

UNIVERSITÄT HAMBURG

II. MEDIZINISCHE KLINIK

PROF. DR. MED. CARSTEN BOKEMEYER

**Charakterisierung der
B-Zell-Immunantwort nach allogener
Stammzelltransplantation beim Multiplen
Myelom**

DISSERTATION

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

Vorgelegt von
Fabian HOFMANN
aus Frankfurt am Main

Hamburg 2016

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 20.10.2016**

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

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Prof. Dr. M. Binder

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. H. Thude

Saturday, Nov. 1st 1845

DEAR DR. JONES,-The tube contains urine of very highspecific gravity. When boiled it becomes slightly opaque. On the addition of nitric acid, it effervesces, assumes a reddish hue, and becomes quite clear; but as it cools, assumes the consistence and appearance which you see. Heat reliquifies it. What is it?

Brief von Thomas Watson an Henry Bence Jones über den Urin des Multiplen Myelom Patienten Thomas Alexander McBean, zitiert nach (Bence Jones, 1847)

Die Ergebnisse dieser Dissertationsschrift wurden teilweise bereits veröffentlicht in (Schieferdecker et al. 2016)

Inhaltsverzeichnis

Inhalt	iv
Abbildungsverzeichnis	viii
Tabellenverzeichnis	x
Arbeitshypothese und Fragestellung	xii
1 Einleitung	1
1.1 Das Multiple Myelom	1
Pathogenese	2
Differentialdiagnose monoklonaler Gammopathien	2
Klinisches Bild	2
Klassifikation	4
Staging	4
Therapie	5
Hochdosis-Therapie	6
Nicht-Hochdosis-Therapie	7
1.2 Allogene Knochenmarktransplantation beim Multiplen Myelom	7
Eigenschaften der allogenen Knochenmarktransplantation	7
Graft-versus-Host-Disease	9
akute Graft-versus-Host-Disease	9
1.3 Anti-Tumor-Immunität beim MM	10
1.3.1 Immunüberwachung	10
1.3.2 Beeinflussung der Anti-Tumor-Immunität durch die MM-Therapie	10
Der immunogene Zelltod	10
Die spezifische Immuntherapie	11
Der Graft-versus-Myeloma-Effekt der allo-Tx	12
Oligoklonale Banden	13
1.4 Erklärung essentieller Begriffe dieser Dissertation	13
1.4.1 Antikörper	13
1.4.2 Bakteriophage M13	14
Struktur	14
1.4.3 Epitop	15
1.4.4 Mimotop	15

2	Material und Methoden	16
2.1	Material	16
2.1.1	Selektions- und Kontroll-Antikörper	16
2.1.2	Phagen und Bakterien	16
	Ph.D. TM Phage Display Peptide Library	16
2.1.3	Chemikalien	17
2.1.4	Geräte	19
2.1.5	Verbrauchsmaterialien	20
2.1.6	Stocklösungen	21
2.1.7	Rezepte	21
2.2	Methoden	23
2.2.1	Trennung der Antikörper-Fraktionen mittels KappaSelect	23
2.2.2	Überprüfung der Reinheit von Antikörper-Fraktionen mittels Western Blot	24
2.2.3	Phagedisplay	25
	0. Tag – Vorbereitung	26
	1. Tag – 1. Selektion / 1. Amplifikation	26
	2. Tag – 2. Selektion	26
	3. Tag – 2. Amplifikation	26
	4. Tag – 3. Selektion	27
	5. Tag – Herstellung von Einzelphagenklonen	27
	6. Tag – ELISA mit unreinem Phagenamplifikat	27
	Weiteres Vorgehen	27
	2.2.3.1 Phagenselektion	27
	2.2.3.2 Phagenamplifikation	28
2.2.4	Herstellung von Phageneinzelklonen	29
	1. Schritt – unreines Phagenamplifikat	29
	2. Schritt – reines Phagenamplifikat	30
2.2.5	Phagentitration	30
2.2.6	ELISA zur Testung der Bindungsstärke zwischen Phage und Antikörper	31
2.2.7	DNA-Extraktion aus den Phagen	32
2.2.8	Sequenzierung der Phagen-DNA	33
2.2.9	Übersetzung der sequenzierten DNA in eine Aminosäuresequenz	33
2.2.10	Zeitlicher Verlauf der humoralen Immunantwort	33
2.2.11	Kreuzreaktivitäts-Analyse	34
2.2.12	Statistische Methodik	35
	In den Kreuzreaktivitäts-ELISAs	35
3	Ergebnis	36
3.1	Auftrennung der Antikörper mittels kappaSelect	36
3.2	Auf den post-Tx Antikörpern selektierte Phagen	38
3.2.1	MM023	39
	kappa	39
	lambda	39
3.2.2	MM025	39
	kappa	39

	lambda	39
3.2.3	MM031	39
	kappa	39
	lambda	39
3.2.4	MM043	40
	kappa	40
	lambda	40
3.2.5	MM046	40
	kappa	40
	lambda	40
3.2.6	MM051	40
	kappa	40
	lambda	40
3.2.7	MM054	41
	kappa	41
	lambda	41
3.3	Zeitlicher Verlauf der humoralen Immunantwort	48
3.4	Kreuzreaktivitäts-Analyse	49
4	Diskussion	53
4.1	Übersicht	53
4.2	Diskussion der angewendeten Methodik	54
4.2.1	Trennung der Antikörper in ihren κ - und λ -Anteil	54
4.2.2	Phagedisplay zum Epitopmapping von Phagen	54
4.2.3	ELISA zur Evaluation der Bindungsstärke	54
	Zur Testung der gewonnenen Klone auf dem jeweiligen Antikörper	54
	Im Kreuzreaktivitätsessay	55
4.3	Epitope der humoralen Anti-Tumor-Immunantwort	55
4.3.1	Bisherige Arbeiten zur Anti-Tumor-Immunität beim <i>MM</i>	55
	Antigenidentifikation mittels SEREX	55
4.3.2	Epitopsuche in dieser Arbeit	56
4.4	Hypothese zur Entstehung und Funktion der post-Tx Antikörper	56
4.5	Zeitlicher Verlauf der humoralen Immunantwort	57
4.6	Kreuzreaktivitäten	57
4.7	Aussicht	59
4.7.1	Zusammenschau meiner Ergebnisse mit denen anderer Mitglieder meiner Arbeitsgruppe	59
4.7.2	Polyepitopreaktivität in der klinischen Anwendung	59
4.7.3	Nutzung der Phagen zur Tumorstimmung	60
4.7.4	Nutzung der klassifizierten Antikörper zur passiven Immuntherapie	60
A	Durch andere Mitarbeiter der Arbeitsgruppe durchgeführte Experimente	61
A.1	Durch ander Mitarbeiter der Arbeitsgruppe durchgeführte Selektionen	61
A.2	Mittels Immunoblot gefundene Targets der B-Zell-Anti-Tumor-Antwort	65

Zusammenfassung	67
Abstract	68
Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikation	69
Abkürzungen	70
Literatur	71
Danksagung	86
Lebenslauf	87
Eidesstattliche Erklärung	88

Abbildungsverzeichnis

1.1	Inzidenz des Multiplen Myeloms nach Lebensalter in Deutschland (im Jahr 2008), nach Daten des Robert Koch Instituts (Kaatsch et al. 2013)	2
1.2	Pathogenese von MGUS und der Progression zum Multiplen Myelom	3
1.3	Therapiealgorithmus bei neu-diagnostiziertem <i>MM</i>	6
1.4	Darstellung der für die Proliferation des <i>MM</i> förderlichen und immunsuppressiven Faktoren der Knochenmarknische sowie die Anti-Tumor-Immunität. Aus (Guillerey et al. 2016).	11
1.5	Struktur des Immunglobulin G	14
1.6	Bakteriophage M13	15
2.1	Beschickung des Gels zur Überprüfung der Reinheit von aufgetrennter IgGs	24
2.2	Prinzip des Phagedisplay. Von S. Jähnichen - Eigenes Werk, CC BY-SA 3.0, https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=8281540	25
2.3	Schema der Selektionsrunden	29
2.4	Schema des Sandwich-ELISAs	32
2.5	Übersicht des ELISA-Aufbaus	32
3.1	Westernblot zur Überprüfung der Reinheit der Lambda-Fractionen von Kappa-Kontaminationen von MM023, MM025 und MM031. (EF= Elutionsfraktion). Die Grafik wurde nachbearbeitet (Skala neu eingefügt, Beschriftung).	36
3.2	Westernblot zur Überprüfung der Reinheit der Kappa-Fractionen von Lambda-Kontaminationen von MM023, MM025 und MM031. (EF= Elutionsfraktion). Die Grafik wurde nachbearbeitet (Skala neu eingefügt, Beschriftung).	37
3.3	Westernblot zur Überprüfung der Reinheit der Lambda-Fractionen von Kappa-Kontaminationen von MM043, MM046, MM051 und MM054. Die Grafik wurde nachbearbeitet (Skala neu eingefügt, Beschriftung).	37
3.4	Westernblot zur Überprüfung der Reinheit der Kappa-Fractionen von Lambda-Kontaminationen von MM043, MM046, MM051 und MM054. Die Grafik wurde nachbearbeitet (Skala neu eingefügt, Beschriftung, abgerissene Ecke wieder angefügt).	38
3.5	ELISA zur Evaluation der Bindungsstärke und zugehörige Sequenzen von MM023 κ	41
3.6	ELISA zur Evaluation der Bindungsstärke und zugehörige Sequenzen von MM025 κ	42
3.7	ELISA zur Evaluation der Bindungsstärke und zugehörige Sequenzen von MM031 κ (beide Daten)	43

3.8	ELISA zur Evaluation der Bindungsstärke und zugehörige Sequenzen von MM043 κ	44
3.9	ELISA zur Evaluation der Bindungsstärke und zugehörige Sequenzen von MM043 λ	44
3.10	ELISA zur Evaluation der Bindungsstärke und zugehörige Sequenzen von MM046 κ	45
3.11	ELISA zur Evaluation der Bindungsstärke und zugehörige Sequenzen von MM046 λ	46
3.12	ELISA zur Evaluation der Bindungsstärke und zugehörige Sequenzen von MM051 κ	46
3.13	ELISA zur Evaluation der Bindungsstärke und zugehörige Sequenzen von MM054 κ	47
3.14	Verlauf der humoralen Immunantwort gegenüber 1243.5 (ALRMPTMKTFIP) von MM023 (Allo-Tx im April 2009)	48
3.15	Verlauf der humoralen Immunantwort gegenüber 160.4 (TYPIHGALSKGG) von MM031 (Allo-Tx im Mai 2010)	49
3.16	Relative Bindungsstärke der jeweiligen Phagen an die Antikörper der post-Tx-MM-Patienten (*:p \leq 0,05; **:p \leq 0,001)	50
3.17	Relative Bindungsstärke der jeweiligen Phagen an die Antikörper der gesunden Kontrollen (HD) und der aus anderer Indikation allogenen Knochenmarks transplantierten (KMT) (*:p \leq 0,05; **:p \leq 0,001)	51
4.1	Wege des immunogenen Zelltodes über die Sekretion oder Translokation an die Zelloberfläche von HSP.	58
A.1	Gefundene Phagen und Konsensmotiv auf MM023 λ . Experiment durchgeführt von M. Binder.	61
A.2	Gefundene Phagen und Konsensmotiv auf MM040 κ . Experiment durchgeführt von M. Voigt.	62
A.3	Gefundene Phagen und Konsensmotiv auf MM040 λ . Experiment durchgeführt von M. Voigt.	62
A.4	Gefundene Phagen und Konsensmotiv auf MM041 λ . Experiment durchgeführt von M. Voigt.	63
A.5	Gefundene Phagen und Konsensmotiv auf MM045 κ . Experiment durchgeführt von M. Voigt.	63
A.6	Gefundene Phagen und Konsensmotiv auf MM045 λ . Experiment durchgeführt von M. Voigt.	64
A.7	Gefundene Phagen und Konsensmotiv auf MM047 κ . Experiment durchgeführt von M. Voigt.	64
A.8	Gefundene Phagen und Konsensmotiv auf MM047 λ . Experiment durchgeführt von M. Voigt.	65

Tabellenverzeichnis

1.1	Kriterien zur Differenzialdiagnose der monoklonalen Gammopathien . . .	4
1.2	Staging-System nach (Durie und Salmon, 1975), Tabelle nach (Kortüm et al. 2013) (modifiziert), sowie das <i>International Staging System</i> der <i>IMWG</i> nach (Greipp et al. 2005) (modifiziert)	5
1.3	Klassifikation des Ansprechens von <i>MM</i> -Patienten auf eine Therapie . . .	8
1.4	Einteilung der akuten Graft-versus-Host-Disease	9
2.1	Details zum Subtyp des <i>MM</i> der Patienten und dem Ansprechen auf die allogene Stammzelltransplantation	17
2.2	Verwendete Phagen-Datenbank sowie der zur Zucht benutzte bakterielle Vektor	17
2.3	Zur Sequenzierung verwendeter Primer <i>-96 gIII</i>	17
2.4	Aminosäuresequenz des zur Kontrolle verwendeten Phagen R1	17
2.5	Verwendete Antikörper	18
2.6	Verwendete Chemikalien	18
2.7	Verwendete Geräte	19
2.8	Verwendete Verbrauchsmaterialien	20
2.9	Häufigkeit und Dauer der Depletion der Phagen mittels polyklonalem IgG in den jeweiligen Selektionsrunden	28
2.10	PBS-Beschickung einer 96-Well-Platte für die Phagentitration. Alle Angaben in Mikroliter (μl)	31
2.11	Für den zeitlichen Verlauf verwendete Phagen und Antikörper	33
2.12	Verwendete Phagen und die von ihnen präsentierte Aminosäuresequenz	34
3.1	Erkannte Motive der verschiedenen Fraktionen	52
3.2	Verwendete Phagen und die Häufigkeit ihrer Erkennung	52
3.3	χ^2 -Test zum Nachweis einer signifikanten Abhängigkeit der Tiefe der Remission zu der Menge der erkannten Epitope	52
A.1	Durch (Rahlff et al. 2012) mittels Immunoblot gefundene Targets der B-Zell-Anti-Tumor-Antwort	66

Für Sandra und meine Eltern

Arbeitshypothese und Fragestellung

Patienten mit *Multiple Myelom* können nach einer allogenen Knochenmarktransplantation abnorme Proteinbanden in der Immunfixation entwickeln. Diese gehen mit einer Verbesserung der Prognose einher und gelten als B-Zell-vermittelte Anti-Tumor-Immunantwort. Tumor-Epitope gegen welche eine B-Zell-Immunantwort post-Tx entwickelt werden kann, sind bisher nicht näher beschrieben. Um diese Frage zu klären, wurden per Phagedisplay Mimotope gesucht, gegen die sieben Patienten post-Tx spezifische Antikörper bildeten, um dann auf Tumor-Epitope schließen zu können. Zur weiteren Charakterisierung der gefundenen Mimotope wurde per ELISA untersucht in welchem Umfang Antikörper gegen diese (und weitere zuvor selektierte) Phagen bei zwölf verschiedenen *MM*-Patienten post-Tx sowie bei gesunden Spendern und bei post-allo-Tx-Patienten ohne *MM* vorkommen. Ebenfalls wurde per ELISA untersucht wie sich die B-Zell-Anti-Tumor-Immunantwort über die Zeit entwickelt. Ziel dieser Arbeit ist es, ein genaueres Verständnis der humoralen Anti-Tumor-Immunität nach *allo-Tx* zu erlangen, indem die dazugehörigen Epitope identifiziert und hinsichtlich ihrer Spezifität evaluiert werden. Durch die genaue Beschreibung der post-Tx gebildeten Antikörper in dieser Arbeit soll ermöglicht werden, die Erkenntnisse im Sinne von aktiven und passiven Immuntherapien nutzbar zu machen, ohne dabei die Nachteile einer allogenen Knochenmarktransplantation in Kauf nehmen zu müssen.

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Das Multiple Myelom

Das Multiple Myelom (*MM*) (ICD-10 C90) ist eine maligne Erkrankung des Knochenmarks, charakterisiert durch eine unkontrollierte Proliferation entarteter Plasmazellen (*Plasmazellneoplasie*). Es zählt zu den niedrig-malignen Non-Hodgkin-Lymphomen sowie den monoklonalen Gammopathien. 1844 wurde die Krankheit erstmals durch Samuel Solly beschrieben (Kyle und Steensma, 2011). Das *MM* ist die zweithäufigste maligne hämatologische Erkrankung (Munshi und Anderson, 2013) und für ca. 1 % aller neoplastischen Erkrankungen der westlichen Welt verantwortlich, wobei die Prävalenz deutlich von Geschlecht (Männer erkranken häufiger als Frauen) und ethnischer Zugehörigkeit (Afroamerikaner erkranken doppelt so häufig wie andere Ethnien) abhängt (Raab et al. 2009). Die Inzidenz des *MM* steigt mit zunehmendem Lebensalter an (siehe hierzu Abbildung 1.1). Unter derzeitiger Therapie beträgt das mediane Überleben 6,1 Jahre (Kumar, Dispenzieri et al. 2013). Durch den Einsatz neuer therapeutischer Verfahren konnte eine deutliche Verbesserung des Überlebens erreicht werden (von 4,6 Jahre in 2000-2005 zu 6,1 Jahre in 2006-2010) (Kumar, Dispenzieri et al. 2013) (Mey et al. 2015). Der Begriff *Plasmozytom* wird, im weiteren Sinne, synonym zu *Multiple Myelom* benutzt, beschreibt aber im engeren Sinne nur das solitäre Plasmozytom. Um Zweideutigkeiten zu vermeiden wird daher in dieser Arbeit von der Verwendung des Begriffs *Plasmozytom* als Synonym zu *Multiple Myelom* abgesehen. Die von den entarteten Plasmazellen produzierten Proteine (Immunglobuline oder Teile davon) werden als *Paraprotein* oder *M-Protein* bezeichnet. Als *Bence-Jones-Protein (BJP)* wird ein Paraprotein bezeichnet, das aus κ - oder λ -Leichtketten besteht. Die charakteristischen Symptome des *MM* (Hyper-Calcaemia, Renal Failure, Anaemia, Bone-Lesions) werden unter dem Begriff *CRAB* subsumiert.

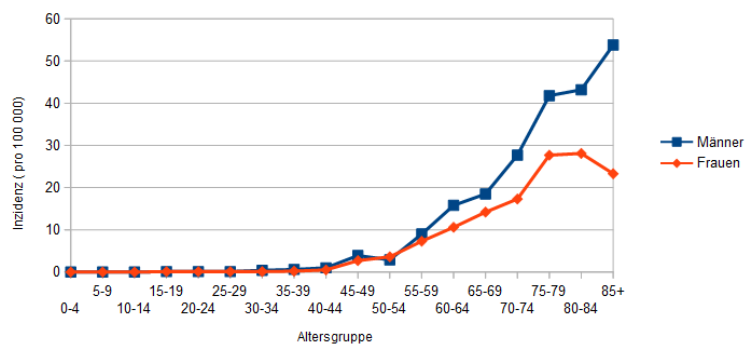


ABBILDUNG 1.1: Inzidenz des Multiplen Myeloms nach Lebensalter in Deutschland (im Jahr 2008), nach Daten des Robert Koch Instituts (Kaatsch et al. 2013)

Pathogenese Das Multiple Myelom entsteht über die Vorstufe des MGUS, die sich bei ca. 6 % aller Menschen über 70 Jahren findet (Cohen et al. 1998) und welches mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 %/Jahr zu einem *MM* voranschreitet (Kyle und Rajkumar, 2005). Hierbei variieren die dafür notwendigen genetischen Alterationen sowie die Dauer der malignen Transformation zwischen Monaten und Jahrzehnten (Seidl et al. 2003) (siehe hierzu Abbildung 1.2). Die Myelomzellen wandern in das Knochenmark aus und proliferieren dort in Abhängigkeit von der Umgebung (*Microenvironment*) des Knochenmarks (Kuehl und Bergsagel, 2002). Das *Microenvironment* und das Myelom beeinflussen sich dabei gegenseitig, sodass die Bedingungen für die Proliferation des *MM* optimiert werden (Guillerey et al. 2016). Dies geschieht u.a. durch eine Steigerung der Zytokinausschüttung (Klein et al. 1995) und der Angiogenese (Giuliani et al. 2011) sowie einer Suppression des Immunsystems. Daher ist das gezielte Angreifen dieser, für das *MM*-Wachstum entscheidenden, *Microenvironment* ein Ansatz in der Therapie des *MM* (Moschetta et al. 2016).

Differentialdiagnose monoklonaler Gammopathien Für die Differentialdiagnose von monoklonalen Gammopathien siehe Tabelle 1.1.

Klinisches Bild Die Verdrängung und Beeinflussung des Knochens und der hämatopoetischen Stammzellen, sowie die massenhaft vorhandenen Immunglobuline und Plasmazellen können zu folgenden klinischen Symptomen führen (unvollständige Auflistung):

1. *Hyperkalzämie*: Die Hyperkalzämie ist die häufigste metabolische Entgleisung bei *MM*-Patienten. Diese kann bis hin zu lebensbedrohlichen hyperkalzämischen Krisen führen (Oyajobi, 2007).
2. *Niereninsuffizienz*: Die Überlastung der Niere durch das Paraprotein führt zu einer tubulären Nierenschädigung. Weitere Mechanismen der Schädigung der Niere

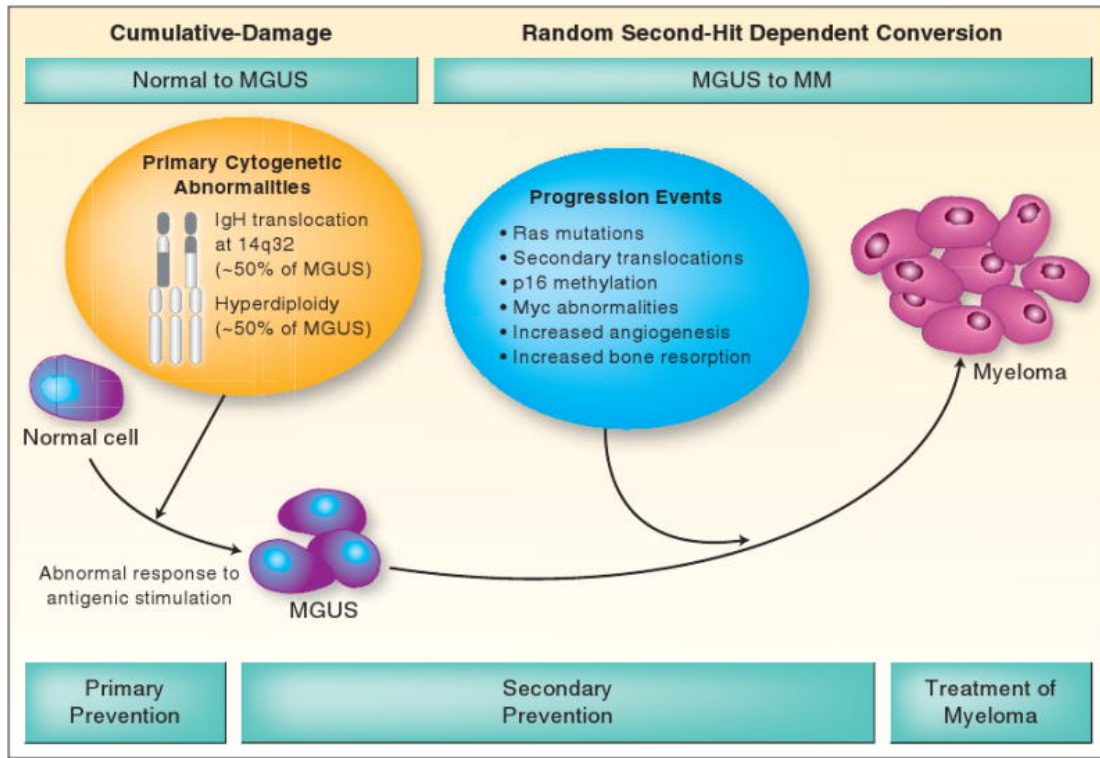


ABBILDUNG 1.2: Pathogenese von MGUS und der Progression zum Multiplen Myelom. Abbildung aus (Rajkumar, 2009)

durch ein *MM* sind beschrieben (Tumorinfiltration, AL-Amyloidose u.a.) (Leung und Nasr, 2014).

3. *Anämie*: Die Verdrängung des gesunden Knochenmarks in Verbindung mit einer Niereninsuffizienz kann zu einer normozytären, normochromen Anämie hervorrufen (Ludwig et al. 2004).
4. *Ossäre Destruktion*: Die Aktivierung von Osteoklasten und die Inhibierung von Osteoblasten führt zu einer Zerstörung der Knochensubstanz mit pathologischen Frakturen als mögliche Folge (Edwards et al. 2008) (Oranger et al. 2013).
5. *Infektanfälligkeit*: Die Verdrängung der gesunden Zellpopulation und die hormonelle Dysregulation durch das *MM* verursachen eine erhöhte Infektanfälligkeit, die in 20 - 50 % der Fälle unmittelbar für den Tod verantwortlich ist (Morrison, 2014).
6. *Hyperviskositätssyndrom*: Die Steigerung der Viskosität des Blutes durch das Paraprotein beeinflusst die Zirkulation negativ. Die veränderte Viskosität kann sowohl zu Blutungs- als auch zu thromboembolischen Komplikationen führen (Kwaan, 2013).

MGUS	Alle drei Kriterien müssen erfüllt sein: M-Protein im Serum $< 30\text{g/l}$ klonale Plasmazellen im Knochenmark $< 10\%$ keine <i>MM</i> -bezogenen Endorganschäden
SMM	Beide Kriterien müssen erfüllt sein: Monoklonales Protein im Serum (IgG oder IgA) $\geq 30\text{g/l}$ oder Plasmazellen im Knochenmark $\geq 10\%$ keine <i>MM</i> -bezogenen Endorganschäden
MM	Alle drei Kriterien müssen erfüllt sein: Plasmazellen im Knochenmark $\geq 10\%$ Nachweis von Paraprotein im Serum oder Urin (ausgenommen beim Vorliegen eines nichtsekretorischen <i>MM</i>) Nachweis von <i>MM</i> -bezogenen Endorganschäden, wie: <ul style="list-style-type: none"> • Hyperkalziämie (Serumkalzium $\geq 11,5\text{ mg/dl}$) • Niereninsuffizienz (Serumkreatinin $\geq 0,173\text{ mmol/l}$) • normozytäre, normochrome Anämie (Hämoglobin $\leq 8\text{ g/dl}$) • ossäre Destruktion
SP	Alle vier Kriterien müssen erfüllt sein: Histologischer Nachweis einer solitären Knochen- oder Weichteilläsion mit dem Vorhandensein monoklonaler Plasmazellen Sonstiges Knochenmark ohne Hinweis auf monoklonalen Zellbefall Radiologisch unauffälliges Skelettsystem (mit Ausnahme der solitären Läsion) keine <i>MM</i> -bezogenen Endorganschäden

TABELLE 1.1: Kriterien für die Diagnose einer Monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (*MGUS*), eines smoldering Multiple Myeloma (*SMM*), des Multiplen Myeloms (*MM*) und des solitären Plasmozytoms (*SP*) nach (Kyle und Rajkumar, 2009)

Klassifikation Das *MM* wird klassischerweise nach der Art des sezernierten Paraproteins klassifiziert, dabei sind IgG- (52 % der Fälle), IgA- (21 %) und Leichtketten-Myelome (16 %) die häufigsten Formen. Daneben gibt es seltenere Formen wie das nicht-sezernierende *MM* (3 %) sowie IgD (2 %) und IgM ($< 1\%$) (Kyle, Gertz et al. 2003). Die *International Myeloma Working Group (IMWG)* schlägt vor die Klassifikation des *MM* primär anhand des Genotyps vorgenommen, da dies eine genauere Aussage über die Prognose erlaubt und für die Therapie entscheidend ist (Fonseca et al. 2009).

