

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Onkologisches Zentrum

II. Medizinische Klinik und Poliklinik

Abteilung für Onkologie, Hämatologie, Stammzelltransplantation
mit der Sektion Pneumologie

Klinikdirektor: Prof. Dr. med. Carsten Bokemeyer

Untersuchung des Expressionsmusters von Cancer-Testis-Antigenen im Knochenmark und peripheren Blut von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie

Dissertation

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

vorgelegt von:
Benjamin Kloth
aus Bollschweil

Hamburg 2012

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 14.08.2012

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. D. Atanackovic

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. W. Fiedler

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Einführung und Zielsetzung	1
1.2 Akute myeloische Leukämie	2
1.2.1 Definition und Epidemiologie	2
1.2.2 Pathophysiologie und Ätiologie	2
1.1.3 Klinik und Diagnostik	3
1.2.4 Klassifikation	5
1.2.5 Therapie	6
1.2.5.1 Chemotherapie	6
1.2.5.2 Blutstammzelltransplantation	7
1.2.5.3 Strahlentherapie	8
1.2.5.4 Neue Therapieverfahren	9
1.2.6 Prognose	9
1.3 Tumorimmunologie und Immuntherapie	10
1.3.1 Immuntherapeutische Ansätze bei der AML	11
1.3.1.1 Allogene Donorleukozyteninfusionen und NK-Zell-Therapie	12
1.3.1.2 Spontane und Zytokin-induzierte Immunantworten	12
1.3.1.3 Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern	13
1.3.1.4 Tumorstimmimpfung	14
1.4 Tumorantigene	15
1.4.1 Tumorantigene bei der akuten myeloischen Leukämie	16
1.4.2 Cancer-Testis-Antigene (CTA)	16
2. Material und Methoden	20
2.1 Material	20
2.1.1 Patientenproben	20
2.1.2 Proben der Kontrollgruppe	20
2.1.3 Studiendesign	20
2.2 Methoden	21
2.2.1 Zellseparation	21
2.2.2 RNA-Isolation und Spektrometrie	22
2.2.3 cDNA-Gewinnung	23
2.2.4 Qualitative-PCR	23
2.2.5 Gelelektrophorese	24
2.2.6 Sequenzierung	25
2.2.7 Statistik und Darstellung	26
3. Ergebnisse	27
3.1 Eigenschaften des Patientenkollektivs und der Proben	27
3.2 Expression von CT-Antigenen	28
3.3 Korrelation der CTA-Expression mit klinischen Parametern	31
3.3.1 Korrelation von Geschlecht und CTA-Expression	31
3.3.2 Korrelation von Patientenalter und CTA-Expression	32
3.3.3 Korrelation von Blastenkonzentration und CTA-Expression	33
3.3.4 Korrelation von FAB-Klassifikation und CTA-Expression	34
3.3.5 Korrelation von CTA-Expression und Vortherapie	35
3.3.6 Korrelation von CTA-Expression und zytogenetischem Risikoprofil	36
3.4 Einfluss der CTA-Expression auf das Gesamtüberleben	37
3.5 Einfluss der Expression von PRAME auf das Gesamtüberleben innerhalb der zytogenetischen Risikogruppen	40

4. Diskussion.....	43
4.1 Expressionsmuster der CT-Antigene bei AML Patienten	44
4.2 Korrelation mit klinischen Parametern.....	47
4.3 CTA-Expression und Gesamtüberleben	48
4.4 Kritik.....	49
5. Zusammenfassung und Schlussfolgerung	50
Literaturverzeichnis.....	52
Tabellen	78
Danksagung.....	85
Eidesstattliche Erklärung	86

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: RT-PCR Ergebnisse	28
Abbildung 2: Anzahl der exprimierten CT-Antigene.....	29
Abbildung 3: CTA-Expression bei AML	30
Abbildung 4: Geschlechtsspezifische CTA-Expression.....	31
Abbildung 5: Altersabhängige CTA-Expression	32
Abbildung 6: CTA-Expression in Abhängigkeit von der Blasteninfiltration.....	33
Abbildung 7: CTA-Expression in Abhängigkeit von der FAB-Klassifikation	34
Abbildung 8: CTA-Expression in Abhängigkeit von der Vortherapie.....	35
Abbildung 9: CTA-Expression in Abhängigkeit von der Zytogenetik	36
Abbildung 10: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von PRAME	37
Abbildung 11: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von NY-SAR-35.....	38
Abbildung 12: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von SLLP1.....	38
Abbildung 13: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von SCP1	39
Abbildung 14: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von ROPN1	39
Abbildung 15: Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der Zytogenetik	40
Abbildung 16: Gesamtüberleben der "good risk-" Gruppe in Abhängigkeit von PRAME	41
Abbildung 17: Gesamtüberleben der "intermediate risk-" Gruppe in Abhängigkeit von PRAME.	41
Abbildung 18: Gesamtüberleben der "poor risk-" Gruppe in Abhängigkeit von PRAME	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: FAB-Klassifikation der AML.....	78
Tabelle 2: WHO-Klassifikation der AML	79
Tabelle 3: Primersequenzen, Anlagerungstemperatur und Größe	80
Tabelle 4: Verwendete Materialien.....	81
Tabelle 5: Eigenschaften des Patientenkollektivs.....	83
Tabelle 6: Eigenschaften der Proben	84

Abkürzungsverzeichnis

6-TG	6-Thioguanin
ACTB	beta Actin
AML	akute myeloische Leukämie
ARA-C	Arabinofuranosyl Cytidine
ATO	Arsen-Trioxid
ATRA	all-trans-retinoic acid
BAGE	B melanoma antigen
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BP	Basenpaare
BSZT	Blutstammzelltransplantation
CCD	Charge-Coupled-Device
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CMV	Zytomegalie Virus
CRP	C-reaktives Protein
CTA	Cancer-Testis-Antigen
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DLI	Donorleukozytentransfusion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco Phosphate Buffered Saline
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
FAB	French-American-British
FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
GvL	Graft-versus-Leukemia
GvH	Graft-versus-Host
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	human leukocyte antigen
HNO	Hals-Nasen-Ohren
hTERT	human Telomerase Reverse Transkriptase
IL-2	Interleukin-2
ITD	internal tandem duplication
LAA	Leukämie-assoziierte Antigene
LDH	Lactatdehydrogenase
m-AMSA	Amsacrin
MAGE	melanoma antigen gene
MHC	Major Histocompatibility Complex
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NK	Natürliche Killerzellen
NPM1	Nucleophosmin-1
OFA-iLRP	oncofetal antigen immature laminin receptor protein
PCR	polymerase chain reaction
RHAMM	receptor for hyaluronan-mediated motility
rIL-2	rekombinantes Interleukin-2
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RT-PCR	Real-Time-PCR
SCP1	synaptoneal complex protein 1
SEREX	serological identification of antigens by recombinant expression cloning
SLLP1	sperm lysozyme-like protein
TAA	Tumor-assoziierte Antigene
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBI	total body irradiation
TIL	Tumor-Infiltrierende Lymphozyten

UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organization
WT-1	Wilms-Tumor-1

1. Einleitung

1.1 Einführung und Zielsetzung

Die akute myeloische Leukämie ist eine maligne Erkrankung des blutbildenden Systems. Die unkontrollierte Proliferation hämatopoetischer Vorläuferzellen führt zur Verdrängung der normalen Hämatopoese, was bei unbehandelten Patienten bereits nach wenigen Wochen bis einigen Monaten zum Tod führt (Haferlach, Perne et al. 2010). Allerdings zeigen auch die klassischen Therapieansätze häufig nicht den erwünschten Erfolg. So liegt trotz großer Fortschritte bei der Therapie - einschließlich der Einführung der allogenen Stammzelltransplantation - die 5-Jahres-Überlebensrate für alle registrierten AML Patienten in den USA bei nur knapp über 20 Prozent (SEER Nov. 2010).

Tumorantigene (TAA), zu denen auch die Cancer-Testis-Antigene zählen, stellen Zielstrukturen für neue diagnostische und therapeutische Ansätze dar. Gegenüber anderen TAA haben CT-Antigene den Vorteil, dass sie außer in verschiedenen Malignomen ausschließlich in immunprivilegiertem Gewebe exprimiert werden. Für einige durch Cancer-Testis-Antigene kodierte Proteine konnte ihre Immunogenität und ihre Fähigkeit, sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten bei Krebspatienten auszulösen, bereits nachgewiesen werden (Simpson, Caballero et al. 2005). Sie stellen somit besonders vielversprechende Targets für Vakzine oder Antikörpertherapien dar und könnten etablierte Therapiemethoden unterstützen oder sogar ersetzen.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, das Expressionsmuster sowie die Expressionsfrequenz von Cancer-Testis-Antigenen im Knochenmark bzw. peripheren Blut von an AML erkrankten Patienten zu analysieren und dadurch neue Zielstrukturen für immuntherapeutische Ansätze zu ermitteln. Darüber hinaus wird die mögliche Korrelation zwischen der Expression von CT-Antigenen und verschiedenen klinischen Parametern wie Alter, Geschlecht, Blastenkonzentration, FAB-Klassifikation, Vortherapie und zytogenetischem Risikoprofil untersucht. Um eine mögliche prognostische Aussagekraft der Expression von Cancer-Testis-Antigenen über den Verlauf einer AML-Erkrankung zu untersuchen, wird zuletzt der Einfluss der Expression auf das 5-Jahres-Überleben der Patienten untersucht.

1.2 Akute myeloische Leukämie

1.2.1 Definition und Epidemiologie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine klonale Erkrankung einer frühen, myeloisch determinierten Vorläuferzelle mit gestörter Ausreifung und unkontrollierter Proliferation leukämischer Blasten im Knochenmark und meistens auch im peripheren Blut (Classen, Diehl et al. 2004). Die AML kann als de novo Leukämie ohne offensichtliche Vorerkrankung oder auf dem Boden von Knochenmarksstörungen, wie z.B. dem myelodysplastischen Syndrom, der aplastischen Anämie oder der Fanconi Anämie, sowie nach einer vorangegangenen Chemotherapie entstehen. Infolge der hohen Proliferationsrate der malignen Zellen entwickeln sich akute Leukämien in der Regel kurzfristig, innerhalb von wenigen Wochen. Bei älteren Patienten bzw. bei der sekundären AML kann die Krankheitsentwicklung gelegentlich auch protrahiert verlaufen (Ehninger, Link et al. 2008).

Prinzipiell kann die akute myeloische Leukämie in jedem Alter auftreten. Typischerweise manifestiert sie sich jedoch im höheren Lebensalter. In unterschiedlichen Studien ergab sich ein mittleres Alter von 55 bis 60 Jahren bei Erstdiagnose (Arlin, Case et al. 1990). Im Gegensatz zu Kindern, bei denen nur etwa 15-20% aller akuten Leukämien ihren Ursprung in einer myeloischen Vorläuferzelle haben, sind es beim Erwachsenen etwa 80 - 90%. In Deutschland liegt die geschätzte jährliche Inzidenz der AML bei 4,3/100.000 für Männer und 2,9/100.000 für Frauen (Ehninger, Link et al. 2008). Weltweit finden sich die höchsten Inzidenzen der AML beim erwachsenen Menschen in Nordamerika, Australien und Westeuropa (Jemal, Thomas et al. 2002).

1.2.2 Pathophysiologie und Ätiologie

Die Entstehung der akuten myeloischen Leukämie beruht auf genetischen Alterationen der myeloischen Vorläuferzellen. Diese genetischen Veränderungen führen zur Aktivierung von wachstumsfördernden Onkogenen, zur Inaktivierung von Suppressor-Genen oder zur Veränderung von Transkriptionsfaktoren (Kelly, Clark et al. 2002; Scandura, Boccuni et al. 2002) und somit zu einer malignen Transformation und

klonalen Expansion der myeloisch determinierten Stammzelle mit Verdrängung der physiologischen Blutbildung (Classen, Diehl et al. 2004).

Die genaue, vermutlich multifaktorielle Ätiologie der AML ist aber in vielen Punkten noch unklar. Mit großer Wahrscheinlichkeit entsteht ein überwiegender Teil der Erkrankungen durch den Kontakt zu speziellen Noxen im Laufe des Lebens (Ehninger, Link et al. 2008). Nur ein kleiner Prozentsatz der AML-Fälle beruht auf Mutationen in der Keimbahn. So haben z.B. Patienten mit Trisomie 21 ein zehn- zwanzigfach erhöhtes Risiko, an einer Leukämie zu erkranken (Mitelman, Heim et al. 1990). Andere Risikofaktoren als Folge der Veränderung der Keimbahn sind Mutationen im CCAAT enhancer binding protein alpha (Smith, Cavenagh et al. 2004), Mutationen der NAD(P)H-Quinone-Oxidoreduktase 1 (Smith, Wang et al. 2001), die Ataxia teleangiectatica, Osteogenesis imperfecta (Classen, Diehl et al. 2004), das Klinefelter-Syndrom (Deschler and Lubbert 2006), das Li-Fraumeni-Syndrom (Potsch, Voigtlander et al. 2002), die Fanconi Anämie und die Neurofibromatose (Aquino 2002). Externe Noxen, die das Risiko erhöhen an einer AML zu erkranken, sind Benzol (Austin, Delzell et al. 1988; Jacobs 1989; Hayes, Yin et al. 1997), ionisierende Strahlen, wie sie beim Einsatz von Atombomben entstehen (Bizzozero, Johnson et al. 1966), aber auch bei der therapeutischen Bestrahlung eingesetzt werden (Darby, Doll et al. 1987), Zigarettenrauch (Sandler, Shore et al. 1993) und vorausgegangene Chemotherapien mit Alkylanzien (Andrieu, Ifrah et al. 1990), Etoposid oder anderen Topoisomerasehemmern (Pui, Ribeiro et al. 1991). Sowohl bei der durch Strahlentherapie ausgelösten als auch bei einer nach Chemotherapie auftretenden AML spricht man von der sogenannten sekundären akuten myeloischen Leukämie.

1.1.3 Klinik und Diagnostik

Die ersten Symptome der AML sind variabel, eher unspezifisch und in der Regel durch die Knochenmarksinsuffizienz hervorgerufen. Meist beginnt das manifeste Krankheitsbild der akuten myeloischen Leukämie innerhalb von drei Monaten mit unspezifischen Allgemeinsymptomen wie Abgeschlagenheit, Leistungsminderung, Müdigkeit, Appetitlosigkeit, Knochenschmerzen, Nachtschweiß, Fieber und Gewichtsverlust (Michl 2008). Protrahierte oder schwerwiegende Infekte, die sich vornehmlich im HNO-Bereich manifestieren, sind in der Regel auf eine Granulozytopenie

zurückzuführen. Relativ häufig berichten die Patienten auch von einer erhöhten Blutungsneigung, verursacht durch eine Thrombozytopenie, die sich durch zum Beispiel schwer stillbares Nasen- und/oder Zahnfleischbluten äußert oder zu Hämatomen und Petechien führt. Seltener auftretende Symptome sind Gingivahyperplasie, Hauttumore, granulozytäre Sarkome (Chlorome), Kopfschmerzen, Meningismus, Photophobie (Meningiosis leukaemica) und Lymphadenopathien. Diese seltener auftretenden klinischen Anzeichen sind auf die Proliferation und Infiltration maligner Zellen in den jeweiligen Geweben zurückzuführen.

Schon in der frühen Phase der Erkrankung kann es zu erheblichen, lebensbedrohlichen Komplikationen kommen. Dazu gehören die Hyperleukozytose, das Tumorlysesyndrom und schwerwiegende Hämorrhagien. Bei der Hyperleukozytose kommt es durch Leukostase zur Verlegung von Kapillaren, vor allem der Endstromgebiete von Lunge und Gehirn, und somit schließlich zum Multiorganversagen (Dutcher, Schiffer et al. 1987). Ein Tumorlysesyndrom tritt selten spontan auf. Oft wird es erst durch die eingeleitete Therapie ausgelöst.

Bei dem klinischen Verdacht auf eine akute myeloische Leukämie wird zunächst ein Blutbild angefertigt. Auffällig können hierbei quantitative Veränderungen aller drei Zellreihen sein, wobei sich der maligne Verdrängungseffekt im peripheren Blutbild als typischerweise normozytäre Anämie mit erniedrigter Retikulozytenzahl und Thrombozytopenie bemerkbar macht. Die Leukozytenwerte können sowohl im Normbereich sein als auch durch eine Leukozytose oder Leukopenie auffallen. Nach der WHO-Klassifikation kann die Diagnose einer akuten Leukämie beim Nachweis von >20% blastärer Zellen im peripheren Blut oder im Knochenmark gestellt werden (Vardiman, Harris et al. 2002), ein niedrigerer Wert schließt sie jedoch nicht aus. Auch bei Patienten mit >30% blastären Zellen im Differenzialblutbild ist eine Knochenmarkspunktion obligat, da nur Knochenmarksmaterial wichtige nachfolgende Untersuchungen mit höherer Sensitivität möglich macht (Cheson, Bennett et al. 2003).

Zur Diagnosesicherung und Prognoseeinschätzung sollten zytomorphologische und zytochemische Untersuchungen des peripheren Bluts und des Knochenmarks durchgeführt werden. In dem nach Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa) gefärbten Knochenmarksausstrich findet sich typischerweise eine stark erhöhte Zelldichte von

unreifen, blastären Zellen und eine stark verminderte oder fehlende reguläre Hämatopoese. Ein besonderer morphologischer Marker, beweisend für den myeloischen Ursprung der Blasten, sind Auer-Stäbchen, die bei etwa jeder vierten AML im Zytoplasma nachweisbar sind. Mit Hilfe zytochemischer Färbungen werden Myeloperoxidase-positive Blasten mit myeloischer Herkunft unterschieden von α -Naphthyl-azetatesterase-positiven Blasten mit monozytärem Ursprung. Darüber hinaus sollte eine Immunphänotypisierung mittels Durchflusszytometrie zum Nachweis linienspezifischer Oberflächenantigene vorgenommen werden sowie zytogenetische und molekularbiologische Untersuchungen zur Darstellung genetischer Veränderungen stattfinden.

Um mögliche Komplikationen rechtzeitig zu erkennen, sollten regelmäßig Elektrolyte, Leber- und Nierenfunktionswerte, LDH, CRP, Procalcitonin und der Gerinnungsstatus kontrolliert werden. Bei der Erstdiagnostik einer akuten myeloischen Leukämie sollten darüber hinaus eine EBV-, CMV-, Hepatitis-B-, Hepatitis-C- und eine HIV-Serologie erfolgen. Dies dient sowohl der Klärung von Differentialdiagnosen als auch dem Management der weiteren Behandlung. Eine Aspergillusinfektion wird mittels eines Aspergillus-Galactomannan-Tests ausgeschlossen. Um eine eventuell notwendige Stammzellspendersuche nicht zu verzögern, sollte eine frühzeitige HLA-Typisierung des Patienten erfolgen. Vor dem Beginn einer intensivierten Therapie muss die Organfunktion mittels apparativer Routinediagnostik eingeschätzt werden. Hierzu gehören eine Röntgenuntersuchung des Thorax, eine abdominelle Ultraschalluntersuchung, ein EKG sowie die echokardiographische Untersuchung des Herzens.

1.2.4 Klassifikation

Die Einteilung der akuten myeloischen Leukämie erfolgt gegenwärtig entsprechend der WHO-Klassifikation (siehe Tabelle 1) der Tumoren des hämatopoetischen und lymphatischen Gewebes aus dem Jahre 2001 (Jaffe, World Health Organization et al. 2001). In dieser wird die AML in erster Linie nach genetischen Veränderungen klassifiziert. Dabei werden jedoch die von der FAB-Gruppe festgelegten morphologischen und immunologischen Kriterien zur Abgrenzung einzelner Subtypen weiterhin beibehalten. Gegenwärtig lassen sich jedoch nur etwa 30% der AML-Fälle

anhand der durch die WHO festgelegten Kriterien genetisch definieren (Ehninger, Link et al. 2008).

Die von Benett 1976 publizierten Vorschläge der French-American-British Cooperative Group berücksichtigen neben zytomorphologischen auch zytochemische Kriterien. In der FAB-Klassifikation (siehe Tabelle 2) wird anhand der Linienzugehörigkeit (granulozytäre, monozytäre, erythroide bzw. megakaryozytäre Zellreihe) und Differenzierung der Blasten zwischen acht Subgruppen unterschieden (Sack 2007).

1.2.5 Therapie

Die akute myeloische Leukämie ist eine Erkrankung, bei der für große Patientengruppen bislang keine Standardtherapie etabliert werden konnte. Dies rückt die Notwendigkeit der Behandlung innerhalb von prospektiven klinischen Studien in den Vordergrund (Ehninger, Link et al. 2008).

1.2.5.1 Chemotherapie

Nach wie vor bildet die Chemotherapie die Basis der AML-Therapie. Unterschieden wird zwischen einer First-Line-Therapie (Primärtherapie) nach Diagnosestellung und einer Second-line-Therapie (Sekundärtherapie) bei Therapierefraktärität. Ob eine intensive, kurative Chemotherapie durchgeführt wird oder die Therapie palliativ erfolgt, hängt von der Konstitution und den Komorbiditäten des Patienten ab. Ziel der intensivierten Chemotherapie ist das Erreichen einer kompletten hämatologischen Remission. Diese definiert sich durch eine stattgehabte Regeneration des peripheren Blutbildes (>1000 Neutrophile/ μl und ≥ 100.000 Thrombozyten/ μl), durch das Vorliegen von $< 5\%$ Blasten ohne Auer-Stäbchen im Knochenmark und das erwiesene Fehlen von Blasten im peripheren Blut oder extramedullären Leukämiemanifestationen (Cheson, Bennett et al. 2003).

Die am häufigsten eingesetzten Zytostatika sind Cytosin-Arabinosid (ARA-C), Anthrazykline, Mitoxantron, Amsacrin (m-AMSA), 6-Thioguanin (6-TG), Etoposid (VP-16) und Fludarabin. Beim Ablauf der Chemotherapie unterscheidet man die Induktionstherapie, die in der Regel aus zwei Zyklen einer intensiven Kombinations-

chemotherapie besteht, von der Konsolidations- bzw. Postremissionstherapie. Die Induktionstherapie dient der deutlichen Reduktion der Tumorlast und damit dem Erreichen einer kompletten Remission. Ziel der Konsolidationstherapie ist es, ein Rezidiv dauerhaft zu verhindern. Eine Erhaltungstherapie erbringt gegenüber der intensiven Konsolidationstherapie keinen Überlebensvorteil (Miyawaki, Sakamaki et al. 2005). Aus diesem Grund wird sie nicht mehr durchgeführt. Ausnahmen sind die akute Promyelozytenleukämie und ältere Patienten, denen eine intensive Konsolidationstherapie nicht mehr zugemutet werden kann.

Eine Besonderheit in der Therapie stellt die Promyelozytenleukämie FAB M3 mit der Translokation t(15;17) dar. Durch die Gabe von all-trans-Retinsäure (ATRA), einem Vitamin A Metaboliten, oder Arsentrioxid (ATO) kann der Reifungsblock der Promyelozyten aufgehoben und eine Remission erreicht werden. Eine neu diagnostizierte akute Promyelozytenleukämie wird derzeit mit einer Kombination aus ATRA und Chemotherapie behandelt. Mit dieser Kombination werden Remissionsraten von 85-95% erreicht (Sanz, Montesinos et al. 2008). Die Behandlung mit ATRA alleine ist meist nicht erfolgreich, da es unter andauernder Therapie zu Resistenzen und Rezidiven kommt.

1.2.5.2 Blutstammzelltransplantation

Ein weiteres etabliertes Therapieverfahren zur Behandlung der AML ist die Stammzelltransplantation. Man unterscheidet hierbei die autologe, bei der spendereigene Stammzellen nach der Therapie retransfundiert werden, von der allogenen Transplantation, bei welcher der Patient die Stammzellen eines gesunden, gewebeverträglichen Spenders erhält. Besonders zugenommen hat die Stammzelltransplantation von nicht verwandten Spendern, die im Jahr 2005 bereits etwa 62% der allogenen Ersttransplantationen in Deutschland ausmachte (Ottinger 2006).

Die autologe Stammzelltransplantation scheint der konsolidierenden Therapie mit hochdosiertem ARA-C in erster Remission gleichwertig zu sein (Cassileth, Harrington et al. 1998; Farag, Ruppert et al. 2005). Lediglich infektiöse Komplikationen im Rahmen vorausgegangener Therapiezyklen könnten auf Grund einer deutlich verkürzten Neutropeniedauer für eine autologe Stammzelltransplantation sprechen (Ehninger, Link

et al. 2008). Besonders positive Ergebnisse konnten mit der autologen Blutstammzelltransplantation (BSZT) bei der akuten Promyelozytenleukämie (FAB M3) in zweiter kompletter Remission erreicht werden (de Botton, Fawaz et al. 2005). Auch bei anderen Entitäten ist eine autologe Transplantation in zweiter Remission mit guten Ergebnissen assoziiert. Jedoch sollte vor dieser mit Hilfe einer Rezidivtherapie eine erneute Remission angestrebt werden (Craddock, Tauro et al. 2005).

Bei der allogenen Transplantation ist neben dem zytoreduktiven Faktor der Konditionierung vor allem der Graft-versus-Leukämie-Effekt (GvL) ein wesentliches Therapieprinzip und trägt in erheblichem Maß zum Heilungserfolg bei. Durch diesen Effekt liegt die Rezidivwahrscheinlichkeit nach allogener Transplantation wesentlich niedriger als nach autologer Blutstammzelltransplantation (15% vs. 40%) (Ehninger, Link et al. 2008). Aus diesem Grund sollte bei Patienten unter 60 Jahren sofort nach Diagnosestellung ein Familienspender gesucht werden. Lässt sich ein kompatibler Spender finden, sollte in erster kompletter Remission, mit Ausnahme von Patienten mit prognostisch günstigem Karyotyp, eine allogene Stammzelltransplantation angestrebt werden (Classen, Diehl et al. 2004). Nachdem sich inzwischen die Ergebnisse der allogenen Blutstammzelltransplantation von nicht verwandten Spendern zunehmend den Ergebnissen der Transplantationen von verwandten Spendern annähern, wird bei Patienten mit Hochrisikozytogenetik auch in erster Remission eine BSZT von einem unverwandten Spender durchgeführt (Anasetti, Perkins et al. 2006). Auch bei der Rezidivtherapie nimmt die allogene Transplantation einen höheren Stellenwert ein als die autologe. So kann bei einer langsamen Proliferationskinetik des Rezidivs und einer schnellen Spenderidentifikation die allogene BSZT auch ohne Rezidivtherapie direkt durchgeführt werden. Zum Zeitpunkt des Konditionierungsbeginns sollten jedoch im Blut keine Blasten zirkulieren (Wong, Shahjahan et al. 2005).

1.2.5.3 Strahlentherapie

Ziel einer lokalen Strahlentherapie ist es, das Auftreten von Rezidiven in den Regionen zu verhindern, die entweder wegen eines großen initialen Tumolvolumens oder auch durch besondere anatomische Gegebenheiten nicht oder nicht ausreichend durch die Chemotherapie erreicht werden können und somit möglicherweise einen Ausgangspunkt für Rezidive darstellen (Ehninger, Link et al. 2008). Kinder im 1.

Lebensjahr sollten grundsätzlich keine ZNS-Bestrahlung erhalten. Bei manifestem initialem ZNS-Befall ("Meningeosis leukemica": >5 Zellen/mm³) und eindeutigen Blasten im Liquor ist nach Ansicht der meisten europäischen und amerikanischen Leukämietherapeuten bei allen Patienten (nach Erreichen des 1. Lebensjahres) auch eine ZNS-Bestrahlung notwendig (Hämatologie 05/2008).

Eine andere Form der Bestrahlung ist die Ganzkörperbestrahlung (Total Body irradiation, TBI). Sie ist wegen der relativ hohen Strahlenempfindlichkeit myeloischer und lymphatischer Zellen ein wichtiger Teil traditioneller Strahlen- und Chemotherapieprotokolle vor allogener und autologer Knochenmark- oder Blutstammzelltransplantation. Die Wirkmechanismen beinhalten die Vernichtung klonaler maligner Zellen, die myeloablative Therapie und im Fall einer allogenen Transplantation die immunablative Konditionierungstherapie (Bremer and Karstens 2002). In einer randomisierten Studie konnte gezeigt werden, dass die Konditionierung mit TBI bei Patienten mit AML einer TBI-losen Konditionierung überlegen war (Blaise, Maraninchi et al. 1992; Blaise, Maraninchi et al. 2001).

1.2.5.4 Neue Therapieverfahren

Das zunehmende Wissen über Ursachen und molekularebiologische Hintergründe der akuten myeloischen Leukämie führt in der Behandlung zur Entwicklung ständig neuer Therapieansätze. Dazu gehören Tyrosinkinaseinhibitoren, Angiogenesehemmer, die Hemmung RTK-aktivierter Signalwege, die Modulation der Multi Drug Resistance und die Apoptose Induktion. Darüber hinaus werden immuntherapeutische Verfahren wie die Zytokintherapie, die Antikörpertherapie, die allogene Donor-Leukozyten-Infusion, die Vakzinierung, die T-Zell-Therapie und die NK-Zell-Therapie bei der akuten myeloischen Leukämie eingesetzt.

1.2.6 Prognose

Trotz aggressiver Therapie und ständiger Neuentwicklungen in der Behandlung ist die Prognose von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie unbefriedigend. Die Langzeitüberlebensrate von Patienten unter 60 Jahren liegt nicht über 40%, bei Patienten über 60 Jahren nicht über 20% (Büchner, Berdel et al. 2009). Wie bei allen

Erkrankungen haben Patienten mit vielen Komorbiditäten und funktioneller Einschränkung eine schlechtere Prognose als Patienten mit geringerer Beeinträchtigung (Estey, Smith et al. 1989; Appelbaum, Gundacker et al. 2006; Estey 2007). Einer der wichtigsten patientenbezogenen Prognosefaktoren der AML ist das Erkrankungsalter. Da ältere Patienten auch innerhalb definierter biologischer Risikoklassen eine signifikant schlechtere Prognose als jüngere aufweisen, hängt dies nicht nur mit den zunehmenden Komorbiditäten zusammen (Büchner, Berdel et al. 2007).

Anhand spezieller, regelmäßig auftretender zytogenetischer Veränderungen ist es möglich, verschiedene Risikogruppen einzuteilen. Dabei geht zum Beispiel die Translokation t(8,21) mit einer verbesserten Prognose einher (Stone 2009). Ein besonders ungünstiger Verlauf der Erkrankung wird bei Patienten beobachtet, die drei oder mehr Chromosomenaberrationen aufweisen (Haferlach, Kern et al. 2004). Da sich diese Fälle gegenüber der zytostatischen Therapie meist als besonders refraktär erweisen, stellen sie ein großes therapeutisches Problem dar (Ehninger, Link et al. 2008). Als Folge der zunehmenden molekulargenetischen Diagnostik konnte die prognostische Bedeutung einiger weniger, aber häufig auftretender Mutationen unter der derzeit üblichen Therapie untersucht werden. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass Patienten mit Nachweis einer NPM1-Mutation, aber ohne Nachweis von FLT3-ITD-Mutationen (ca. bei 10-15% aller AML Patienten) im Gegensatz zur Gesamtpopulation eine deutlich bessere Prognose haben (Thiede, Koch et al. 2006).

1.3 Tumorimmunologie und Immuntherapie

Von einer idealen Krebstherapie erhofft man sich die selektive Zerstörung möglichst aller malignen Zellen bei gleichzeitiger Schonung des gesunden Gewebes. Dies wäre am besten durch die Aktivierung des körpereigenen Immunsystems gegen tumorspezifische Strukturen zu erreichen. In der Tat spielt das Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Entstehung maligner Tumoren, wobei es auch in der Lage ist, diese zu bekämpfen (Dunn, Bruce et al. 2002). Gestützt wird diese Hypothese durch Spontanremissionen bei Krebserkrankungen und die Rückbildung von Tumoren durch das Auftreten zytotoxischer T-Zell Infiltrate (Mackensen, Carcelain et al. 1994). Auch das erhöhte Malignomrisiko nach einer immunsuppressiven Therapie (Penn 2000) und nach immunsupprimierenden Erkrankungen (Boshoff and Weiss 2002) unterstreicht die

Bedeutung des Immunsystems bei der Entstehung verschiedener Malignome. Verschiedene Arbeitsgruppen haben die prognostische und prädiktive Bedeutung von Tumor-Infiltrierenden Lymphozyten beschrieben. Im Besonderen gilt dies für das Kolonkarzinom, aber auch für viele andere Tumorentitäten (Pages, Berger et al. 2005; Gao, Qiu et al. 2007; Tomsova, Melichar et al. 2008; Ogino, Nosho et al. 2009). Dabei geht das Vorhandensein von TIL in den meisten Studien mit einer besseren Prognose der Erkrankung einher (Zhang, Conejo-Garcia et al. 2003; Sato, Olson et al. 2005; Galon, Costes et al. 2006; Horne, Jack et al. 2011).

Seit Beginn des 21. Jahrhunderts spricht man von "Immunoediting", wenn es um das komplexe System der Tumor-Immunsystem-Auseinandersetzung geht. Dieser Prozess des Immunoediting wird in drei Phasen unterteilt: "elimination" (Elimination), "equilibrium" (Gleichgewicht) und "escape" (Entkommen) (Dunn, Old et al. 2004). Dabei bezeichnet "escape" die Phase, in welcher der Tumor der immunologischen Überwachung und Begrenzung entkommt und klinisch sichtbar wird (Nargosen 2007). Zu diesem Zeitpunkt kann das Immunsystem sogar einen wachstumsfördernden Einfluss auf Tumore ausüben (DeNardo, Johansson et al. 2008). Die Tumorimmunologie versucht, die immunologischen Zusammenhänge aufzuklären und die neu gewonnen Erkenntnisse direkt für die Entwicklung spezifischer Therapien oder neuer diagnostischer Verfahren zu nutzen.

1.3.1 Immuntherapeutische Ansätze bei der AML

Mit Ausnahme der allogenen Stammzelltransplantation spielen immuntherapeutische Behandlungsoptionen bei der AML weiterhin eine kleinere Rolle als bei vielen anderen malignen Erkrankungen. Dies liegt zum einen daran, dass auf Grund der auffälligen Wachstumskinetik der Progress der Leukämie häufig schneller verläuft als der Aufbau einer effektiven Immunabwehr und zum anderen die Immunogenität der myeloischen Leukämiezellen geringer ausfällt als die anderer Tumorentitäten (Ehninger, Link et al. 2008). In klinischen Studien werden derzeit verschiedene Ansätze auf ihre Wirksamkeit untersucht.

1.3.1.1 Allogene Donorleukozyteninfusionen und NK-Zell-Therapie

Durch die Übertragung von Spenderleukozyten kann bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML), die nach allogener Transplantation ein Rezidiv erleiden, in der überwiegenden Zahl der Fälle eine erneute Remission und in der Regel auch eine Heilung der Erkrankung erzielt werden (Kolb, Mittermuller et al. 1990; Ehninger, Link et al. 2008). Bei der AML ist der Erfolg sehr viel geringer und auf ein kleines Patientenkollektiv begrenzt (Kolb, Schattenberg et al. 1995; Porter, Roth et al. 1996; Collins, Shpilberg et al. 1997; Schmid, Labopin et al. 2007). Ein großes Problem stellt die hohe Inzidenz an schweren GvH-Erkrankungen nach Donorleukozyteninfusionen dar. Bei allogenen Lymphozyteninfusionen außerhalb einer Stammzelltransplantation werden die Spenderlymphozyten rasch abgestoßen und können so nur vorübergehend wirken (Ehninger, Link et al. 2008).

Natürliche Killerzellen unterliegen keiner MHC-Restriktion und sind in der Lage, andere Zellen abzutöten, ohne dafür zuvor sensibilisiert worden zu sein (Lanier, Phillips et al. 1986; Ritz, Schmidt et al. 1988; Trinchieri 1989). Sie spielen unter anderem eine wichtige Rolle bei der Zerstörung von Tumorzellen, der Resistenz gegen virale Infektionen und der Regulierung der Hämatopoese (Herberman and Ortaldo 1981; Trinchieri 1989). In Studien konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen auch einen Graft-versus-Leukämie Effekt besitzen (Oshimi, Oshimi et al. 1986; Lotzova, Savary et al. 1987; Fierro, Liao et al. 1988; Savary and Lotzova 1989). Durch die Behandlung mit haploidenten NK-Zellen konnte teilweise sogar eine komplette Remission bei Patienten mit fortgeschrittener AML erreicht werden (Miller, Soignier et al. 2005).

1.3.1.2 Spontane und Zytokin-induzierte Immunantworten

In den letzten Jahren wurden mehrere Studien publiziert, die eine spontane Auseinandersetzung des Immunsystems mit der AML belegen. So findet sich zum Beispiel bei etwa einem Drittel der an AML erkrankten Patienten eine humorale und eine zelluläre Immunantwort gegen das Proteinprodukt des Wilms-Tumorgens-1 (WT1), das bei der AML einen für die Proliferation der Blasten entscheidenden Transkriptionsfaktor darstellt (Gaiger, Carter et al. 2001; Elisseeva, Oka et al. 2002). Um diese spontane autologe Immunantwort oder den nach der Stammzelltransplantation gewünschten Graft-versus-Leukämie Effekt gegen die myeloischen Blasten zu

verstärken, werden in verschiedenen klinischen Studien Stoffe eingesetzt, die zu einer unspezifischen Immunstimulation führen. Meist handelt es sich dabei um rekombinante Zytokine. Umfangreiche klinische Erfahrungen hat man hauptsächlich mit den Zytokinen Interleukin 2 (IL-2) und Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor (GM-CSF) (Ehninger, Link et al. 2008). Während unter der rIL-2 Therapie kein Überlebensvorteil für die Patienten über 60 Jahre beobachtet werden konnte (Baer, George et al. 2008), ließ sich wiederholt zeigen, dass durch eine Kombination von GM-CSF und Chemotherapie eine Verbesserung der Remissionsrate und des rezidivfreien Überlebens erzielt werden kann (Thomas, Raffoux et al. 2007). Da jedoch auch ein Teil der leukämischen Blasten Rezeptoren für IL-2 und GM-CSF besitzen, ist die zytokininduzierte Blastenproliferation eine schwere potenzielle Nebenwirkung (Carron and Cawley 1989; Schmetzer, Gerhartz et al. 1999).

1.3.1.3 Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern

Die passive humorale Immuntherapie zeichnet sich durch die Verabreichung von exogenen Antikörpern aus (Beers and MSD Sharp & Dohme GmbH 2007). Monoklonale Antikörper gewinnen in der Krebstherapie auf Grund ihrer Eigenschaft auch körpereigene Strukturen zu erkennen immer mehr an Bedeutung und sind bei vielen Erkrankungen bereits fester Bestandteil des klinischen Alltags. Der Durchbruch in der therapeutischen Anwendung gelang mit der Herstellung chimärer Antikörper. Diese humanisierten Antikörpermoleküle ermöglichen eine nebenwirkungsarme Anwendung durch Reduktion allergischer Reaktionen und die Verhinderung der Bildung neutralisierender Antikörper. Unterschieden werden unkonjugierte monoklonale Antikörper, die ihre Wirkung über die Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität, die Aktivierung der Komplementkaskade sowie durch Apoptose entfalten, von konjugierten monoklonalen Antikörpern. Diese sind entweder an ein chemotherapeutisches Agens, an Immunotoxine oder an radioaktive Strahler mit kurzer Eindringtiefe gekoppelt und können so die Zielzellen eliminieren, ohne dabei gesundes Gewebe anzugreifen.

Seit 2000 ist der konjugierte monoklonale Antikörper Gemtuzumab in den USA für die Rezidivbehandlung der AML bei CD33-positiven Patienten über 60 Jahren zugelassen (Giles, Estey et al. 2003). Klinische Studien zeigten bei Patienten mit rezidivierter AML

eine Ansprechrate von etwa 30% sowie eine Rate kompletter Remissionen von etwa 15% (Larson, Sievers et al. 2005). In Europa wurde die Zulassung 2008 auch auf Grund der zum Teil erheblichen Nebenwirkungen abgelehnt (EMA 2008). Andere Antigene, die in klinischen Studien als Zielstrukturen für antikörper-basierende Therapien dienen, sind zum Beispiel CD45 und CD66 (Abutalib and Tallman 2006).

1.3.1.4 Tumorstimmimpfung

Das Ziel der Stimmimpfung ist die Induktion einer tumorantigen-spezifischen T-Zell-Antwort, die eine Kontrolle des malignen Zellklons erlaubt. Durch letal bestrahlte oder chemisch modifizierte Leukämieblasten lassen sich sowohl *in vivo* als auch *in vitro* T-Zellantworten induzieren. Allerdings konnte sich dieses Verfahren während der klinischen Erprobung nicht durchsetzen. Vielversprechender scheint die Nutzung spezifischer Antigene zur Immunisierung (Huber and Ackermann 2008). Potenzielle Antigene, die bei der AML für eine solche Stimmimpfung in Frage kommen, sind WT1, RHAMM, Proteinase-3, OFA-iLRP, hTERT, PRAME, Survivin und CD33. (Ehninger, Link et al. 2008). Verschiedene Epitope, die sich von diesen Antigenen ableiten, werden bereits in klinischen Studien zur Stimmimpfung eingesetzt (Greiner, Dohner et al. 2006). Sowohl für das WT1-Peptid (Mailander, Scheibenbogen et al. 2004; Keilholz, Letsch et al. 2009) als auch für PR1 (Muzaffar, Qazilbash. et al. 2004) und RHAMM-R3 (Greiner, Schmitt et al. 2008; Schmitt, Schmitt et al. 2008) konnte bei Stimmimpfungs-Studien eine antigenspezifische T-Zellinduktion und ein gewisses klinisches Ansprechen gezeigt werden.

Ein weiterer Ansatz ist die Stimmimpfung mittels dendritischer Zellen. Dendritische Zellen sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen mit der einmaligen Fähigkeit, native T-Zellen zu stimulieren (Lanzavecchia and Sallusto 2001; Palucka, Laupeze et al. 2005). Hierfür werden die dendritischen Zellen *ex vivo* mit dem Antigen beladen (Ehninger, Link et al. 2008) oder direkt aus leukämischen Blasten generiert (Cignetti, Bryant et al. 1999; Kohler, Plettig et al. 2000; Kufner, Fleischer et al. 2005; Li, Reinhardt et al. 2005; Reichardt and Brossart 2005) und anschließend dem Patienten injiziert. Klinische Studien haben die Durchführbarkeit des Ansatzes bei der AML und anderen hämatologischen Erkrankungen gezeigt (Galea-Lauri 2002; Li, Giannopoulos et

al. 2006; Berneman, Van de Velde et al. 2008; Schmitt, Casalegno-Garduno et al. 2009).

1.4 Tumorantigene

Tumorassoziierte Antigene (TAA) sind Tumorproteine, die als Zielstrukturen für das Immunsystems dienen. Sie können sich sowohl auf der Zellmembran als auch im Plasma oder im Zellkern befinden. Fast alle bisher identifizierten TAA werden auch in der Tasche der MHC-I Moleküle präsentiert und sind somit potentiell der zytotoxischen Antwort der CD8+ T-Zellen ausgesetzt (Van den Eynde and van der Bruggen 1997). Tumorassoziierte Antigene können in verschiedene Unterkategorien eingeteilt werden (De Smet, Lurquin et al. 1997; Wang and Rosenberg 1999; Thompson, Brinckerhoff et al. 2000; Renkvist, Castelli et al. 2001). Die Grenzen zwischen den einzelnen Gruppen sind jedoch fließend, und einzelne Antigene können verschiedenen Kategorien zugeordnet werden:

- Onkofetale Antigene
- Onkovirale Antigene
- Überexprimierte Antigene
- Cancer-Testis-Antigene
- Mutierte Antigene
- Posttranslationale modifizierte Antigene
- linienspezifische Antigene
- Differenzierungsantigene
- tumorassoziierte Autoantigene

Idealerweise wird ein Tumorantigen spezifisch und homogen in malignen Zellen gebildet und über MHC-Moleküle präsentiert. Zudem besitzt es eine hohe Immunogenität um eine breite CD4+ und CD8+ T-Zellantwort zu induzieren. Während des Zellzyklus sollte keine Herunterregulierung erfolgen. Die meisten detektierten tumorassoziierten Antigene sind jedoch nicht malignomspezifisch und werden auch in gesundem Gewebe exprimiert.

1.4.1 Tumorantigene bei der akuten myeloischen Leukämie

Im letzten Jahrzehnt wurden verschiedene Leukämie Assoziierte Antigene (LAA) bei Patienten mit AML identifiziert (Greiner, Bullinger et al. 2008). Für die Antigene BAGE (Boel, Wildmann et al. 1995), BCL-2 (Andersen, Svane et al. 2005), OFA-iLRP (Siegel, Wagner et al. 2003), FLT3-ITD (Graf, Heidel et al. 2007), G250 (Vissers, De Vries et al. 1999), hTERT (Vonderheide, Hahn et al. 1999), PRAME (Kessler, Beekman et al. 2001), Proteinase 3 (Molldrem, Lee et al. 1999; Molldrem, Lee et al. 2003), RHAMM (Greiner, Li et al. 2005), Survivin (Schmidt, Schag et al. 2003) und WT-1 (Ohminami, Yasukawa et al. 2000) konnte gezeigt werden, dass sie eine spezifische T-Zell Antwort auslösen können. Einige Epitope dieser LAA sind sogar imstande, spezifische zytotoxische T-Zellen zu induzieren und darüber die exprimierenden Zielzellen zu lysieren (Molldrem, Lee et al. 1999; Vissers, De Vries et al. 1999; Vonderheide, Hahn et al. 1999; Kessler, Beekman et al. 2001; Molldrem, Lee et al. 2003; Greiner, Li et al. 2005; Greiner, Schmitt et al. 2006).

1.4.2 Cancer-Testis-Antigene (CTA)

Mit Ausnahme von immunprivilegiertem Gewebe wie Hoden und Plazenta werden Cancer-Testis-Antigene nicht in gesundem Gewebe exprimiert, lassen sich jedoch in histologisch unterschiedlichen Malignomen nachweisen (Scanlan, Simpson et al. 2004). Einige dieser Antigene, wie zum Beispiel MAGEA1 und MAGEA3, werden auch in den Ovarien und im Trophoblasten gebildet (Old 2001). Die Expression in Malignomen unterliegt einer sehr großen Varianz (30-40%). Stark exprimiert werden CTA in Melanomen, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, hepatozellulären Karzinomen und Harnblasentumoren (Scanlan, Simpson et al. 2004). Für einen Teil der durch Cancer-Testis-Antigene kodierten Proteine konnte ihre Immunogenität und die Fähigkeit, sowohl humorale als auch zelluläre Immunantworten in Krebspatienten auszulösen, nachgewiesen werden (Simpson, Caballero et al. 2005). Eine weitere Gemeinsamkeit der CTA ist die häufige Kodierung auf dem X-Chromosom. Dies führt zu der Unterteilung in "CT-X" und "non-X CT" Genen (Simpson, Caballero et al. 2005). Etwa 10% der identifizierten Gene auf dem X-Chromosom sind CT-Gene (Ross, Grafham et al. 2005). Im Gegensatz zu den "non-X" CT gibt es von den "CT-X" Genen meist mehrere Kopien (Caballero and Chen 2009). Auf Grund der stark differenzierten

Expression in malignen Geweben sind CTAs eine potentiell wichtige Gruppe von Tumorantigenen im Hinblick auf eine gezielte Immuntherapie. Da die CTA-exprimierenden Zellen im Hoden, die Spermatogonien (Jungbluth, Busam et al. 2000; Old 2001), keine MHC-I Moleküle aufweisen, bleiben sie von der Immunantwort unbehelligt (Haas, D'Cruz et al. 1988).

1991 wurde das erste Cancer-Testis-Antigen MAGEA1 von Boon und seiner Arbeitsgruppe in einer Melanomzelllinie entdeckt (van der Bruggen, Traversari et al. 1991). Für ihre Suche benutzten sie eine sehr komplizierte und zeitaufwendige T-Zell basierende Klonierungsstrategie (van der Bruggen, Traversari et al. 1991). Nachdem 1995 die sogenannte SEREX (serological expression cloning) Technik eingeführt wurde, wuchs die Zahl der entdeckten Tumorantigene sehr schnell (Sahin, Tureci et al. 1995). Geprägt wurde der Name Cancer-Testis-Antigen jedoch erst 1997, nachdem festgestellt worden war, dass die einzelnen Gene bis auf ihr Expressionsprofil sehr wenig gemeinsam haben (Chen, Scanlan et al. 1997). Derzeit werden mehr als 200 CTAs in der Literatur beschrieben, die sich in über 100 Genfamilien organisieren (LICR 2009). Die unterschiedlichen Definitionen variieren jedoch sehr. Verschiedene in der Literatur beschriebene Kriterien sind die ausschließliche Expression in Spermatogonien und Malignomen (Scanlan, Gordon et al. 2002; Scanlan, Simpson et al. 2004), die überwiegende Expression in Hodengewebe (Zendman, Ruitter et al. 2003), ein mögliches zusätzliches Vorkommen in Plazenta und Ovarien sowie die epigenetische Regulation (Costa, Le Blanc et al. 2007) und die Zugehörigkeit zu einer Genfamilie und Lokalisation auf dem X-Chromosom (Kalejs and Erenpreisa 2005). Die selektive Expression im Hodengewebe konnte bei einigen als CTA beschriebenen Genen in späteren Versuchen nicht bestätigt werden (Scanlan, Simpson et al. 2004).

Um diese Vielfalt besser einzuschränken, wurden 153 CT-Gene auf ihr Expressionsmuster in verschiedenen Geweben untersucht. Aus dieser Untersuchung resultiert eine genauere Spezifizierung der CT-Gene und eine Einteilung in die drei Gruppen "testis-restricted", "testis/brain-selective" und "testis-selective". 39 der 153 Gene werden ausschließlich in erwachsenem Hodengewebe und in der Plazenta exprimiert ("testis-restricted"), 14 Gene lassen sich darüber hinaus auch in verschiedenen Regionen des Gehirns ("testis/brain-selective") und 85 der Gene in unterschiedlicher Ausprägung auch in histologisch verschiedenen, nicht-immunprivilegierten Geweben nachweisen

("testis-selective"). Da ein Großteil der CTAs, die ausschließlich in immunprivilegiertem Gewebe exprimiert werden, auf dem X-Chromosom liegen, spielen gerade im Hinblick auf therapeutische Interventionsmöglichkeiten CT-X Gene eine besondere Rolle (Hofmann, Caballero et al. 2008).

Beim Multiplen Myelom korreliert die Expression von MAGEA1, MAGEA3, MAGEA4 und MAGEC1 mit dem Grad und dem Risiko der Erkrankung (Dhodapkar, Osman et al. 2003; Condomines, Quittet et al. 2006; Atanackovic, Luetkens et al. 2009). Aber auch für andere Krebsarten konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte CTA-Expression mit einem schlechteren Outcome korreliert (Brasseur, Rimoldi et al. 1995; Yakirevich, Sabo et al. 2003; Gure, Chua et al. 2005; Kim, Reber et al. 2006; Velazquez, Jungbluth et al. 2007; Riener, Wild et al. 2009). In einigen Tumoren konnte auch die Koexpression mehrerer CTAs nachgewiesen werden (Bolli, Schultz-Thater et al. 2005).

Auf Proteinebene wird die Expression von Cancer-Testis-Antigenen mit Hilfe von monoklonalen beziehungsweise polyklonalen Antikörpern und immunhistochemischen Techniken untersucht. Dabei hat sich gezeigt, dass die meisten CT-Antigene im Hodengewebe in den Spermatogonien exprimiert werden. Darüber hinaus gelang der Nachweis jedoch auch in primären und sekundären Spermatozyten sowie reifen Spermien. In der Regel sind die Proteine im Nukleus lokalisiert, aber nicht selten kommen sie auch im Zytoplasma vor. In Tumoren hingegen ist die Expression auf Proteinebene nur für einige wenige CTAs untersucht worden. Für diese konnte jedoch gezeigt werden, dass die Protein-Expression mit der mRNA-Expression korreliert und die CT-Proteine oft sehr heterogen in den Tumoren verteilt sind (Caballero and Chen 2009).

Bei der Regulierung der CTA-Expression, besonders der CT-X Gene, spielen epigenetische Veränderungen eine wichtige Rolle. Mit Hilfe des demethylierenden Agens 5-Aza-2-Deoxycytidine und/oder Histon-Deacetylase Inhibitoren kann die Expression einiger CTAs induziert werden (De Smet, Lurquin et al. 1999; Sigalotti, Fratta et al. 2004; Oi, Natsume et al. 2009). Diese Induktion mit Decitabine, die in den meisten Tumor-Zelllinien gelingt, konnte in primären Fibroblasten nicht nachgewiesen werden (Weber, Salgaller et al. 1994).

Auch wenn die genaue biologische Funktion der meisten CT-X Antigene sowohl in gesundem Gewebe als auch in Malignomen nicht genauer bekannt ist, so konnte doch für einige wenige ein Zusammenhang zwischen ihrer Expression und der Tumorgenese hergestellt werden. Am besten untersucht zeigen sich dabei die Antigene der MAGE-Familie. So konnte z.B. ein Zusammenhang zwischen ihrer Expression und der Unterdrückung der p53-abhängigen Apoptose hergestellt werden (Yang, O'Herrin et al. 2007). Darüber hinaus zeigte sich in einer anderen Studie eine Resistenz gegen spezielle Chemotherapeutika bei Überexpression von MAGE- bzw. GAGE-Genen (Duan, Duan et al. 2003). Im Gegensatz zu den CT-X sind die non-X-CT Antigene auf den Autosomen lokalisiert, und die meisten ihrer Genprodukte spielen eine Rolle bei Spermatogenese und Befruchtung (Meuwissen, Meerts et al. 1997; Robert and Gagnon 1999; Ono, Kurashige et al. 2001; Hamer, Gell et al. 2006; Depa-Martynow, Kempisty et al. 2007; Zhao, Lee et al. 2008).

In mehreren klinischen Studien werden derzeit immuntherapeutische Ansätze getestet, bei denen CTAs als Zielstrukturen dienen. Auf Grund ihrer meist zytoplasmatischen Lokalisation scheinen sie eher für Impfungen als für Antikörpertherapien geeignet (Caballero and Chen 2009).

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenproben

Für diese Arbeit wurden 94 Proben von 64 an akuter myeloischer Leukämie erkrankten Patienten untersucht. Entnommen wurden die Proben im Rahmen diagnostischer Verlaufsuntersuchungen in der II. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die Proben wurden routinemäßig als Knochenmarkaspiration aus dem Beckenkamm entnommen oder mittels peripherer Blutentnahme gewonnen und ohne Zwischenlagerung direkt im Labor weiterverarbeitet, bevor sie bis zur weiteren Verwendung in Flüssigstickstoff eingelagert wurden. Von einigen wenigen Patienten lagen sowohl Knochenmarksproben als auch peripheres Blut zur Untersuchung vor. Einziges Einschlusskriterium der Patienten war die Diagnose einer akuten myeloischen Leukämie. Die schriftliche Einverständniserklärung der Patienten zur Entnahme und wissenschaftlichen Nutzung des entnommenen Materials sowie ein positives Votum der Ethikkommission der Hamburger Ärztekammer wurden eingeholt.

2.1.2 Proben der Kontrollgruppe

Bei der Kontrollgruppe handelte es sich um 10 gesunde Knochenmarksspender, bei denen Knochenmarksproben zur Diagnostik und zur allogenen Stammzelltransplantation im Stammzelltransplantationszentrum des Onkologischen Zentrums der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf entnommen wurden. Die schriftlichen Einverständniserklärungen der Spender zur Entnahme und wissenschaftlichen Nutzung der Proben liegen vor.

2.1.3 Studiendesign

In einer Vorarbeit unserer Arbeitsgruppe wurden zur Überprüfung einer generellen CT-Antigen Expression bei der akuten myeloischen Leukämie zunächst 10 AML-Zelllinien (GF-D8, HL-60, KASUMI-1, MUTZ-2, MUTZ-3, ML-2, MONO-MAC-1, MV4-11, SKM-1 und OCI-M1) auf die Expression von 21 CT-Genen (BAGE, KKLC1, LAGE,

LDHC, MAGEA1, MAGEA3, MAGEA8, MAGEC1, MAGEC2, NXF2, NY-ESO-1, PRAME, NY-SAR-35 ROPN1, SCP1, SLLP1, SPANXB, SPO11, SSX1, SSX2, SSX4) untersucht. Sieben dieser 21 Antigene ließen sich in unterschiedlich vielen Zelllinien nachweisen.

Bei dieser Studie handelt es sich um eine experimentelle Arbeit zum Nachweis der Expression von CT-Antigenen bei an AML erkrankten Patienten. Untersucht wurde die Expression der sieben CT-Antigene PRAME, NY-SAR-35, MAGEA3, ROPN1, SCP1, SLLP1 und SPO11 sowie dem Haushaltsgen GAPDH mittels RT-PCR in Knochenmarks- und peripheren Blutproben von an AML erkrankten Patienten. Bei positivem Ergebnis der PCR wurde diese wiederholt und nur bei erneuter Bestätigung als positiv gewertet. Bei Patienten, von denen mehrere Proben zur Untersuchung vorlagen, wurde die Probe mit maximaler CTA-Expression gewertet. Zur Kontrolle erfolgte die Gensequenzierung und der Abgleich mit einer Genomdatenbank.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellseparation

Die Separation der mononukleären Zellen aus den Proben erfolgte durch eine Dichtegradientenzentrifugierung in Ficoll Paque (Biochrom). Auf Grund ihrer höheren Dichte wandern Erythrozyten und neutrophile Granulozyten dabei durch eine Membran, während die peripheren mononukleären Zellen oberhalb dieser einen weißen Ring im Plasma bilden.

Zunächst wurde in ein 50 ml Probenröhrchen mit Filtereinheit 15ml Ficoll (Biocoll Separating Solution) gefüllt und eine Minute bei Raumtemperatur mit 1200 rpm zentrifugiert. Auch das Citrat Vollblut wurde in ein 50 ml Röhrchen gegeben und 1:1 mit DPBS (Gibco) gemischt. Dieses Blut-DPBS-Gemisch wurde nun auf die Filtereinheit gegeben und 15 Minuten ohne Bremse bei Raumtemperatur mit 2000 rpm zentrifugiert. Danach wurden etwa 15 ml Plasma abpipetiert, wobei darauf geachtet wurde, die weiße Bande auf alle Fälle in dem Röhrchen zu belassen. Der Rest wurde in ein neues 50 ml Röhrchen überführt und mit DPBS aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde

daraufrin zehn Minuten bei Raumtemperatur mit 1200 rpm zentrifugiert. Der verbliebene Überstand wurde verworfen. Das entstandene Pellet wurde in 5 ml Erylysepuffer (8,29g NH₄CL, 1g KHCO₃, 45,2mg EDTA, 11 Aqdest.) aufgenommen und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Röhrrhen bis 30 ml mit DPBS aufgefüllt und zehn Minuten bei Raumtemperatur mit 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das entstandene Pellet in DPBS aufgenommen.

Für die Zellzählung wurden nun 90 µl Tryprranblau und 10 µl Zellsuspension gemischt. Von dieser Mischung wurden 10 µl in eine Neubauer Zählkammer gegeben und die Zellen in den großen Quadranten gezählt. Die Zellzahl/ml berechnete sich wie folgt: Zellzahl eines Quadranten x 10⁴ x 10.

Das restliche Gemisch wurde nun erneut zehn Minuten bei Raumtemperatur mit 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur RNA-Analyse wurden die Zellen in 500 µl RLT-Puffer + Mercaptoethanol aufgenommen und bei -80°C eingefroren.

2.2.2 RNA-Isolation und Spektrometrie

Für die RNA Isolation wurden die Zellen zunächst durch den QUIAshredder (Quiagen, zwei Minuten bei 13.000 rpm) und die 1:1 Mischung (350 bzw 600 µl) mit 70%igem Ethanol zerstört und aus diesem Gemisch nun mittels RNAeasy Mini Kit (Qiagen) die RNA isoliert. Hierfür wurde die Probe (max. 700 µl) auf eine RNAeasy Säule gegeben und bei 10.000 rpm für 15 Sekunden zentrifugiert. Dabei blieb die RNA in der Membran der Säule hängen, und der Durchfluss wurde verworfen. Um das restliche Ethanol zu entfernen, erfolgten nun mehrere Waschrhritte mit verschiedenen Puffern. Zuerst wurden 700 µl RW1 Puffer auf die Säule gegeben und bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, und es erfolgte eine zweimalige Waschung mit 500 µl RPE Puffer, zuerst 15 Sekunden bei 10.000 rpm, danach 2 Minuten bei 10.000 rpm. Zum Abschluss wurde die Säule für eine Minute bei 13.000 rpm trocken zentrifugiert.

Um die RNA aus der Membran zu gewinnen, wurden 40 µl Ribonuklease (RNase) und Desoxynuklease (DNase) freies Wasser (Sigma) in die RNeasy Säule pipetiert und alles eine Minute bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die gewonnene RNA wurde in ein Eppendorf-Tube pipetiert und die Menge mittels Spektrometer bestimmt. Hierfür wurden 58 µl RNase- und DNase-freies Wasser mit 2 µl RNA gemischt. Die Nulleichung erfolgte mit 60 µl RNase- und DNase-freiem Wasser. Danach wurde die RNA in cDNA umgeschrieben oder bei -80° C eingefroren.

2.2.3 cDNA-Gewinnung

Durch ihre Einzelstrangstruktur und das häufige Vorkommen von RNAsen ist Ribonukleinsäure im Gegensatz zu doppelsträngiger DNA sehr viel instabiler und wird schneller enzymatisch abgebaut. Aus diesem Grund wurde die gewonnene RNA in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden 2 µg RNA in 9 µl RNase freiem Wasser, einem Ansatz aus

- 4 µl Mgcl2 (Promega),
- 2 µl 10x Puffer (Promega),
- 2 µl dNTPs (dATP, dGTP, dUTP, dCTP; Invitrogen),
- 0,5 µl RNAsin (Promega),
- 1,5µl AMV Reverse Transkriptase (Promega)
- und 1µl Random Primer

hinzugefügt. Das Reverse Transkriptions-Programm des Eppendorf Master Cycler gradient lief für 45 Minuten bei 42°C und zur Enzyminaktivierung für 5 Minuten bei 95°C. Die entstandene cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.2.4 Qualitative-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein in-vitro-Verfahren zur Amplifizierung von DNA. Dadurch wird die Erkennbarkeit von Nukleinsäuren einschließlich der Details ihrer Basensequenzen deutlich verbessert. Zur Untersuchung der CT-Antigenexpression wurden 4µl cDNA amplifiziert mit:

- 2µl MgCl₂ (Perkin-Elmer)
- 2,5µl 10xPuffer (Perkin-Elmer)
- 2µl dNTPs (dATP, dTTP, DCTP, dGTP; Invitrogen)
- 2µl Primer (Vorwärts- und Rückwärtsprimer; MWG-Biotech)
- 0,13 µl AmpliTaqGold Polymerase (Perkin-Elmer)
- 12,38 µl RNase, DNase freies Wasser (Sigma)

Dieser Ansatz wurde nun in 0,2 ml Kettentubes (Sarstedt) pipettiert und im Eppendorf Mastercycler gradient amplifiziert. Nach der Spaltung der DNA-Doppelstrangstruktur in Einzelstränge durch Denaturierung (erhitzen auf 95°C) lagern sich die spezifischen Primer am 3'-Ende des abzulesenden Abschnitts an und bilden somit das Startsignal für die Taq-Polymerase. Durch die Polymerasen wird die DNA-Sequenz abgelesen und die entsprechenden Nukleotide (dNTPs) angelagert. Dies dauert etwa eine Minute und benötigt die für die Primer notwendige Anlagerungstemperatur (Annealingtemperatur). Anschließend werden bei 72°C die angelagerten Basentriplets verknüpft. Diese Schritte werden 35 mal wiederholt, wobei bei jedem Zyklus die Zahl der DNA-Stränge verdoppelt wird.

Alle verwendeten cDNA Proben wurden mittels des Haushalts-Gens GAPDH auf ihre Qualität überprüft. Als Positivkontrolle diente cDNA von humanem Testisgewebe (Ambion) und als Negativkontrolle wurde RNase- und DNase-freies Wasser (Sigma) verwendet.

2.2.5 Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine molekularbiologische Methode zur größenabhängigen Auftrennung von RNA und DNA. Um die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle durch die Gelmatrix zu ziehen, wird ein elektrisches Feld verwendet. Je kleiner die Moleküle sind, desto schneller durchwandern sie das Gel. Somit erfolgt eine Auftrennung der Stränge nach ihrer Größe.

Für die Herstellung des Gels wurde zunächst ein 50 x TAE Puffer angesetzt. Hierfür wurden 121 g Tris base (Sigma-Aldrich) mit 28,55 ml Eisessig (Sigma-Aldrich) und 50

ml EDTA (Sigma-Aldrich) mittels Magnetrührer zu einer klaren Flüssigkeit verrührt. Diese wurde dann mit destilliertem Wasser (Th. Geyer) auf 500 ml aufgefüllt. Um den benötigten 1 x TAE Puffer zu erhalten, wurden nun 20 ml 50 x TAE Puffer mit 980 ml destilliertem Wasser (Th. Geyer) vermischt. Für das eigentliche Gel wurden 1,5 g Agarose (Lonza) mit 100 ml 1 x TAE Puffer vermischt. Um eine spätere Beurteilung der cDNA-Banden unter UV-Licht zu ermöglichen, wurden zusätzlich 8 µl Ethidiumbromid (Invitrogen) zu dem Gemisch hinzugegeben. Die Aushärtung des Gels dauerte etwa 30 Minuten.

Für die elektrophoretische Auftrennung der cDNA wurde das PCR-Amplifikat mit 1,5 µl Ladepuffer gemischt. Von diesem Gemisch wurden 20 µl in eine Agarose-Gel-Tasche pipetiert und bei 120 V Spannung und 250 mA Stromstärke in einer Gelelektrophorese-Kammer (Bio-Rad DNA-Subcell und Model 1000/500 power supply) separiert. Als Laufpuffer diente 1 x TAE-Puffer. Das bei der Gelherstellung verwendete Ethidiumbromid interkalierte dabei zwischen die Basen der DNA und ermöglichte durch Veränderung des Anregungsspektrums die Fluoreszenz unter einer UV-Lichtlampe. So war es möglich, die im Gel entstandenen DNA-Banden sichtbar zu machen und das Ergebnis mit einer CCD-Kamera (Apegene imager) zu fotografieren.

Sichtbare Banden mit der dem Antigen entsprechenden Produktlänge wurden bei negativer Wasserkontrolle als positiv gewertet. Bei jedem positiven Ergebnis wurde die PCR unter gleichen technischen Bedingungen wiederholt. Blieb sie positiv, wurde sie als solche gewertet. Bei negativer zweiter PCR wurde das negative Ergebnis angenommen. Keine sichtbare Bande bedeutete ein negatives Ergebnis. Als Negativkontrolle diente eine mit RNase-freiem Wasser (Sigma-Aldrich) durchgeführte PCR. Die Positivkontrolle erfolgte mit von Human-Testis-RNA (Ambion) abstammender cDNA.

2.2.6 Sequenzierung

Bei jeweils einer positiven Probe pro CTA erfolgte zur Überprüfung des PCR-Ergebnisses die Kontrolle mittels Sequenzierung. Hierfür wurde das unter UV-Licht fluoreszierende PCR-Produkt aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des Qiaquick GelExtraction Kit (Quiagen) aufgereinigt. Zur Herstellung des

Markierungsansatzes wurde das kommerziell erhältliche BigDyeKit V.1.1 (Applied Biosystems) verwendet. In diesem sind ein 2,5%-Puffer, dNTP, BigDye, Taq sowie Vorwärts- und Rückwärtsprimer enthalten. Dieser Mix wurde mit 6 µl des aufgereinigten PCR-Produkts im Mastercycler gradient (Eppendorf) amplifiziert und das Ergebnis mittels 2 µl Natrium-Acetat und 60 µl 100%igem-Ethanol (J.T. Baker) ausgefällt. Nach der Zentrifugation (Biofuge 13R, Heraeus Sepatech) für 30 Minuten bei 13.000 rpm wurde der Überstand abpipettiert und 70%igem Ethanol zugefügt. Mittels weiterer Zentrifugation wurde das entstandene Produkt in der Speedvac (Hetovac, Intermed CT60 e) getrocknet und im ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) auf Glaskapillaren aufgetragen. Die entstandenen Kettenabbruchprodukte wurden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt und mit Hilfe eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt. Das dabei entstandene Chromatogramm gab direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges wieder.

2.2.7 Statistik und Darstellung

Die statistischen Berechnungen erfolgten in dieser Arbeit mit der Software SPSS statistics 17. Die Korrelation zwischen Antigenexpression und klinischen Parametern wurde mit Hilfe der Pearson-Korrelation überprüft. Der Logrank-Test diente dem Vergleich unterschiedlicher Überlebensraten in den verschiedenen Stichproben. Die graphische Darstellung der Überlebenszeitanalysen erfolgte mittels Kaplan-Meier-Kurven mit SPSS 17. Alle weiteren Graphiken wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2008 für Macintosh erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Eigenschaften des Patientenkollektivs und der Proben

Wie in Tabelle 3 des Anhangs zu sehen, zeigte sich bei Betrachtung aller Patienten ein im Median 59 Jahre altes Kollektiv, in dem sich mehr Männer als Frauen befanden. Fast ein Drittel der Patienten war an einer akuten myelomonozytären Leukämie (FAB M4) erkrankt. Außerdem im Patientenkollektiv häufig vertretene FAB Klassifikationen waren die akute myeloische Leukämie mit Ausreifung (FAB M2) sowie die akute myeloische Leukämie ohne Ausreifung (FAB M1). Die genetische Risikoeinteilung erfolgte an Hand der Karyotypen in 3 Gruppen, wobei die Translokationen t(15;17) und t(8;21) sowie die Inversion 16 mit einem verbesserten 5-Jahres Überleben einhergehen und somit der "good risk"-Gruppe zugeteilt wurden. Zur "poor risk"-Gruppe wurden Patienten mit Deletionen auf Chromosom 7 sowie 5q oder solche mit mehr als drei chromosomalen Abnormalitäten gerechnet, da diese als Risikofaktoren für einen schwereren Verlauf der Erkrankung gelten. Aus dem für diese Arbeit untersuchten Kollektiv wurde der größte Teil der Patienten der "intermediate risk"- Gruppe zugeordnet. Hierzu zählen Erkrankte mit normalem Karyotyp sowie alle weiteren pathologischen Veränderungen (Stone 2009). Mehr als die Hälfte der Patienten erhielt zum Zeitpunkt der Probenentnahme noch keine Chemotherapie.

Der größere Teil der untersuchten Proben waren Knochenmarkspunktate, wobei die peripher entnommenen Blutproben mit einem Median von 56% im Durchschnitt eine höhere Blasteninfiltration zeigten (siehe Tabelle 4). Von 14 Patienten wurde sowohl das Knochenmark als auch peripheres Blut auf die Expression von Cancer-Testis-Antigenen untersucht.

3.2 Expression von CT-Antigenen

Untersucht wurde die Expression von den 7 CT-Antigenen PRAME (siehe Abb. 1B), NY-SAR-35 (siehe Abb. 1C), SLLP1 (siehe Abb. 1C), SCP1 (siehe Abb. 1C), ROPN1 (siehe Abb. 1C), SPO11 und MAGEA3 sowie dem Haushaltsgen GAPDH (siehe Abb. 1A) mittels RT-PCR in 94 Knochenmark- und peripheren Blutproben von 64 an AML erkrankten Patienten.

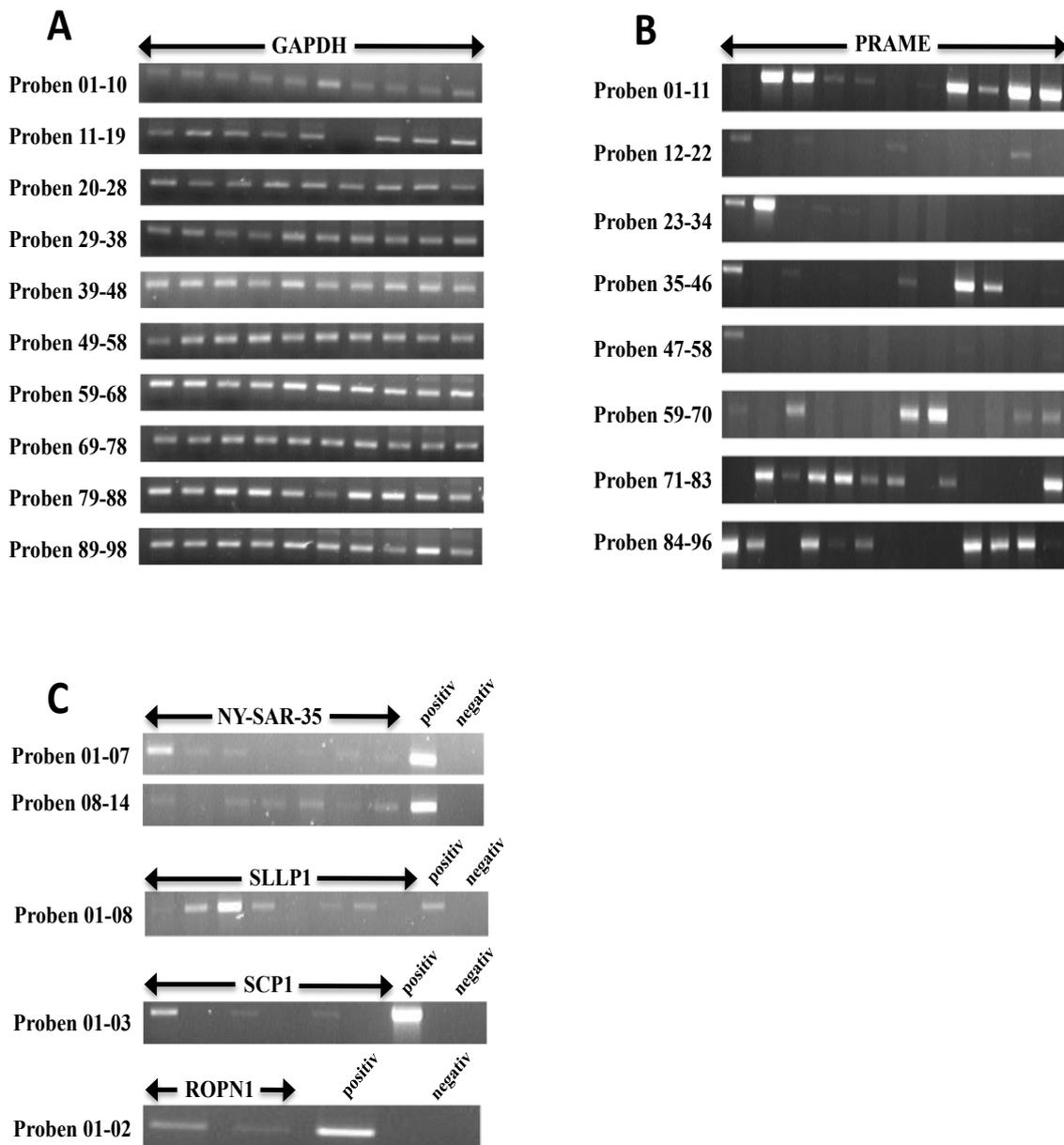


Abbildung 1: A: Ergebnisse der RT-PCR des Haushaltsgens GAPDH zur Kontrolle der Probenqualität B: Ergebnisse der RT-PCR des CT-Antigens PRAME C: Ergebnisse der Kontroll-RT-PCR der CT-Antigene NY-SAR-35, SLLP1, SCP1 und ROPN1

Bei mehr als der Hälfte der Patienten ließ sich die Expression von mindestens einem der untersuchten CT-Antigene nachweisen, wobei dies in peripheren Blutproben ohne signifikanten Unterschied ($p=0,192$) etwas häufiger gelang als in Knochenmarksproben (siehe Abb. 2). Die maximal exprimierte Anzahl von drei Cancer-Testis-Antigenen in ein und derselben Probe zeigte sich nur bei sehr wenigen Patienten.

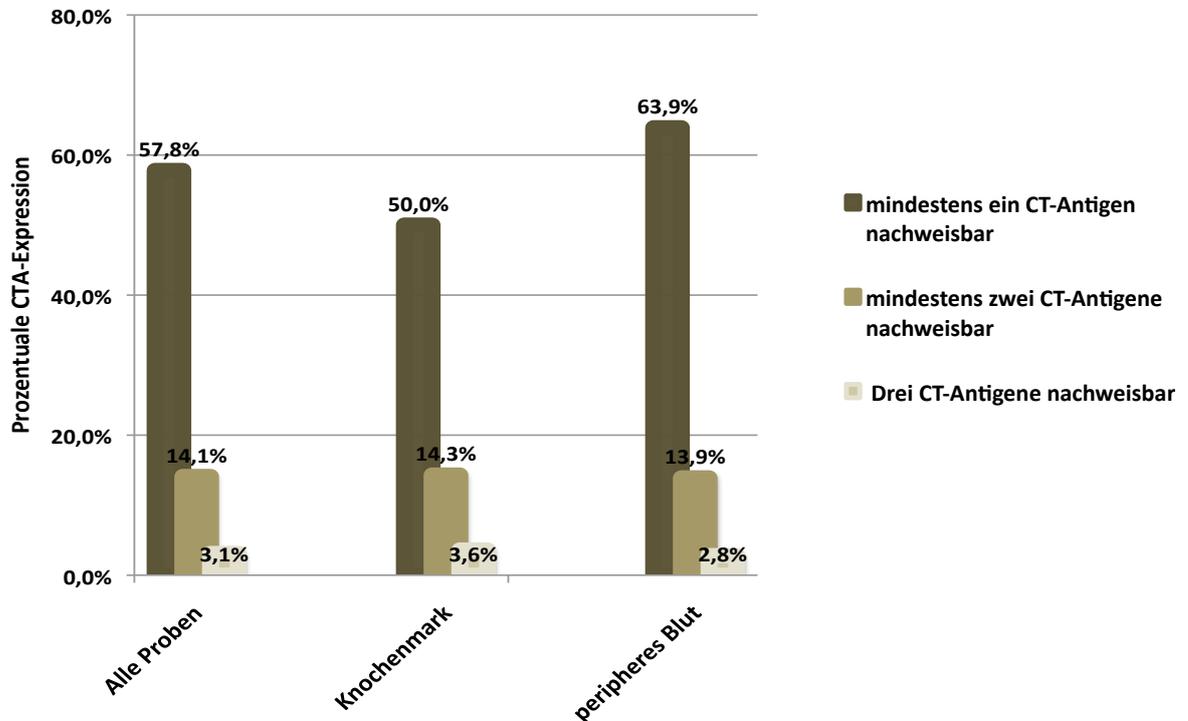


Abbildung 2: Graphische Darstellung der Anzahl der exprimierten CT-Antigene bei allen Patienten (N=64) bzw. im Vergleich zwischen Knochenmark- (N=28) und peripheren Blutproben (N=36).

Während MAGEA3 und SPO11 in keiner der untersuchten Proben exprimiert wurden, ließen sich die CT-Antigene ROPN1 und SCP1 bei einer kleinen Minderheit der Patienten auf mRNA-Basis nachweisen. SLLP1 zeigte sich bei 5 und NY-SAR-35 immerhin bei 8 der AML Patienten. Mit Abstand am häufigsten exprimiert wurde das CT-Antigen PRAME, das sich bei der Hälfte der untersuchten Patienten nachweisen ließ (siehe Abb. 3).

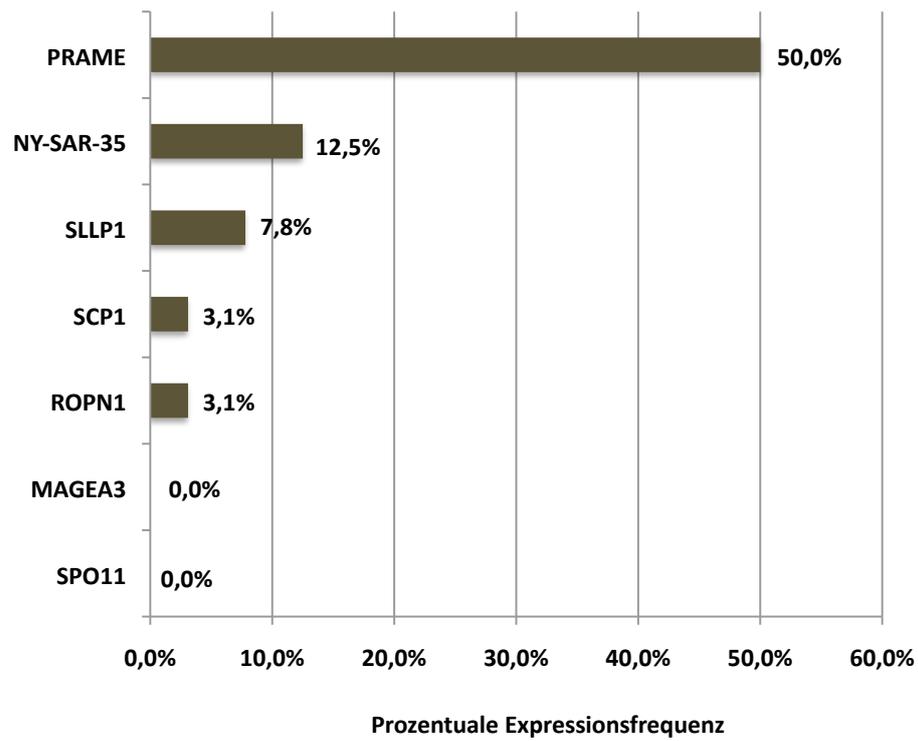


Abbildung 3: Graphische Darstellung der prozentualen Expression der einzelnen CT-Antigene bei 64 an AML erkrankten Patienten.

3.3 Korrelation der CTA-Expression mit klinischen Parametern

Um zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen der CTA-Expression und spezifischen klinischen Parametern besteht, wurden an Hand von Alter, Geschlecht, Blastenkonzentration, FAB-Klassifikation, Vortherapie und dem zytogenetischen Risikoprofil verschiedene Patientengruppen gebildet.

3.3.1 Korrelation von Geschlecht und CTA-Expression

Während sich bei knapp der Hälfte aller untersuchten Männer die Expression mindestens eines Antigens nachweisen ließ, exprimierten über zwei Drittel der Frauen des Kollektivs Cancer-Testis-Antigene. Bei Betrachtung der einzelnen untersuchten Antigene zeigte sich diese Expressionsdominanz beim weiblichen Geschlecht für alle untersuchten CTAs (siehe Abb. 4). Eine signifikante Korrelation zwischen dem Geschlecht und der CT-Antigenexpression bestand nach Pearson allerdings nicht ($p=0,103$).

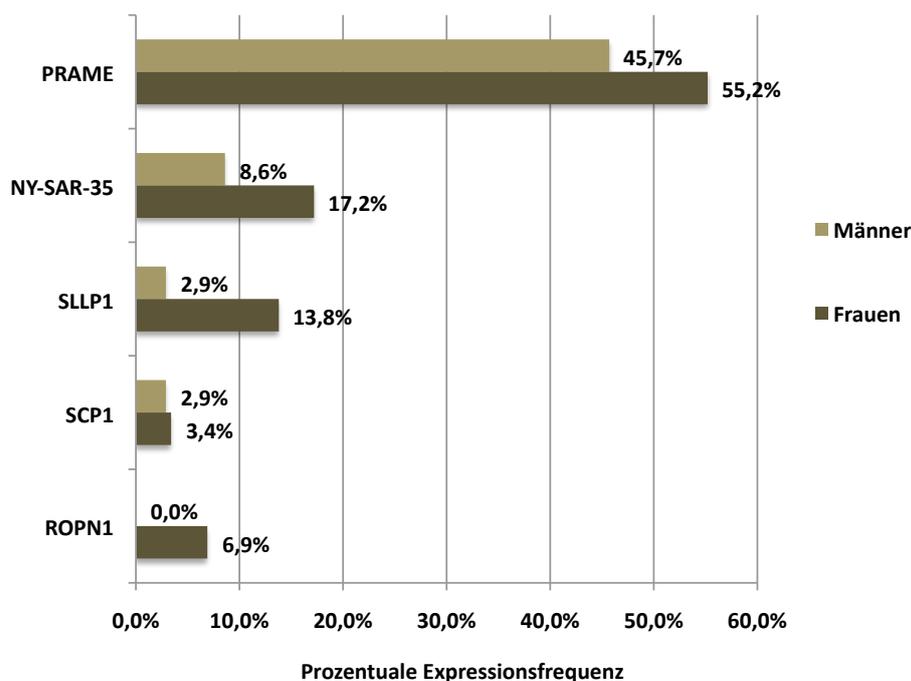


Abbildung 4: Graphische Darstellung der prozentualen CTA-Expression im Vergleich zwischen Männern (N=35) und Frauen (N=29).

3.3.2 Korrelation von Patientenalter und CTA-Expression

Die akute myeloische Leukämie ist typischerweise eine Erkrankung des älteren Menschen. Um festzustellen, ob es einen Einfluss des Erkrankungsalters auf die Expressionsfrequenz gibt, wurde das Patientenkollektiv für die Untersuchung in zwei Altersgruppen aufgeteilt. Hierbei zeigten Patienten über 55 Jahre eine etwas häufigere Expression der Antigene als die jüngere Vergleichsgruppe (siehe Abb. 5). Ein signifikanter Unterschied konnte allerdings nicht festgestellt werden ($p=0,272$). Auch Patienten, bei denen sich mehr als ein Antigen nachweisen ließ, zeigten kein erhöhtes Durchschnittsalter (Median 55,8 Jahre, Range: 31,6 - 72,9 Jahre).

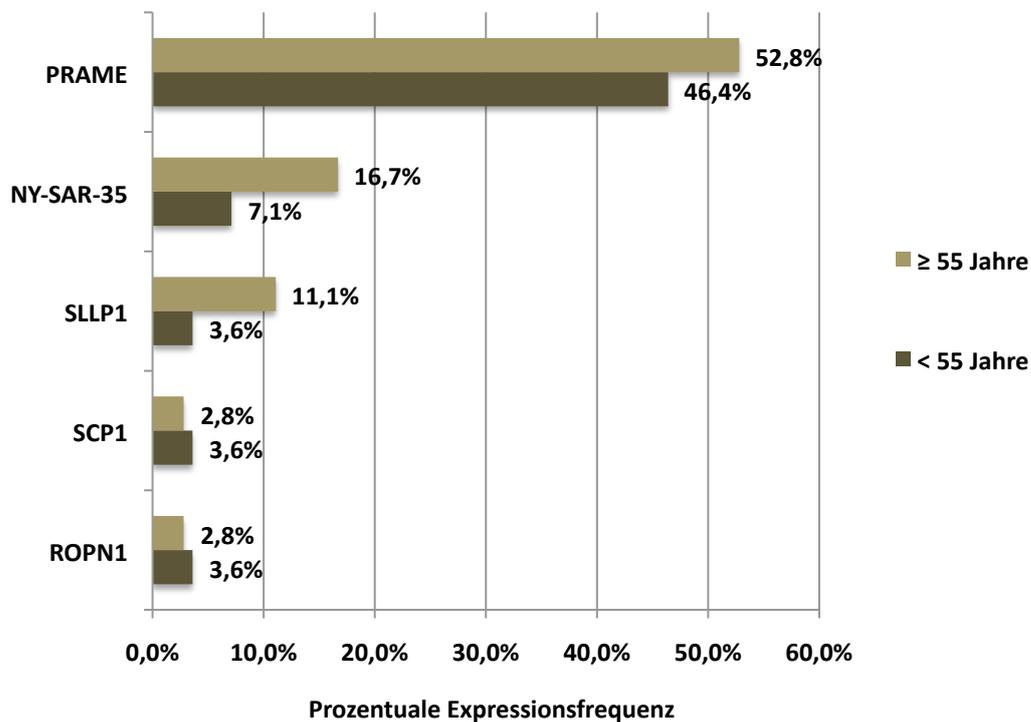


Abbildung 5: Graphische Darstellung der prozentualen CTA-Expression bei Patienten über (N=36) und unter (N=28) 55 Jahren.

3.3.3 Korrelation von Blastenkonzentration und CTA-Expression

Die prozentuale Blasteninfiltration des Knochenmarks ist bei der AML sowohl ein wichtiges diagnostisches als auch prognostisches Kriterium. Eine signifikante Korrelation der prozentualen Blastenkonzentration und der CTA-Expression konnte bei dem für diese Arbeit untersuchten Patientenkollektiv jedoch nicht festgestellt werden ($p=0,450$). Allerdings zeigte sich eine deutliche Häufung der Expression des CT-Antigens PRAME bei Patienten mit einem Blasteninfiltrationsgrad von über 20% (siehe Abb. 6). Bei Proben, in denen sich drei Antigene nachweisen ließen, lag der Blastenanteil sogar über 60%.

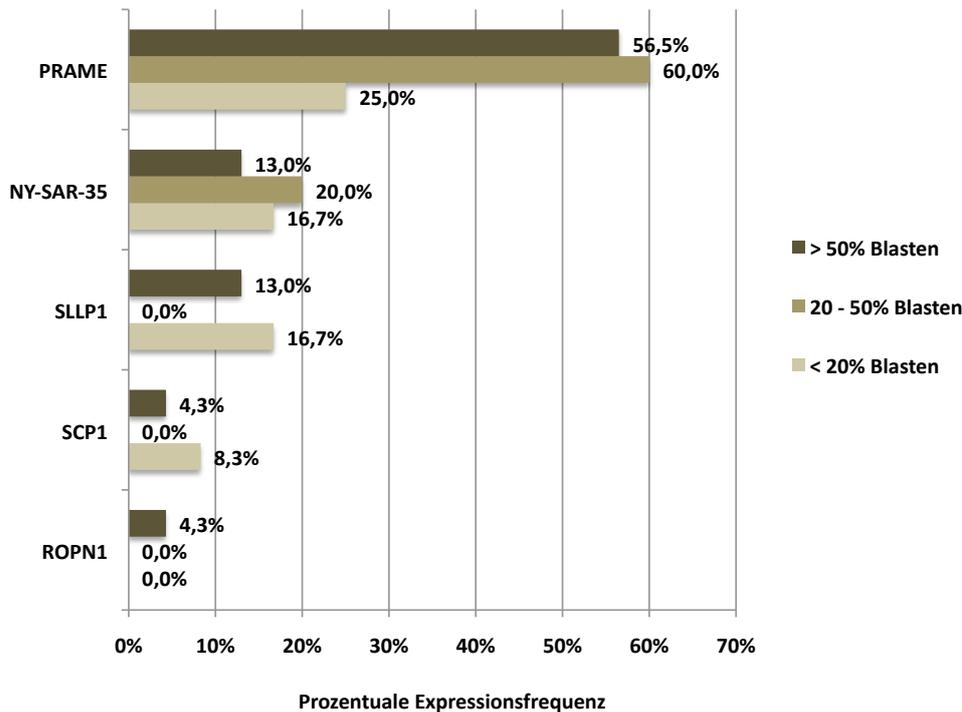


Abbildung 6: Graphische Darstellung der CTA-Expression bei Patienten mit einer Blasteninfiltration von über 50% (N=23), von 20-50% (N=10) und von unter 20% (N=12).

3.3.4 Korrelation von FAB-Klassifikation und CTA-Expression

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Klassifikation der akuten myeloischen Leukämie an Hand der FAB-Klassifikation. In dem untersuchten Kollektiv befanden sich mit Abstand am häufigsten Patienten mit einer AML FAB M4, M2 oder M1. Vergleich man diese in ihrer CTA-Expressionsfrequenz, ließ sich mit 78,6% am häufigsten bei Patienten mit einer FAB M2 mindestens eins der untersuchten Antigene nachweisen (FAB M4 55,6%, FAB M1 45,5%). Auch bei Betrachtung der einzelnen Antigene fiel eine Häufung der Expression bei der akuten myeloischen Leukämie mit Ausreifung (FAB M2) auf (siehe Abb. 7). Eine signifikante Korrelation zwischen FAB-Klassifikation und CTA-Expression zeigte sich allerdings nicht ($p=0,234$).

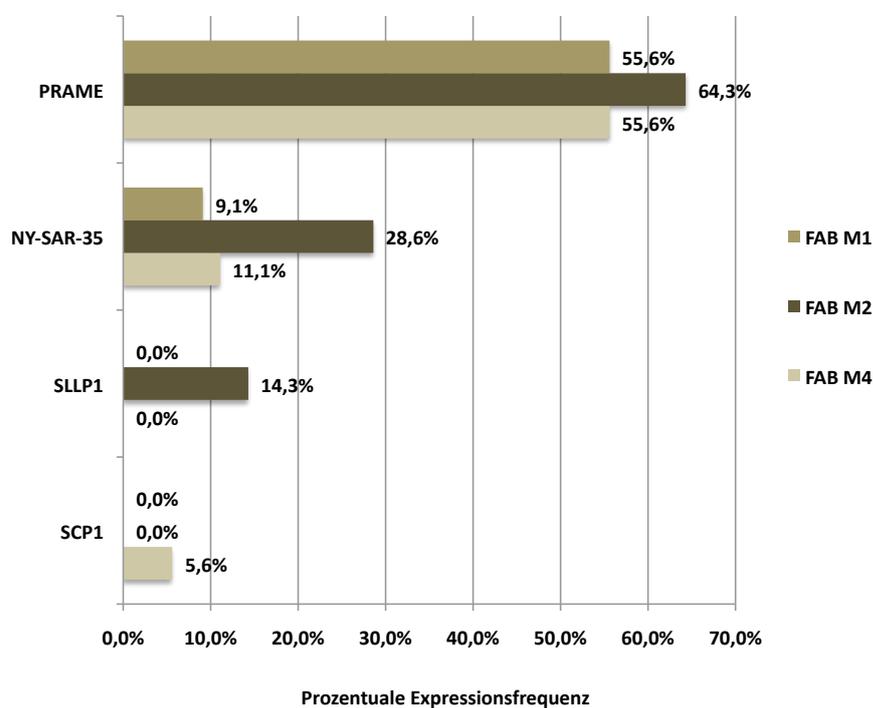


Abbildung 7: Graphische Darstellung der CTA-Expression in Abhängigkeit von den FAB-Klassifikationen FAB M1 (N=11), FAB M2 (N=14) und FAB M4 (N=18).

3.3.5 Korrelation von CTA-Expression und Vortherapie

Der Großteil der Patienten wurde zum Zeitpunkt der Probeentnahme noch nicht therapiert. Nur etwa ein Drittel erhielt bereits eine konventionelle Chemotherapie. In Art und Anzahl der exprimierten CT-Antigene unterschieden sich die behandelten von den unbehandelten Patienten nur marginal (siehe Abb. 8). Eine signifikante Korrelation bestand nicht ($p=0,836$). Allerdings hatten beide Patienten, bei denen die maximale Anzahl von drei CT-Antigenen nachgewiesen wurde, bereits eine Chemotherapie erhalten, bevor die Probe entnommen wurde.

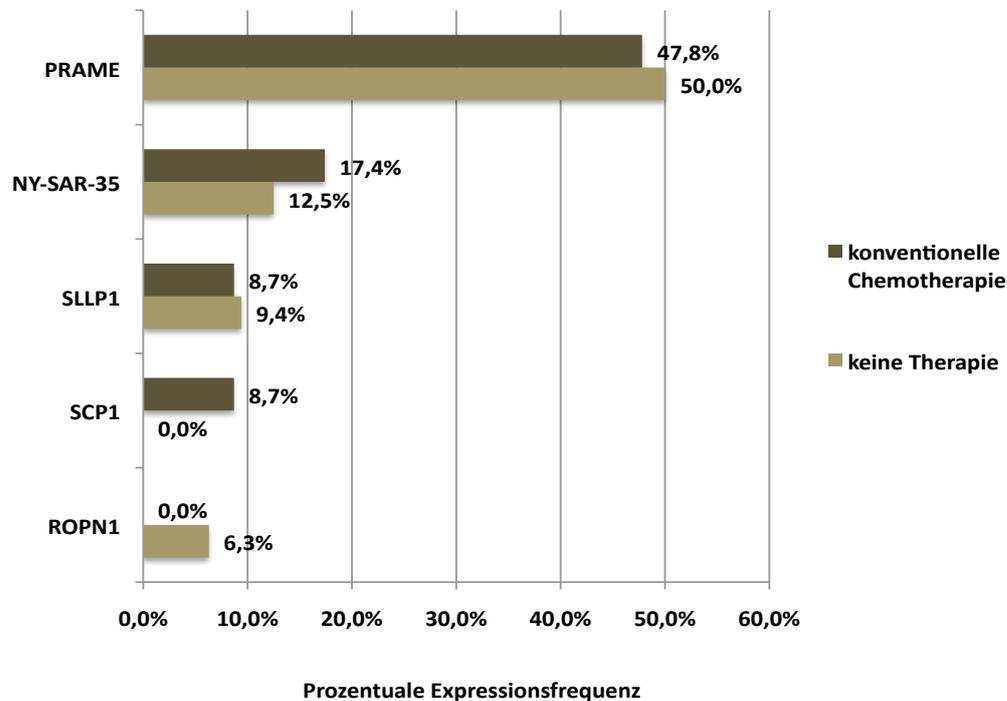


Abbildung 8: Graphische Darstellung der CTA-Expression bei Patienten mit (N=23) und ohne (N=32) Chemotherapie vor Probeentnahme.

3.3.6 Korrelation von CTA-Expression und zytogenetischem Risikoprofil

Zytogenetische Veränderungen spielen sowohl eine sehr wichtige Rolle bei der prognostischen Einschätzung der AML als auch bei ihrer Klassifikation. In dem untersuchten Patientenkollektiv exprimierten Erkrankte der "good risk -" Risikogruppe deutlich häufiger CT-Antigene als Patienten, die der "Intermediate risk -" oder der "poor risk-" Gruppe zugeordnet worden waren (siehe Tabelle 5) . Eine signifikante Korrelation zwischen dem zytogenetischen Risikoprofil und der Expression mindestens eines CT-Antigens bestand jedoch nicht ($p=0,220$). Allerdings fällt auch bei Betrachtung der einzelnen untersuchten Antigene eine Häufung in der "good risk -" Gruppe auf (siehe Abb. 9).

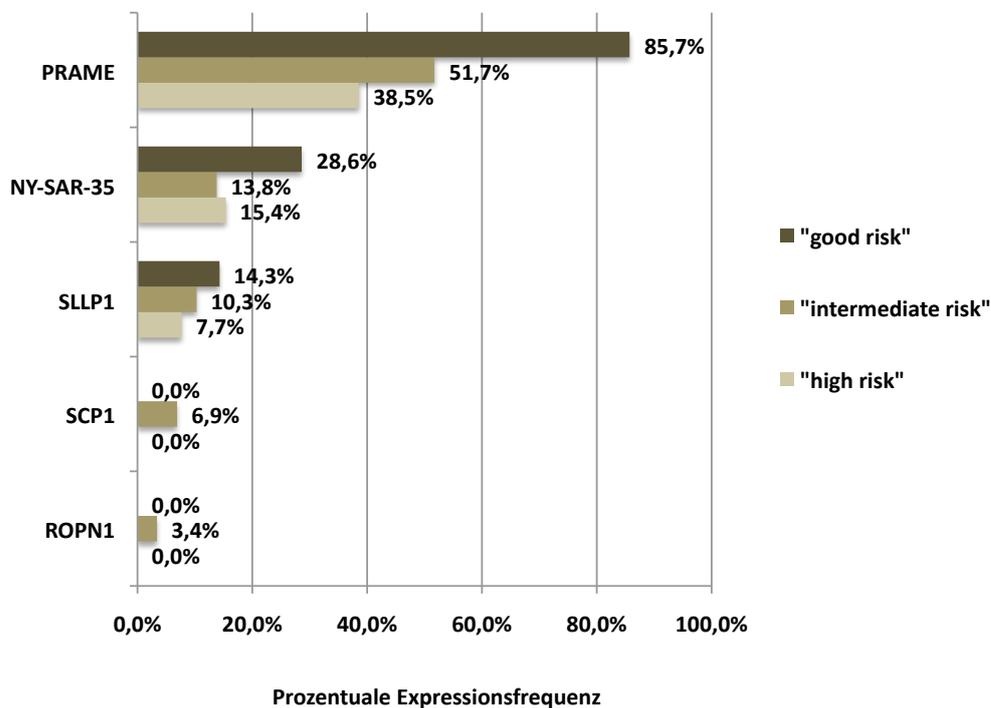


Abbildung 9: Graphische Darstellung der CTA-Expression bei unterschiedlichen zytogenetischen Risikoprofilen: "good risk" (N=7), "intermediate risk" (N= 29), "poor risk" (N=13).

3.4 Einfluss der CTA-Expression auf das Gesamtüberleben

In dem folgenden Kapitel wird ein möglicher Einfluss der CTA-Expression auf das Gesamtüberleben untersucht. 39 der 62 Patienten, von denen Überlebensdaten zur Verfügung standen, waren zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits verstorben. Der Untersuchungszeitraum betrug fünf Jahre ab der Erstdiagnose, wobei die mediane Überlebenszeit bei ca. zwei Jahren lag. Mit Hilfe von Kaplan Meier Kurven erfolgt die graphische Darstellung der Überlebenszeitanalysen in den Abbildungen 10 bis 14. Eine mögliche Korrelation wurde mittels Logrank-Test überprüft.

Die Expression aller CT-Antigene bis auf SLLP1 gingen mit einer Verschlechterung des geschätzten medianen Überlebens einher. Ein signifikanter Unterschied bestand allerdings nur bei Patienten, die das Antigen SCP1 exprimierten ($p < 0.004$).

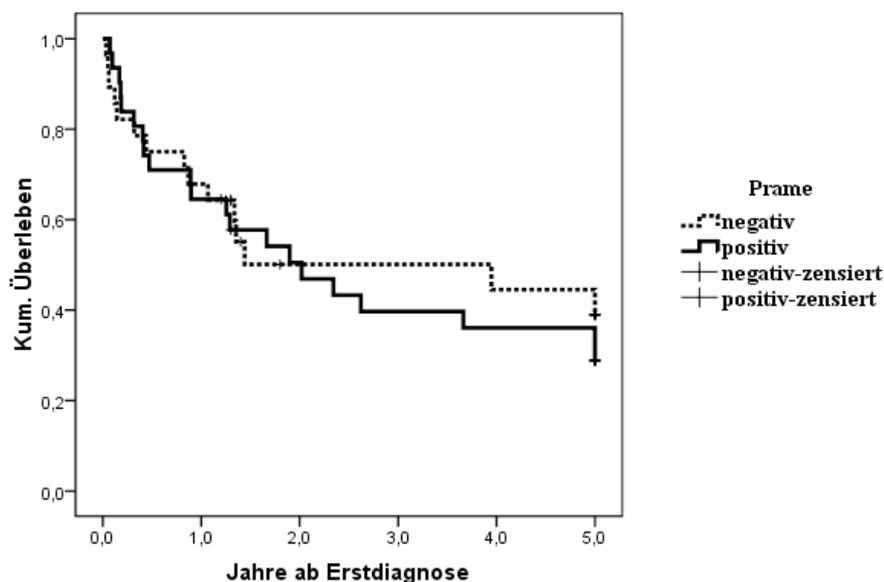


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Überlebenszeit bei PRAME-negativen (N=28) bzw. PRAME-positiven (N=31) Patienten ($p=0,651$; geschätztes medianes Überleben: 3,9 zu 2,0 Jahren).

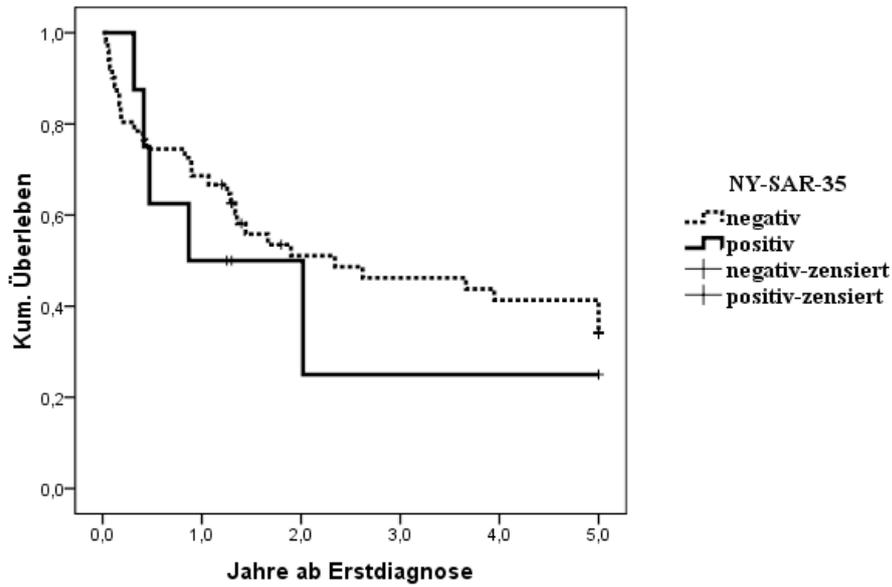


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Überlebenszeit bei NY-SAR-35-negativen (N=51) bzw. NY-SAR-35-positiven (N=8) Patienten ($p=0,54$; geschätztes medianes Überleben: 2,3 zu 0,9 Jahren).

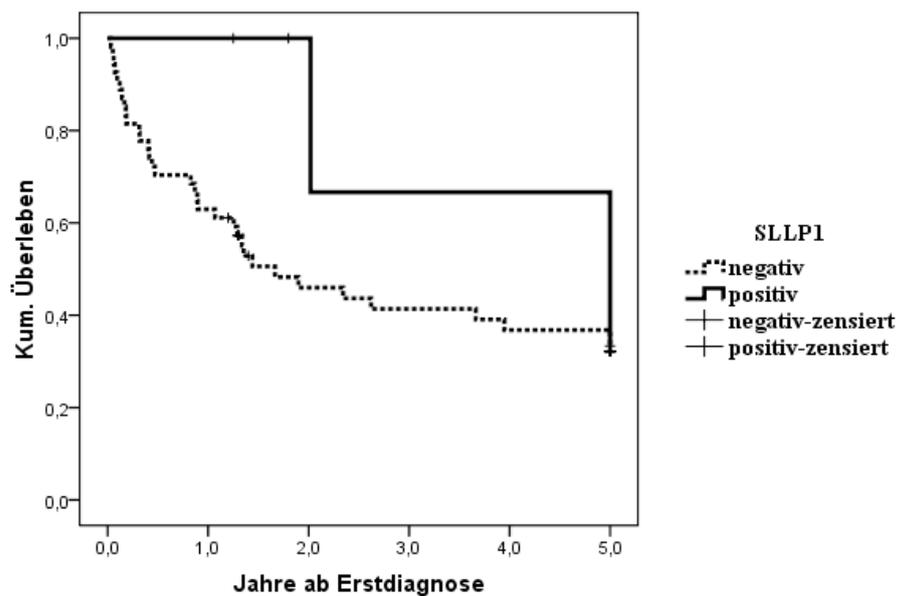


Abbildung 12: Graphische Darstellung der Überlebenszeit bei SLLP1-negativen (N=54) bzw. SLLP1-positiven (N=5) Patienten ($p=0,29$; geschätztes medianes Überleben: 1,7 zu 5 Jahren).

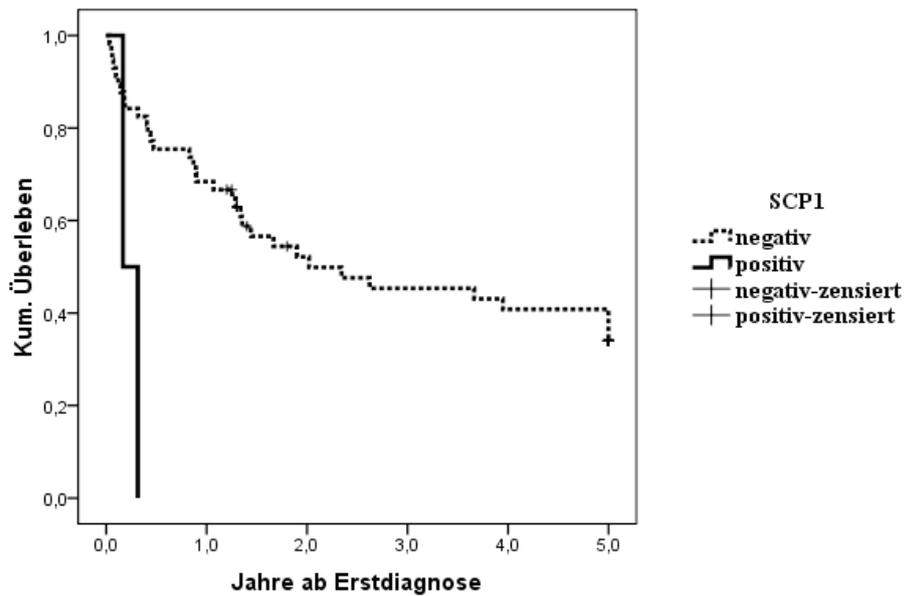


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Überlebenszeit bei SCP1-negativen (N=57) bzw. SCP1-positiven (N=2) Patienten ($p=0,004$; geschätztes medianes Überleben: 2,0 zu 0,2 Jahren).

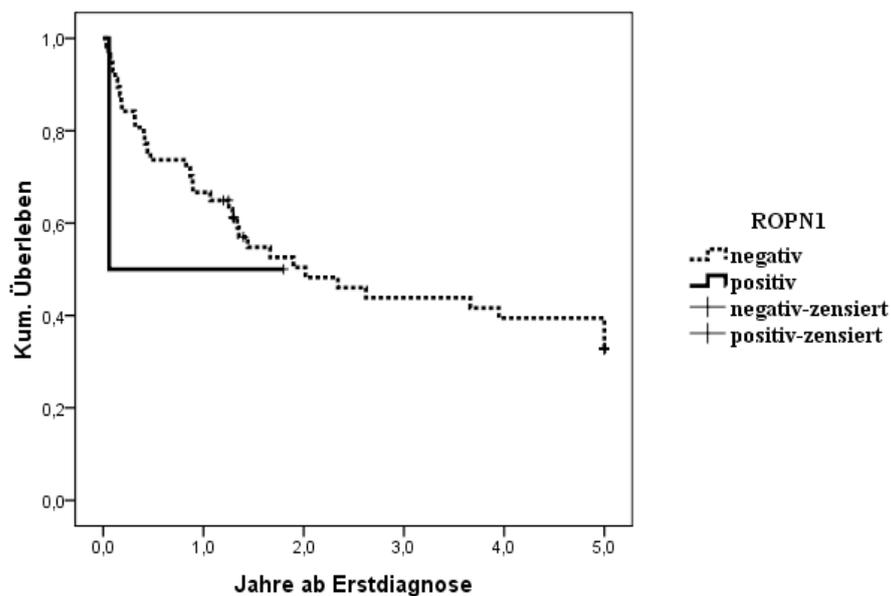


Abbildung 14: Graphische Darstellung der Überlebenszeit bei ROPN1-negativen (N=57) bzw. ROPN1-positiven (N=2) Patienten ($p=0,7$; geschätztes medianes Überleben: 2,0 zu 0,6 Jahren).

3.5 Einfluss der Expression von PRAME auf das Gesamtüberleben innerhalb der zytogenetischen Risikogruppen

Im folgenden Kapitel wird der Einfluss der Expression des Antigens PRAME auf die Überlebenszeit der einzelnen zytogenetischen Risikogruppen untersucht und in Abb. 16 bis 18 mittels Kaplan Meier Kurven dargestellt. Wie in Abbildung 15 gut zu erkennen ist, ging auch in dem für diese Arbeit untersuchten Patientenkollektiv die Zugehörigkeit zur "poor risk-" Risikogruppe mit einer verkürzten Überlebenszeit einher. Vor allem in der "intermediate risk-", aber auch in der "high risk-" Gruppe zeigten Patienten, bei denen sich das CT-Antigen PRAME nachweisen ließ, eine Verschlechterung des geschätzten medianen Überlebens.

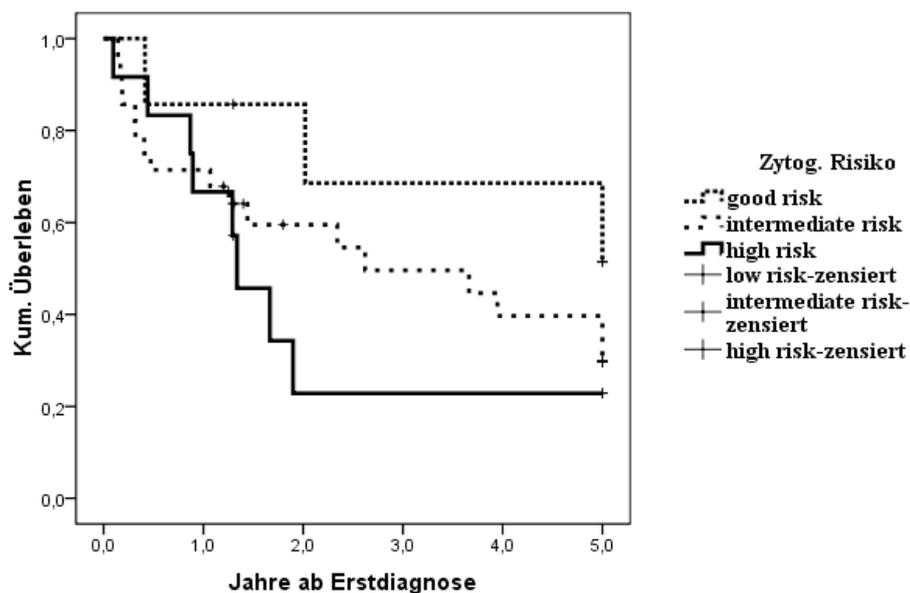


Abbildung 15: Graphische Darstellung der Überlebenszeit in Abhängigkeit des zytogenetischen Risikos: "good risk" (N=7), "intermediate risk" (N=28) und poor risk (N=12) (p=0,338)

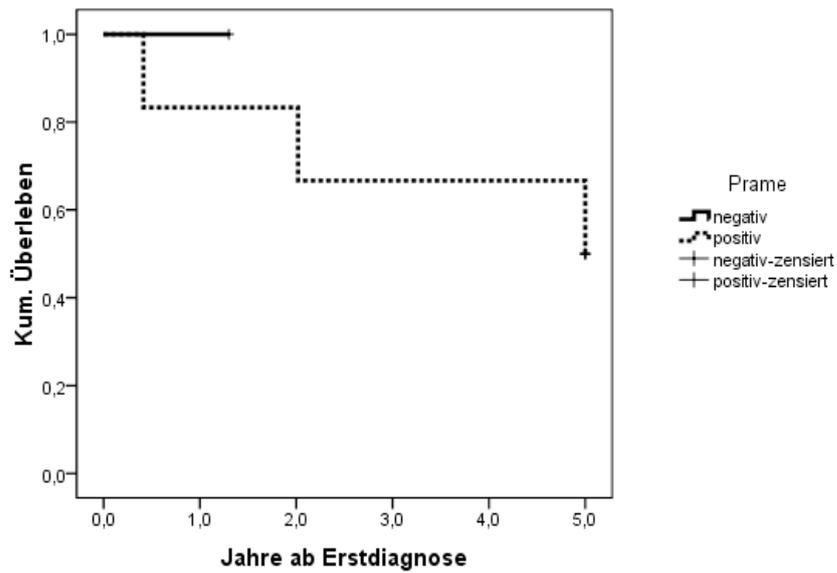


Abbildung 16: Graphische Darstellung der Überlebenszeit bei PRAME-negativen (N=1) bzw. PRAME-positiven (N=6) Patienten der zytogenetischen "good risk-" Gruppe.

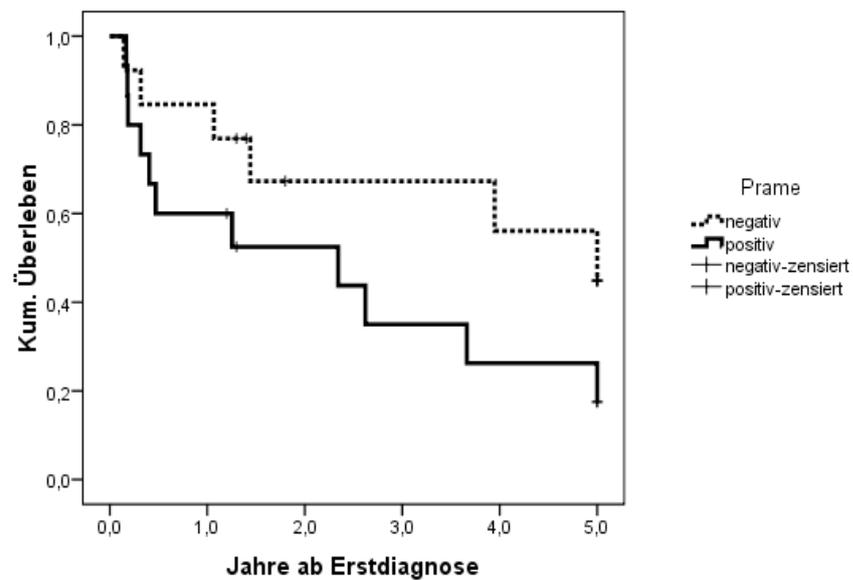


Abbildung 17: Graphische Darstellung der Überlebenszeit bei PRAME-negativen (N=13) bzw. PRAME-positiven (N=15) Patienten der zytogenetischen "intermediate risk-" Gruppe.

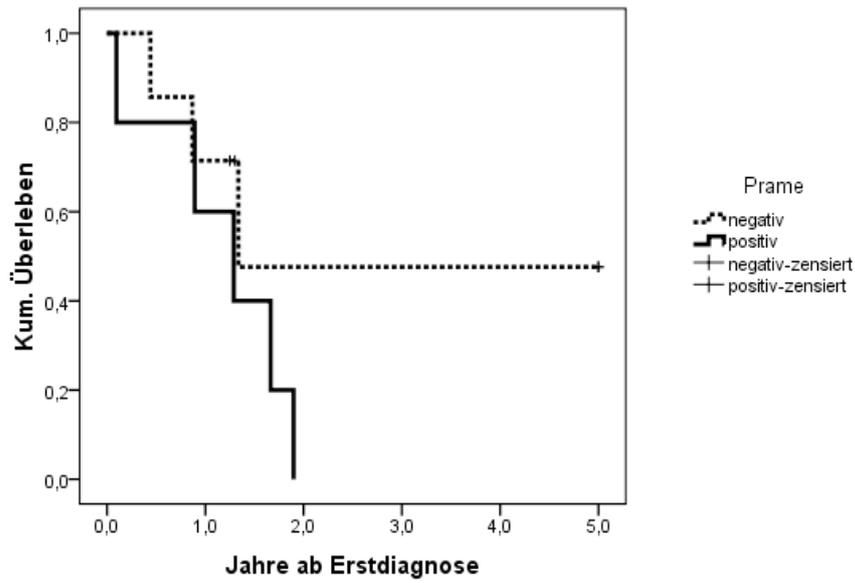


Abbildung 18: Graphische Darstellung der Überlebenszeit bei PRAME-negativen (N=7) bzw. PRAME-positiven (N=5) Patienten der zytogenetischen "poor risk-" Gruppe.

4. Diskussion

Die Prognose von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie ist trotz neuer intensiver Chemotherapien und der Möglichkeit einer allogenen Knochenmarkstransplantation in vielen Fällen immer noch sehr schlecht. Die Langzeitüberlebensrate liegt, abhängig vom Alter der Patienten, zwischen 16-37% (Büchner, Berdel et al. 2009). Aus diesem Grund ist es sehr wichtig, sowohl neue Therapieansätze zu entwickeln und zu etablieren als auch prognostische und prädiktive Faktoren zu detektieren.

Ein relativ innovativer und erfolgversprechender Ansatz sind immuntherapeutische Behandlungen, die die Immunogenität der Krebszelle nutzen, um diese unter Ausnutzung des Immunsystems gezielt zu zerstören oder eine Apoptose auszulösen. Um gesunde Zellen zu schützen und Nebenwirkungen so gering zu halten wie möglich, benötigt man geeignete Zielantigene, die ausschließlich von malignen Zellen exprimiert werden. Eine wichtige Rolle bei der Suche nach geeigneten Zielstrukturen für immuntherapeutische Ansätze spielen Cancer-Testis-Antigene, da sie - mit Ausnahme von immunprivilegiertem Gewebe wie Hoden und Plazenta - nicht in gesundem Gewebe exprimiert werden, aber in histologisch unterschiedlichen Malignomen aktiviert sind (Scanlan, Simpson et al. 2004). Darüber hinaus konnte in mehreren Studien eine spontane Immunantwort auf verschiedene CT-Antigene nachgewiesen werden (Stockert, Jager et al. 1998; Jager, Nagata et al. 2000; Gnjatic, Atanackovic et al. 2003; Goodyear, Pratt et al. 2008; Lendvai, Gnjatic et al. 2010).

Bei einigen speziellen hämatologischen Erkrankungen, wie zum Beispiel dem Multiplen Myelom, konnte bereits eine häufige und sehr starke Expression mehrerer Cancer-Testis-Antigene nachgewiesen werden (Atanackovic, Hildebrandt et al. ; Pabst, Zustin et al. ; Jungbluth, Ely et al. 2005; Atanackovic, Arfsten et al. 2007). Anders stellt sich dies bei myeloischen Neoplasien dar. Über das komplette Expressionsmuster von CT-Antigenen bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie ist bisher wenig bekannt. In einer Vorarbeit unserer Arbeitsgruppe wurde die Expression von 21 CT-Antigenen in 10 AML-Zelllinien auf mRNA-Basis untersucht. Aus diesen 21 CT-Antigenen kristallisierten sich sieben potenziell interessante Antigene heraus (PRAME, NY-SAR-35, SLLP1, SCP1, ROPN1, MAGEA3, SPO11), von denen sich keines in den Proben 10 gesunder Knochenmarksspende nachweisen ließ.

4.1 Expressionsmuster der CT-Antigene bei AML Patienten

Basierend auf den oben beschriebenen Untersuchungsergebnissen an AML-Zelllinien, wurde das Expressionsmuster von sieben CT-Antigenen bei 64 an akuter myeloischer Leukämie erkrankten Patienten untersucht. Bei den untersuchten Patienten handelte es sich um ein auf der Basis einer Stichprobe zufällig ausgewähltes Patientenkollektiv, das hinsichtlich der prozentualen Geschlechtsverteilung mit den in der Literatur beschriebenen Angaben für die AML übereinstimmt und sich im Median etwa 5 Jahre jünger zeigte (A. Hellenbrecht 2006).

Mehr als die Hälfte der Patienten exprimierte mindestens ein CT-Antigen, wobei sich die Antigene MAGEA3 und SPO11 bei keinem der Patienten nachweisen ließen. Schon in einer früheren Studie wurde dies bereits für verschiedene Mitglieder der MAGEA Familie bei Leukämien gezeigt (Chambost, van Baren et al. 2001). Anders stellt sich dies in einer Studie der Arbeitsgruppe um Martinez dar. Hier wurde die Expression von MAGEA3 bei 10 von 32 an AML erkrankten Patienten beschrieben (Martinez, Olarte et al. 2007). Über das Expressionsmuster von SPO11 bei Leukämien hat es bisher keine Veröffentlichungen gegeben, wobei sich jedoch das Antigen bei verschiedenen soliden Tumoren nachweisen ließ (Koslowski, Tureci et al. 2002; Atanackovic, Blum et al. 2006).

Jeweils 2 der Patienten exprimierten die Antigene SCP1 und ROPN1, die auch von anderen Autoren bereits im Zusammenhang mit der AML beschrieben wurden. Während ROPN1 in einer früheren Studie bei einem kleinen Anteil an AML Patienten sowie bei anderen hämatologischen Erkrankungen wie dem Multiplem Myelom oder der chronisch lymphatischen Leukämie nachgewiesen wurde (Li, Li et al. 2007), wird das Vorkommen von SCP1 bei der AML mit 0-10% angegeben (Lim, Austin et al. 1999; Niemeyer, Tureci et al. 2003; Guinn, Gilkes et al. 2005). Die physiologische Funktion der beiden Proteine ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Während man annimmt, dass Ropporin an der Spermienbeweglichkeit beteiligt ist (Chen, Wang et al. 2011), scheint SCP1 eine wichtige Rolle während der Meiose zu spielen (Ollinger, Alsheimer et al. 2005). Allerdings spielen diese beiden Antigene auf Grund ihres relativ seltenen Vorkommens eher keine Rolle bei der Suche nach Zielstrukturen für immuntherapeutische Ansätze bei der akuten myeloischen Leukämie.

Die Expression des CT-Antigens SLLP1 konnte in der vorliegenden Studie bei fünf Patienten gezeigt werden. In einer früheren Studie, in der allerdings nur neun Patienten mit akuter myeloischer Leukämie eingeschlossen wurden, ließ sich das Antigen bei zwei der Erkrankten nachweisen. Darüber hinaus zeigte es sich auch bei anderen hämatologischen Neoplasien wie der CLL, CML oder dem Multiplen Myelom. Zusätzlich wiesen einige dieser Patienten auch hohe IgG-Antikörper Titer gegen SLLP1 auf (Wang, Zhang et al. 2004), womit es als Zielstruktur für eine Immuntherapie durchaus in Frage kommt. Bei gesunden Probanden ließ sich das Protein in den Akrosomen von Spermien nachweisen (Mandal, Klotz et al. 2003) und könnte dort eine Aufgabe bei der Verschmelzung von Spermium und Eizelle übernehmen (Herrero, Mandal et al. 2005). Auf Grund seiner relativ seltenen Expressionsfrequenz sollte der Einsatz bei einer Immuntherapie jedoch eher in Form eines polyvalenten Impfstoffs in Kombination mit weiteren Antigenen erfolgen.

Als zweithäufigstes Cancer-Testis-Antigen ließ sich bei etwa 13% der Patienten NY-SAR-35 auf mRNA-Ebene nachweisen. Dieses CT-Antigen, das auch unter dem Namen FMR1NB bekannt ist, wurde in der Literatur erstmals 2003 beschrieben. Es wird in unterschiedlicher Frequenz bei verschiedenen soliden Tumoren exprimiert und ist in der Lage, bei einigen Patienten eine spontane humorale Immunantwort auszulösen (Lee, Obata et al. 2003). Bisher gibt es keine Veröffentlichungen über das Expressionsmuster bei hämatologischen Neoplasien. Das Gen ist wie die meisten anderen Cancer-Testis-Antigene auf dem kurzen Arm des X Chromosoms lokalisiert (Xq27.3-q28) und lässt sich *in vitro* durch Hypomethylierung einer CpG Insel in der Promotor Region aktivieren (Park, Song et al. 2011). Über Funktion und Lokalisation des Proteins ist bisher nichts bekannt. Als potentiell Zielantigen für Immuntherapien scheint die Nutzung von NY-SAR-35 durchaus in Frage zu kommen. Die Expressionshäufigkeit sollte jedoch in weiteren Studien an einer größeren Patientenzahl untersucht und die physiologische Funktion des Proteins bestimmt werden.

Mit Abstand am häufigsten konnte in dem für diese Arbeit untersuchten Patientenkollektiv die Expression des CT-Antigens PRAME nachgewiesen werden. Bei der Hälfte der Erkrankten ließ sich dieses Antigen auf mRNA-Ebene detektieren. PRAME wurde 1997 das erste Mal beschrieben und wurde bis heute bei vielen verschiedenen Malignomen nachgewiesen (Cuffel, Rivals et al. ; Ikeda, Lethe et al.

1997; Pellat-Deceunynck, Mellerin et al. 2000; Boon, Edwards et al. 2003; Oberthuer, Hero et al. 2004; Figueiredo, Mamede et al. 2006; Doolan, Clynes et al. 2008). Für die akute myeloische Leukämie wurden Expressionsfrequenzen von 35-64% beschrieben (van Baren, Chambost et al. 1998; Greiner, Ringhoffer et al. 2000; Matsushita, Ikeda et al. 2001; Greiner, Ringhoffer et al. 2004; Zhou, Li et al. 2007; Qin, Zhu et al. 2009). PRAME wird - ausgenommen von Hoden, Ovar, Endometrium, Plazenta Nebennieren und Nieren - nicht in gesundem Gewebe exprimiert, vor allem nicht in den Knochenmarksproben, peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) sowie CD34+-Progenitorzellen von 23 gesunden Knochenmarksspendern (Liggins, Lim et al. ; Ikeda, Lethe et al. 1997; Andrade, Vettore et al. 2008; Luetkens, Schafhausen et al. 2010). Innerhalb der Zelle ist das Protein sowohl im Nukleus als auch im perinukleären Raum lokalisiert (Wadelin, Fulton et al. ; Tajeddine, Gala et al. 2005). Besonders interessant ist der Einfluss von PRAME auf Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Progenitorzellen. So beschreibt eine Arbeitsgruppe um Oehler die hemmende Wirkung einer Überexpression von PRAME auf die Differenzierung myeloischer Vorläuferzellen (Oehler, Guthrie et al. 2009). Auch scheint die Inhibierung der Expression von PRAME zur Apoptose leukämischer Zellen zu führen (Tanaka, Wang et al. 2011). Im Gegensatz hierzu beschreibt die Arbeitsgruppe um Tajeddine den Zelltod-induzierenden Einfluss von PRAME und der daraus verbesserten Prognose bei Überexpression des Antigens (Tajeddine, Gala et al. 2005). Die physiologische Funktion des CT-Antigens und dessen Einfluss auf den Zellzyklus sind offensichtlich noch nicht ausreichend untersucht worden und sollten in weiteren Studien mit größerem Augenmerk betrachtet werden. Sowohl in vivo als auch in vitro zeigt sich eine spontane zelluläre Immunantwort gegen PRAME (Ikeda, Lethe et al. 1997; Quintarelli, Dotti et al. 2008; Rezvani, Yong et al. 2009), so dass es bei Patienten mit metastasiertem Melanom bereits in einer Phase I Studie für eine gezielte Immuntherapie genutzt werden konnte (Weber, Vogelzang et al. 2011). Die vergleichsweise hohe Expressionsfrequenz, die Selektivität und die Immunogenität von PRAME heben dieses Antigen gegenüber den anderen untersuchten CTAs als Primärziel antigenspezifischer Immuntherapien bei akuter myeloischer Leukämie deutlich hervor.

4.2 Korrelation mit klinischen Parametern

In Übereinstimmung mit früheren Studien konnte in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Korrelation zwischen der CTA-Expression und verschiedenen klinischen Parametern wie Geschlecht, Alter, Blastenkonzentration, Vortherapie, FAB-Klassifikation und dem zytogenetischen Risikoprofil festgestellt werden (Paydas, Tanriverdi et al. 2005; Zhou, Li et al. 2007; Zhu, Liu et al. 2007). Allerdings ließ sich das Antigen PRAME deutlich häufiger bei Patienten mit einem Blasteninfiltrationsgrad von über 20% nachweisen. Durch die Annahme einer blastenabhängigen CTA-Expression ließe sich sowohl die bessere Nachweisbarkeit der Antigene im peripheren Blut als auch die beobachtete Häufung der Expression beim weiblichen Geschlecht erklären. Mit 56% zeigten die untersuchten peripheren Blutproben eine deutlich stärkere mediane Blasteninfiltration als die Knochenmarksproben (43%), und über 40% der Frauen wiesen eine Blastenkonzentration von über 50% auf (Männer: 31%). Am ehesten ist die häufigere Nachweisbarkeit bei einem erhöhten Blasteninfiltrationsgrad auf eine bessere Detektion bei größerer Tumormasse zurückzuführen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass es bei fortgeschrittener Erkrankung zu einer verstärkten CTA-Expression kommt.

In einer früheren Studie zeigte sich ein starker Zusammenhang zwischen der Translokation t(8,21) und der Nachweisbarkeit von PRAME (van Baren, Chambost et al. 1998). Obwohl in der hier untersuchten Stichprobe nur fünf der Patienten diese zytogenetische Veränderung aufwiesen, ließ sich bei vier von ihnen PRAME in den untersuchten Proben nachweisen. Auch beim Vergleich der verschiedenen FAB-Klassifikationen fiel eine Häufung der Expression von PRAME bei der für die Translokation t(8,21) typischen FAB-M2 auf. Auf Grund dieses Ergebnisses sollten weitere Untersuchungen bezüglich der biologischen Zusammenhänge zwischen der Expressionssteuerung von PRAME und dem aus der Translokation t(8,21) entstandenen Fusionsgen AML1/ETO erfolgen.

Relativ neu eingesetzte Medikamente zur Therapie der AML sind demethylierende Substanzen, wie zum Beispiel Decitabine und 5-Azacytidine (Blum, Garzon et al. 2010; Al-Ali, Jaekel et al. 2011). Eine Hypothese über den Wirkmechanismus dieser Substanzen ist die epigenetische Hochregulierung immunpotenter Antigene in den Krebszellen durch das demethylierende Agens (Claus, Almstedt et al. 2005). Allerdings

sind diese Effekte meist nur an Zelllinien erforscht und nicht bei Patienten nachgewiesen. In dem für diese Arbeit untersuchten Kollektiv erhielt nur einer der Patienten im Rahmen seiner Therapie 5-Azacytidine vor der Probeentnahme. In der entnommenen peripheren Blutprobe ließ sich ausschließlich das CT-Antigen PRAME nachweisen. Eine Referenzprobe aus der Zeit vor Beginn der Chemotherapie lag leider nicht vor. Um den genauen Effekt der demethylierenden Substanzen auf leukämische Blasten zu untersuchen, sollte die Expressionsfrequenz von Tumorantigenen bei mit Decitabine oder 5-Azacytidine anbehandelten Patienten in einer größeren Studie untersucht werden.

4.3 CT-Antigen-Expression und Gesamtüberleben

In verschiedenen Studien wird ein Zusammenhang hergestellt zwischen der Expression von PRAME und einem längeren krankheitsfreien Überleben bei Kindern mit AML und bei Patienten mit einer AML FAB-M3 (Steinbach, Hermann et al. 2002; Santamaria, Chillon et al. 2008; Tajeddine, Louis et al. 2008). Im Gegensatz dazu geht die Nachweisbarkeit von PRAME bei anderen hämatologischen Erkrankungen wie der CML, aber auch bei einigen soliden Malignomen, wie zum Beispiel dem Mammakarzinom, mit einem verschlechterten Gesamtüberleben einher (Epping, Hart et al. 2008; Luetkens, Schafhausen et al. 2010).

In dem für diese Arbeit untersuchten Kollektiv konnte bei der Betrachtung aller Patienten kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Expression von PRAME und einer Verschlechterung oder Verbesserung des Gesamtüberlebens festgestellt werden. Mit Ausnahme von SCP1, das auf Grund seiner sehr geringen Expressionsfrequenz nicht aussagekräftig ist, galt dies auch für die anderen untersuchten Antigene. Ein anderes Ergebnis zeigte sich jedoch bei isolierter Betrachtung der zytogenetischen Risikogruppen. Hier scheint sich die Expression von PRAME vor allem bei der "intermediate risk" Patientengruppe negativ auf die Überlebenszeit auszuwirken. Dies widerspricht einer Studie der Arbeitsgruppe um Santamaria, die eine hohe Expressionsfrequenz von PRAME bei Patienten mit AML ohne zytogenetische Veränderungen als prognostisch positiv bewertete (Santamaria, Chillon et al. 2009). Allerdings wird auch dieses Ergebnis in einer neueren Arbeit nicht bestätigt (Damm,

Heuser et al. 2011). Überhaupt scheint es fraglich zu sein, ob der Verlauf der Erkrankung durch das Vorhandensein von PRAME direkt beeinflusst wird, wie es eine Studie um Epping erwarten lässt (Epping, Wang et al. 2005), oder ob die Expression des Antigens nicht vielmehr mit anderen Faktoren, wie zum Beispiel zytogenetischen Veränderungen zusammenhängt, die mit einer positiven bzw. negativen Beeinflussung der AML einhergehen. Auf Grund dieser Tatsachen sollte die Steuerung der Transkription sowie die genaue Funktion von PRAME in den verschiedenen Malignomen genauer untersucht werden.

4.4 Kritik

Wichtigster Kritikpunkt bei dieser Arbeit ist die geringe Patientenzahl der untersuchten Stichprobe. Gerade bei der Einteilung des Kollektivs nach einzelnen klinischen Charakteristika gehören manchen Untergruppen nur noch einige wenige Patienten an. Das macht sich besonders bemerkbar bei der sehr inhomogenen Verteilung der FAB Klassifikation. So sind die FAB Klassifikationen M0, M3, M4Eo, M5, M5a und M5b nur mit einigen wenigen Patienten vertreten, und keiner der Untersuchten ist an einer FAB M6 bzw. M7 erkrankt. Allerdings wird diese Einteilung der akuten myeloischen Leukämie auch mehr und mehr durch die neuere WHO-Klassifikation, die ein relativ großes Augenmerk auf zytogenetischen Veränderungen legt, abgelöst. Durch den retrospektiven Charakter der Studie kamen jedoch einige molekulargenetische Untersuchungsmöglichkeiten, die heute zum Standard der AML Diagnostik gehören, bei vielen Patienten gar nicht zum Einsatz.

Gleiches gilt auch für die zytogenetischen Veränderungen. So zeigt insbesondere die "good risk" Gruppe eine zu geringe Patientenanzahl, um eine aussagekräftige Überlebenszeitanalyse durchführen zu können. Darüber hinaus wird die direkte Vergleichbarkeit der Überlebenszeiten durch die Verwendung unterschiedlicher Bewertungsmethoden zur Beurteilung der Expressionsfrequenz erschwert. So quantifizieren andere Arbeitsgruppen die Expression einzelner Cancer-Testis-Antigene zur Risikobeurteilung, während in der vorliegenden Arbeit das Vorhandensein lediglich mit positiv oder negativ beurteilt wird.

5. Zusammenfassung und Schlussfolgerung

Trotz zahlreicher Fortschritte bei der Behandlung der akuten myeloischen Leukämie ist die Prognose bei vielen erkrankten Patienten noch sehr schlecht. Gerade ältere und multimorbide Patienten profitieren oft nur sehr gering von aggressiven Therapien, und nicht selten können diese wegen ihres Nebenwirkungsprofils gar nicht erst zum Einsatz kommen. Große Hoffnungen werden deshalb auf den Einsatz neuer Immuntherapien gesetzt, für die man jedoch geeignete Zielantigene benötigt. Auf der Suche nach spezifischen Targets spielen Cancer-Testis-Antigene auf Grund ihrer selektiven Expression eine wichtige Rolle.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsmuster von CT-Antigenen bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie untersucht. Als Untersuchungsmaterial dienten Knochenmarks- sowie periphere Blutproben von 64 an AML erkrankten Patienten. Mit Hilfe der qualitativen Real Time PCR konnte auf mRNA-Ebene gezeigt werden, dass die meisten Cancer-Testis-Antigene nicht oder in nur sehr geringem Ausmaß exprimiert werden. Dennoch ließ sich bei fast 60% der Patienten mindestens eins der untersuchten CT-Antigene nachweisen. Hierbei fiel vor allem das CT-Antigen PRAME auf, das von der Hälfte der Patienten exprimiert wurde. Weitere Antigene, die zumindest für einen Teil der Patienten für Vakzinierungsstrategien in Frage kommen, sind NY-SAR-35 sowie SLLP1. Hieraus ergibt sich die potentielle Möglichkeit, monovalente bzw. polyvalente Vakzine, wie sie bereits bei anderen Krebserkrankungen innerhalb von Studien erfolgreich getestet wurden, zur Therapie der AML einzusetzen.

Eine Korrelation zwischen der Expression von Cancer-Testis-Antigenen mit den untersuchten klinischen Parametern konnte bei dem vorliegenden Patientenkollektiv nicht festgestellt werden. Allerdings scheint sich die Expression von PRAME negativ auf die Überlebenszeit der Patienten mit intermediärem Risiko-Karyotyp auszuwirken. Da bei den sehr heterogenen Verläufen der AML die Prognose einen sehr großen Stellenwert einnimmt und auch durchaus mit in das geplante Therapiekonzept einfließt, sollte die genaue prognostische Aussagekraft von PRAME in einer größeren Studie untersucht werden.

Obwohl sich bei dieser Arbeit gezeigt hat, dass die Expression von CT-Antigenen bei der akuten myeloischen Leukämie deutlich geringer ausfällt als bei anderen malignen Erkrankungen, könnte doch über die Hälfte der Patienten von einem Einsatz CT-Antigen spezifischer Immuntherapien profitieren. Größtes Augenmerk sollte bei weiteren Studien auf das Cancer-Testis-Antigen PRAME gelegt werden.

Literaturverzeichnis

- A. Hellenbrecht, D. M., N. Gökbuget. (2006, 21.02.2008). "Leukämien in Deutschland." Retrieved 22.07.2011, 2011, from <http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/aerzte/epidemiologie/leukaemiehaeufigkeit/>.
- Abutalib, S. A. and M. S. Tallman (2006). "Monoclonal antibodies for the treatment of acute myeloid leukemia." Curr Pharm Biotechnol **7**(5): 343-69.
- Al-Ali, H. K., N. Jaekel, et al. (2011). "Azacitidine in patients with acute myeloid leukemia medically unfit for or resistant to chemotherapy: a multicenter phase I/II study." Leuk Lymphoma.
- Anasetti, C., J. Perkins, et al. (2006). "Are matched unrelated donor transplants justified for AML in CR1?" Best Pract Res Clin Haematol **19**(2): 321-8.
- Andersen, M. H., I. M. Svane, et al. (2005). "Immunogenicity of Bcl-2 in patients with cancer." Blood **105**(2): 728-34.
- Andrade, V. C., A. L. Vettore, et al. (2008). "Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients." Cancer Immun **8**: 2.
- Andrieu, J. M., N. Ifrah, et al. (1990). "Increased risk of secondary acute nonlymphocytic leukemia after extended-field radiation therapy combined with MOPP chemotherapy for Hodgkin's disease." J Clin Oncol **8**(7): 1148-54.
- Appelbaum, F. R., H. Gundacker, et al. (2006). "Age and acute myeloid leukemia." Blood **107**(9): 3481-5.
- Aquino, V. M. (2002). "Acute myelogenous leukemia." Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care **32**(2): 50-8.

- Arlin, Z., D. C. Case, Jr., et al. (1990). "Randomized multicenter trial of cytosine arabinoside with mitoxantrone or daunorubicin in previously untreated adult patients with acute nonlymphocytic leukemia (ANLL). Lederle Cooperative Group." Leukemia **4**(3): 177-83.
- Atanackovic, D., J. Arfsten, et al. (2007). "Cancer-testis antigens are commonly expressed in multiple myeloma and induce systemic immunity following allogeneic stem cell transplantation." Blood **109**(3): 1103-12.
- Atanackovic, D., I. Blum, et al. (2006). "Expression of cancer-testis antigens as possible targets for antigen-specific immunotherapy in head and neck squamous cell carcinoma." Cancer Biol Ther **5**(9): 1218-25.
- Atanackovic, D., Y. Hildebrandt, et al. "Cancer-testis antigens MAGE-C1/CT7 and MAGE-A3 promote the survival of multiple myeloma cells." Haematologica **95**(5): 785-93.
- Atanackovic, D., T. Luetkens, et al. (2009). "Longitudinal analysis and prognostic effect of cancer-testis antigen expression in multiple myeloma." Clin Cancer Res **15**(4): 1343-52.
- Austin, H., E. Delzell, et al. (1988). "Benzene and leukemia. A review of the literature and a risk assessment." Am J Epidemiol **127**(3): 419-39.
- Baer, M. R., S. L. George, et al. (2008). "Low-dose interleukin-2 immunotherapy does not improve outcome of patients age 60 years and older with acute myeloid leukemia in first complete remission: Cancer and Leukemia Group B Study 9720." J Clin Oncol **26**(30): 4934-9.
- Beers, M. H. and MSD Sharp & Dohme GmbH (2007). Das MSD-Manual der Diagnostik und Therapie. München, Elsevier, Urban & Fischer.

- Berneman, Z., A. Van de Velde, et al. (2008). "Immunogenicity and Antileukemic Activity of Dendritic Cells Electroporated with Wilms' Tumor WT1 mRNA: A Phase I/II Trial in Acute Myeloid Leukemia." Blood **112**(830).
- Bizzozero, O. J., Jr., K. G. Johnson, et al. (1966). "Radiation-related leukemia in Hiroshima and Nagasaki, 1946-1964. I. Distribution, incidence and appearance time." N Engl J Med **274**(20): 1095-101.
- Blaise, D., D. Maraninchi, et al. (1992). "Allogeneic bone marrow transplantation for acute myeloid leukemia in first remission: a randomized trial of a busulfan-Cytosan versus Cytosan-total body irradiation as preparative regimen: a report from the Group d'Etudes de la Greffe de Moelle Osseuse." Blood **79**(10): 2578-82.
- Blaise, D., D. Maraninchi, et al. (2001). "Long-term follow-up of a randomized trial comparing the combination of cyclophosphamide with total body irradiation or busulfan as conditioning regimen for patients receiving HLA-identical marrow grafts for acute myeloblastic leukemia in first complete remission." Blood **97**(11): 3669-71.
- Blum, W., R. Garzon, et al. (2010). "Clinical response and miR-29b predictive significance in older AML patients treated with a 10-day schedule of decitabine." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(16): 7473-8.
- Boel, P., C. Wildmann, et al. (1995). "BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes." Immunity **2**(2): 167-75.
- Bolli, M., E. Schultz-Thater, et al. (2005). "NY-ESO-1/LAGE-1 coexpression with MAGE-A cancer/testis antigens: a tissue microarray study." Int J Cancer **115**(6): 960-6.

- Boon, K., J. B. Edwards, et al. (2003). "Comparison of medulloblastoma and normal neural transcriptomes identifies a restricted set of activated genes." Oncogene **22**(48): 7687-94.
- Boshoff, C. and R. Weiss (2002). "AIDS-related malignancies." Nat Rev Cancer **2**(5): 373-82.
- Brasseur, F., D. Rimoldi, et al. (1995). "Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma." Int J Cancer **63**(3): 375-80.
- Bremer, M. and J. Karstens (2002). Strahlentherapeutische Interventionen bei Leukämien. Der Onkologe Berlin ;Heidelberg ;New York, Springer: Online-Ressource.
- Büchner, T., W. E. Berdel, et al. (2009). "Age-related risk profile and chemotherapy dose response in acute myeloid leukemia: a study by the German Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group." J Clin Oncol **27**(1): 61-9.
- Büchner, T., W. E. Berdel, et al. (2007). "Older-age AML: Disease biology and dose response." Journal of Clinical Oncology, **25**.
- Caballero, O. L. and Y. T. Chen (2009). "Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy." Cancer Sci **100**(11): 2014-21.
- Carron, J. A. and J. C. Cawley (1989). "IL-2 and myelopoiesis: IL-2 induces blast cell proliferation in some cases of acute myeloid leukaemia." Br J Haematol **73**(2): 168-72.
- Cassileth, P. A., D. P. Harrington, et al. (1998). "Chemotherapy compared with autologous or allogeneic bone marrow transplantation in the management of acute myeloid leukemia in first remission." N Engl J Med **339**(23): 1649-56.
- Chambost, H., N. van Baren, et al. (2001). "MAGE-A genes are not expressed in human leukemias." Leukemia **15**(11): 1769-71.

- Chen, J., Y. Wang, et al. (2011). "Functional expression of ropporin in human testis and ejaculated spermatozoa." J Androl **32**(1): 26-32.
- Chen, Y. T., M. J. Scanlan, et al. (1997). "A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 1914-8.
- Cheson, B. D., J. M. Bennett, et al. (2003). "Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia." J Clin Oncol **21**(24): 4642-9.
- Cignetti, A., E. Bryant, et al. (1999). "CD34(+) acute myeloid and lymphoid leukemic blasts can be induced to differentiate into dendritic cells." Blood **94**(6): 2048-55.
- Classen, M., V. Diehl, et al. (2004). Innere Medizin : mit 1246 Tabellen ; [Online-Zugang + interaktive Extras www.studentconsult.de]. München [u.a.], Urban & Fischer.
- Claus, R., M. Almstedt, et al. (2005). "Epigenetic treatment of hematopoietic malignancies: in vivo targets of demethylating agents." Semin Oncol **32**(5): 511-20.
- Collins, R. H., Jr., O. Shpilberg, et al. (1997). "Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation." J Clin Oncol **15**(2): 433-44.
- Condomines, M., P. Quittet, et al. (2006). "Functional regulatory T cells are collected in stem cell autografts by mobilization with high-dose cyclophosphamide and granulocyte colony-stimulating factor." J Immunol **176**(11): 6631-9.
- Costa, F. F., K. Le Blanc, et al. (2007). "Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer." Stem Cells **25**(3): 707-11.

- Craddock, C., S. Tauro, et al. (2005). "Biology and management of relapsed acute myeloid leukaemia." Br J Haematol **129**(1): 18-34.
- Cuffel, C., J. P. Rivals, et al. "Pattern and clinical significance of cancer-testis gene expression in head and neck squamous cell carcinoma." Int J Cancer **128**(11): 2625-34.
- Damm, F., M. Heuser, et al. (2011). "Integrative prognostic risk score in acute myeloid leukemia with normal karyotype." Blood **117**(17): 4561-8.
- Darby, S. C., R. Doll, et al. (1987). "Long term mortality after a single treatment course with X-rays in patients treated for ankylosing spondylitis." Br J Cancer **55**(2): 179-90.
- de Botton, S., A. Fawaz, et al. (2005). "Autologous and allogeneic stem-cell transplantation as salvage treatment of acute promyelocytic leukemia initially treated with all-trans-retinoic acid: a retrospective analysis of the European acute promyelocytic leukemia group." J Clin Oncol **23**(1): 120-6.
- De Smet, C., C. Lurquin, et al. (1997). "Genes coding for melanoma antigens recognised by cytolytic T lymphocytes." Eye (Lond) **11 (Pt 2)**: 243-8.
- De Smet, C., C. Lurquin, et al. (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): 7327-35.
- DeNardo, D. G., M. Johansson, et al. (2008). "Immune cells as mediators of solid tumor metastasis." Cancer Metastasis Rev **27**(1): 11-8.
- Depa-Martynow, M., B. Kempisty, et al. (2007). "Association between fertilin beta, protamines 1 and 2 and spermatid-specific linker histone H1-like protein mRNA levels, fertilization ability of human spermatozoa, and quality of preimplantation embryos." Folia Histochem Cytobiol **45 Suppl 1**: S79-85.

- Deschler, B. and M. Lubbert (2006). "Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology." Cancer **107**(9): 2099-107.
- Dhodapkar, M. V., K. Osman, et al. (2003). "Expression of cancer/testis (CT) antigens MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, CT-7, and NY-ESO-1 in malignant gammopathies is heterogeneous and correlates with site, stage and risk status of disease." Cancer Immun **3**: 9.
- Doolan, P., M. Clynes, et al. (2008). "Prevalence and prognostic and predictive relevance of PRAME in breast cancer." Breast Cancer Res Treat **109**(2): 359-65.
- Duan, Z., Y. Duan, et al. (2003). "Overexpression of MAGE/GAGE genes in paclitaxel/doxorubicin-resistant human cancer cell lines." Clin Cancer Res **9**(7): 2778-85.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, et al. (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." Nat Immunol **3**(11): 991-8.
- Dunn, G. P., L. J. Old, et al. (2004). "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting." Immunity **21**(2): 137-48.
- Dutcher, J. P., C. A. Schiffer, et al. (1987). "Hyperleukocytosis in adult acute nonlymphocytic leukemia: impact on remission rate and duration, and survival." J Clin Oncol **5**(9): 1364-72.
- Ehninger, G., H. Link, et al. (2008). Akute myeloische Leukämie : Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose Köln, Dt. Ärzte-Verl.
- Elisseeva, O. A., Y. Oka, et al. (2002). "Humoral immune responses against Wilms tumor gene WT1 product in patients with hematopoietic malignancies." Blood **99**(9): 3272-9.

- EMA. (2008, 24.01.2008). "Questions and answers on recommendation for the refusal of the marketing authorisation for Mylotarg." Retrieved 07.12.2009, 2009, from http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/opinion/Q&A_Mylotarg_3753708en.pdf.
- Epping, M. T., A. A. Hart, et al. (2008). "PRAME expression and clinical outcome of breast cancer." *Br J Cancer* **99**(3): 398-403.
- Epping, M. T., L. Wang, et al. (2005). "The human tumor antigen PRAME is a dominant repressor of retinoic acid receptor signaling." *Cell* **122**(6): 835-47.
- Estey, E. (2007). "Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in older patients." *J Clin Oncol* **25**(14): 1908-15.
- Estey, E., T. L. Smith, et al. (1989). "Prediction of survival during induction therapy in patients with newly diagnosed acute myeloblastic leukemia." *Leukemia* **3**(4): 257-63.
- Farag, S. S., A. S. Ruppert, et al. (2005). "Outcome of induction and postremission therapy in younger adults with acute myeloid leukemia with normal karyotype: a cancer and leukemia group B study." *J Clin Oncol* **23**(3): 482-93.
- Fierro, M. T., X. S. Liao, et al. (1988). "In vitro and in vivo susceptibility of human leukemic cells to lymphokine activated killer activity." *Leukemia* **2**(1): 50-4.
- Figueiredo, D. L., R. C. Mamede, et al. (2006). "Expression of cancer testis antigens in head and neck squamous cell carcinomas." *Head Neck* **28**(7): 614-9.
- Gaiger, A., L. Carter, et al. (2001). "WT1-specific serum antibodies in patients with leukemia." *Clin Cancer Res* **7**(3 Suppl): 761s-765s.
- Galea-Lauri, J. (2002). "Immunological weapons against acute myeloid leukaemia." *Immunology* **107**(1): 20-7.

- Galon, J., A. Costes, et al. (2006). "Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome." Science **313**(5795): 1960-4.
- Gao, Q., S. J. Qiu, et al. (2007). "Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection." J Clin Oncol **25**(18): 2586-93.
- Giles, F., E. Estey, et al. (2003). "Gemtuzumab ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia." Cancer **98**(10): 2095-104.
- Gnjatic, S., D. Atanackovic, et al. (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): 8862-7.
- Goodyear, O. C., G. Pratt, et al. (2008). "Differential pattern of CD4+ and CD8+ T-cell immunity to MAGE-A1/A2/A3 in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and multiple myeloma." Blood **112**(8): 3362-72.
- Graf, C., F. Heidel, et al. (2007). "A neoepitope generated by an FLT3 internal tandem duplication (FLT3-ITD) is recognized by leukemia-reactive autologous CD8+ T cells." Blood **109**(7): 2985-8.
- Greiner, J., L. Bullinger, et al. (2008). "Leukemia-associated antigens are critical for the proliferation of acute myeloid leukemia cells." Clin Cancer Res **14**(22): 7161-6.
- Greiner, J., H. Dohner, et al. (2006). "Cancer vaccines for patients with acute myeloid leukemia--definition of leukemia-associated antigens and current clinical protocols targeting these antigens." Haematologica **91**(12): 1653-61.
- Greiner, J., L. Li, et al. (2005). "Identification and characterization of epitopes of the receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM/CD168) recognized by CD8+ T cells of HLA-A2-positive patients with acute myeloid leukemia." Blood **106**(3): 938-45.

- Greiner, J., M. Ringhoffer, et al. (2000). "Simultaneous expression of different immunogenic antigens in acute myeloid leukemia." Exp Hematol **28**(12): 1413-22.
- Greiner, J., M. Ringhoffer, et al. (2004). "mRNA expression of leukemia-associated antigens in patients with acute myeloid leukemia for the development of specific immunotherapies." Int J Cancer **108**(5): 704-11.
- Greiner, J., A. Schmitt, et al. (2008). "High-Dose RHAMM-R3 Peptide Peptide Vaccination for Patients with Vaccination for Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML), Myelodysplastic Syndrome (MDS), Multiple Myeloma (MM) and Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL)." Blood **112**(2911).
- Greiner, J., M. Schmitt, et al. (2006). "Expression of tumor-associated antigens in acute myeloid leukemia: Implications for specific immunotherapeutic approaches." Blood **108**(13): 4109-17.
- Guinn, B. A., A. F. Gilkes, et al. (2005). "Microarray analysis of tumour antigen expression in presentation acute myeloid leukaemia." Biochem Biophys Res Commun **333**(3): 703-13.
- Gure, A. O., R. Chua, et al. (2005). "Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer." Clin Cancer Res **11**(22): 8055-62.
- Haas, G. G., Jr., O. J. D'Cruz, et al. (1988). "Distribution of human leukocyte antigen-ABC and -D/DR antigens in the unfixed human testis." Am J Reprod Immunol Microbiol **18**(2): 47-51.
- Haferlach, T., W. Kern, et al. (2004). "A new prognostic score for patients with acute myeloid leukemia based on cytogenetics and early blast clearance in trials of the German AML Cooperative Group." Haematologica **89**(4): 408-18.

- Haferlach, T., A. Perne, et al. (2010). Labordiagnostik in der Hämatologie : vom Symptom zur Diagnose ; mit 36 Tabellen. Köln, Dt. Ärzte-Verl.
- Hämatologie, D. K. u. G. f. P. O. u. (05/2008, 05/2008). "AWMF Leitlinie "Akute lymphoblastische (ALL) und akute myeloische (AML) Leukämie im Kindesalter." Retrieved 09.11.2009, from <http://www.uni-duesseldorf.de/awmf/ll/025-014.htm>.
- Hamer, G., K. Gell, et al. (2006). "Characterization of a novel meiosis-specific protein within the central element of the synaptonemal complex." J Cell Sci **119**(Pt 19): 4025-32.
- Hayes, R. B., S. N. Yin, et al. (1997). "Benzene and the dose-related incidence of hematologic neoplasms in China. Chinese Academy of Preventive Medicine--National Cancer Institute Benzene Study Group." J Natl Cancer Inst **89**(14): 1065-71.
- Herberman, R. B. and J. R. Ortaldo (1981). "Natural killer cells: their roles in defenses against disease." Science **214**(4516): 24-30.
- Herrero, M. B., A. Mandal, et al. (2005). "Mouse SLLP1, a sperm lysozyme-like protein involved in sperm-egg binding and fertilization." Dev Biol **284**(1): 126-42.
- Hofmann, O., O. L. Caballero, et al. (2008). "Genome-wide analysis of cancer/testis gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(51): 20422-7.
- Horne, Z. D., R. Jack, et al. (2011). "Increased levels of tumor-infiltrating lymphocytes are associated with improved recurrence-free survival in stage 1A non-small-cell lung cancer." J Surg Res **171**(1): 1-5.
- Huber, C. and R. Ackermann (2008). Krebsimmuntherapien : Standards und Innovationen ; mit 61 Tabellen. Köln, Dt. Ärzte-Verl.

- Ikeda, H., B. Lethe, et al. (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.
- Jacobs, A. (1989). "Benzene and leukaemia." Br J Haematol **72**(2): 119-21.
- Jaffe, E. S., World Health Organization, et al. (2001). Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, IARC Press.
- Jager, E., Y. Nagata, et al. (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): 4760-5.
- Jemal, A., A. Thomas, et al. (2002). "Cancer statistics, 2002." CA Cancer J Clin **52**(1): 23-47.
- Jungbluth, A. A., K. J. Busam, et al. (2000). "Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer." Int J Cancer **85**(4): 460-5.
- Jungbluth, A. A., S. Ely, et al. (2005). "The cancer-testis antigens CT7 (MAGE-C1) and MAGE-A3/6 are commonly expressed in multiple myeloma and correlate with plasma-cell proliferation." Blood **106**(1): 167-74.
- Kalejs, M. and J. Erenpreisa (2005). "Cancer/testis antigens and gametogenesis: a review and "brain-storming" session." Cancer Cell Int **5**(1): 4.
- Keilholz, U., A. Letsch, et al. (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): 6541-8.
- Kelly, L., J. Clark, et al. (2002). "Comprehensive genotypic analysis of leukemia: clinical and therapeutic implications." Curr Opin Oncol **14**(1): 10-8.

- Kessler, J. H., N. J. Beekman, et al. (2001). "Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis." J Exp Med **193**(1): 73-88.
- Kim, J., H. A. Reber, et al. (2006). "The clinical significance of MAGEA3 expression in pancreatic cancer." Int J Cancer **118**(9): 2269-75.
- Kohler, T., R. Plettig, et al. (2000). "Cytokine-driven differentiation of blasts from patients with acute myelogenous and lymphoblastic leukemia into dendritic cells." Stem Cells **18**(2): 139-47.
- Kolb, H. J., J. Mittermuller, et al. (1990). "Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients." Blood **76**(12): 2462-5.
- Kolb, H. J., A. Schattenberg, et al. (1995). "Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients." Blood **86**(5): 2041-50.
- Koslowski, M., O. Tureci, et al. (2002). "Multiple splice variants of lactate dehydrogenase C selectively expressed in human cancer." Cancer Res **62**(22): 6750-5.
- Kroschinsky F., W. H. (2008, 01.07.2008). "Klassifikation der AML." Retrieved 22.07.2011, 2011 ,from http://www.onkodin.de/e2/e51675/e52362/index_ger.html.
- Kufner, S., R. P. Fleischer, et al. (2005). "Serum-free generation and quantification of functionally active Leukemia-derived DC is possible from malignant blasts in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes." Cancer Immunol Immunother **54**(10): 953-70.
- Lanier, L. L., J. H. Phillips, et al. (1986). "Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function." J Immunol **137**(9): 2735-9.

- Lanzavecchia, A. and F. Sallusto (2001). "Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination." Nat Immunol **2**(6): 487-92.
- Larson, R. A., E. L. Sievers, et al. (2005). "Final report of the efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first recurrence." Cancer **104**(7): 1442-52.
- Lee, S. Y., Y. Obata, et al. (2003). "Immunomic analysis of human sarcoma." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(5): 2651-6.
- Lendvai, N., S. Gnjatic, et al. (2010). "Cellular immune responses against CT7 (MAGE-C1) and humoral responses against other cancer-testis antigens in multiple myeloma patients." Cancer Immun **10**: 4.
- Li, L., K. Giannopoulos, et al. (2006). "Immunotherapy for patients with acute myeloid leukemia using autologous dendritic cells generated from leukemic blasts." Int J Oncol **28**(4): 855-61.
- Li, L., P. Reinhardt, et al. (2005). "Dendritic cells generated from acute myeloid leukemia (AML) blasts maintain the expression of immunogenic leukemia associated antigens." Cancer Immunol Immunother **54**(7): 685-93.
- Li, Z., W. Li, et al. (2007). "A yeast two-hybrid system using Sp17 identified Ropporin as a novel cancer-testis antigen in hematologic malignancies." Int J Cancer **121**(7): 1507-11.
- LICR. (2009, 2009). "CTDatabase." Retrieved 18.11.2009, 2009, from <http://www.cta.lncc.br/>.
- Liggins, A. P., S. H. Lim, et al. "A panel of cancer-testis genes exhibiting broad-spectrum expression in haematological malignancies." Cancer Immun **10**: 8.

- Lim, S. H., S. Austin, et al. (1999). "Expression of testicular genes in haematological malignancies." Br J Cancer **81**(7): 1162-4.
- Lotzova, E., C. A. Savary, et al. (1987). "Inhibition of clonogenic growth of fresh leukemia cells by unstimulated and IL-2 stimulated NK cells of normal donors." Leuk Res **11**(12): 1059-66.
- Luetkens, T., P. Schafhausen, et al. (2010). "Expression, epigenetic regulation, and humoral immunogenicity of cancer-testis antigens in chronic myeloid leukemia." Leuk Res **34**(12): 1647-55.
- Mackensen, A., G. Carcelain, et al. (1994). "Direct evidence to support the immunosurveillance concept in a human regressive melanoma." J Clin Invest **93**(4): 1397-402.
- Mailander, V., C. Scheibenbogen, et al. (2004). "Complete remission in a patient with recurrent acute myeloid leukemia induced by vaccination with WT1 peptide in the absence of hematological or renal toxicity." Leukemia **18**(1): 165-6.
- Mandal, A., K. L. Klotz, et al. (2003). "SLLP1, a unique, intra-acrosomal, non-bacteriolytic, c lysozyme-like protein of human spermatozoa." Biol Reprod **68**(5): 1525-37.
- Martinez, A., I. Olarte, et al. (2007). "mRNA expression of MAGE-A3 gene in leukemia cells." Leuk Res **31**(1): 33-7.
- Matsushita, M., H. Ikeda, et al. (2001). "Quantitative monitoring of the PRAME gene for the detection of minimal residual disease in leukaemia." Br J Haematol **112**(4): 916-26.
- Meuwissen, R. L., I. Meerts, et al. (1997). "Human synaptonemal complex protein 1 (SCP1): isolation and characterization of the cDNA and chromosomal localization of the gene." Genomics **39**(3): 377-84.

- Michl, M. (2008). Basics Hämatologie. München [u.a.], Elsevier, Urban & Fischer.
- Miller, J. S., Y. Soignier, et al. (2005). "Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer." Blood **105**(8): 3051-7.
- Mitelman, F., S. Heim, et al. (1990). "Trisomy 21 in neoplastic cells." Am J Med Genet Suppl **7**: 262-6.
- Miyawaki, S., H. Sakamaki, et al. (2005). "A randomized, postremission comparison of four courses of standard-dose consolidation therapy without maintenance therapy versus three courses of standard-dose consolidation with maintenance therapy in adults with acute myeloid leukemia: the Japan Adult Leukemia Study Group AML 97 Study." Cancer **104**(12): 2726-34.
- Molldrem, J. J., P. P. Lee, et al. (2003). "Chronic myelogenous leukemia shapes host immunity by selective deletion of high-avidity leukemia-specific T cells." J Clin Invest **111**(5): 639-47.
- Molldrem, J. J., P. P. Lee, et al. (1999). "A PR1-human leukocyte antigen-A2 tetramer can be used to isolate low-frequency cytotoxic T lymphocytes from healthy donors that selectively lyse chronic myelogenous leukemia." Cancer Res **59**(11): 2675-81.
- Muzaffar, H., Qazilbash., et al. (2004). "Vaccination with the PR1 Leukemia-Associated Antigen Can Induce Complete Remission in Patients with Myeloid Leukemia." Blood.
- Nargosen, D. (2007). Antigen-spezifische T-Zell-Immunität und Antigen-präsentierende Zellen bei malignen Erkrankungen, Freie Universität Berlin.
- Niemeyer, P., O. Tureci, et al. (2003). "Expression of serologically identified tumor antigens in acute leukemias." Leuk Res **27**(7): 655-60.

- Oberthuer, A., B. Hero, et al. (2004). "The tumor-associated antigen PRAME is universally expressed in high-stage neuroblastoma and associated with poor outcome." Clin Cancer Res **10**(13): 4307-13.
- Oehler, V. G., K. A. Guthrie, et al. (2009). "The preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME) inhibits myeloid differentiation in normal hematopoietic and leukemic progenitor cells." Blood **114**(15): 3299-308.
- Ogino, S., K. Nosho, et al. (2009). "Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype." Clin Cancer Res **15**(20): 6412-20.
- Ohminami, H., M. Yasukawa, et al. (2000). "HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide." Blood **95**(1): 286-93.
- Oi, S., A. Natsume, et al. (2009). "Synergistic induction of NY-ESO-1 antigen expression by a novel histone deacetylase inhibitor, valproic acid, with 5-aza-2'-deoxycytidine in glioma cells." J Neurooncol **92**(1): 15-22.
- Old, L. J. (2001). "Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer." Cancer Immun **1**: 1.
- Ollinger, R., M. Alsheimer, et al. (2005). "Mammalian protein SCP1 forms synaptonemal complex-like structures in the absence of meiotic chromosomes." Mol Biol Cell **16**(1): 212-7.
- Ono, T., T. Kurashige, et al. (2001). "Identification of proacrosin binding protein sp32 precursor as a human cancer/testis antigen." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(6): 3282-7.
- Oshimi, K., Y. Oshimi, et al. (1986). "Cytotoxicity of interleukin 2-activated lymphocytes for leukemia and lymphoma cells." Blood **68**(4): 938-48.

- Ottinger, H., Müller, C.; Beelen, D.; Ehninger, G.; Schmitz, N., Zander, A.; Schrezenmeier, H. (2006, 13.04.2006). "Entwicklung in der hämatopoetischen Stammzelltransplantation." Retrieved 11.12.2011, 2011, from <http://www.aerzteblatt.de/v4/archiv/artikel.asp?id=52736>.
- Pabst, C., J. Zustin, et al. "Expression and prognostic relevance of MAGE-C1/CT7 and MAGE-C2/CT10 in osteolytic lesions of patients with multiple myeloma." Exp Mol Pathol **89**(2): 175-81.
- Pages, F., A. Berger, et al. (2005). "Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer." N Engl J Med **353**(25): 2654-66.
- Palucka, A. K., B. Laupeze, et al. (2005). "Immunotherapy via dendritic cells." Adv Exp Med Biol **560**: 105-14.
- Park, J. H., M. H. Song, et al. (2011). "Expression of the human cancer/testis antigen NY-SAR-35 is activated by CpG island hypomethylation." Biotechnol Lett **33**(6): 1085-91.
- Paydas, S., K. Tanriverdi, et al. (2005). "PRAME mRNA levels in cases with acute leukemia: clinical importance and future prospects." Am J Hematol **79**(4): 257-61.
- Pellat-Deceunynck, C., M. P. Mellerin, et al. (2000). "The cancer germ-line genes MAGE-1, MAGE-3 and PRAME are commonly expressed by human myeloma cells." Eur J Immunol **30**(3): 803-9.
- Penn, I. (2000). "Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression." Drug Saf **23**(2): 101-13.
- Porter, D. L., M. S. Roth, et al. (1996). "Adoptive immunotherapy with donor mononuclear cell infusions to treat relapse of acute leukemia or myelodysplasia after allogeneic bone marrow transplantation." Bone Marrow Transplant **18**(5): 975-80.

- Potzsch, C., T. Voigtlander, et al. (2002). "p53 Germline mutation in a patient with Li-Fraumeni Syndrome and three metachronous malignancies." J Cancer Res Clin Oncol **128**(8): 456-60.
- Pui, C. H., R. C. Ribeiro, et al. (1991). "Acute myeloid leukemia in children treated with epipodophyllotoxins for acute lymphoblastic leukemia." N Engl J Med **325**(24): 1682-7.
- Qin, Y., H. Zhu, et al. (2009). "Expression patterns of WT1 and PRAME in acute myeloid leukemia patients and their usefulness for monitoring minimal residual disease." Leuk Res **33**(3): 384-90.
- Quintarelli, C., G. Dotti, et al. (2008). "Cytotoxic T lymphocytes directed to the preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) target chronic myeloid leukemia." Blood **112**(5): 1876-85.
- Reichardt, V. L. and P. Brossart (2005). "Dendritic cells in clinical trials for multiple myeloma." Methods Mol Med **109**: 127-36.
- Renkvist, N., C. Castelli, et al. (2001). "A listing of human tumor antigens recognized by T cells." Cancer Immunol Immunother **50**(1): 3-15.
- Rezvani, K., A. S. Yong, et al. (2009). "Ex vivo characterization of polyclonal memory CD8+ T-cell responses to PRAME-specific peptides in patients with acute lymphoblastic leukemia and acute and chronic myeloid leukemia." Blood **113**(10): 2245-55.
- Riener, M. O., P. J. Wild, et al. (2009). "Frequent expression of the novel cancer testis antigen MAGE-C2/CT-10 in hepatocellular carcinoma." Int J Cancer **124**(2): 352-7.
- Ritz, J., R. E. Schmidt, et al. (1988). "Characterization of functional surface structures on human natural killer cells." Adv Immunol **42**: 181-211.

- Robert, M. and C. Gagnon (1999). "Semenogelin I: a coagulum forming, multifunctional seminal vesicle protein." Cell Mol Life Sci **55**(6-7): 944-60.
- Ross, M. T., D. V. Grafham, et al. (2005). "The DNA sequence of the human X chromosome." Nature **434**(7031): 325-37.
- Sack, U. (2007). Zelluläre Diagnostik : Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie ; 163 Tabellen. Basel [u.a.], Karger.
- Sahin, U., O. Tureci, et al. (1995). "Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(25): 11810-3.
- Sandler, D. P., D. L. Shore, et al. (1993). "Cigarette smoking and risk of acute leukemia: associations with morphology and cytogenetic abnormalities in bone marrow." J Natl Cancer Inst **85**(24): 1994-2003.
- Santamaria, C., M. C. Chillon, et al. (2008). "The relevance of preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) as a marker of disease activity and prognosis in acute promyelocytic leukemia." Haematologica **93**(12): 1797-805.
- Santamaria, C. M., M. C. Chillon, et al. (2009). "Molecular stratification model for prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia." Blood **114**(1): 148-52.
- Sanz, M. A., P. Montesinos, et al. (2008). "Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy: long-term outcome of the LPA 99 multicenter study by the PETHEMA Group." Blood **112**(8): 3130-4.
- Sato, E., S. H. Olson, et al. (2005). "Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(51): 18538-43.

- Savary, C. A. and E. Lotzova (1989). "Natural killer cell-mediated inhibition of growth of myeloid and lymphoid clonogenic leukemias." Exp Hematol **17**(2): 183-7.
- Scandura, J. M., P. Boccuni, et al. (2002). "Transcription factor fusions in acute leukemia: variations on a theme." Oncogene **21**(21): 3422-44.
- Scanlan, M. J., C. M. Gordon, et al. (2002). "Identification of cancer/testis genes by database mining and mRNA expression analysis." Int J Cancer **98**(4): 485-92.
- Scanlan, M. J., A. J. Simpson, et al. (2004). "The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary." Cancer Immun **4**: 1.
- Schmetzer, H. M., H. H. Gerhartz, et al. (1999). "GM-CSF stimulates proliferation of clonal leukemic bone marrow cells in acute myeloid leukemia (AML) in vitro." Ann Hematol **78**(10): 449-55.
- Schmid, C., M. Labopin, et al. (2007). "Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party." J Clin Oncol **25**(31): 4938-45.
- Schmidt, S. M., K. Schag, et al. (2003). "Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells." Blood **102**(2): 571-6.
- Schmitt, M., R. Casalegno-Garduno, et al. (2009). "Peptide vaccines for patients with acute myeloid leukemia." Expert Rev Vaccines **8**(10): 1415-25.
- Schmitt, M., A. Schmitt, et al. (2008). "RHAMM-R3 peptide vaccination in patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, and multiple myeloma elicits immunologic and clinical responses." Blood **111**(3): 1357-65.

- SEER. (Nov. 2010, 2011). "SEER Stat Fact Sheets: Acute Myeloid Leukemia." 2011, from <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html#survival>.
- Siegel, S., A. Wagner, et al. (2003). "Induction of cytotoxic T-cell responses against the oncofetal antigen-immature laminin receptor for the treatment of hematologic malignancies." Blood **102**(13): 4416-23.
- Sigalotti, L., E. Fratta, et al. (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): 9167-71.
- Simpson, A. J., O. L. Caballero, et al. (2005). "Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer." Nat Rev Cancer **5**(8): 615-25.
- Smith, M. L., J. D. Cavenagh, et al. (2004). "Mutation of CEBPA in familial acute myeloid leukemia." N Engl J Med **351**(23): 2403-7.
- Smith, M. T., Y. Wang, et al. (2001). "Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity is associated with increased risk of acute leukemia in adults." Blood **97**(5): 1422-6.
- Steinbach, D., J. Hermann, et al. (2002). "Clinical implications of PRAME gene expression in childhood acute myeloid leukemia." Cancer Genet Cytogenet **133**(2): 118-23.
- Stockert, E., E. Jager, et al. (1998). "A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens." J Exp Med **187**(8): 1349-54.
- Stone, R. M. (2009). "Prognostic factors in AML in relation to (ab)normal karyotype." Best Practice & Research Clinical Haematology **22**(4): 523-528.

- Tajeddine, N., J. L. Gala, et al. (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): 7348-55.
- Tajeddine, N., M. Louis, et al. (2008). "Tumor associated antigen PRAME is a marker of favorable prognosis in childhood acute myeloid leukemia patients and modifies the expression of S100A4, Hsp 27, p21, IL-8 and IGFBP-2 in vitro and in vivo." Leuk Lymphoma **49**(6): 1123-31.
- Tanaka, N., Y. H. Wang, et al. (2011). "Inhibition of PRAME expression causes cell cycle arrest and apoptosis in leukemic cells." Leuk Res **35**(9): 1219-25.
- Thiede, C., S. Koch, et al. (2006). "Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML)." Blood **107**(10): 4011-20.
- Thomas, X., E. Raffoux, et al. (2007). "Effect of priming with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in younger adults with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a trial by the Acute Leukemia French Association (ALFA) Group." Leukemia **21**(3): 453-61.
- Thompson, L. W., L. Brinckerhoff, et al. (2000). "Vaccination for melanoma." Curr Oncol Rep **2**(4): 292-9.
- Tomsova, M., B. Melichar, et al. (2008). "Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in ovarian carcinoma." Gynecol Oncol **108**(2): 415-20.
- Trinchieri, G. (1989). "Biology of natural killer cells." Adv Immunol **47**: 187-376.
- van Baren, N., H. Chambost, et al. (1998). "PRAME, a gene encoding an antigen recognized on a human melanoma by cytolytic T cells, is expressed in acute leukaemia cells." Br J Haematol **102**(5): 1376-9.

- Van den Eynde, B. J. and P. van der Bruggen (1997). "T cell defined tumor antigens." Curr Opin Immunol **9**(5): 684-93.
- van der Bruggen, P., C. Traversari, et al. (1991). "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma." Science **254**(5038): 1643-7.
- Vardiman, J. W., N. L. Harris, et al. (2002). "The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms." Blood **100**(7): 2292-302.
- Velazquez, E. F., A. A. Jungbluth, et al. (2007). "Expression of the cancer/testis antigen NY-ESO-1 in primary and metastatic malignant melanoma (MM)--correlation with prognostic factors." Cancer Immun **7**: 11.
- Vissers, J. L., I. J. De Vries, et al. (1999). "The renal cell carcinoma-associated antigen G250 encodes a human leukocyte antigen (HLA)-A2.1-restricted epitope recognized by cytotoxic T lymphocytes." Cancer Res **59**(21): 5554-9.
- Vonderheide, R. H., W. C. Hahn, et al. (1999). "The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes." Immunity **10**(6): 673-9.
- Wadelin, F., J. Fulton, et al. "Leucine-rich repeat protein PRAME: expression, potential functions and clinical implications for leukaemia." Mol Cancer **9**: 226.
- Wang, R. F. and S. A. Rosenberg (1999). "Human tumor antigens for cancer vaccine development." Immunol Rev **170**: 85-100.
- Wang, Z., Y. Zhang, et al. (2004). "The spermatozoa protein, SLLP1, is a novel cancer-testis antigen in hematologic malignancies." Clin Cancer Res **10**(19): 6544-50.
- Weber, J., M. Salgaller, et al. (1994). "Expression of the MAGE-1 tumor antigen is up-regulated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine." Cancer Res **54**(7): 1766-71.

- Weber, J. S., N. J. Vogelzang, et al. (2011). "A Phase 1 Study of a Vaccine Targeting Preferentially Expressed Antigen in Melanoma and Prostate-specific Membrane Antigen in Patients With Advanced Solid Tumors." J Immunother **34**(7): 556-67.
- Wong, R., M. Shahjahan, et al. (2005). "Prognostic factors for outcomes of patients with refractory or relapsed acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndromes undergoing allogeneic progenitor cell transplantation." Biol Blood Marrow Transplant **11**(2): 108-14.
- Yakirevich, E., E. Sabo, et al. (2003). "Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in serous ovarian neoplasms." Clin Cancer Res **9**(17): 6453-60.
- Yang, B., S. M. O'Herrin, et al. (2007). "MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines." Cancer Res **67**(20): 9954-62.
- Zendman, A. J., D. J. Ruiter, et al. (2003). "Cancer/testis-associated genes: identification, expression profile, and putative function." J Cell Physiol **194**(3): 272-88.
- Zhang, L., J. R. Conejo-Garcia, et al. (2003). "Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer." N Engl J Med **348**(3): 203-13.
- Zhao, H., W. H. Lee, et al. (2008). "Identification of novel semenogelin I-derived antimicrobial peptide from liquefied human seminal plasma." Peptides **29**(4): 505-11.
- Zhou, P. Y., W. J. Li, et al. (2007). "[Expression of PRAME gene in adult acute leukemia and its significance in prognosis]." Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi **15**(6): 1177-81.

Zhu, Y. L., J. Liu, et al. (2007). "[Expression of PRAME gene in acute leukemia and its clinical significance]." Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi **15**(6): 1144-9.

Tabellen

Tabelle 1: FAB-Klassifikation der AML (Kroschinsky F. 2008)

FAB-SUBTYP	BEZEICHNUNG
MO	AML mit minimaler myeloischer Differenzierung
M1	AML ohne Ausreifung
M2	AML mit Ausreifung bzw. mit t(8;21) (AML1/ETO)
M3	Akute Promyelozytenleukämie
M3V	AML mit t(15;17) (PML/RARa)
M4	Akute myelomonozytäre Leukämie
M4Eo	AML mit inv16 oder t(16;16) (CBFβ/MYH11)
M5A	Akute Monoblastenleukämie
M5B	Akute Monozytenleukämie
M6	Akute Erythroleukämie
M7	Akute Megakaryoblastenleukämie

Tabelle 2: WHO-Klassifikation der AML (Kroschinsky F. 2008)

KATEGORIEN	LEUKÄMIEFORM
AML mit typischen zytogenetischen Veränderungen	<ul style="list-style-type: none"> • AML mit t(8;21)(q22;q22); AML1/ETO • AML mit abnormen Knochenmark-eosinophilen und inv(16)(p13;q22); CBFβ/MYH11 • Akute Promyelozyteleukämie - AML M3 mit t(15;17)(q22;q11-12) (PML/RARα) - und Varianten • AML mit 11q23-(MLL-)Anomalien
AML mit multilineärer Dysplasie (mindestens 2 Linien betroffen)	<ul style="list-style-type: none"> • AML mit vorausgegangener Myelodysplasie/myeloproliferativem Syndrom • De-novo-AML ohne vorausgegangenes Syndrom
Therapieinduzierte AML und therapieinduziertes myelodysplastisches Syndrom (MDS)	<ul style="list-style-type: none"> • AML/MDS nach Gabe von Alkylanzien • AML/MDS nach Therapie mit Topoisomerase-II-Inhibitoren • AML/MDS nach sonstiger Chemo-/Strahlentherapie
AML ohne andere Einordnungsmöglichkeit	<ul style="list-style-type: none"> • AML, minimal differenziert (FAB M0) • AML ohne Ausreifung (FAB M1) • AML mit Ausreifung (FAB M2) • Akute myelomonozytäre Leukämie (FAB M4) • Akute monozytäre Leukämie (FAB M5a, b) • Akute Erythroleukämie (FAB M6) • Akute Megakaryoblastenleukämie (FAB M7/) • Akute Basophilenleukämie • Akute Panmyelose mit Myelofibrose • Myelosarkom/Chlorom

Tabelle 3: Primersequenzen, Anlagerungstemperatur und Größe

GEN	PRIMERSEQUENZ		°C	BP
GAPDH	For.	5'-TGA TGA CAT CAA GAA GGT GG-3'	60°C	246
	Rev.	5'-TTT CTT ACT CCT TGG AGG CC-3'		
MAGE-A3 / CT1.3	For.	5'-GAA GCC GGC CCA GGC TCG-3'	60°C	432
	Rev.	5'-GAA GTC CTC ATA GGA TTG GCT-3'		
NY-SAR-35 / CT37	For.	5'-CTT GGT GCG ATC AGC CTT AT-3'	55°C	375
	Rev.	5'-TTG ATG CAT GAA AAC AGA ACT C-3'		
PRAME / CT130	For.	5'-CTG TAC TCA TTT CCA GAG CCA GA-3'	63°C	556
	Rev.	5'-TAT TGA GAG GGT TTC CAA GGG GTT-3'		
ROPN-1 / CT91	For.	5'-GCG AAT TCA TGG CTC AGA CAG ATA AGC-3'	66°C	652
	Rev.	5'-ATG GAT CCG TTA CTC CAG CCA AAC CCT-3'		
SCP-1 / CTB	For.	5'-GTA CAG CAG AAA GCA AGC AAC TGA ATG-3'	55°C	564
	Rev.	5'-GAA GGA ACT GCT TTA GAA TCC AAT TTC C-3'		
SLLP-1 / CT54	For.	5'-AAG CTC TAC GGT CGT TGT GAA CTG-3'	66°C	387
	Rev.	5'-CTA GAA GTC ACA GCC ATC CAC CCA-3'		
SPO11 / CT35	For.	5'-AAG ATA CAT CGA GGA AGA TGG-3'	60°C	676
	Rev.	5'-CTC TGG CAA TCA GAG TTC TTC-3'		

Tabelle 4: Verwendete Materialien

Zellseparation		
Ficoll Paque	Biochrom AG	Berlin, Deutschland
Phosphate-buffered saline	Gibcoll	Paisley, GB
Zentrifuge Megafuge 1.OR	Heraeus	Hanau, Deutschland
2-β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, Deutschland
Trypan blue solution 0,4%	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
Mikroskop Telaval 31	Zeiss	Jena, Deutschland
RLT-Puffer	Quiagen	Hilden, Deutschland
RNA-Isolation und Spektrometrie		
Rneasy Mini Kit	Quiagen	Hilden, Deutschland
Quiashredder	Quiagen	Hilden, Deutschland
70% Ethanol	J.T. Baker	Denver, Niederlande
DEPC-behandeltes Wasser	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Mikrozentrifugenröhrchen	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Eppendorf Bio Photometer	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
UVette	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
cDNA-Synthese		
10xPuffer	Promega	Mannheim, Deutschland
MgCl ₂	Promega	Mannheim, Deutschland
Random Primer	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
dNTP (dATP, dGTP, dUTP, dCTP)	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
RNAsin	Promega	Mannheim, Deutschland
AMV Reverse Transcriptase	Promega	Mannheim, Deutschland
DEPC-behandeltes Wasser	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Mastercycler Gradient	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
RT-PCR		
MgCl ₂	PerkinElmer	Waltham, MA, USA
10xPuffer	PerkinElmer	Waltham, MA, USA
dNTP (dATP, dGTP, dUTP, dCTP)	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Custom Primer	MWG-Biotech	Ebersberg, Deutschland
AmpliTaQGold	PerkinElmer	Waltham, MA, USA
DEPC-behandeltes Wasser	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
0,2ml Röhrchen-Kette	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Human Testis RNA	Ambion	Austin, TX, USA
Mastercycler Gradient	Eppendorf	Hamburg, Deutschland

Gelelektrophorese		
Tris base	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Aqua Bidest	Th. Geyer	Berlin, Deutschland
100%ige Essigsäure	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
EDTA (0,5M EDTA, pH 8)	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
DEPC-behandeltes Wasser	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Elektrophoresekammer 1000/500	Bio-Rad	München, Deutschland
Ethidiumbromid	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
The Imager (CCD-Kamera)	Appligene	Cedex, Frankreich
Sequenzierung		
Qiaquick Gel Extraction Kit	Quiagen	Hilden, Deutschland
Isopropanol	Fluka	Buchs, Schweiz
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG	Zürich, Schweiz
Wasserbad	GFL	Burgwedel, Deutschland
Eppendorf Centrifuge	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
0,5ml Eppendorf Röhrchen	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
BigDyeKit V.1.1	Applied Biosystems	Foster City, CA, USA
Primer	MWG Biotech	Ebersberg, Deutschland
DEPC-behandeltes Wasser	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Mastercycler Gradient	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
100%-Ethanol	J.T. Baker	Denventer, Niederlande
70%-Ethanol	J.T. Baker	Denventer, Niederlande
Zentrifuge, Biofuge 13R	Heraeus Sepatech	Hanau, Deutschland
Speedvac, Hetovac, Intermed CT60 e	Heto	Holten, Deutschland
ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems	Foster City, CA, USA

Tabelle 5: Eigenschaften des Patientenkollektivs

Eigenschaft	Anzahl der Patienten	Expression von mindestens einem CT Antigen	Signifikanz
Gesamt	64	57,8%	
Geschlecht Frauen Männer	29 35	69,0% 48,6%	p=0,103
Alter bei Erstdiagnose (Range: 20 bis 79 Jahre) < 55 Jahre ≥ 55 Jahre	28 36	50,0% 63,9%	P=0,272
zytogenetisches Risiko low risk intermediate risk high risk	7 29 13	85,7% 58,6% 53,8%	p=0,220
Vortherapie keine Vortherapie konventionelle Chemotherpaie	32 23	59,4% 56,5%	p=0,836
FAB Klassifikation M0 M1 M2 M3 M4 M4Eo M5 M5a M5b	3 11 14 1 18 3 1 1 1	100% 45,5% 78,6% 100% 55,6% 33,3% 0% 0% 100%	p=0,234

Tabelle 6: Eigenschaften der Proben

Eigenschaften	Anzahl der Proben	Expression von mindestens einem CT-Antigen	Signifikanz
Gesamt	94	61,7%	
Art Knochenmark peripheres Blut	52 42	55,8% 69,0 %	p=0,192
Blastenkonzentration in Knochenmarkproben (Range 0% bis 99%) 0-20% 21-50% >50%	14 13 16	71,4% 46,2% 56,3%	p=0,435
Blastenkonzentration in peripheren Blutproben (Range 2% bis 91%) 0-20% 21-50% >50%	7 3 13	42,9% 100% 69,2%	p=0,330

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Bokemeyer, dem Direktor der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf, für die Möglichkeit, meine Dissertation in seiner Abteilung zu erstellen.

Für die zugrundeliegende Idee und die Betreuung bei der Umsetzung der Arbeit möchte ich mich bei meinem Betreuer PD. Dr. Atanackovic recht herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank geht an das Laborteam um Katrin Bartels, Sabrina Meyer und York Hildebrandt. Ohne die unermüdliche Anleitung und Unterstützung bei der praktischen Laborarbeit wäre die Umsetzung der Dissertation nicht gelungen.

Mein Dank geht auch an Dr. Tim Luetkens, der bei Fragen immer zur Verfügung stand und mit seinen schnellen Rückmeldungen stets bereit war bei Problemen weiterzuhelfen.

Bedanken möchte ich mich bei meiner Freundin Sarah Teising für ihre Geduld und ihre Hilfe bei der Korrektur sowie bei Gregor Fuchs für die Vorarbeit im Labor.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern Astrid und Josef Kloth für die fortwährende, nicht nur finanzielle Unterstützung bedanken, die mir das Medizinstudium erst ermöglicht hat.

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:

Benjamin Kloth