Universitätsklinikum Ulm

Zentrum für Innere Medizin

Klinik für Innere Medizin III

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. H. Döhner

---

mRNA-Expressionsanalyse von Leukämie-assoziierten Antigenen bei der Chronisch myeloischen Leukämie

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von Christian Brunner geboren in Augsburg

2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr.Jochen Greiner

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Jan Torzewski

Tag der Promotion: 29.Mai 2008

FÜR MELANIE

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis I
Abkürzungsverzeichnis III
1 Einleitung 1
1.1 Chronisch myeloische Leukämie (CML) 1
1.2 Medikamentöse Therapie 4
1.2.1 Therapie mit Tyrosinkinasehemmern 4
1.2.2 Interferon α (IFN) 5
1.2.3 Hydroxyurea (HU) 6
1.2.4 Busulfan 6
1.2.5 Fazit der medikamentösen Therapie 6
1.3 Stammzelltransplantation (SZT) 7
1.3.1 Allogene Stammzelltransplantation (Allogene SZT) 7
1.3.2 Autologe Stammzelltransplantation (Autologe SZT) 7
1.4 Immuntherapien bei der CML 7
1.5 Tumor- und Leukämie-assoziierte Antigene (TAA/LAA) 8
1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit 10
2 Materialien und Methoden 11
2.1 Materialien 11
2.1.1 Allgemein verwendete Materialien 11
2.1.2 Plastikwaren 12
2.1.3 Chemikalien 12
2.1.4 Zellkulturen 13
2.1.4.1 Die CML-Zelllinie K562 13
2.1.4.2 Die AML-Zelllinie HL60 14
2.1.4.3 Die Nierenkarzinom-Zelllinie CAKI-1 15
2.1.5 Materialien für die cDNA-Präparation 16
2.1.6 Materialien für die RT-PCR 16
2.1.7 Materialien für die immunomagnetische Separation 17
2.1.8 Materialien für die Immunphänotypisierung von CD34 positiven Zellen 18
2.2 Methoden 19
2.2.1 Zellproben 19
2.2.2 Statistik 19
2.2.3 Einwilligungserklärung 22

2.2.4 Präparation von cDNA 22
2.2.4.1 Separation der mRNA 22
2.2.4.2 Transkription der mRNA in cDNA 23
2.2.5 RT-PCR 24
2.2.5.1 Vorbereitung der cDNA-Proben 24
2.2.5.2 Durchführung der RT-PCR 24
2.2.5.3 RT-PCR für verschiedene TAA/LAA und die Haushaltsgene β-Actin und TBP 25
2.2.5.4 Gelelektrophorese 32
2.2.6 Real-time RT-PCR für BCR-ABL und ABL 33
2.2.7 Nested RT-PCR für das BCR-ABL-Gen 33
2.2.8 Real-time RT-PCR für die TAA RHAMM/CD168, PRAME und WT1 34
2.2.9 Selektion der BCR-ABL-positiven CML-Zellen 34
2.2.9.1 Vorbereitung der Proben 34
2.2.9.2 Immunomagnetische Separation 35
2.2.10 Immunophänotypisierung von CD34 positiven CML-Zellen auf HLA- und kostimulatorische Moleküle 37
3 Ergebnisse 39
3.1 mRNA-Expressionsanalyse von TAA/LAA 39
3.2 mRNA-Expressionsanalyse in der chronischen Phase im Vergleich mit der akzelerierten Phase oder Blastenkrise 49
3.3 Expressionsanalyse von Leukämie-Antigenen bei unterschiedlichen BCR-ABL positiven Zelltypen 50
3.4 Die Expressionsanalyse von BCR-ABL und ABL mittels real-time RT PCR 51
3.5 Zusammenhang zwischen der Expression von TAA/LAA und BCR-ABL 51
3.6 Immunphänotypisierung auf HLA- und kostimulatorische Moleküle der CD34 positiven CML-Zellen 54
4 Diskussion 56
5 Zusammenfassung 59
6 Literaturverzeichnis 61
7 Anhang 75
7.1 Tabellenverzeichnis 75
7.2 Abbildungsverzeichnis 76
Publikationen 77
Danksagung 78

Abkürzungsverzeichnis

ABL	Abelson-Tyrosin-Kinase
ALP	alkalische Leukozytenphosphatase
AML	akute myeloische Leukämie
Ara-C	Arabinosyl-Cytosin
BAGE	„B melanoma antigen”
BCR	Bruchstellenclusterregion
BP	Basenpaare
CD	„cluster of differentiation“ (Differentierungsantigen)
cDNA	„complementary desoxyribonucleic acid” (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CML	chronisch myeloische Leukämie
CMPS	chronisch myeloproliferatives Syndrom
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CT	„Cancer/Testis” (Krebs/Hoden)
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DC	dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„desoxyribonucleic acid” (Desoxyribonukleinsäure)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ET	essentielle Thrombozythämie
FACS	„fluorescence associated cell sorting” (Durchflusszytometrie)
FITC	Fluoro-Isothiozyanat
FKS	fötales Kalbserum (Nährmedium)
G250	Nierenzellkarzinom assoziiertes Antigen
GM-CSF	„granulocyte/macrophage colony stimulation factor” (Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor)
GP	gesunder Proband
GVL	Graft versus leukemia
GVHD	Graft versus host disease
HLA	Haupthistokompatibilitätskomplex
HSP	Hitzeschockprotein
h-TERT	Telomerase katalysierende Untereinheit (Antigen)
HU	Hydroxyurea
IBMTR	“International Bone Marrow Transplant Registry”

IgG	Immunglobulin G
IFN	Interferon α
LAA	Leukämie-assoziiertes Antigen
LDH	Laktatdehydrogenase
m	männlich
MAB	monoklonaler Antikörper
MAGE	„melanoma associated antigen"
MPP11	Antigen des M-Phase Phosphoproteins 11
MRD	„minimal residual disease" (Minimale Resterkrankung)
mRNA	„messenger ribonucleic acid" (Boten-Ribonukleinsäure)
NewRen60	Nierenzellkarzinom assoziiertes Antigen
NY-ESO-1	„Cancer/Testis"-Antigen
OMF	Osteomyelofibrose
PBMC	„peripheral blood mononuclear cells" (Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PCR	„polymerase chain reaction" (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PRAME	„prefentially expressed antigen of melanoma"
PV	Polycythaemia vera
RHAMM	„receptor for hyaluronal acid mediated motility" (Antigen)
RNA	„ribonucleic acid" (Ribonukleinsäure)
RPMI	Zellkulturmedium für Leukozyten (benannt nach dem Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, New York)
RT-PCR	„reverse transcriptase polymerase chain reaction" (PCR nach reverser Transkription der RNA)
SEER	„Surveillance Epidemiology and End Results" (Datenbank des National Cancer Institute, USA)
SEREX	„serological analysis of autologous tumor antigens by recombinant cDNA expression cloning"
Src-Kinase	onkogene zytoplasmatische Protein-Tyrosinkinase
SSX2	„synovial sarcoma, X-chromosome 2" (Antigen)
SZT	Stammzelltransplantation
TAA	Tumor-assoziiertes Antigen
TBP	"TATA-box binding protein"
w	weiblich
WT1	Wilms Tumor Antigen 1

1 Einleitung

1.1 Chronisch myeloische Leukämie (CML)

Die Chronisch myeloische Leukämie (CML) zählt neben der essentiellen Thrombozythämie (ET), der Osteomyelofibrose (OMF) und der Polycythaemia vera (PV) zu den myeloproliferativen Syndromen (CMPS). Diese zeichnen sich durch eine autonome Proliferation einer oder mehrerer hämatopoetischer Zellreihen (Erythro-, Leuko- oder Thrombopoese) aus [43].

Laut dem Jahrbuch des Statistischen Bundesamtes traten in Deutschland 1995 ca. 1600 CML-Neuerkrankungen/Jahr mit einer Inzidenz von etwa 2/100.000 auf. Dabei erkrankten Männer häufiger als Frauen (1,4 : 1) [104]. Gemäß den Daten des „Surveillance, Epidemiology and End Results“-Programms (SEER) weist die Altersgruppe unter 40 Jahren eine Inzidenz der CML von 1/100.000 auf, die dann bei 65-jährigen auf 5/100.000 ansteigt und bei über 80-jährigen mit 11/100.000 ein Maximum erreicht. Mehr als die Hälfte aller Patienten waren zum Diagnosezeitpunkt älter als 60 Jahre [81].
Die CML trat unter der exponierten Bevölkerung von Nagasaki und Hiroshima nach dem Atombombenabwurf häufiger auf, sowie nach einer Exposition mit Röntgen- und Gammabestrahlung oder langjährigem Kontakt mit Benzen bzw. anderen aromatischen Lösungsmitteln [16].

Durch eine maligne Transformation myeloischer pluripotenter Stammzellen kommt es bei der CML zu einer signifikanten Vermehrung der Zellen der myelomonozytären Zellreihe. Häufig ist die CML in der chronischen Phase ein Zufallsbefund. Diagnostische Hinweise bei Verdacht auf CML erhält man zunächst über Anamnese, Klinik und Blutbild. Als diagnostische Maßnahmen erfolgen dann Knochenmarkbiopsie, Aktivitätsnachweis von alkalischer Leukozytenphosphatase (ALP), Bestimmung der LDH und sonographische Ermittlung der Leber- und Milzgröße [48].
Im Blutbild findet man eine Leukozytose durch Vermehrung der neutrophilen Granulozyten, eine Linksverschiebung mit Auftreten von Vorstufen der Granulopoese und typischerweise auch meist eine Basophilie. Begleitet wird dieser Befund zum Teil von einer Anämie und einer anfänglichen Thrombozytose.

Die weitere Diagnostik der CML wird außer durch die typischen Veränderungen im peripheren Blut und Knochenmark durch den zytogenetischen Nachweis der klonalen Vermehrung einer Stammzelle mit reziproker Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 gestellt. Diese Translokation führt zu einer Fusion des Bruchstellenclusterregion(BCR)-Gens auf Chromosom 22q11 mit dem ABL-Gen (homolog dem ABL-Onkogen des Abelson murinen Leukämie-Viruses [103]), welches auf dem Chromosom 9q34 lokalisiert ist, und verkürzt Chromosom 22q. Das so entstandene Chromosom mit der klassischen Translokation t(9;22) (q34;q11) wird als „Philadelphia"-Chromosom bezeichnet. Die „head-to-tail"-Fusionierung der beiden Gene führt zur Bildung des beschriebenen BCR-ABL-Fusionsgens. Dieses Gen kodiert ein Fusionsprotein, meist die Tyrosinkinase p210 [2], welche eine proliferationsfördernde Wirkung ausübt. Das p210-Protein findet sich bei den meisten CML-Patienten [74]. Die Fusionsproteine können mittels RT-PCR und real-time PCR qualitativ und quantitativ bestimmt werden.

Infolge einer Proliferation der chromosomal aberranten Stammzelle kommt es zu einem Überwiegen des transformierten Zellklons bei gleichzeitig zunehmender Unterdrückung der physiologischen Hämatopoese.

Den typischen klinischen Verlauf unterteilt man in folgende drei Phasen (Abb.1) [42, 47]:

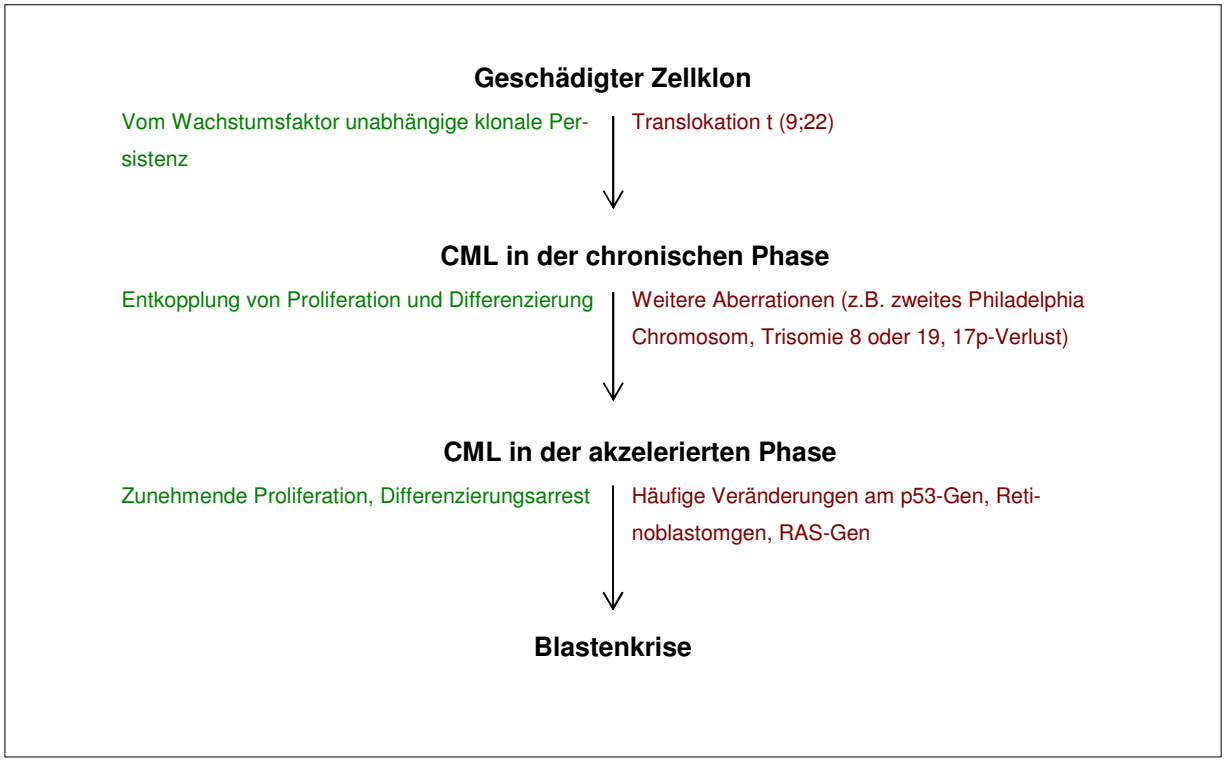


Abb.1:Darstellung des klinischen Verlaufs der Chronisch myeloischen Leukämie (CML) in drei Phasen

Die chronische Phase beginnt meist schleichend, verläuft oft über mehrere Jahre klinisch stabil und zeigt häufig keine klinischen Beschwerden. Die Patienten werden meist durch eine Leukozytose und eine Splenomegalie auffällig, gelegentlich zeigen CML-Patienten eine allgemeine B-Symptomatik mit Nachtschweiß, Leistungsminderung und Müdigkeit.
Die Hämatopoese verläuft in dieser Phase teilweise noch physiologisch mit weniger als 10% Blasten und Promyelozyten im peripheren Blut und Knochenmark [42].
In der folgenden Phase, der Akzeleration, kommt es zu einer Krankheitsprogression. Die Symptomatik verstärkt sich und die normale Hämatopoese wird durch die klonale Blastenpopulation zunehmend verdrängt, welches sich z.B. durch steigende Leukozytenzahlen trotz adäquater zytostatischer Therapie äußert. Charakteristisch für diese Phase ist ein Blastenanteil von 10-19% im peripheren Blut oder Knochenmark bzw. über 20% Basophile im peripheren Blut. Ebenso ist eine anhaltende therapieresistente Thrombozytose, eine wachsende Milzgrösse und ansteigende Leukozytenzahlen typisch. Ausserdem lässt sich bei vorhandenen Vorbefunden zytogenetisch eine klonale Weiterentwicklung nachweisen. Begleitet wird diese Phase von einer persistierenden B-Symptomatik, Anämie und zusätzlichen Chromosomenaberrationen (Aneuploidie, Trisomie 8 und 19, 2.Philadelphia-Chromosom, Isochromosom 17) [7, 45, 56, 110].

Die CML führt letztendlich zu einer terminalen Erkrankungsphase, der sogenannten Blastenkrise. Diese verläuft ähnlich einer akuten Leukämie und endet meist rasch letal. Die Blastenkrise kann auch direkt im Anschluss an die chronische Phase auftreten und hat unter Therapie eine Dauer von drei bis sechs Monaten [19, 24, 57, 95].
Kennzeichnend für die Blastenkrise sind mehr als 20% Blasten im peripheren Blut oder Knochenmark, eine extramedulläre Blastenproliferation bzw. Blastenkonglomerate in der Knochenmarkbiopsie [110]. Man kann in dieser Phase die Blasten anhand von Oberflächenmolekülen in myeloische, lymphatische, erythrozytäre und undifferenzierte Blasten unterteilen. In der Hälfte der Fälle liegt eine myeloische, bei einem Drittel eine lymphatische, zu 10% eine erythrozytäre Blastenkrise und bei 5% die undifferenzierte Form vor [42].

1.2 Medikamentöse Therapie

Derzeit gibt es zwei Erfolg versprechende Therapiestrategien, die grundsätzlich zu Therapiebeginn in Betracht gezogen werden müssen [97]. Zum einen die medikamentöse Therapie mit dem Tyrosinkinasehemmer Imatinib (Imatinib-Mesylat, Glivec®). Mit einer medikamentösen Therapie sollte rasch nach Sicherung der Diagnose begonnen werden.

Zum anderen besteht bei jüngeren Patienten die Möglichkeit einer allogenen Stammzelltransplantation (SZT) unter geeigneten Voraussetzungen (Bewertung nach dem Hasford-Score und EBMT/Gratwohl-Komorbiditäts-/Risiko-Score [29, 39]). Diesen Bewertungsgrundlagen zufolge empfiehlt es sich, bei jüngeren Patienten direkt nach der Diagnosestellung mit einer HLA-Typisierung und ggf. einer Spendersuche zu beginnen, evtl. verbunden mit der Gewinnung von peripheren Stammzellen für eine mögliche autologe Stammzelltransplantation. Die Wertigkeit und der richtige Zeitpunkt einer allogenen SZT ist seit der Einführung der Tyrosinkinasehemmer Gegenstand intensiver Diskussionen [31].

Das primäre Therapieziel ist das Erreichen einer hämatologischen Remission (Normalisierung des Blutbildes, der Milzgröße und Symptomverbesserung). Nur bei Patienten in hämatologischer Remission werden auch zytogenetische Remissionen beobachtet [47]. Zur Therapiekontrolle und zur Detektion einer minimalen Resterkrankung (MRD) nach Beendigung der Therapie verwendet man die quantitative PCR zum Nachweis des BCR-ABL-Gens als molekulargenetischen Marker [68].

1.2.1 Therapie mit Tyrosinkinasehemmern

Tyrosinkinasehemmer (z.B. Imatinib oder neuere Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Dasatinib/Sprycel®) stellen eine vielversprechende kausale Behandlung der CML dar. Tyrosinkinasen wirken in normalen Zellen regulierend auf den Zellzyklus. Bei der CML entsteht als Produkt des BCR-ABL-Gens eine ABL-Tyrosinkinase, die durch Phosphorylierung seiner selbst und anderer Proteine die Signalwege in Richtung Proliferation führen. Durch kompetitive Inhibierung der ATP-Bindung wird eine Tyrosinphosphorylierung von zellulären Proteinen unterbunden und führt letztendlich die leukämischen Blasten selektiv zur Apoptose.

Vorhandene Studien belegen eine deutlich verbesserte Behandlungsmöglichkeit der CML in allen Phasen der Erkrankung [24, 25]. Phase I/II-Studien zeigten, dass bei

Patienten in der IFN-refraktären Phase und auch in fortgeschrittenen Phasen eine hämatologische und zytogenetische Remission erreicht werden kann [24, 25, 55, 85, 98, 106]. In einem Vergleich einer primären Monotherapie mit Imatinib und einer kombinierten Therapie mit IFN/Ara-C zeigte sich eine deutliche Überlegenheit der Imatinib-Therapie bezüglich der hämatologischen und zytogenetischen Remissionsraten [51, 55].
Mögliche Nebenwirkungen sind u.a. eine Neutro- oder Thrombozytopenie, das Auftreten einer gastrointestinalen Symptomatik mit Lidödemen und psoriatiformen Hauteffloreszenzen. Dabei muss auf eine mögliche Resistenzentwicklung der CML-Patienten in allen Phasen der Erkrankung auf Tyrosinkinasehemmer geachtet werden [17, 46]. Derzeit wird an neuen Inhibitoren wie z.B. Dasatinib/Sprycel® gearbeitet, die durch Hemmung mehrer Zielstrukturen (BCR-ABL und Kinasen der Src-Familie) Resistenzmechanismen unterbinden sollen [60].

1.2.2 Interferon α (IFN)

IFN wirkt immunmodulatorisch, wobei der genaue Wirkmechanismus noch nicht vollständig geklärt ist. Die Therapie mit IFN wurde durch die Tyrosinkinase-Inhibitoren weitgehend abgelöst. Bei Unverträglichkeit dieser Inhibitoren ist IFN weiterhin eine Option bei der Behandlung der CML: Die Therapie sollte möglichst früh begonnen und langsam aufdosiert werden, bis ein noch toleriertes Dosismaximum erreicht ist. Initial kann IFN überlappend mit Hydroxyurea gegeben werden, um die Effizienz und Verträglichkeit der Therapie zu verbessern [47].
IFN verlängert die Überlebenszeit der Patienten im Vergleich zu Patienten, die mit Hydroxyurea oder Busulfan behandelt wurden [41]. In über 70% der Fälle kommt es zu einer stabilen hämatologischen Remission. Zytogenetische Langzeitremissionen lassen sich zu einem kleinen Prozentsatz der Fälle erreichen [58]. IFN wird als Dauertherapie verwendet. Hierbei tritt eine vergleichsweise hohe Nebenwirkungsrate auf (Muskel-, Knochen-, Kopfschmerz, Alopezie, Neuropathien, depressive Reaktionen, Exazerbation von Autoimmunerkrankungen) [88, 96]. Neben IFN werden inzwischen auch pegylierte Interferone angeboten, die eine längere Halbwertszeit haben [76, 105].

1.2.3 Hydroxyurea (HU)

Hydroxyurea ist ein S-Phasen-Inhibitor der Ribonukleotidreduktase, dessen Hauptwirkung in der Reduktion der leukämischen Population um mehrere Zehnerpotenzen besteht. Unter HU kann jedoch normalerweise keine molekulargenetische Remission erreicht werden. Im Vergleich zu einer Therapie mit Busulfan konnte für die HU-Therapie ein Vorteil belegt werden [12]. Mit einer Hydroxyurea-Monotherapie kann das mediane Überleben von CML-Patienten auf 48-56 Monate erhöht werden [1, 40]. HU ist wegen seiner kurzen biologischen Wirkung und seinem schnellen Ansprechen gut steuerbar und kann deswegen dem Blutbild entsprechend angepasst werden. Das Ziel einer Therapie mit HU ist die Einstellung der Leukozytenzahl auf normale Werte um 5.000/µl. Zu den Nebenwirkungen zählen häufig auftretende unspezifische gastrointestinale Symptome und seltener dermatologische Erscheinungen wie Haut- und Nagelatrophie oder Lichtdermatosen [62, 114], in Einzelfällen entwickelte sich ein „drug fever“ [109].

1.2.4 Busulfan

Busulfan ist ein Alkylanz, das auf Stammzellebene seine Wirkung entfaltet. Nachdem 1993 die Überlegenheit von HU gegenüber Busulfan gezeigt werden konnte [40], wird eine Therapie mit Busulfan allerdings nur noch bei Therapieresistenz und Unverträglichkeit von Imatinib oder HU angewandt. Häufig treten schwerwiegende Nebenwirkungen auf: Lebensbedrohliche Panzytopenien und Knochenmarksaplasien bei Standarddosen, sowie die „Busulfanlunge“ und Gonadeninsuffizienz [41, 84, 102].

1.2.5 Fazit der medikamentösen Therapie

Nach dem heutigen Kenntnisstand ist die CML medikamentös nicht heilbar. Eine Therapie mit Imatinib scheint erfolgversprechend, wobei Langzeitüberlebensdaten noch ausstehen [51, 55]. Als einzige kurative Möglichkeit steht weiterhin nur die allogene Stammzelltransplantation zur Verfügung [17, 59].

1.3 Stammzelltransplantation (SZT)

1.3.1 Allogene Stammzelltransplantation (Allogene SZT)

Die allogene Stammzelltransplantation ist zur Zeit das einzige Verfahren, das die CML zur definitiven Ausheilung führen kann [17]. Bei Patienten, die sich in der chronischen Phase befinden, kann mit dieser Therapieform eine 5-Jahres-Überlebensrate zwischen 70 und 80% erreicht werden [14, 26, 49]. Sie ist jedoch infolge der Toxizitäten der SZT mit einer transplantationsassoziierten Mortalität von ca. 15-20% verbunden.

Der Erfolg der allogenen SZT ist abhängig vom Alter und der Erkrankungsphase des Patienten, von der HLA-Kompatibilität und dem Intervall zwischen Diagnose und Transplantation. Das Transplantationsrisiko wird durch den bereits erwähnten EBMT-Score nach Gratwohl [29] bestimmt. Eine Komplikation ist die „graft-versus-host-disease“ (GVHD), eine immunologische Unverträglichkeitsreaktion, die trotz erkennbarer Verbesserungen der immunsuppressiven Therapie mit einem erhöhten Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko einhergeht [30].

Durch eine vorausgehende Konditionierungstherapie soll eine Myeloablation und damit eine Eradikation des malignen Klons bewirken werden.

1.3.2 Autologe Stammzelltransplantation (Autologe SZT)

Die autologe SZT wurde ursprünglich in den Spätphasen der CML verwendet, um erneut eine chronische Phase zu induzieren. Normale hämatopoetische Stammzellen treten bei Patienten mit CML vermehrt während der Erholungsphase nach Chemotherapie und Gabe von G-CSF auf.

Bis heute ist die autologe SZT bei der CML kein etabliertes standardisiertes Verfahren, da bisher kein gesicherter Überlebensvorteil nachgewiesen werden konnte. Trotzdem stellt die autologe SZT vor allem bei fehlenden Spendern für eine allogene SZT weiterhin eine Therapieoption dar [4, 93].

1.4 Immuntherapien bei der CML

Trotz der oben genannten Therapieformen fehlen immer noch effiziente Methoden zur Behandlung der Zytostatika- und Tyrosinkinase-resistenten CML und von Rezidiven, wie beispielsweise nach allogener Stammzelltransplantation.

Ein neuer Therapieansatz stellt eine Immuntherapie dar. Die Wirksamkeit von Immuntherapien findet sich in verschiedenen Studien wieder. So zum Beispiel die unspezifische T-Zellstimulation durch IFN, die bei der CML anhaltende zytogenetische Remissionen induziert [45]. Auch bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) zeigte sich nach SZT ein Überlebensvorteil durch eine Therapie mit IFN und Interleukin-2 [73]. Bei einer allogenen SZT (s.o.) kann der Graft-versus-Leukämie-Effekt (GVL) durch Spenderlymphozyten verstärkt werden [15, 28, 64, 65]. Dieser Effekt ist bei der CML ausgeprägter als bei anderen Leukämie-Formen und weist auf eine starke immunogene Komponente der Erkrankung hin [65]. Ein neuer Therapieansatz besteht nun darin, diesen Effekt zusätzlich zu unterstützen, indem man die Immuntherapie noch spezifischer gestaltet. Dabei spielen T-Zellen eine wichtige Rolle, die gemäß einer retrospektiven Studie des International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) die Eliminierung der CML unterstützen können [49]. Man wies eine erhöhte Rückfallquote bei Stammzelltransplantationen nach, die T-Zell-reduziert wurden, um GVHD zu vermeiden [71]. Molldrem et al. [79] konnten T-Zell-Subpopulationen isolieren, die sich durch eine hohe Affinität zu einem spezifischen antigenen Epitop auszeichneten und dadurch CML-Zellen unterdrückten. Somit ist die isolierte Nutzung des GVL-Effekts ohne die unerwünschte GVHD eine entscheidende Fragestellung der Transplantationsmedizin [87]. Die Entwicklung spezifischer Zelltherapien zur Förderung des GVL-Effektes erreicht man durch den Nachweis von charakteristischen Tumor- bzw. Leukämie-assoziierten Antigenen (TAA bzw. LAA). Hierbei verwendet man bereits bekannte Antigene mit spezifischer Expression in Tumoren, so z.B. Cancer/Testis (CT) Antigene, durch deren Einsatz autoimmunologische Mechanismen reduziert oder gar vermieden werden können. Eine Immuntherapie, die gegen LAA gerichtet ist, kann eine Möglichkeit darstellen, die Dauer einer erreichten kompletten Remission der Erkrankung zu verlängern oder zu erhalten. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit, für diese Immuntherapien geeignete LAA zu identifizieren.

1.5 Tumor- und Leukämie-assoziierte Antigene (TAA/LAA)

TAA wurden zuerst in soliden Tumoren charakterisiert. Durch Klasse-I-Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (HLA) werden von einem TAA abgeleitete Peptide präsentiert und können spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) induzie-

ren. Verschiedene Forschungsgruppen wiesen solche TAA zunächst beim malignen Melanom nach. Durch die Proteine bzw. Peptide konnten CTL induziert werden, die Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* erkennen und lysieren [61].

Daneben haben auch kostimulatorische Moleküle wie z.B. CD80, CD83, CD86 und CD40 Einfluss auf die Erkennung von leukämischen Zellen. Eine fehlende oder erniedrigte Expression dieser Moleküle verhindert die Ausbildung einer suffizienten T-Zellantwort [118].

Derzeit werden verschiedene Immuntherapien beim malignen Melanom und einigen gynäkologischen Tumoren in klinischen Studien geprüft [8, 89, 92]. Die Verwendung von Zytokinen wie GM-CSF, CpG-Oligonukleotiden oder dendritischen Zellen (DCs) kann einen wichtigen zusätzlichen Faktor darstellen [53, 66].

Zu den TAA/LAA zählt die Gruppe der Cancer/Testis (CT)-Antigene wie BAGE [6], die MAGE-Gruppe [108], NY-ESO-1 [10, 54] oder SSX2 [107]. Diese CT-Antigene werden von Tumorzellen, aber auch von gesundem Hodengewebe exprimiert. Die mRNA des Antigens BAGE konnte in leukämischen Blasten von Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) nachgewiesen werden [35]. SSX2 fand sich in leukämischen Zelllinien [35]. Das Antigen PRAME wies man in verschiedenen soliden Tumoren und Leukämien nach, jedoch ebenfalls zu einem kleinen Anteil in gesunden Zellen des Endometriums, der Ovarien, des Hodens und der Nebennieren [32, 35, 52]. WT1 wird von AML-Blasten aber auch von CD34 positiven Zellen der normalen Hämatopoese gebildet [3, 50, 83]. Verschiedene Peptide, die WT1- und PRAME-spezifische zytotoxische Lymphozyten (CTLs) aktivieren, konnten bestimmt werden [37, 63, 83, 100]. Die CTL-induzierenden Antigene G250 und die Telomerase katalysierende Untereinheit (hTERT) entdeckte man als immunogene Struktur zuerst in soliden Tumoren [75, 111, 112] und bei Patienten mit AML [35]. NewRen60 ist ein durch das SEREX-Verfahren ermitteltes Antigen, das auch in anderen Geweben vorkommt [99]. Außerdem wurden weiterhin folgende Antigene bei Leukämien nachgewiesen:

Proteinase 3 und das davon abgeleitete CTL-Epitop PR1 ist bei AML- und CML-Patienten exprimiert [77-79]. Jedoch ist Proteinase 3 auch in mehreren physiologischen Gewebstypen zu finden [18]. RHAMM/CD168 und MPP11, die mittels des SEREX-Verfahrens nachgewiesen werden konnten, zeigten tumorspezifische humorale Immunantworten und eine auf den Tumor begrenzte mRNA-Expression bei AML-Patienten [33, 34].

Um Immuntherapien bei der Behandlung von CML durch genau definierte Antigene als Zielstrukturen spezifischer zu machen, untersuchten wir in dieser Studie die mRNA-Expression von TAA bzw. LAA, deren Expression bei CML zu erwarten oder bei anderen malignen hämatologischen Erkrankungen bekannt war und deren Immunogenität bereits beschrieben wurde.

1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit

• In dieser Studie wurde die mRNA von dreizehn Kandidatenantigenen bei Patienten mit CML untersucht. Die Expression von Leukämie-spezifischen Antigenen ist Voraussetzung für eine zielgerichtete („targeted“) Immuntherapie bei CML-Patienten.

• Der Nachweis einer mRNA-Expression wurde bei CML-Patienten in der chronischen und akzelerierten Phase, sowie in der Blastenkrise geführt. • Für die Antigene RHAMM/CD168, WT-1 und PRAME wurde eine quantitative RT-PCR etabliert und der Verlauf der Expression mit dem klinischen Verlauf der BCR-ABL-Expression einzelner CML-Patienten verglichen. • Verschiedene Zelltypen (CD34, CD8, CD14, CD66b) wurden bei einem exemplarischen BCR-ABL-positiven CML-Patienten selektiert und die Expression der Antigene in diesen selektierten Zellproben untersucht.

• Darüber hinaus wurde die Expression der HLA-ABC und HLA-DR-Antigene und der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD83 und CD86 bestimmt, deren Expression für eine effektive Präsentation der Tumorantigene und effiziente Immunantwort von großer Bedeutung sind.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Allgemein verwendete Materialien

Pipetten:	0,5-10 µl, 10-100 µl, 50-250 µl und 100-1000 µl Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Sterile Arbeitsbank:	Heraeus LaminAir HLB 2448 (Heraeus, Hanau, Deutschland)
Digitalwaage:	Mettler PC 440 (Mettler, Giessen, Schweiz); Precisa 3000C-6000D (PAG Oerlikon, Zürich, Schweiz)
FACS-Gerät:	FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)
FACS-Daten-Analyse:	Cellquest™ Software (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
Flüssigstickstofftank:	Taylor Wharton (Taylor Wharton, Mildstedt, Deutschland)
Kühlschrank:	-20°C (Bosch, Deutschland) und -80°C (Ultra Low, Sanyo, Deutschland)
Mikrowelle:	Mikromat (AEG, Deutschland)
Zentrifugen:	Laborfuge A (Heraeus Sepatech GmbH, Osterode, Deutschland) Laborfuge M (Heraeus) Biofuge pico (Heraeus) Beckman GS-6R und GS-15R (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA)
Pipettierhilfe:	Pipetus-Akku (Hirschmann, Eberstadt, Deutschland)
Vortexgerät:	REAX 2000 (Heidolph, Kehlheim, Deutschland)
LightCycler:	“SYBR Green I technology”- Light Cycler® (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Deutschland)
Reagenzien für LightCycler:	LightCycler DNA Master (Roche) [Cat.no. 2015102]

2.1.2 Plastikwaren

Reaktionsgefäße:	0,5, 1, 1,5 und 2 ml Safe-Lock Tube (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
Röhrchen:	15 und 50 ml FALCON® Polypropylen Tubes (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)
Pipettierröhrchen:	10 ml in 1/10 ml steril serological pipet (Falcon)
Glasflaschen:	verschiedene Größen mit Plastikschraubdeckel (Biochrom KG, Berlin, Deutschland)
FACS-Röhrchen:	5 ml FALCON® Polystyrene Round-Bottom Tube
Pipettenspitzen:	epT.I.P.S. Standard 0,1-10, 2-200 und 50-1000 µl (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

2.1.3 Chemikalien

Sämtliche Laborchemikalien wurden in höchstmöglicher Reinheit von folgenden Firmen bezogen:

Roth GmbH + Co., Karlsruhe, Deutschland
Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA
Sigma-Aldrich Chemicals, Deisenhofen, Deutschland
GibcoBRL™, Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

Agarose:	SeaKem®LE Agarose (Bio Whittaker, Rockland, ME, USA)
Molekulargewichtsmarker:	Marker VI (Roche) [Cat.no. 10269220/31]
Loadingbuffer:	32,5 ml destilliertes Wasser 15 ml Glyzinkonzentration 2,5 ml Bromphenolblau 5% (Fa. Braun, Melsungen, Deutschland)
Fluoreszenzfarbstoff:	Ethidiumbromid 0,07% (Fa. Applichem, Darmstadt) [Cat.No. 6G00709]

TBE zehnfach konzentriert:	1 l destilliertes Wasser 108 g TRIS 54 g Borsäure 40 ml 0,5-molares EDTA (pH 8,0)
PBS:	10x (w/o Calcium und Magnesium) (Fa. Gibco™, Auckland, Neuseeland)
TRIZOL-Reagenz:	Gebrauchsfertige monophasische Phenol-Lösung zur RNA-Isolation, Gibco BRL Life Technologies [Cat.No.15596-018]
FACS-Antikörper:	Pharmingen, Heidelberg, Deutschland

2.1.4 Zellkulturen

Die Zelllinien K562, HL-60 und CAKI1 bezogen wir von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig, Deutschland.

Die o.g. Zelllinien wurden in einem Nährmedium, das sich aus 90% (v/v) RPMI 1640, 10% (v/v) FKS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin zusammensetzt, entweder in Mikrotiter-Flachbodenplatten (24-well) oder in Kulturflaschen bei einer Temperatur von 37°C in einer Atmosphäre mit einem CO_2-Anteil von 5% und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% im Brutschrank inkubiert.

2.1.4.1 Die CML-Zelllinie K562

Die CML-Zelllinie K562 wurde 1970 aus dem Pleuraerguss einer 53jährigen CML-Patientin in der Blastenkrise etabliert [21].

Kultivierungsdaten von K562 [21]:

Morphologie:	Große runde, einzelne Zellen in Suspension
Subkultivierung:	0,1-0,5 x 10^6 Zellen/ml, 1:3-1:5-Split alle 3 Tage; Aussaat mit 0,3-0,5 x 10^6 Zellen/ml
Verdopplungszeit:	ca. 30-40 Stunden
Lagerung:	Zelldichte von ca. 5 x 10^6 Zellen/Ampulle

Wissenschaftliche Daten zu K-562 [21]:

Immunologie:	CD3 -, CD13 +, CD19 -, CD20 -, CD34 -, CD41 (+), CD42 +, CD45 +, CD71 +, CD79a -, cyCD79a +, CD80 -, CD235a (+)

Zytogenetik: hypotriploider Karyotyp; - 61-68<3n>XX, -X, -3, +7, -13, -18, +3mar, del (9)(p11/13), der (14)t(14;?) (p11;?), der (17)t (17;?) (p11/13;?), der (?18)t (15;?18) (q21;?q12), del (X) (p22)

2.1.4.2 Die AML-Zelllinie HL60

HL-60 wurde durch Collins et. al. aus dem peripheren Blut einer 35-jährigen kaukasischen Frau gewonnen, die an einer Akuten myeloischen Leukämie erkrankt war [22].

Kultivierungsdaten von HL-60 [22]:

Morphologie: runde, einzelne Zellen in Suspension

Subkultivierung: 0,5-1,0 x 10^6 Zellen/ml, 1:2-1:5-Split alle 1-2 Tage; Aussaat mit 1x 10^6 Zellen/ml

Verdopplungszeit: ca. 25 Stunden

Lagerung: Zelldichte von 4-5 x 10^6 Zellen/Ampulle

Wissenschaftliche Daten von HL-60 [22]:

Immunologie: $CD3^-$, $CD4^+$, $CD13^+$, $CD14^-$, $CD15^+$, $CD19^-$, $CD33^+$, $CD34^-$, $HLA\text{-}DR^-$

Zytogenetik: hypotetraploider Karyotyp mit hypodiploider Sideline und 1,5% polyploid – 82-88<4n>XX, -X, -X, -8, -8, -16, -17, -17, +18, +22, +2mar, ins (1;8) (p?31;q24hsr)x2, der (5) t (5;17) (q11;q11)x2, add (6) (q27)x2, der (9) del (9) (p13) t (9;14) (q?22;q?22)x2, der (14) t (9;14) (q?22;q?22)x2, der (16) t (16;17) (q22; q22) x1-2, add (18) (q21) –c-myc Amplicons präsentieren in der(1) und in beiden Markern.

2.1.4.3 Die Nierenkarzinom-Zelllinie CAKI-1

CAKI-1 entstammt dem Nierenkarzinom (klarzelliges Karzinom) eines 49-jährigen Mannes [23].

Kultivierungsdaten von CAKI-1 [23]:

Morphologie:	epithelialartig, in Monolayer haftend
Subkultivierung:	1:3-1:5-Split unter Verwendung von Trypsin/EDTA; sofortiges Wachstum nach dem Auftauen in einem 80 cm^2-Behälter; Aussaat mit 1-2 x 10^6 Zellen/80 cm^2
Verdopplungszeit:	ca. 48 Stunden
Lagerung:	gefroren mit 70% Medium, 20% FBS, 10% DMSO für 1 x 10^6 Zellen/Ampulle

Wissenschaftliche Daten von CAKI-1 [23]:

Immunologie:	Zytokeratin+, Zytokeratin-7-, Zytokeratin-8+, Zytokeratin-17-, Zytokeratin-18+, Desmin-, Endothel-, GFAP-, Neurofilament-, Vimentin+.
Zytogenetik:	humaner penta-/hexaploider Karyotyp –112-149<6n>XXX, -Y, -Y, -Y, Rearrangements beinhalten add(1)(p22), i(3p), add(3)(p14), der(7)t(7;7)(q34;p14), i(8q), i(10q), add(11)(p11), Großer Isodic Marker x2- korrespondiert nicht mit herausgegebenem Karyotyp.

2.1.5 Materialien für die cDNA-Präparation

RNA-Gewinnung:	Qiagen RNeasy Midi Kit for 10 RNeasy Midi Spin Columns (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) [Cat.No. 75142]
DNA-Verdau:	RNase Free DNase Set für RNeasy/Qi Amp Columns, Qiagen [Cat.No. 79254]
cDNA Synthese:	Random-Primer, Fa. Amersham, Braunschweig, Deutschland [Cat.no.79254] dNTPs (25 mM) Applikon 0,07%, Fa. Amersham RNAsin + MMLV Reverse Transkriptase, inkl. DDT 0,1 molar und Puffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland [Cat.no. 28025-013])
Photometer:	Pharmacia Ultrospec III (LKB Biochrom, Cambridge, England)
Mixer / Schüttler:	Eppendorf Thermomixer 5436 und Thermomixer compact (Eppendorf AG)

2.1.6 Materialien für die RT-PCR

PCR-Gerät:	Trio-Thermoblock (Biometra, Göttingen, Deutschland) GeneAmp PCR-System 2400 (Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland)
Elektrophoresekammer:	Gibco BRL Horizon 11.14 (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)
dNTP:	10 mM (Fa. Amersham)
PCR-Puffer:	PCR-Buffer 10x, 15mM $MgCl_2$ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
Taq-Polymerase:	AmpliTaq® DNA Polymerase (Applied Biosystems)
Geldokumentationsgerät:	Eagle-Eye II (Fa. Stratagene, Heidelberg, Deutschland)
Dokumentationssoftware:	Eagle-Eye Sight Vers. 3.2 (Fa. Stratagene)

Die verwendeten Primer und PCR-Bedingungen werden unter 2.2.4.3. detailliert behandelt.

2.1.7 Materialien für die immunomagnetische Separation

Separations-Kit:	µMACS mRNA Isloation Kit (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland)
Aufbereitung PBMN:	Ficoll-Lösung BIOCOLL Separating Solution, Dichte: 1,077 (Firma Biochrom AG, Berlin, Deutschland)
Nährstofflösung:	RPMI 1x (Fa. Biochrom AG) [Cat.no. F1215] Penicillin + Streptomycin (Fa. Gibco) [Cat.no. 15140-122] l-Glutamin 2 mmol (Fa. Biochrom AG) [Cat.no. K0283] DMSO
AB-Blutgruppen-Serum:	freundlicherweise überlassen vom DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg, Institut Ulm
Spüllösung:	X-Vivo 10 Biowhittaker ohne Phenolrot und Gentamycin (Fa. Cambrex Bio Science, Walkersville, Maryland, USA) [Cat.no. BE04-743Q]
Separationspuffer:	PBS (1x) 2 mM EDTA 0,5% humanes Serumalbumin
Trypanblau:	Fa. Sigma 100 ml [Cat.no. 58154]
Wasserbad:	GFL Typ: 1002 (Gesellschaft für Labordiagnostik GmbH, Burgwedel Deutschland)
Magnetständer:	MACS MultiStand (Miltenyi Biotec GmbH)
Trennsäule:	MACS MS^+ Separation Columns (Miltenyi Biotec GmbH)
Magnetische Markierung:	MicroBeads CD8, CD14, CD34, CD66b (Miltenyi Biotec GmbH) [Cat.no. 5040504055]

2.1.8 Materialien für die Immunphänotypisierung von CD34 positiven Zellen

FITC-konjungierte monoklonale CD34 Antikörper:
Fa. Becton & Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Phycoerythrin (PE)-konjungierte Antikörper HLA-ABC, HLA-DR, CD-33, CD-40, CD-80 CD-83, CD-86:
Fa. Becton & Dickinson

HLA-A2-Antikörper:
freundlicher Weise überlassen von Dr. Alois Wölpl, jetzt Institut für medizinische Genetik, München, Deutschland

PE-konjungierter Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus-Immunglobulin-PE) für HLA-A2-Antikörper:
DAKO Diagnostics, Hamburg

2.2 Methoden

2.2.1 Zellproben

Für die RT-PCR wurden mononukleäre Zellen aus peripherem Blut (PBMC) oder aus Knochenmarkblut von 34 an CML erkrankten Patienten verwendet. In allen Proben wurde das Philadelphia-Chromosom [Translokation t(9;22)] nachgewiesen. Alle Patienten zeigten 6-100% klonale BCR-ABL positive Zellen (durchschnittlich 61%, Standardabweichung 30,41%, Tabelle 1). Drei der Patienten zeigten weitere Chromosomenaberrationen. 24 CML-Patienten befanden sich in der chronischen Phase, 10 Patienten in der Akzelerationsphase bzw. in der Blastenkrise.

Elf der CML-Patienten waren weiblich, 23 männlich. Das durchschnittliche Alter betrug 50,8 Jahre (Spannbreite: 25-79 Jahre).

Zur Untersuchung der mRNA-Expression in unterschiedlichen Zellsubtypen von CML-Patienten wurden Proben von einem Patienten entnommen, der in der diagnostischen RT-PCR für das BRC-ABL-Gen zu 100% positiv war. Außerdem wurden PBMC von gesunden Probanden untersucht.

2.2.2 Statistik

Die Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalysen wurden in absoluten oder relativen Häufigkeiten angegeben.

Zudem wurden die Ergebnisse und Quelldaten durch Berechnung von Mittelwerten (arithmetischer Mittelwert $\bar{x} = \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^{n} x_i$) und der Standardabweichung (empirische Standardabweichung = $\sqrt{\frac{n\sum x^2 - (\sum x)^2}{n(n-1)}}$) zusammengefasst.

Bei der quantitativen Realtime-PCR zur mRNA-Expression von BCR-ABL und ABL sowie der Antigene RHAMM/CD168, PRAME und WT1 wurde die Genexpression des jeweiligen Zielgens auf ein *House-keeping-Gen* bezogen (relative Quantifizierung). Die Daten der PCR wurden durch die Software des Realtime-PCR Systems Light Cycler® (Roche) ermittelt und verarbeitet.

Die gewonnenen Daten der FACS-Analyse wurden mit Hilfe der CellQuest™-Software (Becton Dickinson) erhoben und analysiert. Die Darstellung der einzelnen Merkmale erfolgte als korrelierte Zweiparameterdarstellung im so genannten „Dot Plot“, bei dem jeder einzelne Punkt einem Messereignis entsprach.

Tabelle 1: Klinische Daten der 34 CML-Patienten

CML-Patienten	BCR-ABL (RT-PCR)	BCR-ABL/ABL	Geschlecht	Alter	Therapiestatus	Krankheitsstadium
1	+	100%	w	28	Nach allogener Transplantation	Chronische Phase
2	+	55%	m	46	Nach allogener Transplantation	Chronische Phase
3	+	30%	w	51	Keine Therapie	Chronische Phase
4	+	57%	m	25	Keine Therapie	Chronische Phase
5	+	16%	m	59	Nach autologer Transplantation	Chronische Phase
6	+	58%	m	79	Keine Therapie	Chronische Phase
7	+	6%	m	59	Nach autologer Transplantation	Chronische Phase
8	+	100%	m	47	Nach allogener Transplantation	Chronische Phase
9	+	100%	m	60	Keine Therapie	Chronische Phase
10	+	100%	m	61	Interferon alpha	Chronische Phase
11	+	100%	m	65	Interferon alpha	Akzeleration
12	+	100%	w	56	Interferon alpha	Chronische Phase
13	+	27%	w	66	Interferon alpha/ Hydroxyurea	Chronische Phase
14	+	95%	m	74	Keine Therapie	Chronische Phase
15	+	30%	w	64	Interferon alpha	Blastenkrise (lymphatisch)
16	+	81%	w	61	Interferon alpha	Akzeleration
17	+	100%	w	69	Hydroxyurea	Blastenkrise
18	+	100%	m	60	Keine Therapie	Chronische Phase
19	+	62%	m	46	Interferon alpha/ Hydroxyurea	Blastenkrise
20	+	67%	m	40	Interferon alpha/ Hydroxyurea	Chronische Phase
21	+	91%	w	61	Hydroxyurea	Chronische Phase
22	+	46%	m	53	Hydroxyurea	Blastenkrise (lymphatisch)
23	+	24%	w	48	Hydroxyurea	Chronische Phase
24	+	40%	m	36	Nach allogener Transplantation	Chronische Phase
25	+	81%	m	69	Hydroxyurea	Akzeleration
26	+	56%	w	44	Keine Therapie	Chronische Phase
27	+	64%	m	36	Hydroxyurea	Blastenkrise
28	+	76%	m	37	Keine Therapie	Chronische Phase
29	+	100%	m	29	Interferon alpha/ Hydroxyurea	Akzeleration
30	+	100%	m	42	Nach allogener Transplantation	Chronische Phase
31	+	28%	m	45	Hydroxyurea	Chronische Phase
32	+	21%	m	42	Hydroxyurea	Chronische Phase
33	+	73%	m	33	Hydroxyurea	Chronische Phase
34	+	60%	w	36	Hydroxyurea	Blastenkrise
				Durchschnittsalter der Patienten: 50,8		

Klinische Daten der 34 CML-Patienten, die zur Untersuchung der mRNA-Expression von Tumor-assoziierten Antigenen herangezogen wurden. Alle Patienten waren BCR-ABL positiv. Die quantitative mRNA-Expression mittels Real-Time RT-PCR wies BCR-ABL/ABL-Quotienten von 6-100% auf (durchschnittlich 61%, Standardabweichung 30,41%). BCR-ABL: Bruchstellenclusterregion-Abelson-Tyrosin-Kinase; CML: chronisch myeloische Leukämie; w: weiblich; m: männlich; mRNA: messenger ribonucleic acid; RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction.