Staging Zum Staging des *MM* sind zwei Systeme gebräuchlich, zum einen das *Durie-Salmon-Staging (DSS)* von 1975, sowie das 2005 von der *IMWG* eingeführte *International Staging System (ISS)*. Beide erlauben eine Aussage über den Status und

<i>Klassifikation nach Durie und Salmon</i>			
Parameter	Stadium 1	Stadium 2	Stadium 3
Hämoglobin	> 10g/dl		< 8,5g/dl
Serumkalzium	normal		erhöht
Knochen	normal oder (solitärer Herd)	weder	fortgeschrittene Läsionen
Myelomprotein	IgG < 50g/l (Serum) IgA < 30g/l (Serum) BJP < 4g/24h (Urin)	Stadium 1 noch 3	IgG > 70g/l (Serum) IgA > 50g/l (Serum) BJP > 12g/24h (Urin)
	Zusatzbezeichnung A Kreatinin ≤ 2mg/dl		Zusatzbezeichnung B Kreatinin > 2mg/dl
<i>International Staging System</i>			
Parameter	Stadium 1	Stadium 2	Stadium 3
β ₂ -Microglobulin	< 3,5g/l (Serum)	weder	≥ 5,5g/l (Serum)
Albumin	> 3,5g/l (Serum)	Stadium 1 noch 3	irrelevant

TABELLE 1.2: Staging-System nach (Durie und Salmon, 1975), Tabelle nach (Kortüm et al. 2013) (modifiziert), sowie das *International Staging System* der *IMWG* nach (Greipp et al. 2005) (modifiziert). In beiden Systemen gilt: Für das Stadium 1 müssen alle Kriterien erfüllt sein. Stadium 3 gilt, sobald ein Kriterium erfüllt wird.

die Prognose der Erkrankung. Die Überschneidung der Stadien zwischen beiden Systemen liegt bei lediglich 36 %, wobei (mit Ausnahme der einfacheren Erfassbarkeit des *ISS*) keine klare Überlegenheit besteht (Hari et al. 2009). Zu den Staging-Systemen siehe Tabelle 1.2.

Therapie Die aktive Behandlung des *MM* ist bei symptomatischen Erkrankungen (nach den *CRAB*-Kriterien), und Erkrankungen bei denen ein symptomatischer Verlauf unmittelbar bevorsteht, indiziert (Gentile et al. 2015), (Rajkumar et al. 2015). Andernfalls wird eine *Watch and Wait*-Strategie gewählt (Röllig et al. 2015). Bei der Therapie des *MM* unterscheidet man im Wesentlichen die Hochdosis-Therapie, bei der auf eine Induktionstherapie eine autologe Knochenmarktransplantation folgt, von einer Nicht-Hochdosis-Therapie. Zur Remissionsinduktion wird eine Kombinationstherapie von zwei oder drei verschiedenen Medikamenten eingesetzt (Cavo et al. 2011) (Kortüm et al. 2013).

Neben dem Auslösen der Apoptose über unspezifische zytotoxische Effekte besitzen viele der eingesetzten Medikamente die Möglichkeit einen immunogenen Zelltod zu induzieren (Pol et al. 2015) (siehe hierzu: Abschnitt 4.4). Die zur Induktionstherapie verfügbaren Schemata sind heterogen und die Wahl eines geeigneten Protokolls hängt von vielen Faktoren, unter anderem dem klinischen Zustand des Patienten sowie dem

Erstdiagnose Multiples Myelom

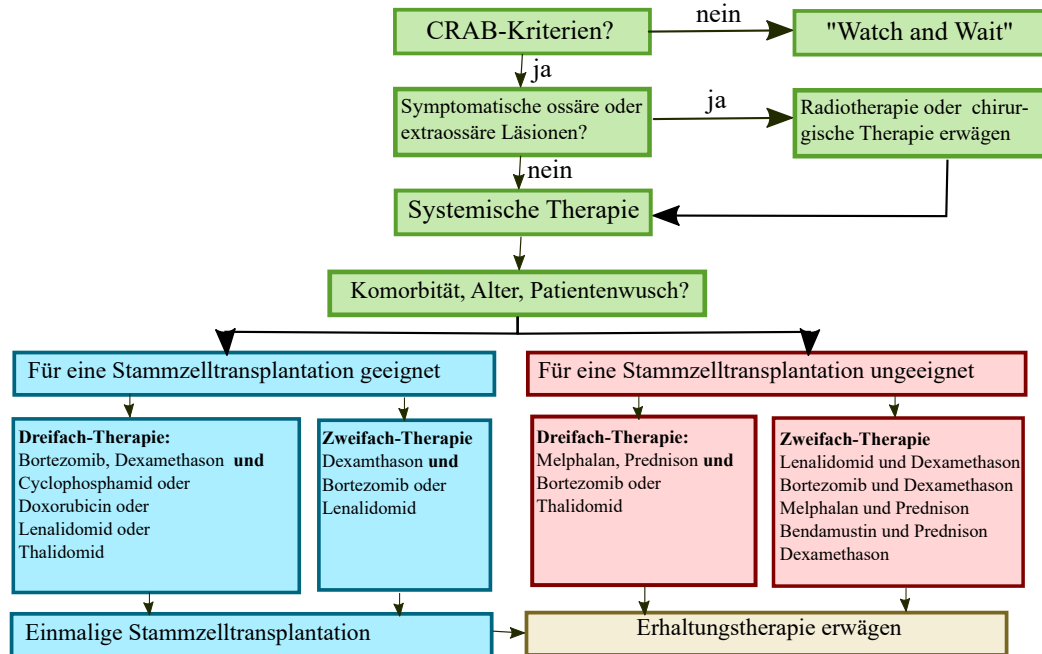


ABBILDUNG 1.3: Therapiealgorithmus bei Patienten mit neu-diagnostiziertem MM. Abbildung modifiziert nach (Röllig et al. 2015)

Genotyp des Tumors, ab. Zum Therapiealgorithmus bei neu-diagnostiziertem, therapienaivem MM siehe Abbildung 1.3.

Hochdosis-Therapie Körperlich fitte und junge (≤ 65 Jahre) Patienten sollten mittels Hochdosis-Therapie behandelt werden (Harousseau und Moreau, 2009) (Engelhardt, Kleber et al. 2010) (Engelhardt, Terpos et al. 2014). Wobei gezeigt werden konnte, dass auch ältere Patienten, die sich für eine Hochdosis-Therapie qualifizieren, von dieser profitieren (Ozaki und Shimizu, 2014).

Patienteneigene Stammzellen werden nach einer viermonatigen Induktionsbehandlung (s.o.) gesammelt und nach einer myeloablativen Konditionierung retransplantiert (*autologe Stammzelltransplantation (auto-Tx)*). Die zur Transplantation benötigte Konditionierung wird in der Regel mittels Melphalan (200 mg/m^2 Körperoberfläche) durchgeführt (Moreau et al. 2002) (Anagnostopoulos et al. 2004). Bei Therapie-Versagen kann eine weitere autologe Stammzelltransplantation angeschlossen werden.

Es zeigt sich eine Überlegenheit der Hochdosis-Therapie gegenüber einer ausschließlichen Chemotherapie (3-Jahres-Überlebensrate: 85 % (Hochdosis) vs. 49,7 % (konventionell)) (Pérez et al. 2015) bei überschaubarer therapiebezogener Mortalität (1 – 2%) (Kumar, Dingli et al. 2008).

Nicht-Hochdosis-Therapie Für die Therapieansätze von Patienten die sich nicht für eine autologe Stammzelltransplantation qualifizieren siehe Abbildung 1.3.

1.2 Allogene Knochenmarktransplantation beim Multiplen Myelom

Neben der Entwicklung und Optimierung medikamentöser Behandlungsoptionen war die Einführung der Knochenmarktransplantation (*KMT*) in die Therapie des *MM* maßgeblich für die Verbesserung des Überlebens der Patienten. Dabei wird zwischen der *autologen* (*auto-Tx*) und der *allogenen* (*allo-Tx*) Knochenmarktransplantation unterschieden. Während bei der *auto-Tx* Donor und Rezipient der Stammzellen dasselbe Individuum ist, sind sie bei der *allo-Tx* verschieden. Das in dieser Arbeit betrachtete Patientenkollektiv wurde allogene Knochenmarktransplantiert.

Die *allo-Tx* wird als einzige potentiell kurative Therapie des *MM* angesehen. Dies begründet sich in der durch die transplantierten Stammzellen erzeugte Immunantwort gegen die Myelomzellen (*Graft-vs-Myeloma-Effekt, GvME*) (Lokhorst, Einsele et al. 2010). Die immunologische Kompatibilität des Knochenmarks des Spenders zu dem Gewebe des Empfängers ist Voraussetzung für das Gelingen einer *allo-Tx*. Ausschlaggebend hierfür sind die so genannten minor und major Histocompatibility Complex (*mHC* und *MHC*). Aufgrund der hohen therapiebezogenen Mortalität gilt die *allo-Tx* der Hochdosis-Therapie als unterlegen und es handelt es sich um einen experimentellen Ansatz (IQWiG, 2011). Besonders bei jungen Patienten mit geringer Komorbidität und aggressiven genotypischen Veränderungen (insbesondere del17p) spielt sie dennoch eine wichtige Rolle (Bruno, 2016).

Eigenschaften der allogenen Knochenmarktransplantation Das progressionsfreie Überleben korreliert mit der Intensität der vorangegangenen Konditionierung (progressionsfrei nach 2 Jahren 34,5 % (myeloablative Konditionierung *MAC*) vs. 18,9 % (Konditionierung mit reduzierter Intensität *RIC*)) (Crawley et al. 2007). Jedoch ist die therapiebezogene Mortalität (*TRM*) bei einer myeloablativen Konditionierung höher als bei einer dosisreduzierten (37 % vs. 24 %). Insgesamt konnte kein signifikanter Vorteil eines der beiden Verfahren auf das Gesamtüberleben gezeigt werden (Crawley et al. 2007).

Art des Ansprechens	Kriterien
Stringent Complete Response, <i>sCR</i>	Alle Kriterien der <i>CR</i> und normale Serum-Leichtketten-Ratio und Abwesenheit von klonalen Zellen im Knochenmark (Nachweis durch Immunhistochemie oder -fluoreszenz)
Complete Response, <i>CR</i>	Negative Immunfixation im Serum und Urin und Kein Vorkommen von Weichteilmanifestationen und $\leq 5\%$ Plasmazellen im Knochenmark
very good Partial Response, <i>vgPR</i>	$\geq 90\%$ Reduktion der Serum-Paraprotein-Konzentration und Paraprotein im Urin < 100 mg/24 h und Paraprotein in der Immunfixation nachweisbar nicht jedoch in der Elektrophorese
Partial Response, <i>PR</i>	$\geq 50\%$ Reduktion der Serum-Paraprotein-Konzentration und Paraprotein (Urin) < 200 mg / 24 h oder Reduktion um $\geq 90\%$ oder Falls Paraprotein nicht bestimmbar: $\geq 50\%$ Reduktion des FLC-Quotienten oder Falls FLC-Quotient auch nicht evaluierbar: $\geq 50\%$ Reduktion von Plasmazellen, solange ihr Anteil im Knochenmark vor Therapie $\geq 30\%$ betrug und zusätzlich zu allen Kriterien: $\geq 50\%$ Reduktion der Größe von Weichteilmanifestationen.
Stable Disease, <i>SD</i>	Erfüllt keines der anderen Kriterien.
Progressive Disease, <i>PD</i>	$\geq 25\%$ Anstieg Paraprotein (Serum) (Anstieg absolut mind. $\geq 0,5$ g/dl) oder $\geq 25\%$ Anstieg Paraprotein (Urin) (Anstieg absolut mind. ≥ 200 mg/24 h) oder $\geq 25\%$ Anstieg des FLC-Quotienten (absoluter Anstieg mind. > 10 mg/dl) oder $\geq 25\%$ Anstieg der Plasmazellen im Knochenmark (Anteil muss $> 10\%$ sein) oder Auftreten neuer Symptome (<i>CRAB</i>) oder Tumormanifestationen.

TABELLE 1.3: Klassifikation des Ansprechens von *MM*-Patienten auf eine Therapie modifiziert nach den *uniform response criteria* der *IMWG* (Durie, Harousseau et al. 2006).

Stadium	Haut	Leber	GI-Trakt
1	Effloreszenzen < 25 % der Haut	Bilirubin 2-3 mg/dl	Diarrhöen > 500 ml/d oder Übelkeit
2	Effloreszenzen 25 - 50 % der Haut	Bilirubin 3-6 mg/dl	Diarrhöen >1000 ml/d
3	Effloreszenzen > 50 % der Haut	Bilirubin 6-15 mg/dl	Diarrhöen > 1500 ml/d
4	Bullöse Erythrodermie	Bilirubin > 15 mg/dl	starke abdominelle Schmerzen
Grad	Haut	Leber	GI-Trakt
0	–	–	–
1	Stadium 1-2	–	–
2	Stadium 3	Stadium 1	Stadium 1
3	–	Stadium 2-3	Stadium 2-4
4	Stadium 4	Stadium 4	–

TABELLE 1.4: Einteilung der akuten Graft-versus-Host-Disease modifiziert nach (Bolaños-Meade und Vogelsang, 2004). Hierbei wird zuerst für jedes der drei Organsysteme ein Stadium gebildet und aus diesen dann der Grad der aGvHD abgeleitet. Der Grad richtet sich nach dem höchsten erreichten Stadium.

Graft-versus-Host-Disease Die *Graft-versus-Host-Disease (GvHD)* beschreibt die immunologische Reaktion des transplantierten Knochenmarks (*Graft*) gegen das Gewebe des neuen Wirts (*Host*). Dabei wird zwischen akuter (*aGvHD*) und chronischer (*cGvHD*) *GvHD* unterschieden. Während die akute Form mit einer Verschlechterung der Prognose und des Überlebens einhergeht, korreliert die chronische Form mit verbessertem Überleben und stellt so (in leichter Form) einen wünschenswerten Zustand dar (Donato et al. 2014).

akute Graft-versus-Host-Disease Als *aGvHD* wird das Auftreten bestimmter Symptome innerhalb der ersten 100 Tage nach einer *allo-Tx* bezeichnet. Diese basieren auf einer immunologischen Inkompatibilität zwischen Spender und Empfänger. Die organische Manifestation der aGVHD zeigt sich zumeist bei Haut, Leber und GI-Trakt. Die Schwere der Symptome bei diesen Organen definiert auch den Schweregrad der *aGvHD* (siehe Tabelle 1.4). Die Anzahl der an *a GvHD* Grad ≥ 2 erkrankten Patienten liegt bei bis zu 50 % (Ball und Egeler, 2008) (z.B. 42 % bei (Rotta et al. 2009); 39,4 % bei (Crawley et al. 2007)).

1.3 Anti-Tumor-Immunität beim MM

1.3.1 Immunüberwachung

Das Immunsystem ist, neben der Abwehr pathogener körperfremder Organismen, fähig entartete körpereigene Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Diese Aufgabe des Immunsystems wird als *Immunüberwachung (immune surveillance)* bezeichnet (Swann und Smyth, 2007). Sie wird offensichtlich, wenn man Mäuse ohne funktionierendes Immunsystem betrachtet bei denen es zur Entwicklung zahlreicher spontaner Tumoren kommt (Shankaran et al. 2001). Analog hierzu ist das Risiko eine maligne Erkrankung zu entwickeln unter Immunsuppression (bspw. nach Organtransplantation) stark erhöht (Geissler, 2015). Als Effektorzellen der Immunüberwachung bei Plasmazellneoplasien sind myeloische Zellen (z.B. *Dendritischer Zellen (DCs)*) sowie verschiedene Populationen von T-Lymphozyten ($CD4^+$ - (Yi et al. 1995), $CD8^+$ - (Halapi et al. 1997) und *Natürliche Killer-* (Carbone et al. 2004)) beschrieben. Demgegenüber ist die Rolle der B-Zellen in der Anti-Tumor-Immunität weit weniger gut verstanden (Schieferdecker et al. 2016).

Trotzdem kann es bei einem gesunden Immunsystem zur Entwicklung eines Myeloms kommen, hierzu supprimieren die Myelomzellen das Immunsystem (Ponzetta et al. 2015) und alterieren ihre Oberfläche um weniger immunogenes Potential zu bilden (Bernal et al. 2009) (siehe hierzu auch Abbildung 1.4). Daher sind das Wiederherstellen einer regulären Immunabwehr oder die Opsonierung von Myelom-Zellen Möglichkeiten eine *MM*-Therapie zu unterstützen.

1.3.2 Beeinflussung der Anti-Tumor-Immunität durch die *MM*-Therapie

Die Therapie des Multiplen Myelom beeinflusst Immunsystem über verschiedene Wege. Hierdurch kann das Immunsystem moduliert werden, sodass es gegen den Tumor sensibilisiert wird. Dies kann durch eine klassische Anti-Tumor-Therapie, über eine spezifische Immuntherapie, sowie per Knochenmarktransplantation erreicht werden.

Der immunogene Zelltod Die in der Anti-Myelom-Therapie eingesetzten Medikamente (insbesondere Bortezomib (Cirone et al. 2012) aber auch Melphalan (P. Zhou et al. 2007), Cyclophosphamid (Ziccheddu et al. 2013) und andere) können einen immunogenen Zelltod auslösen (Pol et al. 2015). Hierbei werden durch die Therapie *damage-associated molecular patterns (DAMPs)* von der sterbenden Tumorzelle sezerniert oder

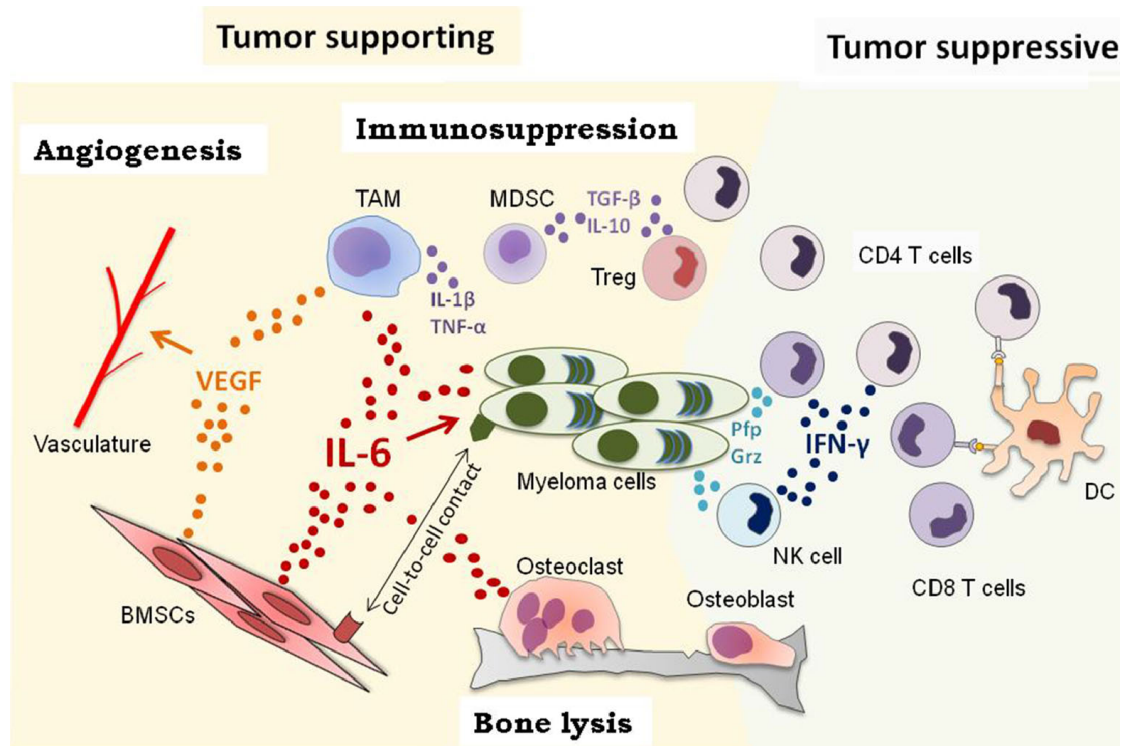


ABBILDUNG 1.4: Darstellung der für die Proliferation des MM förderlichen und immun-suppressiven Faktoren der Knochenmarknische sowie die Anti-Tumor-Immunität. Aus (Guillerey et al. 2016).

auf deren Oberfläche exprimiert (Kroemer et al. 2013). Zu diesen *DAMPs* zählen Proteine (z.B. *High mobility group 1 (HMGB1)* (Scaffidi et al. 2002) oder *Heat-shock-Proteine (HSP)* (Spisek, Charalambous et al. 2007)) sowie nicht proteinische Substanzen (z.B. *Adenosintriphosphat (ATP)* und *Uridintriphosphat (UTP)* (Elliott et al. 2009)). *DCs* exprimieren auf ihrer Oberfläche Rezeptoren, die diese *DAMPs* erkennen können (hierunter *Toll-like receptor 4 (TLR4)* (Apetoh et al. 2007) und der Purin-Rezeptor *P2X(7)* (Ghiringhelli et al. 2009)). Die so aktivierten *DCs* reifen aus und aktivieren *zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs)*, welche zur Lyse von Tumorzellen fähig sind (Kroemer et al. 2013).

Die spezifische Immuntherapie Die spezifische Immuntherapie zielt auf eine Förderung der Anti-Tumor-Eigenschaften des Immunsystems ab. Dabei wird versucht die unerwünschten Wirkungen auf gesunde Zellen, wie sie bei anderen Therapien auftreten (z.B. der *allo-Tx*), zu minimieren. Zur Anregung einer *MM*-spezifischen Immunantwort sind mehrere Strategien Bestandteil von Forschung und Therapie (Luptakova und Avigan, 2015):

1. *Die passive Immuntherapie:* Bei der passiven Immuntherapie werden *monoklonale Antikörper (mAbs)* gegen spezifische Tumor-Antigene eingesetzt. Diese *mAbs*

opsonieren Tumorzellen und können so Zell- oder Komplement-vermittelter Tumorlyse führen (Ferris et al. 2010). Aktuell sind zwei *mAbs* in der Therapie des *MM* von der FDA in den USA zugelassen: Elotuzumab, gerichtet gegen *signaling lymphocytic activation molecule F7 (SLAMF7)* (Lonial et al. 2015) und Daratumumab, das gegen *cluster of differentiation 38 (CD38)* gerichtet ist (Lokhorst, Plesner et al. 2015). Beide konnten eine signifikante Verbesserung des Krankheitsverlaufs und Überlebens zeigen. Essentiell für die Entwicklung neuer *mAbs* ist das Identifizieren tumorspezifischer Antigene (Luptakova und Avigan, 2015).

2. *Aktive Immunisierung mit Tumorstoffen*: Bei der Tumorstoffung werden dem Patienten aufbereitete Tumorstoffe verabreicht um eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort zu generieren. Potentielle Kandidaten für die Tumorstoffung sind unter anderem Proteine aus der Gruppe der *cancer-testis antigens (CTAs)* (Atanackovic et al. 2009) oder der *HSPs* Li2014. Jedoch konnten klinische Studien bislang kein Ansprechen auf diese Stoffungsstrategien zeigen (Luptakova und Avigan, 2015).
3. *Adoptive T-Zell-Therapie*: Hierbei werden dem Patienten T-Zellen entnommen, *ex vivo* moduliert und anschließend dem Patienten reinfundiert. Eine vielversprechende Technik ist das Erstellen so genannter *chimeric antigen receptor T cells (CAR T-Zellen)*, deren T-Zell-Rezeptor per retroviralem Vektor verändert wird um spezifisch Tumor-Antigene zu erkennen (Maus und June, 2014).
4. *Modulation des immunsuppressiven Milieus*: Thalidomid und seine Analoga besitzen neben ihren direkten Anti-Tumor-Effekten weitere Eigenschaften, die zum einen immunmodulatorisch wirken (indem z.B. CTLs und NK-Zellen aktiviert werden) und zum anderen das Microenvironment des Tumors beeinflussen (z.B. über eine Blockade der Angiogenese) (Quach et al. 2009). Eine andere Möglichkeit das Immunsystem zu beeinflussen, ist die Blockade von Molekülen, die eine Anergie von T-Zellen vermitteln (*Immune Checkpoint Blockade*) (Luptakova und Avigan, 2015).

Der Graft-versus-Myeloma-Effekt der allo-Tx Der *Graft-versus-Myeloma-Effekt* beschreibt die Reaktion der aus dem gespendeten Knochenmark hervorgegangenen immunkompetenten Zellen gegen die malignen Zellen des *MM*. Eine *allo-Tx* bei *MM*-Patienten kann in manchen Fällen zu einer anhaltenden Remission führen (Bensinger, 2014). Studien konnten zeigen, dass das Vorhandensein einer cGvHD die Wahrscheinlichkeit eines Rezidives um mehr als 50 % verringerte und das Gesamtüberleben signifikant verbessert (Kröger et al. 2004) (Lokhorst, Wu et al. 2004). So zeigte (Donato et al. 2014) eine deutliche Verbesserung des 5-Jahres-Überlebens bei Entwicklung

einer *cGvHD* (78,8 % vs 42,6 %). Hierbei können T-Zellen über Minor histocompatibility antigens (*miHA*) einen *GvME* als auch eine *GvHD* erzeugen (van Bergen et al. 2007), wobei der konkrete *miHA* entscheidet in welcher Ausprägung beide Effekte auftreten (Hobo et al. 2013). Oligoklonale Banden gelten dabei als Ausdruck eines B-Zell-vermittelten *GvME*.

Oligoklonale Banden Oligoklonale Banden (oder abnormale Proteinbanden (*APB*)) sind Banden, die in der Immunfixation sichtbar werden, welche prä-therapeutisch nicht vorhanden waren und welche nicht das M-Protein repräsentieren. Es konnte gezeigt werden, dass das Auftreten von *APB* Ausdruck einer humoralen Immunantwort ist und eine Verbesserung der Prognose für den Patienten bedeutet (Maisnar et al. 2007) (Hall et al. 2009) (Sucak et al. 2010) (Jo et al. 2013). (Rahlff et al. 2012) konnte zeigen, dass die Ziele dieser humoralen Immunantwort humane Proteine sind, welche in Myelomzellen häufig hoch reguliert oder abnormerweise auf der Membran präsentiert werden. Die verbesserte Prognose bei Patienten die *APB* entwickeln kann somit durch eine B-Zell-Immunantwort erklärt werden (Rahlff et al. 2012).

1.4 Erklärung essentieller Begriffe dieser Dissertation

1.4.1 Antikörper

Antikörper oder auch Immunglobuline (Ig) sind Proteine die von B-Lymphozyten hergestellt und sezerniert werden. Sie sind Teil der adaptiven Immunantwort indem sie spezifisch an Antigene (in der Regel auf der Oberfläche von Viren, Bakterien etc.) binden. Das von Antikörpern erkannte Motiv ist hochspezifisch und wird als Epitop bezeichnet. Antikörper bestehen aus jeweils zwei identischen leichten sowie schweren Ketten. Beim Menschen existieren fünf verschiedene schwere (α , γ , δ , ϵ und μ) sowie zwei verschiedene leichte Ketten (κ und λ). Anhand der schweren Kette werden Immunglobuline klassifiziert (IgA, IgG, IgD, IgE und IgM). Antikörper bestehen aus einer variablen Region (*Fragment antigen binding Fab*) sowie einer konstanten Region (*Fragment crystallizable Fc*). Der Teil des *Fab* der direkt an der Bindung mit dem Antigen beteiligt ist wird *Paratop* oder *Antigenbindungsstelle* genannt. An diese können (je nach Typ verschiedene) Effektorzellen sowie -proteine des Immunsystems binden. IgD, IgG und IgE liegen monomer vor, während IgA und IgM über Joining-Peptide zu di- bzw. pentameren zusammengeslossen sind (Kaufmann, 2014, S. 75–81). Im Rahmen dieser Dissertation wurden nur IGG untersucht und sind daher Gegenstand der Betrachtung.

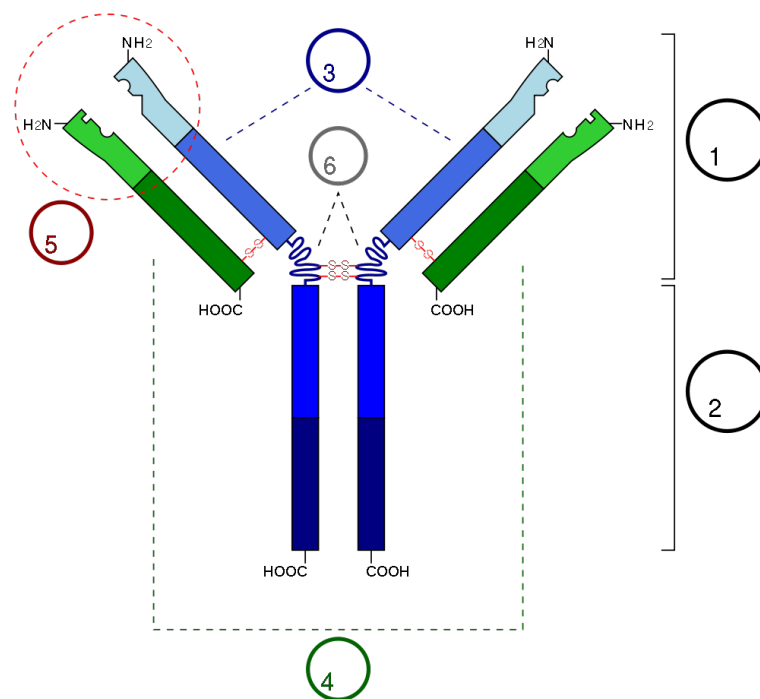


ABBILDUNG 1.5: Struktur des Immunglobulin G. (1) Fab (2) Fc (3) schwere Ketten (4) leichte Ketten (5) Antigenbindungsstelle (6) hinge region. Von user:Y_tambe - Y_tambe's file, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1573513>

1.4.2 Bakteriophage M13

Für das Phagedisplay wurde der Coliphage M13 eingesetzt (siehe auch Kapitel 2). Bakteriophagen sind Viren, die auf Bakterien als Wirt angewiesen sind (bei M13 ist dieser Wirt E.coli). M13 besitzt einzelsträngige DNA (*ssDNA*), die etwa 6400 Basen lang ist und für elf verschiedene Genprodukte kodiert. M13 infiziert E-Coli-Bakterien über deren F-Pilus (Ploß, 2012). M13 ist ein nicht-lytischer Phage, das heißt infizierte Bakterien bleiben vital und können sich weiter teilen. Die Kapsid-Proteine können gentechnisch so verändert werden, dass auf ihnen Peptide demonstriert werden können (Hess et al. 2012).

Struktur Ein M13-Phage ist 900 nm lang und hat einen Durchmesser von 6,5 nm (Vos et al. 2009). Für den Aufbau von M13 siehe Abbildung 1.6.

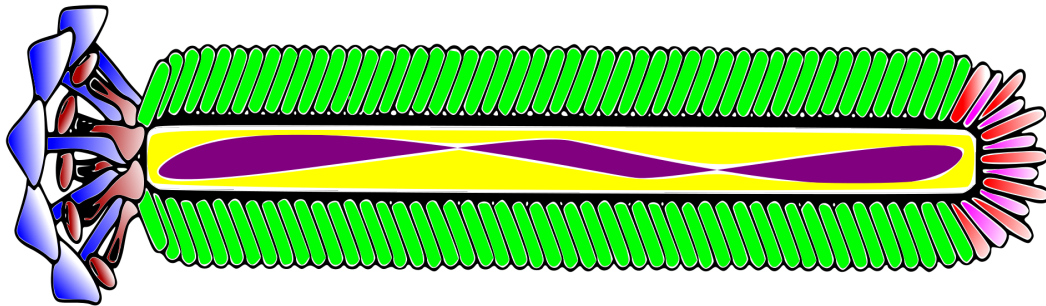


ABBILDUNG 1.6: Bakteriophage M13. links sind die Hüll-Proteine pIII und pVI, rechts die Hüll-Proteine pVII und pVIII dargestellt. Die restliche Phage wird durch das Hüll-Protein pIX umschlossen. Im Phagen befindet sich die Erbinformation als Einzelstrang-DNA. Von J3D3 - Eigenes Werk, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=30612417>

1.4.3 Epitop

Ein Epitop ist ein Bereich auf der Oberfläche eines Antigens, der durch das Immunsystem erkannt und gegen welches eine spezifische Immunreaktion gebildet werden kann. Als *linear* wird ein Epitop bezeichnet, das in dieser Aminosäuresequenz in dem Antigen vorkommt. Als *konformationell* wird ein Epitop bezeichnet, dessen Aminosäuren diskontinuierlich im Antigen verteilt sind, jedoch durch Fältelung nebeneinander erscheinen.

1.4.4 Mimetop

Ein Mimetop ist ein Molekül, meist ein Peptid, das an der Antigen-Bindungsstelle von Antikörpern zu binden kann. Es ist dabei nicht zwangsläufig identisch mit dem eigentlichen Epitop, ahmt dessen antigenischen Eigenschaften aber in ausreichender Art und Weise nach (Geysen et al. 1986).

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Selektions- und Kontroll-Antikörper

Die zur Durchführung der Selektionen bzw. als Kontrollen verwendeten Antikörper wurden nach der informierten Einwilligung der jeweiligen Spender aus Blutproben isoliert.

Die Proben die mit *MM* bezeichnet sind stammen von *MM*-Patienten die eine *allo-Tx* erhalten haben sowie *APB* zeigten (siehe Tabelle 2.1). Die mit *KMT* bezeichneten Proben stammen von Patienten, die aus anderer Indikation als einem Multiplen Myelom allogenen Knochenmarktransplantiert wurden. Die mit *HD* bezeichneten Proben stammen von gesunden Spendern ohne bekannte Grunderkrankung.

2.1.2 Phagen und Bakterien

Ph.D.TM Phage Display Peptide Library Die Phagen des Ph.D.TM-Systems basieren auf *M13* und tragen auf dem fünfmal vorhandenen Oberflächenprotein *gpIII* N-terminal eine randomisierte Peptidsequenz. Dies sind je nach benutzter Bibliothek 7 oder 12 linear oder 7, durch Cystin-Brücken, gekrümmt angeordnete Aminosäuren. Der Genabschnitt, der diese Peptidsequenz kodiert wird als *Insert* bezeichnet. Zudem enthalten die Phagen das *LacZ α* -Gen. Dies führt zu einer Blaufärbung der mit diesen Phagen infizierten K12-Kulturen auf IPTG-XGal-Agarplatten. Für diese Experimente wurde das Produkt *Ph.D.TM-12 Phage Display Peptide Library* (12 linear angeordnete Aminosäuren) genutzt. Für die Sequenzierung wurde der *-96 gpIII-sequencing primer*

Code	Paraprotein	Allo-Tx	Probenentnahmen	IMWG-Score (100 d/12 mon)
MM023	IgG kappa	04/09	03/09 (prä-Tx), 06/09, 08/09, 11/09, 08/10	CR/CR
MM025	IgG kappa	11/09	03/09 (prä-Tx), 03/10, 09/10, 05/11	PR/CR
MM031	IgG lambda	05/10	03/10 (prä-Tx), 09/10, 02/11, 05/11	CR/CR
MM040	IgG kappa	10/09	03/11	CR/CR
MM041	Lambda LC	12/09	03/11	PR/CR
MM043	IgG kappa	09/10	03/11	CR/CR
MM045	IgG lambda	02/10	03/11	CR/CR
MM046	IgA lambda	10/09	03/11	CR/CR
MM047	IgG lambda	11/09	03/11	vgPR/vgPR
MM051	IgG kappa	09/10	04/11	PR/PD
MM054	IgG kappa	02/11	06/11	CR/n.e.

TABELLE 2.1: Details zum Subtyp des *MM* der Patienten und dem Ansprechen auf die allogene Stammzelltransplantation

<i>Stamm</i>	<i>Hersteller</i>
Ph.D. TM -12 Phage Display Peptide Library	New England Biolabs, Frankfurt, D
E.coli K12 ER2738	New England Biolabs, Frankfurt, D

TABELLE 2.2: Verwendete Phagen-Datenbank sowie der zur Zucht benutzte bakterielle Vektor

5' *HO* CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG 3'

TABELLE 2.3: Zur Sequenzierung verwendeter Primer -96 *gIII*

Y M T P P L S S Q Q K S

TABELLE 2.4: Aminosäuresequenz des zur Kontrolle verwendeten Phagen R1

als Primer genutzt. (siehe hierzu Tabelle 2.3). Zur Negativkontrolle wurde der Phage *R1* desselben Produktes mit randomisiertem Insert genutzt (siehe hierzu Tabelle 2.4).

2.1.3 Chemikalien

<i>Antikörper</i>	<i>Hersteller</i>
HRP/Anti-M13 Monoclonal Conjugate	GE Healthcare, Freiburg, D
IgG Intratect®	Biotest, Dreieich, D
Goat anti human lambda	Invitrogen, Camarillo, USA
Goat anti human kappa	Invitrogen, Camarillo, USA
Rabbit anti goat HRP conjugate	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Rituximab	Roche, Basel, Ch

TABELLE 2.5: Verwendete Antikörper

<i>Chemikalien</i>	<i>Hersteller</i>
ABTS	Roche Diagnostics, Grenzach-Wyhlen, D
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Bacto TM Agar	Becton Dickinson and Company, Sparks, USA
Bacto TM Tryptone	Becton Dickinson and Company, Sparks, USA
Bacto TM Yeast Extract	Becton Dickinson and Company, Sparks, USA
di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
di-Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
ECL Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcar, Buckinghamshire, UK
Ethanol, absolut reinst	Th. Geyer GmbH + Co. KG, Renningen, D
Ethanol 70 %, vergällt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
IPTG	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, D
kappaSelect	GE Healthcare, Freiburg, D
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Natronlauge 2 mol/l	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Pageruler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
Polyethylenglycol 8000	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Salzsäure 8 mol/l	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
SDS	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Tetrazyklin	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Trizma® base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Tween 20	MPI Chemie B.V., Houten, NL
X-Gal	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D

TABELLE 2.6: Verwendete Chemikalien

2.1.4 Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Beschreibung</i>
Automatic Sarpette	Sarstedt, Nümbrecht, D	Pipettierhilfe
Certomat® IS	B. Braun Biotech, Melsungen, D	Schüttelinkubator
Heraeus® Function Line	Thermo Scientific, Wilmington, USA	Brutschrank
Innova® 40	New Brunswick Scientific, Edison, USA	Inkubator
membraPure	membraPure, Berlin, D	System für Reinstwasser
NanoDrop ND-100	Thermo Scientific, Wilmington, USA	Mikrophotometer
Pioneer™	Ohaus, Parsippany, USA	Präzisionswaage
Research plus	Eppendorf, Hamburg, D	Pipetten (10, 100, 1000, multi 200)
Reax 2000	Heidolph, Schwabach, D	Vortexer
Sorvall RC 5 C Plus	Thermo Scientific, Wilmington, USA	Zentrifuge
Sunrise microplate reader	Tecan, Männedorf, CH	Plate Reader
Wasserbad	GFL, Burgwedel, D	

TABELLE 2.7: Verwendete Geräte

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

<i>Beschreibung</i>	<i>Hersteller</i>
96 well plate Immulon 2HB (ELISA)	Thermo Scientific, Wilmington, USA
96 well plate MaxiSorp (PD)	Thermo Scientific, Wilmington, USA
96 well plate (Titration)	Thermo Scientific, Wilmington, USA
Biosphere Filter Tips 10 μ l	Sarstedt, Nümbrecht, D
Biosphere Filter Tips 200 μ l	Sarstedt, Nümbrecht, D
Biosphere Filter Tips 1000 μ l	Sarstedt, Nümbrecht, D
Kulturröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipetten 5 ml	Falcon, Franklin Lakes, USA
Pipetten 10 ml	Falcon, Franklin Lakes, USA
Pipetten 25 ml	Falcon, Franklin Lakes, USA
Safe-Lock Tubes 0,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
Safe-Lock Tubes 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
Zentrifugenröhrchen 12 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D

TABELLE 2.8: Verwendete Verbrauchsmaterialien

2.1.6 Stocklösungen

Tetrazyklin

Stocklösung 5 mg/ml

IPTG

Stocklösung 23,83 mg/ml

X-Gal

Stocklösung 40 mg/ml

2.1.7 Rezepte

Nachfolgend finden sich alle Rezepte die für die Experimente verwendet wurden.

BSA 30 %

1,5 g BSA

5 ml PBS

Beides miteinander vermischen, anschließend bei -20 °C lagern.

BSA 3 %

5 ml BSA 30 % auf 50 ml mit PBS auffüllen.

LB-Medium (flüssig)

10 g Bacto-Tryptone

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

Auf 1 l mit Reinstwasser auffüllen, autoklavieren und bei 4 °C lagern.

LB-Medium (fest)

10 g Bacto-Tryptone

5 g Hefeextrakt

5 g NaCl

15 g Agar

Nach dem Autoklavieren, das LB-Medium entweder weiterverwenden (Zugabe weiterer Stoffe) oder die sofortige Aliquotierung in Petrischalen bevor das Medium erhärtet, anschließend Lagerung bei 4 °C.

LB-Medium (fest) plus Tetrazyklin

Das LB-Medium nach dem Autoklavieren für 30 min bei 50 °C im Wasserbad lagern und anschließend 4 ml der Tetrazyklin-Stocklösung hinzugeben. Danach das Medium in Petrischalen aliquotieren und bei 4 °C lagern.

LB-Medium (fest) plus IPTG-X-Gal

Das LB-Medium nach dem Autoklavieren für 30 min bei 50 °C im Wasserbad lagern und anschließend 2 ml der Stocklösung IPTG und 1 ml X-Gal hinzugeben. Danach das Medium in Petrischalen aliquotieren und bei 4 °C lagern.

PBS 10x

80 g NaCl

14,4 g Na₂HPO₄

2,4 g K₂HPO₄

2 g KCl

800 ml Reinstwasser

Nach dem Lösen sämtlicher Bestandteile wurde der pH auf 7,4 eingestellt und mit Reinstwasser auf 1 l Volumen aufgefüllt.

PBS 1x

100 ml PBS 10x

900 ml Reinstwasser

Wenn nur von *PBS* die Rede ist, ist stets das PBS 1x gemeint.

PBS-T 10x

1 l PBS 10x

2 ml Tween 20

PBS-T 1x

100 ml PBS-T 10x

900 ml Reinstwasser

Wenn nur von *PBS-T* die Rede ist, ist stets das PBS-T 1x gemeint.

PBS High Salt 1x

100 ml PBS 10x

900 ml Reinstwasser

50,53 g NaCl

PEG/NaCl

100 g PEG

73 g NaCl

mit Reinstwasser auf 500 ml auffüllen.

Die Lösung muss nach dem Autoklavieren bis zum Erreichen von Raumtemperatur mit einem Rührfisch vermischt werden um eine möglichst hohe Homogenität zu gewährleisten.

TBS 10x

60,5 g Tris

87,6 g NaCl

800 ml Reinstwasser

Nach dem Lösen sämtlicher Bestandteile wird ein pH von 7,5 eingestellt und anschließend auf 1 l Volumen mit Reinstwasser aufgefüllt.

TBS 1x

100 ml TBS 10x

900 ml Reinstwasser

Wenn nur von *TBS* die Rede ist, ist stets das TBS 1x gemeint.

Runningbuffer 10x

144 g Glycin

30 g Tris HCl

100 ml 10 % SDS

mit Reinstwasser auf 1 l Volumen auffüllen

2.2 Methoden

2.2.1 Trennung der Antikörper-Fractionen mittels KappaSelect

Um die Menge der detektierbaren Konsensmotive zu erhöhen wurde auf den κ - und λ -Fractionen getrennt selektioniert. Hierfür wurden die Patienten-IgGs zunächst mit *KappaSelect* aufgetrennt.

Eine Chromatografie-Säule wurde mit 500 μl KappaSelect beladen und dann je einmal mit PBS und PBS High Salt gewaschen. Anschließend wurden die aufzutrennenden IgGs zweimal über die Säule gegeben und der Durchfluss aufgehoben. Die Säule wurde mit 5 Volumen PBS High Salt und dem gleichen Volumen PBS gewaschen. Danach wurde mittels 900 μl Glycin 0,1 M pH 2,5 die erste κ -Fraction eluiert (*Ekappa 1*). Das Eluat wurde in einem Mikroreaktionsgefäß mit 100 μl Tris-HCl 1 M pH 9,1 aufgefangen und gepuffert. Das Eluieren wurde viermal wiederholt (Eluate *Ekappa 2-5*). Hiernach schloss sich das erneute Waschen der Chromatografie-Säule mit je 5 Volumen PBS High Salt und PBS an. Die Proteinkonzentrationen der erhaltenen Fractionen wurden am Mini-Photometer gegen den Blank-Wert (900 μl Glycin 0,1 M pH 2,5 mit 100 μl Tris-HCl 1 M pH 9,1) bestimmt.

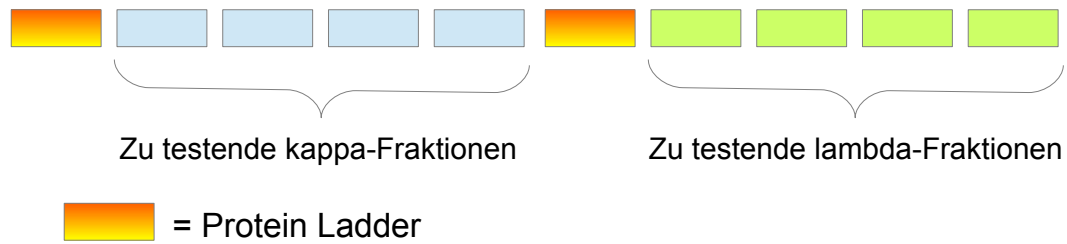


ABBILDUNG 2.1: Beschickung des Gels zur Überprüfung der Reinheit von aufgetrennter IgGs

2.2.2 Überprüfung der Reinheit von Antikörper-Fractionen mittels Western Blot

In zwei 1D-SDS-PAGE-Gele können 4 Fraktionspaare (κ und λ) getestet werden. Von jeder Fraktion wurden $40 \mu\text{l}$ mit $8 \mu\text{l}$ 5x reduzierendem Lämmli Puffer vermischt und für 10 min bei $95 \text{ }^\circ\text{C}$ im Wasserbad gelagert. Danach wurden die Taschen des Gels mit jeweils $20 \mu\text{l}$ der zu testenden Fraktionen sowie zweimal $8 \mu\text{l}$ Prestained Protein Ladder beladen (siehe Abbildung 2.1). Beide Gele wurden dabei gleich beschickt. Anschließend wurden die Gele bei 130 V in 1x Running Puffer bis zum Erreichen des Unterrandes laufen gelassen (die Dauer hierfür betrug $\approx 1,5 \text{ h}$). Die Gele wurden dann bei 100 V für 1 h in (initial) $4 \text{ }^\circ\text{C}$ kaltem Transferpuffer auf eine PVDF Membran geblottet. Der Blot wurde mit 10 ml Milch/TBS-T bedeckt und bei Raumtemperatur 1 h schüttelnd inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Ein Blot wurde mit *goat-anti human kappa Ig* in 10 ml Milch/TBS-T (Verdünnung 1:1500), der andere mit *goat-anti human lambda Ig* in 10 ml Milch/TBS-T (Verdünnung 1:3 000) für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Beide Antikörper-Lösungen wurden hiernach verworfen und anschließend dreimal mit 10 ml TBST-T für 10 min bei RT gewaschen. Als Detektionsantikörper wurde *rabbit anti-goat Ig* in 10 ml Milch/TBS-T (Verdünnung 1:10 000) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend erneut dreimal mit 10 ml TBS-T für jeweils 10 min bei Raumtemperatur gewaschen. Danach wurde das Gel mit ECL-Lösungen entwickelt (welche zuvor durch Mischung der Komponenten A und B aktiviert wurde).

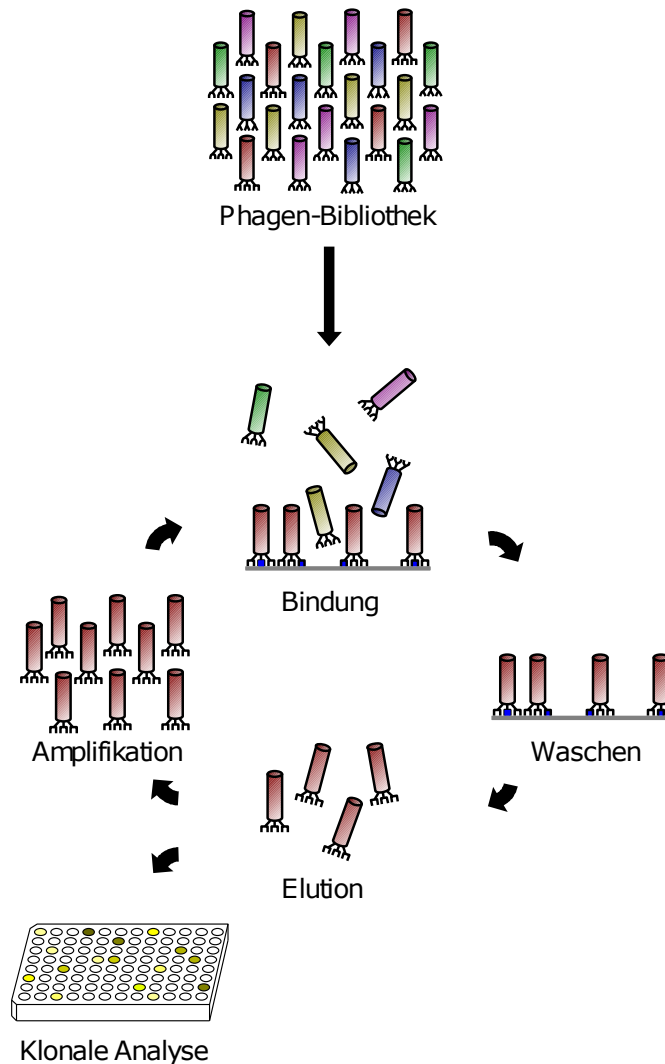


ABBILDUNG 2.2: Prinzip des Phagedisplay. Von S. Jähnichen - Eigenes Werk, CC BY-SA 3.0, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=8281540>

2.2.3 Phagedisplay

Das *Phagedisplay* (*PD*) ist ein erstmals 1985 durch George P. Smith beschriebenes Verfahren (Smith, 1985). Dabei werden Genfraktionen in Bakteriophagen kloniert. Somit wird das durch die Klonierung transduzierte Genprodukt auf der Oberfläche der Bakteriophagen exprimiert (Smith, 1985) und schließlich für Antikörper als Epitop zugänglich. Mit Hilfe des *PD* wurden diejenigen Phagen, aus der randomisierten Phagenbank (s.o.), extrahiert, welche die stärkste Bindung zu den bestimmten Antikörpern zeigten. Dies geschah durch wiederholte positive und negative Selektion der Phagen. In der ersten Selektionsrunde wurden die Antikörperfraktionen zunächst mit der nativen, randomisierten Phagenbank konfrontiert. Die hierdurch gewonnen Phagen wurden daraufhin amplifiziert und erneute Selektionen durchgeführt. Für das Prinzip des Phage-Display siehe Abbildung 2.2.

0. Tag – Vorbereitung Eine Petrischale mit LB-Medium und Tetrazyklin (zur Selektion F-Pilus positiver K12 *E. coli*) (*LB-Tet-Platte*) wurde über Nacht mit *E. coli* K12 bei 37 °C inkubiert. Auf einer 96-Well-Platte wurden über Nacht 10 µg des Target-Antikörpers in insgesamt 100 µl Volumen (aufgefüllt mit PBS) bei 4 °C gecoatet (alternativ für 2 h bei 37 °C).

1. Tag – 1. Selektion / 1. Amplifikation Mit der angezüchteten K12-Kultur wurden 40 ml flüssiges LB-Medium mit Tetrazyklin (*LB-Tet-Medium*) beimpft und bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ bei 37 °C inkubiert (≈ 2 h).

Es fand nun die erste Selektionsrunde statt (siehe Abschnitt 2.2.3.1). Anschließend wurden die gewonnenen Phagen, mit Hilfe der zuvor angelegten K12-Kultur amplifiziert (bis zur Fällung mit PEG-NaCl). Zur Vorbereitung der nächsten Selektionsrunde wurden vier Wells mit 10 µg IgG und ein Well mit 10 µg Target in 100 µl Volumen (aufgefüllt mit PBS) bei 4 °C gecoatet (siehe auch Abbildung 2.3), zusätzlich wurde eine weitere LB-Tet-Agarplatte mit K12 bestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2. Tag – 2. Selektion Analog zum Vortag wurden 40 ml K12-Kultur in LB-Tet-Medium bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ inkubiert. Anschließend wurde die Amplifikation des Vortages beendet (s.u.). 80 µl der erhaltenen, amplifizierten Phagen wurden daraufhin mit 20 µl 1 % BSA vermischt und für die zweite Selektionsrunde verwendet (siehe Abschnitt 2.2.3.1). Zur Überprüfung ob bereits eine Anreicherung von spezifischen Phagen stattgefunden hatte, wurden 0,5 µl der selektierten Phagen (auf dem Target sowie auf dem letzten IgG) mit 180 µl K12-Flüssigkultur vermischt. Davon werden 100 µl direkt auf einer IPTG-X-Gal-Agarplatte ausgestrichen. Weitere 20 µl der bereits infizierten K12 wurden mit 180 µl nativem K12 vermischt und erneut 100 µl auf IPTG-X-Gal ausplattiert (Verdünnung 1:10). Die verbleibenden Phagen wurden bei -20°C gelagert. Für die am nächsten Tag stattfindende zweite Amplifikation war das Anlegen einer LB-Tet-Agarplatte mit K12 erforderlich.

3. Tag – 2. Amplifikation 40 ml K12-Kultur in LB-Tet-Medium wurden bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ angelegt. Die Anzahl der blau gefärbten Kolonien (d.h. die Menge der von Phagen infizierten *E. coli* Kolonien) der am Vortag ausgestrichenen IPTG-X-Gal-Platten wurde ausgezählt und insbesondere das Verhältnis zwischen den auf dem Target selektionierten Phagen mit den auf dem IgG erhaltenen Phagen verglichen (dabei spricht ein großes Verhältnis von Target-AK zu IgG für eine spezifische Anreicherung). Es folgte die zweite Amplifikation der auf dem Target-AK erhaltenen Phagen (s.u.) bis zur PEG-NaCl-Fällung.

Für die dritte Selektionsrunde wurden sieben Wells mit jeweils 10 μg IgG und ein Well mit 10 μg Target-AK in jeweils 100 μl Volumen (in PBS) über Nacht bei 4 °C gecoatet (siehe auch Abbildung 2.3) sowie eine K12-Kultur auf einer LB-Tet-Agarplatte über Nacht bei 37 °C angelegt.

4. Tag – 3. Selektion An diesem Tag fand die dritte (und in der Regel letzte) Selektionsrunde statt. Zum Ablauf der Selektion siehe Abschnitt 2.2.3.1. Ebenso wie nach der zweiten Selektionsrunde wurde eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt um die Selektivität der erhaltenen Phagen abschätzen sowie Einzelklone picken und amplifizieren zu können. Hierfür wurden 20 ml LB-Tet-Flüssigmedium mit K12 infiziert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5. Tag – Herstellung von Einzelphagenklonen Am fünften Tag fand das Picken und Amplifizieren von Einzelklonen von einer der IPTG-X-Gal-Platten statt, welche die auf dem Target selektierten Phagen enthielt. Hieraus wurde das unreine Phagenamplifikat erstellt, siehe hierzu Abschnitt 2.2.4.

6. Tag – ELISA mit unreinem Phagenamplifikat Zur Überprüfung der Spezifität der gepickten und amplifizierten Einzelklone, wurden ELISAs mit den unreinen Phagenamplifikaten durchgeführt. Da die Menge der enthaltenden Phagen nicht bekannt ist, ist die Aussagekraft des ELISAs von qualitativer Natur.

Weiteres Vorgehen Nachdem die unreinen Phagen auf ihre Bindungseigenschaften evaluiert wurden, wurde die DNA der Phagen extrahiert und sequenziert (siehe Kapitel 2.2.7 und Kapitel 2.2.8), welche eine spezifische Bindung zeigten. Parallel dazu wurde das reine Phagenamplifikat hergestellt und titriert (siehe Kapitel 2.2.3.2 und Kapitel 2.2.5). Mit diesen titrierten Phagen konnte dann ein standardisierter ELISA durchgeführt werden und die gemessenen Bindungsstärken miteinander verglichen werden (siehe Kapitel 2.2.6).

2.2.3.1 Phagenselektion

Durch die Phagenselektion wurden Phagen mit einer geringen Bindung zu dem jeweiligen Antikörper aussortiert und jene mit hoher Affinität selektioniert.

Für die erste Selektionsrunde wurde die Antikörper-Lösung aus dem Well entfernt, bevor dieses für 1 h bei Raumtemperatur mit 120 μl 3 % BSA geblockt, und schließlich

Selektionsrunde	Anzahl	jeweilige Dauer
1	0	–
2	3	45 min
3	6	25 min
(4)	(6)	(25 min)

TABELLE 2.9: Häufigkeit und Dauer der Depletion der Phagen mittels polyklonalem IgG in den jeweiligen Selektionsrunden

einmal mit 120 μl PBS gewaschen wurde. Danach wurden 10 μl der nativen Phagendatenbank in 100 μl Volumen (in 1 % BSA) in das Well pipettiert auf dem Schüttelinkubator inkubiert, alle 20 min gemischt, und anschließend gelöst (s.u.).

Bei den anderen Selektionsrunden wurde wie folgt verfahren: Zur Entfernung von Phagen mit unselektivem Bindungsverhalten wurden die zuvor selektierten Phagen in 100 μl Volumen gegenüber polyklonalem IgG konfrontiert. Hierfür wurden Wells mit 10 μg IgG Intratect über Nacht gecoatet, dann für mindestens 1 h bei Raumtemperatur mit 120 μl 3 % BSA blockiert und anschließend mit 120 μl PBS gewaschen. Die Dauer und Häufigkeit der negativen Selektion war abhängig von der Selektionsrunde (siehe Tabelle 2.9) und fand bei Raumtemperatur auf dem Schüttelinkubator bei regelmäßigem Durchmischen mittels Pipette statt. Nach dieser Depletion wurden die Phagen aufgeteilt und jeweils 45 μl Lösung (aufgefüllt auf 100 μl mittels 1 % BSA) auf dem Target-AK sowie IgG Intratect für 1 h positiv selektioniert (siehe auch Abbildung 2.3) und beide Phagenfraktionen getrennt gelöst.

Zur Lösung der an die jeweiligen Antikörper gebundenen Phagen wurden zunächst die Phagenlösungen aus den entsprechenden Wells entfernt und diese anschließend 5/10/15 mal (1./2./3. Selektionsrunde) mit jeweils 120 μl PBS-T gespült. Durch Zugabe von 100 μl 0,2 M Glycin (pH 2,2) für 10 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttelinkubator wurden die Antikörper-Phagen-Bindungen gelöst. Die erhaltene Lösung wurde daraufhin abgenommen und mit 15 μl Tris-HCl (pH 9,0) gepuffert.

2.2.3.2 Phagenamplifikation

Mit einer über Nacht gewachsenen *K12*-Kultur wurden 20 ml LB-Medium beimpft und bei 37 °C inkubiert. Nachdem diese eine $OD_{500} = 0,5$ erreicht hatte wurden die zu amplifizierenden Phagen hinzugegeben und für vier Stunden bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Zum Entfernen bakterieller Bestandteile wurde das Gemisch auf zwei Zentrifugationsröhrchen aufgeteilt und für 10 min bei 8 000 min^{-1} und 4 °C zentrifugiert. Der nun klare Überstand wurde in neue Zentrifugationsröhrchen überführt, mit 1,5 ml PEG/NaCl vermischt und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt (*PEG-NaCl-Fällung*).

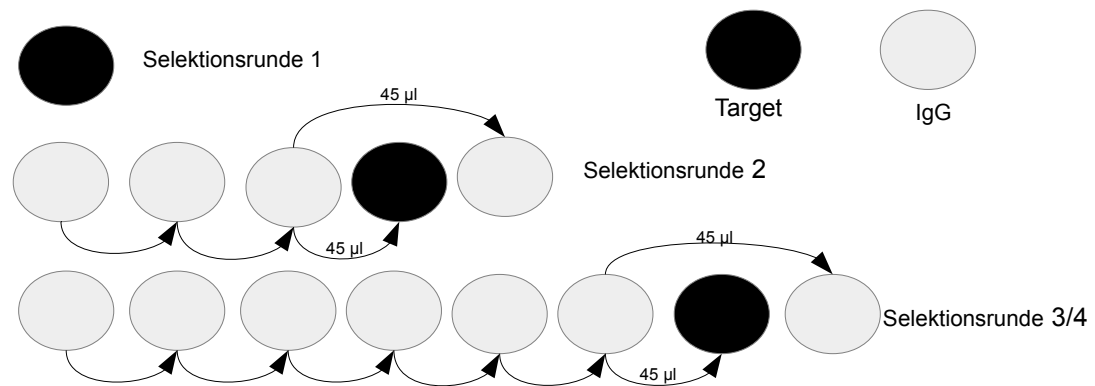


ABBILDUNG 2.3: Schematische Darstellung des Ablaufs der verschiedenen Selektionsrunden

Am nächsten Tag erfolgte das erneute Zentrifugieren bei $10\,000\text{ min}^{-1}$ für 20 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hierbei blieben die Phagen in einem Pellet im Zentrifugationsröhrchen zurück. Der Überstand wurde entsorgt, für 5 min wie zuvor zentrifugiert und der restliche Überstand entfernt. Das verbleibende Pellet wurde in $200\ \mu\text{l}$ TBS schüttelnd bei Raumtemperatur gelöst (mindestens für 10 min, jedoch bis das Pellet vollständig aufgelöst ist). Die in TBS gelösten Phagen wurden in ein $1,5\text{ ml}$ Mikroreaktionsgefäß überführt. Zur Entfernung bakterieller Restbestandteile wurde das Mikroreaktionsgefäß bei $14\,000\text{ min}^{-1}$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 min auf der Tischzentrifuge zentrifugiert, anschließend wurde der Inhalt in ein neues Gefäß überführt.

2.2.4 Herstellung von Phageneinzelklonen

1. Schritt – unreines Phagenamplifikat Die über Nacht bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ gewachsene K12-Kultur in LB-Tet-Medium wurde im Verhältnis 1 : 100 mit sterilem LB-Tet-Medium verdünnt und pro Klon 1 ml des Gemischs in ein Kulturröhrchen aliquotiert. Mit einem autoklavierten Holzstäbchen wurde eine solitäre, blaue (d.h phageninfizierte) Kolonie von der IPTG-X-Gal-Agarplatte gepickt und mit dieser ein Kulturröhrchen angeimpft (im Regelfall wurden 12 solcher Einzelklone gepickt). Die nun beimpften K12-Kulturen wurden für 4 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Schüttelinkubator wachsen gelassen. Der Inhalt der Kulturröhrchen wurde in $1,5\text{ ml}$ Mikroreaktionsgefäße überführt und mit der Tischzentrifuge bei $8\,000\text{ min}^{-1}$ für 5 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Anschließend wurde der Inhalt in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Das so erhaltene Produkt wird als *unreines Phagenamplifikat* bezeichnet.

2. Schritt – reines Phagenamplifikat Analog zum ersten Schritt wurde eine über Nacht gewachsene K12-Flüssigkultur verdünnt. Für jeden Klon wurden 20 ml verdünnte Kultur in einen Erlenmeyerkolben gegeben, mit 5 μl des unreinen Amplifikats vermengt und für 5 h bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien-Phagen-Gemische auf zwei Zentrifugationsröhrchen aufgeteilt und bei 8 000 min^{-1} für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in zwei neuen Zentrifugationsröhrchen mit 1,5 ml PEG-NaCl vermischt (*PEG-NaCl-Fällung*) und über Nacht auf Eis bei 4 °C verwahrt.

Am nächsten Tag wurden die Zentrifugationsröhrchen bei 8 000 min^{-1} für 20 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand entfernt und erneut für 5 min zentrifugiert. Der restliche Überstand wurde abpipettiert und das Phagenpellet in 200 μl TBS gelöst und für 15 min (mindestens jedoch bis zur vollständigen Lösung des Pellets) bei Raumtemperatur schüttelnd gelöst. Der Inhalt der beiden Zentrifugenröhrchen, die aus dem selben Einzelklon hervorgingen, wurde in einem 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß gepoolt. Zur Entfernung bakterieller Restbestandteile wurde dieses auf der Tischzentrifuge bei 14 000 min^{-1} für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der nun reine Phagenüberstand wurde in ein sauberes 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Dieses Produkt wird als *reines Phagenamplifikat* bezeichnet.

2.2.5 Phagentitration

Zur Bestimmung der Phagen-Konzentration [$\text{pfu}/\mu\text{l}$] wurden diese titriert. Eine K12-Flüssigkultur wurde angelegt und bei 37 °C bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,5$ inkubiert. Eine 96-Well-Platte wurde wie in Tabelle 2.10 mit PBS beschickt. Nach jedem nun folgenden Schritt war die Pipettenspitze zu werfen. Von jedem zu testenden Phagen (A bis N) wurden 5 μl in das erste Well pipettiert und gemischt. Aus diesem ersten Well wurden 20 μl in das daneben liegende Well überführt und erneut gemischt. Dies wurde wiederholt bis 20 μl in das leere Well 7 überführt wurden. Ab dann wurden jeweils 2 μl in das nächste Well überführt und gemischt. Die Wells 9 bis 11 wurden anschließend mit jeweils 180 μl der K12-Lösung vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. 100 μl des so erhaltenen Phagen-Bakterien-Gemischs wurden dann auf IPTG-XGal ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag konnte dann die Anzahl der blauen (d.h. von Phagen infizierten) Kolonien ausgezählt und somit auf die Konzentration geschlossen werden.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	45	180	180	180	180	180	–	18	18	18	18	18
B
.
.
N

TABELLE 2.10: PBS-Beschickung einer 96-Well-Platte für die Phagentitration. Alle Angaben in Mikroliter (μl)

2.2.6 ELISA zur Testung der Bindungsstärke zwischen Phage und Antikörper

Zur Messung der Bindungsstärke von Phagen zu einem Antikörper wurde ein Sandwich-ELISA durchgeführt. Dabei wurde als Detektions-Antikörper *Anti-M13-HRP-conjugate* und als Substrat *ABTS* eingesetzt. Um unspezifische Bindungen sowohl von Seiten des Phagen als auch von Seiten des Antikörpers auszuschließen wurde der zu testende Phagen auch auf polyklonalem IgG, sowie ein randomisierter Phage *R1* auf dem Antikörper getestet. Zur Quantifizierung der Enzymaktivität wurde die Adsorption im Plate Reader bei 405 nm bestimmt. Siehe auch Abbildung 2.4.

Für jeden zu testenden Phagen wurden jeweils ein Well mit 5 μg Target-Antikörper in insgesamt 100 μl Volumen (in PBS) und ebenso ein Well mit der äquivalenten Menge IgG in ebenfalls 100 μl , ein Well mit IgG (Negativkontrolle) und zusätzlich eines mit Rituximab (Positivkontrolle) beschickt und die vorbereitete Platte bei 4 °C über Nacht gecoatet (alternativ: für 2 h bei 37 °C) (siehe hierzu auch Abbildung 2.5). Am nächsten Tag wurden die Antikörper-Lösungen verworfen und zur Blockierung vakanter Proteinbindungsstellen alle Wells mit 120 μl 3 % BSA für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttelinkubator blockiert. Nach dem Entfernen des BSA wurden 10⁸ pfu titrierte Phagen (im Falle von unreinem Phagenamplifikat wurden pauschal 20 μl verwendet) in 100 μl Volumen (PBS) hinzugegeben und für eine Stunde auf dem Schüttelinkubator bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phagen wurden entsorgt und die Wells viermal mit 120 μl PBS-T sowie einmal mit 120 μl PBS gewaschen. Anti-M13-HRP-conjugate wurde 1:5 000 in 1 % BSA verdünnt und 100 μl in jedes Well gegeben. Die Inkubation und die anschließende Waschung erfolgte analog zu der vorangegangenen Phase. Danach wurden die Wells mit 100 μl aktivierter ABTS-Lösung beschickt und die Adsorption im Photometer bei 405 nm nach 15, 20, 25, 30 min sowie gegebenenfalls zu späteren Zeitpunkten bestimmt.

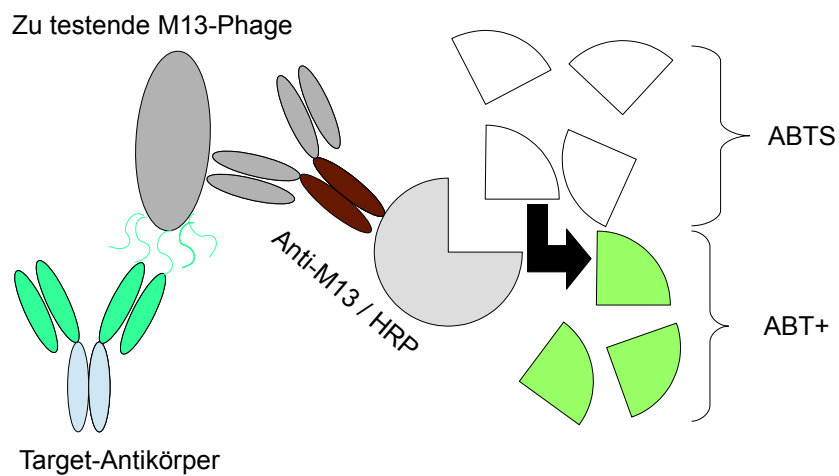


ABBILDUNG 2.4: Schematische Darstellung des Sandwich-ELISAs (modifiziert zur Darstellung der Sachverhalte im konkreten Fall)

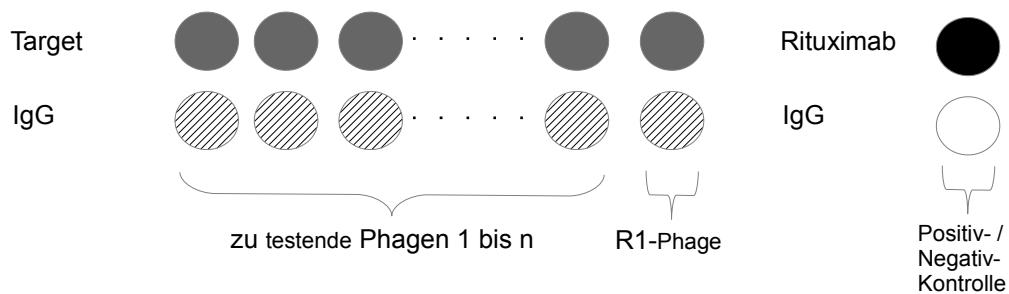


ABBILDUNG 2.5: Übersicht zur Beschickung des ELISAs und der angewandten Phagen. Die positiv- / negativ-Kontrolle erfolgte mit dem Phagen 5.2 tet.

2.2.7 DNA-Extraktion aus den Phagen

500 μl des unreinen Phagenüberstandes (alternativ 200 μl des reinen Phagenamplikats) in insgesamt 500 μl Volumen (in TBS) wurden mit 200 μl PEG/NaCl gemischt, für 10 min bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert und anschließend bei 13 000 min^{-1} zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Das Phagenpellet wurde dann in 100 μl Iodid Puffer sowie 250 μl Ethanol für 10 min bei Raumtemperatur ohne Schütteln resuspendiert. Dann wurde das Gemisch erneut für 10 min bei 13 000 min^{-1} zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das restliche Pellet wurde zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, der Überstand entfernt und das Pellet für 15 min getrocknet. Zur Resuspendierung wurden 30 μl Reinstwasser hinzugegeben. Mit Hilfe des Mikrophotometes wurde die Konzentration der DNA gemessen. 300 ng der DNA wurden mit 6 μl Reinstwasser und 20 pmol des Primers -96 gIII und zur Sequenzierung an *GATC* geschickt.

MM023	
<i>benutzter Phage</i>	<i>Antikörper</i>
1243.5	03/09 (prä-Tx)
ALRMPTMKTFIP	08/09
	11/10
	08/12
MM031	
<i>benutzter Phage</i>	<i>Antikörper</i>
160.4	03/10 (prä-Tx)
TYPIHGALSKGG	09/10
	02/11
	05/11
	11/11
	08/12

TABELLE 2.11: Für den zeitlichen Verlauf verwendete Phagen und Antikörper

2.2.8 Sequenzierung der Phagen-DNA

Für die Sequenzierung der Phagen-DNA wurde der Dienst *LIGHTrun Sequenzierung* der GATC Biotech AG, Konstanz, D genutzt.

2.2.9 Übersetzung der sequenzierten DNA in eine Aminosäuresequenz

Die DNA des verwendeten Phagen M13 ist (+)-ss-DNA. Der verwendete Primer *-96 gIII* setzte 96 Aminosäuren in 3'-Richtung des codogenen Strangs an. Hieraus folgt, dass das Produkt der durchgeführten Sanger-Sequenzierung die revers-komplementäre Aminosäuresequenz ergibt. Zum Erhalt der durch die Phagen-DNA codierte Aminosäuresequenz wurde also zunächst die revers-komplementäre DNA gebildet und diese anschließend in eine Aminosäuresequenz übersetzt.

2.2.10 Zeitlicher Verlauf der humoralen Immunantwort

Um den Verlauf der humoralen Immunantwort zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu quantifizieren wurden ELISAs (wie in Abschnitt 2.2.6) durchgeführt. Hierfür wurden die am stärksten bindenden Phagen zu jedem Konsensmotiv auf den unfraktionierten IgGs verschiedener Zeitpunkte (prä- und post-Tx) getestet. Der Phage 1243.5 wurde durch M. Binder selektiert. Für die verwendeten Phagen und Antikörper (Zeitpunkte der Probenentnahme) siehe Tabelle 2.11.

<i>Phage</i>	<i>Sequenz</i>
1243.5 (MM023 λ)	ALRMPTMKTFIP
146.2 (MM040 κ)	YDRLLYQSTLRY
147.15 (MM040 λ)	EGSILYYTSKWTW
149.1 (MM041 λ)	NLSSDMYRWNWP
149.5 (MM041 λ)	MFDVRRPPGNTFK
150.5 (MM045 κ)	NTVDGDDIYLTP
151.1 (MM045 λ)	KAIEEPKAMMYL
152.2 (MM047 κ)	TNSMPPDAYTE
153.2 (MM047 λ)	MGFERNPPRVLS
159.13 (sequentiell MM023/MM031/MM041)	THMWVWDVSPEL
160.6 (MM031 κ)	YPSLFRPTAFNN
161.8 (MM023 κ)	HNSEAPMPVKNQ
162.27 (MM025 κ)	QNLTFISLPGNI
166.18 (MM043 λ)	DVNTRRGIDLLK
166.21 (MM043 λ)	VLPNTSSGRLLM
167.8 (MM046 λ)	QSMHIGSSSVSG
168.1 (MM031 κ)	SAMAGASAMSTM
168.2 (MM031 κ)	TFASMSKDSGNE
168.11 (MM031 κ)	YDSTLTWGQSHA
170.3 (MM054 κ)	MVEDDLSSPRYM
171.4 (MM043 κ)	SPSTVAGVTLLD
172.4 (MM046 κ)	YRPDEFWSPRKS
173.7 (MM051 κ)	HGVSFERYNLS

TABELLE 2.12: Verwendete Phagen und die von ihnen präsentierte Aminosäuresequenz

2.2.11 Kreuzreaktivitäts-Analyse

Für die Kreuzreaktivitäts-Analyse wurden die zuvor auf den post-Tx-Antikörpern selektionierten Phagen verwendet. Hierbei wurde der am stärksten bindende Phage zu jedem Konsensmotiv ausgewählt (siehe Tabelle 2.12). Zur Überprüfung von Kreuzreaktivitäten wurden ELISAs (wie in Abschnitt 2.2.6) mit diesen Phagen auf den unfraktionierten IgGs der *MM*-Patienten durchgeführt. Als Kontrolle dienen zum einen gesunde Spender (*HD*), sowie zum anderen Patienten, die aus anderer Indikation als einem *MM* eine *allo*-Tx erhalten haben (*KMT*). Die Phagen ab 160 wurden von mir selektiert (siehe hierzu Kapitel 3). Der Phage 1243.5 wurde von M. Binder und die Phagen 146 bis 153 von M. Voigt selektiert (siehe dazu Anhang A). Bei 159.13 handelt es sich um einen Phagen der durch sequentielle Selektion entstanden ist, das heißt die erste Selektionsrunde fand auf MM023 statt, die zweite auf MM031 und die letzte auf MM041, diese Selektion wurde ebenfalls von M. Voigt durchgeführt.

2.2.12 Statistische Methodik

In den Kreuzreaktivitäts-ELISAs Das Signifikanzniveau wurde mit $p=0,05$ angesetzt. Die Bindung zwischen Antikörper und Phage wurde als relevant angesehen, wenn sie im Student-T-Test signifikant gegenüber der Bindung am randomisierten Phagen R1 waren, sowie mindestens die 1,8 fache Bindungsstärke gegenüber diesem hatten. Für den Student-T-Test wurde zunächst die relative Bindung der Phagen an den Antikörpern für den jeweiligen ELISA anhand der zu dieser Messung gehörenden R1-Phagen errechnet:

$\frac{Adsorption_{405nm}(betrachteterPhage)}{Adsorption_{405nm}(R1)}$ Anschließend wurde ein einseitiger Student-T-Test aller relativen Messwerte gegenüber aller relativen R1- (das heißt Kontroll-) Werte durchgeführt. Einmalig hoch gemessene Werte ($>3x$ der Mittelwert der anderen Messungen), die sich nicht reproduzieren ließen, wurden ausgeschlossen.

Zur Analyse ob Patienten mit hoher Polyreaktivität eine bessere Prognose besitzen, wurde der χ^2 -Test angewendet.

Kapitel 3

Ergebnis

3.1 Auftrennung der Antikörper mittels kappaSelect

Die Auftrennung der Antikörper in eine κ - und eine λ -Fraktion sollte das Selektieren eines breiteren Spektrums möglicher Konsensmotive erlauben. Es zeigten sich λ -Fraktionen ohne nennenswerten κ -Anteil, während die κ -Fraktionen eine hohe Kontamination mit λ -Anteilen aufwiesen. Es konnten (mit Ausnahme von MM054) ausreichende Mengen an IgG- κ bzw. IgG- λ gewonnen werden. Von MM054 konnte aufgrund mangelnden Materials keine ausreichende λ -Fraktion gewonnen werden.

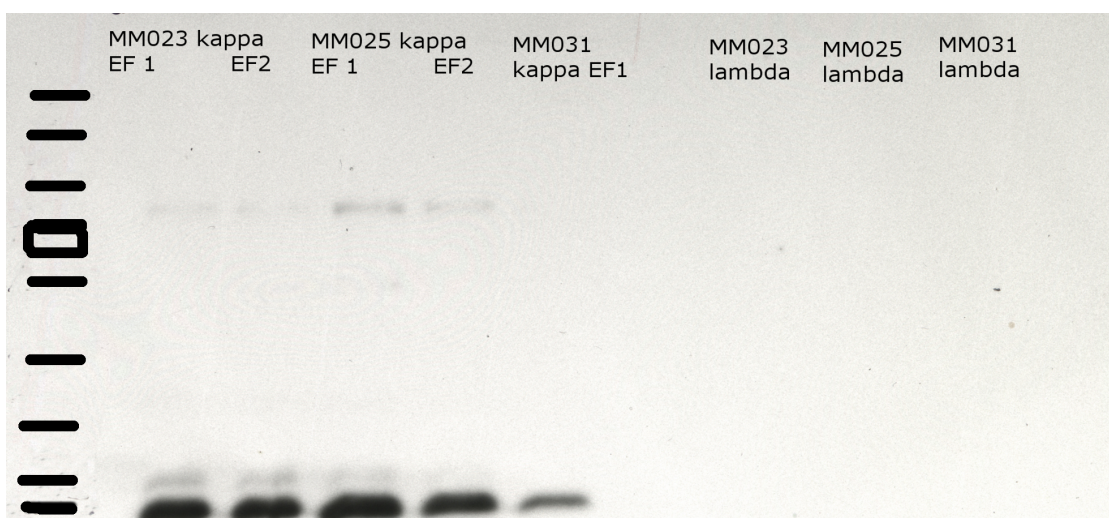


ABBILDUNG 3.1: Westernblot zur Überprüfung der Reinheit der Lambda-Fractionen von Kappa-Kontaminationen von MM023, MM025 und MM031. (EF= Elutionsfraktion). Die Grafik wurde nachbearbeitet (Skala neu eingefügt, Beschriftung).

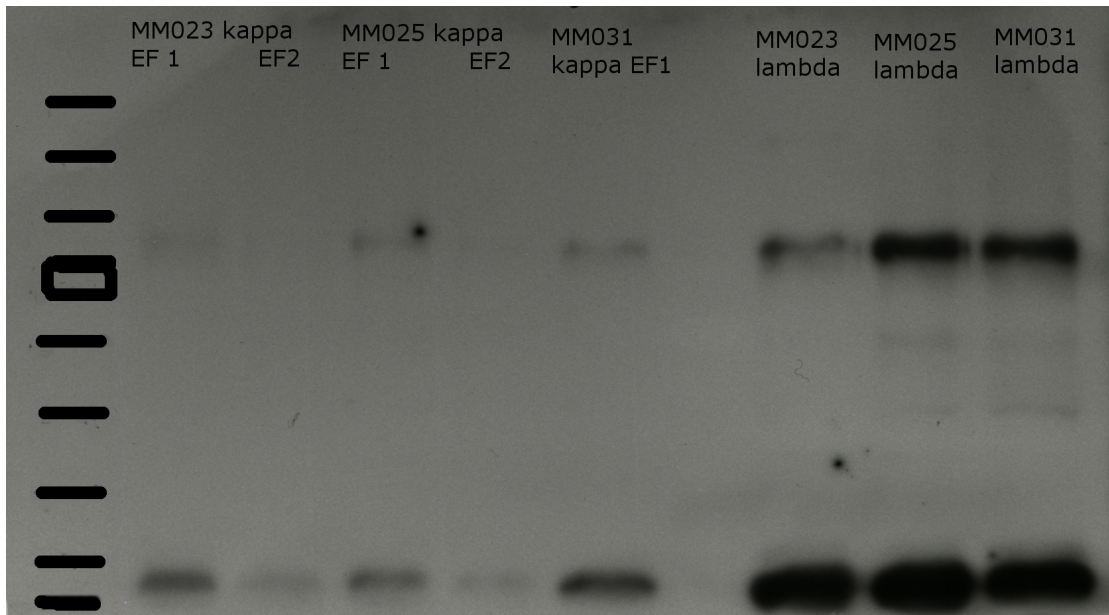


ABBILDUNG 3.2: Westernblot zur Überprüfung der Reinheit der Kappa-Fractionen von Lambda-Kontaminationen von MM023, MM025 und MM031. (EF= Elutionsfraktion). Die Grafik wurde nachbearbeitet (Skala neu eingefügt, Beschriftung).

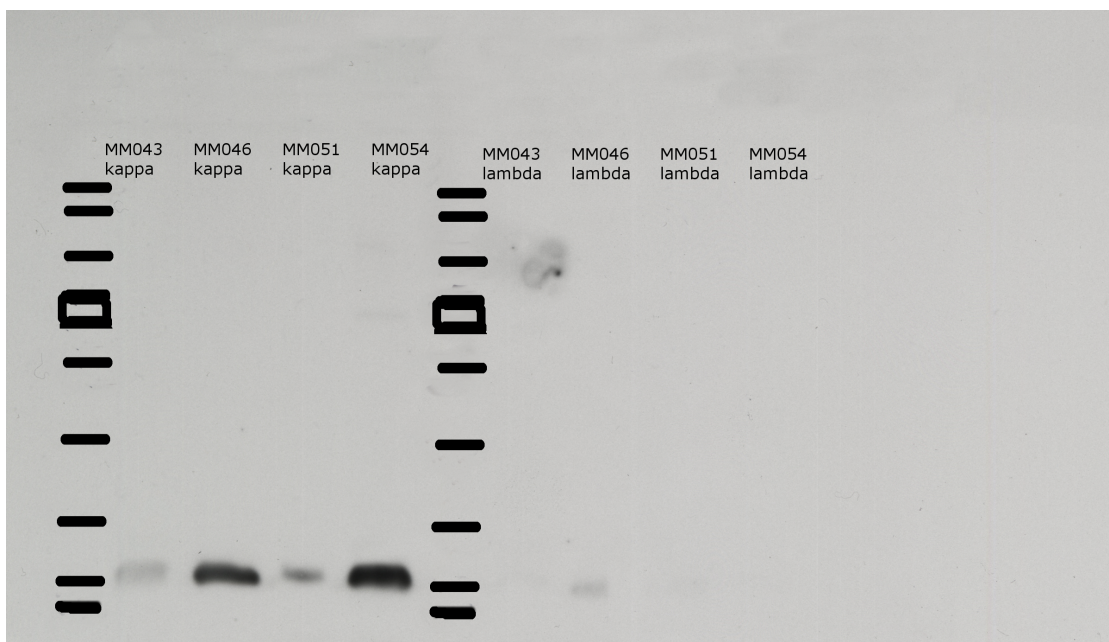


ABBILDUNG 3.3: Westernblot zur Überprüfung der Reinheit der Lambda-Fractionen von Kappa-Kontaminationen von MM043, MM046, MM051 und MM054. Die Grafik wurde nachbearbeitet (Skala neu eingefügt, Beschriftung).

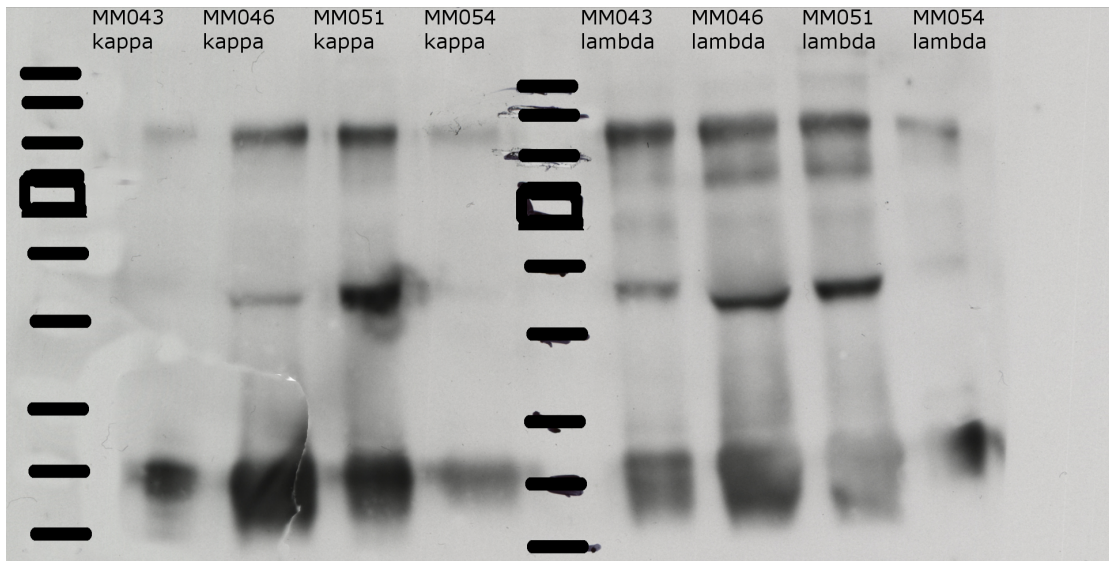


ABBILDUNG 3.4: Westernblot zur Überprüfung der Reinheit der Kappa-Fractionen von Lambda-Kontaminationen von MM043, MM046, MM051 und MM054. Die Grafik wurde nachbearbeitet (Skala neu eingefügt, Beschriftung, abgerissene Ecke wieder angefügt).

3.2 Auf den post-Tx Antikörpern selektierte Phagen

In diesen Experimenten wurden Phagen gesucht, die Mimotope der jeweiligen Antikörper darstellen. Hierzu wurde auf jeder Fraktion der Patienten-Antikörper (κ und λ) ein Phagedisplay durchgeführt, Einzelklone gepickt, per ELISA die Bindungsstärke evaluiert und schließlich die DNA sequenziert um mittels Konsensmotiv das Mimotop abzuleiten. Bei den sieben von mir untersuchten Patienten konnten auf allen κ -aber nur auf drei λ -Fraktionen Phagen selektiert werden. Bei den Experimenten auf den λ -Fraktionen von MM025, MM031 und MM051 zeigte sich keine spezifische Anreicherung der Phagen. Bei drei gesunden Spendern wurde ebenfalls versucht per Phage-Display ein Konsensmotiv zu isolieren, jedoch konnte hierbei keine Anreicherung über den Verlauf des Phagedisplay beobachtet oder ein erkennbares Konsensmotiv isoliert werden.

Soweit nicht anders angegeben, wurden 3 Selektionsrunden durchgeführt sowie 12 Einzelklone gepickt. Mit diesen Phagen wurde ein Screening-ELISA mit unreinen Phagenüberständen gemacht. Die Phagen mit einer mindestens 1,8-fach stärkeren Bindung auf der AK-Fraktion als auf polyklonalem IgG wurden weiter evaluiert. Pro Patient konnten zwischen einem und drei unterschiedliche Konsensmotive isoliert werden. Für die ELISAs mit reinen Phagen wurden drei voneinander unabhängige Messungen durchgeführt. Diese sind in den ELISA-Diagrammen mit Standardabweichung dargestellt. Alle in diesem Kapitel gezeigten Motive wurden von mir gefunden. Für die im Kreuzreaktivitätssays verwendeten Phagen, die von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe evaluiert wurden siehe Appendix A.

3.2.1 MM023

kappa Bei 8 der 12 gescreenten Phagen zeigte sich eine positive Bindung. Aus diesen konnte das Konsensmotiv *N W/F E A P* extrahiert werden. Dabei zeigten die Phagen trotz eindeutigem Konsensmotiv nur eine schwache Bindung auf der AK-Fraktion.

lambda Die Selektion auf der λ -Fraktion wurde bereits durch M. Binder durchgeführt (siehe hierzu Abbildung A.1)

3.2.2 MM025

kappa Nach drei Selektionsrunden zeigte keiner von 24 gescreenten Phagen eine spezifische Bindung an MM025 κ . Daraufhin wurde eine vierte Selektionsrunde abgeschlossen. Hiernach zeigten 10 von 12 gescreenten Klonen eine Bindung oberhalb des Hintergrunds. Aus diesen wurde auf das Konsensmotiv *F I/V S L P G N I/L* geschlossen.

lambda Eine Selektion von bindenden Klonen gelang auf der λ -Fraktion von MM025 nicht.

3.2.3 MM031

kappa Die Selektion von MM031 κ wurden zunächst auf der κ -Fraktion der Patienten-Antikörpern vom Februar 2011 durchgeführt. Hierbei zeigten 9 der 12 gescreenten Klonen eine spezifische Bindung. Von diesen trugen 7 Klone das Motiv *KDSGNE*, welches zuvor von M. Binder als zum Paraprotein gehörig beschrieben worden war. Daher wurde eine erneute Selektion auf später gewonnenen Antikörpern vom Mai 2011 gemacht. Hierbei wurden ebenfalls 9 von 12 Einzelklone als spezifisch bindend getestet, wobei wiederum vier dieser das Paraproteinmotiv zeigten. Insgesamt konnten auf diese Weise folgende Motive extrahiert werden: *K D S G N E*, *Y P I/L*, *M X X X S A M*.

lambda Eine Selektion von bindenden Klonen gelang auf der λ -Fraktion von MM031 nicht.

3.2.4 MM043

kappa 10/12 der gescreenten Klone zeigten eine Spezifität für MM043 κ . Hierbei konnte aus fünf Phagen das Konsensmotiv $S P S X V X G V/L T/S$ extrahiert werden. Zwei Phagen zeigten das Motiv $S A X X L M$. Hierbei scheint es sich um das Konsensmotiv von MM043 λ ($P X X X S G X X L M$) zu handeln. Die vier restlichen Phagen zeigten Sequenzen die zu keinem Motiv zusammengefasst werden konnten.

lambda Zunächst zeigte keines der 12 gepickten Klone eine Positivität, daraufhin wurden 12 weitere gepickt von denen 10 positiv waren. Hierbei konnten die zwei Konsensmotive $T X X Q G X L X K$ sowie $P X X X S G X X L M$ extrahiert werden. Einer der zehn Klone lies sich keiner Motiv-Gruppe zuordnen.

3.2.5 MM046

kappa Neun der gepickten Klone zeigten ein spezifisches Bindungsverhalten. Aus fünf dieser Klone lies sich das Konsensmotiv $Y X P D/E X F W$ extrahieren. Die übrigen vier konnten keinem Konsensmotiv zugeordnet werden.

lambda Nur vier der gepickten Klone zeigten ein spezifisches Bindungsverhalten im Screening. Daher wurden zwölf weitere gepickt von denen sechs im Screening positiv waren. In den ELISAs mit titrierten Phagen wurden nur noch sehr schwache Bindungen gemessen und eine Bindung über dem Hintergrund konntenur für wenige Phagen bestätigt werden. Dennoch ließen sich die zwei Konsensmotive $H I/V G X X X V$ sowie $D X P X X X X X D K$ extrahieren.

3.2.6 MM051

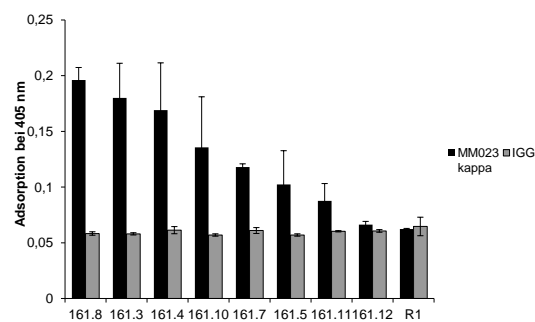
kappa Acht der zwölf gepickten Klone zeigten eine Bindung über dem Hintergrund. Hieraus konnte das Konsensmotiv $H G/A V S$ abgeleitet werden.

lambda Eine Selektion von spezifisch bindenden Klonen gelang auf der λ -Fraktion von MM051 nicht.

3.2.7 MM054

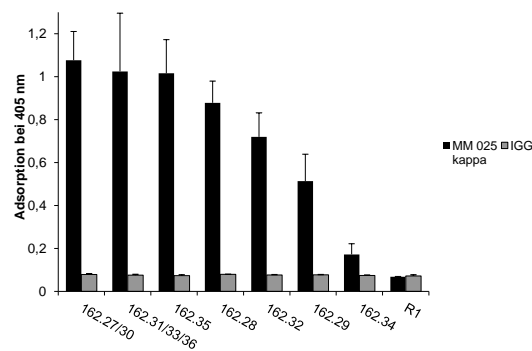
kappa Fünf der gepickten Klone zeigten eine spezifische Anreicherung auf MM054 κ . Aus dreien davon konnte das Konsensmotiv *D L S S P R* sowie aus zweien das bereits von MM031 bekannte Konsensmotiv *K D S G N E* abgeleitet werden.

lambda Aus den vorliegenden Seren von MM054 konnten keine ausreichenden Mengen einer λ -Fraktion extrahiert werden. Daher konnte keine Selektion auf dieser Fraktion durchgeführt werden.



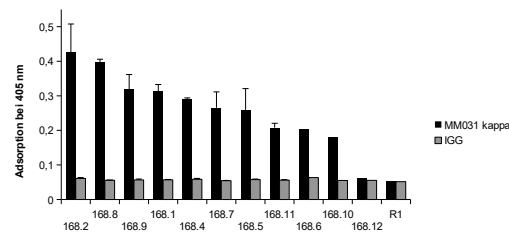
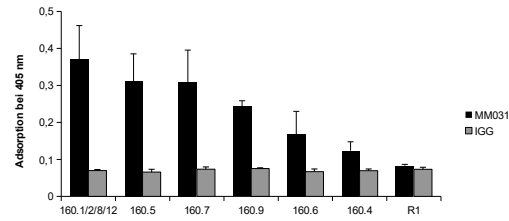
No.	amino acid sequence of phage clone	absolute and relative frequency of phage clone
selection of 12mer phage library on MM023 kappa		
161.08	H N S E A P M P V K N Q	1/8 (13%)
161.03	W N W E A Q S L A M P L	1/8 (13%)
161.04	A N F E V P D A H S W R	1/8 (13%)
161.10	S N F E A G W Y S I I P	1/8 (13%)
161.07	G S F E A P V Q H M K N	1/8 (13%)
161.05	H N W E A C E N S A R C	1/8 (13%)
161.11	G N C E V S W K Q S P H	1/8 (13%)
161.12	S H P S T R I Y E K N Y	1/8 (13%)
	consensus motif: N W/F E A P	

ABBILDUNG 3.5: ELISA zur Evaluation der Bindungsstärke und zugehörige Sequenzen von MM023 κ



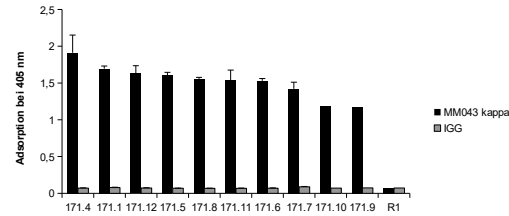
No.	amino acid sequence of phage clone	absolute and relative frequency of phage clone
selection of 12mer phage library on MM025 kappa		
162.27/30	Q N L T F I S L P G N I	2/10 (20%)
162.31/33/36	N I F T P L P G N L M E	3/10 (30%)
162.35	R F L R V C L V I C R T	1/10 (10%)
162.28	Y V S L P G N A S S I R	1/10 (10%)
162.32	Y S V V S L P G N L E K	1/10 (10%)
162.29	V Q G T V S L P G N M T	1/10 (10%)
162.34	Y F P S P N H Q I S R L	1/10 (10%)
	consensus motif: F I/V S L P G N I	

ABBILDUNG 3.6: ELISA zur Evaluation der Bindungsstärke und zugehörige Sequenzen von MM025 κ



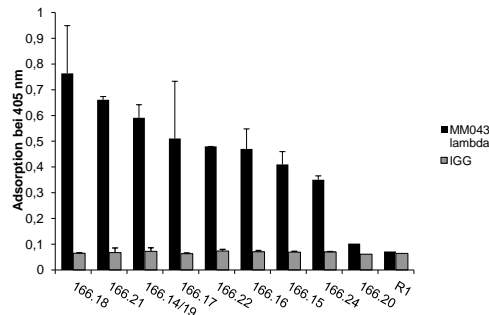
No.	amino acid sequence of phage clone	absolute and relative frequency of phage clone
selection of 12mer phage library on MM031 kappa		
160.01/02/08/12; 168.08/04	T F A S M S K D S G N E	6/18 (33%)
160.05	K T S G N E S I A L W Q	1/18 (6%)
160.07	W S G F K D D G N E T W	1/18 (6%)
160.05	S S K D V G N E F S W S	1/18 (6%)
168.09	K D S G N E Q T F L P P	1/18 (6%)
160.06	Y P S L F R P T A F N N	1/18 (6%)
160.04	T Y P I H G A L S K G G	1/18 (6%)
168.12	Y P I Q G G S L K E Q M	1/18 (6%)
168.01	S A M A G A S A M S T M	1/18 (6%)
168.07	A L A N M S P V S A M V	1/18 (6%)
168.06	N D Y W S K P V W S D E	1/18 (6%)
168.11	Y D S T L T W G Q S H A	1/18 (6%)
168.10	G S G G K D D G K E R W	1/18 (6%)
	consensus motif: K D S G N E Y P I/L M X X X S A M	

ABBILDUNG 3.7: ELISA zur Evaluation der Bindungsstärke und zugehörige Sequenzen von MM031 κ (beide Daten)



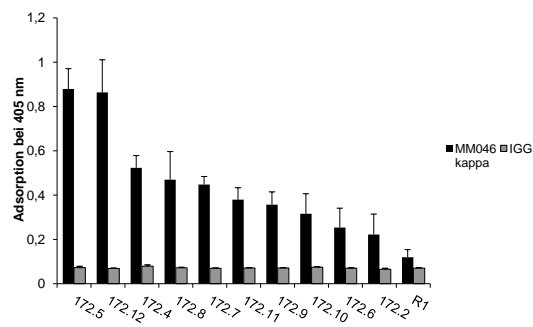
No.	amino acid sequence of phage clone	absolute and relative frequency of phage clone
selection of 12mer phage library on MM043 kappa		
171.04	S P S T V A G V T L L D	1/10 (10%)
171.01	S P N L T K G L S M W P	1/10 (10%)
171.12	S P S A V V G T N L L R	1/10 (10%)
171.05	G F S T I S G L S M T T	1/10 (10%)
171.06	V N R T P G L S L L E R	1/10 (10%)
171.07	T Y M S T V S A T A L M	1/10 (10%)
171.10	D P M P H S A L H L M H	1/10 (10%)
171.08	I T P Y L G T P P N L H	1/10 (10%)
171.11	Q F A K Q R P P M Q E W	1/10 (10%)
171.09	T S N A A M M W D V S P	1/10 (10%)
	consensus motive: S P S X V X G v/L z/s S A X X L M	

ABBILDUNG 3.8: ELISA zur Evaluation der Bindungsstärke und zugehörige Sequenzen von MM043 κ



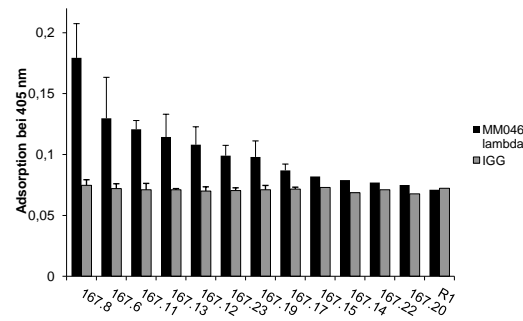
No.	amino acid sequence of phage clone	absolute and relative frequency of phage clone
selection of 12mer phage library on MM043 lambda		
166.18	D V N T R R G I D L L K	1/10 (10%)
166.14/19	L P T P V Q G S L T K N	2/10 (20%)
166.24	T A V P Q G Q L T K T F	1/10 (10%)
166.20	H S A G L T Q G R L D K	1/10 (10%)
166.22	S P P M I N L N R P P Q	1/10 (10%)
166.21	V L P N T S S G R L L M	1/10 (10%)
166.15	T P C A A N G K M L M A	1/10 (10%)
166.17	S P S V I T G H Q L A T	1/10 (10%)
166.16	M P V P P Y S G G Q L M	1/10 (10%)
	consensus motive: T X X Q G X L X K P X X X S G X X L M	

ABBILDUNG 3.9: ELISA zur Evaluation der Bindungsstärke und zugehörige Sequenzen von MM043 λ



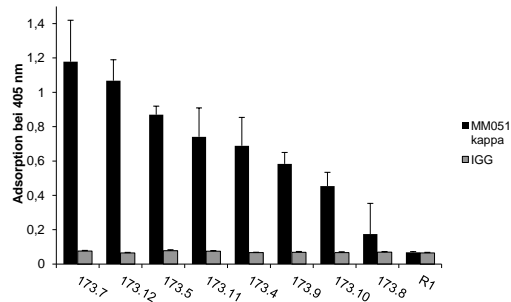
No.	amino acid sequence of phage clone	absolute and relative frequency of phage clone
selection of 12mer phage library on MM046 kappa		
172.5	Y R P D E F W S P R K S	1/10 (10%)
172.12	E A Y A P D T F W L T H	1/10 (10%)
172.11	I Y W P P E R H W Q P I	1/10 (10%)
172.9	I E M W P T E R A W R G	1/10 (10%)
172.6	D V F R Y N P E Y F W R	1/10 (10%)
172.4	M H Q P W D V P P M R W	1/10 (10%)
172.8	F Q V P G I S A T P A F	1/10 (10%)
172.7	Q S S H Y N I L F W N K	1/10 (10%)
172.6	D V F R Y N P E Y F W R	1/10 (10%)
172.2	Y Y P R T S E V S I T G	1/10 (10%)
	consensus motive : Y X P D/E X F W	

ABBILDUNG 3.10: ELISA zur Evaluation der Bindungsstärke und zugehörige Sequenzen von MM046 κ



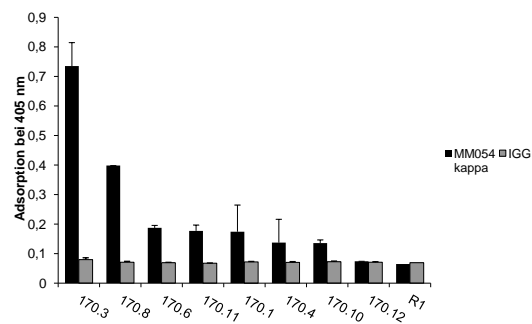
No.	amino acid sequence of phage clone	absolute and relative frequency of phage clone
selection of 12mer phage library on MM046 lambda		
167.08	Q S M H I G S S S V S G	1/10 (10%)
167.12	F V A E H V G N R Y V M	1/10 (10%)
167.06	G D P F A K L T Q A P S	1/10 (10%)
167.13	M P D H P L V G K L D K	1/10 (10%)
167.23	D L P V N S K M D K G M	1/10 (10%)
	A D P M H K P S H S L K	1/10 (10%)
167.11	G Y L K P L H S L N K H	1/10 (10%)
167.19	Q T N H S R T P A F G Y	1/10 (10%)
167.17	K I M L C P T M E V H N	1/10 (10%)
167.14	S Y R M D A R E W N R H	1/10 (10%)
	consensus motive: H ±/v G X X X V D X P X X X X D K	

ABBILDUNG 3.11: ELISA zur Evaluation der Bindungsstärke und zugehörige Sequenzen von MM046λ



No.	amino acid sequence of phage clone	absolute and relative frequency of phage clone
selection of 12mer phage library on MM051 kappa		
173.7	H G V S F E R Y N L	1/8 (13%)
173.12	N A F H G A S M T T A Q	1/8 (13%)
173.5	Y T T T S T S Q R P V Q	2/8 (25%)
173.10	V D C P V K W H A L C T	1/8 (13%)
173.11	N N A F S D A S R S V T	1/8 (13%)
173.8 173.9	H A L S N S S T S M	2/8 (25%)
	consensus motive: H G/A v/L s/z	

ABBILDUNG 3.12: ELISA zur Evaluation der Bindungsstärke und zugehörige Sequenzen von MM051κ



No.	amino acid sequence of phage clone	absolute and relative frequency of phage clone
selection of 12mer phage library on MM051 kappa		
170.3	M V E D D L S S P R Y M	1/5 (20%)
170.8	G V E L P L H L S S P R	1/5 (20%)
170.4	H P F D L S S P R Q R Y	1/5 (20%)
170.6	A L G S M S K D S G N E	1/5 (20%)
170.1	K D S G N E Q T F L P	1/5 (20%)
	consensus motive: D L S S P R K D S G N E	

ABBILDUNG 3.13: ELISA zur Evaluation der Bindungsstärke und zugehörige Sequenzen von MM054 κ

3.3 Zeitlicher Verlauf der humoralen Immunantwort

Im Rahmen dieser Dissertation wurde am Beispiel zweier Patienten (MM023 und MM031) getestet, wie sich die humorale Immunantwort über die Zeit entwickelt. Hierfür wurden zeitlich disjunkte, unfraktionierte Antikörper-Seren verwendet und auf ihre Bindung zu einem Phagen untersucht, welcher zuvor auf den post-Tx Antikörpern dieser Patienten selektiert wurde. Es zeigt sich bei beiden untersuchten Patienten, dass die entsprechende Phage vier Monate nach Durchführung einer *allo-Tx* keine signifikanten Bindungen aufweist. Zu den jeweils darauffolgenden Zeitpunkten (19 Monate bei MM023; 9 Monate bei MM031) ist das Maximum der humoralen Immunantwort erreicht. Bei beiden getesteten Patienten-Antikörpern kommt es nach diesem Maximum zu einem Abfall der humoralen Immunantwort. Während bei MM031 ab dem Zeitpunkt 18 Monate post-Tx keine Bindung mehr nachweisbar ist, ist diese bei MM023 auch 40 Monate post-Tx noch nachweisbar.

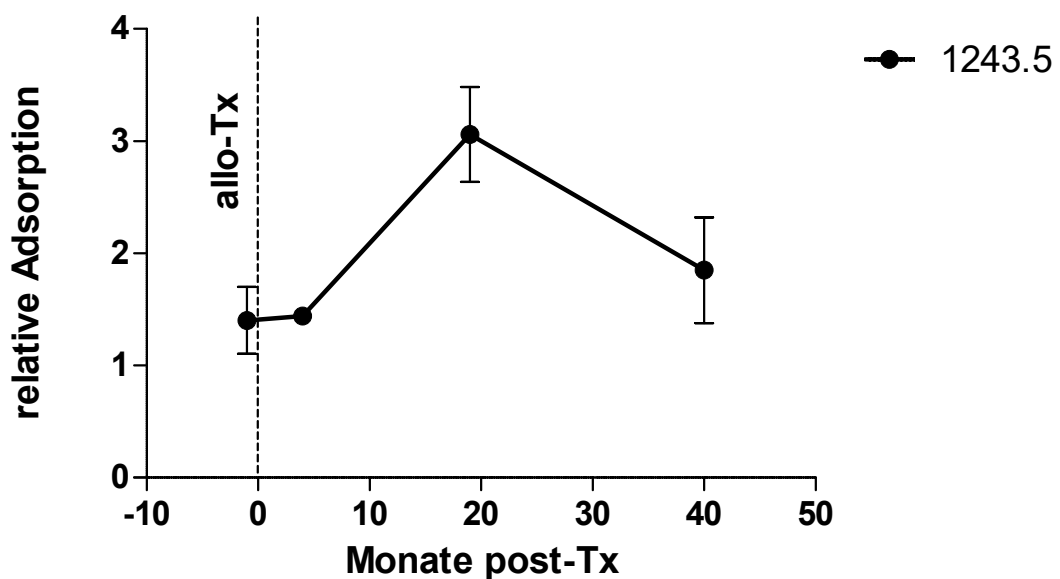


ABBILDUNG 3.14: Verlauf der humoralen Immunantwort gegenüber 1243.5 (ALRMPTMKTFIP) von MM023 (Allo-Tx im April 2009)

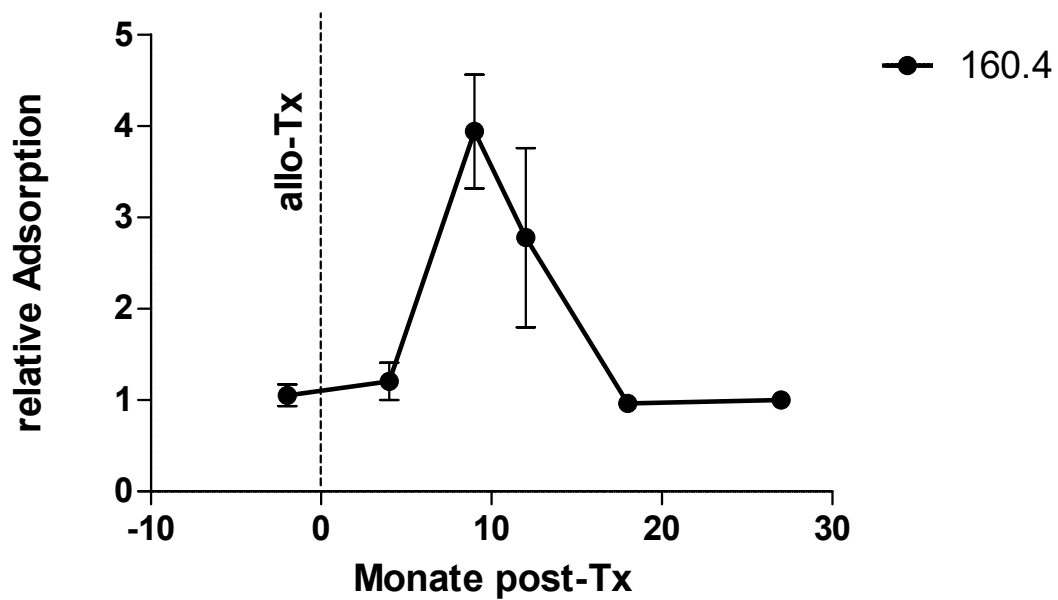


ABBILDUNG 3.15: Verlauf der humoralen Immunantwort gegenüber 160.4 (TYPIHGALSKGG) von MM031 (Allo-Tx im Mai 2010)

3.4 Kreuzreaktivitäts-Analyse

Zwischen den gefundenen Phagen und den post-Tx Antikörpern zeigen sich weitreichende, in Abbildung 3.17 dargestellte, Kreuzreaktionen. Eine Kreuzreaktivität zwischen den gefundenen Phagen und den Antikörpern gesunder Spender sowie *allo-Tx*-Patienten ohne *MM* ist praktisch nicht existent. Die Anzahl der erkannten Motive variiert dabei stark zwischen den unterschiedlichen Patienten (Median 3 (Range 1 bis 15; Mittelwert 4,36; Standardabweichung 3,91) (Tabelle 3.1)). Ebenso unterscheiden sich die einzelnen Epitope in der Anzahl der Patienten die diese erkennen (Median 2 (Range 0 bis 5; Mittelwert 2,1; Standardabweichung 1,2) (Tabelle 3.2)). Das Ansprechen auf die *allo-Tx* nach 12 Monaten korreliert signifikant ($p = 0,0157$) mit der Polyepitopreaktivität (d.h. ≥ 3 spezifisch bindende Phagen) (Tabelle 3.3).

	10,74**	2,04*	2,72*	1,22	1,16	1,42	1,09	1,30	1,06	1,09	1,45	1243.5(MM023κ) ALRMPTMKTFIP
	1,11	1,50	3,09*	13,63*	1,08	1,27	1,08	1,27	1,26	1,08	1,09	146.2 (MM040κ) YDRLLYQSTLRY
	1,00	1,08	2,15*	13,38*	0,91	1,29	1,06	1,16	1,01	0,98	1,05	147.15(MM040λ) EGSILYYTSKWTW
	1,03	0,91	0,85	0,92	3,27*	1,07	0,96	1,05	0,98	1,51	1,03	149.1(MM041λ) NLSSDMYRWNP
	1,00	1,09	1,41	1,09	7,66*	1,46	1,07	1,26	0,99	1,29	1,15	149.5(MM041λ) MFDVRRPPGNTFFK
	1,10	1,51	2,77*	1,52	1,25	1,17	8,63**	1,22	0,98	1,08	1,10	150.5(MM045κ) NTVDGDDIYLTP
	3,77**	1,49	3,37*	1,51	1,08	1,47	7,80**	1,87*	1,06	1,10	1,18	151.1(MM045λ) KAIEEPKAMMYL
	1,05	1,13	2,59*	1,53	1,11	1,17	1,08	1,24	13,47**	1,07	1,04	152.2(MM047κ) TNSMPPDAYTE
	1,28	1,91*	1,49	1,60	2,14*	1,08	1,35	1,22	13,13*	1,22	1,09	153.2(MM047λ) MGFERNFPRVLS
	1,91*	1,16	3,07*	1,91*	3,41*	1,05	1,11	3,21*	1,08	1,12	1,22	159.13 THMWVWDVSPPEL
	0,96	1,11	5,54*	1,09	0,93	1,14	0,99	1,11	0,95	0,96	1,16	160.6(MM031κ) YPSLFRPTAFNN
	0,99	1,07	1,28	0,99	0,92	1,12	1,00	1,11	0,97	0,99	1,07	161.8(MM023κ) HNSEAMPVKNQ
	1,07	5,47*	2,15*	1,35	1,18	1,41	1,06	2,27*	1,14	1,45	1,06	162.27(MM025κ) QNLTFISLPGNI
	0,99	1,23	0,97	1,39	1,12	3,24*	1,01	1,13	0,96	1,00	1,10	166.18(MM043λ) DVNTRRGIDLLK
	1,03	1,12	2,22*	1,25	1,17	3,51*	1,04	1,91*	0,93	1,02	1,18	166.21(MM043λ) VLPNTSSGRLLM
	0,94	1,04	1,15	1,15	0,88	0,99	0,96	5,16*	0,92	1,07	1,00	167.8(MM046λ) QSMHIGSSSVSG
	0,95	1,13	3,60*	1,24	1,09	1,04	1,24	1,27	1,03	1,33	0,98	168#1(MM031κ) SAMAGASAMSTM
	1,02	1,21	12,48*	1,29	1,13	1,27	1,03	2,17*	1,04	0,98	6,35*	168.9(MM031κ) TFASMSKDSGNE
	1,01	1,07	2,85*	5,22*	0,93	1,13	0,95	1,27	0,94	1,00	0,99	168#11(MM031κ) YDSTLTWQSHA
	1,11	1,30	2,08*	1,51	1,13	1,06	1,12	2,73*	1,01	1,04	3,51*	170#3(MM054κ) MVEDDLSSPRYM
	1,03	1,07	1,58	1,09	1,46	12,79**	1,01	1,65	1,00	0,99	1,15	171.4(MM043κ) SPSTVAGVTLDD
	1,08	1,06	1,96*	1,20	1,67	1,46	1,00	6,99*	0,89	1,12	1,05	172.4(MM046κ) YRPDEFWSPRKS
	1,02	1,96	1,74	1,30	1,04	1,18	1,07	1,13	1,12	5,19*	1,39	173#7(MM051κ) HGVSFERYNLS
MM023												
MM025												
MM031												
MM040												
MM041												
MM043												
MM045												
MM046												
MM047												
MM051												
MM054												

ABBILDUNG 3.16: Relative Bindungsstärke der jeweiligen Phagen an die Antikörper der post-Tx-MM-Patienten (*:p≤0,05; **:p≤0,001)

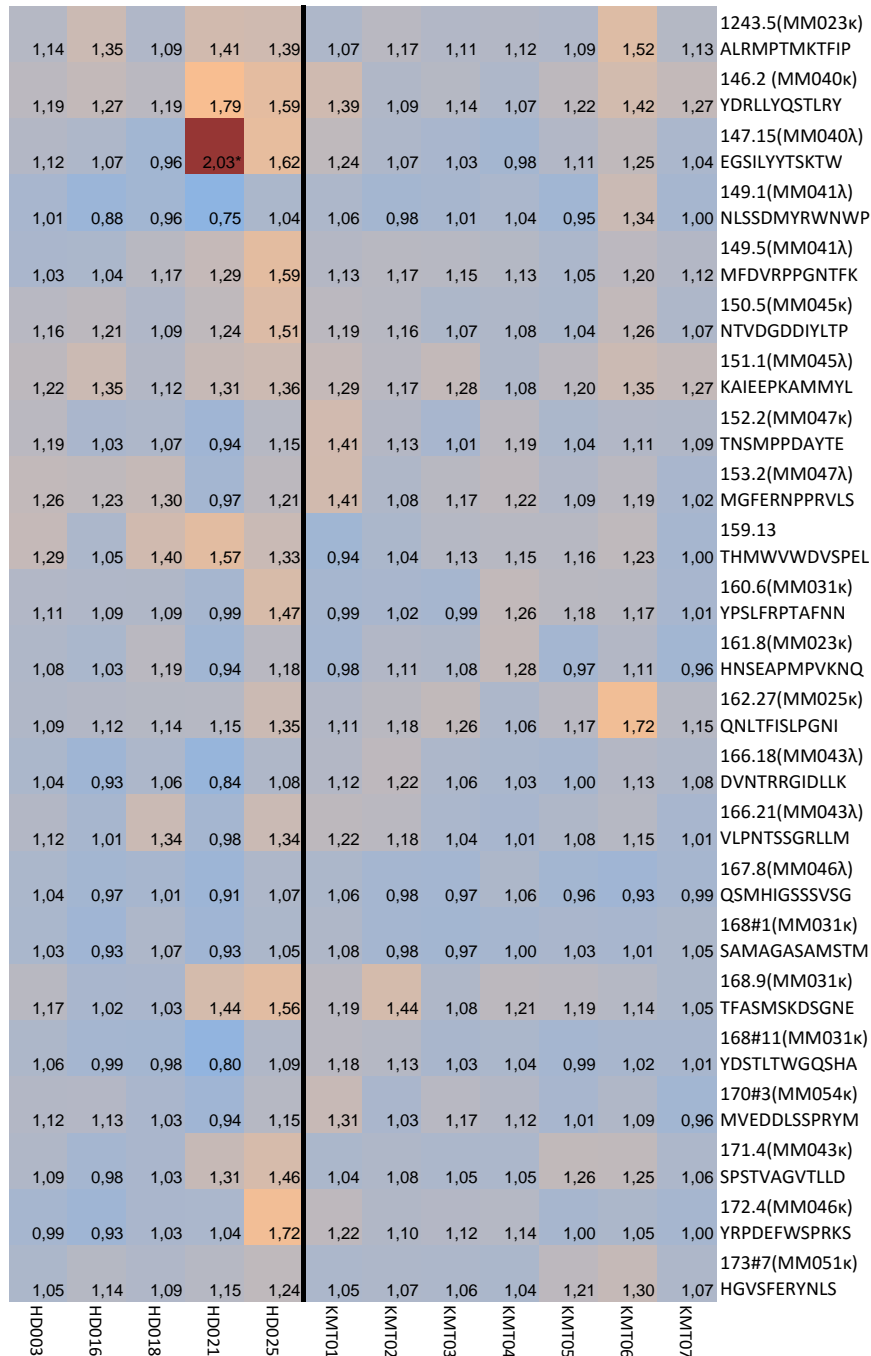


ABBILDUNG 3.17: Relative Bindungsstärke der jeweiligen Phagen an die Antikörper der gesunden Kontrollen (HD) und der aus anderer Indikation allogenen Knochenmarks transplantierten (KMT) (*:p≤0,05; **:p≤0,001)

<i>Patient</i>	<i>erkannte Phagen</i>
MM023	3
MM025	3
MM031	15
MM040	4
MM041	4
MM043	3
MM045	2
MM046	9
MM047	2
MM051	1
MM054	2

TABELLE 3.1: Erkannte Motive der verschiedenen Fraktionen

<i>Phage</i>	<i>#AK</i>	<i>Phage</i>	<i>#AK</i>
1243.5 (MM023 λ)	3	162.27 (MM025 κ)	3
146.2 (MM040 κ)	2	166.18 (MM043 λ)	1
147.15 (MM040 λ)	2	166.21 (MM043 λ)	3
149.1 (MM041 λ)	1	167.8 (MM046 λ)	1
149.5 (MM041 λ)	1	168.1 (MM031 κ)	1
150.5 (MM045 κ)	2	168.2 (MM031 κ)	3
151.1 (MM045 λ)	4	168.11 (MM031 κ)	2
152.2 (MM047 κ)	2	170.3 (MM054 κ)	3
153.2 (MM047 λ)	3	171.4 (MM043 κ)	2
159.13(sequentiell)	5	172.4 (MM046 κ)	2
160.6 (MM031 κ)	1	173.7 (MM051 κ)	1
161.8 (MM023 κ)	0		

TABELLE 3.2: Verwendete Phagen und die Häufigkeit ihrer Erkennung

<i>Erkannte Epitope</i>	<i>CR</i>	<i>non-CR</i>	<i>Total</i>
≥ 3	7	0	7
< 2	1	2	3
<i>Total</i>	8	2	10
<i>p</i>	0,0157		

TABELLE 3.3: χ^2 -Test zum Nachweis einer signifikanten Abhängigkeit der Tiefe der Remission zu der Menge der erkannten Epitope

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Übersicht

Der kürzliche Einzug monoklonaler Antikörper in die Therapie des *MM* verdeutlicht, dass die spezifische Immuntherapie zu einer Verbesserung der Patientenversorgung führt und daher zukünftig eine immer größere Rolle spielen wird (Thanendrarajan et al. 2016) (El-Deiry, 2013). Unerlässlich hierfür ist das Entdecken und Evaluieren von Tumorantigenen. In dieser Dissertation wurde auf Epitopebene untersucht, gegen welche Antigene sich post-Tx-Antikörper beim *MM* richten, um hieraus mögliche Ziele einer spezifischen Immuntherapie abzuleiten. Bei allen untersuchten Patienten konnten mittels Phagedisplay Mimotope mit spezifischen Bindungseigenschaften gefunden werden. Es liegt nahe, dass es sich bei den gefundenen Motiven um Ziele einer Post-Tx B-Zell-Antitumor-Antwort handelt. In den Verlaufsanalysen konnte die Dynamik dieser dargestellt werden. Mit den durchgeführten Kreuzreaktivitätsanalysen wurde demonstriert, dass die gefundenen Epitope spezifisch für das *MM* nach allo-Tx sind und diese Patienten ein charakteristisches Profil an Epitopen erkennen lassen. Hierbei zeigt sich eine signifikante Abhängigkeit der Prognose von der Anzahl erkannter Epitope. Zunächst erörtere ich die Vor- und Nachteile der verwendeten Methodik zur Beantwortung der darliegenden Fragestellung. Im Anschluss daran werden die einzelnen, von mir erlangten Ergebnisse diskutiert.

4.2 Diskussion der angewendeten Methodik

4.2.1 Trennung der Antikörper in ihren κ - und λ -Anteil

Bei der Trennung der Antikörper in ihren κ - und λ -Anteil gelang im Westernblot eine nahezu vollständige Aufreinigung der λ - von der κ -Fraktion. Jedoch blieb die κ -Fraktion stark durch λ -Anteile kontaminiert. Ursache hierfür ist vermutlich, dass es nicht gelang vor der Elution der Antikörper aus den kappaSelect-Säulen letztere ausreichend von λ -Bestandteilen zu befreien. Auch nach Veränderung des Protokolls zur Aufreinigung gelang eine ausreichende Trennung nicht. Zur Durchführung der Experimente war allerdings keine absolute Separation der κ - von der λ -Fraktion nötig. Entscheidend ist vielmehr, dass jeweils eine der Fraktionen nach der Separation dominant gegenüber der anderen ist. Und so zeigen sich auch retrospektiv betrachtet sehr wenige Überschneidungen der Konsensmotive auf beiden Fraktionen.

4.2.2 Phagedisplay zum Epitopmapping von Phagen

Das Phagedisplay ist als Möglichkeit zum schnellen Epitopmapping von Antikörpern etabliert (Pande et al. 2010) (Rojas et al. 2014). Ein häufiges Anwendungsgebiet ist hierbei das Erforschen der funktionellen Epitope von monoklonalen Antikörpern (z.B. bei Antikörpern gegen EGFR (Binder et al. 2006), (Voigt et al. 2012), (Navari et al. 2014)). Die Herausforderung dieser Arbeit bestand mitunter darin, Epitope von Antikörpern polyklonaler Natur zu charakterisieren. Bei allen untersuchten Patienten konnte mindestens ein Mimotop selektioniert werden, welches spezifisch für die jeweiligen Antikörper ist. In diesem Zusammenhang konnten weiterhin die Epitope der humoralen Immunantwort charakterisiert werden. Die gefundenen Mimotope waren allerdings in der Regel zu kurz und mehrdeutig, sodass ein direkter Rückschluss auf das parentale Antigen, durch Computer-basierte Methoden (z.B. *BLAST*), nicht möglich war.

4.2.3 ELISA zur Evaluation der Bindungsstärke

Zur Testung der gewonnenen Klone auf dem jeweiligen Antikörper Bei der Suche nach dem Klon mit der stärksten Bindung zu einem bestimmten Antikörper konnte das ELISA trennscharfe Ergebnisse liefern. Die Bindungsstärke der Phagen auf ihren Selektion-Antikörpern ist hierbei sehr unterschiedlich.

Im Kreuzreaktivitätstest Mit Hilfe des ELISAs konnten die Kreuzreaktivitäten identifiziert werden. Es zeigten sich häufig relativ schwache Bindungen von Phagen auf den Antikörpern auf denen sie nicht selektiert wurden. Trotzdem konnte mit Hilfe des ELISAs reproduzierbar Bindungen nachgewiesen werden und somit Kreuzreaktivitäten identifiziert werden.

4.3 Epitope der humoralen Anti-Tumor-Immunantwort

4.3.1 Bisherige Arbeiten zur Anti-Tumor-Immunität beim *MM*

Die Immunüberwachung (*immune surveillance*) beschreibt die Fähigkeit des Immunsystems entartete Zellen zu erkennen und zu zerstören. Es fungiert daher als erste Abwehr gegen das Aufkommen von Tumoren (Swann und Smyth, 2007). CD8⁺-T-Zellen können, vermittelt über Dendritische Zellen, zur Tumorlyse führen und somit das Tumorstadium begrenzen (siehe Abbildung 4.1, rechter Weg) (Dhodapkar et al. 2002) (Wen et al. 2002). Der Verlust dieser tumorsuppressiven Eigenschaften der CD8⁺-T-Zellen könnte ein wichtiger Schritt für den Übergang eines *MGUS* in ein *MM* sein (Kocoglu und Badros, 2016). Spezifische Antigene die ein Ziel für eine T-Zell-vermittelte Immunität darstellen können, sind weitreichend beschrieben (Li et al. 2014) (Rapport et al. 2015) (Walz et al. 2015). Der Einfluss der humoralen Immunantwort auf das Tumorstadium ist wesentlich schlechter erforscht. Hierbei liegen mit Ausnahme von SEREX-Experimenten keine Erkenntnisse zu von Antikörpern erreichbaren Tumorantigenen vor (Schieferdecker et al. 2016)(Xie et al. 2001)(F. L. Zhou et al. 2005).

Antigenidentifikation mittels SEREX Bei der *serological identification of antigens by recombinant expression cloning (SEREX)* wird ausgenutzt, dass Tumor-Patienten Antikörper gegen autologe Tumorantigene entwickeln können. Hierbei werden cDNAs aus Tumorzellen isoliert und die Genprodukte auf Phagen präsentiert. Anschließend wird die Affinität zwischen Patienten-Antikörpern zu den Genprodukten evaluiert. Hierdurch können diejenigen Antigene identifiziert werden, für die spezifische Antikörper im Patientenserum existieren (Sahin et al. 1995). So konnten mittels *SEREX* verschiedene autologe Antigene identifiziert werden, gegen die *MM*-Patienten Antikörper bilden, ohne jedoch genaue Epitope bestimmen zu können (Xie et al. 2001)(F. L. Zhou et al. 2005).

4.3.2 Eitopsuche in dieser Arbeit

In dieser Arbeit selektierte ich Epitope, gegen welche sechs Patienten post-allo-Tx Antikörper bildeten. Diese Patienten bildeten im weiteren Verlauf nach der Knochenmarktransplantation APB, welche mit einer Verbesserung der Prognose einhergehen (Sucak et al. 2010) (Jo et al. 2013), sowie Ausdruck einer B-Zell-vermittelten Anti-Tumor-Immunantwort sind (Rahlff et al. 2012). Da die Antikörper *in vivo* durch somatische Hypermutation entstanden, sind die zugehörigen Epitope spezifisch und für das Immunsystem zugänglich. Durch die verwendete Methodik des Phagedisplay mit randomisiertem Insert ist es möglich praktisch jedes Antigen der B-Zell-Immunantwort darzustellen (Schieferdecker et al. 2016). Eine Bestimmung der parentalen Antigene durch einen Sequenzabgleich ist nicht möglich. Ursächlich hierfür ist die Kürze und Ambiguität der isolierten Konsensmotive, welche nicht zwangsläufig lineare sondern auch konformationelle Epitope darstellen können. Jedoch kann die Identifizierung des parentalen Antigens durch weitere Experimente erfolgen. So konnten (Schieferdecker et al. 2016) für das Motiv THMWVWDVSPSEL (159.13) HSP60 als parentales Antigen identifizieren. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von (Rahlff et al. 2012), welche HSP als Ziel einer humoralen Immunantwort nach *allo-Tx* erkannte. Pro Patient konnten bis zu drei unterschiedliche Konsensmotive isoliert werden. Dies bedeutet, dass es bis zu drei dominierende Antikörper innerhalb des polyklonalen Antikörper-Reservoirs der post-Tx-B-Zellen gibt.

4.4 Hypothese zur Entstehung und Funktion der post-Tx Antikörper

Neben den direkten zytotoxischen Effekten einer Antitumor-Chemotherapie, spielt die Induktion des immunogenen Zelltodes (*ICD*) für die Wirkung und den Langzeiterfolg einer Therapie eine wichtige Rolle (Kroemer et al. 2013). Entscheidend für diesen Effekt ist die durch die Therapie ausgelöste Sekretion oder Exposition von *Damage-associated molecular patterns (DAMPs)*. *Heat shock Proteine* können unter der Therapie mit Bortezomib auf der Zellmembran präsentiert werden (Spisek, Charalambous et al. 2007) und so eine Reaktion des Immunsystems hervorrufen (Spisek und Dhodapkar, 2007). Analog zu der von (Kroemer et al. 2013) beschriebenen direkten Aktivierung dendritischer Zellen durch DAMPs, postuliert unsere Arbeitsgruppe eine Aktivierung dendritischer Zellen über den FC γ -Rezeptor durch DAMPs-oponisierende Antikörper und somit eine Sensibilisierung des Immunsystems gegen den Tumor (Schieferdecker et al. 2016) (siehe hierzu Abbildung 4.1. Der Anti-Tumor-Effekt der Antikörper

liegt demnach nicht primär in der komplement- oder zellvermittelten Tumorlyse sondern in der Modulation und Aktivierung des Immunsystems hin zu einer Anti-Myelom-Immunantwort. Der *Graft-vs.-Myeloma Effekt* könnte, aufgrund der immunologischen Inkompatibilität, die Qualität der B-Zell-Antitumor-Antwort positiv beeinflussen (Schieferdecker et al. 2016, vgl. hier die Polyepitopreaktivität von allo-Tx und auto-Tx Patienten).

4.5 Zeitlicher Verlauf der humoralen Immunantwort

Bei den Experimenten zum zeitlichen Verlauf der humoralen Immunantwort konnte vier Monate nach stattgefunderer allo-Tx eine humorale Immunantwort gegenüber den selektierten Phagen nicht nachgewiesen werden. Abnorme Proteinbanden treten in der Immunfixation median nach 7,9 (Range 2,2 - 95,7) Monaten auf (Jo et al. 2013) und bleiben dann median für 5,5 (Range 1,5 - 14) Monate bestehen (Sucak et al. 2010). Diese Experimente legen eine Dynamik und Transienz der B-Zell vermittelten Anti-Tumor-Immunantwort nahe. In den hier durchgeführten Versuchen zeigt sich vier Monate post-Tx nur eine schwach ausgeprägte (MM023) bzw. keine (MM031) Erkennung der entsprechenden Phagen. Ursächlich hierfür könnte sein, dass unmittelbar nach der Transplantation das Immunsystem sich zunächst rekonsolidieren muss und erst nach gewisser Zeit eine ausreichende B-Zell-Immunantwort bilden kann. Nach etwa einem Jahr kommt es zum Maximum der Epitop-spezifischen Antikörper, daraufhin kommt es zu einem Abfall der Antikörper auf das Niveau prä-Tx. Dies deckt sich mit der beobachteten Transienz in den Experimenten zu den *APB*. Die Abnahme des Antikörper-Titers geht vermutlich auf die Reduktion an antigenem Stimulus zurück. Dies kann sowohl an einer reduzierten Tumormasse als auch an einer Veränderung der immunogenen Oberfläche der Myelomzellen liegen (Guillerey et al. 2016).

4.6 Kreuzreaktivitäten

Die post-Tx Antikörper der Mehrzahl der Patienten erkennt nicht ausschließlich die Phagen die auf ihnen selektiert wurden, sondern es existieren weitreichende Kreuzreaktivitäten. Hierbei bildet sich im Rahmen dieser Experimente für jeden Patienten ein charakteristisches Profil an Epitopen die erkannt werden. Es zeigt sich, dass diese Epitope spezifisch sind für allo-Tx *MM*-Patienten die *APB* bilden (dies wird durch

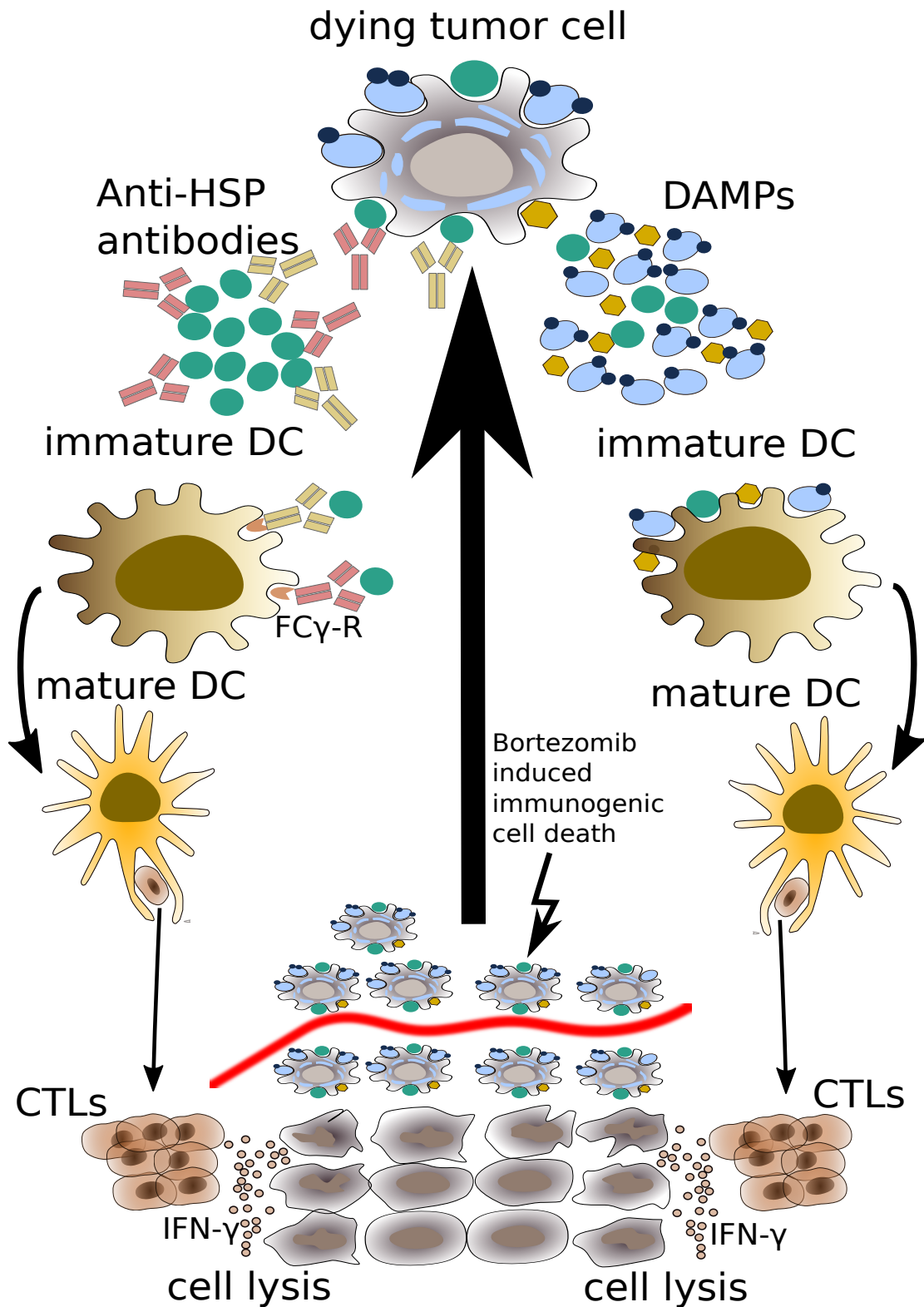


ABBILDUNG 4.1: Wege des immunogenen Zelltodes über die Sekretion oder Translokation an die Zelloberfläche von HSP. Rechts der von (Kroemer et al. 2013) beschriebene Weg über die direkte Aktivierung dendritischer Zellen durch DAMPs. Links der von (Schieferdecker et al. 2016) beschriebene alternative Weg über die Aktivierung Dendritischer Zellen über die Opsonisierung von Tumorzellen. Beide Wege können letztendlich zu einer T-Zell-vermittelten Anti-Tumor-Immunantwort und damit zum immunogenen Zelltod führen. Aus (Schieferdecker et al. 2016) adaptiert nach (Kroemer et al. 2013).

weitere Kontrollen durch (Schieferdecker et al. 2016) bestätigt). Hierbei ist die Immunität der verschiedenen Mimotope sehr unterschiedlich. So bilden fast 50 % der allo-Tx-Patienten Antikörper gegen THMWVDVSP_{EL} (159.13), welches sequenziell auf den Antikörper-Fractionen verschiedener Patienten von M. Voigt selektiert wurde, während andere Mimotope nur von ihrem eigenen Antikörper erkannt werden. Aus diesen Ergebnissen lassen sich Epitope bzw. Antikörper ableiten, die sich am ehesten für eine weitere Evaluation hin zu einer passiven Immuntherapie eignen. Eine hohe Epitopreaktivität korreliert mit dem Erreichen einer *Complete Remission* und somit stellt eine *Polyepitopreaktivität* einen anstrebenswerter Zustand ist (Schieferdecker et al. 2016). Diese Verbesserung der Prognose sowie das Fehlen von Antikörpern in den Gruppen der Kontrolle unterstützen die These, dass es sich bei den Post-Tx-Antikörpern um den Ausdruck einer gegen den Tumor gerichteten Immunantwort handelt.

4.7 Aussicht

4.7.1 Zusammenschau meiner Ergebnisse mit denen anderer Mitglieder meiner Arbeitsgruppe

In dieser Arbeit konnte eine signifikante Abhängigkeit des Erreichens einer kompletten Remission von der Anzahl der Epitope gezeigt werden. Die Experimente von M. Göthel die mit einem gleichem Ansatz mit post-Tx-AKs von *auto-Tx*-Patienten durchgeführt wurden, bekräftigen diese Beobachtungen zusätzlich. Zudem wurde durch das Hinzuziehen weiterer Kontrollen verdeutlicht, dass die gefundenen Epitope spezifisch für die humorale Immunantwort von *MM*-Patienten, die nach der *allo-Tx APB* bilden, sind (Schieferdecker et al. 2016).

4.7.2 Polyepitopreaktivität in der klinischen Anwendung

Die Entwicklung von *APB* stellt einen erstrebenswerten Zustand innerhalb der Gruppe der *MM*-Patienten dar, da er mit einer Verbesserung der Prognose einhergeht (Rahlff et al. 2012) (Sucak et al. 2010) (Jo et al. 2013). Nun konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung einer Polyepitopreaktivität einen erstrebenswerten Zustand innerhalb dieser Subpopulation darstellt. Aus diesen Erkenntnissen könnte folgendes diagnostisches Werkzeug entwickelt werden: Zunächst wird post-Tx auf *APB* gescreent. Entwickelt der Patient diese, wird die Polyepitopreaktivität untersucht um damit Aussagen über die Prognose tätigen zu können.

4.7.3 Nutzung der Phagen zur Tumorstimmung

Die Tumorstimmung stellt eine spezifische Immuntherapie dar, bei der durch das Verabreichen eines Vakzins eine Immunreaktion gegen einen Tumor erzielt werden soll (Mallmann, 1995). Phagen stellen per se einen geeigneten Träger zur Entwicklung einer Immunantwort dar (de la Cruz, V F et al. 1988). Es bestehen Ansätze Phagen mit Mimotopen von Antigenen maligner Tumoren zur Tumorstimmung einzusetzen (Fang et al. 2005)(Shadidi et al. 2008)(Roehnsch et al. 2014). Hierbei werden diese Phagen als Träger von Tumorepitopen aufbereitet und Patienten mit dem Ziel verabreicht, eine gegen den Phagen und damit gegen den Tumor gerichtete Immunantwort zu erzeugen. Die gefundenen Epitope könnten, als Ziele einer natürlichen Anti-Tumor-Immunantwort, nach näherer Evaluation als Kandidaten für eine Tumorstimmung genutzt werden.

4.7.4 Nutzung der klassifizierten Antikörper zur passiven Immuntherapie

Wie bereits angesprochen wird die passive Immuntherapie mittels Antikörpern in der Behandlung des *MM* eine zunehmend wichtige Rolle spielen. Seit Ende des Jahres 2015 sind zwei Antikörper für die *MM*-Therapie in den USA zugelassen. Essentiell für die Entwicklung weiterer therapeutisch nutzbarer Antikörper ist die Identifikation von Epitopen die tumorspezifisch und für das Immunsystem zugänglich sind. Zu den selektierten Mimotopen können Antikörper mit den zugehörigen Paratopen gewonnen werden, um diese hinsichtlich ihrer Effekte auf Tumorzellen zu evaluieren. Hierfür kann zum einen die Hybridom-Technik genutzt werden, bei der eine Maus mit einem bestimmten Phagen immunisiert wird (Köhler und Milstein, 1975). Eine andere Möglichkeit zur Vielfältigung der Antikörper ist das rekombinante Erstellen von Antikörperbibliotheken mit Hilfe eines Phagenvektors. Hierbei könnte man aus dem Immunom der Patienten, welche Antikörper gegen ein bestimmtes Mimotop gebildet haben, direkt humane Antikörper generieren (Hoogenboom, 2005). Diese Antikörper sind direkt humanen Ursprungs und müssten für ihre Anwendung nicht erst humanisiert werden. Im Rahmen einer passiven Immuntherapie könnten diese Antikörper eingesetzt werden um Therapie und Prognose von *MM*-Patienten zu optimieren.

Anhang A

Durch andere Mitarbeiter der Arbeitsgruppe durchgeführte Experimente

A.1 Durch ander Mitarbeiter der Arbeitsgruppe durchgeführte Selektionen

No.	amino acid sequence of phage clone	absolute and relative frequency of phage clone
	selection of 12mer phage library on MM023 lambda	
1243.5/6	A L R M P T M K T F I P	2/8 (22%)
1243.3	A Q A K N L R M P F T K	1/8 (11%)
1243.4	E F L S K V R L P M A K	1/8 (11%)
1243.1	K V M M P L E K N W G Y	1/8 (11%)
1243.8	T V K M P S D K I S R H	1/8 (11%)
1243.10	S I A E V R L P G A K L	1/8 (11%)
1243.2	L A L D S H P F Y I P S	1/8 (11%)
1243.9	S W M P H P R W S P Q H	1/8 (11%)
	consensus motif : V/L R M P X X K	

ABBILDUNG A.1: Gefundene Phagen und Konsensmotiv auf MM023 λ. Experiment durchgeführt von M. Binder.

No.	amino acid sequence of phage clone	absolute and relative frequency of phage clone
selection of 12mer phage library on MM040 kappa		
146.2	Y D R L L Y Q S T L R Y	1/8 (13%)
146.1	H T N Q T Y L T T L K Y	1/8 (13%)
146.4	T L Y S T T L T Y S T P	1/8 (13%)
146.3	Y S T T L M Y S N I T P	1/8 (13%)
146.10	Y S T T L S W G E K P H	1/8 (13%)
146.7	R I L L F I A S T K I Y	1/8 (13%)
146.8	S Q T V I Y N T T M G Y	1/8 (13%)
146.6	Q N T P L F R T T Y F Y	1/8 (13%)
consensus motif : L/I Y /F X T/S T L X Y /W		

ABBILDUNG A.2: Gefundene Phagen und Konsensmotiv auf MM040 κ . Experiment durchgeführt von M. Voigt.

No.	amino acid sequence of phage clone	absolute and relative frequency of phage clone
selection of 12mer phage library on MM040 lambda		
147.3	E P T Y Y S P T L Y F G	2/14 (14%)
147.8	S D T N W Y R A T L H Y	1/14 (7%)
147.15	E G S I L Y Y T S K T W	1/14 (7%)
147.4	E L E K A Y K T T L S Y	7/14 (50%)
147.20	H T N Q T Y L T T L K Y *	1/14 (7%)
147.14	T N Y A Y T T T L V Y V	1/14 (7%)
147.2	W P S Y Y P N Q P H Q K	1/14 (7%)
consensus motif : E /D X X X Y X T T/S L X Y		

ABBILDUNG A.3: Gefundene Phagen und Konsensmotiv auf MM040 λ . Experiment durchgeführt von M. Voigt.

No.	amino acid sequence of phage clone	absolute and relative frequency of phage clone
selection of 12mer phage library on MM041 lambda		
149.1	N L S S D M Y R W N W P	1/9 (11%)
149.5	M F D V R P P G N T F K	1/9 (11%)
149.4	M H Q P W D V P P M R W	1/9 (11%)
149.8	Y E Q S W D L P P L G L	1/9 (11%)
149.3	T H F L W D V A P T G R	2/9 (22%)
149.2	A S W D I A P V N S T S	1/9 (11%)
149.9	V E P W D I S P T N I F	1/9 (11%)
149.6	H V L K P V L S G K A A	1/9 (11%)
consensus motive : W/F D V/I/L X P		

ABBILDUNG A.4: Gefundene Phagen und Konsensmotiv auf MM041 λ. Experiment durchgeführt von M. Voigt.

No.	amino acid sequence of phage clone	absolute and relative frequency of phage clone
selection of 12mer phage library on MM045 kappa		
150.5	N T V D G D D I Y L T P	2/9 (22%)
150.9	L V L E S H P N R H G Q	1/9 (11%)
150.4	G V T S P G S H W F T V	1/9 (11%)
150.2	G H L H E R Q F W F T V	1/9 (11%)
150.3	W I E P M K G P A T W S	1/9 (11%)
150.6	V P A W I T T M M S N K	1/9 (11%)
150.10	F M Y P G E T M V L A D	1/9 (11%)
150.7	N E W S P M A L G A P P	1/9 (11%)
consensus motive : L/V E/D X X X X W/Y X S/T X M		

ABBILDUNG A.5: Gefundene Phagen und Konsensmotiv auf MM045 κ. Experiment durchgeführt von M. Voigt.

No.	amino acid sequence of phage clone	absolute and relative frequency of phage clone
selection of 12mer phage library on MM045 lambda		
151.1	K A I E E P K A M M Y L	4/10 (40%)
151.2	N A K V R E E P V W H I	1/10 (10%)
151.8	I G K T V D E P K S H W	1/10 (10%)
151.5	S Q G D R M L H S P L L	1/10 (10%)
151.4	G Q D T N L H K I F N T	1/10 (10%)
151.7	N E W L L H N I P F R S	1/10 (10%)
151.6	V P S L K E G E K I W W	1/10 (10%)
consensus motive : K X X E/D E X V/L/I K/H		

ABBILDUNG A.6: Gefundene Phagen und Konsensmotiv auf MM045 λ. Experiment durchgeführt von M. Voigt.

No.	amino acid sequence of phage clone	absolute and relative frequency of phage clone
selection of 12mer phage library on MM047 kappa		
152.2	T N S M P P D A Y T E	1/9 (11%)
152.1	T P E N A Y S S N T P T	1/9 (11%)
152.4	I P P E N A Y G T T R M	2/9 (22%)
153.8	I S L R H P E N A Y N K	1/9 (11%)
152.9	L G A R V P E N A Y N R	1/9 (11%)
152.6	Q L P P E S A Y N I V L	1/9 (11%)
152.7	S T L H M P E N A Y G Q	1/9 (11%)
152.3	P P A N Y Y P S D I M Y*	1/9 (11%)
consensus motive : P P E/D N A Y		

ABBILDUNG A.7: Gefundene Phagen und Konsensmotiv auf MM047 κ. Experiment durchgeführt von M. Voigt.

No.	amino acid sequence of phage clone	absolute and relative frequency of phage clone
selection of 12mer phage library on MM046 kappa		
153.2	M G F E R N P P R V L S	1/8 (13%)
153.1	G S F N P E R D L G I P	1/8 (13%)
153.3	N A E Y P R N P E R D A	1/8 (13%)
153.7	F P W H L V N K P S H R	1/8 (13%)
153.5	V K N P V P P P W S F Y	2/8 (25%)
153.4	G T E F G D K L T E R T	1/8 (13%)
153.8	M V P K T H G D Y H T L	1/8 (13%)
	consensus motive : K/R N P E/D R/H	

ABBILDUNG A.8: Gefundene Phagen und Konsensmotiv auf MM047 λ . Experiment durchgeführt von M. Voigt.

A.2 Mittels Immunoblot gefundene Targets der B-Zell-Anti-Tumor-Antwort

Code	erkannte Proteine
<i>MM023</i>	Heat-shock protein HSP 90-beta (HSP90AB1), Heat-shock protein HSP 90-alpha (HSP90AA1), 40S Ribosomal protein SA (RPSA), Melanoma-associated antigen 4 (MAGEA4), 60 kDa Heat-shock protein, Mitochondrial (HSP60), Hematopoietic lineage cell-specific protein (HCLS1), Neutral alpha-glucosidase AB (GANAB)
<i>MM025</i>	Alpha-enolase (ENO1), Neutral alpha-glucosidase AB (GANAB), Heat-shock cognate 71 kDa protein (HSPA8), Stress-70 protein, Mitochondrial (HSPA9), Zinc finger CCCH domain-containing protein 11A (ZC3H11A), Tryptophanyl-tRNA synthetase, Cytoplasmic (WARS), X-ray repair cross-complementing protein 5 (XRCC5), T-complex protein 1 subunit alpha (TCP1), Ezrin (EZR)
<i>MM031</i>	Heat-shock protein HSP 90-beta (HSP90AB1), Heat-shock protein HSP 90-alpha (HSP90AA1), Alpha-enolase (ENO1), Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), 60 kDa Heat-shock protein, Mitochondrial (HSP60), UV excision repair protein RAD23 homolog B (RAD23B), Lamin B1 (LMNB1), Phosphoglycerate mutase 1 (PGAM1), Triphosphate isomerase (TPI1), Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (FKBP4)
<i>MM040</i>	Elongation factor 1-delta (EEF1D)
<i>MM041</i>	Heat-shock protein HSP 90-beta (HSP90AB1), Heat-shock protein HSP 90-alpha (HSP90AA1), Vimentin (VIM), Heat-shock cognate 71 kDa protein (HSPA8)
<i>MM043</i>	Protein disulfide-isomerase (P4HB)
<i>MM045</i>	Vimentin (VIM)
<i>MM046</i>	Neutral alpha-glucosidase AB (GANAB), Alpha-enolase (ENO1)
<i>MM047</i>	Heat-shock protein HSP 90-beta (HSP90AB1)
<i>MM051</i>	Tubulin beta chain (TUBB)
<i>MM054</i>	Proteasome activator complex subunit 1 (PSME1)

TABELLE A.1: Durch (Rahlff et al. 2012) mittels Immunoblot gefundene Targets der B-Zell-Anti-Tumor-Antwort

Zusammenfassung

Charakterisierung der B-Zell-Immunantwort nach allogener Stammzelltransplantation beim Multiplen Myelom

von Fabian HOFMANN

Patienten, die an einem *Multiplen Myelom (MM)* leiden und aus diesem Grund allo-
gen Knochenmarktransplantiert (*allo-Tx*) wurden, können daraufhin oligoklonale Prote-
inbanden (*APB*) in der Immunfixation entwickeln. Während die Ursache hierfür unbe-
kannt ist, weiß man, dass das Auftreten von *APB* (als Ausdruck einer B-Zell-vermittelte
Anti-Tumor-Immunantwort) mit einer Verbesserung der Prognose einhergeht.

In dieser Arbeit wurden via Phagedisplay Mimotope selektiert, welche die post-Tx-
Antikörper von sechs *MM*-Patienten spezifisch binden. Die so erhaltenen Phagen wur-
den daraufhin mittels ELISA auf ihre Bindungseigenschaften zu anderen post-Tx-Antikörpern
evaluiert (*Kreuzreaktivitätsanalyse*). Es wurde ebenfalls mittels ELISA untersucht, wie
sich die B-Zell-Immunantwort über die Zeit nach der *allo-Tx* quantitativ entwickelt.

Für jeden *post-Tx-AK* konnte mindestens ein spezifisch bindendes Mimotop selektiert
werden. Einige Mimotope zeigten weitreichende myelom-spezifische Kreuzreaktivitäten.
Hierbei stellt sich eine signifikante Abhängigkeit der Polyreaktivität der Pati-
entensera zu dem Ansprechen auf die *allo-Tx* ($p < 0,05$) dar. In den Verlaufs-ELISAs
konnte gezeigt werden, dass die Bindung zu den Mimotopen innerhalb eines Jahres ei-
ne stärkste Ausprägung annimmt und dann mit größer werdendem Abstand zur *allo-Tx*
sukzessive geringer wird.

In dieser Arbeit wurde die humorale Anti-Tumor-Immunantwort nach *allo-Tx* zum ers-
ten mal auf Epitopebene untersucht. Eine Zuordnung eines gefundenen Mimotops zu
einem dazugehörigen parentalem Antigen ist durch die durchgeführten Experimente
nicht möglich, kann aber durch weitere Experimente erfolgen. Die Ergebnisse zeigen,
dass die gefundenen Epitope spezifisch für das genannte Patientenkollektiv sind. Eine
Polyepitopreaktivität stellt einen erstrebenswerten Zustand dar, der mit einer Besserung
der Prognose einhergeht. Dies unterstützt die Theorie der Epitope als Ziele einer hu-
moralen Anti-Tumor-Immunantwort. Diese Ergebnisse können weiter evaluiert werden
und hieraus sowohl diagnostische als auch therapeutische Mittel entwickelt werden.

Abstract

Characterization of B-cell-immuno response after allogenic stem cell transplantation in multiple myeloma

by Fabian HOFMANN

Patients suffering from *Multiple Myeloma* who underwent allogenic stem cell transplantation *allo-SCT* may develop abnormal protein bands (*APB*) in immunofixation. It is known that the appearance of *APB* (which is presumably an expression of a B-cell-mediated anti-tumor-immune response) leads to an improved prognosis.

In this thesis mimotopes binding specifically to the *post-SCT* antibodies of six patients were selected using phage display. The hereby obtained phages were subsequently examined via ELISA regarding their interaction towards other antibodies. Afterwards the chronological sequence of mimotope reactivity was evaluated. For each patient at least one mimotope could be found that was binding significantly. A significant amount of myeloma specific cross reactivities could be observed. The polyreactivity of a patient's serum correlates significantly with the response of that patient to the *allo-Tx*. In the experiments examining the chronological sequence of mimotope reactivity the strongest antibody mimotope binding could be observed approximately one year after *allo-SCT* and declines from there on.

In this thesis the b-cell mediated anti-tumor immunity following *allo-SCT* was examined on epitope level for the first time. A connection of the found mimotopes to their parental antigens was not possible with the conducted experiments, but may be established using additional experiments. The results show a specificity of the found epitopes for *MM* patients with *APB* after *allo-SCT*. A polyepitope reactivity is a desirable situation that correlates with an improved prognosis. This supports the theory of these epitopes being targets of a humoral anti-tumor immunity. These results may be evaluated further in order to develop diagnostic as well as therapeutic tools.

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Publikation

Die Ergebnisse dieser Dissertationsschrift wurden teilweise bereits veröffentlicht in:

Aneta Schieferdecker, Anna Oberle, Benjamin Thiele, Fabian Hofmann, Markus Göthel, Sebastian Miethel, Michael Hust, Friederike Braig, Mareike Voigt, Ute-Marie von Pein, Friedrich Koch-Nolte, Friedrich Haag, Malik Alawi, Daniela Indenbirken, Adam Grundhoff, Carsten Bokemeyer, Ulrike Bacher, Nicolaus Kröger, Mascha Binder

A transplant immunome deep sequencing and screening platform defines a unique targetable epitope fingerprint of multiple myeloma

Blood Jan 2016, blood-2015-10-676536; DOI: 10.1182/blood-2015-10-676536 (ePub ahead of Print)

Abkürzungen

allo-Tx	allogene Knochenmarktransplantation
auto-Tx	autologe Knochenmarktransplantation
BJP	Bence Jones Proteine
CRAB	Hyper-Calcaemia, Renal Failure, Anaemia, Bone-Lesions
DAMP	Damage Associated Molecular Pattern
HSP	Heat Shock Protein
Ig	Immunglobulin
ICD	Immunogenic Cell Death
IMWG	International Myeloma Working Group
IPTG	Isopropyl-β-D- KMT
Knochenmarktransplantation	
MAC	Myeloablative Conditioning
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MM	Multiples Myelom
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBS-T	Phosphate Buffered Saline mit Tween
RIC	Reduced Intensity Conditioning
SMM	Smoldering Multiples Myelom
SP	Solitäres Plasmozytom
TBS	Tris Buffered Saline
TBS-T	Tris Buffered Saline mit Tween

Literatur

- Anagnostopoulos, A., A. Aleman, G. Ayers, M. Donato, R. Champlin, D. Weber, R. Alexanian und S. Giralt (2004). „Comparison of high-dose melphalan with a more intensive regimen of thiotepa, busulfan, and cyclophosphamide for patients with multiple myeloma“. In: *Cancer* 100.12, S. 2607–2612.
- Apetoh, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, M. Obeid, C. Ortiz, A. Criollo, G. Mignot, M. C. Maiuri, E. Ullrich, P. Saulnier, H. Yang, S. Amigorena, B. Ryffel, F. J. Barrat, P. Saffig, F. Levi, R. Lidereau, C. Nogues, J.-P. Mira, A. Chompret, V. Joulin, F. Clavel-Chapelon, J. Bourhis, F. André, S. Delaloge, T. Tursz, G. Kroemer und L. Zitvogel (2007). „Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy“. In: *Nature medicine* 13.9, S. 1050–1059. ISSN: 1078-8956.
- Atanackovic, D., T. Luetkens, Y. Hildebrandt, J. Arfsten, K. Bartels, C. Horn, T. Stahl, Y. Cao, A. R. Zander, C. Bokemeyer und N. Kröger (2009). „Longitudinal analysis and prognostic effect of cancer-testis antigen expression in multiple myeloma“. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15.4, S. 1343–1352. ISSN: 1078-0432.
- Ball, L. M. und R. M. Egeler (2008). „Acute GvHD: pathogenesis and classification“. In: *Bone Marrow Transplantation* 41, S58–S64. URL: www.nature.com/bmt/journal/v41/n2s/full/bmt200856a.html.
- Bence Jones, H. (1847). „Papers ON CHEMICAL PATHOLOGY; Prefaced by the Gulstonian Lectures, read at the Royal College of Physicians, 1846. Lecture III“. In: *The Lancet* 50.1247, S. 88–92.
- Bensinger, W. (2014). „Allogeneic Stem Cell Transplantation for Multiple Myeloma“. In: *Hematology/Oncology Clinics of North America* 28.5, S. 891–902. ISSN: 08898588.

- Bernal, M., P. Garrido, P. Jiménez, R. Carretero, M. Almagro, P. López, P. Navarro, F. Garrido und F. Ruiz-Cabello (2009). „Changes in activatory and inhibitory natural killer (NK) receptors may induce progression to multiple myeloma: Implications for tumor evasion of T and NK cells“. In: *Human Immunology* 70.10, S. 854–857. ISSN: 01988859.
- Binder, M., F. Otto, R. Mertelsmann, H. Veelken und M. Trepel (2006). „The epitope recognized by rituximab“. In: *blood* 108.6, S. 1975–1978.
- Bolaños-Meade, J. und G. B. Vogelsang (2004). „Acute Graft-Versus-HostDisease“. In: *Clinical Advances in Hematology & Oncology Volume 2* 2.10, S. 672–683. URL: <http://www.med.upenn.edu/timm/documents/ClinAdvHematolOncolBolanos-Meade.pdf>.
- Bruno, B. (2016). „Allogeneic transplantation for multiple myeloma: yes, no or maybe[quest]“. In: *Bone Marrow Transplant*.
- Carbone, E., P. Neri, M. Mesuraca, M. T. Fulciniti, T. Otsuki, D. Pende, V. Groh, T. Spies, G. Pollio, D. Cosman, L. Catalano, P. Tassone, B. Rotoli und S. Venuta (2004). „HLA class I, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells“. In: *blood* 105.1, S. 251–258. URL: <http://www.bloodjournal.org/content/105/1/251>.
- Cavo, M., S. V. Rajkumar, A. Palumbo, P. Moreau, R. Orłowski, J. Bladé, O. Sezer, H. Ludwig, M. A. Dimopoulos, M. Attal, P. Sonneveld, M. Boccadoro, K. C. Anderson, P. G. Richardson, W. Bensinger, H. E. Johnsen, N. Kroeger, G. Gahrton, P. L. Bergsagel, D. H. Vesole, H. Einsele, S. Jagannath, R. Niesvizky, B. G. M. Durie, J. San Miguel und S. Lonial (2011). „International Myeloma Working Group consensus approach to the treatment of multiple myeloma patients who are candidates for autologous stem cell transplantation“. In: *blood* 117.23, S. 6063–6073.
- Cirone, M., L. Di Renzo, L. V. Lotti, V. Conte, P. Trivedi, R. Santarelli, R. Gonnella, L. Frati und A. Faggioni (2012). „Primary Effusion Lymphoma Cell Death Induced by Bortezomib and AG 490 Activates Dendritic Cells through CD91“. In: *PLoS ONE* 7.3,
- Cohen, H. J., J. Crawford, M. K. Rao, C. F. Pieper und M. S. Currie (1998). „Racial differences in the prevalence of monoclonal gammopathy in a community-based sample of the elderly“. In: *The American journal of medicine* 104.5, S. 439–444. ISSN: 0002-9343.
- Crawley, C., S. Iacobelli, B. Björkstrand, J. F. Apperley, D. Niederwieser, G. Gahrton, for the Chronic Leukaemia Working Party of the European Group for Blood und Marrow

- Transplantation (2007). „Reduced-intensity conditioning for myeloma: lower nonrelapse mortality but higher relapse rates compared with myeloablative conditioning“. In: *blood* 109.8, S. 3588–3594.
- de la Cruz, V F, A. A. Lal und T. F. McCutchan (1988). „Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage“. In: *Journal of Biological Chemistry* 263.9, S. 4318–4322.
- El-Deiry, W. S., Hrsg. (2013). *Impact of Genetic Targets on Cancer Therapy*. Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer New York. ISBN: 978-1-4614-6175-3.
- Dhodapkar, M. V., J. Krasovsky und K. Olson (2002). „T cells from the tumor microenvironment of patients with progressive myeloma can generate strong, tumor-specific cytolytic responses to autologous, tumor-loaded dendritic cells“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99.20, S. 13009–13013. ISSN: 0027-8424.
- Donato, M. L., D. S. Siegel, D. H. Vesole, P. McKiernan, T. Nyirenda, A. L. Pecora, M. Baker, S. L. Goldberg, A. Mato, A. Goy und S. D. Rowley (2014). „The graft-versus-myeloma effect: Chronic graft-versus-host disease but not acute graft-versus-host disease prolongs survival in patients with multiple myeloma receiving allogeneic transplantation“. In: *Biology of Blood and Marrow Transplantation* ahead of Print. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24792872>.
- Durie, B. G. M., J.-L. Harousseau, J. S. Miguel, J. Bladé, B. Barlogie, K. Anderson⁶, M. Gertz, M. Dimopoulos, J. Westin, P. Sonneveld, H. Ludwig, G. Gahrton, M. Beksac, J. Crowley, A. Belch, M. Boccadaro, I. Turesson, D. Joshua, D. Vesole, R. Kyle, R. Alexanian, G. Tricot, M. Attal, G. Merlini, R. Powles, P. Richardson, K. Shimizu, P. Tosi, G. Morgan und S V Rajkumar⁷ on behalf of the International Myeloma Working Group (2006). „International uniform response criteria for multiple myeloma“. In: *Leukemia* 20.20, S. 1467–1473. URL: <http://www.nature.com/leu/journal/v20/n9/full/2404284a.html>.
- Durie, B. G. M. und S. E. Salmon (1975). „A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival“. In: *Cancer* 36.3, S. 842–854. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1182674>.
- Edwards, C. M., J. Zhuang und G. R. Mundy (2008). „The Pathogenesis of the Bone Disease of Multiple Myeloma“. In: *Bone* 42.6, S. 1007–1013. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18406675>.

- Elliott, M. R., F. B. Chekeni, P. C. Trampont, E. R. Lazarowski, A. Kadl, S. F. Walk, D. Park, R. I. Woodson, M. Ostankovich, P. Sharma, J. J. Lysiak, T. K. Harden, N. Leitinger und K. S. Ravichandran (2009). „Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance“. In: *Nature* 461.7261, S. 282–286.
- Engelhardt, M., M. Kleber, J. Udi, R. Wäsch, A. Spencer, F. Patriarca, S. Knop, B. Bruno, M. Gramatzki, F. Morabito, M. Kropff, A. Neri, O. Sezer, R. Hajek, D. Bunjes, M. Boccadoro, C. Straka, M. Cavo, A. Polliack, H. Einsele und A. Palumbo (2010). „Consensus statement from European experts on the diagnosis, management, and treatment of multiple myeloma: from standard therapy to novel approaches“. In: *Leukemia & lymphoma* 51.8, S. 1424–1443. URL: <http://dx.doi.org/10.3109/10428194.2010.487959>.
- Engelhardt, M., E. Terpos, M. Kleber, F. Gay, R. Wäsch, G. Morgan, M. Cavo, N. van de Donk, A. Beilhack, B. Bruno, H. E. Johnsen, R. Hajek, C. Driessen, H. Ludwig, M. Beksac, M. Boccadoro, C. Straka, S. Brighen, M. Gramatzki, A. Larocca, H. Lokhorst, V. Magarotto, F. Morabito, M. A. Dimopoulos, H. Einsele, P. Sonneveld und A. Palumbo (2014). „European Myeloma Network recommendations on the evaluation and treatment of newly diagnosed patients with multiple myeloma“. In: *Haematologica* 99.2, S. 232–242. ISSN: 0390-6078.
- Fang, J., G. Wang, Q. Yang, J. Song, Y. Wang und L. Wang (2005). „The potential of phage display virions expressing malignant tumor specific antigen MAGE-A1 epitope in murine model“. In: *Vaccine* 23.40, S. 4860–4866. ISSN: 0264-410X.
- Ferris, R. L., E. M. Jaffee und S. Ferrone (2010). „Tumor Antigen-Targeted, Monoclonal Antibody-Based Immunotherapy: Clinical Response, Cellular Immunity, and Immunoescape“. In: *Journal of Clinical Oncology* 28.28, S. 4390–4399.
- Fonseca, R., P. L. Bergsagel, J. Drach, J. Shaughnessy, N. Gutierrez, A. K. Stewart¹, G. Morgan, B. van Ness, M. Chesi, S. Minvielle, A. Neri, B. Barlogie, W. M. Kuehl, P. Liebisch, F. Davies, S. Chen-Kiang, B. G. M. Durie, R. Carrasco, O. Sezer, T. Reiman, L. Pilarski und H. Avet-Loiseau (2009). „International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review“. In: *Leukemia* 23, S. 2210–2221. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19798094>.
- Geissler, E. K. (2015). „Post-transplantation malignancies: here today, gone tomorrow?“ In: *Nature reviews. Clinical oncology* 12.12, S. 705–717. ISSN: 1759-4782.

- Gentile, M., M. Offidani, E. Vigna, L. Corvatta, A. G. Recchia, L. Morabito, M. Martino, F. Morabito und S. Gentili (2015). „Smoldering multiple myeloma: to treat or not to treat“. In: *Expert Opinion on Pharmacotherapy* 16.6, S. 785–790. URL: <http://dx.doi.org/10.1517/14656566.2015.1007952>.
- Geysen, H. M., S. J. Rodda und T. J. Mason (1986). „A priori delineation of a peptide which mimics a discontinuous antigenic determinant“. In: *Molecular immunology* 23.7, S. 709–715. ISSN: 0161-5890.
- Ghiringhelli, F., L. Apetoh, A. Tesniere, L. Aymeric, Y. Ma, C. Ortiz, K. Vermaelen, T. Panaretakis, G. Mignot, E. Ullrich, J.-L. Perfettini, F. Schlemmer, E. Tasdemir, M. Uhl, P. Génin, A. Civas, B. Ryffel, J. Kanellopoulos, J. Tschopp, F. André, R. Lide-reau, N. M. McLaughlin, N. M. Haynes, M. J. Smyth, G. Kroemer und L. Zitvogel (2009). „Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors“. In: *Nature medicine* 15.10, S. 1170–1178. ISSN: 1078-8956.
- Giuliani, N., P. Storti, M. Bolzoni, B. D. Palma und S. Bonomini (2011). „Angiogenesis and multiple myeloma“. In: *Cancer microenvironment : official journal of the International Cancer Microenvironment Society* 4.3, S. 325–337. ISSN: 1875-2284.
- Greipp, P. R., J. S. Miguel, B. G. M. Durie, J. J. Crowley, B. Barlogie, J. Bladé, M. Boccadoro, J. A. Child, H. Avet-Loiseau, R. A. Kyle, J. J. Lahuerta, H. Ludwig, G. Morgan, R. Powles, K. Shimizu, C. Shustik, P. Sonneveld, P. Tosi, I. Turesson und J. Westin (2005). „International Staging System for Multiple Myeloma“. In: *Journal of Clinical Oncology* 23.15, S. 3412–3420. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15809451>.
- Guillerey, C., K. Nakamura, S. Vuckovic, G. R. Hill und M. J. Smyth (2016). „Immune responses in multiple myeloma: role of the natural immune surveillance and potential of immunotherapies“. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. ISSN: 1420-9071.
- Halapi, E., Å. Werner, J. Wahlström, A. Österborg, M. Jeddi-Tehrani, Q. Yi, C. H. Janson, H. Wigzell, J. Grunewald und H. Mellstedt (1997). „T cell repertoire in patients with multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance: Clonal CD8+ T cell expansions are found preferentially in patients with a low tumor burden“. In: *European Journal of Immunology* 27.9, S. 2245–2252. ISSN: 00142980.

- Hall, S. L., J. Tate, D. Gill und P. Mollee (2009). „Significance of abnormal protein bands in patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation“. In: *Clin Biochem Rev* 30.3, S. 113–118.
- Hari, P. N., M.-J. Zhang, V. Roy, W. S. Pérez, A. Bashey, L. B. To, G. Elfenbein, C. O. Freytes, R. P. Gale, J. Gibson, R. A. Kyle, H. M. Lazarus, P. L. McCarthy, G. A. Milone, S. Pavlovsky, D. E. Reece, G. Schiller, J. Vela-Ojeda, D. Weisdorf und D. Vesole (2009). „Is the International Staging System superior to the Durie-Salmon staging system? A comparison in multiple myeloma patients undergoing autologous transplant“. In: *Cancer* 23.8, S. 1528–1532. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19322205>.
- Harousseau, J.-L. und P. Moreau (2009). „Autologous Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for Multiple Myeloma“. In: *New England Journal of Medicine* 360.25, S. 2645–2654. URL: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMct0805626>.
- Hess, G. T., J. J. Cragolini, M. W. Popp, M. A. Allen, S. K. Dougan, E. Spooner, H. L. Ploegh, A. M. Belcher und C. P. Guimaraes (2012). „M13 Bacteriophage Display Framework That Allows Sortase-Mediated Modification of Surface-Accessible Phage Proteins“. In: *Bioconjugate Chemistry* 23.7, S. 1478–1487. URL: <http://dx.doi.org/10.1021/bc300130z>.
- Hobo, W., K. Broen, van der Velden, Iter J.F.M., A. Greupink-Draaisma, N. Adisty, Y. Wouters, M. Kester, H. Fredrix, J. H. Jansen, B. van der Reijden, J. H. F. Falkenburg, T. d. Witte, F. Preijers, T. Schattenberg, T. Feuth, N. M. Blijlevens, N. Schaap und H. Dolstra (2013). „Association of Disparities in Known Minor Histocompatibility Antigens with Relapse-Free Survival and Graft-versus-Host Disease after Allogeneic Stem Cell Transplantation“. In: *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 19.2, S. 274–282.
- Hoogenboom, H. R. (2005). „Selecting and screening recombinant antibody libraries“. In: *Nat Biotech* 23.9, S. 1105–1116. ISSN: 1087-0156.
- IQWIG (2011). *Stammzelltransplantation bei Multiplem Myelom*. Hrsg. von Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen.
- Jo, J.-C., D. H. Yoon, S. Kim, K. Lee, E. H. Kang, S. Jang, C.-J. Park, H.-S. Chi, J. Huh, C.-S. Park und C. Suh (2013). „Clinical significance of the appearance of abnormal protein band in patients with multiple myeloma“. In: *Annals of Hematology* 93.3, S. 463–469. ISSN: 1432-0584. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00277-013-1890-2>.

- Kaatsch, P., C. Spix, S. Hentschel, A. Katalinic, S. Luttmann, C. Stegmaier, S. Caspritz, J. Cernaj, A. Ernst, J. Folkerts, J. Hansmann, K. Kranzhöfer, E. Kriehoff-Henning, B. Kunz, A. Penzkofer, K. Treml, K. Wittenberg, N. Baras, B. Barnes, J. Bertz, N. Buttman-Schweiger, S. Dahm, M. Franke, J. Haberland, K. Kraywinkel, A. Wienecke und U. Wolf (2013). *Krebs in Deutschland 2009/2010*. Bd. 9. Berlin: Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg).
- Kaufmann, S. H. E. (2014). *Basiswissen Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. ISBN: 978-3-642-40324-8.
- Klein, B., X. G. Zhang, Z. Y. Lu und R. Bataille (1995). „Interleukin-6 in human multiple myeloma“. In: *blood* 85.4, S. 863–872.
- Kocoglu, M. und A. Badros (2016). *The Role of Immunotherapy in Multiple Myeloma*. Bd. 9. Pharmaceuticals. ISBN: 1424-8247.
- Köhler, G. und C. Milstein (1975). „Pillars Article: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity“. In: *Nature* 256.5517, S. 495–497.
- Kortüm, M., H. Einsele, C. Driessen, E. Gunsilius, H. Ludwig, N. Kröger, M. Kropff, P. Liebisch, R. Naumann, D. Peest, C. Taverna, B. Wörmann und H. Goldschmidt (2013). *Multiple Myelom Leitlinie*. Bd. 9. Ausgabe. Berlin: Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie (Hrsg. URL: <https://www.dgho-onkopedia.de/de/onkopedia/leitlinien/multiples-myelom>).
- Kroemer, G., L. Galluzzi, O. Kepp und L. Zitvogel (2013). „Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy“. In: *Annual Review of Immunology* 31.1, S. 51–72. URL: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100008>.
- Kröger, N., J. A. Perez-Simon, H. Myint, H. Klingemann, A. Shimoni, A. Nagler, R. Martino, A. Alegre, J. F. Tomas, R. Schwerdtfeger, M. Kiehl, A. Fauser, H. G. Sayer, A. Leon, J. Beyer, T. Zabelina, F. Ayuk, J. F. S. Miguel, R. Brand und A. R. Zander (2004). „Relapse to prior autograft and chronic graft-versus-host disease are the strongest prognostic factors for outcome of melphalan/fludarabine-based dose-reduced allogeneic stem cell transplantation in patients with multiple myeloma“. In: *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 10.10, S. 698–708.
- Kuehl, W. M. und P. L. Bergsagel (2002). „Multiple myeloma: Evolving genetic events and host interactions“. In: *Nature Reviews Cancer* 2.3, S. 175–187. ISSN: 1474-175X.
- Kumar, S. K., D. Dingli, A. Dispenzieri, M. Q. Lacy, S. R. Hayman, F. K. Buadi, S. V. Rajkumar, M. R. Litzow und M. A. Gertz (2008). „Impact of pretransplant therapy

- in patients with newly diagnosed myeloma undergoing autologous SCT“. In: *Bone Marrow Transplant* 41.12, S. 1013–1019. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18332915>.
- Kumar, S. K., A. Dispenzieri, M. Q. Lacy, M. A. Gertz, F. K. Buadi, S. Pandey, P. Kapoor, D. Dingli, S. R. Hayman, N. Leung, J. Lust, A. McCurdy, S. J. Russell, S. R. Zeldenrust, R. A. Kyle und S. V. Rajkumar (2013). „Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients“. In: *Leukemia* doi:10.1038/leu.2013.313, S. 1–7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24157580>.
- Kwaan, H. C. (2013). „Hyperviscosity in plasma cell dyscrasias“. In: *Clinical Hemorheology and Microcirculation* 55.1, S. 75–83. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23455837>.
- Kyle, R. A. und D. P. Steensma (2011). „History of multiple myeloma“. In: *Recent Results Cancer Res* 183, S. 3–23. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21509678>.
- Kyle, R. A., M. A. Gertz, T. E. Witzig, J. A. Lust, a. Q. Lacy, A. Dispenzieri, R. Fonseca, S. V. Rajkumar, J. R. Offord, D. R. Larson, M. E. Plevak, T. M. Therneau und P. R. Greipp (2003). „Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma“. In: *Mayo Clin Proceedings* 78.1, S. 21–33. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12528874>.
- Kyle, R. A. und S. V. Rajkumar (2005). „Monoclonal gammopathies of undetermined significance“. In: *Best practice & research. Clinical haematology* 18.4, S. 689–707. ISSN: 1521-6926.
- (2009). „Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma“. In: *Leukemia* 23.1, S. 3–9. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18971951>.
- Leung, N. und S. H. Nasr (2014). „Myeloma-related Kidney Disease“. In: *Advances in Chronic Kidney Disease* 21.1, S. 36–47. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24359985>.
- Li, R., J. Qian, W. Zhang, W. Fu, J. Du, H. Jiang, H. Zhang, C. Zhang, H. Xi, Q. Yi und J. Hou (2014). „Human heat shock protein-specific cytotoxic T lymphocytes display potent antitumour immunity in multiple myeloma“. In: *British Journal of Haematology* 166.5, S. 690–701. ISSN: 1365-2141.
- Lokhorst, H. M., H. Einsele, D. Vesole, B. Bruno, J. S. Miguel, J. A. Pérez-Simon, N. Kröger, P. Moreau, G. Gahrton, C. Gasparetto, S. Giralt und W. Bensinger (2010).

- „International Myeloma Working Group Consensus Statement Regarding the Current Status of Allogeneic Stem-Cell Transplantation for Multiple Myeloma“. In: *Journal of Clinical Oncology* 28.29, S. 4521–4530.
- Lokhorst, H. M., T. Plesner, J. P. Laubach, H. Nahi, P. Gimsing, M. Hansson, M. C. Minnema, U. Lassen, J. Krejčík, A. Palumbo, van de Donk, Niels W C J, T. Ahmadi, I. Khan, C. M. Uhlar, J. Wang, A. K. Sasser, N. Losic, S. Lisby, L. Basse, N. Brun und P. G. Richardson (2015). „Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma“. In: *The New England Journal of Medicine* 373.13, S. 1207–1219.
- Lokhorst, H. M., K. Wu, L. F. Verdonck, L. L. Laterveer, Niels W. C. J. van de Donk, Marinus H. J. van Oers, J. J. Cornelissen und A. V. Schattenberg (2004). „The occurrence of graft-versus-host disease is the major predictive factor for response to donor lymphocyte infusions in multiple myeloma“. In: *blood* 103.11, S. 4362–4364. URL: <http://bloodjournal.org/content/103/11/4362>.
- Lonial, S., M. Dimopoulos, A. Palumbo, D. White, S. Grosicki, I. Spicka, A. Walter-Croneck, P. Moreau, M.-V. Mateos, H. Magen, A. Belch, D. Reece, M. Beksac, A. Spencer, H. Oakervee, R. Z. Orlowski, M. Taniwaki, C. Röllig, H. Einsele, K. L. Wu, A. Singhal, J. San-Miguel, M. Matsumoto, J. Katz, E. Bleickardt, V. Poulart, K. C. Anderson und P. Richardson (2015). „Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma“. In: *The New England Journal of Medicine* 373.7, S. 621–631.
- Ludwig, H., G. Pohl und A. Osterborg (2004). „Anemia in multiple myeloma“. In: *Clin Adv Hematol Oncol* 2.4, S. 233–241. ISSN: 233-241. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.22273>.
- Luptakova, K. und D. Avigan (2015). „Immune Therapy in Multiple Myeloma“. In: *Clinical Advances in Hematology & Oncology* 13.11, S. 767–775.
- Maisnar, V., M. Tichý, L. Smolej, P. Zák, J. Radocha, V. Palicka, J. Malý und V. Bláha (2007). „Isotype class switching after transplantation in multiple myeloma“. In: *Neoplasma* 54.3, S. 225–228.
- Mallmann, P. (1995). „Tumorkvakzination“. In: *Onkologie* 18.1, S. 27–32. ISSN: 1423-0240.
- Maus, M. V. und C. H. June (2014). „CARTs on the Road for Myeloma“. In: *Clinical Cancer Research* 20.15, S. 3899–3901.
- Mey, U. J. M., C. Leitner, C. Driessen, R. Cathomas, D. Klingbiel und F. Hitz (2015). „Improved survival of older patients with multiple myeloma in the era of novel agents“. In: *Hematological oncology*. ISSN: 1099-1069.

- Moreau, P., T. Facon, M. Attal, C. Hulin, M. Michallet, F. Maloisel, J.-J. Sotto, F. Guilhot, G. Marit, C. Doyen, J. Jaubert, J.-G. Fuzibet, S. François, L. Benboubker, M. Monconduit, L. Voillat, M. Macro, C. Berthou, V. Dorvaux, B. Pignon, B. Rio, T. Matthes, P. Casassus, D. Caillot, N. Najman, B. Grosbois, R. Bataille und J.-L. Harousseau (2002). „Comparison of 200 mg/m² melphalan and 8 Gy total body irradiation plus 140 mg/m² melphalan as conditioning regimens for peripheral blood stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: final analysis of the Intergroupe Francophone du Myélome 9502 randomized trial“. In: *blood* 99.3, S. 731–735.
- Morrison, V. A. (2014). „Infections in Patients with Leukemia and Lymphoma“. In: *Cancer Treatment and Research* 161, S. 319–349. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24706230>.
- Moschetta, M., Y. Mishima, Y. Kawano, S. Manier, B. Paiva, L. Palomera, Y. Aljawai, A. Calcinotto, C. Unitt, I. Sahin, A. Sacco, S. Glavey, J. Shi, M. R. Reagan, F. Prosper, M. Bellone, M. Chesi, L. P. Bergsagel, A. Vacca, A. M. Roccaro und I. M. Ghobrial (2016). „Targeting vasculogenesis to prevent progression in multiple myeloma“. In: *Leukemia*.
- Munshi, N. C. und K. C. Anderson (2013). „New strategies in the treatment of multiple myeloma“. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19.13, S. 3337–3344. ISSN: 1078-0432.
- Navari, M., M. Zare, M. Javanmardi, M. Asadi-Ghalehni, H. Modjtahedi und M. J. Rasaei (2014). „Epitope mapping of epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibody and induction of growth-inhibitory polyclonal antibodies by vaccination with EGFR mimotope“. In: *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 36.5, S. 309–315. URL: <http://dx.doi.org/10.3109/08923973.2014.945127>.
- Oranger, A., C. Carbone, M. Izzo und M. Grano (2013). „Cellular Mechanisms of Multiple Myeloma Bone Disease“. In: *Clinical and Developmental Immunology* 2013.ID: 289458, S. 1–11. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23818912>.
- Oyajobi, B. O. (2007). „Multiple myeloma/hypercalcemia“. In: *Arthritis Research & Therapy* 9.Suppl 1, S4–S4. ISSN: 1478-6362.
- Ozaki, S. und K. Shimizu (2014). „Autologous Stem Cell Transplantation in Elderly Patients with Multiple Myeloma: Past, Present, and Future“. In: *BioMed Research International* 2014.394792, S. 1–7. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24719860>.

- Pande, J., M. M. Szewczyk und A. K. Grover (2010). „Phage display: Concept, innovations, applications and future“. In: *Biotechnology Advances* 28.6, S. 849–858. ISSN: 0734-9750. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975010000972>.
- Pérez, R., M. S. Durán, J. Mayans, A. Soler, I. Castillo, M. Jurado, P. Ribas, M. C. Menchaca Echevarria, M. T. Hernandez, M. D. Lopez Garcia-Carreño, A. Echeveste Gutierrez, A. Bailen Garcia, S. Lopez, J. Baquero und G. Ramirez (2015). „Clinical features and survival of 338 multiple myeloma patients treated with hematopoietic stem cell transplantation or conventional chemotherapy“. In: *European Journal of Haematology*. ISSN: 1600-0609.
- Ploß, M. (2012). *Biogenese und Virusassembly des filamentösen Coliphagen M13*. URL: http://opus.uni-hohenheim.de/volltexte/2012/786/pdf/Diss_Martin_Ploss.pdf.
- Pol, J., E. Vacchelli, F. Aranda, F. Castoldi, A. Eggermont, I. Cremer, C. Sautès-Fridman, J. Fucikova, J. Galon, R. Spisek, E. Tartour, L. Zitvogel, G. Kroemer und L. Galluzzi (2015). „Trial Watch: Immunogenic cell death inducers for anticancer chemotherapy: Oncolmmunology“. In: *Oncolmmunology* 4.4, e1008866.
- Ponzetta, A., G. Benigni, F. Antonangeli, G. Sciume, E. Sanseviero, A. Zingoni, M. R. Ricciardi, M. T. Petrucci, A. Santoni und G. Bernardini (2015). „Multiple Myeloma Impairs Bone Marrow Localization of Effector Natural Killer Cells by Altering the Chemokine Microenvironment“. In: *Cancer Research* 75.22, S. 4766–4777. ISSN: 0008-5472.
- Quach, H., D. Ritchie, A. K. Stewart, P. Neeson, S. Harrison, M. J. Smyth und H. M. Prince (2009). „Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma“. In: *Leukemia* 24.1, S. 22–32.
- Raab, M. S., K. Podar, I. Breitkreutz, P. G. Richardson und K. C. Anderson (2009). „Multiple myeloma“. In: *Lancet* 374, S. 324–339. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19541364>.
- Rahlff, J., M. Trusch, F. Haag, U. Bacher, A. Horst, H. Schluter und M. Binder (2012). „Antigen-specificity of oligoclonal abnormal protein bands in multiple myeloma after allogeneic stem cell transplantation“. In: *Cancer Immunol. Immunother.* 61.10, S. 1639–1651.

- Rajkumar, S. V. (2009). „Prevention of Progression in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance“. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15.18, S. 5606–5608. ISSN: 1078-0432.
- Rajkumar, S. V., O. Landgren und M. Mateos (2015). „Smoldering multiple myeloma“. In: *blood*.
- Rapoport, A. P., E. A. Stadtmauer, G. K. Binder-Scholl, O. Goloubeva, D. T. Vogl, S. F. Lacey, A. Z. Badros, A. Garfall, B. Weiss, J. Finklestein, I. Kulikovskaya, S. K. Sinha, S. Kronsberg, M. Gupta, S. Bond, L. Melchiori, J. E. Brewer, A. D. Bennett, A. B. Gerry, N. J. Pumphrey, D. Williams, H. K. Tayton-Martin, L. Ribeiro, T. Holdich, S. Yanovich, N. Hardy, J. Yared, N. Kerr, S. Philip, S. Westphal, D. L. Siegel, B. L. Levine, B. K. Jakobsen, M. Kalos und C. H. June (2015). „NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma“. In: *Nat Med* 21.8, S. 914–921. ISSN: 1078-8956.
- Roehnisch, T., C. Then, W. Nagel, C. Blumenthal, T. Braciak, M. Donzeau, T. Böhm, M. Flaig, C. Bourquin und F. S. Oduncu (2014). „Phage idiotype vaccination: first phase I/II clinical trial in patients with multiple myeloma“. In: *Journal of translational medicine* 12, S. 119. ISSN: 1479-5876.
- Rojas, G., Y. Tundidor und Y. C. Infante (2014). „High throughput functional epitope mapping: Revisiting phage display platform to scan target antigen surface“. In: *mAbs* 6.6, S. 1368–1376.
- Röllig, C., S. Knop und M. Bornhäuser (2015). „Multiple myeloma“. In: *The Lancet* 385.9983, S. 2197–2208. URL: <http://www.thelancet.com/article/S0140673614604931/fulltext>.
- Rotta, M., B. E. Storer, F. Sahebi, J. A. Shizuru, B. Bruno, T. Lange, E. D. Agura, P. A. McSweeney, M. A. Pulsipher, P. Hari, R. T. Maziarz, T. R. Chauncey, F. R. Appelbaum, M. L. Sorrow, W. Bensinger, B. M. Sandmaier, R. F. Storb und D. G. Maloney (2009). „Long-term outcome of patients with multiple myeloma after autologous hematopoietic cell transplantation and nonmyeloablative allografting“. In: *blood* 113.14, S. 3383–3391.
- Sahin, U., O. Türeci, H. Schmitt, B. Cochlovius, T. Johannes, R. Schmits, F. Stenner, G. Luo, I. Schobert und M. Pfreundschuh (1995). „Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92.25, S. 11810–11813. ISSN: 0027-8424.

- Scaffidi, P., T. Misteli und M. E. Bianchi (2002). „Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation“. In: *Nature* 418.6894, S. 191–195.
- Schieferdecker, A., A. Oberle, B. Thiele, F. Hofmann, M. Göthel, S. Miethe, M. Hust, F. Braig, M. Voigt, U.-M. von Pein, F. Koch-Nolte, F. Haag, M. Alawi, D. Indenbirken, A. Grundhoff, C. Bokemeyer, U. Bacher, N. Kröger und M. Binder (2016). „A transplant immunome deep sequencing and screening platform defines a unique targetable epitope fingerprint of multiple myeloma“. In: *Blood*. ISSN: 0006-4971. URL: <http://www.bloodjournal.org/content/early/2016/03/31/blood-2015-10-676536>.
- Seidl, S., H. Kaufmann und J. Drach (2003). „New insights into the pathophysiology of multiple myeloma“. In: *THE LANCET Oncology* 4.1, S. 557–564. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12965277>.
- Shadidi, M., D. Sorensen, A. Dybwad, G. Furset und M. Sioud (2008). „Mucosal vaccination with phage-displayed tumour antigens identified through proteomics-based strategy inhibits the growth and metastasis of 4T1 breast adenocarcinoma“. In: *International journal of oncology* 32.1, S. 241–247. ISSN: 1019-6439.
- Shankaran, V., H. Ikeda, A. T. Bruce, J. M. White, P. E. Swanson, L. J. Old und R. D. Schreiber (2001). „IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity“. In: *Nature* 410.6832, S. 1107–1111.
- Smith, G. P. (1985). „Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface“. In: *Science* 228.4705, S. 1315–1317. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4001944>.
- Spisek, R., A. Charalambous, A. Mazumder, D. H. Vesole, S. Jagannath und M. V. Dhodapkar (2007). „Bortezomib enhances dendritic cell (DC)–mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications“. In: *blood* 109.11, S. 4839–4845.
- Spisek, R. und M. V. Dhodapkar (2007). „Towards a better way to die with chemotherapy: role of heat shock protein exposure on dying tumor cells“. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 6.16, S. 1962–1965. ISSN: 1551-4005.
- Sucak, G., E. Suyan, Z. N. Ozkurt, Z. A. Ye?in, Z. Aki und M. Yagci (2010). „Abnormal protein bands in patients with multiple myeloma after haematopoietic stem cell transplantation: does it have a prognostic significance?“ In: *Hematol Oncol* 28.4, S. 180–184.
- Swann, J. B. und M. J. Smyth (2007). „Immune surveillance of tumors“. In: *Journal of Clinical Investigation* 117.5, S. 1137–1146. ISSN: 0021-9738.

- Thanendrarajan, S., F. E. Davies, G. J. Morgan, C. Schinke, P. Mathur, C. J. Heuck, M. Zangari, J. Epstein, S. Yaccoby, N. Weinhold, B. Barlogie und F. van Rhee (2016). „Monoclonal antibody therapy in multiple myeloma: where do we stand and where are we going?“ In: *Immunotherapy* 8.3, S. 367–384. ISSN: 1750-7448.
- van Bergen, C. A. M., M. G. D. Kester, I. Jedema, M. H. M. Heemskerk, van Luxemburg-Heijs, Simone A. P., F. M. Kloosterboer, W. A. E. Marijt, A. H. d. Ru, M. R. Schaafsma, R. Willemze, P. A. van Veelen und J. H. F. Falkenburg (2007). „Multiple myeloma-reactive T cells recognize an activation-induced minor histocompatibility antigen encoded by the ATP-dependent interferon-responsive (ADIR) gene“. In: *blood* 109.9, S. 4089–4096. URL: <http://bloodjournal.org/content/109/9/4089>.
- Voigt, M., F. Braig, M. Göthel, A. Schulte, K. Lamszus, C. Bokemeyer und M. Binder (2012). „Functional Dissection of the Epidermal Growth Factor Receptor Epitopes Targeted by Panitumumab and Cetuximab“. In: *Neoplasia (New York, N.Y.)* 14.11, S. 1023–1031. ISSN: 1476-5586.
- Vos, W. L., P. V. Nazarov, R. B. Koehorst, R. B. Spruijt und M. A. Hemminga (2009). „From ‘I’ to ‘L’ and back again: the odyssey of membrane-bound 5M136 protein“. In: *Trends in Biochemical Sciences* 34.5, S. 249–255. ISSN: 0968-0004. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968000409000619>.
- Walz, S., J. S. Stickel, D. J. Kowalewski, H. Schuster, K. Weisel, L. Backert, S. Kahn, A. Nelde, T. Stroh, M. Handel, O. Kohlbacher, L. Kanz, H. R. Salih, H.-G. Rammensee und S. Stevanović (2015). „The antigenic landscape of multiple myeloma: mass spectrometry (re)defines targets for T-cell-based immunotherapy“. In: *blood* 126.10, S. 1203–1213.
- Wen, Y.-J., R. Min, G. Tricot, B. Barlogie und Q. Yi (2002). „Tumor lysate-specific cytotoxic T lymphocytes in multiple myeloma: promising effector cells for immunotherapy“. In: *blood* 99.9, S. 3280–3285.
- Xie, X., R. Schmits, C. Renner, D. Preuss, B. Kubuschok und M. Pfreundschuh (2001). „Systematic search and molecular characterization of the antigenic targets of myeloma immunoglobulins: a monoclonal IgA from a female patient targeting sperm-specific cylicin II“. In: *Cancer immunity* 1, S. 11. ISSN: 1424-9634.
- Yi, Q., A. Osterborg, S. Bergenbrant, H. Mellstedt, G. Holm und A. K. Lefvert (1995). „Idiotypic-reactive T-cell subsets and tumor load in monoclonal gammopathies“. In: *blood* 86.8, S. 3043–3049.

- Zhou, F. L., W. G. Zhang, G. Chen, W. H. Zhao, X. M. Cao, Y. X. Chen, W. Tian, J. Liu und S. H. Liu (2005). „Serological identification and bioinformatics analysis of immunogenic antigens in multiple myeloma“. In: *Cancer Immunology, Immunotherapy* 55.8, S. 910–917. ISSN: 1432-0851. URL: <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-005-0074-x>.
- Zhou, P., J. Teruya-Feldstein, P. Lu, M. Fleisher, A. Olshen und R. L. Comenzo (2007). „Calreticulin expression in the clonal plasma cells of patients with systemic light-chain (AL-) amyloidosis is associated with response to high-dose melphalan“. In: *blood* 111.2, S. 549–557.
- Ziccheddu, G., E. Proietti und F. Moschella (2013). „The Janus face of cyclophosphamide: A sterile inflammatory response that potentiates cancer immunotherapy“. In: *OncolImmunology* 2.9, e25789.

Danksagung

An allererster Stelle danke ich Frau Prof. Dr. Mascha Binder für das interessante Thema, die erstklassige Betreuung, ihr immer offenes Ohr für etwaig aufkommende Probleme und letztendlich die Möglichkeit meine Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu können.

Vielen Dank an Mareike, die mich in die Weisheiten von Phage Display und ELISA einweihte, sowie an Fritzi, Janina und Anita für ihre geduldige Einarbeitung und Bereitschaft zur Lösung der Probleme auf die ich bei der Arbeit im Labor stieß. Einen großen Dank auch an Fabrice mit dem ich nicht nur im Labor viel zu Lachen hatte. Und natürlich bei allen anderen, jetzigen und ehemaligen, Mitarbeitern der Arbeitsgruppe.

Des Weiteren gilt mein Dank natürlich meinen Eltern, Perpetua und Wilhelm, ohne welche ein Medizinstudium sowie eine Dissertation undenkbar gewesen wäre und für ihr Verständnis und Geduld.

Vielen Dank an meine Freundin Sandra, die mich all die Zeit unterstützt hat mit ihren aufmunternden Worten und dafür, dass sie meine ganze Arbeit stets relativiert hat und dafür dass sie nachsichtig war, wenn ich noch einmal Sonntag nachts zum Ausplattieren ins Labor bin.

Vielen Dank an meine Brüder Felix und Moritz und an meine Neffen Luka und Tim, die mich mitunter vortrefflich von meiner Arbeit abgelenkt haben.

Ein Dank auch an Jonas der mich zu vielen äußerst effektiven Schreibsitzungen in der Bibliothek motiviert hat und noch viel mehr für die Zeit in der wir zusammen in der Bibliothek waren und nicht gearbeitet haben.

Und natürlich auch alle die ich vergessen habe.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Fabian HOFMANN, 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. Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift:

Datum:
