

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Onkologisches Zentrum

II. Medizinische Klinik

Onkologie, Hämatologie, Knochenmarktransplantation mit der Sektion Pneumologie

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. C. Bokemeyer

Expression von Cancer-Testis-Antigenen in Zelllinien chronisch myeloischer Leukämie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Vorgelegt von:

Tim W. Stasche

aus Brandenburg a. d. Havel

Hamburg 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 03.05.2012

Veröffentlicht mit der Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. med. C. Bokemeyer

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter: PD Dr. med. D. Atanackovic

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter: Prof. Dr. med. G. Sauter

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungen	VII
1. EINLEITUNG	1
1.1. Tumormmunologie	3
1.1.1. Geschichte	3
1.1.2. Tumorassoziierte Antigene.....	4
1.1.2.1. Überexprimierte Antigene	5
1.1.2.2. Differenzierungsantigene	5
1.1.2.3. Mutationsantigene.....	6
1.1.2.4. Cancer-Testis-Antigene (CT-Antigene).....	6
1.1.2.4.1. CT-Antigen-Expression in CML	8
1.1.3. Epigenetische Regulation der CT-Antigen-Expression	8
1.1.3.1. Remodelling des Chromatins durch Beeinflussung der Histone	8
1.1.3.2. DNA-Methylierung	9
1.1.3.3. Beeinflussung der epigenetischen Regulierung.....	10
1.2. Chronische myeloische Leukämie (CML).....	11
1.2.1. Definition	11
1.2.2. Epidemiologie und Ätiologie	12
1.2.3. Pathophysiologie	12
1.2.3.1. Zellularbiologische Grundlagen	12
1.2.3.2. Molekularbiologische Grundlagen.....	13
1.2.4. Klinik, Verlauf	13
1.2.5. Diagnostik	14

1.2.6. Therapie und neue Therapieansätze.....	16
1.2.6.1. Medikamentöse Therapie der CML.....	17
1.2.6.2. Allogene Knochenmark- oder Blutstammzelltransplantation.....	18
1.2.6.3. Die Rolle des Immunsystems bei der Behandlung der CML.....	18
1.2.6.3.1. Graft-versus-Leukemia (GvL) Effekt.....	19
1.2.6.3.2. Donor-Lymphozyten-Infusion (DLI)	19
1.3. Fragestellung	20
2. MATERIAL UND METHODEN	22
2.1. Material	22
2.1.1. CML-Zelllinien	22
2.1.2. Gesunde Spender als Kontrollgruppe	22
2.1.3. Cancer-Testis-Antigene.....	22
2.1.4. Geräte, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien, Enzyme, Nukleotide.....	23
2.2. Methoden.....	23
2.2.1. Kultivierung und epigenetische Behandlung der CML-Zelllinien	23
2.2.2. RNA-Isolation und RNA-Spektrometrie	24
2.2.3. cDNA-Gewinnung.....	24
2.2.4. Qualitative RT-PCR und Gelelektrophorese.....	25
2.2.5. Sequenzierung	26
2.2.6. Western Blot.....	27
2.2.7. Immunfluoreszenz	28
2.2.8. Statistik.....	29
3. ERGEBNISSE	30
3.1. CT-Antigen-Expression.....	30

3.1.1. CT-Antigen-Expression in gesunden Spendern sowie in unbehandelten CML-Zelllinien	30
3.1.2. CT-Antigen-Expression nach epigenetischer Behandlung der CML-Zelllinien, Gruppeneinteilung.....	32
3.1.2.1. Konstant häufig exprimierte CT-Antigene (Gruppe A).....	33
3.1.2.2. Konstant selten exprimierte CT-Antigene (Gruppe B).....	34
3.1.2.3. CT-Antigene mit signifikantem Expressionsanstieg (Gruppe C) ...	36
3.2. CTA-Expressionshäufigkeit in nativen sowie in den verschieden behandelten CML-Zelllinien	38
3.3. Nachweis der CT-Antigen-Ausprägung auf Proteinebene mittels Western Blot	40
3.3.1. Proteinnachweis in nativen CML-Zelllinien und in gesunden Spendern ...	41
3.3.2. Korrelation zwischen mRNA-Transkription und Translation auf Proteinebene von CTA in CML-Zelllinien	42
3.4. Immunfluoreszenz	44
3.4.1. Nachweis des CT-Antigens PRAME in der CML-Zelllinien K-562 mittels Immunfluoreszenz.....	45
4. DISKUSSION	46
4.1. Unspezifisch exprimierte CT-Antigene	47
4.2. CT-Antigene mit häufiger Basisexpression	49
4.3. Effekte der epigenetischen Behandlung	50
4.4. Korrelation zwischen mRNA- und Proteinexpression.....	53

4.5. Lokalisation und Funktion des CT-Antigens PRAME.....	54
4.6. Kritik	55
5. ZUSAMMENFASSUNG	57
REFERENZEN	59
TABELLEN	68
DANKSAGUNG	76
LEBENS LAUF	77
EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG.....	78

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Blutausstriche von an CML erkrankten Patienten in der CP sowie in der BC.	16
Abbildung 2: RT-PCR Ergebnisse aller 31 CT-Antigene in Proben gesunder Knochenmarkspender	32
Abbildung 3: RT-PCR Ergebnisse der konstant häufig exprimierten CT-Antigene sowie des Housekeeping-Gens GAPDH in nativen und behandelten CML-Zelllinien.	34
Abbildung 4: RT-PCR Ergebnisse der selten exprimierten CT-Antigene sowie des Housekeeping-Gens GAPDH in nativen und behandelten CML-Zelllinien.	35
Abbildung 5: RT-PCR Ergebnisse der stark induzierbaren CT-Antigene sowie des Housekeeping-Gens GAPDH in nativen und behandelten CML-Zelllinien.	37
Abbildung 6: Effekt der CML-Zelllinienbehandlung mit epigenetischen Modulatoren auf die Expressionshäufigkeit von CT-Antigenen in CML-Zelllinien.....	40
Abbildung 7: Expression ausgewählter CT-Antigene auf Proteinebene (Western Blot) bei gesunden Spendern sowie bei neun nativen CML-Zelllinien.	42
Abbildung 8: Vergleich der CT-Antigen-Expression in unbehandelten CML-Zelllinien auf mRNA-Ebene (RT-PCR) sowie auf Protein-Ebene (Western Blot).....	44
Abbildung 9: Intrazelluläre Lokalisation des CT-Antigens PRAME in der Zelllinie K-562.	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: CML-Zelllinien.....	68
Tabelle 2: CT-Antigene, Primersequenzen, PCR-Konditionen, Fragmentlängen (Sequenzierungsergebnisse) und weitere Informationen	69
Tabelle 3: PCR-Programm zur Sequenzierung.	71
Tabelle 4: Materialien und Geräte.	71
Tabelle 5: Reaktionsansätze.	74
Tabelle 6: Für den Western Blot verwendete Antikörper.	75

Abkürzungsverzeichnis

Aza	5-Aza-2'-Deoxycytidine
AP	Akzelerationsphase
ATP	Adenosintriphosphat
BC	Blastenkrise
BCR	Breakpoint Cluster Region
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	komplementäre DNA
CML	Chronische myeloische Leukämie
CP	Chronische Phase
CgR	Zytogenetische Remission
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CR	Komplette Remission
CTA	Cancer-Testis-Antigen
DLI	Donor-Lymphozyten-Infusion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyde-3-phosphate-Dehydrogenase
GvHD	Graft-versus-Host Disease
GvL	Graft-versus-Leukemia
h	Stunde
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HR	Hämatologische Remission
HRP	Horseradish-Peroxidase
IFN- α	Interferon-Alpha
l	Liter
LDAC	Low-dose Arabinosyl Cytosin
MAGE	Melanom Antigen
min	Minute
ml	Mililiter
MMoIR	Majore Molekulare Antwort
MRD	Minimal residuale Erkrankung
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SEREX	Serological analysis of recombinant tumor cDNA expression libraries
SZT	Stammzelltransplantation
TAA	Tumorassoziierte Antigene
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TSA	Trichostatin A

1. Einleitung

Seit mehr als einer Dekade befinden sich die Strategien zur Behandlung der CML im Wandel. First-line-Therapieoptionen wie Interferon-Alpha und die allogene Stammzelltransplantation (SZT) sind durch das Aufkommen des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib (Glivec[®], Gleevec[™]) in den Hintergrund getreten. Doch auch Imatinib vermag die CML nicht endgültig zu heilen. Zum einen wird dies durch die mangelnde Fähigkeit bedingt, alle malignen Zellen restlos zu eliminieren. Zum anderen wurden vermehrt präexistierende sowie erworbene Resistenzen gegen Imatinib beobachtet (Branford und Hughes 2006; Litzow 2006; van der Kuip et al. 2005). Folglich bleibt die allogene Stammzelltransplantation (SZT) das einzige kurative Verfahren zur Behandlung der CML. Dieses birgt jedoch bekannte Risiken wie die Graft-versus-Host Disease (GvHD) und opportunistische Infektionen, die mit einer signifikanten Morbidität und Mortalität einhergehen (Grigg und Hughes 2006).

Bei Betrachtung dieser Gegebenheiten wird klar, wie wichtig die Suche nach alternativen Behandlungsvarianten für diese Patienten ist. Immuntherapeutische Theorien erscheinen dabei als die vielversprechendsten Ansätze, dies vor allem im Anbetracht der wichtigen Rolle der Graft-versus-Leukemia (GvL) Effekte bei der Induktion einer kompletten Remission (CR) nach allogener SZT. Diese Erkenntnisse deuten eine beachtliche Rolle des Immunsystems bei der Kontrolle der CML in vivo an (Guglielmi et al. 2002).

Zur Entwicklung Antigen-spezifischer Immuntherapien ist es essentiell, die Identifikation von passenden molekularen Zielstrukturen voranzutreiben. In den letzten 20 Jahren wurden ca. 100 Genfamilien der Gruppe der Cancer-Testis-Antigene (CTA) zugeordnet. Diese unter gesunden Geweben nur in Hodengewebe nachweisbaren Strukturen konnten auf RNA-Ebene mittels Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) sowie auf Protein-Ebene durch Western Blot in einer Vielzahl von soliden und hämatologischen Neoplasien nachgewiesen werden. CTA weisen neben einer auf Tumore beschränkten Expression eine natürliche Immunogenität in Krebspatienten auf. Aufgrund dieser Eigenschaften versprechen CTA passende Zielstrukturen bei der Behandlung humaner Krebserkrankungen zu sein (Meklat et al. 2007; Scanlan et al. 2004). Bezogen auf die CML wurden jedoch nur wenige CTA untersucht. Zudem wurden nur wenige CML-Proben in diesen

Studien getestet, die zudem nur schwache Expressionsraten zeigten (Chambost et al. 2001).

Die Expression der CT-Antigene wird unter anderem auf epigenetischer Ebene moduliert. Mechanismen sind hier die Demethylierung von Promotoren sowie die Acetylierung von Histonen. Um schwache Expressionsraten zu steigern, wurde die Wirkung demethylierender Substanzen wie 5-Aza-2'-deoxycytidin (Aza) und Histon-Deacetylase-inhibierender Agenzien wie Trichostatin A (TSA) auf die Expression von CT-Antigenen in verschiedenen Tumoren untersucht (Sigalotti et al. 2004; Wischnewski et al. 2006). Eine konkrete Analyse der Effekte dieser Substanzen auf die CT-Antigen-Expressionseigenschaften von CML-Zelllinien ist in der Literatur nicht zu finden.

Zur Beantwortung dieser offenen Fragen untersucht diese Arbeit mittels RT-PCR die Expression von 31 CT-Antigenen an zehn kultivierten CML-Zelllinien. Von Interesse war hierbei die Basisexpression der CTA. Um diese Ergebnisse vergleichen zu können, wurden die CTA an Proben zehn gesunder Knochenmarkspender untersucht (RT-PCR). Um den Einfluss demethylierender und Histon-Deacetylase-inhibierender Agenzien auf die CT-Antigen-Expression in CML-Zelllinien zu erfahren, untersuchte die vorliegende Arbeit zudem die CTA-Expression der CML-Zelllinien, nachdem diese mit demethylierenden und Deacetylase-inhibierenden Substanzen jeweils alleine sowie in Kombination behandelt wurden (RT-PCR). Desweiteren wurde die Translation ausgewählter CTA auf Proteinebene in den CML-Zelllinien untersucht (Western Blot). Hierdurch sollte Klarheit darüber geschaffen werden, ob die CT-Antigen-RNA auch in Proteine übersetzt wird, wodurch sie als Targetstrukturen eines immunologischen Therapieansatzes nutzbar wären. Als letztes wurde versucht, die Lokalisation eines CTA in einer spezifischen CML-Zelllinie zu bestimmen, um dadurch Vermutungen über dessen Funktion anstellen zu können (Immunfluoreszenz).

Ziel dieser Untersuchungen sollte es sein, im Falle der CML möglichst vielversprechende CT-Antigene sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene zu identifizieren. Zudem sollten mögliche expressionsmodulierende Effekte epigenetisch wirkender Agenzien auch für die CML gefunden werden.

1.1. Tumormimmunologie

1.1.1. Geschichte

Während des vergangenen Jahrhunderts hat die Überzeugung, dass das Immunsystem in der Lage sein könnte, Krebszellen als „fremd“ zu erkennen und zu bekämpfen, wiederholt Auftrieb und Niederlagen erfahren. Bereits am Anfang des 20. Jahrhunderts hatte Paul Ehrlich eine Überwachung der Entstehung von malignen Zellen durch das Immunsystem angenommen (Ehrlich 1909). Jahrzehnte später entwickelten Burnet und Thomas das Konzept der „Immunosurveillance“ (Burnet 1970; Burnet 1971; Thomas 1982). Dieses schrieb dem Immunsystem die Fähigkeit zu, den menschlichen Körper ständig auf das Entstehen maligner Zellen hin zu überwachen und diese nötigenfalls zu eliminieren. Beobachtungen, die ein erhöhtes Neoplasievorkommen in organtransplantierten Patienten beschrieben, wenn diese im Zuge ihrer Behandlung zusätzlich immunmodulierende Medikamente wie Azathioprin und Prednison erhielten, schienen diese Theorien zu bestätigen (Krikorian et al. 1978; Penn 1977; Sheil et al. 1981). Obwohl aussichtsreich während dieser Zeit, brachten Tierexperimente nicht die erwarteten Ergebnisse. So konnte in immunkompromittierten Mäusen kein vermehrtes Auftreten von Tumoren beobachtet werden (Rygaard und Povlsen 1974).

Jüngere Untersuchungen weisen jedoch eindeutig darauf hin, dass das Immunsystem tatsächlich die Entstehung und den Verlauf maligner Erkrankungen zu beeinflussen vermag (Dunn et al. 2002). Insbesondere der T-Zell-vermittelten Immunität scheint dabei eine herausragende Bedeutung zu zukommen (Shankaran et al. 2001; Smyth et al. 2000). So konnte eine prognostisch bedeutsame T-Zell-Infiltration von unterschiedlichen Tumorgeweben in verschiedenen Studien beschrieben werden (Clemente et al. 1996; Naito et al. 1998; Ropponen et al. 1997). Davon betroffen waren neben epithelialen Tumoren auch hämatologische Tumore wie das Non-Hodgkin-Lymphom (Ansell et al. 2001; Xu et al. 2001).

Ein enormer Wissenszuwachs bezüglich der Funktionsweise der T-Zell-basierten Immunität sowie die Entwicklung neuer methodischer Verfahren haben wissenschaftliche Felder wie die Tumormimmunologie in den letzten Jahren stetig wachsen lassen. Dabei erlauben die neuen Methoden eine systematische Suche nach korrespondierenden zellulären und molekularen Zielstrukturen. Diese

Fortschritte ermöglichen die Bestimmung einer großen Anzahl zuvor unbekannter tumorassoziierter Antigene (Rosenberg 2001). Diese Strukturen sind Grundlage einer immunologischen Tumortherapie.

1.1.2. Tumorassoziierte Antigene

Tumorassoziierte Antigene (TAA) sind Strukturen, die an der Zelloberfläche präsentiert und von CD8+ T-Zellen erkannt werden (Boon et al. 1994). Charakterisiert werden diese Strukturen durch ihr Expressionmuster. Dieses sollte idealerweise so beschaffen sein, dass sie von entarteten Zellen, nicht jedoch von Zellen des gesunden Organismus ausgeprägt werden. Erst diese Ausprägungseigenschaft macht Antigene zu brauchbaren Strukturen eines immunologischen Tumortherapieansatzes. Eine zweite, entscheidende Fähigkeit dieser Strukturen sollte es sein, spontane Immunantworten in Tumorpatienten zu induzieren. Diese Immunantworten lassen sich in Form von steigenden Antikörpertitern sowie durch den Nachweis Antigen-spezifischer Immuneffektorzellen belegen.

Die systematische Evaluation von Antigen-spezifischer humoraler Immunität und somit dem Nachweis von tumorspezifischen Strukturen wurde durch die SEREX – Methode (serological analysis of recombinant cDNA expression libraries) ermöglicht (Chen et al. 2000). Hierbei wird cDNA, gewonnen aus der mRNA des zu untersuchenden Tumorgewebes, durch ein Phagen-Präsentations-System ausgeprägt und anschließend gegenüber dem Spenderserum ausgesetzt. Reagieren diese vom Tumor abgeleiteten Antigene mit Antikörpern aus den Patientenseren, werden diese Klone sequenziert und mit Genbibliotheken verglichen. Auf diese Weise konnten große Mengen an CT-Antigenen sowie eine gewisse Anzahl an überexprimierten TAA identifiziert werden.

Antikörper haben die Eigenschaft, dass sie, anders als T-Zellen, Antigene HLA-unabhängig erkennen. Ursprünglich hatte dies zu der Annahme geführt, dass Anti-Tumor-Antikörper als Effektoren der humoralen Immunantwort im Vergleich zur zellulären Immunantwort im Überfluss vorhanden sein müssten. Weitere Arbeiten revidierten jedoch diese Aussage und wiesen nach, dass das Auftreten der tumorspezifischen Antikörper, wie im Falle des Tumorantigens MAGE, in Abhängigkeit von T-Zell-Antworten geschieht. Da es sich bei Tumorantigenen um

intrazellulär entstandene, mutierte Proteine handelt, werden diese durch HLA-1 Moleküle präsentiert. Dies erklärt, warum bei der Suche nach potenten, antitumoralen Targets vor allem die Charakterisierung von HLA-1 erkennenden, CD8+ T-Zellen vorangetrieben wurde. Die durch die genannten Methoden entdeckten Tumorantigene wurden nach Ursprung, Funktion und ihrem Expressionsmuster im Vergleich zu gesundem Gewebe klassifiziert (Wang und Rosenberg 1999).

1.1.2.1. Überexprimierte Antigene

Dieser Begriff wird für Moleküle verwendet, die sowohl in gesunden als auch in maligne entarteten Zellen gefunden werden können. Der Unterschied besteht dabei im gesteigerten Expressionsmuster dieser TAA in Tumorzellen. Beispiele sind HER2/neu und WT1. So ist das Protoonkogen HER2/neu in 20-40 % untersuchter Mammakarzinome exprimiert. Dies ist von Bedeutung, da diese Karzinome besonders aggressive Verläufe zeigen (Disis et al. 1994). TAA dieses Typs können als Zielstrukturen für therapeutische Ansätze mit zum Teil vielversprechenden Resultaten dienen (Bernhard et al. 2002; Keilholz et al. 2009)

1.1.2.2. Differenzierungsantigene

Diese TAA wurden zuerst in Melanozyten entdeckt, weswegen sie auch Melanozyten-Differenzierungs-Antigene genannt werden. Sie sind sowohl in Tumorgewebe als auch in gesundem Gewebe zu finden, besonders in Melanomen bzw. in Melanozyten. Da diese Antigene nach Prozessierung an der Zelloberfläche präsentiert werden, stellte sich die Frage, ob diese Moleküle nicht auch als Zielstrukturen einer artifiziell induzierten Immunreaktion genutzt werden könnten (Anichini et al. 1993). Diese Überlegung beinhaltete jedoch die Gefahr, möglicherweise autoimmunologische Reaktionen hervorzurufen. Diese Befürchtung konnte jedoch bei Patienten, die adäquate immunologische Reaktionen gegen diese offensichtlichen Autoantigene entwickelten, nicht beobachtet werden. Differenzierungsantigene wurden als sichere Zielstrukturen einer Vakzinierungstherapie vermutet (Berger et al. 2004; Slingluff et al. 2003).

1.1.2.3. Mutationsantigene

Bei diesen TAA handelt es sich um in einem Tumor spezifisch gebildete Antigene. Sie basieren auf somatischen Mutationen, die den Genotyp des jeweiligen Malignoms bedingen. Meist handelt es sich um Gene, deren molekulare Veränderungen die Transformation der Zelle in eine maligne Zelle begünstigen. Dies geschieht durch Punktmutationen im Genom, die Frameshiftmutationen oder Missensemutationen zur Folge haben. Diese Veränderungen kommen jedoch nur in den jeweils transformierten Zellen zur Ausprägung. Eines dieser Gene ist z.B. Beta-Catenin (Robbins et al. 1996).

Mutierte Gene, die sich sowohl in einer Reihe von Tumoren des gleichen Ursprungs als auch in Tumoren verschiedener Entitäten nachweisen lassen, codieren meist für Produkte, die die Transformation einer Zelle auslösen. Beispiel hierfür ist das Onkogen K-RAS, das eine wichtige Rolle in einer Reihe maligner Tumoren spielt (Kranenburg 2005).

1.1.2.4. Cancer-Testis-Antigene (CT-Antigene)

Bei diesen TAA handelt es sich um eine Gruppe von Antigenen, der bis heute durch intensive Forschung nicht weniger als 204 einzelne Gene zugerechnet wurden. Aufgrund der Fülle von Genen wurden diese je nach Ursprung und Sequenzierungsähnlichkeiten weiter in mittlerweile mehr als 100 Genfamilien klassifiziert (Almeida et al. 2009). Etwa die Hälfte der CT-Antigene ist auf dem X-Chromosom lokalisiert. Alle weiteren CT-Antigene liegen auf den Autosomen verteilt (Tureci et al. 1998). Diese Eigenschaft ist ein Unterscheidungsmerkmal, um Vertreter dieser Antigenfamilie zu ordnen. Dementsprechend werden CT-X-Antigene von non-X-CT-Antigenen unterschieden.

Ein zweites Merkmal dieser Gruppe ist das Expressionsmuster. Während CT-Antigene in gesunden somatischen Geweben kaum bis gar nicht exprimiert sind, lassen sie sich auf gesunden Keimbahnzellen ungleich häufiger nachweisen. Diese auf Keimbahnzellen beschränkte Expression der CT-Antigene ermöglicht eine Nutzung dieser Strukturen als Targets immunologischer Therapieveruche. Denn obwohl sie, entgegen der Forderung einer nicht nachweisbaren Expression unter

gesunden Geweben, im gesunden Organismus zu finden sind, gewährleistet dieser Expressionsort zwei entscheidende Vorteile. Erstens verhindert die Blut-Hodenschranke, gebildet durch tight junctions zwischen den Sertoli-Zellen, den Übertritt von immunkompetenten Zellen in die Samenkanälchen (Arnold et al. 2002). Das sich in den Samenkanälchen befindliche Keimepithel, welches CT-Antigene exprimiert, wird folglich vom Immunsystem nicht erreicht. Zweitens exprimieren Keimbahnzellen keine HLA-Moleküle auf deren Oberfläche (Fischer und Kurpisz 1998; Jassim et al. 1989). Hierdurch bleibt eine Präsentation der CT-Antigene generell aus, wodurch eine Aktivierung immunkompetenter Zellen verhindert wird.

Neben diesem günstigen Expressionsmuster ist die Fähigkeit, immunologische Reaktionen in Tumorgeweben zu induzieren, ein weiteres charakteristisches Merkmal dieser Gengruppe. Diese stellt sich durch den Nachweis spezifischer Antikörper-Antworten sowie Antigen-spezifischer CD4+ und CD8+ T-Zellen in Tumorpatienten dar. Neoplasien, bei denen die beschriebenen Immunantworten nachzuweisen waren, sind z. B. das maligne Melanom, das Mammakarzinom, das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom, Kopf-Hals-Tumore und das Ovarialkarzinom (Scanlan et al. 2004). Im Falle des CTA NY-ESO-1 korrelierte die Antikörper-Antwort gegen das betreffende CT-Antigen häufig mit dem gleichzeitigen Auftreten Antigen-spezifischer CD4+ und CD8 + T-Zellen. Diese Beobachtung stellt einen Indikator für eine integrierte Immunantwort dar und belegt das immunogene Potential dieses Gens im Speziellen und der Genfamilie im Allgemeinen (Gnjatic et al. 2003; Jager et al. 1998; Jager et al. 2000).

Über die Funktion der CT-Antigene gibt es nur wenige Daten. Verschiedene Rollen bei zellulären Prozessen während der Gametogenese des Keimzellgewebes erscheinen wahrscheinlich. Hierfür spricht die phasenspezifische Expression vor allem der CT-X-Antigene. Sie finden sowohl bei der transkriptionalen und der translationalen Steuerung (Kalejs 2005; Tureci et al. 2002; Tureci et al. 1996) als auch bei der Kontrolle der Chromosomenpaarung während der Meiose als regulierende Faktoren Bedeutung (Tureci et al. 1998). Ebenso scheinen sie an Vorgängen beteiligt, welche die Zellen vor Apoptose schützt (Cilensek et al. 2002) bzw. die Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika induzieren (Duan et al. 2003).

1.1.2.4.1. CT-Antigen-Expression in CML

Systematische Untersuchungen zur Expression von CT-Antigenen in CML-Zelllinien bzw. CML-Patienten sind im Vergleich zu soliden Tumoren bisher wenig durchgeführt worden. Vereinzelt zeigen Studien jedoch einen Zusammenhang auf. So konnten CT-Antigene in CML-Zelllinien bzw. in Proben an CML erkrankter Patienten nachgewiesen werden (Lim et al. 1999; Wang et al. 2003; Wang et al. 2004). Hierbei fiel auf, dass vor allem in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung CT-Antigene vermehrt nachweisbar waren (Adams et al. 2002).

Insgesamt ist an den bisherigen Studien zu bemängeln, dass jeweils nur sehr wenige Patienten mit CML bzw. nur wenige CML-Zelllinien eingeschlossen wurden. Nur vergleichsweise wenige Mitglieder der CT-Antigen-Familie fanden Beachtung. Ebenso wurde der mögliche Einfluss epigenetischer Mechanismen, wie z.B. die Methylierung von Promotorregionen, die der Grund für eine fehlende Expression einzelner Antigene sein könnte, nur sehr unsystematisch untersucht.