2.2.3 Einwilligungserklärung

Die genannten Proben wurden von Patienten zur Verfügung gestellt, die in der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums Ulm behandelt wurden.
Alle Patienten gaben ihre Einwilligung, ihre Proben zu wissenschaftlichen Zwecken zur Verfügung zu stellen.

2.2.4 Präparation von cDNA

Zur Untersuchung der TAA/LAA-Expression in den Patientenproben mittels RT-PCR wurde die mRNA als Matrix für die Synthese einer komplementären DNA (cDNA) verwendet. Die Herstellung von cDNA erfolgte, um im Vergleich zu mRNA ein wesentlich stabileres Substrat zu erhalten.
Die Gewinnung der RNA aus den gelagerten Proben wurde mit dem Präparationsset RNAeasy Midi-Kit von Miltenyi (s.o.) durchgeführt.
Während der einzelnen Verfahrensschritte bestand die Gefahr einer Verunreinigung der Proben mit RNasen. RNasen sind ubiquitär vorhanden. Daher wurde bei der Aufbereitung durchweg mit Handschuhen gearbeitet und alle Materialien, die RNase-frei sein sollten, direkt den zuvor verschlossenen Orginalverpackungen entnommen.

2.2.4.1 Separation der mRNA

Zunächst wurde das eingefrorene Zellpellet bei Raumtemperatur aufgetaut, im Röhrchen mit 2 ml Ethanol (70%) homogenisiert und anschließend mittels eines Guanidin-Isothiocyanat (GITC)-Lysis-Puffers (2 ml) lysiert. Dieser erste Arbeitsschritt fand wegen des leicht flüchtigen 2-Mercapto-Ethanols unter einer Clean Bench statt.
Die entstandene milchig trübe Lösung wurde in ein spezielles Röhrchen gegeben, das aus dem Präparationsset stammte. Dieses Röhrchen enthielt eine Silikonmembran, die RNA-Anteile aufgrund eines poly(T)-Stranges, an der der poly(A)-Bereich der mRNA endet, zurückbehielt und alle restlichen Bestandteile der Lösung passieren ließ. Dazu mußte das Röhrchen 5 Minuten bei 4.000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert werden.
Danach wurde der abzentrifugierte Überstand verworfen und die zurückbehaltene RNA auf der Membran mit einem RW1-Puffer (im Präparationsset enthalten) gewaschen und nochmals zentrifugiert (siehe oben). Um mögliche DNA-Reste aus dem

gewonnenen RNA-Überstand zu entfernen, wurde 20 µl DNAse zusammen mit 140 µl RDD-Puffer (aus RNase-Free Dnase Set) auf die Membran gegeben. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur erhielt man das gereinigte RNA-Substrat. Zur Entfernung der aufgebrachten DNAse von der Membran erfolgte ein Reinigungsschritt mit 2 ml RW1-Puffer mit 5 Minuten Inkubation und Zentrifugation (s.o.). Nach Abgießen des Überstandes erfolgt ein zweiter und dritter Reinigungsschritt mit jeweils 2,5 ml RPE-Puffer, Zentrifugation (4.000 Umdrehungen/Minute über 5 Minuten) und Verwerfen des Überstandes.
Die RNA-haltige Membran wurde in ein neues Röhrchen (aus dem Präparationsset) gegeben und zweimal mit RNAse-freiem Wasser gespült und zentrifugiert, so dass sich im Überstand schließlich die gewaschene RNA befand. Dieser Überstand umfasste eine Menge von 220 bis 270 µl (je nach Substratmenge). Das genaue Volumen wurde gemessen.
7 µl wurden mit 63 µl destilliertem Wasser verdünnt und mittels eines Photometers quantitativ ausgewertet. Die Photometrie lieferte die Konzentration und den Reinheitsgrad der mRNA. Diese Angaben wurden für die folgende Transkription von mRNA in cDNA benötigt.

2.2.4.2 Transkription der mRNA in cDNA

Das restliche mRNA-Substrat (ca. 200 µl) wurde unter Zugabe von 800 µl Ethanol 100% und 20 µl Kalium-Acetat (pH 5,2) für 30 Minuten bei -80°C inkubiert und schließlich zentrifugiert (14.000 Umdrehungen/Minute über 45 Minuten). Nach dem Dekantieren des Überstandes und erneuter Reinigung mit Ethanol 70% (14.000 Umdrehungen/Minute über 15 Minuten) entstand nach Entfernen des Überstandes und Trocknen des Röhrchens ein Pellet.
Durch Zugabe einer definierten Menge destillierten Wassers wurde das Pellet im Thermomixer bei 37°C innerhalb von 10 Minuten gelöst und nach weiteren 10 Minuten bei 65°C mit einer vorgefertigten Substanz versetzt, die 4 µl RNAsin und 8 µl MMLV-Reverse Transkriptase enthielt. Danach erfolgte ein Inkubationsschritt von 2 Stunden Dauer bei 37°C.
Schließlich erhielt man transkribierte cDNA, die zur Analyse der Antigensequenz verwendet werden konnte.

2.2.5 RT-PCR

2.2.5.1 Vorbereitung der cDNA-Proben

2,0 µg einer jeden mRNA-Probe wurden der cDNA-Synthese unterzogen. Für die PCR wurde eine cDNA-Menge verwendet, die 0,1 µg mRNA entspricht.

2.2.5.2 Durchführung der RT-PCR

Die Polymerasekettenreaktion (engl. Polymerase chain reaction, PCR) ist eine *in vitro*-Technik, mit der man gezielt cDNA-Abschnitte, die von zwei bekannten cDNA-Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigen kann.

Nachdem die PCR sehr kontaminationsanfällig ist, wurden folgende Vorkehrungen zur Vermeidung von falsch positiven Ergebnissen durchgeführt:
Zum Nachweis von Verunreinigungen der Reagenzien und der Spezifität der Reaktion wurde parallel immer eine PCR ohne cDNA (Wasser-/Leerkontrolle) durchgeführt.
Um die Vollständigkeit der PCR-Mischung, den Ablauf und die Empfindlichkeit der Reaktion zu gewährleisten, wurde mRNA von K562-Zellen als Positivkontrolle vorab getestet (ausgenommen NewRen60, bei der die HL-60-Zellreihe und G250, bei der CAKI-1 als Positivkontrolle zur Anwendung kam).
Falsch positive Ergebnisse durch eine Kontamination der DNA konnten durch die Wahl der Primer, die sich in unterschiedlichen Exons befanden, ausgeschlossen werden.

2.2.5.3 RT-PCR für verschiedene TAA/LAA und die Haushaltsgene β-Actin und TBP

BAGE

Ansatz:		
	40 µl	Destilliertes Wasser
	5 µl	PCR-Puffer
	1 µl	Forward primer [10 pmol]
	1 µl	Reward primer [10 pmol]
	1 µl	dNTPs (Desoxnukleosidtrisphosphat) [10 pmol]
	1 µl	TAC-Polymerase [5 units/µl]
	1 µl	Probe

Primer:		
	Antigen:	BAGE (NM_001187.1)
	Forward primer:	5‘ TGG CTC GTC TCA CTC TGG 3‘
	Reverse primer:	5‘ CCT CCT ATT GCT CCT GTT G 3‘

PCR-Bedingungen:

Initiale Denaturierung:	94°C	für 5 Min.
Denaturierung:	95°C	für 1 Min.
Primeranlagerung:	64°C	für 1 Min.
Extension:	72°C	für 1 Min.
Abschließende Extension:	72°C	für 7 Min.
Zyklen:	36	
$MgCl_2$:	1,5 mM	

G250

Ansatz:		
	39 µl	Destilliertes Wasser
	5 µl	PCR-Puffer
	1 µl	$MgCl_2$
	1 µl	Forward primer [10 pmol]
	1 µl	Reward primer [10 pmol]
	1 µl	dNTPs [10 pmol]
	1 µl	TAC-Polymerase [5 units/µl]
	1 µl	Probe

Primer:		
	Antigen:	G250 (NM_0011216.1)
	Forward primer:	5‘ ACT GCT GCT TCT GAT GCC TGT 3‘
	Reverse primer:	5‘ AGT TCT GGG AGC GGC GGG A 3‘

PCR-Bedingungen:

Initiale Denaturierung:	94°C	für 5 Min.
Denaturierung:	95°C	für 1 Min.
Primeranlagerung:	56°C	für 1 Min.
Extension:	72°C	für 1 Min.
Abschließende Extension:	72°C	für 7 Min.
Zyklen:	35	
$MgCl_2$:	2,5 mM	

Anmerkung: Als Positivkontolle wurde cDNA der CAKI-1-Zellreihe verwendet.

hTERT

Ansatz:

39 µl	Destilliertes Wasser
5 µl	PCR-Puffer
1 µl	Forward primer [10 pmol]
1 µl	Reward primer [10 pmol]
1 µl	dNTPs [10 pmol]
1 µl	TAC-Polymerase [5 units/µl]
1 µl	Probe

Primer:	Antigen:	HTERT (NM_003219.1)
	Forward primer:	5‘ CCT CTG TGC TGG GCC TGG ACG ATA 3‘
	Reverse primer:	5‘ ACG GCT GGA GGT CTG TCA AGG TAG 3‘

PCR-Bedingungen:

Initiale Denaturierung:	94°C	für 5 Min.
Denaturierung:	95°C	für 1 Min.
Primeranlagerung:	68°C	für 1 Min.
Extension:	72°C	für 1 Min.
Abschließende Extension:	72°C	für 7 Min.
Zyklen:	35	
$MgCl_2$:	2,5 mM	

MAGE A1

Ansatz:

39 µl	Destilliertes Wasser
5 µl	PCR-Puffer
1 µl	$MgCl_2$
1 µl	Forward primer [10 pmol]
1 µl	Reward primer [10 pmol]
1 µl	dNTPs [10 pmol]
1 µl	TAC-Polymerase [5 units/µl]
1 µl	Probe

Primer:	Antigen:	MAGE A1 (NM_004988.2)
	Forward primer:	5‘CGG CCG AAG GAA CCT GAC CCA G 3‘
	Reverse primer:	5‘GCT GGA ACC CTC ACT GGG TTG CC 3‘

PCR-Bedingungen:

Initiale Denaturierung:	94°C	für 5 Min.
Denaturierung:	95°C	für 1 Min.
Primeranlagerung:	64°C	für 1 Min.
Extension:	72°C	für 1 Min.
Abschließende Extension:	72°C	für 7 Min.
Zyklen:	35	
$MgCl_2$:	1,5 mM	

MPP11

Ansatz:

40 µl	Destilliertes Wasser
5 µl	PCR-Puffer
1 µl	Forward primer [10 pmol]
1 µl	Reward primer [10 pmol]
1 µl	dNTPs [10 pmol]
1 µl	TAC-Polymerase [5 units/µl]
1 µl	Probe

Primer:	Antigen:	MPP11 (X98260)
	Forward primer:	5‘ AAG ATC ATT ATG CAG TTC TTG GAC 3‘
	Reverse primer:	5‘ CCA ATA ACA TCT TTG GCA GTT CT 3‘

PCR-Bedingungen:

Initiale Denaturierung:	94°C	für 5 Min.
Denaturierung:	95°C	für 1 Min.
Primeranlagerung:	60°C	für 1 Min.
Extension:	72°C	für 1 Min.
Abschließende Extension:	72°C	für 7 Min.
Zyklen:	35	
$MgCl_2$:	1,5 mM	

NewRen60

Ansatz:

40 µl	Destilliertes Wasser
5 µl	PCR-Puffer
1 µl	Forward primer [10 pmol]
1 µl	Reward primer [10 pmol]
1 µl	dNTPs [10 pmol]
1 µl	TAC-Polymerase [5 units/µl]
1 µl	Probe

Primer:	Antigen:	NewRen60 (NM_032582.2)
	Forward primer:	5‘ GAA TCG CCC CAG CCT CTT TG 3‘
	Reverse primer:	5‘ ACT CTG CGC ATC CAC TTT CTT CAG 3‘

PCR-Bedingungen:

Initiale Denaturierung:	94°C	für 5 Min.
Denaturierung:	95°C	für 1 Min.
Primeranlagerung:	58°C	für 1 Min.
Extension:	72°C	für 1 Min.
Abschließende Extension:	72°C	für 7 Min.
Zyklen:	35	
$MgCl_2$:	1,5 mM	

Anmerkung: Als Positikontrolle wurde cDNA von HL-60 verwendet.

NY-ESO-1

Ansatz:

40 µl	Destilliertes Wasser
5 µl	PCR-Puffer
1 µl	Forward primer [10 pmol]
1 µl	Reward primer [10 pmol]
1 µl	dNTPs [10 pmol]
1 µl	TAC-Polymerase [5 units/µl]
1 µl	Probe

Primer:	Antigen:	NY-ESO-1 (NM_139250)
	Forward primer:	5' ATG GAT GCT GCA GAT GCG G 3'
	Reverse primer:	5' GGC TTA GCG CCT CTG CCC TG 3'

PCR-Bedingungen:

Initiale Denaturierung:	94°C	für 5 Min.
Denaturierung:	95°C	für 1 Min.
Primeranlagerung:	60°C	für 1 Min.
Extension:	72°C	für 1 Min.
Abschließende Extension:	72°C	für 7 Min.
Zyklen:	35	
$MgCl_2$:	1,5 mM	

PRAME

Ansatz:

40 µl	Destilliertes Wasser
5 µl	PCR-Puffer [10 pmol]
1 µl	Forward primer [10 pmol]
1 µl	Reward primer [10 pmol]
1 µl	dNTPs [10 pmol]
1 µl	TAC-Polymerase [5 units/µl]
1 µl	Probe

Primer:	Antigen:	PRAME (NM_006115)
	Forward primer:	5‘ GTC CTG AGG CCA GCC TAA GT 3‘
	Reverse primer:	5‘ GGA GAG GAG GAG TCT ACG AC 3‘

PCR-Bedingungen:

Initiale Denaturierung:	94°C	für 5 Min.
Denaturierung:	95°C	für 1 Min.
Primeranlagerung:	64°C	für 1 Min.
Extension:	72°C	für 1 Min.
Abschließende Extension:	72°C	für 7 Min.
Zyklen:	35	
$MgCl_2$:	1,5 mM	

Proteinase 3

Ansatz:

40 µl	Destilliertes Wasser
5 µl	PCR-Puffer
1 µl	Forward primer [10 pmol]
1 µl	Reward primer [10 pmol]
1 µl	dNTPs [10 pmol]
1 µl	TAC-Polymerase [5 units/µl]
1 µl	Probe

Primer:		
	Antigen:	Proteinase 3 (NM_002777.2)
	Forward primer:	5‘ ACC TCA GTC CAG CTG CCA 3‘
	Reverse primer:	5‘ GAA AGT GCA AAT GTT ATG 3‘

PCR-Bedingungen:

Initiale Denaturierung:	94°C	für 5 Min.
Denaturierung:	95°C	für 1 Min.
Primeranlagerung:	52°C	für 1 Min.
Extension:	72°C	für 1 Min.
Abschließende Extension:	72°C	für 7 Min.
Zyklen:	35	
$MgCl_2$:	1,5 mM	

RHAMM/CD168

Ansatz:

40 µl	Destilliertes Wasser
5 µl	PCR-Puffer
1 µl	Forward primer [10 pmol]
1 µl	Reward primer [10 pmol]
1 µl	dNTPs [10 pmol]
1 µl	TAC-Polymerase [5 units/µl]
1 µl	Probe

Primer:		
	Antigen:	RHAMM/CD168 (NM_012484.1)
	Forward primer:	5‘ CAG GTC ACC CAA AGG AGT CTC G 3‘
	Reverse primer:	5‘ CAA GCT CAT CCA GTG TTT GC 3‘

PCR-Bedingungen:

Initiale Denaturierung:	94°C	für 5 Min.
Denaturierung:	95°C	für 1 Min.
Primeranlagerung:	60°C	für 1 Min.
Extension:	72°C	für 1 Min.
Abschließende Extension:	72°C	für 7 Min.
Zyklen:	35	
$MgCl_2$:	1,5 mM	

SSX2

Ansatz:

40 µl	Destilliertes Wasser
5 µl	PCR-Puffer
1 µl	Forward primer [10 pmol]
1 µl	Reward primer [10 pmol]
1 µl	dNTPs [10 pmol]
1 µl	TAC-Polymerase [5 units/µl]
1 µl	Probe

Primer:	Antigen:	SSX2 (XM_088714.2)
	Forward primer:	5‘ ATG AAC GGA GAC GAC GCC 3‘
	Reverse primer:	5‘ TGA GGG GAG TTA CTC GTC ATC 3‘

PCR-Bedingungen:

Initiale Denaturierung:	94°C	für 5 Min.
Denaturierung:	95°C	für 1 Min.
Primeranlagerung:	68°C	für 1 Min.
Extension:	72°C	für 1 Min.
Abschließende Extension:	72°C	für 7 Min.
Zyklen:	35	
$MgCl_2$:	1,5 mM	

WT1

Ansatz:

37,5 µl	Destilliertes Wasser
5 µl	PCR-Puffer
1 µl	Forward primer [10 pmol]
1 µl	Reward primer [10 pmol]
1 µl	dNTPs [10 pmol]
1 µl	TAC-Polymerase [5 units/µl]
1 µl	Probe

Primer:	Antigen:	WT1 (NM_000378.2)
	Forward primer:	5‘ ATG AGG ATC CCA TGG GCC AGC A 3‘
	Reverse primer:	5‘ ATG AGG ATC CCA TGG GCC AGC A 3‘

PCR-Bedingungen:

Initiale Denaturierung:	94°C	für 5 Min.
Denaturierung:	95°C	für 1 Min.
Primeranlagerung:	66°C	für 1 Min.
Extension:	72°C	für 1 Min.
Abschließende Extension:	72°C	für 7 Min.
Zyklen:	35	
$MgCl_2$:	1,5 mM	

Haushaltsgene:

TBP

Ansatz:

40 µl	Destilliertes Wasser
5 µl	PCR-Puffer
1 µl	Forward primer [10 pmol]
1 µl	Reward primer [10 pmol]
1 µl	dNTPs [10 pmol]
1 µl	TAC-Polymerase [5 units/µl]
1 µl	Probe

Primer:	Antigen:	TBP (NM_003194.2)
	Forward primer:	5‘CAC GAA CCA CGG CAC TGA TT 3‘
	Reverse primer:	5‘TTT TCT TGC TGC CAG TCT GGA C 3‘

PCR-Bedingungen:

Initiale Denaturierung:	94°C	für 5 Min.
Denaturierung:	95°C	für 1 Min.
Primeranlagerung:	60°C	für 1 Min.
Extension:	72°C	für 1 Min.
Abschließende Extension:	72°C	für 7 Min.
Zyklen:	40	
$MgCl_2$:	1,5 mM	

β-Actin

Ansatz:

40 µl	Destilliertes Wasser
5 µl	PCR-Puffer
1 µl	Forward prime [10 pmol]r
1 µl	Reward primer [10 pmol]
1 µl	dNTPs [10 pmol]
1 µl	TAC-Polymerase [5 units/µl]
1 µl	Probe

Primer:	Antigen:	ß-Actin (XM_037235)
	Forward primer:	5‘ GCA TCG TGA TGG ACT CCG 3‘
	Reverse primer:	5‘ GCT GGA AGG TGG ACA GCG A 3‘

PCR-Bedingungen:

Initiale Denaturierung:	94°C	für 5 Min.
Denaturierung:	95°C	für 1 Min.
Primeranlagerung:	68°C	für 1 Min.
Extension:	72°C	für 1 Min.
Abschließende Extension:	72°C	für 7 Min.
Zyklen:	23	
$MgCl_2$:	1,5 mM	

2.2.5.4 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese stellt eine einfache Möglichkeit dar, die Endprodukte der PCR, die sogenannten Amplikons, mittels elektrophoretischer Auftrennung der Nukleinsäuren nachzuweisen.

Zugabe von 2 g LE Agarose-Puder zu 100 ml TBE-Puffer und anschließendes Erhitzen in der Mikrowelle für 2 Minuten ergab ein flüssiges Gel, das in den Gelträger mit einem Kamm gegossen wurde. Nach dem Abkühlen des Gels und Entfernen des Kammes konnte das Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer gegeben werden. Die Geltaschen wurden mit einem vorgemischten Substrat befüllt, welches aus 7 µl des PCR-Produkts und 3 µl eines Loadingbuffers bestand. Außerdem wurde eine zweite Tasche mit 7 µl destilliertem Wasser und 3 µl Loadingbuffer als Negativkontrolle und eine dritte Tasche mit 7 µl des K562-PCR-Produktes und 3 µl Loadingbuffer als Positivkontrolle gefüllt.
Die beiden äußersten Taschen enthielten jeweils 3 µl eines Molekulargewichtmarkers (Leiter) für 2%iges Agarose-Gel.
Nach Anlegen einer Spannung von 100 Volt waren nach ca. 1 Stunde die Amplikons aufgetrennt. Zur Darstellung des Ergebnisses wurde für 20 Minuten die Gelplatte in ein Bad mit Ethidiumbromid (ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert) gelegt. Danach konnten die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht und mittels des Eagle-Eye der Fa. Stratagene abgebildet werden.
Die Expression der zu untersuchenden Gene wurde anhand der digitalisierten Bilder in folgende Kategorien unterteilt:

+ m-RNA-Expression des gesuchten Antigens
- keine nachweisbare mRNA-Expression des gesuchten Antigens

2.2.6 Real-time RT-PCR für BCR-ABL und ABL

Die quantitative Auswertung der mRNA-Expression von BCR-ABL und ABL in den verwendeten Proben erfolgte im Rahmen der klinischen Diagnostik. Dabei wurde für die real-time RT-PCR die “SYBR Green I technology” am Light Cycler® angewandt. Gemäß den Herstellervorgaben [27, 101] wurden die Primer 5’ TTC AGA AGC TTC TCC CTG ACA T 3’ und 5’ CGG CTC TCG GAG GAG ACG TAG A 3’ für die BCR-ABL Transkription p210 und die Primer 5’ CAG ATC TGG CCC AAC GAT GG 3’ und 5’ CCC AAC CTT TTC GTT GCA CTG T 3’ für die BCR-ABL Transkription p190 [27] benutzt. Die initiale Denaturierung erfolgte bei 95 °C für 1 Minute, mit 45 Zyklen 1 Sek. bei 95°C, 10 Sek. bei 64°C, 26 Sek. bei 72°C für BCR-ABL Transkription p210. Für die BCR-ABL Transkription von p190 wurde initial bei 95 °C für 1 Minute denaturiert, dann 45 Zyklen 1 Sek. bei 95°C, 10 Sek. bei 64°C und 26 Sek. bei 72°C.
Für die RT-PCR wurde 0,1 µg mRNA verwendet. Um die mRNA-Expression von BCR-ABL zu quantifizieren, verglich man die Expression der BCR-ABL-Gene der Proben mit der mRNA Expression des ABL-Gens [27] und errechnete die Ratio BCR-ABL versus ABL.

2.2.7 Nested RT-PCR für das BCR-ABL-Gen

Durch die so genannte Nested-PCR, d.h. eine verschachtelte PCR, erhöhen sich die Empfindlichkeit und Spezifität der DNA-Vervielfältigung.
Bei diesem Verfahren hybridisieren die Primer der Nested-PCR innerhalb eines Abschnittes des ersten Primerpaares. Damit dient das DNA-Molekül, das in der ersten PCR amplifiziert wurde, als Template für die zweite PCR.
Bei Proben, die sich nach real-time PCR als BCR-ABL negativ erwiesen, wurde die nested RT-PCR (p210) mit folgenden Primern durchgeführt: 5' GAG CGT GCA GAG TGG AGG GAG AAC A 3' und 5' GGT ACC AGG AGT GTT TCT CCA GAC TG 3' für die erste Runde und den Primer 5' TTC AGA AGC TTC TCC CTG ACA T 3' und 5' TGT TGA CTG GCG TGA TGT AGT TGC TTG G 3' für die nested RT-PCR. Initiale Denaturierung bei 95°C für 1 Minute, anschließend 30 Zyklen, 60 Sek. bei 95°C, 50 Sek. bei 64°C, 60 Sek. bei 72°C für die PCR 1. Initiale Denaturierung bei 95°C für 1 Minute, dann 35 Zyklen 60 Sek. bei 95°C, 50 Sek. bei 64°C, 60 Sek. bei 72°C für die nested RT-PCR (PCR 2). Dabei wurde 0,1 µg mRNA verwendet.

