiert auf der Fähigkeit von BrdU, sich anstelle von Thymidin in neu synthetisierte DNA von sich replizierenden Zellen (vorzugsweise in der S-Phase des Zellzyklus) einzubauen. Mithilfe von spezifischen Anti-BrdU-Antikörpern lässt sich dieser Einbau nachweisen und erlaubt somit Rückschlüsse auf die DNA-Replikationsintensität einzelner Zellen, folglich auf die stattgehabte Zellproliferation. Die Antikörperbindung bedarf einer Denaturierung der DNA-Ketten. Dies erfolgte in der Regel durch Hitze oder Säureexposition.

Aufgrund der interkalierenden Eigenschaften von BrdU ist die Substanz als potenziell mutagen einzustufen und erfordert somit entsprechende Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang.

In dem von uns genutzten "Biotrak<sup>TM</sup> ELISA proliferation assay" wurden die Myelomzelllinien mit 10 μM Bromodeoxyuridin (BrdU) in den letzten 18 Stunden Zellkulturzeit behandelt. Nach Fixierung erfolgte die Inkubation mit peroxidasetragenden Anti-BrdU-Antikörper nach Versuchsvorschrift. Die resultierenden Immunkomplexe wurden mittels einfacher Substratreaktion detektiert sowie mittels Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 450 nm mit dem "microtiter plate spectrophotometer" (SLT Labinstruments) quantifiziert.

# 4.9. CFSE-Assay

Material:

CFSE Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

FACS BD Bioscience, Heidelberg,

Deutschland

CFSE, ein Succinimidylester von Carboxyfluorseceindiacetat, ist ein fluoreszierender Farbstoff, der frei in die Zellen diffundiert und dort an intrazelluläre Proteine bindet. Im Falle von einer Zellteilung verteilt sich der Farbstoff gleichmäßig auf alle Tochterzellen, folglich vermindert sich mit Fortschreiten der Zahl der Zellteilungen die Intensität der intrazellulären Fluoreszenz (Lyons, 2000).

Auf diesem Mechanismus aufbauend kann ein quantitativer Vergleich bezüglich der Zellproliferation auf einfachem Wege in der Durchflusszytometrie dargestellt werden.

Für die FACS-Analyse wurden die Myelomzelllinien mit 700 ng/ml CFSE beimpft. Die Intensität der resultierenden grünlichen Fluoreszenz wurde mittels Durchflusszytometrie nach 0, 12, 24, 48 und 72 Stunden Zellkulturzeit gemessen.

#### 4.10. Adhesion Assay

Material:

RPMI-1640 + 0.2% BSA Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

96-well plates Sigma Aldrich, Buchs, Schweiz

Fibronectin (20 µg/ml) Sigma Aldrich, Buchs, Schweiz

RPMI 1640 Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Chromogen Substrate Solution Alpco, Salem, USA

Spectrophotometer SLT Lab., Achterwehr, Deutschland

Die Zelladhäsion ist ein komplexer Prozess, dem viele unterschiedliche molekulare Interaktionen wie Rezeptor-Liganden-Bindung, Veränderungen im Ablauf intrazellulärer "signaling pathways" und Modulation zytoskelletaler Arrangements zugrunde liegen.

In diesem Sinne misst ein "adhesion assay" nicht nur den Kontakt zwischen Zelle und extrazellulären Adhäsionsproteinen, sondern macht auch Aussagen zu anderen zellulären Ereignissen (Humphries, 2009).

Der hier verwendete "adhesion assay" basiert auf einer kolorimetrischen Detektion und geht auf *Kueng et al.* zurück (Kueng et al., 1989).

72 Stunden nach erfolgter Transfektion der jeweiligen Myelomzelllinien wurden die entsprechenden Zellen in RPMI-1640 + 0.2% BSA ("adhesion medium") in einer Konzentration von 5x10<sup>6</sup> /ml überführt. Es folgte eine Inkubation des Ansatzes für 30 min bei 37° C sowie eine zweimalige Waschung. Daraufhin erfolgt eine erneute Überführung in "adhesion medium" mit einer anschließenden Aussaat in Triplikaten in mit Fibronectin (20 μg/ml) vorbehandelten 96-well plates. Es folgte eine weitere Inkubation bei 37° C für insgesamt 4h. Die sich anschließende Waschung (4x) mit RPMI 1640 führte zu einer Entfernung disadhärenter Zellen. Zum Abschluss erfolgt die Auswertung durch Absorptionsmessung mit "Chromogen Substrate Solution" bei 450/620 nm durch das Spektrophotometer.

#### **4.11.** Statistische Analyse

Die statistischen Analysen erfolgten mithilfe der SPSS Software. Der Mann-Whitney-U-Test bildete die Grundlage für die Kalkulation der Differenzen der verschiedenen Versuchsanordnungen. Die Signifikanz wurde für p < 0.05 festgelegt.

# 5.0 ERGEBNISSE

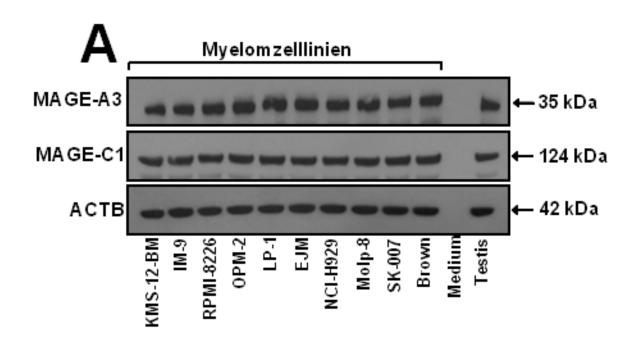
# 5.1. "Gene-silencing" von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7

Da eine ausgeprägte Sequenzhomologie unter den Mage-A-Proteinen anzunehmen war, führten wir zunächst eine Überprüfung der Spezifität unseres M3H67-Antikörpers durch. Dabei konnten wir eine spezifische Bindung des genannten Antikörpers an rekombinanten MAGE-A3 im WesternBlot nachweisen. Bei den rekombinanten Proteinen MAGE-A2, MAGE-A4 und MAGE-A12 gelang dies nicht.

Rekombinantes MAGE-A6 stand uns leider nicht zur Verfügung. Bei einer bekannten Sequenzhomologie von über 95% ist eine Kreuzreaktion jedoch anzunehmen. Dies beachtend ist in den folgenden Ergebnissen eher von einer Kombination MAGE-A3/A6 zu sprechen.

In Vorbereitung auf die funktionalen Analysen bezüglich der Proteinfunktion von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7 im MM wurde zunächst die regelhafte Expression der genannten CT-Ag auf Proteinebene mittels WesternBlot nachgewiesen.

Dabei zeigte sich eine regelhafte und deutliche Expression von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7 in allen 10 untersuchten Zelllinien des Multiplen Myeloms (**Grafik 1A**), ersichtlich an den Banden bei 35 kDa (*MAGE-A3*) sowie 124 kDa (*MAGE-C1/CT7*) im WesternBlot.



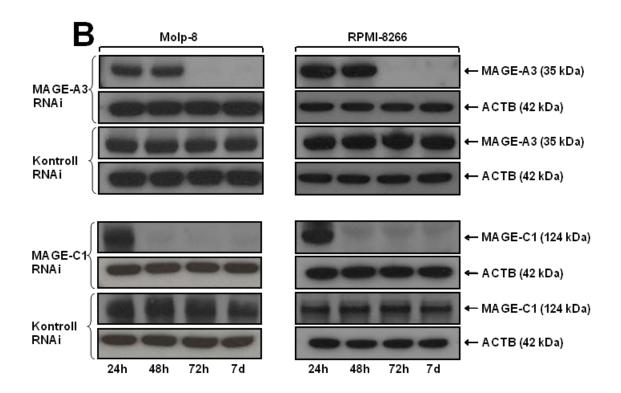
# Grafik 1A: Expression von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7 in 10 Myelomzelllinien

10 Myelomzelllinien wurden hinsichtlich ihrer Expression von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7 Proteinen mittels Western Blot analysiert. Beta-actin (ACTB) diente zur internen Kontrolle der Proteinqualität. Das Proteinlysat von Zellen des menschlichen Hodens (Testis) diente der Positivkontrolle. Zellfreies Medium (Medium) entsprach der Negativkontrolle. Zu sehen ist eine durchgehende Expression der genannten CT-Ag in allen 10 dargestellten Zelllinien.

Da MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7 von allen uns zur Verfügung stehenden Myelomzelllinien exprimiert wurden, war uns eine Funktionsanalyse durch entsprechenden Gentransfer in MAGE-negative Myelomzellen nicht möglich. Deshalb und aufgrund der regelhaften Expression von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7 in allen uns zur Verfügung stehenden Myelomzelllinien sollte die funktionale Analytik besagter CT-Ag auf Basis

eines sogenannten "gene-silencing", d.h. einer Suppression der Proteinexpression mittels RNAi, unternommen werden. Zu diesem Zweck muss die RNAi in die jeweiligen Zellen transfiziert, d.h. mittels chemischer Transfektion (kationische Lipofektion), in die Zelllinien eingebracht werden. In Vorversuchen zeigte sich eine vergleichsweise hohe Transfektionseffektivität von 70 – 80% in den Myelomzelllinien Molp-8 und RPMI-8266, die, wie der Grafik 1A zu entnehmen ist, ebenfalls MAGE-A3 als auch MAGE-C1/CT7 auf Proteinebene exprimieren. Aus diesem Grund wurden unter anderem diese Myelomzelllinien für die im Folgenden dargestellten Experimente verwendet.

In den sich anschließenden Experimenten zum "gene-silencing" verwendeten wir mit MAGE-A3 als auch mit MAGE-C1/CT7 spezifischer RNAi sowie zum Vergleich mit einer unspezifischen RNAi, auch Kontroll-RNAi genannt, transfizierte Zelllinien sowie unbehandelte Zelllinien (im Folgenden nicht dargestellt). Im WesternBlot zeigt sich dabei eine deutliche Expressionsminderung auf Proteinebene sowohl für MAGE-A3 (**Grafik 1B**) als auch für MAGE-C1/CT7 (**Grafik 1B**) für die spezifische Transfektion sowie eine fast unveränderte Expression bei Transfektion mit Kontroll-RNAi.



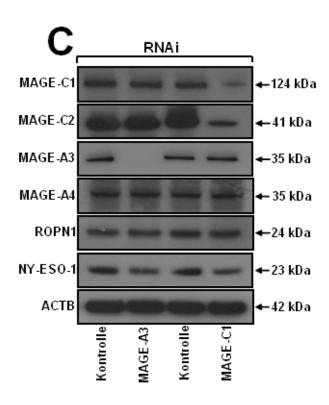
Grafik 1B: "Gene-silencing" von MAGE-A3 und CT7/MAGE-C1

Die Myelomzelllinien Molp-8 (linke Spalte) und RPMI-8226 (rechte Spalte) wurden jeweils mit MAGE-A3 oder MAGE-C1/CT-spezifischer RNAi bzw. mit der sogenannten "Kontroll-RNAi" transfiziert. In den mit spezifischer RNAi behandelten Zelllinien zeigt sich eine Abnahme der MAGE-A3- und MAGE-C1/CT7-Proteinexpression, beginnend innerhalb von 48-72h, anhaltend für mindestens 7 Tage nach erfolgter Transfektion. Dargestellt sind die entsprechenden WesternBlot-Ergebnisse eines repräsentativen Versuches.

Dabei tritt der "gene-silencing" Effekt bei MAGE-A3 am deutlichsten 72 Stunden nach Transfektion auf (**Grafik 1B**), bei MAGE-C1/CT7 bereits nach 48 Stunden (**Grafik 1B**). In beiden Fällen ist die Unterdrückung der Proteinexpression auch noch nach 7 Tagen nachweisbar, gleichwohl das "gene-silencing" mittels RNAi keinem dauerhaften "Gen-

knock-out" entspricht. Nach ca. 12 Tagen ist ein Rückgang des Effektes zu beobachten (hier nicht mit dargestellt).

Zudem bewiesen wir die Spezifität des "gene-silencing" von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7 durch die verwendete RNAi, indem wir "Wechseleffekte" bzw. ein "co-gene silencing" bei anderen Proteinen der MAGE-Familie (z.B. MAGE-A4) als auch bei nicht zur MAGE-Familie gehörenden CT-Antigenen (z.B. Ropporin-1 und NY-ESO-1) im Westernblot ausschließen konnten (**Grafik 1C**).



Grafik 1C: CT-Ag betreffende "co-gene-silencing" Effekte

Die dargestellten WesternBlot-Ergebnisse zeigen, dass keine Wechseleffekte im Sinne eines "co-gene-silencing" bei Behandlung mit der spezifischen RNAi für MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7 bezogen auf andere CT-Ag (hier MAGE-A4, Ropporin-1, NY-ESO-1) in der Zelllinie MOLP-8 nachweisbar sind. Eine Ausnahme bildet das CT-Ag MAGE-C2/CT10, das eine Expressionsminderung nach MAGE-C1/CT7-spezifischer RNAi Behandlung

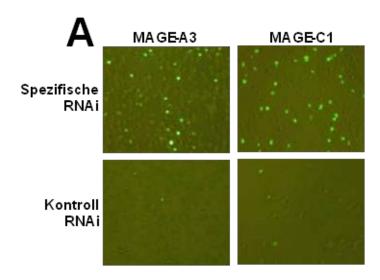
zeigte. Ähnliches wurde nach "gene-silencing" in Zellen der Zelllinie RPMI-8226 unter Verwendung einer zweiten spezifischen RNAi nachgewiesen.

Dadurch lassen sich die noch im Folgenden dargestellten funktionalen Effekte hinreichend auf das spezifische "gene-silencing" von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7 zurückführen und können somit direkt in Verbindung mit der zellulären Funktion des jeweiligen CT-Antigens gebracht werden.

Der darstellbare "gene-silencing"-Effekt von MAGE-C2/CT10 in Zelllinien, die mit MAGE-C1/CT7-spezifischer RNAi transfiziert wurden, führen wir auf eine ausgeprägte genetische Homologie der beiden Proteine zurück (Andrade et al., 2008)

# 5.2. Effekte auf die Apoptose

Bei den Versuchen zum spezifischen "gene-silencing" von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7 zeigte sich bereits 72h nach Transfektion unter dem Mikroskop eine deutliche Zunahme der Zelluntergänge (**Grafik 2A**) in den Zelllinien, die mit spezifischer RNAi transfiziert wurden.

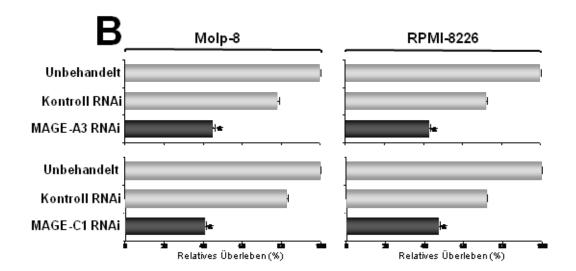


# Grafik 2A: Fluoreszierendes Bild nach "gene-silencing" im TUNEL-Assay

Dargestellt ist das mikroskopische Bild eines repräsentativen Versuches (TUNEL-Assay) 48-72h nach erfolgtem "gene-silencing" von MAGE-A3 bzw. MAGE-C1/CT-7. Die deutliche grüne Fluoreszenz in den Zelllinien, die mit spezifischer RNAi (spezifische RNAi) behandelt wurden, zeugt von einer größeren Menge an DNA-Fragmenten und folglich von einer höheren Apoptoserate. In der Kontrollgruppe mit unspezifischer RNAi-Behandlung (Kontroll-RNAi) zeigt sich nahezu kein Effekt.

Die mit Kontroll-RNAi transfizierten Zelllinien zeigten dagegen ein Wachstum/Apoptoseverhalten, ähnlich dem der unbehandelten, "nativen" Zelllinien. Um die Ergebnisse zu objektivieren und quantitativ darzustellen, wurde ein sogenannter MTT-Assay durchgeführt.

Dabei zeigte sich ein deutlicher Rückgang der Anzahl der lebenden Zellen in der Kontrollgruppen, die mit MAGE-A3 (**Grafik 2B**) und MAGE-C1/CT7 (**Grafik 2B**) spezifischer RNAi transfiziert wurden, im Vergleich zu Kontroll-RNAi transfizierten bzw. nativen Zellkulturen.

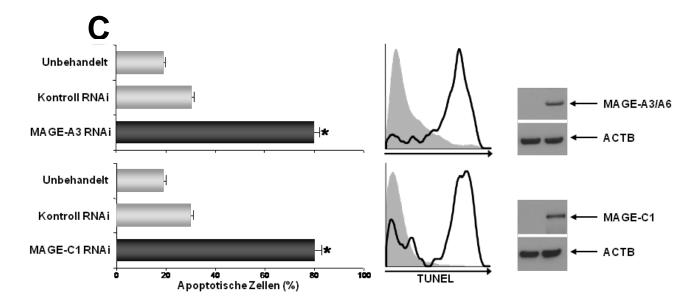


## Grafik 2B: Apoptose nach spezifischem "gene-silencing" im MTT-Assay

Die Myelomzelllinien Molp-8 (linke Spalte) und RPMI-8226 (rechte Spalte) wurden jeweils mit MAGE-A3- oder MAGE-C1/CT7-spezifischer RNAi bzw. mit der sogenannten "Kontrol-RNAi" transfiziert. Die Anzahl der lebenden Zellen, die mit der für das jeweilige Gen spezifischen RNAi bzw. mit der KontrollRNAi transfiziert wurde, wurde im prozentualen Verhältnis zu der Anzahl der unbehandelten und lebenden Zellen (100%) gestellt. Dargestellt sind die Ergebnisse 72h nach Transfektion von spezifischer RNAi für MAGE-A3 bzw. MAGE-C1/CT7. Es zeigt sich eine signifikante Abnahme des prozentuellen Zellüberlebens in der Gruppe nach spezifischen "gene-silening", basierend auf den Ergebnissen des "MTT assays". Die Resultate beruhen auf den Mittelwerten (+/-Standardabweichung) von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Das Sternchen deutet auf den statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen der unbehandelten, Kontroll-RNAi und spezifischer RNAi (\*p<0.05).

Es war jedoch zunächst unklar, ob diese nachgewiesen Reduktion der Zellzahl auf einen antiproliferativen bzw. einen proapoptotischen Effekt des spezifischen "gene-silencing" zurückzuführen ist.

Zur weiteren Analyse dieser Frage führten wir den sogenannten TUNEL-Assay durch. Mithilfe dieses Assays gelang es 72h nach Transfektion mit spezifischer RNAi eine deutlich erhöhte Anzahl apoptotischer Myelomzellen in der Gruppe des spezifischen "gene-silencing" (Grafik 2C) im Vergleich zu den Zelllinien, die mit Kontroll-RNAi behandelt wurden als auch zu den unbehandelten Zelllinien darzustellen.



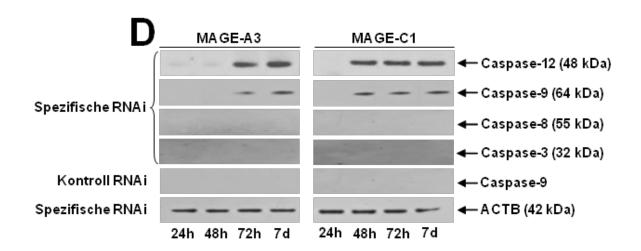
Grafik 2C: Apoptose nach spezifischen "gene-silencing" im TUNEL-Assay

Die Darstellung beruht auf den prozentuellen Anteilen von apoptotischen Zellen in MOLP-8-Zellkulturen. Die Analyse beruht auf den auf Durchflusszytometrie basierenden TUNEL-Assay und erfolgte 72 h nach Transfektion mit spezifischer RNAi für MAGE-A3 bzw. MAGE-C1/CT7. Die Resultate beruhen auf den Mittelwerten (+ Standardabweichung) von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Das Sternchen deutet auf den statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen der unbehandelten Kontroll-RNAi und spezifischen RNAi (\*p<0.05) hin. Der prozentuelle Bezug ist die Gesamtzellzahl. Das "gene-silencing" von MAGE-A3 bzw. MAGE-C1/CT7 führt zu einer signifikanten Zunahme der Zellapoptosen. Die Histogramme zeigen die Resultate eines repräsentativen Experiments (y-Achse: nachweisbare Zellen [aufsteigend]); x-Achse: Konzentration Fluoreszenzfarbstoff markierte dUTP-Nukleotide [anteigend]) im "TUNEL-Assay". Die Gruppe Kontroll-RNAi wird durch die das graue Areal repräsentiert, die Gruppe spezifische RNAi durch das schwarze Areal. Auch hier zeigt sich eine deutliche Zunahme des Nachweises von DNA-Bruchstücken in der Gruppe der spezifischen RNA. Rechts in der Grafik ist eine auf Annexin V-Markierung beruhende Zellsortierung mit anschließender Proteinanalyse im Westernblot gezeigt. Im Gegensatz zur Population der apoptotischen Zellen (linke Spalte) weisen die (über)lebenden Zellen eine signifikante

Expression von dem jeweiligen CT-Ag auf. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich unter Verwendung der Zelllinie RPMI-8226 bei gleicher Versuchsanordnung

Dabei konnten wir zeigen, dass der Verlust des mutmaßlich antiapoptotischen Effektes von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7 Apoptoseraten bis zu 80% provozieren kann (**Grafik 2C**). Zur Verifizierung der Effektivität des "gene-silencing" in überlebenden Zellen wurden, wie üblich, die Zellen der entsprechenden Zelllinien mit der jeweiligen RNAi transfiziert, und nach 72 h erfolgte eine Zellsortierung mittels FACS entsprechend der "Annexin V"-Markierung in die Population der lebenden und der in Apoptose befindlichen Zellen. Die Analyse beider Zellpopulationen mittels WesternBlot zeigte eine deutliche Expression der entsprechenden MAGE-Proteine bei den (über)lebenden Zellen und einen entsprechenden "Expressionsausfall" bei den apoptotischen Zellen (**Grafik 2C, rechtes Bild**). Dies spricht am ehesten dafür, dass das Überleben der wenigen Myelomzellen darin begründet ist, dass durch die Transfektion nicht alle Zellen erfasst werden können. Dies entspräche auch der bereits erwähnte Transfektionseffektivität.

Bei der Analyse der Ursachen für die beschriebene Apoptoseinduktion zeigte sich bei spezifischen "gene-silencing" von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7 eine Expressionszunahme der Caspase-9 und Caspase-12. Dieser Effekt wurde 48 h nach Transfektion mit spezifischer RNAi beobachtet und blieb in den Kontrollgruppen aus. Keine Effekte konnten bei der Expression von Caspase-3 oder -8 dargestellt werden (Grafik 2D).

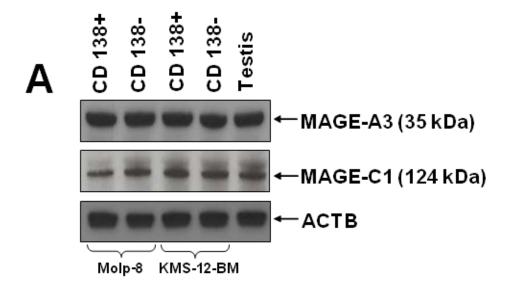


Grafik 2D: Caspasenexpression in Abhängigkeit vom spezifischen "gene-silencing"

Dargestellt sind WesternBlot-Ergebnisse. Es zeigt sich, dass es bei entsprechenden "genesilencing" von MAGE-A3 (linke Spalte) sowie MAGE-C1/CT7 (rechte Spalte) zu einer
Zunahme der Expression von Caspase-12 sowie Caspase-9 nach 48 Stunden (bei MAGEC1/CT7) bzw. nach 72 Stunden (bei MAGE-A3) kommt. Es zeigen sich keine
Expressionseffekte bzgl. Caspase-8 und Caspase-3. Ebenso zeigt sich keine Expression von
(hier exemplarisch dargestellt) Caspase-9 in der Kontrollgruppe. Verwendet wurden
Zellen der Zelllinie MOLP-8.

# 5.3. "Gene-silencing" bei CD138-negativen Zellen des Multiplen Myeloms

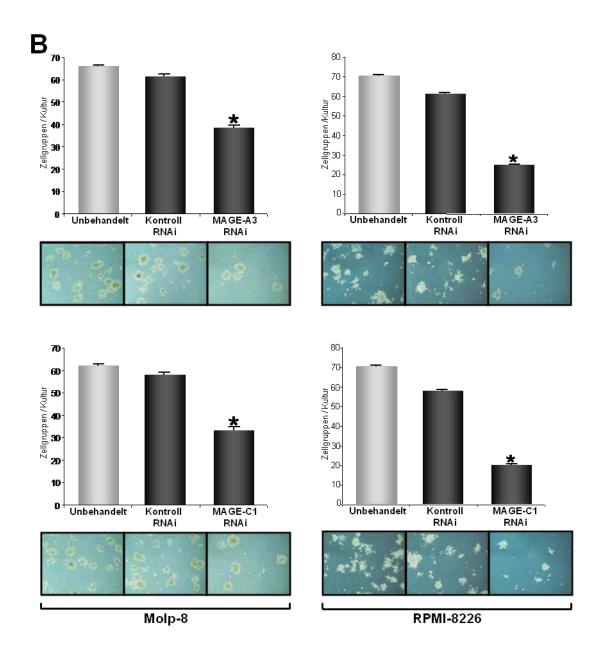
Im Folgenden interessierten wir uns für die Expression bzw. Expressionsunterschiede von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7 in CD138-positiven und CD138-negativen Myelomzellen. Durch Separation dieser Zellpopulationen mittels FACS-Sortierung und anschließenden Expressionsanalysen mittels WesternBlot konnten wir sowohl in der Zelllinie MOLP-8 als auch KMS-12-BM eine deutliche Expression der besagten CT-Ag nachweisen (**Grafik 3A**).



Grafik 3A: MAGE-A3 und CT7/MAGE-C1 Expression in CD138 positiven (+)/negativen(-) Zellen

Vorangehend erfolgte die FACS-Sortierung nach CD138-positiven (+) und CD138-negativen (-) Subpopulationen. Im WesternBlot zeigte sich, dass jeweils in den Zelllinien Molp-8 sowie KMS-12-BM in beiden Subpopulationen (CD138+/CD138-) eine gleichartige Expression von MAGE-A3 als auch MAGE-C1/CT7 darstellbar ist. Positivkontrolle waren Zellen des menschlichen Hodens.

In dem sich anschließenden "Colony formation assay", mit dem wir das klonogene Wachstum der Zellpopulationen messen können, konnten wir zeigen, dass das spezifische "gene-silencing" von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7 auch in CD138-negativen Zellpopulationen sowohl bei MAGE-A3 "gene-silencing" (Grafik 3B) als auch beim MAGE-C1/CT7 "gene-silencing" (Grafik 3B) zur einer signifikanten Reduktion der Anzahl der Zellkolonien führt.



Grafik 3B: CD138-negative Zellen nach "gene-silencing" von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7

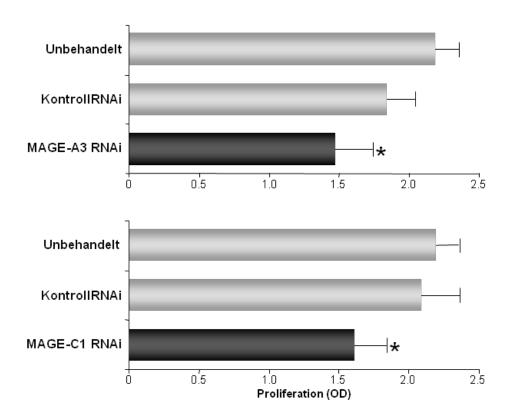
Dargestellt sind die Ergebnisse des "Colony formation assay". Die Kolonien der CD 138 negativen Zellen wurden zwischen dem 7-10 Tag nach Versuchsbeginn ausgezählt. CD 138(-) Zellen der Zelllinien Molp-8 (linke Spalte) und RPMI-8226 (rechte Spalte) wurden

jeweils mit je zwei RNAi spezifisch für die CT-Ag MAGE-A3 (obere Zeile) bzw. MAGE-C1/CT7 (untere Zeile) transfiziert. Die Balken entsprechen jeweils dem Mittelwert (+Standardabweichung) aus drei unabhängigen Experimenten. Die Einheit entspricht den gezählten Zellkolonien in Kultur. Betrachtet werden unbehandelte Zellen (unbehandelt), unspezifisch transfizierte Zellen (Kontroll-RNAi) sowie die entsprechend spezifisch transfizierten Zellen (MAGE-A3 / MAGE-C1/CT7 RNAi. Der Stern (\*) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an (\*p<0.05). Die mikroskopischen Bilder zeigen repräsentative Resultate aus einem Experiment. Zu sehen ist, dass das "gene-silencing" von MAGE-A3- als auch MAGE-C1/CT7 zu einer signifikant geringeren Anzahl von Kolonien CD138-negativen Myelomzellen führt.

#### 5.4. Effekte auf die Proliferation

Im nächsten Schritt sollte die Frage beantwortet werden, inwieweit neben den apoptosehemmenden Eigenschaften andere zellfunktionale Effekte mit der Expression bzw. im Umkehrschluss mit dem "gene-silencing" von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7 in Verbindung stehen. Wir entschieden uns bei dieser Fragestellung für eine Untersuchung der Proliferation der Myelomzellen in Abhängigkeit von der Expression von MAGE-A3 and MAGE-C1/CT7 mittels BRDU-Assay.

Die Auswertung der Versuchsreihe ergab einen geringen proliferationshemmenden Effekt bei einem "gene-silencing" von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7 (**Grafik 4**).



Grafik 4: Proliferation nach "gene-silencing" von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7

Dargestellt sind die Ergebnisse des "BRDU-Assay". Verwendet wurden Zellen der Zelllinie MOLP-8. Betrachtet werden unbehandelte Zellen (unbehandelt), unspezifisch transfizierte Zellen (Kontroll-RNAi) sowie die entsprechend spezifisch transfizierten Zellen (MAGE-A3 / MAGE-C1/CT7 RNAi). Der Stern (\*) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied an (\*p<0.05). Dargestellt sind die Ergebnisse 72 h nach erfolgter Transfektion (mit spezifischer RNAi als auch Kontroll-RNAi). Sowohl bei spezifischen "gene-silencing" von MAGE-A3 als auch MAGE-C1/CT7 zeigen sich antiproliferative Effekte.

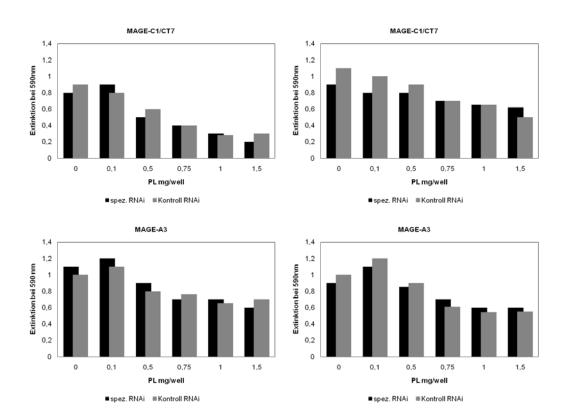
Dabei ist nicht auszuschließen, dass die nachgewiesenermaßen erhöhte Apoptoserate in Kultur nach "gene-silencing" von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7 die Ergebnisse der Proliferationsmessung beeinflusst haben können.

Zur Spezifikation der Ergebnisse zum Proliferationsverhalten der Myelomzellen führten wir ein "gating" der nicht-apoptotischen Zellen mittels Durchflusszytometrie durch. Die Untersuchung mittels CFSE-Assay der Zellpopulationen 72 h nach spezifischer Transfektion im Vergleich zu der Zellpopulation nach unspezifischer Transfektion mit Knotroll-RNAi erbrachte dabei keine weiterführenden Ergebnisse.

#### 5.5. Effekte auf die Adhäsion

Untersucht wurde das Adhäsionsverhalten der Myelomzellen in Abhängigkeit von der Expression von MAGE-A3 and MAGE-C1/CT7. Die Interaktion von Stromazellen und Myelomzellen spielt eine wichtige Rolle, und der Adhäsion von Myelomzellen an Stromazellen kommt auch eine prognostische Bedeutung zu. (Dhodapkar et al., 1998, Dhodapkar et al., 1997). Bisher konnte für die Expression von CT-Ag wie CAGE ein Effekt im Sinne einer erleichterten bzw. vermehrten Zellmigration von Tumorzellen nachgewiesen werden (Cilensek et al., 2002) sowie dementsprechend ein gen-knock-down von CT-Ag der SSX-Familie in Zellen des menschlichen Melanoms eine Minderung der Migrationsfähigkeit derselbigen begründen (Cronwright et al., 2005).

Der hier beschriebene "Adhesion-Assay" mit den Myelomzelllinie Molp-8 und KMS-12-BM wurde, entsprechend der Vorversuche mit Zellen nach spezifischem "gene-silencing", mit den Kontroll-RNAi Transfektaten und den nativen Zellen durchgeführt. Dabei zeigt sich bezüglich der Testergebnisse keine Unterschiede in den Vergleichsgruppen, was nahelegt, dass die Expression von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7 keinen bzw. einen in unserer Versuchsanordnung nicht nachweisbaren Effekt im Ädhäsionsverhalten des MM aufweißt.



Grafik 5: Zelladhäsion und "gene-silencing"

Dargestellt sind die Ergebnisse eines "adhesion assay" auf Fibronectinbasis. Die Diagramme der linken Seite zeigen die Ergebnisse für die Zelllinie KMS-12-BM, die Diagramme der rechten Seite entsprechende Ergebnisse für die Zelllinie MOLP-8. Verglichen wurde jeweils Zellen nach spezifischen "gene-silencing" für MAGE-C1/CT7 bzw. MAGE-A3 mit Zellen nach unspezifischer RNAi Transfektion (Kontroll-RNAi).

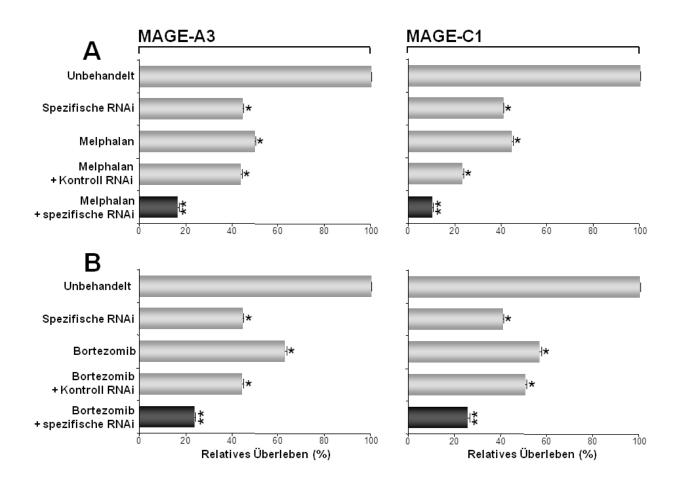
Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in den Vergleichsgruppen. Unter Zugabe von Phospholipiden (PL) entsprechend Herstellerangaben kommt es bei steigender Konzentration zu einer erwartungsgemäßen Abnahme der Zelladhäsion in beiden Vergleichsgruppen.

#### 5.6. Effekte auf die Chemosensibilität

Ebenfalls untersucht wurde die Frage nach etwaigen additiven Effekten des spezifischen "gene-silencing" von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7 und der gleichzeitigen Behandlung mit in der Therapie des MM typischen Chemotherapeutika.

In unserer Versuchsreihe wurde die Zytotoxizität anhand des oben beschriebenen "MTT-Assays" gemessen. Analysiert wurde jeweils das Apoptoseverhalten unter dem Chemotherapeutikum Melphalan als auch unter dem neuen Medikament Bortezemib, ein sogenannter Proteasomeninhibitor, als alleinige Therapie als auch in Kombination mit dem spezifischen "gene-silencing" von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7.

Die Versuche ergaben dabei eine Zunahme der Zytotoxizität der eingesetzten Medikamente bei Myelomzell nach spezifischen "gene-silencing" im Vergleich zur Einzeltherapie sowohl für Mephalan (**Grafik 6A**) als auch Bortezomib (**Grafik 6B**).



# Grafik 6A&B: Zytotoxizität unter der kombinierten Behandlung von "genesilencing" und Chemotherapie

Dargestellt sind Ergebnisse unter Anwendung eines "MTT-Assay". Verwendet wurden Zellen der Myelomzelllinie MOLP-8. Betrachtet werden unbehandelte Zellen (unbehandelt), unspezifisch transfizierte Zellen (Kontroll-RNAi), entsprechend spezifisch transfizierte Zellen (spezifische RNAi) mit MAGE-A3 (linke Spalte) und MAGE-C1/CT7 Spalte) RNAi, unbehandelte Zellen mit entsprechendem Zusatz von Chemotherapeutika (Melphalan/Bortezomib), die Kombination von Kontroll-RNAi und Chemotherapeutikum (Kontroll-RNAi + Melphalan/Bortezomib) sowie die Kombination spezifischer RNAi (s.o.) und Chemothrapeutikum (Melphalan/Bortezomib). 72 h nach Transfektion erfolgte eine 12-stündige Inkubation mit Melphalan (A) oder Bortezemib (B). Die Untersuchung der Zellvitalität erfolgte mittels "MTT Assay". Alle zu untersuchenden Entitäten wurden prozentual zu der Gruppe der unbehandelten Zellen betrachtet. Die Resultate beruhen auf den Mittelwerten (+ Standardabweichung) von drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Das Sternchen deutet auf den statistisch signifikanten Unterschied der Vergleichsgruppen hin (\*p<0,05; \*\*p<0,01). Deutlich zeigt sich eine Zunahme der Zytotoxizität in der Gruppe von spezifischer RNAi + Chemotherapeutikum.

#### 6.0 Interpretation&Diskussion

In vorangegangenen Studien konnte eine regelmäßige und vermehrte Expression von CT-Antigenen sowohl in Myelomzelllinien als auch in Proben von am MM erkrankten Patienten nachgewiesen werden (Atanackovic et al., 2007).

Dies berücksichtigend wurde in dieser Arbeit erstmalig eine Funktionsanalyse von CT-Ag im Multiplen Myelom durchgeführt.

# 6.1. Cancer Testis Antigene und additive Effekte

Es konnte nachgewiesen werden, dass einige CT-Ag funktional Transkriptionsfaktoren ähneln und ihre häufige Co-Expression suggeriert, dass einige Mitglieder dieser Proteinfamilie die Expression anderer CT-Ag regulieren können (van der Bruggen et al., 1991, Cho et al., 2002, Wang et al., 2002). MAGE-A3 soll mutmaßlich eine solche regulatorische Funktion innehaben (Atanackovic et al., 2007).

Diese CT-Ag-Interaktion betreffend wurde außerdem die Vermutung geäußert, dass das CT-Ag NY-ESO-1 einen Bindungspartner von MAGE-C1/CT7 darstellen könnte (Cho et al., 2006).

Das "gene-silencing" von MAGE-C1/CT7 und MAGE-A3 zeigte in unseren Versuchen im Allgemeinen kaum Effekte auf andere CT-Ag und im Speziellen keinen Effekt auf die NY-ESO-1-Expression im MM. Der einzige zu beobachtende Effekt war ein Begleitsuppressionseffekt der Expression von MAGE-C2/CT10 beim spezifischen "genesilencing" von MAGE-C1/CT7. Erklärend scheint dabei die hochgradige Homologie der beiden zugrundeliegenden Gene (Andrade et al., 2008).

# 6.2. Cancer Testis Antigene und Apoptose

Wie beschrieben führte ein "gene-silencing" von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7 im MM zu einer Verringerung der Anzahl lebender Myelomzellen in vitro.

Es konnte gezeigt werden, dass insbesondere das spezifische MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7 "gene-silencing" im MM einen deutlichen apoptoseinduzierenden Effekt aufweist. Dies ist vereinbar mit Erkenntnissen, die die MAGE-Proteinfamilie zu den apoptoseverhütenden Faktoren in Zellen des Melanoms zählen (Yang et al., 2007b).

In Studien an Myeloblastenzelllinien der Maus konnte zudem gezeigt werden, dass MAGE-A3 eine Bindungsaffinität zu Caspase-12 zeigt und unter Stresssituationen des endoplasmatischen Reticulums deren Aktivität unterband. Als Effekt dieses Vorganges wird zusätzlich eine Beeinträchtigung der Aktivität von, im "caspasepathway" folgenden, Caspase-9 und Caspase-3 beschrieben (Morishima et al., 2002). In dieser Studie wird auch vermutet, dass eine Überexpression von MAGE-A3 über eine Aktivitätsabnahme von Caspase-12 die Toleranz von Tumorzellen der Maus gegenüber zellulärem Stress zunimmt. Zu beachten bleibt, dass ähnliche Aussagen bzgl. humanen Zellen bisher nicht getroffen werden konnten und es somit unklar war, ob und/oder inwieweit der MAGE-Proteinfamilie eine Rolle in der Regulation der humanen "caspasepathways" zukommt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, insbesondere der deutliche pro-apoptotische Effekt beim Multiplen Myelom nach "gene-silencing" von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7 in Verbindung mit der Zunahme der Expression von Caspase-12 sowie Caspase-9 nach 48 Stunden (bei MAGE-C1/CT7) bzw. nach 72 Stunden (bei MAGE-A3), lässt eine Verbindungen dieser MAGE-Proteine zu Caspase-12 und -9 im MM des Menschen wahrscheinlich erscheinen.

Nicht nachgewiesen werden konnte die Induktion der zentralen Caspase-3 im Zuge des "gene-silencing" von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7. Die Option, dass der apotoseinduzierende Effekt eines spezifischen "gene-silencing" der untersuchten MAGE-Proteine unabhängig von der in Apoptosemechanismen zentralen Caspase-3 ist, kann aber nicht ausgeschlossen werden, auch wenn kein darstellbarer Expressionseffekt bzgl. Caspase-3 in den hier angestellten Experimenten vorlag.

Dies erhärtet aber die Vermutung, dass Caspase-12 und Caspase-9 partizipatorische Faktoren für den Apoptosemechanismus des menschlichen MM darstellen, zu mindestens im Zusammenhang mit dem spezifischen "gene-silencing" von MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7.

# **6.3.** Cancer Testis Antigene und Proliferation

Des Weiteren wurde die Möglichkeit einer verminderten Proliferationsfähigkeit durch "gene-silencing" von CT-Ag in Myelomzellen überprüft. Andere Studien zeigen in vitro eine Reduktion der Zellproliferation von soliden Tumoren in Abhängigkeit von der Expression von CT-Ag (in diesem Fall CAGE) (Cho et al., 2002, Shim et al., 2006).

Zusätzlich wurde in einer Studie gezeigt, dass eine vermehrte Expression von MAGE-C1/CT7 oder MAGE-A3 bei Patienten mit MM mit einer erhöhten Plasmazellenzahl im Knochenmark assoziiert ist (Jungbluth et al., 2005, Tinguely et al., 2008)

Auch zeigten Microarray-Analysen mit Proben von Myelompatienten, dass eine Korrelation besteht zwischen der CT-Ag Expression und diversen prognostisch relevanten Faktoren wie  $\beta$ 2-Microglobulinlevel  $\geq$ 3.5 mg/l und Chromosome 13 Deletion (Condomines et al., 2007).

Letztlich konnte in dieser Arbeit unter Berücksichtigung der erschwerten technischen und analytischen Gegebenheiten bei einem deutlichen apoptosefördernden Effekt des "genesilencing" von MAGE-C1/CT7 und MAGE-A3 lediglich eine statistisch kaum signifikante Verbindung der beschriebenen CT-Ag-Expression mit den Proliferationsverhalten des MM nachgewiesen werden.

Ähnlich Untersuchungen konnten zeigen, dass eine Suppression von MAGE-Proteinexpression in Mastzellleukämiezelllinien einen gehäuften Verbleib in der S-Phase und somit einen proliferationsmindernden Effekt aufweist (Yang et al., 2007a).

## 6.4. Cancer Testis Antigene und CD138-negative Myelomzellen

Schon seit längerer Zeit wird vermutet, dass im MM eine kleine Anzahl von teilungsfähigen Vorläuferzellen die Grundlage für die sogenannte "minimal residual disease" ("minimale Resterkrankung") darstellt, d.h. diese Vorläuferzellen regenerieren laufend eine große Anzahl nicht zur Teilung fähiger, ausdifferenzierter Myelomzellen. Zudem besteht die Annahme, dass diese besagten Vorläuferzellen resistent gegenüber diversen Chemotherapeutika sind, folglich sollen Zellen dieses Zelltyps erheblich zu der

schlechten Prognose des MM beitragen. Diese Vorläuferzellen konnten sowohl im Knochenmark von Patienten als auch in Zellkulturen des MM nachgewiesen werden und sind charakterisiert durch das Fehlen des Oberflächenmarkers CD138 (sogenannten CD138-negative Zellen) (Matsui et al., 2004).

Die neuen therapeutischen Lösungen in der Therapie des MM wie Bortezomib und Lenalidomide haben signifikante Effekte auf die "normalen", differenzierten malignen Plasmazellen des MM, jedoch, zumindest in vitro, wenig Wirkung auf die CD138negativen Myelomzellen (Matsui et al., 2008). Dieser Umstand mag erklären, warum diese Substanzen zu Krankheitsremission führen können, aber keine Heilung herbeiführen (Huff et al., 2006).

Ebenfalls zur Diskussion steht der Umstand, dass CT-Ag, die häufig nur eine sehr heterogene Expression in nur einigen Zellen der Tumormasse zeigen, spezifisch auf Krebsstammzellen exprimiert werden sollen (Costa et al., 2007)

In diesem Zusammenhang konnten wir in dieser Arbeit eine der ersten Darstellungen zur Expression der CT-Ag MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7 in CD138-positiven und den CD138-negativen Myelomzellen veröffentlichen.

In vorangegangenen Studien wurden Proben von am MM erkrankten Patienten mittels "Colony formation assays" untersucht. Es zeigte sich, dass Patientenproben, die unter diesen Kulturbedingungen zum Wachstum von Vorläuferzellkolonien des MM führen, eine Hochrisikogruppe darstellen, mit einer signifikant kürzeren Überlebenszeit als Patienten, bei denen ein solches Zellwachstumsverhalten nicht zu beobachten ist (Takahashi et al., 1985).

In unseren Versuchen führte ein "gene-silencing" von MAGE-A3 und/oder MAGE-C1/CT7 zu einer signifikanten Verminderung der Ausbildung erwähnter Kolonien. Dies suggeriert, dass das gezielte Angehen der CT-Ag nicht nur die differenzierten Myelomzellen tangiert, sondern ebenso die CD138-negativen Myelomzellen, die in Mitverantwortung gezogen werden sowohl für therapeutische Resistenzen als auch die häufigen Rezidiverkrankungen.

# 6.5. Cancer Testis Antigene und Chemotherapie

Eine kleine Fraktion von Myelomzellen entzieht sich regelmäßig der chemotherapeutischen Intervention. Auch neuere Substanzen wie Bortezomib und Thalidomid/Lenalidomid haben kaum zur Änderung dieses Sachverhalts beigetragen. Diese MM Zellen verbleiben im menschlichen Knochenmark trotz der sogenannten "complete remission" (= kompletter Remission).

Seit Längerem wird die Beteiligung der CT-Ag an dieser Form der Therapieresistenz im MM diskutiert. Ebenso wird ihnen eine Rolle bei der Persistenz der sogenannten Residualerkrankung bei menschlichen Krebserkrankungen zugesprochen. Unterstützt werden diese Hypothesen von Studien, die bei einer Expression von MAGE- und GAGE-Genen in Krebszelllinien einen chemotherapieresistenten Phenotyp in vitro nachweisen konnten. (Duan et al., 2003).

Zusätzlich scheint die Ansprechrate auf Chemotherapie bei Karzinomen des Magens mit der Expression von MAGE-A1 durch den Tumor zu korrelieren (Suzuki et al., 2007).

Der in dieser Arbeit nachgewiesene deutliche additive Effekt eines "gene-silencing" von MAGE-C1/CT7 und MAGE-A3 bei Behandlung der Myelomzellen mit den in der Therapie des MM gängigen Substanzen Melphalan und Bortezomib könnte somit neue Therapieansätze (z.B. spezifische CT-Ag Immuntherapie) bei Therapieresistenzen gegenüber den üblichen Agenzien als auch zur Therapieergänzung darstellen.

#### 6.6. Cancer Testis Antigene und neue Therapieansätze

Natürlich stellt sich die Frage nach der Möglichkeit der praktischen Umsetzung des hier getätigten Ansatzes, der die CT-Ag als neue Zielproteine der Myelomtherapie betrachtet. CT-Ag werden häufig als Ziel immuntherapeutischer Intervention diskutiert, insbesondere im MM, unter Berücksichtigung des Expressionsmuster für CT-Ag scheint dieser Ansatz vielversprechend (Atanackovic et al., 2009).

Das MM stellt eine Erkrankungsentität dar, die zumindest teilweise vom Immunsystem kontrolliert werden kann. Dies wird u.a. dadurch deutlich, dass der therapeutische Erfolg

der allogenen Stammzelltransplantation zu Teilen auf die Immunreaktion der Spender-T-Zellen gegen die Zellen des MM zurückgeführt wird. Selbiges gilt für die Übertragung von Spender-T-Zellen, die eine Remission bei Rezidiverkrankung induzieren können (Tricot et al., 1996, Orsini et al., 2003).

Ebenfalls gelang der Beweis, dass es zu einer spontanen Bildung von Antikörpern als auch zur Ausbildung einer T-Zellimmunität gegen MAGE-A3 und MAGE-C1/CT7 bei am MM erkrankten Patienten kommen kann (Goodyear et al., 2008, Goodyear et al., 2005, Curioni-Fontecedro et al., 2008, Atanackovic et al., 2007). Zusätzlich scheint diese spontan induzierte "(Teil)immunität" die Prognose der Patienten zu verbessern (Goodyear et al., 2008)

Diese Erkenntnisse lassen die CT-Ag-spezifische T-Zell-basierte Immuntherapie als eine mögliche, neue Therapieoption bei der Behandlung des MM erscheinen. Unterstützt wird diese Hypothese durch Erkenntnisse, die zeigen, dass eine Immunisierung mit MAGE-A3 bei Patienten mit Melanomen und Lungenkarzinomen sich als sicher und durchführbar präsentierte und zusätzlich eine gewünschte spezifische humorale als auch T-Zellantwort im untersuchten Patientenkollektiv induziert wurde (Atanackovic et al., 2004, Atanackovic et al., 2008). Ähnliche Behandlungsansätze befinden sich bereits in klinischen Studien der Phase III und zeigen ein vielversprechendes Potenzial (Brichard and Lejeune, 2007).

Auch der Mechanismus der RNAi wird therapeutisch zunehmend interessanter (Takeshita and Ochiya, 2006). Als große Herausforderung stellt sich dabei der suffiziente Transport der siRNA in die Zielzelle und die Minimierung von unerwünschten Nebeneffekten dar (Takeshita and Ochiya, 2006). Unter anderem wird Atelkollagen als ein mögliches Trägermolekül für siRNA diskutiert (Minakuchi et al., 2004). Mit Fortschreiten dieser vielversprechenden Technologie könnten auch die hier untersuchten CT-Ag eine neue therapeutische Relevanz erhalten.

#### 7.0 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit konnte das "gene-silencing" von MAGE-C1/CT7 und MAGE-A3 in Zellkulturen des Multiplen Myeloms (MM) entwickelt und erfolgreich etabliert werden. Unspezifische und "co gene-silencing-Effekte" konnte dabei weitgehend ausgeschlossen werden.

Es wurde gezeigt, dass die Cancer-Testis Antigene (CT-Ag) MAGE-C1/CT7 und MAGE-A3 relevante Parameter für die Vitalität des MM in vitro darstellen.

Weniger deutlich war die Aussagekraft bezüglich des Proliferationsverhaltens in den entsprechenden Versuchsanordnungen.

Zudem konnte gezeigt werden, dass MAGE-C1/CT7 und MAGE-A3 sowohl auf CD138-positiven wie CD138-negativen (vermeintliche Vorläuferzellen) Myelomzellen exprimiert werden und ein spezifisches "gene-silencing" ebenfalls deutliche vitalitätsmindernde Effekte auf CD138-negative Myelomzellen in Zellkultur haben.

Auch konnte ein deutlicher additiver Effekt bei der Behandlung mit alten (Melphalan) und neuen (Bortezomib) therapeutischen Substanzen in Kombination mit dem spezifischen "gene-silencing" von MAGE-C1/CT7 und MAGE-A3 in vitro nachgewiesen werden.

Obwohl ein möglicher Zusammenhang zwischen spezifischen "gene-silencing" von MAGE-C1/CT7 und MAGE-A3 und der Expression von Caspase-12 und Caspase-9 aufgezeigt werden konnte, sind die genauen molekularen Mechanismen nach wie vor unverstanden.

In Zusammenschau mit Beobachtungen, dass es sich bei dem MM um eine CT-Ag expressionsstabile und expressionsstarke Malignität handelt, zusätzlich die Expression deutliche prognostische Relevanz trägt sowie die Möglichkeit zu spezifischen, induzierbaren Immunreaktion gegeben ist, deutet, auch mit Blick auf die hier präsentierten Ergebnisse ein deutliches therapeutisches Potenzial der CT-Ag MAGE-C1/CT7 und MAGE-A3 an.

Ergebnisse dieser Arbeit fanden Verwendung in der Publikation "Cancer-testis antigens MAGE-C1/CT7 and MAGE-A3 promote the survival of multiple myeloma cells" im Haematologica, May 2010; 95: 785 – 793; Atanackovic et al.

#### 8.0 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACTB Beta-actin (Name des entsprechenden Gens)

AlloSCT Allogene stem cell transplantation
APAF-1 apoptotic protease activating factor 1

Apo2L Apo2 ligand

ASCT autologous stem cell transplantation

Bak BCL2-antagonist/killer
Bax BCL2-associated X protein
BBC3(PUMA) BCL2 binding component 3

Bcl-2 B-cell lymphoma 2

Bfl-1/A1 BCL2-related protein A1(synonym)

BH Bcl-2 homology

BID Bcl-2 Interacting domain Death agonist)
Bid BH3 interacting domain death agonist

Bik BCL2-interacting killer
CARD Caspase Recruiting Domain

CCND1 Cyclin D1

CCND3 Cyclin D3

CD cluster of differentiation

CD95L CD95Ligand

CR Complete Remission

CRAB Calcium, Renal sysfunction, Anemia, Bone lesions

CT-Ag Cancer Testis Antigene

cyto c Cytochrome c
DD DeathDomain

DED Death Effector Domain

DISC Death-Inducing Signaling Comple)

DR Death Receptor dsRNA doublestrang RNA

ER endoplasmatischen Retikulum
FACS fluorescence activated cell sorting

FADD Fas-Associating Death Domain-containing protein

FasL FasLigand

FGFR fibroblast growth factor receptor
FISH Fluoreszenz in situ Hybridisierung

GVHD Graft Versus Host Disease
GvM Graft versus Myeloma

Gy Gray (Radiologische Einheit) HLA Humanes Leukozyten Antigen

HtrA2 (Omi) HtrA serine peptidase 2
IAP inhibitor of apoptosis

ICE Interleukin-1ß-Converting Enzyme

IgA Immungloblin A
IgG ImmunGlobulin G

IL InterLeukin

IMF International Myeloma Foundation
IMWG International Myeloma Working Group

ISS International Staging System mAb monoklonale Antikörper

mafB / cmaf v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B

MAGE-A3 melanoma antigen family A 3

MAGE-C1/CT7 melanoma antigen family C, 1

Mcl-1 myeloid cell leukemia sequence 1

MGUS Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz

miRNA microRNA

MM Multiples Myelom
MR Minor Response
mRNA messengerRNA
NFkB nuclear factor kB
ORF Open Reading Frame
PD Progressive Disease

POEMS Polyneuropathy, Organomegaly, Endocrinopathy/Edema, Skin

abnormalities

PR Partial Remission

RANKL receptor activator of nuclear factor kB ligand

RISC RNA induced silencing complex

RITS RNA-induced transcriptional silencing

RNA RiboNucleic Acid RNAi RNA interference

RT-PCR Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction

sCR stringend Complete Remission

SD Stable Disease

siRNA small interfering RNA

SSX-2 Synovial Sarcoma X-breakpoint 2

tBID Truncated BID

TNF-a Tumornekrosefactor-a

TNFR1 TNF receptor 1

TRAIL TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand

VEGF vascular endothelial growth factor

VGPR Very Good Partial Remission

WHO World Health Organisation

WHSC1(MMSET) Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1

# 9.0 LITERATURVERZEICHNIS

- 2003. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol*, 121, 749-57.
- ABE, M., HIURA, K., WILDE, J., MORIYAMA, K., HASHIMOTO, T., OZAKI, S., WAKATSUKI, S., KOSAKA, M., KIDO, S., INOUE, D. & MATSUMOTO, T. 2002. Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Blood*, 100, 2195-202.
- AHLQUIST, P. 2002. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science*, 296, 1270-3.
- ALEXANIAN, R., DIMOPOULOS, M. A., DELASALLE, K. & BARLOGIE, B. 1992. Primary dexamethasone treatment of multiple myeloma. *Blood*, 80, 887-90.
- ALMASAN, A. & ASHKENAZI, A. 2003. Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. Cytokine Growth Factor Rev, 14, 337-48.
- ANDRADE, V. C., VETTORE, A. L., FELIX, R. S., ALMEIDA, M. S., CARVALHO, F., OLIVEIRA, J. S., CHAUFFAILLE, M. L., ANDRIOLO, A., CABALLERO, O. L., ZAGO, M. A. & COLLEONI, G. W. 2008. Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer Immun*, 8, 2.
- ARENDS, M. J. & WYLLIE, A. H. 1991. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol*, 32, 223-54.
- ATANACKOVIC, D., ALTORKI, N. K., CAO, Y., RITTER, E., FERRARA, C. A., RITTER, G., HOFFMAN, E. W., BOKEMEYER, C., OLD, L. J. & GNJATIC, S. 2008. Booster vaccination of cancer patients with MAGE-A3 protein reveals long-term immunological memory or tolerance depending on priming. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 1650-5.
- ATANACKOVIC, D., ALTORKI, N. K., STOCKERT, E., WILLIAMSON, B., JUNGBLUTH, A. A., RITTER, E., SANTIAGO, D., FERRARA, C. A., MATSUO, M., SELVAKUMAR, A., DUPONT, B., CHEN, Y. T., HOFFMAN, E. W., RITTER, G., OLD, L. J. & GNJATIC, S. 2004. Vaccine-induced CD4+ T cell responses to MAGE-3 protein in lung cancer patients. *J Immunol*, 172, 3289-96.
- ATANACKOVIC, D., ARFSTEN, J., CAO, Y., GNJATIC, S., SCHNIEDERS, F., BARTELS, K., SCHILLING, G., FALTZ, C., WOLSCHKE, C., DIERLAMM, J., RITTER, G., EIERMANN, T., HOSSFELD, D. K., ZANDER, A. R., JUNGBLUTH, A. A., OLD, L. J., BOKEMEYER, C. & KROGER, N. 2007. Cancer-testis antigens are commonly expressed in multiple myeloma and induce systemic immunity following allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 109, 1103-12.
- ATANACKOVIC, D., LUETKENS, T., HILDEBRANDT, Y., ARFSTEN, J., BARTELS, K., HORN, C., STAHL, T., CAO, Y., ZANDER, A. R., BOKEMEYER, C. & KROGER, N. 2009. Longitudinal analysis and prognostic effect of cancer-testis antigen expression in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*, 15, 1343-52.
- ATTAL, M., HAROUSSEAU, J. L., FACON, T., GUILHOT, F., DOYEN, C., FUZIBET, J. G., MONCONDUIT, M., HULIN, C., CAILLOT, D., BOUABDALLAH, R., VOILLAT, L., SOTTO, J. J., GROSBOIS, B. & BATAILLE, R. 2003. Single versus double autologous stemcell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med*, 349, 2495-502.
- ATTAL, M., MOREAU, P., AVET-LOISEAU, H. & HAROUSSEAU, J. L. 2007. Stem cell transplantation in multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 311-6.
- AVET-LOISEAU, H., ATTAL, M., MOREAU, P., CHARBONNEL, C., GARBAN, F., HULIN, C., LEYVRAZ, S., MICHALLET, M., YAKOUB-AGHA, I., GARDERET, L., MARIT, G., MICHAUX, L., VOILLAT, L., RENAUD, M., GROSBOIS, B., GUILLERM, G., BENBOUBKER, L., MONCONDUIT, M., THIEBLEMONT, C., CASASSUS, P., CAILLOT, D., STOPPA, A. M., SOTTO, J. J., WETTERWALD, M., DUMONTET, C., FUZIBET, J. G., AZAIS, I., DORVAUX, V., ZANDECKI, M., BATAILLE, R., MINVIELLE, S., HAROUSSEAU, J. L., FACON, T. & MATHIOT, C. 2007. Genetic abnormalities and survival

- in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. Blood, 109, 3489-95.
- BARLOGIE, B., JAGANNATH, S., DESIKAN, K. R., MATTOX, S., VESOLE, D., SIEGEL, D., TRICOT, G., MUNSHI, N., FASSAS, A., SINGHAL, S., MEHTA, J., ANAISSIE, E., DHODAPKAR, D., NAUCKE, S., CROMER, J., SAWYER, J., EPSTEIN, J., SPOON, D., AYERS, D., CHESON, B. & CROWLEY, J. 1999. Total therapy with tandem transplants for newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*, 93, 55-65.
- BARLOGIE, B., JAGANNATH, S., VESOLE, D. H., NAUCKE, S., CHESON, B., MATTOX, S., BRACY, D., SALMON, S., JACOBSON, J., CROWLEY, J. & TRICOT, G. 1997. Superiority of tandem autologous transplantation over standard therapy for previously untreated multiple myeloma. *Blood*, 89, 789-93.
- BARR, R. D., KOEKEBAKKER, M. & RAND, C. A. 1985. Growth of erythroid colonies in agar cultures of normal human bone marrow. *Blut*, 50, 179-83.
- BENSINGER, W. I. 2004. The current status of hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2, 46-52.
- BERNAS, T. & DOBRUCKI, J. 2002. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*, 47, 236-42.
- BRADLEY, T. R. & METCALF, D. 1966. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 44, 287-99.
- BRICHARD, V. G. & LEJEUNE, D. 2007. GSK's antigen-specific cancer immunotherapy programme: pilot results leading to Phase III clinical development. *Vaccine*, 25 Suppl 2, B61-71.
- BROXMEYER, H. E. 1984. Colony assays of hematopoietic progenitor cells and correlations to clinical situations. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1, 227-57.
- CARRINGTON, J. C. & AMBROS, V. 2003. Role of microRNAs in plant and animal development. *Science*, 301, 336-8.
- CASTANOTTO, D. & ROSSI, J. J. 2009. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature*, 457, 426-33.
- CAVO, M., ZAMAGNI, E., TOSI, P., TACCHETTI, P., CELLINI, C., CANGINI, D., DE VIVO, A., TESTONI, N., NICCI, C., TERRAGNA, C., GRAFONE, T., PERRONE, G., CECCOLINI, M., TURA, S. & BACCARANI, M. 2005. Superiority of thalidomide and dexamethasone over vincristine-doxorubicindexamethasone (VAD) as primary therapy in preparation for autologous transplantation for multiple myeloma. *Blood*, 106, 35-9.
- CERRETTI, D. P., KOZLOSKY, C. J., MOSLEY, B., NELSON, N., VAN NESS, K., GREENSTREET, T. A., MARCH, C. J., KRONHEIM, S. R., DRUCK, T., CANNIZZARO, L. A. & ET AL. 1992. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science*, 256, 97-100.
- CHANG, E. T., SMEDBY, K. E., HJALGRIM, H., PORWIT-MACDONALD, A., ROOS, G., GLIMELIUS, B. & ADAMI, H. O. 2005. Family history of hematopoietic malignancy and risk of lymphoma. *J Natl Cancer Inst*, 97, 1466-74.
- CHECK, E. 2007. RNA interference: hitting the on switch. Nature, 448, 855-8.
- CHEN, Q., GONG, B. & ALMASAN, A. 2000. Distinct stages of cytochrome c release from mitochondria: evidence for a feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondrial dysfunction in genotoxic stress induced apoptosis. *Cell Death Differ*, 7, 227-33.
- CHILD, J. A., MORGAN, G. J., DAVIES, F. E., OWEN, R. G., BELL, S. E., HAWKINS, K., BROWN, J., DRAYSON, M. T. & SELBY, P. J. 2003. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med*, 348, 1875-83.
- CHO, B., LIM, Y., LEE, D. Y., PARK, S. Y., LEE, H., KIM, W. H., YANG, H., BANG, Y. J. & JEOUNG, D. I. 2002. Identification and characterization of a novel cancer/testis antigen gene CAGE. *Biochem Biophys Res Commun*, 292, 715-26.
- CHO, H. J., CABALLERO, O. L., GNJATIC, S., ANDRADE, V. C., COLLEONI, G. W., VETTORE, A. L., OUTTZ, H. H., FORTUNATO, S., ALTORKI, N., FERRERA, C. A., CHUA, R.,

- JUNGBLUTH, A. A., CHEN, Y. T., OLD, L. J. & SIMPSON, A. J. 2006. Physical interaction of two cancer-testis antigens, MAGE-C1 (CT7) and NY-ESO-1 (CT6). *Cancer Immun*, 6, 12.
- CILENSEK, Z. M., YEHIELY, F., KULAR, R. K. & DEISS, L. P. 2002. A member of the GAGE family of tumor antigens is an anti-apoptotic gene that confers resistance to Fas/CD95/APO-1, Interferon-gamma, taxol and gamma-irradiation. *Cancer Biol Ther*, 1, 380-7.
- CONDOMINES, M., HOSE, D., RAYNAUD, P., HUNDEMER, M., DE VOS, J., BAUDARD, M., MOEHLER, T., PANTESCO, V., MOOS, M., SCHVED, J. F., ROSSI, J. F., REME, T., GOLDSCHMIDT, H. & KLEIN, B. 2007. Cancer/testis genes in multiple myeloma: expression patterns and prognosis value determined by microarray analysis. *J Immunol*, 178, 3307-15.
- CORRADINI, P., VOENA, C., TARELLA, C., ASTOLFI, M., LADETTO, M., PALUMBO, A., VAN LINT, M. T., BACIGALUPO, A., SANTORO, A., MUSSO, M., MAJOLINO, I., BOCCADORO, M. & PILERI, A. 1999. Molecular and clinical remissions in multiple myeloma: role of autologous and allogeneic transplantation of hematopoietic cells. *J Clin Oncol*, 17, 208-15.
- CORRAL, L. G., HASLETT, P. A., MULLER, G. W., CHEN, R., WONG, L. M., OCAMPO, C. J., PATTERSON, R. T., STIRLING, D. I. & KAPLAN, G. 1999. Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-alpha. *J Immunol*, 163, 380-6.
- CORY, A. H., OWEN, T. C., BARLTROP, J. A. & CORY, J. G. 1991. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun*, 3, 207-12.
- CORY, S. & ADAMS, J. M. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer*, 2, 647-56.
- COSTA, F. F., LE BLANC, K. & BRODIN, B. 2007. Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer. *Stem Cells*, 25, 707-11.
- CRONWRIGHT, G., LE BLANC, K., GOTHERSTROM, C., DARCY, P., EHNMAN, M. & BRODIN, B. 2005. Cancer/testis antigen expression in human mesenchymal stem cells: down-regulation of SSX impairs cell migration and matrix metalloproteinase 2 expression. *Cancer Res*, 65, 2207-15.
- CURIONI-FONTECEDRO, A., KNIGHTS, A. J., TINGUELY, M., NUBER, N., SCHNEIDER, C., THOMSON, C. W., VON BOEHMER, L., BOSSART, W., PAHLICH, S., GEHRING, H., MOCH, H., RENNER, C., KNUTH, A. & ZIPPELIUS, A. 2008. MAGE-C1/CT7 is the dominant cancer-testis antigen targeted by humoral immune responses in patients with multiple myeloma. *Leukemia*, 22, 1646-8.
- DAINIAK, N., KRECZKO, S., COHEN, A., PANNELL, R. & LAWLER, J. 1985. Primary human marrow cultures for erythroid bursts in a serum-substituted system. *Exp Hematol*, 13, 1073-9.
- DANIAL, N. N. & KORSMEYER, S. J. 2004. Cell death: critical control points. Cell, 116, 205-19.
- DANKBAR, B., PADRO T, LEO R, FELDMANN B, KROPFF M, MESTERS RM, SERVE H, BERDEL WE, KIENAST J. 2000. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood*, 95, 2630-6.
- DEBATIN, K. M. & KRAMMER, P. H. 2004. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene*, 23, 2950-66.
- DEGTEREV, A., BOYCE, M. & YUAN, J. 2003. A decade of caspases. Oncogene, 22, 8543-67.
- DESAGHER, S. & MARTINOU, J. C. 2000. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*, 10, 369-77.
- DHODAPKAR, M. V., ABE, E., THEUS, A., LACY, M., LANGFORD, J. K., BARLOGIE, B. & SANDERSON, R. D. 1998. Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology: control of tumor cell survival, growth, and bone cell differentiation. *Blood*, 91, 2679-88.
- DHODAPKAR, M. V., KELLY, T., THEUS, A., ATHOTA, A. B., BARLOGIE, B. & SANDERSON, R. D. 1997. Elevated levels of shed syndecan-1 correlate with tumour mass and decreased matrix metalloproteinase-9 activity in the serum of patients with multiple myeloma. *Br J Haematol*, 99, 368-71.

- DHODAPKAR, M. V., OSMAN, K., TERUYA-FELDSTEIN, J., FILIPPA, D., HEDVAT, C. V., IVERSEN, K., KOLB, D., GELLER, M. D., HASSOUN, H., KEWALRAMANI, T., COMENZO, R. L., COPLAN, K., CHEN, Y. T. & JUNGBLUTH, A. A. 2003. Expression of cancer/testis (CT) antigens MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, CT-7, and NY-ESO-1 in malignant gammopathies is heterogeneous and correlates with site, stage and risk status of disease. *Cancer Immun*, 3, 9.
- DIMOPOULOS, M. A., RICHARDSON, P. G., SCHLAG, R., KHUAGEVA, N. K., SHPILBERG, O., KASTRITIS, E., KROPFF, M., PETRUCCI, M. T., DELFORGE, M., ALEXEEVA, J., SCHOTS, R., MASSZI, T., MATEOS, M. V., DERAEDT, W., LIU, K., CAKANA, A., VAN DE VELDE, H. & SAN MIGUEL, J. F. 2009. VMP (Bortezomib, Melphalan, and Prednisone) is active and well tolerated in newly diagnosed patients with multiple myeloma with moderately impaired renal function, and results in reversal of renal impairment: cohort analysis of the phase III VISTA study. *J Clin Oncol*, 27, 6086-93.
- DREDGE, K., MARRIOTT, J. B., MACDONALD, C. D., MAN, H. W., CHEN, R., MULLER, G. W., STIRLING, D. & DALGLEISH, A. G. 2002. Novel thalidomide analogues display antiangiogenic activity independently of immunomodulatory effects. *Br J Cancer*, 87, 1166-72.
- DRESCH, C., JOHNSON, G. R. & METCALF, D. 1977. Eosinophil colony formation in semisolid cultures of human bone marrow cells. *Blood*, 49, 835-44.
- DU, C., FANG, M., LI, Y., LI, L. & WANG, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102, 33-42.
- DUAN, Z., DUAN, Y., LAMENDOLA, D. E., YUSUF, R. Z., NAEEM, R., PENSON, R. T. & SEIDEN, M. V. 2003. Overexpression of MAGE/GAGE genes in paclitaxel/doxorubicin-resistant human cancer cell lines. *Clin Cancer Res*, 9, 2778-85.
- DURIE, B. G., HAROUSSEAU, J. L., MIGUEL, J. S., BLADE, J., BARLOGIE, B., ANDERSON, K., GERTZ, M., DIMOPOULOS, M., WESTIN, J., SONNEVELD, P., LUDWIG, H., GAHRTON, G., BEKSAC, M., CROWLEY, J., BELCH, A., BOCCADARO, M., CAVO, M., TURESSON, I., JOSHUA, D., VESOLE, D., KYLE, R., ALEXANIAN, R., TRICOT, G., ATTAL, M., MERLINI, G., POWLES, R., RICHARDSON, P., SHIMIZU, K., TOSI, P., MORGAN, G. & RAJKUMAR, S. V. 2006. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia*, 20, 1467-73.
- DURIE, B. G., KYLE, R. A., BELCH, A., BENSINGER, W., BLADE, J., BOCCADORO, M., CHILD, J. A., COMENZO, R., DJULBEGOVIC, B., FANTL, D., GAHRTON, G., HAROUSSEAU, J. L., HUNGRIA, V., JOSHUA, D., LUDWIG, H., MEHTA, J., MORALES, A. R., MORGAN, G., NOUEL, A., OKEN, M., POWLES, R., ROODMAN, D., SAN MIGUEL, J., SHIMIZU, K., SINGHAL, S., SIROHI, B., SONNEVELD, P., TRICOT, G. & VAN NESS, B. 2003. Myeloma management guidelines: a consensus report from the Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation. *Hematol J*, 4, 379-98.
- DURIE, B. G. & SALMON, S. E. 1975. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*, 36, 842-54.
- DURIE, B. G. M. 2004. Epidemiology of Multiple Myeloma and Related Diseases. *In:* BERENSON, J. R. (ed.) *Biology and Management of Multiple Myeloma*. Humana Press.
- DURIE, B. G. M. 2007. International Myeloma Foundation [Online]. Available: www.myeloma.org.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E. & MELLO, C. C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. *Nature*, 391, 806-11.
- FISCHER, H., KOENIG, U., ECKHART, L. & TSCHACHLER, E. 2002. Human caspase 12 has acquired deleterious mutations. *Biochem Biophys Res Commun*, 293, 722-6.
- FISCHER, U., JANICKE, R. U. & SCHULZE-OSTHOFF, K. 2003. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*, 10, 76-100.
- GAHRTON, G., SVENSSON, H., CAVO, M., APPERLY, J., BACIGALUPO, A., BJORKSTRAND, B., BLADE, J., CORNELISSEN, J., DE LAURENZI, A., FACON, T., LJUNGMAN, P., MICHALLET, M., NIEDERWIESER, D., POWLES, R., REIFFERS, J., RUSSELL, N. H.,

- SAMSON, D., SCHAEFER, U. W., SCHATTENBERG, A., TURA, S., VERDONCK, L. F., VERNANT, J. P., WILLEMZE, R. & VOLIN, L. 2001. Progress in allogenic bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma: a comparison between transplants performed 1983--93 and 1994--8 at European Group for Blood and Marrow Transplantation centres. *Br J Haematol*, 113, 209-16.
- GAVRIELI, Y., SHERMAN, Y. & BEN-SASSON, S. A. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119, 493-501.
- GERTZ, M. A., LACY, M. Q., DISPENZIERI, A., GREIPP, P. R., LITZOW, M. R., HENDERSON, K. J., VAN WIER, S. A., AHMANN, G. J. & FONSECA, R. 2005. Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood*, 106, 2837-40.
- GERTZ, M. A., LACY, M. Q., INWARDS, D. J., CHEN, M. G., PINEDA, A. A., GASTINEAU, D. A., GREIPP, P. R., LUST, J. A., TEFFERI, A., WITZIG, T. E., KYLE, R. A. & LITZOW, M. R. 1999. Early harvest and late transplantation as an effective therapeutic strategy in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant*, 23, 221-6.
- GITLIN, L., KARELSKY, S. & ANDINO, R. 2002. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*, 418, 430-4.
- GIULIANI, N., MORANDI, F., TAGLIAFERRI, S., LAZZARETTI, M., BONOMINI, S., CRUGNOLA, M., MANCINI, C., MARTELLA, E., FERRARI, L., TABILIO, A. & RIZZOLI, V. 2007. The proteasome inhibitor bortezomib affects osteoblast differentiation in vitro and in vivo in multiple myeloma patients. *Blood*, 110, 334-8.
- GOODYEAR, O., PIPER, K., KHAN, N., STARCZYNSKI, J., MAHENDRA, P., PRATT, G. & MOSS, P. A. 2005. CD8+ T cells specific for cancer-germline gene antigens are found in many patients with multiple myeloma and their frequency correlates with disease burden. *Blood*.
- GOODYEAR, O. C., PRATT, G., MCLARNON, A., COOK, M., PIPER, K. & MOSS, P. 2008. Differential pattern of CD4+ and CD8+ T-cell immunity to MAGE-A1/A2/A3 in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and multiple myeloma. *Blood*, 112, 3362-72.
- GREGERSEN, P. K. 2007. Modern genetics, ancient defenses, and potential therapies. *N Engl J Med*, 356, 1263-6.
- GREIPP, P. R., SAN MIGUEL, J., DURIE, B. G., CROWLEY, J. J., BARLOGIE, B., BLADE, J., BOCCADORO, M., CHILD, J. A., AVET-LOISEAU, H., KYLE, R. A., LAHUERTA, J. J., LUDWIG, H., MORGAN, G., POWLES, R., SHIMIZU, K., SHUSTIK, C., SONNEVELD, P., TOSI, P., TURESSON, I. & WESTIN, J. 2005. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 23, 3412-20.
- GRIGNANI, G., GOBBI, P. G., FORMISANO, R., PIERESCA, C., UCCI, G., BRUGNATELLI, S., RICCARDI, A. & ASCARI, E. 1996. A prognostic index for multiple myeloma. *Br J Cancer*, 73, 1101-7.
- HAROUSSEAU, J. L., ATTAL, M., LELEU, X., TRONCY, J., PEGOURIE, B., STOPPA, A. M., HULIN, C., BENBOUBKER, L., FUZIBET, J. G., RENAUD, M., MOREAU, P. & AVETLOISEAU, H. 2006. Bortezomib plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of an IFM phase II study. *Haematologica*, 91, 1498-505.
- HEGDE, R., SRINIVASULA, S. M., ZHANG, Z., WASSELL, R., MUKATTASH, R., CILENTI, L., DUBOIS, G., LAZEBNIK, Y., ZERVOS, A. S., FERNANDES-ALNEMRI, T. & ALNEMRI, E. S. 2002. Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem*, 277, 432-8.
- HEROLD, A., SUYAMA, M., RODRIGUES, J. P., BRAUN, I. C., KUTAY, U., CARMO-FONSECA, M., BORK, P. & IZAURRALDE, E. 2000. TAP (NXF1) belongs to a multigene family of putative RNA export factors with a conserved modular architecture. *Mol Cell Biol*, 20, 8996-9008.
- HIDESHIMA, T. & ANDERSON, K. C. 2002. Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma. *Nat Rev Cancer*, 2, 927-37.

- HJORTH, M., HELLQUIST, L., HOLMBERG, E., MAGNUSSON, B., RODJER, S. & WESTIN, J. 1993. Initial versus deferred melphalan-prednisone therapy for asymptomatic multiple myeloma stage I--a randomized study. Myeloma Group of Western Sweden. *Eur J Haematol*, 50, 95-102.
- HOLMQUIST, G. P. & ASHLEY, T. 2006. Chromosome organization and chromatin modification: influence on genome function and evolution. *Cytogenet Genome Res*, 114, 96-125.
- HUANG, D. C. & STRASSER, A. 2000. BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell*, 103, 839-42.
- HUFF, C. A., MATSUI, W., SMITH, B. D. & JONES, R. J. 2006. The paradox of response and survival in cancer therapeutics. *Blood*, 107, 431-4.
- HUMPHRIES, M. J. 2009. Cell adhesion assays. Methods Mol Biol, 522, 203-10.
- ISCOVE, N. N. & SIEBER, F. 1975. Erythroid progenitors in mouse bone marrow detected by macroscopic colony formation in culture. *Exp Hematol*, 3, 32-43.
- JANICKE, R. U., SPRENGART, M. L., WATI, M. R. & PORTER, A. G. 1998. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem*, 273, 9357-60.
- JOZA, N., SUSIN, S. A., DAUGAS, E., STANFORD, W. L., CHO, S. K., LI, C. Y., SASAKI, T., ELIA, A. J., CHENG, H. Y., RAVAGNAN, L., FERRI, K. F., ZAMZAMI, N., WAKEHAM, A., HAKEM, R., YOSHIDA, H., KONG, Y. Y., MAK, T. W., ZUNIGA-PFLUCKER, J. C., KROEMER, G. & PENNINGER, J. M. 2001. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410, 549-54.
- JUNGBLUTH, A. A., ELY, S., DILIBERTO, M., NIESVIZKY, R., WILLIAMSON, B., FROSINA, D., CHEN, Y. T., BHARDWAJ, N., CHEN-KIANG, S., OLD, L. J. & CHO, H. J. 2005. The cancer-testis antigens CT7 (MAGE-C1) and MAGE-A3/6 are commonly expressed in multiple myeloma and correlate with plasma-cell proliferation. *Blood*, 106, 167-74.
- KLEIN, B., ZHANG, X-G, ZHAO-YANG,L, BATAILLE, RÉGIS 1995. Interleukin-6 in Human Multiple Myeloma. *Blood*, 85, 863-872.
- KOOPMAN, G., REUTELINGSPERGER, C. P., KUIJTEN, G. A., KEEHNEN, R. M., PALS, S. T. & VAN OERS, M. H. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, 84, 1415-20.
- KORETH, J., CUTLER, C. S., DJULBEGOVIC, B., BEHL, R., SCHLOSSMAN, R. L., MUNSHI, N. C., RICHARDSON, P. G., ANDERSON, K. C., SOIFFER, R. J. & ALYEA, E. P., 3RD 2007. High-dose therapy with single autologous transplantation versus chemotherapy for newly diagnosed multiple myeloma: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Biol Blood Marrow Transplant*, 13, 183-96.
- KRÖGER, N. 2007. Mini-Midi-Maxi? How to harness the graft-versus-myeloma effect and target molecular remission after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*, 1-8.
- KROGER, N., EINSELE, H., DERIGS, G., WANDT, H., KRULL, A. & ZANDER, A. 2010. Long-term follow-up of an intensified myeloablative conditioning regimen with in vivo T cell depletion followed by allografting in patients with advanced multiple myeloma. *Biol Blood Marrow Transplant*, 16, 861-4.
- KROGER, N., SAYER, H. G., SCHWERDTFEGER, R., KIEHL, M., NAGLER, A., RENGES, H., ZABELINA, T., FEHSE, B., AYUK, F., WITTKOWSKY, G., SCHMITZ, N. & ZANDER, A. R. 2002a. Unrelated stem cell transplantation in multiple myeloma after a reduced-intensity conditioning with pretransplantation antithymocyte globulin is highly effective with low transplantation-related mortality. *Blood*, 100, 3919-24.
- KROGER, N., SCHWERDTFEGER, R., KIEHL, M., SAYER, H. G., RENGES, H., ZABELINA, T., FEHSE, B., TOGEL, F., WITTKOWSKY, G., KUSE, R. & ZANDER, A. R. 2002b. Autologous stem cell transplantation followed by a dose-reduced allograft induces high complete remission rate in multiple myeloma. *Blood*, 100, 755-60.
- KROGER, N., SHIMONI, A., ZAGRIVNAJA, M., AYUK, F., LIOZNOV, M., SCHIEDER, H., RENGES, H., FEHSE, B., ZABELINA, T., NAGLER, A. & ZANDER, A. R. 2004. Low-dose

- thalidomide and donor lymphocyte infusion as adoptive immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Blood*, 104, 3361-3.
- KUEHL, W. M. & BERGSAGEL, P. L. 2002. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer*, 2, 175-87.
- KUENG, W., SILBER, E. & EPPENBERGER, U. 1989. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem*, 182, 16-9.
- KUMAR, S. K., RAJKUMAR, S. V., DISPENZIERI, A., LACY, M. Q., HAYMAN, S. R., BUADI, F. K., ZELDENRUST, S. R., DINGLI, D., RUSSELL, S. J., LUST, J. A., GREIPP, P. R., KYLE, R. A. & GERTZ, M. A. 2008. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood*, 111, 2516-20.
- KYLE, R. A. 1978. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. Natural history in 241 cases. *Am J Med*, 64, 814-26.
- KYLE, R. A. 2002. Diagnosis of multiple myeloma. Semin Oncol, 29, 2-4.
- KYLE, R. A., GERTZ, M. A., WITZIG, T. E., LUST, J. A., LACY, M. Q., DISPENZIERI, A., FONSECA, R., RAJKUMAR, S. V., OFFORD, J. R., LARSON, D. R., PLEVAK, M. E., THERNEAU, T. M. & GREIPP, P. R. 2003. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*, 78, 21-33.
- KYLE, R. A. & KUMAR, S. 2009. The significance of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Haematologica*, 94, 1641-4.
- KYLE, R. A. & RAJKUMAR, S. V. 2004. Multiple myeloma. N Engl J Med, 351, 1860-73.
- KYLE, R. A., REMSTEIN, E., THERNEAU,T. 2007. Clinical course and prognosis of smoldering multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*, 356, 2582-2590.
- KYLE, R. A., THERNEAU, T. M., RAJKUMAR, S. V., OFFORD, J. R., LARSON, D. R., PLEVAK, M. F. & MELTON, L. J., 3RD 2002. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*, 346, 564-9.
- LADURON, S., DEPLUS, R., ZHOU, S., KHOLMANSKIKH, O., GODELAINE, D., DE SMET, C., HAYWARD, S. D., FUKS, F., BOON, T. & DE PLAEN, E. 2004. MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription. *Nucleic Acids Res*, 32, 4340-50.
- LAMKANFI, M., KALAI, M. & VANDENABEELE, P. 2004. Caspase-12: an overview. *Cell Death Differ*, 11, 365-8.
- LANDGREN, O., KYLE, R. A., HOPPIN, J. A., BEANE FREEMAN, L. E., CERHAN, J. R., KATZMANN, J. A., RAJKUMAR, S. V. & ALAVANJA, M. C. 2009. Pesticide exposure and risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance in the Agricultural Health Study. *Blood*, 113, 6386-91.
- LI, L. C., OKINO, S. T., ZHAO, H., POOKOT, D., PLACE, R. F., URAKAMI, S., ENOKIDA, H. & DAHIYA, R. 2006. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 17337-42.
- LI, L. Y., LUO, X. & WANG, X. 2001. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412, 95-9.
- LIM, S. H., AUSTIN, S., OWEN-JONES, E. & ROBINSON, L. 1999. Expression of testicular genes in haematological malignancies. *Br J Cancer*, 81, 1162-4.
- LIM, S. H., BUMM, K., CHIRIVA-INTERNATI, M., XUE, Y. & WANG, Z. 2001. MAGE-C1 (CT7) gene expression in multiple myeloma: relationship to sperm protein 17. *Eur J Haematol*, 67, 332-4.
- LYONS, A. B. 2000. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods*, 243, 147-54.
- MARTINS, L. M., IACCARINO, I., TENEV, T., GSCHMEISSNER, S., TOTTY, N. F., LEMOINE, N. R., SAVOPOULOS, J., GRAY, C. W., CREASY, C. L., DINGWALL, C. & DOWNWARD, J. 2002. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaperlike motif. *J Biol Chem*, 277, 439-44.

- MATSUI, W., HUFF, C. A., WANG, Q., MALEHORN, M. T., BARBER, J., TANHEHCO, Y., SMITH, B. D., CIVIN, C. I. & JONES, R. J. 2004. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood*, 103, 2332-6.
- MATSUI, W., WANG, Q., BARBER, J. P., BRENNAN, S., SMITH, B. D., BORRELLO, I., MCNIECE, I., LIN, L., AMBINDER, R. F., PEACOCK, C., WATKINS, D. N., HUFF, C. A. & JONES, R. J. 2008. Clonogenic multiple myeloma progenitors, stem cell properties, and drug resistance. *Cancer Res*, 68, 190-7.
- MAZUMDER, S., GONG, B., CHEN, Q., DRAZBA, J. A., BUCHSBAUM, J. C. & ALMASAN, A. 2002. Proteolytic cleavage of cyclin E leads to inactivation of associated kinase activity and amplification of apoptosis in hematopoietic cells. *Mol Cell Biol*, 22, 2398-409.
- MEHTA, J. & SINGHAL, S. 1998. Graft-versus-myeloma. Bone Marrow Transplant, 22, 835-43.
- MESTER, B., NIETERS A, DEEG E, ELSNER G, BECKER N, SEIDLER A. 2006. Occupation and malignant lymphoma: a population based case control study in Germany. *Occupation and Environment Medicine*, 63, 17-26.
- METCALF, D. 1977. Hemopoietic colonies: in vitro cloning of normal and leukemic cells. *Recent Results Cancer Res*, Title page, 1-227.
- MINAKUCHI, Y., TAKESHITA, F., KOSAKA, N., SASAKI, H., YAMAMOTO, Y., KOUNO, M., HONMA, K., NAGAHARA, S., HANAI, K., SANO, A., KATO, T., TERADA, M. & OCHIYA, T. 2004. Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res*, 32, e109.
- MITRA-KAUSHIK, S., HARDING, J. C., HESS, J. L. & RATNER, L. 2004. Effects of the proteasome inhibitor PS-341 on tumor growth in HTLV-1 Tax transgenic mice and Tax tumor transplants. *Blood*, 104, 802-9.
- MORISHIMA, N., NAKANISHI, K., TAKENOUCHI, H., SHIBATA, T. & YASUHIKO, Y. 2002. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem*, 277, 34287-94.
- MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.
- NAITO, Y., YAMADA, T., MATSUMIYA, T., UI-TEI, K., SAIGO, K. & MORISHITA, S. 2005. dsCheck: highly sensitive off-target search software for double-stranded RNA-mediated RNA interference. *Nucleic Acids Res*, 33, W589-91.
- NAKAGAWA, T., ZHU, H., MORISHIMA, N., LI, E., XU, J., YANKNER, B. A. & YUAN, J. 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*, 403, 98-103.
- NICHOLSON, D. W. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*, 6, 1028-42.
- ORSINI, E., BELLUCCI, R., ALYEA, E. P., SCHLOSSMAN, R., CANNING, C., MCLAUGHLIN, S., GHIA, P., ANDERSON, K. C. & RITZ, J. 2003. Expansion of tumor-specific CD8+ T cell clones in patients with relapsed myeloma after donor lymphocyte infusion. *Cancer Res*, 63, 2561-8.
- PALUMBO, A. & RAJKUMAR, S. V. 2009. Treatment of newly diagnosed myeloma. *Leukemia*, 23, 449-56.
- PARKER, G. S., ECKERT, D. M. & BASS, B. L. 2006. RDE-4 preferentially binds long dsRNA and its dimerization is necessary for cleavage of dsRNA to siRNA. RNA, 12, 807-18.
- PELLAT-DECEUNYNCK, C., MELLERIN, M. P., LABARRIERE, N., JEGO, G., MOREAU-AUBRY, A., HAROUSSEAU, J. L., JOTEREAU, F. & BATAILLE, R. 2000. The cancer germ-line genes MAGE-1, MAGE-3 and PRAME are commonly expressed by human myeloma cells. *Eur J Immunol*, 30, 803-9.
- PIKE, B. L. & ROBINSON, W. A. 1970. Human bone marrow colony growth in agar-gel. *J Cell Physiol*, 76, 77-84.
- QIU, S., ADEMA, C. M. & LANE, T. 2005. A computational study of off-target effects of RNA interference. *Nucleic Acids Res*, 33, 1834-47.

- RABITSCH, W., PRINZ, E., ACKERMANN, J., WOHRER, S., KAUFMANN, H., SEIDL, S., KEIL, F., KALHS, P., GREINIX, H., GISSLINGER, H., LEITNER, G. & DRACH, J. 2004. Long-term follow up of patients with multiple myeloma after high-dose chemotherapy and allogeneic stem cell transplantation. *Eur J Haematol*, 72, 26-31.
- RAJKUMAR, S. 2005. MGUS and Smoldering Multiple Myeloma: Update on Pathogenesis, Natural History, and Management. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)*, 340-5.
- RAJKUMAR, S. V., BLOOD, E., VESOLE, D., FONSECA, R. & GREIPP, P. R. 2006. Phase III clinical trial of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone alone in newly diagnosed multiple myeloma: a clinical trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol*, 24, 431-6.
- RAJKUMAR, S. V., GERTZ, M. A., KYLE, R. A. & GREIPP, P. R. 2002a. Current therapy for multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*, 77, 813-22.
- RAJKUMAR, S. V., HAYMAN, S. R., LACY, M. Q., DISPENZIERI, A., GEYER, S. M., KABAT, B., ZELDENRUST, S. R., KUMAR, S., GREIPP, P. R., FONSECA, R., LUST, J. A., RUSSELL, S. J., KYLE, R. A., WITZIG, T. E. & GERTZ, M. A. 2005. Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (Rev/Dex) for newly diagnosed myeloma. *Blood*, 106, 4050-3.
- RAJKUMAR, S. V., MESA, R. A., FONSECA, R., SCHROEDER, G., PLEVAK, M. F., DISPENZIERI, A., LACY, M. Q., LUST, J. A., WITZIG, T. E., GERTZ, M. A., KYLE, R. A., RUSSELL, S. J. & GREIPP, P. R. 2002b. Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and primary amyloidosis. *Clin Cancer Res*, 8, 2210-6.
- REED, J. C., DOCTOR, K., ROJAS, A., ZAPATA, J. M., STEHLIK, C., FIORENTINO, L., DAMIANO, J., ROTH, W., MATSUZAWA, S., NEWMAN, R., TAKAYAMA, S., MARUSAWA, H., XU, F., SALVESEN, G. & GODZIK, A. 2003. Comparative analysis of apoptosis and inflammation genes of mice and humans. *Genome Res*, 13, 1376-88.
- REED, J. C., DOCTOR, K. S. & GODZIK, A. 2004. The domains of apoptosis: a genomics perspective. *Sci STKE*, 2004, re9.
- RENART, J., REISER, J. & STARK, G. R. 1979. Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 3116-20.
- ROODMAN, G. D. 2002. Role of the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *J Bone Miner Res*, 17, 1921-5.
- ROSENDAAL, M., ADAM, J., POTTER, D. & DUFF, M. 1986. Assessing cultured colonies automatically. *Leuk Res*, 10, 539-47.
- SAN-MIGUEL, J. F. & MATEOS, M. V. 2009. How to treat a newly diagnosed young patient with multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 555-65.
- SAUMET, A. & LECELLIER, C. H. 2006. Anti-viral RNA silencing: do we look like plants? Retrovirology, 3, 3.
- SCANLAN, M. J., GURE, A. O., JUNGBLUTH, A. A., OLD, L. J. & CHEN, Y. T. 2002. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev*, 188, 22-32.
- SCANLAN, M. J., SIMPSON, A. J. & OLD, L. J. 2004. The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immun*, 4, 1.
- SEIDL, S., KAUFMANN, H. & DRACH, J. 2003. New insights into the pathophysiology of multiple myeloma. *Lancet Oncol*, 4, 557-64.
- SHIM, E., SHIM, H., BAE, J., LEE, H. & JEOUNG, D. 2006. CAGE displays oncogenic potential and induces cytolytic T lymphocyte activity. *Biotechnol Lett*, 28, 515-22.
- SIOMI, H. & SIOMI, M. C. 2009. On the road to reading the RNA-interference code. *Nature*, 457, 396-404.
- SIROHI, B. & POWLES, R. 2004. Multiple myeloma. Lancet, 363, 875-87.
- SOHN, D. 2007. Mechanismen der apoptotischen Signaltransduktion: Modulation der Aktivierung von Initiator-Caspasen. Dissertation ed. Düsseldorf.

- SPENCER, A., PRINCE, H. M., ROBERTS, A. W., PROSSER, I. W., BRADSTOCK, K. F., COYLE, L., GILL, D. S., HORVATH, N., REYNOLDS, J. & KENNEDY, N. 2009. Consolidation therapy with low-dose thalidomide and prednisolone prolongs the survival of multiple myeloma patients undergoing a single autologous stem-cell transplantation procedure. *J Clin Oncol*, 27, 1788-93.
- SRINIVASULA, S. M., HEGDE, R., SALEH, A., DATTA, P., SHIOZAKI, E., CHAI, J., LEE, R. A., ROBBINS, P. D., FERNANDES-ALNEMRI, T., SHI, Y. & ALNEMRI, E. S. 2001. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*, 410, 112-6.
- STRAM, Y. & KUZNTZOVA, L. 2006. Inhibition of viruses by RNA interference. *Virus Genes*, 32, 299-306.
- STRASSER, A., O'CONNOR, L. & DIXIT, V. M. 2000. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*, 69, 217-45.
- SUZUKI, T., YOSHIDA, K., WADA, Y., HAMAI, Y., SENTANI, K., OUE, N. & YASUI, W. 2007. Melanoma-associated antigen-A1 expression predicts resistance to docetaxel and paclitaxel in advanced and recurrent gastric cancer. *Oncol Rep*, 18, 329-36.
- SZEGEZDI, E., FITZGERALD, U. & SAMALI, A. 2003. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci*, 1010, 186-94.
- TAKAHASHI, T., LIM, B., JAMAL, N., TRITCHLER, D., LOCKWOOD, G., MCKINNEY, S., BERGSAGEL, D. E. & MESSNER, H. A. 1985. Colony growth and self renewal of plasma cell precursors in multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 3, 1613-23.
- TAKESHITA, F. & OCHIYA, T. 2006. Therapeutic potential of RNA interference against cancer. Cancer Sci, 97, 689-96.
- TERPOS, E., DIMOPOULOS, M. A. & SEZER, O. 2007. The effect of novel anti-myeloma agents on bone metabolism of patients with multiple myeloma. *Leukemia*, 21, 1875-84.
- THORNBERRY, N. A., BULL, H. G., CALAYCAY, J. R., CHAPMAN, K. T., HOWARD, A. D., KOSTURA, M. J., MILLER, D. K., MOLINEAUX, S. M., WEIDNER, J. R., AUNINS, J. & ET AL. 1992. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*, 356, 768-74.
- TINGUELY, M., JENNI, B., KNIGHTS, A., LOPES, B., KOROL, D., ROUSSON, V., CURIONI FONTECEDRO, A., COGLIATTI, S. B., BITTERMANN, A. G., SCHMID, U., DOMMANN-SCHERRER, C., MAURER, R., RENNER, C., PROBST-HENSCH, N. M., MOCH, H., KNUTH, A. & ZIPPELIUS, A. 2008. MAGE-C1/CT-7 expression in plasma cell myeloma: sub-cellular localization impacts on clinical outcome. *Cancer Sci*, 99, 720-5.
- TOWBIN, H., STAEHELIN, T. & GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4.
- TRICOT, G., VESOLE, D. H., JAGANNATH, S., HILTON, J., MUNSHI, N. & BARLOGIE, B. 1996. Graft-versus-myeloma effect: proof of principle. *Blood*, 87, 1196-8.
- TURECI, O., SAHIN, U., KOSLOWSKI, M., BUSS, B., BELL, C., BALLWEBER, P., ZWICK, C., EBERLE, T., ZUBER, M., VILLENA-HEINSEN, C., SEITZ, G. & PFREUNDSCHUH, M. 2002. A novel tumour associated leucine zipper protein targeting to sites of gene transcription and splicing. *Oncogene*, 21, 3879-88.
- TURECI, O., SAHIN, U., SCHOBERT, I., KOSLOWSKI, M., SCMITT, H., SCHILD, H. J., STENNER, F., SEITZ, G., RAMMENSEE, H. G. & PFREUNDSCHUH, M. 1996. The SSX-2 gene, which is involved in the t(X;18) translocation of synovial sarcomas, codes for the human tumor antigen HOM-MEL-40. *Cancer Res*, 56, 4766-72.
- VAN BAREN, N., BRASSEUR, F., GODELAINE, D., HAMES, G., FERRANT, A., LEHMANN, F., ANDRE, M., RAVOET, C., DOYEN, C., SPAGNOLI, G. C., BAKKUS, M., THIELEMANS, K. & BOON, T. 1999. Genes encoding tumor-specific antigens are expressed in human myeloma cells. *Blood*, 94, 1156-64.

- VAN DER BRUGGEN, P., TRAVERSARI, C., CHOMEZ, P., LURQUIN, C., DE PLAEN, E., VAN DEN EYNDE, B., KNUTH, A. & BOON, T. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254, 1643-7.
- VAN DER BRUGGEN, P., TRAVERSARI, C., CHOMEZ, P., LURQUIN, C., DE PLAEN, E., VAN DEN EYNDE, B. J., KNUTH, A. & BOON, T. 2007. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Immunol*, 178, 2617-21.
- VERMES, I., HAANEN, C., STEFFENS-NAKKEN, H. & REUTELINGSPERGER, C. 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 184, 39-51.
- VERMEULEN, A., BEHLEN, L., REYNOLDS, A., WOLFSON, A., MARSHALL, W. S., KARPILOW, J. & KHVOROVA, A. 2005. The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency. *RNA*, 11, 674-82.
- VON METZLER, I., KREBBEL, H., HECHT, M., MANZ, R. A., FLEISSNER, C., MIETH, M., KAISER, M., JAKOB, C., STERZ, J., KLEEBERG, L., HEIDER, U. & SEZER, O. 2007. Bortezomib inhibits human osteoclastogenesis. *Leukemia*, 21, 2025-34.
- WANG, Y., HAN, K. J., PANG, X. W., VAUGHAN, H. A., QU, W., DONG, X. Y., PENG, J. R., ZHAO, H. T., RUI, J. A., LENG, X. S., CEBON, J., BURGESS, A. W. & CHEN, W. F. 2002. Large scale identification of human hepatocellular carcinoma-associated antigens by autoantibodies. *J Immunol*, 169, 1102-9.
- WEBPAGE, I. 2007. Available: https://catalog.invitrogen.com/index.cfm?fuseaction=viewCatalog.viewProductDetails&productDescription=12119 2007].
- WHITE, L. J., DECLERCQ, W., ARFUSO, F., CHARLES, A. K. & DHARMARAJAN, A. M. 2009. Function of caspase-14 in trophoblast differentiation. *Reprod Biol Endocrinol*, 7, 98.
- YANG, B., O'HERRIN, S., WU, J., REAGAN-SHAW, S., MA, Y., NIHAL, M. & LONGLEY, B. J. 2007a. Select cancer testes antigens of the MAGE-A, -B, and -C families are expressed in mast cell lines and promote cell viability in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol*, 127, 267-75.
- YANG, B., O'HERRIN, S. M., WU, J., REAGAN-SHAW, S., MA, Y., BHAT, K. M., GRAVEKAMP, C., SETALURI, V., PETERS, N., HOFFMANN, F. M., PENG, H., IVANOV, A. V., SIMPSON, A. J. & LONGLEY, B. J. 2007b. MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines. *Cancer Res*, 67, 9954-62.
- YUAN, W. Z., BODMER, R., ZHU, C. B., WANG, Y. Q., LI, Y. Q. & WU, X. S. 2002. [The use of RNAi as a technique to study the functions of heart-related genes in Drosophila]. *Yi Chuan Xue Bao*, 29, 34-8.
- ZAMORE, P. D., TUSCHL, T., SHARP, P. A. & BARTEL, D. P. 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101, 25-33.
- ZHAN, F., HUANG, Y., COLLA, S., STEWART, J. P., HANAMURA, I., GUPTA, S., EPSTEIN, J., YACCOBY, S., SAWYER, J., BURINGTON, B., ANAISSIE, E., HOLLMIG, K., PINEDAROMAN, M., TRICOT, G., VAN RHEE, F., WALKER, R., ZANGARI, M., CROWLEY, J., BARLOGIE, B. & SHAUGHNESSY, J. D., JR. 2006. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood*, 108, 2020-8.

### 10.0 DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich Prof. Dr. med. N. Kröger für die Gelegenheit danken, interessante wissenschaftliche Erkenntnisse gewonnen zu haben, die Möglichkeit mit diesen hoffentlich einen medizinschen Doktorgrad erlangt zu haben sowie für eine zu jeder Zeit hilfreichen und motivierenden Unterstützung.

Ebenso möchte ich Dr. med. D. Atanackovic danken für die ausgezeichnete Betreuung vor Ort, für viele wegweisende wissenschaftliche Impulse und für die Möglichkeit, Erwähnung in seinen Publikationen zu finden.

Tim für die vielen sehr hilfreiche Emails, die mir das Leben und das Schreiben an den entscheidenden Stellen erleichtert, wenn nicht ermöglicht haben.

Caro und Constantin für die wissenschaftlich Inspiration und das Format.

Allen Mitarbeitern des 4.OG des Campus Forschung (UKE) für viele offene Ohren, noch mehr helfende Hände und viele nette Bekanntschaften und Gespräche.

Meiner Freundin Anna und meiner Familie Bozena Marian und Thomas, für die Unterstützung während des Studiums und bei der Ausarbeitung dieser Dissertation.

Und nicht zuletzt und vor allem York Hildebrandt dafür, dass er mich nur selten mit seinem fragwürdigen Musikgeschmack behelligt hat, mir in strenger väterlicher Fürsorge die Relevanz von Organisation und Ordnung im Wissenschaftbetrieb näherbrachte und ohne den ich niemals diese Zeilen hier hätte schreiben können.

Vielen Dank auch Allen, die zu erwähnen mir an dieser Stelle leider vergönnt war und denen Dank gebührt.

# 11.0 LEBENSLAUF

#### PERSÖNLICHE ANGABEN

Geburtsname Adam Marian Jadczak

Geburtsdatum 05.10.1984

Geburtsort Nowa Sol, Polen

Staatsangehörigkeit Deutsch

Familienstand Ledig

## BILDUNGSWEG

1991 – 1995 Grundschule Reeseberg / Julius Ludewig Strasse

(Hamburg, Deutschland)

1995 – 2004 Gymnasium Sophie-Barat-Schule (Hamburg, Deutschland)

10.2004 – 10.2010 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg

# 12.0 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

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:	
---------------	--