1.1.3. Epigenetische Regulation der CT-Antigen-Expression

Pluripotente Stammzellen haben die Fähigkeit, sich in eine Vielzahl spezialisierter Zelltypen des menschlichen Organismus zu differenzieren (Eblenkamp et al. 2008). Je nach Zellart werden verschiedene Informationen zur Differenzierung benötigt. Diese unterscheiden sich von Zelltyp zu Zelltyp. Die nicht benötigten Informationen werden jedoch nicht gelöscht sondern abgeschaltet. Methoden zur Abschaltung von Genen bzw. zur Regulation dieser beruhen auf spezifischen DNA-Abschnitten und deren epigenetischer Modifikation, wobei die eigentliche Basenabfolge der DNA unbeeinflusst bleibt. Bei den erwähnten DNA-Abschnitten handelt es sich unter anderem um Promotorregionen, die jedem Gen angegliedert sind. Der Promotor interagiert mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wodurch die Expression der ihm zugehörigen Gene reguliert werden kann (Graw 2005).

1.1.3.1. Remodelling des Chromatins durch Beeinflussung der Histone

Durch eine Änderung der Chromatinstruktur, ohne jedoch die DNA-Sequenz zu verändern, lässt sich die Expression von Genen beeinflussen. Eine Möglichkeit zu

einer derartigen Modifikation ist die Acetylierung von Histonen, wodurch sich deren positive Ladung der Amine neutralisiert und die Bindung zur negativ geladenen DNA geringer wird. Dies führt zu einer Entspiralisierung der DNA, wodurch Transkriptionsfaktoren besser binden und Gene von diesen Chromatinabschnitten leichter abgelesen werden können (Kuo et al. 1998; Zhang und Reinberg 2001). Die Intensität der Kondensation der DNA wird von zwei opponierenden Enzymgruppen gesteuert, den Histon-Deacetylasen (HDAC) und den Histon-Acetyltransferasen (HAT). HDAC verstärken durch Deacetylierung der Histone die Verpackung der DNA, wodurch die Gene inaktiviert werden (Silverstein und Ekwall 2005). HAT verringern, wie schon angedeutet, durch Übertragung von Acetylgruppen die positive Ladung der Histone und somit die Kondensation des Chromatins.

Die Methylierung von Histonen ist eine weitere Möglichkeit, die Transkription von Genen zu regulieren. Vermittelt wird dies durch spezifische Lysin- und Arginin-Methyltransferasen, die Methylgruppen auf Histone übertragen und dadurch die Genexpression regulieren (Chen et al. 1999; Rea et al. 2000).

1.1.3.2. DNA-Methylierung

Ein weiterer Mechanismus zur Regulierung der Genexpression ist die DNA-Methylierung. Dabei werden durch spezifische Enzyme, die Methyltransferasen, Methylgruppen auf CpG-reiche Abschnitte der Promotoren der zu regulierenden Gene übertragen. Der Effekt, den die Hypermethylierung von Promotoren bewirkt, ist ambivalent und unterscheidet sich von Gen zu Gen. Gemeint ist hierbei, dass obwohl das eine Gen durch die Hypermethylierung seiner Promotorregion aktiviert wird, ein anderes durch den gleichen Vorgang abgeschaltet werden kann.

In Fällen, in denen die Expression der Gene durch Hypermethylierung des Promotors gehemmt wird, erleichtert die Methylierung den Zugang von DNA-bindenden Proteinen. Hierdurch wird der Promotorzugang für Transkriptionsfaktoren erschwert und die Expression des betreffenden Gens inhibiert (Iguchi-Arigo und Schaffner 1989). Es resultieren Tumorerkrankungen, die durch Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen (Herman et al. 1994) bzw. von DNA-Reparaturgenen (Esteller et al. 2000) ausgelöst bzw. mitbedingt werden. Umgekehrt kann die

Hypomethylierung der CpG-reichen Promotoren der Grund dafür sein, dass ähnliche Gene vermehrt ausgeprägt werden (De Smet et al. 1999; Kulozik et al. 2000).

Bei Betrachtung anderer Gene wiederum lässt sich gegenteiliges Verhalten beobachten. So werden Gene beschrieben, im speziellen das translozierte ABL-Gen, deren Expression durch die Hypermethylierung seiner Promotoren gesteigert wird. Dieser Effekt der Hypermethylierung von Genen soll später bei der Schilderung der molekularen Grundlagen der CML zur Sprache kommen.

1.1.3.3. Beeinflussung der epigenetischen Regulierung

Die Expression immunologisch relevanter Gene, z. B. die von CT-Antigenen in Tumoren, wird ebenfalls durch die eben beschriebenen epigenetischen Mechanismen beeinflusst. Dies konnte wiederholt belegt werden, indem eine Behandlung von Tumorzellen mit demethylierenden Substanzen oder Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDAC-Inhibitoren) *in vitro* die Expression von CT-Antigenen in Tumorzellen förderte. Es resultierte eine Steigerung der Immunogenität der malignen Zellen (Sigalotti et al. 2004; Weber et al. 1994; Weiser et al. 2001; Wischnewski et al. 2006).

Um die Expression tumorspezifischer Gene zu fördern werden Medikamente angewendet, die die oben beschriebenen Mechanismen der epigenetischen Regulation beeinflussen. Zur Modulation der DNA-Methylierung werden Nukleosidanaloga verwendet. Das in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz kommende Nukleosidanalogon 5-Aza-2'-Deoxycytidine (Aza, Decitabin) zeichnet sich durch den Austausch eines Kohlenstoffatoms für ein Stickstoffatom an Position 5 der Nukleosidringstruktur aus. Es wird während der DNA-Replikation anstatt Cytosin in CpG-Inseln innerhalb des Promotorbereichs eingebaut. Decitabin-enthaltende Promotoren können nicht mehr methyliert werden und führen zudem zu einem Verharren der Methylgruppen-übertragenden Enzyme (Schermelleh et al. 2005). Gene, die vorher durch Methylierung der Promotorregion nur schwach ausgeprägt waren, zeigen einen Anstieg der Expression nach der Behandlung mit Decitabin (Stresemann und Lyko 2008).

Ein weiterer Weg der epigenetischen Modulation von Genexpressionshäufigkeiten ist die schon angedeutete Veränderung der Acetylierung von Histonen. Diese bestimmt über den Kondensationsgrad der DNA die Expressionshäufigkeit von auf entsprechenden Abschnitten liegenden Genen. Die Kondensation der DNA kann durch die Hydroxamsäure Trichostatin A (TSA) vermindert werden (Tsuji et al. 1976). Dies geschieht durch die Hemmung der HDAC durch TSA, wodurch es zu einer verminderten Deacetylierung der Histone kommt (Yoshida et al. 1990). Dies verbessert den Zugang von Transkriptionsfaktoren zu der darunter liegenden DNA, was die Genexpression steigert. TSA wird in der vorliegenden Arbeit als epigenetischer Modulator genutzt.

Ließe sich die Expression tumorspezifischer Gene durch die Behandlung mit demethylierenden bzw. HDAC-inhibierenden Substanzen steigern bzw. induzieren, würde die Attraktivität dieser Antigene für immunologische Krebstherapien weiter zunehmen. So konnte eine Neuexpression von CT-Antigenen in soliden Tumoren sowie in hämatologischen Malignomen nach der Behandlung mit Decitabin beobachtet werden (Claus et al. 2005; Schrump et al. 2006; Sigalotti et al. 2003). Auch im Falle der CML ließ sich ein solcher Zusammenhang bereits nachweisen (Roman-Gomez et al. 2007a). Die vorliegende Arbeit bedient sich ebenfalls dieser Methoden, um eine Induzierbarkeit der untersuchten CT-Antigene in CML-Zelllinien zu prüfen.

1.2. Chronische myeloische Leukämie (CML)

1.2.1. Definition

Die CML wurde 1845 das erste Mal durch die Pathologen Dr. Rudolf Virchow und Dr. John Hughes Bennett beschrieben (Bennett 1845; Virchow 1845). Sie beruht auf einer klonalen Vermehrung einer pluripotenten Stammzelle im Knochenmark mit reziproker Translokation zwischen Chromosom 9 und Chromosom 22. Die veränderte Stammzelle behält ihre Fähigkeit zur Differenzierung bei. Dadurch zeigt sich im Verlauf der Erkrankung ein typisches Bild mit einer starken Vermehrung von funktionstüchtigen, reifen neutrophilen Granulozyten und deren Vorstufen (Fialkow et al. 1977). Bei ausbleibender Behandlung geht die Erkrankung regelhaft von einer

chronischen Phase (CP) über eine akzelerierte Phase (AP) in eine Blastenkrise (BC) über (Hehlmann et al. 2005).

1.2.2. Epidemiologie und Ätiologie

Die CML stellt 15% aller Leukämien. Die Inzidenz beträgt ca. ein bis zwei Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner/ Jahr. Im Median tritt sie zwischen dem 45. und 55. Lebensjahr auf (Faderl et al. 1999). Die Ätiologie ist nicht vollständig geklärt. Als Risikofaktoren gelten hohe Dosen ionisierender Strahlen und Chemikalien wie Benzol (Bizzozero et al. 1966). Der Eintritt der BC wird durch Nikotinkonsum beschleunigt (Hehlmann et al. 2005).

1.2.3. Pathophysiologie

1.2.3.1. Zellularbiologische Grundlagen

Die CML wird zu den myeloproliferativen Erkrankungen gezählt. Ein genetischer Defekt einer myeloischen Stammzelle ist Ausgangspunkt der Erkrankung. Die Expansion des unreifen Klon im Knochenmark bewirkt eine Verdrängung der gesunden Hämatopoese. Die Verdrängung hat im Verlauf der Erkrankung eine Abnahme der Erythrozyten- und Thrombozytenzahlen im Blut zur Folge. Im Vordergrund steht jedoch die ausgeprägte Zunahme von Granulozyten und ihrer Vorstufen (Hehlmann et al. 2005). Diese fehlerhafte Expansion myeloischer Klone beruht auf einer Veränderung ihrer proliferativen Kapazität. Diese ist im Vergleich zu normalen Progenitorzellen stark gesteigert. Zudem kommt es zu einer Verlagerung der Balance zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung zugunsten der Differenzierung. Dies bewirkt eine Verkleinerung des Stammzellpools bei zeitgleichem Anstieg der Zahl von Progenitorzellen (Faderl et al. 1999). Außerdem scheint ein bestimmtes Zytokinprofil im Serum von CML-Patienten die Expansion der CML-Progenitorzellen zu verstärken (Brown et al. 1986). So zeigt z. B. die Produktion von Interleukin-1 β , das im Knochenmark CML-kranker Patienten gebildet wird, einen proliferationssteigernden Effekt (Estrov et al. 1991).

1.2.3.2. Molekularbiologische Grundlagen

Molekularbiologisch beruht die CML auf einer reziproken Translokation zwischen Chromosom 9 und Chromosom 22. Diese fiel zuerst in zytogenetischen Untersuchungen durch ein verkürztes Chromosom 22 (22q-) auf, was auch heute noch als Philadelphia-Chromosom (Ph+) bezeichnet wird (Nowell und Hungerford 1960). Dabei kommt es zur Deletion des langen Arms von Chromosom 22, wodurch dieser auf Chromosom 9 transloziert wird. Gleichzeitig wird ein Teil des langen Arms des Chromosoms 9 auf Chromosom 22 transloziert (Rowley 1973). Die Translokation t(9;22) spielt in der Entwicklung der CML eine entscheidende Rolle und kann bei 90-95% der Patienten nachgewiesen werden.

Das Onkogen c-ABL ist auf dem langen Arm des Chromosoms 9 lokalisiert, der auf Chromosom 22 transloziert wird. Es codiert für eine non-Rezeptor Tyrosinkinase (Faderl et al. 1999). Diese fusioniert mit der BCR (breakpoint cluster region) auf Chromosom 22 (Heisterkamp et al. 1985). Das dabei entstehende Fusionsgen heißt BCR-ABL (Ben-Neriah et al. 1986). Nach der Translokation bilden das BCR-Gen sowie das ABL-Gen eine transkriptionale Einheit, die vom Promotor des BCR-Gens reguliert wird (Shah et al. 1991). Im Verlauf der Erkrankung wird die Aktivierung des Fusionsgens durch Methylierung des Promoters beeinflusst. Es erfolgt eine *de novo* Methylierung zuvor unmethylierter CpG-reicher Promotorbereiche, was die Expression des Fusionsgens weiter steigert. Diese wird vor allem in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien beobachtet (Asimakopoulos et al. 1999; Issa et al. 1999; Zion et al. 1994). Das nach Translation des Fusionstranskripts hervorgehende BCR-ABL-Protein fungiert als konstitutiv aktivierte Tyrosinkinase (Konopka et al. 1984; Muller et al. 1991).

Das BCR-ABL Transkript ist der zentrale Mediator der myeloischen Proliferation. Es bewirkt eine gestörte Regulation von Proliferation und Differenzierung sowie eine Hemmung der Apoptose in myeloischen Zellen (Staib und Diehl 2004).

1.2.4. Klinik, Verlauf

Durch die Expansion des Zellklons kommt es zur Verdrängung der gesunden Hämatopoese, die in extramedulläre Organe wie Leber und Milz verlagert wird (Fischer et al. 2007). Die Entwicklung und Ausbreitung der Erkrankung, die die

Verdrängung der gesunden Hämatopoese zur Folge hat, lässt sich in drei Phasen gliedern.

In der chronischen Phase (CP), in der die Erkrankung gut auf eine Therapie anspricht (Kantarjian et al. 2002), ist eine ausgeprägte Granulozytose samt Granulozytenvorstufen und eine Splenomegalie vorherrschend. Klinische Allgemeinsymptome wie Müdigkeit, eingeschränkte Leistungsfähigkeit, Gewichtsverlust und Nachtschweiß sind selten, können aber auftreten. Als Komplikation der hohen Leukozytenzahlen sind in seltenen Fällen leukämische Thromben möglich, die unter anderem Milzinfarkte, neurologische Ausfälle und Angina Pectoris Beschwerden hervorrufen können (Leukostasesyndrom) (Hehlmann et al. 2005). Die CP hält unbehandelt im Mittel vier bis sechs Jahre an, bevor die Erkrankung dann in einer akzelerierten Phase (AP) in die terminale Blastenkrise (BC) übergeht (Druker 2008).

AP und BC fallen durch Zunahme der Allgemeinsymptome trotz durchgeführter Therapie auf. Hinweise für diese fortgeschrittenen Krankheitsstadien sind unklares Fieber, Gewichtsverlust, Knochenschmerzen, zunehmender Medikamentenbedarf, Anämie, Blutungen und Infektionen (Staib und Diehl 2004).

1.2.5. Diagnostik

An CML erkrankte Patienten werden in ca. 85% der Fälle in der CP diagnostiziert (Faderl et al. 1999). Zur diagnostischen Sicherung des Verdachts einer CML sind ein Differenzialblutbild, ein Blutastrich (Abb. 1), die Sonographie des Abdomens zur Beurteilung einer Splenomegalie, eine Knochenmarkzytologie, eine Knochenmarkhistologie, die Bestimmung der alkalischen Leukozytenphosphatase (ALP) sowie der Laktatdehydrogenase (LDH) erforderlich. Mittels Zytogenetik erfolgt der Nachweis des Ph⁺ und mit Hilfe molekulargenetischer Methoden (PCR, FISH) wird das BCR-ABL-Fusionsgen nachgewiesen. Die Stadieneinteilung wird anhand des Anteils von Promyelozyten und Blasten im peripheren Blut und im Knochenmark bestimmt (Staib und Diehl 2004).

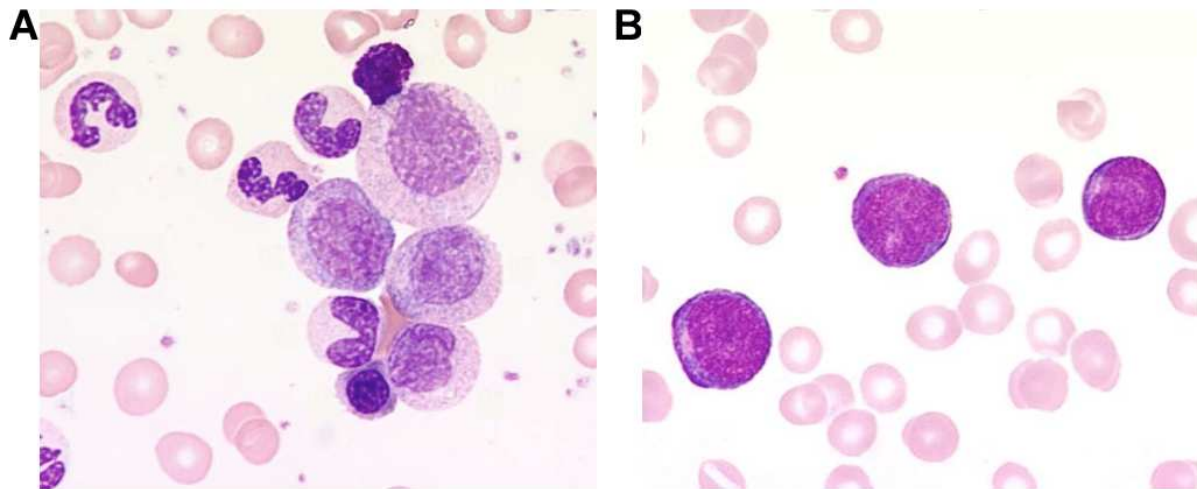
In der CP findet sich im Blutastrich eine kontinuierliche Linksverschiebung bis zum Promyelozyten oder Myeloblasten bei ausgeprägter Leukozytose. Die Leukozytose

bei der CML ist die ausgeprägteste aller Leukämien. Der Anteil an Blasten im peripheren Blut und im hyperzellulären Knochenmark ist <5%.

Bei einem Promyelozyten- und Blastenanteil im peripheren Blut von 10 bis <30% besteht der Verdacht auf eine CML in der AP. Im Knochenmark lassen sich sogar Promyelozyten und Blasten von 10 bis <50% nachweisen. Weiter charakteristisch ist eine Basophilie von >20% und eine Thrombozytopenie ($<100 \times 10^3/\mu\text{l}$) bzw. eine Thrombozytose ($>1000 \times 10^3/\mu\text{l}$). Mittels Zytogenetik lassen sich zusätzlich weitere Chromosomenveränderungen nachweisen (Staib und Diehl 2004).

Steigt der Anteil der Blasten im peripheren Blut auf >20% bzw. im Knochenmark auf >50% an, spricht man von einer Blastenkrise. Bei der Entnahme von Knochenmarkbiopsien finden sich charakteristische Blastencluster (Cortes et al. 2006). Im Blutaussstrich zeigt sich während der BC ein Hiatus leucaemicus mit Fehlen der mittleren Entwicklungsstufen der Granulopoese. Bei zwei Drittel der Patienten kommt es zu einer myeloischen Blastenkrise mit einem Anstieg von Myeloblasten und Promyelozyten, bei einem Drittel zu einer phänotypisch lymphatischen Blastenkrise (Staib und Diehl 2004).

Abbildung 1: Blutausstriche von an CML erkrankten Patienten in der CP sowie in der BC.



A: Blutausstrich eines an CML erkrankten Patienten in der CP. Es sind alle Entwicklungsstufen der Granulopoese zu sehen (1000-fache Vergrößerung); [Online im Internet] URL http://www.uke.de/extern/klinische-chemie/protected/hemosurf/Data/Data_D/Gallery/CML_fr.htm. [Stand: 02.11.2010, 10:00]

B: Blutausstrich eines an CML erkrankten Patienten in der BC. Es sind leukämische Blasten zu sehen (1000-fache Vergrößerung); [Online im Internet] URL http://www.uke.de/extern/klinische-chemie/protected/hemosurf/Data/Data_D/Gallery/CBS_fr2.htm. [Stand: 02.11.2010, 10:00]

Aus: HemoSurf, mit freundlicher Genehmigung von Dr. med. U. Woermann, Bereichsleiter E-Learning, Institut für Medizinische Lehre, Universität Bern, Schweiz.

1.2.6. Therapie und neue Therapieansätze

Primäre Therapieoptionen der CML sind die medikamentöse Therapie mit verschiedenen Medikamentenklassen sowie, als bisher einziger kurativer Ansatz, eine frühe allogene Stammzelltransplantation (SZT) (Hochhaus et al. 2004). Therapieziele sind das Erreichen einer kompletten hämatologischen Remission (HR), einer kompletten zytogenetischen Remission (CgR) sowie einer bedeutenden molekularen Remission (MMoIR). HR bedeutet eine Normalisierung des Blutbilds, CgR beschreibt den fehlenden Nachweis des Ph⁺ Chromosoms. Ein molekulares Ansprechen ist durch den negativen Nachweis des Fusionsgens BCR-ABL mittels RT-PCR definiert (Baccarani et al. 2006).

1.2.6.1. Medikamentöse Therapie der CML

Ein Durchbruch der medikamentösen CML-Therapie gelang mit der Einführung des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib. Dieser hemmt die im unbehandelten Krankheitsverlauf konstitutiv aktivierte BCR-ABL-Tyrosinkinase. Bei dem Medikament handelt es sich um ein Molekül, das kompetitiv an die vom Gen c-ABL codierte Tyrosinkinase bindet und dadurch das Andocken von ATP und die Übertragung von Phosphatgruppen auf Substrate der Signalkaskade unterbindet (Hochhaus et al. 2004).

Der Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI) Imatinib gilt bei neu diagnostizierter CML in der CP als das Medikament der ersten Wahl. In mehreren Studien zeigte es sich dem früheren Therapiestandard gegenüber, bestehend aus Interferon-Alpha (IFN- α) mit oder ohne Low-dose Arabinosyl Cytosin (LDAC), überlegen (Hughes et al. 2003; O'Brien et al. 2003). Auch in fortgeschrittenen Erkrankungsstadien (AP und BC) bewirkt Imatinib gute Ansprechraten (Sawyers et al. 2002; Talpaz et al. 2002). Bezüglich der Langzeitwirkung gab es zunächst nur wenige Informationen, da das Medikament erst im Jahre 2001 eingeführt wurde. Veröffentlichte Studien aus diesem und den vergangenen Jahren bringen nun jedoch Neuigkeiten über die Imatinibtherapie zum Vorschein. So konnte in Studien bei ca. 20% der mit Imatinib behandelten Patienten keine vollständige CgR erreicht werden (de Lavallade et al. 2008). Diese vor Therapiebeginn bestehenden sowie andere, erworbene Resistenzen lassen sich in target-independent, target-dependent sowie drug-dependent Resistenzen unterscheiden (Branford et al. 2003; le Coutre et al. 2000; Quintas-Cardama et al. 2009; van der Kuip et al. 2005). Zudem mehren sich Fälle von schweren Nebenwirkungen und minimal residualen Erkrankungen (MRD).

Da nach den geschilderten Berichten nicht alle Patienten auf eine Imatinib-Therapie anzusprechen scheinen und einige Patienten nach einer gewissen Therapiedauer ebenfalls Resistenzen gegenüber Imatinib entwickeln, wurde die Erforschung neuer BCR-ABL-Tyrosinkinase-Inhibitoren vorangetrieben. In Folge wurden potentere TKI entwickelt und untersucht. Nilotinib, eine der gut untersuchten Alternativen, zeigt signifikant höhere Raten bezüglich der kompletten CgR als Imatinib (Saglio et al. 2010). Auch Dasatinib, ein weiterer alternativer TKI, zeigt vorteilhaftere Ergebnisse als Imatinib. Für ihn lassen sich neben signifikant höheren kompletten CgR-Raten auch höhere MMolR-Raten nachweisen (Kantarjian et al. 2010).

Trotz guter Ergebnisse der medikamentösen Therapieoptionen verspricht keines der genannten Präparate eine Heilung der Erkrankung. Einzig die allogene SZT ist derzeit in der Lage, die CML zu heilen. Welche Faktoren für die Indikation der allogenen SZT von Bedeutung sind und welche Rolle das Immunsystem dabei spielt, soll im Folgenden geschildert werden.

1.2.6.2. Allogene Knochenmark- oder Blutstammzelltransplantation

Als momentan einziger gesicherter kurativer Ansatz zur Heilung der CML kann die allogene Stammzelltransplantation (SZT) angesehen werden (Transplantation 1999). Unter Berücksichtigung individueller Risikoparameter des Patienten zum Diagnosezeitpunkt, die mit Hilfe von CML-disease-risk-scores und einem Transplantationsrisiko-Score eruiert werden (Gratwohl et al. 1998; Hasford et al. 1998), sowie des medianen Alters, der Genetik der HLA-Antigene und des individuellen Transplantationsrisikos, ist eine HLA-identische Geschwisterspender-Transplantation bei ca. 20% der CML-Patienten möglich. Vor- und Nachteile dieser Behandlung liegen dabei nah beieinander. Zum einen ist das Auftreten einer Graft-versus-Host Disease (GvHD) für niedrige Rezidivquoten verantwortlich. Zum anderen bedingt diese Reaktion, ebenso wie die zu beobachtenden opportunistischen Infektionen, auch die hohen transplantationsassoziierten Mortalitätsraten von 20-30% (Kolbe et al. 2007).

Wegen der guten Wirksamkeit und der besseren Überlebensraten von Imatinib ist die allogene SZT heute nur noch in wenigen Fällen indiziert (Henkes et al. 2008). Indikationen für eine allogene SZT sind weiterhin das Versagen einer Therapie mit Imatinib oder neueren Tyrosinkinase-Inhibitoren bzw. die Progression der Erkrankung in die AP und BC (von Bubnoff und Duyster 2010).

1.2.6.3. Die Rolle des Immunsystems bei der Behandlung der CML

Dass immunologische Prozesse bei der Kontrolle der CML ein zentrales Element darstellen, ist früh belegt worden. So stellt die allogene SZT, wie schon erwähnt, die einzige Therapieform mit kurativem Potential dar. Dieses Potenzial beruht nicht nur auf der vor der Transplantation applizierten Chemotherapie (Konditionierung)

sondern auch auf dem Graft-versus-Leukemia (GvL) Effekt. Dieser durch T-Zellen vermittelte Effekt beruht auf den Grundlagen der GvHD-Reaktion (Goldman und Melo 2003).

1.2.6.3.1. Graft-versus-Leukemia (GvL) Effekt

Der Effekt einer GvL-Reaktion als Teilaspekt des kurativen Potenzials einer allogenen SZT ist heute unbestritten (Barrett und Malkovska 1996). Dass dieser Effekt durch allogene T-Zellen vermittelt werden könnte, ließ sich durch mehrere Beobachtungen belegen. So ist z. B. ein Rückfall einer CML nach allogener SZT bei Auftreten einer GvHD seltener zu verzeichnen (Sullivan et al. 1989; Weiden et al. 1979). Desweiteren kommt es eher zum Rezidiv, wenn bei der SZT Zellen von synergetischen Geschwisterspendern transplantiert werden, wohingegen Transplantationen von allogenen Stammzellen seltener zum Rückfall führen (Gale et al. 1994; Horowitz et al. 1990). Zusätzlichen Verdacht auf eine Rolle der T-Zellen bei der GvL-Reaktion schürt der Befund, dass Patienten, die Stammzelltransplantate mit verminderten Lymphozytenzahlen erhalten, ebenfalls eher ein Rezidiv erleiden (Goldman et al. 1988; Hale und Waldmann 1994).