2.2.8 Real-time RT-PCR für die TAA RHAMM/CD168, PRAME und WT1

Zur Messung der mRNA-Expression von RHAMM/CD168, PRAME und WT1 in den CML-Proben, wurde die Methode der real-time RT-PCR mittels der “SYBR Green I technology” mit dem Light Cycler® angewandt. Dabei wurde nach folgendem Protokoll des Herstellers verfahren und die oben aufgeführten Primer verwendet:

Antigen RHAMM/CD168:

Denaturierung:	95°C	für 15 Sek.
Primeranlagerung:	62°C	für 10 Sek.
Extension:	72°C	für 40 Sek.
Zyklen:	45	
$MgCl_2$:	3 mM	

Antigen PRAME:

Denaturierung:	95°C	für 20 Sek.
Primeranlagerung:	64°C	für 10 Sek.
Extension:	72°C	für 40 Sek.
Zyklen:	40	
$MgCl_2$:	2,5 mM	

Antigen WT-1:

Denaturierung:	95°C	für 15 Sek.
Primeranlagerung:	62°C	für 10 Sek.
Extension:	72°C	für 22 Sek.
Zyklen:	45	
$MgCl_2$:	2,25 mM	

Zur Etablierung des Standards für die quantitative RT-PCR von RHAMM/CD168, PRAME und WT1 wurde eine konventionelle PCR für das entsprechende Antigen durchgeführt und das cDNA-Produkt photometrisch ermittelt. Eine Verdünnungsreihe der cDNA wurde einer PCR unterzogen, um die Standardkurven zu ermitteln. Für die Berechnung der mRNA-Expression der Antigene wurde die mRNA-Menge des jeweiligen Antigens auf 1 pg des House-keeping-Gens “TATA-box binding protein” (TBP), von dem bislang keine Pseudo-Retrogene bekannt sind, bezogen [5].

2.2.9 Selektion der BCR-ABL-positiven CML-Zellen

2.2.9.1 Vorbereitung der Proben

Die Gewinnung der mononuklären Zellen (PBMC) erfolgte mittels Ficoll-Separation.

Die so gewonnenen Monozyten und Lymphozyten wurden anschließend in einem Kulturmedium (RPMI-1640 + 1% Penicillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, 20% Serum der Blutgruppe AB und 10% DMSO) bei -196°C gelagert.

2.2.9.2 Immunomagnetische Separation

Um Zellen mit bestimmten Oberflächenmerkmalen (CD, sogenannte „clusters of differentiation“) selektiv aus einer Probe zu erhalten, wurde den Zellen ein mit einem Metallmolekül beladener Antikörper, der an das gewünschte Oberflächenprotein binden konnte, zugegeben. Mittels eines Magneten konnten anschließend die metallmarkierten Zellen separiert werden.

Zur Separation der mononukleären Zellen nach verschiedenen CD-Antigenen an der Oberfläche wurde ein immunomagnetisches Verfahren mittels Separationssäulen verwendet (Fa. Miltenyi Biotec, Deutschland).

Hierzu wurde das eingefrohrene Zellsubstrat (s.o.) innerhalb von 2 Minuten in einem 37°C warmen vorgeheizten Wasserbad aufgetaut und mit einer X-Vivo-10-Lösung gespült, um ein DMSO-freies Substrat zu erhalten. Nach Zentrifugation (1.300 Umdrehungen/Minute für 5 Minuten) konnte man die Spüllösung inklusive der verbliebenen Nährstoff-Lösung dekantieren.

Nach Zugabe des Separationspuffers wurde durch Aufschütteln des Zellpellets eine zellklumpenfreie Suspension angefertigt.

Die Zählung der vorhandenen Zellen im aufbereiteten Substrat wurde unter dem Mikroskop in der Neubauer-Zählkammer unter Anfärbung der Zellen mit Trypanblau durchgeführt. Sollten in dem Substrat zu viele Erythrozyten verblieben sein, kann durch eine Färbung mit Türklösung eine Lyse der Erythrozyten und eine Anfärbung der Zellkerne der mononukleären Zellen erreicht werden. Die verwendete Menge kann laut Herstellerangaben der Säulen eine Zellmenge von bis zu 1 x 10^7 Zellen aufweisen.

Nach nochmaliger Zentrifugation (1.300 Umdrehungen/Minute für 5 Minuten) und nach dem Dekantieren wurden einer Zellzahl von 1 x 10^7 Zellen eine Menge von 80 µl Separationspuffer und 20 µl MicroBeads® (Lösung mit den Metall-gekoppelten Antikörpern, die an das gewünschte Oberflächenprotein binden) zugeführt. Dieses Gemisch wurde bei 4°C für 15 Minuten inkubiert.

Nach einem weiteren Waschschritt der inkubierten Lösung (2 ml Separationspuffer, 10 Minuten bei 1.300 Umdrehungen/Minute zentrifugiert) wurde 500 µl Separationspuffer ergänzt und erneut aufgeschüttelt. Hierbei durfte sich in der Lösung keine Verklumpung finden lassen.

Die Separationssäule, die sich in einem Dauermagneten befand, wurde von oben zunächst mit 500 µl Separationspuffer vorgespült. Anschließend ließ man 500 µl des Zellsubstrats hindurchfließen. In der aufgefangenen Flüssigkeit befanden sich nun jene Zellen, die *kein* gesuchtes Oberflächenmarkerprotein präsentierten.

Nach dreimaligem Ausspülen der Säule, die sich nun nicht mehr im Magneten befand und nach Auspressen der verbliebenen Flüssigkeit in der Säule mittels eines Stempels (im Set enthalten), erhielt man als Eluat jene Zellen, die den gesuchten CD-Rezeptor aufwiesen. Dieses Substrat wurde mit RPMI angereichert, um den Zellen Nährstoffe zuzuführen. Die Zellen wurden nochmals gewaschen, um den Separationspuffer zu entfernen und schließlich mit Trypanblau gefärbt und mikroskopisch ausgezählt (siehe oben).

In diesem Fall wurde nun aus einer Probe mittels des oben beschriebenen Selektionsverfahrens CD34 positive CML-Zellen separiert. Die durchflusszytometrische Analyse (fluorescence associated cell sorting, FACS), bei der Phycoerythrin (PE) gekoppelte Anti-CD34-Antikörper (Becton & Dickinson, Heidelberg, Germany) verwendet wurden, zeigte einen über 90%-igen Reinheitsgrad der gewonnenen Probe.

Um die mRNA-Expression von LAA in maturen BCR-ABL positiven Zellen nachzuweisen, selektierten wir CML-abgeleitete BCR-ABL positive Zelltypen mit den Oberflächenmolekülen CD34, CD66b, CD14 und CD8 mittels des immunomagnetischen Verfahrens.

Die quantitative mRNA-Expression des BCR-ABL-Gens ergab einen BCR-ABL/ABL-Quotienten von 100% in den Proben der CML-Patienten, die für diese Zellselektion herangezogen wurden. Damit waren alle untersuchten Zellen klonale Leukämiezellen. Die mRNA wurde nach vorbeschriebenem Schema (s.o.) aufbereitet. Alle Proben wurden auf die mRNA-Expression der oben beschriebenen LAA mittels RT-PCR untersucht.

2.2.10 Immunophänotypisierung von CD34 positiven CML-Zellen auf HLA- und kostimulatorische Moleküle

Die Immunphänotypisierung wurde an CD34 positiven Zellen durchgeführt, die in der quantitativen RT-PCR 100% BCR-ABL positiv waren. Die Zellen wurde mit Hilfe der multiparametrischen Durchflusszytometrie (FACS) untersucht und sowohl im Vorwärts-(FSC) und Seitwärtsstreulicht (SSC) als auch im Zweifarben-Fluoreszenz-Verfahren gemessen. Zur Verwendung kam das Durchflusszytometer FACSCalibur™ (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) mit einer Rechnereinheit. Das Softwareprogramm CellQuest™ derselben Firma wurde zur Messung und Auswertung verwendet. Zehn CD34 positive Proben von CML-Patienten wurden untersucht.

Doppelfärbung der Proben (double staining):

Nach Abfüllen des Volumens mit der gewünschten Zellzahl in ein Falcon-Röhrchen wurde dieses für 5 Minuten bei 1.200 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das Sediment in 5 ml PBS resuspendiert. Nach nochmaligem Waschen wurde das Sediment entsprechend dem Volumen der bereitgestellten Röhrchen resuspendiert und aufgeteilt.

Es folgen zwei weitere Waschschritte mit PBS. Beim letzten Waschschritt wurden 50–100 µl PBS wegen der nun folgenden Antikörperzugabe in den Probenröhrchen belassen.

Die erste Färbung des double staining erfolgte durch Zugabe von jeweils 10 µl der Phycoerythrin(PE)-gefärbten Antikörper CD33, CD40, CD80, CD83, CD86, HLA-ABC und HLA-DR in jeweils ein Röhrchen und Inkubation für 20 Minuten auf Eis in einem lichtgeschützten Behälter.

Bei der zweiten Färbung wurde nach kurzem Mischen 10 µl der FITC (Fluoro-Isothiozyanat)-gefärbten Antikörper CD34 in jedes Röhrchen gegeben und erneut für 20 Minuten inkubiert, entsprechend den Bedingungen wie sie bei der ersten Färbung beschrieben wurden.

Nach Abschluss der Doppelfärbung wurden die Proben erneut gemischt und anschließend zweimal mit jeweils etwa 1 ml PBS gewaschen. Die Sedimente wurden dann in 500 µl PBS resuspendiert und in FACS-Röhrchen pipettiert, die mit 2 ml PBS befüllt waren.

Anschließend wurde ein letztes Mal bei 1.200 Umdrehungen/Minute zentrifugiert und die Sedimente in 300 µl resuspendiert, um sie dann auf Eis und unter Lichtabschirmung zur durchflusszytometrischen Untersuchung bereitzustellen.
Da die Anti-HLA-A2-Antikörper nicht an PE konjugiert waren, musste man im Anschluss an die Färbung eine Inkubation mit einem PE-konjugierten Sekundär-Antikörper (Ziege-Anti-Maus-Immunglobulin-PE) (DAKO Diagnostics, Hamburg) durchführen:
Zuerst wurden die Zellen mit dem Primär-Antikörper HLA-A2 (Verdünnung 1:20) und CD34-FITC inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-Immunglobulin-PE.
Zur Messung lag die zu untersuchende Leukozytensuspension in einer Konzentration von etwa 10.000.000 Zellen/l (10.000 Zellen/ml) in einem Probenröhrchen vor. Die Zellen wurden nun einer FACS-Analyse unterzogen. Zur Analyse wurde die Zellsuspension über eine Stahlkapillare durch Überdruck in eine Messkammer eingeführt. Um die Messkonstanz zu gewährleisten, erfolgte vor jeder Inbetriebnahme des Zytometers eine Überprüfung der Gerätefunktion und Messempfindlichkeit mittels eines standardisierten Testprogrammes (Autocomp, Becton Dickinson).
Geräteeinstellung: Die Probendurchflussgeschwindigkeit wurde auf 12 µl/Minuten festgelegt. Hierbei wurden zwischen 500 und 1.000 Zellen/Sek. analysiert. Pro Einzelmessung wurden 10.000 Ereignisse („counts“) untersucht.
Zur Festlegung der Obergrenze der unspezifischen bzw. Autofluoreszenz dienten fluoreszenzmarkierte, mit Oberflächenantigenen nicht reagierende Antikörper (Mouse-FITC, Mouse-PE) der gleichen Isotypen (IgG-Klasse) als Negativkontrolle.
Anschließend erfolgte die elektronische Aufarbeitung des gewonnenen Datenmaterials mittels der CellQuest™-Software (Becton Dickinson).
Dabei wurden alle Zellen als korrelierte Zweiparameterdarstellung im so genannten „Dot Plot“ dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 mRNA-Expressionsanalyse von TAA/LAA

Anhand der Proben von 34 CML-Patienten (Tab.1) konnten wir die mRNA-Expression von acht verschiedenen Antigenen nachweisen. Die Abbildungen 2-15 zeigen auszugsweise die Expressionsauswertung der TAA/LAA RHAMM/CD168, WT1, PRAME, hTERT, G250, Proteinase 3 und MPP11. In Tabelle 2 und 3 finden sich die Ergebnisse in der Übersicht, aufgegliedert nach Patienten in der chronischen (Tab. 2) und in der akzelerierten Phase bzw. Blastenkrise (Tab. 3). Folgende Antigene mit bekannter Expression bei anderen Leukämieformen (AML oder Leukämiezelllinien) zeigten keine mRNA-Expression bei den verwendeten CML-Proben:
Für das Antigen NY-ESO-1 konnte keine mRNA-Expression in sämtlichen CML-Zellen nachgewiesen werden. Auch die TAA SSX2, MAGE A1 und BAGE, die sich nur in der Positivkontrolle der Leukämiezellinie K562 fanden, waren in den Proben der CML-Patienten negativ.
Im Gegensatz dazu ergab die mRNA-Expressionsanalyse der anderen untersuchten Antigene positive Befunde: das Antigen G250 war bei 8 von 34 (24%) und hTERT bei 18 von 34 (53%) der CML-Patienten zu detektieren. MPP11 konnte in der K562-Zellreihe, die als Positiv-Kontrolle diente, und in allen weiteren von uns untersuchten Leukämie-Zellinien dargestellt werden. 31 von 34 (91%) der CML-Patienten zeigten eine deutliche mRNA-Expression des Antigens MPP11. Bei dem Antigen NewRen60 waren 32 der 34 Patientenproben (94%) und alle Leukämie-Zellinien positiv. PRAME wies eine positive mRNA-Expression bei 21 von 34 Proben (62%) auf und das Antigen Proteinase 3 war bei 24 von 34 Proben (71%) zu finden. RHAMM/CD168 war bei 28 von 34 Patienten (83%) exprimiert. Das Antigen WT1 war ebenfalls in einer höheren Frequenz bei AML-Patienten nachweisbar: In der vorliegenden Arbeit zeigten 18 der 34 CML-Patienten (53%) eine mRNA-Expression von WT1.

Gelelektrophoresebanden des Antigens RHAMM/CD168:

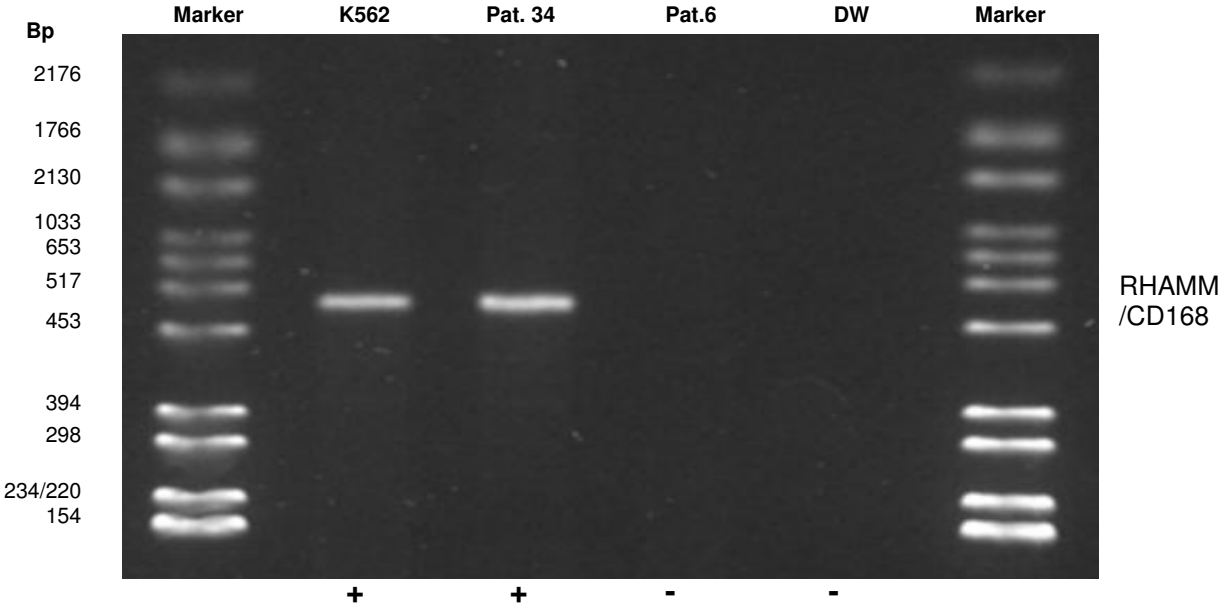


Abb. 2: Gelelektrophorese einer RT-PCR des Antigens RHAMM/CD168. Die Abbildung zeigt die Positivkontrolle K562, die Probe eines exemplarischen CML-Patienten mit positiver Expression (Patient 34), einen Patienten ohne Expression (Patient 6) und die Negativkontrolle (demineralisiertes Wasser DW). Links und rechts sind die Molekulargewichtsmarker („Marker“) aufgetragen. Skalierung in Basenpaaren (Bp). RHAMM/CD168 war bei 28 von 34 CML-Patienten (83%) exprimiert. RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction.

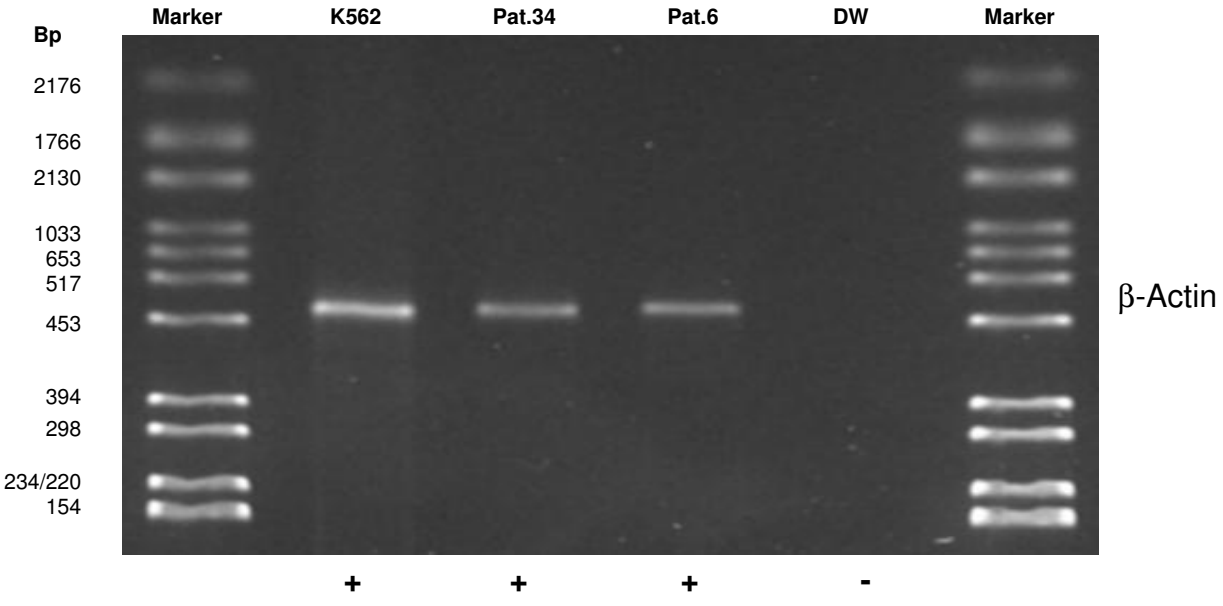


Abb. 3: Gelelektrophorese einer RT-PCR des Antigens β-Actin der o.g. Patienten als Positivkontrolle. Die Abbildung zeigt die Positivkontrolle K562, die Probe eines exemplarischen CML-Patienten mit positiver Expression (Patient 34), einen Patienten ohne Expression (Patient 6) und die Negativkontrolle (demineralisiertes Wasser DW). Links und rechts sind die Molekulargewichtsmarker („Marker“) aufgetragen. Skalierung in Basenpaaren (Bp). RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction.

Gelelektrophoresebanden des Antigens WT1:

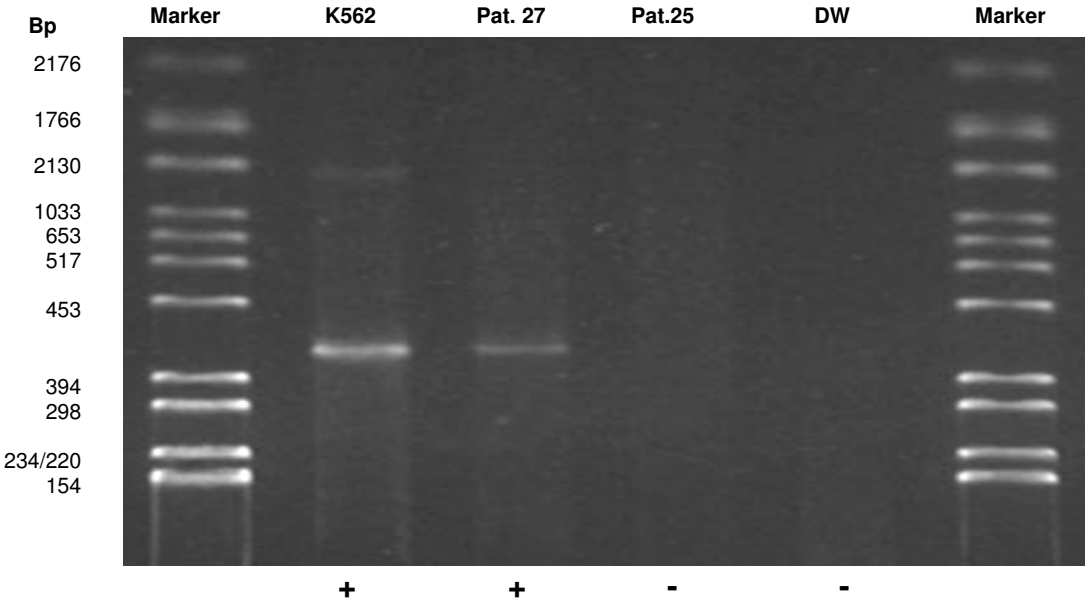


Abb. 4: Gelelektrophorese einer RT-PCR des Antigens WT1. Die Abbildung zeigt die Positivkontrolle K562, die Probe eines exemplarischen CML-Patienten mit positiver Expression (Patient 27), einen Patienten ohne Expression (Patient 25) und die Negativkontrolle (demineralisiertes Wasser DW). Links und rechts sind die Molekulargewichtsmarker („Marker“) aufgetragen. Skalierung in Basenpaaren (Bp). WT1 war bei 18 von 34 CML-Patienten (53%) exprimiert. RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction.

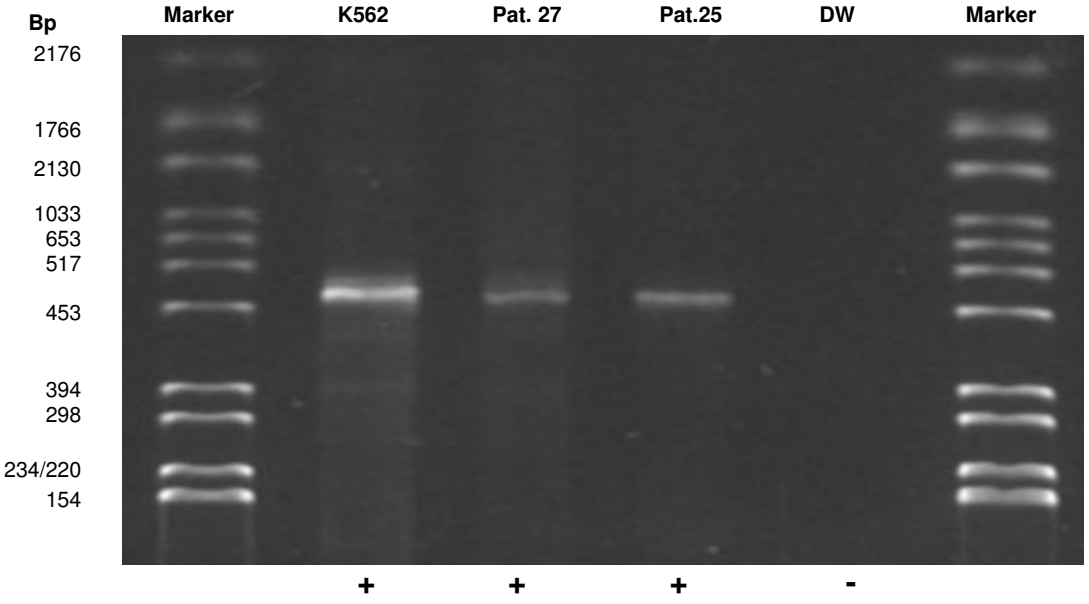


Abb. 5: Gelelektrophorese einer RT-PCR des Antigens β-Actin der o.g. Patienten als Positivkontrolle. Die Abbildung zeigt die Positivkontrolle K562, die Probe eines exemplarischen CML-Patienten mit positiver Expression (Patient 27), einen Patienten ohne Expression (Patient 25) und die Negativkontrolle (demineralisiertes Wasser DW). Links und rechts sind die Molekulargewichtsmarker („Marker“) aufgetragen. Skalierung in Basenpaaren (Bp). RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction.

