

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie

Expression von Cancer-Testis-Antigenen bei  
Plasmazellneoplasien

Teresa Roos

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. M. A. Kremer
2. Univ.-Prof. Dr. J. G. Duyster (schriftliche Beurteilung)
3. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel (mündliche Prüfung)

Die Dissertation wurde am 05.07.2011 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin  
am 21.11.2012 angenommen.

*Die Arbeit möchte ich von ganzem Herzen meinen Eltern widmen.*

*Ich danke Euch für alles...*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Einführung.....	1
1.2 Darstellung der Plasmazellneoplasien.....	1
1.2.1 Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) .....	1
1.2.2 Multiples Myelom (MM) .....	4
1.2.3 Extramedulläres Myelom (EMM) .....	9
1.2.4 Extramedulläres Plasmozytom (EMP) .....	10
1.3 Cancer-Testis-Antigene im Überblick.....	12
1.4 Cancer-Testis-Antigene bei Plasmazellneoplasien.....	15
1.5 Darstellung der untersuchten Cancer-Testis-Antigene .....	16
1.6 Darstellung der untersuchten Prognosemarker .....	18
1.7 Darstellung des IgH-Bruchs .....	20
<b>2. Problemstellung und Zielsetzung</b> .....	<b>22</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>23</b>
3.1 Herkunft und Sammlung des Materials .....	23
3.1.1 Patienten und Auswahlkriterien .....	23
3.1.2 Kontrollfälle .....	25
3.1.3 Sammlung klinischer Daten .....	25
3.2 Herstellung der Tissue-Mikroarrays-Arrays und der Schnitte .....	26
3.2.1 Herstellung der Tissue-Mikro-Arrays .....	26
3.2.2 Anfertigung der Schnitte für histologische und immunhistochemische Färbungen.....	27
3.3 Immunhistochemie .....	28
3.3.1 Antikörper .....	28
3.3.2 Durchführung der manuellen Immunhistochemie .....	29
3.3.3 Durchführung der Immunhistochemie mit dem automatischen Immunostainer .....	31
3.4 Auswertung .....	32
3.5 Statistische Methoden.....	32
3.6 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) .....	33
3.6.1 Erläuterung der FISH-Methode .....	33
3.6.2 Durchführung und Auswertung der FISH-Untersuchungen.....	34
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>37</b>
4.1 Patienten .....	37
4.2 Klinische Daten .....	38
4.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen mit den Cancer-Testis-Antigenen .....	42
4.3.1 Cancer-Testis-Antigene: Lokalisation und Färbeintensität .....	42
4.3.2 Verteilung der Cancer-Testis-Antigene bei den Plasmazellneoplasien.....	44

4.3.3	Expressionsmuster der Cancer-Testis-Antigene.....	49
4.4	Ergebnisse mit den Prognosemarkern .....	52
4.4.1	Ausprägung der Prognosemarker in den verschiedenen Gruppen.....	52
4.4.2	Korrelation zwischen Prognosemarkern und den Cancer-Testis-Antigenen.....	53
4.5	Cancer-Testis-Antigen-Expression und IgH-Brüche bei den EMP.....	53
4.6	Korrelation: Cancer-Testis-Antigene und Grading .....	54
4.7	Korrelation: Cancer-Testis-Antigene und Krankheitsverlauf.....	55
4.7.1	Cancer-Testis-Antigen-Expression und Krankheitsüberleben .....	55
4.7.2	Cancer-Testis-Antigen-Expression und Rezidive .....	57
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>59</b>
5.1	Diskussion der Ergebnisse.....	59
5.1.1	Cancer-Testis-Antigen-Expression bei den Plasmazellneoplasien.....	59
5.1.2	Expressionsmuster und Koexpression der Cancer-Testis-Antigene.....	70
5.1.3	Bedeutung der Lokalisation der Cancer-Testis-Antigene .....	71
5.1.4	Prognosemarker und IgH-Bruch.....	72
5.1.5	Klinische Daten und klinischer Verlauf .....	73
5.2	Fazit und Bedeutung für die Praxis .....	76
5.3	Ausblick .....	77
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>79</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>81</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>93</b>
8.1	Immunhistochemie .....	93
8.2	FISH: Puffer und Lösungen .....	93
8.3	Abbildungsverzeichnis .....	95
8.4	Tabellenverzeichnis.....	96
8.5	Abkürzungen .....	97
<b>9.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>99</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>100</b>

## 1. Einleitung

### 1.1 Einführung

In der vorliegenden Arbeit soll die Expression von Cancer-Testis-Antigenen bei den verschiedenen Plasmazellneoplasien untersucht werden.

Unter der Gruppe der Plasmazellneoplasien werden die folgenden Entitäten zusammengefasst:

Die Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz, das Multiple Myelom, das extramedulläre Myelom und das extramedulläre Plasmozytom.

Trotz der geringen immunphänotypischen und zytologischen Differenzen, unterscheiden sich diese Erkrankungen erheblich in klinischen Aspekten, im Therapieansprechen und in der Prognose.

Im Folgenden sollen sie einzeln kurz vorgestellt werden.

### 1.2 Darstellung der Plasmazellneoplasien

#### 1.2.1 Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS)

##### *Definition und Epidemiologie*

Bei der Monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) handelt es sich um eine hämatologische Erkrankung, die durch eine erhöhte Immunglobulin-Produktion gekennzeichnet ist.

Laut den Definitionskriterien der WHO handelt es sich um eine MGUS, wenn Patienten eine erhöhte Immunglobulin-Produktion in Serum oder Urin aufweisen, welcher im Gegensatz zum Multiplen Myelom unter 3 g/dl liegt, eine Plasmazellinfiltration im Knochenmark von unter 10% aufweisen und extramedulläre Plasmazellherde fehlen. Des Weiteren sollten keine klinischen Beschwerden oder Endorganschäden vorliegen, die auf eine gestörte Plasmazellproliferation bzw. einen erhöhten Serum-Immunglobulin-Spiegel zurückgeführt werden könnten, insbesondere Hypercalcämie, Nierenschäden, Anämie und osteolytische Knochenläsionen (siehe **Tabelle 1**). Andere Erkrankungen, die ebenfalls einen erhöhten M-Protein-Spiegel verursachen können, müssen ausgeschlossen werden. Dabei handelt es sich vor allem um das Multiple Myelom, den Morbus Waldenström und die primäre Amyloidose (International Myeloma Working Group 2003, Rajkumar, Dispenzieri et al. 2006, Rajkumar, Lacy et al. 2007).

<b>Tabelle 1: Definitionen der MGUS und des MM</b>	
<b>Erkrankung</b>	<b>Definitionskriterien</b>
<b>Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS)</b>	<p><b>Alle 3 Kriterien müssen zutreffen:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Monoklonales Protein im Serum &lt; 3 g/dl</li> <li>- Infiltration klonaler Plasmazellen im Knochenmark <math>\leq</math> 10%</li> <li>- Kein Vorliegen von Endorganschäden wie Hypercalcämie, Niereninsuffizienz, Anämie und Knochenläsionen, die auf eine Störung in der Proliferation der Plasmazellen zurückgeführt werden können</li> </ul>
<b>Multiplles Myelom (MM)</b>	<p><b>Alle 3 Kriterien müssen zutreffen:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Infiltration klonaler Plasmazellen im Knochenmark &gt;10%</li> <li>- Erhöhtes monoklonals Protein im Serum und/oder Urin (ausser bei Patienten mit nicht-sekretorischer Variante des Multiplen Myeloms)</li> <li>- Vorliegen von Endorganschäden, die auf eine zugrundeliegende Plasmazellproliferation zurückzuführen sind, im Speziellen: Hypercalcämie (Serum-Calzium <math>\geq</math> 11,5 mg/dl oder Niereninsuffizienz mit Serum-Kreatinin &gt; 2 mg/dl); Anämie (normochrom, normozytisch mit einem Hb-Wert, der &gt; 2g/dl unterhalb der Normalwerte liegt oder einem Hb-Wert von &lt; 10 g/dl); Knochenläsionen (osteolytische Läsionen, starke Osteopenie oder pathologische Frakturen)</li> </ul>

**Tab. 1:** Definitionen der MGUS und des MM

Die Prävalenz der MGUS beträgt ungefähr 3% bei 50-jährigen und 5% bei 70-jährigen Patienten. Meist wird sie im Alter von 70 Jahren erstdiagnostiziert, nur 2% der Patienten sind bei Stellung der Erstdiagnose unter 40 Jahre alt. Insgesamt überwiegt das männliche Geschlecht. Außerdem tritt diese Erkrankung zwei- bis dreimal häufiger bei der farbigen als bei der weißen Bevölkerung auf (Kyle, Therneau et al. 2006, Landgren, Gridley et al. 2006, Blade, Rosinol et al. 2008).

### Klinik, Verlauf und Prognose

Oftmals wird eine MGUS zufällig im Rahmen einer Routineuntersuchung oder bei der Abklärung anderer Erkrankungen diagnostiziert, wobei sich ein typisch homogener Peak in der Serumprotein-Elektrophorese zeigt. Wichtig bei der Diagnosestellung einer MGUS sind Ausschluss und Abgrenzung eines Multiplen Myeloms oder einer anderen malignen Plasmazellerkrankung. Auch wenn eine MGUS häufig als gutartig bezeichnet wird, so weiß man heute, dass lebenslang die Gefahr besteht, dass aus einer MGUS ein Multiples Myelom hervorgehen kann. Das Risiko hierfür beträgt ungefähr 1% im Jahr (Kyle, Therneau et al. 2002, Kyle and Rajkumar 2006, Kyle, Durie et al. 2010, Landgren, Kyle et al. 2011). Interessanterweise zeigen MGUS-Patienten zu 90% zytogenetische Veränderungen. Hyperdiploidien sind bereits genau so oft zu finden, wie bei Patienten mit Multiplen Myelom. Dies ist ein Hinweis darauf, dass Hyperdiploidie eine frühe Veränderung auf dem Wege zum Multiplen Myelom darstellen könnte.

Auch bilden MGUS-Patienten Translokationen im Bereich der IgH-Region aus. Selbst Chromosom-13-Verluste, welche mit schlechter Prognose beim MM assoziiert sind, findet man bereits bei 50% der MGUS Patienten. Neuere Studien weisen vermehrt Veränderungen der lokalen Mikroenvironment eine besondere Rolle in der Krankheitsprogression zu: Angiogeneseinduktion und Hemmung der Angiogeneseinhibition, Unterdrückung der lokalen Immunsuppression und parakrine Zytokinfreisetzung, vor allem Interleukin 6, scheinen eine entscheidende Rolle in Bezug auf das Fortschreiten einer MGUS zu spielen (Fonseca, Barlogie et al. 2004, Rajkumar 2009, Rajkumar 2009).

Klinisch haben sich einige Parameter als ausschlaggebend für die Prognose und die weitere Entwicklung einer MGUS zum Multiplen Myelom herauskristallisiert. Dabei handelt es sich um folgende unabhängige, signifikante Risikofaktoren (siehe **Tabelle 2**) (Rajkumar, Kyle et al. 2005).

Ein hoher M-Proteinspiegel ( $\geq 1,5$  g/dl), ein Ungleichgewicht im Verhältnis der Leichtketten im Serum (FLC-Ratio: normalerweise: 0,26-1,65), sowie eine MGUS, welche nicht vom IgG-Typ ist (vor allem das Vorliegen von IgA). So hatten Patienten mit allen drei genannten Risikofaktoren (high risk) ein Risiko von 58%, innerhalb von 20 Jahren ein Multiples Myelom auszubilden. Wohingegen Patienten, bei denen keiner der Risikofaktoren vorlag (low risk), nur in 5% der Fälle ein Myelom innerhalb von 20 Jahren entwickelten (Rajkumar, Kyle et al. 2005, Kyle and Rajkumar 2007).

<b>Tabelle 2: Risikofaktoren für die Progression von MGUS zu MM</b>			
<b>Risikogruppe</b>	<b>Patientenzahl</b>	<b>Relatives Risiko</b>	<b>Absolutes Risiko einer Progression in 20 Jahren (%)</b>
<b>Low Risk (kein Risikofaktor)</b>	449	1	5
<b>Low-intermediate-Risk (1 Risikofaktor)</b>	420	5,4	21
<b>High-intermediate-Risk (2 Risikofaktoren)</b>	226	10,1	37
<b>High-Risk (3 Risikofaktoren)</b>	53	20,8	58

**Risikofaktoren:** Serum-M-Protein  $\geq 1,5$  g/dl; Nicht-IgG-Subtyp; abnormaler FLC Ratio

**Tab. 2:** Risikofaktoren für die Progression von MGUS zu MM

Die Tabelle stellt das relative und absolute Risiko für MGUS-Patienten dar, innerhalb von 20 Jahren ein MM zu entwickeln in Abhängigkeit von der Anzahl der Risikofaktoren (hoher M-Proteinspiegel, ein Ungleichgewicht im Verhältnis der Leichtketten im Serum, Nicht-IgG-Typ-MGUS).

Der größte Teil der MGUS verläuft jedoch indolent und es gibt keinen Nutzen diese Vorstufe bereits therapeutisch anzugehen. Dennoch sollten regelmäßig Kontrolluntersuchungen durchgeführt werden, um die Entwicklung einer malignen Erkrankung frühzeitig zu erkennen und Komplikationen wie Nierenschäden oder pathologischen Frakturen rechtzeitig vorbeugen zu können.

### 1.2.2 Multiples Myelom (MM)

#### Definition und Epidemiologie

Das Multiple Myelom ist ein aggressives B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom, gekennzeichnet durch die klonale Proliferation terminal differenzierter Plasmazellen im Knochenmark, die von medullären B-Zellen abstammen (Sirohi and Powles 2004). Per Definition müssen mindestens > 10% des Knochenmarks durch Plasmazellen infiltriert sein, sowie ein erhöhtes monoklonales Protein im Serum und/oder im Urin vorhanden sein (siehe **Tabelle 1**, Seite 2). Letzteres trifft jedoch nicht für Patienten mit einem sogenannten asekretorischen Multiplen Myelom zu, dass ungefähr 1-3% der MM-Fälle ausmacht und in diesem Fall eine Ausnahme darstellt.

Im Gegensatz zu der vorher besprochenen asymptomatischen Pathologie, der MGUS, liegt bei dem Multiplen Myelom eine Beteiligung von Endorganen vor, die auf die gesteigerte Proliferation von Plasmazellen zurückzuführen ist (International Myeloma Working Group 2003, Greipp, San Miguel et al. 2005, Rajkumar and Kyle 2005, Gonzalez, van der Burg et al. 2007).

Am häufigsten (60%) wird Immunglobulin G von den Plasmazellklonen exprimiert, IgA zu 24% und zu 3% IgD. 20% der Patienten exprimieren nur leichte Ketten (Bence-Jones-Myelom).

Das Multiple Myelom zählt mit ungefähr 10-15% zu den am häufigsten diagnostizierten hämatologischen Tumoren. Jährlich treten in den USA ungefähr 20000 Neuerkrankungen mit einer Inzidenz von 7/100000 für Männer und 4/100000 für Frauen auf. Farbige erkranken wie bei der MGUS doppelt so oft an einem Multiplen Myelom als die weiße Bevölkerung (Kyle and Rajkumar 2004, Kyle and Rajkumar 2008, Jemal, Siegel et al. 2009, Raab, Podar et al. 2009).

Im Durchschnitt tritt die Erkrankung im Alter von 62 Jahren bei Männern und 61 Jahren bei Frauen auf, wobei 75 bzw. 79% über 70 Jahre alt sind (Brenner, Gondos et al. 2008). Nur 3% aller Patienten sind jünger als 40 Jahre.

#### Pathogenese

Pathogenetisch geht man von einer schrittweisen Entwicklung eines Multiplen Myeloms aus, welche durchwegs aus MGUS hervorzugehen scheint (Landgren, Kyle et al. 2011). Hierbei werden verschiedene Ansätze diskutiert:

Zum einen bewirken zytogenetische Veränderungen eine Krankheitsprogression, wobei man ein hypodiploides Muster von einem hyperdiploiden Muster unterscheidet. Myelome mit hypodiploiden Chromosomensätzen sind oftmals mit schlechter Prognose assoziiert, vor allem aufgrund von Mutationen und Translokationen im Rahmen des Immunglobulin-Rearrangements der schweren Kette. Des Weiteren verursachen partielle oder komplette Deletionen von Chromosom 17 und Chromosom 13 hypodiploide Muster. Patienten mit hyperdiploiden Myelom-Zellen weisen dahingegen bessere Überlebensraten. Auch spätere Translokationen und Genmutationen werden für die weitere Krankheitsprogression verantwortlich gemacht z.B. die Gene *cmyc*, *kras*, *p53*, *RB1*, *PTEN* betreffend.

Wichtig ist hier weitere Gene ausfindig zu machen, welche potentielle therapeutische Angriffspunkte darstellen können.

Darüber hinaus scheinen auch Veränderungen der Mikroenvironment im Knochenmark ursächlich für Pathogenese und Progress der Erkrankung zu sein, zumal sich MGUS und MM zytogenetisch nur gering unterscheiden und therapeutische Eingriffe in die Mikroenvironment bereits große Erfolge erzielten (Fonseca, Barlogie et al. 2004, Kyle and Rajkumar 2004, Sirohi and Powles 2004, Avet-Loiseau, Attal et al. 2007, Gonzalez, van der Burg et al. 2007, Bink, Haralambieva et al. 2008, Raab, Podar et al. 2009).

### Klinik

Klinisch im Vordergrund steht beim Multiplen Myelom die Knochendestruktion, welche durch Aktivierung von Osteoblasten bei gleichzeitiger Aktivierung von Osteoklasten, und durch die Infiltration der Tumorzellen im Knochenmark verursacht wird (Giuliani, Rizzoli et al. 2006).

Meist handelt es sich hierbei um osteolytische Knochenläsionen (nur 2% sind osteosklerotisch), die Hypercalzämie und pathologische Frakturen nach sich ziehen. Oftmals findet man bei den Patienten auch Anämie, Thromozytopenie und Leukopenie aufgrund der Verdrängung des gesunden Knochenmarks. Daneben führen die massive Produktion defekter Immunglobuline und die geschädigte Immunantwort zu Immunschwäche und vermehrten opportunistischen Infektionen sowie zur Ausbildung eines Hyperviskositätssyndroms. Eine schwerwiegende Krankheitsfolge sind die häufig auftretenden renalen Komplikationen, die von akutem Nierenversagen bis hin zur Amyloidose und chronischer Niereninsuffizienz reichen (Dispenzieri and Kyle 2005, Eleutherakis-Papaiakovou, Bamias et al. 2007, Caers, Vande broek et al. 2008, Nau and Lewis 2008).

### Stadien und Prognosefaktoren

Die Schwere der Erkrankung lässt sich in verschiedene Stadien untergliedern, wobei zwei Klassifizierungssysteme existieren. Das ältere System ist das „Durie-Salmon-Staging-System“, welches das Multiple Myelom in 3 Stadien einteilt und vor allem klinische Parameter beurteilt (siehe **Tabelle 3**): Hämoglobinwert, Serum-Calzium, das Ausmaß der Osteolysen, die Höhe des monoklonalen Proteins im Serum, sowie die Höhe der Bence-Jones-Proteinurie.

Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion (Kreatinin > 2mg/dl) wird die zusätzliche Bezeichnung „B“ angefügt.

Diese Stadieneinteilung erlaubt zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine recht gute Abschätzung der Tumorzellmasse (Durie and Salmon 1975).

Seit Mai 2005 existiert eine weitere Klassifikation des Multiplen Myeloms, das „Internationale Staging System“ (ISS). Es basiert allein auf den Konzentrationen von  $\beta_2$ -Mikroglobulin und Albumin im Serum (siehe **Tabelle 3**) (Durie and Salmon 1975, Greipp, San Miguel et al. 2005).

Diese Laborwerte sind im Gegensatz zu der Bestimmung des Osteolysen-Ausmaßes bei der „Durie-Salmon-Klassifikation“ untersucherunabhängig und gut reproduzierbar.

Von Nachteil ist, dass diese Klassifikation weder einen Überblick über die Höhe der Tumorlast vermittelt, noch eine Unterscheidung zwischen MGUS, der Zwischenform „Smoldering Multiple Myeloma“ (SMM) und dem Multiplen Myelom ermöglicht. Jedoch haben die ISS-Stadien prognostische Bedeutung mit einem medianen Überleben von 62 Monaten, 44 Monaten bzw. 29 Monaten in den Stadien 1, 2 bzw. 3. Aufgrund der verschiedenen Vor- und Nachteile empfiehlt es sich beide Klassifizierungen anzugeben (Greipp, San Miguel et al. 2005, Kyle and Rajkumar 2009).

<b>Tabelle 3: Klassifizierungssysteme Multiples Myelom</b>		
<b>Stadium</b>	<b>Durie-Salmon-Klassifikation</b>	<b>ISS-Klassifikation</b>
<b>I</b>	Alle 4 Kriterien treffen zu: -Hb > 10 g/dl -Serum-Ca-Wert normal -Skelettröntgen normal oder solitäre Osteolyse -Geringe Immunglobulinproduktion (IgG > 5 g/dl; IgA > 3 g/dl; Bence-Jones-Proteinurie < 4 g/24h)	-β <sub>2</sub> -Mikroglobulin < 3,5 mg/l -Albumin ≥ 3,5 g/dl
<b>II</b>	weder I noch III	weder I noch III
<b>III</b>	Eines oder mehrere Kriterien treffen zu: -Hb < 8,5 g/dl -Serum-Ca-Wert erhöht -Multiple Osteolysen -Hohe Immunglobulinproduktion (IgG > 7 g/dl; IgA > 5 g/dl; Bence-Jones-Proteinurie > 12 g/24h)	-β <sub>2</sub> -Mikroglobulin > 5,5 mg/l
<b>Zusatz</b>	A: Serumkreatinin < 2 mg/dl B: Serumkreatinin ≥ 2 mg/dl	

**Tab. 3:** Klassifizierungssysteme Multiples Myelom

Neben der „ISS-Einteilung“ des Multiplen Myeloms in 3 unterschiedliche Stadien existieren weitere für die Prognose und den Verlauf entscheidende Faktoren. Diese sind zusammenfassend in **Tabelle 4** dargestellt. Jedoch konnten diese Risikofaktoren bis jetzt nicht in die Therapierichtlinien des Multiplen Myeloms Einzug finden (Fonseca, Barlogie et al. 2004, Dewald, Therneau et al. 2005, Rajkumar and Kyle 2005, Dispenzieri, Rajkumar et al. 2007, Blade, Rosinol et al. 2008, Ludwig, Durie et al. 2008, Kyle and Rajkumar 2009, Rajkumar 2009, National Comprehensive Cancer Network 2010).

<b>Tabelle 4: Prognosefaktoren beim Multiplen Myelom</b>	
<b>Faktoren für schlechte Prognose</b>	<b>Faktoren für gute Prognose</b>
Alter > 50 Jahre	Alter < 50 Jahre
fortgeschrittenes ISS-Stadium	
fortgeschrittenes Durie-Stadium	
Schädigung der Nierenfunktion	
Hypodiploidie	Hyperdiploidie
Deletion Chromosom 13q	
Deletion Chromosom 17q	
Translokation t(4;14)	Translokation t(11;14)
Translokation t(8;14)	
plasmoblastischer Typ	

**Tab. 4:** Prognosefaktoren beim Multiplen Myelom

Die Tabelle listet Faktoren für eine gute bzw. schlechte Prognose für Patienten mit MM auf.

### Verlauf, Therapie und Prognose

Trotz der Einführung neuer Medikamente und neuer Möglichkeiten in der Therapie des Multiplen Myeloms, bleibt diese Erkrankung weiterhin nicht heilbar. Im Jahre 2009 wurden 20580 neue Myelom-Patienten in den USA diagnostiziert und 10580 Betroffene verstarben. Das Gesamtüberleben variiert zwischen Monaten und Jahren, abhängig von Risikofaktoren und Therapieansprechen. Im Mittel jedoch liegt es bei maximaler Therapie weiterhin nur bei 3-5 Jahren (Kyle 1983, Kyle and Rajkumar 2004, Dispenzieri, Rajkumar et al. 2007, Munshi 2008, Jemal, Siegel et al. 2009, Raab, Podar et al. 2009, National Comprehensive Cancer Network 2010).

Standardtherapie über Jahre bei Patienten mit Multiplen Myelom war und ist immer noch eine Hochdosischemotherapie gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation (SZTX). Jedoch wurden in den letzten Jahren neue Therapiemöglichkeiten durch die Entdeckung neuer Medikamente eröffnet.

Diese sind mittlerweile nicht nur noch für therapierefraktäre Patienten und Patienten mit Rezidiv zugelassen, sondern haben bereits Eingang in die offiziellen Therapierichtlinien gefunden.

Hierbei handelt es sich um die immunmodulatorisch-wirksamen Medikamente Thalidomid und das Analogon Lenalidomid, sowie den Proteasom-Inhibitor Bortezomib (Dimopoulos and Kastritis 2008, National Comprehensive Cancer Network 2010).

Zwar ist es möglich, Patienten in verschiedene Risikogruppen mit geringem, bzw. hohem Risiko einzuteilen, jedoch ist es schwer, daraus klare Konsequenzen für verschiedene Therapieprogramme zu ziehen. Die Einteilung in Low-Risk -und High-Risk-Typen ist daher bis jetzt nur Gegenstand von Studien (Rajkumar and Kyle 2005, Dispenzieri, Rajkumar et al. 2007, Schwartz and Vozniak 2008, Kyle and Rajkumar 2009).

Patienten, die an einem symptomatischen Multiplen Myelom leiden (ab Stadium 2), sollen laut Richtlinien in jedem Fall therapiert werden. Entscheidend ist dabei als erstes die Frage, ob der jeweils betroffene Patient für eine Transplantation geeignet ist. Dies ist abhängig von Alter und Komorbidität, wobei ältere Patienten mit über 65 Jahren weniger geeignet scheinen für eine Transplantation als jüngere Patienten. Jedoch gibt es keine klaren Richtlinien, und die Entscheidung wird individuell für jeden Patienten getroffen. Zu Beginn wird in jedem Fall eine Induktionstherapie durchgeführt. Wird eine Transplantation in Erwägung gezogen, kommen Dexamethason alleine oder in Kombination mit Thalidomid oder Bortezomib zum Einsatz. Alkylierenden Substanzen wie Melphalan dürfen nicht verwendet werden, da diese die Stammzellen, die später gesammelt werden sollen, schädigen. Andernfalls haben sich Melphalan/Prednisolon mit entweder Thalidomid oder Bortezomib als besonders geeignet erwiesen (Harousseau, Attal et al. 2006, Nau and Lewis 2008, San Miguel, Schlag et al. 2008, Harousseau and Dreyling 2010, National Comprehensive Cancer Network 2010). Nach der Induktionstherapie werden Stammzellen für mindestens 2 Stammzelltransplantationen gewonnen um später, im Falle eines Rezidivs, eine sogenannte „salvage“-Transplantation durchführen zu können. Anschließend folgen Hochdosischemotherapie mit Melphalan und autologe Stammzelltransplantation. Auch wenn eine allogene Stammzelltransplantation die einzige Möglichkeit einer definitiven Heilung darstellt und Vorteile aufweist, wie die Transplantation tumorzellfreien Materials und den Graft-versus-Leukemia-Effekt bei nicht-myeloablativer Induktionstherapie, so überwiegen die Nachteile. Oftmals sind die Patienten nicht geeignet und ein passender HLA-identischer Spender schwer zu finden. Auch sind viele Nebenwirkungen mit hoher Mortalität die Folgen einer allogenen SZTX. Die Überlebensvorteile sind ungewiss.

Daher wird die allogene SZTX nur noch bei therapierefraktären Patienten und im Rahmen von Studienprotokollen verwendet (Kyle and Rajkumar 2004, Harousseau 2008, Rajkumar 2009, National Comprehensive Cancer Network 2010).

Zur Aufrechterhaltung der Therapie wird Thalidomid  $\pm$  Prednison verwendet.

Zeigt ein Patient eine Krankheitsprogression bzw. ein Rezidiv innerhalb von 6 Monaten nach Transplantation, so kommen andere Medikamentenkombinationen zum Einsatz wie z.B. Bortezomib alleine oder in Kombination mit PLD (Pegyliertes liposomales Doxorubicin). Eventuell werden auch eine allogene SZTX oder eine Tandem-Auto-SZTX durchgeführt. Bei einem Rezidiv, das über 6 Monate nach der Transplantation auftritt, wird das gesamte Therapieschema incl. Induktionstherapie wiederholt (Rajkumar and Kyle 2005, Raab, Podar et al. 2009, National Comprehensive Cancer Network 2010).

Dennoch resultiert die Erkrankung bei fast allen Patienten in Rezidiven, im Schnitt bereits nach 9,9 Monaten, und die Entwicklung einer Therapieresistenz im weiteren Krankheitsverlauf ist beinahe die Regel. Aktuelle Therapieansätze bewirken nur ein transientes Ansprechen und vorübergehende Krankheitsstabilisierung (Kyle and Rajkumar 2009).

### 1.2.3 Extramedulläres Myelom (EMM)

#### Definition

Bei diesem Krankheitsbild handelt es sich um eine Verlaufsform des Multiplen Myeloms. Daher gelten die gleichen Diagnosekriterien und Klassifizierungen wie beim Multiplen Myelom.

Ein extramedulläres Myelom ist jedoch zusätzlich durch extraossäre Manifestationen gekennzeichnet (International Myeloma Working Group 2003, Damaj, Mohty et al. 2004).

Man unterscheidet zwei Formen des EMM. Zum einen gibt es Patienten mit Multiplen Myelom, welche bereits zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eine extramedulläre Beteiligung aufweisen. Hierbei handelt es sich um einen Anteil von 15-20% aller Myelom-Patienten mit vorwiegender Lokalisation in Pleura, Lymphknoten und Weichteilen. Zum anderen entwickeln 15% der Myelom-Patienten erst im Verlauf der Erkrankung eine extramedulläre Komponente, bei welcher vor allem Lymphknoten und ZNS betroffen sind und welche sich oftmals multilokulär präsentiert (Blade, Kyle et al. 1996, Damaj, Mohty et al. 2004, Rosinol, Cibeira et al. 2004, Laura, Cibeira et al. 2006, Chen, Fu et al. 2007).

#### Therapie und Prognose

Beim EMM handelt es sich um eine aggressive Erkrankung, bei der sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung der Großteil der Patienten bereits in fortgeschrittenen Stadien (Durie 3, bzw. ISS 3) befindet.

Außerdem steht das Vorkommen von extramedullären Manifestationen im Zusammenhang mit Plasmazelleukämie. So konnte gezeigt werden, dass Patienten, die eine Plasmazelleukämie entwickelten, fast alle gleichzeitig extramedulläre Myelominfiltrate ausgebildet hatten.

Eine besonders schlechte Prognose zeigen Fälle, die bereits von Beginn an eine extramedulläre Beteiligung aufweisen. Diese haben eine mediane Überlebenszeit von nur 12 Monaten. Im Gegensatz dazu überleben Patienten, die im Laufe der Erkrankung extramedulläre Infiltrate entwickeln im Schnitt 24 Monate (Dimopoulos, Palumbo et al. 1994, Damaj, Mohty et al. 2004).

Auch therapeutisch erweisen sich EMM als kompliziert.

Insgesamt sprechen EMM-Patienten kaum auf Chemotherapien an oder zeigen kurz nach Therapie Rezidive, die spätestens dann nicht mehr chemosensitiv sind. Selbst Thalidomid, das erfolgreich in der Therapie des Multiplen Myeloms eingesetzt wird, erweist sich größtenteils als ineffektiv.

Die Ursache dafür könnte in der Wirkungsweise von Thalidomid liegen, welches speziell in der Microenvironment des Knochenmarks wirkt und zum anderen schlecht gewebeängig ist und so nicht alle Tumorzellen therapeutisch erfasst werden können. Jedoch könnte das fehlende Ansprechen von Thalidomid auch ein Hinweis sein, dass dem EMM eine andere Tumorbiologie zu Grunde liegt (Blade, Perales et al. 2001, Damaj, Mohty et al. 2004, Rosinol, Cibeira et al. 2004, Candoni, Simeone et al. 2008).

Bortezomib hingegen konnte, dank seiner guten Gewebegängigkeit, erfolgreich auch in der Behandlung fortgeschrittener, extramedullärer Myelome eingesetzt werden (Blade, Perales et al. 2001, Laura, Cibeira et al. 2006, Raanani, Shpilberg et al. 2007).

Auffallend ist jedoch, dass sich in jüngster Zeit extramedulläre Verläufe häufen und auch posttherapeutisch zunehmend mehr Fälle mit extramedullären Anteilen rezidivieren.

Bei derartigen Rezidiven handelt es sich um besonders aggressive Varianten. Cerny et al berichten in einer Studie von einer medianen Überlebenszeit von 38 Tagen nach Entwicklung eines Rezidiv-EMM. Des Weiteren verfügen sie über eine schlechte histologische Differenzierung und präsentieren häufig Chemo- und Therapieresistenzen (Pellat-Deceunynck, Barille et al. 1998, Raanani, Shpilberg et al. 2007, Cerny, Fadare et al. 2008).

Es wird vermutet, dass der Einsatz der neuen immunmodulatorischen Medikamente durch Veränderungen in der Microenvironment auch zu einer Veränderung in der Biologie und im Verhalten des Tumors führt.

Neue Therapieansätze sind daher gerade in der Behandlung des EMM nötig (Dawson, Patil et al. 2007, Cerny, Fadare et al. 2008).

#### **1.2.4 Extramedulläres Plasmozytom (EMP)**

##### Definition und Epidemiologie

Hierbei handelt es sich um eine extramedulläre, klonale Plasmazellneoplasie, wobei gleichzeitig keinerlei Evidenz für ein Multiples Myelom vorliegt, was anhand einer Knochenmarkuntersuchung und röntgenographischer Kontrolle bestätigt werden sollte. Auch fehlen die für das Multiple Myelom typischen Organ- und Gewebefolgeerscheinungen. Das monoklonale Protein im Serum und/oder Urin ist gar nicht oder allenfalls nur gering erhöht. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung weisen bis zu 25 % der Patienten erhöhte Immunglobulin-G-Werte auf, welche sich aber unter adäquater Therapie des EMP zurückbilden. Bei Verdacht auf ein EMP müssen alle relevanten diagnostischen Tests durchgeführt werden, um ein Multiples Myelom möglichst sicher auszuschließen. Auch ist eine sorgfältige lokale Diagnostik nötig, um die Größe des submukös wachsenden Tumors genau abschätzen zu können (Alexiou, Kau et al. 1999, International Myeloma Working Group 2003).

Extramedulläre Plasmozytome sind eine seltene Erkrankung und machen nur 4% aller Plasmazellneoplasien aus. Das Durchschnittsalter bei Erstdiagnose liegt im Gegensatz zu den anderen bisher besprochenen Entitäten etwas niedriger, etwa bei 50-60 Jahren. In einer Studie waren sogar 30% der Patienten unter 50 Jahre alt. Männer erkrankten mindestens dreimal häufiger als Frauen (Galieni, Cavo et al. 2000, Dores, Landgren et al. 2009).

### Lokalisation

Typischerweise liegen EMP solitär vor und sind zu 80% im Bereich des oberen Respirationstraktes, besonders im Oro-Nasopharynx und in paranasalen Sinus zu finden. Hierbei handelt es sich um sogenannte UAD (= Upper Aerodigestive Tract) EMP.

Die restlichen 20% werden als Non-UAD-EMP bezeichnet und sind gehäuft im Gastrointestinal- und Genito-Urinal-Trakt lokalisiert. Selten sind Haut, Lunge, Brust, Hoden oder ZNS betroffen (Bachar, Goldstein et al. 2008).

Patienten mit einem EMP präsentieren sich zumeist mit lokalen Symptomen und Verdrängungsercheinungen, wie z.B. Schwellungen, Einengungen der Nasenwege oder Nasenbluten (Alexiou, Kau et al. 1999, Straetmans and Stokroos 2008).

### Therapie und Prognose

Generell sprechen Patienten mit EMP besonders gut auf eine Radiotherapie an. Therapie der Wahl ist daher aktuell eine lokale, fraktionierte Strahlentherapie von 45-55 Gray über einen Zeitraum von 4-6 Wochen. Alternativ kann der Tumor operativ entfernt werden. Falls nach der Resektion noch Tumorstoffe vorhanden sind bzw. dies ungewiss ist, sollte sich zusätzlich eine Radiotherapie anschließen.

Besonders bei UAD-EMP ist eine radikale Tumorentfernung aufgrund der Lokalisation im HNO-Bereich oftmals schwer zu erreichen, so dass gerade hier eine Kombination beider Verfahren den einzelnen Verfahren überlegen ist (Creach, Foote et al. 2009).

Insgesamt erreichen über 80% der Patienten durch diese Therapie eine Vollremission mit 5-Jahres-Überlebensraten von 60-80%. Nur ein kleiner Teil erweist sich als therapieresistent.

Im Verlauf bilden EMP-Patienten in 10-20% Lokalrezidive aus und in weiteren 10-20% entwickelt sich ein Multiples Myelom (im Schnitt innerhalb von 2-3 Jahren) mit einer Tendenz derjenigen Fälle, die primär kein Therapieansprechen zeigen oder lokale Rezidive ausbilden (Galièni, Cavo et al. 2000, Straetmans and Stokroos 2008). Aufgrund der Gefahr des Lokalrezidives bzw. der MM-Entwicklung bedürfen Patienten mit diagnostiziertem EMP einer lebenslangen Verlaufskontrolle.

Im Gegensatz zum MM, weisen EMP Patienten insgesamt indolente Verläufe mit guten Überlebensraten auf.

Trotz der großen Unterschiede im klinischen Verlauf sind MM und EMP immunhistochemisch und zytogenetisch nur verhältnismäßig schwer zu differenzieren. Hyperdiploide Fälle treten bei beiden Entitäten gleichhäufig auf (50%), auch Chromosom-13-Verluste sind wie beim MM in 40% zu finden. Oftmals sind EMP histologisch gut differenziert, haben geringere Proliferationsindices und CD56, Bcl-2, p21 und p53 werden im Vergleich zum MM vermindert exprimiert. Interessanterweise sind beim EMP auch Veränderungen im Bereich der IgH-Region vorhanden, wobei andere Translokationen vorliegen als beim MM. (Kremer, Ott et al. 2005, Bink, Haralambieva et al. 2008).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es einer klaren und genauen Abgrenzung gegenüber dem Multiplen Myelom bedarf, besonders gegenüber dem klinisch ähnlich erscheinenden extramedullären

Myelom. Auch ist es bis dato nicht möglich vorherzusagen, welche EMP-Fälle im Krankheitsverlauf in ein Multiples Myelom übergehen werden.

### 1.3 Cancer-Testis-Antigene im Überblick

#### Bedeutung der Cancer-Testis-Antigene (CT-A)

Immer mehr Aufmerksamkeit im Bereich der Tumorforschung widmet sich den Cancer-Testis-Antigenen. Cancer-Testis-Antigene stellen die im Moment am intensivsten untersuchte Gruppe von Antigenen im Bereich der Tumorimmunologie dar (Kalejs and Erenpreisa 2005).

Seit das erste Cancer-Testis-Antigen im Jahre 1991 bei Melanomen entdeckt wurde, ist sukzessive an diesen geforscht worden und mittlerweile stellen sie vielversprechende Targets tumortherapeutischer Verfahren dar, vor allem die Tumor-Vakzin-Therapie betreffend.