1.2.6.3.2. Donor-Lymphozyten-Infusion (DLI)

Einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung des Immunsystems ist der Effekt der DLI. Dieser beruht ebenfalls auf der GvL-Reaktion. Dabei bewirken als Infusion gegebene Lymphozyten des ursprünglichen Spenders eine erneute komplette CgR, wenn es nach der allogenen SZT zu einem Rückfall gekommen ist (Collins et al. 1997; Guglielmi et al. 2002; Kolb et al. 1995; van Rhee et al. 1994). Welche molekularen Zielstrukturen von den tumorspezifischen T-Zellen erkannt werden, ist jedoch noch weitgehend unbekannt.

1.3. Fragestellung

Der Behandlung der CML stehen heutzutage eine Reihe von therapeutischen Möglichkeiten zur Verfügung. Doch trotz der recht guten Langzeitergebnisse, die durch die vielen in den letzten Jahren durchgeführten klinischen Studien gewonnen wurden, besteht Handlungsbedarf. Gründe hierfür ergeben sich aus den beobachteten Nebenwirkungen und Resistenzen, die durch die medikamentöse Therapie hervorgerufen werden. Einer der vielversprechendsten neuen therapeutischen Wege ist die zielgerichtete Immuntherapie.

Als mögliche Zielstrukturen einer solchen Immuntherapie sind die Cancer-Testis-Antigene zu sehen. Bei verschiedenen malignen Erkrankungen dienen sie sowohl als Zielstrukturen neuer therapeutischer Optionen als auch als diagnostische Parameter bei der Beurteilung therapeutischer Erfolge. Es stellt sich die Frage, ob diese Aussagen bezüglich der CTA auch für die CML zutreffen. Bisher existieren nur wenige systematische Untersuchungen, die eine Beurteilung des immunologischen Potenzials von CTA als therapeutische Zielstrukturen bei der Behandlung der CML ermöglichen.

Bei der Etablierung von CT-Antigenen als Zielstrukturen immunologischer Therapieoptionen spielt deren Expressionshäufigkeit in den jeweils malignen veränderten Zellen eine große Rolle. Welche CT-Antigene im Falle der CML häufig exprimiert sind ist bisher nicht systematisch untersucht worden. Auf Grund dessen soll sich die vorliegende Arbeit zunächst damit beschäftigen, in CML-Zelllinien häufig und spezifisch exprimierte CT-Antigene zu beschreiben.

Mittels epigenetischer Modulatoren ist es möglich, die Expressionshäufigkeit immunologischer Zielstrukturen zu beeinflussen. Ob dies auch auf in CML-Zelllinien nachgewiesene CTA zutrifft, ist bisher nur wenig untersucht worden. In der vorgelegten Arbeit sollen die CML-Zelllinien mit den epigenetisch wirksamen Substanzen 5-Aza-2'-Deoxycytidine (Aza) zum einen und mit Trichostatin A (TSA) zum anderen behandelt werden. Hierbei soll der Frage auf den Grund gegangen werden, ob epigenetische Modulatoren auch im Falle der CML die Expression von immunologischen Zielstrukturen zu steigern vermögen.

Die beschriebenen Expressionsuntersuchungen dieser Studie erfolgen auf RNA-Ebene mittels RT-PCR. Da immunkompetente Zellen jedoch vorwiegend

Proteinstrukturen als Antigene erkennen, soll im Verlauf der Arbeit untersucht werden, ob die auf RNA-Ebene exprimierten CTA durch den Vorgang der Translation auch auf Protein-Ebene ausgeprägt werden. Diese Untersuchung erfolgt mittels Western Blot. Im Falle einer positiven Expression der einzelnen CTA auf Protein-Ebene wäre dann ein Einsatz als Zielstruktur immunkompetenter Zellen denkbar.

Im Falle der meisten CTA ist deren Funktion im Zellzyklus einer maligne transformierten Zelle oft unklar. Um Anhaltspunkte über die Aufgaben dieser Antigene zu bekommen, ist es nützlich, die Lokalisation der einzelnen Strukturen auf zellulärer Ebene zu klären. Folglich soll als letzter Punkt dieser Arbeit der Nachweis eines bestimmten CTA in einer CML-Zelllinie mittels Immunfluoreszenz erfolgen, um aus der Lokalisation Rückschlüsse auf deren Funktion zu ziehen.

Alle hier beschriebenen Untersuchungen sollen dazu beitragen, Antworten auf die gestellten Fragen zu liefern, um neue Zielstrukturen für die Diagnostik und die Therapie der CML zu gewinnen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. CML-Zelllinien

Die Zelllinien, an denen die Expression von CT-Antigenen nachgewiesen werden, wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Germany) bezogen und nach Ursprung, Erkrankungsphase, molekulargenetischen sowie zytogenetischen Gesichtspunkten charakterisiert. Die Reihenfolge der Aufzählung erfolgt alphabetisch (Tab. 1).

2.1.2. Gesunde Spender als Kontrollgruppe

Bei den Kontrollproben handelt es sich um gesunde Knochenmarkspender, die freiwillig in eine Knochenmarkentnahme an der Interdisziplinären Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) einwilligten. Der Großteil des Materials dient dabei therapeutischen Zwecken. Reste des Materials werden mit Einwilligung der Patienten zu Forschungszwecken genutzt. Die Verwendung dieses Zellmaterials wurde von der Ethikkommission bewilligt.

In dieser Arbeit dienen die Knochenmarkproben als Kontrollgruppe. Eine ausbleibende Expression der CTA bestätigt deren Profil, nachdem sie nicht in gesunden Körpergeweben zu finden sind, ausgenommen von gesundem humanem Hodengewebe (Testis). Erfüllen die hier getesteten CTA diese Grundvoraussetzung, werden sie in den Pool der zu untersuchenden Antigene aufgenommen.

2.1.3. Cancer-Testis-Antigene

Auf der Suche nach Targetstrukturen werden 31 Cancer-Testis-Antigene untersucht. Diese sind im Anhang tabellarisch aufgelistet (Tab. 2). Darin werden die verwendeten Primersequenzen der einzelnen CTA, die PCR-Konditionen sowie die genomische Lokalisation der CTA angegeben. Quellen, in denen die jeweiligen CTA schon Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen waren, werden ebenfalls genannt. Desweiteren sind die durch Sequenzierung kontrollierten Fragmentgrößen der

cDNAs aufgeführt. Die Einstellungen des PCR-Programms zur Sequenzierung sind separat aufgelistet (Tab. 3).

2.1.4. Geräte, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien, Enzyme, Nukleotide

Die während dieser Arbeit verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Chemikalien, Reagenzien, Enzyme und Nukleotide sowie verwendete Kits sind im Anhang tabellarisch aufgelistet (Tab. 4). Ebenfalls werden die Komponenten der verwendeten Gebrauchslösungen tabellarisch aufgeführt und deren Herstellung kurz beschrieben (Tab.5).

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung und epigenetische Behandlung der CML-Zelllinien

Die CML-Zelllinien werden entsprechend der Instruktionen der DSMZ kultiviert. Um den Einfluss epigenetischer Substanzen auf die Expression von CT-Antigenen in den einzelnen CML-Zelllinien zu untersuchen, werden demethylierende sowie HDAC-inhibierende Substanzen während der Kultivierung hinzugegeben. Hierbei finden die Reagenzien 5-Aza-2'-Deoxycytidine (Aza) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) und Trichostatin A (TSA) (Sigma-Aldrich) allein als auch in Kombination Verwendung (Tab. 4).

Zur Kultivierung der CML-Zelllinien werden 3 ml Nährmedium pro Kultivierungseinheit gegeben. Das Medium enthält RPMI 1640 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) und 10% FCS (Invitrogen). In dieses gibt man 5×10^6 Zellen und inkubiert sie bei 37°C für insgesamt 72 h. Das Medium wird täglich durch abzentrifugieren und Zugabe neuen Mediums gewechselt, wobei auch die epigenetischen Modulatoren nach festgelegtem Schema hinzugefügt werden (Tab. 5). Nach 72 h werden die Zellen geerntet, gezählt und gewaschen. Hiernach werden die kultivierten CML-Zelllinien in 350 µl RLT-Puffer aufgenommen und bei -80°C eingefroren.

2.2.2. RNA-Isolation und RNA-Spektrometrie

Um den mRNA-Expressionsstatus der untersuchten CT-Antigene zu erfassen, muss diese zuvor aus allen Proben mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) herausgelöst werden. Die RNA-Isolation erfolgt nach den Richtlinien des Herstellers. Dazu werden die Zellen durch den QIAshredder (Qiagen) vom Zelldetritus getrennt, der in der Membran des Systems verbleibt. Durch Zufügen von 70%igen Ethanol (J. T. Baker, Deventer, Netherlands) werden die Zellen, die sich im Eluat befinden, zerstört. Mittels RNeasy-Mini-Kit (Qiagen) wird die RNA isoliert. Hierzu wird das erhaltene Gemisch aus mRNA und Alkohol auf eine Membran gegeben und in mehreren Schritten mittels Buffer-RW1 und Buffer-RPE (aus RNeasy Mini Kit, Qiagen) gewaschen, um den Alkohol zu entfernen. Die gewonnene RNA bindet an die Membran und wird durch 40 µl DEPC-behandeltem Wasser (Sigma-Aldrich) eluiert und nach Zentrifugation in ein Eppendorf-Tube (Eppendorf, Hamburg, Germany) pipettiert. Die Menge der gewonnenen RNA wird mittels Spektrometer gemessen. Nach erfolgter Bestimmung wird die RNA für 10 min bei 70°C im Wasserbad inkubiert und anschließend bei -70°C eingefroren.

Die Spektrometermessung erfolgt im Eppendorf Bio Photometer (Eppendorf). Dabei werden 2 µl der eluierten RNA mit 58 µl DEPC-behandeltem Wasser (Sigma-Aldrich) in einer UVette 220-160 nm (Eppendorf) verdünnt. Nach einer Eichung mit 60 µl DEPC-behandeltem Wasser erfolgt die photometrische Bestimmung.

2.2.3. cDNA-Gewinnung

Aufgrund der Instabilität der RNA wird zur Sicherung der Information cDNA generiert. Dazu werden 2 µg RNA in einen 20µl Reverse-Transkriptase (RT) Reaktionsansatz gegeben (Tab.5). Diese Reaktionslösung enthält die AMV-RT (Promega, Mannheim, Germany) sowie Random Primer (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) als unspezifische Initiationsorte der Transkription. Das Programm läuft 45 min bei 42°C gefolgt von der Inaktivierung des Enzymes bei 95°C für 5 min. Die cDNA wird mit 60µl DEPC-behandeltem Wasser (Sigma-Aldrich) verdünnt und bei -20°C gelagert.

2.2.4. Qualitative RT-PCR und Gelelektrophorese

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) verwendet biologische Prinzipien, die mit Hilfe von hitzestabilen DNA-Polymerasen eine *in vitro* Vermehrung bestimmter DNA-Sequenzen ermöglichen. Diese Enzyme sind in der Lage, aus einzelsträngiger DNA die stabilere Doppelstrang-DNA zu synthetisieren. Für diesen Vorgang werden die für jedes Transkript spezifischen Primer benötigt (Tab. 2). Dies sind kurze Oligonukleotid-Sequenzen, die zu den Enden der zu amplifizierenden Sequenzen homolog sind. Durch wiederholte Schmelz- und Annealingzyklen, die für die einzelnen Primer unterschiedlich sein können (Tab. 2), führt die PCR zur exponentiellen Vermehrung der gewünschten Zielsequenz. Zur Visualisierung werden die Sequenzen durch Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels des fluoreszierenden DNA-Farbstoffs Ethidiumbromid (Invitrogen) sichtbar gemacht.

Zur Expressionsanalyse der einzelnen CTA benötigt man 4 µl cDNA (Äquivalent 0,1 µg RNA) und 21 µl eines PCR-Reaktionsansatzes (Tab. 5). Die Analyse erfolgt in einem für jedes CTA spezifischen Programm (Tab. 2).

Im Anschluss werden die PCR-Produkte auf einem 1,5 %igen Agarose Gel aufgetrennt, mit 12 µl Ethidiumbromid (Invitrogen) gefärbt, durch UV-Licht visualisiert und mittels CCD-Kamera (Appligene, Cedex, France) aufgenommen.

Deutlich sichtbare Banden sowie weniger deutlich sichtbare Banden werden bei negativer Wasserkontrolle als positives Ergebnis gewertet. Das Ausbleiben einer Bande bei nachweisbarer Positivkontrolle (Human Testes Proben) wird als negatives Ergebnis gewertet. Die Fragmentlänge wird abgeschätzt und mit Internetdatenbanken sowie mit Angaben in anderen Arbeiten verglichen. Zur Überprüfung und Bestätigung wird das Fragment später sequenziert. Die Qualität der cDNA wird mit dem Housekeeping-Gen Glycerinaldehyde-3-phosphate-Dehydrogenase (GAPDH) überprüft. Als Negativkontrolle wurden alle PCRs mit DEPC-behandeltem Wasser (Sigma-Aldrich) anstatt cDNA durchgeführt. Als Positivkontrollen diente cDNA abstammend von Human Testes Total RNA (Ambion, Austin, TX, USA).

2.2.5. Sequenzierung

Nach der Gelelektrophorese werden die gewünschten Banden ausgeschnitten, in ein 0,5 ml Eppendorf-Tube (Eppendorf) gefüllt und gewogen (Angabe in mg). Entsprechend des Fragmentgewichts wird die dreifache Menge an Buffer-QG aus dem Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) in μl hinzugegeben. Es folgen 10 min Inkubationszeit bei 50°C im Wasserbad. Danach wird Isopropanol im Verhältnis 1:1 dem Fragmentgewicht zugegeben und mittels Vortex vermischt.

Der gesamte Inhalt wird auf eine Säule aus dem Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) gegeben, 1 min stehen gelassen und dann 1 min bei 7826 g in der Eppendorf Centrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. Das Eluat wird verworfen. Danach erfolgt die Zugabe von 500 μl Buffer-QG (Qiagen) auf die Säule und Zentrifugierung bei 7826 g für 1 min. Daraufhin wird das Eluat verworfen, worauf die Zugabe von 750 μl Buffer-PE (Qiagen) und eine 1 min lange Zentrifugierung bei 7826 g folgt. Das Eluat wird erneut verworfen und die Probe erneut zentrifugiert (2 min lang bei 13 225 g). Im letzten Schritt wird die Säule in ein 0,5 ml Eppendorf-Tube (Eppendorf) gestellt, 30 μl DEPC-behandeltes Wasser (Sigma-Aldrich) auf die Säule gegeben, 1 min stehen gelassen und hiernach 1 min bei 7826 g zentrifugiert. In diesem Schritt wird das Genprodukt aus der Säulenmembran gelöst und in einem Eppendorf-Tube aufgefangen. Die Probe wird bei -20°C eingefroren.

10 μl der gereinigten Probe werden einer Sequenzierungsreaktion hinzugegeben (Tab. 5). Die erste Sequenzierungsreaktion erfolgt im Programm Sequenz (Tab. 3) des Master Cycler Gradient (Eppendorf). Nach der Sequenzierungsreaktion wird das Produkt in 0,5 ml Eppendorf-Tubes umgefüllt und auf Eis gestellt. Hinzugegeben werden 2 μl Natriumacetat und 60 μl 100%igen Ethanol (J. T. Baker). Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis wird die Probe 30 min bei 4°C und 30285 g in der Biofuge 13R (Heraeus Sepatech, Hanau, Germany) zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert. Es folgt die Zugabe von 60 μl 70%igen Ethanol (J. T. Baker), wonach die Probe 15 min bei 30285 g bei einer Temperatur von 4 °C in der Biofuge 13R (Heraeus Sepatech) zentrifugiert wird. Der Überstand wird erneut abpipettiert. Zum Trocknen des Tubeinneren werden die Tubes in geöffnetem Zustand 20 min in einer Vakuumzentrifuge (Heto, Holten, Germany) zentrifugiert. Anschließend wird die Probe bei -20°C eingefroren. Die Farbstoff-terminierten Sequenzen werden anschließend im ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City,

CA, USA) durch einen Sequenzierdienst sequenziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

2.2.6. Western Blot

Die Methode des Western Blots erlaubt es, Proteine nach verschiedenen Eigenschaften aufzutrennen. Die gebräuchlichste Form ist die Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE). Dabei bewirkt das Dodecylsulfat eine Umhüllung des gesamten Proteins, wodurch die Migration des Proteins im elektrischen Feld erleichtert wird. Proteine verschiedener Größen durchwandern dieses mit verschiedenen Geschwindigkeiten, was eine Unterscheidung anhand des Molekulargewichts nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran erlaubt. Die Unterscheidung ist jedoch erst nach Visualisierung der Proteinbanden möglich. Hierfür werden Antikörper verwendet, die spezifisch die gesuchten Proteine erkennen. Diese Protein-Antikörper-Komplexe werden wiederum durch einen Zweitantikörper erkannt, der die Sichtbarmachung vermittelt.

Zur Gewinnung des Totalproteins aus den CML-Zelllinien sowie aus den Spenderzellen werden diese Proben mit RIPA-Lysispuffer (BioVision, Mountain View, Ca, USA) und einem Protease-Inhibitor-Cocktail (Roche, Basel, Schweiz) versetzt und bei 4°C auf einen Schüttler (IKA, Staufen, Germany) 30 min lang bewegt. Danach wird das Lysat 30 min bei 4°C und 13225 g zentrifugiert.

Zur Auftrennung der in den Lysaten enthaltenen Proteine müssen die Proteine vorher denaturiert werden. Dazu werden je 30 µg Protein mit 5 µl LDS-Sample-Buffer (Invitrogen) und 2 µl Sample-Reducing-Agent (Invitrogen) versetzt und 10 min bei 70°C inkubiert. Die Lysatproben werden auf 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE Gelen (Invitrogen) aufgetragen. Zudem werden 1,5 µl Größenmarker See-Blue-Plus-2-Prestrained-Standard (Invitrogen) auf das Gel aufgetragen. Daraufhin werden die Proben elektrophoretisch im Mini-Protean3 Electrophoresis System (Invitrogen) bei konstant 195 V in Nu-Page-SDS-Running-Buffer 20x (Invitrogen) 1 h lang aufgetrennt. Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf die Nitrozellulosemembran (Whatman, Dassel, Germany) geschieht in der Western Blot Kammer Mini Trans Blot Cell (Invitrogen). Hierbei werden die Proteine bei konstant 25 V 1 h lang auf die Membran geblottet. Im Anschluss wird die Nitrozellulosemembran in 3%iger

Blocklösung (Top Fluka + TBST) bei 4°C über Nacht inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Membran zu blockieren. Es folgt die 4 h dauernde Inkubation mit den Primärantikörpern (Tab. 6). Anschließend wird die Nitrozellulosemembran viermal mit TBS-Tween (Sigma-Aldrich) gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Darauf wird die Membran 1 h mit dem 1:5000 verdünnten, gegen Kaninchen-IgG gerichteten, Zweitantikörper versetzt. Es folgen erneut vier Waschschriffe mit TBS-Tween (Sigma-Aldrich), um nicht gebundene Zweitantikörper zu entfernen. Die Zweitantikörper sind mit HRP konjugiert, was die Detektion im ECL-Plus-System (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) ermöglicht. Reagenz A und Reagenz B des ECL-Plus-Systems werden im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Membran wird mit dieser Mischung 1 min lang versetzt und danach getrocknet. Durch die Zugabe der ECL-Mischung oxidiert die an die Zweitantikörper konjugierte Horseradish-Peroxidase (HRP) das in der ECL-Plus-Mischung enthaltene Lumigen PS-3 Acriden Substrat. Das entstandene Produkt luminesziert und färbt somit den in einer Röntgenfilmkassette auf die Membran aufgelegten Audiographiefilm. Zur Qualitätskontrolle der Proben wird jeweils auch ein Western Blot des Housekeeping-Gens β -Actin durchgeführt.

Die Ausprägung der neun CT-Antigene wird nach der geschilderten Methode an neun CML-Zelllinien sowie an 10 gesunden Spenderproben untersucht. Die dabei verwendeten Antikörper wurden u. a. vom Ludwig Institute for Cancer Research (Abteilung New York) zur Verfügung gestellt. Anti- β -Actin Antikörper wurden kommerziell erworben (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA).

2.2.7. Immunfluoreszenz

Mittels Immunfluoreszenz wird die Anwesenheit und Lokalisation bestimmter Antigene in bzw. auf Zellen nachgewiesen. Man unterscheidet die direkte von der indirekten Immunfluoreszenz. Bei der direkten Immunfluoreszenz sind die detektierenden Antikörper direkt mit einem Fluorochrom gekoppelt und können, nachdem diese gebunden haben, direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Bei der indirekten Immunfluoreszenz, wie sie in der vorgelegten Studie zur Anwendung kommt, sind die das Antigen erkennenden Antikörper nicht mit einem Fluorochrom gekoppelt. Stattdessen wird ein Zweitantikörper hinzugegeben, der die

gebundenen, spezifischen Antigen-erkennenden Antikörper erkennt und seinerseits mit Fluorochrom gekoppelt ist (Kayser et al. 2005).

Die Visualisierung des CT-Antigens PRAME bei der CML-Zelllinie K-562 bedarf mehrerer Schritte. Zuerst wird die Zellsuspension auf einen Objektträger gegeben und dieser 5 min lang bei 19 g in der Cytospin-2-Centrifuge (Shandon, Frankfurt a. M., Germany) zentrifugiert. Nach Trocknung wird die Zellsuspension auf dem Objektträger mit 1%iger Paraformaldehyde/PBS-Lösung (Sigma-Aldrich) fixiert und in einem Waschvorgang mit 0,1%iger TritonX100/PBS (Sigma-Aldrich) für 2,5 min permeabilisiert. Nach einem erneuten Waschvorgang werden die Zellen mit einer 3%igen BSA/PBS-Lösung über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer geblockt. Darauf folgen vier Waschvorgänge und die Inkubation mit 100 µl polyklonalem anti-PRAME-Antikörper (Abcam, Cambridge, MA, USA) (5 µg/ml) für 2 h. Nach erneutem sechsfachem Waschgang folgt die Inkubation mit 100 µl FITC-gekoppelten monoklonalen Anti-Maus Antikörper für 45 min. Das Fluorochrom FITC (Fluoresceinisothiocyanat) absorbiert UV-Licht und emittiert dafür grünes Licht. Nach einem letzten vierfachen Waschvorgang werden die Zellen mit dem Blaulicht emittierenden Kernfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) eingedeckelt, worauf die Zellen im Fluoreszenzmikroskop beurteilt werden können.

2.2.8. Statistik

Die statistische Analyse der gewonnenen Daten wurde mit Hilfe des Programms PASW® Statistics 18 durchgeführt. Zur Berechnung der Expressionsunterschiede von nativen und behandelten CML-Zelllinien wurde der Mann-Whitney-Test durchgeführt. Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) wurden mittels Microsoft Excel 2007 berechnet.

Eine Korrelation wird bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant angesehen. Die prozentuale Häufigkeit der CTA-Expression, der MW und die SD werden in Klammern angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. CT-Antigen-Expression

Um die Expressionshäufigkeiten der CTA an CML-Zelllinien sowie deren Induzierbarkeit durch epigenetische Modulatoren herauszufinden, wird die Ausprägung der Gene in den CML-Zelllinien mittels RT-PCR untersucht. Als interne Kontrolle der RT-PCRs dient das Housekeeping-Gen GAPDH. Als Negativkontrolle wird bei jeder RT-PCR eine Probe des Reaktionsgemisches mit DEPC-behandeltem Wasser geprüft. Die durchgehend negativen Ergebnisse dieser Kontrollen sind in den folgenden Abbildungen nicht dargestellt

Die CT-Antigene werden nach ihrer Expressionshäufigkeit bzw. ihren Expressionseigenschaften in 3 Gruppen eingeteilt. Die Nennung der Eigenschaften sowie die Einteilung der Gruppen soll im nächsten Absatz erläutert werden. Zuvor muss jedoch die Frage geklärt werden, ob die CT-Antigene ausschließlich in maligne entarteten Knochenmarkzellen vorkommen.

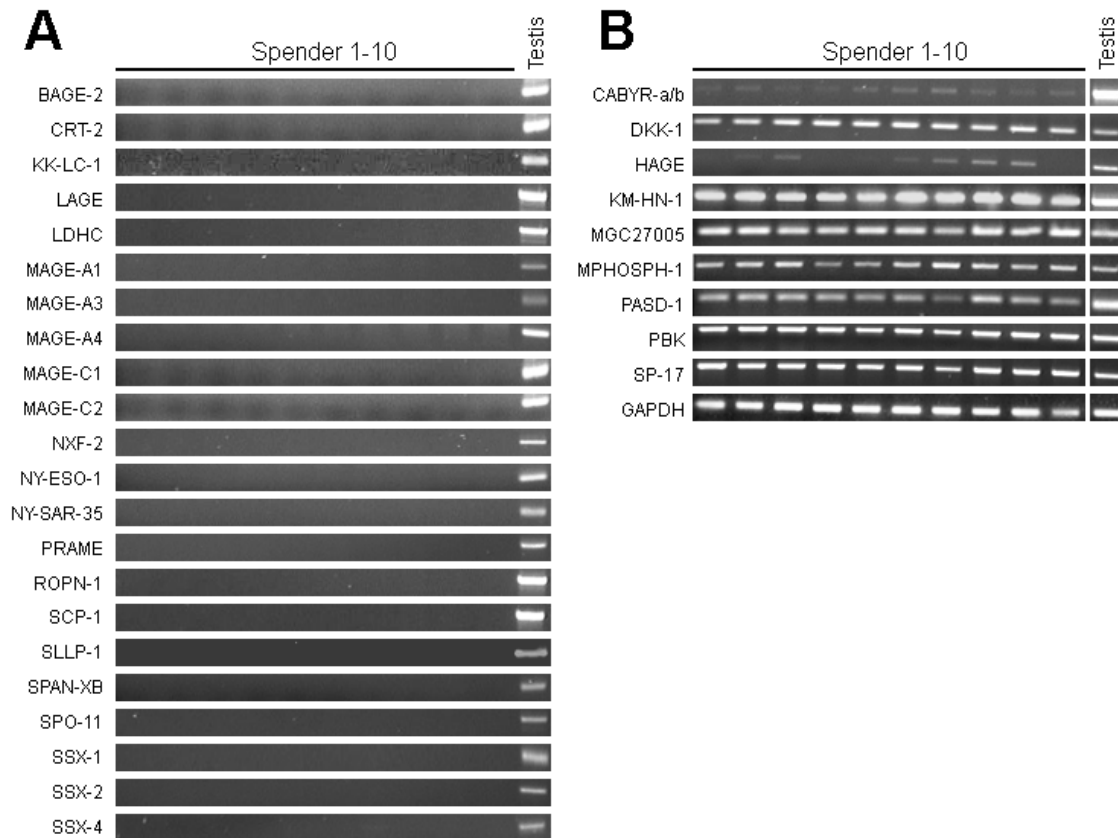
3.1.1. CT-Antigen-Expression in gesunden Spendern sowie in unbehandelten CML-Zelllinien

Es werden insgesamt 31 CT-Antigene an zehn nativen CML-Zelllinien getestet. Dabei zeigen eine Vielzahl der CT-Antigene positive Ergebnisse (Abb. 3-6). Außerdem wird jedes CT-Antigen an Proben zehn gesunder Knochenmarkspender untersucht um beurteilen zu können, inwieweit die bei den Zelllinien beobachtete Expression wirklich tumorspezifisch ist. Neun der 31 CTA weisen positive Ergebnisse in Proben gesunder Knochenmarkspender auf. Sie werden Spender-positive CTA genannt (Abb. 2). Die Sequenzen der neun Spender-positiven CTA wurden mittels Sequenzanalyseverfahren bestätigt. Die Primer dieser CTA lassen sich aufgrund ihres Aufbaus in Intron-Spanning Primer und Non-Intron-Spanning Primer unterscheiden. Die Primer der CTA CABYR-a/b, HAGE und MPHOSPH-1 lassen sich ersterer Gruppe zuordnen, die Primer der CTA DKK-1, KM-HN-1, MGC27005 (CT45), PASD-1, PBK und SP-17 der zweiten Gruppe.