Gelelektrophoresebanden des Antigens PRAME:

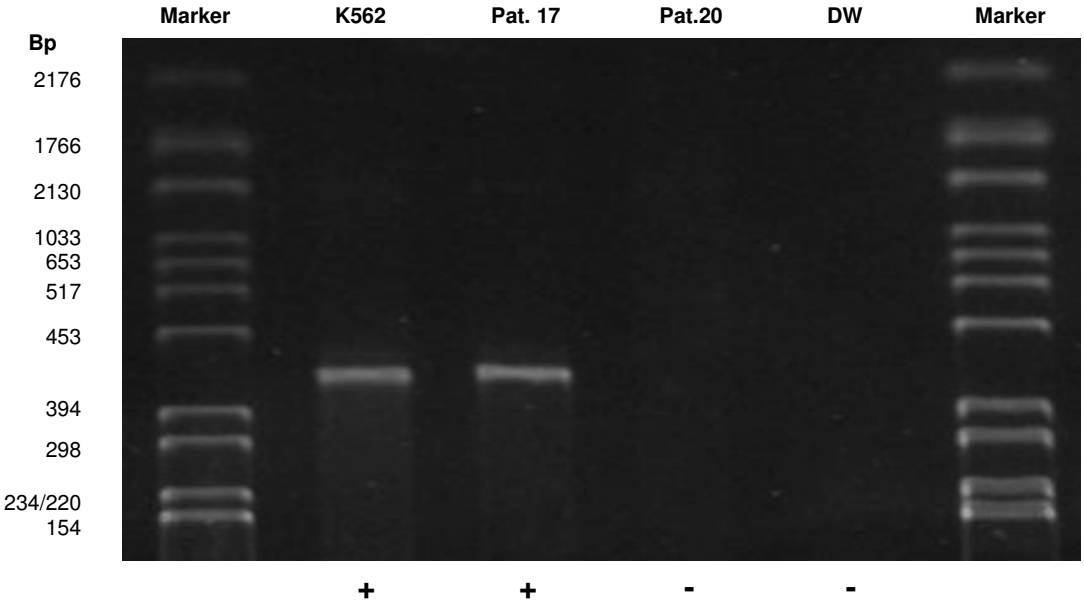


Abb. 6: Gelelektrophorese einer RT-PCR des Antigens PRAME. Die Abbildung zeigt die Positivkontrolle K562, die Probe eines exemplarischen CML-Patienten mit positiver Expression (Patient 17), einen Patienten ohne Expression (Patient 20) und die Negativkontrolle (demineralisiertes Wasser DW). Links und rechts sind die Molekulargewichtsmarker („Marker“) aufgetragen. Skalierung in Basenpaaren (Bp). PRAME war bei 21 von 34 CML-Patienten (62%) exprimiert. RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction.

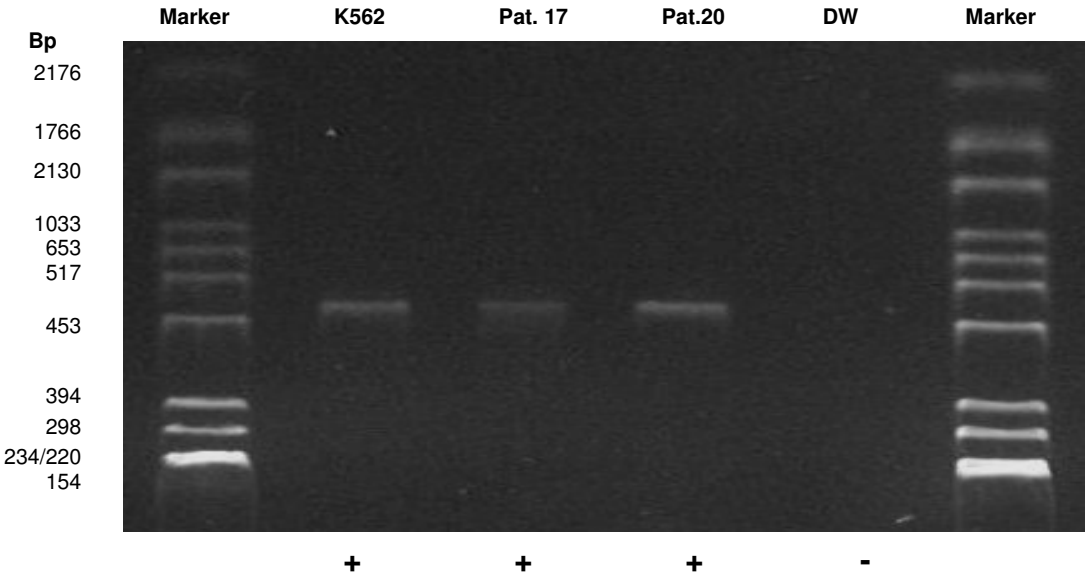


Abb. 7: Gelelektrophorese einer RT-PCR des Antigens β-Actin der o.g. Patienten als Positivkontrolle. Die Abbildung zeigt die Positivkontrolle K562, die Probe eines exemplarischen CML-Patienten mit positiver Expression (Patient 17), einen Patienten ohne Expression (Patient 20) und die Negativkontrolle (demineralisiertes Wasser DW). Links und rechts sind die Molekulargewichtsmarker („Marker“) aufgetragen. Skalierung in Basenpaaren (Bp). RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction.

Gelelektrophoresebanden des Antigens hTERT:

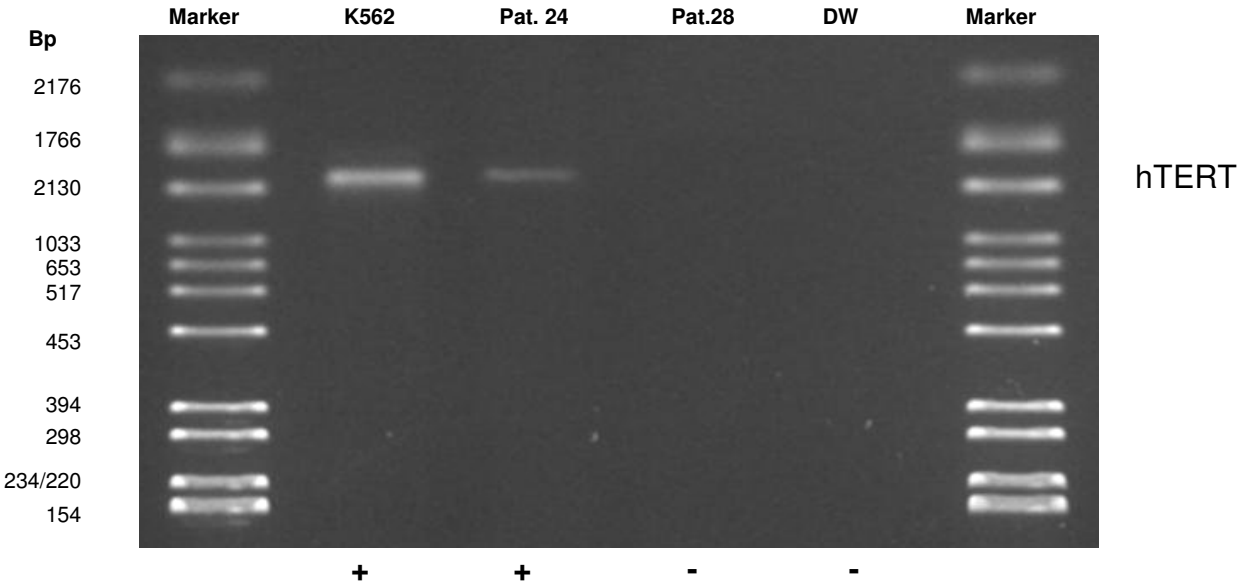


Abb. 8: Gelelektrophorese einer RT-PCR des Antigens hTERT. Die Abbildung zeigt die Positivkontrolle K562, die Probe eines exemplarischen CML-Patienten mit positiver Expression (Patient 24), einen Patienten ohne Expression (Patient 28) und die Negativkontrolle (demineralisiertes Wasser DW). Links und rechts sind die Molekulargewichtsmarker („Marker“) aufgetragen. Skalierung in Basenpaaren (Bp). hTERT war bei 18 von 34 CML-Patienten (53%) exprimiert. RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction.

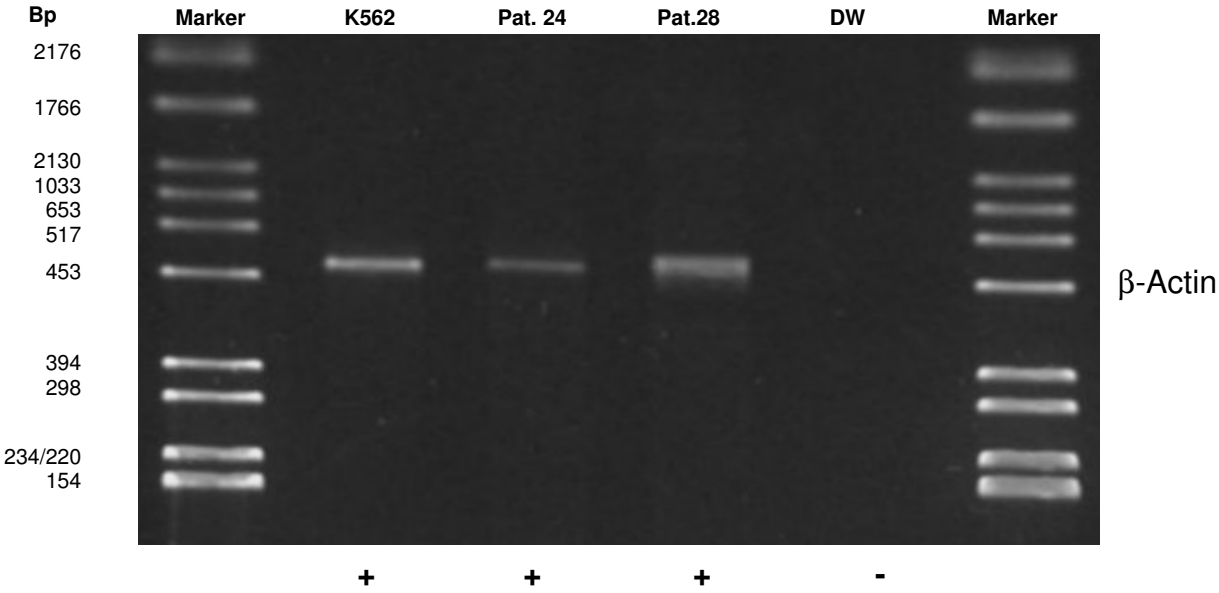
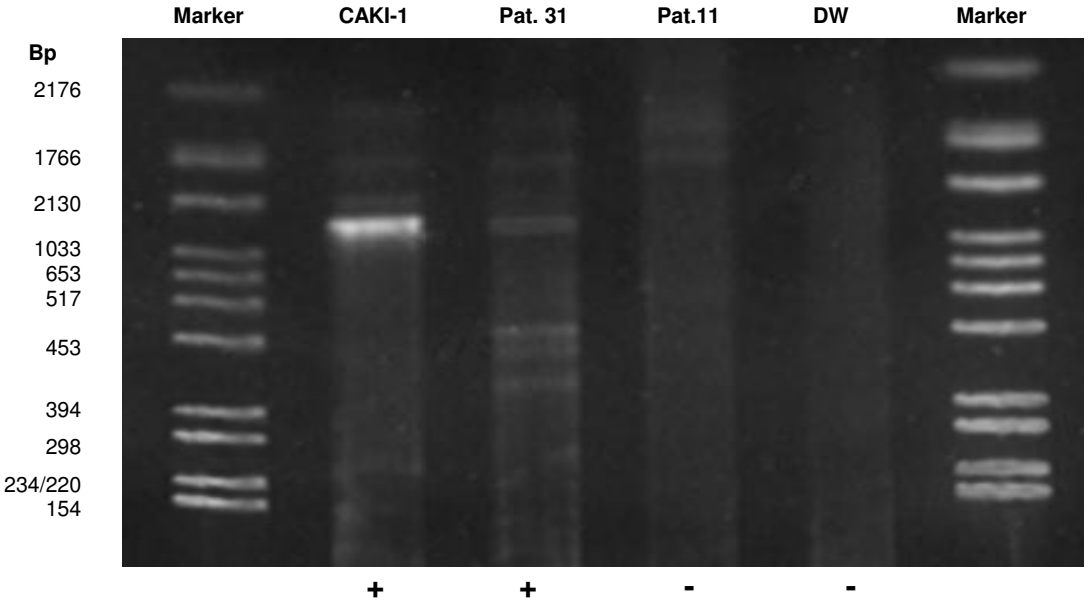


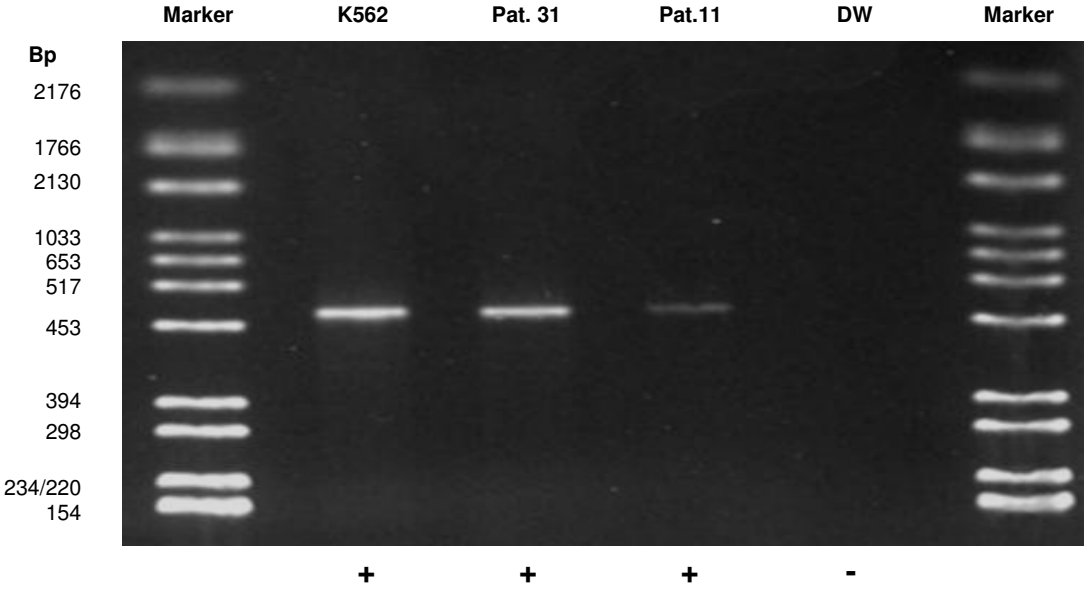
Abb. 9: Gelelektrophorese einer RT-PCR des Antigens β-Actin der o.g. Patienten als Positivkontrolle. Die Abbildung zeigt die Positivkontrolle K562, die Probe eines exemplarischen CML-Patienten mit positiver Expression (Patient 24), einen Patienten ohne Expression (Patient 28) und die Negativkontrolle (demineralisiertes Wasser DW). Links und rechts sind die Molekulargewichtsmarker („Marker“) aufgetragen. Skalierung in Basenpaaren (Bp). RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction.

Gelelektrophoresebanden des Antigens G250:



G250

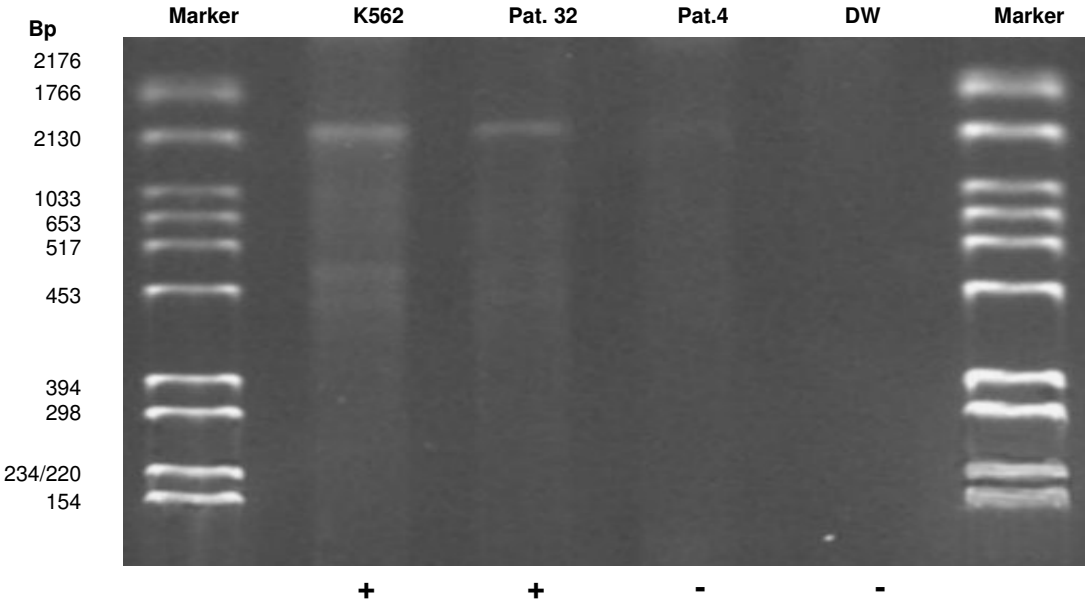
Abb. 10: Gelelektrophorese einer RT-PCR des Antigens G250. Die Abbbildung zeigt die Positivkontrolle CAKI-1, die Probe eines exemplarischen CML-Patienten mit geringer positiver Expression (Patient 31), einen Patienten ohne Expression (Patient 11) und die Negativkontrolle (demineralisiertes Wasser DW). Links und rechts sind die Molekulargewichtsmarker („Marker“) aufgetragen. Skalierung in Basenpaaren (Bp). G250 war bei 8 von 34 CML-Patienten (24%) exprimiert. RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction.



β-Actin

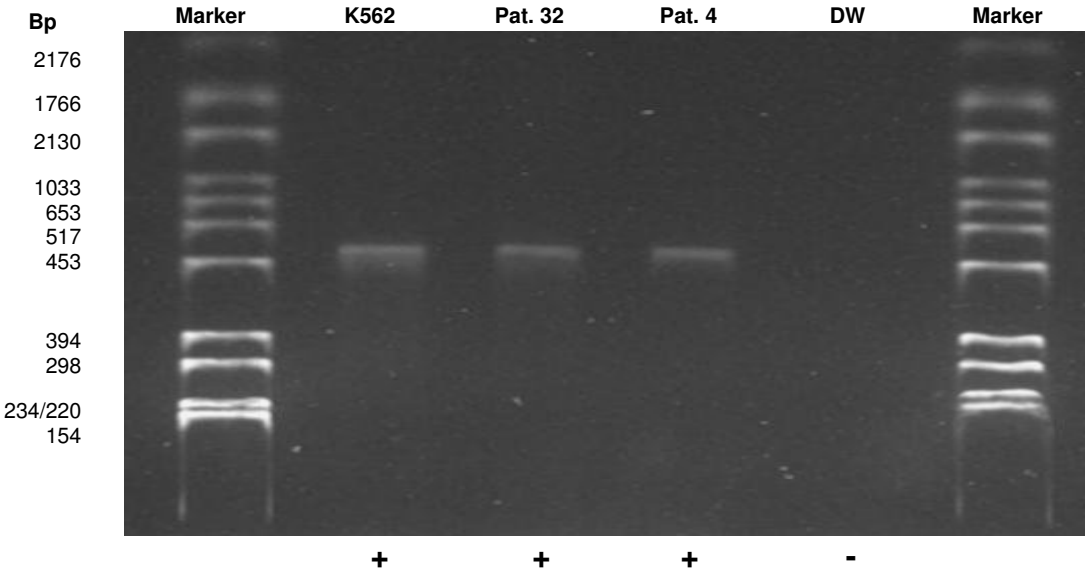
Abb. 11: Gelelektrophorese einer RT-PCR des Antigens β-Actin der o.g. Patienten als Positivkontrolle. Die Abbildung zeigt die Positivkontrolle K562, die Probe eines exemplarischen CML-Patienten mit positiver Expression (Patient 31), einen Patienten ohne Expression (Patient 11) und die Negativkontrolle (demineralisiertes Wasser DW). Links und rechts sind die Molekulargewichtsmarker („Marker“) aufgetragen. Skalierung in Basenpaaren (BP). RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction.

Gelelektrophoresebanden des Antigens Proteinase 3:



Proteinase 3

Abb. 12: Gelelektrophorese einer RT-PCR des Antigens Proteinase 3. Die Abbildung zeigt die Positivkontrolle K562, die Probe eines exemplarischen CML-Patienten mit positiver Expression (Patient 32), einen Patienten ohne Expression (Patient 4) und die Negativkontrolle (demineralisiertes Wasser DW). Links und rechts sind die Molekulargewichtsmarker („Marker“) aufgetragen. Skalierung in Basenpaaren (Bp). Proteinase 3 war bei 24 von 34 CML-Patienten (71%) exprimiert. RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction.



β-Actin

Abb. 13: Gelelektrophorese einer RT-PCR des Antigens β-Actin der o.g. Patienten als Positivkontrolle. Die Abbildung zeigt die Positivkontrolle K562, die Probe eines exemplarischen CML-Patienten mit positiver Expression (Patient 32), einen Patienten ohne Expression (Patient 4) und die Negativkontrolle (demineralisiertes Wasser DW). Links und rechts sind die Molekulargewichtsmarker („Marker“) aufgetragen. Skalierung in Basenpaaren (Bp). RT-PCR: Reverse transcriptase polymerase chain reaction.

Gelelektrophoresebanden des Antigens MPP11:

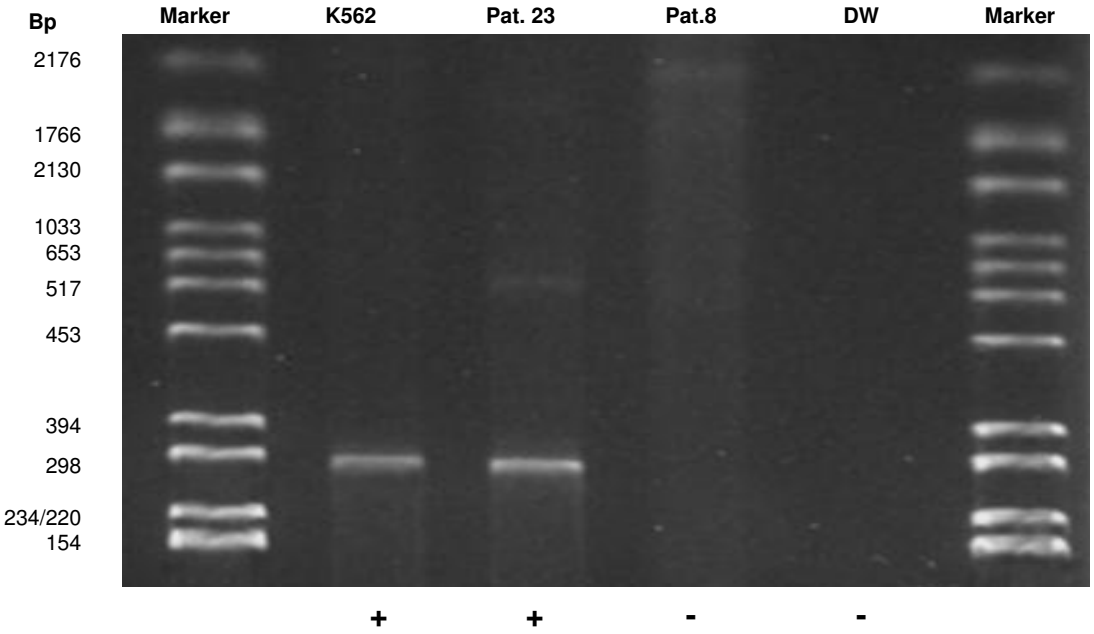


Abb. 14: Gelelektrophorese einer RT-PCR des Antigens MPP11. Die Abbildung zeigt die Positivkontrolle K562, die Probe eines exemplarischen CML-Patienten mit positiver Expression (Patient 23), einen Patienten ohne Expression (Patient 8) und die Negativkontrolle (demineralisiertes Wasser DW). Links und rechts sind die Molekulargewichtsmarker („Marker“) aufgetragen. Skalierung in Basenpaaren (BP). MPP11 war bei 31 von 34 CML-Patienten (91%) exprimiert. RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction.

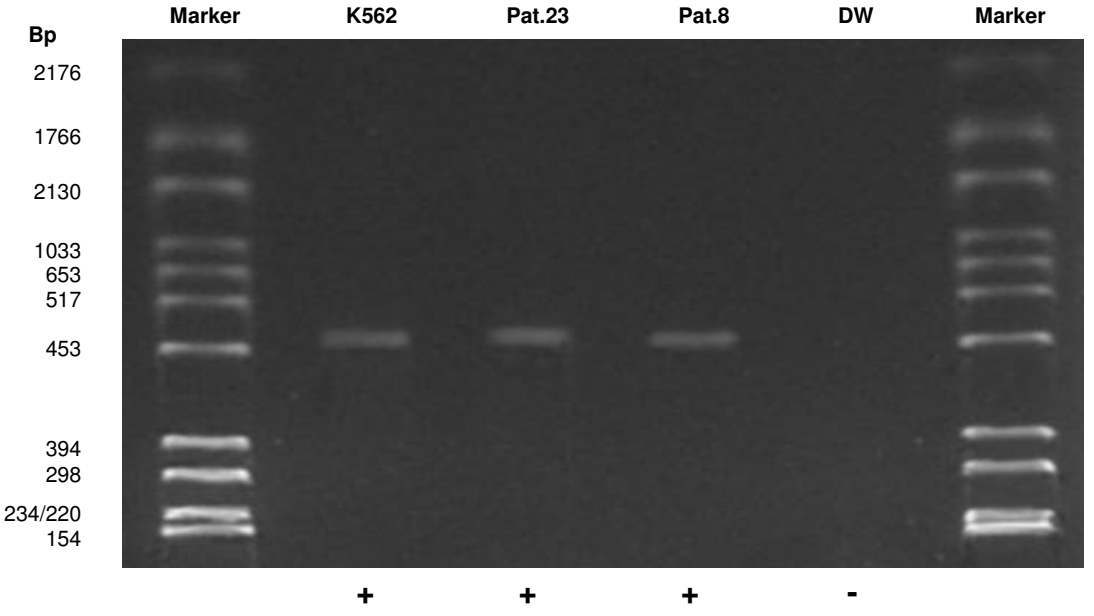


Abb. 15: Gelelektrophorese einer RT-PCR des Antigens β-Actin der o.g. Patienten als Positivkontrolle. Die Abbildung zeigt die Positivkontrolle K562, die Probe eines exemplarischen CML-Patienten mit positiver Expression (Patient 23), einen Patienten ohne Expression (Patient 8) und die Negativkontrolle (demineralisiertes Wasser DW). Links und rechts sind die Molekulargewichtsmarker („Marker“) aufgetragen. Skalierung in Basenpaaren (Bp). RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction.

Tabelle 2: Ergebnisse der RT-PCR zum Nachweis der mRNA-Expression von Tumor-/Leukämie-assoziierten Antigenen von CML-Patienten in der chronischen Phase

CML-Patient Nr.	β-Actin	TBP	BAGE	G250	HTERT	MAGE A1	MPP11	NewRen60	PRAME	Proteinase 3	RHAMM/CD168	SSX2	WT1	NY-ESO-1	BCR-ABL	BCR-ABL/ABL
1	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	100%
2	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	55%
3	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	30%
4	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	57%
5	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	16%
6	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	58%
7	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	6%
8	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	100%
9	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	100%
10	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	100%
12	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	100%
13	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	27%
14	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	95%
18	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	100%
20	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	67%
21	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	91%
23	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	24%
24	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	40%
26	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	56%
28	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	76%
30	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	100%
31	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	28%
32	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	21%
33	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	73%
Nachweisbare Expression in Prozent:	100%	100%	0%	29%	54%	0%	92%	92%	58%	63%	75%	0%	54%	0%	100%	

RT-PCR zum Nachweis der mRNA-Expression von Tumor-/Leukämie-assoziierten Antigenen aus mononukleären Zellproben des peripheren Blutes von CML-Patienten in der chronischen Phase. (+) zeigt eine nachweisbare m-RNA-Expression des gesuchten Antigens, bei (-) war das Antigen nicht nachweisbar. Alle Patienten waren BCR-ABL positiv. Die quantitative mRNA-Expression mittels Real-Time RT-PCR wies BCR-ABL/ABL-Quotienten von 6-100% auf (durchschnittlich 63,3 %). Die Qualität der cDNA wurde durch PCRs auf β-Actin, TBP und das ABL-Gen evaluiert. Alle Proben zeigten einen hohen Anteil an BCR-ABL/ABL in diesen Qualitätskontrollen.
BCR-ABL: Bruchstellenclusterregion-Abelson-Tyrosin-Kinase; CML: chronisch myeloische Leukämie; cDNA: complementary desoxyribonucleic acid; mRNA: messenger ribonucleic acid; RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction.

Tabelle 3: Ergebnisse der RT-PCR zum Nachweis der mRNA-Expression von Tumor-/Leukämie-assoziierten Antigenen von CML-Patienten in der Akzelerationsphase oder Blastenkrise

CML-Patient Nr.	β-Actin	TBP	BAGE	G250	hTERT	MAGE A1	MPP11	NewRen60	PRAME	Proteinase 3	RHAMM/CD168	SSX2	WT1	NY-ESO-1	BCR-ABL	BCR-ABL/ABL
11	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	100%
15	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	8%
16	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	81%
17	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	100%
19	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	62%
22	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	46%
25	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	81%
27	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	64%
29	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	100%
34	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	60%
Nachweisbare Expression in Prozent:	100	100%	0%	10%	50%	0%	90%	100%	70%	90%	100%	0%	50%	0%	100%	

RT-PCR zum Nachweis der mRNA-Expression von Tumor-/Leukämie-assoziierten Antigenen aus mononukleären Zellproben des peripheren Blutes von CML-Patienten in der Akzelerationsphase oder Blastenkrise. (+) zeigt eine nachweisbare m-RNA-Expression des gesuchten Antigens, bei (-) war das Antigen nicht nachweisbar.
Alle Patienten waren BCR-ABL positiv. Die quantitative mRNA-Expression mittels Real-Time RT-PCR wies BCR-ABL/ABL-Quotienten von 8-100% auf (durchschnittlich 70,2 %). Die Qualität der cDNA wurde durch PCRs auf β-Actin, TBP und das ABL-Gen evaluiert. Alle Proben zeigten einen hohen Anteil an BCR-ABL/ABL in diesen Qualitätskontrollen.
BCR-ABL: Bruchstellenclusterregion-Abelson-Tyrosin-Kinase; cDNA: complementary desoxyribonucleic acid; CML: chronisch myeloische Leukämie; mRNA: messenger ribonucleic acid; RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction.

3.2 mRNA-Expressionsanalyse in der chronischen Phase im Vergleich mit der akzelerierten Phase oder Blastenkrise

Alle Transkripte, die bei den untersuchten CML- Patienten nachgewiesen wurden, waren sowohl in der chronischen als auch in der akzelerierten Phase bzw. Blastenkrise nachweisbar. Bei den Antigenen RHAMM/CD168, PRAME, G250 und Proteinase 3 ergaben sich unterschiedliche Häufigkeiten: In der Akzelerationsphase und waren RHAMM/CD168, PRAME und Proteinase 3 häufiger exprimiert. RHAMM/CD168, PRAME und Proteinase 3 waren zu 100%, 70% bzw. 90% in der akzelerierten und Blastenkrise nachweisbar, wohingegen diese Antigene zu 75%, 58% bzw. 63% bei CML-Patienten in der chronischen Phase detektiert waren. Im Gegensatz dazu war das Antigen G250 in der akzelerierten Phase und Blastenkrise mit einer niedrigeren Häufigkeit von 10% und 29% (Tab. 4) nachweisbar.

Tabelle 4: Vergleich der chronischen Phase mit der akzelerierten Phase bzw. Blastenkrise zum Nachweis der mRNA -Expression von Tumor-/Leukämie-assoziierten Antigenen

Nachweisbare Expression in Prozent bei Patienten in der:	β-Actin	TBP	BAGE	G250	HTERT	MAGE A1	MPP11	NewRen60	PRAME	Proteinase 3	RHAMM/CD168	SSX2	WT1	NY-ESO-1	BCR-ABL
Chronischen Phase	100%	100%	0%	29%	54%	0%	92%	92%	58%	63%	75%	0%	54%	0%	100%
Akzelerierten Phase/ Blastenkrise	100%	100%	0%	10%	50%	0%	90%	100%	70%	90%	100%	0%	50%	0%	100%
Alle Phasen	**100%**	**100%**	**0%**	**24%**	**53%**	**0%**	**91%**	**94%**	**62%**	**71%**	**83%**	**0%**	**53%**	**0%**	**100%**

Vergleich der chronischen Phase mit der akzelerierten Phase bzw. Blastenkrise der RT-PCR zum Nachweis der mRNA-Expression von Tumor-/Leukämie-assoziierten Antigenen aus mononukleären Zellproben des peripheren Blutes von allen CML-Patienten in allen Phasen der CML und die Gesamtergebnisse.
BCR-ABL: Bruchstellenclusterregion-Abelson-Tyrosin-Kinase; CML: chronisch myeloische Leukämie; mRNA: messenger ribonucleic acid; RT-PCR: reverse transcriptase-polymerase chain reaction.

3.3 Expressionsanalyse von Leukämie-Antigenen bei unterschiedlichen BCR-ABL positiven Zelltypen

Bei einer Patientenprobe war ausreichend Material vorhanden (10^{11} PBMC), um CD34-,CD14-, CD8-, oder CD66b-positive Zellen zu isolieren. Der BCR-ABL/ABL-Quotient war > 80%, so dass ein Großteil der Zellen BCR-ABL positiv war. Die Zellzählung der Probe ergab $26x10^9$/µl Leukozyten. Darunter waren 5% Blasten, 7% Promyelozyten, 11% Metamyelozyten, 12% Myelozyten, 15% Stabkernige, 35% Neutrophile Granulozyten, 5% Basophile Granulozyten, 2% Eosinophile Granulozyten, 2% Monozyten und 5% Lymphozyten.

Die unselektierten CML-Zellproben dieses Patienten zeigten eine mRNA-Expression der TAA/LAA MPP11, NewRen60, PRAME, RHAMM/CD168 und WT1. Von den Antigenen hTERT und G250 war keines in der mRNA-Analyse nachweisbar. Bei isolierten CD34 positiven Zellen waren alle angegebenen Antigene detektierbar. Interessanterweise fand sich das TAA PRAME weder bei CD14 positiven, noch bei CD8 positiven oder CD66b positiven Zellen. Die Antigene RHAMM/CD168 und WT1 waren in diesen einzelnen Leukozytensubpopulationen bei bis zu 35 PCR-Zyklen nur sehr schwach zu detektieren. PRAME und RHAMM/CD168 zeigten bei CD34 positiven Progenitor-Zellen ein deutliches Signal. Die anderen Antigene (MPP11, NewRen60, Proteinase 3) waren in allen Subpopulationen der Leukozyten vorhanden (Tab. 5).

Tabelle 5: mRNA-Expression von TAA/LAA bei verschiedenen BCR-ABL positiven Leukozyten-Subpopulationen der CML durch konventionelle RT-PCR ermittelt

Antigen	Unselektiert	CD34 positiv	CD14 positiv	CD8 positiv	CD66b positiv	Lineage negative cells	K562	Destiliertes Wasser	PBMC von GP
MPP11	++	++	++	++	++	++	++	-	(+)
NewRen60	++	++	++	++	++	++	++	-	+
PRAME	+	+	-	-	-	+	++	-	-
Proteinase 3	++	++	++	++	++	++	++	-	+
RHAMM/CD168	++	++	(+)	(+)	(+)	++	++	-	-
WT1	+	+	+	+	+	+	++	-	-
β-Actin	++	++	++	++	++	++	++	-	++

mRNA-Expression von Tumor-/Leukämie-assoziierten Antigenen bei verschiedenen BCR-ABL positiven Leukozyten-Subpopulationen der CML, welche durch konventionelle RT-PCR ermittelt wurde. Mit „++“ kennzeichneten wir eine sehr deutlich nachweisbare mRNA-Expression des gesuchten Antigens, „+“ eine deutliche, „-“ mit keiner und „(+)“ mit geringer aber noch nachweisbarer mRNA-Expression des gesuchten Antigens. Zum Vergleich der Antigennachweis bei mononuklären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) eines gesunden Probanden (GP).
CML: chronisch myeloische Leukämie; BCR-ABL: Bruchstellenclusterregion-Abelson-Tyrosin-Kinase; mRNA: messenger ribonucleic acid; RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction;

3.4 Die Expressionsanalyse von BCR-ABL und ABL mittels real-time RT PCR

Eine quantitative Messung durch real-time RT-PCR der mRNA, die für BCR-ABL kodiert, wurde bei allen Proben durchgeführt. Alle Patienten zeigten eine mRNA-Expression von BCR-ABL. Der BCR-ABL/ABL-Quotient ist in Tabelle 1 mit angeführt.

3.5 Zusammenhang zwischen der Expression von TAA/LAA und BCR-ABL

Die Expression von TAA/LAA wurde während des klinischen Verlaufs von zwei CML-Patienten untersucht, die sich in der chronischen Phase befanden. Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse am Beispiel eines CML-Patienten. Die Antigenexpression von Proteinase 3, NewRen60 und MPP11 zeigten keinen Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf der CML-Patienten (Tab. 6). Diese Antigene waren im selben Maße

wie in den Proben mit negativer BCR-ABL-Expression exprimiert, die mittels real-time RT-PCR und nested RT-PCR untersucht wurden (Sensitivität: Eine BCR-ABL positive Zelle unter 1 x 10^5 bis 1 x 10^6 BCR-ABL negativen Zellen nachweisbar). Im Gegensatz dazu war die Expression von RHAMM/CD168, PRAME und WT1 in Phasen mit niedriger BCR-ABL-Expression vermindert. In der molekularen kompletten Remission (kein Nachweis von BCR-ABL durch nested RT-PCR) war RHAMM/CD168 gleichsinnig herunterreguliert (Abb. 16). Bei einem erneuten Ausbruch der Erkrankung war die Expression von RHAMM/CD168 wieder erhöht. In Stadien der kompletten Remission war die Expression der Antigene PRAME und WT1 ebenfalls reduziert, wobei beide Antigene auch in einer BCR-ABL-negativen Probe gefunden wurden (Spalte 3) und in einer Probe mit sehr niedriger BCR-ABL-Expression nicht nachweisbar waren (Spalte 5).

Tabelle 6: Zusammenhang zwischen der Antigenexpression von Proteinase 3, NewRen60 und MPP11 und dem klinischen Verlauf am Beispiel eines CML-Patienten

Antigen	K 562	Erstdiagnose (BCR-ABL/ABL 62%)	BCR-ABL/ABL: negativ (nested-PCR)	Nested-PCR positiv, LC negativ	BCR-ABL/ABL: 0.14%	BCR-ABL/ABL: 1.2%	BCR-ABL/ABL: 11.6%	Destilliertes Wasser	PBMC von GP
MPP11	++	++	+	+	+	+	++	-	-
NewRen60	++	++	++	++	++	++	++	-	+
Proteinase3	++	+	+	+	+	+	+	-	+
β-Actin	++	++	++	++	++	++	++	-	++

Im Vergleich zu den in Abbildung 16 verwendeten Antigenen RHAMM/CD168, WT1 und PRAME zeigen die Antigene MPP11, NewRen60 und Proteinase3 keinen Zusammenhang mit dem klinischen Verlauf des gleichen Patienten. Die Expression des BCR-ABL-Gens der Proben wurde mit der mRNA-Expression des ABL-Gens korreliert (BCR-ABL/ABL-Quotient in Prozent) und stehen in Zusammenhang mit den verschiedenen CML-Stadien. Der Patient zeigt Phasen mit erniedrigter BCR-ABL-Expression, totale molekulare Remission mit negativem BCR-ABL-Nachweis durch nested RT-PCR (ABL/ABL negativ, nested RT-PCR) und anschließendem Rückfall mit Anstieg des Quotienten. „++“ soll eine sehr deutlich nachweisbare mRNA-Expression des gesuchten Antigens darstellen, „+“ eine deutliche und „-“ keine nachweisbare Expression der verwendeten Antigene. β-Actin und K562 dienten als Positivkontrollen. Zum Vergleich der Antigennachweis bei mononuklären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) eines gesunden Probanden (GP).
CML: chronisch myeloische Leukämie; BCR-ABL: Bruchstellenclusterregion-Abelson-Tyrosin-Kinase; LC: Light Cycler®; mRNA: messenger ribonucleic acid; RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction.

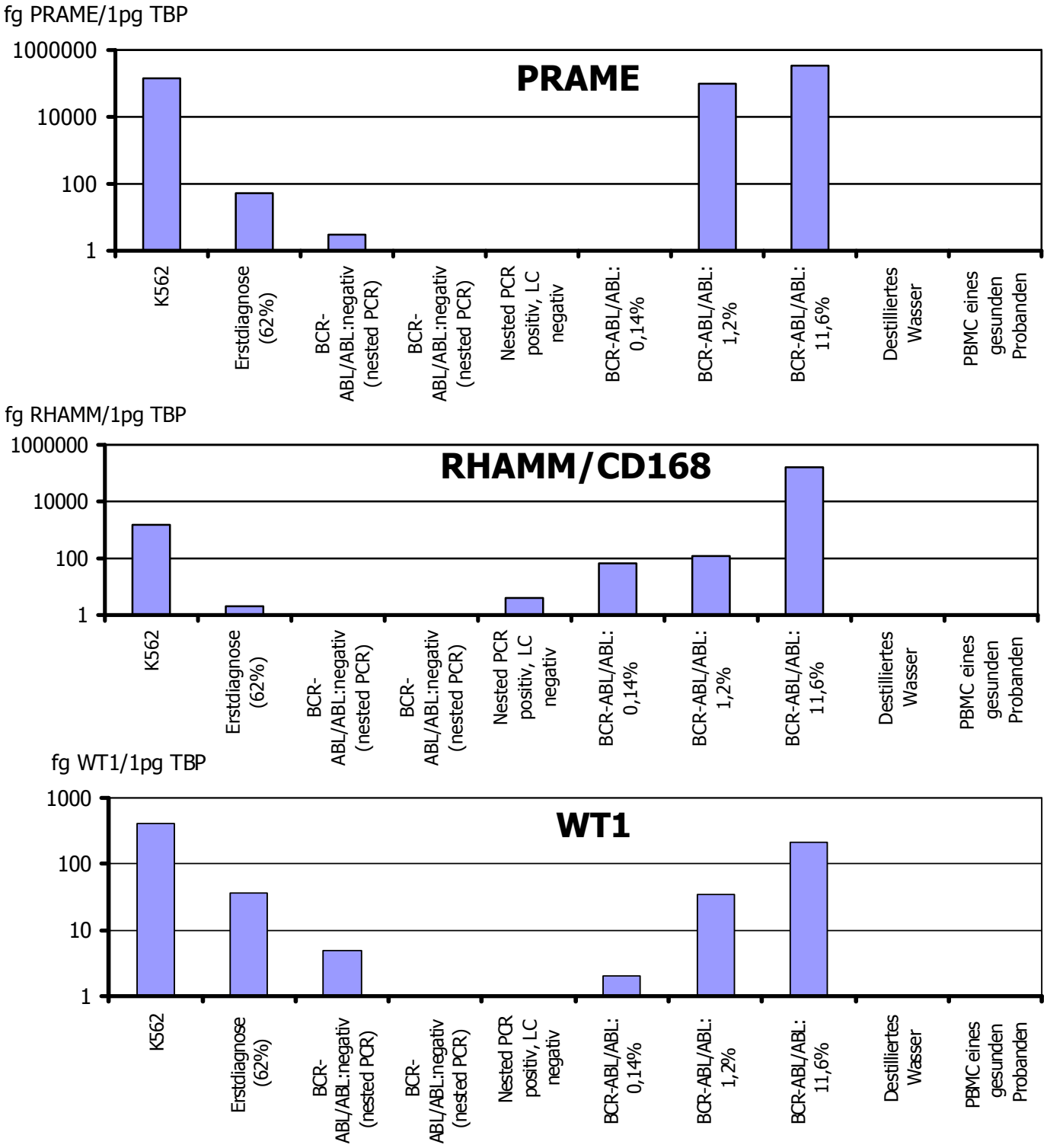


Abb.16: Quantitative real time RT-PCR der Antigene PRAME, RHAMM/CD168 und WT1 im klinischen Verlauf am Beispiel eines Patienten. Die Expression des BCR-ABL-Gens der Proben wurde mit der mRNA-Expression des ABL-Gens verglichen (BCR-ABL/ABL-Quotient in Prozent) und stehen in Zusammenhang mit den verschiedenen CML-Stadien. Der Patient zeigt Phasen mit erniedrigter BCR-ABL-Expression, totale molekulare Remission mit negativem BCR-ABL-Nachweis durch nested RT-PCR (ABL/ABL negativ, nested RT-PCR) und anschließendem Rückfall mit Anstieg des Quotienten. Die mRNA-Menge des jeweiligen Antigens wurde normiert auf die mRNA-Menge von 1 pg des house keeping-Gens "TATA-box binding protein" (TBP), von dem bislang keine Pseudo-Retrogene bekannt sind. Zum Vergleich der Antigennachweis bei mononuklären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) eines gesunden Probanden. CML: chronisch myeloische Leulämie; BCR-ABL: Bruchstellenclusterregion-Abelson-Tyrosin-Kinase; LC: Light Cycler®; mRNA: messenger-ribonucleic acid; RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction.

3.6 Immunphänotypisierung auf HLA- und kostimulatorische Moleküle der CD34 positiven CML-Zellen

Die FACS-Analyse von BCR-ABL-positiven CD34 positiven Zellen, die in der RT-PCR-Analyse 100% BCR-ABL-positiv waren, zeigte eine Expression von HLA-ABC und HLA-DR von über 95%. Diese Beobachtung machten wir bei allen untersuchten zehn Patienten. Bei allen diesen Patienten lag der Quotient BCR-ABL/ABL bei 100%. 10-30% der CD34 positiven Zellen wiesen den Zelloberflächenmarker CD33 auf. Im Gegensatz dazu fanden wir unter der CD34 positiven Zellpopulation keine Expression (<5%) der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD83 und CD86. Dies könnte ein Hinweis auf einen möglichen „Tumor escape“-Mechanismus der CML Progenitor-Zellen darstellen. Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse eines exemplarischen Patienten.

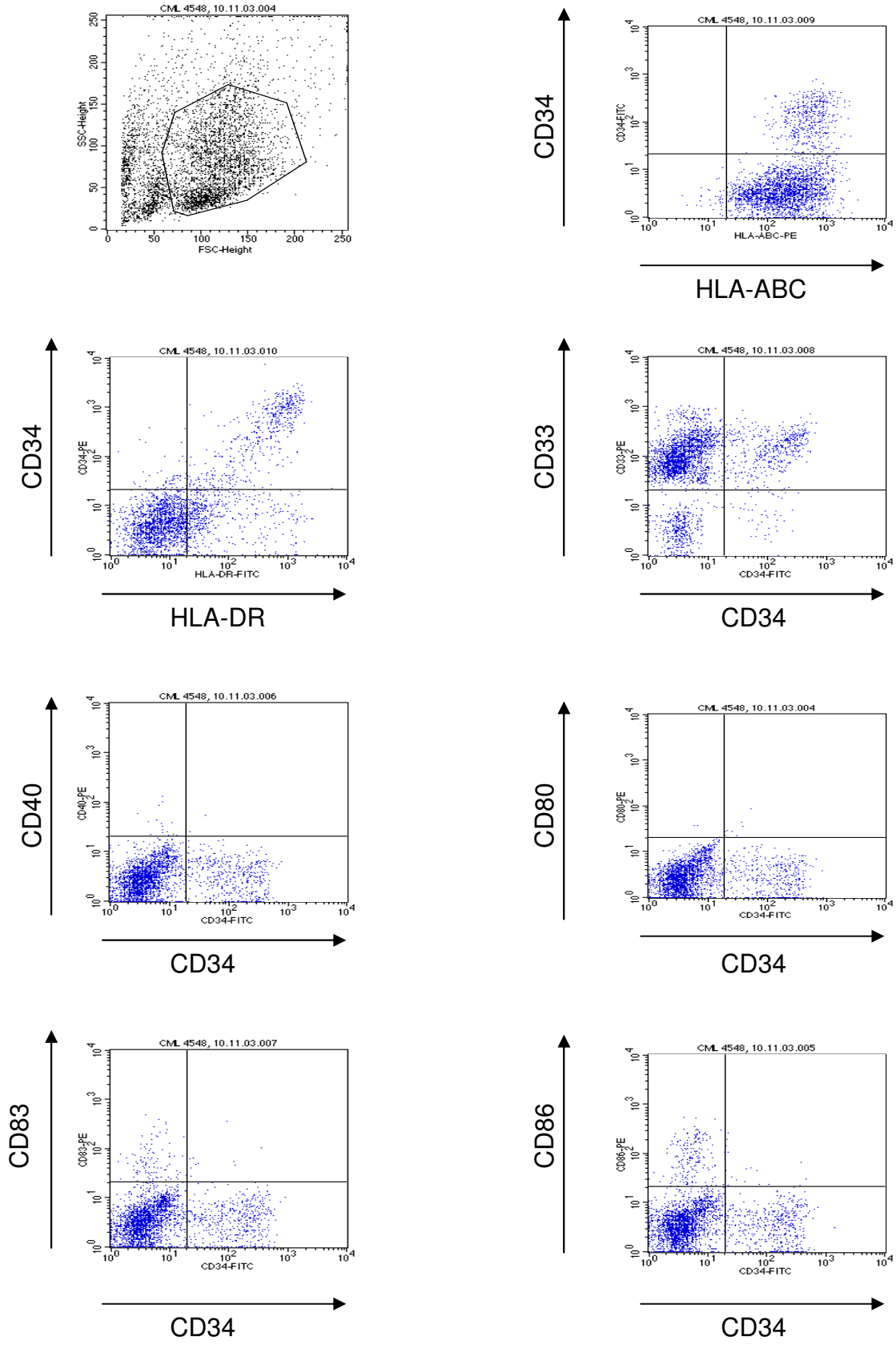


Abb.17: FACS-Analyse der Expression von HLA-ABC, HLA-DR, CD33, CD34, CD40, CD80, CD83 und CD86 bei CD34 positiven Zellen, bei denen durch RT-PCR BCR-ABL/ABL nachgewiesen werden konnte (Quotient BCR-ABL/ABL von 100%).
BCR-ABL/ABL: Bruchstellenclusterregion/ Abelson-Tyrosin-Kinase; CD: cluster of differentiation; FACS: fluorescence associated cell sorting; FITC: Fluoreszin Isothiozyanat; FSC: Vorwärtsstreulicht; HLA: Haupthistokompatibilitätskomplex; PE: Phycoerythrin; RT-PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction; SSC: Seitwärtsstreulicht.

