

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Onkologisches Zentrum
II. Medizinische Klinik und Poliklinik
Onkologie, Hämatologie und Knochenmarktransplantation
mit Sektion Pneumologie
Direktor: Prof. Dr. C. Bokemeyer

Evaluierung der humoralen Immunantwort gegen Cancer-Testis-Antigene nach autologer und allogener Stammzelltransplantation bei Patienten mit Multiplem Myelom

Dissertation

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

vorgelegt von:

Eva Schlingloff
aus Braunschweig

Hamburg 2016

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 05.12.2017

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

Prof. Dr. Mascha Binder

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in:

Prof. Dr. Nikolaus Kröger

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Tumorimmunologie.....	1
1.2 Humorale Immunantwort gegen Tumorantigene.....	3
1.3 Cancer-Testis-Antigene.....	5
1.3.1 Geschichte und Definition	5
1.3.2 Expression und Funktion.....	6
1.3.3 CT-Antigene als Ziel für Immuntherapien	7
1.4 Multiples Myelom	8
1.4.1 Definition	8
1.4.2 Epidemiologie.....	9
1.4.3 Ätiologie und Pathogenese.....	10
1.4.4 Klinik und Diagnostik	11
1.4.5 Therapie.....	15
1.5 Fragestellung	17
2. Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Patientenmaterial	19
2.1.2 Chemikalien	19
2.1.3 Laborgeräte.....	23
2.1.4 Verbrauchsmaterialien	23
2.1.5 Studiendesign	24
2.2 Methoden	26
2.2.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	26
2.2.2 Epitop-Mapping	28
2.2.3 Reverse Transkriptase – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).....	28
2.2.4 Statistische Analysen	31
3. Ergebnisse.....	32
3.1 Korrelation zwischen CT-Antigenexpression und humoraler Immunantwort	32
3.1.1 Übersicht der Immunantworten und Expression von CT-Antigenen.....	32
3.1.2 CT-spezifische humorale Immunantwort steigt nach SZT, während die Expression abnimmt.....	35
3.1.3 Nach SZT geht die Expression der CT-Antigene MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-C1 und MAGE-C2 zurück	37
3.1.4 Nach SZT steigt die humorale Immunantwort gegen die CT-Antigene NY-ESO-1, MAGE-A1, MAGE-A12 und MAGE-B3	39

3.1.5	Besonders nach allogener SZT treten erhöhte IgG-Titer gegen CT-Antigene auf	41
3.2	Epitop-Mapping	42
4.	Diskussion	44
4.1	Häufigkeit der CT-Antigenexpression und der humoralen Immunantwort im Multiplen Myelom	44
4.2	Einfluss der Tandem-SZT auf CT-Antigenexpression und humorale Immunantwort im Multiplen Myelom.....	47
4.3	Limitation der aktuellen Untersuchung.....	49
5.	Zusammenfassung	51
6.	Abkürzungsverzeichnis	53
7.	Literaturverzeichnis	55
8.	Anhang.....	66
8.1	Tabellen	66
8.2	Einverständniserklärung	67
9.	Danksagung	88
10.	Lebenslauf	89
11.	Eidesstattliche Erklärung	90

1. Einleitung

1.1 Tumorimmunologie

Die konventionelle Chirurgie-, Strahlen- und Chemotherapie bilden das Rückgrat der Tumorthherapie. Diese Behandlungsmöglichkeiten haben sich aber insofern weiterentwickelt, als es heutzutage immer mehr zusätzliche und kombinierbare Behandlungsoptionen gibt (Vanneman & Dranoff 2012). Dazu gehört einerseits die „gezielte Therapie“ (engl. *targeted therapy*), bei der mit Hilfe von kleinen Molekülen, nicht selten Tyrosin-Kinase-Inhibitoren, eine Blockierung von Strukturen erfolgt, die für die Tumorzellen essentiell für Wachstum, Vaskularisierung und Zellzyklusprogression sind. Vorreiter für diese Gruppe war das Medikament Imatinib (Glivec von Novartis), welches u.a. bei chronisch myeloischer Leukämie (CML) eingesetzt wird (Druker 2003).

Andererseits gehört zu den neuen Behandlungsmöglichkeiten auch die Immuntherapie. Das Immunsystem besteht aus verschiedenen Anteilen – humoral und zellulär, angeboren und erworben – und dient der Abwehr körperfremder Strukturen z.B. Bakterien (Mak & Saunders 2006). Obwohl Tumorzellen aus körpereigenen Zellen entstehen, besitzen sie aufgrund hoher Mutationsraten gelegentlich Merkmale, durch die sie durch das Immunsystem erkannt werden können. Die Interaktion mit dem Immunsystem erstreckt sich von der Immunsuppression durch den Tumor selbst und dadurch Förderung des Tumorwachstums (Zhang & Grizzle 2011) bis hin zur Unterdrückung der Tumorgenese. Letzteres wurde bereits zu Beginn des 20. Jhd. von Paul Ehrlich vermutet und durch Impfversuche mit Tumormaterial an Mäusen bekräftigt (Ehrlich 1908).

Der Gedanke, sich das eigene Immunsystem gegen Tumorzellen zu Nutze zu machen, ist bis heute aktuell. Um eine effiziente Anti-Tumor-Antwort zu erzielen, sind laut Mellman et al. (2011) drei ausschlaggebende Bereiche zu beeinflussen: die Förderung von Antigen-Präsentation durch v.a. dendritische Zellen, die Unterstützung der Bildung von Anti-Tumor-T-Zellen und die Überwindung der Immunsuppression im Tumorgewebe.

Gelegentlich entstehen diese Anti-Tumor-Reaktionen des Immunsystems spontan, doch kann man mit Hilfe der richtigen Medikamente diese Immunantwort verstärken oder neu hervorrufen. Eine Art der Immuntherapie ist dabei aktivierend auf das

körpereigene Immunsystem gerichtet, wie **Abbildung 1** anhand einiger Beispiele zeigt. Ziel dabei ist es, tumorspezifische T- und B-Zellen zu aktivieren, so dass das eigene Immunsystem den Tumor effizient bekämpft. Wichtige Methoden sind dabei die adoptive T-Zell-Therapie und die Vakzinierung. Ersteres macht sich das Prinzip zunutze, autologe Anti-Tumor-Lymphozyten aus einem Krebspatienten zu isolieren, *ex vivo* zu stimulieren und expandieren und sie anschließend zu reinfundieren (June 2007). Bei Vakzinierungen dagegen wird eine aktive Impfung vorgenommen, indem man Tumormaterial als Impfstoff einsetzt und so eine Immunantwort hervorruft. Eine andere Art der Immuntherapie ist dagegen die direkte Gabe von therapeutischen Antikörpern, welche in Teilen einer passiven Impfung gleicht (Adler & Dimitrov 2012). Da die humorale Immunantwort, spontan oder medikamenteninduziert, in dieser Arbeit von besonderer Bedeutung ist, wird sie im Abschnitt „Humorale Immunantwort auf Tumorantigene“ gesondert vorgestellt.

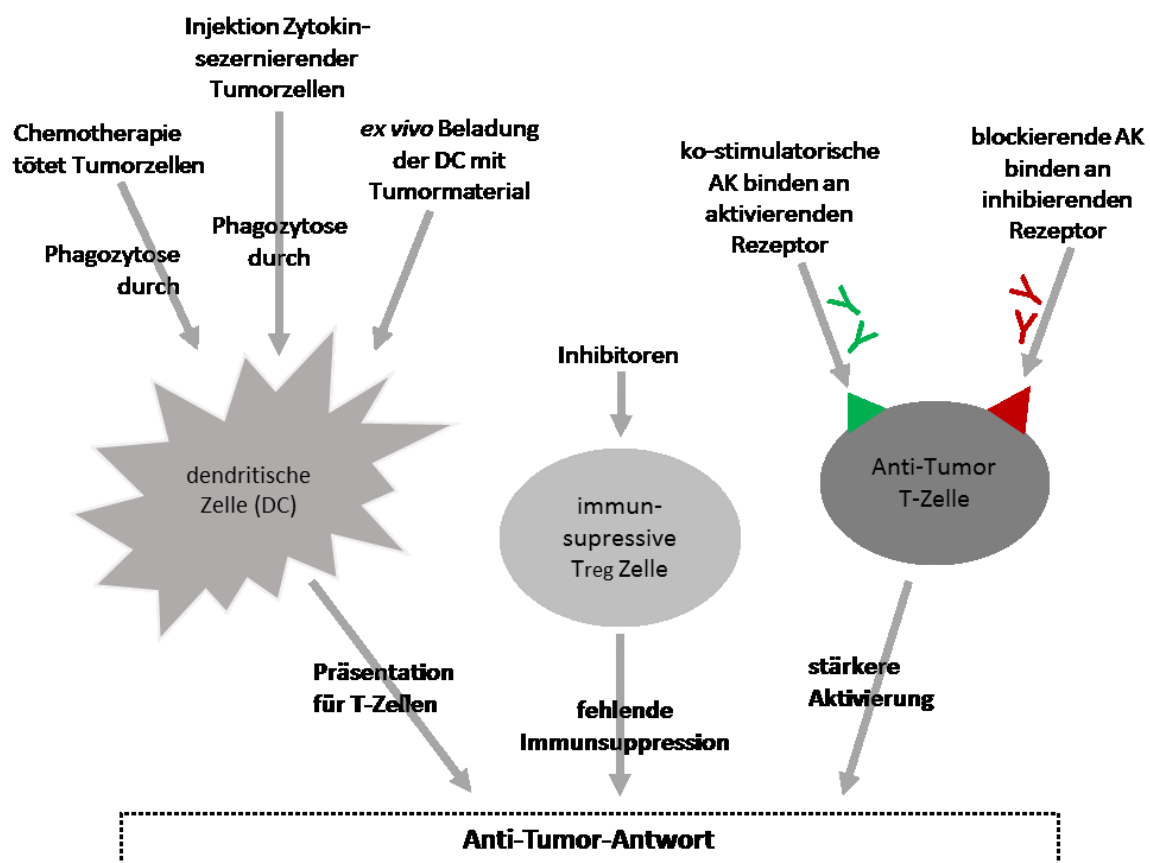


Abbildung 1. Medikationsmöglichkeiten in der Tumorimmunologie nach Vannemann & Dranoff (2012). Der linke Anteil zeigt drei verschiedene Arten, wie antigenpräsentierende dendritische Zellen (hellgrau, DC) zur Präsentation von Tumormaterial angeregt werden können. In der Mitte ist die Inhibition von regulatorischen T-Zellen (grau, Treg) gezeigt, durch die die Sekretion immunsupprimierender Zytokine abgeschwächt wird. Direkte Wirkungen auf zytotoxische oder T-Helfer-Zellen können über agonistische bzw. ko-stimulatorische Antikörper (AK) an aktivierenden Rezeptoren (beide grün) oder über antagonistische bzw. blockierende AK an inhibierenden Rezeptoren (beide rot) erreicht werden, wie rechts dargestellt. Insgesamt wird dadurch die T-Zell-Antwort gestärkt.

1.2 Humorale Immunantwort gegen Tumorantigene

Die humorale Immunantwort besteht aus Antikörpern (AK), die von Plasmazellen gebildet werden und gegen ein spezifisches Antigen gerichtet sind. Bevor sich B-Zellen jedoch in diese Plasmazellen differenzieren, muss ein Antigen-Kontakt am B-Zell-Rezeptor und eine Stimulation durch T-Helfer-Zellen stattgefunden haben. Dieser Vorgang geschieht teilweise spontan gegen Tumorzellen, kann aber auch durch Gabe spezifischer Anti-Tumor-AK initiiert werden.

Wie viele der Patienten spontan AK-Titer gegen die Antigene entwickeln, variiert zwischen den Tumorentitäten und –stadien, so dass Reuschenbach et al. (2009) in einer Metaanalyse über 11 Studien für spontane AK-Bildung gegen NY-ESO-1 eine Spanne von 0-23% feststellte. Diese spontane Immunreaktion korrelierte insofern mit dem Krankheitsverlauf, als die hohen AK-Titer vermehrt bei fortgeschrittenen Stadien auftraten (Fichtner et al. 2015; Svobodová et al. 2011; Pabst et al. 2010; Akcakanat et al. 2004). Welche Bedeutung die spontane AK-Bildung gegen Tumorantigene für die Klinik hat und welcher Mechanismus ihr zugrunde liegt, ist allerdings nicht eindeutig geklärt (Luetkens et al. 2014). Da in frühen Tumorstadien bereits geringe Mengen Tumorantigen eine relativ starke Immunantwort auslösen können, wird über die Verwendung der autologen AK als diagnostischer oder prognostischer Marker nachgedacht (Heo et al. 2012).

In der Tumorthherapie können die gentechnisch hergestellten AK gegen ganz unterschiedliche Ziele gerichtet sein (Scott et al. 2012). Erstens können sie direkt an die Tumorzellen binden und dort Rezeptoren, die ein wachstumsförderndes Signal ins Zellinnere weiterleiten, blockieren oder andersherum apoptotische Signale durch agonistische Rezeptorbindung fördern (**Abbildung 1**). Beispiele, die in den klinischen Alltag Einzug gehalten haben, sind die beiden Antagonisten des wachstumsvermittelnden EGFR (engl. *epidermal growth factor receptor*) Cetuximab und Panitumumab (Martinelli et al. 2009).

Zweitens können AK mit dem Immunsystem interagieren. So binden sie an ein spezifisches Antigen auf der Tumorzelloberfläche und aktivieren mit dem „herausragenden“ F_c – Teil (konstantes Fragment) das Komplementsystem, Effektorzellen oder die Phagozytose (Scott et al. 2012). Im therapeutischen Kontext eingesetzte monoklonale Antikörper können auch direkt an inhibitorische oder aktivierende Rezeptoren von Immunzellen binden und so ihre Effektorfunktion

ausüben (**Abbildung 1**) (Weiner et al. 2012). Dass dieses Prinzip *in vivo* funktioniert, wurde bei dem aktivierenden Oberflächenrezeptor CD40 untersucht, der von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird. Durch Gabe von agonistischen AK konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass das Tumorstadium u.a. bei soliden Tumoren und Non-Hodgkin-Lymphomen reduziert wird (Khalil & Vonderheide 2007). Ebenfalls im Fokus aktueller Untersuchungen ist das inhibitorische Oberflächenprotein CTLA-4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte antigen-4*), das von T-Zellen exprimiert wird und in mehreren Studien durch antagonistische AK (z.B. Ipilimumab) blockiert wurde. Trotz stark fortgeschrittenen Krankheitsstadiums der Patienten mit metastasiertem Melanom konnte in einigen Studien ein erhöhtes Gesamtüberleben bei Gabe von Ipilimumab beobachtet werden (Sarnaik & Weber 2009; Robert et al. 2011).

Drittens können AK die Mikroumgebung des Tumors beeinflussen, indem sie beispielsweise dessen Angiogenese und somit Sauerstoffversorgung verschlechtern. Die erste klinische Phase III Studie, bei der der gefäßwachstumsvermittelnde VEGF (engl. *vascular endothelial growth factor*) bei Patienten mit Kolorektalkarzinom mit dem AK Bevacizumab blockiert wurde, bildete mit ihren positiven Resultaten die Grundlage für heutige Medikamente (Hurwitz et al. 2004). Obwohl der genaue Funktionsmechanismus der VEGF-Blocker noch nicht geklärt ist, bietet diese Medikamentengruppe Vorteile gegenüber konventioneller Therapie allein (Ellis & Hicklin 2008).

Als weitere Therapieoption ist die Kopplung von Chemotherapeutika oder Radioisotopen an die AK zu nennen. Durch Bindung der AK an bekannte Zielstrukturen auf den Tumorzellen können die zytotoxischen Substanzen direkt am Tumor wirksam werden (Hughes 2010).

Um bei der AK-basierten Immuntherapie eine hohe Spezifität und somit wenig Nebenwirkungen zu gewährleisten, ist es wichtig, dass der AK idealerweise nur an Strukturen z.B. Rezeptoren oder Antigene bindet, die ausschließlich auf neoplastischen Zellen vorkommen. Da gerade Rezeptoren aber oft ubiquitär exprimiert sind, wird an AK geforscht, die möglichst nur an die mutierten, überexprimierten oder konstitutiv aktiven Rezeptoren an der Tumorzelloberfläche binden und nicht an die im normalen Gewebe (Scott et al. 2007). Genauso wichtig wie die Suche nach diesen AK ist demnach auch die Entdeckung tumorspezifischer Antigene wie z.B. den Cancer-Testis(CT)-Antigenen.

1.3 Cancer-Testis-Antigene

1.3.1 Geschichte und Definition

Um Tumorzellen direkt mit Antikörpern im Rahmen einer Immuntherapie behandeln zu können, bedarf es idealerweise Zielstrukturen, die ausschließlich und dauerhaft auf der Tumorzelloberfläche exprimiert werden. Obwohl die Idee von Paul Ehrlich bereits Anfang des 20. Jahrhunderts formuliert wurde, entdeckte man die ersten Tumorantigene erst in den 1960er Jahren (Gold & Freedman 1965; Abelev et al. 1963). Anfang der 1990er Jahre wurde schließlich auf Melanomzellen das erste Cancer-Testis-Antigen entdeckt, welches von der MAGE (engl. *melanoma antigen*) – Genfamilie auf Chromosom X codiert wird (Van der Bruggen et al. 1991; Coulie et al. 1993). Der Terminus „Cancer-Testis-Antigen“ wurde durch Chen et al. (1997) eingeführt, da die immer größer werdende Gruppe dieser Antigene nachweislich in histologisch unterschiedlichen Tumoren (engl. *cancer*), aber auch in den immunprivilegierten männlichen Keimzellen (lat. *testis*) exprimiert werden.

Heutzutage ist diese Definition nicht mehr vollständig zutreffend, da einige CT-Antigene in gesundem Gewebe nicht nur in männlichen Keimzellen, sondern z.B. auch in der Plazenta vorkommen (Zendman et al. 2002). Des Weiteren ging man zunächst davon aus, dass alle CT-Gene auf dem X-Chromosom lägen, doch viele andere liegen ebenso auf somatischen Chromosomen (Simpson et al. 2005). Die aktuelle Definition der CT-Antigene zeigt **Abbildung 2**.

Cancer	–	Testis	–	Antigen
Vorkommen in histologisch unterschiedlichen Tumoren		Vorkommen in männl. Keimbahnzellen → vereinzelt auch in anderem gesunden Gewebe (z.B. NY-ESO-1 Im Ovar)		teilw. bei neu entdeckten CT-Antigenen methodenbedingt keine Immunogenität nachweisbar

Abbildung 2. Erklärung des Begriffs Cancer-Testis-Antigen nach Lim et al. (2012).

1.3.2 Expression und Funktion

Nach Angaben des Ludwig Institute for Cancer Research sind mittlerweile 276 Gene aus 158 Genfamilien bekannt (<http://www.cta.lncc.br/>). Die Expressionshäufigkeit für jedes dieser Antigene ist dabei in den verschiedenen Tumorentitäten sehr variabel. Da in dieser Arbeit der Fokus auf dem Multiplen Myelom (MM) liegt und dieses bezüglich der CT-Antigenexpression auch besonders gut erforscht ist (Lim et al. 2012), wird im Folgenden, wenn möglich, auf diese Erkrankung Bezug genommen.

Obwohl die Expressionshäufigkeit sehr unterschiedlich ist, sind zwei Tendenzen zu erkennen (Caballero & Chen 2009). Eine davon ist, dass innerhalb einer Tumorentität die Anzahl der exprimierten CT-Antigene und deren Expressionsfrequenz steigen, je fortgeschrittener das Stadium ist. So exprimierten bspw. 29% der neu diagnostizierten Patienten mit Multiplem Myelom im Stadium I-II mindestens eins von vier getesteten CT-Antigenen (MAGE-C1, -C2, -A3 und SSX-2), im Stadium III jedoch schon 60% (Atanackovic et al. 2009). Ähnliche Ergebnisse erzielte bereits eine andere Studie, in der keiner der MM-Patienten in Stadium I-II und 62% der Patienten in Stadium III mindestens ein CT-Antigen der untersuchten MAGE-Familie exprimierten (van Baren et al. 1999). Basierend auf diesen Daten wird die Expression mehrerer CT-Antigene in einem Patienten als prognostischer Faktor erwogen (Andrade et al. 2008). Hinweise auf CT-Antigenexpression als negativer prognostischer Marker finden sich dabei nicht nur im MM (Tyler et al. 2014; Zhang et al. 2014; Pabst et al. 2010), sondern auch in diversen anderen Tumorentitäten wie z.B. Lungen- oder Eierstockkrebs (Zhang et al. 2015; Xu et al. 2015; Laban et al. 2014). Allerdings wird dieser Zusammenhang für manche CT-Antigene kontrovers diskutiert, so werden die Antigene MAGE-C1 und -C2 auch unabhängig vom MM-Stadium exprimiert (De Carvalho et al. 2013). Eine andere Theorie betrifft die Koexpression. Wenn ein bestimmtes CT-Antigen exprimiert wird, steigt die Wahrscheinlichkeit, dass gemeinsam mit ihm ein weiteres exprimiert ist (Svobodová et al. 2011; Gure et al. 2005).

Über die Funktion der CT-Antigene ist bislang wenig bekannt. Die Beobachtung der Zeitpunkte, zu denen die Antigene bei der Gametogenese im Hoden aktiv sind, konnte zumindest über die Funktion einiger CT-Antigene in den Keimzellen Aufschluss geben (Türeci et al. 1998). Die Suche nach Sequenzhomologien auf Genebene mit bereits bekannten Proteinen ist ebenfalls eine Option, auf die Funktion zu schließen (Kalejs & Erenpreisa 2005). So werden die Antigene der MAGE-Familie mit dem Protein Necdin

in Zusammenhang gebracht, was auf eine Funktion in der Transkriptionsregulation schließen lässt (Kuwako et al. 2004). Tatsächlich deuten die meisten Untersuchungen auf eine Funktion der CT-Antigene, u.a. der MAGE- und SSX-Familie, als Regulatoren von Transkription und Apoptose hin (Simpson et al. 2005; Kalejs & Erenpreisa 2005). Die von Atanackovic et al. (2010) veröffentlichte Untersuchung bestätigt und erweitert diese Überlegungen, indem gezeigt wurde, dass einige CT-Antigene, hier MAGE-C1 und MAGE-A3, das Überleben der MM-Tumorzellen fördern bzw. deren Apoptose verhindern.

Dennoch bleibt die Frage, welche Funktion oder Bedeutung die Expression dieser Antigene der Keimzellbahn für Tumorzellen hat. Einerseits besteht die Hypothese, dass allein die genomische Instabilität in Tumoren zur zufälligen Expression beliebiger Antigene führt, doch erklärt das nicht die Häufung von Keimzell-Antigenen. Eine weitere Theorie sieht die globale Demethylierung in Tumoren im Fokus. Die Expression der CT-Antigene kann in normalen aber auch in Tumorzellen durch Demethylierung der Promoter-Region auf DNA-Ebene induziert werden, welche normalerweise in somatischen Zellen durch Methylierung inaktiviert ist (Shichijo et al. 1996; De Smet et al. 1999). So kann das Auftreten in beiden Zellarten, Keim- und Tumorzellen, erklärt werden. Allerdings sah bereits Old (2001) einen funktionellen Zusammenhang zwischen der CT-Antigenexpression der Tumorzellen und den stammzellähnlichen Eigenschaften der Keimzellen (Old 2001). Die Expression der CT-Antigene könnte Ausdruck eines gametogenetischen oder ontogenetischen Programms sein, welches in Tumorzellen abläuft, um Zellteilung, Chromosomenpaarung und –reparaturen ähnlich einer Keimzelle möglichst fehlerfrei zu durchlaufen (Kalejs & Erenpreisa 2005). Die Aktivierung von Keimzellgenen, die in somatischen Zellen durch Methylierung ausgeschaltet sind, scheint den Tumorzellen besonders im Hinblick auf Proliferation und Vermeidung der Apoptose von Vorteil zu sein (Simpson et al. 2005).

1.3.3 CT-Antigene als Ziel für Immuntherapien

Die Erforschung der CT-Antigene als Ziele für die Immuntherapie geht in unterschiedliche Richtungen. Zum einen gibt es Studien, in denen Patienten direkt mit autologen, CT-antigenspezifischen T-Zellen behandelt wurden (adoptive T-Zell-Therapie), wobei die Ergebnisse unterschiedlich ausfielen. Häufig wurde dabei bei

Melanom-Patienten sowohl das besonders immunogene und häufig exprimierte Antigen NY-ESO-1 untersucht (Hunder et al. 2008; Robbins et al. 2011), als auch andere CT-Antigene wie bspw. MAGE-A3 (Russo et al. 2013).

Zum anderen steht die Vakzinierung gegen bestimmte CT-Antigene im Fokus. Da einige der CT-Antigene, vor allem NY-ESO-1, immunogen genug sind, um spontane Immunantworten auszulösen, sind sie als Ziele für Impf- bzw. Vakzinierungsstudien besonders attraktiv. Einige Studien konnten bereits zeigen, dass die Gabe von rekombinantem NY-ESO-1 mit oder ohne zusätzlichem Adjuvant zu einer Verbesserung der Resultate bei vielen Patienten führt und gut verträglich ist (Jäger et al. 2006; Jäger et al. 2000; Davis et al. 2004). Auch die Vakzinierung mit einem weiteren CT-Antigen, MAGE-A3, wird als Therapie beim nicht-kleinzelligen Lungenkrebs untersucht (Tyagi & Mirakhur 2009). Eine aktuelle Studie von Pujol et al. (2015) zu diesem Thema zeigte ein vielversprechendes Ergebnis bezüglich der Immunogenität von MAGE-A3, da alle 67 vakzinierten Patienten eine humorale Immunantwort gegen das CT-Antigen ausbilden konnten. Ob die Bildung dieser Antikörper gegen die geimpften CT-Antigene auch ein besseres Überleben für den Patienten bedeutet, ist Gegenstand aktueller Forschung. Saito et al. (2014) untersuchten zu diesem Zweck 20 Patienten mit diversen fortgeschrittenen Tumorentitäten, die mit MAGE-A4 vakziniert wurden. Zwar entwickelten nur vier Patienten humorale Immunantworten, doch hatten diese Patienten ein signifikant längeres Überleben.

1.4 Multiples Myelom

1.4.1 Definition

Als Multiples Myelom (MM) wird eine neoplastische Entartung von B-Zellen im Knochenmark bezeichnet, die zu den Non-Hodgkin-Lymphomen gehört. Charakterisiert wird diese Erkrankung im Allgemeinen durch die erhöhte Proliferation einer zur Plasmazelle differenzierten B-Zelle, welche dadurch das normale Knochenmarksgewebe verdrängt und übermäßig viel Paraprotein, also funktionsunfähige (un)vollständige Antikörper, produziert (Silbermann & Roodman 2010).

Die 1873 erstmals vom Arzt v. Rustizky beschriebene Erkrankung lässt sich mittlerweile auf verschiedene Arten gliedern bzw. unterteilen (Saltykow 1903). Die Art der Symptomatik, symptomatisch bzw. aktiv oder asymptomatisch bzw. schwelend („Smouldering MM“), aber auch die Anzahl der Tumorherde, solitär oder disseminiert, spielen dabei eine Rolle (Palumbo & Cerrato 2013). Ein solitärer Tumor, auch als solitäres Plasmozytom bezeichnet, gilt als Sonderform des MM und kann zusätzlich nach der Lokalisation im oder außerhalb des Knochens (ossär oder extraskelletär) unterteilt werden. Eine dritte Differenzierung kann über die Art der sezernierten Immunglobuline getroffen werden. Am häufigsten treten demnach Myelome des Subtypes Immunglobulin G (IgG) mit ca. 50%, IgA mit 25% und der Bence-Jones-Subtyp (Leichtkettenmyelom) mit 20% auf (Sirohi et al. 2001).

Generell ist das MM von anderen monoklonalen Gammopathien abzugrenzen, die sich, bis auf das non-sekretorische MM, alle durch das Auftreten von Immunglobulinen im Serum auszeichnen. Da die verschiedenen Paraproteinämien in einander übergehen und diagnostisch auseinander gehalten werden müssen, werden sie im Abschnitt „Klinik und Diagnostik“ erläutert.

1.4.2 Epidemiologie

Das Multiple Myelom macht unter allen Krebserkrankungen ca. 1%, bei allen hämatologischen Krebserkrankungen gut ein Zehntel aus (Kyle et al. 2003).

Zwischen den Jahren 1975 und 2010 betrug die Inzidenz für das MM in westlichen Ländern im Schnitt 5,7 auf 100.000 Einwohner jährlich, wobei Männer etwas häufiger als Frauen (7,1 bzw. 4,7 pro 100.000 Einwohner) betroffen waren. Im Jahr 2010 betrug die Inzidenz allgemein 6,4, für Männer ca. 8 und für Frauen ca. 5 auf 100.000 Einwohner (National Cancer Institute 2013). Doch nicht nur das Geschlecht, auch die Ethnologie ist insofern von Bedeutung als schwarze Amerikaner ungefähr zweimal so oft vom MM betroffen sind wie weiße.

Der Häufigkeitsgipfel des Erkrankungsalters liegt um das 65. Lebensjahr herum (Kyle et al. 2003). Tatsächlich treten 99% der Erkrankungen bei über 40-Jährigen auf, wobei die Inzidenz stetig ansteigt und erst bei den über 84-Jährigen wieder absinkt (Alexander et al. 2007). Die geschlechterunabhängige relative Fünf-Jahres-Überlebensrate betrug zwischen 1975-1977 noch 24,6%, stieg 1996-1998 auf 32,3%

und belief sich zwischen 2003-2009 auf 44,9%, wobei die Differenz zwischen den Zeitpunkten um 1975 und 2009 signifikant ist (National Cancer Institute 2013).

1.4.3 Ätiologie und Pathogenese

Da die Ätiologie weitestgehend ungeklärt ist, gibt es nur wenige Hinweise auf eine Ursache für die Entstehung des Multiplen Myeloms. Bekannt sind vor allem Häufungen der Erkrankung bei erhöhter Strahlenbelastung wie bei Betroffenen der Atombomben bei Hiroshima und Nagasaki (Ichimaru & Mabuchi 1991) oder US-amerikanischen Radiologen um 1955 (Lewis 1963). Neben den Umwelteinflüssen wurden aber auch genetische Dispositionen diskutiert (Shoenfeld et al. 1982).

Der pathogenetischen Entwicklung des MM aus der monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) hin zur Plasmazellleukämie liegen bei jedem Schritt verschiedene Mutationen zugrunde, die sich über die Zeit akkumulieren, siehe **Abbildung 3**.

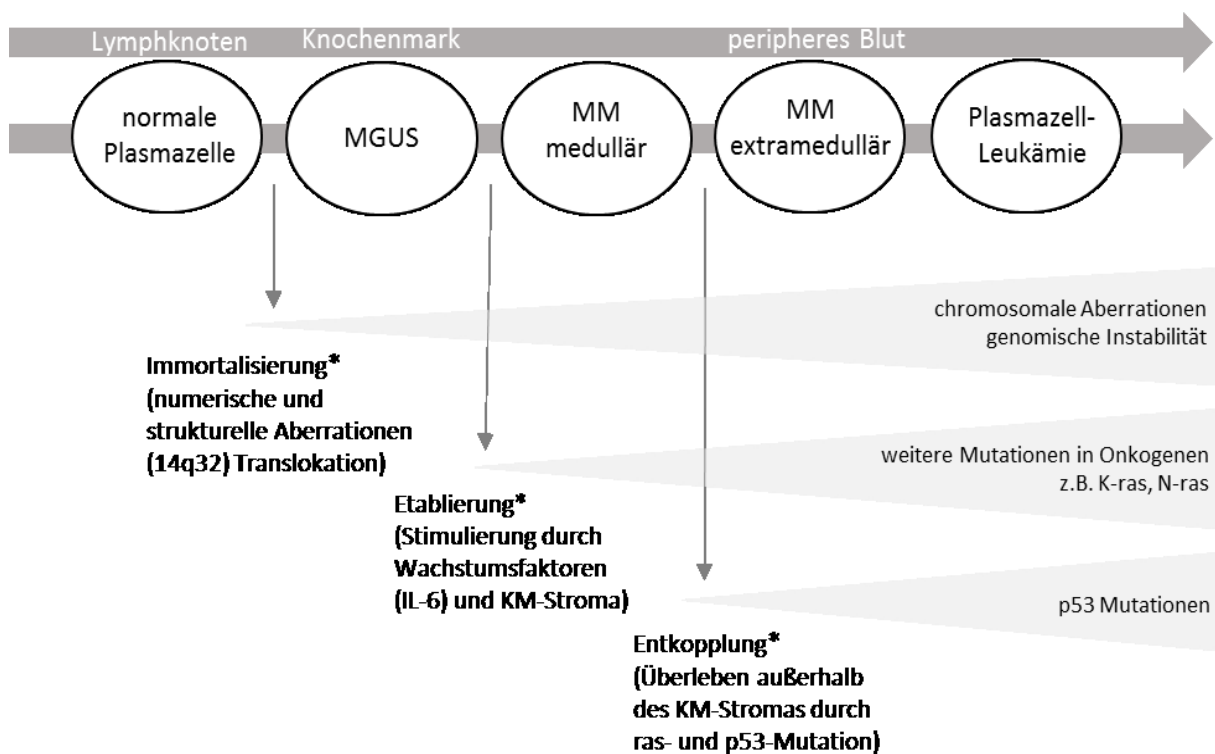


Abbildung 3. Pathogenese des MM mit verschiedenen Mutationen. Mit einem Stern (*) markiert sind die Prozessbezeichnungen nach Hallek et al. (1998). Die hellgrauen Dreiecke deuten die Akkumulation von Mutationen ab einem bestimmten Stadium an.

Zur Immortalisierung einer normalen Plasmazelle führen sowohl numerische, z.B. Monosomie 13 und Trisomie 3, 5, 7, 9, 11, 15 oder 19, als auch strukturelle Chromosomenaberrationen, z.B. häufig Translokationen im Immunglobulinschwerkettenloкус auf Chromosom 14. Diese karyotypischen Abnormalitäten akkumulieren insofern, als sich im MM Stadium I 20%, im MM Stadium III 60% und im extramedullären MM über 80% der Patienten mit solchen Veränderungen finden (Hallek et al. 1998).

Ist bereits eine MGUS entstanden, bedarf es zusätzlicher Einflüsse, die zu einer Progression und damit zu einem medullären MM führen. Neben weiteren Mutationen spielen auch epigenetische Vorgänge wie die globale Demethylierung der DNA (Morgan, Walker et al. 2012) und micro-RNAs eine Rolle (Roccaro et al. 2009). Doch auch äußere Einflüsse durch das Knochenmarksstroma wie die parakrine Stimulierung durch den Wachstumsfaktor Interleukin 6 kann die Proliferation von MM-Zellen begünstigen (Klein et al. 1989). Diese Phase wird von Hallek et al. als Etablierung bezeichnet.

In der Entkopplungsphase bewirken weitere Mutationen, dass die Tumorzellen auch ohne den Einfluss des Knochenmarkmilieus proliferieren können. So geht das medulläre in das extramedulläre MM und später in die Plasmazellleukämie über. Verantwortlich dafür sind wahrscheinlich Mutationen in den ras-Onkogenen (Corradini et al. 1993) und im Gen des Zellzyklusregulators p53 (Neri et al. 1993). Dementsprechend ist eine Mutation im p53-Gen (Chromosom 17) nur in fortgeschrittenen MM-Stadien zu finden und gilt als prognostischer Faktor für kürzeres Überleben (Drach et al. 1998). Ebenso stellte sich heraus, dass je mehr Abnormalitäten (z.B. komplexer Karyotyp, Hypoploidie) ein Tumor angesammelt hat, desto niedriger ist das mediane Überleben der Patienten (Jekarl et al. 2013).

1.4.4 Klinik und Diagnostik

Das Multiple Myelom ist charakterisiert durch die übermäßige Proliferation eines Plasmazellklons, durch den es zur Paraproteinämie, Osteolyse und Schädigung anderer Endorgane kommen kann (Kyle & Rajkumar 2009). Durch die Produktion einer unphysiologisch hohen Menge an Paraprotein bzw. Antikörpern (Paraproteinämie) und deren Ablagerungen in den Nierentubuli kann die Nierenfunktion eingeschränkt werden. Außerdem verdrängt die Masse an

Plasmazellen im Knochenmark das normale Gewebe, wodurch das dort angesiedelte blutbildende System in seiner Funktion eingeschränkt wird und es zur Anämie (resultiert in allgemeiner Schwäche), Leukopenie (Infektanfälligkeit) und Thrombozytopenie (Gerinnungsstörungen) kommen kann (Durie et al. 2003). Diese Osteolyse führt zudem zu einer Hyperkalziämie und Knochenschmerzen und ist im Röntgenbild als eine Art „ausgestanzte“ Kreise sichtbar. Im Schädelknochen spricht man dann vom sogenannten „Schrotschussschädel“ (Bannas & Kröger 2012). Eine tumortypische Begleitsymptomatik wie Gewichtsverlust und Schwächegefühl gehören ebenfalls zum klinischen Bild des MM (Kyle et al. 2003).

Die beschriebenen Endorganschäden, die für das MM besonders charakteristisch sind, werden nicht selten mit der englischen Abkürzung CRAB zusammengefasst. Diese steht für Hyperkalziämie, engl. *calcaemia*, (20% der MM-Patienten bei Diagnosestellung), **R**enale Dysfunktion (20%), **A**nämie (67%) und Knochenläsionen, engl. *bone lesions* (80%) (The International Working Group 2003).

Da dem klassischen symptomatischen MM verschiedene Vorstufen vorausgehen, ist es wichtig, diese diagnostisch gegeneinander abzugrenzen. **Abbildung 4** zeigt die Entwicklung von der MGUS über das asymptomatische und symptomatische MM bis hin zur sekundären Plasmazelleukämie mit den dazugehörigen Diagnosekriterien, wie sie die „International Myeloma Working Group“ 2003 vorschlug und wie sie als Guideline empfohlen wird (Kumar et al. 2009).

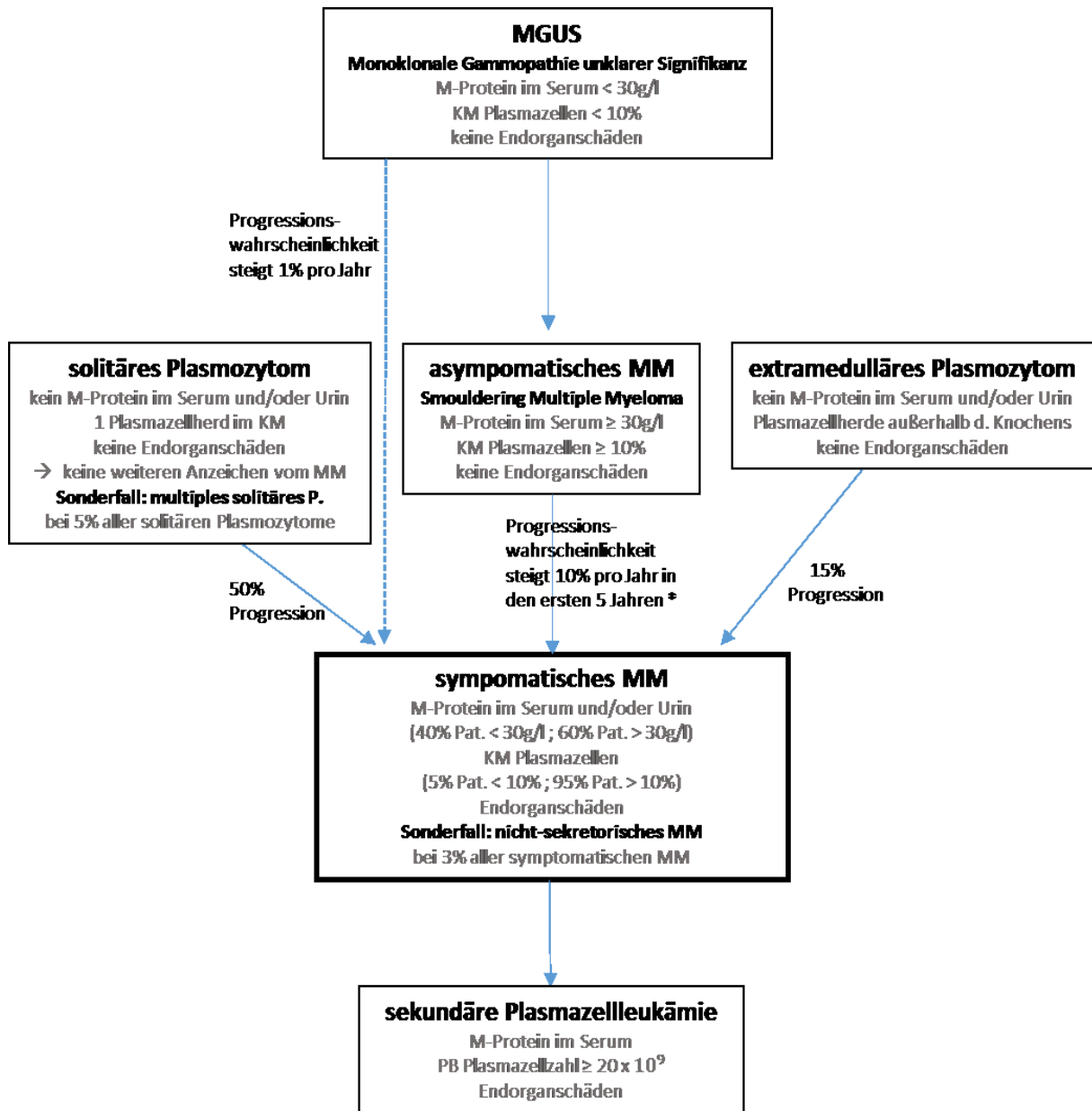


Abbildung 4. Das symptomatische Multiple Myelom im Kontext verschiedener Paraproteinämien mit den jeweiligen diagnostischen Parametern nach der „International Myeloma Working Group“ 2003. Mit einem Stern (*) markiert ist eine Angabe von Kyle et al. (2007). KM = Knochenmark; PB = peripheres Blut.

Doch nicht nur beim Stellen der richtigen Diagnose, auch bei der entsprechenden Stadieneinteilung des MM herrscht teilweise Uneinigkeit. Die etwas ältere, aber teils noch gebräuchliche Einteilung nach Durie und Salmon berücksichtigt folgende vier Parameter: Knochenläsionen im Röntgenbild, Paraprotein (M-Protein) im Serum und Urin, Serumkalziumkonzentration und Hämoglobin (Durie & Salmon, 1975). Später wurde aufgrund der moderneren Bildgebungstechniken allerdings anstatt der Läsionen im Röntgenbild die Anzahl der Tumorherde im MRT oder PET-CT eingeführt (Durie 2006). Zwar bleibt das Röntgenverfahren aufgrund niedriger Kosten und hoher

Verfügbarkeit auch nach dem sog. Pariser Schema der Goldstandard (Dimopoulos et al. 2009), doch gewinnen MRT- und PET-CT-Verfahren aufgrund der höheren Sensitivität für extra- und ossäre Tumore zunehmend an Bedeutung bei röntgenologisch scheinbar unauffälligen Patienten (Bannas & Kröger 2012).

Eine wesentlich simplere Einteilung wurde im International Staging System entwickelt, dabei werden ausschließlich β_2 -Microglobulin und Albumin im Serum ermittelt (Greipp et al. 2005). **Tabelle 1** zeigt die beiden Einteilungssysteme zusammen mit dem medianen Überleben der Patienten, die in das jeweilige Stadium eingeteilt wurden.

Tabelle 1. Stadieneinteilung nach Durie & Salmon und dem International Staging System (ISS) mit medianem Überleben nach Greipp et al., 2005.

Stadium & Myelom-Zellmasse (Zellen x $10^{12}/m^2$ Körperoberfläche)	Durie & Salmon 2006	Medianes Überleben (in Monaten)	ISS	Medianes Überleben (in Monaten)
I <0,6	a) Knochenläsionanzahl im MRT/CT: 0-4 b) M-Protein IgG < 50 mg/ml IgA < 30 mg/ml c) Hämoglobin: > 0,1 g/ml d) Serumkalzium $\leq$ 0,12 mg/ml	IA: 62 IB: 22	a) Serumalbumin $\geq$ 3,5 g/dl b) β_2 -Mikroglobulin < 3,5 mg/l	I: 62
II 0,6 - 1,2	Knochenläsionanzahl im MRT/CT: 5-20 weder I noch III zugehörig	IIA: 58 IIB: 34	weder I noch III zugehörig	II: 44
III >1,2	a) Knochenläsionanzahl im MRT/CT: >20 b) M-Protein IgG > 70 mg/ml IgA > 50 mg/ml c) Hämoglobin: < 0,085 g/ml d) Serumkalzium > 0,12 mg/ml	IIIA: 45 IIIB: 24	a) Serumalbumin b) β_2 -Mikroglobulin $\geq$ 5,5 mg/l	III: 29
A = Serumkreatinin < 2 mg/dl ; B = Serumkreatinin > 2 mg/dl				

1.4.5 Therapie

Bislang werden nur symptomatische Formen des Multiplen Myeloms behandelt, für die MGUS und das asymptomatische MM, was dem MM Stadium I nach Durie & Salmon entspricht, werden lediglich regelmäßige Kontrollen empfohlen (Kyle et al. 2010). Die Wahl der Therapie hängt maßgeblich vom Alter und von der Konstitution des Patienten ab (Palumbo & Anderson 2011).

1.4.5.1 Induktionstherapie

Bei Patienten unter 65 Jahren ohne Komorbiditäten lässt die physische Verfassung in der Regel Hochdosis-Chemotherapeutika im Rahmen einer Induktionstherapie vor autologer Stammzelltransplantation (auto-SZT) zu. Bei den Thalidomid (T)-basierten Therapien ist eine Kombination mit Dexamethason (TD) einer der vielversprechendsten Ansätze, zumal die TD-Therapie nachweisbar bessere Ergebnisse erzielt als Dexamethason allein (Rajkumar et al. 2006). Zusätzlich zu dieser Standardtherapie können wirkungsvolle Zytostatika wie Cyclophosphamide (CTD) (Morgan et al. 2012) und Proteasom-Inhibitoren wie Bortezomib (BTD) gegeben werden (Morgan & Davies 2013). Neben Thalidomid bilden auch Lenalidomid und Bortezomib Therapiegrundsätze als Induktionstherapie (Palumbo & Cerrato 2013). Beide können entweder nur einzeln mit Dexamethason, mit anderen Zytostatika oder gemeinsam mit Dexamethason kombiniert werden (Richardson et al. 2010). Auf eine dieser genannten Induktionstherapien folgt idealerweise eine Hochdosis-Chemotherapie mit Melphalan und, wenn möglich, eine auto-SZT. Das Immunsystem soll durch Letztere rekonstituiert werden.

Bei Patienten über 65 Jahren oder jüngeren mit Komorbiditäten ist eine SZT dagegen meist nicht möglich. In diesen Fällen wird eine Induktionstherapie mit Melphalan und Prednison entweder mit Thalidomid (MPT) (Morgan & Davies 2013) oder mit Bortezomib (MPB) (Palumbo et al. 2009; Mateos et al. 2010) empfohlen.

Generell spricht die schnelle und sehr gute Wirksamkeit für Dreifachmedikationen, so dass nun auch an der Gabe von vier Medikamenten geforscht wird (Kumar et al. 2012). Zu beachten ist bei Mehrfachmedikationen allerdings stets das richtige Verhältnis zwischen hoher Wirksamkeit und toxizitätsbedingten Nebenwirkungen (Stewart et al. 2009).

1.4.5.2 Stammzelltransplantation

Falls es die Konstitution, das Alter und die Komorbiditäten des Patienten zulassen, wird im Anschluss an eine Induktionstherapie mit limitierter Zyklusanzahl (meist 4-6 Zyklen) eine autologe Stammzelltransplantation vorgenommen (Stewart et al. 2009; Chou 2012). Dass eine auto-SZT das progressionsfreie und Gesamtüberleben gegenüber einer konventionellen Chemotherapie bei Patienten mit MM verbessert, ist schon länger bekannt (Attal et al. 1996; Child et al. 2003). Ob allerdings eine Tandem-SZT, also entweder zwei autologe SZTs (auto-auto) oder erst eine autologe, dann eine allogene SZT (auto-allo), wirksamer sind als eine SZT allein, ist bisher umstritten.

Einige ältere Studien stellten einen Vergleich zwischen einer Therapie mit einer einzelnen auto-SZT und zwei aufeinanderfolgenden auto-SZTs (Tandem) bei MM-Patienten an, der nicht selten einen Vorteil der Tandem-Methode zeigte. Eine Untersuchung verzeichnete bei auto-auto-SZT ein besseres Gesamtüberleben, aber schlechtere Antwortraten (Attal et al. 2003), eine andere zwar auch einen Vorteil der Tandem-SZT, aber gegenteiliger Natur (Kumar et al. 2009). Letztere Beobachtung, also kein signifikant besseres Gesamtüberleben, aber bessere Antwortraten gegenüber einzelner SZT, konnte ebenfalls eine andere Studie unterstützen (Cavo et al. 2007).

Neuere Meta-Analysen kommen allerdings zu keinen eindeutigen Ergebnissen (Barlogie et al. 2010). Die Ansicht, dass die neusten Hochdosis-Induktionstherapien mittlerweile genauso hohe Antwortraten liefern wie eine Tandem auto-auto-SZT und deren Einsatzvorteil daher fraglich ist, wird zur Zeit von vielen geteilt (Palumbo & Cerrato 2013; Palumbo & Anderson 2011; Stewart et al. 2009).

Der zweite Ansatz, eine Tandem auto-allo-SZT, wird bisher ebenfalls als Alternative zur auto-auto-SZT diskutiert, ist jedoch noch wenig erforscht. Vorteile einer allogenen SZT sind die Möglichkeit einer Heilung, da keine Tumorzellen reimplantiert werden können wie bei einer auto-SZT, und das Auftreten eines Graft-versus-Myeloma-Effekts, durch den Tumorzellen des Empfängers als fremd erkannt und effizient bekämpft werden (Mehta & Singhal 1998). Die Ergebnisse bisheriger Studien zeigen allerdings keine signifikanten Unterschiede im Gesamt- und progressionsfreien Überleben gegenüber einer auto-auto-SZT (Wirk et al. 2013; Garban et al. 2006). Trotzdem gibt es auch hier kontroverse Resultate, so ermittelte z.B. eine andere Studie

Vorteile der allogenen SZT im Gesamt- und progressionsfreien Überleben (Bruno et al. 2007).

Obwohl die Vorteile der Anwendung einer Tandem-SZT, auto-auto oder auto-allo, noch nicht ganz geklärt sind, wird diese Art der Therapie für Patienten empfohlen, die nach der ersten auto-SZT noch kein befriedigendes Ansprechen zeigen (Attal et al. 2003; Cavo et al. 2007).

1.5 Fragestellung

Wie eingangs erwähnt, birgt die Immuntherapie großes Potenzial zur Behandlung von Krebserkrankungen. Bevor allerdings solche Behandlungsmethoden eingesetzt werden können, muss die Expressionshäufigkeit und Immunogenität von Zielstrukturen wie den CT-Antigenen untersucht werden.

In dem Zusammenhang ist es von Interesse, wie sich die spontane Antikörperbildung im Verlauf einer konventionellen, auf Stammzelltransplantation (SZT) basierten Therapie verhält. Im Rahmen einer Studie des universitären Cancer Center Hamburg (UCCH), die dieser Arbeit zugrunde liegt, durchlaufen Patienten mit Multiplem Myelom entweder eine Tandem auto-auto-SZT oder Tandem auto-allo-SZT. So lässt sich untersuchen, wie sich die humorale Immunantwort und die CT-Antigenexpression nach der zweiten autologen bzw. allogenen SZT entwickeln und ob man Unterschiede in den beiden Therapieansätzen festmachen kann. Auf die erste, autologe SZT wird dagegen nicht weiter eingegangen.

Ziel dieser Arbeit ist es also, die Expression von und die spontane humorale Immunantwort gegen verschiedene CT-Antigene bei Patienten mit Multiplem Myelom zu untersuchen. Diese zwei Parameter werden in den beiden Patientengruppen (auto-allo-SZT und auto-auto-SZT) zu mehreren Zeitpunkten im Therapieverlauf untersucht. So können die CT-Antigene in ihrer Rolle sowohl für konventionelle Therapien (SZT), als auch für neue Therapieansätze (Immuntherapie) beleuchtet werden.

Konkrete Fragestellungen lauten dabei wie folgt:

- a) Wie häufig exprimieren Patienten mit MM CT-Antigene?
- b) Wie häufig bildet sich bei Patienten mit MM eine humorale Immunantwort gegen CT-Antigene aus?

- c) Wie verändern sich die CT-Antigenexpression und die humorale Immunantwort von Patienten mit MM während einer Therapie mit auto-auto-SZT oder auto-allo-SZT?
- d) Welche Bereiche einzelner CT-Antigene sind für die Immunogenität verantwortlich?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenmaterial

Zur Messung der humoralen Immunantwort gegen Cancer-Testis-Antigene mittels IgG-ELISA wurden größtenteils Knochenmarksplasma-Proben (KM-Proben) verwendet. Da zu manchen Abnahmezeitpunkten bei einigen Patienten allerdings ausschließlich Blutplasma-Proben (BP-Proben) vorlagen, wurden diese anstelle von KM-Proben benutzt, um ein vollständigeres Bild über den zeitlichen Verlauf zu geben. Die Antikörpertiter im KM-Plasma sind dabei denen im Blutplasma ähnlich bzw. vergleichbar (Luetkens et al. 2014). Für die Untersuchung der CT-Antigenexpression mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden ebenfalls KM-Proben der Patienten benutzt.

Die schriftlichen Einverständniserklärungen für die durchgeführten Versuche wurden im Rahmen der dieser Arbeit übergeordneten Studie „Autolog-allogene Tandem-Stammzelltransplantation und Erhaltungstherapie mit Thalidomid und Sponderlymphozyten-Infusion für Patienten mit MM und einem Alter von 60 Jahren und jünger: Eine Phase II-Studie“ (Registrierungsnr. 00777998), die von Herrn Prof. Kröger am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf geleitet wird, eingeholt (siehe Anhang). Gleiches gilt für die Genehmigung der Ethikkommission der Ärztekammer Hamburg.

2.1.2 Chemikalien

2.1.2.1 ELISA

Tabelle 2. Reagenzien ELISA

Material	Hersteller	Katalognummer
Magermilchpulver	Spinnrad, Bad Segeberg (D)	2231018
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) 1x	Invitrogen, Karlsruhe (D)	14190-094
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)	26628-22-8

Tabelle 3. Fortsetzung

Material	Hersteller	Katalognummer
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)	P1379
Para-Nitrophenylphosphat (PNPP-Substrat)	Southern Biotech, Birmingham (USA)	0201-01
Goat-Anti-Human IgG-AP	Southern Biotech, Birmingham (USA)	2040-04
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)	63068
Diethanolamin	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)	D8885
Salzsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)	N076.1

Tabelle 4. CT- Proteine

Protein	Hersteller	Katalognummer	verwendete Konzentration(nM)
NY-ESO-1	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. med. Lütken	-	100
SSX-1	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Templin	-	200
SSX-2	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. med. Lütken	-	100
SSX-3	s.o.	-	200
SSX-4	s.o.	-	200
SSX-5	s.o.	-	200
SSX-7	s.o.	-	200
MAGE-A1	s.o.	-	100
MAGE-A2	s.o.	-	100
MAGE-A3	s.o.	-	100
MAGE-A4	s.o.	-	100
MAGE-A6	s.o.	-	100
MAGE-A8	s.o.	-	100
MAGE-A10	s.o.	-	100
MAGE-A12	s.o.	-	100
MAGE-B1	s.o.	-	200
MAGE-B3	s.o.	-	100
MAGE-C1	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Alessandra Curioni, Universitätsspital Zürich, Klinik für Onkologie	-	200
MAGE-C2	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. med. Lütken	-	200
FMR1NB	s.o.	-	200
DKK1	Abnova, Heidelberg (D)	H00022943-P01	34,5
AKAP4	Abnova, Heidelberg (D)	H00008852-Q01	10,5
GST	Abnova, Heidelberg (D)	P0001	200
Tetanus (TT)	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. med. Lütken	-	6,7

Tabelle 5. Einzelpeptide des Epitopmappings für MAGE-C2, MAGE-B3, sowie NY-ESO-1. Verwendet wurden überlappende 20mer Peptide, die die gesamte Aminosäuresequenz der getesteten Proteine umfassen.

NY-ESO-1 Peptides & Elephants, Potsdam (D)

Name	#	Sequenz
NY-ESO-1 1	1-20	mqaegrstggstgdadgpgg
NY-ESO-1 2	11-30	stgdadgpggpgipdgpggn
NY-ESO-1 3	21-40	pgipdgpggnaggpgeagat
NY-ESO-1 4	31-50	aggpgeagatggrgprgaga
NY-ESO-1 5	41-60	ggrgprgagaaarasgpggga
NY-ESO-1 6	51-70	arasgpgggaprgphggaas
NY-ESO-1 7	61-80	prgphggaasglnccrcga
NY-ESO-1 8	71-90	glnccrcgargpesrllef
NY-ESO-1 9	81-100	rgpesrllefylampfatpm
NY-ESO-1 10	91-110	ylampfatpmeaelarrsla
NY-ESO-1 11	101-120	eaelarrslaqdaplpvpg
NY-ESO-1 12	111-130	qdaplpvpgvllkeftvsg
NY-ESO-1 13	121-140	vllkeftvsgniltirtaa
NY-ESO-1 14	131-150	niltirtaadhrlqlqlsis
NY-ESO-1 15	141-160	dhrqlqlsissclqqlslm
NY-ESO-1 16	151-170	sclqqlslmwitqclpfvf
NY-ESO-1 17	161-180	witqclpfvflaqpssgqrr

MAGE-A3 Ludwig Institut for Cancer Research, NY, USA)

Name	#	Sequenz
MAGE-A3 1	1-20	mpleqrsqhckpeeglearg
MAGE-A3 2	11-30	kpeegleargealglvgaqa
MAGE-A3 3	21-40	ealglvgaqapateeqeaaas
MAGE-A3 4	31-50	pateeqeaaassstlvevtl
MAGE-A3 5	41-60	ssstlvevtlgevpaaespd
MAGE-A3 6	51-70	gevpaaespppqspqgass
MAGE-A3 7	61-80	ppqspqgasslpttmnyplw
MAGE-A3 8	71-90	lpttmnyplwvsqsyedssnq
MAGE-A3 9	81-100	sqsyedssnqeegpstfpd
MAGE-A3 10	91-110	eeegpstfpdlesefqaals
MAGE-A3 11	101-120	lesefqaalsrkvaelvhl
MAGE-A3 12	111-130	rkvaelvhlilkylrarepv
MAGE-A3 13	121-140	ilkylrarepvtkaelgsvv
MAGE-A3 14	131-150	tkaelgsvvgnwqyffpvi
MAGE-A3 15	141-160	gnwqyffpvijskassslql
MAGE-A3 16	151-170	fskassslqlvfgielmevd
MAGE-A3 17	161-180	vfgielmevdipghlyifat
MAGE-A3 18	171-190	pighlyifatclglsydgll
MAGE-A3 19	181-200	clglsydgllgdhnpkag
MAGE-A3 20	191-210	gdhnpkagllilvliiaa
MAGE-A3 21	201-220	lilvliiaaregdcapeek
MAGE-A3 22	211-230	regdcapeekiweelsvlev
MAGE-A3 23	221-240	iweelsvlevfegredsilg
MAGE-A3 24	231-250	fegredsilgdpkklthqf
MAGE-A3 25	241-260	dpkklthqfvenyleyryq
MAGE-A3 26	251-270	vqenyleyryqpsdpacye
MAGE-A3 27	261-280	vpgsdpacyeflwgrpralvets
MAGE-A3 28	271-290	flwgrpralvetsykvvlhmm
MAGE-A3 29	281-300	tsykvvlhmmvkisggphis
MAGE-A3 30	291-314	vkisggphispylhwviregee

MAGE-B3 Peptides & Elephants, Potsdam (D)

Name	#	Sequenz
MAGE-B3 1	1-20	mprgqkstlharekrqqtgr
MAGE-B3 2	11-30	arekrqqtgrqtdhqqaqi
MAGE-B3 3	21-40	qtqdhqqaqiatnkkkvsf
MAGE-B3 4	31-50	tatnkkkvsfssplilgati
MAGE-B3 5	41-60	ssplilgatiqkksagrsrs
MAGE-B3 6	51-70	qkksagrsrsalkkpqrals
MAGE-B3 7	61-80	alkkpqralssttsvdvsyk
MAGE-B3 8	71-90	tttsvdvsykyksgansk
MAGE-B3 9	81-100	ksykganskiekkqsfsgql
MAGE-B3 10	91-110	ekksqsfsgqlsstvqsrtdp
MAGE-B3 11	101-120	sstvsrtdplimktnmlvq

MAGE-B3 (Fortsetzung)

Name	#	Sequenz
MAGE-B3 12	111-130	limktnmlvqfilmemykmkk
MAGE-B3 13	121-140	flmemykmkkpimkadmiki
MAGE-B3 14	131-150	pimkadmikivqkshkncfp
MAGE-B3 15	141-160	vqkshkncfpeilkkasfnm
MAGE-B3 16	151-170	eilkkasfnmefvfgvdlkk
MAGE-B3 17	161-180	evvfgvdlkkvdskdsyvl
MAGE-B3 18	171-190	vdskdsyvlvskmdlpnng
MAGE-B3 19	181-200	vskmdlpnngvtvtrgrgfpk
MAGE-B3 20	191-210	vtvtrgrgfpktgllnlvg
MAGE-B3 21	201-220	tgllnlvgvfmkngcate
MAGE-B3 22	211-230	ifmkngcateekiweeflnkm
MAGE-B3 23	221-240	ekiweeflnkmriydgkhhfi
MAGE-B3 24	231-250	riydgkhhfifgeprklitq
MAGE-B3 25	241-260	fgeprklitqdlvklkyley
MAGE-B3 26	251-270	dlvklkyleyrvqvpnspar
MAGE-B3 27	261-280	rvqvpnsparparyeflwgrprah
MAGE-B3 28	271-290	yeflwgrprahetskmkvle
MAGE-B3 29	281-300	aetskmkvlefwakvntktp
MAGE-B3 30	291-310	fwakvntktpsafqfwyeea
MAGE-B3 31	301-320	safqfwyeealrdeervqsa
MAGE-B3 32	311-330	lrdeervqsaamlndgsssa
MAGE-B3 33	321-340	aamlndgssamgrkcskaka
MAGE-B3 34	331-350	mgrkcskakasssssha