Ihre physiologische Expression ist limitiert und sie beschränkt sich auf das Vorkommen in männlichen Keimzellen des Hoden, auf Keimzellen des Ovars und auf Trophoblasten der Plazenta, wobei CT-A in den genannten Geweben natürlicherweise exprimiert werden (Kalejs and Erenpreisa 2005, Simpson, Caballero et al. 2005, Ghafouri-Fard and Modarresi 2009). Interessanterweise jedoch tauchen sie auch im Zuge der Tumorentstehung auf und sind so bei einer Vielzahl von Tumoren verschiedener histologischer Arten zu finden, wie z.B. bei Melanomen, nicht-kleinzelligen Lungentumoren, hepatozellulären Tumoren, Gehirntumoren, Prostata- und Blasentumoren und bei Multiplen Myelomen. In allen anderen Geweben werden sie nicht oder nur zu geringen Anteilen exprimiert (Scanlan, Simpson et al. 2004, Oba-Shinjo, Caballero et al. 2008, Grau, Oltra et al. 2009).

Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, dass der Hoden einen immungeschützten Bereich darstellt. Zum einen verhindert die Blut-Hoden-Schranke den Kontakt zwischen dem Immunsystem und den heranreifenden Keimzellen, und zum anderen verfügen Keimzellen nicht über HLA Klasse I Moleküle und können dadurch zelleigene Proteine nicht auf ihrer Oberfläche darstellen und somit nicht den Zellen des Immunsystems präsentieren.

Das sind zwei Gründe, warum Cancer-Testis-Antigene als „tumorspezifisch“ betrachtet werden können (Galea, Bechmann et al. 2007, Meklat, Li et al. 2007, Condomines, Hose et al. 2009). Ein weiterer Punkt, welcher Cancer-Testis-Antigene in den Mittelpunkt der Forschungen rücken lässt, ist ihre Fähigkeit einen starken immunogenen Effekt auf menschliche Zellen in vivo und in vitro auszulösen. So konnten zytotoxische T-Zellen gegen CT-A sogar eine Abtötung autologer und allogener Tumorzellen bewirken (van Rhee, Szmania et al. 2005, Atanackovic, Arfsten et al. 2007, Meklat, Li et al. 2007, Goodyear, Pratt et al. 2008). Erstmals konnte sogar gezeigt werden, dass CD4 und CD8-T-Zellen gegen CT-A zur Spontanremission eines Tumors, nämlich eines nicht-kleinzelligen Lungentumors, geführt haben (Nakamura, Noguchi et al. 2009).

Auch laufen bereits Phase-2-Studien, die den therapeutischen Einsatz von CT-A in der Klinik erproben. So setzen GlaxoSmithKline beispielsweise ein rekombinantes MAGE-A3-Protein erfolgreich bei

Patienten mit metastasiertem Melanom und nichtkleinzelligem Bronchialkarzinom ein (Vansteenkiste, Zielinski et al. 2007, Kruit, Suciú et al. 2008, Caballero and Chen 2009).

Cancer-Testis-Antigene weisen noch andere interessante Aspekte auf: Ihre Expression korreliert oftmals mit höheren Tumorstadien und schlechter Prognose und es bietet sich hierdurch in Zukunft die Möglichkeit, CT-A als diagnostische Parameter für Rezidive, Metastasen, Krankheitsverlauf und selbst in der Frühdiagnostik einzusetzen (Li, Yuan et al. 2005, Cho, Caballero et al. 2006, Suri 2006, Kanojia, Garg et al. 2009).

### Definition und Einteilung

Der Begriff „Cancer-Testis-Antigen“ wurde 1997 von Chen et al eingeführt (Chen, Scanlan et al. 1997). Jedoch gibt es bis heute keine eindeutige und klare Definition für diese heterogene Gruppe von Antigenen, so dass CT-A im Wesentlichen anhand ihres Expressionsprofils definiert werden: Das Vorkommen in unterschiedlichen Tumoren und in Keimzellen des Hodens, sowie die fehlende, bzw. geringe Expression in anderen Geweben. Mittlerweile konnten 153 CT-A-Gene identifiziert werden, welche 83 Genfamilien angehören. Angesichts der rasch wachsenden Anzahl neuer CT-A wurden Online CT-A-Datenbanken angelegt, welche CT-A übersichtlich darstellen und zu klassifizieren versuchen (Old 2001, Kalejs and Erenpreisa 2005, <http://www.cta.Incc.br/> 2005-2009).

Anhand des Expressionsprofils teilten Hofmann et al. alle nachgewiesenen CT-A in 3 Kategorien ein: „Testis-restricted“ CT-A, welche ausschließlich im Hoden vorkommen, „testis-selective“ CT-A, welche zwar hauptsächlich, aber nicht nur im Hoden exprimiert werden und sogenannte „testis-brain-restricted“ CT-A, welche im Hoden und zu geringem Masse auch im Gehirn zu finden sind.

Eine Studie, welche das Expressionsmuster aller bisher identifizierten CT-A analysierte, belegt, dass nur 39 der 153 existierenden CT-A ausschließlich im Hoden („testis-restricted“) zu finden sind und weitere 14 CT-A zusätzlich in einem weiteren immunprivilegierten Organ, dem Gehirn exprimiert werden („testis-brain-restricted“). Der weitaus größte Teil der CT-A jedoch ist auch außerhalb dieser immunprivilegierten Bereiche zu finden („testis-selective“) (Hofmann, Caballero et al. 2008, Almeida, Sakabe et al. 2009).

Hauptsächlich sind CT-A in Form von Genfamilien auf dem X-Chromosom lokalisiert (83 der 153 CT-A-Gene) und werden als Cancer-Testis-X-Antigene (CT-A-X) bezeichnet (Simpson, Caballero et al. 2005, Meklat, Li et al. 2007). Analysen des menschlichen X-Chromosoms ergaben, dass sogar 10% der Gene auf dem X-Chromosom CT-A-Gene sind (Ross, Grafham et al. 2005). Nur wenige CT-A liegen nicht auf dem X-Chromosom. Sie werden als Non-X-CT-A bezeichnet und bilden für gewöhnlich keine Genfamilien, sondern verteilen sich auf das gesamte Genom.

CT-A-X und Non-X-CT-A werden zu unterschiedlichen Reifestadien der männlichen Keimzellentwicklung exprimiert. So sind CT-A-X vor allem in frühen Stadien, in den Spermatogonien zu finden, welche proliferierende Keimzellen darstellen. Non-X-CT-A hingegen werden eher in späteren Stadien

der Keimzeldifferenzierung, in Spermatozyten, ausgebildet und sind vor allem mit Funktionen der Meiose und Gametogenese assoziiert.

Besonders CT-A-X scheinen für eine Tumor-Vakzin-Therapie in Frage zu kommen, da diese äußerst limitiert exprimiert werden und hauptsächlich der Gruppe der „testis-restricted“ CT-A zugehörig sind (Simpson, Caballero et al. 2005, Hofmann, Caballero et al. 2008, Caballero and Chen 2009).

#### Funktion der Cancer-Testis-Antigene

Über die Funktionen der CT-A, vor allem der CT-A-X, ist jedoch bis jetzt noch sehr wenig bekannt. Es stellt sich die wichtige Frage, ob CT-A als Onkogene wirken und in der Tumorentstehung eine Rolle spielen oder ob sie nur ein zufälliges Nebenprodukt in der Tumorentstehung darstellen. Einiges deutet jedoch daraufhin, dass sie eine Rolle in der Tumorentstehung spielen.

So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass innerhalb der großen MAGE-Familie der CT-A die zentrale, stark konservierte MAGE-Homology-Domain (MHD) eine wichtige Stelle von Protein-Protein-Interaktionen darstellt und so zelluläre Vorgänge wie Transkription, Translation und Chromosomen-Rekombinationen beeinflussen kann (Simpson, Caballero et al. 2005, Meklat, Li et al. 2007, Hofmann, Caballero et al. 2008).

Erstmals konnte durch Cho et al. gezeigt werden, dass Cancer-Testis-Antigene offensichtlich auch untereinander interagieren, in dem NY-ESO-1 und MAGE-C1 als Bindungspartner identifiziert wurden und im Zytoplasma ko-lokalisiert zu finden sind (Cho, Caballero et al. 2006).

#### Regulation der Cancer-Testis-Antigene

Reguliert werden CT-A vor allem über epigenetische Mechanismen, wobei Demethylierung und Histonacetylierung von Promotergenen eine führende Rolle spielen. Alle bisher untersuchten CT-A verfügen in somatischen Geweben über methylierte CpG-Stellen in Promotergenen und werden über Demethylierung während der Spermatogenese aktiviert.

Es konnte sogar gezeigt werden, dass Zellen nach einer Behandlung mit 5-Azacytidin, welches eine Demethylierung bewirkt, zusätzlich CT-A exprimierten. Daneben führt die Bindung an MeCP2, einem Komplex, der eine Deacetylierung katalysiert, zu einer verminderten CT-A-Expression (Wischnewski, Pantel et al. 2006, Meklat, Li et al. 2007, Almstedt, Blagitko-Dorfs et al. 2010).

Zudem scheinen CT-A untereinander durch gemeinsame Mechanismen reguliert zu werden, da mehrere verschiedene CT-A in Tumorgeweben oft gleichzeitig exprimiert werden und auch die Expressionshöhe untereinander korreliert.

## 1.4 Cancer-Testis-Antigene bei Plasmazellneoplasien

### Vorkommen und Bedeutung der CT-A im Krankheitsverlauf

Untersuchungen der Cancer-Testis-Antigene beschränkten sich bisher auf solide Tumore. In jüngster Zeit wurden neue CT-A jedoch zunehmend bei hämatologischen Neoplasien entdeckt, so dass diese verstärkt in den Mittelpunkt der Forschung rückten.

Dabei konzentrieren sich Untersuchungen der CT-A vorrangig auf das Multiple Myelom mit dem Ziel, neue Therapieoptionen für diese maligne Erkrankung zu schaffen (Meklat, Li et al. 2007). Cancer-Testis-Antigene sind bei fast allen Betroffenen zu finden. So exprimieren bis zu 95% der Patienten mindestens ein Cancer-Testis-Antigen. Studien ergaben, dass CT-A damit zu denjenigen Antigenen gehören, welche in tumorösen Plasmazellen hochreguliert sind.

Besonders häufig sind dabei Cancer-Testis-Antigene der sogenannten MAGE-Familie (Melanoma associated Antigen) zu finden, einer Genfamilie, welche aus 19 Gen-Mitgliedern besteht, die alle auf dem X-Chromosom lokalisiert sind (Condomines, Hose et al. 2007, Meklat, Li et al. 2007, Andrade, Vettore et al. 2008). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die CT-A-Expression in schweren Krankheitsstadien ansteigt und zudem mit der Plasmazellproliferation korreliert (MAGE-C1 und MAGE-A3/6) (van Baren, Brasseur et al. 1999, Jungbluth, Ely et al. 2005). So werden die Cancer-Testis-Antigene MAGE-A1, MAGE-A3/6, MAGE-C1 und NY-ESO-1 vor allem bei Patienten im Durie-Stadium III nachgewiesen. Die Höhe der CT-A-Expression deutet dabei auf die Schwere der Erkrankung hin. Dabei verfügen Patienten mit EMM und insbesondere Patienten mit Plasmazellleukämien über eine erhöhte CT-A-Anzahl (Tarte, De Vos et al. 2002, Dhodapkar, Osman et al. 2003). Außerdem korrelieren klinisch prognostische Parameter, wie die Höhe des Immunglobulin-Spiegels und die  $\beta_2$ -Mikroglobulin-Konzentration mit den Cancer-Testis-Antigenen in dem Sinne, dass mit zunehmenden Immunglobulin- und  $\beta_2$ -Mikroglobulinwerten eine gesteigerte CT-A-Expression zu finden ist. Selbst Schwankungen dieser Parameter spiegeln sich parallel in der CT-A-Expression wider (Atanackovic, Arfsten et al. 2007, Condomines, Hose et al. 2007, Atanackovic, Luetkens et al. 2009). Auch können CT-A ein Hochrisikoprofil bei MM-Patienten andeuten. So wird beispielsweise NY-ESO-1 bei Patienten mit chromosomalen Aberrationen oder Rezidiven signifikant mehr exprimiert (van Rhee, Szmania et al. 2005).

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass Cancer-Testis-Antigene mit schlechter Prognose beim Multiplen Myelom assoziiert sind. Je mehr CT-A gleichzeitig von einem Patienten exprimiert werden, umso kürzere Überlebenszeiten weisen diese auf (Andrade, Vettore et al. 2008).

### Bedeutung der Immunogenität

CT-A sind in der Lage in vivo und in vitro zelluläre und humorale Immunantworten auszulösen. So können aktive zytotoxische CD8-T-Zellen, die unter anderem gegen NY-ESO-1, MAGE-A1 und

MAGE-A3/6 gerichtet waren, auch im Blut von Patienten mit Multiplen Myelom nachgewiesen werden und waren hier bis zu 3-mal häufiger als bei gesunden Patienten zu finden.

Die Anzahl an CD8-T-Zellen steigt dabei mit zunehmender Tumorlast an und weist Parallelen mit der Paraproteinkonzentration auf. Ähnlich der CT-A-Expression nimmt die Anzahl korrespondierender reaktiver CD8-T-Zellen bei Krankheitsprogression und bei Patienten mit Myelom-Rezidiven zu, teilweise schon bevor Veränderungen in der Immunglobulin-Konzentration messbar sind (Goodyear, Piper et al. 2005, Curioni-Fontecedro, Knights et al. 2008, Goodyear, Pratt et al. 2008).

Auch sind gegen CT-A gerichtete CD8-T-Zellen besonders bei Patienten mit chromosomalen Aberrationen zu finden (van Rhee, Szmania et al. 2005).

Patienten mit solchen CT-A-spezifischen T-Zellantworten weisen bessere Überlebenszeiten auf als Patienten, bei denen eine Immunantwort ausbleibt (Goodyear, Pratt et al. 2008).

Darüber hinaus konnten van Rhee und Kollegen zeigen, dass CD8-T-Zellen gegen NY-ESO-1 und auch CD4-T-Zellen gegen MAGE-A3/6 in der Lage sind, primäre Myelomzellen zu töten (van Rhee, Szmania et al. 2005, Goodyear, Pratt et al. 2008).

Zu den Mechanismen, die eine persistierende Remission beim Multiplen Myelom bewirken können, gehört unter anderem die allogene SZTX, wobei besonders dem Graft-versus-Leukemia-Effekt eine bedeutende Rolle zukommt. Das Tumorwachstum wird dabei durch CD4- und CD8-T-Zellen kontrolliert und gedrosselt (Mielcarek and Storb 2003, Schetelig, Kiani et al. 2005, Goodyear, Pratt et al. 2008, Atanackovic, Luetkens et al. 2009).

Atanackovic D et al. konnten zeigen, dass Cancer-Testis-Antigene mögliche Zielantigene bei dem Graft-versus-Leukemia-Effekt nach allogener SZTX darstellen. Sowohl CD4- als auch CD8-T-Zellen, die gegen die Cancer-Testis-Antigene NY-ESO-1 und MAGE-A3/6 gerichtet waren, konnten nach allogener SZTX im Blut von MM-Patienten gefunden werden. Dahingegen waren sie vor der Transplantation oder in dem gespendeten Stammzellpool nicht nachzuweisen (Atanackovic, Arfsten et al. 2007).

## 1.5 Darstellung der untersuchten Cancer-Testis-Antigene

Im Folgenden werden diejenigen CT-A, die in der Studie untersucht wurden, genauer vorgestellt.

Es handelt sich um fünf Cancer-Testis-Antigene, welche besonders oft bei Multiplen Myelomen nachzuweisen sind. Vier dieser CT-A gehören der MAGE-Familie an: MAGE-A1, MAGE-A3/6, MAGE-C1 und MAGE-C2. Zusätzlich wurde noch NY-ESO-1 untersucht (siehe **Tabelle 5**) (van der Bruggen, Traversari et al. 1991, De Plaen, Arden et al. 1994, Gaugler, Van den Eynde et al. 1994, Chen, Scanlan et al. 1997, Chen, Gure et al. 1998, Gure, Stockert et al. 2000, <http://www.cta.lncc.br/> 2005-2009).

Alle untersuchten CT-A gehören zu den CT-A-X, da die entsprechenden Gene auf dem X-Chromosom lokalisiert sind. Auch konnten für alle untersuchten CT-A bereits zelluläre und humorale Immunant-

worten nachgewiesen werden (Curioni-Fontecedro, Knights et al. 2008, Caballero and Chen 2009, Lendvai, Gnjatic et al. 2010).

<b>Tabelle 5: Darstellung der untersuchten CT-A</b>					
<b>CT-Antigen</b>	<b>Erstmals identifiziert</b>	<b>Expressionsmuster</b>	<b>Vorkommen in Tumoren</b>	<b>Häufigkeit beim MM<sup>1</sup></b>	<b>Funktion</b>
<b>MAGE-A1</b>	Van der Bruggen et al, 1991	testis-restricted	Gehirn, Lunge, Brust, Melanom, Plattenepithelkarzinom, Ovar, HCC, GIST	20-40%	Transkriptionsinhibitor
<b>MAGE-A3/6<sup>2</sup></b>	Gaugler et al, De Plaen et al, 1994	testis-selective	Gehirn, Lunge, HCC, Melanom, GIST	30-100%	Hemmung der Apoptose von MM-Zellen
<b>MAGE-C1</b>	Chen et al, 1998	testis-restricted	Gehirn, Lunge, Melanom, GIST	70-100%	Bindungspartner von NY-ESO-1; Hemmung der Apoptose von MM-Zellen
<b>MAGE-C2</b>	Gure et al, 2000	testis-brain-restricted	Gehirn, HCC	50-60%	Hemmung der Apoptose
<b>NY-ESO-1</b>	Chen et al, 1997	testis-restricted	Gehirn, Lunge, Melanom, Ovar, Brust, HCC, Plattenepithelkarzinom	10-60%	Bindungspartner von MAGE-C1
<sup>1</sup> Werte in Abhängigkeit vom Durie-Salmon-Stadium					
<sup>2</sup> Die beiden Gene MAGE-A3 und MAGE-A6 liegen nahe beieinander und kodieren gemeinsam ein Peptid. Sie werden deshalb als ein CT-A betrachtet.					

**Tab. 5:** Darstellung der untersuchten CT-A

### MAGE-A1

MAGE-A1 interagiert mit dem Transkriptions-Regulatorprotein SKIP, welches einen Bindungspartner darstellt. Über Wechselwirkung mit einer Deacetylase kann MAGE-A1 als Transkriptionsrepressor wirken (Laduron, Deplus et al. 2004).

### MAGE-A3/6 und MAGE-C1

Besonders häufig beim Multiplen Myelom werden MAGE-A3/6 und MAGE-C1 exprimiert, sogar bis zu 70-100%. MAGE-A3/6 und MAGE-C1 verlängern das Überleben von MM-Zellen, indem sie die Apoptose der malignen MM-Zelle hemmen. Auch konnte gezeigt werden, dass MM-Patienten besser auf herkömmliche Therapien ansprechen, wenn diese Gene ausgeschaltet sind (Atanackovic, Hildebrandt et al. 2010).

MAGE-C1 gilt als unabhängiger Prognoseparameter für das Multiple Myelom und es erweist sich zunehmend als bedeutendes CT-A, zumal es sehr häufig und sehr konstant beim MM exprimiert wird und sehr gut mit dem klinischen Verlauf korreliert (Andrade, Vettore et al. 2008, Atanackovic, Luetkens et al. 2009).

### MAGE-C2

Zusammen mit MAGE-A3/6 bildet MAGE-C2 einen Komplex mit „Kap-1“, einem bekannten Korepressor von p53, welcher zu einer verminderten Expression von p53, einem Tumorsuppressor-Gen führt und damit verbunden auch zu einer reduzierten Zellapoptose maligner Tumorzellen (Yang, O'Herrin et al. 2007, Caballero and Chen 2009).

### NY-ESO-1

NY-ESO-1 ist das wohl stärkste immunogene CT-A und löst starke humorale und zelluläre CD4- und CD8-T-Zell-Immunantworten aus (van Rhee, Szmania et al. 2005, Old 2008). Cho HJ und Kollegen konnten zeigen, dass NY-ESO-1 und MAGE-C1 interagieren, Bindungspartner in MM-Zellen darstellen, und im Zytoplasma ko-lokalisiert sind (Cho, Caballero et al. 2006).

## **1.6 Darstellung der untersuchten Prognosemarker**

### CD56

CD56 ist ein neuraler Adhäsionsmarker, welcher natürlicherweise bei Stroma-Zellen, Osteoblasten und Osteoklasten im Knochenmark zu finden ist (Damgaard, Knudsen et al. 2009).

Zudem wird CD56, im Gegensatz zu gesunden Plasmazellen, welche CD-56 negativ sind, in ca.70% der Fälle von malignen Plasmazellen exprimiert und ist daher charakteristisch für das Multiple Myelom (Kremer, Ott et al. 2005). Teilweise jedoch ist CD56 auch bei Plasmazellen im Rahmen einer MGUS nachweisbar. Die Frage, ob CD56 eine Rolle in der Pathogenese des MM spielt, ist bis jetzt unklar.

Jedoch wird CD56 mit Aufgaben der interzellulären Adhäsion und der Adhäsion zu Komponenten des Knochenmarks und der extrazellulären Matrix in Zusammenhang gebracht.

Entsprechend wird ein fehlender Nachweis von CD56 mit aggressivem und invasivem Tumorwachstum beim MM assoziiert (Sahara, Takeshita et al. 2002, Sahara and Takeshita 2004).

So konnte in Studien gezeigt werden, dass extramedulläre MM (EMM) und Plasmazelleukämiezellen oftmals vermindert CD56 exprimieren (Pellat-Deceunynck, Barille et al. 1998, Dahl, Rasmussen et al. 2002). Auch wurde in Studien eine Korrelation zwischen fehlendem CD56 und hohen  $\beta_2$ -Mikroglobulinwerten sowie schlechten Überlebensraten festgestellt. Jedoch weisen auch EMP-Patienten geringe CD56-Expressionsraten auf (Kremer, Ott et al. 2005). In einer Studie konnte erst

kürzlich ein Zusammenhang zwischen der CD56- und der Cyclin D1-Expression festgestellt werden. Dabei wurde CD56 vor allem bei Cyclin D1 negativen Myelomzellen gefunden und vice versa. Damgaard et al. postulieren in ihrer Studie, dass CD56 mit Proliferation, Antiapoptose, Differenzierung und medullärer Erkrankung im Zusammenhang steht und vermuten, dass Cyclin D1 auf CD56-exprimierende Myelomzellen regulatorisch wirkt (Damgaard, Knudsen et al. 2009).

### Cyclin D1

Eine Überexpression von Cyclin D1 ist bei ca. 15-25% der MM-Patienten zu finden und beruht entweder auf einer t(11;14) Translokation im Bereich der IgH-Region (14q32) oder auf einer Polysomie 11 (Slotta-Huspenina, Koch et al. 2008). Cyclin D1 übernimmt wesentliche Aufgaben in der Zellzykluskontrolle: Es unterstützt den Übergang von der G1 Phase, der Ruhephase, zu der S-Phase, in welcher die DNA-Synthese stattfindet. Zusammen mit der zugehörigen Cyclin-abhängigen Kinase bewirkt es eine Phosphorylierung des Retinoblastom-Genproduktes, welches die weitere DNA-Replikationskaskade in Gang setzt (Athanasίου, Kaloutsi et al. 2001).

Beim Multiplen Myelom ist eine Überexpression von Cyclin D1 paradoxerweise mit einer guten Prognose assoziiert, da Cyclin D1 beim MM eine ungenügende Phosphorylierung des Retinoblastomproteins bewirkt und zusätzliche Kinasen benötigt werden, um den Zellzyklus weiter zu führen.

Interessanterweise ist Cyclin D1 genauso häufig bei MGUS-Patienten zu finden wie bei MM-Patienten. Dahingegen konnte Cyclin D1 bei EMP-Fällen bisher nicht nachgewiesen werden (Fonseca, Blood et al. 2003, Ely, Di Liberto et al. 2005, Bink, Haralambieva et al. 2008).

### Ki67

Ki67 fungiert als Proliferationsmarker. Die Tatsache, dass Ki67-Protein in allen aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert wird (G1, S, G2, Mitose), aber in ruhenden Zellen (G0) nicht nachweisbar ist, macht es zu einem exzellenten Marker, um die sogenannte Wachstumsfraktion einer Zellpopulation zu bestimmen. Ki67 steht also für Zellwachstum, welches oftmals ein Zeichen für Malignität darstellt. Aus diesem Grunde wird Ki67 in der Diagnostik verschiedener Neoplasien eingesetzt. Beim MM wird Ki67 vor allem in höheren Krankheitsstadien und bei Rezidiven exprimiert und korreliert zudem mit der  $\beta_2$ -Mikroglobulin-Konzentration.

Darüber hinaus ist Ki67 zusätzlich mit dem Grad der Angiogenese im Knochenmark und der Tumormasse assoziiert und spielt daher in der Diagnostik des MM eine bedeutende Rolle (Scholzen and Gerdes 2000, Alexandrakis, Passam et al. 2004, Alexandrakis, Passam et al. 2004, Gastinne, Leleu et al. 2007).

## 1.7 Darstellung des IgH-Bruchs

Brüche im Bereich der schweren Kette der Immunglobuline, sogenannte IgH-Brüche, welche den Genlocus 14q32 betreffen, treten im Rahmen der Bildung und Reifung differenzierter Immunglobuline auf. Plasmazellen sind in der Lage, eine Vielzahl diverser Immunglobuline hervorzubringen. Jedoch impliziert die Komplexität der Immunglobulin-Produktion gleichzeitig genetische Instabilität. Oft sind Fehler im Verlauf des Rekombinationsvorganges beim Austausch und Wechsel der Immunglobulin-Klassen die Ursache.

Nach Ausbildung von DNA-Brüchen kommt es zu fehlerhafter Wiederverknüpfung von DNA-Segmenten, so dass verschiedene Translokationen entstehen können, wobei Protoonkogene in die Nähe von Ig-Enhancern gelangen mit der Folge abnormer Expression translozierter Gene (Fonseca, Blood et al. 2003, Specht, Haralambieva et al. 2004).

Jede IgH-Translokation ist dabei mit der Dysregulation eines spezifischen Gens assoziiert.

IgH-Brüche treten früh in der Pathogenese des Multiplen Myeloms auf und stellen einen ersten Schritt zur malignen Transformation reifer B-Zellen dar. Bei 70% der MM-Patienten findet man IgH-Brüche- und Translokationen, welche zum großen Teil mit einer schlechten Prognose gekoppelt sind. Diese IgH-Brüche verändern sich höchst selten im Krankheitsverlauf und sind zum großen Teil bei allen Plasmazellklonen eines Patienten zu finden.

Auch MGUS-Patienten bilden bereits in 50% der Fälle Translokationen im Bereich der IgH-Region aus, und es sind ähnliche Translokationen zu finden wie beim MM mit jeweils geringeren Häufigkeiten als beim MM (Fonseca, Barlogie et al. 2004).

Die häufigste Translokation ist die Translokation t(11;14), welche bei 15-25% der MM-Fälle auftritt und zur Überexpression von Cyclin D1 führt.

Weitere Translokationen sind im Folgenden kurz aufgeführt, wobei in Klammern das jeweilige betroffene Gen angeführt wird:

Translokation t(4;14) zu 10-15% (FGFR3); Translokation t(16;14) in weniger als 5% (c-maf); Translokation t(6;14) in weniger als 5% (Cyclin D3).

Die Translokation t(8;14) dereguliert das Protoonkogen cmyc und ist in 5% der Fälle zu finden, vor allem in fortgeschrittenen Tumorstadien des MM. Bei MGUS-Patienten liegt diese Translokation für gewöhnlich nicht vor. Auch die Translokation t(4;14) ist mit schlechter Prognose assoziiert (Gonzalez, van der Burg et al. 2007).

Interessanterweise sind Brüche in der IgH-Region zu 37% auch bei Patienten mit extramedullärem Plasmozytom vorhanden, wobei andere Translokationen als beim Multiplen Myelom und der MGUS dominieren. Nur die Translokation t(4;14), welche zu 5% beim MM zu finden ist, wird auch von EMP-Patienten -und zwar zu 16%- ausgebildet.

Besonders hervorstechend ist das komplette Fehlen der Translokation t(11;14), was eine häufige und typische Translokation beim MM und der MGUS darstellt (Bink, Haralambieva et al. 2008).

Die Rolle des IgH-Bruches bei den EMP ist bis jetzt nicht klar, zumal die typischen Translokationen des MM hier nicht vorhanden sind und keine Korrelation zu klinischen Parametern und klinischem Verlauf gezeigt werden konnte (Bink, Haralambieva et al. 2008).

## 2. Problemstellung und Zielsetzung

Das Multiple Myelom ist für 20-30% der Todesfälle aller malignen, hämatologischen Erkrankungen verantwortlich.

Obwohl durch Hochdosis-Chemotherapie und anschließende autologe Stammzelltransplantation eine Komplettremission in 20-30% der Fälle erreicht werden kann, rezidiert die Erkrankung im Schnitt innerhalb von 1-2 Jahren. Auch nimmt die Anzahl der prognostisch ungünstigen, extramedullär verlaufenden Multiplen Myelome tendenziell zu. Trotz neuer Therapieformen wie die Gabe von Bortezomib oder Thalidomid bleibt das Multiple Myelom weiterhin eine unheilbare Erkrankung. Deshalb sind alternative Therapieformen, welche in der Lage sind, das rezidivfreie Überleben zu verlängern und extramedulläre Verläufe zu verhindern, dringend erforderlich (Condomines, Hose et al. 2007, Raanani, Shpilberg et al. 2007, Jemal, Siegel et al. 2009).

Die Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz stellt hingegen eine relativ harmlose Vorläufererkrankung des Multiplen Myeloms dar, wobei jedoch jährlich 1% der MGUS-Fälle in ein MM übergehen (Rajkumar, Lacy et al. 2007).

Das Extramedulläre Plasmozytom (EMP) ist eine weitere Plasmazellneoplasie. Sie ist charakterisiert als eine meist indolent verlaufende Erkrankung, die durch lokale Therapie geheilt werden kann und 5-Jahres-Überlebensraten von fast 80% aufweist. Das EMP wird auf der einen Seite als eigenständige Tumorgattung betrachtet, auf der anderen Seite aber wird es auch als mögliche Vorläufererkrankung des Multiplen Myeloms diskutiert (Alexiou, Kau et al. 1999, Bink, Haralambieva et al. 2008).

Oftmals fällt besonders eine Abgrenzung zwischen extramedullären MM-Infiltraten und dem EMP schwer, und eine Diagnose ist nur anhand von Knochenmarkuntersuchungen zu stellen.

Eine Unterscheidung zwischen den beschriebenen Entitäten und eine Abgrenzung gegenüber dem Multiplen Myelom haben weitreichende prognostische und therapeutische Konsequenzen.

Cancer-Testis-Antigene (CT-A) stellen hierbei eine mögliche Perspektive dar. Sie sind eine Gruppe von Antigenen, welche exklusiv im Hoden und in Tumoren exprimiert werden, besonders beim Multiplen Myelom. In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass CT-A vor allem in höheren Krankheitsstadien exprimiert werden und in der Lage sind, zelluläre und humorale Immunantworten auszulösen. Auch gibt es bereits Hinweise, dass CT-A eine Rolle in der Frühdiagnostik spielen und als Marker für den Krankheitsverlauf eingesetzt werden können.

Bisherige Untersuchungen konzentrierten sich dabei stets auf die CT-A-Expression im Multiplen Myelom (Meklat, Li et al. 2007, Atanackovic, Luetkens et al. 2009, Kanojia, Garg et al. 2009).

MGUS- und EMM-Fälle wurden bis jetzt nur vereinzelt untersucht und vergleichende Analysen fehlen bislang.

In der vorliegenden Arbeit soll daher die Expression von Cancer-Testis-Antigenen bei den verschiedenen Plasmazellneoplasien untersucht werden, wobei sich diese Studie erstmalig in diesem Zusammenhang mit der Erkrankung EMP befasst. Dabei sollen im Speziellen Unterschiede in der Expression der CT-A zwischen diesen einzelnen Entitäten herausgearbeitet werden.

Ist ein bestimmtes Cancer-Testis-Antigen oder eine Kombination von Cancer-Testis-Antigenen für eine Erkrankung typisch?

Studien konnten zeigen, dass CT-A oftmals gleichzeitig exprimiert werden (Meklat, Li et al. 2007).

Die vorliegende Arbeit soll zeigen, welche CT-A bei den verschiedenen Plasmazellneoplasien gleichzeitig exprimiert werden und ob die Expressionen einzelner CT-A untereinander in Verbindung stehen. Darüber hinaus soll die CT-A-Expression mit prognostisch relevanten Markern und dem Grad der Differenzierung (Grading) der Plasmazellneoplasien korreliert werden.

Erst kürzlich konnten Bink K. et al. zeigen, dass nicht nur MM-Patienten prognostisch ungünstige Brüche in der IgH-Region aufweisen (in 50-70% der Fälle), sondern auch EMP-Patienten in bis zu 37% einen IgH-Bruch im Bereich des Genlokus 14q32 ausbilden (Bink, Haralambieva et al. 2008).

In dieser Arbeit soll geprüft werden, wie sich EMP-Fälle mit einem IgH-Bruch bezüglich der CT-A-Expression verhalten.

Cancer-Testis-Antigene wurden in bisher durchgeführten Analysen oftmals mit einer schlechten Prognose assoziiert (Cho, Caballero et al. 2006, Atanackovic, Luetkens et al. 2009). In der vorliegenden Studie soll daher die Cancer-Testis-Antigen-Expression auch mit dem klinischen Verlauf beim MM und EMM und dem Auftreten von Rezidiven beim EMP verglichen werden.

Das Ziel der Arbeit ist es, Unterschiede in der Cancer-Testis-Antigen-Expression zwischen den verschiedenen Plasmazellneoplasien aufzudecken, welche für diagnostische und prognostische Zwecke von großer Bedeutung sein können.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Herkunft und Sammlung des Materials**

##### **3.1.1 Patienten und Auswahlkriterien**

Für die vorliegende Studie wurde das Archiv des Instituts für Pathologie und Pathologische Anatomie des Klinikums Rechts der Isar der TU München retrospektiv von 1989 bis 2007 nach geeigneten Patientenfällen durchgesehen. Als Suchmaschine diente dabei das Computersystem PAS-Net, wobei nach folgenden Plasmazellneoplasien recherchiert wurde:

Monoklonale Gammopathien unklarer Signifikanz (MGUS), Multiple Myelome bzw. Plasmozytome (MM), Multiple Myelome mit osteolysären Läsionen (MM), extramedulläre Myelome (EMM) und Fälle mit der Diagnose des extramedullären Plasmozytoms (EMP).

Im weiteren Verlauf wurden die oben genannten Fälle eingehend begutachtet, wobei folgende Einschlusskriterien für die Selektion der geeigneten Patienten maßgebend waren:

MGUS-Patienten sollten eine Infiltration durch Plasmazellen von 10% oder weniger aufweisen. Im Gegensatz dazu sollte die Infiltration bei den Multiplen Myelomen mindestens 20% betragen, um möglichst viel Tumormaterial für die Untersuchungen zur Verfügung zu haben. Bei Fällen des osteolytischen MM sollte es sich um weichgewebliche Infiltrate aus pathologisch osteolytisch bedingten Frakturen mit nicht entkalkten Knocheninfiltraten handeln.

Sowohl für die extramedullären Myelome als auch für die extramedullären Plasmozytome war eine extraossäre Plasmazellmanifestation Voraussetzung. Gleichzeitig sollte die zeitnah durchgeführte Untersuchung des Knochenmarks bei den EMM eine Infiltration von Tumorzellen nachweisen. Bei den EMP sollte die Knochenmarkuntersuchung definitionsgemäß negativ bezüglich Tumorzellen ausfallen. Um die Unterscheidung zwischen EMM und EMP zu kräftigen, wurden nur solche EMP Fälle ausgewählt, die mindestens 12 Monate nach Diagnosestellung im Verlauf kein Multiples Myelom entwickelt hatten.

Um ausreichend Gewebe für die Herstellung der Tissue Micro Arrays zur Verfügung zu haben und um möglichst viele Tumorzellen gewinnen zu können, wurden nur Knochenmark-Trepanate von mindestens 1cm Größe inkludiert.

Nach Auswahl der Fälle wurden die Gewebeblöcke und die zu dem Fall gehörigen Schnitte dem Archiv des Instituts für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie entnommen und mit Hilfe von zwei Hämatopathologen (Prof. Falko Fend, PD. Dr. Marcus Kremer) begutachtet und reevaluiert. Gesichtet wurden die histologischen und immunhistochemischen Standardfärbungen zur Diagnosestellung (Giemsa, HE, PAS, Leichtketten, CD138, CD20, Cyclin D1 und CD56).

Die Stellen mit der größten Dichte des Tumorinfiltrats wurden auf den Schnitten (HE, bzw. Giemsa gefärbt) markiert, um anzuzeigen an welcher Stelle später bei der Herstellung des Tissue Micro Arrays die Probenentnahme durchgeführt werden sollte.

Zusätzliche Fälle aus den Pathologien von Kooperationspartnern (Universitätskliniken Würzburg und Graz, sowie aus Aarau, Liège und Kuala Lumpur) wurden in die Studie inkludiert, um eine größere Anzahl von Fällen mit extramedullärem Plasmozytom und extramedullärem Myelom zu gewinnen.

### 3.1.2 Kontrollfälle

Als Kontrollmaterial zur Positivkontrolle diente Keimzellepithelgewebe verschiedener Hodenpräparate, welche in derselben Weise wie in 3.1.1. bereits erläutert herausgesucht und gesichtet wurden (Kalejs and Erenpreisa 2005).

Als Negativkontrollen dienten Paraffinblöcke mit Gewebeproben aus Dünndarm, Tonsillen, Mantelzelllymphomen und MALT-Lymphomen, die sich ebenfalls auf den hergestellten Tissue-Micro-Arrays befanden, um sie unter gleichen Bedingungen zu färben und zu bearbeiten.

Die weiteren Positiv- und Negativkontrollen, die bei den verschiedenen Untersuchungsmethoden verwendet wurden, werden an der jeweiligen Stelle genannt.

### 3.1.3 Sammlung klinischer Daten

Um die Diagnosestellung der Patienten zu sichern wurde bei allen Fällen eine möglichst umfassende Anzahl klinischer Daten gesammelt.

Diese Informationen wurden zunächst aus den jeweiligen pathologischen Befunden des Computersystem PAS-Net zusammengetragen. Weitere Daten wurden den Patientenakten entnommen, welche aus den entsprechenden Archiven des Klinikums Rechts der Isar entliehen wurden (Tumorthérapiezentrum, Hämatologische Tagesklinik, Archiv der Strahlenklinik, HNO-Archiv, Neurologisches Archiv, Zentralarchiv Trogerstrasse, Münchner Studienzentrum).

Zur weiteren Absicherung und Vervollständigung der Patientendaten wurden die behandelnden Hämatologen und Hausärzte der Patienten befragt.

Hierzu wurde ein Fragebogen entworfen und den Ärzten zugesandt mit der Bitte, die fehlenden klinischen Informationen einzutragen und den Fragebogen zurückzusenden.

Zum anderen wurden die betreuenden Ärzte mehrfach angerufen und über ihre Patienten befragt. Bei den Fällen der auswertigen Pathologien wurden die klinischen Informationen telefonisch oder schriftlich mitgeteilt.

Bei allen Fällen wurde Alter, Geschlecht, Zeitpunkt der Erstdiagnose der Erkrankung und das Grading ermittelt.

Für jede Diagnoseart wurden folgende, weitere klinischen Daten erhoben:

*MGUS*: Infiltrationsdichte, M-Gradient, leichte Kette, Therapie, Verlauf, Dauer des Follow-ups.

*MM/Osteolysen*: Infiltrationsdichte, M-Gradient, leichte Kette, Rezidiv oder Persistenz der Erkrankung, Lokalisation, Knochenmarkbefall, Durie-Salmon-Stadium, Therapie, Krankheitsverlauf, Dauer des Follow-ups.

*EMM*: Infiltrationsdichte, M-Gradient, leichte Kette, Rezidiv oder Persistenz der Erkrankung, Lokalisation, Knochenmarkbefall, Durie-Salmon-Stadium, Therapie, Krankheitsverlauf, Dauer des Follow-ups.

*EMP*: M-Gradient, leichte Kette, Erstdiagnose oder Rezidiv, Lokalisation, Knochenmarkbefall, Durie-Salmon-Stadium, Therapie, Krankheitsverlauf (Lokalrezidiv bzw. Entwicklung eines MM), Dauer des Follow-ups.

## 3.2 Herstellung der Tissue-Mikroarrays-Arrays und der Schnitte

### 3.2.1 Herstellung der Tissue-Mikro-Arrays

Für die Untersuchungen wurden Biopsien aus den Gewebeblöcken entnommen und drei verschiedene Tissue-Micro-Arrays (= TMA) hergestellt, wobei der Aufbau der TMA nach Diagnosestellung sortiert vorgenommen wurde. Von jedem TMA wurde außerdem jeweils ein zweiter identischer TMA angefertigt.

Die Herstellung der Tissue-Micro-Arrays fand in dem Institut für Pathologie des Helmholtz Zentrums München statt.

Als erstes wurde eine Stelle mit hoher Tumorzell-dichte auf einem histologisch-angefärbten Schnitt des jeweiligen Spenderblocks als Entnahmestelle markiert (Giemsa, HE).

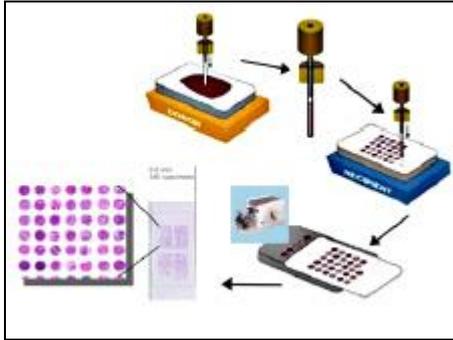
Im Folgenden wurde ein Paraffin-Leer-Block ausgegossen (Tiefe 5 bis 10mm), der als Empfängerblock für die Stanzen der Gewebeproben dienen sollte. Nach Aushärtung des Paraffin-Leer-Blocks wurden alle Unebenheiten vom Blockhalter entfernt und geprüft, ob der Block frei von Luftblasen war. Vor der eigentlichen Herstellung der TMA wurde die Anordnung der Stanzproben auf einem Lageplan festgelegt.

Dabei ist auf einen ausreichenden Abstand zwischen den Gewebeproben und den Rändern des Paraffinblocks geachtet worden (3-4 mm), um Rissbildungen im Ansatz zu vermeiden.

Im Anschluss wurden die TMA mit Hilfe des „Manuellen Tissue Arrayers“ MTA-1 2005 (AlphaMetrix Biotech GmbH, Rödermark, Deutschland) angefertigt.

Dieses Gerät verfügt über zwei Stanzen:

Eine Stanze mit einem kleinen Lumen, welches dazu dient, Löcher in den Empfängerblock zu stanzen und eine weitere Stanze mit einem größeren Lumen, um Stanzproben aus den ausgewählten Bereichen des Spenderblocks zu entnehmen (siehe **Abbildung 1**) (Bedienungsanleitung MTA-1-2005, AlphaMetrix Biotech GmbH, Rödermark, Deutschland).



**Abb. 1:** Darstellung des Tissue-Microarrays (TMA)

In der Abbildung sind die einzelnen Schritte für die Herstellung eines Tissue-Micro-Arrays dargestellt: von der Gewinnung der Gewebeprobe bis zu deren Aufbringung in den Empfängerblock. (Bedienungsanleitung MTA-1-2005, AlphaMetrix Biotech GmbH, Rödermark, Deutschland).

Nach Adjustierung des Gerätes wurde als erstes der Empfängerblock in die Halterung eingespannt, wobei die Oberfläche des Blockes parallel zur Arbeitsfläche liegen sollte. Zunächst wurde ein Loch mit der dünneren Stanze an der ersten Position des Paraffinblocks durchgeführt (Einstechtiefe zwischen 0,5 und 1mm). Diese Stanze wurde verworfen, der Empfängerblock aus der Haltungsverrichtung gelöst und durch den Spenderblock ersetzt. Der entsprechende HE-Schnitt mit der Markierung wurde dabei über den Spenderblock gelegt um die zu stanzende Stelle auszumachen. Dieses „Schnitt-Block-Sandwich“ wurde nun mit der eingezeichneten Gewebeentnahmestelle unterhalb der Stanze mit dem größeren Lumen in die richtige Position gebracht, der Schnitt entfernt ohne den Spenderblock dabei in seiner Lage zu verändern und die Stanze durchgeführt.

Nach der Probenentnahme wurde wiederum der Empfängerblock eingespannt und die Stanze genau über das vorgesehene, vorgestanzte Loch positioniert und die Probe mit Hilfe eines Ausdruckstempels in das Loch überführt. Auf dieselbe Weise wurden die restlichen Stanzen entnommen und auf den Empfängerblock gebracht, wobei von links nach rechts in der X-Achse der Reihe nach vorgegangen wurde. Für die Fertigstellung des TMA war wichtig, dass sich die Gewebeprobe mit dem umliegenden Paraffin verbinden, um das Herauslösen einzelner Stanzen zu vermeiden. Hierfür wurden die TMA für zwei bis drei Stunden bei 37°C in einem Ofen erwärmt.

Mit Hilfe eines Objektträgers wurde die Oberfläche des aufgewärmten Arrays durch gleichmäßigen Druck auf dieselbe Höhe gebracht (Bedienungsanleitung MTA-1-2005, AlphaMetrix Biotech GmbH, Rödermark, Deutschland).

### 3.2.2 Anfertigung der Schnitte für histologische und immunhistochemische Färbungen

Für alle histologischen und immunhistochemischen Färbungen wurden stets frische Schnitte mit einer Schnittdicke von 2µm angefertigt. Um ein Herauslösen der Gewebelöcke aus dem umliegenden Paraffin zu vermeiden, galt es zu beachten, dass die Gewebeschnitte der TMA in ein Wasserbad mit

einer Temperatur von höchstens 38-39°C gelegt wurden. Anschließend wurden sie direkt auf Glasobjektträger (Länge: 76 mm, Breite: 34 mm, Dicke: 0,17 mm; Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim) aufgebracht. Zur Fixierung des dünnen Gewebematerials auf dem Glas, wurden die Arrayschnitte bei 37°C für zwei bis drei Tage, die anderen Schnitte bei 60°C über Nacht im Ofen gehalten.

### 3.3 Immunhistochemie

#### 3.3.1 Antikörper

Um die Plasmazellen im Präparat verstärkt zu visualisieren und den Immunphänotyp der verschiedenen Plasmazellneoplasien näher zu charakterisieren wurden eine Reihe histologischer und immunhistochemischer Färbungen mit diagnostischen Antikörpern durchgeführt (CD138, CD20, CD5, CD79a, CD56, Cyclin D1, Ki67, kappa, lambda, HE, Giemsa, EBV) (Ely, Di Liberto et al. 2005, Kremer, Ott et al. 2005, Gastinne, Leleu et al. 2007, Swerdlow, Campo et al. 2008, Ngo, Brodie et al. 2009) (siehe **Tabelle 6**).

<b>Tabelle 6: Antikörper zur Charakterisierung des MM</b>				
<b>Antikörper</b>	<b>Klon</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung (Knochenmark- Trepanat)</b>	<b>Positivkontrolle</b>
CD138	MI15	Dako, Glostrup, Dänemark	1:25	Tonsille
CD20	L26	Dako, Glostrup, Dänemark	1:500 (1:2000)	Appendix
CD5	4C7	Novocastra, Newcastle, UK	1:20	Appendix
CD79a	SP18	NeoMarkers, Fremont, CA, USA	1:100 (1:20)	Tonsille
CD56	1B6	Novocastra, Newcastle, UK	1:20	Lymphknoten (LK)
Cyclin D1	SP4	DCS, Hamburg, Deutschland	1:25	Mantelzellymphom
Ki67	MIB-1	Dako, Glostrup, Dänemark	1:100	Appendix
Kappa	R10-21-F3	Dako, Glostrup, Dänemark	1:2500 (1:750)	Tonsille
Lambda	N 10/2	Dako, Glostrup, Dänemark	1:1000 (1:500)	Tonsille
EBV	CS 1-4	Dako, Glostrup, Dänemark	1:50	Mononukleose-infiz. LK

**Tab. 6:** Antikörper zur Charakterisierung des MM

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die Antikörper, die mit Hilfe des automatischen Immunostainer (Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ, USA) angefärbt wurden.

<b>Tabelle 7: Cancer-Testis-Antigen-Antikörper</b>				
<b>Antikörper</b>	<b>Klon</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Positivkontrolle</b>
MAGE-A1	MA454	non-commercial	1:500	Keimepithel Hoden
MAGE-A3/6	M3H67	non-commercial	1:10000	Keimepithel Hoden
MAGE-C1	CT7-33	non-commercial	1:2000	Keimepithel Hoden
MAGE-C2	CT10-5	non-commercial	1:200	Keimepithel Hoden
NY-ESO-1	E 978	ZYMED, San Francisco, USA	1:75	Keimepithel Hoden

**Tab. 7:** Cancer-Testis-Antigen-Antikörper

Die Tabelle liefert eine Übersicht über die Antikörper, die manuell immunhistochemisch angefärbt wurden.

Darüber hinaus wurden alle Fälle mit ausgetesteten Antikörpern gegen Cancer-Testis-Antigene angefärbt (MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-C1, MAGE-C2, NY-ESO-1). Diese Antikörper gegen Cancer-Testis-Antigene wurden von Dr. Achim Jungbluth, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA, zur Verfügung gestellt (siehe **Tabelle 7**) mit Ausnahme von NY-ESO-1, welcher kommerziell erhältlich ist.

### 3.3.2 Durchführung der manuellen Immunhistochemie

Die Färbungen gegen Cancer-Testis-Antigene (siehe **Tabelle 7**) wurden manuell im Labor durchgeführt, wobei die Schnitte zunächst nach folgendem Protokoll entparaffiniert und anschließend rehydriert wurden:

2 x 10 Minuten in jeweils frischem Xylol

2 x 5 Minuten in jeweils 100% Ethanol

2 x 5 Minuten in jeweils 96% Ethanol

2 x 5 Minuten in jeweils 70% Ethanol

Anschließend kurzes Eintauchen in Aqua dest.

2 x 5 Minuten in jeweils frischem TBS (=Tris-buffered saline: genaue Zusammensetzung ist im Anhang Kapitel 8.1. aufgeführt).

Nachdem die Schnitte entparaffiniert und rehydriert wurden, erfolgte im nächsten Schritt das sogenannte „Antigen-retrieval“ durch Erhitzen der zu färbenden Schnitte in einer Pufferlösung (Dinges, Denk et al. 2002). Dies war ein notwendiger Schritt, um Bindungsstellen für die folgenden immunhistochemischen Färbungen freizulegen.

Die benötigten Pufferlösungen wurden bereits während des Entparaffinierens hergestellt.

Dabei kamen zwei verschiedene Pufferlösungen zur Anwendung:

*Citratpuffer* (10 mM; pH 6,0) für die Antikörper MAGE-C1 und NY-ESO-1

*EDTA-Puffer* (1 mM; pH 8,0) für die Antikörper MAGE-A1, MAGE-A3 und MAGE-C2

(Die genaue Herstellung der Pufferlösungen ist im Anhang, Kapitel 8.1).

Der Dampfgerar wurde mit destilliertem Wasser bis zur Markierung angefüllt und zusammen mit der jeweiligen Pufferlösung in einer mit Alufolie bedeckten Küvette 20 Minuten lang vorgeheizt.

Im Anschluss wurden die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte in die Küvetten mit den entsprechenden Puffer positioniert. Stets wurde darauf geachtet, dass die Schnitte so platziert waren, dass sie sich untereinander nicht berührten und jeder Schnitt benetzt wurde.

Daraufhin wurden die Schnitte in der jeweiligen Pufferlösung für weitere 30 Minuten im Dampfgerar gekocht. Anschließend sollten sie 30 Minuten lang in der Pufferlösung abkühlen. Es erfolgte eine weitere Spülung mit TBS.

Im Folgenden wurden einige Schritte durchgeführt, die dazu dienten, die einzelnen Antikörper möglichst spezifisch an ihre Zielstrukturen binden zu lassen um so eine Färbung des Hintergrundes zu reduzieren.

Als erstes wurde dabei die endogene Peroxidase blockiert. Dies erfolgte durch Inkubation der Schnitte in einer 3%-igen Wasserstoffperoxidlösung (30%,  $H_2O_2$  Merck, Darmstadt, Deutschland) für 15 Minuten und anschließender Spülung in TBS.

Die weiteren Schritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt.

Einige Gewebe können Avidin oder andere Komponenten des Biotin-Avidin-Systems binden, noch bevor ein biotinylierter Sekundärantikörper hinzugefügt wurde. Diese unspezifischen Bindungen können z.B. durch Biotin, biotinbindende Proteine oder Lectine, die im Gewebe enthalten sind, verursacht werden. Um die verbliebenen Biotinbindungsstellen am Avidin zu blockieren, wurden die Gewebeschnitte als erstes mit Avidin und anschließend mit Biotin vorbehandelt (jeweils 2 Tropfen pro Schnitt, je 15 min inkubieren) (Avidin/Biotin Blocking Kit, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA). Anschließend erfolgte eine Blockierung unspezifischer Bindungen durch Zugabe von 5%-igem Normalserum (Goat Serum (Normal), Dako, Glostrup, Dänemark), in dem die Schnitte mit je 100  $\mu$ l Normalserum für mindestens 30 Minuten inkubiert wurden.

Des Weiteren erfolgte die Herstellung der verschiedenen Verdünnungen der Primärantikörper gegen die Cancer-Testis-Antigene. Als Verdünnungsmittel diente Antibody Diluent (Dako Real, Glostrup, Deutschland). Die Präparate wurden mit je 100  $\mu$ l des verdünnten Primärantikörpers über Nacht bei  $-4^\circ\text{C}$  in einer Kühlkammer inkubiert und am folgenden Tag als erstes mit TBS gespült.

Um die Empfindlichkeit des Antigennachweises zu erhöhen, wurde die LSAB-Verstärkermethode angewendet (Dako REAL Detection System, Peroxidase/DAB<sup>+</sup>, Rabbit/Mouse, Dako, Glostrup, Dänemark). Dafür wurden auf jeden Schnitt 100  $\mu$ l eines biotinylierten Sekundärantikörpers für 30 Minuten aufgetragen (Link, Biotinylated Secondary Antibodies). Nach Spülung mit TBS wurden je 100  $\mu$ l eines Komplexbildners hinzugegeben (Streptavidin Peroxidase (HRP)). Nach 30-minütiger Inkubation erfolgte die Visualisierung der Antigenbindungen mit DAB (Diaminobenzidinlösung;

DAB<sup>+</sup> Chromogen), das in HRP-Substratpuffer (HRP-Substrate Buffer) verdünnt wurde - 100 µl pro Schnitt für 5 Minuten (für die genaue Herstellung der Verdünnung siehe Anhang, Kapitel 8.1.).

Nach kurzer Spülung in Aqua dest. wurden die Schnitte für 10 Sekunden mit Hämalaun gegengefärbt, gebläut (5-minütiges Spülen mit normalem Leitungswasser), in Aqua dest. getaucht und in der folgenden aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (2 x 70% Ethanol, 2 x 96% Ethanol, 2 x 100 % Ethanol, 2 x Xylol). Anschließend wurden die Präparate mit Eukitt eingedeckelt und getrocknet.

### 3.3.3 Durchführung der Immunhistochemie mit dem automatischen Immunostainer

Die zu untersuchenden Gewebe wurden mit einer Reihe diagnostischer und prognostischer Marker angefärbt (siehe **Tabelle 6**). Diese Färbungen erfolgten automatisiert in einem Immunostainer (Ventana Medical Systems, Tuscon, AZ, USA) gemäß den Standardprotokollen der jeweiligen Hersteller (siehe **Tabelle 6**).

Zunächst wurden die Schnitte nach folgendem Protokoll entparaffiniert und rehydriert:

2 x 5 Minuten in jeweils frischem Xylol

2 x 5 Minuten in 100% Ethanol

1 Minute in 100% Ethanol

2 x 1 Minute in jeweils 96% Ethanol

1 Minute in 80% Ethanol

3 Minuten Waschen in fließendem Wasser

Der folgende Schritt, das „antigen-retrieval“ erfolgte in diesem Fall durch Kochen der Schnitte in der Mikrowelle.

Dazu wurde zunächst 1,5 Liter Citratpuffer hergestellt (10 mM, pH 6,0; für die genaue Herstellung siehe Anhang, Kapitel 8.1.) und in einen Topf gefüllt. Die entparaffinierten Schnitte wurden in Glashakeln platziert, in den Topf gestellt, und in der Mikrowelle bei 800 Watt für 40 Minuten lang gekocht. Nach dem Kochen wurden die Objektträger direkt in 20°C warmen TBS-Puffer mit 3% Ziegen Serum (Normal Goat Serum, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gegeben und für mindestens 20 Minuten inkubiert. Dieser Schritt diente zur Abkühlung der Gewebeschnitte und zur Blockierung unspezifischer Bindungen.

Im Anschluss wurden die Objektträger mit computerlesbaren Etiketten versehen, auf denen Fallnummer, Monat und Jahr, sowie der verwendete Antikörper und dessen Verdünnung notiert wurden.

Die Schnitte wurden daraufhin mit den entsprechenden, mit Antibody Diluent-verdünnten (Dako, Glostrup, Dänemark) Antikörpern bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert.

Die weiteren Schritte- sekundärer Antikörper, Avidin-Biotin Komplex (ABC), Farbentwicklung und Gegenfärbung- erfolgten automatisiert in einem Immunostainer (Ventana Medical Systems Inc., Tuc-

son, AZ, USA) gemäß dem jeweiligen Protokoll des Antikörpers. Abschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (Ablauf siehe Kapitel 3.3.2.) eingedeckelt und getrocknet.

### 3.4 Auswertung

Die immunhistochemischen Färbungen der Biopsien mit den verschiedenen Antikörpern wurden gemeinsam mit zwei Pathologen (Hr. PD Dr. Marcus Kremer und Prof. Dr. Falko Fend) unabhängig semiquantitativ mit Hilfe eines Rasterokkulares ausgewertet. Bei allen Färbungen wurde die Färbintensität in drei Abstufungen bestimmt (1 = gering; 2 = mittel; 3 = stark) und die Lokalisation der einzelnen CT-A in der Zelle bestimmt, sowohl an jeder Patientenbiopsie, als auch an den Positivkontrollen (Hodenkeimepithel).

#### Auswertung der CD138-Färbungen

Vor der Auswertung der CT-A-gefärbten Gewebeschnitte wurde die Infiltrationsdichte der Plasmazellen in den einzelnen Präparaten mit Hilfe der CD138-Färbung bestimmt, um die Tumorzellen von anderen Zellen besser differenzieren zu können (Ng, Wei et al. 2006, Swerdlow, Campo et al. 2008).

#### Auswertung der Cancer-Testis-Antigen-Färbungen

Im Abgleich mit den CD138 gefärbten Schnitten wurden bei jeder Probe 100 Plasmazellen angesehen und diejenigen Zellen gezählt, die eine für den jeweiligen Antikörper typische Positivreaktion aufwiesen. Anschließend wurde ein Prozentwert gebildet (Anteil der positiven Plasmazellen von den 100 ausgezählten Plasmazellen, wobei die Prozentzahlen in 5%-Schritten von 0-100 Prozent angegeben wurden). Zunächst wurde die Höhe der CT-A-Expression in drei Gruppen eingeteilt: Gruppe 1: 0-5%; Gruppe 2: > 5-50%; Gruppe 3: > 50-100%. Um jedoch Unterschiede in der Expression deutlicher herauszukristallisieren, wurde eine binäre Einteilung gewählt, in dem die Gruppen 2 (> 5% -50%) und 3 (> 50%) zu einer Gruppe mit allen Werten > 5% zusammengefasst wurden.

### 3.5 Statistische Methoden

Die erhobenen Daten wurden zunächst deskriptiv analysiert und auf fehlerhafte Eingaben, wie z.B. Extremwerte und Ausreißer untersucht. Für quantitative Merkmale wurden der Mittelwert oder der Median sowie die Spannweiten (Min- und Max-Werte) angegeben. Für kategoriale Daten wurden die absoluten Häufigkeiten einzelner Merkmalsausprägungen tabelliert und die entsprechenden Anteilswerte (relative Häufigkeiten in Prozent) berechnet. Für einzelne Parameter wurden Klassenbildungen vorgenommen, um einfacher interpretierbare Vergleichsgruppen mit adäquaten Fallzahlen zu definie-

ren. Um Häufigkeiten von kategorialen Merkmalsausprägungen graphisch zu illustrieren wurden Säulendiagramme verwendet.

Um bivariate Assoziationen zwischen kategorialen Merkmalen zu prüfen wurde der  $\chi^2$ -Test verwendet. Waren die asymptotischen Voraussetzungen für diesen Test nicht erfüllt, kam der Exakte-Test von Fisher zum Einsatz. Mit Hilfe logistischer Regressionsanalysen wurde der simultane Einfluss verschiedener Parameter auf interessierende Prävalenzen untersucht. Im Zuge dessen wurden Chancenverhältnisse (Odds Ratios) mit 95% Konfidenzintervallen berichtet.

Um bivariate Assoziationen zwischen ordinal skalierten Merkmalen zu quantifizieren wurde der Kappa Koeffizient nach Cohen berechnet. Dieses Übereinstimmungsmaß nimmt Werte im Bereich 0 bis 1 an. Je näher der Koeffizient am Absolutwert 1 liegt, umso größer ist der positive Zusammenhang zwischen zwei ordinalen Merkmalen. Ein Kappa-Koeffizient nahe 0 bedeutet, dass kein Zusammenhang besteht.

Überlebenswahrscheinlichkeiten wurden nach der Methode von Kaplan-Meier berechnet und dargestellt. Der Log-Rank-Test kam zum Einsatz, um Überlebenskurven zwischen unabhängigen Kollektiven statistisch zu vergleichen. Alle statistischen Auswertungen erfolgten zu einem zweiseitigen Signifikanzniveau von 5%. Die Auswertungen wurden mit PASW Version 17 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) vorgenommen.

### **3.6 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)**

#### **3.6.1 Erläuterung der FISH-Methode**

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ermöglicht die direkte Visualisierung numerischer und struktureller Veränderungen von Chromosomen. So können z.B. balancierte und unbalancierte Translokationen oder Chromosomenbrüche mit Hilfe der FISH diagnostiziert werden. Das Grundprinzip der FISH-Technik beruht dabei auf der Eigenschaft von Nukleinsäuren, komplementäre Basenpaare zu binden, so dass die selektive Detektion spezifischer Sequenzen innerhalb von Zellen mit Hilfe spezieller DNA-Sonden ermöglicht wird. Voraussetzung dafür ist, dass die DNA als Einzelstrang vorliegt und Bindungsstellen für die komplementäre Sonde frei werden, was durch Denaturierung der DNA erreicht wird. Nach Bindung der DNA-Sonde kann die so markierte DNA-Sequenz in einem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden (Rautenstraß and Liehr 2002).

### 3.6.2 Durchführung und Auswertung der FISH-Untersuchungen

#### *Material*

Die Untersuchungen wurden an Paraffinschnitten der ausgewählten EMP-Fälle, bzw. an Schnitten des Tissue-Mikro-Arrays mit den entsprechenden EMP-Fällen durchgeführt, wobei in beiden Fällen eine Schnittdicke von 7µm gewählt wurde.

Als Kontrollmaterial dienten Gewebeproben aus normalen Lymphknoten, sowie Fälle von Multiplen Myelomen und Non-Hodgkin-Lymphomen mit bekannten Translokationen.

#### *FISH-Untersuchung*

Die FISH-Untersuchungen fanden in dem Institut für Pathologie des Helmholtz Zentrums München statt.

Die ersten Schritte der Untersuchung dienten dazu, die Nukleinsäuren der DNA, die sich innerhalb des fixierten Gewebes befanden, zu demaskieren, das heißt Komponenten der Zellkerne und des Zytoplasmas zu entfernen, um der Sonde einen Zugang zu den Zellkernen und der DNA zu ermöglichen (Rautenstrauß and Liehr 2002).

Dazu wurde als erstes eine Entparaffinierung der Formalin-fixierten Schnitte vorgenommen, wobei die Gewebeproben dabei über Nacht bei Raumtemperatur in Xylol lagerten und anschließend 5 Minuten in Isopropanol überführt wurden. Daraufhin wurde eine absteigende Alkoholreihe durchgeführt, wobei die Schnitte jeweils 5 Minuten in 100%, 90% und 70% Ethanol getaucht wurden. Diese Schritte erfolgten bei Raumtemperatur.

Die Gewebeproben wurden anschließend mit dem Ziel der Demaskierung von Bindungsstellen weiter vorbehandelt. Dafür wurden die Proben 5 Minuten lang bei Raumtemperatur in Phosphatpuffer mit einem pH von 7,0 getaucht (genaue Herstellung siehe Anhang, Kapitel 8.2.). Im nächsten Schritt wurde Citratpuffer (genaue Herstellung siehe Anhang, Kapitel 8.2.) bei 900 Watt in der Mikrowelle zum Kochen gebracht und die Schnitte anschließend bei 350 Watt 20 Minuten lang im Citratpuffer gekocht. Daraufhin wurden die Proben in Phosphatpuffer gespült und das Gewebe 2 Minuten lang proteolytisch bei 37°C im Wasserbad vorbehandelt mit Hilfe des Enzyms Pronase E 0,05% (Merck, Darmstadt, Deutschland).

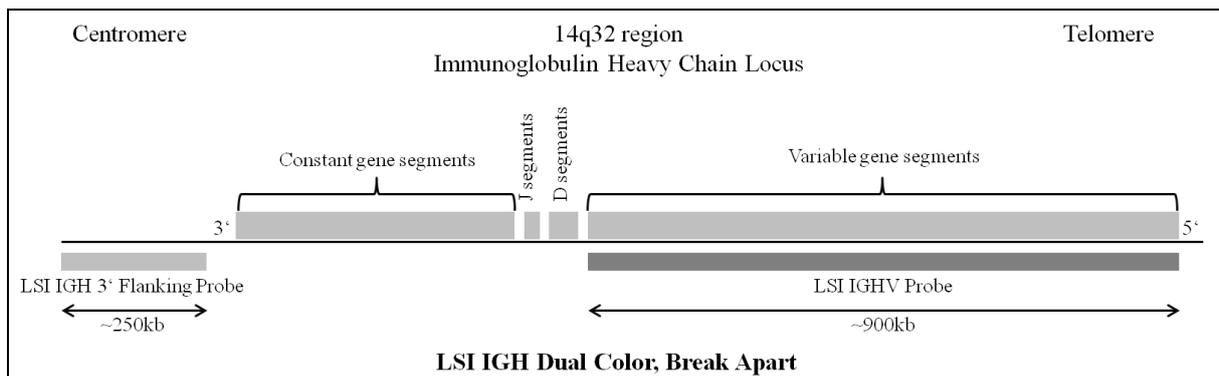
Dabei sollte die Verdünnung von Pronase E mindestens 5 Minuten im Phosphatpuffer equilibriert sein. Anschließend wurden die Schnitte bei Raumtemperatur noch einmal im Phosphatpuffer gespült. Eine aufsteigende Alkoholreihe schloss sich an (je 5 Minuten in 70%, 90%, 100% Ethanol). Die Objektträger sollten an der Luft trocknen und wurden gleichzeitig auf -20°C abgekühlt.

Im Anschluss erfolgte die simultane Denaturierung der zu untersuchenden DNA und der spezifischen Sonde.

Für die Detektion der IgH-Brüche wurde folgende Sonde verwendet:

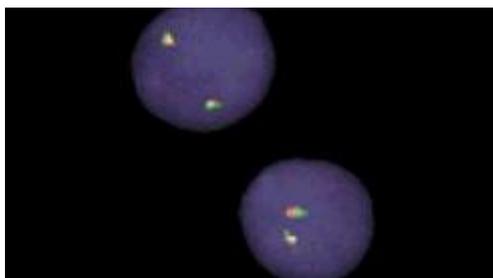
LSI IgH Dual Color, 5J7301, Break Apart, Rearrangement Probe der Firma ABBOTT GMBH & CO, Wiesbaden, Deutschland (siehe **Abbildungen 2-3**)

(<http://www.abbottmolecular.com/us/products/analyte-specific-reagent/fish/vysis-lsi-igh-dual-color-break-apart-rearrangement-probe.html> 2010).



**Abb. 2:** Darstellung der IgH-Sonde

Die Sonde hybridisiert mit der 14q32 Bande, wobei das Ende, das auf der telomeren Seite des IgH-Lokus liegt grün, und die centromere Seite des IgH-Lokus orange markiert wird. Bei einem einfachen IgH-Bruch kommen in den Zellkernen zum einen ein gelbes Fusionssignal, sowie 2 separierte Signale (orange und grün) zur Darstellung, welche den stattgefundenen IgH-Bruch markieren (<http://www.abbottmolecular.com/us/products/analyte-specific-reagent/fish/vysis-lsi-igh-dual-color-break-apart-rearrangement-probe.html> 2010).



**Abb. 3:** Aufnahme von Zellkernen nach einer FISH-Untersuchung

Darstellung zweier Zellkerne nach einer FISH-Untersuchung mit der LSI IGH Dual Color, Break Apart Rearrangement Sonde, welche mit DNA zweier Zellkerne hybridisiert. Es sind zwei Fusionssignale erkennbar, d.h. ein IgH-Bruch liegt hier nicht vor (<http://www.abbottmolecular.com/us/products/analyte-specific-reagent/fish/vysis-lsi-igh-dual-color-break-apart-rearrangement-probe.html> 2010).

Zunächst wurde die Sondenlösung vorbereitet, bestehend aus 2µl Sonde, 4µl Aqua dest und 14µl LSI-Sonden-Puffer (wird mit der LSI-Sonde geliefert), welche stets bei -20°C im Dunkeln gelagert wurde. Vor der eigentlichen Denaturierung wurde die Sondenlösung auf die Objektträger pipettiert, welche auf einer Heizplatte mit einer Temperatur von 37°C lagerten, wobei sich die Menge der zu verwend-

ten Sondenlösung nach der Größe der Biopsie richtete (Deckglasgröße 24x32mm: 20µl Sondenlösung; 24x24mm: 15µl Sondenlösung).

Die Schnitte wurden anschließend mit einem Deckglas und Fixogum (Marabu GmbH & Co, Tamm, Deutschland) versiegelt und solange abgedunkelt gelagert, bis Fixogum durchsichtig wurde. Anschließend erfolgte die simultane Denaturierung durch Erhitzen der Gewebeproben bei 75°C auf der Heizplatte für 8 Minuten. Um die Hybridisierung zwischen DNA-Strängen und Sonde zu erleichtern, wurden die Proben in einer feuchten Kammer bei 37°C über Nacht gelagert.

Im letzten Schritt erfolgte ein „Waschvorgang“, der überschüssige Sondenlösung entfernen und instabile, unspezifische Bindungen zwischen Sonde und Zell-DNA beseitigen sollte.

Dieser Vorgang erfolgte im Dunkeln. Die Proben wurden zweimal kurz in eine Mischlösung aus Standard-Saline-Citratlösung (genaue Herstellung siehe Anhang, Kapitel 8.2.) und 0,3% N-P40-Lösung (Nonidet™ P 40, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) getaucht und anschließend 2 Minuten lang in dieselbe Lösung mit hoher Temperatur von 73°C gestellt.

Die Schnitte wurden im Dunkeln getrocknet und 3 Minuten in Hoechst-Gebrauchslösung (Nr. 33342; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland; genaue Herstellung siehe Anhang, Kapitel 8.2.) bei Raumtemperatur gegengefärbt. Nach Trocknung der Objektträger wurden sie mit VECT-ASHIELD® eingedeckelt (VECT-ASHIELD® Mounting Medium, H 1000, Vector Laboratories, CA, USA), welches ein Ausbleichen des Fluoreszenz-Signals verhindern sollte, und im Anschluss kühl und im Dunkeln gelagert.

### Auswertung

Die Auswertung der FISH-Untersuchungen und die Aufnahme der Ergebnisse erfolgten unter einem speziell geeigneten Mikroskop (Axioimager.Z1, Carl Zeiss AG, München, Deutschland).

In dieses Mikroskop ist ein ApoTome Zusatz integriert, eine strukturierte Beleuchtung, die es ermöglicht Schnittbilder in der z-Ebene aufzunehmen. Die Auswertung erfolgte anhand von 2 spezialisierten, erfahrenen Fachkräften semiquantitativ und unabhängig voneinander.

An jeder Gewebeprobe wurden mindestens 100 Zellkerne analysiert und der Grenzwert für die Auswertung des IgH-Bruches mit der LSI-IgH-Break-Sonde wurde an 10 positiv markierten Proben bestimmt (Mittelwert  $\pm$  3 Standardabweichungen). Dabei wurde die Grenzmarke, ob ein Fall positiv für einen IgH-Break gewertet wurde, auf 10,3% (Mittelwert  $\pm$  3 Standardabweichungen) gelegt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Patienten

In die Studie wurden 11 Fälle von MGUS und 57 MM-Fälle aus dem Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie des Klinikums Rechts der Isar der TU München inkludiert, wobei sich letztere aus 25 Biopsien weichgeweblicher Infiltrate aus pathologisch, osteolytisch bedingten Frakturen und aus 32 Beckenkammstanzen von Patienten mit einem Multiplen Myelom zusammensetzten (siehe **Tabelle 8**). Weiterhin waren 8 Patienten mit extramedullärem Plasmozytom (EMP) sowie 6 Fälle extramedullärer Myelome (EMM) geeignet. Um die Anzahl der in die Studie eingeschlossenen extramedullären Plasmozytome zu erhöhen, wurden zusätzlich 24 Fälle aus den Pathologien von Kooperationspartnern in die Studie mit einbezogen.

Im Einzelnen waren das: 11 Fälle aus dem Institut für Pathologie der Universität Graz, 5 Fälle aus dem Pathologischen Institut der Universität Würzburg, 3 Fälle aus Kuala Lumpur, 2 Fälle aus Aarau und 3 Fälle aus Liège.

Nach Auswahl der Fälle wurden die Gewebeproben histologisch und in Zusammenschau mit den klinischen Daten und den recherchierten Krankheitsverläufen reevaluiert und gegebenenfalls reklassifiziert. Hierbei ergab sich für 4 Fälle, welche initial als EMP eingestuft worden waren, eine Änderung der Diagnose, indem sie im Verlauf der Gruppe der EMM zugeordnet wurden.

Pro Patient wurde jeweils nur ein Fall in die Auswertung eingeschlossen, wobei derjenige Fall von einem Patienten ausgewählt wurde, bei dem die meisten Informationen und das meiste Gewebe auf den Blöcken vorhanden war. Unabhängig von den Färbeergebnissen wurde bei den Untersuchungen stets derselbe Fall von einem Patienten ausgewertet. Hinzu kamen drei Biopsien von Keimzellepithelien des Hodens aus dem Pathologischen Institut der TU München, welche als Kontrollgewebe für die Immunhistochemie mit den Cancer-Testis-Antigenen dienen sollten.

<b>Tabelle 8: Patientenauswahl</b>	
<b>Diagnose</b>	<b>Fallzahl</b>
MGUS	11
Multipl. Myelom	57
EMM	10
EMP	28
Gesamt	106

**Tab. 8:** Patientenauswahl

Die Tabelle zeigt die endgültige Zusammensetzung der Studienpatienten für alle Auswertungen.

## 4.2 Klinische Daten

Die klinischen Charakteristika der Studienpatienten sind in **Tabelle 9** zusammengefasst.

### MGUS

Von den 11 Patienten mit Monoklonaler Gammopathie unklarer Signifikanz waren 6 weiblich und 5 männlich mit einem Altersmedian zum Zeitpunkt der Primärdiagnose von 65 Jahren (61-81) (siehe **Tabelle 9**). Histologisch wurden alle Fälle als sehr gut differenziert klassifiziert (Grad 1 in der Grading-Einteilung nach Bartl) (Bartl, Frisch et al. 1987).

6 der 11 Patienten produzierten Immunglobulin G, 1 Patient Immunglobulin A und 2 Patienten Immunglobulin M. Beim Großteil der Fälle wurde die leichte Kette lambda (50%) exprimiert. Eine Therapie der MGUS musste bei keinem der Patienten eingeleitet werden.

9 der 11 Patienten konnten regelmäßig nachbeobachtet werden, wobei die mittlere Nachbeobachtungszeit (= Dauer des Follow-ups) bei 26 Monaten lag (siehe **Tabelle 10**). In diesem Zeitraum entwickelte sich bei keinem der Patienten ein Multiples Myelom und zum Zeitpunkt des letzten Follow-ups waren alle Patienten am Leben.

### Multiples Myelom

23 der MM-Patienten waren weiblichen und 34 männlichen Geschlechts, wobei der Altersmedian bei 66 Jahren lag (32-84) (siehe **Tabelle 9**). Das Material entstammte in allen Fällen aus dem Knochenmark und zeigte eine Plasmazellinfiltration von mindestens 20%, wobei der Mittelwert bei 76% lag. Von 56 verfügbaren Fällen waren 33 als sehr gut differenziert eingestuft worden, wobei 6 weitere Fälle eine lymphoplasmazytische Differenzierung aufwiesen. 16 Biopsien zeigten eine mäßige Differenzierung (Grad 2) und nur 1 Fall zeigte eine schlechte Differenzierung (Grad 3) (siehe **Tabelle 9**). Von den untersuchten Fällen zeigten 64% eine Immunglobulin-G- und 22% eine Immunglobulin-A-Produktion. Ein Nachweis der Leichtkettenproduktion kappa war in 70% der Fälle zu vermerken. Klinisch befanden sich 24% der Patienten zu dem Zeitpunkt der Diagnosestellung im Durie-Stadium 1, 10% der Patienten im Durie-Stadium 2 und 66% der Patienten waren bereits im fortgeschrittenen Durie-Stadium 3 der Erkrankung. Therapeutisch kam vor allem Chemotherapie alleine oder in Kombination mit Stammzelltransplantation bzw. Radiotherapie zum Einsatz.