4 Diskussion

Das Immunsystem spielt bei der Kontrolle der Proliferation leukämischer Zellen eine bedeutende Rolle. Immuntherapien, die TAA/LAA als Targetstrukturen anzielen, stellen eine Möglichkeit dar, das Immunsystem spezifisch gegen Leukämiezellen zu aktivieren oder den Graft-versus-Leukämie (GVL)-Effekt nach allogener Stammzelltransplantation zu steigern, *ohne* eine gleichzeitige Verstärkung der Graft-versus-host disease (GVHD) zu bewirken. Eine spezifische, gegen CML-Progenitorzellen (Vorläuferzellen) gerichtete Antwort von zytotoxischen T-Zellen könnte möglicherweise eine Eliminierung der minimalen Resterkrankung (MRD) nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation zu bewirken.

Zur Beurteilung des klinischen Verlaufs von BCR-ABL positiven CML-Patienten eignet sich die quantitative mRNA-Expression von BCR-ABL, die mit dem Verlauf gut korreliert [51, 80]. Dies ermöglicht auch ein konsequentes Monitoring der therapeutischen Wirksamkeit [27].

Das Fusionsprotein des BCR-ABL-Gens stellt darüber hinaus auch ein potentielles Ziel für das Immunsystem dar. Allerdings gibt es widersprüchliche Berichte über die Induktion spezifischer Immunreaktionen durch BCR-ABL-Epitope, die auf eher seltene HLA-Moleküle beschränkt waren [9, 13, 69, 91, 117], oder nur eine geringe T-Zell-Antwort erreichten [90]. Aus diesem Grund führten wir eine Suche nach weiteren bei der CML exprimierten Antigenen als Zielstrukturen für Immuntherapien durch.

Wir konnten die Expression einiger Leukämie-spezifischer Antigene bei CML-Zellen nachweisen: RHAMM/CD168, hTERT, MPP11, PRAME, Proteinase 3, NewRen60 und WT1 waren bei über 50%, und G250 bei 20 bis 50% der untersuchten CML-Proben zu finden. Die Cancer/Testis-Antigene NY-ESO-1, SSX2, MAGE A1 und BAGE konnten nicht deteketiert werden. Die letzteren waren auch bei anderen Leukämie-Entitäten nicht nachweisbar [35, 82]. Für die Antigene RHAMM/CD168, G250, PRAME, Proteinase 3, WT1 und hTERT (ausgenommen MPP11 und NewRen60) konnten spezifische zelluläre Immunantworten bei Patienten verschiedener Tumorentitäten [6, 36, 37, 50, 54, 63, 78-80, 83, 108, 111] gezeigt werden. Proteinase 3, WT1 und RHAMM/CD168 enthalten Proteine, die zu einer gezielten T-Zell-Antwort führen [67, 70, 77, 78, 100] und die bereits in klinischen Vakzinierungsstudien bei Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen als Target benutzt wurden.

Antigene wie NewRen60, Proteinase3 und WT1, die auch in verschiedenen Normalgeweben exprimiert werden, können aufgrund ihrer ubiquitären Expression in diesen Gewebstypen gegebenenfalls autoimmunologische Reaktionen auszulösen [18, 35, 50, 77, 78]. Im Gegensatz dazu sind RHAMM/CD168, PRAME, hTERT und G250 weitgehend tumorspezifisch [33, 35, 63]. Die Antigene mit Expression bei BCR-ABL positiven Zellen waren in allen Krankheitsphasen der untersuchten CML-Patienten vorhanden. Bei den Antigenen RHAMM/CD168, PRAME, G250 und Proteinase 3 gab es jedoch Unterschiede: In der akzelerierten Phase und Blastenkrise zeigten RHAMM/CD168, PRAME und Proteinase 3 eine höhere Frequenz bei CML-Patienten, das Antigen G250 hingegen war weniger nachweisbar. Von RHAMM/CD-168 ist bekannt, dass es bei soliden Tumoren mit Metastasen und fortgeschrittenen Tumorstadien häufiger detektiert wird [38, 72, 94, 113]. Daher könnte eine häufigere Expression von RHAMM/CD168 ebenfalls mit einem fortgeschrittenen CML-Stadium assoziiert sein.

In der real-time RT-PCR konnte das Antigen RHAMM/CD168 nicht bei Proben nachgewiesen werden, die während kompletter molekularer Remission entnommen wurden. Die Expression von WT1 und PRAME war während molekularer Remission vermindert, allerdings immer noch nachweisbar. Die Expression von WT1 in normalen CD34 positiven Progenitorzellen konnte in einer anderen Arbeit bereits gezeigt werden [50].

CD34 positive CML-Zellen zeigten eine Expression verschiedener TAA/LAA. Immuntherapien, die auf diese Antigene ausgerichtet sind, könnten CML-Vorläufer-Zellen zerstören und eher ausdifferenzierte, möglicherweise funktionsfähige Zellen fortbestehen lassen.

Die CML ist die einzige Tumorentität, deren Zellen in verschiedene reife Formen mit spezifischen Zelloberflächen-Molekülen ausdifferenzieren. CD34 positive CML-Zellen wiesen HLA-Moleküle an ihrer Oberfläche auf, jedoch alle CD34 positiven Proben exprimierten nicht die untersuchten kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD83 und CD86. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen überein [20, 44, 118].

Die Expression dieser Moleküle ist notwendig, um TAA/LAA an der Oberfläche effizient präsentieren zu können. CML-Zellen können nur dann ein Ziel für CD8 positive T-Zellen sein, wenn sie in der Lage sind, das so genannte „erste Signal“ mit ihren HLA-ABC-Molekülen anzubieten. Darüber hinaus benötigen sie die o.g. kostimulato-

rischen Moleküle, um ein „zweites Signal“ auszusenden. Damit erlangen sie die Fähigkeit, T-Zellen zu stimulieren. Da diese kostimulatorischen Proteine nicht oder nur vermindert exprimiert werden, könnte dies für CD34 positive CML-Progenitor-Zellen ein „escape“-Mechanismus darstellen [116].

Die Wirkung von Interferon α, das zur Therapie der CML eingesetzt wird, steht *in vivo* und *in vitro* zumindest teilweise in Zusammenhang mit der Aufregulation dieser kostimulatorischen Moleküle [86]. Die Aufregulation von CD40, CD80, CD83 und CD86 könnte u.a. auch durch den Einsatz von aus CML-Zellpopulationen gewonnenen dendritischen Zellen (DC) erreicht werden. Die Applikation solcher CML-DC ist Gegenstand momentaner Forschung [11, 115].

Unter Beachtung der Expressionsmuster in Normalgewebe bietet sich mit dem Antigen RHAMM/CD168 durch seine hohe Expressionsfrequenz bei CML-Zellen ein geeigneter Kandidat für Vakzinierungstherapien an. Darüber hinaus stellen die TAA/LAA G250, hTERT, PRAME und WT1 für die CML ebenfalls mögliche Zielstrukturenstrukturen für diese Behandlungsform dar.

5 Zusammenfassung

Maligne Zellen exprimieren Antigenstrukturen, die spezifische Immunantworten auslösen können. Die Definition geeigneter Zielstrukturen ist ein entscheidender Schritt für die Durchführung einer Immuntherapie bei malignen hämatologischen Erkrankungen: Mit spezifischen Immuntherapien könnte ein antileukämischer Effekt nach (Poly-)Chemotherapie und/oder Stammzelltransplantation ausgelöst oder gesteigert werden. Zudem könnte damit die Dauer einer Remission verlängert oder eine minimale Resterkrankung behandelt werden. Bei der Chronisch myeloischen Leukämie (CML) gab es jedoch bislang keine systematische Analyse der Expressionsfrequenzen Leukämie-assoziierter Antigene (LAA).

Daher wurde in dieser Arbeit die Expression vorbeschriebener Antigenstrukturen bei anderen hämatologischen Erkrankungen exprimierter LAA mit konventioneller PCR nach reverser Transkription der RNA (RT-PCR) bei 34 CML-Patienten untersucht. Die Messenger-Ribonukleinsäure (mRNA)-Expression wurde in der chronischen Phase, der akzelerierten Phase sowie in der Blastenkrise von CML-Patienten gemessen. Bei wichtigen Tumor-spezifisch exprimierten Antigenen wurde zusätzlich eine real-time RT-PCR von einzelnen Patienten im klinischen Verlauf durchgeführt. Von den dreizehn untersuchten Antigenstrukturen zeigten acht LAA eine mRNA-Expression: BCR-ABL (Fusionsgen des „Bruchstellen-cluster-Region“-Gens und des „Abelson Thyrosin-Kinase“Gens), RHAMM/CD168 („Receptor for hyaluronal acid mediated motility“-Antigen), hTERT („telomerase catalytic sub-unit“-Antigen), New-Ren60 (Nierenzellkarzinom assoziiertes Antigen), MPP1 (Antigen des M-Phase Phosphoproteins 11), PRAME („Preferentially expressed antigen of melanoma“), Proteinase3 und WT1 (Wilms-Tumor-Antigen) waren bei über 50% und G250 (Nierenzellkarzinom assoziiertes Antigen) bei 20-50% der untersuchten CML-Proben nachzuweisen. Die „Cancer/Testis“-Antigene NY-ESO1 (Antigen, das von mehreren Tumorentitäten exprimiert wird), SSX2 („synovial sarcoma, X-chromosome“) und die Antigene der humanen Melanomzellreihe MZ2-MEL MAGE A1 („melanoma associated antigen”) und BAGE („B melanoma antigen”) konnten dagegen bei CML-Patienten nicht detektiert werden. Aufgrund der hohen Frequenz einiger dieser Antigene eignen sich diese immunologischen Strukturen auch für einen polyvalenten Vakzinierungsansatz.

CD34-selektierte BCR-ABL-positive CML-Zellen zeigten eine Expression von verscheidenen LAA. Somit sind diese CML-Progenitorzellen potentielle Angriffspunkte von spezifischen T-Lymphozyten bei einer Immuntherapie. Das Fehlen der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 , CD83 und CD86 bei CML-Progenitorzellen, das wir mittels Immunphänotypisierung von CD34 positiven CML-Zellen zeigen konnten, könnte einen wesentlichen Mechanismus für einen „Tumor-Escape“ dieser Tumorzellpopulation darstellen.

6 Literaturverzeichnis

1. Allan, N.C., S.M. Richards, and P.C. Shepherd, *UK Medical Research Council randomised, multicentre trial of interferon-alpha n1 for chronic myeloid leukaemia: improved survival irrespective of cytogenetic response. The UK Medical Research Council's Working Parties for Therapeutic Trials in Adult Leukaemia.* Lancet, 1995. **345**: 1392-1397.
2. Ben-Neriah Y, D.G., Mes-Masson AM, Witte ON, Baltimore D., *The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene.* Science, 1986. **233**: 212-214.
3. Bergmann, L., C. Miething, U. Maurer, J. Brieger, T. Karakas, E. Weidmann, and D. Hoelzer, *High levels of Wilms' tumor gene (wt1) mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome.* Blood, 1997. **90**: 1217-1225.
4. Bhatia, R. and P.B. McGlave, *Autologous hematopoietic cell transplantation for chronic myelogenous leukemia.* Hematol Oncol Clin North Am, 2004. **18**: 715-732, xi.
5. Bieche, I., I. Laurendeau, S. Tozlu, M. Olivi, D. Vidaud, R. Lidereau, and M. Vidaud, *Quantitation of MYC gene expression in sporadic breast tumors with a real-time reverse transcription-PCR assay.* Cancer Res, 1999. **59**: 2759-2765.
6. Boel, P., C. Wildmann, M.L. Sensi, R. Brasseur, J.C. Renauld, P. Coulie, T. Boon, and P. van der Bruggen, *BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes.* Immunity, 1995. **2**: 167-175.
7. Cervantes, F., A. Lopez-Guillermo, F. Bosch, M.J. Terol, C. Rozman, and E. Montserrat, *An assessment of the clinicohematological criteria for the accelerated phase of chronic myeloid leukemia.* Eur J Haematol, 1996. **57**: 286-291.
8. Chang, J., *Efficient amplification of melanoma-specific CD8+ T cells using artificial antigen presenting complex.* Exp Mol Med, 2006. **38**: 591-598.
9. Chen, W., H. Qin, V.A. Reese, and M.A. Cheever, *CTLs specific for bcr-abl joining region segment peptides fail to lyse leukemia cells expressing p210 bcr-abl protein.* J Immunother, 1998. **21**: 257-268.

10. 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, *A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**: 1914-1918.
11. Choudhury, A., J.L. Gajewski, J.C. Liang, U. Popat, D.F. Claxton, K.O. Kliche, M. Andreeff, and R.E. Champlin, *Use of leukemic dendritic cells for the generation of antileukemic cellular cytotoxicity against Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia.* Blood, 1997. **89**: 1133-1142.
12. Chronic myeloid leukemia trialists' collaborative group and k.A. gelistet), *Hydroxyurea versus busulphan for chronic myeloid leukaemia: an individual patient data meta-analysis of three randomized trials.* Br J Haematol, 2000. **110**: 573-576.
13. Clark, R.E., I.A. Dodi, S.C. Hill, J.R. Lill, G. Aubert, A.R. Macintyre, J. Rojas, A. Bourdon, P.L. Bonner, L. Wang, S.E. Christmas, P.J. Travers, C.S. Creaser, R.C. Rees, and J.A. Madrigal, *Direct evidence that leukemic cells present HLA-associated immunogenic peptides derived from the BCR-ABL b3a2 fusion protein.* Blood, 2001. **98**: 2887-2893.
14. Clift, R.A., J. Radich, F.R. Appelbaum, P. Martin, M.E. Flowers, H.J. Deeg, R. Storb, and E.D. Thomas, *Long-term follow-up of a randomized study comparing cyclophosphamide and total body irradiation with busulfan and cyclophosphamide for patients receiving allogenic marrow transplants during chronic phase of chronic myeloid leukemia.* Blood, 1999. **94**: 3960-3962.
15. Collins, R.H., Jr., O. Shpilberg, W.R. Drobyski, D.L. Porter, S. Giralt, R. Champlin, S.A. Goodman, S.N. Wolff, W. Hu, C. Verfaillie, A. List, W. Dalton, N. Ognoskie, A. Chetrit, J.H. Antin, and J. Nemunaitis, *Donor leukocyte infusions in 140 patients with relapsed malignancy after allogeneic bone marrow transplantation.* J Clin Oncol, 1997. **15**: 433-444.
16. Cronkite, E., *Chemical leukemogenesis: benzene as a model.* Semin Hematol, 1987. **24**: 2-11.
17. Deininger, M., E. Buchdunger, and B.J. Druker, *The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia.* Blood, 2005. **105**: 2640-2653.

18. Dengler, R., U. Munstermann, S. al-Batran, I. Hausner, S. Faderl, C. Nerl, and B. Emmerich, *Immunocytochemical and flow cytometric detection of proteinase 3 (myeloblastin) in normal and leukaemic myeloid cells.* Br J Haematol, 1995. **89**: 250-257.
19. Derderian, P.M., H.M. Kantarjian, M. Talpaz, S. O'Brien, A. Cork, E. Estey, S. Pierce, and M. Keating, *Chronic myelogenous leukemia in the lymphoid blastic phase: characteristics, treatment response, and prognosis.* Am J Med, 1993. **94**: 69-74.
20. Dermime, S., D. Mavroudis, Y.Z. Jiang, N. Hensel, J. Molldrem, and A.J. Barrett, *Immune escape from a graft-versus-leukemia effect may play a role in the relapse of myeloid leukemias following allogeneic bone marrow transplantation.* Bone Marrow Transplant, 1997. **19**: 989-999.
21. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. K-562, 2004, DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php?dsmz_nr=10&from=cell_line_index&select=K&term=&preselect=human;hamster;mouse;rat;insect;other&firstload=0
22. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. HL-60, 2004, DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php?dsmz_nr=3&from=cell_line_index&select=H&term=&preselect=human;hamster;mouse;rat;insect;other&firstload=0
23. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. CAKI-1, 2004, DSMZ- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, http://www.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php?dsmz_nr=142&from=cell_line_index&select=C&term=&preselect=human;hamster;mouse;rat;insect;other&firstload=0
24. Druker, B.J., C.L. Sawyers, H. Kantarjian, D.J. Resta, S.F. Reese, J.M. Ford, R. Capdeville, and M. Talpaz, *Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome.* N Engl J Med, 2001. **344**: 1038-1042.

25. Druker, B.J., M. Talpaz, D.J. Resta, B. Peng, E. Buchdunger, J.M. Ford, N.B. Lydon, H. Kantarjian, R. Capdeville, S. Ohno-Jones, and C.L. Sawyers, *Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia.* N Engl J Med, 2001. **344**: 1031-1037.
26. Druker, B.J., S.G. O'Brien, J. Cortes, and J. Radich, *Chronic myelogenous leukemia.* Hematology (Am Soc Hematol Educ Program), 2002: 111-135.
27. Emig, M., S. Saussele, H. Wittor, A. Weisser, A. Reiter, A. Willer, U. Berger, R. Hehlmann, N.C. Cross, and A. Hochhaus, *Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR.* Leukemia, 1999. **13**: 1825-1832.
28. Falkenburg, J.H., A.R. Wafelman, P. Joosten, W.M. Smit, C.A. van Bergen, R. Bongaerts, E. Lurvink, M. van der Hoorn, P. Kluck, J.E. Landegent, H.C. Kluin-Nelemans, W.E. Fibbe, and R. Willemze, *Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes.* Blood, 1999. **94**: 1201-1208.
29. Gratwohl, A., J. Hermans, J.M. Goldman, W. Arcese, E. Carreras, A. Devergie, F. Frassoni, G. Gahrton, H.J. Kolb, D. Niederwieser, T. Ruutu, J.P. Vernant, T. de Witte, and J. Apperley, *Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation.* Lancet, 1998. **352**: 1087-1092.
30. Gratwohl, A., *Prognostic factors in chronic myeloid leukemia: allografting.* Semin Hematol, 2003. **40**: 13-21.
31. Gratwohl, A., *Does early stem-cell transplantation have a role in chronic myeloid leukaemia? For the proposal.* Lancet Oncol., 2005. **6**: 722-723.
32. Greiner, J., M. Ringhoffer, O. Simikopinko, A. Szmaragowska, S. Huebsch, U. Maurer, L. Bergmann, and M. Schmitt, *Simultaneous expression of different immunogenic antigens in acute myeloid leukemia.* Exp Hematol, 2000. **28**: 1413-1422.
33. Greiner, J., M. Ringhoffer, M. Taniguchi, A. Schmitt, D. Kirchner, G. Krahn, V. Heilmann, J. Gschwend, L. Bergmann, H. Dohner, and M. Schmitt, *Receptor for hyaluronan acid-mediated motility (RHAMM) is a new immunogenic leukemia-associated antigen in acute and chronic myeloid leukemia.* Exp Hematol, 2002. **30**: 1029-1035.

34. Greiner, J., M. Ringhoffer, M. Taniguchi, T. Hauser, A. Schmitt, H. Dohner, and M. Schmitt, *Characterization of several leukemia-associated antigens inducing humoral immune responses in acute and chronic myeloid leukemia.* Int J Cancer, 2003. **106**: 224-231.
35. Greiner, J., M. Ringhoffer, M. Taniguchi, L. Li, A. Schmitt, H. Shiku, H. Dohner, and M. Schmitt, *mRNA expression of leukemia-associated antigens in patients with acute myeloid leukemia for the development of specific immunotherapies.* Int J Cancer, 2004. **108**: 704-711.
36. Greiner, J., L. Li, M. Ringhoffer, T.F. Barth, K. Giannopoulos, P. Guillaume, G. Ritter, M. Wiesneth, H. Dohner, and M. Schmitt, *Identification and characterization of epitopes of the receptor for hyaluronic acid-mediated motility (RHAMM/CD168) recognized by CD8+ T cells of HLA-A2-positive patients with acute myeloid leukemia.* Blood, 2005. **106**: 938-945.
37. Greiner, J., M. Schmitt, L. Li, K. Giannopoulos, K. Bosch, A. Schmitt, K. Dohner, R.F. Schlenk, J.R. Pollack, H. Dohner, and L. Bullinger, *Expression of tumor-associated antigens in acute myeloid leukemia: Implications for specific immunotherapeutic approaches.* Blood, 2006. **108**: 4109-4117.
38. Hall, C.L., B. Yang, X. Yang, S. Zhang, M. Turley, S. Samuel, L.A. Lange, C. Wang, G.D. Curpen, R.C. Savani, A.H. Greenberg, and E.A. Turley, *Overexpression of the hyaluronan receptor RHAMM is transforming and is also required for H-ras transformation.* Cell, 1995. **82**: 19-26.
39. Hasford, J., M. Pfirrmann, R. Hehlmann, N.C. Allan, M. Baccarani, J.C. Kluin-Nelemans, G. Alimena, J.L. Steegmann, and H. Ansari, *A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. Writing Committee for the Collaborative CML Prognostic Factors Project Group.* J Natl Cancer Inst, 1998. **90**: 850-858.
40. Hehlmann, R., H. Heimpel, J. Hasford, H.J. Kolb, H. Pralle, D.K. Hossfeld, W. Queisser, H. Loffler, B. Heinze, A. Georgii, and et al., *Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. The German CML Study Group.* Blood, 1993. **82**: 398-407.

41. Hehlmann, R., H. Heimpel, J. Hasford, H.J. Kolb, H. Pralle, D.K. Hossfeld, W. Queisser, H. Loffler, A. Hochhaus, B. Heinze, and et al., *Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. The German CML Study Group.* Blood, 1994. **84**: 4064-4077.
42. Hehlmann, R., A. Hochhaus, T. Büchner, U. Berger, M. Wetzler, J.C. Byrd, and C.D. Bloomfield: *Akute und chronische myeloische Leukämie*. M. Dietel, Dudenhausen J., Suttrop N., Braunwald E., Fauci A.S., Kasper D.L., Hauser S.L., Longo D.L., Jameson J.L. (Hrsg), Harrisons Innere Medizin 1, Vol. 1, 15. Aufl., ABW-Wissenschaftsverlag, Berlin, 781-789 (2003).
43. Hehlmann, R., A. Hochhaus, T. Büchner, U. Berger, M. Wetzler, J.C. Byrd, and C.D. Bloomfield: *Polycthemia vera und andere myeloproliferative Erkrankungen*. M. Dietel, Dudenhausen J., Suttrop N., Braunwald E., Fauci A.S., Kasper D.L., Hauser S.L., Longo D.L., Jameson J.L. (Hrsg), Harrisons Innere Medizin 1, Vol. 1, 15. Aufl., ABW-Wissenschaftsverlag, Berlin, 777-780 (2003).
44. Hirano, N., T. Takahashi, S. Ohtake, K. Hirashima, N. Emi, K. Saito, M. Hirano, K. Shinohara, M. Takeuchi, F. Taketazu, S. Tsunoda, M. Ogura, M. Omine, T. Saito, Y. Yazaki, R. Ueda, and H. Hirai, *Expression of costimulatory molecules in human leukemias.* Leukemia, 1996. **10**: 1168-1176.
45. Hochhaus, A., A. Reiter, S. Saussele, A. Reichert, M. Emig, J. Kaeda, B. Schultheis, U. Berger, P.C. Shepherd, N.C. Allan, R. Hehlmann, J.M. Goldman, and N.C. Cross, *Molecular heterogeneity in complete cytogenetic responders after interferon-alpha therapy for chronic myelogenous leukemia: low levels of minimal residual disease are associated with continuing remission. German CML Study Group and the UK MRC CML Study Group.* Blood, 2000. **95**: 62-66.
46. Hochhaus, A. and P. La Rosee, *Imatinib therapy in chronic myelogenous leukemia: strategies to avoid and overcome resistance.* Leukemia, 2004. **18**: 1321-1331.
47. Hochhaus, A., Berger, U., Hehlmann, R.: *Medikamentöse Therapie*. A. Hochhaus, Berger, U., Hehlmann, R. (Hrsg), Chronische myeloische Leukämie, 2. Aufl., Uni-Med, Bremen, 47-64 (2004).
48. Hochhaus, A., Müller, M.C., Hehlmann, R., *Diagnostik und Therapie der chronischen myeloischen Leukämie.* Der Onkologe, 2002. **8**: 693-707.

49. Horowitz, M.M., P.A. Rowlings, and J.R. Passweg, *Allogeneic bone marrow transplantation for CML: a report from the International Bone Marrow Transplant Registry.* Bone Marrow Transplant, 1996. **17 Suppl 3**: S5-6.
50. Hosen, N., Y. Sonoda, Y. Oji, T. Kimura, H. Minamiguchi, H. Tamaki, M. Kawakami, M. Asada, K. Kanato, M. Motomura, M. Murakami, T. Fujioka, T. Masuda, E.H. Kim, A. Tsuboi, Y. Oka, T. Soma, H. Ogawa, and H. Sugiyama, *Very low frequencies of human normal CD34+ haematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumour gene WT1 at levels similar to those in leukaemia cells.* Br J Haematol, 2002. **116**: 409-420.
51. Hughes, T.P., J. Kaeda, S. Branford, Z. Rudzki, A. Hochhaus, M.L. Hensley, I. Gathmann, A.E. Bolton, I.C. van Hoomissen, J.M. Goldman, and J.P. Radich, *Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia.* N Engl J Med, 2003. **349**: 1423-1432.
52. Ikeda, H., B. Lethe, F. Lehmann, N. van Baren, J.F. Baurain, C. de Smet, H. Chambost, M. Vitale, A. Moretta, T. Boon, and P.G. Coulie, *Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor.* Immunity, 1997. **6**: 199-208.
53. Jager, E., M. Ringhoffer, H.P. Dienes, M. Arand, J. Karbach, D. Jager, C. Ilsemann, M. Hagedorn, F. Oesch, and A. Knuth, *Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo.* Int J Cancer, 1996. **67**: 54-62.
54. Jager, E., Y.T. Chen, J.W. Drijfhout, J. Karbach, M. Ringhoffer, D. Jager, M. Arand, H. Wada, Y. Noguchi, E. Stockert, L.J. Old, and A. Knuth, *Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2-binding peptide epitopes.* J Exp Med, 1998. **187**: 265-270.
55. Kantarjian, H., C. Sawyers, A. Hochhaus, F. Guilhot, C. Schiffer, C. Gambacorti-Passerini, D. Niederwieser, D. Resta, R. Capdeville, U. Zoellner, M. Talpaz, B. Druker, J. Goldman, S.G. O'Brien, N. Russell, T. Fischer, O. Ottmann, P. Cony-Makhoul, T. Facon, R. Stone, C. Miller, M. Tallman, R. Brown, M. Schuster, T. Loughran, A. Gratwohl, F. Mandelli, G. Saglio, M. Lazzarino, D. Russo, M. Baccarani, and E. Morra, *Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia.* N Engl J Med, 2002. **346**: 645-652.

56. Kantarjian, H.M., D. Dixon, M.J. Keating, M. Talpaz, R.S. Walters, K.B. McCredie, and E.J. Freireich, *Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia.* Cancer, 1988. **61**: 1441-1446.
57. Kantarjian, H.M., M. Talpaz, D. Kontoyiannis, J. Gutterman, M.J. Keating, E.H. Estey, S. O'Brien, M.B. Rios, M. Beran, and A. Deisseroth, *Treatment of chronic myelogenous leukemia in accelerated and blastic phases with daunorubicin, high-dose cytarabine, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.* J Clin Oncol, 1992. **10**: 398-405.
58. Kantarjian, H.M., S. O'Brien, P. Anderlini, and M. Talpaz, *Treatment of myelogenous leukemia: current status and investigational options.* Blood, 1996. **87**: 3069-3081.
59. Kantarjian, H.M., F. Giles, A. Quintas-Cardama, and J. Cortes, *Important therapeutic targets in chronic myelogenous leukemia.* Clin Cancer Res, 2007. **13**: 1089-1097.
60. Kantarjian HM, T.M., Giles F, O'Brien S, Cortes J, *New insights into the pathophysiology of chronic myeloid leukemia and imatinib resistance.* Ann Intern Med., 2006. **145**: 913-923.
61. Kawakami, Y., S. Eliyahu, C.H. Delgado, P.F. Robbins, K. Sakaguchi, E. Appella, J.R. Yannelli, G.J. Adema, T. Miki, and S.A. Rosenberg, *Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**: 6458-6462.
62. Kennedy, B.J., L.R. Smith, and R.W. Goltz, *Skin changes secondary to hydroxyurea therapy.* Arch Dermatol, 1975. **111**: 183-187.
63. Kessler, J.H., N.J. Beekman, S.A. Bres-Vloemans, P. Verdijk, P.A. van Veelen, A.M. Kloosterman-Joosten, D.C. Vissers, G.J. ten Bosch, M.G. Kester, A. Sijts, J. Wouter Drijfhout, F. Ossendorp, R. Offringa, and C.J. Melief, *Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis.* J Exp Med, 2001. **193**: 73-88.

64. Kolb, H.J., A. Schattenberg, J.M. Goldman, B. Hertenstein, N. Jacobsen, W. Arcese, P. Ljungman, A. Ferrant, L. Verdonck, D. Niederwieser, F. van Rhee, J. Mittermueller, T. de Witte, E. Holler, and H. Ansari, *Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients.* Blood, 1995. **86**: 2041-2050.
65. Kolb, H.J., C. Schmid, A.J. Barrett, and D.J. Schendel, *Graft-versus-leukemia reactions in allogeneic chimeras.* Blood, 2004. **103**: 767-776.
66. Krieg, A.M., *CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects.* Annu Rev Immunol, 2002. **20**: 709-760.
67. Kurbegov, D. and J.J. Molldrem, *Immunity to chronic myelogenous leukemia.* Hematol Oncol Clin North Am, 2004. **18**: 733-752, XI-XII.
68. Lee WI, K.H., Glassman A, Talpaz M, Lee MS, *Quantitative measurement of BCR/abl transcripts using real-time polymerase chain reaction.* Ann Oncol., 2002. **13**: 781-788.
69. Madrigal, A.J., S. Rusakiewicz, A.I. Dodi, and R. Rees, *Immunotherapy with alloreactive T-cells?* Hematol J, 2004. **5 Suppl 3**: 91-95.
70. Mailander, V., C. Scheibenbogen, E. Thiel, A. Letsch, I.W. Blau, and U. Keilholz, *Complete remission in a patient with recurrent acute myeloid leukemia induced by vaccination with WT1 peptide in the absence of hematological or renal toxicity.* Leukemia, 2004. **18**: 165-166.
71. Marmont, A.M., M.M. Horowitz, R.P. Gale, K. Sobocinski, R.C. Ash, D.W. van Bekkum, R.E. Champlin, K.A. Dicke, J.M. Goldman, R.A. Good, and et al., *T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia.* Blood, 1991. **78**: 2120-2130.
72. Maxwell, C.A., E. Rasmussen, F. Zhan, J.J. Keats, S. Adamia, E. Strachan, M. Crainie, R. Walker, A.R. Belch, L.M. Pilarski, B. Barlogie, J. Shaughnessy, Jr., and T. Reiman, *RHAMM expression and isoform balance predict aggressive disease and poor survival in multiple myeloma.* Blood, 2004. **104**: 1151-1158.
73. Mehta, J., R. Powles, S. Singhal, D. Tait, J. Swansbury, and J. Treleaven, *Cytokine-mediated immunotherapy with or without donor leukocytes for poor-risk acute myeloid leukemia relapsing after allogeneic bone marrow transplantation.* Bone Marrow Transplant, 1995. **16**: 133-137.
74. Melo, J., *BCR-ABL gene variants.* Baillieres Clin Haematol, 1997. **10**: 203-222.

75. Meyerson, M., C.M. Counter, E.N. Eaton, L.W. Ellisen, P. Steiner, S.D. Caddle, L. Ziaugra, R.L. Beijersbergen, M.J. Davidoff, Q. Liu, S. Bacchetti, D.A. Haber, and R.A. Weinberg, *hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization.* Cell, 1997. **90**: 785-795.

76. Michallet, M., F. Maloisel, M. Delain, A. Hellmann, A. Rosas, R.T. Silver, and C. Tendler, *Pegylated recombinant interferon alpha-2b vs recombinant interferon alpha-2b for the initial treatment of chronic-phase chronic myelogenous leukemia: a phase III study.* Leukemia, 2004. **18**: 309-315.

77. Molldrem, J., S. Dermime, K. Parker, Y.Z. Jiang, D. Mavroudis, N. Hensel, P. Fukushima, and A.J. Barrett, *Targeted T-cell therapy for human leukemia: cytotoxic T lymphocytes specific for a peptide derived from proteinase 3 preferentially lyse human myeloid leukemia cells.* Blood, 1996. **88**: 2450-2457.

78. Molldrem, J.J., P.P. Lee, C. Wang, R.E. Champlin, and M.M. Davis, *A PR1-human leukocyte antigen-A2 tetramer can be used to isolate low-frequency cytotoxic T lymphocytes from healthy donors that selectively lyse chronic myelogenous leukemia.* Cancer Res, 1999. **59**: 2675-2681.

79. Molldrem, J.J., P.P. Lee, S. Kant, E. Wieder, W. Jiang, S. Lu, C. Wang, and M.M. Davis, *Chronic myelogenous leukemia shapes host immunity by selective deletion of high-avidity leukemia-specific T cells.* J Clin Invest, 2003. **111**: 639-647.

80. Muller, M.C., N. Gattermann, T. Lahaye, M.W. Deininger, A. Berndt, S. Fruehauf, A. Neubauer, T. Fischer, D.K. Hossfeld, F. Schneller, S.W. Krause, C. Nerl, H.G. Sayer, O.G. Ottmann, C. Waller, W. Aulitzky, P. le Coutre, M. Freund, K. Merx, P. Paschka, H. Konig, S. Kreil, U. Berger, H. Gschaidmeier, R. Hehlmann, and A. Hochhaus, *Dynamics of BCR-ABL mRNA expression in first-line therapy of chronic myelogenous leukemia patients with imatinib or interferon alpha/ara-C.* Leukemia, 2003. **17**: 2392-2400.

81. National Cancer Institute, N. SEER Stat Fact Sheets- Chronic Myeloid Leukemia, 1975-2003, US National Insitutes of Health, http://seer.cancer.gov/statfacts/html/cmyl.html?statfacts_page=cmyl.html&x=22&y=19

82. Niemeyer, P., O. Tureci, T. Eberle, N. Graf, M. Pfreundschuh, and U. Sahin, *Expression of serologically identified tumor antigens in acute leukemias.* Leuk Res, 2003. **27**: 655-660.
83. Ohminami, H., M. Yasukawa, and S. Fujita, *HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide.* Blood, 2000. **95**: 286-293.
84. Ohnishi, K., R. Ohno, M. Tomonaga, N. Kamada, K. Onozawa, A. Kuramoto, H. Dohy, H. Mizoguchi, S. Miyawaki, K. Tsubaki, and et al., *A randomized trial comparing interferon-alpha with busulfan for newly diagnosed chronic myelogenous leukemia in chronic phase.* Blood, 1995. **86**: 906-916.
85. Ottmann, O.G., B.J. Druker, C.L. Sawyers, J.M. Goldman, J. Reiffers, R.T. Silver, S. Tura, T. Fischer, M.W. Deininger, C.A. Schiffer, M. Baccarani, A. Gratwohl, A. Hochhaus, D. Hoelzer, S. Fernandes-Reese, I. Gathmann, R. Capdeville, and S.G. O'Brien, *A phase 2 study of imatinib in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemias.* Blood, 2002. **100**: 1965-1971.
86. Paquette, R.L., N. Hsu, J. Said, M. Mohammed, N.P. Rao, G. Shih, G. Schiller, C. Sawyers, and J.A. Glaspy, *Interferon-alpha induces dendritic cell differentiation of CML mononuclear cells in vitro and in vivo.* Leukemia, 2002. **16**: 1484-1489.
87. Parkman, R., *Getting a handle on graft-versus-host disease.* N Engl J Med, 2004. **350**: 614-615.
88. Pavol MA, M.C., Rexer JL, Valentine AD, Mattis PJ, Talpaz M, *Pattern of neurobehavioral deficits associated with interferon alfa therapy for leukemia.* Neurology, 1996. **47**: 308-309.
89. Perales, M.A. and J.D. Wolchok, *Melanoma vaccines.* Cancer Invest, 2002. **20**: 1012-1026.
90. Pinilla-Ibarz, J., T. Korontsvit, V. Zakhaleva, W. Roberts, and D.A. Scheinberg, *Synthetic peptide analogs derived from bcr/abl fusion proteins and the induction of heteroclitic human T-cell responses.* Haematologica, 2005. **90**: 1324-1332.
91. Posthuma, E.F., C.A. van Bergen, M.G. Kester, R.A. de Paus, P.A. van Veelen, A.H. de Ru, J.W. Drijfhout, E.G. Lurvink, R. Willemze, and J.H. Falkenburg, *Proteosomal degradation of BCR/ABL protein can generate an HLA-A*0301-restricted peptide, but high-avidity T cells recognizing this leukemia-specific antigen were not demonstrated.* Haematologica, 2004. **89**: 1062-1071.

92. Qian, F., S. Gnjatic, E. Jager, D. Santiago, A. Jungbluth, C. Grande, S. Schneider, B. Keitz, D. Driscoll, G. Ritter, S. Lele, A. Sood, L.J. Old, and K. Odunsi, *Th1/Th2 CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in HLA-DPB1*0401/0402 patients with epithelial ovarian cancer.* Cancer Immun, 2004. **4**: 12.
93. Reiffers, J., J. Goldman, G. Meloni, J.Y. Cahn, and A. Gratwohl, *Autologous stem cell transplantation in chronic myelogenous leukemia: a retrospective analysis of the European Group for Bone Marrow Transplantation. Chronic Leukemia Working Party of the EBMT.* Bone Marrow Transplant, 1994. **14**: 407-410.
94. Rein, D.T., K. Roehrig, T. Schondorf, A. Lazar, M. Fleisch, D. Niederacher, H.G. Bender, and P. Dall, *Expression of the hyaluronan receptor RHAMM in endometrial carcinomas suggests a role in tumour progression and metastasis.* J Cancer Res Clin Oncol, 2003. **129**: 161-164.
95. Sacchi, S., H.M. Kantarjian, S. O'Brien, J. Cortes, M.B. Rios, F.J. Giles, M. Beran, C.A. Koller, M.J. Keating, and M. Talpaz, *Chronic myelogenous leukemia in nonlymphoid blastic phase: analysis of the results of first salvage therapy with three different treatment approaches for 162 patients.* Cancer, 1999. **86**: 2632-2641.
96. Sacchi S, K.H., O'Brien S, Cohen PR, Pierce S, Talpaz M., *Immune-mediated and unusual complications during interferon alfa therapy in chronic myelogenous leukemia.* J Clin Oncol., 1995. **13**: 2401-2407.
97. Saussele, S. Kompetenznetz "Akute und chronische Leukämien", 2005, http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/content/e20/index_ger.html
98. Sawyers, C.L., A. Hochhaus, E. Feldman, J.M. Goldman, C.B. Miller, O.G. Ottmann, C.A. Schiffer, M. Talpaz, F. Guilhot, M.W. Deininger, T. Fischer, S.G. O'Brien, R.M. Stone, C.B. Gambacorti-Passerini, N.H. Russell, J.J. Reiffers, T.C. Shea, B. Chapuis, S. Coutre, S. Tura, E. Morra, R.A. Larson, A. Saven, C. Peschel, A. Gratwohl, F. Mandelli, M. Ben-Am, I. Gathmann, R. Capdeville, R.L. Paquette, and B.J. Druker, *Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study.* Blood, 2002. **99**: 3530-3539.
99. Scanlan, M.J., J.D. Gordan, B. Williamson, E. Stockert, N.H. Bander, V. Jongeneel, A.O. Gure, D. Jager, E. Jager, A. Knuth, Y.T. Chen, and L.J. Old, *Antigens recognized by autologous antibody in patients with renal-cell carcinoma.* Int J Cancer, 1999. **83**: 456-464.

100. Scheibenbogen, C., A. Letsch, E. Thiel, A. Schmittel, V. Mailaender, S. Baerwolf, D. Nagorsen, and U. Keilholz, *CD8 T-cell responses to Wilms tumor gene product WT1 and proteinase 3 in patients with acute myeloid leukemia.* Blood, 2002. **100**: 2132-2137.
101. Schmitt, M., L. Li, K. Giannopoulos, J. Chen, C. Brunner, T. Barth, A. Schmitt, M. Wiesneth, K. Dohner, H. Dohner, and J. Greiner, *Chronic myeloid leukemia cells express tumor-associated antigens eliciting specific CD8+ T-cell responses and are lacking costimulatory molecules.* Exp Hematol, 2006. **34**: 1709-1719.
102. Shepherd, P.C., S. Richards, and N.C. Allan, *Severe cytopenias associated with the sequential use of busulphan and interferon-alpha in chronic myeloid leukaemia.* Br J Haematol, 1994. **86**: 92-96.
103. Siegler, R. and S. Zajdel, *Pathogenesis of Abelson-virus-induced murine leukemia.* J Natl Cancer Inst, 1972. **48**: 189-218.
104. Statistisches Bundesamt, *Sterbefälle und Todesursachen in Deutschland*. 1995.
105. Talpaz, M., S. O'Brien, E. Rose, S. Gupta, J. Shan, J. Cortes, F.J. Giles, S. Faderl, and H.M. Kantarjian, *Phase 1 study of polyethylene glycol formulation of interferon alpha-2B (Schering 54031) in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia.* Blood, 2001. **98**: 1708-1713.
106. Talpaz, M., R.T. Silver, B.J. Druker, J.M. Goldman, C. Gambacorti-Passerini, F. Guilhot, C.A. Schiffer, T. Fischer, M.W. Deininger, A.L. Lennard, A. Hochhaus, O.G. Ottmann, A. Gratwohl, M. Baccarani, R. Stone, S. Tura, F.X. Mahon, S. Fernandes-Reese, I. Gathmann, R. Capdeville, H.M. Kantarjian, and C.L. Sawyers, *Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study.* Blood, 2002. **99**: 1928-1937.
107. Tureci, O., Y.T. Chen, U. Sahin, A.O. Gure, C. Zwick, C. Villena, S. Tsang, G. Seitz, L.J. Old, and M. Pfreundschuh, *Expression of SSX genes in human tumors.* Int J Cancer, 1998. **77**: 19-23.
108. van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth, and T. Boon, *A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma.* Science, 1991. **254**: 1643-1647.

109. van der Klooster, J.M., P.M. Sucec, W.F. Stiegelis, and A. Hagenbeek, *Fever caused by hydroxyurea: a report of three cases and review of the literature.* Neth J Med, 1997. **51**: 114-118.
110. Vardiman, J.W., N.L. Harris, and R.D. Brunning, *The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms.* Blood, 2002. **100**: 2292-2302.
111. Vissers, J.L., I.J. De Vries, M.W. Schreurs, L.P. Engelen, E. Oosterwijk, C.G. Figdor, and G.J. Adema, *The renal cell carcinoma-associated antigen G250 encodes a human leukocyte antigen (HLA)-A2.1-restricted epitope recognized by cytotoxic T lymphocytes.* Cancer Res, 1999. **59**: 5554-5559.
112. Vonderheide, R.H., W.C. Hahn, J.L. Schultze, and L.M. Nadler, *The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes.* Immunity, 1999. **10**: 673-679.
113. Wang, C., A.D. Thor, D.H. Moore, 2nd, Y. Zhao, R. Kerschmann, R. Stern, P.H. Watson, and E.A. Turley, *The overexpression of RHAMM, a hyaluronan-binding protein that regulates ras signaling, correlates with overexpression of mitogen-activated protein kinase and is a significant parameter in breast cancer progression.* Clin Cancer Res, 1998. **4**: 567-576.
114. Weber, L., E. Schick, M. Merkel, H. Pillekamp, and W. Sterry, *[Dermatomyositis-like skin changes with long-term hydroxyurea (Litalir) therapy].* Hautarzt, 1995. **46**: 717-721.
115. Westermann, J., J. Kopp, I. Korner, G. Richter, Z. Qin, T. Blankenstein, B. Dorken, and A. Pezzutto, *Bcr/abl+ autologous dendritic cells for vaccination in chronic myeloid leukemia.* Bone Marrow Transplant, 2000. **25 Suppl 2**: S46-49.
116. Yang, L. and D.P. Carbone, *Tumor-host immune interactions and dendritic cell dysfunction.* Adv Cancer Res, 2004. **92**: 13-27.
117. Yotnda, P., H. Firat, F. Garcia-Pons, Z. Garcia, G. Gourru, J.P. Vernant, F.A. Lemonnier, V. Leblond, and P. Langlade-Demoyen, *Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukemia.* J Clin Invest, 1998. **101**: 2290-2296.
118. Zheng, Z., M. Takahashi, S. Aoki, K. Toba, A. Liu, Y. Osman, H. Takahashi, N. Tsukada, N. Suzuki, K. Nikkuni, T. Furukawa, T. Koike, and Y. Aizawa, *Expression patterns of costimulatory molecules on cells derived from human hematological malignancies.* J Exp Clin Cancer Res, 1998. **17**: 251-258.

7 Anhang

7.1 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Daten der CML-Patienten, die zur Untersuchung der mRNA-Expression von Tumor assoziierten Antigenen herangezogen wurden.

Tabelle 2: Ergebnisse der RT-PCR zum Nachweis der mRNA-Expression von TAA/LAA aus PBMC-Proben von CML-Patienten in der chronischen Phase.

Tabelle 3: Ergebnisse der RT-PCR zum Nachweis der mRNA-Expression von TAA/LAA aus PBMC-Proben von CML-Patienten in der Akzelerations-phase oder Blastenkrise.

Tabelle 4: Vergleich der chronischen Phase mit akzelerierten Phase bzw. Blastenkrise der RT-PCR zum Nachweis der mRNA-Expression von TAA/LAA aus PBMC-Proben von allen CML-Patienten in allen Phasen der CML und die Gesamtergebnisse.

Tabelle 5: mRNA-Expression von TAA/LAA bei verschiedenen BCR-ABL positiven Leukozyten-Subpopulationen der CML durch konventionelle RT-PCR ermittelt.

Tabelle 6: Zusammenhang zwischen der Antigenexpression von Proteinase 3, NewRen60 und MPP11 und dem klinischen Verlauf am Beispiel eines CML-Patienten.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klinischer Verlauf der CML in drei Phasen.

Abbildung 2-15: Exemplarische Elektrophorese-Banden der RT-PCR zum Nachweis der mRNA-Expression der Antigene RHAMM/CD168, WT1, PRAME, hTERT, G250, Proteinase 3 und MPP11 aus PBMC-Proben von 34 Patienten verschiedener CML-Stadien.

Abbildung 16: mRNA-Expression im klinischen Verlauf am Beispiel eines Patienten (quantitative RT-PCR).

Abbildung 17: FACS-Analyse der Expression von HLA-ABC, HLA-DR, CD33, CD34, CD40, CD80, CD83 und CD86 bei CD34 positiven Zellen, bei denen durch RT-PCR BCR-ABL nachgewiesen werden konnte.

Publikationen

Schmitt M, Li L, Giannopoulos K, Chen J, Brunner C, Döhner K, Döhner H, Greiner J. Chronic myeloid leukemia (CML) cells express tumor associated antigens eliciting specific CD8+ T cell responses and are lacking costimulatory molecules. Exp Hematol 34:1709-1719, 2006.

Greiner J, Li L, Brunner C, Wiesneth M, Ringhoffer M, Döhner H, Schmitt M. Differential expression of tumor associated antigens and immuno-stimulatory molecules in chronic myeloid leukemia (CML) cells. Onkologie 27 (Suppl.3): P846, 2004. (Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie [DGHO], Innsbruck, 2004

Greiner J, Li L, Giannopoulos K, Brunner C, Döhner K, Döhner H, Schmitt M. Chronic Myeloid Leukemia (CML) Cells Express Tumor Associated Antigens Eliciting Specific CD8+ T Cell Responses Despite of Deficient Expression of Costimulatory Molecules. Blood 106:2886, 2005 (abstract). (Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, 2005).

Greiner J, Li L, Giannopoulos K, Brunner C, Döhner K, Döhner H, Schmitt M. Chronic myeloid leukemia cells express tumor associated antigens eliciting specific CD8+ T cell responses despite of deficient expression of costimulatory molecules. Onkologie 28 (Suppl.3): 666, 2005. (Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie [DGHO], Hannover, 2005).

Schmitt M, Greiner J, Li L, Chen J, Giannopoulos K, Brunner C, Döhner K, Döhner H, Greiner J. Chronic myeloid leukemia cells express tumor-associated antigens eliciting specific CD8+ T cell responses and are lacking costimulatory molecules. Haematologica 91 (Suppl. 1): 0144, 2006.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Michael Schmitt und PD Dr. med. Jochen Greiner, die mir mit viel Geduld und Rat weiterhalfen und zu jeder Zeit ein offenes Ohr für meine Fragen hatten. Zudem möchte ich Frau Anita Szmaragowska danken, die mir im Labor sehr hilfreich zur Seite stand.

Für ihre bedingungslose Unterstützung und ihren liebevollen Rat danke ich meinen Eltern von Herzen, ohne die meine Ausbildung kaum möglich gewesen wäre.