MAGE-C2 Iris Biotech, Marktredwitz (D)

Name	#	Sequenz
MAGE-C2 1	1-20	mppvpvgypfrnvdndsptsv
MAGE-C2 2	11-30	nvdndsptsvledwvdaqh
MAGE-C2 3	21-40	eledwdaqhtdeeeeeeas
MAGE-C2 4	31-50	ptdeeeeeeassstlylvf
MAGE-C2 5	41-60	sasstlylvfsspsfstss
MAGE-C2 6	51-70	spssfstsssilggpeeeee
MAGE-C2 7	61-80	ilggpeeeeevpsgvipnlt
MAGE-C2 8	71-90	vpsgvipnltespssppqg
MAGE-C2 9	81-100	esipssppqgppqgspqsp
MAGE-C2 10	91-110	ppqqspqspssccsfsws
MAGE-C2 11	101-120	ssccsfswsssfseesssqk
MAGE-C2 12	111-130	sfseesssqkgedtgcqgl
MAGE-C2 13	121-140	gedtgcqglpdsessfyt
MAGE-C2 14	131-150	pdsessfytldkvaelve
MAGE-C2 15	141-160	ldkvaelveflilkyeaae
MAGE-C2 16	151-170	flilkyeaaepvtaeamlmi
MAGE-C2 17	161-180	pvtaeamlmivikydyfpv
MAGE-C2 18	171-190	vikydyfpvilkraefme
MAGE-C2 19	181-200	ilkraefmellglaliev
MAGE-C2 20	191-210	llglalievghpvhcfvan
MAGE-C2 21	201-220	ghpvhcfantvgltdegds
MAGE-C2 22	211-230	tvgltdegsddegmpensll
MAGE-C2 23	221-240	degmpensllilsvifik
MAGE-C2 24	231-250	ililsvifikncaseeviw
MAGE-C2 25	241-260	ncaseeviwvlnavgvya
MAGE-C2 26	251-270	evlnavgvyaagrehfvygep
MAGE-C2 27	261-280	grehfvygeprelltkvwvq
MAGE-C2 28	271-290	relltkvwvqghyleyrevp
MAGE-C2 29	281-300	ghyleyrevhassppyyefl
MAGE-C2 30	291-310	hssppyyeflwgprahsesi
MAGE-C2 31	301-320	wgprahsesikkkvleflak
MAGE-C2 32	311-330	kkkvleflaklntvpssfp
MAGE-C2 33	321-340	lntvpssfpsswykdalkdv
MAGE-C2 34	331-350	swykdalkdveervqatidt
MAGE-C2 35	341-360	eervqatidtaddatvmase
MAGE-C2 36	351-370	addatvmaseslvmssnvsv
MAGE-C2 37	361-373	slvmssnvsvfse

2.1.2.2 PCR

Tabelle 6. PCR-Reagenzien

Material	Hersteller	Katalognummer
Magnesiumchlorid-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe (D)	4311806
10x PCR Gold Puffer	Invitrogen, Karlsruhe (D)	4311806
AmpliTaq Gold DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe (D)	4311806
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Invitrogen, Karlsruhe (D)	10297-018
Agarose	Lonza, Rockland (USA)	50004
50x Tris-Acetate-EDTA (TAE) Puffer	Invitrogen, Karlsruhe (D)	24710-030
Fermentas 6x Orange DNA Ladepuffer	Thermo Fisher Scientific Schwerte (D)	R0631
DNA-Leiter Mix Orange G	Peqlab, Erlangen (D)	25-2390
Ethidiumbromid	Invitrogen, Karlsruhe (D)	15585-011
10x RT Puffer	Promega, Madison (USA)	A356A
Ribonuklease Inhibitor (rRNasin)	Promega, Madison (USA)	N251A
AMV Reverse Transkriptase	Promega, Madison (USA)	M510A
Random Primer	Invitrogen, Karlsruhe (D)	58875
PCR Wasser	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)	W4502

Tabelle 7. CT-antigen-spezifische Primer bezogen bei Eurofins, Ebersberg (D)

Primer	Sequenz (5' -> 3')
MAGE-A1 fwd	TTTCCATTCTGAGGGACGGC (20)
MAGE-A1 rev	GGACTCTGGGGAGGATCTGT (20)
MAGE-A2 fwd	CCAAGCATCCAGGTGGAGAG (20)
MAGE-A2 rev	TAGTCGAGAAGCTGGAGGCT (20)
MAGE-A3 fwd	GAAGCCGGCCCAGGCTCG (18)
MAGE-A3 rev	GGAGTCCTCATAGGATTGGCT (21)
MAGE-A10 fwd	GTCAACACAGGGAACCCCTC (20)
MAGE-A10 rev	AGGCCCTGTGTCTCACTTTG (20)
MAGE-B3 fwd	CGGAGGACCTTGATCTGAGC (20)
MAGE-B3 rev	GCAGAAGGGCAGGTGATACA (20)
AKAP4 fwd	ACGTGCCCATGCTCTACTCT (20)
AKAP4 rev	CACAGGCAACTGCTCAAGTG (20)
GAPDH fwd	TGATGACATCAAGAAGGTGG (20)
GAPDH rev	TTTCTTACTCCTTGGAGGCC (20)
NY-ESO-1 fwd	CCGGCAACATACTGACTATCC (21)
NY-ESO-1 rev	ATCAACAGGGAAAGCTGCTG (20)
MAGE-C1 fwd	CGGAGGGAGGAGACTTA (17)
MAGE-C1 rev	TTAAGGTGGTGTCTTAGG (18)
MAGE-C2 fwd	CGGATCGAAGGCATTTGTGAG (21)
MAGE-C2 rev	GTGAACTCACGGGCTCTCTTGAG (23)
SSX-2 fwd	GTGCTCAAATACCAGAGAAGATC (23)
SSX-2 rev	TTTTGGGTCCAGATCTCTCGTG (22)

2.1.3 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Kühlschrank mit Gefrierfach	Liebherr, Biberach an der Riss (D)
Vortex-Mixer (Genie 2)	Bender und Hobein, Zürich (Schweiz)
Waage (Pioneer)	Ohaus, Parsippany NJ (USA)
Zentrifuge (Centrifuge 5418)	Eppendorf, Hamburg (D)
Mikroplatten-Washer (Columbus Pro)	Tecan, Männedorf (Schweiz)
ELISA-Reader (Sunrise)	Tecan, Männedorf (Schweiz)
pH-Meter	WTW, Weilheim (D)
Mastercycler	Eppendorf, Hamburg (D)
Mikrowelle R-2V26	Sharp, Hamburg (D)
Gelelektrophorese-Netzteil (PowerPac300)	Bio-Rad, München (D)
Elektrophoresekammer (DNA Sub Cell)	Bio-Rad, München (D)
Gelschlitten	Bio-Rad, München (D)
Gelkämme 20er	Bio-Rad, München (D)
Geldokumentationssystem (E-Box)	Peqlab, Erlangen (D)
Bio-Fotometer	Eppendorf, Hamburg (D)

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Pipette	0,5 – 10 µl 10 – 100 µl 100 – 1000 µl Eppendorf, Hamburg (D)
Pipettenspitzen	10 µl 100 µl 1000 µl Nerbe-plus, Winsen/Luhe (D)
Multi-Step-Pipette (Multipette)	Eppendorf, Hamburg (D)
Pipettenspitzen (Multi-Step-Pipette)	Eppendorf, Hamburg (D)
	0,1 ml 0,2 ml 2,5 ml 10 ml
Multikanalpipette	10-100 µl Eppendorf, Hamburg (D)
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann, Eberstadt (D)
Pipetten Falcon (Pipettierhilfe) 10 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes (USA)
Safe-Lock-Tubes 2 ml	Eppendorf, Hamburg (D)
96 Well Platte	Corning, New York (USA)
Abdichtungsfolie	R&D Systems, Minneapolis (USA)
PCR Soft Tubes 0,5 ml	Biozym, Wien (Österreich)
Multiply®-µStrip 0,2 ml Kette	Sarstedt, Nümbrecht (D)
8er Deckelkette	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Zell-Lysat Homogenisator (QIAshredder)	Qiagen, Hilden (D)
RNA Isolationskit (RNeasy Mini Kit)	Qiagen, Hilden (D)

2.1.5 Studiendesign

Diese Arbeit wurde begleitend zu der klinischen Studie „Autolog-allogene Tandem-Stammzelltransplantation und Erhaltungstherapie mit Thalidomid und Spenderlymphozyten-Infusion für Patienten mit MM und einem Alter von 60 Jahren und jünger: Eine Phase II-Studie“ („Tandem auto-allo-SZT in MM“) verfasst, die am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in der interdisziplinären Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation durchgeführt wurde. Ziel dieser prospektiven Multi-Center-Studie ist es, die Verträglichkeit und Effektivität der Tandem auto-allo-Stammzelltransplantation zu vergleichen mit der Tandem auto-auto-SZT bei Patienten mit Multiplem Myelom. Grundgedanke dabei ist, die bisherige Standardtherapie (Hochdosischemotherapie gefolgt von autologer SZT für Patienten unter 65 Jahren) aufgrund der hohen Rückfallrate zu optimieren und z.B. das progressionsfreie Überleben zu verlängern. Das Prinzip ist, den Patienten nach einer autologen SZT wenn möglich zusätzlich eine zweite, allogene SZT zu verabreichen (Tandem auto-allo-SZT). Wenn kein fremder Spender gefunden werden konnte oder der Patient eine allogene SZT ablehnte, wurde als zweite eine weitere autologe SZT vorgenommen (Tandem auto-auto-SZT).

Der genaue Behandlungsverlauf ist in **Abbildung 5** dargestellt. Als Einschlusskriterium wurde das vorherige Durchlaufen von maximal 8 Chemotherapiezyklen im Rahmen einer herkömmlichen Therapie (Induktionschemotherapie) herangezogen. Nach der Stammzellmobilisierung mit vorbereitender Hochdosis-Chemotherapie unterzogen sich alle Patienten einer autologen Stammzelltransplantation. Ungefähr zwei Monate später wurde dann, wenn möglich, eine allogene oder ansonsten autologe SZT durchgeführt. Eine Folgetherapie zur Stärkung des Anti-Myeloma-Effekts wurde mit Thalidomid und, nach allogener SZT, Donor-Lymphozyten-Infusion festgesetzt.

Im Rahmen dieser Studie wurde dem Großteil der Patienten zu mehreren Zeitpunkten Knochenmark und peripheres Blut entnommen, wodurch longitudinale Analysen der CT-spezifischen Immunantworten und Expression durchgeführt werden konnten. Um den zeitlichen Verlauf der CT-Antigenexpression bzw. humoralen Immunantwort aufzeigen zu können, wurden für diese Arbeit vier Zeitpunkte vor der zweiten SZT (prä-4, prä-3, prä-2, prä-1) und sieben Zeitpunkte danach (1-2M, 4M, 6M, 12M, 18M, 24M, 36M; M=Monate nach zweiter SZT) gewählt, siehe **Abbildung 5**. Die Zuordnung der

Proben erfolgte mit einem Toleranzintervall von bis zu drei Monaten bei den späteren Zeitpunkten.

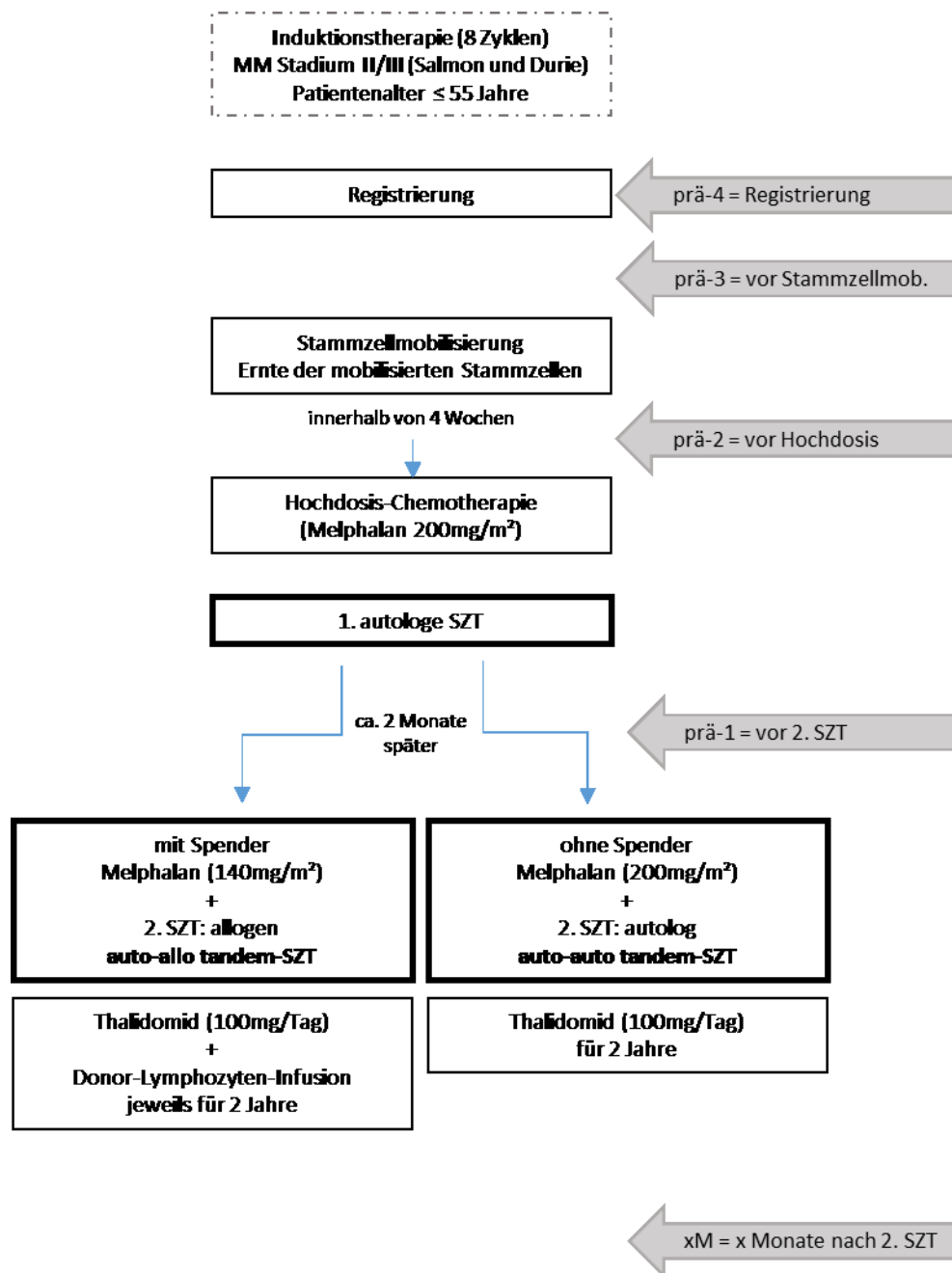


Abbildung 5. Studiendesign der Studie „Tandem auto-allo-SZT in MM“ im Verlaufsdiagramm.

2.2 Methoden

2.2.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA wird generell als Nachweisverfahren für humorale Immunantworten verwendet. Dabei binden die gesuchten Antikörper im Patientenplasma an vorgegebene Antigene. An diese Antigen-Antikörper-Komplexe binden nun Detektionsantikörper, an welche ein Enzym gekoppelt ist. Ein spezifisches Substrat wird anschließend hinzugegeben und von dem Enzym zu einem chromogenen Produkt umgesetzt wird. So kann man von der Stärke des Farbumschlages bzw. der Lichtabsorption Rückschlüsse auf die Menge des zu untersuchenden Antikörpers ziehen.

Zuerst werden 96 Well-Platten mit je 25 µl der in Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS) 1x verdünnten verschiedenen Cancer-Testis- Proteinantigene befüllt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Bei diesem Beschichtungsvorgang wird das Protein durch unspezifische Anziehungskräfte an den Polystyroluntergrund gebunden. Um die eingesetzten Stoffmengen direkt vergleichbar zu machen, sind alle Konzentrationen in Molar angegeben. Das Konzentrationsspektrum der verwendeten CT-Proteine umfasst 10,5-200 nM (detaillierte Auflistung siehe **Tabelle 4**). Am nächsten Tag werden die Platten mit Hilfe des Mikrotiterplatten-Waschgeräts sowohl zweimal mit D-PBS-Tween20 (0,05% Tween20 in 1x PBS) als auch einmal mit D-PBS (1x) gewaschen, wobei jeweils 100-150 µl pro Well eingesetzt werden. Dieser Waschvorgang dient dazu, überschüssiges Antigen, das nicht an den Plattenboden binden konnte, zu entfernen. Eventuell freigebliebene Bindungsstellen auf dem Kunststoffuntergrund werden im Anschluss mit einem indifferenten Protein blockiert, um die Bindung unerwünschter Moleküle und später falsch-positiver Ergebnisse zu verhindern. Hierzu wird ein Blockpuffer eingesetzt (Zusammensetzung s. u.). Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur werden die Mikrotiterplatten erneut gewaschen. Anschließend werden je 30 µl Knochenmark- bzw. Blutplasmaverdünnung (1:100 in Blockpuffer) pro Well aufgetragen, um die Bindung der zu untersuchenden Antikörper an das entsprechende Antigen zu ermöglichen. Je höher der Antikörpertiter gegen ein bestimmtes CT-Antigen, desto stärker ist später der nachweisbare Farbumschlag.

Nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur mit anschließendem Waschvorgang wird ein zweiter Antikörper, der Detektionsantikörper (Goat-Anti-

Human IgG-AP von Southern Biotech, Birmingham (USA)), mit einer Konzentration von 0,3 µg/ml in Blockpuffer dazugegeben. Davon werden 30 µl pro Well aufgetragen. Der Detektionsantikörper bindet spezifisch an das konstante Fragment (Fc-Teil) des Antikörpers aus dem Patientenplasma und ist mit einem Enzym konjugiert, in diesem Fall alkalischer Phosphatase. Die Inkubation bei Raumtemperatur erfolgt für eine Stunde. Durch das anschließende Waschen werden Reste des zweiten Antikörpers entfernt. Um nun eine Reaktion des Enzyms zu bewirken, wird eine Lösung von 1 mg/ml Para-Nitrophenylphosphat (PNPP) im dazugehörigen PNPP-Puffer (Zusammensetzung s.u.) dazugegeben. Durch die Umsetzung von PNPP durch die alkalische Phosphatase in Para-Nitrophenylat färbt sich die zunächst durchsichtige Lösung gelblich. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wird eine zeitnahe Messung bei 405 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) mit dem ELISA Reader durchgeführt.

Puffer-Zusammensetzung:

PBS-Tween20:	0,05% Tween20 in 1x PBS
Blockpuffer:	5% Magermilchpulver in 1x D-PBS 0,02% Natriumazidlösung (10%)
PNPP-Puffer:	0,5 mM Magnesiumchlorid in dest. Wasser 1 M Diethanolamin in dest. Wasser pH-Wert 9,8

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit Hilfe des Programms Excel. Dass die Versuchsdurchführung per se funktioniert, beweist eine Positivkontrolle, in diesem Falle die Reaktion auf Tetanustoxin. Dies gründet auf der Annahme, dass jeder Mensch gegen Tetanus geimpft und somit stets ein Antikörpertiter gegen dieses Antigen nachweisbar ist. Um umgekehrt falsch-positive Ergebnisse herausfiltern zu können, dient die Gluthation-S-Transferase (GST) als Negativkontrolle. GST wird im selben System, hier dem Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*), exprimiert wie die anderen verwendeten Antigene, und löst normalerweise keine Immunantwort aus. Sollten dennoch Reaktionen mit GST zu beobachten sein, spricht das dafür, dass bakterielle Proteine in dem in *E. coli* produzierten Antigen verblieben sind und diese zu falsch positiven Ergebnissen führen können.

Als positiv für eine spezifische humorale Immunantwort gegen ein CT-Antigen werden Proben gewertet, deren gemessene optische Dichte (OD) sowohl über dem probenspezifischen als auch dem antigenspezifischen Cut-Off-Wert liegen. Letzterer

Wert ergibt sich aus dem Mittelwert der Messungen der gesunden Spender für jedes einzelne Antigen multipliziert mit der dreifachen Standardabweichung. Der probenspezifische Cut-Off-Wert wird für jede gemessene Knochenmarksplasmaprobe einzeln ermittelt. Zunächst wird der Gesamt-Mittelwert aller gemessenen Werte (für alle Antigene und alle Proben) errechnet. Anschließend wird aus allen Werten innerhalb einer Probe, die den Gesamtmittelwert nicht überschreiten, ein Mittelwert errechnet und mit dem Faktor 1,5 multipliziert.

Antigenspezifischer Cut Off:

Mittelwert Antigen A (alle Donoren auf Antigen A) x (3x Standardabweichung)

Probenspezifischer Cut-Off:

Mittelwert (alle Werte einer Probe < Gesamtmittelwert) x1,5

2.2.2 Epitop-Mapping

Die Epitop-Kartierung (engl. *epitop mapping*) dient der Identifizierung immundominanter, linearer Peptidepitope eines Proteins durch, in diesem Fall, Antikörper. Hierfür werden 20mer Peptide verwendet, mit einer Überlappung von 10 Aminosäureresten, um möglichst sämtliche Epitope des jeweiligen Proteins zu erfassen. Durch Reaktion mit Antikörpern aus dem Plasma der Patienten, kann erkannt werden, welche Epitope in dem Antigen genau die Antikörperbindung hervorrufen.

Untersucht wurden vier der 22 CT-Antigene, NY-ESO-1, MAGE-A3, MAGE-B3 und MAGE-C2 (**Tabelle 5**). Der Versuchsablauf läuft entsprechend des oben beschriebenen IgG-ELISAs ab, allerdings wurden die Platten nicht mit vollständigen CT-Proteinen, sondern mit den jeweiligen Einzelpeptiden in einer Konzentration von 20 µM beschichtet. Um auch schwächere Immunantworten bzw. IgG-Titer zu detektieren, wurde im Allgemeinen eine 1:10 Verdünnung der KM-Proben eingesetzt. Nur bei einem CT-Antigen, MAGE-A3, waren die OD-Werte hoch genug, dass eine 1:100 Verdünnung verwendet und so Material eingespart werden konnte.

2.2.3 Reverse Transkriptase – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Ziel der RT-PCR ist es, die Expression eines bestimmten Proteins in einer Zelle nachzuweisen. Dabei macht man sich zunutze, dass von einem exprimierten Protein

stets die mRNA in einer Zelle vorliegt. Diese wird mit Hilfe eines Enzyms, der reversen Transkriptase, in cDNA (copy DNA) umgeschrieben. Diese genaue Nachbildung der mRNA auf DNA-Ebene kann nun mit der herkömmlichen PCR-Methode amplifiziert werden. Nachgewiesen wird das PCR-Produkt mit Hilfe der Gelelektrophorese.

2.2.3.1 RNA Isolierung

Mit Hilfe des RNeasy-Kits von Qiagen wurde die RNA genau nach Herstellerangaben aus dem Knochenmarksplasma der Patienten isoliert. Dabei wird die RNA nach Lyse des Zellmaterials durch mehrere Wasch- und Zentrifugievorgänge mit verschiedenen Puffern auf einer Säule aufgereinigt.

2.2.3.2 Reverse Transkription

Ein PCR Ansatz, in dem 2 µg RNA pro 20 µl Ansatz umgeschrieben werden, wird wie folgt hergestellt:

Reagenz	Hersteller	Katalognummer
Magnesiumchlorid-Lösung (5 mM)	Invitrogen, Karlsruhe (D)	4311806
10x Puffer (1:10)	Promega, Madison (USA)	A356A
Desoxyribonukleotide / dNTPs (0,25 mM)	Invitrogen, Karlsruhe (D)	10297-018
Ribonuklease Inhibitor / rRNasin (1 U/µl)	Promega, Madison (USA)	N251A
AMV Reverse Transkriptase (0,75 U/µl)	Promega, Madison (USA)	M510A
Random Primer (0,15 µg/µl)	Invitrogen, Karlsruhe (D)	58875

Die enzymatische Reaktion erfolgt im Mastercycler für 45 min bei 42°C und wird terminiert durch eine anschließende Inkubation bei 95°C für 5 Minuten. Das Produkt der reversen Transkription, die cDNA, wird mit PCR-Wasser 1:4 verdünnt. Die Lagerung erfolgt bei -20°C.

2.2.3.3 PCR

In diesem Schritt soll nun ausgehend von der zuvor hergestellten cDNA die Expression bestimmter mRNAs nachgewiesen werden. In diesem Fall handelt es sich um 10 Cancer-Testis-Antigene (siehe **Tabelle 7**) sowie das House-Keeping-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), welches als Positivkontrolle

dient. GAPDH kodiert für das gleichnamige Protein, welches als Enzym der Glykolyse lebensnotwendig und somit ubiquitär exprimiert ist, so dass es in einer PCR stets nachweisbar sein sollte. Da in Testis-Gewebe alle CT-Antigene exprimiert werden, dient Testis-cDNA als weitere Positivkontrolle. Als Negativ-Kontrolle wird Wasser statt cDNA verwendet.

Nachdem die cDNA aufgetaut ist, wird der 25 µl PCR-Ansatz, mit dem 100 ng cDNA umgesetzt werden, wie folgt angesetzt:

Reagenz	Hersteller	Katalognummer
PCR Wasser (12,3 µl)	Sigma-Aldrich, Steinheim (D)	W4502
Magnesiumchlorid-Lösung (2 mM)	Invitrogen, Karlsruhe (D)	4311806
10x PCR Gold Puffer (1:10)	Invitrogen, Karlsruhe (D)	4311806
Desoxyribonukleotide / dNTPs (0,25 mM)	Invitrogen, Karlsruhe (D)	10297-018
fwd + rev Primer (0,16 pmol/µl)	Eurofins, Ebersberg (D)	-
AmpliTaQ Gold DNA Polymerase (0,04 U/µl)	Invitrogen, Karlsruhe (D)	4311806

Das PCR Programm im Cyclet läuft wie folgt:

Temperatur	Dauer	
95°C	10 min	
95°C	1 min	} 36 Wiederholungen
60°C	1 min	
72°C	1 min	
72°C	6 min	
4°C	∞	

Das PCR-Produkt wird bei 4°C im Kühlschrank gelagert, bis es mit Hilfe der Gelelektrophorese ausgewertet wird.

2.2.3.4 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese macht man sich die physikalischen Eigenschaften von DNA zunutze. Aufgrund der negativen Ladung wandern DNA-Fragmente bei Anlegen einer elektrischen Spannung zur positiv geladenen Anode, wobei kleinere Fragmente schneller wandern. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid lagert sich dann in die Nukleinsäuren ein und kann unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Zunächst muss das Gel gegossen werden, indem eine 1,5%ige Agaroselösung hergestellt wird. Dazu wird die entsprechende Menge an Agarose-Pulver in 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer(TAE)-Puffer (1:50 Verdünnung in Wasser mit 50x TAE Puffer) gegeben. Die Lösung wird erhitzt, bis sich die Agarose komplett gelöst hat. Nach kurzem Abkühlen wird Ethidiumbromid (Invitrogen, Karlsruhe (Deutschland)) hinzugegeben (1 µg/ml Ethidiumbromid in Agaroselösung), durch Schwenken vermengt und anschließend in den Gelschlitten gegossen. Nach 20 min ist das Gel erstarrt.

Zu jedem Tube mit PCR-Produkt wird so viel Ladepuffer (Fermentas 6x Orange DNA Ladepuffer von Thermo Fisher Scientific, Schwerte (Deutschland)) gegeben, dass er 1:6 verdünnt wird. Beim anschließenden Beladen des Gels mit dem PCR-Produkt wird in eine der Geltaschen der DNA-Leiter (DNA-Leiter Mix Orange G von Peqlab, Erlangen (Deutschland)) gegeben, der als Größenmarker fungiert. Eine Spannung von 120 V wird angelegt.

Nach einer knappen Stunde werden die Banden mit Hilfe des Geldokumentationssystems per UV-Licht sichtbar gemacht. Aufgrund der Kanzerogenität von Ethidiumbromid müssen während des gesamten Vorgangs Nitril-Schutzhandschuhe getragen werden.

2.2.4 Statistische Analysen

Zur statistischen Auswertung der Daten wurde das Programm Graph Pad Prism verwendet. Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson wurde für die Beurteilung von Häufigkeitsunterschieden bei Patienten nach autologer oder allogener Stammzelltransplantation (SZT) in Bezug auf die CT-Antigenexpression und spezifische IgG-Serumtitel benutzt. Außerdem wurde der verbundene t-Test angewendet, um einen signifikanten Unterschied bezüglich der CT-Antigenexpression und humoralen Immunantwort in einer Patientengruppe vor und nach SZT zu ermitteln. Das minimale Signifikanzniveau wurde bei allen Tests bei $p < 0,05$ festgesetzt. Ein Ergebnis $p < 0,001$ galt als sehr signifikant und $p < 0,0001$ als hoch signifikant.

3. Ergebnisse

3.1 Korrelation zwischen CT-Antigenexpression und humoraler Immunantwort

Es wurde die Expression von 10 CT-Antigenen bei 140 Patienten mit Multiplem Myelom (MM) und zusätzlich die humorale Immunantwort gegen 22 CT-Antigene bei 156 MM-Patienten untersucht.

3.1.1 Übersicht der Immunantworten und Expression von CT-Antigenen

Tabelle 8 zeigt eine Übersicht aller getesteten CT-Antigene hinsichtlich ihrer Expression in den Tumorzellen der Patienten und der gegen sie gerichteten humoralen Immunantwort. Dabei wird keine Unterscheidung nach den oben genannten Zeitpunkten getroffen, sondern zunächst nur nach der Art der zweiten SZT unterschieden. Wie aus der rechten Spalte „CT-Antigenexpression“ ersichtlich, konnte für einige CT-Antigene keine Expression nachgewiesen werden. Diese, AKAP4 und MAGE-B3, wurden deshalb in den weiterführenden Grafiken ausgeschlossen. Das gleiche gilt für die humorale Immunantwort (linke Spalte) gegen das CT-Antigen DKK1. Antigene, die nicht getestet wurden, sind mit einem Bindestrich markiert.

Antigene, die vor und während der Therapie am häufigsten exprimiert wurden, sind MAGE-A2 (39,7% der getesteten Patienten waren positiv), MAGE-C1 (15,6%), NY-ESO-1 (7,4%) und MAGE-A1 (6,3%). Die restlichen Antigene wurden bei 3,7% der Patienten oder weniger nachgewiesen. Insgesamt exprimierten 68 der 140 Patienten (48,6%) zu mindestens einem Zeitpunkt eines der CT-Antigene. 22 dieser 68 Patienten (32,4%) waren zu mehreren Zeitpunkten positiv und 10 Patienten (14,7%) exprimierten mehrere Antigene zu einem Zeitpunkt.

Humorale Immunantworten wurden am häufigsten gegen die CT-Antigene NY-ESO-1 (16,7% der untersuchten Patienten waren positiv), MAGE-A12 (13,5%), MAGE-B3 (12,8%), SSX-2 (11,5%), MAGE-A1 (9,0%), MAGE-A2 (8,3%), MAGE-C2 und MAGE-A10 (je 7,7%) festgestellt. Gegen die restlichen CT-Antigene bildeten höchstens 6,4% der Patienten humorale Immunantworten aus. Insgesamt bildeten während des gesamten Therapiezeitraums 74 der 156 Patienten (47,4%) eine Immunantwort gegen mindestens eins der CT-Antigene aus. 28 dieser 74 Patienten (37,8%) bildeten zu mehreren Zeitpunkten Antikörper und 44 (59,5%) reagierten gegen mehrere CT-Antigene zu einem Zeitpunkt. Obwohl die Tendenz augenscheinlich dahin geht, dass

nach allogener Stammzelltransplantation (allo-SZT) prozentual mehr humorale Immunantworten auftreten, sind die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auto-SZT und allo-SZT nicht signifikant. Gleiches gilt für die Ergebnisse der CT-Antigenexpression mit Ausnahme der beiden Antigene MAGE-A2 und MAGE-C1, bei denen die Antigenexpression nach allo-SZT verglichen mit auto-SZT einmal ansteigt (MAGE-A2) als auch absinkt (MAGE-C1).

Tabelle 8. CT-Antigenspezifische humorale Immunantwort und -expression zu allen Zeitpunkten. Aufgeschlüsselt nach gesamt, vor zweiter Stammzelltransplantation (SZT), nach zweiter autologer SZT (auto-SZT) und allogener SZT (allo-SZT). Abfallend geordnet nach Häufigkeit der Immunantwort. Patienten mit mindestens einem positiven Ereignis im betrachteten Zeitraum gelten als positiv.

CT-Antigen		CT-spezifische Immunantwort		CT-Antigenexpression	
		% positiver Patienten	Stichprobenumfang n	% positiver Patienten	Stichprobenumfang n
NY-ESO-1	Gesamt	16,7	156	7,4	135
	vor SZT	5,2	115	3,8	106
	Auto-SZT	22,2	18	3,4	29
	Allo-SZT	26,8	56	4,4	45
MAGE-A12	Gesamt	13,5	156	-	-
	vor SZT	3,5	115	-	-
	Auto-SZT	22,2	18	-	-
	Allo-SZT	23,2	56	-	-
MAGE-B3	Gesamt	12,8	156	0	123
	vor SZT	1,7	115	0	91
	Auto-SZT	11,1	18	0	29
	Allo-SZT	28,6	56	0	37
SSX-2	Gesamt	11,5	156	3,0	135
	vor SZT	6,1	115	2,8	106
	Auto-SZT	5,6	18	3,4	29
	Allo-SZT	16,1	56	0	45
MAGE-A1	Gesamt	9,0	156	6,3	126
	vor SZT	0	115	6,4	94
	Auto-SZT	11,1	18	3,4	29
	Allo-SZT	19,6	56	5,4	37
MAGE-A2	Gesamt	8,3	156	39,7	126
	vor SZT	3,5	115	31,9	94
	Auto-SZT	5,6	18	13,8	29
	Allo-SZT	16,1	56	48,6	37
MAGE-A10	Gesamt	7,7	156	3,2	124
	vor SZT	2,6	115	2,1	95
	Auto-SZT	5,6	18	0	29
	Allo-SZT	12,5	56	2,7	37
MAGE-C2	Gesamt	7,7	156	2,2	135
	vor SZT	1,7	115	1,9	106
	Auto-SZT	0	18	3,4	29
	Allo-SZT	12,5	56	0	45
FMR1NB	Gesamt	6,4	156	-	-
	vor SZT	4,3	115	-	-
	Auto-SZT	5,6	18	-	-
	Allo-SZT	7,1	56	-	-

**p = 0,004

Tabelle 9. Fortsetzung

CT-Antigen		CT-spezifische Immunantwort		CT-Antigenexpression	
		% positiver Patienten	Stichprobenumfang n	% positiver Patienten	Stichprobenumfang n
AKAP4	Gesamt	5,8	156	0	123
	vor SZT	3,5	115	0	91
	Auto-SZT	0	18	0	29
	Allo-SZT	7,1	56	0	37
MAGE-A6	Gesamt	5,8	156	-	-
	vor SZT	3,5	115	-	-
	Auto-SZT	0	18	-	-
	Allo-SZT	8,9	56	-	-
SSX-1	Gesamt	5,1	156	-	-
	vor SZT	3,5	115	-	-
	Auto-SZT	5,6	18	-	-
	Allo-SZT	7,1	56	-	-
MAGE-A3	Gesamt	3,8	156	3,7	135
	vor SZT	2,6	115	2,8	106
	Auto-SZT	0	18	3,4	29
	Allo-SZT	5,4	56	2,2	45
MAGE-A4	Gesamt	3,8	156	-	-
	vor SZT	0,9	115	-	-
	Auto-SZT	5,6	18	-	-
	Allo-SZT	5,4	56	-	-
MAGE-B1	Gesamt	3,8	156	-	-
	vor SZT	3,5	115	-	-
	Auto-SZT	5,6	18	-	-
	Allo-SZT	1,8	56	-	-
MAGE-C1	Gesamt	3,8	156	15,6	135
	vor SZT	2,6	115	16,0	106
	Auto-SZT	0	18	17,2	29
	Allo-SZT	3,6	56	0	45
SSX-3	Gesamt	3,2	156	-	-
	vor SZT	1,7	115	-	-
	Auto-SZT	0	18	-	-
	Allo-SZT	5,4	56	-	-
SSX-4	Gesamt	3,2	156	-	-
	vor SZT	2,6	115	-	-
	Auto-SZT	0	18	-	-
	Allo-SZT	5,4	56	-	-
SSX-5	Gesamt	3,2	156	-	-
	vor SZT	0,9	115	-	-
	Auto-SZT	0	18	-	-
	Allo-SZT	5,4	56	-	-
MAGE-A8	Gesamt	1,3	156	-	-
	vor SZT	0	115	-	-
	Auto-SZT	0	18	-	-
	Allo-SZT	1,8	56	-	-
SSX-7	Gesamt	1,3	156	-	-
	vor SZT	0,9	115	-	-
	Auto-SZT	0	18	-	-
	Allo-SZT	1,8	56	-	-
DKK1	Gesamt	0	118	-	-
	vor SZT	0	85	-	-
	Auto-SZT	0	17	-	-
	Allo-SZT	0	47	-	-

**

p = 0,007

3.1.2 CT-spezifische humorale Immunantwort steigt nach SZT, während die Expression abnimmt

Nach dem allgemeinen Überblick über die Verteilung der CT-Antigenexpression und die humorale Immunantwort gegen jedes einzelne Antigen, wurde der zeitliche Verlauf genauer aufgeschlüsselt. **Abbildung 6** zeigt die CT-Antigenexpression bzw. die humorale Immunantwort gegen alle CT-Antigene zusammengefasst im Therapieverlauf. Die Anzahl der Patienten variiert zwischen den einzelnen Zeitpunkten (siehe Anhang, **Tabelle 12**).

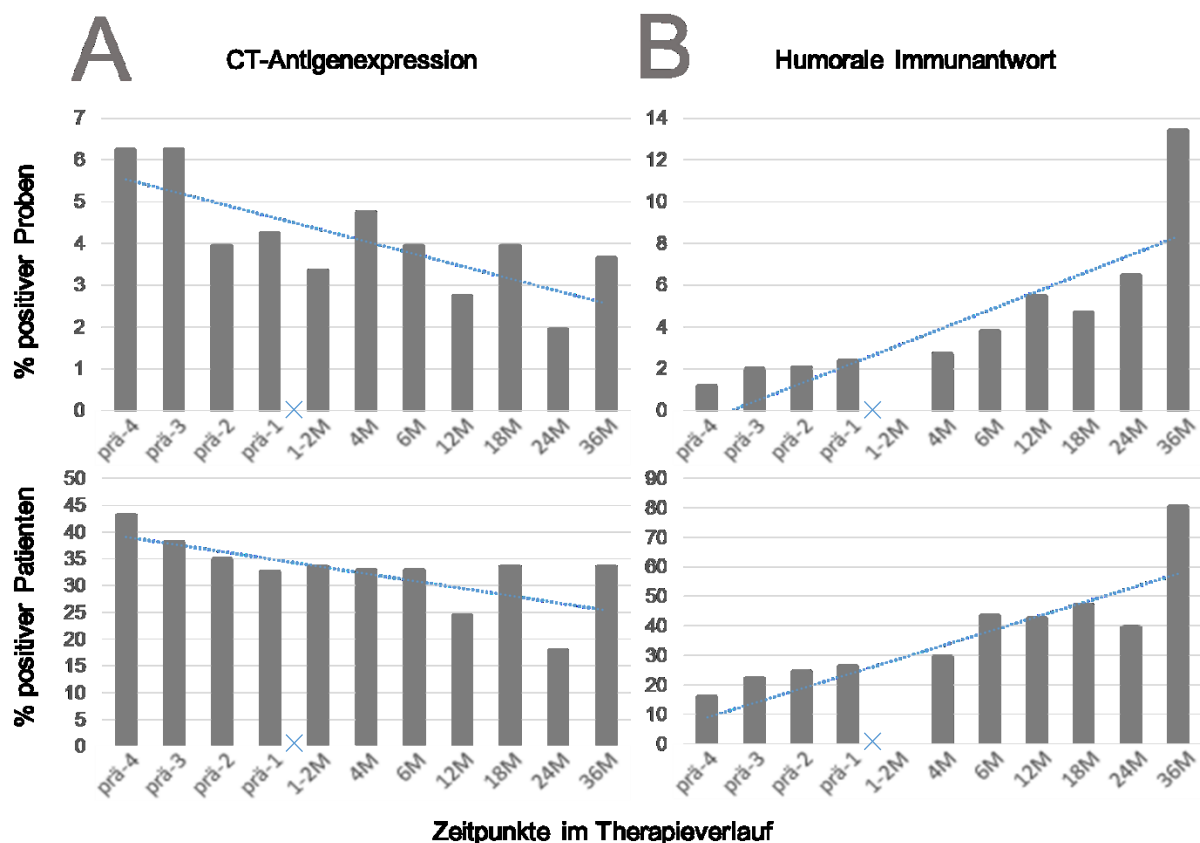


Abbildung 6. Cancer-Testis-Antigenexpression und humorale Immunantwort im Knochenmark aller positiv gewerteten Patientenproben im zeitlichen Verlauf. **A)** Mittels Reverse-Transkriptase-PCR ermittelte Expressionsdaten dargestellt als prozentualer Anteil positiver Proben (oben) und prozentualer Anteil Patienten (unten), die CT-Antigenexpression im Knochenmark zeigten. **B)** Per IgG-ELISA bestimmte Antikörperantworten im Knochenmarksplasma gegen CT-Antigene. Dargestellt sind jeweils der Anteil aller Proben oberhalb des Schwellenwerts und der Anteil aller Patienten mit positiver humoraler Immunantwort gegen mindestens ein CT-Antigen. Eine Trendlinie wurde ermittelt (blaue Punkte). Der Zeitpunkt der zweiten Stammzelltransplantation (SZT) ist mit einem x gekennzeichnet. Die Zeitpunkte vor der zweiten SZT sind mit „prä-x“ und Zeitpunkte danach mit „xM“ (M=Monate) bezeichnet.

In **Abbildung 6 A** wird das Absinken der CT-Antigenexpression im Laufe der Therapie sowohl bei Betrachtung der positiven Proben als auch dem Anteil positiver Patienten deutlich. Von unmittelbar vor der zweiten SZT (Zeitpunkt prä-1) zum Beispiel sinkt der Anteil positiver Proben von 4,2% auf 1,9% zwei Jahre danach (Zeitpunkt 24M). Auch der Anteil von Patienten mit CT-Antigen-exprimierenden Tumoren fällt signifikant von 29,9% (Zeitpunkt prä-1) auf 24,1% ein Jahr nach der zweiten SZT ($p = 0,024$).

Gleichzeitig steigt über denselben Zeitraum die humorale Immunantwort an, siehe **Abbildung 6 B**. Da das Immunsystem nach einer Stammzelltransplantation erst langsam rekonstituiert wird, sind kurz nach der zweiten SZT (Zeitpunkt 1-2 Monate nach SZT) keine humoralen Immunantworten gegen CT-Antigene feststellbar, steigen dann aber deutlich über die Werte vor der SZT an (nach 12 Monaten 5,4% und nach 36 Monaten 13,3% positive Proben). Besonders bei Betrachtung des Anteils positiver Patienten wird die steigende Tendenz deutlich: während sich der Prozentsatz vor der zweiten SZT (Zeitpunkte prä-4 bis prä-1) bei ca. 20% hält, steigt er nach dem Einbruch unmittelbar nach der SZT (Zeitpunkt 1-2M) auf rund 40% nach 12-24 Monaten an und erreicht nach 36 Monaten 80%. Die humorale Immunantwort steigt bei Betrachtung der Patienten signifikant ($p = 0,002$) und der Proben hoch signifikant ($p < 0,0001$) an.

Um statistische Analysen durchzuführen, die die oben beschriebenen Ergebnisse untermauern, wurde eine möglichst große Gruppe von Patienten bzw. Proben untersucht, von der sowohl zu einem Zeitpunkt vor (prä-1) als auch nach der zweiten SZT (12M) Material vorlag. Der Vergleich der Patientengruppen zu den beiden Zeitpunkten ergab, dass sowohl der Anstieg der humoralen Immunantwort als auch das Absinken der CT-Antigenexpression signifikant ist (**Abbildung 7**). Zusätzlich dazu ist bei Betrachtung der Proben auch dort der Anstieg der humoralen Immunantwort signifikant. So kann die in **Abbildung 6** gezeigte Tendenz der Trendlinien statistisch untermauert werden.

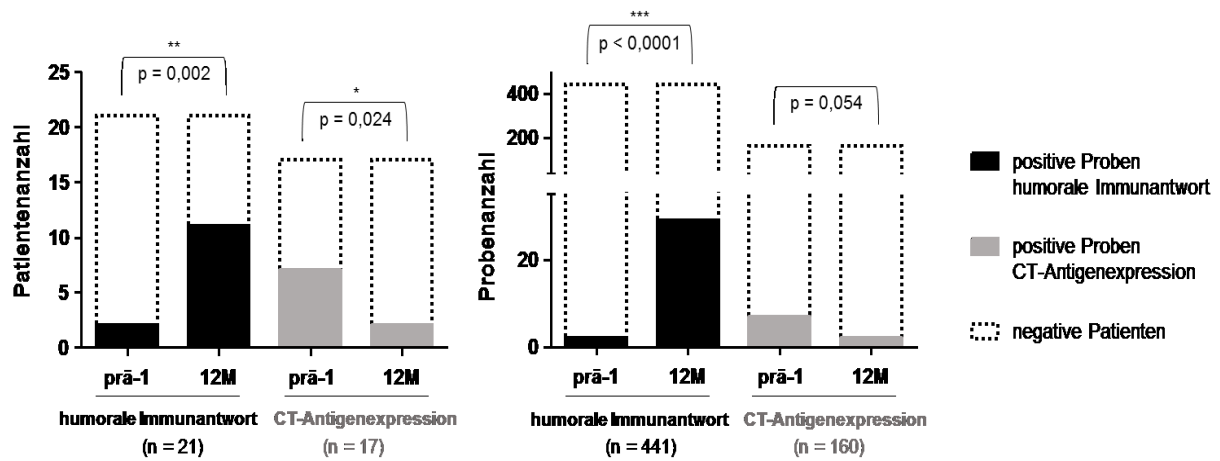


Abbildung 7. Direkter Vergleich von Patienten- (links) bzw. Probengruppen (rechts) bezüglich der humoralen Immunantwort (schwarze Balken) und der CT-Antigenexpression (graue Balken). Verglichen wurde die Anzahl positiver Ereignisse zu einem Zeitpunkt vor der zweiten Stammzelltransplantation (prä-1) und 12 Monate danach (12M). Der Stichprobenumfang ist jeweils in Klammern angegeben.

3.1.3 Nach SZT geht die Expression der CT-Antigene MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-C1 und MAGE-C2 zurück

Um die Frage zu klären, welche CT-Antigene für die Gesamtabnahme der Expression verantwortlich sind, werden in **Abbildung 8** die vier CT-Antigene einzeln dargestellt, an denen dieser Abwärtstrend besonders deutlich wird. Da es sich hierbei aufgrund der Datenlage um eine rein deskriptive Analyse handelt, wurden keine statistischen Analysen durchgeführt. Analog zu **Abbildung 6 A** sinkt die Expression der Antigene (MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-C1 und MAGE-C2) im Verlauf der Therapie ab. Besonders deutlich ist dieser Abwärtstrend an dem Antigen MAGE-C1 zu sehen. Dort sinkt der Anteil positiver Patienten von ca. 23% vor dem Start der Therapie (Zeitpunkt prä-4) über 7,5% nach 4 Monaten nach der zweiten Stammzelltransplantation (SZT) auf 5% nach eineinhalb Jahren (Zeitpunkt 18M).

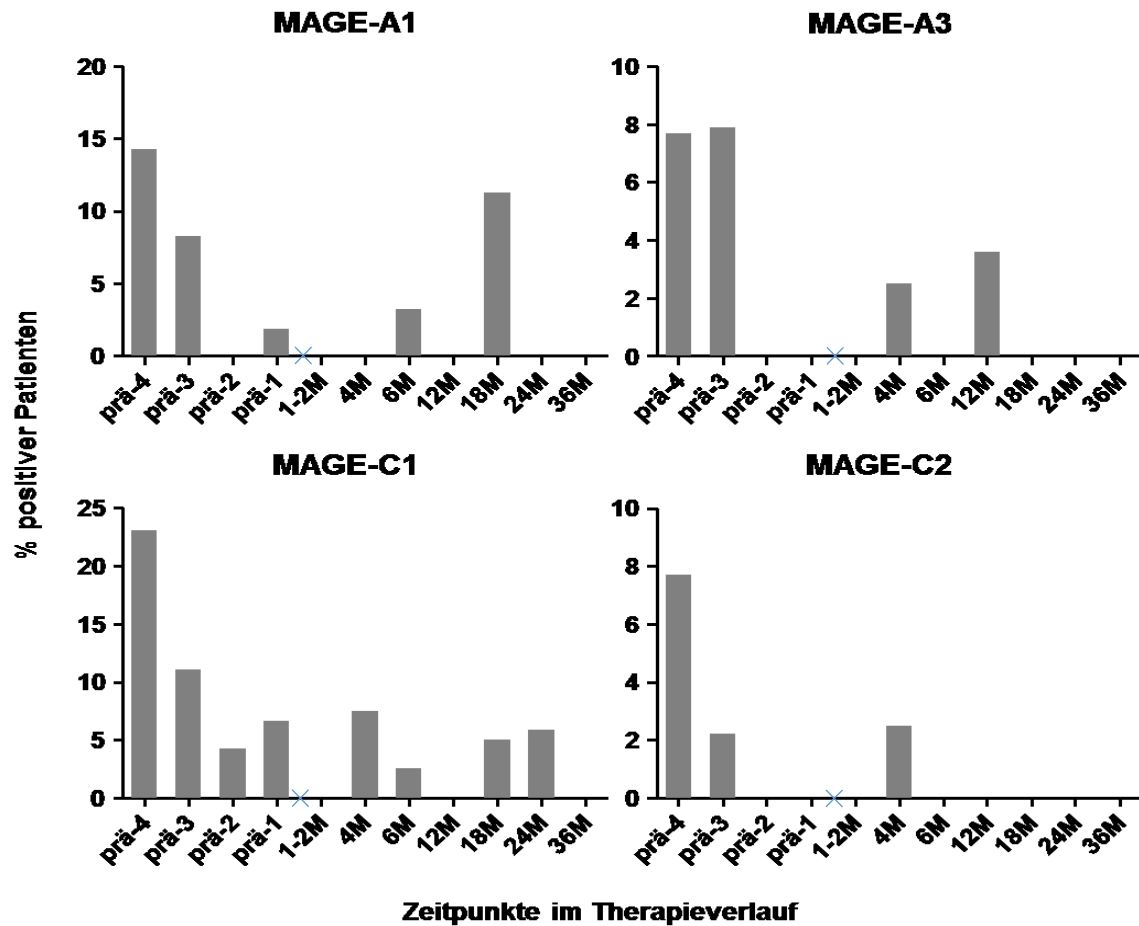


Abbildung 8. Cancer-Testis(CT)-Antigenexpression von vier Antigenen im Knochenmark aller Patienten im zeitlichen Verlauf. Die mittels Reverse-Transkriptase-PCR ermittelten Ergebnisse sind als Balken mit prozentualen Anteil aller positiven Patienten (größenspezifische Bande im Agarosegel) dargestellt. Der Stichprobenumfang n ist im Folgenden genannt: prä-4 $n=13$; prä-3 $n=45$; prä-2 $n=23$; prä-1 $n=60$; 1-2M $n=3$; 4M $n=40$; 6M $n=39$; 12M $n=28$; 18M $n=20$; 24M $n=17$; 36M $n=5$. Der Zeitpunkt der zweiten Stammzelltransplantation (SZT) ist mit einem x gekennzeichnet. Die Zeitpunkte vor der zweiten SZT sind mit „prä-x“ und Zeitpunkte danach mit „xM“ (M=Monate) bezeichnet.

3.1.4 Nach SZT steigt die humorale Immunantwort gegen die CT-Antigene NY-ESO-1, MAGE-A1, MAGE-A12 und MAGE-B3

Wie für die CT-Antigenexpression, wurde auch die humorale Immunantwort aus **Abbildung 6 B** weiter in die einzelnen Antigene aufgeteilt. **Abbildung 9** zeigt als Beispiele die drei CT-Antigene, deren Immunantwort nach der zweiten SZT signifikant anstieg (NY-ESO-1, MAGE-A1 und MAGE-B3), und eines, gegen das neben NY-ESO-1 am häufigsten Immunantworten nachgewiesen wurde (MAGE-A12). Bei allen vier CT-Antigenen steigt die Zahl der positiven Patienten aus dem einstelligen Prozentbereich vor der zweiten Stammzelltransplantation (SZT) auf teilweise über 20% nach zwei bis drei Jahren (Zeitpunkte 24M und 36M) nach der zweiten SZT.

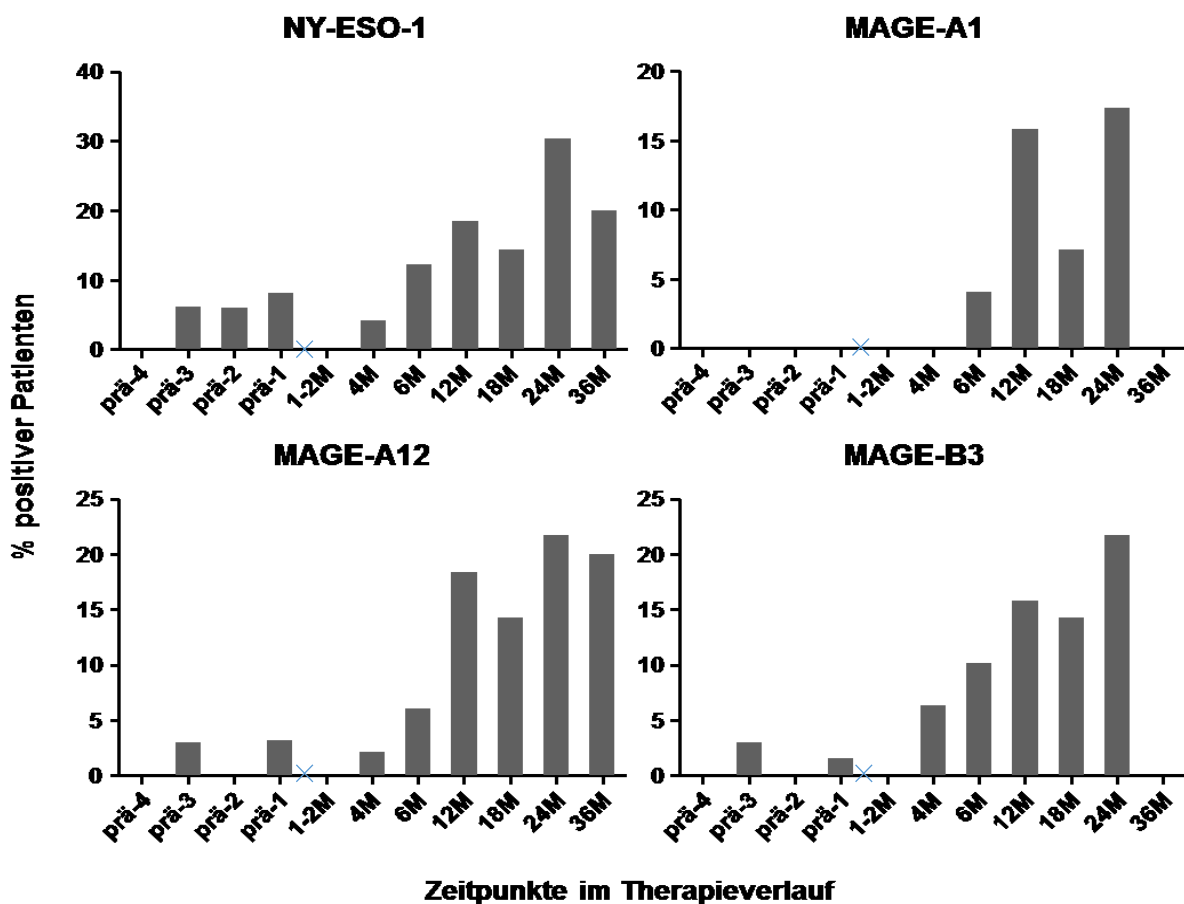


Abbildung 9. Humorale Immunantwort gegen neun Cancer-Testis-Antigene im Knochenmark aller Patienten im zeitlichen Verlauf. Jeder Balken zeigt den Prozentsatz aller positiven Patienten. Die Anzahl der mittels IgG-ELISA pro Zeitpunkt getesteten Proben ist im Folgenden genannt: prä-4 n=13; prä-3 n=46; prä-2 n=21; prä-1 n=66; 1-2M n=4; 4M n=48; 6M n=49; 12M n=38; 18M n=28; 24M n=23; 36M n=5. Der Zeitpunkt der zweiten Stammzelltransplantation (SZT) ist mit einem x gekennzeichnet. Die Zeitpunkte vor der zweiten SZT sind mit „prä-x“ und Zeitpunkte danach mit „xM“ (M=Monate) bezeichnet.

Analog zu **Abbildung 7** wurde hier eine statistische Analyse vorgenommen. Dazu wurde wieder eine möglichst große Patientengruppe ausgewählt, die zu den Zeitpunkten vor zweiter SZT (prä-1) und 12 Monate danach (12M) betrachtet wurde. Die Analysen ergaben für drei der vier CT-Antigene (NY-ESO-1, MAGE-A1 und MAGE-B3) einen signifikanten Anstieg der IgG-Titer nach der zweiten SZT, so dass die augenscheinliche Tendenz des Anstiegs der Immunantwort bewiesen und hauptsächlich auf diese drei CT-Antigene zurückgeführt werden kann (**Abbildung 10**).

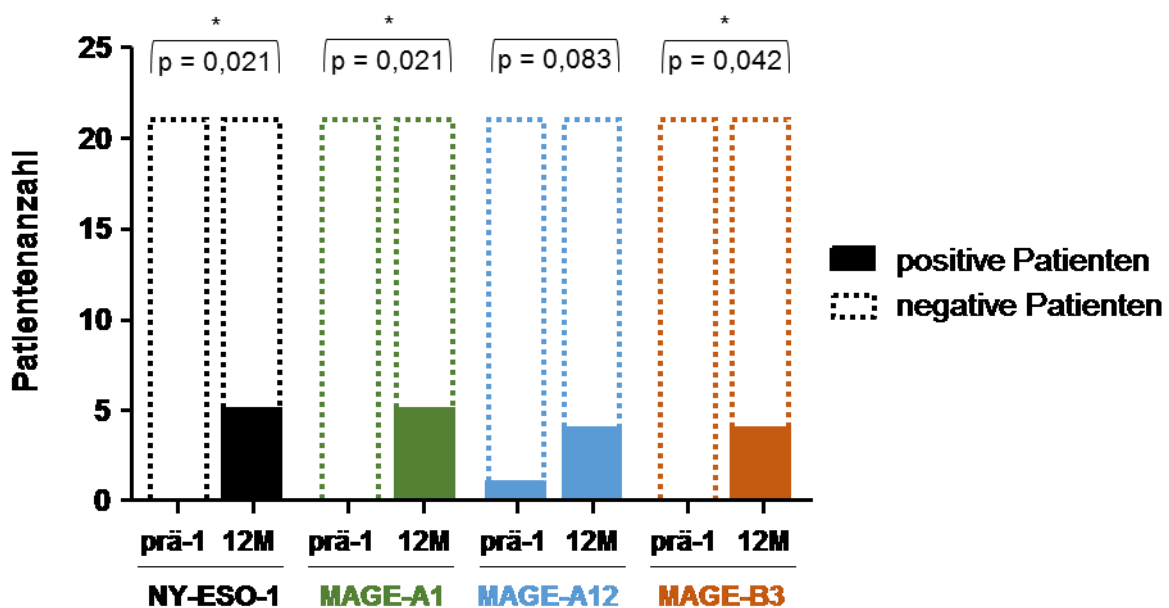


Abbildung 10. Direkter Vergleich einer Patientengruppe ($n = 21$) bezüglich der humoralen Immunantwort gegen die vier CT-Antigene NY-ESO-1 (schwarz), MAGE-A1 (grün), MAGE-A12 (blau) und MAGE-B3 (orange) vor der zweiten Stammzelltransplantation (prä-1) und 12 Monate danach (12M). Angegeben ist jeweils die Anzahl positiver Patienten (gefüllter Balken) in der gesamten Gruppe (weißer Balken).

Im Folgenden werden zur besseren Veranschaulichung der bisherigen Ergebnisse Patientenbeispiele gezeigt. **Abbildung 11** zeigt vier Patienten aus der auto-allo-SZT-Gruppe (00117, 01002, 01005 und 01804), bei denen die Immunreaktion auf verschiedene CT-Antigene dargestellt ist. Bei der Betrachtung der einzelnen Patienten fällt die steigende Tendenz der humoralen Immunantwort ab dem Zeitpunkt nach der zweiten SZT auf. Besonders hervorzuheben ist dabei Patient 01804, bei dem die IgG-Titer gegen sieben CT-Antigene ansteigen. Außerdem ist festzuhalten, dass bei allen vier Patienten die drei CT-Antigene NY-ESO-1, MAGE-A1 und MAGE-B3 an dem Anstieg der Immunantwort beteiligt sind.

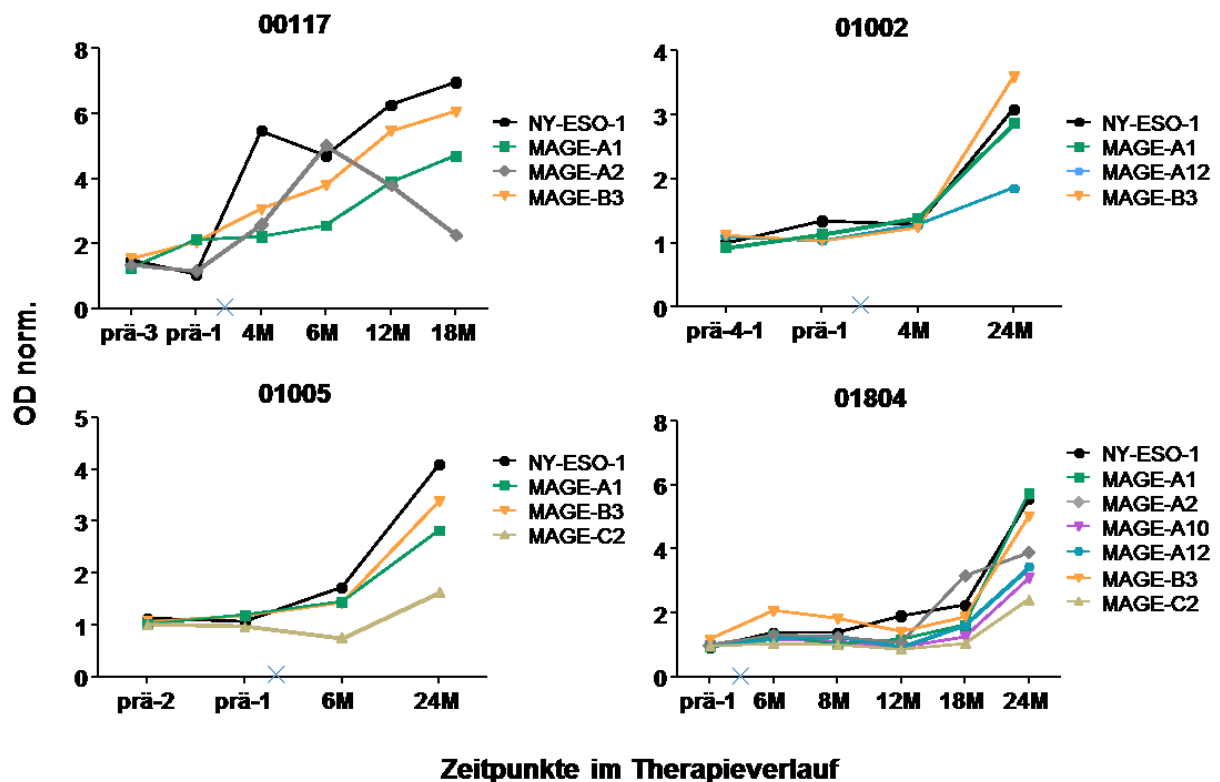


Abbildung 11. Humorale Immunantwort gegen verschiedene Cancer-Testis-Antigene im Knochenmark von vier Patienten (00117, 01002, 01005 und 01804). Angegeben ist die normalisierte OD (Quotient aus gemessener OD und OD der Negativkontrolle GST) mit Standardabweichung der einzelnen CT-Antigene zu den jeweiligen Zeitpunkten vor oder nach der zweiten, in allen vier Fällen allogenen Stammzelltransplantation (SZT). Schwarz = NY-ESO-1; Grün = MAGE-A1, Grau = MAGE-A2, Pink = MAGE-A10, Blau = MAGE-A12, Orange = MAGE-B3, Beige = MAGE-C2. Der Zeitpunkt der zweiten SZT ist mit einem x gekennzeichnet. Die Zeitpunkte vor der zweiten SZT sind mit „prä-x“ und Zeitpunkte danach mit „xM“ (M=Monate) bezeichnet.

3.1.5 Besonders nach allogener SZT treten erhöhte IgG-Titer gegen CT-Antigene auf

Neben dem zeitlichen Verlauf wurde weiterhin untersucht, inwiefern die Art der zweiten Stammzelltransplantation, autolog oder allogene, die humorale Immunantwort und die CT-Antigenexpression beeinflusst. Dazu wurden Patienten verglichen, von denen es sowohl vor als auch nach der zweiten SZT Proben gab. Als hoch signifikant stellte sich die Entwicklung der humoralen Immunantwort nach allo-SZT heraus ($p < 0,0001$), wohingegen nach auto-SZT kein signifikanter Anstieg nachweisbar ist. Auch die CT-Antigenexpression war weder nach auto-SZT noch nach allo-SZT signifikant niedriger (Abbildung 12).

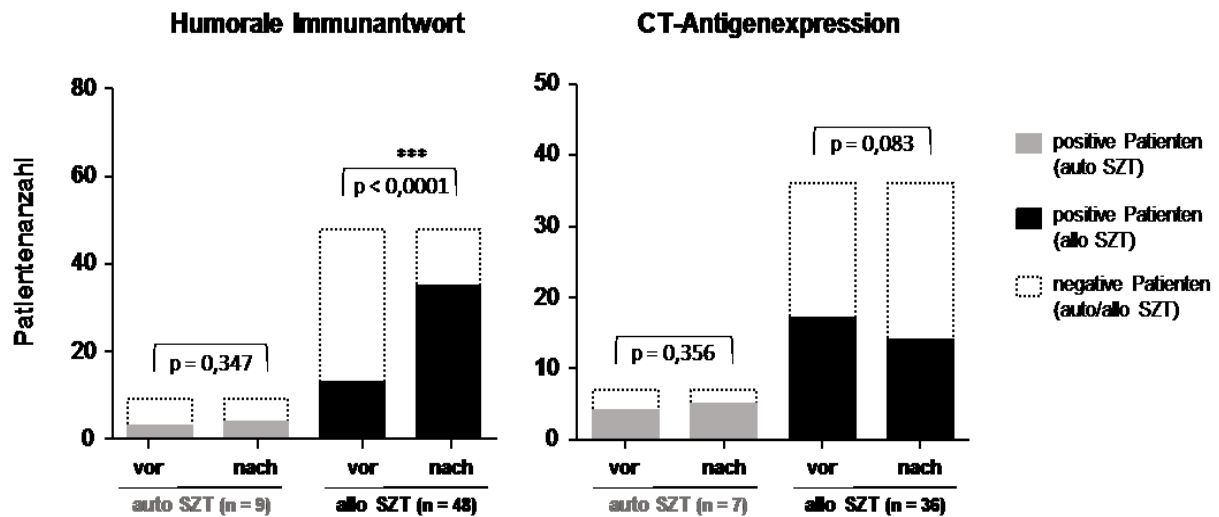


Abbildung 12. Humorale Immunantwort (links) und Cancer-Testis-Antigenexpression (rechts) vor und nach autologer (auto-SZT) oder allogener Stammzelltransplantation (allo-SZT). Dargestellt ist die Menge positiver (gefüllter Balken, schwarz nach allo-SZT oder grau nach auto-SZT) und negativer Patienten (weiß) in der untersuchten Gruppe (gestrichelter Balken). Unterteilt wurde nach Art der zweiten SZT, autolog (grau) und allogenen (schwarz). Verglichen wurde stets die gleiche Patientengruppe, von der es vor und nach SZT Proben gab. Alle Zeitpunkte vor der zweiten SZT und alle danach wurden zusammengefasst. Als positiv gilt ein Patient, wenn zu mindestens einem Zeitpunkt ein Ereignis stattfand. Der Stichprobenumfang n ist in Klammern angegeben.

3.2 Epitop-Mapping

Um die Frage zu klären, wie heterogen die erkannten Peptidepitope sind, bzw. ob es immundominante Bereiche gibt oder es im Verlauf der Behandlung zu einem Epitop-Spreading kommt, wurde eine Epitopkartierung (engl. *epitop mapping*) durchgeführt. Das Prinzip beruht darauf, das gesamte zu untersuchende Protein in Peptide mit einer Länge von 20 sich überlappenden Aminosäuren aufzuteilen, wobei die gesamte Aminosäuresequenz des Antigens abgedeckt ist. Anschließend wird mittels IgG-ELISA untersucht, welche dieser Epitope von den spezifischen Antikörpern erkannt werden. Hierfür wurde KM-Plasma von Patienten verwendet, die eine starke humorale Immunantwort gegen die CT-Antigene MAGE-A3, MAGE-B3, MAGE-C2 und NY-ESO-1 im zeitlichen Verlauf der Behandlung zeigten (**Abbildung 13**). Insgesamt wurden 32 Patienten zu 65 Zeitpunkten untersucht, allerdings sind nur diejenigen dargestellt, die positiv auf ein Epitop reagierten.

Bei den meisten Patienten sind individuell klare Peptidepitope identifizierbar, die im Behandlungsverlauf stabil bleiben. Eine Diversifizierung der humoralen Immunantwort bzw. ein Epitop-Spreading während der Therapie im einzelnen Individuum findet demnach nicht statt. Die immundominanten Regionen befinden sich bei den CT-Antigenen MAGE-A3 und MAGE-C2 vorwiegend am C-terminalen Ende des Proteins.

Bei den CT-Antigenen NY-ESO-1 und MAGE-B3 zeigte sich im Verlauf der Therapie eines Patienten zwar ebenfalls keine Diversifizierung, allerdings liegen die immundominanten Epitope zwischen Mitte und C-Terminus des Antigens verteilt. Ein patientenübergreifendes, immundominantes Epitop ist allerdings nicht feststellbar.

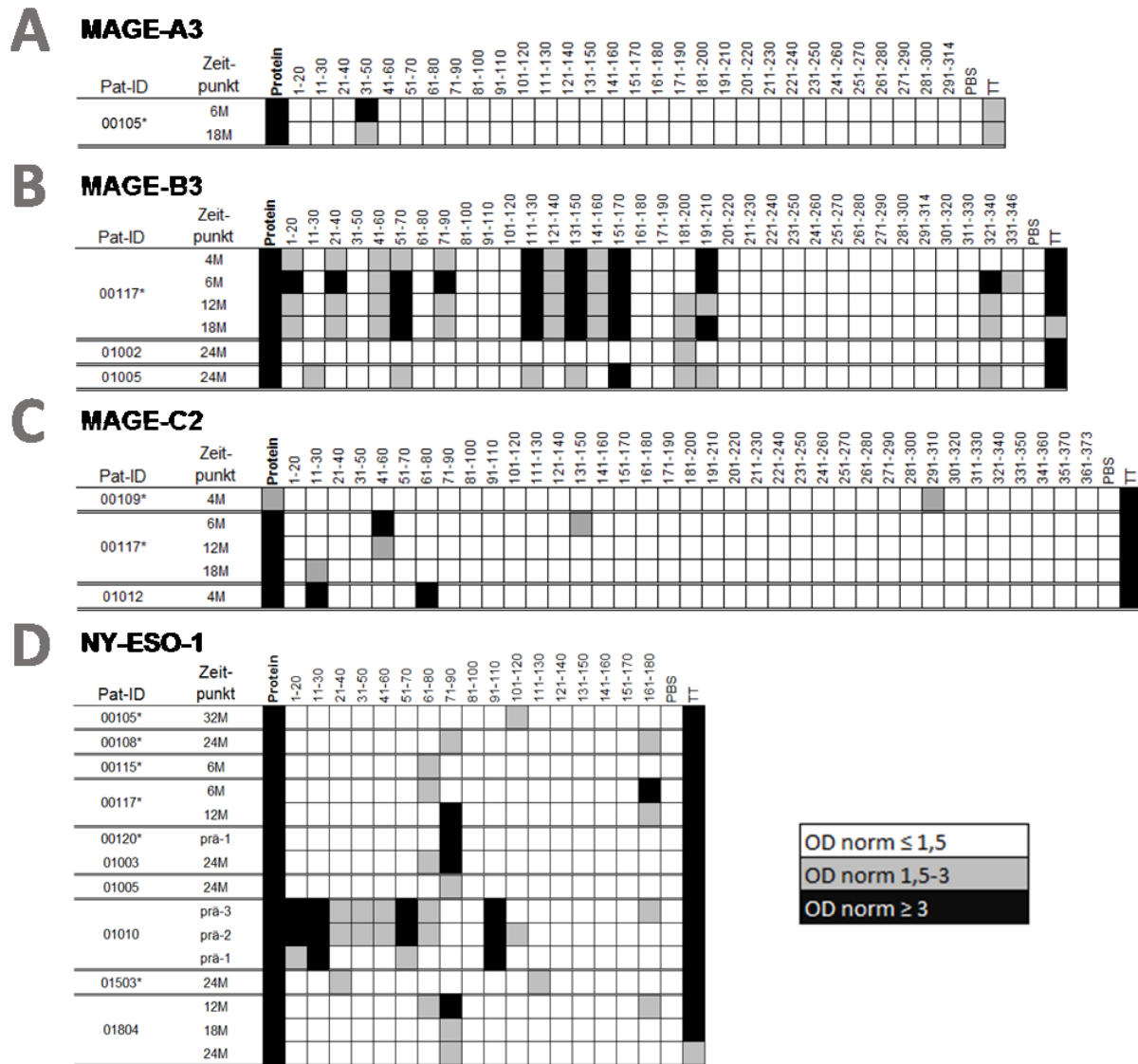


Abbildung 13. Humorale Immunantwort gegen lineare Peptidepitope vier verschiedener Cancer-Testis-Antigene. Durch IgG-ELISA wurden die normalisierten OD-Werte (gemessene OD/OD der Negativkontrolle GST) ermittelt, wobei gilt: OD norm. ≤ 1,5 weißer Kasten, OD norm. 1,5 – 3 grauer Kasten, OD norm. ≥ 3 schwarzer Kasten. Links aufgetragen ist jeweils die Patienten-ID (Pat-ID) mit entsprechenden Zeitpunkten. Gehörte der Patient in die auto-allo-Gruppe, wurde die ID mit einem * gekennzeichnet. Die Zeitpunkte vor der zweiten Stammzelltransplantation sind mit „prä-x“ und Zeitpunkte danach mit „xM“ (M=Monate) bezeichnet. An erster Position befindet sich jeweils als Positivkontrolle das Full-Length Protein und nachfolgend die getesteten 20mer Peptide, bezeichnet jeweils nach der ersten und letzten Aminosäure. Als Negativkontrolle diente PBS und als weitere Positivkontrolle Tetanus (TT). Dargestellt sind jeweils die Ergebnisse zu **A**) MAGE-A3 (30 Epitope), **B**) MAGE-B3 (34 Epitope), **C**) MAGE-C2 (37 Epitope) und **D**) NY-ESO-1 (17 Epitope).

4. Diskussion

4.1 Häufigkeit der CT-Antigenexpression und der humoralen Immunantwort im Multiplen Myelom

Das Multiple Myelom ist eine neoplastische Erkrankung, die trotz moderner Therapieoptionen wie der Stammzelltransplantation mit vorangegangener Chemotherapie oder Zytostatika wie Lenalidomid eine hohe Rückfallrate aufweist. Daher ist die Suche nach neuen Therapieansätzen wie der Immuntherapie von großer Bedeutung. Um Ziele für solch eine gerichtete und effiziente Immuntherapie wie z.B. der Antikörpergabe zu finden, bedarf es einer genauen Untersuchung von Zielstrukturen im MM. In dieser Arbeit wurden zu diesem Zweck die Expression von 10 und die spontane humorale Immunantwort gegen 22 Cancer-Testis-Antigene/n untersucht, so dass ein möglichst häufig exprimiertes und immunogenes Antigen gefunden werden kann.

Die Analyse der Expressionsdaten ergab, dass knapp die Hälfte der 140 Patienten mindestens zu einem Zeitpunkt des Beobachtungszeitraums eines der 10 getesteten CT-Antigene exprimierte. Betrachtet man eine Studie, die trotz der vergleichbaren Anzahl von 13 untersuchten CT-Antigenen 92% positive Patienten identifizieren konnte (Andrade et al. 2008), erscheint das in dieser Arbeit ermittelte Ergebnis relativ gering auszufallen. Allerdings befanden sich die Patienten dieser Studie zu 95% in Stadium III der Erkrankung und waren unbehandelt, so dass die Vergleichbarkeit mit den hier untersuchten Patienten fraglich ist. Verglichen mit drei anderen Studien, deren Werte bei 38% mit 4 (Atanackovic et al. 2009), 80% mit 15 (Atanackovic et al. 2007) oder 98% mit 35 (Condomines et al. 2007) getesteten CT-Antigenen liegen, ist das Ergebnis von knapp 49% bei 10 getesteten Antigenen zwar geringer, jedoch im Durchschnitt. So können insgesamt bisherige Daten bestätigt werden, wenn man das wesentlich größere oder kleinere Spektrum an CT-Antigenen beachtet, das dort jeweils untersucht wurde.

Ein weiteres Ergebnis dieser Untersuchung beinhaltet, dass ca. 15% der positiven bzw. 7% aller Patienten mehrere (mindestens 2) CT-Antigene simultan exprimierten. In diesem Fall können die bisher veröffentlichten Daten von 86% mit 35 (Condomines et al. 2007) und 55% mit 15 (Atanackovic et al. 2007) getesteten CT-Antigenen nicht bestätigt werden. Auch die in **Tabelle 10** aufgelisteten Expressionshäufigkeiten der

einzelnen CT-Antigene sind mit Ausnahme von MAGE-A2 und teilweise NY-ESO-1 geringer als in der Literatur. Das kann dadurch bedingt sein, dass die Patienten auch zum frühesten Zeitpunkt der Probenentnahme schon eine Vielzahl von Therapien, mehrere Chemotherapiezyklen und später auch die erste SZT, erhalten haben, durch die die CT-Antigenexpression beeinflusst werden kann. Zudem sind die Expressionshäufigkeiten wie oben erwähnt auch abhängig vom Krankheitsstadium der untersuchten Patienten.

Tabelle 10. Expressionshäufigkeit von 10 CT-Antigenen mit Vergleichswerten aus Studien am MM. Die Werte von Fichtner et al. 2015 beziehen sich auf Patienten im fortgeschrittenen Stadium.

CT-Antigen	%	Vergleich %	Quelle
NY-ESO-1	7,4	36; 26; 7; 13; 29	(Andrade et al. 2008); (Carvalho et al. 2011); (Atanackovic et al. 2007); (Condomines et al. 2007) (Fichtner et al. 2015)
SSX-2	3,0	12; 16; 23; 25,6	(Atanackovic et al. 2009); (Atanackovic et al. 2007); (Taylor et al. 2005); (Zhang et al. 2014)
MAGE-A1	6,3	31	(Andrade et al. 2008)
MAGE-A2	39,7	4,7; 41	(Fichtner et al. 2015); (Andrade et al. 2008)
MAGE-A3	3,7	46; 52; 55; 38; 76,9	(Andrade et al. 2008); (Atanackovic et al. 2009); (Atanackovic et al. 2007); (Fichtner et al. 2015) (Zhang et al. 2014)
MAGE-A10	3,2	0	(Andrade et al. 2008)
MAGE-B3	0	-	-
MAGE-C1	15,6	67; 77; 65; 80; 75; 88,5	(Carvalho et al. 2013); (Andrade et al. 2008); (Atanackovic et al. 2009); (Tyler et al. 2014); (Pabst et al. 2010); (Zhang et al. 2014)
MAGE-C2	2,2	59; 43; 56; 54; 82,1	(Carvalho et al. 2013); (Atanackovic et al. 2009); (Atanackovic et al. 2007); (Pabst et al. 2010); (Zhang et al. 2014)
AKAP4	0	42	(Chiriva-Internati et al. 2008)

Nach eigenen Ergebnissen stellen MAGE-A2, -C1 und NY-ESO-1 die am häufigsten exprimierten CT-Antigene in dieser Gruppe von Myelompatienten dar. Obwohl in der Literatur höhere Prozentangaben zu finden sind, gehören neben anderen auch dort die Antigene MAGE-C1, -A2 und NY-ESO-1 zu den häufig exprimierten Strukturen.

Im Hinblick auf interessante Ziele für Immuntherapien gilt zusätzlich die Frage zu klären, welches CT-Antigen besonders immunogene Eigenschaften besitzt. Diese Arbeit ist allerdings die erste, bei der ein so breites Spektrum an CT-Antigenen untersucht wurde. So bedarf es weiterer Untersuchungen, damit der Prozentsatz der Patienten, die mindestens einmal eine humorale Immunantwort gegen mindestens ein

CT-Antigen hatten, knapp 50%, verglichen werden kann. Lediglich einige Einzelwerte konnten mit Literaturwerten verglichen werden (**Tabelle 11**). Die Häufigkeit der Patienten, die humorale Immunantworten zeigten, stimmt bei SSX-1, MAGE-A1 und -A3 in der Größenordnung mit den Literaturwerten überein. Bei NY-ESO-1 konnte eine höhere stadienunabhängige Auftretenswahrscheinlichkeit festgestellt werden, als bislang gezeigt (16,7% versus 3%). Ähnliches gilt für SSX-2, wohingegen für MAGE-C1 und AKAP4 niedrigere Werte als in der Literatur ermittelt wurden.

Wie der Vergleich mit Literaturwerten zeigt, ist dies unseres Wissens die erste Studie am MM, bei der ein so großes Patientenkollektiv (n = 156) bezüglich der humoralen Immunantwort gegen so viele CT-Antigene (22) untersucht wurde. Nach diesen Ergebnissen gelten die CT-Antigene NY-ESO-1, MAGE-A12, -B3 und SSX-2 als sehr immunogen und daher besonders interessant als Zielstrukturen für Immuntherapien. Dass NY-ESO-1 besonders immunogene Eigenschaften besitzt, bestätigen mehrere Studien zum MM (Szmania et al. 2006) und zu anderen Tumorentitäten (Stockert et al. 1998; Ademuyiwa et al. 2012). Insgesamt kann hier die Rolle von NY-ESO-1 als vielversprechendes Immuntherapieziel unterstützt werden, da es sowohl zu den am häufigsten exprimierten als auch zu den sehr immunogenen CT-Antigenen im MM gehört.

Tabelle 11. Häufigkeiten der humoralen Immunantwort gegen 7 der 22 untersuchten CT-Antigene, zu denen Vergleichswerte gefunden wurden. Verglichen wurde mit Studien an MM, monoklonaler Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) und Morbus Waldenström (die letzten beiden nur bei der Studie von Lendvai et al. 2010).

CT-Antigen	%	Vergleich %	Quelle
NY-ESO-1	16,7	3; 2,6; 0-33; 3,3	(Carvalho et al. 2011); (Luetkens et al. 2014) (Rhee et al. 2005) Werte hier stadienabhängig; (Curioni-Fontecedro et al. 2008)
SSX-1	5,1	4,2	(Lendvai et al. 2010)
SSX-2	11,5	1,7; 3,1	(Curioni-Fontecedro et al. 2008); (Luetkens et al. 2014)
MAGE-A1	9	4,2	(Lendvai et al. 2010)
MAGE-A3	3,8	1,7; 0	(Curioni-Fontecedro et al. 2008); (Luetkens et al. 2014)
MAGE-C1	3,8	50	(Curioni-Fontecedro et al. 2008)
AKAP4	5,8	32	(Chiriva-Internati et al. 2008)

4.2 Einfluss der Tandem-SZT auf CT-Antigenexpression und humorale Immunantwort im Multiplen Myelom

Neben der Analyse der ermittelten Daten in Hinblick auf zukünftige Immuntherapien, steht die zu den konventionellen Therapien gehörende Stammzelltransplantation im Vordergrund dieser Arbeit. Wie eingangs bereits erwähnt, gehört zur Standardtherapie des Multiplen Myeloms (MM) bei Patienten < 65 Jahren in guter Verfassung eine Induktionstherapie mit Hochdosischemotherapeutika mit anschließender autologer SZT. Die Überlegung, aufgrund des Erfolgs der auto-SZT, eine zweite durchzuführen (Tandem auto-auto-SZT), wurde bereits erforscht und lieferte meist erfolgversprechende Ergebnisse verglichen mit einer einzelnen auto-SZT (Kumar et al. 2009; Attal et al. 2003; Cavo et al. 2007). Empfohlen wird diese Therapie aufgrund erhöhter Toxizität allerdings eher bei Patienten, die auf eine auto-SZT allein schlecht ansprechen (Hungria et al. 2013). Bislang wenig untersucht ist dagegen der Therapieansatz der Tandem auto-allo-SZT, bei dem nach regulärer auto-SZT ein fremder Spender gefunden und zusätzlich eine allogene SZT durchgeführt wird. Obwohl eine allo-SZT eine Graft-versus-Host-Disease auslösen kann, ist sie bisher die einzige Möglichkeit, das MM z.B. durch den Graft-versus-Myeloma-Effekt kurativ zu behandeln (Mehta & Singhal 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst der allgemeine Einfluss einer zweiten SZT auf die CT-Antigenexpression und die humorale Immunantwort untersucht. Am eindrücklichsten waren dabei sicherlich der gleichzeitige Abfall der CT-Antigenexpression und der Anstieg der humoralen Immunantwort nach der zweiten SZT. Diese reziproke Entwicklung, die sich bis zu 36 Monate nach der zweiten SZT nachverfolgen lies, konnte sogar an einzelnen CT-Antigenen gezeigt werden. Mit diesem Querschnittsbereich zwischen CT-antigenspezifischer Tumorimmunologie und SZT haben sich bislang nur wenige Arbeitsgruppen beschäftigt. Trotzdem kann die in dieser Arbeit beschriebene, absteigende Tendenz der CT-Antigenexpression nach SZT bestätigt werden (Atanackovic et al. 2009). Atanackovic et al. beschreiben dabei des Weiteren einen Zusammenhang zwischen dieser Expressionsabnahme und dem Remissionsstatus. So exprimierten bei progressiver Erkrankung 90% der Patienten mindestens ein CT-Antigen, bei Teilremission nur noch 50% und bei kompletter Remission 21%. Obwohl mangels klinischer Daten diese Beobachtung nicht bestätigt werden kann, ist es denkbar, dass auch in dieser Arbeit die Abnahme der CT-Antigenexpression Ausdruck eines Krankheitsrückganges ist. In diesem Fall könnte

die SZT das Immunsystem derart rekonstituiert haben, dass die antigenpositiven Tumorzellen immer stärker eliminiert werden. Das zuvor durch die Tumorzellen verdrängte blutbildende System im Knochenmark würde dabei durch die SZT mit neuen Stammzellen besetzt. Diese wären nun in der Lage, Immunzellen auszubilden, welche die verbleibenden, Antigen-exprimierenden Tumorzellen angreifen und somit zu einer Krankheitsremission führen.

Zu dieser Theorie würde passen, dass die hier ermittelte spontane humorale Immunantwort während der Therapie ansteigt. Dementsprechend könnten die Antikörper die messbare Auswirkung des rekonstituierten Immunsystems sein, welches sich gegen die verbliebenen Tumorzellen richtet. Wenn auch anhand einer geringen Stichprobe (7 Patienten), so konnte doch die gleiche Entwicklung von Atanackovic et al. beschrieben werden. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass die gemessenen Antikörpertiter gegen CT-Antigene erst nach einer SZT und zu keinem Zeitpunkt davor erschienen (Atanackovic et al. 2007).

Untersucht wurde allerdings nicht ausschließlich der Einfluss einer zweiten SZT generell, sondern auch die Art dieses Eingriffs im Rahmen einer Tandem-SZT. Diese beiden Therapieansätze, auto-auto-SZT und auto-allo-SZT, wurden in Bezug auf die CT-Antigenexpression und die humorale Immunantwort miteinander verglichen. Betrachtet man die CT-Antigenexpression, ist kein für alle CT-Antigene gleichermaßen geltender Unterschied zwischen auto-auto-SZT und auto-allo-SZT festzustellen. 4 der 10 getesteten CT-Antigene wurden vermindert nach auto-auto-SZT (NY-ESO-1, MAGE-A1, -A2, A10) und 4 nach auto-allo-SZT exprimiert (SSX-2, MAGE-A3, -C1, -C2). Die restlichen 2 CT-Antigene, MAGE-B3 und AKAP4, wurden zu keinem Zeitpunkt exprimiert. Signifikant waren zwei einzelne Ergebnisse, einmal der Expressionsrückgang nach auto-auto-SZT bei MAGE-A2 ($p < 0,001$) und nach auto-allo-SZT bei MAGE-C1 ($p < 0,001$). So lässt sich kein allgemeingültiger Unterschied in der Beeinflussung der Expression zwischen den beiden Therapieformen beschreiben.

Betrachtet man alle CT-Antigene zusammen und vergleicht die gleiche Patientengruppe vor und nach auto- bzw. allo-SZT wie in **Abbildung 12**, kann auch dort kein signifikanter Unterschied gezeigt werden, obwohl der Expressionsrückgang augenscheinlich nach allo-SZT deutlicher wird. Dieses Ergebnis kann durch die geringe Stichprobengröße (z.B. auto-auto-SZT-Gruppe $n = 7$) bedingt sein. Atanackovic et al. (2009) dagegen konnten zeigen, dass die CT-Antigenexpression bei

allen MM-Patienten nach Chemotherapie allein noch bei 100% lag, nach auto-SZT dagegen bei 77% und nach allo-SZT sogar bei 40%.

Die Frage, welche Art der Tandem-SZT die humorale Immunantwort am meisten beeinflusst, wurde ebenfalls beantwortet. Der bereits beobachtete Anstieg der Antikörperproduktion konnte anhand des Vorher-Nachher-Vergleichs einer gleichbleibenden Patientengruppe nach auto-allo-SZT als hoch signifikant ($p < 0,0001$) eingestuft werden. Nach auto-auto-SZT dagegen konnte kein signifikanter Anstieg der humoralen Immunantwort gezeigt werden, was allerdings auch hier der geringen Stichprobengröße geschuldet sein kann (auto-SZT-Gruppe $n = 9$). Dieses eindeutige Ergebnis entspricht einer Studie, in der 10 von 66 Patienten nach SZT eine humorale Immunantwort ausbildeten, von denen 9 eine allo-SZT und nur 1 eine auto-SZT erhielten (Atanackovic et al. 2007). Die Differenzierung der einzelnen CT-Antigene unterstützt ebenfalls dieses Ergebnis, indem der Anstieg der humoralen Immunantwort gegen 19 der 22 CT-Antigene nach auto-allo-SZT prozentual stärker ausgeprägt war als nach auto-auto-SZT. Nur gegen 2 der 22 CT-Antigene war das prozentuale Ergebnis nach auto-auto-SZT höher.

Für gewöhnlich werden bei der Gegenüberstellung der auto-auto- und auto-allo-SZT das Gesamt-, das progressionsfreie Überleben und die Antwortrate der zwei Patientengruppen miteinander verglichen. Da die übergeordnete Studie von Herrn Prof. Kröger am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) noch nicht abgeschlossen ist und der Großteil der Daten beim Abschluss dieser Arbeit noch nicht vorliegt, kann zu diesen Punkten keine eigene Aussage getroffen werden.

Abschließend kann gesagt werden, dass CT-Antigene insgesamt und NY-ESO-1 im Speziellen geeignete Ziele für gerichtete Immuntherapien darstellen. Die CT-Antigenexpression und die spontane humorale Immunantwort gegen diese Antigene werden durch eine Tandem-SZT beeinflusst, wobei die Expressionshäufigkeit über die Zeit signifikant absinkt und die Immunantwort ansteigt. Diese Entwicklung der Antikörperproduktion wird besonders nach auto-allo-SZT beobachtet.

4.3 Limitation der aktuellen Untersuchung

Wie bereits angedeutet, wurde eine sehr große Stichprobe an Patienten ($n = 156$ für die Antikörperantworten, $n = 140$ bei Expressionsdaten) bzw. Proben ($n = 434$ bzw. $n = 336$) für die Analysen verwendet. Da die übergeordnete Studie am

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE) von Herrn Prof. Kröger noch nicht abgeschlossen ist, fehlen für dieses große Patientenkollektiv in dieser Arbeit die Charakteristika wie Alter, Geschlecht etc. Die Auswertung bezog sich daher ausschließlich auf die ermittelten Daten und nicht auf klinische Parameter. Verbunden mit dem großen Patientenkollektiv ist außerdem die lediglich semiquantitative Analyse mittels Reverse-Transkriptase-PCR und IgG-ELISA. Bei kleinerem Stichprobenumfang ist eine quantitative Real-Time-PCR zur Expressionsanalyse bzw. bei zusätzlich ausreichend hohen OD-Werten eine Titerbestimmung bei der Analyse humoraler Immunantworten möglich.

Ein weiterer Kritikpunkt ist die Heterogenität der Proben in Bezug auf Anzahl, Zeitpunkte vor bzw. nach SZT und Zugehörigkeit zur auto- bzw. allo-SZT-Gruppe. Einige Proben mussten daher mangels Daten zum Abnahmezeitpunkt und Art der zweiten SZT aus der Auswertung ausgeschlossen werden.

5. Zusammenfassung

Das Multiple Myelom (MM) ist eine Tumorerkrankung des Knochenmarks. Trotz wirksamer Therapien wie der Chemotherapie und der autologen Stammzelltransplantation (SZT) ist die Rückfallrate hoch. Zur Therapieoptimierung wurde daher in einer übergeordneten, prospektiven Multicenter-Studie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf die Tandem-SZT untersucht, bei welcher auf eine autologe SZT entweder eine allogene (auto-allo-SZT) oder eine weitere autologe SZT (auto-auto-SZT) folgt.

Diese Arbeit befasste sich mit der Auswirkung dieser Tandem-SZT auf die Expression von bestimmten tumorspezifischen Antigenen, den Cancer-Testis-(CT)-Antigenen, und der spontanen humoralen Immunantwort gegen diese. Zu diesem Zweck wurden die Expressionsdaten von 10 CT-Antigenen bei 140 MM-Patienten mittels RT-PCR und die humorale Immunantwort gegen 22 CT-Antigene bei 156 MM-Patienten mittels IgG-ELISA zu mehreren Zeitpunkten vor und nach der zweiten SZT untersucht.

Die zentrale Beobachtung ist hierbei das gleichzeitige Absinken der Antigenexpression und das signifikante Ansteigen der humoralen Immunantwort nach Tandem-SZT. Diese reziproke Tendenz, die sich auch an einzelnen CT-Antigenen oder Patienten darstellen lässt, könnte auf eine positive Beeinflussung des Immunsystems durch eine zweite SZT hindeuten. Das Ansteigen der humoralen Immunantwort ist nach auto-allo-SZT signifikant nachweisbar, nicht jedoch nach auto-auto-SZT. Ebenso zeigt sich der prozentuale Anstieg der humoralen Immunantwort nach einer auto-allo-SZT bei der Mehrzahl der CT-Antigene (19 von 22) stärker als nach einer auto-auto-SZT.

Neben dem Einfluss einer Tandem-SZT wurde auch die generelle Expression von bzw. humorale Immunantwort gegen CT-Antigene im Hinblick auf gerichtete Immuntherapien untersucht. Dass einerseits knapp 50% der MM-Patienten zu mindestens einem Zeitpunkt ein CT-Antigen exprimierten und andererseits knapp 50% mindestens einmal gegen ein CT-Antigen Antikörper bildeten, zeigt das Potenzial dieser Antigene als Zielstrukturen für gerichtete Tumorthérapien. Besonders hervorzuheben ist hierbei das CT-Antigen NY-ESO-1, da es sowohl zu den am häufigsten exprimierten als auch den potentesten immunogenen CT-Antigenen zählt.

Insgesamt zeigen das Absinken der Expression und der Anstieg der humoralen Immunantwort besonders nach auto-allo-SZT eine Beeinflussung des Immunsystems nach Tandem-SZT. Ob diese auch eine Krankheitsremission bedeutet, muss nach

Abschluss der Studie noch untersucht werden. Deutlich gezeigt werden konnte allerdings das Potenzial der CT-Antigene im Allgemeinen und von NY-ESO-1 im Speziellen als Zielstrukturen für die gerichtete Immuntherapie beim MM.

Summary

The multiple myeloma (MM) is a neoplasia of the bone marrow. Despite therapies like chemotherapy and autologous stem cell transplantation (SCT) the rate of relapse is still high. In order to optimize the therapy there has been an investigation on the effects of a tandem-SCT on MM patients at the Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. A tandem-SCT is defined as an autologous SCT which is either followed by an allogenic SCT (auto-allo-SCT) or an autologous SCT (auto-auto-SCT).

This work is focused on the influence of tandem-SCT on the expression of certain tumour specific antigens, called Cancer-Testis-(CT)-antigens, and on the humoral immune response against them. The investigation included the expression rates of 10 CT-antigens (140 patients) and also the humoral immune responses to 22 CT-antigens (156 patients) regarding several dates before and after the second SCT.

The decreasing expression of CT-antigens and the significantly increasing humoral immune responses after tandem-SCT are the main results of this work. Being also shown with single antigens or single patients this inverse trend might be an indication for the second SCT's positive influence on the immune system. In contrast to the auto-auto-SCT, the auto-allo-SCT leads to a significant increase of the humoral response. On top of that the percentage increase of humoral immune responses to most CT-antigens (19 out of 22) was higher after auto-allo-SCT than after auto-auto-SCT.

Aside from that, the general expression of CT-antigens and the general occurrence of humoral immune responses have been investigated: around 50% of MM patients expressed at least one antigen once at a specific date and around 50% of them had at least one humoral immune response to an antigen. Interestingly, the CT-antigen NY-ESO-1 is not only expressed the most often but is also the most immunogenic antigen.

In summary, expression of CT-antigens and humoral immune responses are effected especially by auto-allo-SCT. Further investigation will show if this correlates with remission of disease. The role of NY-ESO-1 in targeted therapy could be underlined.

6. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
allo	allogen
auto	autolog
B	Bortezomib
BP	Blutplasma
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
C	Cyclophosphamid
ca.	zirka
(PET)-CT	(Positronen-Emissions-)Computertomographie
CT	Cancer Testis
D	Dexamethason
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D-PBS(-Tween)	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (-Tween)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
engl.	englisch
Fc	konstantes Fragment
fwd	forwards / vorwärts
g	Gramm
GST	Glutathion-S-Transferase
HCl	Salzsäure
Ig	Immunglobulin
ISS	International Staging System
KM	Knochenmark
l	Liter
lat.	lateinisch
M	Melphalan oder Monate
m ²	Quadratmeter
µg/µl	mikrogramm /-liter
mg/ml	Milligramm /-liter

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGUS	Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz
MM	Multiples Myelom
MRT	Magnetresonanztomographie
n	Anzahl
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
nm/nM	Nanometer / Nanomol
OD	optische Dichte = Extinktion
P	Prednison
Pat.	Patienten/innen
PB	peripheres Blut
(RT-)PCR	Reverse Transkriptase – Polymerase Kettenreaktion
PNPP	Para-Nitrophenylphosphat
rev	reverse / entgegengesetzt
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
SZT	Stammzelltransplantation
T	Thalidomid
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TT	Tetanus Toxoid
u.a.	unter anderem
z.B.	zum Beispiel

7. Literaturverzeichnis

- Abelev, G.I. et al., 1963. Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplantation*, 1, pp.174–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14010646> [Accessed August 16, 2013].
- Ademuyiwa, F.O. et al., 2012. NY-ESO-1 cancer testis antigen demonstrates high immunogenicity in triple negative breast cancer. *PloS one*, 7(6), p.e38783. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3386262&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 23, 2013].
- Adler, M.J. & Dimitrov, D.S., 2012. Therapeutic antibodies against cancer. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.*, 26(3), pp.447–481.
- Akcakanat, A. et al., 2004. NY-ESO-1 expression and its serum immunoreactivity in esophageal cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 54(1), pp.95–100. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15118836> [Accessed August 18, 2013].
- Alexander, D.D. et al., 2007. Multiple myeloma: a review of the epidemiologic literature. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 120 Suppl , pp.40–61. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17405120> [Accessed June 7, 2013].
- Andrade, V.C.C. et al., 2008. Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients. *Cancer immunity*, 8(October 2007), p.2. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2935785&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Atanackovic, D. et al., 2007. Cancer-testis antigens are commonly expressed in multiple myeloma and induce systemic immunity following allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 109(3), pp.1103–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17023585> [Accessed September 19, 2013].
- Atanackovic, D. et al., 2010. Cancer-testis antigens MAGE-C1/CT7 and MAGE-A3 promote the survival of multiple myeloma cells. *Haematologica*, 95(5), pp.785–93. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2864385&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 20, 2014].
- Atanackovic, D. et al., 2009. Longitudinal analysis and prognostic effect of cancer-testis antigen expression in multiple myeloma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(4), pp.1343–52. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19190130> [Accessed February 5, 2013].
- Attal, M. et al., 1996. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Français du Myélome. *The New England journal of medicine*, 335(2), pp.91–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8649495> [Accessed July 13, 2013].
- Attal, M. et al., 2003. Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *The New England journal of medicine*, 349(26), pp.2495–502. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14695409> [Accessed July 13, 2013].

- Bannas, P. & Kröger, N., 2012. Modern Imaging Techniques in Patients with Multiple Myeloma. *RoFo: Fortschritte auf dem ...*, 185(1), pp.26–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23196838> [Accessed February 9, 2013].
- Van Baren, N. et al., 1999. Genes encoding tumor-specific antigens are expressed in human myeloma cells. *Blood*, 94(4), pp.1156–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10438702> [Accessed August 16, 2013].
- Barlogie, B. et al., 2010. Long-term follow-up of autotransplantation trials for multiple myeloma: update of protocols conducted by the intergroupe francophone du myelome, southwest oncology group, and university of arkansas for medical sciences. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(7), pp.1209–14. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2834471&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 13, 2013].
- Van der Bruggen, P. et al., 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science (New York, N.Y.)*, 254(5038), pp.1643–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1840703>.
- Bruno, B. et al., 2007. A comparison of allografting with autografting for newly diagnosed myeloma. *The New England journal of medicine*, 356(11), pp.1110–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22897964>.
- Caballero, O. & Chen, Y., 2009. Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer science*, 100(11), pp.2014–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19719775> [Accessed August 16, 2013].
- De Carvalho, F. et al., 2011. Evaluation of LAGE-1 and NY-ESO-1 expression in multiple myeloma patients to explore possible benefits of their homology for immunotherapy. *Cancer immunity*, 11(January), p.1. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3077292&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 19, 2013].
- De Carvalho, F. et al., 2013. MAGE-C1/CT7 and MAGE-C2/CT10 are frequently expressed in multiple myeloma and can be explored in combined immunotherapy for this malignancy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 62(1), pp.191–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23180015> [Accessed February 21, 2013].
- Cavo, M. et al., 2007. Prospective, randomized study of single compared with double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma: Bologna 96 clinical study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(17), pp.2434–41. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17485707> [Accessed July 13, 2013].
- Chen, Y.T. et al., 1997. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(5), pp.1914–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=20017&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Child, J.A. et al., 2003. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *The New England journal of medicine*, 348(19), pp.1875–83. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12736280> [Accessed July 13, 2013].

- Chiriva-Internati, M. et al., 2008. AKAP-4: a novel cancer testis antigen for multiple myeloma. *British journal of haematology*, 140(4), pp.465–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18217892> [Accessed September 19, 2013].
- Chou, T., 2012. Multiple myeloma : recent progress in diagnosis and treatment. *Journal of clinical and experimental hematopathology : JCEH*, 52(3), pp.149–59. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23269074>.
- Condomines, M. et al., 2007. Cancer/testis genes in multiple myeloma: expression patterns and prognosis value determined by microarray analysis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 178(5), pp.3307–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17312182> [Accessed September 19, 2013].
- Corradini, P. et al., 1993. Mutational activation of N- and K-ras oncogenes in plasma cell dyscrasias. *Blood*, 81(10), pp.2708–13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8490179> [Accessed July 11, 2013].
- Coulie, P.G. et al., 1993. Genes coding for tumor antigens recognized by human cytolytic T lymphocytes. *Journal of immunotherapy with emphasis on tumor immunology : official journal of the Society for Biological Therapy*, 14(2), pp.104–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8280701> [Accessed August 16, 2013].
- Curioni-Fontecedro, A. et al., 2008. MAGE-C1/CT7 is the dominant cancer-testis antigen targeted by humoral immune responses in patients with multiple myeloma. *Leukemia*, 22(8), pp.1646–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18323799> [Accessed September 19, 2013].
- Davis, I.D. et al., 2004. Recombinant NY-ESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4(+) and CD8(+) T cell responses in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(29), pp.10697–702. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=489997&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 18, 2013].
- Dimopoulos, M. et al., 2009. International myeloma working group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple Myeloma. *Leukemia*, 23(9), pp.1545–56. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19421229> [Accessed July 10, 2013].
- Drach, J. et al., 1998. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood*, 92(3), pp.802–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9680348> [Accessed July 11, 2013].
- Druker, B.J., 2003. David A. Karnofsky Award lecture. Imatinib as a paradigm of targeted therapies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(23 Suppl), p.239s–245s. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14645403> [Accessed August 14, 2013].
- Durie, B. et al., 2003. Myeloma management guidelines: a consensus report from the Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation. *The hematology journal : the official journal of the European Haematology Association / EHA*, 4(6), pp.379–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14671610>.
- Durie, B. & Salmon, S., 1975. A Clinical Staging System for Multiple Myeloma. *Cancer*, 36(3).

- Durie, B.G.M., 2006. The role of anatomic and functional staging in myeloma: description of Durie/Salmon plus staging system. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 42(11), pp.1539–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16777405> [Accessed June 18, 2013].
- Ehrlich, P., 1908. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 5, pp.273–290.
- Ellis, L.M. & Hicklin, D.J., 2008. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nature reviews. Cancer*, 8(8), pp.579–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18596824> [Accessed August 9, 2013].
- Fichtner, S. et al., 2015. Association of Antigen-Specific T-cell Responses with Antigen Expression and Immunoparalysis in Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research*, 21(18), pp.1712–1722. Available at: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-14-1618>.
- Garban, F. et al., 2006. Prospective comparison of autologous stem cell transplantation followed by dose-reduced allograft (IFM99-03 trial) with tandem autologous stem cell transplantation (IFM99-04 trial) in high-risk de novo multiple myeloma. *Blood*, 107(9), pp.3474–80. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16397129> [Accessed July 13, 2013].
- Gold, P. & Freedman, S.O., 1965. Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *The Journal of experimental medicine*, 122(3), pp.467–81. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2138078&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 16, 2013].
- Greipp, P.R. et al., 2005. International staging system for multiple myeloma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(15), pp.3412–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15809451> [Accessed June 18, 2013].
- Gure, A.O. et al., 2005. Cancer-testis genes are coordinately expressed and are markers of poor outcome in non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 11(22), pp.8055–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16299236> [Accessed August 9, 2013].
- Hallek, M., Bergsagel, P.L. & Anderson, K.C., 1998. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood*, 91(1), pp.3–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9414264> [Accessed July 11, 2013].
- Heo, C.-K., Bahk, Y.Y. & Cho, E.-W., 2012. Tumor-associated autoantibodies as diagnostic and prognostic biomarkers. *BMB reports*, 45(12), pp.677–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23261052> [Accessed August 27, 2013].
- Hughes, B., 2010. Antibody-drug conjugates for cancer: poised to deliver? *Nature reviews. Drug discovery*, 9(9), pp.665–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20811367> [Accessed August 15, 2013].
- Hunder, N.N. et al., 2008. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *The New England journal of medicine*, 358(25), pp.2698–703. Available at:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3277288&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 18, 2013].
- Hungria, V.T.D.M. et al., 2013. Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma treatment: Associação Brasileira de Hematologia e Hemoterapia e Terapia Celular Project guidelines: Associação Médica Brasileira - 2012. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*, 35(3), pp.201–17. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3728136&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 23, 2013].
- Hurwitz, H. et al., 2004. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*, 350(23), pp.2335–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15175435> [Accessed August 15, 2013].
- Ichimaru, M. & Mabuchi, K., 1991. Multiple Myeloma among Atomic Bomb Survivors. *Journal of Radiation Research*, 32, pp.168–171.
- Jäger, E. et al., 2000. Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), pp.12198–203. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=17318&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 18, 2013].
- Jäger, E. et al., 2006. Recombinant vaccinia/fowlpox NY-ESO-1 vaccines induce both humoral and cellular NY-ESO-1-specific immune responses in cancer patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(39), pp.14453–8. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1570182&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Jekarl, D.W. et al., 2013. Impact of genetic abnormalities on the prognoses and clinical parameters of patients with multiple myeloma. *Annals of laboratory medicine*, 33(4), pp.248–54. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3698302&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 11, 2013].
- June, C.H., 2007. Science in medicine Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *J. Clin. Invest.*, 117(6), pp.1466–1476.
- Kalejs, M. & Erenpreisa, J., 2005. Cancer/testis antigens and gametogenesis: a review and “brain-storming” session. *Cancer cell international*, 5(1), p.4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=552320&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 30, 2013].
- Khalil, M. & Vonderheide, R., 2007. Anti-CD40 agonist antibodies : preclinical and clinical experience. *Update Cancer Ther.*, 2(2), pp.61–65.
- Klein, B. et al., 1989. Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood*, 73(2), pp.517–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2783861> [Accessed July 11, 2013].
- Kumar, A. et al., 2009. Tandem versus single autologous hematopoietic cell transplantation for the treatment of multiple myeloma: a systematic review and meta-analysis. *Journal*

- of the National Cancer Institute, 101(2), pp.100–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19141779> [Accessed July 13, 2013].
- Kumar, S. et al., 2012. Randomized, multicenter, phase 2 study (EVOLUTION) of combinations of bortezomib, dexamethasone, cyclophosphamide, and lenalidomide in previously untreated multiple myeloma. *Blood*, 119(19), pp.4375–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22422823> [Accessed June 27, 2013].
- Kumar, S.K. et al., 2009. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*, 84(12), pp.1095–110. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2787395&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 11, 2013].
- Kuwako, K., Taniura, H. & Yoshikawa, K., 2004. Necdin-related MAGE proteins differentially interact with the E2F1 transcription factor and the p75 neurotrophin receptor. *The Journal of biological chemistry*, 279(3), pp.1703–12. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14593116> [Accessed August 16, 2013].
- Kyle, R. et al., 2010. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management. *Leukemia*, 24(6), pp.1121–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20410922> [Accessed July 12, 2013].
- Kyle, R. et al., 2003. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clinic proceedings. Mayo Clinic*, 78(1), pp.21–33. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12528874>.
- Kyle, R. & Rajkumar, S., 2009. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*, 23(1), pp.3–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2627786&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 26, 2013].
- Laban, S. et al., 2014. Simultaneous cytoplasmic and nuclear protein expression of melanoma antigen-A family and NY-ESO-1 cancer-testis antigens represents an independent marker for poor survival in head and neck cancer. *International Journal of Cancer*, 135(5), pp.1142–1152.
- Lendvai, N. et al., 2010. Cellular immune responses against CT7 (MAGE-C1) and humoral responses against other cancer-testis antigens in multiple myeloma patients. *Cancer immunity*, 10(August 2009), p.4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2926649&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 19, 2013].
- Lewis, E.B., 1963. Leukemia, Multiple Myeloma, and Aplastic Anemia in American Radiologists. *Science*, 42, pp.1492–1494.
- Lim, S.H., Zhang, Y. & Zhang, J., 2012. Cancer-testis antigens: the current status on antigen regulation and potential clinical use. *American journal of blood research*, 2(1), pp.29–35. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3301432&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 16, 2013].

- Ludwig Institute for Cancer Research, 2015. CTDATABASE. Available at: <http://www.cta.lncc.br/> [Accessed August 31, 2015].
- Luetkens, T. et al., 2014. Functional autoantibodies against SSX-2 and NY-ESO-1 in multiple myeloma patients after allogeneic stem cell transplantation. *Cancer immunology, immunotherapy*, pp.1151–1162. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25078248> [Accessed October 16, 2014].
- Mak, T.W. & Saunders, M.E., 2006. Introduction to the Immune Response. In *The Immune Response Basic and Clinical Principles*. Elsevier Inc, pp. 17–33.
- Martinelli, E. et al., 2009. Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. *Clinical and experimental immunology*, 158(1), pp.1–9. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2759052&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 15, 2013].
- Mateos, M.-V. et al., 2010. Bortezomib plus melphalan and prednisone compared with melphalan and prednisone in previously untreated multiple myeloma: updated follow-up and impact of subsequent therapy in the phase III VISTA trial. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(13), pp.2259–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20368561> [Accessed June 18, 2013].
- Mehta, J. & Singhal, S., 1998. Graft-versus-myeloma. *Bone marrow transplantation*, 22(9), pp.835–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9827810> [Accessed July 14, 2013].
- Mellman, I., Coukos, G. & Dranoff, G., 2011. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*, 480(7378), pp.480–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22193102> [Accessed August 7, 2013].
- Morgan, G.J. et al., 2012. Cyclophosphamide, thalidomide, and dexamethasone as induction therapy for newly diagnosed multiple myeloma patients destined for autologous stem-cell transplantation: MRC Myeloma IX randomized trial results. *Haematologica*, 97(3), pp.442–50. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3291601&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 14, 2013].
- Morgan, G.J. & Davies, F.E., 2013. Role of thalidomide in the treatment of patients with multiple myeloma. *Critical reviews in oncology/hematology*, pp.1–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23827438> [Accessed July 11, 2013].
- Morgan, G.J., Walker, B. a. & Davies, F.E., 2012. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature reviews. Cancer*, (April), pp.1–13.
- National Cancer Institute, 2013. National Cancer Institute SEER Cancer Statistics Review 1975-2010. , pp.1992–2010.
- Neri, A. et al., 1993. p53 gene mutations in multiple myeloma are associated with advanced forms of malignancy. *Blood*, 81(1), pp.128–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8417784> [Accessed July 11, 2013].
- Old, L.J., 2001. Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer immunity*, 1, p.1. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12747762> [Accessed August 28, 2013].

- Pabst, C. et al., 2010. Expression and prognostic relevance of MAGE-C1/CT7 and MAGE-C2/CT10 in osteolytic lesions of patients with multiple myeloma. *Experimental and Molecular Pathology*, 89(2), pp.175–181. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2010.06.011>.
- Palumbo, A. et al., 2009. International Myeloma Working Group guidelines for the management of multiple myeloma patients ineligible for standard high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation. *Leukemia*, 23(10), pp.1716–30. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19494840> [Accessed June 17, 2013].
- Palumbo, A. & Anderson, K., 2011. Multiple myeloma. *The New England journal of medicine*, 364(11), pp.1046–60.
- Palumbo, A. & Cerrato, C., 2013. Diagnosis and therapy of multiple myeloma. *The Korean journal of internal medicine*, 28(3), pp.263–73. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3654121&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Pujol, J.-L. et al., 2015. *Safety and Immunogenicity of MAGE-A3 Cancer Immunotherapeutic with or without Adjuvant Chemotherapy in Patients with Resected Stage IB to III MAGE-A3-Positive NSCLC*, Available at: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=01243894-900000000-98933>.
- Rajkumar, S.V. et al., 2006. Phase III clinical trial of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone alone in newly diagnosed multiple myeloma: a clinical trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(3), pp.431–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16365178> [Accessed July 12, 2013].
- Reuschenbach, M., von Knebel Doeberitz, M. & Wentzensen, N., 2009. A systematic review of humoral immune responses against tumor antigens. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, 58(10), pp.1535–44. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2782676&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed February 23, 2013].
- Rhee, F. Van et al., 2005. NY-ESO-1 is highly expressed in poor-prognosis multiple myeloma and induces spontaneous humoral and cellular immune responses. *Blood*, 105(10), pp.3939–44. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1895070&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 19, 2013].
- Richardson, P.G. et al., 2010. Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*, 116(5), pp.679–86. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3324254&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 14, 2013].
- Robbins, P.F. et al., 2011. Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 29(7), pp.917–24. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3068063&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 8, 2013].

- Robert, C. et al., 2011. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *The New England journal of medicine*, 364(26), pp.2517–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21639810>.
- Roccaro, A.M. et al., 2009. MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma. *Blood*, 113(26), pp.6669–80. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2710922&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 11, 2013].
- Russo, V. et al., 2013. Clinical and immunologic responses in melanoma patients vaccinated with MAGE-A3-genetically modified lymphocytes. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 132(11), pp.2557–66. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23151995> [Accessed June 20, 2013].
- Saito, T. et al., 2014. High expression of MAGE-A4 and MHC class I antigens in tumor cells and induction of MAGE-A4 immune responses are prognostic markers of CHP-MAGE-A4 cancer vaccine. *Vaccine*, 32(45), pp.5901–5907. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X14012171>.
- Saltykow, S., 1903. Beitrag zur Kenntnis des Myeloms. *Virchows Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin*, 173(3), p.pp 531–538.
- Sarnaik, A.A. & Weber, J.S., 2009. Recent advances using anti-CTLA-4 for the treatment of melanoma. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 15(3), pp.169–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19556898> [Accessed August 15, 2013].
- Scott, A.M. et al., 2007. A phase I clinical trial with monoclonal antibody ch806 targeting transitional state and mutant epidermal growth factor receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(10), pp.4071–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1805701&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Scott, A.M., Wolchok, J.D. & Old, L.J., 2012. Antibody therapy of cancer. *Nature reviews. Cancer*, 12(4), pp.278–87. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22437872> [Accessed August 7, 2013].
- Shichijo, S. et al., 1996. Induction of MAGE genes in lymphoid cells by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Japanese journal of cancer research : Gann*, 87(7), pp.751–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8698626> [Accessed August 28, 2013].
- Shoenfeld, Y. et al., 1982. Familial multiple myeloma. A review of thirty-seven families. *Postgraduate Medical Journal*, 58, pp.12–16.
- Silbermann, R. & Roodman, G.D., 2010. Myeloma Bone Disease. In G. D. Roodman, ed. *Myeloma Bone Disease*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 1–13. Available at: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-1-60761-554-5> [Accessed July 14, 2013].
- Simpson, A.J.G. et al., 2005. Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nature reviews. Cancer*, 5(8), pp.615–25.
- Sirohi, B. et al., 2001. Comparison of new patients with Bence-Jones, IgG and IgA myeloma receiving sequential therapy: the need to regard these immunologic subtypes as

- separate disease entities with specific prognostic criteria. *Bone marrow transplantation*, 28(1), pp.29–37. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11498741>.
- De Smet, C. et al., 1999. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Molecular and cellular biology*, 19(11), pp.7327–35. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=84726&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 28, 2013].
- Stewart, K., Richardson, P. & San-Miguel, J., 2009. How I treat multiple myeloma in younger patients. *Blood*, 114(27), pp.5436–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19861683> [Accessed May 27, 2013].
- Stockert, E. et al., 1998. A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *The Journal of experimental medicine*, 187(8), pp.1349–54. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2212223&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed September 23, 2013].
- Svobodová, S. et al., 2011. Cancer-testis antigen expression in primary cutaneous melanoma has independent prognostic value comparable to that of Breslow thickness, ulceration and mitotic rate. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 47(3), pp.460–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21115342> [Accessed August 8, 2013].
- Szmania, S., Tricot, G. & van Rhee, F., 2006. NY-ESO-1 immunotherapy for multiple myeloma. *Leukemia & lymphoma*, 47(10), pp.2037–48. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17071474> [Accessed September 23, 2013].
- Taylor, B.J. et al., 2005. SSX cancer testis antigens are expressed in most multiple myeloma patients: co-expression of SSX1, 2, 4, and 5 correlates with adverse prognosis and high frequencies of SSX-positive PCs. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, 28(6), pp.564–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16224274> [Accessed September 23, 2013].
- The International Working Group, 2003. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *British journal of haematology*, 121(5), pp.749–57. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12780789>.
- Türeci, O. et al., 1998. Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(9), pp.5211–6. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=20240&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 16, 2013].
- Tyagi, P. & Mirakhur, B., 2009. Current Trial MAGRIT : The Largest-Ever Phase III Lung Cancer Trial Aims to Establish a Novel Tumor-Specific Approach to Therapy. *Clinical Lung Cancer*, 10(5), pp.371–374. Available at: <http://dx.doi.org/10.3816/CLC.2009.n.052>.
- Tyler, E.M. et al., 2014. Cancer-testis antigen 7 expression and immune responses following allogeneic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Cancer immunology research*, 2(6), pp.547–58. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24894092>.

- Vanneman, M. & Dranoff, G., 2012. Combining immunotherapy and targeted therapies in cancer treatment. *Nature reviews. Cancer*, 12(4), pp.237–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22437869> [Accessed August 6, 2013].
- Weiner, L., Murray, J. & Shuptrine, C., 2012. Antibody-based immunotherapy of cancer: New insights, new targets. *Cell*, 148(6), pp.1081–1084.
- Wirk, B. et al., 2013. Outcomes of salvage autologous versus allogeneic hematopoietic cell transplantation for relapsed multiple myeloma after initial autologous hematopoietic cell transplantation. *Journal of clinical medicine research*, 5(3), pp.174–84. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3651068&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Xu, Y. et al., 2015. Overexpression of MAGE-A9 Is Predictive of Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer. *Scientific Reports*, 5, p.12104. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/srep12104>.
- Zendman, A.J.W. et al., 2002. The XAGE family of cancer/testis-associated genes: alignment and expression profile in normal tissues, melanoma lesions and Ewing's sarcoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 99(3), pp.361–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11992404> [Accessed August 16, 2013].
- Zhang, H.-G. & Grizzle, W.E., 2011. Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(5), pp.959–64. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3155407&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 14, 2013].
- Zhang, W. et al., 2015. DNA hypomethylation-mediated activation of *Cancer/Testis Antigen 45 (CT45)* genes is associated with disease progression and reduced survival in epithelial ovarian cancer. *Epigenetics*, (August), pp.00–00. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15592294.2015.1062206>.
- Zhang, Y. et al., 2014. The clinical value of the quantitative detection of four cancer-testis antigen genes in multiple myeloma. *Molecular cancer*, 13, p.25. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3922338&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

8. Anhang

8.1 Tabellen

Tabelle 12. Zeitpunkte und Stichprobenumfang in **Abbildung 6**.

Zeitpunkt	Bedeutung	Stichprobenumfang n in Abbildung 6			
		1A oben	1A unten	1B oben	1B unten
prä-4	Registrierung	128	14	273	13
prä-3	vor Stammzellmobilisierung	420	45	966	46
prä-2	vor Hochdosis-Chemotherapie	206	23	441	21
prä-1	vor 2. SZT	592	62	1407	62
1-2M	1-2 Monate nach 2. SZT	30	3	84	4
4M	4 Monate nach 2. SZT	360	40	1008	48
6M	6 Monate nach 2. SZT	380	40	1134	49
12M	12 Monate nach 2. SZT	260	29	798	38
18M	18 Monate nach 2. SZT	207	21	630	28
24M	24 Monate nach 2. SZT	155	17	483	23
36M	36 Monate nach 2. SZT	55	6	105	5

8.2 Einverständniserklärung



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

Interdisziplinäre Klinik und
Poliklinik für
Stammzelltransplantation

Prof. Dr. Dr. h.c. A. R. Zander
Direktor

Onkologisches Zentrum

Martinistraße 52
20246 Hamburg
Telefon: (040) 7410-54850/51
Telefax: (040) 7410-53795
zander@uke.uni-hamburg.de
bmt@uke.uni-hamburg.de
www.kmt-hamburg.de

Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation
Martinistraße 52 20246 Hamburg



Zertifikat Nr. QS-3753HH
Zertifizierung nach ISO 9001:2008

Autolog-Allogene Tandem-Stammzelltransplantation und Erhaltungstherapie mit Thalidomid und Spenderlymphozyten-Infusion für Patienten mit Multiplem Myelom (MM) und einem Alter von 60 Jahren und jünger: Eine Phase II-Studie

Version: 29. Oktober 2009

**Vorname, Name und Geburtsdatum des
Patienten bzw. Patientenaufkleber**

A) Patienteninformation

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

bei Ihnen wurde eine bösartige Erkrankung des blutbildenden Systems festgestellt, und zwar eine so genanntes Multiples Myelom (MM).

Durch Medikamente, mit denen die bösartigen Zellen getötet werden (Chemotherapie), kann man den Krankheitsverlauf zwar günstig beeinflussen, die Heilungschancen bei Ihrer Erkrankung sind jedoch geringer als 2 %. Mit einer autologen Stammzelltransplantation kann der Krankheitsverlauf zwar insoweit verbessert werden, dass das Überleben verlängert wird, aber eine Heilung kann hiermit auch nicht erzielt werden. Gegenwärtig besteht die Standardtherapie für Patienten mit Multiplem Myelom und einem Alter unter 60 Jahren aus zwei solchen Hochdosistherapien, gefolgt von autologer (d. h. eigener) Blutstammzelltransplantation. Mit einer Knochenmark- oder Stammzelltransplantation von einem passenden Spender ist mit einer Heilung in etwa 30 % der Fälle zu rechnen. Auf Grund der mit dieser Therapieform verbundenen Risiken kommt es, je nach Alter und Krankheitsstadium, in circa 10 - 20 % der Fälle zu therapiebedingten Komplikationen, die tödlich sind. Aus diesem Grund wird diese Therapieform nur bei Patienten, die in einem gutem Allgemeinzustand und 65 Jahre oder jünger sind, durchgeführt.

Ziel der Studie

Das Ziel dieser Studie ist es, Ihnen auf Grund Ihres Alters von weniger als 60 Jahren zu ermöglichen, sich einer allogenen Stammzelltransplantation von einem verwandten oder unverwandten Spender zu unterziehen, um die potenzielle Heilungschance zu nutzen. Des Weiteren wird in der Studie eine Erhaltungstherapie mit der Substanz Thalidomid nach der Transplantation durchgeführt, um nach der Transplantation noch verbleibende Tumorzellen abzutöten und so das Rückfallrisiko zu senken.

Ablauf der Studie:

Wenn Sie die Einschlusskriterien wie "Alter weniger als 60 Jahre" und "weniger als acht vorherige Chemotherapien" erfüllen, werden Sie zunächst als potenzieller Studienpatient registriert. Wenn Sie mit der Teilnahme an der Studie einverstanden sind, wird bei Ihnen eine Spendersuche begonnen, und es werden dann zunächst Ihre eigenen Blutstammzellen gesammelt. Hierzu wird Ihnen entweder nur ein Wachstumsfaktor / Granulozyten-stimulierender Faktor (G-CSF) für vier bis fünf Tage ins Unterhautfettgewebe gespritzt, oder es wird eine Chemotherapie in Kombination mit G-CSF verabreicht, um die Blutstammzellen aus dem Knochenmark ins Blut zu mobilisieren. Danach werden die Blutstammzellen aus dem Blut mittels eines Zellseparators gesammelt und tiefgefroren. Zur selben Zeit wird für Sie eine Suche nach einem passenden Stammzellspender (zunächst in der Familie, sonst ein Fremdspender) eingeleitet. Danach werden Sie für circa drei Wochen stationär zur Durchführung der Hochdosistherapie und Transplantation der eigenen Stammzellen aufgenommen.

Falls vier Wochen nach der Hochdosistherapie kein passender Spender ausfindig gemacht werden konnte, wird acht Wochen nach der ersten Hochdosistherapie die zweite Hochdosistherapie in identischer Weise wie die erste Hochdosistherapie durchgeführt. Falls für Sie ein passender Familien- oder Fremdspender gefunden wurde, wird circa acht Wochen nach der ersten (autologen) Transplantation die allogene Stammzelltransplantation durchgeführt.

Hochdosistherapie mit autologer Blutstammzelltransplantation

Bei dieser Behandlung werden Ihnen an zwei aufeinander folgenden Tagen 100 mg/m² Melphalan über 30 Minuten infundiert. Am vierten Tag erfolgt die Rücktransfusion der Stammzellen. Dazwischen liegt ein Tag Pause.

Auf die Transplantation folgt gewöhnlich eine Zeit von 9 bis 14 Tagen, während der die transplantierten blutbildenden Vorläuferzellen noch keine entsprechende Anzahl von Blutzellen produzieren (einschließlich weißer Blutkörperchen, die zur Verhinderung von Infektionen erforderlich sind, Blutplättchen, die zur Verhinderung von Blutungen benötigt werden, und roter Blutkörperchen, die den Sauerstoff transportieren).

In dieser Zeit werden Ihnen Medikamente gegen Viren, Bakterien und Pilze vorbeugend gegeben.

Allgemeine und spezielle Nebenwirkungen der Hochdosistherapie mit Melphalan

Melphalan ist ein Zytostatikum, welches die Zellteilung hemmt. Betroffen durch diese Hemmung sind insbesondere diejenigen Zellen, die sich schnell teilen, also in erster Linie die Tumorzellen. Aber auch gesunde sich schnell teilende Zellen werden gehemmt. Hiervon sind vor allem das blutbildende Knochenmark, das Lymphgewebe, die Haare und der gesamte Magen-Darm-Trakt betroffen.

- Die Hemmung des Knochenmarks führt zum Mangel an weißen Blutkörperchen und damit zu einer Abwehrschwäche mit der Folge einer besonderen Infektionsgefährdung. Um das Risiko einer Infektion gering zu halten, werden vorbeugend Medikamente (z. B. Antibiotika) zum Infektionsschutz eingesetzt. Trotzdem können lebensbedrohliche Infektionen auftreten.
- Die Hemmung des Knochenmarks führt auch zu einem Mangel an roten Blutkörperchen (Erythrozyten) und an Blutplättchen (Thrombozyten). Zur Vermeidung von Blutarmut und Spontanblutungen erhalten Sie gegebenenfalls Bluttransfusionen. In seltenen Fällen können lebensbedrohliche Blutungen auftreten.
- Während der Therapie kann es zu Übelkeit und Erbrechen (circa 70 %) kommen, welche aber auch durch Medikamente in der Regel gut beherrscht werden. Appetitminderung sowie Entzündungen der Mund- und der Rachenschleimhaut treten häufig auf. Hier kann durch regelmäßiges Mundspülen und schmerzstillende Medikamente (u. a. auch Opiate) Linderung erreicht werden.
- Ein Haarverlust, vor allem der Kopfbehaarung (circa 95 %), aber auch der Barthaare, Augenbrauen, Wimpern und evtl. der Schamhaare, besteht in der Regel nur für sechs Monate. Es kann aber auch in einzelnen Fällen ein dauerhafter Haarverlust auftreten. Falls gewünscht, verordnen wir Ihnen in der Zwischenzeit eine Perücke.
- Durch die Chemotherapie ist bei Männern und Frauen mit einer Unfruchtbarkeit zu rechnen. Während der Therapie und bis zu drei Monaten danach muss auf eine strikte Schwangerschaftsverhütung geachtet werden, da eine Schädigung der Ei- bzw. Spermazellen oder des Embryos nicht auszuschließen ist. Bei Männern besteht die Möglichkeit, Samenflüssigkeit für eine eventuelle spätere künstliche Befruchtung aufzubewahren (dies muss vor Beginn der Chemotherapie erfolgen!).
- Bei Frauen werden während der Chemotherapie die Periodenblutungen ihre Regelmäßigkeit verlieren oder vorübergehend ganz verschwinden und auch die Wechseljahre verfrüht beginnen. Dadurch ausgelöste Beschwerden wie Hitzewallungen oder Schweißausbrüche können durch Hormonersatzbehandlung in der Regel unterbunden werden.

- Zytostatika-bedingte Nebenwirkungen auf Nervensystem, Herz sowie Nieren und ableitende Harnwege sind selten und meist nur vorübergehend.
- Die Gabe von Zytostatika kann es in 1 - 2 % der Fälle zu einem späteren Zeitpunkt zur Entwicklung von Zweittumoren bzw. Leukämien beitragen.
- Bei einem Prozentsatz von weniger als 2 % der Patienten muss mit dem Auftreten einer Lebervenenverschlusskrankheit (VOD) gerechnet werden. Dabei kommt es zu einer Leberfunktionsstörung, die zu Beginn mit einem Anstieg des gelben Blutfarbstoffs und einem Abfall der Zahl der Blutplättchen einhergeht. Diese seltene Nebenwirkung wird bei entsprechender Behandlung meist gut beherrscht, kann in seltenen Fällen aber auch tödlich verlaufen.
- Häufiger treten als Überempfindlichkeitsreaktionen Fieber und grippeähnliche Symptome auf.

Risiken und Nebenwirkungen der autologen Blutstammzelltransplantation

Die Rückgabe der zuvor durch Leukapherese gewonnenen körpereigenen Blutstammzellen kann in sehr seltenen Fällen durch allergische Reaktionen, Herz-Kreislaufschwäche, Entwicklung eines akuten Nierenversagens oder die Unfähigkeit der Stammzellen, sich im Knochenmark wieder anzusiedeln, kompliziert werden. Diese Komplikationen können auch lebensbedrohlichen Charakter haben.

Die Stammzelltransplantation selbst kann durch den Geschmack des Konservierungsmittels DMSO, welches zum Einfrieren der Stammzellen notwendig ist, unangenehm sein. DMSO wird in einer Konzentration von 10 % den körpereigenen Stammzellen zugesetzt. In der Regel erhalten Sie 10 - 15 ml davon. DMSO ist kein zugelassenes Arzneimittel für die intravenöse Gabe, es wird aber weltweit in der Stammzelltransplantation eingesetzt. Neben dem unangenehmen Geschmack können in sehr seltenen Fällen durch DMSO allergische Reaktionen und Herz-Kreislaufschwäche ausgelöst werden.

Risiken und Nebenwirkungen der Übertragung von Blutprodukten

Blutprodukte (Erythrozyten oder Thrombozyten) müssen bei entsprechendem Mangel ersetzt werden. Sie stammen von freiwilligen gesunden Blutspendern. Die Gabe von Blutprodukten kann zu allergischen Reaktionen mit Fieber, Schüttelfrost, Atemnot und Kreislaufschwäche führen. Die Blutprodukte und deren Spender werden sorgfältig auf Infektionen untersucht. Trotzdem besteht ein minimales Restrisiko, durch die Transfusionen Infektionen zu übertragen (inklusive Viren, die eine Leberentzündung, Hepatitis B/C-Erkrankung oder die AIDS-Erkrankung verursachen können). Hierüber erhalten Sie eine separate Aufklärung und Einwilligungserklärung, die als Anlage in Abschnitt 30.13 beigelegt ist.

Eingriffe vor der Studie

Es werden Blut-, Urin-, Knochenmark- und Röntgenuntersuchungen durchgeführt. Diese Untersuchungen sind notwendig, um den Erfolg der Therapie, die Erholung der Blutbildung und Komplikationen der Behandlung oder ein mögliches Wiederauftreten des Multiplen Myeloms frühzeitig feststellen und somit rascher und wirksamer therapieren zu können.

Selten, d.h. in weniger als 0.01 % der Fälle, kann es bei der Blutentnahme zu Nervenschädigungen kommen, die auch zu einer dauerhaften Schädigung des Nerven und zu chronischen Schmerzen führen kann sowie zu einer damit verbundenen Beeinträchtigung der Lebensführung.

Eine Knochenmarkpunktion wird vor Verabreichung der Transplantation durchgeführt. Weitere Knochenmarkpunktionen (etwa sechs Punktionen) werden während der drei Jahre nach der Transplantation möglicherweise auch zu anderen Zeitpunkten vorgenommen, um einen eventuellen Rückfall des Multiplen Myeloms festzustellen. Sie als Patientin/Patient werden mindestens vier Jahre lang hinsichtlich des Ergebnisses der Transplantation und des Krankheitsverlaufs nachbeobachtet.

Die Knochenmarkpunktion kann Schmerzen vom Nadeleinstich verursachen, und an der Einstichstelle kann ein Bluterguss (Hämatom) entstehen.

Allogene Stammzelltransplantation

Bei der allogenen Stammzelltransplantation werden nach der Chemotherapie die fremden Stammzellen transplantiert. Eine der Hauptkomplikationen, die nach einer allogenen Stammzelltransplantation auftreten können, ist die so genannte akute oder chronische Spender-gegen-Wirt-Reaktion, auch Graft-versus-Host-Disease (GvHD) genannt. Diese Reaktion wird durch die vom Spender übertragenen Lymphozyten hervorgerufen. Dabei greifen die Abwehrzellen Ihres Spenders unterschiedliche Organ Ihres Körpers, insbesondere Haut, Darm und Leber, an, so dass es zu Hautrötungen, Durchfall und auch zur Entwicklung einer nicht-ansteckenden Gelbsucht kommen kann. Diese Reaktion ist jedoch teilweise erwünscht, da diese Abwehrreaktion sich gleichzeitig auch gegen die verbliebenen Tumorzellen richtet. Trotzdem muss diese Abwehrreaktion mit Medikamenten, die das Immunsystem kontrollieren, unterdrückt werden. Hier wird insbesondere Ciclosporin A routinemäßig eingesetzt. Dieses Medikament müssen Sie nach der Transplantation noch bis circa zum Tag 180 einnehmen. Da dieses Medikament potentiell die Nieren schädigen kann, ist immer für ausreichende Flüssigkeitszufuhr zu sorgen.

Ein weiteres Medikament, das das Risiko einer so genannten Spender-gegen-Wirt-Reaktion reduzieren kann, ist Anti-T-Lymphozyten-Globulin (ATG). Das ATG ist ein vom Kaninchen hergestelltes Serum, welches zu einem Abfall der so genannten T-Zellen führt. Da ATG ein fremdes Eiweiß ist, kann es hier zu Nebenwirkungen wie Fieber (circa 90 %), Schüttelfrost (circa 80 %), Pulsanstieg (circa 90 %), Blutdruckabfall (circa 10 %), sehr selten auch zu einer allergischen Reaktion im Sinne von Atemnot oder Hautausschlag (< 5 %) kommen. Dieser Reaktion wird in der Regel durch ein entsprechendes Medikament, nämlich Kortison, vorgebeugt. Der Wert von ATG im Rahmen der Stammzelltransplantation ist noch unklar. Beobachtungen von einzelnen Arbeitsgruppen lassen jedoch vermuten, dass es durch das Hinzufügen von ATG in die Konditionierungstherapie zu einem Rückgang des Risikos einer akuten und chronischen Spender-gegen-Wirt-Reaktion kommen kann. Andererseits ist es potentiell möglich, dass der über die fremden Abwehrzellen vermittelte immunologische Effekt auf die Leukämiezellen auch durch das ATG minimiert werden kann. Unter ATG Fresenius kommt es aufgrund der langen Verweildauer im Blut auch zu einer verzögerten Erholung des Immunsystems nach der allogenen Transplantation, so dass bei diesem Medikament die Infektionsgefahr, insbesondere durch Viren erhöht ist.

Nachdem die Vorsorgeuntersuchungen, insbesondere von Lungen- und Herzfunktion, keine Einwände gegen die geplante Therapie zeigten, wird Ihnen zunächst stationär ein Katheter implantiert, über den Sie nun die Chemotherapie und das ATG erhalten. Beides sind Medikamente, die zum einen Ihre Krankheit bekämpfen und zum anderen Ihr Immunsystem unterdrücken, damit die übertragenen Stammzellen Ihres Spenders besser angenommen und nicht abgestoßen werden; ferner verhindern sie, dass eine schwerwiegende Spender-gegen-Wirt-Reaktion auftreten kann. Die Chemotherapie wird Ihnen intravenös verabreicht.

Die Nebenwirkungen der Chemotherapie von Melphalan sind insbesondere Haarverlust (fast 100 %, in weniger als 1 % der Fälle dauerhaft), Übelkeit (circa 90 %), Entzündung der Mundschleimhäute (circa 70 %), Infektanfälligkeit und Fieber durch Abfall der weißen Blutkörperchen und Blutungsneigung durch Abfall der Blutplättchen (80 - 90 %); Hautveränderungen im Sinne von Pigmentationen können in circa 30 - 50 % der Fälle auftreten. Eine hämorrhagische Zystitis (blutige Harnwegsinfektion) tritt in weniger als 10 % der Fälle auf. Als Organschäden können Störungen des Herzens (weniger als 1 % der Fälle) und (je nach Vorbehandlung) durch die gewählten Chemotherapiekombinationen Schäden der Leber in bis zu 30 % der Fälle auftreten. In der Regel sind Übertragungen von Blutkonserven notwendig, und wenn die Werte der Blutplättchen unter einen bestimmten Schwellenwert fallen, ist die Gabe von Thrombozytenkonzentraten notwendig. Auch erhalten Sie prophylaktisch Medikamente gegen Bakterien, Pilze und Viren, damit es nicht zu einer infektiösen Erkrankung kommt.

Nach Abschluss der Vorbehandlungen werden Ihnen die Stammzellen Ihres Spenders injiziert. In den darauf folgenden 2 – 3 Wochen kann es zu den oben beschriebenen Nebenwirkungen kommen. Nach circa zwei Wochen kommt es zu einem Anwachsen der Stammzellen.

Die Untersuchungen, die vor und nach der Transplantation durchgeführt werden (wie Herz-echo, Lungenfunktion sowie Bestimmung von Infektionszeichen im Serum) dienen dem rechtzeitigen Erkennen von Komplikationen und unterscheiden sich nicht von den Untersuchungen, die bei einer allogenen Stammzelltransplantation außerhalb dieser Studie erfolgen würden. Diese Untersuchungen haben folgende Risiken bzw. Nebenwirkungen:

- Blutentnahmen: Die Blutentnahmen erfolgen routinemäßig über den eingelegten zentralen Venenkatheter und sind somit mit keinerlei Schmerzen oder Risiken behaftet. Falls in der ambulanten Phase der Katheter bereits entfernt ist, wird das Blut in der Regel durch Venenpunktion gewonnen. Dafür wird eine sterile Nadel in eine entsprechende Vene des Arms gelegt. Dies ist meist mit einem kurzen Schmerz verbunden. Schwerwiegende Probleme ergeben sich hieraus nicht. In seltenen Fällen kann es, wenn die Thrombozytenwerte zu niedrig sind, auch zu geringen Nachblutungen oder Blutergüssen kommen. Unangenehme Empfindungen wie Schwindel oder Infektionen sind in weniger als 1 % der Fälle zu erwarten.
- Knochenmarkpunktionen: Um das Ergebnis der Transplantation festzustellen, aber auch um die Remission der Krankheit vor Transplantation zu beurteilen, muss eine knochenmarkzytologische Untersuchung vorgenommen werden. Hierzu wird Ihnen in lokaler Betäubung Knochenmark (in der Regel vom hinteren Beckenknochen) entnommen. Dazu werden nach Desinfektion die Haut und das Knochenperiost mit einem Lokalanästhetikum betäubt. Dieses Lokalanästhetikum kann in weniger als 2 % der Fälle zu allergischen Reaktionen führen. Das Knochenmark selbst wird nach Desinfektion und Lokalanästhesie mittels einer Sternalpunktionsnadel gewonnen. Hierzu werden die betäubte Haut und das Periost durchstoßen und das Knochenmark mittels einer sterilen Spritze aspiriert. Das Aspirieren selbst ist mit einem kurzzeitigen Schmerz verbunden. Nennenswerte Nebenwirkungen durch die Knochenmarkpunktion gibt es nicht. Es können jedoch Blutungen bei niedriger Thrombozytenzahl auftreten. In weniger als 1 % der Fälle kann es zu lokalen Infektionen oder sogar zum Abbrechen der Nadel kommen.
- Lungenfunktionsprüfung: Die Lungenfunktionsprüfung wird durchgeführt, um potentielle Komplikationen nach Transplantation rechtzeitig zu erkennen. Hierzu bekommen Sie ein Mundstück mit einem Schlauch und einer Nasenklammer und werden nach Aufforderung durch das Pflegepersonal verschiedene Atemübungen durchführen, worüber man dann die Lungenfunktion bestimmen kann. Schwerwiegende Probleme oder Nebenwirkungen ergeben sich aus dieser Untersuchung nicht.

- Herzecho: Um die Herzfunktion vor der Transplantation, aber auch nach der Transplantation zu beurteilen, wird mittels Ultraschalluntersuchung die Herzfunktion, insbesondere die Herzkraft, gemessen. Hierzu werden mittels eines Ultraschallkopfes nach Desinfektion der Haut im Bereich der linken Rippenapertur die Herzkammern bildlich dargestellt. Nennenswerte Nebenwirkungen oder Risiken ergeben sich durch diese Untersuchung nicht.

Die Produktion Ihres Knochenmarks von weißen Blutkörperchen (Leukozyten), roten Blutkörperchen (Erythrozyten) und Blutplättchen (Thrombozyten) wird noch mehrere Wochen vermindert sein, so dass ein Bedarf für Transfusionen von Erythrozyten und Thrombozyten besteht. Nachdem die Leukozyten und speziell die Untergruppe der Granulozyten eine sichere Konzentration erreicht haben, werden Sie von der Transplantationseinheit entlassen. Zunächst häufigere, später weniger häufige Besuche in der Ambulanz werden notwendig sein, um die weitere Entwicklung in der Nachtransplantationsphase zu begutachten und die notwendigen Medikamente einzustellen.

Die T-Zellen aus dem Knochenmark bzw. aus dem Stammzellpräparat Ihres Spenders haben nicht nur einen maßgeblichen Einfluß auf die Entwicklung einer Spender-gegen-Wirt-Reaktion (GvHD), sondern sie haben auch einen positiven Einfluß auf die Abtötung der Tumorzellen, so dass ein Teil dieser Zellen Ihnen auch noch später in Form einer Spritze zur Verstärkung dieses Effektes auf die Tumorzellen gegeben werden kann. Auch hier kann es, ähnlich wie zu Beginn der Behandlung, zu Komplikationen im Sinne einer Spender-gegen-Wirt-Reaktion kommen. Diese Lymphozyten bekommen Sie nach Absetzen der das Immunsystem unterdrückenden Medikamente insgesamt dreimal, um die Rückfallgefahr zu senken.

Zusammenfassend können folgende Nebenwirkungen durch die Behandlung auftreten (in Klammern: Häufigkeit des Auftretens):

- Akute Spender-gegen-Wirt-Reaktion (aGvHD) mit Hautexanthenen, schweren Durchfällen und starker Gelbsucht (circa 30 % bei Familienspender, circa 50 % bei Fremdspendern);
- chronische Spender-gegen-Wirt-Reaktion (cGvHD) mit Hautexanthenen, Muskel- und Gelenkbeteiligung. Schleimhautentzündungen des Mundes und Leberfunktionsstörungen (mildere Fälle bei Familienspendertransplantation: circa 20 %, bei Fremdspendertransplantation circa 30 %; schwerwiegende Verlaufsformen bei Familienspendertransplantation circa 5 %; bei Fremdspendertransplantation circa 10 %);
- Infektionen während der Transplantationsphase (circa 80 %);
- Entzündungen an den Schleimhäuten (Mucositis) des Mundes, des Rachen, der Speiseröhre, des Magens und des Darmes (circa 75 %);
- Blutungen während der akuten Transplantationsphase (Nasenbluten und selten Darmbluten) (weniger als 10 % der Fälle);
- interstitielle Pneumonien (Lungenentzündungen), die in den ersten drei Monaten nach Transplantation auftreten können (weniger als 10 % der Fälle);
- Nebenwirkungen des Ciclosporin A, wie z. B. Störungen der Nierenfunktion (weniger als 30 % der Fälle), Depressionen (weniger als 5 % der Fälle), Bluthochdruck (weniger als 20 % der Fälle), Krämpfe (weniger als 10 % der Fälle), außergewöhnlicher Haarwuchs (circa 40 %) und Übelkeit (circa 10 %);
- Nebenwirkungen des ATG FRESENIUS (Anti-T-Lymphozyten-Globulin): Fieber (90 – 100 %), Schüttelfrost (80 – 90 %), allergische Reaktionen (10 %), selten Veränderungen des Blutbildes und der Leberenzyme (weniger als 5 % der Fälle);

- falls es zu einer Spender-gegen-Wirt-Reaktion kommt, muss das Kortisonpräparat eingesetzt werden; hierbei können insbesondere Muskelschwäche, Verbreiterung des Gesichts, Schwäche der Knochenstruktur mit möglichen Knochenbrüchen oder Diabetes (Zuckerkrankheit) auftreten;
- Sterilität und (bei Frauen) Ausbleiben der Monatsblutung (circa 100 %);
- Verlust des Haupthaars, meist vorübergehend, (90 – 100 %, selten dauerhaft (weniger als 1 % der Fälle));
- selten Schädigung des Herzmuskels (insbesondere unter Cyclophosphamid, d. h. = Standardtherapie) (weniger als 1 % der Fälle);
- sehr selten dauerhafte Schädigung der Nierenfunktion (weniger als 1 % der Fälle);
- Abstoßungsreaktion des Knochenmark- bzw. Blutstammzelltransplantates; in diesem Falle würde ein zweites Transplantat vom Spender folgen (weniger als 5 % der Fälle);
- erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass in den nächsten 20 Jahren andere Tumoren auftreten können (weniger als 5 % der Fälle).

Behandlung mit Spenderlymphozyten nach Stammzelltransplantation

Um den Effekt der Abwehrzellen Ihres Spenders auf die Myelomzellen auch nach der Transplantation zu nutzen und somit das Rückfallrisiko zu senken, wird Ihnen zweimal (3 - 6 Monate nach der Transplantation) eine Spenderlymphozytengabe verabreicht. Dies geschieht in der Regel ambulant und erfordert keine besondere Vorbehandlung. Hier kann es aber, wie nach der Stammzelltransplantation, zum Auftreten einer akuten (circa 20 - 40 %) oder chronischen (15 %) Spender-gegen-Wirt-Reaktion (GvHD) kommen.

Erhaltungstherapie mit Thalidomid

Trotz der möglichen, heilenden Wirkung der allogenen Stammzelltransplantation kann es auch zu einem Rückfall der Erkrankung kommen. Das Risiko, einen Krankheitsrückfall zu erleiden, liegt zwischen 40 % und 50 %. Um das Rückfallrisiko zu senken, erhalten Sie nach der zweiten Transplantation (auch falls für Sie kein Spender gefunden wurde und Sie zwei autologe Stammzelltransplantationen erhalten haben) das beim Multiplen Myelom wirksame Medikament Thalidomid in einer Dosis von 100 mg täglich für zwei Jahre. Falls es bei Ihnen zu Nebenwirkungen unter Thalidomid kommt, muss die Dosis reduziert oder sogar das Medikament abgesetzt werden. Abgesetzt wird Thalidomid ebenfalls, falls es während dieser Therapie zu einem Krankheitsprogress kommt. Thalidomid wird einmal täglich (abends) in Tablettenform eingenommen.

Die Einnahme von Thalidomid-Kapseln erfolgt täglich in 28 Tage langen Zyklen und dauert insgesamt bis zu 24 Zyklen lang (zwei Jahre). Falls sich Ihre Erkrankung verschlimmert, wird das Arzneimittel abgesetzt.

Die Medikation mit Thalidomid wird im Rahmen der Studie gestellt.

Sie haben folgende Pflichten:

- Sie müssen die Studienmedikation laut Anweisung einnehmen und Ihrem Apotheker alle gebrauchten und nicht gebrauchten Blister-Packungen zurückgeben.
- Wenn Sie Thalidomid einnehmen, müssen Sie daran denken, Maßnahmen zur Empfängnisverhütung durchzuführen.
- Sie müssen den Studienarzt über alle Erkrankungen, Verletzungen, unerwarteten oder unangenehmen Nebenwirkungen oder Probleme informieren, die während der Studie auftreten.

- Sie müssen den Studienarzt benachrichtigen, wenn Sie beabsichtigen, sich operieren zu lassen oder andere medizinische Behandlungen oder Verfahren durchführen zu lassen.
- Falls Sie sich in irgendeiner Weise beeinträchtigt fühlen, müssen Sie jede Tätigkeit beenden, die zu einem Schaden für Sie selbst oder andere Personen oder zu Sachschäden führen könnte (z. B. Führen eines Fahrzeugs, Bedienen von Maschinen, Verwenden einer Leiter).
- **Die Studienmedikation muss sicher, unzugänglich und stets verschlossen aufbewahrt werden. Die Weitergabe der Studienmedikation ist unter keinen Umständen zulässig. Die Studienmedikation darf nur von Ihnen unter genauer Einhaltung der vom Studienarzt gegebenen Anweisungen eingenommen werden.**

Es ist sehr wichtig, dass Sie die oben genannten Punkte einhalten, da dies sonst Ihren Versicherungsschutz beeinträchtigen könnte.

Gebärfähige Frauen **müssen sich bereit erklären, zwei Verhütungsmethoden anzuwenden** (siehe dazu auch die Angaben im Abschnitt "*Welche möglichen Risiken bringt die Einnahme von Thalidomid mit sich?*"). Es ist außerdem wichtig, dass Sie nicht stillen, während Sie Thalidomid einnehmen.

Falls Sie ein Mann sind und eine Partnerin in gebärfähigem Alter haben, müssen Sie sich bereit erklären, Verhütungsmaßnahmen anzuwenden.

Welche möglichen Risiken bringt die Einnahme von Thalidomid mit sich?

Durch die Einnahme von Thalidomid könnte es bei Ihnen zu einer oder mehreren Nebenwirkungen kommen. Die möglichen Nebenwirkungen sind im Folgenden aufgeführt.

Mögliche Nebenwirkungen von Thalidomid

- Die Fortpflanzung betreffende Risiken von Thalidomid

Wichtige Informationen und Warnungen für alle Patienten, die Thalidomid einnehmen

Warnung: Schwerwiegende Geburtsschäden beim Menschen

Die Einnahme von Thalidomid in der Schwangerschaft kann zu schwerwiegenden Geburtsschäden oder zum Tod des Kindes im Mutterleib führen. Thalidomid darf nie von Frauen angewendet werden, die schwanger sind oder während der Einnahme des Arzneimittels schwanger werden könnten. Bereits eine einzige von einer Schwangeren eingenommene Dosis kann schwerwiegende Geburtsschäden hervorrufen.

Während Ihrer Teilnahme an dieser Studie sollten Sie nicht schwanger werden bzw. kein Kind zeugen. Sie sollten Ihren Säugling nicht stillen, während Sie an der Studie teilnehmen. Die folgenden Methoden zur Empfängnisverhütung sind zwingend vorgeschrieben. Wenn Sie eine Frau im gebärfähigen Alter sind, müssen Sie zwei Verhütungsmethoden (gleichzeitig) anwenden: eine höchst wirksame Methode (Intrauterinpessar (Spirale), Ovulationshemmer (Pille), Tubenligation oder Vasektomie des Partners) sowie eine weitere Methode (Kondom, Diaphragma oder Scheidenpessar). Frauen, bei denen eine Gebärmutterentfernung (Hysterektomie) vorgenommen wurde oder die postmenopausal sind und in den letzten 24 Monaten keine Regelblutung gehabt haben, müssen die beschriebenen Verhütungsmaßnahmen nicht anwenden.

Es ist bekannt, dass bei mit Thalidomid behandelten Männern auch im Samen Thalidomid feststellbar ist. Alle Männer sollten während des Geschlechtsverkehrs mit einer Frau ein Kondom verwenden (selbst Männer, bei denen eine Vasektomie durchgeführt wurde), während sie das Arzneimittel einnehmen sowie vier Wochen lang nach Beendigung der Behandlung. Männer sollten ihre Partnerinnen über das durch Thalidomid bestehende Risiko informieren und die Anwendung einer zweiten Verhütungsmethode zusätzlich zum Kondom erwägen.

Sie dürfen während der Behandlung mit Thalidomid und bis acht Wochen nach Beendigung der Arzneimittelaufnahme weder Samen noch Blut spenden.

Frauen, die noch eine Regelblutung haben und schwanger werden können, müssen vor der Teilnahme an dieser Studie einen Blutschwangerschaftstest durchführen. Ist der Schwangerschaftstest positiv, werden Sie nicht an der Studie teilnehmen können. Man wird Ihnen die Ergebnisse des Schwangerschaftstests mitteilen.

Ein Blut- oder Urin-Schwangerschaftstest wird jeweils innerhalb von 24 Stunden vor der Einnahme von Thalidomid durchgeführt. Während der Behandlung werden Blut- oder Urin-Schwangerschaftstests alle vier Wochen (bei Frauen mit regelmäßiger Regelblutung) oder alle zwei Wochen (bei unregelmäßiger Regelblutung) durchgeführt. Diese Tests werden innerhalb von 24 Stunden vor der Aushändigung des Thalidomid-Rezepts an Sie durchgeführt, und Sie müssen Ihr Rezept innerhalb von sieben Tagen in der Apotheke vorlegen.

Wird Thalidomid von einer Schwangeren eingenommen, führt dies bei dem ungeborenen Kind zu schweren Geburtsschäden. Eine einzelne Dosis Thalidomid kann Geburtsschäden bei Säuglingen hervorrufen. Unter anderem wurden bei Säuglingen, deren Mütter während der Schwangerschaft Thalidomid ausgesetzt waren, schwere Missbildungen an Armen und Beinen oder fehlende Gliedmaßen beobachtet. Aufgrund des Schweregrads dieser Schäden ist es äußerst wichtig, dass eine Schwangerschaft in jedem Fall vermieden wird, während Sie Thalidomid einnehmen.

Sie sollten die für Sie am besten geeigneten Verhütungsmethoden mit Ihrem Arzt besprechen.

Andere mögliche Nebenwirkungen von Thalidomid

- Es kann eine Nervenschädigung (periphere Neuropathie) in circa 50 % der Fälle auftreten, die in circa 15 % der Fälle auch schwerwiegend und manchmal dauerhaft sein kann. Symptome einer Nervenschädigung sind u. a. Prickeln, Schmerzen oder Taubheitsgefühl in Ihren Armen, Händen, Beinen und Füßen. Man wird Sie während dieser Studie regelmäßig auf eine Nervenschädigung hin untersuchen.
- Es können allergische Reaktionen in weniger als 10 % der Fälle auftreten; Symptome sind u. a. Ausschläge, manchmal Fieber und ein beschleunigter Herzschlag.
- Eine weitere genannte Nebenwirkung ist Benommenheit in circa 35 % der Fälle. Da Sie aber in dieser Studie Thalidomid vor dem Schlafengehen einnehmen werden, dürfte sich dies nicht störend auf Ihre Lebensweise auswirken. Falls es bei Ihnen zu Benommenheit kommt, sollten Sie keine Fahrzeuge führen (z.B. Auto fahren) oder Maschinen bedienen.
- Andere mögliche Nebenwirkungen sind Verstopfung (circa 20 % der Fälle), Schwindelgefühl (circa 20 % der Fälle), ein verlangsamter Herzschlag (Bradykardie) (weniger als 10 % der Fälle) und tiefe Venenthrombose (weniger als 5 % der Fälle).

Welchen Nutzen könnte die Teilnahme an der Studie haben?

Ein direkter Nutzen kann Ihnen durch die Teilnahme an der Studie nicht garantiert werden. Jedoch könnten Sie folgenden Nutzen aus ihr ziehen:

- Die Studienmedikation könnte Ihre Symptome lindern und/oder die Verschlimmerung Ihrer Erkrankung verzögern helfen oder Ihren Krankheitszustand verbessern.
- Ihr Krankheitszustand wird während der gesamten Studiendauer überwacht. Die im Rahmen der Studie geleisteten Dienste und erfolgenden Untersuchungen sind allerdings beschränkt und sollten nicht als Ersatz für eine gründliche Untersuchung, andauernde medizinische Versorgung oder Nachuntersuchung durch den Arzt, der Sie normalerweise behandelt, betrachtet werden.
- Sie werden anderen helfen, indem Sie einen Beitrag zur medizinischen Forschung leisten.

Welche Kosten hat die Teilnahme an der Studie für mich?

Die Studienmedikation wird Ihnen kostenlos zur Verfügung gestellt, und es werden Ihnen keine Kosten für studienrelevante Arzttermine, Laborarbeiten, Tests oder Verfahren entstehen.

Da die Knochenmarktransplantation / Stammzelltransplantation eine junge Behandlungsform ist, können theoretisch noch Nebenwirkungen auftreten, die bisher noch nicht beschrieben sind. Die möglichen Vorteile der allogenen Blutstammzelltransplantation liegen gegenüber den herkömmlichen Therapien in der größeren Wahrscheinlichkeit, eine langdauernde Remission und eine Heilung der zugrunde liegenden Erkrankung zu erreichen.

Sollten Sie sich gegen eine Teilnahme an dieser Studie aussprechen, wird Ihnen von den behandelnden Ärzten eine zweite autologe Stammzelltransplantation empfohlen.

Andere Behandlungsformen (außer der allogenen Stammzelltransplantationen) wurden mit Ihnen diskutiert:

- Verabreichung einer Chemotherapie zur Tumorreduktion (ohne Heilungschancen).
- Verabreichung von Kortison zur Tumorreduktion (ohne Heilungschancen).
- Alleinige autologe Stammzelltransplantation zur Überlebensverlängerung (ohne realistische Heilungschancen).

Ihre während Blutstammzelltransplantation erhobenen Behandlungsdaten werden anonym im europäischen und internationalen Bone Marrow Transplantation Register zur Verbesserung der Knochenmarktransplantation gespeichert.

Im Falle von weitergehenden Fragen oder sonstigem Klärungsbedarf steht Ihnen Herr Prof. Dr. Nicolaus Kröger unter Tel. 040-7410-55864 gern zur Verfügung.

Im Rahmen dieser Studie wurde für Sie eine Versicherung nach § 40, 41 Arzneimittelgesetz abgeschlossen bei

Allianz Versicherungs-AG
Versicherungs-Nr. 30-0446-530 2378/490
Ansprechpartner:
Ecclesia Milderberger Hospital GmbH
Frau Wind
Klingenbergstraße 4, 32758 Detmold
Tel. 05231/603-6434
Fax: 05231/603-606 434

Die Versicherungssumme pro Patient beträgt € 500.000,-, die Höchstleistung für alle Versicherungsfälle aus der klinischen Studie ist jedoch auf € 50.000.000,- begrenzt.

Ihre Teilnahme an der Studie ist freiwillig und kann jederzeit widerrufen werden; allerdings hat ein Abbruch der klinischen Prüfung nach Erhalt der hochdosierten Chemotherapie und vor der Reinfusion der Blutstammzellen mit sehr großer Wahrscheinlichkeit Ihren Tod zur Folge.

Der Versicherungsschutz besteht für studienbedingte Gesundheitsschäden, die innerhalb von fünf Jahren nach Abschluss während der Nachbeobachtungsphase der beim Versicherten durchgeführten klinischen Prüfung eingetreten sind und nicht später als zehn Jahre nach der Beendigung der klinischen Prüfung dem Versicherer gemeldet werden.

Die Allgemeinen Versicherungsbedingungen werden an Sie ausgehändigt.

Für klinische Studien gibt es eine Beratungsstelle beim

Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
Fachgebiet Klinische Prüfung / Inspektionen
Kurt-Georg-Kiesinger-Allee 3
53175 Bonn
Tel.: 0228-207-4318
Fax: 0228-207-4355
E-Mail: klinpruefung@bfarm.de

B) Patienteneinwilligungserklärung

- Über den Zweck und den Hergang der Knochenmark- bzw. Blutstammzelltransplantation wurde ich von Frau / Herrn Dr. _____ informiert und eingehend über Wirksamkeit, Nebenwirkungen sowie Risiken aufgeklärt. Ich hatte ausreichend Zeit, um eine Entscheidung zu fällen. Weitere Informationen kann ich jederzeit erfragen. Die Teilnahme an der Studie ist freiwillig und kann jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für meine medizinische Behandlung widerrufen werden; allerdings hat ein Abbruch der klinischen Prüfung nach Erhalt der hochdosierten Chemotherapie und vor der Reinfusion der Blutstammzellen mit sehr großer Wahrscheinlichkeit meinen Tod zur Folge.
- Bezüglich der Behandlung mit Thalidomid:
 - ***Für erwachsene (gebärfähige) Patientinnen***
 1. Ich habe verstanden, dass es bei Anwendung von Thalidomid zu schweren Geburtsschäden kommen kann. Ich wurde von meinem Arzt gewarnt, dass für jedes Kind im Mutterleib ein hohes Risiko von Geburtsschäden besteht und dass es sogar sterben könnte, wenn eine Frau während der Einnahme von Thalidomid schwanger ist oder schwanger wird.
 2. Ich habe verstanden, dass ich Thalidomid nicht einnehmen darf, wenn ich schwanger bin, ein Kind stille oder wenn ich schwanger werden könnte und die zwei notwendigen Verhütungsmethoden nicht anwende.
 3. Ich habe verstanden, dass ich **gleichzeitig** zwei Empfängnisverhütungsmethoden anwenden muss, und zwar eine hochwirksame Methode und eine zusätzliche wirksame Methode:
 - Hochwirksame Methode = Intrauterinpessar (Spirale), Ovulationshemmer (Pille), Tubenligation oder Vasektomie des Partners.
 - Andere zusätzliche wirksame Methode = Kondom, Diaphragma oder Scheidenpessar.Diese Verhütungsmethoden müssen mindestens vier Wochen vor Beginn der Thalidomid-Behandlung, während der Thalidomid-Behandlung und mindestens vier Wochen nach Beendigung der Thalidomid-Behandlung angewendet werden.

Falls eine hormonale Methode (Pille, Injektionen oder Implantate) oder ein Intrauterinpessar für mich medizinisch nicht in Frage kommt, kann ich auch eine andere hochwirksame Methode oder zwei Barrieremethoden gleichzeitig anwenden.
 4. Ich weiß, dass ich vor Beginn der Thalidomid-Behandlung einen Schwangerschaftstest durchführen lassen muss. Dieser Test wird jeweils innerhalb von 24 Stunden vor Beginn der Thalidomid-Behandlung durchgeführt. Dann werde ich alle vier Wochen (falls meine Regelblutung regelmäßig ist) oder alle zwei Wochen (falls sie unregelmäßig ist) einen Schwangerschaftstest durchführen lassen, während ich Thalidomid einnehme.

5. Ich weiß, dass ich unverzüglich aufhören muss, Thalidomid einzunehmen, und meinen Arzt informieren muss, wenn ich während der Einnahme dieses Arzneimittels schwanger werde, wenn meine Regelblutung ausbleibt oder wenn ich irgendeine ungewöhnliche Regelblutung habe oder wenn ich aus irgendeinem Grund denke, dass ich schwanger sein könnte.
6. Ich bin jetzt nicht schwanger und werde auch bis mindestens vier Wochen nach Beendigung der Einnahme von Thalidomid nicht versuchen, schwanger zu werden.
7. Ich habe verstanden, dass Thalidomid NUR mir verschrieben wird. Ich darf es sonst NIEMANDEM zur Einnahme geben, auch nicht jemandem, der ähnliche Symptome hat wie ich. Das Arzneimittel muss für Kinder unzugänglich aufbewahrt werden und darf NIEMALS einer Frau gegeben werden, die schwanger ist.
8. Ich habe den Abschnitt zu den die Fortpflanzung betreffenden Risiken von Thalidomid gelesen. Ich habe den Inhalt des Abschnitts verstanden, auch die anderen möglichen Gesundheitsprobleme, die sich aus den Nebenwirkungen von Thalidomid ergeben können. Ich weiß, dass ich während der Einnahme von Thalidomid kein Blut spenden darf.

- ***Für erwachsene (nicht gebärfähige) Patientinnen***

1. Ich habe verstanden, dass es bei Anwendung von Thalidomid zu schweren Geburtsschäden kommen kann. Ich wurde von meinem Arzt gewarnt, dass für jedes Kind im Mutterleib ein hohes Risiko von Geburtsschäden besteht und dass es sogar sterben könnte, wenn eine Frau während der Einnahme von Thalidomid schwanger ist oder schwanger wird.
2. Ich bestätige hiermit, dass ich weder jetzt schwanger bin noch gebärfähig bin, da ich entweder seit mehr als 24 Monaten postmenopausal bin (die Wechseljahre abgeschlossen habe) oder da meine Gebärmutter entfernt wurde (Hysterektomie).
3. Ich habe verstanden, dass Thalidomid NUR mir verschrieben wird. Ich darf es sonst NIEMANDEM zur Einnahme geben, auch nicht jemandem, der ähnliche Symptome hat wie ich. Das Arzneimittel muss für Kinder unzugänglich aufbewahrt werden und darf NIEMALS einer Frau gegeben werden, die ein Kind erwartet.
4. Ich habe den Abschnitt zu den die Fortpflanzung betreffenden Risiken von Thalidomid gelesen. Ich habe den Inhalt des Abschnitts verstanden, auch die anderen möglichen Gesundheitsprobleme, die sich aus den Nebenwirkungen von Thalidomid ergeben können. Ich weiß, dass ich während der Einnahme von Thalidomid kein Blut spenden darf.

- **Für erwachsene männliche Patienten**

1. Ich habe verstanden, dass es bei Anwendung von Thalidomid zu schweren Geburtsschäden kommen kann. Ich wurde von meinem Arzt gewarnt, dass für jedes Kind im Mutterleib ein hohes Risiko von Geburtsschäden besteht und dass es sogar sterben könnte, wenn eine Frau während der Einnahme von Thalidomid schwanger ist oder schwanger wird.
2. Mein Arzt hat mir mitgeteilt, dass ich NIEMALS sexuellen Kontakt mit einer Frau im gebärfähigen Alter haben darf, ohne Verhütungsmaßnahmen anzuwenden. Da Thalidomid im Samen vorhanden ist, hat mir mein Arzt erklärt, dass ich während der Einnahme von Thalidomid bei JEDEM sexuellen Kontakt mit Frauen, die schwanger sind oder schwanger werden könnten, ein Kondom verwenden muss. Dies gilt auch noch vier Wochen nach Beendigung der Arzneimittelleinnahme, selbst wenn ich eine erfolgreiche Vasektomie hatte.
3. Ich weiß, dass ich meinen Arzt informieren muss, wenn ich ohne Verhütungsmaßnahmen sexuellen Kontakt mit einer Frau hatte, die schwanger werden kann. Ich muss ebenfalls meinen Arzt informieren, wenn ich AUS IRGEND EINEM GRUND denke, dass meine Sexualpartnerin schwanger sein könnte.
4. Ich habe verstanden, dass Thalidomid NUR mir verschrieben wird. Ich darf es sonst NIEMANDEM zur Einnahme geben, auch nicht jemandem, der ähnliche Symptome hat wie ich. Das Arzneimittel muss für Kinder unzugänglich aufbewahrt werden und darf NIEMALS einer Frau gegeben werden, die ein Kind erwartet.
5. Ich habe den Abschnitt zu den die Fortpflanzung betreffenden Risiken von Thalidomid gelesen. Ich habe den Inhalt des Abschnitts verstanden, auch die anderen möglichen Gesundheitsprobleme, die sich aus den Nebenwirkungen von Thalidomid ergeben können. Ich weiß, dass ich während der Einnahme von Thalidomid und bis acht Wochen nach Beendigung der Behandlung weder Blut noch Samen spenden darf.

- Ich bin mit der im Rahmen der klinischen Prüfung erfolgenden Aufzeichnung von Krankheitsdaten, ihrer Weitergabe zur Überprüfung an den Auftraggeber, an die zuständige Überwachungsbehörde oder die zuständige Bundesoberbehörde und, soweit es sich um personenbezogene Daten handelt, mit deren Einsichtnahme durch Beauftragte des Auftraggebers oder der Behörden einverstanden.

- Ich wurde darüber informiert, dass eine Patientenversicherung gemäß geltendem Arzneimittelrecht abgeschlossen wurde.

- Ich bin bereit, die erhobenen Behandlungsdaten anonymisiert* an europäische und internationale Knochenmarktransplantations-Register zur Verbesserung der Knochenmarktransplantation zur Verfügung zu stellen.

(*Anonymisieren ist das Verändern personenbezogener Daten derart, dass die Einzelangaben über persönliche oder sachliche Verhältnisse nicht mehr oder nur mit einem unverhältnismäßig großen Aufwand an Zeit, Kosten und Arbeitskraft einer bestimmten oder bestimmaren natürlichen Person zugeordnet werden können).

Ich erkläre mich mit der angegebenen Behandlung einverstanden.

Kopien der Patienteninformation und der unterschriebenen Patienteneinwilligungserklärung wurden mir ausgehändigt.

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

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

C) Einwilligungserklärung zum Datenschutz (Arzneimittelgesetz)

Bei klinischen Prüfungen werden persönliche Daten und medizinische Befunde erhoben. Die Erhebung, Weitergabe, Speicherung und Auswertung dieser Angaben über die Gesundheit erfolgt nach den gesetzlichen Bestimmungen. Danach setzt die Teilnahme an der klinischen Prüfung die vorherige Einwilligung nachfolgenden Inhaltes voraus:

- 1. Ich bin damit einverstanden, dass die im Rahmen dieser klinischen Prüfung erhobenen personenbezogenen Daten, insbesondere Gesundheitsdaten, soweit erforderlich**
 - a. zur Einsichtnahme durch die Überwachungsbehörde oder Beauftragte des Sponsors zur Überprüfung der ordnungsgemäßen Durchführung der klinischen Prüfung bereitgehalten werden,**
 - b. pseudonymisiert* an den Sponsor oder eine von diesem beauftragte Stelle zum Zwecke der wissenschaftlichen Auswertung weitergegeben werden,**
 - c. im Falle eines Antrages auf Zulassung pseudonymisiert* an den Antragsteller und die für die Zulassung zuständige Behörde weitergegeben werden,**
 - d. im Falle unerwünschter Ereignisse des zu prüfenden Arzneimittels pseudonymisiert* an den Sponsor, die lokale sowie zuständige Ethik-Kommissionen und die zuständige Bundesoberbehörde sowie von dieser an die Europäische Datenbank weitergegeben werden.**

(*Pseudonymisieren ist das Ersetzen des Namens und anderer Identifikationsmerkmale durch ein Kennzeichen zu dem Zweck, die Bestimmung des Betroffenen auszuschließen oder wesentlich zu erschweren.)
- 2. Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass die Einwilligung zur Erhebung und Verarbeitung der Angaben über meine Gesundheit unwiderruflich ist.**
- 3. Ich bin ferner darüber aufgeklärt worden, dass ich jederzeit die Teilnahme an der klinischen Prüfung ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für meine medizinische Behandlung beenden kann. Im Falle eines Widerrufs erkläre ich mich damit einverstanden, dass die bis zu diesem Zeitpunkt gespeicherten Daten weiterhin verwendet werden dürfen, soweit dies erforderlich ist, um**
 - a. Wirkungen des zu prüfenden Arzneimittels festzustellen,**
 - b. sicherzustellen, dass schutzwürdige Interessen meiner Person nicht beeinträchtigt werden,**
 - c. der Pflicht zur Vorlage vollständiger Zulassungsunterlagen zu genügen.**
- 4. Ich bin damit einverstanden, dass meine Daten bei den genannten Stellen für die Zeit der Bearbeitung und des Genehmigungsverfahrens gespeichert werden.**
- 5. Ich wurde ferner darüber informiert, dass im Widerrufsfall die verantwortlichen Stellen zu prüfen haben, inwieweit die gespeicherten Daten für die vorgenannten Zwecke a. bis c. noch erforderlich sein können. Mir wurde mitgeteilt, dass nicht mehr benötigte Daten unverzüglich gelöscht werden und im Übrigen die erhobenen personenbezogenen Daten nach Ablauf von 15 Jahren ab dem Ende der klinischen Prüfung gelöscht werden, sofern nicht gesetzliche, satzungsmäßige oder vertragliche Aufbewahrungsfristen entgegenstehen.**

Eine Kopie dieser Einwilligung habe ich erhalten.

Ort, Datum (**persönlich**)

Unterschrift des **Patienten**

Ort, Datum (**persönlich**)

Unterschrift des **Prüfarztes**

D) Patientenaufklärung und –einwilligungserklärung zur Begleitstudie "Zytogenetik, residuelle Erkrankung und CT-Antigen-Expression zur Prognoseabschätzung nach allogener Stammzelltransplantation"

Sehr verehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

bei Ihnen ist auf Grund einer bösartigen Erkrankung der Plasmazellen (so genanntes Multiples Myelom) die Durchführung einer allogenen Blutstammzelltransplantation von einem verwandten oder unverwandten Spender geplant. Über die Chancen und Risiken dieser komplexen Behandlung wurden Sie in einer getrennten Aufklärung ausführlich aufgeklärt. Dabei haben Sie erfahren, dass es potentiell möglich ist, die Krankheit mit der bei Ihnen durchgeführten Therapie, nämlich der allogenen Blutstammzelltransplantation, zu heilen. Trotzdem bleibt das Risiko eines Rückfalls bei dieser Erkrankung nicht unbeträchtlich. Um die Prognose, insbesondere das Rückfallrisiko, besser abschätzen zu können, haben wir deshalb im Rahmen dieser klinischen Studie auch einige Begleituntersuchungen geplant, um weitere Faktoren zu finden, die den Krankheitsverlauf nach allogener Stammzelltransplantation beeinflussen.

Zum einen werden nach Einschluss in die Studie bei Ihnen 5 - 10 ml Knochenmark zusätzlich untersucht. Hierfür ist keine zusätzliche Punktion notwendig, da im Rahmen der Status-erhebung Ihrer Krankheit in jedem Falle eine Knochenmarkpunktion bei Ihnen durchgeführt werden muss. An diesem im Rahmen dieser Punktion zusätzlich entnommenen Material sollen folgende Untersuchungen durchgeführt werden:

1) Zytogenetik:

Hierbei wird geprüft, ob in den malignen Plasmazellen (hier: multiple Myelomzellen) bestimmte chromosomale Veränderungen vorhanden sind und ob diese chromosomalen Veränderungen Einfluß auf den weiteren Krankheitsverlauf haben.

2) Bestimmung eines "genetischen Fingerabdrucks" der Plasmazellen:

Obwohl das Multiple Myelom eine häufige Erkrankung ist, ist das bei Ihnen vorkommende Multiple Myelom in gewisser Weise einzigartig, und mit einem so genannten "genetischen Fingerabdruck" kann diese Einzigartigkeit nachgewiesen werden. Mit dieser Untersuchung versuchen wir, aus den malignen Plasmazellen einen "genetischen Fingerabdruck" zu erzeugen, um nach erfolgreicher Transplantation mit diesem "genetischen Fingerabdruck" eine mögliche residuelle, d.h. noch vorhandene Erkrankung, nachzuweisen, die mit den sonst üblichen Labormethoden nicht zu finden ist. Dies hat großen Einfluß, da Sie im Rahmen des Studienprotokolls auch eine Erhaltungstherapie bzw. ein weiteres Mal Spenderlymphozyten Ihres Spenders erhalten, um diese minimale Resterkrankung zu beseitigen. Diese Analyse wird dann, wenn es gelungen ist, diesen "genetischen Fingerabdruck" zu erstellen, ein halbes Jahr, ein Jahr, anderthalb Jahre, zwei Jahre und drei Jahre nach der Blutstammzelltransplantation anhand der Knochenmarkpunktion erneut untersucht.

3) Cancer-Testis-Antigene

Bei dieser Untersuchung werden die Plasmazellen auf die Expression von bestimmten, tumorspezifischen Antigenen untersucht. Während die erste Untersuchung anhand der Knochenmarkprobe erfolgt, sind nach Transplantation an Tag 180, nach einem Jahr, nach anderthalb Jahren sowie nach zwei, drei und vier Jahren jeweils Blutuntersuchungen (20 ml) notwendig, um zu prüfen, ob Ihr neues Immunsystem gegen diese speziellen Antigene Antikörper gebildet hat. Dies ist von großer Bedeutung, da man daraus eine spezifischer erstellte Therapie etablieren könnte. Für Sie ergeben sich – außer der zusätzlichen Blutentnahme – zunächst

keine zusätzlichen Behandlungen. Ebenso werden alle die für die Transplantation erforderlichen Untersuchungen unbeeinflusst von den Ergebnissen dieser Untersuchung nach bestem derzeitigem Stand durchgeführt. Die erhobenen Daten zum Verlauf nach Transplantation werden im Rahmen der Routinedokumentation und -qualitätssicherung erhoben. Es sind zu keinem Zeitpunkt zusätzliche Untersuchungen außer der oben genannten Blutentnahme notwendig.

Da mit der Untersuchung der DNA grundsätzlich Erbmaterial aus Ihren Zellen isoliert wird, werden weitere besondere Vorsichtsmaßnahmen zum Schutz gegen Missbrauch und zur Vermeidung von Datenschutzverletzungen durchgeführt:

Die DNA, die aus Ihren Zellen gewonnen wird, wird verschlüsselt aufbewahrt, bis die Auswertungen dieser Studie abgeschlossen sind. Sie wird nur für die Analyse der oben beschriebenen Gene eingesetzt. Weitergehende Untersuchungen dürfen ohne Einholung einer erneuten Zustimmung nicht durchgeführt werden, ebenso dürfen die DNA-Proben nicht an Dritte, die nicht an dieser Studie teilnehmen, weitergegeben werden. In gleicher Weise wird sichergestellt, dass die verschlüsselten Daten nur für Auswertungen im Rahmen dieser Studie an durch das Studienprotokoll autorisierte Personen weitergegeben werden. Die Proben werden von Ihrem behandelnden Arzt an die Universitätsklinik Hamburg versandt, wo sie gelagert und später analysiert werden. Die nach der Analyse verbleibenden Restproben werden verworfen.

Ansprechpartner in der Universitätsklinik Hamburg sind:

Marion Heinzelmann c/o Prof. Dr. N. Kröger
Interdisziplinäre Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Martinistraße 52, D- 20246 Hamburg
Telefon: 040/7410-54850 / -54851
Fax: 040/7410-53795

Wir bitten Sie nach genauer Prüfung unseres Anliegens und ausführlicher Diskussion des geplanten Forschungsprojekts mit Ihrem betreuenden Arzt und auf Wunsch gerne auch dem Studienleiter um Ihre schriftliche Einwilligung zur zusätzlichen Blutentnahme, zur Isolierung von DNA und zu den beschriebenen Untersuchungen. Sie können Ihre Zustimmung zu dem Forschungsprojekt auch nach erfolgter Blutentnahme ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile für Ihre medizinische Behandlung jederzeit zurückziehen.

Sie haben bei Widerruf das Recht zu entscheiden, ob die bereits entnommene Blutprobe vernichtet werden soll oder in anonymisierter* Form der Forschung zur Verfügung stehen soll. (Anonymisieren ist das Verändern personenbezogener Daten derart, dass die Einzelangaben über persönliche oder sachliche Verhältnisse nicht mehr oder nur mit einem unverhältnismäßig großen Aufwand an Zeit, Kosten und Arbeitskraft einer bestimmten oder bestimmbar natürlichen Person zugeordnet werden können.)

Ein Widerruf der Teilnahme an dieser Begleitstudie führt für Sie zu keinem Nachteil. Dies gilt auch für den Fall, dass keine Teilnehmer für diese Begleitstudie gewonnen werden können.

Bitte nutzen Sie die Gelegenheit und stellen Sie uns weitere Fragen, wenn Unklarheiten bestehen. Wir hoffen auf Ihre Zustimmung zu diesem Forschungsprojekt.

Prof. Dr. N Kröger

Ich erkläre mich mit der Teilnahme an der prospektiven Begleitstudie

**"Zytogenetik, residuelle Erkrankung und CT-Antigen-Expression zur Prognose-
abschätzung nach allogener Stammzelltransplantation"
zur Studie**

**"Autolog-Allogene Tandem-Stammzelltransplantation und Erhaltungstherapie mit
Thalidomid und Spenderlymphozyten-Infusion für Patienten mit Multiplem Myelom
(MM) und einem Alter von $\leq$ 60 Jahren: Eine Phase II-Studie"**

einverstanden.

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

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

9. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Nicolaus Kröger, Direktor der interdisziplinären Klinik und Poliklinik für Stammzelltransplantation am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), danke ich für die Überlassung dieses interessanten Teilgebiets seiner Studie.

Herrn PD Dr. med. Djordje Atanackovic, ehemaliger Oberarzt der Medizinischen Klinik II am UKE und Leiter des Tumorimmunologischen Labors, jetziger Direktor des MM-Programms und der Immuntherapie am Huntsman Cancer Institute der Universität Utah, möchte ich für die ständige Betreuung und Geduld beim Korrekturlesen danken.

Frau Prof. Dr. med. Mascha Binder, Oberärztin der Medizinischen Klinik II am UKE und Leiterin des Tumorbologischen Labors, für das freundliche Aufnehmen als ihre Doktorandin.

Besonderer Dank gilt Dr. rer. nat. Sara Yousef, wissenschaftliche Mitarbeiterin ehemals im Tumorimmunologischen Labor, aktuell im Huntsman Cancer Institute der Universität Utah, für die geduldige Einarbeitung, die ständige Begleitung und das kluge Beantworten all meiner Fragen.

Ebenso möchte ich mich bei Katrin Bartels für die Einarbeitung und anfängliche Unterstützung bei der Versuchsdurchführung im Labor bedanken, sowie bei Dr. med. Tim Lütken, für die tatkräftige Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

10. Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

11. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

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

Unterschrift:.....