80% der Patienten erhielten eine Chemotherapie, 33% eine Stammzelltherapie und 48% eine Radiotherapie. Die relativ hohe Rate an Operationen (39%) wurde vor allem durch den Einschluss weichgeweblich infiltrierender Osteolysen pathologischer Frakturen in die Studie verursacht, welche in den meisten Fällen operativ angegangen wurden (18 der 25 Osteolysen-Fälle). Bei 3 Patienten wurde eine so genannte „wait & see“ Therapie veranschlagt. 52 der 57 Patienten konnten nachbeobachtet werden mit einer mittleren Follow-up-Dauer von 41 Monaten mit weiter Spannweite von 2 bis 228 Monaten. Im Verlauf sind 38% verstorben, wobei der größte Teil krankheitsbedingt verstarb (siehe

**Tabelle 10).** Die verbliebenen 62% der Patienten waren zum Zeitpunkt des letzten Follow-ups noch am Leben, wobei 52% unter der Erkrankung litten und nur 10% keinerlei Evidenz des einst diagnostizierten Multiplen Myeloms zeigten.

<b>Tabelle 9: Klinische Patientendaten</b>					
	<b>MGUS (n=11)</b>	<b>MM (n=57)</b>	<b>EMM (n=10)</b>	<b>EMP (n=28)</b>	<b>Gesamt (n=106)</b>
<b>Geschlecht</b>					
weiblich	6 (55%)	23 (40%)	4 (44%)	8 (30%)	41 (39%)
männlich	5 (45%)	34 (60%)	5 (56%)	19 (70%)	63 (61%)
auswertbare Fälle	11 (100%)	57 (100%)	9 (90%)	27 (96%)	104 (98%)
<b>Alter [Jahre]<sup>1</sup></b>	65 (r: 61-81)	66 (r: 32-84)	67 (r: 45-76)	58 (r: 28-83)	65 (r: 28-84)
auswertbare Fälle	9 (82%)	53 (93%)	9 (90%)	27 (96%)	98 (92%)
<b>Grading</b>					
1/LP	11 (100%)/0	33 (59%)/6 (11%)	3 (30%)/2 (20%)	22 (78%)/1 (4%)	69 (65%)/9 (9%)
2	0	16 (28%)	4 (40%)	5 (18%)	25 (24%)
3	0	1 (2%)	1 (10%)	0	2 (2%)
auswertbare Fälle	11 (100%)	56 (98%)	10 (100%)	28 (100%)	105 (99%)
<b>M-Gradient<sup>2</sup></b>					
G	6 (67%)	32 (64%)	5 (83%)	16 (84%)	59 (70%)
A	1 (11%)	11 (22%)	0	0	12 (14%)
M	2 (22%)	0	0	0	2 (2%)
auswertbare Fälle	9 (82%)	50 (88%)	6 (60%)	19 (68%)	84 (79%)
<b>Leichte Kette<sup>3</sup></b>					
Kappa	4 (40%)	37 (70%)	5 (83%)	16 (73%)	62 (68%)
Lambda	5 (50%)	15 (28%)	1 (17%)	6 (27%)	27 (30%)
auswertbare Fälle	10 (91%)	53 (93%)	6 (60%)	22 (79%)	91 (86%)
<b>Durie Stadium</b>					
1	-	12 (24%)	-	-	12 (21%)
2	-	5 (10%)	-	-	5 (9%)
3	-	33 (66%)	7 (100%)	-	40 (70%)
auswertbare Fälle		50 (88%)	7 (70%)		57 (85%)
<b>Therapie<sup>4,5</sup></b>					
CTX	-	43 (80%)	7 (100%)	0	50 (59%)
SZTX	-	18 (33%)	2 (29%)	0	20 (24%)
RTX	-	26 (48%)	3 (42%)	11 (79%)	40 (47%)
OP	-	21 (39%)	5 (71%)	10 (71%)	36 (42%)
keine	10 (91%)	3 (6%)	0	0	13 (15%)
auswertbare Fälle	10 (91%)	54 (95%)	7 (70%)	14 (50%)	85 (80%)

<sup>1</sup> r: range  
<sup>2</sup>M-Gradient : 7 MM-Patienten zeigten keine Erhöhung des M-Gradienten; 1 EMM-Patient zeigte eine Produktion von G und M; 2 EMP-Patienten zeigten eine Produktion von G und D gleichzeitig und bei einem EMP-Patienten war keine Immunglobulinproduktion nachweisbar  
<sup>3</sup> Leichte Kette: 1 MGUS-Patient zeigte eine Produktion von kappa und lambda Leichtketten gleichzeitig und 1 Patient war negativ für kappa und lambda  
<sup>4</sup> Mehrere Ausprägungen pro Patient möglich, daher Summe der Prozentwerte über 100%  
<sup>5</sup> CTX: Chemotherapie; SZTX: Stammzelltransplantation; RTX: Radiotherapie; OP: Operation

**Tab. 9:** Klinische Patientendaten

Die Tabelle stellt eine Zusammenschau der klinischen Daten aller Patientengruppen dar. Dabei beziehen sich die Berechnungen (Anteilswerte (%)/ Mittelwerte  $\pm$  Stabw.) auf die auswertbaren Fälle.

<b>Tabelle 10: Klinischer Verlauf</b>						
<b>Klinischer Verlauf</b>	<b>MGUS (n=11)</b>	<b>MM (n=57)</b>	<b>EMM (n=10)</b>	<b>EMP (n=28)</b>	<b>Gesamt (n=106)</b>	
<b>verstorben</b>	krankheitsbedingt	0	16 (31%)	5 (83%)	0	21 (23%)
	andere Ursache	0	4 (7%)	0	4 (17%)	8 (9%)
<b>überlebt<sup>1</sup></b>	mit Erkrankung	0	27 (52%)	1 (17%)	0	29 (32%)
	keine Evidenz für Erkrankung	0	5 (10%)	0	19 (83%)	23 (26%)
	ohne Progress der Erkrankung <sup>2</sup>	9 (100%)	0	0	0	9 (10%)
<b>Nachbeobachtete Fälle</b>	9 (82%)	52 (91%)	6 (60%)	23 (82%)	90 (85%)	
<b>keine Nachbeobachtung</b>	2 (18%)	5 (9%)	4 (40%)	5 (18%)	16 (15%)	
<b>Nachbeobachtungszeit<sup>3</sup></b>	26 (12-60)	41 (2-228)	26 (2-104)	84 (8-188)	41 (2-228)	
<sup>1</sup> bis zum letzten Nachbeobachtungszeitpunkt						
<sup>2</sup> nur für MGUS-Patienten						
<sup>3</sup> Nachbeobachtungszeit in Monaten. Median (Minimum-Maximum); bei den EMM-Fällen sind Todesfälle inbegriffen						

**Tab. 10:** Klinischer Verlauf

Die Tabelle stellt den weiteren klinischen Krankheitsverlauf der Patienten dar, die Anzahl der Patienten die an der Erkrankung verstorben sind, sowie die Anzahl derjenigen die nicht krankheitsbedingt verstarben. Demgegenüber werden die Patientenanzahlen aufgelistet, welche die Krankheit überlebt haben. Auch wird die Dauer der Nachbeobachtung der Patienten mit den verschiedenen Erkrankungen angegeben.

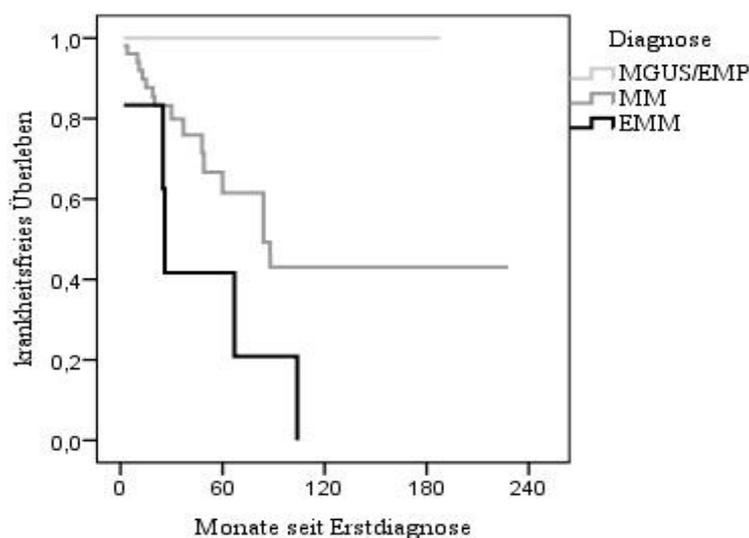
### EMM

Unter den 10 untersuchten Fällen mit extramedullärem Myelom waren 4 Frauen und 5 Männer mit einem Altersmedian von 67 Jahren (45-76) (siehe **Tabelle 9**). Das Material aller Patienten entstammte, wie vorausgesetzt, einer extramedullären Lokalisation. Im Einzelnen waren dies: Larynx (1), Hals (1), Milz (1), Orbita (1), Haut (3), Nasennebenhöhlersystem (1). Ein Patient zeigte eine generalisierte Infiltration mehrerer Organe. Die Fälle wurden histologisch klassifiziert, wobei 30% sehr gut differenziert waren und 20% eine lymphoplasmozytische Ausprägung aufwiesen (siehe **Tabelle 9**).

4 der 10 Fälle wurden als mäßig differenziert und nur ein Fall als schlecht differenziert beurteilt. Alle Fälle produzierten Immunglobulin G und leichte Kette kappa und jeweils nur ein Patient produzierte zusätzlich Immunglobulin M bzw. anstelle kappa die leichte Kette lambda. Alle Patienten befanden sich zum Zeitpunkt der Materialgewinnung im klinischen Durie-Salmon Stadium 3 und wurden chemotherapeutisch behandelt. In 71% der Fälle war auch eine Operation nötig. Insgesamt konnten 6 der 10 Patienten nachbeobachtet werden, wobei die mittlere Beobachtungszeit (Follow-up) der Patienten 26 Monate betrug mit einer Spannweite von 2 bis 104 Monaten (siehe **Tabelle 10**). Zum Zeitpunkt des letzten Follow-ups waren von diesen 6 Patienten bereits 5 an der Erkrankung verstorben und nur 1 Patient noch am Leben.

EMP

Der überwiegende Teil der EMP-Patienten war männlichen Geschlechts (19 von 27 Patienten) und zeigte im Schnitt ein Alter von 58 Jahren (28-83) (siehe **Tabelle 9**). Die Tumore waren zum größten Teil in Pharynx (9 von 27 Patienten) und in Lymphknoten (7 Patienten) lokalisiert. Die Ursprungsorte der anderen Fälle verteilten sich wie folgt: Nasenhöhle (5), Haut (2), Tonsille (1), Mundhöhle (1), Orbita (1), Larynx (1). Nach histologischer Begutachtung wurden 78% der Fälle als sehr gut differenziert eingestuft mit einer Anzahl von 4% lymphoplasmazytischen Fällen und nur 18% wurden als mäßig differenziert klassifiziert. Dabei konnte bei allen Fällen eine Immunglobulin-G-Produktion nachgewiesen werden. Die leichte Kette kappa wurde zu 73% exprimiert. Die Hälfte der Patienten wurde mit einer Kombination aus operativer Entfernung und lokaler Radiotherapie behandelt. Die andere Hälfte erhielt entweder eine alleinige Radiotherapie oder eine lokale Operation. Bei 23 der 28 Patienten waren Informationen über den weiteren Krankheitsverlauf verfügbar, wobei diese im Mittel 84 Monate (8-188 Monate) nachbeobachtet wurden (siehe **Tabelle 10**). In diesem Zeitraum verstarben 17% der Patienten, jedoch aufgrund anderer Erkrankungen. Die restlichen Patienten blieben bis zum Zeitpunkt des letzten Follow-ups ohne den Nachweis eines EMP oder eines Multiplen Myeloms am Leben (siehe **Abb. 4**). Ein Patient jedoch zeigte im Verlauf (45 Monate nach Erstdiagnose) eine solitäre, osteolytische Knochenläsion im Schädel, die zwar verdächtig auf ein Multiples Myelom gewesen wäre, aber histologisch nicht untersucht worden ist. Ein anderer Patient entwickelte eine Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (144 Monate nach Erstdiagnose) und ein weiterer Patient ein nodales Marginalzonen (B-Zell)-Lymphom (27 Monate nach Erstdiagnose). Insgesamt 6 Patienten (26%) entwickelten ein Lokalrezidiv des EMP in einem Zeitraum zwischen 24 und 96 Monaten nach Stellung der Primärdiagnose.



**Abb. 4:** Überlebenskurven

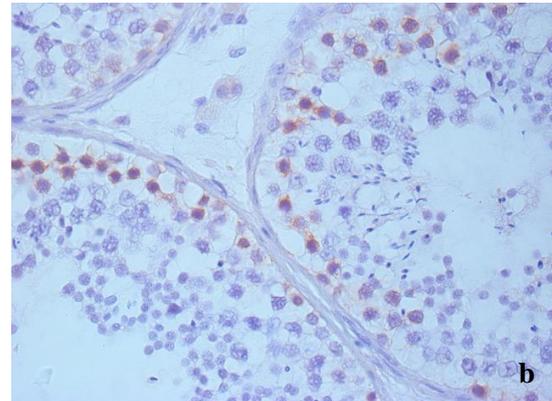
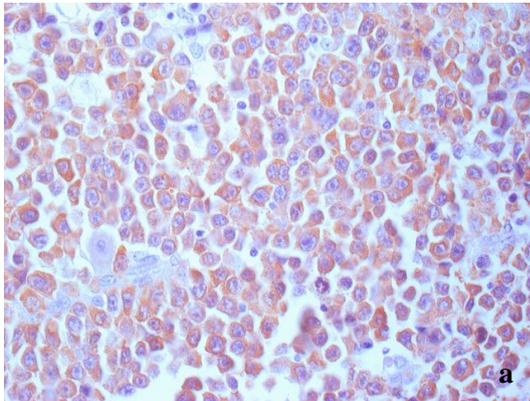
Die Abbildung zeigt die Überlebenskurven der einzelnen Diagnosegruppen, bezogen auf die Patienten, die an der Erkrankung verstorben sind. In der MGUS- und EMP-Gruppe ist kein Patient an der Erkrankung verstorben. Im Verlauf zeigten Patienten mit der Diagnose Multiples Myelom und EMM ein signifikant schlechteres Überleben ( $p < 0,001$ ).

### 4.3 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen mit den Cancer-Testis-Antigenen

#### 4.3.1 Cancer-Testis-Antigene: Lokalisation und Färbeintensität

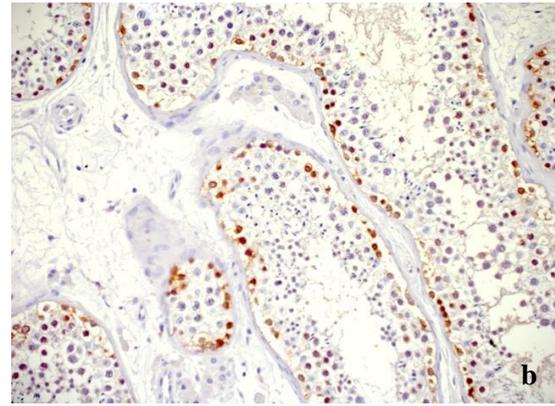
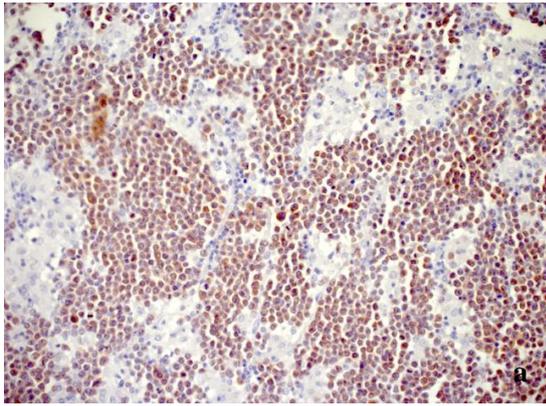
Bezüglich der Färbeintensität lässt sich sagen, dass es keine Varianz in der Intensität zwischen den verschiedenen Tumorfällen und Tumorgattungen gab. Ein Antikörper präsentierte also insgesamt entweder eine rein schwache, mittlere oder starke Farbintensität, unabhängig von der Diagnoseart.

MAGE-A1 zeigte sowohl in den Tumorpräparaten, als auch in den Keimepithelien des Hodens durchweg eine zytoplasmatische Expression, wobei unabhängig von der Diagnoseart die Schnitte insgesamt sehr schwach angefärbt wurden (siehe **Abbildungen 5**). MAGE-A3/6 wurde ebenfalls in den Kontrollen wie auch in allen Plasmazellfällen zytoplasmatisch exprimiert mit einer schwachen bis mittelstarken Anfärbung (siehe **Abbildungen 6**). Das Cancer-Testis-Antigen MAGE-C1 konnte überwiegend zytoplasmatisch nachgewiesen werden mit insgesamt starker Intensität. Jedoch zeigten 6 MM-Fälle, sowie jeweils 1 EMM- und 1 EMP-Fall zusätzlich eine nukleäre Expression (siehe **Abbildungen 7 und 8a**). MAGE-C2 wies eine rein nukleäre Expression in allen Proben auf, wobei generell eine mittel- bis starke Farbintensität vorlag (siehe **Abbildungen 8b und 9**). Das Cancer-Testis-Antigen NY-ESO-1 wurde stets zytoplasmatisch exprimiert, mit mittelkräftiger Farbgebung (siehe **Abbildungen 10**).



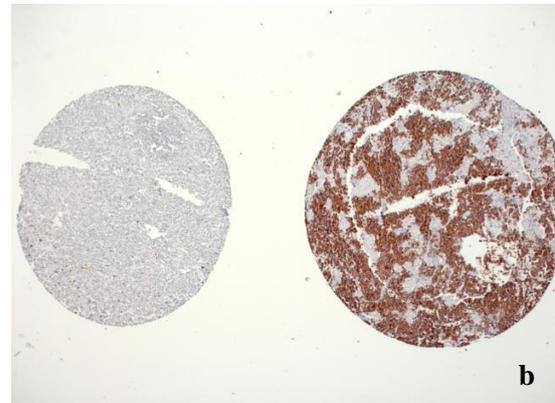
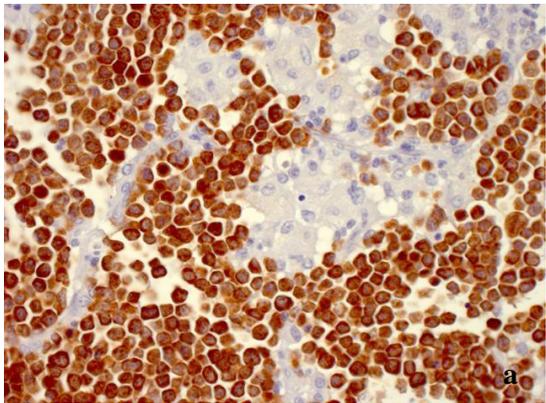
**Abb. 5:** Immunhistochemie mit MAGE-A1

**Abb. 5a** zeigt die Immunhistochemie eines MM-Falles. Die zytoplasmatische Färbung ist deutlich sichtbar. **Abb. 5b** stellt Keimepithel des Hodens dar, welches bei der Färbung als Positivkontrolle diente.



**Abb. 6:** Immunhistochemie mit MAGE-A3/6

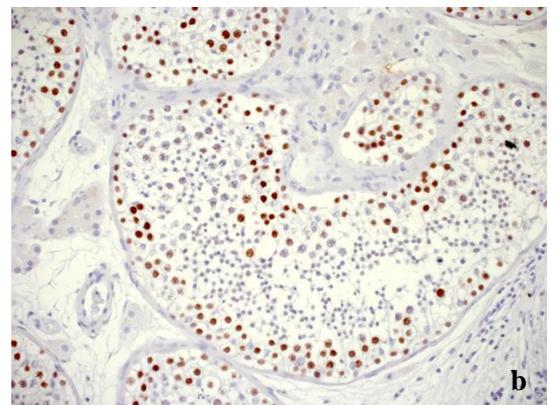
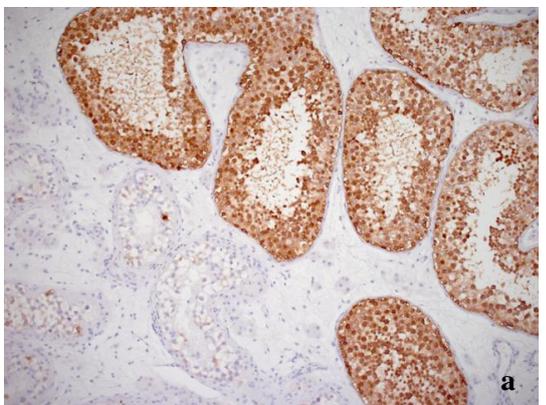
**Abb. 6a** demonstriert die zytoplasmatische Expression von MAGE-A3/6 am Beispiel eines EMP-Falles. **Abb. 6b** zeigt die entsprechende Positivkontrolle (Keimepithels des Hodens).



**Abb. 7:** Immunhistochemie mit MAGE-C1

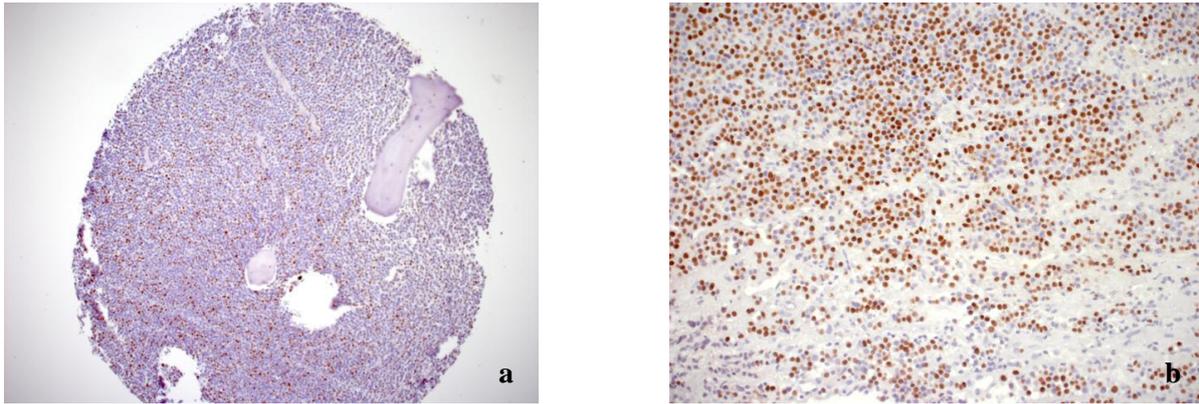
**Abb. 7a** zeigt ein Bild eines EMP-Falles, bei dem die zytoplasmatische Expression von MAGE-C1 zu erkennen ist.

Auch fällt eine starke Färbintensität auf. **Abb. 7b** zeigt denselben Fall in geringerer Vergrößerung neben einem schwach positiven EMP-Fall.



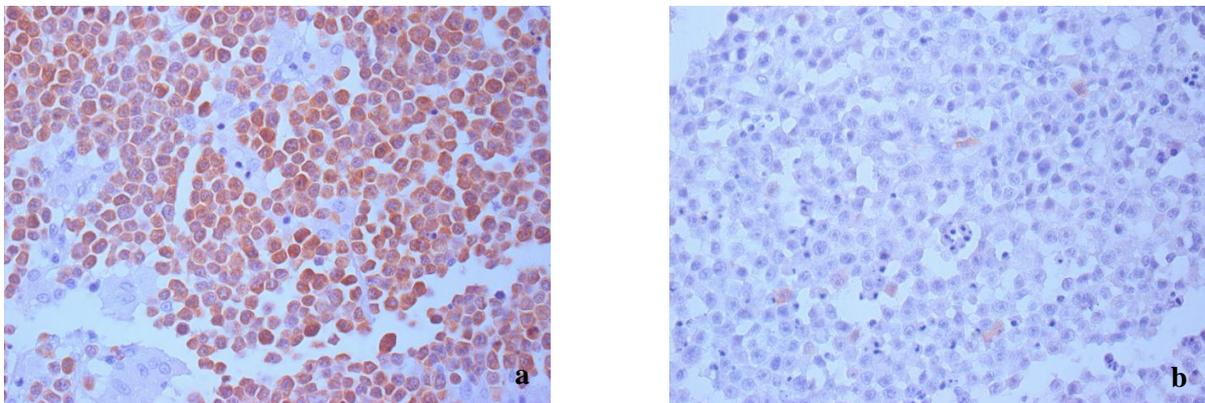
**Abb. 8:** Positivkontrollen MAGE-C1 und MAGE-C2

**Abb. 8a** zeigt Keimepithel des Hodens, welches mit MAGE-C1 angefärbt wurde. In **Abb. 8b** ist die nukleäre Expression von MAGE-C2 erkennbar.



**Abb. 9:** Immunhistochemie mit MAGE-C2

**Abb. 9a** und **Abb. 9b** zeigen einen MM-Fall, welcher MAGE-C2 exprimierte. Wie bei der Positivkontrolle liegt eine nukleäre Färbung vor.



**Abb. 10:** Immunhistochemie mit NY-ESO-1

**Abb. 10a** stellt einen MM-Fall dar, bei dem die zytoplasmatische Färbung zu erkennen ist. **Abb. 10b** zeigt Keimepithel des Hoden, welches als Positivkontrolle diente. Hier wird die relativ schwache Farbintensität von NY-ESO-1 sichtbar.

## 4.3.2 Verteilung der Cancer-Testis-Antigene bei den Plasmazellneoplasien

### 4.3.2.1 Gesamtüberblick

Im Rahmen der Studie wurden alle Fälle mit 5 verschiedenen Cancer-Testis-Antigenen angefärbt (MAGE-A1, MAGE-A3/6, MAGE-C1, MAGE-C2 und NY-ESO-1).

Die Ergebnisse sind in **Tabelle 11** dargestellt. Es konnte eine signifikant unterschiedliche Expression in den Diagnosegruppen festgestellt werden.

Tabelle 11: Verteilung der CT-A-Expression							
CT-A		MGUS (n=11)	MM (n=57)	EMM (n=10)	EMP (n=28)	Gesamt (n=106)	p-Wert
<b>MAGE-A1</b>	0-5%	9 (100%)	30 (65%)	5 (56%)	13 (50%)	57 (64%)	0,039
	>5%	0	16 (35%)	4 (44%)	13 (50%)	33 (36%)	
<b>MAGE-A3/6</b>	0-5%	11 (100%)	22 (44%)	6 (67%)	23 (85%)	62 (64%)	< 0,001
	>5%	0	28 (56%)	3 (33%)	4 (15%)	35 (36%)	
<b>MAGE-C1</b>	0-5%	11 (100%)	17 (33%)	4 (45%)	16 (59%)	48 (49%)	< 0,001
	>5%	0	34 (67%)	5 (55%)	11 (41%)	50 (51%)	
<b>MAGE-C2</b>	0-5%	9 (100%)	31 (67%)	3 (33%)	20 (74%)	63 (69%)	0,018
	>5%	0	15 (33%)	6 (67%)	7 (26%)	28 (31%)	
<b>NY-ESO-1</b>	0-5%	11 (100%)	41 (82%)	5 (56%)	25 (93%)	82 (85%)	0,035
	>5%	0	9 (18%)	4 (44%)	2 (7%)	15 (15%)	

**Tab. 11:** Verteilung der CT-A-Expression:

Die Tabelle zeigt die Anzahl an Patienten (Anzahl/%) mit einer CT-A Expression von 0-100%, den Diagnosegruppen nach geordnet. Der p-Wert gilt für die binäre Gruppeneinteilung 0-5% vs. >5% für das jeweilige Cancer-Testis-Antigen. Wie schon im Unterpunkt 4.3.1. beschrieben, wird die Farbintensität nicht gesondert aufgeführt.

### MGUS

Von den MGUS-Patienten wurde keines der untersuchten Cancer-Testis-Antigene exprimiert.

### Multiplles Myelom

Bei den MM-Patienten wurde MAGE-A1 zu 35% exprimiert (siehe **Tabelle 11**).

Sowohl MAGE-A3/6 als auch MAGE-C1 wurden mit 56% bzw. 67% relativ stark exprimiert. MAGE-C2 wurde bei 33% der Patienten mit einem MM gefunden. NY-ESO-1 hingegen wurde nur von 18% der untersuchten Patienten exprimiert.

### EMM

Patienten mit einem EMM zeigten folgendes Expressionsmuster (siehe **Tabelle 11**):

44% der Patienten zeigten eine Expression von MAGE-A1.

33% der Patienten waren positiv für MAGE-A3/6. MAGE-C1 und MAGE-C2 wurden in dieser Gruppe stark exprimiert mit 55%, bzw. 67%. NY-ESO-1 wurde ebenfalls zu relativ großen Anteilen ausgebildet und bei 44% der Patienten gefunden.

### EMP

Bei den EMP-Patienten war MAGE-A1 dasjenige CT-A, welches mit 50% am stärksten exprimiert wurde (siehe **Tabelle 11**). Das weitere Vorkommen der CT-A verteilte sich wie folgt: Eine Expression von MAGE-A3/6 zeigten nur 4 der 27 Patienten (15%). MAGE-C1 exprimierten 41% und MAGE-C2 26% der EMP-Patienten. NY-ESO-1 wurde nur zu sehr geringen Anteilen bei den EMP-Patienten gefunden, und zwar bei 2 der 27 untersuchten Fälle (7%).

#### **4.3.2.2 Vergleichende Betrachtung der CT-A-Expression zwischen den Diagnosegruppen**

##### MGUS versus MM

Besonders auffällig zeigte sich das Expressionsprofil der MGUS-Patienten, bei denen keines der untersuchten Cancer-Testis-Antigene nachzuweisen war.

##### MM versus EMM

Im Folgenden wurde die Expression zwischen den MM- und den EMM-Fällen miteinander verglichen. Hierbei konnten folgende Beobachtungen gemacht werden:

Sowohl MAGE-A1, als auch MAGE-C1 wurden von beiden Patientengruppen ähnlich stark exprimiert. MAGE-A1 wurde von den MM zu 35% und von den EMM zu 44% ausgebildet. MAGE-C1 konnte bei 67% der MM-Patienten nachgewiesen werden, während es bei den EMM-Patienten in 55% der Fälle zu finden war (siehe **Tabelle 11**).

Dahingegen haben Patienten mit einem Multiplen Myelom jedoch fast doppelt so oft MAGE-A3/6 exprimiert als Patienten mit einem EMM (56% vs. 33%). Umgekehrt hatten die EMM-Patienten eine zweimal so hohe Expression an MAGE-C2 als die MM-Patienten (67% beim EMM vs. 33% beim MM). NY-ESO-1 wurde ebenfalls bei den EMM-Patienten um 26% mehr-exprimiert als bei den MM-Patienten (44% vs. 18%).

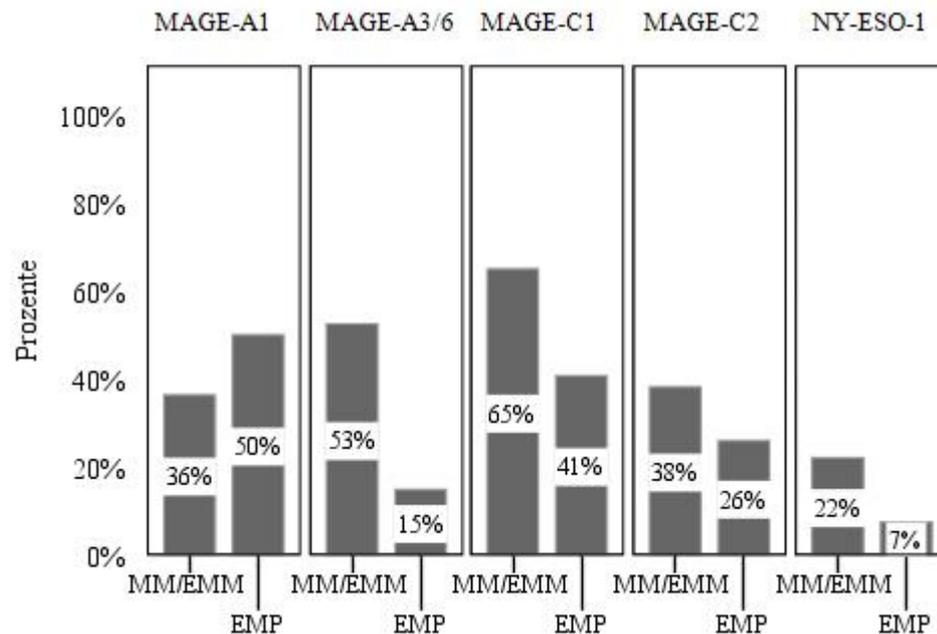
##### MM und EMM versus EMP

Da es sich beim Multiplen Myelom und dem extramedullären Multiplen Myelom um zwei Manifestationsformen derselben Erkrankung handelt, und weil keine signifikanten Unterschiede zwischen diesen beiden Patientengruppen gefunden wurden, sind sie im Folgenden zu einer Fall-Gruppe, der MM/EMM-Gruppe, zusammengeschlossen und anschließend den EMP-Fällen gegenübergestellt worden (siehe **Tabelle 12** und **Abbildung 11**).

Tabelle 12: CT-A-Expression MM/EMM versus EMP				
		MM/EMM (n=67)	EMP (n=28)	p-Wert
<b>MAGE-A1</b>	0-5%	35 (64%)	13 (50%)	0,33
	>5%	20 (36%)	13 (50%)	
<b>MAGE-A3/6</b>	0-5%	28 (47%)	23 (85%)	0,001
	>5%	31 (53%)	4 (15%)	
<b>MAGE-C1</b>	0-5%	21 (35%)	16 (59%)	0,039
	>5%	39 (65%)	11 (41%)	
<b>MAGE-C2</b>	0-5%	34 (62%)	20 (74%)	0,33
	>5%	21 (38%)	7 (26%)	
<b>NY-ESO-1</b>	0-5%	46 (78%)	25 (93%)	0,084
	>5%	13 (22%)	2 (7%)	

**Tab. 12:** CT-A-Expression MM/EMM versus EMP

Die Tabelle zeigt die Gegenüberstellung MM/EMM versus EMP, wobei sich die p-Werte auf den Vergleich 0-5% vs. >5% beziehen und für das jeweilige Cancer-Testis-Antigen dargestellt sind.



**Abb. 11:** CT-A-Expression MM/EMM vs. EMP

Das Balkendiagramm stellt die Ergebnisse der Tabelle 12 graphisch dar und zeigt die Gegenüberstellung der Diagnosegruppen MM/EMM und EMP bezüglich der Expression der einzelnen Cancer-Testis-Antigene.

Die Gegenüberstellung erbrachte folgende Ergebnisse:

Es zeigte sich eine signifikant unterschiedliche Expression des Antigens MAGE-A3/6 in den Diagnosegruppen MM/EMM und EMP (p-Wert: 0,001). Patienten mit EMP wiesen geringere Ausprägungen auf als Patienten mit einem MM, bzw. einem EMM. So war z.B. der Anteil an >5%-Expression bei den EMP um 38% geringer als in der MM/EMM-Gruppe (siehe **Tabelle 12**). Auch hinsichtlich der Expression von MAGE-C1 konnten statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Diagnosegruppen MM/EMM und EMP festgestellt werden (p-Wert: 0.039).

In der Gruppe der MM/EMM waren insgesamt höhere Expressionswerte zu verzeichnen als in der EMP Gruppe (65% vs. 41%) (siehe **Tabelle 12**).

Außerdem konnte beobachtet werden, dass MAGE-C2 bei den EMP etwas niedriger als bei den MM/EMM ausgebildet wurde (26 % bei EMP vs. 38 % bei MM/EMM).

Ebenfalls das Cancer-Testis-Antigen NY-ESO-1 wurde mit 7% deutlich geringer in der EMP-Gruppe exprimiert im Vergleich zu der MM/EMM Gruppe, die eine NY-ESO-1-Expression von 22% aufwies. Nur eines der fünf untersuchten Cancer-Testis-Antigene, MAGE-A1, wurde bei Patienten mit EMP mehr als bei Patienten mit MM/EMM exprimiert (50 % vs. 36 %) (siehe **Tabelle 12**).

Die beiden CT-Antigene, MAGE-A3/6 und MAGE-C1, die sich in der Gegenüberstellung MM/EMM vs. EMP als signifikant erwiesen hatten, wurden im multiplen logistischen Regressionsmodell auf ihren unabhängigen Prädiktionscharakter bezüglich der Unterscheidung MM/EMM und EMP geprüft. Für beide CT-A (MAGE-A3/6 und MAGE-C1) konnte ein von Alter und Geschlecht signifikant unabhängiger Erklärungsgehalt hinsichtlich der Diagnose MM/EMM vs. EMP bestätigt werden (p-Wert für MAGE-A3/6: 0,006; p-Wert für MAGE-C1: 0,016). Demnach haben Patienten mit MAGE-A3/6 Expression (>5%) eine ca. 90% geringere Chance ein EMP aufzuweisen als Patienten mit keiner Expression ( $\leq 5\%$ : adjustiertes Chancenverhältnis (odds ratio): 0,110; 95% Konfidenzintervall: 0,022-0,537).

Patienten mit MAGE-C1 Expression >5% hingegen haben eine ca. 77% geringere Wahrscheinlichkeit, ein EMP aufzuweisen als Patienten mit einer MAGE-C1 Expression ( $\leq 5\%$ : adjustiertes Chancenverhältnis (odds ratio):0,225; 95% Konfidenzintervall: 0,067-0,753).

In weiterführenden Analysen wurde zudem eine signifikante, mittelstarke Korrelation zwischen den Expressionen dieser beiden CT-A festgestellt (Cohens Kappa: 0,54;  $p < 0,001$ ). Das bedeutet, dass MAGE-C1 und MAGE-A3/6, wie in **Tabelle 12** ersichtlich, bei Patienten mit MM/EMM hochreguliert sind und bei Patienten mit einem EMP in beiden Fällen geringer exprimiert werden.

Des Weiteren wurde geprüft, inwiefern die verschiedenen Cancer-Testis-Antigene simultanen Erklärungsgehalt hinsichtlich der Diagnoseart (MM/EMM vs. EMP) liefern.

Dazu wurde eine multiple logistische Regressionsanalyse mit allen 5 Markern durchgeführt. Im Zuge einer Variablenselektionsprozedur (Rückwärtsselektion) wurden dabei schrittweise jene CT-Antigene aus dem Modell ausgeschlossen, die simultan keinen signifikanten Erklärungsgehalt lieferten.

Hierbei konnten die Antigene MAGE-A1 und MAGE-A3/6 als signifikante Einflussgrößen eruiert werden (p-Wert für MAGE-A1: 0,007; p-Wert für MAGE-A3/6: 0,001). Demzufolge nimmt die Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen von EMP signifikant mit zunehmender MAGE-A1-Ausprägung zu und gleichzeitig mit zunehmender MAGE-A3/6-Expression ab.

### 4.3.3 Expressionsmuster der Cancer-Testis-Antigene

#### Gesamtüberblick

Der folgende Abschnitt stellt dar, wie oft Cancer-Testis-Antigene untereinander gleichzeitig exprimiert wurden und welche CT-A gehäuft mit anderen CT-A in Kombination auftraten (siehe **Tabelle 13** und **Abbildung 12**).

Da von den Patienten mit MGUS keines der CT-A exprimiert wurde, werden sie aus den folgenden Erläuterungen ausgeklammert.

Patienten der übrigen Diagnosegruppen exprimierten im Gegensatz zu den MGUS-Patienten sehr häufig wenigstens ein CT-A. So war bei den MM-Patienten in 83% der Fälle mindestens eines der CT-A nachzuweisen, und bei den EMM-Patienten konnten Cancer-Testis-Antigene zu 78% gefunden werden. Auch Fälle mit der Diagnose EMP zeigten in 70% zumindest die Expression von einem der fünf Cancer-Testis-Antigene.

In der MM-Gruppe wurden CT-A meist singular exprimiert (29%). Mehrere CT-A, d.h. zwei bzw. drei CT-A wurden in 20% bzw. 17% der Fälle gleichzeitig exprimiert. Vier und fünf CT-A wurden noch seltener zeitgleich exprimiert, mit 15% für vier CT-A und nur 2% für fünf CT-A.

Im Gegensatz dazu haben EMM-Patienten oftmals sogar alle fünf CT-A gleichzeitig exprimiert, und zwar in 23%. Nur 11% der Fälle zeigten eine singuläre CT-A-Expression. Bei den weiteren Patienten konnte eine Koexpression von zwei CT-A in 22% der Fälle nachgewiesen werden.

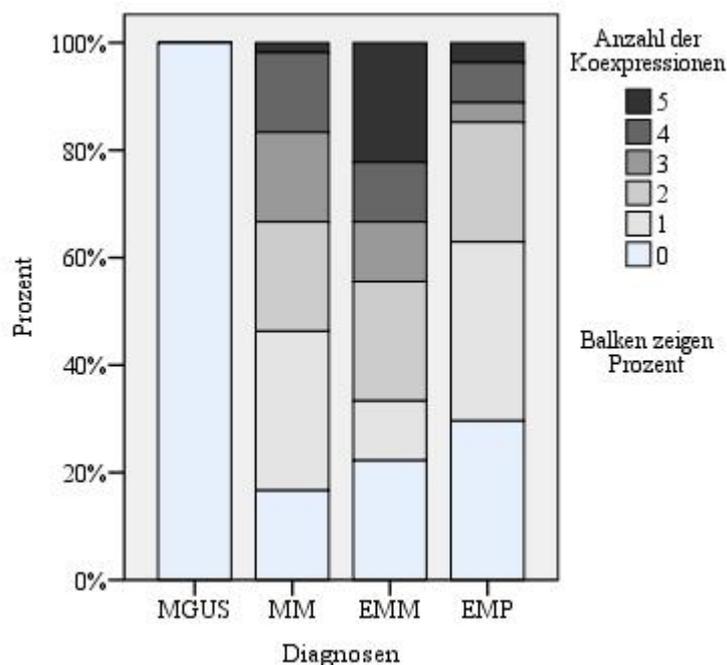
Drei und vier Cancer-Testis-Antigene wurden zu jeweils 11% gleichzeitig exprimiert.

Bei den EMP-Patienten konnte oftmals nur ein einzelnes CT-A nachgewiesen werden (33%). Auch zwei Cancer-Testis-Antigene wurden oftmals koexprimiert (22%). Dahingegen wurden drei, vier und fünf CT-A sehr selten gleichzeitig gefunden mit Werten von 4%, 7% und 4%.

Tabelle 13: Übersicht über die Koexpression von Cancer-Testis-Antigenen					
Anzahl der gleichzeitig exprimierten CT-A	MGUS (n=11)	MM (n=54)	EMM (n=9)	EMP (n=27)	Gesamt (n=101)
0	11 (100%)	9 (17%)	2 (22%)	8 (30%)	30 (30%)
<b>mindestens 1 CT-A</b>	<b>0</b>	<b>45 (83%)</b>	<b>7 (78%)</b>	<b>19 (70%)</b>	<b>71 (70%)</b>
1	0	16 (29%)	1 (11%)	9 (33%)	26 (25%)
2	0	11 (20%)	2 (22%)	6 (22%)	19 (19%)
3	0	9 (17%)	1 (11%)	1 (4%)	11 (11%)
4	0	8 (15%)	1 (11%)	2 (7%)	11 (11%)
5	0	1 (2%)	2 (23%)	1 (4%)	4 (4%)

**Tab. 13:** Übersicht über die Koexpression von Cancer-Testis-Antigenen

Die Tabelle stellt für jede Diagnoseart die Anzahl der koexprimierten CT-A dar. Ausgenommen der MGUS-Patienten wird in allen Diagnosegruppen sehr häufig mindestens ein CT-A exprimiert. MM exprimieren vor allem ein und zwei CT-A gleichzeitig. Auch bei den EMP ist zum überwiegenden Teil eine singuläre CT-A-Expression vorhanden. Dagegen exprimieren EMM-Patienten sehr häufig alle fünf CT-A gleichzeitig (23%).



**Abb. 12:** Darstellung der Koexpression von CT-A

Die Graphik stellt bildlich dar, wie oft in den einzelnen Diagnosegruppen Cancer-Testis-Antigene gleichzeitig exprimiert wurden. MGUS exprimieren keines der untersuchten CT-A. EMM-Patienten exprimieren auffallend häufig 4 und 5 CT-A gleichzeitig.

### Vergleiche zwischen den Gruppen

Im Folgenden wurde überprüft, ob signifikante Unterschiede in den Häufigkeiten der gleichzeitig exprimierten CT-A zwischen den verschiedenen Diagnosegruppen vorzufinden waren.

Herausstechend ist, dass bei den EMM-Patienten im Gegensatz zu den anderen Diagnosegruppen deutlich häufiger fünf CT-A gleichzeitig exprimiert wurden. So wurden bei den EMM in 23% der Fälle alle fünf CT-A koexprimiert, während bei MM- und EMP-Patienten dies nur in 2% bzw. in 4% der Gewebeproben der Fall war (p-Wert: 0,05) (siehe **Tabelle 13**).

Nachdem keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Diagnosegruppen festgestellt werden konnten, wurden die MM- und die EMM-Fälle erneut zu einer Gruppe, der MM/EMM-Gruppe zusammengefasst und den EMP gegenübergestellt (siehe **Tabelle 14**). In der Tabelle erkennt man, dass 44% der MM/EMM-Patienten kein oder nur ein CT-A koexprimierten, während das bei gut einem Drittel mehr EMP-Patienten zutrifft, nämlich in 63% der Fälle. MM/EMM-Patienten wiesen daneben auch geringfügig mehr 4 und 5 CT-A gleichzeitig auf als EMP-Patienten (19 % vs. 11%).

<b>Tabelle 14: Darstellung der koexprimierten CT-A (MM/EMM vs. EMP)*</b>		
<b>Anzahl der koexprimierten CT-A</b>	<b>MM/EMM</b>	<b>EMP</b>
0/1	28 (44%)	17 (63%)
2/3	23 (37%)	7 (26%)
4/5	12 (19%)	3 (11%)
*p-Wert (Fisher-Exact-Test): 0,309		

**Tab. 14:** Darstellung der koexprimierten CT-A (EMM/MM vs. EMP)

In der Tabelle erkennt man, dass 44% der MM/EMM-Patienten entweder keines oder nur eines der CT-A exprimierten. Dagegen exprimierten EMP um ein Drittel mehr kein bzw. nur ein CT-A (63%).

### Darstellung der gleichzeitig exprimierten CT-A

Im Anschluss wurde geprüft, welche CT-A singular bzw. in Kombination exprimiert wurden.

In der MM-Gruppe zeigte sich, dass die untersuchten CT-A unabhängig voneinander exprimiert wurden - bis auf MAGE-A1, welches nur in Kombination mit anderen CT-A auftrat.

Bei den EMM-Patienten wurden alle CT-A nur in Kombinationen mit den anderen untersuchten CT-A exprimiert, außer NY-ESO-1, das auch singular exprimiert wurde.

Bei den EMP-Patienten wurden MAGE-A3/6 und NY-ESO-1 nur in Kombination mit mindestens einem weiteren CT-A ausgebildet. Alle weiteren CT-A konnten auch unabhängig voneinander gefunden werden.

#### 4.4 Ergebnisse mit den Prognosemarkern

Um zu untersuchen, inwiefern die Expression der Cancer-Testis-Antigene mit der Prognose der Erkrankung zusammenhängt, wurden einige für das Multiple Myelom typische Prognosemarker herangezogen (Cyclin D1, CD56, Ki67) (Ely, Di Liberto et al. 2005, Kremer, Ott et al. 2005, Gastinne, Leleu et al. 2007).

Dafür wurde zunächst die Ausbildung der Prognosemarker in den verschiedenen Gruppen betrachtet und anschließend die Expressionshöhe der Prognosemarker mit der Expression der einzelnen CT-A verglichen.

##### 4.4.1 Ausprägung der Prognosemarker in den verschiedenen Gruppen

Die **Tabelle 15** zeigt das Vorkommen der drei Prognosemarker bei den verschiedenen Plasmazellneoplasien an. Sowohl Cyclin D1, als auch CD56 wurden vor allem von MM und- EMM-Patienten exprimiert. So konnte Cyclin in 63% der MM-Fälle und in 43% der EMM-Fälle vorgefunden werden. Der Prognosemarker CD56 wurde von 53% der MM-Patienten und von 75% der EMM-Patienten exprimiert. Dahingegen wurden diese beiden Prognosemarker beim EMP jeweils nur zu 8% ausgebildet und damit im Vergleich zu den MM/EMM hochsignifikant geringer exprimiert (p-Werte bei CD56 und Cyclin D1 <0,001).

Des Weiteren lässt die Tabelle eine ähnlich starke Ki67 Proliferation bei allen Diagnosegruppen erkennen, die um den Wert von 50% liegt.

Tabelle 15: Darstellung der Expression der Prognosemarker						
Prognosemarker	MGUS (n=11)	MM (n=57)	EMM (n=10)	EMP (n=28)	Gesamt (n=106)	p-Wert
<b>Cyclin D1</b>	0	30 (63%)	3 (43%)	2 (8%)	35 (38%)	<0,001
<b>CD56</b>	0	25 (53%)	6 (75%)	2 (8%)	33 (38%)	<0,001
<b>Ki 67</b>	0	21 (48%)	4 (50%)	11 (46%)	36 (43%)	>0,99

**Tab. 15:** Darstellung der Expression der Prognosemarker

Die Tabelle stellt die Expression der Prognosemarker Cyclin D1, CD56 und Ki67 bei den verschiedenen Diagnosegruppen dar. Es lässt sich eine signikant geringere Cyclin D1- und CD56-Expression bei den EMP-Patienten im Vergleich zu den MM/EMM-Patienten erkennen. Der Prognosemarker Ki67 wird in allen Gruppen ähnlich stark ausgebildet.

#### 4.4.2 Korrelation zwischen Prognosemarkern und den Cancer-Testis-Antigenen

Es wurde auch für jede Diagnosegruppe geprüft, ob die Expression der Cancer-Testis-Antigene mit dem Vorkommen der untersuchten Prognosemarker in einem Zusammenhang steht. In der folgenden Tabelle (**Tabelle 16**) sind die Kombinationen von Cancer-Testis-Antigenen und Prognosemarkern für die einzelnen Untergruppen dargestellt, die in den Untersuchungen signifikant miteinander korrelierten. Innerhalb der MM-Gruppe fanden sich signifikante Korrelationen zwischen dem Prognosemarker CD56 und den CT-A MAGE-C2 und MAGE-A1. MAGE-A1 korrelierte ebenfalls mit der Ki67-Expression. Innerhalb der EMM-Gruppe fanden sich Korrelationen zwischen dem Proliferationsmarker Ki67 und den CT-A MAGE-C2 und MAGE-C1. Auch in der EMP-Gruppe konnte ein Zusammenhang zwischen MAGE-C2 und Ki67 festgestellt werden. Ebenfalls zeigte sich hier eine signifikante Korrelation zwischen MAGE-C2 und Cyclin D1.

Es zeigen sich insgesamt also vereinzelt signifikante Korrelationen, wobei ein signifikanter Zusammenhang für die gesamte Gruppe der CT-A in toto nicht zu erkennen ist.

Tabelle 16: Korrelation zw. Prognosemarkern und einzelnen CT-A		
Plasmazellneoplasie	p-Wert	
<b>Multiples Myelom</b>	MAGE-C2 und CD56	0,011
	MAGE-A1 und Ki67	0,001
	MAGE-A1 und CD56	0,001
<b>EMM</b>	MAGE-C2 und Ki67	0,008
	MAGE-C1 und Ki67	0,008
<b>EMP</b>	MAGE-C2 und CyclinD1	0,015
	MAGE-C2 und Ki67	0,023

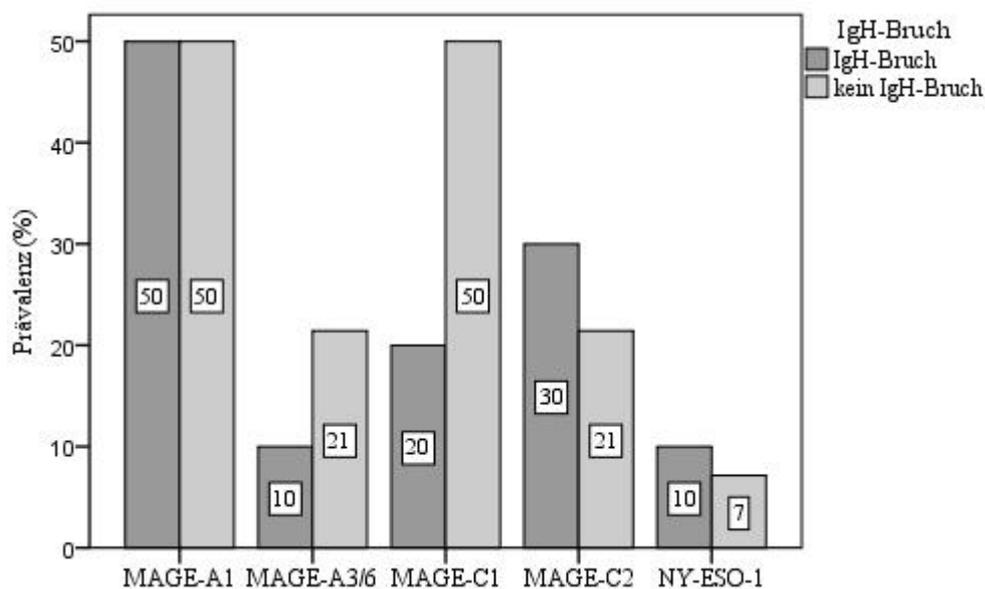
**Tab. 16:** Korrelation zwischen Prognosemarkern und einzelnen CT-A

#### 4.5 Cancer-Testis-Antigen-Expression und IgH-Brüche bei den EMP

Nachdem die Arbeitsgruppe bereits die Ausbildung und das Vorkommen von IgH-Brüchen bei den Multiplen Myelomen untersucht hatte, wurde in der vorliegenden Studie darauf aufbauend analysiert, ob ein Zusammenhang zwischen der Cancer-Testis-Antigen-Expression und der Ausbildung von IgH-

Brüchen bei den Patienten mit einem EMP besteht (Bink, Haralambieva et al. 2008) (siehe **Abbildung 13**).

In der Abbildung werden EMP-Patienten mit und ohne IgH-Bruch hinsichtlich ihrer CT-A-Expression gegenübergestellt. Das Cancer-Testis-Antigen MAGE-A1 wurde bei beiden Patientengruppen gleichermaßen exprimiert (p-Wert: 1,0). MAGE-A3/6 und MAGE-C1 wurden deutlich geringer bei Patienten mit einem IgH-Bruch gefunden (10% vs. 21%; p-Wert: 0,615) und (20% vs. 50%; p-Wert: 0,210). Die Cancer-Testis-Antigene MAGE-C2 und NY-ESO-1 wurden tendenziell mehr von Patienten mit einem IgH-Bruch ausgebildet (30% vs. 21%; p-Wert: 0,665) und (10% vs. 7%; p-Wert: 1,0).



**Abb. 13:** Vergleich der CT-A-Expression und des IgH-Bruchs bei den EMP-Patienten

Die Abbildung zeigt die Gegenüberstellung zwischen EMP-Patienten mit einem IgH-Bruch und EMP-Patienten ohne einen IgH-Bruch hinsichtlich der Cancer-Testis-Antigen-Expression.

#### 4.6 Korrelation: Cancer-Testis-Antigene und Grading

Die Verteilung der verschiedenen Differenzierungsgrade (Grad 1-3 nach Bartl) bei den einzelnen Plasmazellneoplasien wurde bereits im Kapitel 4.2. beschrieben. Im Folgenden wurde untersucht, ob die histologische Differenzierung im Zusammenhang mit der Expression der einzelnen Cancer-Testis-Antigene steht. Bei der Auswertung wurden die Fälle, die sehr gut differenziert waren und die lymphoplasmazytischen Fälle zu einer Gruppe zusammengefasst. Unabhängig von der Unterteilung in Diagnosegruppen konnte für MAGE-C1 eine signifikante Korrelation zwischen dem Grading und der Höhe der CT-A-Expression gefunden werden (p-Wert: 0,02; Kendall-Tau-b: 0,26).

Bei Analyse des Zusammenhangs zwischen CT-A-Expression und Grading in den verschiedenen Subgruppen ergab sich nur für MAGE-C1 eine signifikante Korrelation zwischen Expression und Grading in der EMP-Subgruppe (p-Wert: 0,048).

#### 4.7 Korrelation: Cancer-Testis-Antigene und Krankheitsverlauf

##### 4.7.1 Cancer-Testis-Antigen-Expression und Krankheitsüberleben

Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern sich die Expression einzelner Cancer-Testis-Antigene auf den Krankheitsverlauf der untersuchten Patienten auswirkte und ob die Cancer-Testis-Antigen-Expression in einem Zusammenhang mit krankheitsbedingten Versterben (dead with disease = DWD) stand. Dabei wurden Überlebenskurven für jedes CT-A erstellt, die das Überleben der Patienten in Abhängigkeit von der Höhe der CT-A-Expression (geringe bzw. keine CT-A-Expression von 0-5% vs. höhere CT-A-Expression von > 5%) vergleichen sollten. Hierbei fanden sich zwar keine statistisch signifikanten Korrelationen, jedoch zeichneten sich deutlich Tendenzen ab. **Tabelle 17** zeigt die Anzahl der Patienten, die an der Erkrankung gestorben sind, wobei jeweils zwischen Patienten, die das CT-A exprimiert hatten und Patienten, die das CT-A nicht exprimiert hatten unterschieden wird.

<b>Tabelle 17: Krankheitsbedingtes Versterben (DWD) in Abhängigkeit der Höhe der CT-A-Expression</b>			
	<b>DWD (0-5%)</b>	<b>DWD (&gt;5%)</b>	<b>p-Wert</b>
<b>MAGE-A1</b>	13/43 (=30%)	6/26 (=23%)	0,13
<b>MAGE-A3/6</b>	10/46 (=22%)	9/30 (=30%)	0,42
<b>MAGE-C1</b>	5/36 (=14%)	15/42 (=36%)	0,1
<b>MAGE-C2</b>	8/48 (=17%)	10/21 (=48%)	0,051
<b>NY-ESO-1</b>	13/64 (=20%)	7/13 (=54%)	0,11

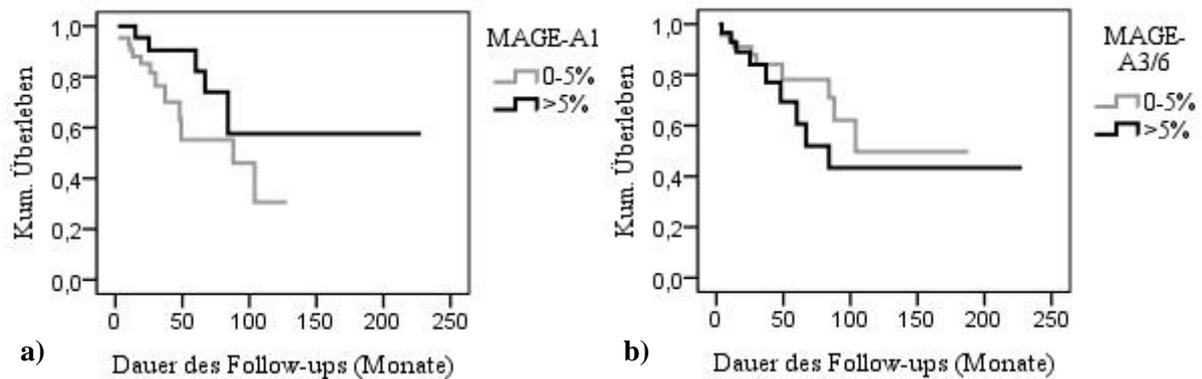
**Tab. 17:** Krankheitsbedingtes Versterben (DWD) in Abhängigkeit der Höhe der CT-A-Expression

Die Tabelle zeigt die Unterschiede im Krankheitsverlauf in Abhängigkeit von der Cancer-Testis-Antigen-Expression an. In der linken Spalte ist der Anteil der Patienten dargestellt, die an der Erkrankung verstorben sind, ohne das jeweilige CT-A zu exprimieren. In der rechten Spalte wird dahingegen der Anteil der Patienten genannt, der an der Erkrankung verstorben ist, bei gleichzeitig erhöhten Werten für das jeweilige CT-A. Am Ende der Spalte steht der entsprechende p-Wert.

In **Tabelle 17** und **Abbildung 14a** erkennt man, dass Patienten mit höherer MAGE-A1-Expression etwas seltener an der Erkrankung starben als Patienten mit fehlender MAGE-A1-Expression (23% vs. 30%). Hier lag ein p-Wert von 0,13 vor.

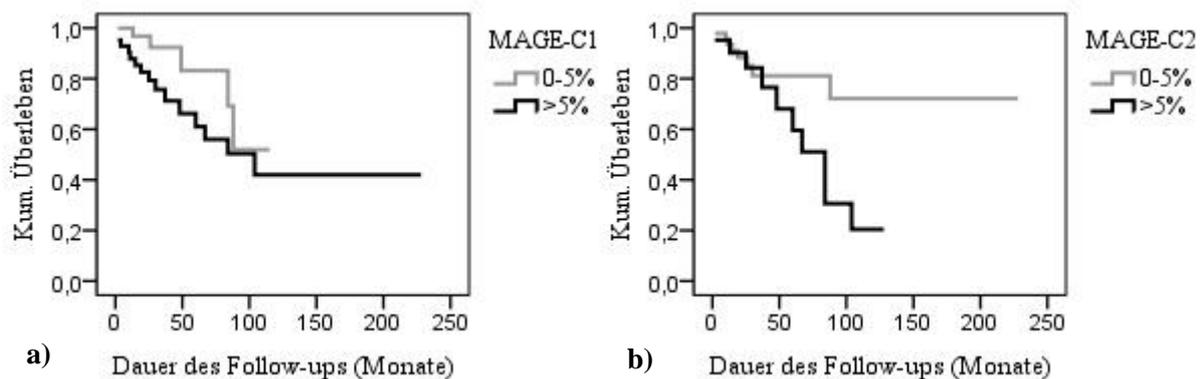
Bei den übrigen CT-A konnten gegenläufige Tendenzen beobachtet werden, das heißt Patienten mit höherer CT-A-Expression verstarben eher an ihrer Erkrankung und zeigten somit schlechtere Überlebenskurven.

So verstarben 30% der MAGE-A3/6-positiven Patienten, wohingegen Patienten ohne MAGE-A3/6-Expression zu 22% an der Erkrankung verstarben (p-Wert: 0,42) (siehe **Tabelle 17** und **Abbildung 14b**).



**Abb. 14:** Überlebenskurven MAGE-A1 und MAGE-A3/6

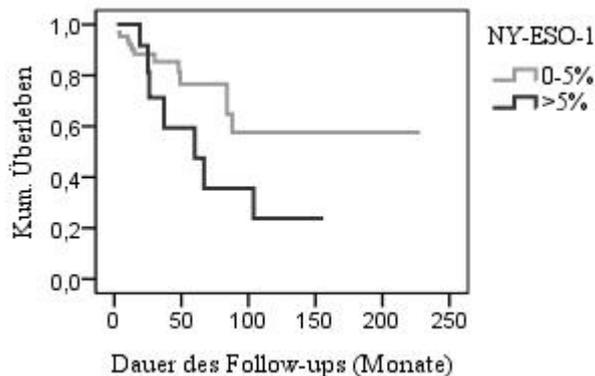
**Abb.14a** zeigt die Überlebenskurven für Patienten in Abhängigkeit von der Höhe der MAGE-A1-Expression. Patienten, die MAGE-A1 exprimierten wiesen eine etwas bessere Überlebenskurve auf, als Patienten, bei denen MAGE-A1 nicht vorhanden war (p-Wert: 0,13). **Abb.14b** zeigt die Überlebenskurven für Patienten in Abhängigkeit von der Höhe der MAGE-A3/6-Expression. Patienten, die MAGE-A3/6 exprimierten wiesen eine schlechtere Überlebenskurve auf, als Patienten, die dieses CT-A nicht exprimierten (p-Wert: 0,42).



**Abb. 15:** Überlebenskurven MAGE-C1 und MAGE-C2

**Abb. 15a** zeigt die Überlebenskurven für Patienten in Abhängigkeit von der Höhe der MAGE-C1-Expression. Patienten, die MAGE-C1 exprimierten wiesen eine etwas schlechtere Überlebenskurve auf, als Patienten, bei denen MAGE-C1 nicht vorhanden war (p-Wert: 0,1). **Abb. 15b** zeigt die Überlebenskurven für Patienten in Abhängigkeit von der Höhe der MAGE-C2-Expression. Patienten, die MAGE-C2 exprimierten wiesen eine deutlich schlechtere Überlebenskurve auf, als Patienten, die dieses CT-A nicht exprimierten (p-Wert: 0,051).

Auch MAGE-C1-positive Patienten verstarben tendenziell früher (36% vs. 14%; p-Wert 0,1) (siehe **Tabelle 17** und **Abbildung 15a**). Patienten mit einer erhöhten Expression von MAGE-C2 starben deutlich häufiger an ihrer Erkrankung als Patienten mit geringer MAGE-C2-Expression (48% vs. 17%; p-Wert: 0,051) (siehe **Tabelle 17** und **Abbildung 15b**). Auch zeigten NY-ESO-1-positive Patienten bei höherer CT-A-Expression ein schlechteres Überleben (54% vs. 20%; p-Wert 0,11) (siehe **Tabelle 17** und **Abbildung 16**).



**Abb. 16:** Überlebenskurve NY-ESO-1

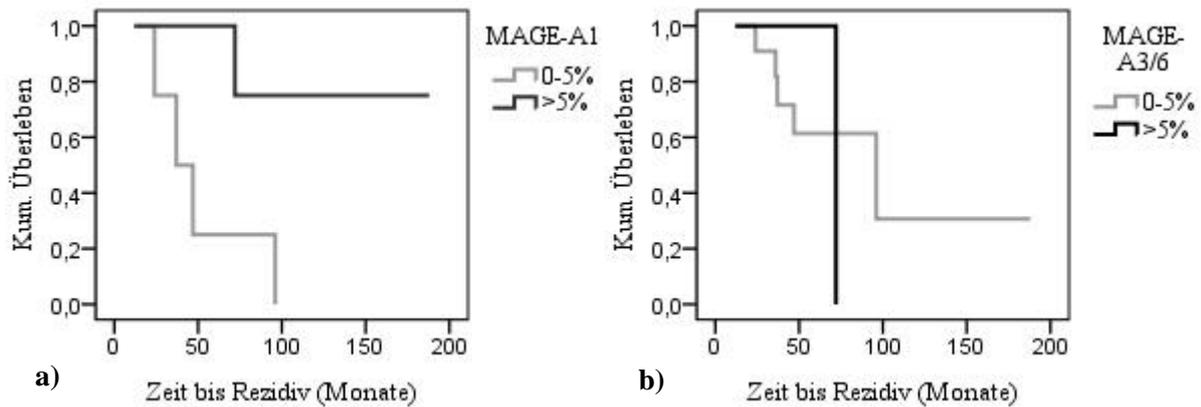
Die Graphik zeigt die Überlebenskurven für Patienten in Abhängigkeit von der Höhe der NY-ESO-1-Expression. Patienten, die NY-ESO-1 exprimierten wiesen eine schlechtere Überlebenskurve auf, als Patienten, die dieses CT-A nicht exprimierten (p-Wert: 0,11).

#### 4.7.2 Cancer-Testis-Antigen-Expression und Rezidive

Außerdem wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen der Cancer-Testis-Antigen-Expression und dem Auftreten von Rezidiven in der EMP-Gruppe besteht.

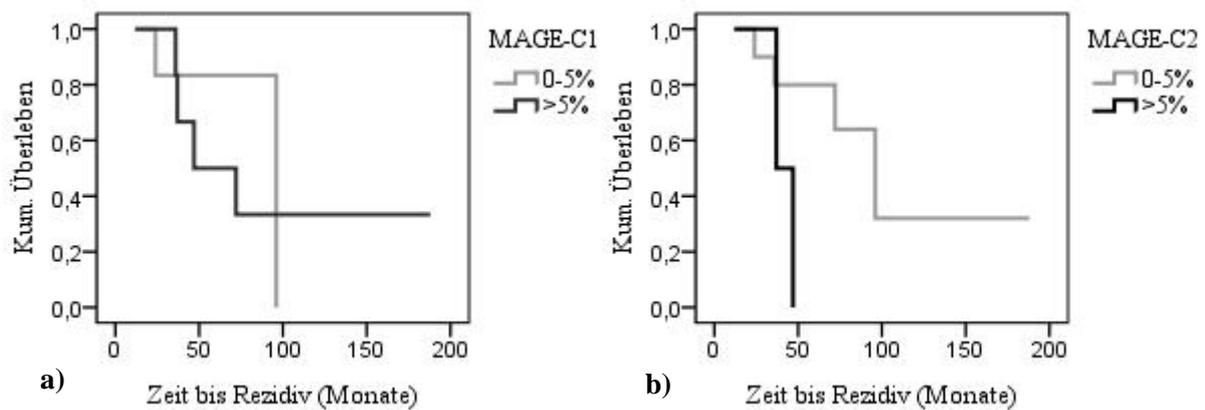
Hierbei konnte gezeigt werden, dass Patienten mit fehlender MAGE-A1-Expression signifikant eher ein Rezidiv entwickelten als Patienten, die MAGE-A1 vermehrt exprimiert hatten (p-Wert: 0,02) (siehe **Abbildung 17a**).

Im Gegensatz dazu zeigten sich bei allen anderen untersuchten CT-A, sowie bei den Überlebenskurven, entgegengesetzte Tendenzen: Mit steigender CT-A-Expression sank die Dauer des rezidivfreien Überlebens, wobei für NY-ESO-1 aufgrund der fehlenden Expression bei den Rezidiv-Patienten kein Vergleich aufgestellt werden konnte (siehe **Abbildungen 17b-18**). So fanden sich bei Patienten mit Expression von MAGE-A3/6 (p-Wert: 0,6), MAGE-C1 (p-Wert: 0,5) und MAGE-C2 (p-Wert: 0,084) tendenziell schlechtere Überlebensraten als bei Patienten mit fehlender Expression der erwähnten CT-A.



**Abb. 17:** Rezidivkurven MAGE-A1 und MAGE-A3/6

**Abb. 17a** stellt die Rezidivkurve für MAGE-A1 dar. Patienten mit fehlender MAGE-A1-Expression wiesen ein signifikant kürzeres, rezidivfreies Intervall auf (p-Wert: 0,02). **Abb. 17b** stellt die Rezidivkurve für MAGE-A3/6 dar. Patienten mit einer MAGE-A3/6 Expression hatten ein kürzeres, rezidivfreies Intervall (p-Wert: 0,6).



**Abb. 18:** Rezidivkurven MAGE-C1 und MAGE-C2

**Abb. 18a** stellt die Rezidivkurve für MAGE-C1 dar. Patienten mit MAGE-C1-Expression hatten ein kürzeres, rezidivfreies Intervall (p-Wert: 0,5). **Abb. 18b** stellt die Rezidivkurve für MAGE-C2 dar. Patienten mit einer Expression von MAGE-C2 hatten ein kürzeres, rezidivfreies Intervall (p-Wert: 0,084).

## 5. Diskussion

### 5.1 Diskussion der Ergebnisse

#### 5.1.1 Cancer-Testis-Antigen-Expression bei den Plasmazellneoplasien

„MGUS ist durch Abwesenheit von Cancer-Testis-Antigenen gekennzeichnet“:

##### MGUS in der Fragestellung

Bei der Monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz handelt es sich um eine Vorläufererkrankung des Multiplen Myeloms, welche mit einem Risiko von 1% pro Jahr in ein MM übergehen kann. Dennoch sind zytogenetische und immunphänotypische Unterschiede zwischen beiden Erkrankungen minimal. So sind selbst Parameter, welche mit einer schlechten Prognose beim MM behaftet sind, bereits bei der Vorläufererkrankung MGUS zu finden z.B. die hohe Anzahl von IgH-Brüchen und die daraus entstehenden Translokationen t(4;14) und t(14;16) (Fonseca, Barlogie et al. 2004, Gonzalez, van der Burg et al. 2007).

Daher interessierte in dieser Studie besonders, ob MGUS und MM sich möglicherweise in der CT-A-Expression unterscheiden, zumal jene sehr oft beim Multiplen Myelom zu finden sind, und mit einer schlechten Prognose assoziiert werden (Meklat, Li et al. 2007).

##### Darstellung der Ergebnisse

Interessanterweise kennzeichneten sich alle, in unserer Studie untersuchten MGUS-Patienten durch eine nicht vorhandene CT-A-Expression aus, und unterschieden sich damit deutlich von den anderen Plasmazellneoplasien.

Es lässt sich einwenden, dass die Expression nur anhand einer kleinen Anzahl der 153 bereits identifizierten CT-A geprüft wurde. Der Großteil dieser 153 CT-A wurde jedoch erst kürzlich neu identifiziert. Daher stehen sie meist noch nicht als Antikörper für Untersuchungszwecke zur Verfügung und Erfahrungswerte und Vergleichsstudien über jene CT-A fallen somit spärlich aus.

Bei den Cancer-Testis-Antigenen, die in der vorliegenden Studie untersucht wurden handelt es sich um eine bewusst durchgeführte Auswahl. Zusammen gehören sie zu den häufigsten CT-A beim MM. Auch waren sie bereits mehrfach Gegenstand vorangegangener Studien des Multiplen Myeloms und auch anderer Tumorarten (Dhodapkar, Osman et al. 2003, Jungbluth, Ely et al. 2005, van Rhee, Szmania et al. 2005, Atanackovic, Arfsten et al. 2007, Condomines, Hose et al. 2007, Andrade, Vettore et al. 2008, Atanackovic, Luetkens et al. 2009).

### Vergleich mit Literatur: Vorkommen von CT-A bei MGUS

Gegensätzlich zu den Ergebnissen dieser Studie, werden in der Literatur allerdings auch vereinzelt MGUS-Fälle beschrieben, welche CT-A exprimieren.

Condomines M. et al. analysierten die Expression von 35 Cancer-Testis-Antigenen an MM- und MGUS-Patienten auf RNA-Ebene. Darunter waren auch die Cancer-Testis-Antigene MAGE-A3/6, MAGE-C1 und MAGE-C2, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

MGUS-Patienten exprimierten dabei 8 der 35 untersuchten CT-A, wobei es sich um folgende CT-A handelte: KM-HN-1 (83%), MAGE-C1 (33%), DDX43 (33%), SPANXB (8%), CT45 (8%), GAGE1-8 (8%), SPACA3 (8%) und MORC (8%).

Die Cancer-Testis-Antigene KM-HN-1, DDX43, MORC und SPACA3 wurden allerdings in derselben Studie ebenfalls bei normalen B-Zellen, Plasmoblasten und sogar gesunden Plasmazellen des Knochenmarks gefunden. Dies lässt zweifeln, ob die Zuordnung dieser Antigene zu der Gruppe der Cancer-Testis-Antigene gerechtfertigt ist (Condomines, Hose et al. 2007).

Von den CT-A, die in der Studie bei den MGUS gefunden wurden, werden laut CT-A-Datenbank nur SPANXB und MAGE-C1 als testis-restricted ausgegeben (<http://www.cta.lncc.br/> 2005-2009).

Die übrigen CT-A werden also nicht nur in Hoden und Tumoren, sondern auch vermehrt in normalen Geweben exprimiert, womit auch die Wahrscheinlichkeit steigt, sie bei MGUS-Patienten zu finden.

Die Anwesenheit von MAGE-C1 bei MGUS-Patienten wurde von zwei weiteren Arbeitsgruppen untermauert. So zeigten einer von 3 bzw. einer von 6 untersuchten MGUS-Fällen eine MAGE-C1-Expression (Jungbluth, Ely et al. 2005, Andrade, Vettore et al. 2008).

Nur in jeweils einer einzigen Arbeit wurden MAGE-A3/6, bzw. NY-ESO-1 bereits bei MGUS-Patienten gefunden (Jungbluth, Ely et al. 2005, van Rhee, Szmania et al. 2005). Unsere und die anderen, bereits erwähnten Studien, konnten die Ergebnisse dieser Arbeitsgruppen allerdings nicht bestätigen. MAGE-A3/6 und NY-ESO-1 wurden hier erst von Patienten mit manifestem Multiplem Myelom exprimiert.

Festzuhalten bleibt demnach, dass MGUS-Fälle größtenteils negativ für CT-A sind und eventuell bereits MAGE-C1 oder auch SPANXB exprimieren.

Diese beiden CT-A treten also früh in der Pathogenese der MGUS, bzw. des MM auf und könnten damit eine Rolle in der Frühdiagnostik dieser Erkrankungen spielen.

Auch legen diese Beobachtungen die Behauptung nahe, dass diese CT-A möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese der MGUS spielen. Nachdem diese vor allen anderen CT-A auftreten, nehmen sie eine Funktion als sogenannte „Gatekeeper“ ein und können den Übergang in ein MM anzeigen (Andrade, Vettore et al. 2008, Atanackovic, Luetkens et al. 2009).

So deutete das Vorkommen von CT-A bei den Studien, welche CT-A bei MGUS nachweisen konnten, möglicherweise bereits den Übergang von einer MGUS zu einem MM an. Interessant wäre es den weiteren Verlauf dieser Patienten zu verfolgen, ob sie im Verlauf ein MM entwickelten. Dagegen stehen die MGUS-Fälle dieser Studie, bei denen keine CT-A-nachweisbar waren. Diese Fälle stellen

demnach vielleicht MGUS-Entitäten dar, welche sich auf einer „niedrigeren Stufe“ in Bezug auf die Entwicklung zu einem MM befinden. Dabei ist anzumerken, dass auch nicht alle MGUS-Fälle in ein MM übergehen (Landgren, Kyle et al. 2011).

#### Bedeutung von CT-A in der Pathogenese der MGUS und des MM

Einige weitere Beobachtungen kräftigen die These, dass CT-A als Onkogene fungieren und in der Entwicklung der MGUS eine bedeutende Rolle spielen. Die MGUS stellt im Gegensatz zum MM eine benigne Erkrankung dar, bei der die Proliferation der Plasmazellen kontrolliert verläuft. Auch werden CT-A im Gegensatz zum MM größtenteils noch nicht exprimiert.

In einigen Studien wird ein Vergleich zwischen der Entwicklung der Cancer-Testis-Antigen-Expression im Rahmen der Tumorentstehung und der Spermatogenese aufgestellt (Kalejs and Erenpreisa 2005, Costa, Le Blanc et al. 2007, Caballero and Chen 2009).

Bei der Spermatogenese sind CT-A vor allem in den frühen Vorläuferzellen, den Spermatogonien, zu finden, wo sie verschiedene Funktionen übernehmen, um eine Genomstabilität zu gewährleisten, wie z.B. Zellstabilisierung und Unterdrückung der Zellapoptose. Im Zuge der Zellreifung werden sie supprimiert und erst bei der Zell-Dedifferenzierung und Entstehung von Tumoren werden die vorüber still gelegten CT-A-Gene erneut aktiviert und übernehmen parallel der Spermatogenese Funktionen des Zellerhalts wahr (Yang, O'Herrin et al. 2007).

CT-A könnten somit als Zeichen eines malignen Transformationsprozesses verstanden werden, was sich mit der Beobachtung deckt, dass sie bei der MGUS nur selten exprimiert werden (Atanackovic, Luetkens et al. 2009).

Cancer-Testis-Antigene sind auch Grundlage einer weiteren These, die den Übergang von der MGUS zum Multiplen Myelom zu erklären versucht. Bei dieser These wird das Fortschreiten der Erkrankung durch eine starke Immunität gegen Cancer-Testis-Antigene mittels reaktiver T-Zellen gegen CT-A verhindert. Erst Veränderungen im Sinne eines Verlustes dieser Immunität, bewirken eine unkontrollierte Zellproliferation und die Progression zum MM (Dhodapkar, Geller et al. 2003, Dhodapkar, Osman et al. 2003, Rajkumar, Lacy et al. 2007). So verfügen MGUS-Patienten im Gegensatz zu MM-Patienten über eine hohe Anzahl an CD4-T-Zellen gegen MAGE-A1 und MAGE-A3/6 (Goodyear, Pratt et al. 2008). Auch sind CD4-T-Zellen gegen CT-A in der Lage eine persistierende Remission beim MM im Rahmen des Graft-versus-Leukemia-Effekts zu erzielen (Atanackovic, Luetkens et al. 2009).

Therapien gegen Cancer-Testis-Antigene, sei es durch eine Hemmung der CT-A-Expression oder durch Boosterung der körpereigenen Immunantwort gegen CT-A im Sinne einer Tumorstabilisierung, könnten die Entwicklung eines MM eventuell erfolgreich verhindern.

Weitere wichtige pathogenetische Ursachen bei der Entstehung eines MM sind möglicherweise Vorgänge, die in der Microenvironment begründet sind. Dabei spielt insbesondere die Expression von Interleukin 6 eine entscheidende Rolle. Die parakrine Freisetzung von Interleukin 6 wird dabei über

den NF- $\kappa$ B Signalweg reguliert. Liganden, welche an Toll-like-Rezeptoren binden, führen zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B, was wiederum zu einer Steigerung der Interleukin 6 Freisetzung in MM-Zellen führt. Interleukin 6 induziert eine erhöhte Proliferation von Plasmazellen und steigert die Angiogenese im Knochenmark (Sirohi and Powles 2004, Xu, Zhao et al. 2010, Landgren, Kyle et al. 2011). Hier ist eine Verbindung mit den Cancer-Testis-Antigenen vorstellbar. So konnte in einer Studie gezeigt werden, dass das Cancer-Testis-Antigen SEMG-1, welches in Myelomzellen vorkommt, durch die Freisetzung von Interleukin 6 gesteigert exprimiert wird. Auch ein Zusammenhang zwischen der Expression von CT-A und Toll-like-Rezeptoren wäre in dem Kontext äußerst interessant. Bisher wurde dies in der Literatur nicht untersucht (Zhang, Wang et al. 2009).

Dennoch bleibt unklar, warum MGUS-Patienten keine CT-A exprimieren und bei MM-Patienten dahingegen vermehrt Cancer-Testis-Antigenen nachzuweisen sind. Bei bisher ungenügender Information über die Funktion der CT-A und in Zusammenschau mit den beschriebenen Fakten der bisher veröffentlichten Daten erscheint eine pathogenetische Funktion und Rolle der CT-A aber äußerst plausibel. Es gäbe noch einen weiteren Ansatzpunkt: Interessanterweise verfügen MGUS-Patienten, im Gegensatz zu MM-Patienten nicht über die t(8,14) Translokation, welche mit schlechter Prognose beim MM assoziiert ist. Ansonsten unterscheiden sich MGUS- und MM-Patienten nur durch geringere Prozentzahlen der im Kapitel 1.7. beschriebenen IgH-Translokationen. Möglicherweise ist die CT-A-Expression bei den MM mit dieser Translokation assoziiert. Auch die Translokation t(4,14) wird mit schlechter Prognose beim MM in Verbindung gebracht und wird deutlich seltener bei MGUS-, als bei MM-Patienten gefunden. Dies könnte andeuten, dass die Translokation t(4,14) ebenfalls mit einer CT-A-Expression gekoppelt ist (Fonseca, Barlogie et al. 2004, Gonzalez, van der Burg et al. 2007, Bink, Haralambieva et al. 2008).

**„MM und EMM sind durch erhöhte Cancer-Testis-Antigen-Expression gekennzeichnet“:**

#### Zusammenfassung der Ergebnisse

Neben Patienten mit MGUS, wurden auch Patienten mit Multiplem Myelom bzw. mit extramedullär verlaufendem Multiplem Myelom in Bezug auf die CT-A-Expression betrachtet.

Bei beiden Patientengruppen konnte, im Gegensatz zu den MGUS-Patienten, eine gesteigerte Expression von CT-A beobachtet werden und durchschnittlich wurde in 80,5% der Fälle mindestens ein CT-A exprimiert. Dabei ist das Cancer-Testis-Antigen MAGE-C1 mit 65% am häufigsten gefunden worden.

In absteigender Reihenfolge schlossen sich die Cancer-Testis-Antigene MAGE-A3/6 (53%), MAGE-C2 (38%), MAGE-A1 (36%) und NY-ESO-1 (22%) an.

### Bedeutung von MAGE-C1

Auch in der Literatur wird MAGE-C1 als ein CT-A charakterisiert, welches besonders häufig beim MM exprimiert wird. Damit stehen die Ergebnisse dieser Studie im Einklang mit den Ergebnissen anderer Studiengruppen, welche vergleichende Expressionszahlen für MAGE-C1 angeben, welche Werte von 58% bis 82% für dieses CT-A anzeigen:

58% (Curioni-Fontecedro, Knights et al. 2008), 65% (Atanackovic, Luetkens et al. 2009), 66% (Condomines, Hose et al. 2007), 77% (Andrade, Vettore et al. 2008), 77% (Cho, Caballero et al. 2006), 79% (Dhodapkar, Osman et al. 2003) und sogar von 82% (Jungbluth, Ely et al. 2005).

MAGE-C1 gewinnt unter der Gruppe der CT-A zunehmend an Bedeutung, da seine Expression gekennzeichnet ist durch eine enge, hoch signifikante Korrelation mit dem klinischen Krankheitsverlauf der entsprechenden Patienten. Auch erwies sich MAGE-C1 in bisherigen Studien als zuverlässiger Marker für Krankheitsprogression und Therapieansprechen, sowie für das Auftreten von Rezidiven des MM. MAGE-C1 wird als dasjenige CT-A mit dem größten Einfluss auf die Prognose von MM-Patienten diskutiert, was die Ergebnisse dieser Studie bestätigen (Andrade, Vettore et al. 2008, Atanackovic, Luetkens et al. 2009, Atanackovic, Hildebrandt et al. 2010).

### Bedeutung von MAGE-A3/6

Das Cancer-Testis-Antigen MAGE-A3/6 wurde beim MM und EMM zu 53% exprimiert. Auch in der Literatur werden vergleichbare Werte zitiert, welche von 33% bis 52% reichen:

33% (Condomines, Hose et al. 2007), 46% (Andrade, Vettore et al. 2008), 48% (Dhodapkar, Osman et al. 2003) und 52% (Atanackovic, Luetkens et al. 2009).

Jungbluth et al wiesen eine MAGE-A3/6-Expression von 50% in den Durie-Stadien I und II bei MM-Patienten nach. Im schlechteren Durie-Stadium III konnte eine gesteigerte MAGE-A3/6-Expression von 70% verzeichnet werden (Jungbluth, Ely et al. 2005). Dies sind vergleichsweise hohe Expressionswerte für MAGE-A3/6.

Hierbei ist anzumerken, dass in derselben Arbeit auch 4 der 5 untersuchten MGUS-Fälle MAGE-A3/6 exprimierten. Eine solch gesteigerte Expressionsrate von MAGE-A3/6 bei MGUS-Fällen konnte in unserer und anderen Studien nicht nachvollzogen werden.

Darüber hinaus wird MAGE-A3/6 bei Patienten mit chromosomalen Aberrationen und bei Patienten mit Rezidiven vermehrt gefunden und ist mit signifikant schlechteren Überlebensraten assoziiert, was sich mit den Ergebnissen dieser Studie deckt (van Rhee, Szmania et al. 2005, Condomines, Hose et al. 2007).

Stellt man in unserer Studie MM-und EMM-Fälle gegenüber so fällt auf, dass MAGE-A3/6 beim MM mehr als beim EMM exprimiert wird (56% vs. 33%), was jedoch nicht statistisch signifikant ist und damit an Bedeutung verliert. Theoretisch hätte man Gegenteiliges annehmen können, und zwar dass Patienten mit EMM, der aggressiven, extramedullären Verlaufsform des MM, mehr MAGE-A3/6 exprimieren würden.

Zusammen mit MAGE-C1 korreliert MAGE-A3/6 gut mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung und kann einen wesentlichen prognostischen Parameter beim Multiplen Myelom darstellen (Atanackovic, Luetkens et al. 2009, Atanackovic, Hildebrandt et al. 2010). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression dieser beiden CT-A positiv miteinander korreliert (Cohens Kappa: 0,54;  $p < 0,001$ ; siehe Ergebnisse, Kapitel 4.3.2.2.). Auch Dhodapkar et al konnten eine Korrelation zwischen MAGE-C1 und MAGE-A3/6 nachweisen (Dhodapkar, Osman et al. 2003).

Darüber hinaus wurde erst kürzlich veröffentlicht, dass MAGE-C1 und MAGE-A3/6 einer gemeinsamen Funktion nachgehen, indem sie die Apoptose maligner Plasmazellen und klonaler Myelomvorläuferzellen verhindern und so für Therapieresistenz und Krankheitspersistenz verantwortlich sind. Diese Veröffentlichung unterstreicht damit auch die Beobachtungen der vorliegenden Studie.

#### Vergleich zwischen MM und EMM: MAGE-C2 und NY-ESO-1

Bei der Gegenüberstellung zwischen dem Multiplen Myelom und seiner extramedullären Verlaufsform, dem EMM, fällt auf, dass MAGE-C2 und NY-ESO-1 besonders stark von den EMM-Patienten exprimiert werden, allerdings ohne statistisch signifikante Wertigkeit zu erreichen.

So wurde MAGE-C2 doppelt so oft bei den EMM-Fällen gefunden (67% beim EMM vs. 33% beim MM). Auch NY-ESO-1 konnte bei den EMM-Patienten beinahe zweimal häufiger als bei den MM-Patienten nachgewiesen werden (44% beim MM vs. 18% beim EMM).

Die Cancer-Testis-Antigene MAGE-C2 und NY-ESO-1 stellen somit Marker dar, die spät im Verlauf der Erkrankung auftreten und demnach mit besonders schlechter Prognose assoziiert sind. MAGE-C2 führt zu einer Hemmung der Apoptose durch eine supprimierte Expression des Tumorsuppressorgens p53. Mutationen und Deletionen von p53 sind generell Vorgänge, welche sich in späteren Stadien eines MM abspielen (Chng, Glebov et al. 2007, Yang, O'Herrin et al. 2007). Dies deckt sich mit den Ergebnissen dieser Studie, welche zeigen, dass MAGE-C2 besonders in fortgeschrittenen MM-Stadien zu finden ist.

Die Beobachtungen werfen die Frage auf, ob MAGE-C2 und NY-ESO-1 eventuell eine gemeinsame Funktion haben. Was ist ihre Bedeutung innerhalb der Tumorentwicklung? Warum werden gerade diese Cancer-Testis-Antigene in späten Stadien und im EMM exprimiert? Leider sind mögliche Antworten auf diese Fragen anhand der bisherigen Literatur nicht möglich, zumal kaum etwas über die Funktion der Cancer-Testis-Antigene bekannt ist.

#### Bedeutung von NY-ESO-1

In der vorliegenden Arbeit wurde NY-ESO-1 von allen untersuchten Cancer-Testis-Antigenen mit 22% am seltensten beim Multiplen Myelom exprimiert.

Dieses Ergebnis deckt sich mit Angaben in der Literatur, welche ebenfalls verhältnismäßig geringe Expressionszahlen für NY-ESO-1 liefern von 21% ,27% und 36% (Dhodapkar, Osman et al. 2003, Jungbluth, Ely et al. 2005, Andrade, Vettore et al. 2008).

Im Gegensatz dazu werden in einigen Studien aber auch wesentlich geringere Häufigkeiten bezüglich der NY-ESO-1-Expression gemacht von 4%, 7% und 13% (Atanackovic, Arfsten et al. 2007, Condomines, Hose et al. 2007, Curioni-Fontecedro, Knights et al. 2008). Dabei wurde in diesen Studien der gleiche Antikörper-Klon für NY-ESO-1 (E978) für die immunhistochemischen Färbungen wie in der vorliegenden Arbeit verwendet.

Interessanterweise berichten Atanackovic und Kollegen ebenfalls über einen EMM-Fall, der sich von den anderen Patienten mit Multiplen Myelom durch eine besonders starke NY-ESO-1-Expression hervorhebt (75% gegenüber 7%) (Atanackovic, Arfsten et al. 2007).

Bei der MGUS konnte NY-ESO-1 größtenteils gar nicht, und nur in einer Studie zu 5% gefunden werden (van Rhee, Szmania et al. 2005). Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen für MGUS, welche komplett negativ für CT-A waren.

Zudem zeigten Van Rhee und Kollegen, dass NY-ESO-1, wie MAGE-A3/6, vor allem bei Patienten mit chromosomalen Aberrationen und zytogenetischen Veränderungen vorkommen und besonders bei Patienten mit Rezidiven zu finden sind.

So exprimierten betroffene Patienten doppelt so oft NY-ESO-1 gegenüber Patienten mit normaler Zytogenetik (60% gegenüber 31%) (van Rhee, Szmania et al. 2005). Auch wenn diese Zahlen im Vergleich zu anderen Literaturangaben als recht hoch einzuschätzen sind, so lässt sich daraus erkennen, dass NY-ESO-1 ein Hochrisikoprofil bei MM-Patienten andeutet.

#### Bedeutung von MAGE-C2

MAGE-C2 wurde ebenfalls besonders bei EMM-Patienten gefunden und wurde mit 67% beim EMM doppelt so oft exprimiert als beim MM mit 33%.

Erst kürzlich zeigten Atanackovic et al. erstmalig, dass MAGE-C2 mit einer Expressionsrate von 56% in deren Studie zu den häufigsten CT-A beim MM gehört (Atanackovic, Arfsten et al. 2007).

In der weiteren Literatur konnten vergleichbare Ergebnisse für MAGE-C2 erzielt werden, von 43% und 54% (Atanackovic, Luetkens et al. 2009, Pabst, Zustin et al. 2010).

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Condomines M et al., bei denen nur geringe Expressionszahlen für MAGE-C2 zitiert werden (13%) (Condomines, Hose et al. 2007).

Unsere Studie zeigt erstmals, dass MAGE-C2 besonders häufig bei Patienten mit extramedullären Manifestationen exprimiert wird. Auch zeigt diese Studie, dass MAGE-C2 erst beim Multiplen Myelom und noch nicht bei der Vorstufe, der MGUS, zu finden ist.

Zusammen mit MAGE-C1 wird MAGE-C2 bei Osteolysen gesteigert exprimiert (Pabst, Zustin et al. 2010). Osteolysen sind bezeichnend für das Multiple Myelom und bei der Vorstufe MGUS noch nicht vorhanden. Folglich könnten diese Ergebnisse für eine osteolysäre Wirkung der Cancer-Testis-

Antigene MAGE-C2 und MAGE-C1 beim MM sprechen und den Beginn eines malignen Verlaufs kennzeichnen. Diese CT-A drücken also aus, dass ein Multiples Myelom vorliegt und gleichzeitig das MGUS-Stadium verlassen wurde. Diese Beobachtungen werden unterstrichen von der Tatsache, dass in dieser Studie bei MGUS-Patienten keine CT-A nachgewiesen werden konnten. In der Literatur wird sogar für ein Cancer-Testis-Antigen eine osteolytische Funktion beschrieben. Das CT-A CAGE aktiviert über den NF- $\kappa$ B-Signalweg eine Matrix-Metalloproteinase, welche eine osteolytische und remodelierende Funktion auf Knochen und Gewebe hat (Kim and Jeoung 2009). In der vorliegenden Studie konnte zudem erstmals eine signifikante Korrelation zwischen dem Cancer-Testis-Antigen MAGE-C2 und CD56 beim Multiplen Myelom festgestellt werden. Interessanterweise werden sowohl MAGE-C2, als auch CD56 mit Osteolysen beim MM assoziiert (Ely and Knowles 2002, Pabst, Zustin et al. 2010). Hier besteht abermals ein Zusammenhang zwischen CT-A und dem Vorliegen von Osteolysen, so dass innerhalb der vorliegenden Arbeit sich die Beobachtungen gegenseitig bestärken, dass CT-A möglicherweise eine osteolytische Wirkung im Knochen induzieren.

Anhand der beschriebenen Fakten kristallisiert sich also insbesondere MAGE-C2 -und auch MAGE-C1- zunehmend als negative Prädiktoren beim Multiplen Myelom heraus.

#### Das EMM: Nur eine Verlaufsform des MM?

Beim EMM handelt es sich um ein Multiples Myelom, bei dem sich extramedulläre Herde gebildet haben. Dennoch gibt es Anzeichen, dass die extramedullären Manifestationen nicht den medullären Myelom-Herden gleichzusetzen sind und biologische Unterschiede vorliegen.

Studien zufolge spielt die lokale Microenvironment des Knochenmark für Entstehung und Verlauf eines MM eine bedeutende Rolle (Gonzalez, van der Burg et al. 2007, Raab, Podar et al. 2009). Dabei sind Myelomzellen in niedrigen Stadien hinsichtlich Proliferation und Antiapoptose noch komplett von der Microenvironment im Knochenmark abhängig. Noch im medullären Milieu kommt es im weiteren Verlauf zu genetischen Alterationen, wobei insbesondere die IgH-Region auf dem Genlocus 14q32 betroffen ist. Dies führt zu ungehemmter Proliferation der Tumorzellen und diese werden zunehmend vom umgebenden Stroma unabhängig. Sie proliferieren unabhängig von der lokalen, medullären Microenvironment, können das Knochenmark verlassen und extramedulläre Manifestationen ausbilden (Sirohi and Powles 2004). Was unterscheidet die medulläre Microenvironment von der extramedullären Microenvironment? Im Knochenmark herrscht ein Zusammenspiel zwischen MM-Zellen, extrazellulären Matrixproteinen und Stromazellen. Bindet eine MM-Zelle an Stromazellen im Knochenmark wird die Transkription und Sekretion von Zytokinen induziert, insbesondere von Interleukin 6, Insulin-like growth factor (IGF-1), Tumornekrosefaktor  $\alpha$ , Vascular endothelial growth factor (VEGF) und stroma-derived factor-1 (Sirohi and Powles 2004) Gibt es eine Verbindung zwischen CT-A und den erwähnten Faktoren der Microenvironment? Bisher gibt es in der Literatur leider keine Studien, welche diesen Fragen nachgehen.

Wie bereits erwähnt, führen genetische Alterationen, insbesondere prognostisch schlechte IgH-Translokationen zu einer Stromaunabhängigkeit und extramedullären MM-Verläufen. Gleichzeitig sind CT-A häufig bei Patienten mit genetischen Aberrationen zu finden und werden eventuell durch eine, bzw. vielmehr durch ein Zusammenspiel multipler genetischer Alterationen exprimiert (van Rhee, Szmania et al. 2005). In dieser Studie finden sich CT-A vermehrt bei Patienten mit EMM. Dies deutet daraufhin, dass CT-A im Zusammenhang mit genetischen Aberrationen entstehen können. CT-A werden dort vermehrt exprimiert, wo bereits genetische Mutationen aufgetreten sind. Dabei bleibt zu klären, ob die Expression von CT-A auf eine genetische Alteration zurückzuführen ist, oder – und dies ist im Kontext der bisher erwähnten Fakten am ehesten wahrscheinlich- durch eine Akkumulation verschiedener, multipler genetischer Alterationen bedingt wird. Einhergehend mit der gesteigerten CT-A-Expression entsteht also eine Unabhängigkeit vom medullären Milieu.

Gibt es einen Zusammenhang zwischen den prognostisch ungünstigen Faktoren beim MM, welche den Übergang in ein EMM verursachen, und der Expression von CT-A? Die Deletion q13 wird tatsächlich mit gesteigerter CT-A-Expression in Verbindung gebracht (van Rhee, Szmania et al. 2005). Daneben sind die Translokationen t(4,14) und t(8,14) mit schlechter Prognose assoziiert (Fonseca, Barlogie et al. 2004, Gonzalez, van der Burg et al. 2007). Bis jetzt wurde der Zusammenhang zwischen diesen Translokationen und der CT-A-Expression allerdings nicht erforscht.

Extramedullär können zudem andere, noch unbekannte lokale Einflüsse auf die extramedullären Tumormanifestationen einwirken und die Erkrankung darüber hinaus noch regulieren und modulieren. Dies könnte unter anderem eine weitere Erklärung für die gesteigerte CT-A-Expression bei den EMM sein.

### **„EMP exprimieren CT-A“:**

#### EMP in der Fragestellung

Beim extramedullären Plasmozytom handelt es sich um eine extramedullär gelegene Plasmazellneoplasie, bei der gleichzeitig eine medulläre Beteiligung ausgeschlossen wurde. Theoretisch kann sich ein EMP an allen Stellen des Körpers entwickeln, wo lymphatisches Gewebe zu finden ist (Bachar, Goldstein et al. 2008). Zumeist jedoch sind sie solitär im HNO-Bereich lokalisiert und durch den Einsatz lokaler Maßnahmen, wie Strahlentherapie, bzw. Tumorsektion können sehr gute Heilungsraten für diese Erkrankung erzielt werden (Alexiou, Kau et al. 1999).

Cancer-Testis-Antigene werden in Studien mit schlechter Prognose assoziiert und als ein Zeichen für Malignität gewertet. In fortgeschrittenen Stadien werden sie vermehrt exprimiert.

Dies trifft nicht nur für das Multiple Myelom zu, sondern gilt auch für Tumoren anderen histologischen Ursprungs (Caballero and Chen 2009).

Ein EMP stellt eine in der Regel gutartig verlaufende Erkrankung dar. Daher interessierte in dieser Studie besonders, ob diese Patienten überhaupt eine Expression von Cancer-Testis-Antigenen zeigen.

Dabei interessierte ebenfalls, ob sie über die für das MM typischen CT-A verfügen, und ob die Möglichkeit besteht das EMP gegenüber dem MM mit Hilfe der CT-A abzugrenzen.

#### Zusammenfassung der Ergebnisse

Hierzu wurden 28 EMP-Fälle und ihre CT-A-Expression betrachtet (siehe Ergebnisse Kapitel 4.3.2.). Interessanterweise zeigten die EMP-Fälle relativ hohe Expressionsraten für alle untersuchten Cancer-Testis-Antigene und exprimierten, ähnlich dem MM, in 70% der Fälle mindestens ein CT-A.

Dabei wurde das Cancer-Testis-Antigen MAGE-A1 mit 50% besonders häufig gefunden. MAGE-C1 konnte ebenfalls relativ oft nachgewiesen werden (41%). Die weiteren CT-A verteilten sich wie folgt: MAGE-C2 (26%), MAGE-A3/6 (15%) und NY-ESO-1 (7%).

Diese Studie untersuchte erstmalig die CT-A-Expression an EMP-Fällen und konnte zusammenfassend zeigen, dass EMP ebenfalls häufig CT-A exprimieren und sie über dasselbe CT-A-Spektrum verfügen wie Patienten mit Multiplen Myelom.

#### EMP: Abgrenzung zu anderen Erkrankungen

Zum Einen wird das EMP, ähnlich der MGUS, als eine Vorläufererkrankung des Multiplen Myeloms diskutiert (Bink, Haralambieva et al. 2008).

Interessanterweise sind beim EMP Cancer-Testis-Antigene zu finden, während sie von den MGUS-Patienten nicht exprimiert wurden. Darüber hinaus handelt es sich bei diesen Cancer-Testis-Antigenen um die typischen CT-A wie beim MM.

Diese Erkenntnis wirft die Frage auf, ob dem EMP ähnliche pathogenetische Vorgänge zu Grunde liegen wie dem MM, und ob Cancer-Testis-Antigene auch bei den EMP eine prognostische Rolle spielen.

Zum Anderen wird das EMP als eigenständige Tumorart, ohne direkte Beziehung zum Multiplen Myelom betrachtet. Dies stellt die weitaus häufigere und anerkanntere der beiden Sichtweisen dar und wird bestärkt durch die stark differierenden Überlebensraten und Prognosen beider Erkrankungen und die fehlende intramedulläre Komponente bei den EMP (Galieni, Cavo et al. 2000, Bink, Haralambieva et al. 2008). Auch sprechen EMP im Gegensatz zum MM nicht auf Chemotherapie an, aber sind durch lokale Radiotherapie gut beherrschbar (Markou, Karasmanis et al. 2009).

Die Expression von Cancer-Testis-Antigenen beim EMP könnte in dem Fall ein Zeichen für Dedifferenzierung darstellen und generell Hinweise auf ein tumoröses Geschehen liefern.

Eine dritte Sichtweise ist auf der Idee begründet, dass ein EMP keine Plasmazellneoplasie, sondern eine Form eines extranodalen Lymphoms darstellt, das eine plasmazytische Differenzierung vollzogen hat. Dabei kommen ein Marginalzonenlymphom (MALT-Lymphom) oder auch ein immunozytisches Lymphom in Frage (Kremer, Ott et al. 2005, Luh, Lai et al. 2007, Bink, Haralambieva et al. 2008, Straetmans and Stokroos 2008).

Um diese Erkrankungen vom EMP abzugrenzen, wurden die Fälle zu Anfang der Studie immunhistochemisch mit CD5, CD20 und EBV untersucht (Swerdlow, Campo et al. 2008).

Eventuell bieten Cancer-Testis-Antigene auch eine Perspektive, die Differenzierung zwischen dem EMP und Lymphomen zu erleichtern. In dieser Studie entwickelte ein EMP-Fall ein MALT-Lymphom. Dieser Patient exprimierte keines der untersuchten Cancer-Testis-Antigene und grenzte sich damit von den übrigen EMP-Patienten ab, welche im Schnitt zu 70% mindestens ein CT-A exprimierten.

#### Abgrenzung MM/EMM gegenüber EMP

Bei der Gegenüberstellung von MM und EMM gegenüber dem EMP fällt auf, dass Cancer-Testis-Antigene generell etwas geringer von den EMP-Patienten exprimiert werden (siehe Ergebnisse Kapitel 4.3.2.).

Dabei haben sich MAGE-C1 und MAGE-A3/6 als signifikant für die Unterscheidung zwischen MM/EMM und EMP erwiesen und sind Kennzeichen des Multiplen Myeloms. Beim EMP wurden diese wesentlich geringer exprimiert (MAGE-C1: 41% beim EMP vs. 65% bei MM/EMM; MAGE-A3/6: 15% beim EMP vs. 53% bei MM/EMM). Dennoch weisen EMP-Patienten auch zu geringen Anteilen diese CT-A auf, und MAGE-C1 und MAGE-A3/6 sind deshalb nicht als reine, typische Marker des Multiplen Myeloms zu bezeichnen.

Im Hinblick auf die Abgrenzung zum MM/EMM können die Cancer-Testis-Antigene MAGE-A1 und MAGE-A3/6 simultanen Erklärungsgehalt liefern, indem hohe MAGE-A1-Werte bei gleichzeitig niedrigen MAGE-A3/6-Werten ein EMP wahrscheinlicher werden lassen.

Eine Ausnahme stellt also das Cancer-Testis-Antigen MAGE-A1 dar, indem es als einziges CT-A mehr bei EMP-Patienten als bei MM- und EMM-Patienten gefunden wurde (50% bei den EMP gegenüber 36% bei MM/EMM).

#### Offene Fragen

Cancer-Testis-Antigene werden, generell gesprochen, von Tumoren exprimiert und sind besonders bei Tumorpatienten mit schlechter Prognose zu finden (Caballero and Chen 2009).

In Übereinstimmung zu diesen Beobachtungen, wurden sie von MGUS-Patienten in dieser Studie nicht exprimiert. Bei der MGUS handelt es sich um eine bloße Vorläufererkrankung des Multiplen Myeloms.

Dagegen waren CT-A bei den ebenfalls gutartigen extramedullären Plasmozytomen häufig vorhanden. Diese Ergebnisse erscheinen beinahe widersprüchlich. Eine mögliche Erklärung könnte in der Tatsache begründet liegen, dass EMP sich außerhalb des Knochenmarks befinden und so der modulierenden Funktion der lokalen Microenvironment des Knochenmarks entkommen, während MGUS- und MM-Tumorzellen jener jedoch unterliegen.

Nicht nur beim EMP, sondern auch beim extramedullären MM wurden vermehrt CT-A gefunden.

In beiden Fällen handelt es sich um extramedulläre Erkrankungen.

Während Cancer-Testis-Antigene beim MM und EMM jedoch mit schlechter Prognose in Verbindung stehen, ist die Funktion und Bedeutung der Cancer-Testis-Antigene bei den EMP unklar.

Es stellt sich die Frage, ob Cancer-Testis-Antigene generell eine extramedulläre Erkrankung andeuten, und ob es möglicherweise einen Zusammenhang zwischen den extramedullär gelegenen Erkrankungen gibt. Vergleicht man die genetischen Translokationen, welche beim MM/EMM zu finden sind mit den Translokationen bei EMP und MGUS, so stellt sich heraus, dass bei den EMP gehäuft die Translokation t(4,14) zu finden ist. Diese Translokation deutet beim MM/EMM einen schlechten Krankheitsverlauf - also auch erhöhtem Risiko einer extramedullären Erkrankung - an. Dahingegen ist diese Translokation bei der MGUS nur sehr selten zu finden. Da in dieser Studie eine CT-A-Expression bei den MGUS fehlt, während sie bei den MM und EMP-Fällen aber exprimiert werden, steht diese Translokation möglicherweise in einem Zusammenhang mit einer gesteigerten CT-A-Expression. Ansonsten differiert das Translokationsprofil von MM und EMP beachtlich und weist keine weiteren Gemeinsamkeiten auf (Gonzalez, van der Burg et al. 2007, Bink, Haralambieva et al. 2008).

### 5.1.2 Expressionsmuster und Koexpression der Cancer-Testis-Antigene

#### Zusammenfassung der Ergebnisse und Vergleich mit der Literatur

Patienten mit Multiplen Myelom und EMM haben zusammen in 83% der Fälle mindestens eines der untersuchten Cancer-Testis-Antigene exprimiert. Auch in der gängigen Literatur werden hierfür vergleichbare Werte angegeben, welche bei 80%, 92,3% und sogar bei 98% liegen (Atanackovic, Arfsten et al. 2007, Condomines, Hose et al. 2007, Andrade, Vettore et al. 2008, Atanackovic, Luetkens et al. 2009).

Interessanterweise exprimieren EMP-Patienten ebenfalls häufig, zu 70%, mindestens ein CT-A.

Diese Studie zeigt zudem, dass Patienten mit MM und EMM mehrere Cancer-Testis-Antigene gleichzeitig exprimieren als Patienten mit EMP, und dass besonders die aggressiven EMM-Fälle eine erhöhte Rate gleichzeitig exprimierter CT-A aufweisen. So wurde bei den EMM in 34% vier und fünf CT-A gleichzeitig gefunden, während MM-Patienten nur zu 17%, und EMP-Patienten zu 11% vier und fünf CT-A koexprimierten.

Dabei konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass alle untersuchten Cancer-Testis-Antigene singular bzw. kombiniert exprimiert werden können.

Im Einklang stehen die Ergebnisse von Atanackovic und Kollegen. Hier wird gezeigt, dass die Häufigkeit gleichzeitig exprimierter Cancer-Testis-Antigene vom Durie-Stadium abhängig ist und in höheren MM-Stadien eine zunehmende Anzahl koexprimierter CT-A zu verzeichnen ist (Atanackovic, Luetkens et al. 2009). Je mehr CT-A also gleichzeitig exprimiert werden, desto schlechter wirkt sich

dies auf die Prognose der Patienten aus und bestärkt die Hypothese, dass Cancer-Testis-Antigene in der Summe die Pathogenese des MM unterstützen (Andrade, Vettore et al. 2008).

#### Interpretation der Ergebnisse

Als Fazit steht die Erkenntnis, dass Cancer-Testis-Antigene häufig koexprimiert werden (Meklat, Li et al. 2007, Atanackovic, Luetkens et al. 2009).

Zudem stehen Cancer-Testis-Antigene untereinander in Korrelation, wie in dieser Studie anhand MAGE-C1 und MAGE-A3/6 bewiesen werden konnte. Auch werden sie über gleiche epigenetische Mechanismen reguliert, korrelieren gemeinsam mit dem Krankheitsverlauf und der Plasmazellproliferation und haben zudem noch gleiche Funktionen, wie z.B. MAGE-C1 und MAGE-A3/6, welche beide die Apoptose tumoröser Plasmazellen verhindern. Darüber hinaus konnten Cho und Kollegen sogar eine Interaktion von Cancer-Testis-Antigenen nachweisen (Jungbluth, Ely et al. 2005, Cho, Caballero et al. 2006, Atanackovic, Luetkens et al. 2009, Atanackovic, Hildebrandt et al. 2010).

Diese Erkenntnisse bekräftigen die Vorstellung, dass Cancer-Testis-Antigene im Rahmen eines genetischen Programmes koordiniert exprimiert und reguliert werden, und sie eine gemeinsame Rolle in der Tumorgenese spielen (Andrade, Vettore et al. 2008, Atanackovic, Luetkens et al. 2009).

### **5.1.3 Bedeutung der Lokalisation der Cancer-Testis-Antigene**

MAGE-A1, MAGE-A3/6 und NY-ESO-1 konnten in Übereinstimmung mit der Literatur zytoplasmatisch lokalisiert werden (Satie, Rajpert-De Meyts et al. 2002, Dhodapkar, Osman et al. 2003, Jungbluth, Ely et al. 2005, Cho, Caballero et al. 2006, Atanackovic, Hildebrandt et al. 2010). MAGE-C2 zeigte konkordant mit anderen Studie ein nukleäres Expressionsmuster (Zhuang, Zhu et al. 2006, Atanackovic, Arfsten et al. 2007).

MAGE-C1 konnte in unserer Studie überwiegend zytoplasmatisch nachgewiesen werden. Dennoch zeigten 6 MM-Fälle, 1 EMM und 1 EMP-Fall zusätzlich eine nukleäre Expression.

Auch in der Literatur wird eine gelegentliche nukleäre Expression von MAGE-C1 angegeben, welche zugleich mit einer schlechten Prognose für diese Patienten beim MM assoziiert ist (Dhodapkar, Osman et al. 2003, Cho, Caballero et al. 2006, Tinguely, Jenni et al. 2008).

Interessanterweise zeigte der eine EMP-Patient, welcher MAGE-C1 nukleär exprimierte im Verlauf ein Rezidiv.

### 5.1.4 Prognosemarker und IgH-Bruch

#### CD56: Ergebnisse und Interpretation

Patienten mit einem MM und EMM haben signifikant häufiger den Prognosemarker CD56 exprimiert als Patienten mit einem EMP. Damit konnten wir die Ergebnisse von Kremer et al bestätigen, welche ebenfalls eine verminderte CD56-Expression bei EMP-Patienten nachwiesen (Kremer, Ott et al. 2005). In beiden Studien konnten annähernd gleich hohe Expressionsraten für CD56 bei Patienten mit MM und EMM gefunden werden. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen einiger anderer Arbeitsgruppen, welche eine verminderte Expression von CD56 bei EMM-Patienten zeigen. Ein Verlust von CD56, einem Adhäsionsprotein, wird dabei mit aggressiven, invasiven Wachstum assoziiert (Sahara and Takeshita 2004, Cerny, Fadare et al. 2008). Da erscheint es widersprüchlich, dass CD56 bei den EMP vermindert exprimiert wird, welche ein indolentes, lokales Wachstum pflegen. Eine Vermutung ist, dass ein Fehlen von CD56 beim EMP im Gegensatz zum EMM nicht auf einem Verlust von CD56 im Rahmen der Dedifferenzierung beruht, sondern vielmehr auf einer verminderten Expression von Beginn an. Ein Fehlen von CD56 könnte insgesamt also Hinweise auf eine extramedulläre Erkrankung liefern (Kremer, Ott et al. 2005).

In dieser Studie konnte erstmals eine signifikante Korrelation zwischen dem Cancer-Testis-Antigen MAGE-C2 und CD56 beim Multiplen Myelom festgestellt werden. Interessanterweise werden sowohl MAGE-C2, als auch CD56 mit Osteolysen beim MM assoziiert (Ely and Knowles 2002, Pabst, Zustin et al. 2010).

#### Cyclin D1 und IgH-Break: Ergebnisse und Interpretation

Cyclin D1 wurde signifikant häufiger von Patienten mit MM und EMM exprimiert als von Patienten mit einem EMP. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studiengruppen (Kremer, Ott et al. 2005, Bink, Haralambieva et al. 2008). Daneben waren die Patienten mit MGUS in dieser Studie negativ bezüglich Cyclin D1. Auch wird Cyclin D1 nicht von gesunden Plasmazellen exprimiert und scheint daher insbesondere das Vorliegen eines Multiplen Myeloms anzudeuten.

In unserer Studie zeigten nur zwei EMP-Fälle eine Expression von Cyclin D1. Interessanterweise entwickelte einer dieser Patienten im Verlauf eine singuläre Osteolyse im Schädel, welche sich als stark verdächtig auf ein Multiples Myelom erwies. Möglicherweise kennzeichnete die Expression von Cyclin D1 bei diesem Patienten bereits das entstandene Multiple Myelom. Darüber hinaus exprimierte dieser Patient CD56 und die Cancer-Testis-Antigene MAGE-C2 und MAGE-C1, welche mit Osteolysen in Verbindung stehen. In der vorliegenden Studie konnte erstmals eine Korrelation zwischen dem Cancer-Testis-Antigen MAGE-C2 und Cyclin D1 gezeigt werden, welches typisch für das Multiple Myelom ist.

Während Cyclin D1 bei Patienten mit MM für eine gute Prognose spricht, scheint es beim EMP dahingegen mit schlechter histologischer Differenzierung und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für ein Multiples Myelom in Verbindung zu stehen (Kojima, Motoori et al. 2009).

Über den zweiten EMP-Patienten mit Cyclin D1-Expression waren keine weiteren klinischen Informationen bekannt.

Das Vorliegen von IgH-Brüchen ist mit einer schlechten Prognose beim MM gekoppelt. Dahingegen ist die Rolle des IgH-Bruches bei den EMP-Patienten bis jetzt unklar. Auch konnte kein Zusammenhang zu der Expression von Cancer-Testis-Antigenen gefunden werden.

#### Cyclin D1 und IgH-Break: Differenzierung MM und EMP

Das Multiple Myelom und das extramedulläre Plasmozytom sind trotz unterschiedlicher klinischer Verläufe morphologisch schwer zu differenzieren (Kremer, Ott et al. 2005, Dores, Landgren et al. 2009). Auch zytogenetisch sind beide Erkrankungen eng verwandt. Dennoch gibt es markante Unterschiede, welche andeuten, dass es sich bei diesen Erkrankungen vielmehr um zwei unterschiedliche Tumorgattungen handelt, als nur um zwei Verlaufsformen derselben Erkrankung.

Zum einen sind EMP durch eine komplette Abwesenheit von Cyclin D1 gekennzeichnet, und zum anderen weisen sie andere IgH-Translokationspartner auf als MGUS und MM-Patienten (Bink, Haralambieva et al. 2008).

#### Ki67: Ergebnisse und Interpretation

Den Proliferationsmarkers Ki67 betreffend, konnten keine Unterschiede in der Expression zwischen MM, EMM und EMP gefunden werden. Während Ki67 von diesen Diagnosegruppen exprimiert wurde, konnte es bei Patienten mit MGUS nicht nachgewiesen werden (Kremer, Ott et al. 2005, Gastinne, Leleu et al. 2007). MM, EMM und EMP stellen also, im Gegensatz zur MGUS, stark proliferative Erkrankungen dar.

Darüber hinaus korrelieren die Cancer-Testis-Antigene MAGE-C1, MAGE-C2 und MAGE-A1 in dieser Studie mit einer erhöhten Proliferationsrate.

Andere Studien konnte bereits zeigen, dass MAGE-A3/6 und MAGE-C1 mit der Plasmazellproliferation beim Multiplen Myelom korrelieren (Jungbluth, Ely et al. 2005, Pabst, Zustin et al. 2010).

Diese Studie aber zeigt erstmals eine Verbindung zwischen der Expression von MAGE-C2 und einer erhöhten Proliferationsrate bei MM- und EMP-Patienten.

### **5.1.5 Klinische Daten und klinischer Verlauf**

#### Durie-Stadium

MAGE-C1 wurde in unserer Studie als häufigstes CT-A bei MM-Patienten im Durie-Stadium I exprimiert, und zwar bei 5 der 9 Patienten, welche sich im Durie-Stadium I befanden, also in 56% der

Fälle. Dabei zeigten vier dieser fünf Patienten sogar eine Expressionsrate von 100%. Danach folgten die Cancer-Testis-Antigene MAGE-A1 und MAGE-A3/6 mit jeweils 33%. Die Cancer-Testis-Antigene NY-ESO-1 und MAGE-C2 wurden nur bei jeweils 22% der Patienten im Durie-Stadium I gefunden. Auch andere Arbeitsgruppen konnte zeigen, dass besonders MAGE-C1 bereits in frühen MM-Stadien ausgebildet wird und auch teilweise schon bei Patienten mit MGUS zu finden ist (Jungbluth, Ely et al. 2005, Condomines, Hose et al. 2007, Andrade, Vettore et al. 2008).

#### Histologische Differenzierung (Grading)

EMP-Patienten sind größtenteils histologisch gut differenziert (Kremer, Ott et al. 2005).

So wiesen EMP-Fälle in dieser Studie nur zu 18% eine mäßige Differenzierung auf, und schlecht differenzierte EMP-Fälle waren gar nicht vorhanden. Dahingegen waren MM-, und besonders EMM-Fälle vermehrt mäßig bis schlecht differenziert (MM: 30%; EMM: 50%).

In dieser Studie konnte erstmals eine Korrelation zwischen histologischem Grading und der Expression eines Cancer-Testis-Antigens gezeigt werden. So nahm die Expression von MAGE-C1 bei schlecht differenzierten Fällen zu. MAGE-C1 könnte also Hinweis auf eine Dedifferenzierung in Tumoren sein.

#### Krankheitsbedingtes Versterben

Die untersuchten Plasmazellneoplasien unterscheiden sich deutlich im klinischen Verlauf.

Während keiner der EMP- und MGUS-Patienten krankheitsbedingt verstarb, so lagen die krankheitsbedingten Sterberaten in dieser Studie für MM- und EMM-Patienten bei 31%, respektive 83%. Darüber hinaus wurde untersucht, ob Cancer-Testis-Antigene mit krankheitsbedingtem Tod in Verbindung stehen.

Patienten, welche Cancer-Testis-Antigene exprimierten, wiesen tendenziell schlechtere Überlebensraten auf als Patienten ohne CT-A-Expression. Dabei konnte nur für MAGE-C2 ein beinahe signifikantes Ergebnis erreicht werden (p-Wert: 0,05).

MAGE-C2 wurde vermehrt bei Osteolysen gefunden, NY-ESO-1 und MAGE-A3/6 kommen besonders bei MM-Patienten mit Hochrisiko-Profil vor und MAGE-C1 wird von Patienten mit Rezidiven und bei fehlendem Therapieansprechen gesteigert exprimiert (van Rhee, Szmania et al. 2005, Atanackovic, Luetkens et al. 2009, Pabst, Zustin et al. 2010).

Diese Cancer-Testis-Antigene deuten also einen schlechten Verlauf beim Multiplen Myelom an.

Eine Ausnahme stellt MAGE-A1 dar, worauf etwas später eingegangen wird.

#### EMP-Rezidive

Von den EMP-Patienten entwickelten sechs Patienten Rezidive im Verlauf der Erkrankung. Das sind 26% aller EMP-Patienten. Auch in der Literatur werden Rezidivraten von ungefähr 20% angegeben (Alexiou, Kau et al. 1999, Galieni, Cavo et al. 2000, Straetmans and Stokroos 2008). Allerdings kon-

statieren diese ebenfalls eine Wahrscheinlichkeit von 15-20%, dass EMP zu einem Multiplen Myelom konvertieren. Diese Studie liefert allerdings widersprüchliche Ergebnisse dazu. Nur ein EMP-Patient entwickelte ein fragliches Multiples Myelom (unter 1% der Fälle) und nur ein Patient lieferte Hinweise auf die Entstehung einer MGUS. Vielmehr stimmt diese Studie mit den aktuelleren Ergebnissen von Kremer M et al überein, bei denen ebenfalls kein Patient ein MM entwickelte. Die Unterschiede können zum einen auf strengeren Einschlusskriterien beruhen und zum anderen wurden in ältere Studien oft EMM-Fälle anstelle von EMP-Fällen eingeschlossen (Kremer, Ott et al. 2005).

Bisher konnte gezeigt werden, dass Cancer-Testis-Antigene mit dem klinischen Verlauf beim Multiplen Myelom korrelieren und bei Patienten mit MM-Rezidiven gesteigert exprimiert werden (Atanackovic, Luetkens et al. 2009).

In dieser Studie wurde erstmals der Zusammenhang zwischen Rezidiven des extramedullären Plasmozytoms und der CT-A-Expression untersucht.

Tendenziell wiesen Patienten mit höheren CT-A-Expressionen ein kürzeres rezidivfreies Intervall auf. Dabei wurde NY-ESO-1 von keinem der betroffenen EMP-Patienten exprimiert.

Eine Ausnahme stellt wiederum MAGE-A1 dar, worauf im nächsten Abschnitt eingegangen wird.

Interessanterweise wiesen drei der sechs Rezidiv-Patienten (50%) eine mäßige histologische Differenzierung auf. Damit grenzen sie sich von den übrigen EMP-Fällen ab, welche mit 18% wesentlich seltener mäßig differenziert waren. Darüber hinaus korrelierte MAGE-C1 besonders in der EMP-Gruppe mit dem Grading. Zusätzlich wies derjenige EMP-Patient, welcher eine MGUS ausbildete, ebenfalls eine mäßige histologische Differenzierung auf.

Ein schlechtes histologisches Grading scheint also bei EMP-Patienten ein besonderer Risikofaktor für die Entstehung eines Rezidivs bzw. einer MGUS zu sein (Kremer, Ott et al. 2005).

#### Ausnahme: Cancer-Testis-Antigen MAGE-A1

MM- und EMM-Patienten mit MAGE-A1-Expression wiesen in dieser Studie tendenziell bessere Überlebensraten auf. Zudem hatten EMP-Patienten, welche MAGE-A1 ausbildeten, signifikant längere rezidivfreie Intervalle und entwickelten seltener Rezidive als EMP-Patienten mit fehlender MAGE-A1-Expression.

Diese Ergebnisse deuten an, dass MAGE-A1 sowohl bei den MM und EMM, als auch insbesondere bei den EMP-Patienten mit einer guten Prognose assoziiert werden kann.

Interessanterweise wurde MAGE-A1 erst kürzlich mit einer guten Prognose bei Gehirntumoren, genauer gesagt Neuroblastomen, in Verbindung gebracht (Grau, Oltra et al. 2009).

MAGE-A1 stellt anscheinend eine Ausnahme unter den Cancer-Testis-Antigenen dar, welche für gewöhnlich für einen schlechten Verlauf sprechen. Dabei scheint diese Ausnahme für Tumoren verschiedener histologischer Arten zuzutreffen.

Yang B et al konnten zeigen, dass MAGE-A1 auch funktionell von anderen MAGE-Cancer-Testis-Antigenen abweicht. Eine Suppression von MAGE-A1 führte hier nicht zu einer vermehrten Apoptose

maligner Tumorzellen. Dahingegen führte die Suppression der übrigen MAGE-CT-A zu einer vermehrten Apoptose von Tumorzellen. Während MAGE-CT-A also durch ihre Expression generell das Überleben der Tumorzellen unterstützen, scheint MAGE-A1 im Gegensatz dazu den Erhalt von Tumorzellen nicht weiter zu fördern (Yang, O'Herrin et al. 2007).

## 5.2 Fazit und Bedeutung für die Praxis

### Unterscheidung der Plasmazellneoplasien anhand der CT-A-Expression

Bisherige Untersuchungen konzentrierten sich stets auf das Multiple Myelom. In dieser Studie wurde erstmals untersucht, ob eine Unterscheidung der Plasmazellneoplasien MGUS, MM, EMM und EMP anhand der Cancer-Testis-Antigen-Expression möglich ist.

MGUS-Patienten lassen sich dabei eindeutig abgrenzen, da Cancer-Testis-Antigene bei ihnen nicht zu finden waren. Dahingegen exprimierten MM- und EMM häufig Cancer-Testis-Antigene mit vorwiegender Expression von MAGE-C1 und MAGE-C2.

Interessanterweise sind Cancer-Testis-Antigene auch bei EMP-Fällen nachzuweisen, wobei MAGE-C1 und MAGE-A3/6 signifikante Parameter für die Abgrenzung zum MM und EMM darstellen.

Darüber hinaus steigt die Wahrscheinlichkeit für ein EMP, wenn gleichzeitig hohe MAGE-A1- und niedrige MAGE-A3/6-Expressionen vorliegen.

### Bedeutung der CT-A und Konsequenz

Auch wenn Cancer-Testis-Antigene definitionsgemäß einer Antigengruppe angehören, so bestehen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen CT-A, sei es im Zeitpunkt des Auftretens innerhalb der Tumorentstehung, in der Beziehung zum klinischen Verlauf, in der Stärke der Immunität oder in der prognostischen Relevanz.

Folglich dürfen sie nicht als eine Einheit aufgefasst werden. Im Gegenteil, Cancer-Testis-Antigene müssen vielmehr individuell betrachtet werden, um beispielsweise Aussagen über die Prognose eines Patienten machen zu können.

Darüber hinaus konnte in dieser Studie erstmals eine prognostische Relevanz von Cancer-Testis-Antigenen bei EMP-Patienten belegt werden: EMP-Patienten, welche MAGE-A1 exprimierten wiesen deutlich seltener Rezidive ihrer Erkrankung auf als Patienten mit fehlender MAGE-A1-Expression.

Interessanterweise scheinen CT-A bei EMP und MM/EMM eine ähnliche prognostische Bedeutung zu implizieren, zumal in beiden Gruppen Patienten mit gesteigerter CT-A-Expression tendenziell ungünstigere klinische Verläufe zeigten, als Patienten ohne CT-A-Expression. MAGE-A1 stellt prognostisch sowohl bei MM/EMM, als auch bei EMP eine Ausnahme unter den CT-A dar.

### CT-A als Proliferationsmarker

Die Untersuchung der Cancer-Testis-Antigene mit den Prognosemarkern CD56, Cyclin D1 und Ki67 ergab mehrere signifikante Korrelationen für einzelne Cancer-Testis-Antigene. Ein Zusammenhang generell zu allen CT-A konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Diese Beobachtung bestärkt die Vermutung, dass CT-A unterschiedliche Funktionen haben und in der Bedeutung für die Plasmazellneoplasien differieren.

Interessanterweise ähnelte das Muster der CT-A-Expression insgesamt deutlich dem Bild der Ki67-Expression. MGUS-Patienten wiesen weder CT-A, noch eine gesteigerte Proliferationsrate auf, was an der Ki67-Expression gemessen wurde. Die übrigen Erkrankungen MM, EMM und EMP, verfügten gleichzeitig über eine gesteigerte Proliferationsrate und über eine gesteigerte Cancer-Testis-Antigen-Expression. Cancer-Testis-Antigene könnten somit insgesamt eine Bedeutung als Proliferationsmarker erhalten.

### Problematik

Als problematisch jedoch erweist sich die Tatsache, dass alle untersuchten CT-A auch von allen untersuchten Entitäten exprimiert wurden. Nur die MGUS ist durch fehlende CT-A-Expression klar abgrenzbar.

Darüber hinaus ist die Expression der einzelnen CT-A sehr heterogen, selbst innerhalb einer Tumorgattung (Meklat, Li et al. 2007).

Innerhalb eines Tumors jedoch erweist sich die Cancer-Testis-Antigen-Expression als stabil.

Wird ein Cancer-Testis-Antigen erst einmal von einer Tumorzelle exprimiert, so persistiert dieses CT-A im weiteren Krankheitsverlauf des Patienten (Atanackovic, Luetkens et al. 2009).

Dennoch ist es schwer aus diesen Daten eindeutige Konsequenzen für die klinische Routine zu ziehen. Individuell gesehen jedoch können Cancer-Testis-Antigene prognostische Hinweise für den einzelnen Patienten liefern.

Um Cancer-Testis-Antigene jedoch im klinischen Alltag einzusetzen, sind weitere Untersuchungen diesbezüglich nötig.

## **5.3 Ausblick**

Angesichts der in dieser Studie belegten Möglichkeit der prognostischen Bedeutung von Cancer-Testis-Antigenen und der Differenzierungsmöglichkeiten zwischen den einzelnen Plasmazellneoplasien sind weitere Untersuchungen erstrebenswert.

Das Cancer-Testis-Antigen MAGE-C2 wurde in dieser Studie vorwiegend von den prognostisch ungünstigen EMM-Fällen exprimiert. Darüber hinaus gehört es zu den häufigsten CT-A beim Multiplen Myelom. Daher sind gerade für MAGE-C2 weitere Analysen bezüglich Funktion und Korrelation zu klinischen Prognoseparametern erforderlich.

MGUS-Patienten erwiesen sich in dieser Studie als komplett negativ für Cancer-Testis-Antigene. Andere Arbeitsgruppen konnten jedoch CT-A bereits bei der MM-Vorstufe MGUS nachweisen. Es stellt sich die Frage, ob solche Fälle eher in ein MM übergehen, als MGUS-Fälle ohne Cancer-Testis-Antigen-Expression. Therapeutische Maßnahmen gegen CT-A bei MGUS sind möglicherweise in der Lage, die weitere Pathogenese eines MM aufzuhalten.

MAGE-C1 und MAGE-A3/6 sind CT-A, die auch von MM-Patienten in frühen klinischen Krankheitsstadien exprimiert werden. Zusätzlich konnten diese CT-A bei Myelomvorläuferzellen gefunden werden, welche oftmals chemoresistent sind und für das Auftreten von Rezidiven verantwortlich gemacht werden (Costa, Le Blanc et al. 2007, Atanackovic, Hildebrandt et al. 2010). Therapeutische Maßnahmen gegen diese CT-A könnten also die Entstehung und Entwicklung eines MM und von MM-Rezidiven verhindern.

In dieser Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass Cancer-Testis-Antigene auch eine prognostische Bedeutung bei EMP-Patienten haben. So entwickelten EMP-Patienten mit MAGE-A1 seltener Rezidive als EMP-Patienten mit fehlender MAGE-A1-Expression. Dennoch ist die Bedeutung der CT-A bei den EMP weitgehend ungeklärt.

In dem Rahmen wäre es interessant, solche EMP-Fälle zu betrachten, welche im Verlauf ein MM entwickeln, und jene bezüglich der CT-A-Expression zu analysieren.

In dieser Studie ging allerdings kein EMP-Fall in ein MM über. Das wirft die Frage auf, ob aus einem EMP überhaupt ein MM entsteht und ob es sich bei den Fällen, bei denen ein MM im Verlauf gefunden wird nicht um versteckte EMM-Fälle handelt. Darüber hinaus könnte in zukünftigen Studien ein Vergleich zwischen beiden extramedullären Erkrankungen EMM und EMP durchgeführt werden mit der Analyse, inwiefern die lokale Microenvironment die CT-A-Expression beeinflusst.

## 6. Zusammenfassung

Das Multiple Myelom (MM) und seine extramedulläre Verlaufsform (EMM) differieren hinsichtlich Klinik und Prognose deutlich vom extramedullären Plasmozytom (EMP). Morphologisch sind diese Entitäten jedoch nur schwer voneinander abzugrenzen. Auch zytogenetisch sind beide Erkrankungen sehr ähnlich. So verfügen sie über einige gemeinsame Translokationen, wie beispielsweise die Translokationen t(11;14) und t(4;14).

Cancer-Testis-Antigene stellen eine Gruppe von Antigenen dar, welche besonders häufig beim MM zu finden sind und bei dieser Erkrankung mit einem aggressiven Krankheitsverlauf assoziiert werden.

Die vorliegende Dissertation versuchte daher das Expressionsprofil von fünf Cancer-Testis-Antigenen bei Patienten mit MGUS, MM, EMM und EMP zu analysieren, um mögliche Unterschiede zwischen den Entitäten aufzudecken.

Hierzu erfolgte eine ausführliche Archivsuche, um geeignete Fälle zu ermitteln. Insgesamt wurden 106 Gewebeproben in die Studie eingeschlossen, wobei es sich im Einzelnen um 11 MGUS-, 57 MM-, 10 EMM- und 28 EMP-Fälle handelte.

Nach Herstellung entsprechender Tissue-Micro-Arrays, wurden immunhistochemische Färbungen mit fünf Antikörpern gegen Cancer-Testis-Antigene vorgenommen, wobei folgende Cancer-Testis-Antigene untersucht wurden: MAGE-A1, MAGE-A3/6, MAGE-C1, MAGE-C2 und NY-ESO-1.

Auch wurde die Cancer-Testis-Antigen-Expression mit prognostischen Parametern (CD56, Cyclin D1, Ki67) verglichen und zusätzlich mit klinischen Daten korreliert. Darüber hinaus interessierte bei Patienten mit EMP, ob ein Zusammenhang zwischen dem Vorliegen eines IgH-Bruches und der Expression von Cancer-Testis-Antigenen besteht, wobei IgH-Brüche mittels der FISH-Technik ermittelt wurden.

Die vorliegende Studie deckte deutliche Unterschiede zwischen den Plasmazellneoplasien auf.

Während MGUS-Patienten keines der untersuchten Cancer-Testis-Antigene exprimierten, präsentierten MM- und EMM-Patienten eine deutlich gesteigerte Cancer-Testis-Antigen-Expression. 83% der Fälle exprimierten mindestens eines der Cancer-Testis-Antigene, wobei insbesondere MAGE-C1 (65%) und MAGE-A3/6 zu verzeichnen waren.

Im Vergleich mit dem klinischen Verlauf wiesen Cancer-Testis-Antigene sowohl beim MM und EMM, als auch beim EMP prognostische Bedeutung auf.

MM/EMM-Patienten mit MAGE-A1 verfügten über etwas bessere Überlebensraten, als Patienten mit fehlender MAGE-A1-Expression. MAGE-C2 kennzeichnete dahingegen einen ungünstigen Verlauf beim MM/EMM. Beim EMP korrelierte die Expression von MAGE-A1 mit einer reduzierten Wahrscheinlichkeit ein Lokalrezidiv zu entwickeln.

Auch ergab die Studie, dass EMP-Fälle in 70% der Fälle mindestens ein Cancer-Testis-Antigen exprimierten. Trotz des klinisch meist gutartigen Erscheinungsbildes exprimieren EMP also ebenfalls

---

häufig CT-A und verfügen dabei sogar über ein ähnliches Spektrum an CT-A wie Patienten mit einem MM oder EMM.

Dennoch können CT-A bei der differentialdiagnostischen Unterscheidung zwischen den Plasmazellneoplasien hilfreich sein. Die Cancer-Testis-Antigene MAGE-C1 und MAGE-A3/6 wurden beispielsweise signifikant seltener von EMP-Patienten als von MM/EMM-Patienten exprimiert.

Die vorliegende Studie zeigt also, dass Cancer-Testis-Antigene als differentialdiagnostische Marker fungieren können. Darüber hinaus beeinflussen Cancer-Testis-Antigene den klinischen Verlauf und sind sowohl beim MM und EMM, als auch bei EMP von prognostischer Bedeutung.

## 7. Literaturverzeichnis

Alexandrakis, M. G., F. H. Passam, C. Dambaki, C. A. Pappa and E. N. Stathopoulos (2004). "The relation between bone marrow angiogenesis and the proliferation index Ki-67 in multiple myeloma." J Clin Pathol **57**(8): 856-860.

Alexandrakis, M. G., F. H. Passam, D. S. Kyriakou, K. Dambaki, M. Niniraki and E. Stathopoulos (2004). "Ki-67 proliferation index: correlation with prognostic parameters and outcome in multiple myeloma." Am J Clin Oncol **27**(1): 8-13.

Alexiou, C., R. J. Kau, H. Dietzfelbinger, M. Kremer, J. C. Spiess, B. Schratzenstaller and W. Arnold (1999). "Extramedullary plasmacytoma: tumor occurrence and therapeutic concepts." Cancer **85**(11): 2305-2314.

Almeida, L. G., N. J. Sakabe, A. R. deOliveira, M. C. Silva, A. S. Mundstein, T. Cohen, Y. T. Chen, R. Chua, S. Gurung, S. Gnjatic, A. A. Jungbluth, O. L. Caballero, A. Bairoch, E. Kiesler, S. L. White, A. J. Simpson, L. J. Old, A. A. Camargo and A. T. Vasconcelos (2009). "CTdatabase: a knowledge-base of high-throughput and curated data on cancer-testis antigens." Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D816-819.

Almstedt, M., N. Blagitko-Dorfs, J. Duque-Afonso, J. Karbach, D. Pfeifer, E. Jager and M. Lubbert (2010). "The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine induces expression of NY-ESO-1 and other cancer/testis antigens in myeloid leukemia cells." Leuk Res **34**(7): 899-905.

Andrade, V. C., A. L. Vettore, R. S. Felix, M. S. Almeida, F. Carvalho, J. S. Oliveira, M. L. Chauffaille, A. Andriolo, O. L. Caballero, M. A. Zago and G. W. Colleoni (2008). "Prognostic impact of cancer/testis antigen expression in advanced stage multiple myeloma patients." Cancer Immun **8**: 2.

Atanackovic, D., J. Arfsten, Y. Cao, S. Gnjatic, F. Schnieders, K. Bartels, G. Schilling, C. Faltz, C. Wolschke, J. Dierlamm, G. Ritter, T. Eiermann, D. K. Hossfeld, A. R. Zander, A. A. Jungbluth, L. J. Old, C. Bokemeyer and N. Kroger (2007). "Cancer-testis antigens are commonly expressed in multiple myeloma and induce systemic immunity following allogeneic stem cell transplantation." Blood **109**(3): 1103-1112.

Atanackovic, D., Y. Hildebrandt, A. Jadcak, Y. Cao, T. Luetkens, S. Meyer, S. Kobold, K. Bartels, C. Pabst, N. Lajmi, M. Gordic, T. Stahl, A. R. Zander, C. Bokemeyer and N. Kroger (2010). "Cancer-testis antigens MAGE-C1/CT7 and MAGE-A3 promote the survival of multiple myeloma cells." Haematologica **95**(5): 785-793.

Atanackovic, D., T. Luetkens, Y. Hildebrandt, J. Arfsten, K. Bartels, C. Horn, T. Stahl, Y. Cao, A. R. Zander, C. Bokemeyer and N. Kroger (2009). "Longitudinal analysis and prognostic effect of cancer-testis antigen expression in multiple myeloma." Clin Cancer Res **15**(4): 1343-1352.

Athanasiou, E., V. Kaloutsi, V. Kotoula, P. Hytioglou, I. Kostopoulos, C. Zervas, P. Kalogiannidis, A. Fassas, J. I. Christakis and C. S. Papadimitriou (2001). "Cyclin D1 overexpression in multiple myeloma. A morphologic, immunohistochemical, and in situ hybridization study of 71 paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens." Am J Clin Pathol **116**(4): 535-542.

Avet-Loiseau, H., M. Attal, P. Moreau, C. Charbonnel, F. Garban, C. Hulin, S. Leyvraz, M. Michallet, I. Yakoub-Agha, L. Garderet, G. Marit, L. Michaux, L. Voillat, M. Renaud, B. Grosbois, G. Guillermin, L. Benboubker, M. Monconduit, C. Thieblemont, P. Casassus, D. Caillot, A. M. Stoppa, J. J. Sotto, M. Wetterwald, C. Dumontet, J. G. Fuzibet, I. Azais, V. Dorvaux, M. Zandecki, R. Bataille, S. Minvielle, J. L. Harousseau, T. Facon and C. Mathiot (2007). "Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome." Blood **109**(8): 3489-3495.

- Bachar, G., D. Goldstein, D. Brown, R. Tsang, G. Lockwood, B. Perez-Ordóñez and J. Irish (2008). "Solitary extramedullary plasmacytoma of the head and neck--long-term outcome analysis of 68 cases." Head Neck **30**(8): 1012-1019.
- Bartl, R., B. Frisch, A. Fateh-Moghadam, G. Kettner, K. Jaeger and W. Sommerfeld (1987). "Histologic classification and staging of multiple myeloma. A retrospective and prospective study of 674 cases." Am J Clin Pathol **87**(3): 342-355.
- Bink, K., E. Haralambieva, M. Kremer, G. Ott, C. Beham-Schmid, L. de Leval, S. C. Peh, H. R. Laeng, U. Jutting, P. Hutzler, L. Quintanilla-Martinez and F. Fend (2008). "Primary extramedullary plasmacytoma: similarities with and differences from multiple myeloma revealed by interphase cytogenetics." Haematologica **93**(4): 623-626.
- Blade, J., R. A. Kyle and P. R. Greipp (1996). "Presenting features and prognosis in 72 patients with multiple myeloma who were younger than 40 years." Br J Haematol **93**(2): 345-351.
- Blade, J., M. Perales, L. Rosinol, M. Tuset, S. Montoto, J. Esteve, F. Cobo, L. Vilella, M. Rafel, B. Nomdedeu and E. Montserrat (2001). Thalidomide in multiple myeloma: lack of response of soft-tissue plasmacytomas. Br J Haematol. England. **113**: 422-424.
- Blade, J., L. Rosinol and M. T. Cibeira (2008). "Prognostic factors for multiple myeloma in the era of novel agents." Ann Oncol **19 Suppl 7**: vii117-120.
- Blade, J., L. Rosinol, M. T. Cibeira and C. F. de Larrea (2008). "Pathogenesis and progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance." Leukemia **22**(9): 1651-1657.
- Brenner, H., A. Gondos and D. Pulte (2008). "Recent major improvement in long-term survival of younger patients with multiple myeloma." Blood **111**(5): 2521-2526.
- Caballero, O. L. and Y. T. Chen (2009). "Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy." Cancer Sci **100**(11): 2014-2021.
- Caers, J., I. Vande broek, H. De Raeve, L. Michaux, F. Trullemans, R. Schots, B. Van Camp and K. Vanderkerken (2008). "Multiple myeloma--an update on diagnosis and treatment." Eur J Haematol **81**(5): 329-343.
- Candoni, A., E. Simeone and R. Fanin (2008). "Extramedullary progression of multiple myeloma under thalidomide therapy despite concomitant response of medullary disease." Am J Hematol **83**(8): 680-681.
- Cerny, J., O. Fadare, L. Hutchinson and S. A. Wang (2008). "Clinicopathological features of extramedullary recurrence/relapse of multiple myeloma." Eur J Haematol **81**(1): 65-69.
- Chen, H. F., W. J. Fu, D. X. Wang, Z. G. Yuan, Y. B. Chen and J. Hou (2007). "[Clinical features of multiple myeloma patients with extramedullary disease: a report of 40 cases from a single center]." Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi **28**(10): 655-658.
- Chen, Y. T., A. O. Gure, S. Tsang, E. Stockert, E. Jager, A. Knuth and L. J. Old (1998). "Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(12): 6919-6923.
- Chen, Y. T., M. J. Scanlan, U. Sahin, O. Tureci, A. O. Gure, S. Tsang, B. Williamson, E. Stockert, M. Pfreundschuh and L. J. Old (1997). "A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 1914-1918.
- Chng, W. J., O. Glebov, P. L. Bergsagel and W. M. Kuehl (2007). Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. Best Pract Res Clin Haematol. England. **20**: 571-596.

- Cho, H. J., O. L. Caballero, S. Gnjatic, V. C. Andrade, G. W. Colleoni, A. L. Vettore, H. H. Outtz, S. Fortunato, N. Altorki, C. A. Ferrera, R. Chua, A. A. Jungbluth, Y. T. Chen, L. J. Old and A. J. Simpson (2006). "Physical interaction of two cancer-testis antigens, MAGE-C1 (CT7) and NY-ESO-1 (CT6)." *Cancer Immun* **6**: 12.
- Condomines, M., D. Hose, P. Raynaud, M. Hundemer, J. De Vos, M. Baudard, T. Moehler, V. Pantesco, M. Moos, J. F. Schved, J. F. Rossi, T. Reme, H. Goldschmidt and B. Klein (2007). "Cancer/testis genes in multiple myeloma: expression patterns and prognosis value determined by microarray analysis." *J Immunol* **178**(5): 3307-3315.
- Condomines, M., D. Hose, T. Reme, G. Requirand, M. Hundemer, M. Schoenhals, H. Goldschmidt and B. Klein (2009). "Gene expression profiling and real-time PCR analyses identify novel potential cancer-testis antigens in multiple myeloma." *J Immunol* **183**(2): 832-840.
- Costa, F. F., K. Le Blanc and B. Brodin (2007). "Concise review: cancer/testis antigens, stem cells, and cancer." *Stem Cells* **25**(3): 707-711.
- Creach, K. M., R. L. Foote, M. A. Neben-Wittich and R. A. Kyle (2009). "Radiotherapy for extramedullary plasmacytoma of the head and neck." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **73**(3): 789-794.
- Curioni-Fontecedro, A., A. J. Knights, M. Tinguely, N. Nuber, C. Schneider, C. W. Thomson, L. von Boehmer, W. Bossart, S. Pahlich, H. Gehring, H. Moch, C. Renner, A. Knuth and A. Zippelius (2008). "MAGE-C1/CT7 is the dominant cancer-testis antigen targeted by humoral immune responses in patients with multiple myeloma." *Leukemia* **22**(8): 1646-1648.
- Dahl, I. M., T. Rasmussen, G. Kauric and A. Husebekk (2002). "Differential expression of CD56 and CD44 in the evolution of extramedullary myeloma." *Br J Haematol* **116**(2): 273-277.
- Damaj, G., M. Mohty, N. Vey, E. Dincan, R. Bouabdallah, C. Faucher, A. M. Stoppa and J. A. Gastaut (2004). "Features of extramedullary and extraosseous multiple myeloma: a report of 19 patients from a single center." *Eur J Haematol* **73**(6): 402-406.
- Damgaard, T., L. M. Knudsen, I. M. Dahl, P. Gimsing, M. Lodahl and T. Rasmussen (2009). "Regulation of the CD56 promoter and its association with proliferation, anti-apoptosis and clinical factors in multiple myeloma." *Leuk Lymphoma* **50**(2): 236-246.
- Dawson, M. A., S. Patil and A. Spencer (2007). "Extramedullary relapse of multiple myeloma associated with a shift in secretion from intact immunoglobulin to light chains." *Haematologica* **92**(1): 143-144.
- De Plaen, E., K. Arden, C. Traversari, J. J. Gaforio, J. P. Szikora, C. De Smet, F. Brasseur, P. van der Bruggen, B. Lethe, C. Lurquin and et al. (1994). "Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family." *Immunogenetics* **40**(5): 360-369.
- Dewald, G. W., T. Therneau, D. Larson, Y. K. Lee, S. Fink, S. Smoley, S. Paternoster, A. Adeyinka, R. Ketterling, D. L. Van Dyke, R. Fonseca and R. Kyle (2005). "Relationship of patient survival and chromosome anomalies detected in metaphase and/or interphase cells at diagnosis of myeloma." *Blood* **106**(10): 3553-3558.
- Dhodapkar, M. V., M. D. Geller, D. H. Chang, K. Shimizu, S. Fujii, K. M. Dhodapkar and J. Krasovsky (2003). "A reversible defect in natural killer T cell function characterizes the progression of premalignant to malignant multiple myeloma." *J Exp Med* **197**(12): 1667-1676.
- Dhodapkar, M. V., K. Osman, J. Teruya-Feldstein, D. Filippa, C. V. Hedvat, K. Iversen, D. Kolb, M. D. Geller, H. Hassoun, T. Kewalramani, R. L. Comenzo, K. Coplan, Y. T. Chen and A. A. Jungbluth (2003). "Expression of cancer/testis (CT) antigens MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-A4, CT-7, and

NY-ESO-1 in malignant gammopathies is heterogeneous and correlates with site, stage and risk status of disease." Cancer Immun **3**: 9.

Dimopoulos, M. A. and E. Kastritis (2008). "The role of novel drugs in multiple myeloma." Ann Oncol **19 Suppl 7**: vii121-127.

Dimopoulos, M. A., A. Palumbo, K. B. Delasalle and R. Alexanian (1994). "Primary plasma cell leukaemia." Br J Haematol **88**(4): 754-759.

Dinges, H.-P., H. Denk, A. Reiner and F. Würtz, Eds. (2002). Immunhistochemie, ÖGP:Qualitätsstandards in der Pathologie.

Dispenzieri, A. and R. A. Kyle (2005). "Multiple myeloma: clinical features and indications for therapy." Best Pract Res Clin Haematol **18**(4): 553-568.

Dispenzieri, A., S. V. Rajkumar, M. A. Gertz, R. Fonseca, M. Q. Lacy, P. L. Bergsagel, R. A. Kyle, P. R. Greipp, T. E. Witzig, C. B. Reeder, J. A. Lust, S. J. Russell, S. R. Hayman, V. Roy, S. Kumar, S. R. Zeldenrust, R. J. Dalton and A. K. Stewart (2007). "Treatment of newly diagnosed multiple myeloma based on Mayo Stratification of Myeloma and Risk-adapted Therapy (mSMART): consensus statement." Mayo Clin Proc **82**(3): 323-341.

Dores, G. M., O. Landgren, K. A. McGlynn, R. E. Curtis, M. S. Linet and S. S. Devesa (2009). "Plasmacytoma of bone, extramedullary plasmacytoma, and multiple myeloma: incidence and survival in the United States, 1992-2004." Br J Haematol **144**(1): 86-94.

Durie, B. G. and S. E. Salmon (1975). "A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival." Cancer **36**(3): 842-854.

Eleutherakis-Papaiakovou, V., A. Bamias, D. Gika, A. Simeonidis, A. Pouli, A. Anagnostopoulos, E. Michali, T. Economopoulos, K. Zervas and M. A. Dimopoulos (2007). "Renal failure in multiple myeloma: incidence, correlations, and prognostic significance." Leuk Lymphoma **48**(2): 337-341.

Ely, S., M. Di Liberto, R. Niesvizky, L. B. Baughn, H. J. Cho, E. N. Hatada, D. M. Knowles, J. Lane and S. Chen-Kiang (2005). "Mutually exclusive cyclin-dependent kinase 4/cyclin D1 and cyclin-dependent kinase 6/cyclin D2 pairing inactivates retinoblastoma protein and promotes cell cycle dysregulation in multiple myeloma." Cancer Res **65**(24): 11345-11353.

Ely, S. A. and D. M. Knowles (2002). "Expression of CD56/neural cell adhesion molecule correlates with the presence of lytic bone lesions in multiple myeloma and distinguishes myeloma from monoclonal gammopathy of undetermined significance and lymphomas with plasmacytoid differentiation." Am J Pathol **160**(4): 1293-1299.

Fonseca, R., B. Barlogie, R. Bataille, C. Bastard, P. L. Bergsagel, M. Chesi, F. E. Davies, J. Drach, P. R. Greipp, I. R. Kirsch, W. M. Kuehl, J. M. Hernandez, S. Minvielle, L. M. Pilarski, J. D. Shaughnessy, Jr., A. K. Stewart and H. Avet-Loiseau (2004). "Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report." Cancer Res **64**(4): 1546-1558.

Fonseca, R., E. Blood, M. Rue, D. Harrington, M. M. Oken, R. A. Kyle, G. W. Dewald, B. Van Ness, S. A. Van Wier, K. J. Henderson, R. J. Bailey and P. R. Greipp (2003). "Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma." Blood **101**(11): 4569-4575.

Galea, I., I. Bechmann and V. H. Perry (2007). "What is immune privilege (not)?" Trends Immunol **28**(1): 12-18.

Galieni, P., M. Cavo, A. Pulsoni, G. Avvisati, C. Bigazzi, S. Neri, U. Caliceti, M. Benni, S. Ronconi and F. Lauria (2000). "Clinical outcome of extramedullary plasmacytoma." *Haematologica* **85**(1): 47-51.

Gastinne, T., X. Leleu, A. Duhamel, A. S. Moreau, G. Franck, J. Andrieux, J. L. Lai, V. Coiteux, I. Yakoub-Agha, F. Bauters, J. L. Harousseau, M. Zandecki and T. Facon (2007). "Plasma cell growth fraction using Ki-67 antigen expression identifies a subgroup of multiple myeloma patients displaying short survival within the ISS stage I." *Eur J Haematol* **79**(4): 297-304.

Gaugler, B., B. Van den Eynde, P. van der Bruggen, P. Romero, J. J. Gaforio, E. De Plaen, B. Lethe, F. Brasseur and T. Boon (1994). "Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes." *J Exp Med* **179**(3): 921-930.

Ghafouri-Fard, S. and M. H. Modarressi (2009). "Cancer-testis antigens: potential targets for cancer immunotherapy." *Arch Iran Med* **12**(4): 395-404.

Giuliani, N., V. Rizzoli and G. D. Roodman (2006). "Multiple myeloma bone disease: Pathophysiology of osteoblast inhibition." *Blood* **108**(13): 3992-3996.

Gonzalez, D., M. van der Burg, R. Garcia-Sanz, J. A. Fenton, A. W. Langerak, M. Gonzalez, J. J. van Dongen, J. F. San Miguel and G. J. Morgan (2007). "Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma." *Blood* **110**(9): 3112-3121.

Goodyear, O., K. Piper, N. Khan, J. Starczynski, P. Mahendra, G. Pratt and P. Moss (2005). "CD8+ T cells specific for cancer germline gene antigens are found in many patients with multiple myeloma, and their frequency correlates with disease burden." *Blood* **106**(13): 4217-4224.

Goodyear, O. C., G. Pratt, A. McLarnon, M. Cook, K. Piper and P. Moss (2008). "Differential pattern of CD4+ and CD8+ T-cell immunity to MAGE-A1/A2/A3 in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and multiple myeloma." *Blood* **112**(8): 3362-3372.

Grau, E., S. Oltra, F. Martinez, C. Orellana, A. Canete, J. M. Fernandez, M. Hernandez-Marti and V. Castel (2009). "MAGE-A1 expression is associated with good prognosis in neuroblastoma tumors." *J Cancer Res Clin Oncol* **135**(4): 523-531.

Greipp, P. R., J. San Miguel, B. G. Durie, J. J. Crowley, B. Barlogie, J. Blade, M. Boccadoro, J. A. Child, H. Avet-Loiseau, R. A. Kyle, J. J. Lahuerta, H. Ludwig, G. Morgan, R. Powles, K. Shimizu, C. Shustik, P. Sonneveld, P. Tosi, I. Turesson and J. Westin (2005). "International staging system for multiple myeloma." *J Clin Oncol* **23**(15): 3412-3420.

Gure, A. O., E. Stockert, K. C. Arden, A. D. Boyer, C. S. Viars, M. J. Scanlan, L. J. Old and Y. T. Chen (2000). "CT10: a new cancer-testis (CT) antigen homologous to CT7 and the MAGE family, identified by representational-difference analysis." *Int J Cancer* **85**(5): 726-732.

Harousseau, J. L. (2008). "Autologous transplantation for multiple myeloma." *Ann Oncol* **19 Suppl 7**: vii128-133.

Harousseau, J. L., M. Attal, X. Leleu, J. Troncy, B. Pegourie, A. M. Stoppa, C. Hulin, L. Benboubker, J. G. Fuzibet, M. Renaud, P. Moreau and H. Avet-Loiseau (2006). "Bortezomib plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of an IFM phase II study." *Haematologica* **91**(11): 1498-1505.

Harousseau, J. L. and M. Dreyling (2010). "Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up." *Ann Oncol* **21 Suppl 5**: v155-157.

Hofmann, O., O. L. Caballero, B. J. Stevenson, Y. T. Chen, T. Cohen, R. Chua, C. A. Maher, S. Panji, U. Schaefer, A. Kruger, M. Lehtvaslaiho, P. Carninci, Y. Hayashizaki, C. V. Jongeneel, A. J. Simpson,

L. J. Old and W. Hide (2008). "Genome-wide analysis of cancer/testis gene expression." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(51): 20422-20427.

<http://www.abbottmolecular.com/us/products/analyte-specific-reagent/fish/vysis-lsi-igh-dual-color-break-apart-rearrangement-probe.html>. (2010). "Vysis LSI IGH Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe." Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, U.S.A Retrieved 21.6.2010.

<http://www.cta.lncc.br/>. (2005-2009). "CTDatabase." Ludwig Institute for Cancer Research (LICR São Paulo Branch)  
Ludwig Institute for Cancer Research (LICR New York Branch)  
Ludwig Institute for Cancer Research affiliate, Weill-Cornell Medical Center  
Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC), Petrópolis, RJ, Brazil Retrieved 18.11.2009.

International Myeloma Working Group (2003). "Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group." Br J Haematol **121**(5): 749-757.

Jemal, A., R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu and M. J. Thun (2009). "Cancer statistics, 2009." CA Cancer J Clin **59**(4): 225-249.

Jungbluth, A. A., S. Ely, M. DiLiberto, R. Niesvizky, B. Williamson, D. Frosina, Y. T. Chen, N. Bhardwaj, S. Chen-Kiang, L. J. Old and H. J. Cho (2005). "The cancer-testis antigens CT7 (MAGE-C1) and MAGE-A3/6 are commonly expressed in multiple myeloma and correlate with plasma-cell proliferation." Blood **106**(1): 167-174.

Kalejs, M. and J. Erenpreisa (2005). "Cancer/testis antigens and gametogenesis: a review and "brainstorming" session." Cancer Cell Int **5**(1): 4.

Kanojia, D., M. Garg, S. Gupta, A. Gupta and A. Suri (2009). "Sperm-associated antigen 9, a novel biomarker for early detection of breast cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **18**(2): 630-639.

Kim, Y. and D. Jeoung (2009). "The cancer/testis antigen CAGE induces MMP-2 through the activation of NF-kappaB and AP-1." BMB Rep **42**(11): 758-763.

Kojima, M., T. Motoori, Y. Tamaki, T. Igarashi, M. Matsumoto, K. Shimizu, A. Ogawa, H. Itoh, S. Asano, N. Masawa and H. Inagaki (2009). Cyclin D1 protein overexpression in extramedullary plasmacytoma: a clinicopathologic study of 11 cases. J Clin Exp Hematop. Japan. **49**: 53-56.

Kremer, M., G. Ott, M. Nathrath, K. Specht, K. Stecker, C. Alexiou, L. Quintanilla-Martinez and F. Fend (2005). "Primary extramedullary plasmacytoma and multiple myeloma: phenotypic differences revealed by immunohistochemical analysis." J Pathol **205**(1): 92-101.

Kruit, W., S. Suciú, B. Dreno, V. Chiarion-Sileni, L. Mortier, C. Robert, M. Maio, V. Brichard, F. Lehmann and U. Keilholz (2008). "Immunization with recombinant MAGE-A3 protein combined with adjuvant systems AS15 or AS02B in patients with unresectable and progressive metastatic cutaneous melanoma: a randomized open-label phase II study of the EORTC Melanoma Group." J Clin Oncol **26**: May 20 suppl, No. 15S, abstr 9065.

Kyle, R. A. (1983). "Long-term survival in multiple myeloma." N Engl J Med **308**(6): 314-316.

Kyle, R. A., B. G. Durie, S. V. Rajkumar, O. Landgren, J. Blade, G. Merlini, N. Kroger, H. Einsele, D. H. Vesole, M. Dimopoulos, J. San Miguel, H. Avet-Loiseau, R. Hajek, W. M. Chen, K. C. Anderson, H. Ludwig, P. Sonneveld, S. Pavlovsky, A. Palumbo, P. G. Richardson, B. Barlogie, P. Greipp, R. Vescio, I. Turesson, J. Westin and M. Boccadoro (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): 1121-1127.
- Kyle, R. A. and S. V. Rajkumar (2004). "Multiple myeloma." N Engl J Med **351**(18): 1860-1873.
- Kyle, R. A. and S. V. Rajkumar (2006). "Monoclonal gammopathy of undetermined significance." Br J Haematol **134**(6): 573-589.
- Kyle, R. A. and S. V. Rajkumar (2007). "Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smouldering multiple myeloma: emphasis on risk factors for progression." Br J Haematol **139**(5): 730-743.
- Kyle, R. A. and S. V. Rajkumar (2008). "Multiple myeloma." Blood **111**(6): 2962-2972.
- Kyle, R. A. and S. V. Rajkumar (2009). "Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma." Leukemia **23**(1): 3-9.
- Kyle, R. A. and S. V. Rajkumar (2009). "Treatment of multiple myeloma: a comprehensive review." Clin Lymphoma Myeloma **9**(4): 278-288.
- Kyle, R. A., T. M. Therneau, S. V. Rajkumar, D. R. Larson, M. F. Plevak, J. R. Offord, A. Dispenzieri, J. A. Katzmann and L. J. Melton, 3rd (2006). "Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance." N Engl J Med **354**(13): 1362-1369.
- Kyle, R. A., T. M. Therneau, S. V. Rajkumar, J. R. Offord, D. R. Larson, M. F. Plevak and L. J. Melton, 3rd (2002). "A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance." N Engl J Med **346**(8): 564-569.
- Laduron, S., R. Deplus, S. Zhou, O. Kholmanskikh, D. Godelaine, C. De Smet, S. D. Hayward, F. Fuks, T. Boon and E. De Plaen (2004). "MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription." Nucleic Acids Res **32**(14): 4340-4350.
- Landgren, O., G. Gridley, I. Turesson, N. E. Caporaso, L. R. Goldin, D. Baris, T. R. Fears, R. N. Hoover and M. S. Linet (2006). "Risk of monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and subsequent multiple myeloma among African American and white veterans in the United States." Blood **107**(3): 904-906.
- Landgren, O., R. A. Kyle and S. V. Rajkumar (2011). From myeloma precursor disease to multiple myeloma: new diagnostic concepts and opportunities for early intervention. Clin Cancer Res. United States. **17**: 1243-1252.
- Laura, R., M. T. Cibeira, C. Uriburu, S. Yantorno, O. Salamero, J. Blade and E. Montserrat (2006). "Bortezomib: an effective agent in extramedullary disease in multiple myeloma." Eur J Haematol **76**(5): 405-408.
- Lendvai, N., S. Gnjatic, E. Ritter, M. Mangone, W. Austin, K. Reyner, D. Jayabalan, R. Niesvizky, S. Jagannath, N. Bhardwaj, S. Chen-Kiang, L. J. Old and H. J. Cho (2010). "Cellular immune responses against CT7 (MAGE-C1) and humoral responses against other cancer-testis antigens in multiple myeloma patients." Cancer Immun **10**: 4.
- Li, M., Y. H. Yuan, Y. Han, Y. X. Liu, L. Yan, Y. Wang and J. Gu (2005). "Expression profile of cancer-testis genes in 121 human colorectal cancer tissue and adjacent normal tissue." Clin Cancer Res **11**(5): 1809-1814.
- Ludwig, H., B. G. Durie, V. Bolejack, I. Turesson, R. A. Kyle, J. Blade, R. Fonseca, M. Dimopoulos, K. Shimizu, J. San Miguel, J. Westin, J. L. Harousseau, M. Beksac, M. Boccadoro, A. Palumbo, B. Barlogie, C. Shustik, M. Cavo, P. R. Greipp, D. Joshua, M. Attal, P. Sonneveld and J. Crowley (2008).

- "Myeloma in patients younger than age 50 years presents with more favorable features and shows better survival: an analysis of 10 549 patients from the International Myeloma Working Group." Blood **111**(8): 4039-4047.
- Luh, S. P., Y. S. Lai, C. H. Tsai and T. C. Tsao (2007). "Extramedullary plasmacytoma (EMP): Report of a case manifested as a mediastinal mass and multiple pulmonary nodules and review of literature." World J Surg Oncol **5**: 123.
- Markou, K., I. Karasmanis, J. K. Goudakos, M. Papaioannou, A. Psifidis and V. Vital (2009). "Extramedullary plasmacytoma of temporal bone: report of 2 cases and review of literature." Am J Otolaryngol **30**(5): 360-365.
- Meklat, F., Z. Li, Z. Wang, Y. Zhang, J. Zhang, A. Jewell and S. H. Lim (2007). "Cancer-testis antigens in haematological malignancies." Br J Haematol **136**(6): 769-776.
- Mielcarek, M. and R. Storb (2003). "Non-myeloablative hematopoietic cell transplantation as immunotherapy for hematologic malignancies." Cancer Treat Rev **29**(4): 283-290.
- Munshi, N. C. (2008). "Plasma cell disorders: an historical perspective." Hematology Am Soc Hematol Educ Program: 297.
- Nakamura, Y., Y. Noguchi, E. Satoh, A. Uenaka, S. Sato, T. Kitazaki, T. Kanda, H. Soda, E. Nakayama and S. Kohno (2009). "Spontaneous remission of a non-small cell lung cancer possibly caused by anti-NY-ESO-1 immunity." Lung Cancer **65**(1): 119-122.
- National Comprehensive Cancer Network (2010). "Multiple Myeloma." Clinical Practice Guidelines in Oncology **V.3.2010**.
- Nau, K. C. and W. D. Lewis (2008). "Multiple myeloma: diagnosis and treatment." Am Fam Physician **78**(7): 853-859.
- Ng, A. P., A. Wei, D. Bhurani, P. Chapple, F. Feleppa and S. Juneja (2006). "The sensitivity of CD138 immunostaining of bone marrow trephine specimens for quantifying marrow involvement in MGUS and myeloma, including samples with a low percentage of plasma cells." Haematologica **91**(7): 972-975.
- Ngo, N. T., C. Brodie, C. Giles, D. Horncastle, M. Klammer, I. A. Lampert, A. Rahemtulla and K. N. Naresh (2009). "The significance of tumour cell immunophenotype in myeloma and its impact on clinical outcome." J Clin Pathol **62**(11): 1009-1015.
- Oba-Shinjo, S. M., O. L. Caballero, A. A. Jungbluth, S. Rosemberg, L. J. Old, A. J. Simpson and S. K. Marie (2008). "Cancer-testis (CT) antigen expression in medulloblastoma." Cancer Immun **8**: 7.
- Old, L. J. (2001). "Cancer/testis (CT) antigens - a new link between gametogenesis and cancer." Cancer Immun **1**: 1.
- Old, L. J. (2008). "Cancer vaccines: an overview." Cancer Immun **8 Suppl 1**: 1.
- Pabst, C., J. Zustin, F. Jacobsen, T. Luetkens, N. Kroger, G. Schilling, C. Bokemeyer, G. Sauter, D. Atanackovic and A. Marx (2010). "Expression and prognostic relevance of MAGE-C1/CT7 and MAGE-C2/CT10 in osteolytic lesions of patients with multiple myeloma." Exp Mol Pathol **89**(2): 175-181.
- Pellat-Deceunynck, C., S. Barille, G. Jego, D. Puthier, N. Robillard, D. Pineau, M. J. Rapp, J. L. Harousseau, M. Amiot and R. Bataille (1998). "The absence of CD56 (NCAM) on malignant plasma cells is a hallmark of plasma cell leukemia and of a special subset of multiple myeloma." Leukemia **12**(12): 1977-1982.

- Raab, M. S., K. Podar, I. Breitkreutz, P. G. Richardson and K. C. Anderson (2009). "Multiple myeloma." Lancet **374**(9686): 324-339.
- Raanani, P., O. Shpilberg and I. Ben-Bassat (2007). "Extramedullary disease and targeted therapies for hematological malignancies--is the association real?" Ann Oncol **18**(1): 7-12.
- Rajkumar, S. V. (2009). "Multiple myeloma." Curr Probl Cancer **33**(1): 7-64.
- Rajkumar, S. V. (2009). "Prevention of progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance." Clin Cancer Res **15**(18): 5606-5608.
- Rajkumar, S. V., A. Dispenzieri and R. A. Kyle (2006). "Monoclonal gammopathy of undetermined significance, Waldenstrom macroglobulinemia, AL amyloidosis, and related plasma cell disorders: diagnosis and treatment." Mayo Clin Proc **81**(5): 693-703.
- Rajkumar, S. V. and R. A. Kyle (2005). "Multiple myeloma: diagnosis and treatment." Mayo Clin Proc **80**(10): 1371-1382.
- Rajkumar, S. V., R. A. Kyle, T. M. Therneau, L. J. Melton, 3rd, A. R. Bradwell, R. J. Clark, D. R. Larson, M. F. Plevak, A. Dispenzieri and J. A. Katzmann (2005). "Serum free light chain ratio is an independent risk factor for progression in monoclonal gammopathy of undetermined significance." Blood **106**(3): 812-817.
- Rajkumar, S. V., M. Q. Lacy and R. A. Kyle (2007). "Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma." Blood Rev **21**(5): 255-265.
- Rautenstrauß, B. and T. Liehr, Eds. (2002). FISH Technology. Berlin Heidelberg, 1-19, Springer.
- Rosinol, L., M. T. Cibeira, J. Blade, J. Esteve, M. Aymerich, M. Rozman, M. Segarra, M. C. Cid, X. Filella and E. Montserrat (2004). "Extramedullary multiple myeloma escapes the effect of thalidomide." Haematologica **89**(7): 832-836.
- Ross, M. T., D. V. Grafham, A. J. Coffey, S. Scherer, K. McLay, D. Muzny, M. Platzer, G. R. Howell, C. Burrows, C. P. Bird, A. Frankish, F. L. Lovell, K. L. Howe, J. L. Ashurst, R. S. Fulton, R. Sudbrak, G. Wen, M. C. Jones, M. E. Hurles, T. D. Andrews, C. E. Scott, S. Searle, J. Ramser, A. Whittaker, R. Deadman, N. P. Carter, S. E. Hunt, R. Chen, A. Cree, P. Gunaratne, P. Havlak, A. Hodgson, M. L. Metzker, S. Richards, G. Scott, D. Steffen, E. Sodergren, D. A. Wheeler, K. C. Worley, R. Ainscough, K. D. Ambrose, M. A. Ansari-Lari, S. Aradhya, R. I. Ashwell, A. K. Babbage, C. L. Bagguley, A. Ballabio, R. Banerjee, G. E. Barker, K. F. Barlow, I. P. Barrett, K. N. Bates, D. M. Beare, H. Beasley, O. Beasley, A. Beck, G. Bethel, K. Blechschmidt, N. Brady, S. Bray-Allen, A. M. Bridgeman, A. J. Brown, M. J. Brown, D. Bonnin, E. A. Bruford, C. Buhay, P. Burch, D. Burford, J. Burgess, W. Burrill, J. Burton, J. M. Bye, C. Carder, L. Carrel, J. Chako, J. C. Chapman, D. Chavez, E. Chen, G. Chen, Y. Chen, Z. Chen, C. Chinault, A. Ciccodicola, S. Y. Clark, G. Clarke, C. M. Clee, S. Clegg, K. Clerc-Blankenburg, K. Clifford, V. Copley, C. G. Cole, J. S. Conquer, N. Corby, R. E. Connor, R. David, J. Davies, C. Davis, J. Davis, O. Delgado, D. Deshazo, P. Dhami, Y. Ding, H. Dinh, S. Dodsworth, H. Draper, S. Dugan-Rocha, A. Dunham, M. Dunn, K. J. Durbin, I. Dutta, T. Eades, M. Ellwood, A. Emery-Cohen, H. Errington, K. L. Evans, L. Faulkner, F. Francis, J. Frankland, A. E. Fraser, P. Galgoczy, J. Gilbert, R. Gill, G. Glockner, S. G. Gregory, S. Gribble, C. Griffiths, R. Grocock, Y. Gu, R. Gwilliam, C. Hamilton, E. A. Hart, A. Hawes, P. D. Heath, K. Heitmann, S. Hennig, J. Hernandez, B. Hinzmann, S. Ho, M. Hoffs, P. J. Howden, E. J. Huckle, J. Hume, P. J. Hunt, A. R. Hunt, J. Isherwood, L. Jacob, D. Johnson, S. Jones, P. J. de Jong, S. S. Joseph, S. Keenan, S. Kelly, J. K. Kershaw, Z. Khan, P. Kioschis, S. Klages, A. J. Knights, A. Kosiura, C. Kovar-Smith, G. K. Laird, C. Langford, S. Lawlor, M. Leversha, L. Lewis, W. Liu, C. Lloyd, D. M. Lloyd, H. Loulseged, J. E. Loveland, J. D. Lovell, R. Lozado, J. Lu, R. Lyne, J. Ma, M. Maheshwari, L. H. Matthews, J. McDowall, S. McLaren, A. McMurray, P. Meidl, T. Meitinger, S. Milne, G. Miner, S. L. Mistry, M. Morgan, S. Morris, I. Muller, J. C. Mullikin, N. Nguyen, G. Nordsiek, G. Nyakatura, C. N.

O'Dell, G. Okwuonu, S. Palmer, R. Pandian, D. Parker, J. Parrish, S. Pasternak, D. Patel, A. V. Pearce, D. M. Pearson, S. E. Pelan, L. Perez, K. M. Porter, Y. Ramsey, K. Reichwald, S. Rhodes, K. A. Ridler, D. Schlessinger, M. G. Schueler, H. K. Sehra, C. Shaw-Smith, H. Shen, E. M. Sheridan, R. Shownkeen, C. D. Skuce, M. L. Smith, E. C. Sotheran, H. E. Steingruber, C. A. Steward, R. Storey, R. M. Swann, D. Swarbreck, P. E. Tabor, S. Taudien, T. Taylor, B. Teague, K. Thomas, A. Thorpe, K. Timms, A. Tracey, S. Trevanion, A. C. Tromans, M. d'Urso, D. Verduzco, D. Villasana, L. Waldron, M. Wall, Q. Wang, J. Warren, G. L. Warry, X. Wei, A. West, S. L. Whitehead, M. N. Whiteley, J. E. Wilkinson, D. L. Willey, G. Williams, L. Williams, A. Williamson, H. Williamson, L. Wilming, R. L. Woodmansey, P. W. Wray, J. Yen, J. Zhang, J. Zhou, H. Zoghbi, S. Zorilla, D. Buck, R. Reinhardt, A. Poustka, A. Rosenthal, H. Lehrach, A. Meindl, P. J. Minx, L. W. Hillier, H. F. Willard, R. K. Wilson, R. H. Waterston, C. M. Rice, M. Vaudin, A. Coulson, D. L. Nelson, G. Weinstock, J. E. Sulston, R. Durbin, T. Hubbard, R. A. Gibbs, S. Beck, J. Rogers and D. R. Bentley (2005). "The DNA sequence of the human X chromosome." *Nature* **434**(7031): 325-337.

Sahara, N. and A. Takeshita (2004). "Prognostic significance of surface markers expressed in multiple myeloma: CD56 and other antigens." *Leuk Lymphoma* **45**(1): 61-65.

Sahara, N., A. Takeshita, K. Shigeno, S. Fujisawa, K. Takeshita, K. Naito, M. Ihara, T. Ono, S. Tamashima, K. Nara, K. Ohnishi and R. Ohno (2002). "Clinicopathological and prognostic characteristics of CD56-negative multiple myeloma." *Br J Haematol* **117**(4): 882-885.

San Miguel, J. F., R. Schlag, N. K. Khuageva, M. A. Dimopoulos, O. Shpilberg, M. Kropff, I. Spicka, M. T. Petrucci, A. Palumbo, O. S. Samoilova, A. Dmoszynska, K. M. Abdulkadyrov, R. Schots, B. Jiang, M. V. Mateos, K. C. Anderson, D. L. Esseltine, K. Liu, A. Cakana, H. van de Velde and P. G. Richardson (2008). "Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma." *N Engl J Med* **359**(9): 906-917.

Satie, A. P., E. Rajpert-De Meyts, G. C. Spagnoli, S. Henno, L. Olivo, G. K. Jacobsen, N. Rioux-Leclercq, B. Jegou and M. Samson (2002). "The cancer-testis gene, NY-ESO-1, is expressed in normal fetal and adult testes and in spermatocytic seminomas and testicular carcinoma in situ." *Lab Invest* **82**(6): 775-780.

Scanlan, M. J., A. J. Simpson and L. J. Old (2004). "The cancer/testis genes: review, standardization, and commentary." *Cancer Immun* **4**: 1.

Schetelig, J., A. Kiani, M. Schmitz, G. Ehninger and M. Bornhauser (2005). "T cell-mediated graft-versus-leukemia reactions after allogeneic stem cell transplantation." *Cancer Immunol Immunother* **54**(11): 1043-1058.

Scholzen, T. and J. Gerdes (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." *J Cell Physiol* **182**(3): 311-322.

Schwartz, R. N. and M. Vozniak (2008). "Current and emerging treatments for multiple myeloma." *J Manag Care Pharm* **14**(7 Suppl): 12-19.

Simpson, A. J., O. L. Caballero, A. Jungbluth, Y. T. Chen and L. J. Old (2005). "Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer." *Nat Rev Cancer* **5**(8): 615-625.

Sirohi, B. and R. Powles (2004). "Multiple myeloma." *Lancet* **363**(9412): 875-887.

Slotta-Huspenina, J., I. Koch, M. Richter, K. Bink, M. Kremer, K. Specht, J. Krugmann, L. Quintanilla-Martinez and F. Fend (2008). "Cyclin D1 positive multiple myeloma: predominance of the short, 3'UTR-deficient transcript is associated with high cyclin D1 mRNA levels in cases with t(11;14) translocation, but does not correlate with proliferation rate or genomic deletions." *Leuk Res* **32**(1): 79-88.

- Specht, K., E. Haralambieva, K. Bink, M. Kremer, S. Mandl-Weber, I. Koch, R. Tomer, H. Hofler, E. Schuurin, P. M. Kluin, F. Fend and L. Quintanilla-Martinez (2004). "Different mechanisms of cyclin D1 overexpression in multiple myeloma revealed by fluorescence in situ hybridization and quantitative analysis of mRNA levels." Blood **104**(4): 1120-1126.
- Straetmans, J. and R. Stokroos (2008). "Extramedullary plasmacytomas in the head and neck region." Eur Arch Otorhinolaryngol **265**(11): 1417-1423.
- Suri, A. (2006). "Cancer testis antigens--their importance in immunotherapy and in the early detection of cancer." Expert Opin Biol Ther **6**(4): 379-389.
- Swerdlow, S. H., E. Campo, N. Lee Harris, E. S. Jaffe, S. A. Pileri, H. Stein, J. Thiele and J. W. Vardiman, Eds. (2008). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, 200-209; 229-232, WHO OMS.
- Tarte, K., J. De Vos, T. Thykjaer, F. Zhan, G. Fiol, V. Costes, T. Reme, E. Legouffe, J. F. Rossi, J. Shaughnessy, Jr., T. F. Orntoft and B. Klein (2002). "Generation of polyclonal plasmablasts from peripheral blood B cells: a normal counterpart of malignant plasmablasts." Blood **100**(4): 1113-1122.
- Tinguely, M., B. Jenni, A. Knights, B. Lopes, D. Korol, V. Rousson, A. Curioni Fontecedro, S. B. Cogliatti, A. G. Bittermann, U. Schmid, C. Dommann-Scherrer, R. Maurer, C. Renner, N. M. Probst-Hensch, H. Moch, A. Knuth and A. Zippelius (2008). "MAGE-C1/CT-7 expression in plasma cell myeloma: sub-cellular localization impacts on clinical outcome." Cancer Sci **99**(4): 720-725.
- van Baren, N., F. Brasseur, D. Godelaine, G. Hames, A. Ferrant, F. Lehmann, M. Andre, C. Ravoet, C. Doyen, G. C. Spagnoli, M. Bakkus, K. Thielemans and T. Boon (1999). "Genes encoding tumor-specific antigens are expressed in human myeloma cells." Blood **94**(4): 1156-1164.
- van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth and T. Boon (1991). "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma." Science **254**(5038): 1643-1647.
- van Rhee, F., S. M. Szmania, F. Zhan, S. K. Gupta, M. Pomtree, P. Lin, R. B. Batchu, A. Moreno, G. Spagnoli, J. Shaughnessy and G. Tricot (2005). "NY-ESO-1 is highly expressed in poor-prognosis multiple myeloma and induces spontaneous humoral and cellular immune responses." Blood **105**(10): 3939-3944.
- Vansteenkiste, J., M. Zielinski, A. Linder, J. Dahabre, E. Esteban, W. Malinowski, J. Jassem, B. Passlick, F. Lehmann and V. Brichard (2007). "Final results of a multi-center, double-blind, randomized, placebocontrolled Phase II study to assess the efficiency of MAGE-A3 immunotherapeutic as adjuvat therapy in stage IB/II NSCLC." J Clin Oncol **25**(7554): June 20 suppl, No. 18S, abstr 7554.
- Wischniewski, F., K. Pantel and H. Schwarzenbach (2006). "Promoter demethylation and histone acetylation mediate gene expression of MAGE-A1, -A2, -A3, and -A12 in human cancer cells." Mol Cancer Res **4**(5): 339-349.
- Xu, Y., Y. Zhao, H. Huang, G. Chen, X. Wu, Y. Wang, W. Chang, Z. Zhu, Y. Feng and D. Wu (2010). Expression and function of toll-like receptors in multiple myeloma patients: toll-like receptor ligands promote multiple myeloma cell growth and survival via activation of nuclear factor-kappaB. Br J Haematol. England. **150**: 543-553.
- Yang, B., S. M. O'Herrin, J. Wu, S. Reagan-Shaw, Y. Ma, K. M. Bhat, C. Gravekamp, V. Setaluri, N. Peters, F. M. Hoffmann, H. Peng, A. V. Ivanov, A. J. Simpson and B. J. Longley (2007). "MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines." Cancer Res **67**(20): 9954-9962.

---

Zhang, Y., Z. Wang, J. Zhang and S. H. Lim (2009). Core promoter sequence of SEMG I spans between the two putative GATA-1 binding domains and is responsive to IL-4 and IL-6 in myeloma cells. Leuk Res. England. **33**: 166-169.

Zhuang, R., Y. Zhu, L. Fang, X. S. Liu, Y. Tian, L. H. Chen, W. M. Ouyang, X. G. Xu, J. L. Jian, A. O. Gure, S. Fortunato, G. Ritter, L. J. Old, A. J. Simpson, Y. T. Chen, B. Jin and A. A. Jungbluth (2006). "Generation of monoclonal antibodies to cancer/testis (CT) antigen CT10/MAGE-C2." Cancer Immun **6**: 7.

## 8. Anhang

### 8.1 Immunhistochemie

#### Puffer

##### *TBS-Puffer*

Stammlösung: 60,5g Tris-Base werden in 700ml Aqua dest. gelöst, mit 2 N HCL (Salzsäure) einen pH von 7,6 einstellen und mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen. Darin 90 g NaCl lösen und in Flaschen abfüllen. Bei Raumtemperatur lagern.

Arbeitslösung: Zu 100 ml der Stammlösung 900 ml Aqua dest. geben

##### *Citrat-Puffer*

2,1 g Citronensäuremonohydrat in 1000 ml Aqua dest. lösen und mit 2 N Natronlauge einen pH von 6,0 einstellen. Aufbewahrung im Kühlschrank.

##### *EDTA-Puffer*

1,116 g EDTA in 2,5 l Aqua dest. lösen und mit 1 N Natronlauge einen pH von 8,0 einstellen. Anschließend Aqua dest. hinzufügen um insgesamt eine Lösung von 3 Litern zu erreichen. Aufbewahrung im Kühlschrank.

#### Chromogen Ansatz ChemMate DAB (K5001 und K5007)

Tabelle 18: DAB-Chromogen-Verdünnungsschema					
Endvolumen	0,1 ml	0,2 ml	1 ml	2 ml	5 ml
HRP-Substratpuffer	100 µl	200 µl	1 ml	2 ml	5 ml
DAB-Diaminobenzidinlösung	2 µl	4 µl	20 µl	40 µl	100 µl

Tab. 18: DAB-Chromogen-Verdünnungsschema

### 8.2 FISH: Puffer und Lösungen

##### *Phosphat-Puffer*

157g von NaCl (1,35 M)

4,5g von KCl (Kaliumchlorid) (30 mM)

28,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot (\text{x}2\text{H}_2\text{O})$ , um die Molarität zu wahren) (80 mM)

4g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (15 mM)

Anschließend einen pH von 7,0 mit Kaliumhydroxidlösung (KOH) einstellen und vor Gebrauch im Verhältnis 1:10 mit Aqua dest. verdünnen.

#### *Citrat-Puffer*

Lösung A: 0,1 M Citronensäure (= 21,01g  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{xH}_2\text{O}$  in 1000 ml Aqua dest.)

Lösung B: 0,1 M Natrium-Citrat (= 29,41g  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot \text{xH}_2\text{O}$  in 1000 ml Aqua dest.)

Für den Puffer 18 ml der Lösung A und 82 ml der Lösung B zusammengeben und mit Aqua dest auf 1000 ml auffüllen (pH 6,0).

#### *Standard-Saline-Citratlösung (SCC)*

3 M NaCl/ 0,3 M Natrium-Citrat auf 250 ml mit  $\text{H}_2\text{O}$  auffüllen und einen pH von 5,3 mit Hilfe von konzentrierter HCl (Salzsäure) einstellen.

Vor Gebrauch ein Verhältnis 1:20 einstellen unter Gebrauch von Aqua dest.

#### *Hoechst-Gebrauchslösung*

Stammlösung: 1mg Hoechst-Gebrauchslösung 33342 pro ml Aqua dest.

Gebrauchslösung: Endkonzentration von 375  $\mu\text{l}$  Stammlösung/50 ml Phosphatpuffer herstellen.

Lagerung bei 4°C, da lichtempfindlich.

### 8.3 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Darstellung des Tissue-Microarrayers (TMA).....	27
<b>Abb. 2:</b> Darstellung der IgH-Sonde .....	35
<b>Abb. 3:</b> Aufnahme von Zellkernen nach einer FISH-Untersuchung.....	35
<b>Abb. 4:</b> Überlebenskurven .....	41
<b>Abb. 5:</b> Immunhistochemie mit MAGE-A1 .....	42
<b>Abb. 6:</b> Immunhistochemie mit MAGE-A3/6 .....	43
<b>Abb. 7:</b> Immunhistochemie mit MAGE-C1.....	43
<b>Abb. 8:</b> Positivkontrollen MAGE-C1 und MAGE-C2.....	43
<b>Abb. 9:</b> Immunhistochemie mit MAGE-C2.....	44
<b>Abb. 10:</b> Immunhistochemie mit NY-ESO-1 .....	44
<b>Abb. 11:</b> CT-A-Expression MM/EMM vs. EMP.....	47
<b>Abb. 12:</b> Darstellung der Koexpression von CT-A.....	50
<b>Abb. 13:</b> Vergleich der CT-A-Expression und des IgH-Bruchs bei den EMP-Patienten .....	54
<b>Abb. 14:</b> Überlebenskurven MAGE-A1 und MAGE-A3/6 .....	56
<b>Abb. 15:</b> Überlebenskurven MAGE-C1 und MAGE-C2.....	56
<b>Abb. 16:</b> Überlebenskurve NY-ESO-1 .....	57
<b>Abb. 17:</b> Rezidivkurven MAGE-A1 und MAGE-A3/6 .....	58
<b>Abb. 18:</b> Rezidivkurven MAGE-C1 und MAGE-C2.....	58

**8.4 Tabellenverzeichnis**

<b>Tab. 1:</b> Definitionen der MGUS und des MM	2
<b>Tab. 2:</b> Risikofaktoren für Progression von MGUS zu MM	3
<b>Tab. 3:</b> Klassifizierungssysteme Multiples Myelom	6
<b>Tab. 4:</b> Prognosefaktoren beim Multiplen Myelom	7
<b>Tab. 5:</b> Darstellung der untersuchten CT-A	17
<b>Tab. 6:</b> Antikörper zur Charakterisierung des MM	28
<b>Tab. 7:</b> Cancer-Testis-Antigen-Antikörper	29
<b>Tab. 8:</b> Patientenauswahl	37
<b>Tab. 9:</b> Klinische Patientendaten	39
<b>Tab. 10:</b> Klinischer Verlauf	40
<b>Tab. 11:</b> Verteilung der CT-A-Expression:	45
<b>Tab. 12:</b> CT-A-Expression MM/EMM versus EMP	47
<b>Tab. 13:</b> Übersicht über die Koexpression von Cancer-Testis-Antigenen	50
<b>Tab. 14:</b> Darstellung der koexprimierten CT-A (EMM/MM vs. EMP)	51
<b>Tab. 15:</b> Darstellung der Expression der Prognosemarker	52
<b>Tab. 16:</b> Korrelation zwischen Prognosemarkern und einzelnen CT-A	53
<b>Tab. 17:</b> Krankheitsbedingtes Versterben (DWD) in Abhängigkeit der Höhe der CT-A-Expression	55
<b>Tab. 18:</b> DAB-Chromogen-Verdünnungsschema	93

## 8.5 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
CT-A	Cancer-Testis-Antigen(e)
CTX	Chemotherapie
DAB	Diaminobenzidin
DWD	Dead With Disease (krankheitsbedingtes Versterben)
EBV.	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMP	Extramedulläres Plasmozytom
EMM	Extramedulläres Myelom
FISH	Floureszenz in situ Hybridisierung
FLC	Free Light Chain
Hb	Hämoglobin
HCL	Salzsäure
HE	Hämatoxylin/Eosin Färbung
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HRP	Horseradish Peroxidase
Ig	Immunglobulin
IgH	Immunglobulin Heavy Chain (Schwere Kette)
IHC	Immunhistochemie
ISS	Internationales Staging System
KCL	Kaliumchlorid
KM	Knochenmark
LK	Lymphknoten
L-Kette	Leichte Kette
LP	Lymphoplasmozytisch
LSAB	Labeled-Streptavidin-Biotin
MAGE	Melanoma associated Antigen(s)
MALT	Mucosa Associated Lymphatic Tissue
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MM	Multiples Myelom
M-Protein	Monoklonales Protein
OP	Operation
PAS	Periodesäure-Schiff Färbung
RTX	Radiotherapie
SZTX	Stammzelltransplantation

---

Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
TMA	Tissue-Micro-Array
UAD	UpperAerodigestive Tract

## 9. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei all denjenigen bedanken, die es mir ermöglicht haben diese Dissertation anzufertigen und zu vollenden.

Zu allererst danke ich Herrn Prof Dr. Falko Fend für die Überlassung des Themas.

Auch möchte ich besonders Herrn PD. Dr. Marcus Kremer für die intensive fachliche Betreuung nach Prof. Dr. Fends Weggang von der TU München danken, und für die Hilfe bei der immunhistochemischen Auswertung. Danke für die Ratschläge und all die Zeit, die in dieser Arbeit steckt!

Herrn Dr. Tibor Schuster danke ich für die kompetente statistische Beratung.

Frau Birgit Geist und Frau Klara Fiszi danke ich für die Einführung in die Labortechniken und die Hilfe im Labor. Dabei danke ich auch für die nette und sympathische Atmosphäre. Stets bin ich mit offenen Armen empfangen worden.

Frau Ulrike Buchholz danke ich für die großartige Hilfsbereitschaft bezüglich der FISH-Methode.

Einen ganz lieben Dank an meinen Freund Dr. Dominik Faber. Vielen Dank, dass du für mich da bist und mir die Zeit gegeben hast, die Arbeit zu vollenden.

Zu guter Letzt möchte ich mich von ganzem Herzen und ganz besonders bei meiner Familie, meinen Eltern und meiner Schwester Kristina bedanken. Ihr unterstützt mich zu jederzeit und habt es mir überhaupt erst ermöglicht eine Doktorarbeit zu verfassen.

## 10. Lebenslauf

### PERSONALIEN

Name: Teresa Roos  
Geburtsdatum/-ort: 21.05.1984 in Starnberg  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

### BERUFLICHER WERDEGANG

seit 01/2011 Assistenzärztin der Neuroradiologie,  
Klinikum rechts der Isar, München

### AUSBILDUNG

10/2003-06/2010 Studium der Humanmedizin,  
Technische Universität München  
06/2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,5)  
08/2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 2,5)  
2003 Allgemeine Hochschulreife (Note:1,8)  
1990-2003 Grundschule Seefeld,  
Max-Born-Gymnasium, Germering  
2000-2001 Austauschjahr an der Farmington Highschool, Missouri, USA

### PRAKTISCHES JAHR

10/2009-01/2010 Wahltertial Neurologie,  
Klinikum rechts der Isar, München  
08/2009-10/2009 Chirurgie,  
Royal North Shore Hospital, Sydney, Australien  
06/2009-08/2009 Chirurgie,  
Hôpital St. Roch, Universität Nizza, Frankreich  
02/2009-06/2009 Innere Medizin,  
Stadtspital Triemli, Zürich, Schweiz

### SPRACHEN

Deutsch (Muttersprache), großes Latinum, Englisch und Französisch fließend