Die restlichen 22 CT-Antigene können nicht in den Proben gesunder Spender nachgewiesen werden. Sie werden Spender-negative CTA genannt (Abb. 2). Da

diese CT-Antigene nicht konstitutiv im gesunden Knochenmarksgewebe, dass ja das Muttergewebe der bei der CML transformierten myeloischen Zellreihe ist, ausgeprägt sind, lassen sich Expressionsvergleiche zwischen den gesunden Spendern und den CML-Zelllinien anstellen. Erst durch die negativen Spenderergebnisse ist für die jeweiligen CT-Antigene die Aussage möglich, dass es sich bei ihnen um spezifische, nur in Neoplasien zu findende Gene handelt. Da es sich bei der vorliegenden Arbeit um eine Suche nach ausschließlich im erkrankten Knochenmark nachzuweisende CT-Antigene handelt und speziell die Expressionsbeeinflussung dieser durch eine epigenetische Modulation untersucht werden soll, liegt der Focus im weiteren Verlauf der durchgeführten Untersuchungen vor allem auf den Spender-negativen CT-Antigenen.

Abbildung 2: RT-PCR Ergebnisse aller 31 CT-Antigene in Proben gesunder Knochenmarkspender



A: Ergebnisse der 22 Spender-negativen CTA. **B:** Ergebnisse der neun Spender-positiven CTA. Die RT-PCR Ergebnisse der Zelllinie Human Testes (Testis) dienen als Positivkontrolle. Die GAPDH RT-PCR-Ergebnisse der einzelnen Spender dienen als interne Kontrolle der Spender-DNA. Links der PCR-Banden: Namen der CTA; Oberhalb der PCR-Banden: Spender (anonymisiert).

3.1.2. CT-Antigen-Expression nach epigenetischer Behandlung der CML-Zelllinien, Gruppeneinteilung

Nachdem die CT-Antigene an Proben gesunder Knochenmarkspender untersucht wurden, lassen sie sich in eine Gruppe Spender-negativer und eine Gruppe Spender-positiver CTA unterteilen. Den schon durchgeführten Untersuchungen an nativen CML-Zelllinien folgen nun die Versuche an behandelten CML-Zelllinien, um einen expressionssteigernden Effekt der epigenetischen Modulatoren nachzuweisen. Da den Spender-positiven CTA ein Referenzwert in Form negativer Ergebnisse bei gesunden Knochenmarkspendern fehlt, wurden sie nicht an den behandelten CML-

Zelllinien untersucht. Folglich werden nur die Spender-negativen CTA an den gleichen CML-Zelllinien untersucht, nachdem diese mit den epigenetischen Modulatoren 5-Aza-2'-Deoxycytidine (Aza) und Trichostatin A (TSA) jeweils allein als auch in Kombination (Aza+TSA) behandelt wurden. Demzufolge wird jedes CT-Antigen an nativen, an mit Aza allein, an mit TSA allein und an mit Aza und TSA in Kombination behandelten CML-Zelllinien getestet.

Anhand der Expressionseigenschaften der einzelnen CTA, sowohl in nativen als auch in behandelten Zelllinien, lassen sich die Spender-negativen CTA in drei Gruppen einteilen. CTA, die mit positiven Ergebnissen bei mindestens 6/10 nativen CML-Zelllinien sehr häufig ausgeprägt sind und die durch die epigenetische Modulation keine wesentliche Expressionssteigerung erfahren, werden der Gruppe der CTA mit konstant häufiger Expression zugeordnet (Gruppe A).

Von konstant seltener Expression wird gesprochen, wenn in weniger als 3/10 nativen CML-Zelllinien das jeweils getestete CTA exprimiert wird und auch die Behandlung mit epigenetischen Modulatoren keinen Expressionsanstieg in mindestens drei zusätzlichen CML-Zelllinien bewirkt (Gruppe B).

Ein signifikanter Expressionsanstieg ist definiert durch ein Plus von mindestens drei zusätzlichen positiven Ergebnissen nach Behandlung der Zelllinien mit epigenetischen Modulatoren im Vergleich zu den Ergebnissen in nativen Zelllinien (Gruppe C).

3.1.2.1. Konstant häufig exprimierte CT-Antigene (Gruppe A)

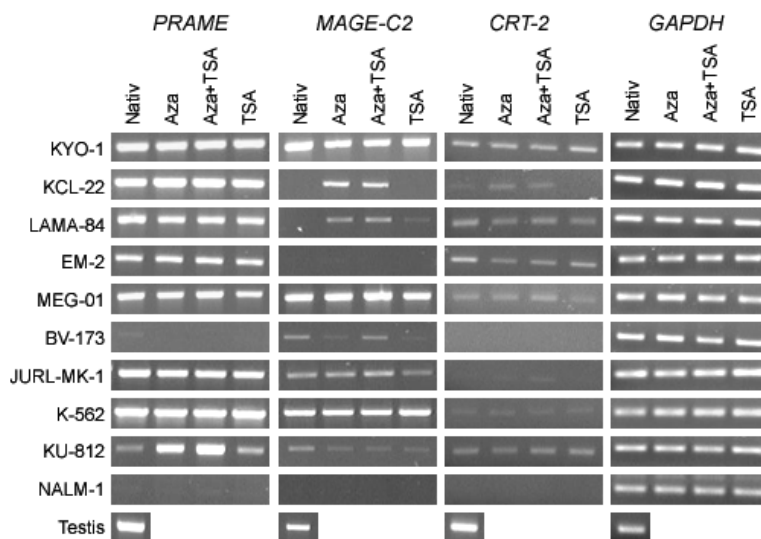
Dieser Gruppe lassen sich drei vielversprechende CT-Antigene zuordnen (Abb. 3). Von diesen ist PRAME das Auffälligste. Allein in den Untersuchungen an den unbehandelten Zelllinien zeigen acht dieser Proben positive Ergebnisse, die auch durch demethylierende bzw. Deacetylase-inhibierende Behandlungen nicht gesteigert werden. Es ist das am häufigsten exprimierte CTA dieser Studie.

MAGE-C2 zeigt ebenfalls die Tendenz einer konstant häufigen Expression. Im Vergleich mit den nativen Zelllinien und nach der alleinigen TSA-Behandlung mit CTA-Ausprägungen in jeweils sechs CML-Zelllinien, zeigt sich nur eine schwache

Steigerung der Expressionshäufigkeit nach der Behandlung mit Aza bzw. mit Aza + TSA.

Das dritte CTA, CRT-2, zeigt in nativen Zelllinien sowie nach der Behandlung mit TSA eine konstant häufige Expression mit positiven Ergebnissen in je sechs CML-Zelllinien, die nach der Behandlung mit Aza allein und mit Aza + TSA in Kombination nur unwesentlich gesteigert wird.

Abbildung 3: RT-PCR Ergebnisse der konstant häufig exprimierten CT-Antigene sowie des Housekeeping-Gens GAPDH in nativen und behandelten CML-Zelllinien.



Dargestellt sind PRAME, MAGE-C2 und CRT-2 als auch das Housekeeping-Gen GAPDH bei nativen CML-Zelllinien sowie nach deren verschiedenen Behandlungen. Links der PCR-Banden: Namen der CML-Zelllinien; Oberhalb der PCR-Banden: Behandlungsvarianten; Allen Genen diente Human Testes cDNA (Testis) als Positivkontrolle.

3.1.2.2. Konstant selten exprimierte CT-Antigene (Gruppe B)

Die insgesamt sechs CT-Antigene dieser Gruppe zeigen bei allen Behandlungsformen konstant seltene Ausprägungen von nicht mehr als drei positiven Ergebnissen (Abb. 4).

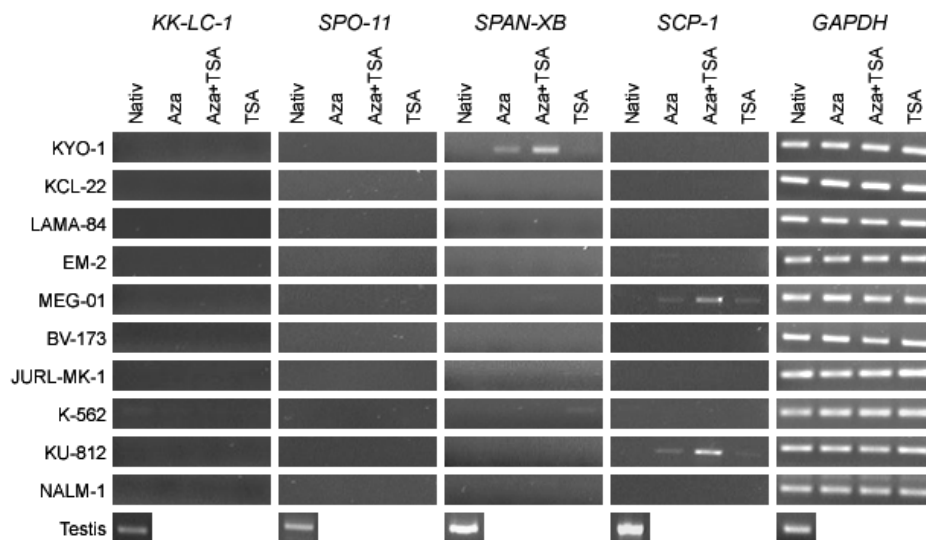
KK-LC-1 und SPO-11 sind die einzigen getesteten Spender-negativen CT-Antigene, die in keiner der Zelllinien, weder im nativen noch im behandelten Zustand, positive Ergebnisse aufweisen.

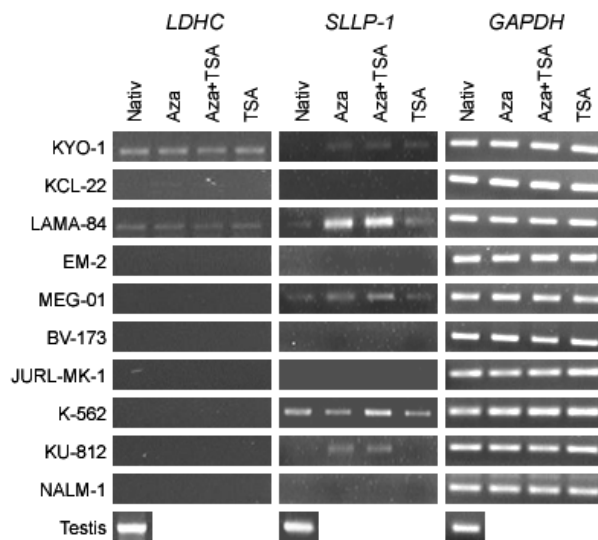
SPAN-XB zeigt nach der Behandlung mit Aza und mit Aza + TSA in Kombination für eine Zelllinie positive und nach der Behandlung mit TSA für eine weitere CML-Zelllinie positive Ergebnisse. SCP-1 zeigt nach allen drei Behandlungsarten positive Ergebnisse in je zwei CML-Zelllinien. Beide genannten CT-Antigene werden von unbehandelten Zelllinien nicht exprimiert.

LDHC wird durch native Zelllinien sowie nach allen Behandlungsvarianten von je zwei CML-Zelllinien exprimiert.

Einzig das CT-Antigen SLLP-1 zeigt annehmbare Expressionshäufigkeiten, wird jedoch aufgrund der Definitionskriterien dieser Gruppe zugeordnet.

Abbildung 4: RT-PCR Ergebnisse der selten exprimierten CT-Antigene sowie des Housekeeping-Gens GAPDH in nativen und behandelten CML-Zelllinien.





Dargestellt sind die CTA KK-LC-1, SPO-11, SPAN-XB, SCP-1, LDHC und SLLP-1 als auch das Housekeeping-Gen GAPDH bei nativen CML-Zelllinien sowie nach deren verschiedenen Behandlungen. Links der PCR-Banden: Namen der CML-Zelllinien; Oberhalb der PCR-Banden: Behandlungsvarianten; Allen Genen diente Human Testes cDNA (Testis) als Positivkontrolle.

3.1.2.3. CT-Antigene mit signifikantem Expressionsanstieg (Gruppe C)

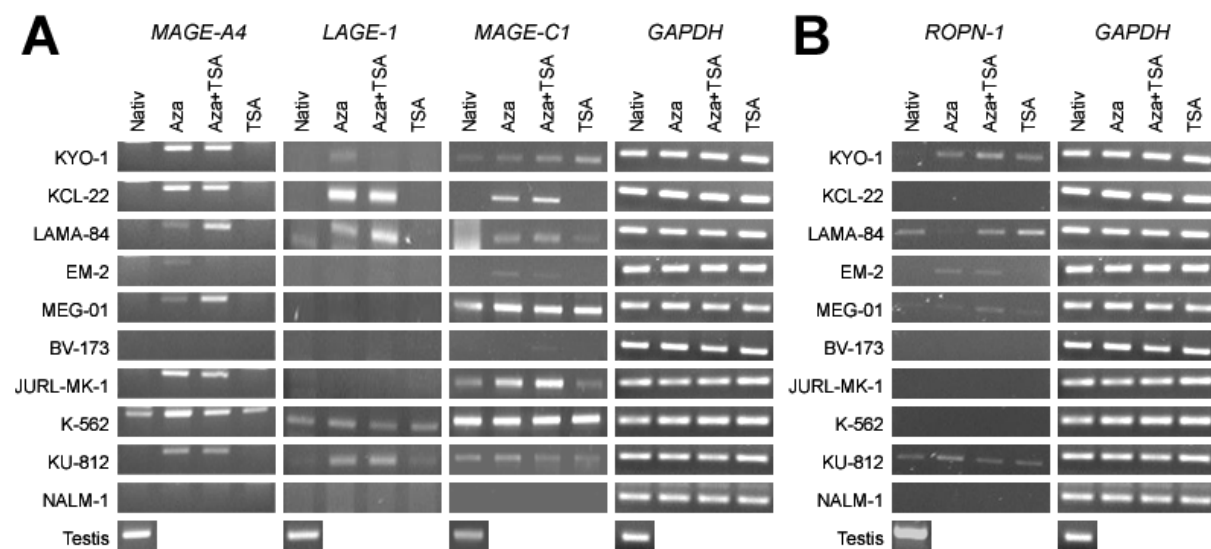
Als dritte Tendenz lässt sich eine Gruppe von 13 CT-Antigenen beschreiben, die von nativen Zelllinien nur selten exprimiert werden, deren Expressionshäufigkeit jedoch nach der Behandlung mit Aza zum einen und mit Aza + TSA zum anderen signifikant ansteigt. Ein Plus von mindestens drei zusätzlichen positiven Ergebnissen im Vergleich zur Expressionshäufigkeit in nativen Zelllinien wird als signifikanter Anstieg festgelegt. Die CTA dieser Gruppe zeigen unterschiedliche Ausprägungshäufigkeiten, so dass sie sich nach diesen Expressionstendenzen wieder unterscheiden lassen (Abb. 5).

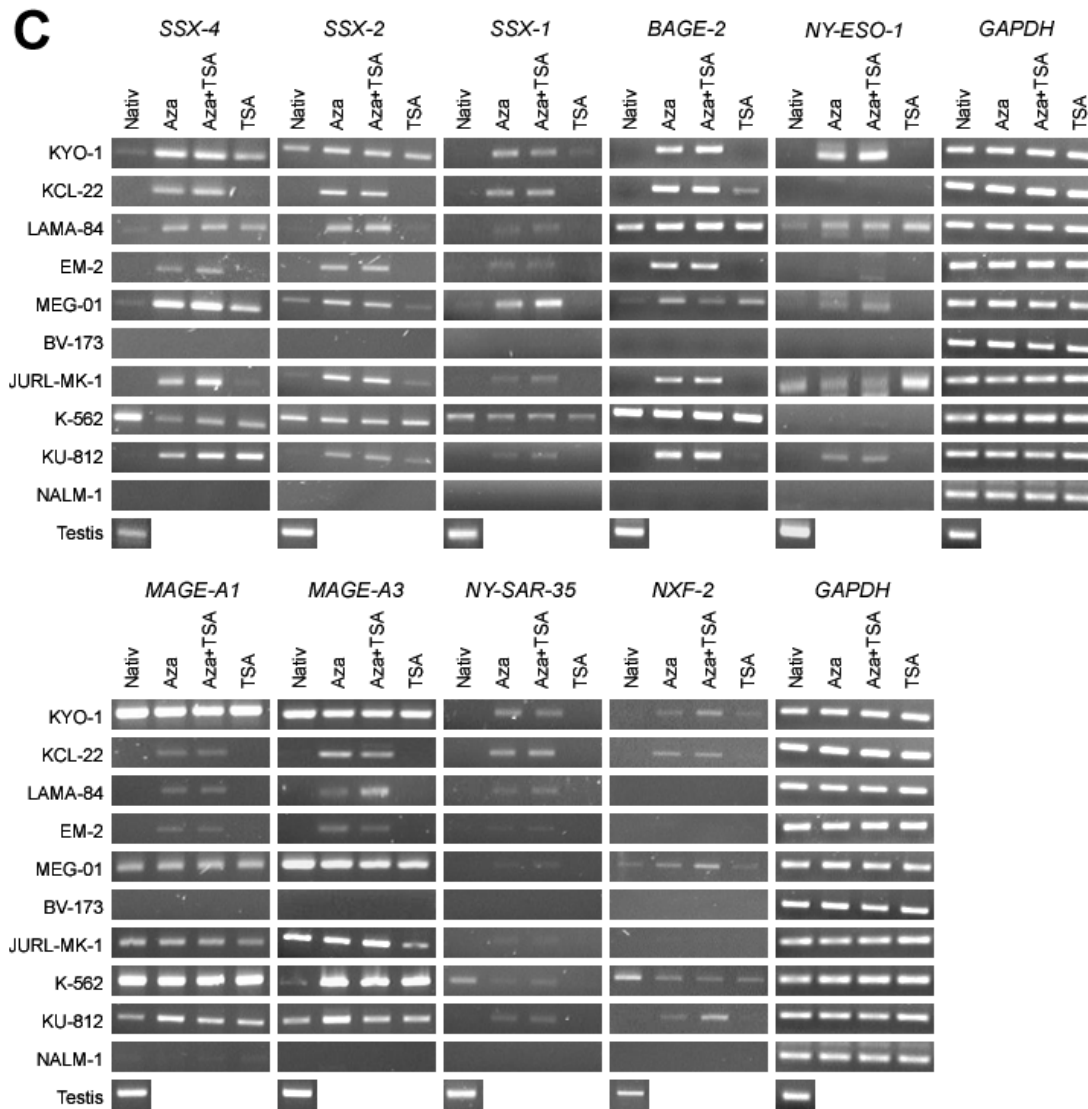
So gibt es drei CTA, die durch die alleinige Behandlung der Zelllinien mit Aza die größte Expressionssteigerung erfahren. Zu diesen CTA gehört unter anderem MAGE-A4, dass nach der Aza-Behandlung von sieben, vorher negativen, CML-Zelllinien ausgeprägt wird. Die anderen beiden CTA dieser Gruppe sind LAGE-1 und MAGE-C1.

Durch die Kombinationsbehandlung mit Aza + TSA lässt sich lediglich die Expression eines CTA im Vergleich zu den anderen Behandlungsvarianten am stärksten steigern (ROPN-1).

Die Expression von neun unter diesem Punkt aufgeführten CTA wird jedoch durch die alleinige Aza-Behandlung ebenso häufig gesteigert wie durch die kombinierte Behandlung der Zelllinien mit Aza + TSA. So z. B. das CTA SSX-1, dessen Expression durch diese beiden Behandlungsvarianten jeweils gar um sieben zusätzlich positive Zelllinien gesteigert wird. Die acht anderen Vertreter dieser Gruppe sind SSX-4, SSX-2, BAGE-2, NY-ESO-1, MAGE-A1, MAGE-A3, NY-SAR-35 und NXF-2.

Abbildung 5: RT-PCR Ergebnisse der stark induzierbaren CTA sowie des Housekeeping-Gens GAPDH in nativen und behandelten CML-Zelllinien.





A: Stärkste CTA-Expressionsinduktion durch Aza. **B:** Stärkste CTA-Expressionsinduktion durch Aza + TSA. **C:** Aza und Aza + TSA als ebenbürtige Induktoren der CTA-Expression. Das Housekeeping-Gen GAPDH diente als interne Kontrolle aller RT-PCRs. Links der PCR-Banden: Namen der CML-Zelllinien; Oberhalb der PCR-Banden: Behandlungsvarianten; Allen Genen diente Human Testes cDNA (Testis) als Positivkontrolle.

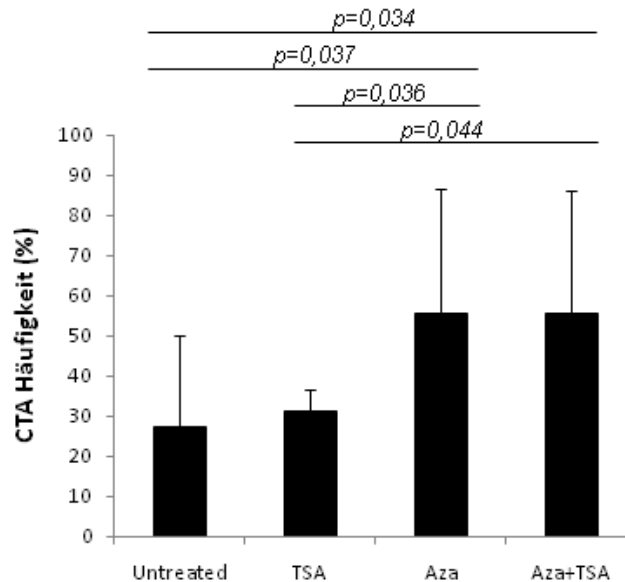
3.2. CTA-Expressionshäufigkeit in nativen sowie in den verschiedenen behandelten CML-Zelllinien

Nachdem alle Ergebnisse der durchgeführten RT-PCRs präsentiert wurden, soll als nächstes beurteilt werden, wie häufig die 22 Spender-negative CTA durch die 10 CML-Zelllinien insgesamt exprimiert wurden. Ein weiteres Augenmerk liegt auf den CTA-Expressionshäufigkeiten der Zelllinien, nachdem diese mit epigenetischen

Modulatoren behandelt wurden. Wie ausgeprägt sich die Expressionsunterschiede darstellen, soll dabei vor allem im Fokus stehen (Abb. 6).

Die nativen Zelllinien exprimieren ungefähr ein Drittel der 22 untersuchten Spender-negativen CTA (27,3%; MW: 6; SD: 4,96). Ähnliches trifft für die Zelllinien nach deren isolierter Behandlung mit TSA zu (30,9%; MW: 7; SD:5,43). Nach der Behandlung der Zelllinien mit Aza allein exprimieren diese gut die Hälfte der getesteten CTA (54,5%; MW: 12; SD:6,81). Dies bedeutet eine signifikante Steigerung der CTA-Expressionshäufigkeit verglichen mit den Expressionshäufigkeiten bei nativen Zelllinien ($p=0,037$) sowie mit der Ausprägungshäufigkeit dieser nach der isolierten TSA-Behandlung ($p=0,036$). Wird die Behandlung der CML-Zelllinien mit Aza durch die Zugabe von TSA ergänzt, bewirkt dies keine weitere Ausprägungssteigerung (54,5%; MW:12; SD: 6,77). Dennoch ist die Steigerung der Ausprägungshäufigkeiten der CTA nach dieser Behandlungsvariante im Vergleich zu den unbehandelten Zelllinien ($p=0,034$) sowie zu den TSA-behandelten Zelllinien ($p=0,044$) statistisch signifikant.

Abbildung 6: Effekt der CML-Zelllinienbehandlung mit epigenetischen Modulatoren auf die Expressionshäufigkeit von CT-Antigenen in CML-Zelllinien.



x-Achse: Behandlungsvarianten der CML-Zelllinien; y-Achse: Expressionshäufigkeit der CTA (%). Die vertikalen Balken illustrieren die für die jeweilige Behandlungsvariante auftretende Standardabweichung (SD) der Expressionsergebnisse vom Mittelwert (MW). Die horizontalen Balken zeigen das Signifikanzniveau (p) der Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Behandlungsvarianten.

3.3. Nachweis der CT-Antigen-Ausprägung auf Proteinebene mittels Western Blot

Um zu untersuchen, ob die nachgewiesenen RNA-Sequenzen zur Translation und damit zur Synthese von Proteinprodukten herangezogen werden, wurden einige CML-Zelllinien mittels spezifischer Antikörper auf das Vorhandensein einzelner Proteine getestet. Nach dem Herauslösen der Proteine aus den Zelllinien werden diese in einem elektrischen Feld aufgetrennt und auf eine Membran geblottet. Durch verschiedene Antikörper werden sie dann detektiert und mittels eines Zweitantikörpers visualisiert.

3.3.1. Proteinnachweis in nativen CML-Zelllinien und in gesunden Spendern

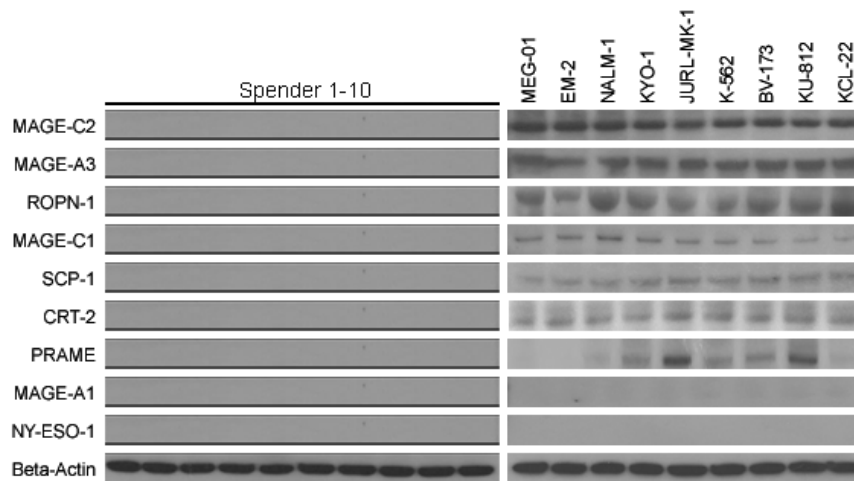
Mittels Western Blot wurden die gesunden Spenderproben sowie die unbehandelten CML-Zelllinien auf eine mögliche Ausprägung der CT-Antigene auf Proteinebene untersucht. Aufgrund der nur limitierten Verfügbarkeit von passenden Antikörpern wurden nur neun der auf mRNA-Ebene untersuchten CT-Antigene getestet. Zudem wurden nur neun der zehn CML-Zelllinien auf die Ausprägung von Proteinen untersucht, die Zelllinie LAMA-84 wurde nicht getestet (Abb. 7).

Zunächst sind alle neun CT-Antigene in keiner der zehn Spenderproben nachweisbar. Die Ladekontrolle des Blots mittels Beta-Actin ist in allen Proben positiv.

Unter den neun getesteten CTA sind sechs von ihnen in allen neun untersuchten CML-Zelllinien nachweisbar. So z. B. das Proteinprodukt des CTAs MAGE-C2, das intensive Banden in allen Zelllinien aufweist. PRAME hingegen ist auf Proteinebene in fünf der neun Zelllinien detektierbar, wobei die Signale der positiven Zelllinien weniger stark sind als die des Kontrollblots mit Beta-Actin. CTA, von denen kein Korrelat auf Proteinebene nachgewiesen werden kann, sind MAGE-A1 und NY-ESO-1.

Wie schon die RT-PCR Versuche fallen auch die Western Blot Experimente der ausgewählten CTA bei gesunden Spendern negativ aus. Diese Resultate lassen ein spezifisches Vorkommen dieser CTA auf Proteinebene in Malignomen vermuten.

Abbildung 7: Expression ausgewählter CT-Antigene auf Proteinebene (Western Blot) bei gesunden Spendern sowie bei neun nativen CML-Zelllinien.



Die Ausprägung auf Proteinebene wurde an zehn gesunden Spendern sowie an neun nativen CML-Zelllinien untersucht. Als Ladekontrolle diente Beta-Actin. Links der WB-Banden: Namen der CTA; Oberhalb der WB-Banden: Spender (anonymisiert) bzw. CML-Zellliniennamen.

3.3.2. Korrelation zwischen mRNA-Transkription und Translation auf Proteinebene von CTA in CML-Zelllinien

Nachdem die Ergebnisse der RT-PCRs und des Western Blots präsentiert wurden, soll nun überprüft werden, wie die RNA-Expression und Protein-Synthese miteinander korrelieren. Dazu werden die RT-PCR Ergebnisse der nativen Zelllinien mit den Western Blot Ergebnissen der neun ausgewählten CT-Antigene verglichen (Abb. 8).

RT-PCR- Ergebnisse und Western Blot-Ergebnisse korrelieren auf vier verschiedene Weisen miteinander. So kann erstens mittels Western Blot keine Proteinausprägung nachgewiesen werden, wenn die dazugehörigen RT-PCR Ergebnisse ebenfalls negativ ausfallen (PCR – /WB –). Zweitens zeigt bei positiven RT-PCR Ergebnissen der Western Blot einiger Zelllinien ebenfalls positive Ergebnisse (PCR + /WB +). Die dritte Variante ist durch negative Western Blot Ergebnisse bei positiver RT-PCR charakterisiert (PCR + /WB –). Als letzte Korrelationsmöglichkeit zeigen sich positive Western Blot Ergebnisse, obwohl keine RT-PCR Ausprägung nachweisbar ist (PCR – /WB +).

Fünf der neun durch Western Blot getesteten CTA verhalten sich zum einen wie zu erwarten, in dem RT-PCR positive CML-Zelllinien auch positive Western Blot Ergebnisse zeigen. Zum anderen lassen sich diese durch CTA codierte Proteine auch in CML-Zelllinien nachweisen, in denen die RT-PCR keine positiven Ergebnisse der CTA erbringen konnte. So z. B. das CTA MAGE-A1, für das diese Beobachtungen fast zu gleichen Teilen zutreffen.

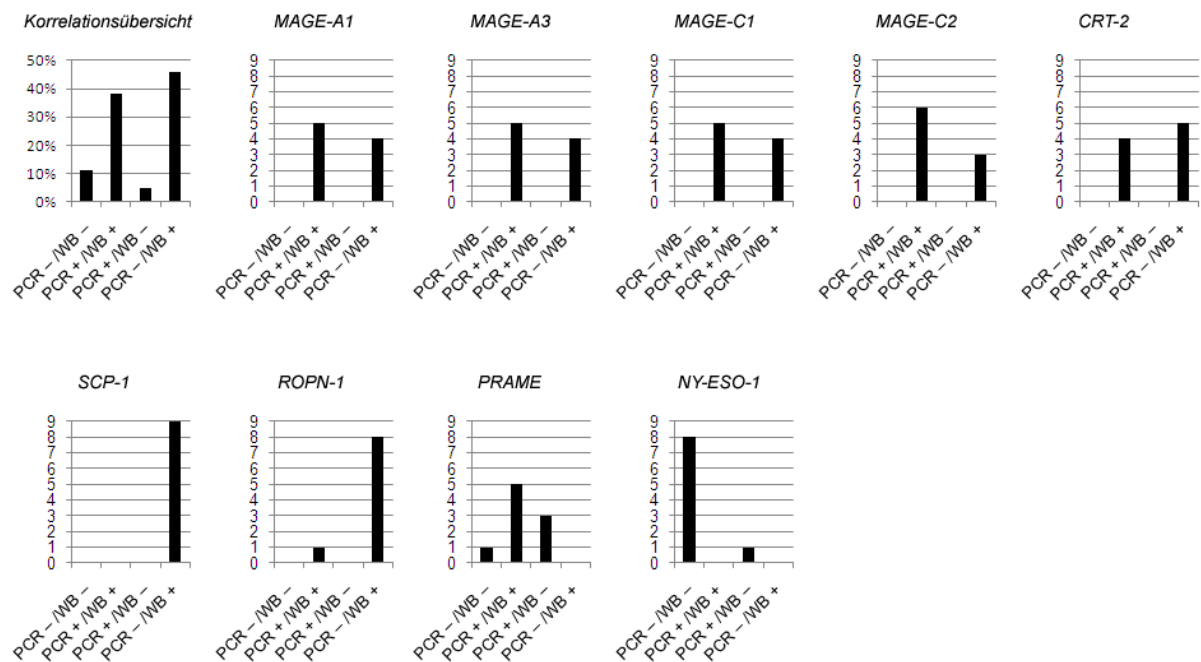
Die Proteinexpression der CTA SCP-1 und ROPN-1 ist durch Western Blot detektierbar, obwohl eine Expression dieser Gene mittels RT-PCR nicht nachgewiesen werden konnte. Einzig eine CML-Zelllinie zeigt auch für ROPN-1 ein positives RT-PCR Ergebnis.

Für das CTA PRAME zeigen die CML-Zelllinien unterschiedliche Korrelationsverhalten. Der Großteil korreliert dabei erwartungsgemäß mit positiven RT-PCR- und Western Blot Ergebnissen. Ebenfalls zu beobachten sind jedoch CML-Zelllinien mit positivem RT-PCR Ergebnis und fehlender Proteinausprägung.

Zu erwartende Ergebnisse zeigt das CT-Antigen NY-ESO-1, das aufgrund fehlender RNA-Expression in fast keiner der CML-Zelllinien eine Proteinsynthese aufweist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombination aus positivem Western Blot und negativem RT-PCR Ergebnis die Korrelationsvariante ist, die sich in fast der Hälfte der Fälle beobachten lässt. Zu einem guten Drittel verhalten sich die Ergebnisse so, dass positive RT-PCR Resultate durch positive Western Blot Befunde bestätigt werden.

Abbildung 8: Vergleich der CT-Antigen-Expression in unbehandelten CML-Zelllinien auf mRNA-Ebene (RT-PCR) sowie auf Proteinebene (Western Blot).



Verglichen werden vier Korrelationsmöglichkeiten: PCR -/+ (negatives /positives RT-PCR Ergebnis), WB -/+ (negatives /positives Western Blot Ergebnis). x-Achse: Korrelationsmöglichkeiten; y-Achse (bei der Korrelationsübersicht): Anzahl der positiven CML-Zelllinien in %; y-Achse (bei Darstellung der Korrelationsergebnisse der einzelnen CTA): Anzahl positiver CML-Zelllinien.

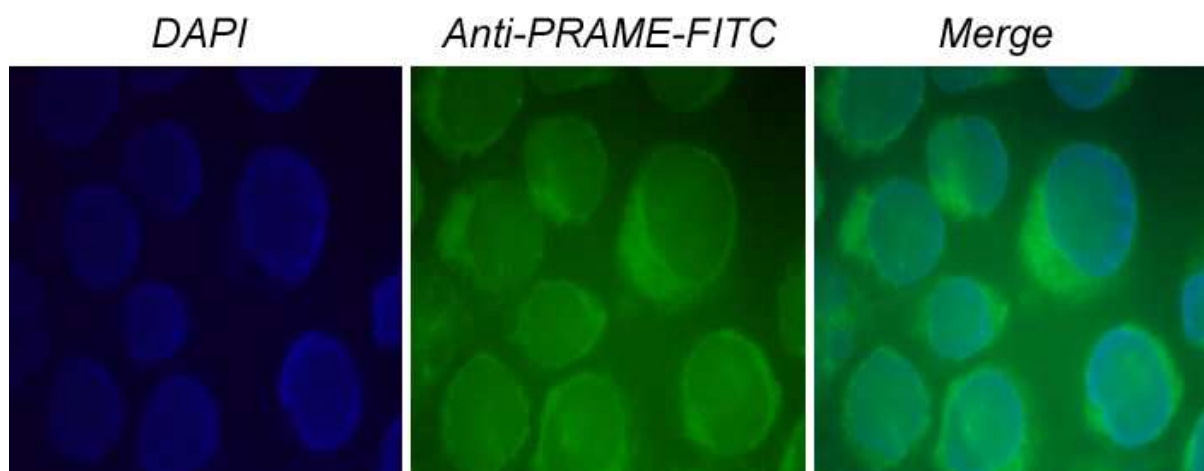
3.4. Immunfluoreszenz

Die Bedeutung der meisten CT-Antigene für die Funktion einer Zelle bzw. bei der Progression einer malignen Erkrankung ist für viele Vertreter der Gruppe nicht geklärt. Um einen Eindruck von der Funktion eines Genprodukts zu bekommen, kann es von Nutzen sein, die Lokalisation des Produkts innerhalb der Zelle zu untersuchen. Durch die Methode der Immunfluoreszenz lassen sich Proteine visualisieren und sie Zellkern oder Zytoplasma zuordnen. Im Bezug auf die zelluläre Lokalisation lassen sich dann verschiedene Funktionen vermuten.

3.4.1. Nachweis des CT-Antigens PRAME in der CML-Zelllinien K-562 mittels Immunfluoreszenz

Um die intrazelluläre Lokalisation eines CTAs in der CML-Zelllinie K-562 zu untersuchen, wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung des CT-Antigens PRAME durchgeführt. Es konnte sowohl membranös als auch zytoplasmatisch nachgewiesen werden (Abb. 9).

Abbildung 9: Intrazelluläre Lokalisation des CT-Antigens PRAME in der Zelllinie K-562.



Rechtes Bild: Färbung der Zellkerne mit DAPI; **Mittleres Bild:** Färbung des Zytoplasmas mittels FITC-labeled anti-PRAME Antikörper; **Linkes Bild:** Färbung des Zytoplasmas mit FITC-labeled anti-PRAME Antikörper und anschließender DAPI-Deckelung. Verwendet wurden DAPI und FITC-labeled anti-PRAME Antikörper.

4. Diskussion

Die Therapie der CML hat sich in den letzten Jahrzehnten durch die Einführung der autologen Stammzelltransplantation, vor allem aber durch die Einführung der Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) stark verbessert. Trotz dieser Erfolge sind alternative Therapieoptionen nötiger denn je, da Langzeitverläufe der TKI-Behandlung noch ausstehen und Resistenzen gegen TKI bereits beobachtet wurden (Gorre et al. 2001; le Coutre et al. 2000). Die zielgerichtete Immuntherapie als alternative Therapieoption stellt eine vielversprechende Möglichkeit bei der Behandlung maligner Erkrankungen im Allgemeinen sowie bei der Behandlung der CML im Besonderen dar. Als Zielstruktur empfehlen sich die verschiedenen Gruppen der CT-Antigene, die durch kürzlich veröffentlichte Studien als tumorspezifisch und immunogen definiert wurden und somit als ideale Strukturen für die verfolgten Ziele angesehen werden können.

In dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung der Basisexpression von CT-Antigenen in CML-Zelllinien mittels RT-PCR sowie deren Induzierbarkeit durch demethylierende und Histon-Deacetylase inhibierende Modulatoren. Der Effekt der epigenetischen Modulatoren sollte dahingehend beurteilt werden, ob eine Behandlung signifikante Expressionsunterschiede zu bewirken vermag und welche Agenzien sich dabei besonders hervortun. Unmittelbares Ziel dieses Screenings war es, potentielle Kandidaten für weitere Untersuchungen an Patientenproben von an CML erkrankten Patienten zu finden.

Erst die Translation der genetischen Information auf Proteinebene befähigt zur Möglichkeit, diese Strukturen als Zielmoleküle z. B. einer Vakzinierungstherapie zu nutzen. Deshalb wurde das Vorhandensein von CT-Antigenen in CML-Zelllinien mittels Western Blot untersucht und mit der Expression der CT-Antigene auf RNA-Ebene verglichen. Ziel dieser Untersuchung war es, die durch die CT-Antigene codierten Produkte nachzuweisen.

Zuletzt erfolgte mit Hilfe der Immunfluoreszenz der Nachweis des Proteins PRAME in der CML-Zelllinie K-562, um Informationen über die Lokalisation und dadurch wohlmöglich über dessen Funktion zu erhalten.

Im Folgenden sollen alle in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse diskutiert werden. Hierzu werden Quellen herangezogen, welche die jeweiligen CTA in früheren

Studien bereits untersuchten. Die hier erhobenen Resultate sollen mit diesen verglichen werden, um Unterschiede zu belegen sowie um bestätigende Gemeinsamkeiten hervorzuheben. Zum Ende eines jeden Abschnitts soll ein Ausblick darauf gegeben werden, welche Methoden und Untersuchungen für nachfolgende Studien anstehen, um die CTA als Strukturen einer neuen Therapieoption zur Behandlung der CML zu etablieren.

4.1. Unspezifisch exprimierte CT-Antigene

Ursprünglich wurde an den zehn CML-Zelllinien die Expression von 31 CT-Antigenen auf RNA-Ebene mittels RT-PCR untersucht. Alle CTA wurden zuvor in anderen Studien schon auf deren Expression in gesunden Geweben untersucht und für Testis-spezifisch befunden. Entgegen dieser Studien wiesen die RT-PCR-Untersuchungen der vorliegenden Arbeit neun CTA nach, die in Proben gesunder Knochenmarkspender exprimiert waren.

Bei Sichtung der Literatur fallen mehrere Gründe auf, warum die erbrachten Ergebnisse von denen vorrausgegangener Studien abweichen. So wird das CTA MPHOSPH-1 als testisspezifisch unter gesunden Geweben beschrieben (Kanehira et al. 2007). Die Untersuchung von gesunden Geweben wird in dieser Arbeit mittels Northern Blot durchgeführt. Die Testung gesunden Knochenmarkgewebes wird dabei jedoch versäumt, womit die zitierte Studie eine Aussage über eine Expression des untersuchten CTA in diesem Gewebe schuldig bleibt.

Gleiches trifft auf das CTA KM-HN-1 zu. In Monji et al. (2004) wird die Untersuchung gesunder Gewebe mittels RT-PCR durchgeführt, eine Analyse gesunden Knochenmarks erfolgt jedoch nicht.

In den Arbeiten über die übrigen sieben Spender-positiven CTA wurde bei der Analyse gesunder Gewebe auch nicht erkranktes Knochenmark untersucht. So können die CTA HAGE und SP-17 in verschiedenen Studien mittels RT-PCR nicht in gesunden Knochenmarkproben nachgewiesen werden (Adams et al. 2002; Lim et al. 2001). Gleiches gilt für die CTA DKK-1 und PBK, die mittels Northern Blot in gesundem Knochenmark nicht nachzuweisen waren (Park et al. 2006; Yamabuki et al. 2007). In einer weiteren Studie wurde die Ausprägung des CTA PASD-1 in

gesundem Knochenmark untersucht. Diese mittels cDNA-Array durchgeführte Analyse fiel ebenfalls negativ aus (Liggins et al. 2004). Zuletzt wurden Studien geprüft, in denen die CTA MGC27005 (CT45) und CABYR-a/b, zwar anstatt in Knochenmarkproben in Blutleukozyten, nicht nachgewiesen werden konnten (Chen et al. 2005; Luo et al. 2007).

Alle neun Spender-positiven CTA wurden mittels Sequenzierung auf ihre Wertigkeit untersucht. Die Sequenzanalyse jedes einzelnen CTA bestätigte die Sequenz des jeweils gesuchten Gens. Zu bemerken ist, dass es sich bei nur drei der verwendeten Primer um Intron-Spanning Primer handelt. Die restlichen sechs CTA wurden mit Non-Intron-Spanning Primern untersucht.

Bei Intron-Spanning Primern erstreckt sich das Gen mit seinen Primersequenzen über zwei oder mehrere Exons, die auf der genomischen DNA von Introns getrennt sind. Bei der Transkription werden die Gene mit ihren Primern auf mRNA umgeschrieben, wobei die Introns herausgeschnitten werden. Da die Primeranteile auf den verschiedenen Exons auf der mRNA nun direkt benachbart liegen, ist deren Gensequenz im Vergleich zu Abschriften genomischer DNA viel kürzer. Würde es sich bei den Ergebnissen der drei CTA, die mit Intron-Spanning Primern amplifiziert wurden, um Abschriften von DNA handeln, so wiese deren Sequenz eine beträchtliche Länge auf. Dann wäre eine Verunreinigung der CML-Proben zu vermuten. Für die gewonnenen Ergebnisse der CTA CABYR-a/b, HAGE und MPHOSPH-1 konnte diese Möglichkeit jedoch nicht beobachtet werden.

Bei den restlichen sechs Primern handelt es sich um Non-Intron-Spanning Primer, sprich das Gen mit seinen Primern liegt auf der genomischen DNA auf einem Exon und ist nicht durch Introns getrennt. Die Gensequenz auf DNA und mRNA ist also gleich lang. Bei den RT-PCR Ergebnissen dieser CTA ist demnach nicht zu unterscheiden, ob es sich bei den Resultaten um Abschriften von mRNA oder DNA handelt. Letztere würden bei DNA-Kontaminationen der Spender-Proben zu finden sein. Im Falle der hier gewonnenen Ergebnisse für diese sechs CTA bedeutet dies, dass es sich bei den Resultaten zum einen um positive mRNA Ergebnisse der gesuchten CTA handeln könnte, zum anderen DNA-Verunreinigungen der Spenderproben vorliegen könnten. Eine Verunreinigung aller Spenderproben erscheint relativ unwahrscheinlich. Demnach wurde in der vorliegenden Arbeit davon ausgegangen, dass die als Spender-positiv benannten CTA tatsächlich in Proben

gesunder Knochenmarkspender vorkommen. Da die Referenzproben, mit denen die Expressionsergebnisse aus den CML-Zelllinien verglichen werden sollten, nun selbst schon positiv ausfielen und somit nicht den Kriterien dieser Arbeit bei der Suche nach Zielstrukturen neuer Therapieoptionen genügten, wurden diese neun CTA von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Um zu untersuchen, ob es sich bei den Ergebnissen, die mittels der sechs Non-Intron-Spanning Primer erhalten wurden, wirklich um die RNA-Abschriften der gesuchten CTA handelt, müssten die Primer dieser CTA neu designed werden. Dabei wäre auf ein Intron-Spanning der jeweiligen Primer zu achten. Durch diese Maßnahme wäre eine Angabe darüber möglich, ob es sich bei den gewonnenen Ergebnissen dieser sechs, hier als Spender-positiv betitelten, CTA wirklich um die gesuchten mRNA-Abschriften handelt. Da in der vorgelegten Studie die fraglichen CTA lediglich von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurden, wurden derartige Schritte nicht unternommen.

4.2. CT-Antigene mit häufiger Basisexpression

Die restlichen 22 CT-Antigene zeigten eine mehr oder weniger häufige Expression in nativen CML-Zelllinien. Wie auch schon bei vielen anderen Neoplasien nachgewiesen werden konnte, beruht diese konzentrierte Expression von CT-Antigenen nicht auf individuellen Regulationssteigerungen einzelner Zellen sondern auf einer Aktivierung bestimmter biologischer Programme (Sahin et al. 1998; Tajima et al. 2003). Bestätigt wurde diese Vermutung durch die häufig beobachtete Korrelation zwischen einer gesteigerten CT-Antigen-Expression und der Hypomethylierung von Promotorbereichen (Meklat et al. 2007; Sigalotti et al. 2002; Simpson et al. 2005). Diese Hypomethylierung, die unter anderem in fortgeschrittenen Stadien verschiedener Tumorerkrankung zu beobachten ist, stellt möglicherweise den Grund dar, weshalb maligne Zellen CT-Antigene verstärkt exprimieren.

Dieser Theorie wurde dahingehend Auftrieb verliehen, da drei der hier untersuchten Spender-negativen CT-Antigene schon in nativen CML-Zelllinien so oft ausgeprägt waren, dass eine epigenetische Behandlung kaum Steigerung bewirkte. Hierbei ist eine Expressionssteigerung gemeint, bei der eine Behandlung die Expression um

nicht mehr als zwei zusätzlich positive Ergebnisse zu steigern vermag. Im Falle des CTA PRAME sogar entgegen älterer Studien, in denen eine gesteigerte Expression dieses CTA vor allem nach hypomethylierender Behandlung zu beobachten war (Ortmann et al. 2008; Schenk et al. 2007). Auch existiert eine Arbeit, in der PRAME, anderes als in der hier präsentierten Arbeit, von der Zelllinie BV-173 exprimiert wird (Roman-Gomez et al. 2007b). In der vorgelegten Arbeit jedoch ist nach Sichtung und Interpretation der Ergebnisse der expressionssteigernde Effekt der Hypomethylierung für PRAME nicht zu reproduzieren.

Dennoch könnte die schon erwähnte Hypomethylierung, die in fortgeschrittenen Neoplasien häufig zu finden ist, im Falle von PRAME (Roman-Gomez et al. 2007b) als auch bei den beiden anderen CTA MAGE-C2 und CRT-2 eine Begründung für deren häufige Basisexpression liefern. Dass diesen CTA ein gewisses Potenzial innewohnt und sie deshalb weiterer Analysen würdig sind, wurde nun neben älteren Studien (Gure et al. 2000; Hayashi et al. 2007) auch durch die hier vorgelegte Arbeit bewiesen.

Der Grund für die ausgesprochen häufige Ausprägung könnte sein, dass in den CTA CRT-2, MAGE-C2 und vor allem PRAME für die CML spezifische Tumorantigene gefunden wurden. Um die Sensitivität dieser CTA für die CML weiter zu festigen, sollte in weiteren Studien die Expression dieser CTA in Proben an CML erkrankter Patienten untersucht werden. Hierbei ließe sich nachweisen, wie es sich mit der Ausprägung dieser Gene in nicht kultivierten Patientenproben verhält. Diese Analysen wären wichtig für die Beantwortung der Frage, ob es sich bei diesen CTA um ernstzunehmende Zielstrukturen für eine CT-Antigen-spezifische Immuntherapie der CML handeln könnte. In diesem Kontext sollte auch auf mögliche Co-Expressionsmuster geachtet werden. Interessant wäre hierbei zu beobachten, ob eine gleichzeitige Ausprägung dieser drei CTA die Prognose der Patienten beeinflusst. Ließe sich eine Co-Expression nachweisen, wäre ein immunologischer Therapieansatz mit mehreren Targetstrukturen denkbar.

4.3. Effekte der epigenetischen Behandlung

Nachdem die Expression der Spender-negativen CT-Antigene in nativen CML-Zelllinien zahlreich zu beobachten war, wurde diese auf einen

expressionssteigernden Effekt durch epigenetische Modulatoren untersucht. Hierfür verwendet wurden das demethylierende Agens 5-Aza-2'-Deoxycytidin (Aza) sowie der Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A (TSA).

Die epigenetischen Modulatoren induzierten in fast allen CML-Zelllinien eine verstärkte Expression der untersuchten CTA. Einzig das Expressionsverhalten der Zelllinie NALM-1 blieb durch die Behandlung unbeeinflusst. Das DSMZ, das diese Zelllinien kommerziell vertreibt, weist auf Ihrer Internetseite auf Probleme bei der Kultivierbarkeit hin ([Online im Internet] URL:http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php?dsmz_nr=131&term=NALM-1&highlight= [Stand: 18.03.2011, 16:00]). Dies könnte auch in dieser Studie dazu geführt haben, keine Ergebnisse bei der Untersuchung dieser Zelllinie zu erhalten. Der in der vorliegenden Arbeit positive Nachweis des Housekeeping-Gens GAPDH belegt jedoch die Wertigkeit der Zelllinie dahingehend, dass die Proben ausreichend genetisches Material enthielten.

Wurde der expressionssteigernde Effekt demethylierender Substanzen für das CTA PRAME durch frühere Studien bereits nachgewiesen, brachte die vorliegende Studie dahingehend Belege, dass der Mechanismus der Demethylierung auch für eine Expressionssteigerung von weiteren CT-Antigenen verantwortlich sein könnte. So erfahren drei CTA ihre größte Expressionssteigerung nach alleiniger Aza-Behandlung der CML-Zelllinien. Die Ausprägung von neun CTA wird hingegen durch den alleinigen Aza-Einfluss ebenso stark beeinflusst wie durch die Kombinationsbehandlung mit Aza und TSA. Bei genauer Betrachtung dieses Ausprägungsverhaltens fällt jedoch auf, dass die Induktion der CTA-Expression durch die zusätzliche TSA-Gabe nicht weiter beeinflusst wird, da deren Expression zuvor schon durch die Aza-Behandlung der CML-Zelllinien erreicht wurde. Nur in einem Fall vermag die zusätzlich zur Aza-Behandlung applizierte TSA-Gabe die Ausprägung weiter zu steigern.

Im Vergleich zu den nativen Zelllinien exprimieren fast alle Aza-behandelten Zelllinien die untersuchten CTA signifikant häufiger. Gleiches gilt für die kombinierte Behandlung der CML-Zelllinien mit Aza und TSA. Unter Rücksichtnahme des beschriebenen eingeschränkten Potenzials der zur Aza-Behandlung additiven TSA-Gabe, liegt die Vermutung nahe, dass vor allem der Mechanismus der Hyper- bzw. Hypomethylierung eine Rolle bei der Regulierung der CTA-Expression zu spielen scheint. Andererseits ist natürlich nicht abzusehen, welches Expressionsverhalten sich

gezeigt hätte, wenn anstatt TSA ein anderer Histon-Deacetylase-Inhibitor verwendet worden wäre.

Tatsächlich wurde bereits eine Studie veröffentlicht, die den Effekt demethylierender Substanzen wie Decitabin bei an Myelodysplastischem Syndrom (MDS) erkrankten Patienten untersuchte. Als Zielstruktur benennt die Arbeit hierbei Inhibitoren Cyclin-abhängiger Kinasen, die eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zellzyklus spielen. Diese Moleküle, darunter p15 im Speziellen, sind in Proben von an MDS erkrankten Patienten hypermethyliert, weswegen deren Expression down-reguliert ist und der Zellzyklus unreguliert abläuft. Die Behandlung dieser Proben mit Decitabin reduziert die Methylierung von p15. Das Gen wird folglich häufiger ausgeprägt und kann somit wieder regulierend in den Zellzyklus eingreifen. Als Resultat der Behandlung lässt sich eine klinische Therapieantwort beobachten (Daskalakis et al. 2002). Der postulierte Effekt der pharmakologischen Demethylierung als Mechanismus zur Induzierung hämatologischer Therapieantworten wird darauf schon bald auf weitere Targetstrukturen erweitert. So beschreibt eine Arbeit das Potenzial von Decitabin, eine *de novo* Expression der CT-Antigene, deren Ausprägung vor allem durch DNA-Methylierung reguliert wird, zu promoten (Sigalotti et al. 2003).

5-Aza-2'-Deoxycytidin eignet sich nach diesen Resultaten vortrefflich, um die Expression von CTA als molekulare Targetstrukturen einer immunologischen Antwort zu induzieren. Dabei darf jedoch die Wirkung, die Aza auf den menschlichen Organismus ausübt, nicht unbeachtet bleiben. Eine Studie, in der Aza an CML-Patienten aus therapeutischen Gründen verabreicht wurde, beobachtete neben einem signifikanten Anti-CML-Effekt auch eine dosisabhängige, anhaltende Myelosuppression als Hauptnebenwirkung (Kantarjian et al. 2003).

Die Wertigkeit der CTA als Zielstrukturen immunologischer Therapieansätze ließ sich durch die zitierten Studien sowie durch die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Resultate bestätigen. Demnach wäre es sinnvoll, diese weiterhin als vielversprechende Moleküle einer Antigen-spezifischen Immuntherapie zu betrachten und sie künftig weiter zu erforschen. Da das Immunsystem, wie das kurative Potenzial der allogenen Knochenmarktransplantation (Gale et al. 1998; van Rhee et al. 1997) und die Therapieerfolge der Donor-Lymphozyten-Infusion (Collins et al. 1997; Drobyski et al. 1999; Guglielmi et al. 2002) belegen, eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der CML zu spielen scheint, wohnt auch diesem Ansatz wohlmöglich ein

kuratives Potenzial inne. Ebenfalls bestätigt wurde das Potenzial von demethylierenden Substanzen wie 5-Aza-2'-Deoxycytidin, die Expression von hypermethylierten CTA zu steigern.

Als Folge dieser Ergebnisse wäre es nun sinnvoll, die schon angedachte Analyse der hier beschriebenen CTA durch eine Behandlung der CML-Patientenproben mit 5-Aza-2'-deoxycytidin zu erweitern, um den Effekt der Expressionsinduktion auch bei diesen Proben zu reproduzieren. Wäre eine Ausprägungssteigerung der CTA durch diese Maßnahmen zu erzielen, würde der Gedanke an CTA als Targets einer Antigen-spezifischen Immuntherapie bei Krebserkrankungen weiter konkretere Formen annehmen. Infolge dessen würde eine Kombination aus demethylierender Behandlung und CT-Antigen-spezifischer Immuntherapie umso sinnvoller erscheinen.

4.4. Korrelation zwischen mRNA- und Proteinexpression

Um einen Bezug zwischen der Transkription der CT-Antigene und der Translation der Information von der mRNA in Proteine herzustellen, wurden Western Blots von neun ausgewählten CT-Antigenen an neun ausgewählten CML-Zelllinien sowie an 10 gesunden Spendern durchgeführt. Anschließend wurden die Ergebnisse des Western Blots mit denen der RT-PCRs dieser CTA verglichen.

Basierend auf der bekannten Grundlage, wonach die Transkription der Gene auf mRNA und die Proteinexpression miteinander gekoppelt sind, wurden positive bzw. negative Western Blot Ergebnisse erwartet, wenn positive bzw. negative Ergebnissen in den zugehörigen RT-PCRs vorlagen. Entsprechende Befunde ließen sich zum Teil für die CT-Antigene MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-C1, MAGE-C2, CRT-2, ROPN-1, PRAME und NY-ESO-1 nachweisen.

Andere Ergebnisse waren, dass in CML-Zelllinien z. B. im Falle von ROPN-1 und SCP-1, Proteine mittels Western Blot nachgewiesen werden konnten, obwohl die dazugehörigen RT-PCRs negativ ausfielen. Diese Beobachtung kann nun unterschiedlich interpretiert werden, wobei biologische von methodischen Gründen abgrenzbar sind. Biologisch gesehen könnte es sich bei den Proteinen um sehr langlebige Vertreter handeln. Diese Langlebigkeit wäre z. B. durch eine niedrige

Turnover-Rate des Proteins zu erklären. Schon in vorangegangenen Studien konnte eine vergleichsweise schwache mRNA-Expression von CT-Antigenen in Kombination mit einer relativ starken Proteinexpression beobachtet werden (Atanackovic et al. 2007; Tian et al. 2004). Dieser Mechanismus würde erklären, weshalb sich die untersuchten Proteine mittels Western Blot nachweisen ließen, die dazugehörigen RT-PCR-Untersuchungen jedoch negativ ausfielen.

Ein anderer Grund für das diskutierte Korrelationsverhältnis könnte sein, dass es sich bei den Ergebnissen des Western Blots um unspezifische Resultate handelt. Da die Ergebnisbanden des Western Blots nicht sequenziert wurden und somit keine Klarheit über deren Spezifität herrscht, ist dieser methodische Erklärungsversuch ebenfalls zu erwägen.

4.5. Lokalisation und Funktion des CT-Antigens PRAME

Um Informationen über die Lokalisation des CTAs PRAME und infolge über dessen Funktion im Zellzyklus zu gewinnen, wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung PRAMEs in der Zelllinie K-562 durchgeführt. Es zeigte sich eine membranöse sowie eine zytoplasmatische Lokalisation.

Bei Sichtung der Literatur auf der Suche nach Untersuchungen über die Lokalisation und die Funktion des CTAs PRAME konnten interessante Anhaltspunkte gefunden werden. So bewirkt eine PRAME-Überexpression in bestimmten myeloischen Leukämiezellen eine signifikant niedrigere Ausprägung von verschiedenen, die Apoptose hemmenden, Proteinen. Die zusätzlich nachgewiesene nukleäre Lokalisation PRAMEs sowie diese molekularen Veränderungen münden schließlich in einer verbesserten Prognose der Leukämie (Tajeddine et al. 2005). Diesen prognostisch günstigen Effekten einer PRAME-Überexpression stehen in der Literatur Arbeiten gegenüber, die hohe PRAME-Expressionsraten als einen wichtigen Faktor bei der Progression maligner Erkrankungen sehen. Dies sei z. B. durch die Beobachtung begründet, wonach PRAME den Apoptose-induzierenden RAR-Signalweg zu inhibieren vermag (Epping et al. 2005).

Die zitierten Resultate schildern die möglichen Funktionen des CTAs PRAME. In Kombination mit der Untersuchung der zellulären Expressionsorte lassen sich in

Folge Funktionsmodelle erdenken, nach denen das untersuchte CTA funktionieren könnte.

Im Falle der in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Resultate lässt sich zunächst sagen, dass PRAME wahrscheinlich eine Rolle bei der Progression der CML zu spielen scheint. Dies vermitteln die hier vorgenommenen RT-PCR Untersuchungen, die hohe Expressionsraten PRAMEs in den CML-Zelllinien (kultiviert aus Zellen während der Blastenkrise) belegen. In Kombination mit den durch die Immunfluoreszenz-Untersuchung gewonnenen Erkenntnissen lassen sich Vermutungen über die Funktion PRAMEs anstellen, die so auch schon von Proto-Siqueira et al. (2006) formuliert wurden. Wie in dieser Arbeit wird dort eine membranöse sowie zytoplasmatische Lokalisation PRAMEs beschrieben. Folglich nährt die hier nachgewiesene membranöse Lokalisation des CTAs PRAME ebenfalls die Vorstellung, nach der PRAME in dieser Position Immunantworten hervorrufen und Zellyse durch zytotoxische T-Lymphozyten vermitteln könnte.

Zudem wären Rollen bei der Diagnose der CML denkbar. Vorausgesetzt, die in den CML-Zelllinien nachgewiesene PRAME-Expression auf RNA-Ebene sowie auf Proteinebene ließe sich in Proben von an CML erkrankten Patienten reproduzieren, könnte das gefundene Expressionsschema in Kombination mit seiner zytoplasmatische Lokalisation zu einem nützlichen Werkzeug bei der Diagnose minimal residueller Erkrankungen (MRD) avancieren.

4.6. Kritik

In der hier vorgelegten Arbeit war es möglich, eine Reihe von CTA an verschiedenen CML-Zelllinien nachzuweisen. Zur Verifikation der gewonnenen Ergebnisse wurden verschiedene Maßnahmen unternommen. So wurde versucht, durch eine Umschreibung der RNA in cDNA die Informationsträger vor dem eigentlichen CTA-Nachweis zu stabilisieren. Desweiteren sollte durch den schon erwähnten Nachweis des Housekeeping-Gens GAPDH sichergestellt werden, dass genügend genetisches Material in den untersuchten Proben vorhanden war. Trotz dieser unternommenen Maßnahmen, welche die Wertigkeit der Ergebnisse dieser Studie unterstreichen, ist zu bemerken, dass es sich bei den untersuchten Zellmaterialien um etablierte Zelllinien handelt. Diese wurden vor unterschiedlich langer Zeit jeweils aus einer

mutierten Zelle, entnommen aus einem an CML erkrankten Patienten, kultiviert. Aufgrund dieser Voraussetzungen gibt diese Arbeit zwar Hinweise darauf, welche CTA in Proben an CML erkrankter Patienten gefunden werden könnten. Eine Übertragung der präsentierten Ergebnisse, wonach die in CML-Zelllinien entdeckten CTA auch in CML-Patientenproben zu finden wären, ist aufgrund dessen aber nicht generell möglich. Um die Resultate zu verallgemeinern, müssten Patientenproben auf die Ausprägung von CTA untersucht werden. Diese Untersuchungen sind somit der nächste Schritt zur Klärung der Frage, ob CTA als Zielstrukturen einer CT-Antigen-spezifischen Immuntherapie bei der CML in Frage kommen.

Ein anderer Kritikpunkt ist der, dass von den momentan bekannten ca. 204 CTA nur 31 Vertreter untersucht wurden. Obwohl die geprüften CTA zum Teil vielversprechende Ergebnisse lieferten ist nicht auszumachen, ob sich unter den nicht untersuchten CTA nicht auch Gene befinden, die gerade in CML-Zelllinien häufig ausgeprägt sind. Um Gewissheit diesbezüglich zu bekommen, müsste die hier durchgeführte Untersuchung um eine Vielzahl an CTA erweitert werden.

5. Zusammenfassung

Cancer-Testis-Antigene gelten als vielversprechende Zielstrukturen einer zielgerichteten Immuntherapie bei malignen Erkrankungen. Auch für die chronische myeloische Leukämie stellt diese neue Behandlungstheorie eine aussichtsreiche Therapieoption dar. Grundlage ist die Identifikation von CTA in Proben der einzelnen Neoplasien. Auch wenn CML-Proben schon in frühere Untersuchungen mit einbezogen wurden, so gibt es bis jetzt keine strukturierte Analyse bezüglich der Expression von CTA bei CML-Zelllinien.

In der vorgelegten Studie wurde die Expression von 31 CTA an Proben zehn gesunder Knochenmarkspender sowie an zehn kultivierten, unbehandelten CML-Zelllinien mittels RT-PCR untersucht. Diese ersten Untersuchungen ergaben, dass neun der zuvor als ausschließlich bei Neoplasien zu findenden CTA doch in Proben gesunder Knochenmarkspender detektierbar waren. Diese neun CTA wurden nicht weiter auf ihre Ausprägung in CML-Zelllinien untersucht.

Nachdem die Untersuchung der Expressionshäufigkeit der restlichen 22 Spender-negativen CTA an den zehn nativen CML-Zelllinien Ausprägungshäufigkeiten in nur ca. einem Drittel der Fälle hervorbrachte, wurde ein möglicher expressionssteigernder Effekt epigenetischer Modulatoren untersucht. Hierfür wurden die CML-Zelllinien mit dem die DNA-Methylierung beeinflussenden Nukleosidanalogen 5-Aza-2'-Deoxycytidin sowie mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A jeweils alleine sowie in Kombination behandelt. Vor allem infolge der Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin exprimierten die CML-Zelllinien nun fast die Hälfte der untersuchten CTA.

Nach Durchführung aller RT-PCR-Untersuchungen stellte sich heraus, dass mit den CTA PRAME, MAGE-C2 und CRT-2 vielversprechende Targetstrukturen gefunden wurden. Ihre Expressionshäufigkeit in nativen CML-Zelllinien zeigte sich beachtlich hoch. Eine Behandlung der Zelllinien mit epigenetischen Modulatoren konnte keine signifikante Steigerung der Ausprägungshäufigkeit dieser drei CTA bewirken.

Weiter konnten CTA wie z. B. MAGE-A4, BAGE-2, NY-ESO-1 sowie drei Vertreter der SSX-Familie (SSX-4, SSX-2, SSX-1) detektiert werden, deren Expressionshäufigkeit vor allem nach der Behandlung der Zelllinien mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin signifikant erhöht war.

Erst die Übersetzung der genetischen Information in den Code der Proteine ermöglicht es, nachgewiesene Gene als Zielstruktur neuer Therapieformen zu nutzen. Deshalb untersuchte die vorliegende Arbeit die Expression ausgewählter CTA auf Proteinebene in neun nativen CML-Zelllinien mittels Western Blot. Zudem wurden die Western Blot Ergebnisse den entsprechenden RT-PCR-Resultaten der einzelnen CML-Zelllinien gegenübergestellt. Hierbei ließ sich beobachten, dass in ca. einem Drittel der Fälle positive RT-PCR Ergebnisse mit positiven Western Blot Resultaten korrelierten. In sogar fast der Hälfte der Fälle fiel auf, dass trotz negativer RT-PCR Befunde positive Western Blot Resultate beobachtet werden konnten.

Zuletzt wurde die Methode der Immunfluoreszenz genutzt, um mehr über die Lokalisation und damit wohlmöglich über die Funktion einzelner CTA zu erfahren. Hierzu erfolgte der Nachweis des CTAs PRAME in der CML-Zelllinie K-562. Die detektierte membranöse sowie zytoplasmatische Lokalisation lässt dabei Interpretationsspielraum.

Diese Resultate, zum einen die spezifische Expression der CTA in CML-Zelllinien, zum anderen die nachgewiesene Translation der genetischen Information dieser Gene auf Proteinebene, bescheinigen den CTA ein großes Potenzial, als Targetstruktur einer Antigen-spezifischen Immuntherapie bei der chronischen myeloischen Leukämie zu dienen. Der nachgewiesene expressionssteigernde Effekt der demethylierenden Substanz 5-Aza-2'-Deoxycytidin lässt ebenso die Überlegung zu, bei der Nutzung der CTA als Targetstrukturen einer CT-Antigen-spezifischen Immuntherapie, hier als Kombinationsbehandlung zur Expressionssteigerung der Zielstrukturen, nützlich zu sein.

Referenzen

- Adams SP, Sahota SS, Mijovic A, Czepulkowski B, Padua RA, Mufti GJ, Guinn BA (2002) Frequent expression of HAGE in presentation chronic myeloid leukaemias. *Leukemia* 16(11):2238-2242.
- Almeida LG, Sakabe NJ, deOliveira AR, Silva MC, Mundstein AS, Cohen T, Chen YT, Chua R, Gurung S, Gnjatic S, Jungbluth AA, Caballero OL, Bairoch A, Kiesler E, White SL, Simpson AJ, Old LJ, Camargo AA, Vasconcelos AT (2009) CTdatabase: a knowledge-base of high-throughput and curated data on cancer-testis antigens. *Nucleic Acids Res* 37(Database issue):D816-819.
- Anichini A, Maccalli C, Mortarini R, Salvi S, Mazzocchi A, Squarcina P, Herlyn M, Parmiani G (1993) Melanoma cells and normal melanocytes share antigens recognized by HLA-A2-restricted cytotoxic T cell clones from melanoma patients. *J Exp Med* 177(4):989-998.
- Ansell SM, Stenson M, Habermann TM, Jelinek DF, Witzig TE (2001) Cd4+ T-cell immune response to large B-cell non-Hodgkin's lymphoma predicts patient outcome. *J Clin Oncol* 19(3):720-726.
- Arnold G, Beier HM, Herrmann M (2002) Becken und Beckeneingeweide: Funktion der männlichen Geschlechtsorgane. In: *Antatomie. T. H. Schiebler, W. Schmidt, K. Zilles (Hrg.) 8. Aufl., Springer, Berlin:654-660.*
- Asimakopoulos FA, Shteper PJ, Krichevsky S, Fibach E, Polliack A, Rachmilewitz E, Ben-Neriah Y, Ben-Yehuda D (1999) ABL1 methylation is a distinct molecular event associated with clonal evolution of chronic myeloid leukemia. *Blood* 94(7):2452-2460.
- 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 DK, Zander AR, Jungbluth AA, Old LJ, 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(3):1103-1112.
- Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, Apperley J, Cervantes F, Cortes J, Deininger M, Gratwohl A, Guilhot F, Horowitz M, Hughes T, Kantarjian H, Larson R, Niederwieser D, Silver R, Hehlmann R (2006) Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 108(6):1809-1820.
- Barrett AJ, Malkovska V (1996) Graft-versus-leukaemia: understanding and using the alloimmune response to treat haematological malignancies. *Br J Haematol* 93(4):754-761.
- Ben-Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson AM, Witte ON, Baltimore D (1986) The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science* 233(4760):212-214.
- Bennett JH (1845) Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood. *Edinb Med Surg J.* 64:413-423.
- Berger TG, Haendle I, Schrama D, Luftl M, Bauer N, Pedersen LO, Schuler-Thurner B, Hohenberger W, Straten Pt P, Schuler G, Becker JC (2004) Circulation and homing of melanoma-reactive T cells to both cutaneous and visceral metastases after vaccination with monocyte-derived dendritic cells. *Int J Cancer* 111(2):229-237.
- Bernhard H, Salazar L, Schiffman K, Smorlesi A, Schmidt B, Knutson KL, Disis ML (2002) Vaccination against the HER-2/neu oncogenic protein. *Endocr Relat Cancer* 9(1):33-44.
- Bizzozero OJ, Jr., Johnson KG, Ciocco A (1966) Radiation-related leukemia in Hiroshima and Nagasaki, 1946-1964. I. Distribution, incidence and appearance time. *N Engl J Med* 274(20):1095-1101.
- Boel P, Wildmann C, Sensi ML, Brasseur R, Renauld JC, Coulie P, Boon T, van der Bruggen P (1995) BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity* 2(2):167-175.
- Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A (1994) Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 12:337-365.
- Branford S, Rudzki Z, Walsh S, Parkinson I, Grigg A, Szer J, Taylor K, Herrmann R, Seymour JF, Arthur C, Joske D, Lynch K, Hughes T (2003) Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* 102(1):276-283.
- Branford S, Hughes T (2006) Detection of BCR-ABL mutations and resistance to imatinib mesylate. *Methods Mol Med* 125:93-106.
- Brown RD, Yuen E, Kronenberg H, Rickard KA (1986) Stimulation of persisting colonies in agar cultures by sera from patients with CML and AML. *Blood* 68(1):37-40.

- Burnet FM (1970) The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13:1-27.
- Burnet FM (1971) Immunological surveillance in neoplasia. *Transplant Rev* 7:3-25.
- Chambost H, Brasseur F, Coulie P, de Plaen E, Stoppa AM, Baume D, Mannoni P, Boon T, Maraninchi D, Olive D (1993) A tumour-associated antigen expression in human haematological malignancies. *Br J Haematol* 84(3):524-526.
- Chambost H, Van Baren N, Brasseur F, Godelaine D, Xerri L, Landi SJ, Theate I, Plumas J, Spagnoli GC, Michel G, Coulie PG, Olive D (2000) Expression of gene MAGE-A4 in Reed-Sternberg cells. *Blood* 95(11):3530-3533.
- Chambost H, van Baren N, Brasseur F, Olive D (2001) MAGE-A genes are not expressed in human leukemias. *Leukemia* 15(11):1769-1771.
- Chen D, Ma H, Hong H, Koh SS, Huang SM, Schurter BT, Aswad DW, Stallcup MR (1999) Regulation of transcription by a protein methyltransferase. *Science* 284(5423):2174-2177.
- Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Tureci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ (1997) A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(5):1914-1918.
- Chen YT, Scanlan MJ, Obata Y, Old LJ (2000) Identification of human tumor antigens by serological expression cloning (SEREX). In: *Principles and Practice of Biologic Therapy of Cancer*. S. A. Rosenberg (Hrg.) 3. Aufl., Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia:557-570.
- Chen YT, Scanlan MJ, Venditti CA, Chua R, Theiler G, Stevenson BJ, Iseli C, Gure AO, Vasicek T, Strausberg RL, Jongeneel CV, Old LJ, Simpson AJ (2005) Identification of cancer/testis-antigen genes by massively parallel signature sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(22):7940-7945.
- Cilensek ZM, Yehiely F, Kular RK, Deiss LP (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(4):380-387.
- Claus R, Almstedt M, Lubbert M (2005) Epigenetic treatment of hematopoietic malignancies: in vivo targets of demethylating agents. *Semin Oncol* 32(5):511-520.
- Clemente CG, Mihm MC, Jr., Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N (1996) Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77(7):1303-1310.
- Collins RH, Jr., Shpilberg O, Drobyski WR, Porter DL, Giralto S, Champlin R, Goodman SA, Wolff SN, Hu W, Verfaillie C, List A, Dalton W, Ognoskie N, Chetrit A, Antin JH, Nemunaitis J (1997) Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Oncol* 15(2):433-444.
- Cortes JE, Talpaz M, O'Brien S, Faderl S, Garcia-Manero G, Ferrajoli A, Verstovsek S, Rios MB, Shan J, Kantarjian HM (2006) Staging of chronic myeloid leukemia in the imatinib era: an evaluation of the World Health Organization proposal. *Cancer* 106(6):1306-1315.
- Coulie PG, Karanikas V, Colau D, Lurquin C, Landry C, Marchand M, Dorval T, Brichard V, Boon T (2001) A monoclonal cytolytic T-lymphocyte response observed in a melanoma patient vaccinated with a tumor-specific antigenic peptide encoded by gene MAGE-3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(18):10290-10295.
- Daskalakis M, Nguyen TT, Nguyen C, Guldberg P, Kohler G, Wijermans P, Jones PA, Lubbert M (2002) Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment. *Blood* 100(8):2957-2964.
- de Lavallade H, Apperley JF, Khorashad JS, Milojkovic D, Reid AG, Bua M, Szydlo R, Olavarria E, Kaeda J, Goldman JM, Marin D (2008) Imatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: incidence of sustained responses in an intention-to-treat analysis. *J Clin Oncol* 26(20):3358-3363.
- De Smet C, Lurquin C, Lethe B, Martelange V, Boon T (1999) DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol Cell Biol* 19(11):7327-7335.
- Di Noto R, Luciano L, Lo Pardo C, Ferrara F, Frigeri F, Mercurio O, Lombardi ML, Pane F, Vacca C, Manzo C, Salvatore F, Rotoli B, Del Vecchio L (1997) JURL-MK1 (c-kit(high)/CD30-/CD40-) and JURL-MK2 (c-kit(low)/CD30+/CD40+) cell lines: 'two-sided' model for investigating leukemic megakaryocytopoiesis. *Leukemia* 11(9):1554-1564.
- Disis ML, Calenoff E, McLaughlin G, Murphy AE, Chen W, Groner B, Jeschke M, Lydon N, McGlynn E, Livingston RB, et al. (1994) Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer. *Cancer Res* 54(1):16-20.
- Drobyski WR, Hessner MJ, Klein JP, Kabler-Babbitt C, Vesole DH, Margolis DA, Keever-Taylor CA (1999) T-cell depletion plus salvage immunotherapy with donor leukocyte infusions as a strategy to treat chronic-phase chronic myelogenous leukemia patients undergoing HLA-identical sibling marrow transplantation. *Blood* 94(2):434-441.

- Druker BJ (2008) Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood* 112(13):4808-4817.
- Duan Z, Duan Y, Lamendola DE, Yusuf RZ, Naeem R, Penson RT, Seiden MV (2003) Overexpression of MAGE/GAGE genes in paclitaxel/doxorubicin-resistant human cancer cell lines. *Clin Cancer Res.* 9(7):2778-2785.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3(11):991-998.
- Eblenkamp M, Neuß-Stein S, Salber S, Jacobs V, Wintermantel E (2008) Stammzellen. In: *Medizintechnik. E. Wintermantel, S.- W. Ha (Hr g.) 4. Aufl., Springer, Berlin:422-428.*
- Ehrlich P (1909) About the current state of carcinoma research. *Ned Tijdscher Geneesk* 5:18.
- Epping MT, Wang L, Edel MJ, Carlee L, Hernandez M, Bernardis R (2005) The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling. *Cell* 122(6):835-847.
- Esteller M, Toyota M, Sanchez-Cespedes M, Capella G, Peinado MA, Watkins DN, Issa JP, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG (2000) Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is associated with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 60(9):2368-2371.
- Estrov Z, Kurzrock R, Wetzler M, Kantarjian H, Blake M, Harris D, Gutterman JU, Talpaz M (1991) Suppression of chronic myelogenous leukemia colony growth by interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist and soluble IL-1 receptors: a novel application for inhibitors of IL-1 activity. *Blood* 78(6):1476-1484.
- Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM (1999) The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 341(3):164-172.
- Fialkow PJ, Jacobson RJ, Papayannopoulou T (1977) Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *Am J Med* 63(1):125-130.
- Fischer T, Thoebald M, Heimpel H, Huber C (2007) Neoplasien der Hämatopoese. In: *Die Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt. W. Gerock, C. Huber, T. Meinertz, H. Zeidler (Hrg.) 11. Aufl., Schattauer, Stuttgart:41-43.*
- Fischer D, Kurpisz M (1998) Major histocompatibility complex expression on human, male germ cells: a review. *Am J Reprod Immunol* 40(3):172-176.
- Fukuyama T, Hanagiri T, Takenoyama M, Ichiki Y, Mizukami M, So T, Sugaya M, Sugio K, Yasumoto K (2006) Identification of a new cancer/germline gene, KK-LC-1, encoding an antigen recognized by autologous CTL induced on human lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 66(9):4922-4928.
- Gale RP, Horowitz MM, Ash RC, Champlin RE, Goldman JM, Rimm AA, Ringden O, Stone JA, Bortin MM (1994) Identical-twin bone marrow transplants for leukemia. *Ann Intern Med* 120(8):646-652.
- Gale RP, Hehlmann R, Zhang MJ, Hasford J, Goldman JM, Heimpel H, Hochhaus A, Klein JP, Kolb HJ, McGlave PB, Passweg JR, Rowlings PA, Sobocinski KA, Horowitz MM (1998) Survival with bone marrow transplantation versus hydroxyurea or interferon for chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group. *Blood* 91(5):1810-1819.
- Gnjatic S, Atanackovic D, Jager E, Matsuo M, Selvakumar A, Altorki NK, Maki RG, Dupont B, Ritter G, Chen YT, Knuth A, Old LJ (2003) Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(15):8862-8867.
- Goldman JM, Gale RP, Horowitz MM, Biggs JC, Champlin RE, Gluckman E, Hoffmann RG, Jacobsen SJ, Marmont AM, McGlave PB, et al. (1988) Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann Intern Med* 108(6):806-814.
- Goldman JM, Melo JV (2003) Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 349(15):1451-1464.
- Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, Sawyers CL (2001) Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 293(5531):876-880.
- Gratwohl A, Hermans J, Goldman JM, Arcese W, Carreras E, Devergie A, Frassoni F, Gahrton G, Kolb HJ, Niederwieser D, Ruutu T, Vernant JP, de Witte T, Apperley J (1998) Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Lancet* 352(9134):1087-1092.
- Graw J (2005) Molekulare Struktur und Regulation eukaryotischer Gene: Regulation und Initiation eukaryotischer Genexpression. In: *Genetik. J. Graw (Hrg.) 4. Aufl., Springer, Berlin:320-330.*

- Grigg A , Hughes T (2006) Role of allogeneic stem cell transplantation for adult chronic myeloid leukemia in the imatinib era. *Biol Blood Marrow Transplant* 12(8):795-807.
- Guglielmi C, Arcese W, Dazzi F, Brand R, Bunjes D, Verdonck LF, Schattenberg A, Kolb HJ, Ljungman P, Devergie A, Bacigalupo A, Gomez M, Michallet M, Elmaagacli A, Gratwohl A, Apperley J, Niederwieser D (2002) Donor lymphocyte infusion for relapsed chronic myelogenous leukemia: prognostic relevance of the initial cell dose. *Blood* 100(2):397-405.
- Gure AO, Tureci O, Sahin U, Tsang S, Scanlan MJ, Jager E, Knuth A, Pfreundschuh M, Old LJ, Chen YT (1997) SSX: a multigene family with several members transcribed in normal testis and human cancer. *Int J Cancer* 72(6):965-971.
- Gure AO, Stockert E, Arden KC, Boyer AD, Viars CS, Scanlan MJ, Old LJ, Chen YT (2000) CT10: a new cancer-testis (CT) antigen homologous to CT7 and the MAGE family, identified by representational-difference analysis. *Int J Cancer* 85(5):726-732.
- Hale G , Waldmann H (1994) Control of graft-versus-host disease and graft rejection by T cell depletion of donor and recipient with Campath-1 antibodies. Results of matched sibling transplants for malignant diseases. *Bone Marrow Transplant* 13(5):597-611.
- Hasford J, Pffirmann M, Hehlmann R, Allan NC, Baccarani M, Kluin-Nelemans JC, Alimena G, Steegmann JL, Ansari H (1998) A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group. *J Natl Cancer Inst* 90(11):850-858.
- Hayashi E, Matsuzaki Y, Hasegawa G, Yaguchi T, Kurihara S, Fujita T, Kageshita T, Sano M, Kawakami Y (2007) Identification of a novel cancer-testis antigen CRT2 frequently expressed in various cancers using representational differential analysis. *Clin Cancer Res* 13(21):6267-6274.
- Hehlmann R, Büchner T, Berger U, Hochhaus A (2005) Akute und chronische myeloische Leukämie. In: *Harrisons Innere Medizin*. M. Dietel, N. Suttorp, M. Zeitz (Hrg.) 16. Aufl., Bd. 1, ABW Wissenschaftsverlag, Berlin:683-687.
- Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A, Grosveld G (1985) Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. *Nature* 315(6022):758-761.
- Henkes M, van der Kuip H, Aulitzky WE (2008) Therapeutic options for chronic myeloid leukemia: focus on imatinib (Glivec, Gleevec trade mark). *Ther Clin Risk Manag* 4(1):163-187.
- Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, Samid D, Duan DS, Gnarr JR, Linehan WM, et al. (1994) Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(21):9700-9704.
- Hochhaus A, Berger U, Hehlmann R (2004) Therapie der CML. *Dtsch Med Wochenschr.* 129:2122–2127.
- Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B, et al. (1990) Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 75(3):555-562.
- Hughes TP, Kaeda J, Branford S, Rudzki Z, Hochhaus A, Hensley ML, Gathmann I, Bolton AE, van Hoomissen IC, Goldman JM, Radich JP (2003) Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 349(15):1423-1432.
- Iguchi-Arigo SM , Schaffner W (1989) CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev* 3(5):612-619.
- Ikeda H, Lethe B, Lehmann F, van Baren N, Baurain JF, de Smet C, Chambost H, Vitale M, Moretta A, Boon T, Coulie PG (1997) Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* 6(2):199-208.
- Issa JP, Kantarjian H, Mohan A, O'Brien S, Cortes J, Pierce S, Talpaz M (1999) Methylation of the ABL1 promoter in chronic myelogenous leukemia: lack of prognostic significance. *Blood* 93(6):2075-2080.
- Jager E, Chen YT, Drijfhout JW, Karbach J, Ringhoffer M, Jager D, Arand M, Wada H, Noguchi Y, Stockert E, Old LJ, Knuth A (1998) Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes. *J Exp Med* 187(2):265-270.
- Jager E, Nagata Y, Gnjatic S, Wada H, Stockert E, Karbach J, Dunbar PR, Lee SY, Jungbluth A, Jager D, Arand M, Ritter G, Cerundolo V, Dupont B, Chen YT, Old LJ, Knuth A (2000) Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9):4760-4765.
- Jassim A, Ollier W, Payne A, Biro A, Oliver RT, Festenstein H (1989) Analysis of HLA antigens on germ cells in human semen. *Eur J Immunol* 19(7):1215-1220.

- Jungbluth AA, Chen YT, Busam KJ, Coplan K, Kolb D, Iversen K, Williamson B, Van Landeghem FK, Stockert E, Old LJ (2002) CT7 (MAGE-C1) antigen expression in normal and neoplastic tissues. *Int J Cancer* 99(6):839-845.
- Kalejs M, Erenpreisa, J (2005) Cancer/testis antigens and gametogenesis: a review and "brainstorming" session. *Cancer cell international* 5(4).
- Kanehira M, Katagiri T, Shimo A, Takata R, Shuin T, Miki T, Fujioka T, Nakamura Y (2007) Oncogenic role of MPHOSPH1, a cancer-testis antigen specific to human bladder cancer. *Cancer Res* 67(7):3276-3285.
- Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, Guilhot F, Schiffer C, Gambacorti-Passerini C, Niederwieser D, Resta D, Capdeville R, Zoellner U, Talpaz M, Druker B, Goldman J, O'Brien SG, Russell N, Fischer T, Ottmann O, Cony-Makhoul P, Facon T, Stone R, Miller C, Tallman M, Brown R, Schuster M, Loughran T, Gratwohl A, Mandelli F, Saglio G, Lazzarino M, Russo D, Baccarani M, Morra E (2002) Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 346(9):645-652.
- Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, Moiraghi B, Shen Z, Mayer J, Pasquini R, Nakamae H, Huguet F, Boque C, Chuah C, Bleickardt E, Bradley-Garelik MB, Zhu C, Sztatowski T, Shapiro D, Baccarani M (2010) Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 362(24):2260-2270.
- Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes J, Giles FJ, Faderl S, Issa JP, Garcia-Manero G, Rios MB, Shan J, Andreeff M, Keating M, Talpaz M (2003) Results of decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine) therapy in 130 patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 98(3):522-528.
- Keilholz U, Letsch A, Busse A, Asemissen AM, Bauer S, Blau IW, Hofmann WK, Uharek L, Thiel E, Scheibenbogen C (2009) A clinical and immunologic phase 2 trial of Wilms tumor gene product 1 (WT1) peptide vaccination in patients with AML and MDS. *Blood* 113(26):6541-6548.
- Kishi K (1985) A new leukemia cell line with Philadelphia chromosome characterized as basophil precursors. *Leuk Res* 9(3):381-390.
- Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, van Rhee F, Mittermueller J, de Witte T, Holler E, Ansari H (1995) Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 86(5):2041-2050.
- Kolbe K, Heimpel H, Huber C (2007) Substitution und Transplantation von Blutzellen. In: *Die Innere Medizin: Referenzwerk für den Facharzt*. W. Gerock, C. Huber, T. Meinertz, H. Zeidler (Hrg.) 11. Aufl., Schattauer, Stuttgart:31-34.
- Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON (1984) An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell* 37(3):1035-1042.
- Koslowski M, Tureci O, Bell C, Krause P, Lehr HA, Brunner J, Seitz G, Nestle FO, Huber C, Sahin U (2002) Multiple splice variants of lactate dehydrogenase C selectively expressed in human cancer. *Cancer Res* 62(22):6750-6755.
- Kranenburg O (2005) The KRAS oncogene: past, present, and future. *Biochim Biophys Acta* 1756(2):81-82.
- Krikorian JG, Anderson JL, Bieber CP, Penn I, Stinson EB (1978) Malignant neoplasms following cardiac transplantation. *JAMA* 240(7):639-643.
- Kubonishi I, Machida K, Sonobe H, Ohtsuki Y, Akagi T, Miyoshi I (1983) Two new human myeloid cell lines derived from acute promyelocytic leukemia and chronic myelocytic leukemia. *Gann* 74(3):319-322.
- Kulozik AE, Hentze MW, Hagemeyer C, Bartram CR (2000) Molekularmedizinische Physiologie und Biochemie: Transkription: DNA-Methylierung und CpG Islands. In: *Molekulare Medizin*. A. E. Kulozik, M. W. Hentze, C. Hagemeyer, C. R. Bartram (Hrg.) 1. Aufl., Walter de Gruyter, Berlin:57-59.
- Kuo MH, Zhou J, Jambeck P, Churchill ME, Allis CD (1998) Histone acetyltransferase activity of yeast Gcn5p is required for the activation of target genes in vivo. *Genes Dev* 12(5):627-639.
- le Coutre P, Tassi E, Varella-Garcia M, Barni R, Mologni L, Cabrita G, Marchesi E, Supino R, Gambacorti-Passerini C (2000) Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood* 95(5):1758-1766.
- Lee SY, Obata Y, Yoshida M, Stockert E, Williamson B, Jungbluth AA, Chen YT, Old LJ, Scanlan MJ (2003) Immunomic analysis of human sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(5):2651-2656.
- Lethe B, Lucas S, Michaux L, De Smet C, Godelaine D, Serrano A, De Plaen E, Boon T (1998) LAGE-1, a new gene with tumor specificity. *Int J Cancer* 76(6):903-908.
- Li Z, Li W, Meklat F, Wang Z, Zhang J, Zhang Y, Lim SH (2007) A yeast two-hybrid system using Sp17 identified Roppurin as a novel cancer-testis antigen in hematologic malignancies. *Int J Cancer* 121(7):1507-1511.

- Liggins AP, Brown PJ, Asker K, Pulford K, Banham AH (2004) A novel diffuse large B-cell lymphoma-associated cancer testis antigen encoding a PAS domain protein. *Br J Cancer* 91(1):141-149.
- Lim SH, Austin S, Owen-Jones E, Robinson L (1999) Expression of testicular genes in haematological malignancies. *Br J Cancer* 81(7):1162-1164.
- Lim SH, Wang Z, Chiriva-Internati M, Xue Y (2001) Sperm protein 17 is a novel cancer-testis antigen in multiple myeloma. *Blood* 97(5):1508-1510.
- Litzow MR (2006) Imatinib resistance: obstacles and opportunities. *Arch Pathol Lab Med* 130(5):669-679.
- Loriot A, Boon T, De Smet C (2003) Five new human cancer-germline genes identified among 12 genes expressed in spermatogonia. *Int J Cancer* 105(3):371-376.
- Lozzio CB, Lozzio BB (1975) Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45(3):321-334.
- Luo C, Xiao X, Liu D, Chen S, Li M, Xu A, Liu J, Gao S, Wu S, He D (2007) CABYR is a novel cancer-testis antigen in lung cancer. *Clin Cancer Res* 13(4):1288-1297.
- Martelange V, De Smet C, De Plaen E, Lurquin C, Boon T (2000) Identification on a human sarcoma of two new genes with tumor-specific expression. *Cancer Res* 60(14):3848-3855.
- Meklat F, Li Z, Wang Z, Zhang Y, Zhang J, Jewell A, Lim SH (2007) Cancer-testis antigens in haematological malignancies. *Br J Haematol* 136(6):769-776.
- Minowada J, Tsubota T, Greaves MF, Walters TR (1977) A non-T, non-B human leukemia cell line (NALM-1): establishment of the cell line and presence of leukemia-associated antigens. *J Natl Cancer Inst* 59(1):83-87.
- Monji M, Nakatsura T, Senju S, Yoshitake Y, Sawatsubashi M, Shinohara M, Kageshita T, Ono T, Inokuchi A, Nishimura Y (2004) Identification of a novel human cancer/testis antigen, KM-HN-1, recognized by cellular and humoral immune responses. *Clin Cancer Res* 10(18 Pt 1):6047-6057.
- Muller AJ, Young JC, Pendergast AM, Pondel M, Landau NR, Littman DR, Witte ON (1991) BCR first exon sequences specifically activate the BCR/ABL tyrosine kinase oncogene of Philadelphia chromosome-positive human leukemias. *Mol Cell Biol* 11(4):1785-1792.
- Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, Ohtani H (1998) CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 58(16):3491-3494.
- Nowell PC, Hungerford DA (1960) Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 25:85-109.
- O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K, Nielsen JL, Rousselot P, Reiffers J, Saglio G, Shepherd J, Simonsson B, Gratwohl A, Goldman JM, Kantarjian H, Taylor K, Verhoef G, Bolton AE, Capdeville R, Druker BJ (2003) Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 348(11):994-1004.
- Ogura M, Morishima Y, Ohno R, Kato Y, Hirabayashi N, Nagura H, Saito H (1985) Establishment of a novel human megakaryoblastic leukemia cell line, MEG-01, with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 66(6):1384-1392.
- Ohkubo T, Kamamoto T, Kita K, Hiraoka A, Yoshida Y, Uchino H (1985) A novel Ph1 chromosome positive cell line established from a patient with chronic myelogenous leukemia in blastic crisis. *Leuk Res* 9(7):921-926.
- Ortmann CA, Eisele L, Nuckel H, Klein-Hitpass L, Fuhrer A, Duhrsen U, Zeschnick M (2008) Aberrant hypomethylation of the cancer-testis antigen PRAME correlates with PRAME expression in acute myeloid leukemia. *Ann Hematol* 87(10):809-818.
- Park JH, Lin ML, Nishidate T, Nakamura Y, Katagiri T (2006) PDZ-binding kinase/T-LAK cell-originated protein kinase, a putative cancer/testis antigen with an oncogenic activity in breast cancer. *Cancer Res* 66(18):9186-9195.
- Pegoraro L, Matera L, Ritz J, Levis A, Palumbo A, Biagini G (1983) Establishment of a Ph1-positive human cell line (BV173). *J Natl Cancer Inst* 70(3):447-453.
- Penn I (1977) Development of cancer as a complication of clinical transplantation. *Transplant Proc* 9(1):1121-1127.
- Quintas-Cardama A, Kantarjian HM, Cortes JE (2009) Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control* 16(2):122-131.
- Raskind WH, Disteche CM, Keating A, Singer JW (1987) Correlation between cytogenetic and molecular findings in human chronic myelogenous leukemia lines EM-2 and EM-3. *Cancer Genet Cytogenet* 25(2):271-284.
- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406(6796):593-599.

- Robbins PF, El-Gamil M, Li YF, Kawakami Y, Loftus D, Appella E, Rosenberg SA (1996) A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *J Exp Med* 183(3):1185-1192.
- Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, San Jose-Eneriz E, Garate L, Cordeu L, Cervantes F, Prosper F, Heiniger A, Torres A (2007a) Epigenetic regulation of human cancer/testis antigen gene, HAGE, in chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 92(2):153-162.
- Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Castillejo JA, Navarro G, Jose-Eneriz ES, Garate L, Cordeu L, Cervantes F, Prosper F, Heiniger A, Torres A (2007b) Epigenetic regulation of PRAME gene in chronic myeloid leukemia. *Leuk Res* 31(11):1521-1528.
- Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava E, Kosma VM (1997) Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *J Pathol* 182(3):318-324.
- Rosenberg SA (2001) Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411(6835):380-384.
- Rowley JD (1973) Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243(5405):290-293.
- Rygaard J, Povlsen CO (1974) The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours. An argument against immunological surveillance. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol* 82(1):99-106.
- Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C, Pasquini R, Clark RE, Hochhaus A, Hughes TP, Gallagher N, Hoenekopp A, Dong M, Haque A, Larson RA, Kantarjian HM (2010) Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 362(24):2251-2259.
- Sahin U, Tureci O, Chen YT, Seitz G, Villena-Heinsen C, Old LJ, Pfreundschuh M (1998) Expression of multiple cancer/testis (CT) antigens in breast cancer and melanoma: basis for polyvalent CT vaccine strategies. *Int J Cancer* 78(3):387-389.
- Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, Goldman JM, Miller CB, Ottmann OG, Schiffer CA, Talpaz M, Guilhot F, Deininger MW, Fischer T, O'Brien SG, Stone RM, Gambacorti-Passerini CB, Russell NH, Reiffers JJ, Shea TC, Chapuis B, Coutre S, Tura S, Morra E, Larson RA, Saven A, Peschel C, Gratwohl A, Mandelli F, Ben-Am M, Gathmann I, Capdeville R, Paquette RL, Druker BJ (2002) Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood* 99(10):3530-3539.
- Scanlan MJ, Simpson AJ, Old LJ (2004) The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary. *Cancer Immunol* 4:1.
- Schenk T, Stengel S, Goellner S, Steinbach D, Saluz HP (2007) Hypomethylation of PRAME is responsible for its aberrant overexpression in human malignancies. *Genes Chromosomes Cancer* 46(9):796-804.
- Schermelleh L, Spada F, Easwaran HP, Zolghadr K, Margot JB, Cardoso MC, Leonhardt H (2005) Trapped in action: direct visualization of DNA methyltransferase activity in living cells. *Nat Methods* 2(10):751-756.
- Schrump DS, Fischette MR, Nguyen DM, Zhao M, Li X, Kunst TF, Hancox A, Hong JA, Chen GA, Pishchik V, Figg WD, Murgo AJ, Steinberg SM (2006) Phase I study of decitabine-mediated gene expression in patients with cancers involving the lungs, esophagus, or pleura. *Clin Cancer Res* 12(19):5777-5785.
- Seigneurin D, Champelovier P, Mouchiroud G, Berthier R, Leroux D, Prenant M, McGregor J, Starck J, Morle F, Micouin C, et al. (1987) Human chronic myeloid leukemic cell line with positive Philadelphia chromosome exhibits megakaryocytic and erythroid characteristics. *Exp Hematol* 15(8):822-832.
- Shah NP, Witte ON, Denny CT (1991) Characterization of the BCR promoter in Philadelphia chromosome-positive and -negative cell lines. *Mol Cell Biol* 11(4):1854-1860.
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD (2001) IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410(6832):1107-1111.
- Sheil AG, Mahony JF, Horvath JS, Johnson JR, Tiller DJ, Stewart JH, May J (1981) Cancer following successful cadaveric donor renal transplantation. *Transplant Proc* 13(1 Pt 2):733-735.
- Sigalotti L, Coral S, Altomonte M, Natali L, Gaudino G, Cacciotti P, Libener R, Colizzi F, Vianale G, Martini F, Tognon M, Jungbluth A, Cebon J, Maraskovsky E, Mutti L, Maio M (2002) Cancer testis antigens expression in mesothelioma: role of DNA methylation and bioimmunotherapeutic implications. *Br J Cancer* 86(6):979-982.

- Sigalotti L, Altomonte M, Colizzi F, Degan M, Rupolo M, Zagonel V, Pinto A, Gattei V, Maio M (2003) 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment of hematopoietic malignancies: a multimechanism therapeutic approach? *Blood* 101(11):4644-4646; discussion 4645-4646.
- Sigalotti L, Fratta E, Coral S, Tanzarella S, Danielli R, Colizzi F, Fonsatti E, Traversari C, Altomonte M, Maio M (2004) Intratumor heterogeneity of cancer/testis antigens expression in human cutaneous melanoma is methylation-regulated and functionally reverted by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res* 64(24):9167-9171.
- Silverstein RA, Ekwall K (2005) Sin3: a flexible regulator of global gene expression and genome stability. *Curr Genet* 47(1):1-17.
- Simpson AJ, Caballero OL, Jungbluth A, Chen YT, Old LJ (2005) Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* 5(8):615-625.
- Slingluff CL, Jr., Petroni GR, Yamshchikov GV, Barnd DL, Eastham S, Galavotti H, Patterson JW, Deacon DH, Hibbitts S, Teates D, Neese PY, Grosh WW, Chianese-Bullock KA, Woodson EM, Wiernasz CJ, Merrill P, Gibson J, Ross M, Engelhard VH (2003) Clinical and immunologic results of a randomized phase II trial of vaccination using four melanoma peptides either administered in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in adjuvant or pulsed on dendritic cells. *J Clin Oncol* 21(21):4016-4026.
- Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA (2000) Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* 192(5):755-760.
- Staib P, Diehl V (2004) Chronisch myeloproliferative Erkrankungen. In: *Innere Medizin*. W. E. Berdel, M. Böhm, M. Classen, V. Diehl, K. Kochsiek, W. Schmiegell (Hrg.) 5. Aufl., Urban und Fischer, München:670-676.
- Stresemann C, Lyko F (2008) Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer* 123(1):8-13.
- Sullivan KM, Weiden PL, Storb R, Witherspoon RP, Fefer A, Fisher L, Buckner CD, Anasetti C, Appelbaum FR, Badger C, Beatty P, Bensinger W, Berenson A, Bigelow C, Cheever MA, Cliff R, Deeg HJ, Doney K, Greenberg P, Hansen JA, Hill R, Loughran T, Martin P, Neiman P, Petersen FB, Sanders J, Singer J, Stewart P, Thomas ED (1989) Influence of acute and chronic graft-versus-host disease on relapse and survival after bone marrow transplantation from HLA-identical siblings as treatment of acute and chronic leukemia. *Blood* 73(6):1720-1728.
- Tajeddine N, Gala JL, Louis M, Van Schoor M, Tombal B, Gailly P (2005) Tumor-associated antigen preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) induces caspase-independent cell death in vitro and reduces tumorigenicity in vivo. *Cancer Res* 65(16):7348-7355.
- Tajima K, Obata Y, Tamaki H, Yoshida M, Chen YT, Scanlan MJ, Old LJ, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T (2003) Expression of cancer/testis (CT) antigens in lung cancer. *Lung Cancer* 42(1):23-33.
- Talpaiz M, Silver RT, Druker BJ, Goldman JM, Gambacorti-Passerini C, Guilhot F, Schiffer CA, Fischer T, Deininger MW, Lennard AL, Hochhaus A, Ottmann OG, Gratwohl A, Baccarani M, Stone R, Tura S, Mahon FX, Fernandes-Reese S, Gathmann I, Capdeville R, Kantarjian HM, Sawyers CL (2002) Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood* 99(6):1928-1937.
- Thomas L (1982) On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med* 55(3-4):329-333.
- Tian Q, Stepaniants SB, Mao M, Weng L, Feetham MC, Doyle MJ, Yi EC, Dai H, Thorsson V, Eng J, Goodlett D, Berger JP, Gunter B, Linseley PS, Stoughton RB, Aebersold R, Collins SJ, Hanlon WA, Hood LE (2004) Integrated genomic and proteomic analyses of gene expression in Mammalian cells. *Mol Cell Proteomics* 3(10):960-969.
- Transplantation ICSSGoCMLaIGfBM (1999) Monitoring treatment and survival in chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 17(6):1858-1868.
- Tsuji N, Kobayashi M, Nagashima K, Wakisaka Y, Koizumi K (1976) A new antifungal antibiotic, trichostatin. *J Antibiot (Tokyo)* 29(1):1-6.
- Tureci O, Sahin U, Schobert I, Koslowski M, Scmitt H, Schild HJ, Stenner F, Seitz G, Rammensee HG, 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(20):4766-4772.
- Tureci O, Sahin U, Zwick C, Koslowski M, Seitz G, Pfreundschuh M (1998) Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(9):5211-5216.
- 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(24):3879-3888.

- van der Kuip H, Wohlbold L, Oetzel C, Schwab M, Aulitzky WE (2005) Mechanisms of clinical resistance to small molecule tyrosine kinase inhibitors targeting oncogenic tyrosine kinases. *Am J Pharmacogenomics* 5(2):101-112.
- van Rhee F, Lin F, Cullis JO, Spencer A, Cross NC, Chase A, Garicochea B, Bungey J, Barrett J, Goldman JM (1994) Relapse of chronic myeloid leukemia after allogeneic bone marrow transplant: the case for giving donor leukocyte transfusions before the onset of hematologic relapse. *Blood* 83(11):3377-3383.
- van Rhee F, Szydlo RM, Hermans J, Devergie A, Frassoni F, Arcese W, de Witte T, Kolb HJ, Niederwieser D, Jacobsen N, Gahrton G, Bandini G, Carreras E, Bacigalupo A, Michallet M, Ruutu T, Reiffers J, Goldman JM, Apperley J, Gratwohl A (1997) Long-term results after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: a report from the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* 20(7):553-560.
- Virchow R (1845) Weisses Blut. *Frorieps Notizen*. 36:151-156.
- von Bubnoff N, Duyster J (2010) Chronic myelogenous leukemia: treatment and monitoring. *Dtsch Arztebl Int* 107(7):114-121.
- Wang RF, Rosenberg SA (1999) Human tumor antigens for cancer vaccine development. *Immunol Rev* 170:85-100.
- Wang Z, Zhang Y, Liu H, Salati E, Chiriva-Internati M, Lim SH (2003) Gene expression and immunologic consequence of SPAN-Xb in myeloma and other hematologic malignancies. *Blood* 101(3):955-960.
- Wang Z, Zhang Y, Mandal A, Zhang J, Giles FJ, Herr JC, Lim SH (2004) The spermatozoa protein, SLLP1, is a novel cancer-testis antigen in hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 10(19):6544-6550.
- Weber J, Salgaller M, Samid D, Johnson B, Herlyn M, Lassam N, Treisman J, Rosenberg SA (1994) Expression of the MAGE-1 tumor antigen is up-regulated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res* 54(7):1766-1771.
- Weiden PL, Flournoy N, Thomas ED, Prentice R, Fefer A, Buckner CD, Storb R (1979) Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med* 300(19):1068-1073.
- Weiser TS, Guo ZS, Ohnmacht GA, Parkhurst ML, Tong-On P, Marincola FM, Fischette MR, Yu X, Chen GA, Hong JA, Stewart JH, Nguyen DM, Rosenberg SA, Schrumph DS (2001) Sequential 5-Aza-2'-deoxycytidine-Depsipeptide FR901228 Treatment Induces Apoptosis Preferentially in Cancer Cells and Facilitates Their Recognition by Cytolytic T Lymphocytes Specific for NY-ESO-1. *J Immunother* (1991) 24(2):151-161.
- Wischnewski F, Pantel K, Schwarzenbach H (2006) Promoter demethylation and histone acetylation mediate gene expression of MAGE-A1, -A2, -A3, and -A12 in human cancer cells. *Mol Cancer Res* 4(5):339-349.
- Xu Y, Kroft SH, McKenna RW, Aquino DB (2001) Prognostic significance of tumour-infiltrating T lymphocytes and T-cell subsets in de novo diffuse large B-cell lymphoma: a multiparameter flow cytometry study. *Br J Haematol* 112(4):945-949.
- Yamabuki T, Takano A, Hayama S, Ishikawa N, Kato T, Miyamoto M, Ito T, Ito H, Miyagi Y, Nakayama H, Fujita M, Hosokawa M, Tsuchiya E, Kohno N, Kondo S, Nakamura Y, Daigo Y (2007) Dikkopf-1 as a novel serologic and prognostic biomarker for lung and esophageal carcinomas. *Cancer Res* 67(6):2517-2525.
- Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* 265(28):17174-17179.
- Zhang Y, Reinberg D (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 15(18):2343-2360.
- Zion M, Ben-Yehuda D, Avraham A, Cohen O, Wetzler M, Melloul D, Ben-Neriah Y (1994) Progressive de novo DNA methylation at the bcr-abl locus in the course of chronic myelogenous leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(22):10722-10726.

Tabellen

Tabelle 1: CML-Zelllinien

Zelllinie	Erkrankungsphase	Ursprungszelle	Ph+	BCR-ABL	Referenz
BV-173	CML, BC	B-Zell Precursor Leukämiezelle	Positiv	Positiv	(Pegoraro et al. 1983)
EM-2	CML, BC	Myeloische Leukämiezelle	Positiv	Negativ	(Raskind et al. 1987)
JURL-MK-1	CML, BC	Myeloische Leukämiezelle	Positiv	Positiv	(Di Noto et al. 1997)
K-562	CML, BC	Myeloische Leukämiezelle	Positiv	Positiv	(Lozzio und Lozzio 1975)
KCL-22	CML, BC	Myeloische Leukämiezelle	Positiv	Positiv	(Kubonishi et al. 1983)
KU-812	CML, BC	Myeloische Leukämiezelle	Positiv	Positiv	(Kishi 1985)
KYO-1	CML, BC	Myeloische Leukämiezelle	Positiv	Positiv	(Ohkubo et al. 1985)
LAMA-84	CML, BC	Myeloische Leukämiezelle	Positiv	Positiv	(Seigneurin et al. 1987)
MEG-01	CML, BC	Myeloische Leukämiezelle	Positiv	Negativ	(Ogura et al. 1985)
NALM-1	CML, BC	Myeloische Leukämiezelle	Positiv	keine Angabe	(Minowada et al. 1977)

Tabelle 2: CT-Antigene, Primersequenzen, PCR-Konditionen, Fragmentlängen (Sequenzierungsergebnisse) und weitere Informationen

CT-Antigen	Primersequenz		PCR-Konditionen	Fragmentlänge (bp)	Gen-Lokus	Referenz
BAGE-2/ CT2.2	F	5'-CTG ACT TCC GCT TTG GAG GC-3'	95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min	230	21p	(Boel et al. 1995)
	R	5'-GCA CCC CCA GAA ACA GAA GAG GAA CA-3'				
CABYR-a/b/ CT88	F	5'-GCA GTC ACC ACG AGT TAG TCC-3'	95°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 1 min	510	18q11.2	(Luo et al. 2007)
	R	5'-CCT CGT TCA CTT GTT GCC AT-3'				
CRT-2/ CT93	F	5'-GAA AGA TAA AGG TCT GCA AAC CAC TCA GAA-3'	95°C 1 min, 57°C 1 min, 72°C 1 min	426	19p13.11	(Hayashi et al. 2007)
	R	5'-TAG AGT GTA CAG GTG TGT-3'				
DKK-1	F	5'-TAG AGT CTA GAA CGC AAG GAT CTC-3'	95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min	139	10q11.2	(Yamabuki et al. 2007)
	R	5'-CAA AAA CTA TCA CAG CCT AAA GGG-3'				
HAGE/ CT13	F	5'-CCT TTC AAT GTT ATC CTG AG-3'	95°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1 min	300	6q12-q13	(Martelange et al. 2000)
	R	5'-TAT TCT TCA GAT TGA CGA AG-3'				
KK-LC-1/ CT83	F	5'-ATG AAC TTC TAT TTA CTC CTA GCG AGC-3'	95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min	350	Xq23	(Fukuyama et al. 2006)
	R	5'-CTA CAA TAT TGA GTG TGG GAA ATT ATT TAA-3'				
KM-HN-1/ CT52	F	5'-CCA TCC CAG ATA CAT TCC GAG GAC-3'	95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min	833	4q35.1	(Monji et al. 2004)
	R	5'-GGT CGA GGA AGG ACA GTG TGT-3'				
LAGE/ CT6	F	5'-CTG CGC AGG ATG GAA GGT GCC CC-3'	95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min	332	Xq28	(Lethe et al. 1998)
	R	5'-GCG CCT CTG CCC TGA GGG AGC-3'				
LDHC/ CT32	F	5'-TGC CGT AGG CAT GGC TTG TGC-3'	95°C 1 min, 68°C 1 min, 72°C 1 min	823	11p15.5- p15.3	(Koslowski et al. 2002)
	R	5'-CAA CAT CTG AGA CAC CAT TCC-3'				
MAGE-A1/ CT1.1	F	5'-CGG CCG AAG GAA CCT GAC CCA G-3'	95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min	420	Xq28	(Chambost et al. 1993)
	R	5'-GCT GGA ACC CTC ACT GGG TTG CC-3'				
MAGE-A3/ CT1.3	F	5'-GAA GCC GGC CCA GGC TCG-3'	95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min	432	Xq28	(Coulie et al. 2001)
	R	5'-GAA GTC CTC ATA GGA TTG GCT-3'				
MAGE-A4/ CT1.4	F	5'-GAG CAG ACA GGC CAA CCG-3'	95°C 1 min, 63°C 1 min, 72°C 1 min	446	Xq28	(Chambost et al. 2000)
	R	5'-AAG GAC TCT GCG TCA GGC-3'				
MAGE-C1/ CT7	F	5'-GAC GAG GAT CGT CTC AGG TCA GC-3'	95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min	632	Xq26	(Jungbluth et al. 2002)
	R	5'-ACA TCC TCA CCC TCA GGA GGG-3'				
MAGE-C2/ CT10	F	5'-CGG ATC GAA GGC ATT TGT GAG-3'	95°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min	884	Xq27	(Gure et al. 2000)
	R	5'-GTG AAC TCA CGG GCT CTC TTG AG-3'				
MGC27005/ CT45A2	Kommerziell erworben von Qiagen, Hilden, Germany. Katalog# PPH22333A		95°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min	180	Xq26.3	(Chen et al. 2005)

MPHOSPH-1/ CT90	F	5'-CCG GGA AAG TAA ACT GAC TCA C-3'	95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min	542	10q22- q24	(Kanehira et al. 2007)
	R	5'-TTC TAG CTC CTC AAC CAA ATC CT-3'				
NXF-2/ CT39	F	5'-CTA TTC CCT TCG ACC CCA-3'	95°C 1 min, 64°C 1 min, 72°C 1 min	740	Xq22.1	(Loriot et al. 2003)
	R	5'-CTC TTT GGG TGG TTA TGT CAC-3'				
NY-ESO-1/ CT6	F	5'-CCC CAC CGC TTC CCG TG-3'	95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min	275	Xq28	(Chen et al. 1997)
	R	5'-CTG GCC ACT CGT GCT GGG A-3'				
NY-SAR-35/ CT37	F	5'-CTT GGT GCG ATC AGC CTT AT-3'	95°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min	375	Xq27.3- q28	(Lee et al. 2003)
	R	5'-TTG ATG CAT GAA AAC AGA ACT C-3'				
PASD-1/ CT63	F	5'-TAC AGG AGC GGA AGA AGT GG-3'	95°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min	214	Xq28	(Liggins et al. 2004)
	R	5'-ACA GGA ACA ATG GGT TGG G-3'				
PBK/ CT84	F	5'-AGA CCC TAA AGA TCG CCT TCT G-3'	95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min	320	8p21.2	(Park et al. 2006)
	R	5'-GTG TTT TAA GTC AGC ATG AGC AG-3'				
PRAME/ CT130	F	5'-CTG TAC TCA TTT CCA GAG CCA GA-3'	95°C 1 min, 63°C 2 min, 72°C 3 min	556	22q11.22	(Ikeda et al. 1997)
	R	5'-TAT TGA GAG GGT TTC CAA GGG GTT-3'				
ROPN-1/ CT91	F	5'-GCG AAT TCA TGG CTC AGA CAG ATA AGC- 3'	95°C 1 min, 66°C 1 min, 72°C 1 min	652	3q21.1	(Li et al. 2007)
	R	5'-ATG GAT CCG TTA CTC CAG CCA AAC CCT- 3'				
SCP-1/ CT8	F	5'-GTA CAG CAG AAA GCA AGC AAC TGA ATG- 3'	95°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min	564	1p13-p12	(Tureci et al. 1998)
	R	5'-GAA GGA ACT GCT TTA GAA TCC AAT TTC C-3'				
SLLP-1/ CT54	F	5'-AAG CTC TAC GGT CGT TGT GAA CTG-3'	95°C 1 min, 66°C 1 min, 72°C 1 min	387	17q11.2	(Wang et al. 2004)
	R	5'-CTA GAA GTC ACA GCC ATC CAC CCA-3'				
SP-17/ CT22	F	5'-GGC AGT TCT TAC CAA GAA GAT-3'	95°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min	500	11q24.2	(Lim et al. 2001)
	R	5'-GGA GGT AAA ACC AGT GTC CTC-3'				
SPAN-XB/ CT11	F	5'-GCG GAT CCA TGG GCC AAC AAT CC-3'	95°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min	328	Xq27.1	(Wang et al. 2003)
	R	5'-GCA AGC TTT TGC TAC TTT TTA GG-3'				
SPO11/ CT35	F	5'-AAG ATA CAT CGA GGA AGA TGG-3'	95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min	676	20q13.2- q13.3	(Koslowski et al. 2002)
	R	5'-CTC TGG CAA TCA GAG TTC TTC-3'				
SSX1/ CT5.1	F	5'-CTA AAG CAT CAG AGA AGA GAA GC-3'	95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min	421	Xp11.23- p11.22	(Gure et al. 1997)
	R	5'-AGA TCT CTT ATT AAT CTT CTC AGA AA-3'				
SSX2/ CT5.2a	F	5'-GTG CTC AAA TAC CAG AGA AGA TC-3'	95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min	434	Xp11.22	(Tureci et al. 1996)
	R	5'-TTT TGG GTC CAG ATC TCT CGT G-3'				
SSX4/ CT5.4	F	5'-AAA TCG TCT ATG TGT ATA TGA AGC T-3'	95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min	415	Xp11.23	(Gure et al. 1997)
	R	5'-GGG TCG CTG ATC TCT TCA TAA AC-3'				
GAPDH	F	5'-TGA TGA CAT CAA GAA GGT GG-3'	95°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min	246	Keine Angabe	
	R	5'-TTT CTT ACT CCT TGG AGG CC-3'				

Tabelle 3: PCR-Programm zur Sequenzierung

Schritt	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	10 sec	35
Annealing	55°	10 sec	35
Elongation	60°C	4 min	35

Die Temperatur des Deckels beträgt 105°C. Nach den 35 Zyklen werden die Proben bis zur Tiefkühlung im Hold Modus bei 4°C konserviert.

Tabelle 4: Materialien und Geräte

Kultivierung und Behandlung der CML-Zelllinien		
6-Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-One	Frickenhausen, Germany
FCS	Invitrogen	Karlsruhe, Germany
Human SCF (100 ng/ml)	R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
Human IL-3 (20 ng/ml)	R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
G-CSF (20 ng/ml)	Amgen	München, Germany
A3656 (Aza)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Germany
T8552 (TSA)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Germany
RLT-Puffer	Qiagen	Hilden, Germany
RPMI-1640	Invitrogen	Karlsruhe, Germany
DEPC-behandeltes Wasser	Sigma-Aldrich	Steinheim, Germany
RNA-Isolation und RNA-Spektrometrie		
RNeasy Mini Kit	Qiagen	Hilden, Germany
QiaShredder	Qiagen	Hilden, Germany
70 %iges Ethanol	J. T. Baker	Deventer, Netherlands
DEPC-behandeltes Wasser	Sigma-Aldrich	Steinheim, Germany
Microcentrifuge Tubes	Eppendorf	Hamburg, Germany
Eppendorf Bio Photometer	Eppendorf	Hamburg, Germany
UVette	Eppendorf	Hamburg, Germany
cDNA-Gewinnung		
10x Puffer	Promega	Mannheim, Germany
MgCl ₂ (25 mM)	Promega	Mannheim, Germany
Random-Primer (3 µg/µl)	Invitrogen	Karlsruhe, Germany
dNTP-Mix (10 mM)	Invitrogen	Karlsruhe, Germany
RNAsin (40 U/µl)	Promega	Mannheim, Germany
AMV-Reverse-Transkriptase (10 U/µl)	Promega	Mannheim, Germany
DEPC-behandeltes Wasser	Sigma-Aldrich	Steinheim, Germany
Master cycler gradient	Eppendorf	Hamburg, Germany

RT-PCR		
MgCl ₂ (25 mM)	Perkin-Elmer	Waltham, MA, USA
10x Puffer	Perkin-Elmer	Waltham, MA, USA
dNTP-Mix (10 mM)	Invitrogen	Karlsruhe, Germany
Custom primer	MWG-Biotech	Ebersberg, Germany
Custom primer	Qiagen	Hilden, Germany
AmpliTaqGold (5 U/μl)	Perkin-Elmer	Waltham, MA, USA
DEPC-behandeltes Wasser	Sigma-Aldrich	Steinheim, Germany
0,2 ml-Röhrchen-Kette	Sarstedt	Nümbrecht, Germany
Human Testes Total RNA	Ambion	Austin, TX, USA
Master cycler gradient	Eppendorf	Hamburg, Germany
Gelelektrophorese für RT-PCR		
Trisbase	Sigma-Aldrich	Steinheim, Germany
Aqua bidest	Th. Geyer	Berlin, Germany
Hydrochloric acid	Sigma-Aldrich	Steinheim, Germany
EDTA (pH 8)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Germany
DEPC-behandeltes Wasser	Sigma-Aldrich	Steinheim, Germany
DNA Subcell, 1000/500	Biorad	München, Germany
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Invitrogen	Karlsruhe, Germany
The Imager	Appligene	Cedex, France
Gelextraktion und Sequenzierung		
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen	Hilden, Germany
Isopropanol	Fluka	Buchs, Switzerland
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG	Zürich, Switzerland
Wasserbad	GFL	Burgwedel, Germany
Eppendorf Centrifuge	Eppendorf	Hamburg, Germany
0,5 ml Eppendorf Tube	Eppendorf	Hamburg, Germany
BigDyeKit V.1.1	Applied Biosystems	Foster City, CA, USA
Primer	MWG Biotech	Ebersberg, Germany
DEPC-behandeltes Wasser	Sigma-Aldrich	Steinheim, Germany
Master cycler gradient	Eppendorf	Hamburg, Germany
Natriumacetat	Sigma-Aldrich	Steinheim, Germany
100 %iges Ethanol	J. T. Baker	Deventer, Netherlands
70 %iges Ethanol	J. T. Baker	Deventer, Netherlands
Biofuge 13R	Heraeus Sepatech	Hanau, Germany
Speedvac, Hetovac, Intermed CT60 e	Heto	Holten, Germany
ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems	Foster City, CA, USA

Western Blot		
RIPA Lysispuffer	BioVision	Mountain View, Ca, USA
Protease Inhibitor Cocktail	Roche	Basel, Switzerland
LDS Sample Buffer	Invitrogen	Karlsruhe, Germany
Sample Reducing Agent	Invitrogen	Karlsruhe, Germany
See Blue Plus 2 Prestrained Standard	Invitrogen	Karlsruhe, Germany
Amersham Hyperprocessor	GE Healthcare	Buckinghamshire, UK
Consort EV202 power supply	Sigma-Aldrich	Steinheim, Germany
Xcell II Blot Kammer	Invitrogen	Karlsruhe, Germany
Xcell SureLock Electrophoresis Cell	Invitrogen	Karlsruhe, Germany
NuPage Bis-Tris SDS-PAGE Gel	Invitrogen	Karlsruhe, Germany
NuPage transfer buffer	Invitrogen	Karlsruhe, Germany
NuPage running buffer	Invitrogen	Karlsruhe, Germany
Methanol	J.T. Baker	Deventer, Netherlands
Natriumchlorid	J.T. Baker	Deventer, Netherlands
Trisbase	Sigma-Aldrich	Steinheim, Germany
Tween 20	Sigma-Aldrich	Steinheim, Germany
Amersham Hyperfilm MP	GE Healthcare	Buckinghamshire, UK
Amersham ECL Detection reagents	GE Healthcare	Buckinghamshire, UK
Protran Nitrocellulose Membran	Whatman	Dassel, Germany
Gel blotting paper	Whatman	Dassel, Germany
Vibrax VXR	IKA Werke	Staufen, Germany
Top-Block	Fluka	Buchs, Switzerland
Anti-ACTB-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology	Santa Cruz, CA, USA
HRP-labeled anti-mouse IgG	R&D Systems	Minneapolis, MN, USA
Immunfluoreszenz		
DAPI	Roche	Basel, Switzerland
BSA	Sigma-Aldrich	Steinheim, Germany
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich	Steinheim, Germany
Triton X-100, 0,1%ig in PBS	Sigma-Aldrich	Steinheim, Germany
Cytospin 2 Centrifuge	Shandon	Frankfurt a.M., Germany
PRAME-Antikörper (5 µg/ml)	Abcam	Cambridge, MA ,USA
Anti-mouse-FITC	BD	Franklin Lakes, NJ, USA
Laborutensilien		
Pipetten	Eppendorf	Hamburg, Germany
Pipettenspitzen	Sarstedt	Nümbrecht, Germany
Gummihandschuhe	Paul Hartmann AG	Heidenheim, Germany
Tubes	Sarstedt	Nümbrecht, Germany

Tabelle 5: Reaktionsansätze

Kultivierungsschema der CML-Zelllinien			
	24h	48h	72h
Blasten Unbehandelt	3 ml Medium	3 ml Medium	3 ml Medium
Blasten + 24h TSA	3 ml Medium	3 ml Medium	3 ml Medium + 5 µM TSA
Blasten + 72h Aza	3 ml Medium + 1µM Aza	3 ml Medium + 1µM Aza	3 ml Medium + 1µM Aza
Blasten + 72h Aza + 24h TSA	3 ml Medium + 1µM Aza	3 ml Medium + 1µM Aza	3 ml Medium + 1,4 µl Aza + 5 µM TSA
Reaktionsansatz (20 µl) zur cDNA-Gewinnung			
10xPuffer	2 µl		
MgCl ²	5 mM		
Random-Primer	3 µg		
dNTP-Mix	1 mM		
RNasin	20 U		
AMV-Reverse-Transkriptase	15 U		
DEPC-behandeltes Wasser	ad 20µl		
Reaktionsansatz (25 µl) für RT-PCR			
MgCl ²	2 mM		
10x PCR Gold Buffer	2,5 µl		
dNTP-Mix	0,8 mM		
Primer	0,16 mM		
AmpliTaqGold	0,625 U		
DEPC-behandeltes Wasser	ad 25 µl		
Herstellung Agarosegel			
Agarosepulver	1,5 g		
TAE Puffer	100 ml		
Ethidiumbromid	0,1 mg		
Zur Herstellung des Agarosegels werden 1,5 g Agarosepulver mit 100 ml TAE Puffer in ein Glasgefäß gegeben, gut vermischt und in einer Mikrowelle solange aufgeköcht, bis die Flüssigkeit klar und klümpchenfrei ist. Danach werden 10 µl Ethidiumbromid hinzugegeben. Die Flüssigkeit wird gut gemischt und erneut kurz aufgeköcht. Danach wird das flüssige Agarosegel in einen vorher präparierten Schlitten einer Gelelektrophoresekammer gegeben und mit einem Kamm zur Formung der Probekammern bestückt. Das Gel wird eine h lang aushärten gelassen, bevor es dann bestückt werden kann.			
DNA-Sequenzierungsansatz (10 µl Reaktionsansatz + 10 µl DNA-Extrakt)			
DNA-Extrakt	10 µl		
Big Dye	2 µl		
2,5-fach-Puffer	6 µl		
Forward Primer	150 pmol		
DEPC-behandeltes Wasser	0,5 µl		
Herstellung des 50x TAE-Puffer (500 ml)			
Trisbase	121 g		
Essigsäure	28,55 ml		
EDTA	50 mM		
Aqua dest			
Zur Herstellung von 500 ml des 50x TAE Puffers werden 121g Trisbase mit 200 ml Aqua dest aufgefüllt. Danach werden 28,55 ml Essigsäure und 50 ml EDTA hinzugegeben. Anschließend wird dieser Ansatz mit Auqua dest bis auf 500 ml Gesamtvolumen aufgefüllt.			

Herstellung des TAE-Puffer (1000 ml)	
50x TAE-Puffer	20 ml
Aqua dest	980 ml
Herstellung des PCR-Markeransatzes (300 µl)	
Ladepuffer	90 µl
100 bp Ladder	10 µl
TAE-Puffer	200µl

Tabelle 6: Für den Western Blot verwendete Antikörper

Antikörper	Klonalität	Klon/ Katalog #	Antigen	Firma
Anti-MAGE-A1/ MA454	monoklonal	E22-11B2-E9	MAGE-A1	Ludwig Institute for Cancer Research, New York, NY, USA
Anti-MAGE-A3 /	monoklonal	M3H67	MAGE-A3	Ludwig Institute for Cancer Research, New York, NY, USA
Anti-MAGE-C1/ CT-7	monoklonal	CT7-33	MAGE-C1	Ludwig Institute for Cancer Research, New York, NY, USA
Anti-MAGE-C2/ CT-10	monoklonal	KLON 5	MAGE-C2	Ludwig Institute for Cancer Research, New York, NY, USA
Anti-NY-ESO-1	monoklonal	Sc-53869	NY-ESO-1	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
Anti-PRAME	polyklonal	ab89097	PRAME	Abcam, Cambridge, MA, USA
Anti-ROPN-1/ KHE 1	monoklonal	KLON 1	ROPN-1	Ludwig Institute for Cancer Research, New York, NY, USA
Anti-SCP-1	polyklonal	KLON NB 300-229 A2	SCP-1	Novus Biologicals, Littleton, CO, USA
Anti-CRT-2	monoklonal	ab57346	CRT-2	Abcam, Cambridge, MA, USA
Anti-Beta Actin	monoklonal	4E8H3	Beta Actin	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
HRP-labeled anti- mouse antibody	polyklonal	HAF007	Mouse IgG	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

Danksagung

Als erstes danken möchte ich PD Dr. Djordje Atanackovic für die Überlassung des Themas, die hilfreichen Ratschläge und Diskussionen sowie die tatkräftige Unterstützung während jeder Phase meiner Arbeit.

Als nächstes gebührt der Dank Dr. med. Tim Lützens für die Ratschläge und die große Unterstützung vor allem bei der Niederschrift und Fertigstellung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich Katrin Bartels, York Hildebrand und Christiane Horn danken für Ihre Unterstützung und die technischen Ratschläge während der experimentellen Phase der Arbeit.

Danken möchte ich auch meinen Freunden und meiner Familie fürs Korrekturlesen sowie die moralische und finanzielle Unterstützung.

Zuletzt möchte ich Prof. Dr. Carsten Bokemeyer für die Möglichkeit danken, dass ich dieses Projekt in der Abteilung für Onkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bearbeiten und fertigstellen durfte.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Tim Wilhelm Stasche
Geburtsdatum/-ort	23.04.1984/ Brandenburg a. d. Havel
Staatsangehörigkeit	deutsch
Anschrift	Pestalozzistrasse 60 10627 Berlin
E-Mail	tim.stasche@googlemail.com

Studium

10/2003 – 05/2010	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
08/2005	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,0)
05/2010	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,5)

Praktisches Jahr

02/2009	Allgemeinchirurgie, Shaare Zedek Medical Center, Jerusalem, Israel
06/2009	Innere Medizin, Royal Liverpool University Hospital, Liverpool, UK
10/2009	HNO, Katholisches Marienkrankenhaus GmbH, Hamburg

Beruflicher Werdegang

01/2011 – 09/2011	Assistenzarzt in der Abteilung für Viszeral- und Unfallchirurgie, Jüdisches Krankenhaus, Heinz-Galinski-Strasse 1, 13347 Berlin
seit 10/2011	Assistenzarzt Urologie, Franziskus Krankenhaus, Budapester Strasse 15-19, 10787 Berlin

Sprachkenntnisse

Deutsch	Muttersprache
Englisch	verhandlungssicher
Französisch	fließend in Wort und Schrift
Spanisch	Grundkenntnisse

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: