

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II

Abteilung für Molekulare Innere Medizin

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele

**Evaluation von BAFF-Rezeptor und B-cell maturation Antigen als Targets in der
Immuntherapie des Multiplen Myeloms**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Elina Marie Hünig

aus Berlin

Würzburg, Oktober 2011

Referenten

Referent : Prof. Dr. Max S. Topp

Korreferent: Prof. Dr. Andreas Rosenwald

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Januar 2013

Die Promovendin ist Ärztin

Inhalt

1.	Das Multiple Myelom- Krankheitsbild und Therapieoptionen	1
1.1.	Historischer Rückblick.....	1
1.2.	Das Krankheitsbild und seine Pathophysiologie.....	2
1.3.	Therapie des Multiplen Myeloms- Entwicklungen bis heute und Zukunftsperspektiven.....	4
1.4.	Immuntherapie – Forschungsstand und Aussichten beim Multiplen Myelom.	5
1.4.1.	Durchbrüche durch monoklonale Antikörper in der Krebstherapie.....	5
1.4.2.	Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern – Ansätze beim Multiplen Myelom.....	6
1.5.	Die Rezeptoren Baff-R und BCMA – ein vielversprechendes Target in der Immuntherapie des Multiplen Myeloms?	7
1.5.1.	Das Ligand/Rezeptoren-System	7
1.5.3.	Die Rolle von BAFF-R und BCMA beim Multiplen Myelom	11
1.6.	Untersuchung des Expressionsmusters von BAFF-R und BCMA – Fragestellung.....	12
2.	Material.....	13
2.1.	Geräte und Verbrauchsmaterial	13
2.2.	Chemikalien	13
2.3.	Enzyme	14
2.4.	Kits.....	14
2.5.	Kulturmedien und Zusätze.....	15
2.6.	Zytokine	15
2.7.	Primer und Antikörper	15
2.7.1.	Primer	15
2.7.2.	Antikörper	16
2.8.	Vektoren.....	17
2.8.1.	Plasmide	17
2.8.2.	Retrovirale Vektoren	17
2.9.	Mikroorganismen, Zellen und Gewebe.....	18
2.9.1.	Escherichia coli	18
2.9.2.	Zellen, Zelllinien und Gewebe	18

3. Methoden	19
3.1. Molekularbiologische Methoden	19
3.1.1. Kultivierung und Kryokonservierung von E. coli.....	19
3.1.2. Transformation von E. coli.....	19
3.1.3. DNA-Präparation aus E. coli.....	20
3.1.3.1. „ <i>Qick and Dirty</i> “-Präparation	20
3.1.3.2. DNA-Minipräparation	20
3.1.4. Analyse und Klonierung von Nukleinsäuren	21
3.1.4.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	21
3.1.4.2. Restriktionsverdau von Nukleinsäuren.....	21
3.1.4.3. Dephosphorylierung von kompatiblen DNA-Enden	21
3.1.4.4. Ligation von DNA-Fragmenten mit dem retroviralen Vektor.....	21
3.1.4.5. Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen.....	22
3.1.4.6. Sequenzierung von DNA.....	22
3.1.4.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	22
3.1.4.8. RNA Isolierung.....	23
3.1.4.9. <i>Reverse transcription</i> - PCR (RT-PCR).....	23
3.2. Zellbiologische Arbeitstechniken	24
3.2.1. Allgemeine Kultivierung und Kryokonservierung von Zellen und Zelllinien	24
3.2.2. Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) und humanen Multiplen Myelom-Zellen	25
3.2.3. Gewinnung von Dendritischen- und NK- Zellen mittels MACS MicroBeads	25
3.2.3.1. Gewinnung von Dendritischen Zellen.....	25
3.2.3.2. Gewinnung von Natürlichen Killer-Zellen.....	25
3.2.4. Gewinnung und Kultivierung humaner T-und B-Zellen.....	26
3.2.5. Zellanalyse	27
3.2.5.1. Durchflusszytometrie (FACS).....	27
3.2.5.2. Immunhistochemische Färbungen.....	27
3.2.6. Produktion von retroviralem Überstand	28

4.	Ergebnisse	29
4.1.	Expression von BAFF-R und BCMA auf frisch isolierten humanen MM-Zellen.....	29
4.2.	Expression von BAFF-R und BCMA auf ruhenden und aktivierten Lymphozyten und NK-Zellen.....	32
4.3.	Expression von BAFF-R und BCMA auf Antigen-präsentierenden Zellen..	34
4.4.	Expression von BAFF-R auf Hirngewebe: Wegfall von BAFF-R als Target in der Immuntherapie des Multiplen Myeloms	35
4.5.	Nachweis von BCMA mRNA in menschlichen Gewebelysaten durch <i>reverse-transcriptase</i> -PCR (RT-PCR).....	36
4.6.	Nachweis der Oberflächenexpression von BCMA auf menschlichen Geweben mittels Immunhistochemie.....	36
5.	Diskussion der Ergebnisse	38
5.1.	Bedeutung der Rezeptorexpression auf den untersuchten Zelltypen.....	38
5.2.	Relevanz der Selektivität von monoklonalen Antikörpern.....	40
6.	Zusammenfassung	44
7.	Literaturverzeichnis	45

1. Das Multiple Myelom- Krankheitsbild und Therapieoptionen

1.1. Historischer Rückblick

Im Jahre 1845 wurde der Londoner Arzt Dr. William Macintyre von dem Patienten Thomas McBean konsultiert. Er äußerte, dass etwas mit seinem Urin nicht stimmte – neben häufigem Harndrang wurde seine Kleidung durch den Urin steif. Außerdem klagte der Patient über Ausgezehrtheit und ein ungewöhnliches Schwächegefühl. Während eines Spaziergangs habe er im Brustkorb ein Knacken verspürt, wobei er starke Schmerzen erlitt. „Case of mollities and fragilitas ossium, accompanied with urine strongly charged with animal matter“ nannte Dr. Macintyre seine Arbeit, welches die erste Beschreibung des Multiplen Myeloms sein sollte und 1850 in London veröffentlicht wurde (Macintyre, 1850). Der ungewöhnlich eiweißreiche Urin des Patienten wurde von Dr. Henry Bence-Jones untersucht und beschrieben (Bence, 1848) während sein Kollege, der Chirurg John Dalrymple, das Knochenmark mikroskopierte und seine Beobachtungen in „On the microscopical character of mollities ossium“ niederschrieb (Dalrymple, 1846).

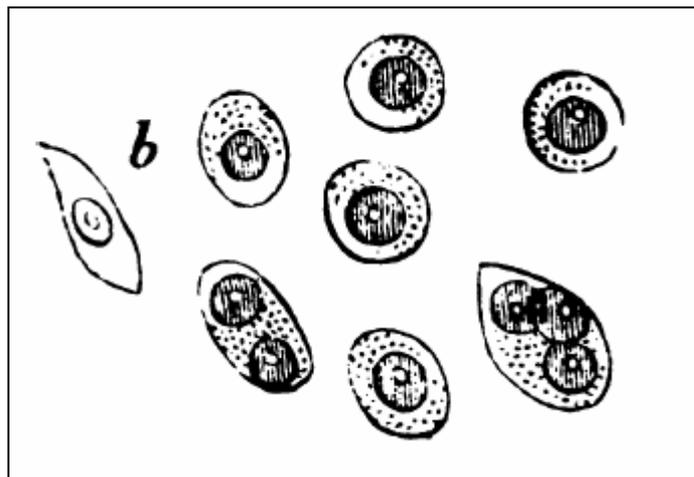


Bild1. Historischer Holzschnitt der histologischen Beobachtungen (Dalrymple, 1846)

1.2. Das Krankheitsbild und seine Pathophysiologie

Das Multiple Myelom (MM) ist ein aggressives B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom, das sich durch eine Infiltration des Knochenmarks mit malignen Plasmazellen auszeichnet. Es macht ca. 1% aller Malignome aus. In den westlichen Industrieländern beträgt die Inzidenz 3-4/100000. Die Krankheit nimmt mit steigendem Alter zu, mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr. Männer sind im Verhältnis 2:3 häufiger betroffen.

Ausgangspunkt der Erkrankung ist ein Klon maligne transformierter Plasmazellen (B-Zellen), die im Knochen akkumulieren, osteolytische Prozesse aktivieren und die normale Blutbildung beeinträchtigen. Häufigste Lokalisation ist die Wirbelsäule, das Becken, die Rippen und der Schädel, doch auch Ansiedlungen in den Weichteilen sind möglich. Handelt es sich um einen solitären Herd maligner Zellen, spricht man vom Plasmozytom. Myelomzellen produzieren meist ein monoklonales Immunglobulin, das in der Elektrophorese von Serum und/oder Urin als monoklonaler Gradient (sog. M-Gradient) nachgewiesen werden kann. Meist handelt es sich um IgG und IgA-Moleküle. Werden, wie bei manchen Patienten, nur leichte Ketten des Immunglobulins produziert, spricht man vom sog. „Bence-Jones“- oder „Leichtketten“-Myelom. Diese Ketten werden aus dem Serum in den Urin ausgeschieden und können dort nachgewiesen werden. Eine ausschließliche Produktion schwerer Ketten findet sich bei der sehr seltenen Schwerkettenkrankheit.

Die „monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz“, kurz MGUS genannt, ist ein Befund, der durch einen M-Gradienten ohne feststellbare Krankheit gekennzeichnet ist. Patienten mit MGUS können ein manifestes Myelom entwickeln. Beim „smoldering Myeloma“ ist der Serumspiegel des monoklonalen Proteins höher als beim MGUS, während ein „indolentes Myelom“ eine manifeste Erkrankung beschreibt, die sich über einen langen Zeitraum kaum verändert (Durie et al., 2003).

Das expansive Wachstum der Myelomzellen und die übermäßige Produktion des Paraproteins haben vielseitige Konsequenzen. Durch Aktivierung osteolytischer Prozesse kommt es zu Skeletterscheinungen in Form multipler Osteolysen mit resultierenden Frakturen, Knochenmarksinsuffizienz mit Beeinträchtigung der normalen Blutbildung und Infektionsneigung durch Mangel an funktionstüchtigen Immunglobulinen, Hyperviskosität des Blutplasmas, Hyperkalzämie und zur Niereninsuffizienz (Durie and Salmon, 1975).

Es gibt immer mehr Erkenntnisse, dass der Entstehung der Erkrankung komplexe Änderungen in der Krebszelle als auch im Milieu des umgebenden Knochenmarks zugrunde liegen (Seidl et al., 2003). Auch ein Einfluss der Funktionalität des Wirts-Immunsystems ist für die Entstehung eines MM wahrscheinlich (Pratt et al., 2007; Seidl et al., 2003). Die Beziehung zwischen Myelomzellen und dem Milieu des umgebenden Knochenmarks ist zudem entscheidend für die Aufrechterhaltung der Krankheit: Tumor- und Stromazellen interagieren über Adhäsionsmoleküle und verschiedene Zytokine miteinander, induzieren Medikamentenresistenzen, stören den Knochenmetabolismus und ermöglichen so der Tumorzelle ihr Überleben. Hierbei spielen eine Vielzahl immunologisch aktiver Komponenten eine Rolle, deren komplexes Zusammenspiel in der nachfolgenden Grafik dargestellt ist (Bild 2) (Pratt et al., 2007).

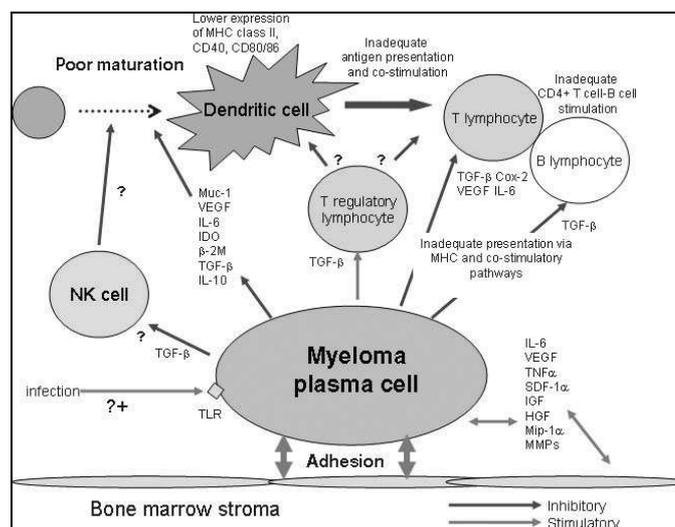


Bild 2. Zusammenspiel zwischen Tumorzelle und dem Milieu des Knochenmarks (Pratt et al., 2007).

Untersuchungen zeigten, dass es für das MM keine typischen genetischen Veränderungen gibt, die diagnostischen Wert besitzen. Die Aktivierung eines der drei Cyclin-D-Gene in fast allen Fällen und Deletionen v.a. von Chromosom 13 in Kombination mit anderen chromosomalen Anomalien können jedoch mit schlechten Prognosen einhergehen (Singhal and Mehta, 2006; Stewart and Fonseca, 2005).

1.3. Therapie des Multiplen Myeloms- Entwicklungen bis heute und Zukunftsperspektiven

Ohne Therapie überleben Patienten mit einem Multiplen Myelom im Stadium II und III im Schnitt sechs Monate. Das mittlere Überleben ab Diagnosestellung eines symptomatischen MM-Patienten, der eine Therapie erhält, konnte in den vergangenen Jahren dank Hochdosis-Chemotherapie mit Stammzelltransplantation (HSCT) und neuer Substanzen auf ca. fünf Jahre angehoben werden (Singhal and Mehta, 2006). Die Chemotherapie stellt momentan die wichtigste Therapieoption dar. Das Alkylans Melphalan war das erste Medikament, das zur Behandlung des MM angewandt wurde (Blokhin et al., 1958), wenige Jahre später folgte das Steroid Prednison. Seit den 60er Jahren galt die Kombination beider Medikamente als sog. Alexanian-Schema als Standard in der MM-Therapie (Alexanian et al., 1969). Die eigentliche Hochdosistherapie bestand anfangs ebenfalls aus Melphalan (McElwain and Powles, 1983). Sie ist zwar besonders wirksam gegen Myelomzellen, supprimiert jedoch auch die normale Blutbildung. Deshalb wird heute die Chemotherapie mit Wachstumsfaktoren zur Stammzellmobilisierung kombiniert und eine Stammzelltransplantation angeschlossen. Anfangs noch mit autologem Knochenmark durchgeführt (Attal et al., 1992; Cunningham et al., 1994), wird diese Art der Transplantation heute durch periphere Stammzellen weitgehend abgelöst (Attal and Harousseau, 1999; Brice et al., 1996; Gianni et al., 1990; Vesole et al., 1994). Der Vorteil der HSCT gegenüber der konventionellen Chemotherapie wurde in mehreren Studien erfolgreich bewiesen (Attal et al., 2003; Attal et al., 1996; Barlogie et al., 1997; Child et al., 2003; Harousseau et al., 2006; Palumbo et al., 1999) und erzielt heute optimalerweise eine Verlängerung der Überlebenszeit von zwölf Monaten (Einsele and Straka, 2004). Für jüngere Patienten ist heute eine zweite Hochdosistherapie mit Transplantation üblich, um die Responsequalität zu verbessern (auch als sog. Tandemtherapie bezeichnet) (Attal et al., 2003; Barlogie et al., 1997; Vesole et al., 1994), während ältere Patienten, die für eine Stammzelltransplantation nicht in Frage kommen, eine Kombination aus Melphalan und Prednison mit dem Proteasominhibitor Bortezomib (Velcade) erhalten (Jackson et al., 2005; Richardson et al., 2007; Venon et al., 2009).

In seltenen Fällen wird eine allogene Transplantation (Gahrton et al., 1995) durchgeführt, das heißt, es werden Stammzellen von einem Familien- bzw. Fremdspender herangezogen und mit einer Donor-Lymphozyteninfusion kombiniert (Lokhorst et al., 2000), der sog. DLI, um einen graft-versus-myeloma-Effekt (Mehta and Singhal, 1998) zu induzieren. Die allogene Transplantation ist momentan die einzige potentiell kurative Therapie beim fortgeschrittenen Myelom. In den vergangenen Jahren wird die sog. „Mini-Transplantation“ oder Dosis-reduzierte Konditionierung (geringere Dosisintensität der Chemotherapie vor allogener Stammzelltransplantation) in klinischen Studien geprüft. Diese Methode könnte durch die geringere Toxizität auch bei älteren Patienten Anwendung finden (Crawley et al., 2007; Crawley et al., 2005; Einsele et al., 2003). Eine weitere Variante ist die Sequenz von Auto- und Allotransplantation, die durch hohe Remissionsraten eine mögliche Therapieoption darstellt (Kroger et al., 2002; Maloney et al., 2003).

Trotz dieser Fortschritte der letzten Jahre ist die Krankheit nur in den seltensten Fällen heilbar, viele Patienten rezidivieren (Singhal and Mehta, 2006). Die Therapieoptionen bergen häufig ein großes Nebenwirkungspotential, die Gefahr opportunistischer Infektionen der sowohl krankheitsbedingt als auch durch Chemotherapie und Stammzelltransplantation immunsupprimierten Patienten ist hoch (Singhal and Mehta, 2006).

Wie bei vielen malignen Erkrankungen besteht deshalb auch beim Multiplen Myelom ein großes Interesse der Medizin an neuen Therapieoptionen.

1.4. Immuntherapie – Forschungsstand und Aussichten beim Multiplen Myelom

1.4.1. Durchbrüche durch monoklonale Antikörper in der Krebstherapie

Besonders im Bereich der Immuntherapien hat es in den vergangenen Jahren in der Krebstherapie große Durchbrüche gegeben. Auf der Suche nach sog. targeted therapies wurden monoklonale Antikörper (mAbs) entwickelt, die heute in der Hämatologie und Onkologie Anwendung finden. Besonders drei mAbs sind momentan sehr erfolgreich in klinischem Gebrauch: Rituximab ist ein Antikörper gegen CD20, ein nicht-

glykosiliertes Phosphoprotein, das sich auf der Oberfläche normaler B-Zellen sowie auf 95% aller Non-Hodgkin-Lymphome der B-Zelllinie befindet (Maloney et al., 1997). In den letzten sieben Jahren konnte mit Rituximab eine radikale Veränderung in der Lymphomtherapie erreicht werden. Besonders Patienten mit diffus-großzelligem und follikulärem Lymphom profitierten durch die Kombination von Rituximab mit Chemotherapeutika (Coiffier et al., 2002; Gao et al., 2009).

Trastuzumab ist ein mAb gegen den Wachstumsfaktorrezeptor HER2 (human epidermal growth factor receptor 2), dessen vermehrte Expression bei ca. 20% aller Brustkrebspatientinnen zu finden ist (Slamon et al., 1989). Die Überexpression führt zu gesteigertem Tumorwachstum und ist somit bei Brustkrebspatienten mit einer aggressiveren Progression und einer schlechteren Prognose assoziiert. Trastuzumab wurde 1998 in den USA erstmalig für die Therapie des metastasierten Brustkrebs zugelassen und findet seit 2006 auch in der adjuvanten und neoadjuvanten Therapie Anwendung. In Studien zeigte sich ein signifikanter Vorteil im Gesamtüberleben durch die adjuvante Gabe von Trastuzumab (Mallmann, 2006; Perez et al., 2006).

Ähnlich wie Trastuzumab wirkt der monoklonale Antikörper Cetuximab, der den Wachstumsfaktorrezeptor EGFR (epidermal growth factor receptor) blockiert. Neben anderen soliden Tumoren wird dieser besonders auf Tumorzellen des Kolon-Karzinoms hochreguliert, einem der häufigsten malignen Tumore des Menschen überhaupt. Neben der Rezeptorblockade, die den Tumor von wichtigen Wachstumssignalen abkoppelt, verstärkt Cetuximab die Wirkung anderer zytotoxischer Therapeutika (Cunningham et al., 2004). Der Antikörper wird inzwischen erfolgreich bei Patienten mit EGFR-überexprimierendem metastasierendem Kolorektalkarzinom in Kombination mit Irinotecan, die auf eine vorherige Irinotecan-haltige Therapie nicht mehr ansprechen, eingesetzt (de Castro-Carpeno et al., 2008; Nagorsen and Thiel, 2007).

1.4.2. Immuntherapie mit monoklonalen Antikörpern – Ansätze beim Multiplen Myelom

Die Suche nach ebensolchen neuen Zielantigenen, die spezifisch oder vermehrt von bestimmten Krebszellen exprimiert werden, ist Gegenstand intensiver Forschung. Auch beim Multiplen Myelom werden verschiedene immuntherapeutische Ansätze verfolgt, die von Harrison und Cook 2005 in einem Review zusammengestellt wurden (Harrison and Cook, 2005). Die Bedeutung, die dem monoklonalen Antikörper Rituximab (anti

CD20) (Kapoor et al., 2008; Musto et al., 2003; Treon et al., 2001) in der Therapie des MM zukommt, ist trotz der Erfolge in der Therapie anderer Non-Hodgkin-Lymphome der B-Zelllinie gering: Weniger als 20% der Plasmazellklone exprimieren CD20, das Zielantigen von Rituximab.

Die Erfolge in der Entwicklung humoraler Immuntherapien in Form monoklonaler Antikörper gegen Myelom-assoziierte Antigene wie CD138 (Ikeda et al., 2009), das auf Plasmazellen exprimiert wird, gegen CD38 (Ellis et al., 1995; Stevenson, 2006) CD40 (Francisco et al., 1997; Khubchandani et al., 2009), VEGF (Yang et al., 2003) und HM 1.24 (Ono et al., 1999) blieben bisher aus oder bleiben noch abzuwarten (Harrison and Cook, 2005). Auch gegen Antigene wie CD75 und MUC-1 wurde ein monoklonaler Antikörper entwickelt (hLL1 milatuzumab oder IMMU-115), dessen möglicher Nutzen beim MM diskutiert wird (Barratt-Boyes, 1996; Singh and Bandyopadhyay, 2007; Stein et al., 2007).

1.5. Die Rezeptoren Baff-R und BCMA – ein vielversprechendes Target in der Immuntherapie des Multiplen Myeloms?

1.5.1. Das Ligand/Rezeptoren-System

Neben den oben genannten Myelom-assoziierten Antigenen, deren Einsatz für zell- und humoral vermittelte Immuntherapien diskutiert wurde, gerieten in den letzten Jahren zwei Rezeptoren in den Fokus des Interesses: *BAFF Receptor* (BAFF-R) (Thompson et al., 2001) und *B-cell maturation antigen* (BCMA) (Laabi et al., 1992). Sie sind, neben *Transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand* (TACI) (von Bulow and Bram, 1997), zwei von drei Rezeptoren des Liganden *B cell activating factor* (BAFF) (Schneider et al., 1999), auch Blys, TALL-1, CD257 oder TNFSF13 genannt, einem Mitglied der *tumor necrosis factor*-Familie (TNF-Familie). Die BAFF-Subfamilie zeigt eine enorme Komplexität in Protein-Expression, Ligand-Rezeptor-Interaktionen und Signalwegen, deren Schlüsselfunktionen zum Teil bereits erforscht wurden. Ein komplettes molekulares Verständnis dieser Funktionen existiert jedoch noch nicht.

Bei dem Liganden BAFF handelt es sich um ein Typ-II-Membranprotein, das sich auf der Zelloberfläche befindet, aber auch in löslicher Form von der Zelle sezerniert wird.

Es wird als Homotrimer von Macrophagen, Monozyten, aktivierten T-Zellen, Neutrophilen, Antigen-präsentierenden Zellen und Dendritischen Zellen exprimiert (Fu et al., 2006; Mackay and Browning, 2002), doch auch aktivierte und maligne B-Zellen können BAFF exprimieren (Chu et al., 2007; Kern et al., 2004; Novak et al., 2002). Über Aufbau und räumliche Struktur von BAFF und APRIL wurde von Schneider und Bossen ausführlich berichtet (Bossen and Schneider, 2006). Bei *a proliferation inducing ligand* (APRIL) handelt es sich um einen Liganden aus derselben Familie mit vielen strukturellen Homologien zu BAFF. Er wird vor allem von lymphoiden und einigen Tumorzellen exprimiert und spielt eine Rolle im CD40-unabhängigen Antikörperklassenwechsel von B-Lymphozyten, beim Überleben von Plasmazellen und beim Wachstum verschiedener Tumoren (Bossen and Schneider, 2006; Hahne et al., 1998; Mackay and Browning, 2002; Mackay and Schneider, 2009). Neuere Entdeckungen belegen zudem eine BAFF-und/oder APRIL-Expression auch in nicht hämatopoetischen Geweben (Mackay and Schneider, 2009).

Man weiß heute, dass BAFF und seine Rezeptoren wichtige Rollen im Immunsystem spielen, insbesondere in der Entwicklung und Homöostase der B-Zelllinie. Bereits in frühen Studien wurde gezeigt, dass BAFF die B-Zell-Proliferation und die Immunglobulin-Sekretion stimuliert (Mackay and Browning, 2002; Schneider et al., 1999). Auf ihrem Entwicklungsweg durchlaufen unreife B-Zellen aus dem Knochenmark die Milz, die sie über transitionale Stadien (T1- und T2-Stadium) als reife B-Zelle oder als Zelle der Marginalzone verlassen (siehe Bild 3). Ein Verlust von BAFF resultiert bei Mäusen in einem Verlust von 90% reifer B-Zellen (follikuläre und Marginalzonen-Lymphozyten), die Reifung wird im T1-Stadium gestoppt (Schiemann et al., 2001). In Einklang damit steht, dass BAFF-transgene Mäuse eine erhöhte Anzahl reifer B-Zellen aufweisen und autoimmune Störungen entwickeln (Mackay et al., 1999). Auch beim Menschen lassen sich erhöhte Level von BAFF sowohl bei Autoimmunerkrankungen (Batten et al., 2000; Mackay and Schneider, 2009) als auch bei Malignomen des hämatopoetischen Systems (siehe 1.5.3) nachweisen.

Neben der B-Zelllinie scheint BAFF zudem eine Bedeutung für die T-Zellphysiologie zu haben: Über den Rezeptor Baff-R können auch CD4⁺ T-Zellen stimuliert werden. Bei allogenen Herztransplantationen konnte so eine kostimulatorische Komponente von BAFF bei der Transplantatabstoßung beobachtet werden (Ye et al., 2004).

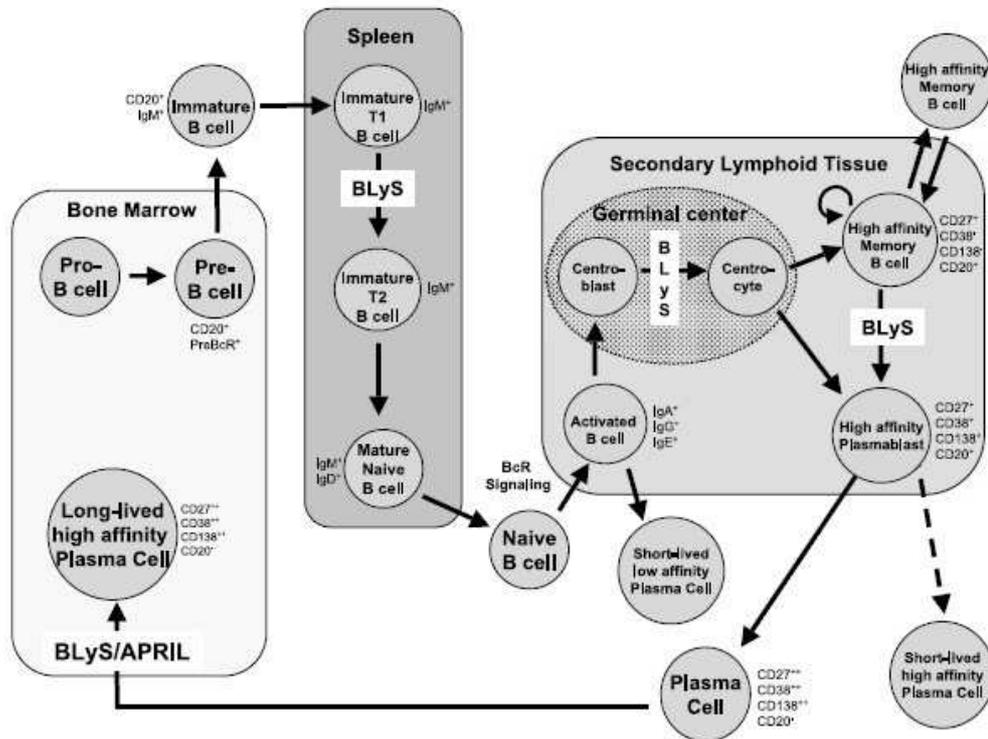


Bild 3. Einfluss von BAFF (hier: Blys) in den verschiedenen Entwicklungsstadien von B-Lymphozyten. (Baker, 2004)

Ligand	Receptor	Function
BAFF	BAFF-R	Survival of transitional B cells, enhanced humoral immunity
	TACI	Enhance T1 responses, negative regulation of B cell activities
APRIL	BCMA	Unknown

Bild 4. Übersicht über die Ligandenbindung der verschiedenen Rezeptoren (Waldschmidt and Noelle, 2001).

Die Rezeptoren BCMA und BAFF-R besitzen keine Signalpeptide und gehören somit zur Gruppe der Typ III-Membran Proteine (Bossen and Schneider, 2006). BAFF wird von seinem Rezeptor BAFF-R selektiv gebunden, während BCMA und TACI auch eine hohe Affinität zu APRIL aufweisen (Bild 4).

Die Interaktion von BAFF-R mit BAFF scheint die entscheidendste Rolle in der B-Zellentwicklung zu spielen. Der Rezeptor wird von allen reifen B-Lymphozyten mit Ausnahme von Plasmazellen des Knochenmarks exprimiert (Darce et al., 2007; Mackay and Schneider, 2009). Er wird bei Mäusen im Laufe der B-Zell-Reifung hochreguliert (Ng et al., 2004). Anhand BAFF-R-Maus-Mutanten (A/WySnJ) (Thompson et al., 2001; Yan et al., 2001) und BAFF-R^{-/-} Mäusen konnte die Relevanz dieses Rezeptors für die B-Zelllinie aufgezeigt werden (Sasaki et al., 2004). Bei diesen Tieren kommt es, wie bei BAFF^{-/-} Mäusen, zu einem nahezu kompletten Verlust reifer B-Zellen – während eine Ausschaltung der Rezeptoren BCMA und TACI diesen ausgeprägten Effekt nicht hat. Es mehren sich die Erkenntnisse, dass Baff-R auch in der T-Zell-Physiologie eine Rolle spielt und von T-Zellen exprimiert wird, beispielsweise indem über ihn co-stimulatorische Signale vermittelt werden (Huard et al., 2004; Mackay and Leung, 2006; Ye et al., 2004). Auch der Rezeptor TACI (von Bulow and Bram, 1997), exprimiert von verschiedenen Untergruppen von B- Zellen, Plasmazellen, Monozyten und Dendritischen Zellen, hat unterschiedliche Aufgaben: Zum einen spielt TACI in den frühen B-Zell Stadien eine entscheidende Rolle, allerdings als negativer Regulator: Der Ausfall von TACI bei Mausmutanten resultiert in einer stark erhöhten Zahl von B-Zellen (Seshasayee et al., 2003) und TACI-Ig transgene Mäuse weisen eine erniedrigte Anzahl reifer B-Zellen auf (Gross et al., 2001). Andererseits wird der Rezeptor TACI für eine effiziente T-Zell unabhängige humorale Typ II-Immunantwort benötigt, da er stark von bestimmten Subpopulationen unreifer B-Zellen, die zu dieser Art von Immunantwort beitragen, exprimiert wird (Mackay and Schneider, 2008).

BCMA, dessen Expression auf die B-Zelllinie beschränkt zu sein scheint, spielt in diesen frühen Entwicklungsstadien wohl noch keine Rolle - BCMA^{-/-} Mäuse sind gesund (O'Connor et al., 2004; Schiemann et al., 2001), auch wenn sie reduzierte Plasmazellzahlen aufweisen. Dies demonstriert die Bedeutung dieses Rezeptors für spätere Differenzierungsstadien: BCMA ist wichtig für das Überleben langlebiger Plasmazellen des Knochenmarks (O'Connor et al., 2004) sowie von Plasmablasten (Avery et al., 2003; Tarte et al., 2003) und wird erst in späten Differenzierungsschritten der B-Zelle hochreguliert (Zhang et al., 2005).

Zudem werden über BCMA stimulatorische Signale zur Hochregulation von Oberflächenmolekülen zur Antigenpräsentation von B-Zellen vermittelt (Yang et al., 2005).

1.5.3. Die Rolle von BAFF-R und BCMA beim Multiplen Myelom

Die Bedeutung dieses Ligand/Rezeptorsystems für die Reifung und Aufrechterhaltung der B-Zell-Population legt den Gedanken nahe, dass ihm auch eine entscheidende Rolle in der Homöostase und beim Überleben der Zellen von B-Zell-Malignomen wie dem Multiplen Myelom zukommen könnte. Verschiedene Autoren berichteten bereits über vermehrte BAFF-Aktivität bzw. Hochregulation seiner Rezeptoren in sowohl Hodgkin- als auch verschiedenen Non-Hodgkin-Lymphomen und vermuteten einen Zusammenhang von erhöhten BAFF-Leveln mit der Aktivität und Schwere der Erkrankung (Elsawa et al., 2006; Fu et al., 2006; He et al., 2004; Kern et al., 2004; Novak et al., 2002).

Auch für das MM gab es bereits diese Vermutungen, die auf der Forschungsarbeit mehrerer Gruppen basierten und zu der Annahme führten, in dem Ligand-/Rezeptorsystem einen möglichen therapeutischen Angriffspunkt gefunden zu haben:

Novak et al. untersuchten, nachdem Sie eine erhöhte Expression von BAFF in Zellen der chronisch lymphoiden B-Zell-Leukämie gefunden hatten (Novak et al., 2002), als erste das Oberflächen-Expressionsmuster von BAFF und seinen drei Rezeptoren auf einem kleinen Panel humaner 138+MM-Zellen sowie humaner MM-Zelllinien (Novak et al., 2004a). Auch Moreaux et al. untersuchten auf RNA-Ebene mehrere MM-Zelllinien sowie frische MM-Zellen auf die Expression von BAFF und seiner Rezeptoren. Beide wiesen eine relevante Expression der Rezeptoren, wenn auch in unterschiedlicher Stärke und Verteilung, nach. Eine weitere wichtige Entdeckung, die die Bedeutung des Ligand-/Rezeptorsystems für das MM hervorhebt, ist die von Bellucci et al. Sie beschrieben die Präsenz von Antikörpern gegen den Rezeptor BCMA bei Patienten mit MM, die eine sog. *Donor lymphocyte infusion*, kurz DLI, im Rahmen eines Rezidivs nach allogener Stammzelltransplantation erhalten haben (siehe 5.1) (Bellucci et al., 2005).

1.6. Untersuchung des Expressionsmusters von BAFF-R und BCMA –Fragestellung

Das unterschiedliche Expressionsmuster auf MM-Zellen ist nicht nur interessant, weil über BAFF/BAFF-R die Überlebenszeit der malignen Zellen verlängert wird, sondern weil die Expression von BAFF-R auf (normalen) Plasmazellen nicht bekannt war. Durch die potentielle Hochregulation des Rezeptors auf MM-Zellen könnte ein neues Zielantigen für die Immuntherapie des MM gefunden worden sein. Der Rezeptor BCMA stellt, durch die Beschränkung der Expression auf Plasmazellen und der signifikanten Expression auf ihrem malignen Pendant, ebenfalls einen potentiellen Kandidaten für ein ebensolches Zielantigen dar.

Um die Eignung dieser beiden Moleküle für die Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers mit geeigneter Selektivität näher zu evaluieren, haben wir eine breit gefächerte Analyse der Oberflächen-Expression von BAFF-R und BCMA vorgenommen. Wir untersuchten ein größeres Panel (21 Proben) von frisch isolierten MM-Zellen mit Hilfe des *fluorescence activated cell sorting* (FACS-Analyse). Die spezifische Expression auf lymphatischen Zellen sollte durch zusätzliche Untersuchung humaner Zellen hämatopoetischen Ursprungs von gesunden Spendern evaluiert werden: Neben B- und T-Lymphozyten in ruhender als auch aktivierter Form untersuchten wir Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) und Antigen-präsentierende Zellen. In Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie der Universität Würzburg wurden zusätzlich lymphatische und nicht-hämatopoetische menschliche Gewebe auf RNA-Ebene anhand der RT-PCR und anhand immunhistochemischer Färbungen auf das Vorkommen und die Verteilungsmuster der Rezeptoren untersucht.

2. Material

2.1. Geräte und Verbrauchsmaterial

Elektroporator EasyJect plus	Peqlab, Erlangen
FACSCalibur inklusive CellQuestPro Software	BD Biosciences, Heidelberg
Geldokumentationseinheit E-Box 008-SD	Peqlab, Erlangen
Mikroskop Axiovert 4 0CFL	Carl Zeiss, Göttingen
PCR Gerät Mastercycler epgradient	Eppendorf, Hamburg
PCR Gerät MWG Biotech Primus	Labbay, Gedermalsen, Netherlands
Photometer Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences, Freiburg
Sterilwerkbank HERASafe KS12/18	Kendro, Osterode
Zellinkubator HERACell 240	Kendro, Osterode
Zellkulturzentrifuge Multifuge 3 S-R	Kendro, Osterode

Verbrauchsmaterial:

Die verwendeten Plastikmaterialien für Zellkulturen und andere molekularbiologische Methoden stammten von Greiner BIO-ONE (Frickenhausen), Eppendorf (Hamburg), Nunc (Wiesbaden) und Corning (Bodenheim).

2.2. Chemikalien

Chemikalien-Lösungen wurden mit entsalztem und gefiltertem Wasser hergestellt und bei Bedarf autoklaviert.

Ampicillin	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Applichem, Darmstadt
Agar	Applichem, Darmstadt
Universal Agarose (peqGold)	Peqlab, Erlangen
BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma, Taufkirchen

DMSO	Sigma, Taufkirchen
DNA-Standards (50bp & 1kb plus DNA-ladder)	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP-Set	Roche, Mannheim
Ethidium Bromid (10 mg/ml)	Applichem, Darmstadt
Ficoll/Paque	Biochrome, Berlin
Formalin Solution 10%	Sigma, Taufkirchen
Hefeextrakt	Applichem, Darmstadt
Kanamycin	Gibco, Karlsruhe
Natrium-Heparin	Braun, Melsungen
Neomycin	Sigma, Taufkirchen
Puromycin	Applichem, Darmstadt
TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylen-diamin)	Sigma, Taufkirchen
Trypton	Applichem, Darmstadt

2.3. Enzyme

Restriktionsendonukleasen	
XhoI, Hind III, Not I, AccI, XmnI	New England Biolabs, Frankfurt
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs, Frankfurt
T4 DNA Ligase	New England Biolabs, Frankfurt
Taq DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden

2.4. Kits

CD1c (BDCA-1) Dendritic cell isolation kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Plasmacytoid Dendritic cell isolation kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Expand High fidelity plus system	Roche, Mannheim
Rneasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden

1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	Roche, Mannheim
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel, Düren
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
pcDNA™3.1/V5-His TOPO® TA Expression Kit	Invitrogen, Karlsruhe

2.5. Kulturmedien und Zusätze

D-PBS (w/o Ca, Mg)	Gibco, Karlsruhe
DMEM	Gibco, Karlsruhe
(high glucose +GlutaMAX+Sodium Pyruvat)	
EDTA-Lösung (0,5 M)	BioWhittaker, Rockland, USA
FCS	Biochrome, Berlin
Penicillin/Streptomycin (100X)	Gibco, Karlsruhe
RPMI 1640 (+GlutaMAX)	Gibco, Karlsruhe
Trypanblau	Gibco, Karlsruhe
Trypsin/EDTA (0,05%)	Gibco, Karlsruhe

2.6. Zytokine

rhIL-2 (Proleukin)	Chiron, Ratingen
--------------------	------------------

2.7. Primer und Antikörper

2.7.1. Primer

Hind-BCMA-for 5' CAAGCTTCCACCATGTTGCAGATGGCTGG 3'
 Not-BCMA-rev 5' TTGCGGCCGCTTACCTAGCAGAAATTGAT 3'

Sigma-Genosys, Steinheim

2.7.2. Antikörper

Typ	Markierung	Anwendung	Hersteller
goat anti-rat IgG F (c)	PE	FACS	Abcam, Cambridge, UK
mouse anti-human BAFF Receptor	PE	FACS	BD Pharmingen, Heidelberg
mouse anti-human BAFF Receptor		FACS, IHC	BioLegend, San Diego, USA
rat anti-BCMA (Vicky-1)		FACS, IHC	Abcam, Cambridge, UK
mouse IgG		FACS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany
mouse anti-human CD3	PE, PerCP	FACS	BD Biosciences, Heidelberg
mouse anti-human CD4	FITC	FACS	BD Biosciences, Heidelberg
mouse anti-human CD8	FITC	FACS	BD Biosciences, Heidelberg
mouse anti-human CD14	FITC	FACS	BD Biosciences, Heidelberg
mouse anti-human CD19	FITC	FACS	BD Biosciences, Heidelberg
mouse anti-human CD56	FITC	FACS	BD Biosciences, Heidelberg
CD 56 MicroBeads	PE	Zelltrennung	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
mouse anti-human 86	PE	FACS	BD Pharmingen, Heidelberg
mouse anti-human CD138	FITC	FACS	BD Biosciences, Heidelberg
anti-Biotin	APC	FACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-BDCA-2	APC	FACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Abkürzungen in der Tabelle: FACS: *fluorescence activated cell sorting*, IHC: *immunohistochemistry*

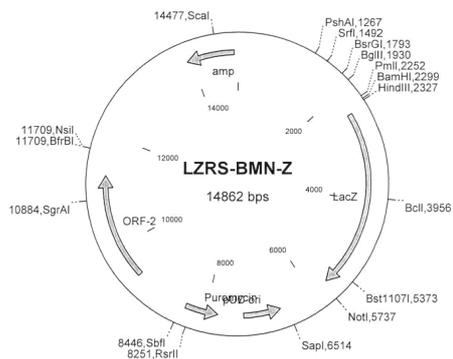
Anmerkung: Diese Tabelle enthält nur Antikörper, die nicht Bestandteil eines Kits (s.o.) sind.

2.8. Vektoren

2.8.1. Plasmide

pcDNA 3.1-V5-His-Topo Invitrogen, Karlsruhe

2.8.2. Retrovirale Vektoren



pLZRS-BMN-Z (Kinsella and Nolan, 1996)

2.9. Mikroorganismen, Zellen und Gewebe

2.9.1. Escherichia coli

Folgende Bakterienstämme von E. coli wurden während dieser Arbeit verwendet:

One Shot DH5 α TM-T1R Competent Cells

One Shot® TOP10 Competent Cells (Invitrogen, Karlsruhe)

2.9.2. Zellen, Zelllinien und Gewebe

Folgende Zellen wurden für die Versuche verwendet:

Phoenix-Ampho, eine Verpackungszelllinie zur Generierung von retroviralem Überstand sowie periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) von gesunden Spendern und Multiple Myelomzellen von Patienten der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg. Eine CMVpp65- spezifische T-Zelllinie, CD40L-aktivierte B-Zellen und polyklonale aktivierte T-Zellen wurden von Jan Diekmann und Eleni Adamopoulou aus unserer Arbeitsgruppe, die Gewebeproben und Zellysate wurden von Prof. S. Gattenlöhner des Instituts für Pathologie der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt. Näheres zu der Gewinnung und Generierung der Zellen findet sich unter „Methoden“.

3. Methoden

3.1. Molekularbiologische Methoden

Um eine BCMA-exprimierende Zelllinie zu generieren wurde eine Transformation von 293T-Zellen mittels Elektroporation oder Lipofectamine (hier nicht weiter ausgeführt) mit dem Plasmidvektor durchgeführt. Da diese nicht erfolgreich war, wurde die BCMA-Sequenz aus dem Plasmid geschnitten und in einen retroviralen Vektor (s. 2.8.1.) kloniert. Dieser Vektor wurde vorerst durch eine Transformation in chemisch kompetente E.coli eingebracht und über einen Kontrollverdau überprüft. Anschließend wurde eine Transfektion einer geeigneten Zelllinie (Phoenix-Ampho) durchgeführt, um eine Expression von BCMA zu erzielen. Die Details zu den einzelnen Arbeitsschritten sind unten aufgeführt.

3.1.1. Kultivierung und Kryokonservierung von E. coli

Die Flüssigkultivierung von E. coli erfolgte über Nacht bei 3°C und 200 rpm unter Schütteln im Inkubator. Die weitere Kultivierung erfolgte auf Festagarplatten, die aus LB-Medium (1% (w/v) Trypton, 1% (w/v) NaCl, 0,5% (w/v) Hefeextrakt), evtl. mit Antibiotikum zur Selektion (100 µg/ml Ampicillin bzw. 50 µg/ml Kanamycin) und mit 2% Agar hergestellt wurden. Zur Aufbewahrung wurden 800 µl einer Kultur mit 200 µl Glycerin versetzt und bei -80°C eingefroren.

3.1.2. Transformation von E. coli

One Shot® TOP10 oder One Shot DH5αTM-T1R Competent Cells wurden auf Eis aufgetaut und zur Transformation mit 2-5 µl der DNA-Lösung (das Plasmid pcDNA 3.1-V5-His-Topo oder der retrovirale Vektor pLZRS-BMN-Z, jeweils mit der Sequenz für BCMA) versetzt. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis erfolgte für 45 Sekunden ein Hitzeschock (42°C). Anschließend wurde der Ansatz wieder zwei Minuten auf Eis belassen. Danach wurden die Zellen in LB-Medium eine Stunde bei 37°C inkubiert. Teile des Ansatzes wurden auf Festagarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und kultiviert.

3.1.3. DNA-Präparation aus E. coli

3.1.3.1. „Qick and Dirty“-Präparation

Für die Durchführung einer *Qick and Dirty*“-Präparation wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur E.coli bei 16.000 rpm für eine Minute zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das entstandene Pellet wurde in 200 µl Pufferlösung1 (50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA) resuspendiert, mit 200 µl Pufferlösung2 (200 mM NaOH, 1% SDS) versetzt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurden 200 µl Pufferlösung3 (3 M Kaliumacetat, pH 5,5) zugefügt und die Lösung für zehn Minuten bei 16.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und 600 µl 100%igem Isopropanol zugegeben. Anschliessend wurde bei 16.000 rpm und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen (16.000 rpm, 4°C, zehn Minuten), der Überstand abgesaugt, bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl destilliertem H₂O aufgenommen.

3.1.3.2. DNA-Minipräparation

Um besonders kleinere Mengen sauberer Plasmid-DNA zu erhalten wurde das Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) verwendet und nach Herstellerprotokoll vorgegangen. Die erhaltene DNA wurde in Elutionspuffer aufgenommen und nach einer Konzentrationsbestimmung weiter zur Sequenzierung eingesetzt.

3.1.4. Analyse und Klonierung von Nukleinsäuren

3.1.4.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Anhand eines Photometers wurden die Konzentrationen von DNA- und RNA-Lösungen durch die Extinktion der Lösung in einer Quarzküvette bei $\lambda=260$ nm ermittelt. Eine Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngige DNA hat eine optische Dichte (OD) von 1, bei RNA entspricht dies 40 $\mu\text{g/ml}$. Der Grad der Verunreinigung der Lösung kann durch den Quotienten der Extinktionen bei $\lambda=260$ nm und $\lambda=280$ nm ermittelt werden, der nicht unter einem Wert von 1,8 liegen sollte.

3.1.4.2. Restriktionsverdau von Nukleinsäuren

Der DNA-Verdau durch Restriktionsendonukleasen wurde nach den jeweils vorgegebenen Anweisungen des Herstellers (New England Biolabs) durchgeführt. Zur anschließenden Klonierung von Vektoren wurden 1-5 μg Nukleinsäure eingesetzt und für zwei Stunden bei 37°C durch das Enzym verdaut.

3.1.4.3. Dephosphorylierung von kompatiblen DNA-Enden

Um eine Religation des Vektors pLZRS-BMN-Z zu vermeiden, wurde die 5'-Phosphatgruppe durch eine Phosphatase (Antarctic Phosphatase, New England Biolabs) abgespalten und nach Herstellerprotokoll vorgegangen.

3.1.4.4. Ligation von DNA-Fragmenten mit dem retroviralen Vektor

Die Ligation des Vektors mit einer Insert-DNA erfolgte mit der T4-DNA-Ligase (New England Biolabs) und dem entsprechenden Puffer. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.1.4.5. Agarose-Gelelektrophorese und Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Kontrolle von Größe und Konzentration der DNA-Fragmente. DNA wurde mit 6× Ladepuffer (30% (v/v) Glycerin, 0,25% Bromphenolblaulösung, 6 mM EDTA) versetzt und je nach Größe in 0,5-2%igen Agarosegelen aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde in 1× TAE-Puffer (40 mM Tris (pH 7,8), 0,5 mM Na-Acetat; 1 mM EDTA) bei Raumtemperatur und mit 100 mA durchgeführt. Zur Detektion der DNA-Banden im UV-Licht wurden die Gele mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Stocklösung 10 mg/ml) versetzt. Nach der Detektion wurden die DNA-Fragmente aus den Agarose-Gelen mit dem NucleoSpin Extract II-Kit (Macherey-Nagel, Düren) extrahiert und nach Herstellerangaben vorgegangen. Anschließend wurde die DNA in 30 µl Elutionspuffer aufgenommen.

3.1.4.6. Sequenzierung von DNA

Nach der Klonierung wurde die Korrektheit der Sequenz durch die Firma GATC Biotech (Konstanz) überprüft.

3.1.4.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Eine der Analyse dienende PCR-Reaktion wurde mit einer Taq-DNA-Polymerase (Qiagen) durchgeführt, für eine geplante Klonierung wurde das Expand High fidelity plus system (Roche) verwendet und nach Herstellerangaben vorgegangen. Für einen Standard PCR-Ansatz von 50 µl wurden 10-100 ng *template* DNA, 0,5 µl (2,5 U) DNA-Polymerase, 5 µl 10× Puffer, 2 µl dNTP-Mix (10 mM each), 1,2 µl (25 µM) *forward* und *reverse* Primer verwendet.

Standard PCR-Programm:

Reaktion	Wiederholung	Temperatur	Zeit
Denaturierung	1×	94°C	2 min
Denaturierung	20-30×	94°C	0,5-1 min
Hybridisierung		56-62°C	0,5-1 min
Amplifikation		72°C	1 min
Amplifikation	1×	72°C	10 min
Ende		4°C	Ohne Beschränkung

Die Reaktionen wurden in einem Mastercycler epgradient (Eppendorf) oder MWG Biotech Primus durchgeführt.

3.1.4.8. RNA Isolierung

Die Isolierung von RNA aus frischen humanen MM-Zellen erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Herstellervorschrift. Eingesetzt wurden $0,5-1 \times 10^6$ Zellen. Um einer Verunreinigung mit DNA entgegenzuwirken wurde zusätzlich das RNase-Free DNase Set (Qiagen) benutzt.

3.1.4.9. Reverse transcription- PCR (RT-PCR)

Um aus RNA cDNA mit der BCMA-Sequenz für eine spätere Klonierung zu synthetisieren wurde eine Reverse Transkription vorgenommen.

Für die Herstellung von cDNA wurde das 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche, Mannheim) mit den entsprechenden Primern (Oligo-p(dT)15 Primer) benutzt und nach den Herstellerangaben vorgegangen. Durch eine Taq-DNA-Polymerase (Qiagen) konnte anschliessend das gewünschte Gen nach obigem Protokoll amplifiziert werden.

Um die Expression von BCMA auf RNA-Ebene in verschiedenen menschlichen Geweben zu evaluieren wurde von Prof. S. Gattenlöhner aus dem Institut für Pathologie der Uni Würzburg eine RT-PCR mit cDNA durchgeführt, die aus extrahierter RNA schockgefrorener humaner Gewebe hergestellt wurde. (Methode beschrieben in: Gattenloehner et al., 1998)

3.2. Zellbiologische Arbeitstechniken

3.2.1 Allgemeine Kultivierung und Kryokonservierung von Zellen und Zelllinien

Die Arbeiten wurden steril an Sicherheitswerkbänken (Heraeus) durchgeführt. Die Kultivierung von Zellen erfolgte in Brutschränken (Heraeus) bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Es fanden regelmäßige Überprüfungen der verwendeten Zelllinien auf Verunreinigung mit Mycoplasmen anhand eines ELISA-Tests (Mycoplasma Detection Kit, Roche, Mannheim) statt.

Zur Überführung adhärent wachsender Zellen wurden diese mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und die Suspension anschließend mit Vollmedium aufgefüllt, erneut zentrifugiert und mit PBS gewaschen, um anschließend wieder in Vollmedium aufgenommen zu werden.

Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer nach Verdünnung der Suspension mit Trypanblau-Lösung bestimmt. Zur weiteren Kultivierung wurden die Zellen je nach Zelltyp 1:2 – 1:20 in Vollmedium verdünnt. Zur Kryokonservierung wurden die Zellen nach dem Zählen jeweils in Einheiten zu 500 µl Vollmedium aufgenommen und in Kryoröhrchen (2 ml) gegeben. Anschließend wurde tropfenweise Einfriermedium (Medium + 10%FCS + 20% DMSO) im Verhältnis 1:1 zugegeben und die Röhrchen in eine mit Isopropanol gefüllte Einfrierbox (Nalgene) gegeben. Vorerst wurden die Zellen bei -80°C eingefroren und nach zwei bis drei Tagen für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Zur erneuten Kultivierung erfolgte eine möglichst rasche Erwärmung auf 37°C und eine Zentrifugation in Vollmedium (200 g, 7 min, RT). Die anschließende Kultivierung der im Pellet enthaltenen Zellen erfolgte im Kulturgefäß.

3.2.2. Isolierung von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) und humanen Multiplen Myelom-Zellen

Die Gewinnung der Zellen erfolgte nach Aufklärung und Einverständniserklärung der Spender. Humane PBMCs wurden aus heparinisiertem Vollblut, die MM-Zellen aus Knochenmarksaspiraten durch einen Ficoll-Dichtegradienten gewonnen. Das Blut oder die Aspiarte wurde zunächst 1:1 mit PBS verdünnt, in einem 50 ml Röhrchen jeweils 30 ml über 15 ml Ficoll geschichtet und 20 Minuten bei 700×g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Interphasenring wurde abpipettiert und mit PBS/EDTA (2mM) versetzt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, erneut mit PBS gewaschen und in Medium aufgenommen.

3.2.3. Gewinnung von Dendritischen- und NK- Zellen mittels MACS MicroBeads

3.2.3.1. Gewinnung von Dendritischen Zellen

Um Zellen einer bestimmten Population anzureichern wurden MicroBead gekoppelte Antikörper verwendet. Zur Isolation myeloider dendritischer Zellen aus PBMCs wurde das CD1c Dendritic cell isolation kit (BDCA-1), für die lymphoiden dendritischen Zellen das Plasmacytoid Dendritic cell isolation kit (BDCA-2) des Herstellers Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, verwendet und nach Herstellerangaben vorgegangen.

Die Antikörper waren entweder direkt gegen ein Oberflächenmolekül gerichtet oder es wurden anti-Biotin MicroBeads benutzt, die nach der Färbung eines Oberflächenmoleküls mit einem Biotin-markierten Antikörper eingesetzt werden konnten, um die so markierten Zellen zu isolieren. Die isolierten Zellen wurden gewaschen, in Medium aufgenommen und gezählt.

3.2.3.2. Gewinnung von Natürlichen Killer-Zellen

Es wurde nach den Herstellerangaben von Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach vorgegangen. 1×10^7 PBMCs wurden in 80 μ l MACS-Puffer (D-PBS + 0,5% BSA + 2 mM EDTA) aufgenommen und mit 20 μ l MicroBeads (CD56 MicroBeads) für 15

Minuten bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 0,5-3 ml Puffer aufgenommen und auf eine in einem Magneten fixierte LS-Säule gegeben. Die Säule wurde 3x mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen und zuerst die eluierte Negativfraktion gewonnen. Zur Gewinnung der markierten Zellen wurde die Säule aus dem magnetischen Feld genommen.

Zur Aktivierung von NK-Zellen wurden die Zellen fünf Tage lang mit 300 U/ml hrIL-2 (Chiron, Germany) inkubiert.

3.2.4. Gewinnung und Kultivierung humaner T-und B-Zellen

Die zur FACS-Analyse verwendeten virusspezifischen B-und T-Zelllinien wurden von Dr. Jan Diekmann und Eleni Adamopoulou aus unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Die polyklonale Aktivierung von T-Zellen aus PBMCs und der CMVpp65-spezifischen T-Zelllinie erfolgte mit 1 µg/ml löslichem anti-CD3, 50 U/ml IL-2 und in Anwesenheit bestrahlter PBMCs und T2-Zellen (sog. feeder cells) für 14 Tage (Riddell and Greenberg, 1990).

CMVpp65- spezifische T-Zellen wurden aus PBMCs von virus-infizierten Spendern und mithilfe des *IFN-γ secretion assay* (Miltenyi Biotec) generiert. Die Methoden sind in der von unserer Arbeitsgruppe veröffentlichten Arbeit „Human CD4+ T Cells Displaying Viral Epitopes Elicit a Functional Virus-Specific Memory CD8+ T Cell Response“ (Adamopoulou et al., 2007) beschrieben.

B-Zellen (CD40B) wurden mit CD40L und IL-4 stimuliert (angelehnt an das Protokoll von Kondo et al. (Kondo et al., 2002)).

3.2.5. Zellanalyse

3.2.5.1. Durchflusszytometrie (FACS)

Das Expressionsmuster verschiedener Proteine auf Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht.

0,2-1×10⁶ Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen gegeben, mit FACS-Puffer (D-PBS + 10% FCS + 0,1% NaN₃) gewaschen (150×g, 5 Minuten, 4°C) und anschliessend resuspendiert. Anschliessend wurde 1-2 µg/ml Fluorochrom-konjugierter mAntikörper zugesetzt und 20-30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und anschließend in 200 µl 1%iger Formalin-Lösung resuspendiert und konserviert. Die Analyse erfolgte in einem FACSCalibur mit CellQuestPro Software (BD Bioscience). Bei Färbungen mit dem Antikörper anti-BCMA wurde als nächster Schritt eine Färbung mit einem PE-konjugierten Sekundär-Antikörper durchgeführt. Dieser wurde mit 2 ml einer 10% Lösung von Maus-IgG bei 4°C 20 Minuten lang geblockt. Die lymphoiden DCs wurden mit einem APC-konjugierten anti-BDCA-2-mAb, die myeloiden DCs mit einem Biotin-konjugierten anti-BDCA-1 mAb, gefolgt von einem APC-konjugierten anti-Biotin-mAb, gefärbt.

3.2.5.2. Immunhistochemische Färbungen

Die monoklonalen Antikörper anti-Baff-R 1C11 (BioLegend, San Diego, CA), und Vicky-1 (Abcam, Oxford, UK) wurden in einer 1:50 Lösung in einer vier Schritte beinhaltenden Immunoperoxidase-Färbung für einzelne Antigene in luftgetrockneten, Aceton fixierten Gewebeproben am Institut für Pathologie der Universität Würzburg von Prof. S. Gattenlöhner durchgeführt (Gattenloehner et al., 1998).

3.2.6. Produktion von retroviralem Überstand

Phoenix-Ampho Zellen wurden zunächst mit einem Derivat des pBMN-Z Vektors, der das Verpackungssignal und das zu exprimierende Gen (BCMA) enthält, transfiziert. 2×10^5 Zellen pro well wurden in einer 6-well Platte ausgesät und für 18-24 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anhand der CaCl_2 Methode (Mandel and Higa, 1970) wurden $2 \mu\text{g}$ DNA pro well in die Zellen eingebracht. Das alte Medium wurde entfernt und durch 1,125 ml frisches Medium ersetzt. Der Vektor wurde in einer 240 mM CaCl_2 -Lösung im Verhältnis 1:1 mit 2×HBS-Puffer (280 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1,5 mM Na_2HPO_4 , pH 7,0) gemischt, 375 μl in jedes well gegeben und die Präzipitatbildung von DNA und CaCl_2 kontrolliert. Nach 24 Stunden im Inkubator wurden transfizierte Zellen anhand eines 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin enthaltenden Mediums selektioniert. Die transfizierten Phoenix-Ampho Zellen wurden zur Virusproduktion in Puromycin-freies Medium gegeben. Ca. 6×10^6 Zellen wurden in einer 75 cm^2 Zellkulturflasche 18-24 h bei oben genannten Bedingungen inkubiert. Ab einer Konfluenz von 80-90% wurde das Medium durch 7,5 ml frisches Medium ersetzt und erneut für 24 Stunden bei 32°C und 5% CO_2 inkubiert. Der Überstand wurde über einen 0,45 μm Filter gereinigt und bei -20°C gelagert.

4. Ergebnisse

Die Bedeutung von BAFF-R als auch BCMA als mögliche Targets in der Immuntherapie des Multiplen Myeloms wurde kürzlich von mehreren Gruppen diskutiert (Bellucci et al., 2005; Moreaux et al., 2004; Novak et al., 2004a). Um ihre Eignung näher zu evaluieren haben wir das Expressionsprofil dieser Rezeptoren in primären humanen Myelomzellen, verschiedenen Untergruppen von humanen PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) und aktivierten humanen Lymphozyten anhand FACS-Analyse und immunhistochemischen Färbungen untersucht.

4.1. Expression von BAFF-R und BCMA auf frisch isolierten humanen MM-Zellen

Die Analyse der BAFF-R Expression auf 21 frisch isolierten MM-Knochenmarksaspiraten mit Hilfe der Durchfluss-Zytometrie (FACS-Analyse) zeigte ein sehr heterogenes Expressionsmuster. Als Marker für die malignen Plasmazellen wurde ein Antikörper gegen CD138 eingesetzt und die Anzahl der doppelt positiven Zellen für CD138/BAFF-R ausgewertet. Die zu analysierende Population CD138-exprimierender Myelomzellen wurde über ihre typische Größe und Granulation ermittelt.

Die Prozentzahlen der doppelt positiven Zellen schwankten zwischen 0-87%. Von allen untersuchten Proben exprimierten 18 BAFF-R, davon zwei nur marginal (unter 5%), die restlichen zu einem vernachlässigbar geringem Prozentsatz (unter 1%), der auch eine unspezifische Färbung darstellen könnte. Vier Proben zeigten eine starke Expression von über 50% doppelt positiver Zellen (siehe Tabelle 1).

Auch die Untersuchung des Expressionsmusters von BCMA, dem zweiten potentiellen Target, zeigte in den untersuchten Proben eine große Variabilität, wie sie schon für BAFF-R beobachtet wurde. Die Prozentzahlen doppelt positiver Zellen (CD138/BCMA) schwankten auch hier zwischen fast null und 85%. Ein Zusammenhang in der Expressionsstärke von BAFF-R und BCMA in denselben Proben konnte nicht festgestellt werden. Einige Myelomzellen exprimierten beide Rezeptoren relativ stark bzw. schwach. In anderen Proben wurde nur einer der Rezeptoren

exprimiert, während der andere lediglich gering vorhanden war. Bei wenigen Proben konnte kein Vergleich stattfinden, da einige der Färbungen für die jeweiligen Rezeptoren aufgrund verschiedener Fehlerquellen nicht auswertbar waren (siehe Figur und Tabelle 1, letzte drei Färbungen).

Durch die Untersuchung der Myelomzellen auf das Vorhandensein der Rezeptoren BAFF-R und BCMA konnte bestätigt werden, dass beide Rezeptoren, wenn auch nicht regelmäßig, zu einem teilweise sehr hohen Prozentsatz auf den malignen Zellen exprimiert werden.

Abbildung 1: Oberflächenexpressionsmuster von BCMA und BAFF-R auf frisch isolierten humanen Multiplen Myelom-Zellen. Die FACS-Analyse einer Doppelfärbung von 21 Knochenmarksaspiraten von Myelompatienten zeigt die Expression von BCMA und BAFF-R in Zusammenhang mit der Expression des Plasmazellmarkers CD138. Die entsprechenden CD138+-Subpopulationen wurden anhand der Größe und Granulation ermittelt. Die doppelt positiven Zellen befinden sich jeweils im rechten oberen Quadranten. Die Achseneinteilung erfolgt in Schritten des Zehnerlogarithmus bis 10^4 .

Tabelle 1: Anteil der BCMA- und/oder BAFF-R exprimierenden Myelomzellen. Die Prozentzahlen beziehen sich auf die CD138+- und BCMA- bzw. BAFF-R-exprimierenden Populationen. Eine Zeile der Tabelle entspricht jeweils einer Probe und ist den zugehörigen FACS-Bildern aus Abbildung 1 auf selber Höhe zugeordnet. Bei den letzten drei Proben ist jeweils nur eine Färbung wegen verschiedener Fehlerquellen analysierbar. Die nicht berücksichtigten Färbungen wurden daher mit "nicht auswertbar" (n.a.) versehen.

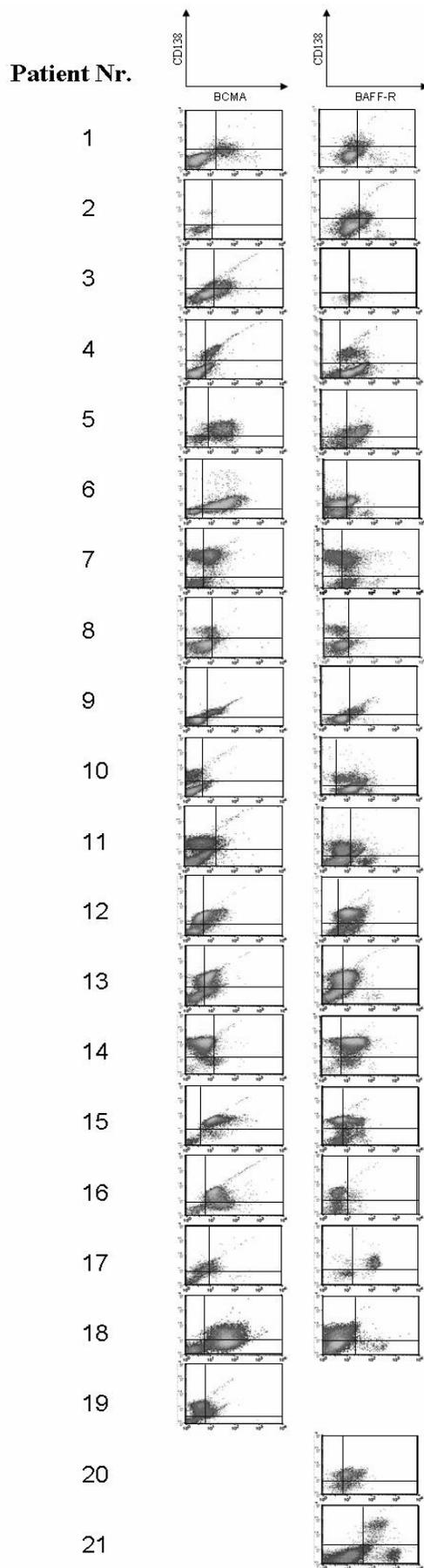


Abbildung 1

CD138+BCMA+	CD138+BAFF-R+
7,03	10,90
1,02	9,89
19,37	7,63
7,71	9,04
73,15	42,63
82,47	18,40
48,13	31,81
4,38	0,67
6,88	8,96
18,52	1,14
0,86	7,83
31,19	81,90
43,63	44,86
0,77	86,96
85,28	33,47
68,44	5,40
21,66	70,72
47,40	0,55
16,73	n.a.
n.a.	56,86
n.a.	4,13

Tabelle 1

4.2. Expression von BAFF-R und BCMA auf ruhenden und aktivierten Lymphozyten und NK-Zellen

Als nächster Schritt wurde die Spezifität der Expression auf Lymphozyten und Plasmazellen evaluiert. Dafür wurden weitere Zelltypen des hämatopoetischen Kompartments mittels FACS-Analyse untersucht.

Erwartungsgemäß konnte eine homogene Expression von BAFF-R auf humanen CD19+ B-Zellen aus dem peripheren Blut gefunden werden. Zusätzlich untersuchten wir aktivierte B-Zellen (CD40L-aktivierte B-Zellen, siehe unter Methoden). Auch hier konnte ein homogenes Expressionsmuster beobachtet werden (Abbildung 2).

Auf anderen Lymphozyten der PBMCs konnte keine BAFF-R-Expression gefunden werden: Weder CD4+ noch CD8+ T-Zellen zeigten in der FACS-Analyse ein spezifisches Signal. Interessant war jedoch, dass die Untersuchung in vitro aktivierter humaner CMV pp65-spezifischer CD8+ T-Zellen und mit anti-CD3 aktivierte polyklonale humane CD4+ T-Zellen eine Expression des Rezeptors von bis zu 90% aufwiesen. Aus PBMCs isolierte CD56+ Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) zeigten, ob ruhend oder mit Interleukin-2 (IL-2) aktiviert, eine marginale Expression von 1%, die jedoch auch auf ein unspezifisches Signal zurückzuführen sein könnte.

Um die Spezifität des für den BCMA-Nachweis verwendeten Antikörpers zu überprüfen, wurde eine Phoenix-Ampho-Zelllinie mit dem BCMA-Gen transfiziert und parallel zu den untersuchten Zellen analysiert. Die Expression von BCMA desselben untersuchten Zell-Panels zeigte sich sehr unterschiedlich zu der bei BAFF-R beobachteten: Auf keinen der untersuchten Lymphozyten, ob ruhend oder aktiviert, konnte BCMA aussagekräftig nachgewiesen werden. Auch die NK-Zellen zeigten keine signifikante Expression des Rezeptors.

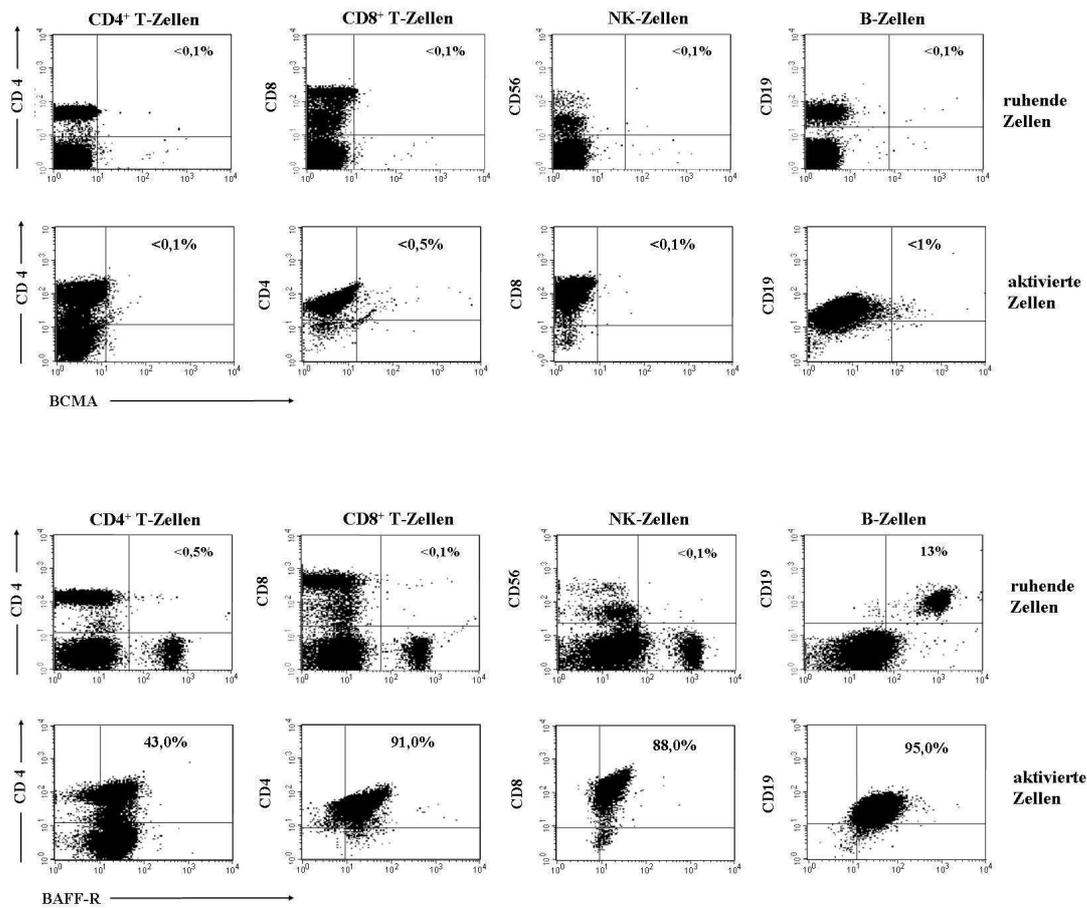


Abbildung 2: Verschiedene Oberflächenexpressionsmuster von BCMA und BAFF-R auf ruhenden und aktivierten humanen lymphoiden Zellen. FACS-Analyse einer Doppelfärbung von ruhenden PBMCs ex vivo und aktivierten lymphoiden Zellen zeigt die Expression von BCMA und BAFF-R in Zusammenhang mit der Expression der phänotypischen Marker CD4, CD8, CD56, CD19. Isolierte CD4⁺ T-Zellen und eine CMV pp65 CD8⁺ T-Zelllinie aus unserem Labor (siehe Methoden) wurden mit anti-CD3, 50 U/ml IL-2 und in Anwesenheit bestrahlter PBMCs und T2-Zellen 14 Tage lang aktiviert. Isolierte CD56⁺ NK-Zellen wurden fünf Tage lang mit 300 U/ml IL-2 inkubiert. B-Zellen wurden in der Gegenwart von CD40L und IL-4 aktiviert (siehe 3.2.4.). Die entsprechenden Subpopulationen wurden anhand der Größe und Granulation ermittelt. Die Prozentzahlen beziehen sich auf die doppelt positiven Zellen. Die Achseneinteilung erfolgt in Schritten des Zehnerlogarithmus bis 10⁴.

4.3. Expression von BAFF-R und BCMA auf Antigen-präsentierenden Zellen

Desweiteren untersuchten wir das Kompartiment Antigen-präsentierender Zellen (APCs): CD14+ Monozyten und speziell aus PBMCs isolierte Untergruppen von Dendritischen Zellen (DCs). Während die Monozyten kein BAFF-R exprimierten, konnte auf myeloiden DCs eine Expression von bis zu 4% und auf lymphoiden DCs eine starke Expression von bis zu 61% beobachtet werden. BCMA konnte weder auf Monozyten noch auf Dendritischen Zellen nachgewiesen werden.

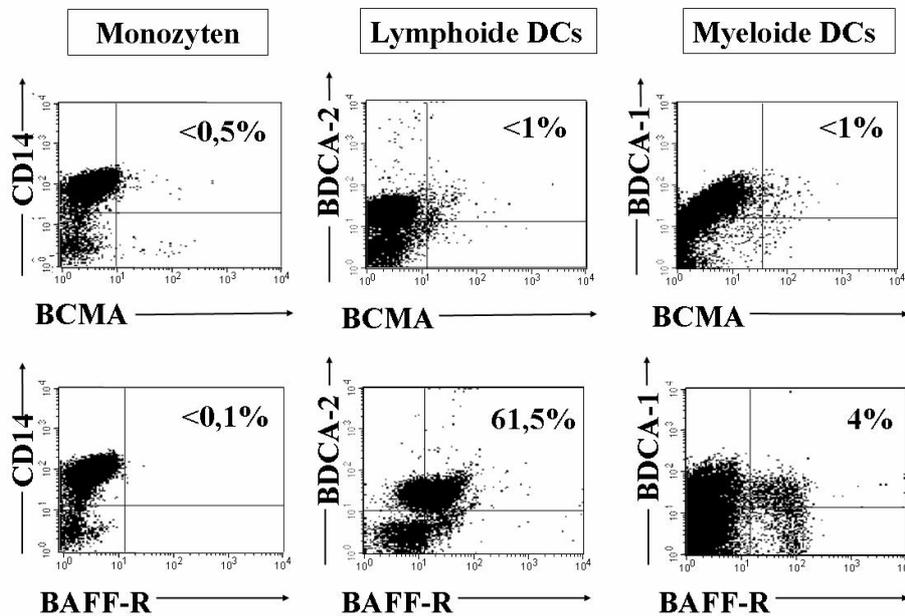


Abbildung 3: Oberflächenexpressionsmuster von BCMA und BAFF-R auf Antigen-präsentierenden Zellen. FACS-Analyse einer Doppelfärbung von Monozyten, lymphoiden und myeloiden Dendritischen Zellen. Für die Untersuchung der Monozyten wurden PBMCs neben den Antikörpern gegen BCMA und BAFF-R mit dem Marker CD14 gefärbt, die DCs wurden speziell aus PBMCs isoliert (Siehe 3.2.3.1.) und mit dem jeweils spezifischen Antikörper gegen BDCA-1 bzw. BDCA-2 markiert. Die Bilder zeigen die anhand der Größe und Granulation ermittelten entsprechenden Populationen. Die Prozentzahlen beziehen sich auf die doppelt positiven Zellen. Die Achseneinteilung erfolgt in Schritten des Zehnerlogarithmus bis 10⁴.

4.4. Expression von BAFF-R auf Hirngewebe: Wegfall von BAFF-R als Target in der Immuntherapie des Multiplen Myeloms

Die Ergebnisse führten zu der vorübergehenden Annahme, dass BAFF-R von B- und T-Lymphozyten und lymphoiden dendritischen Zellen, BCMA hingegen, wie auch in der Literatur beschrieben, restriktiv von Plasmazellen und ihrem malignen Pendant exprimiert wird.

Während unserer Studien beschäftigte sich Prof. Dr. Stefan Gattenlöhner vom Institut für Pathologie ebenfalls mit dem Rezeptor BAFF-R. Über immunhistochemische Nachweisverfahren konnte er zeigen, dass BAFF-R in humanem Hirngewebe exprimiert wird (Abbildung 4). Dieser Nachweis schloss den Rezeptor für weitere Studien aus, da dadurch eine selektive Antikörperbindung an MM-Zellen mit BAFF-R als immuntherapeutisches Zielantigen unmöglich wurde.

Die weiteren Studien fokussierten sich somit auf das Expressionsmuster von BCMA.

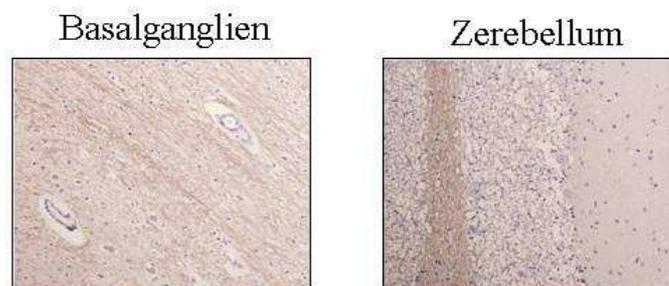


Abbildung 4: Immunhistochemische Färbung zum Nachweis der Oberflächenexpression von BAFF-R. Immunperoxidasefärbung mit Anti-BAFF-R als Primärantikörper. Sowohl im Gewebeschnitt der humanen Basalganglien als auch im Mark des Zerebellums konnte BAFF-R positiv nachgewiesen werden, erkennbar an der dunkelbraunen Färbung. Originalvergrößerung, x 400. Zur Verfügung gestellt durch Prof. S. Gattenlöhner, Institut für Pathologie der Universität Würzburg.

4.5. Nachweis von BCMA mRNA in menschlichen Gewebelysaten durch *reverse-transcriptase-PCR* (RT-PCR)

Zur weiteren Evaluation des Expressionsmusters von BCMA wurde eine RT-PCR durchgeführt (Abbildung 5). Sie diente dem Nachweis von BCMA auf mRNA-Ebene in Lysaten menschlichen Gewebes nicht-hämatopoetischen Ursprungs. BCMA mRNA konnte mit einem starken Signal in Nieren- und Lebergewebe nachgewiesen werden. Eine schwächere, aber dennoch signifikante Expression zeigte sich in den Proben von Lungen-, Haut- und Magengewebe, das Myokard war negativ. So konnte gezeigt werden, dass eine Transkription von BCMA im Rahmen der Proteinbiosynthese in relevanten humanen Geweben nicht-hämatopoetischen Ursprungs stattfindet.

4.6. Nachweis der Oberflächenexpression von BCMA auf menschlichen Geweben mittels Immunhistochemie

Dieselbe Auswahl an Geweben wurde zur weiteren Überprüfung einer Oberflächenexpression von BCMA mit immunhistochemischen Färbemethoden untersucht (Abbildung 6). Als Positivprobe diente lymphatisches Gewebe aus der humanen Tonsille. Die Ergebnisse standen im Einklang mit der RT-PCR: Während sich das Myokard nicht spezifisch anfärben ließ, konnte eine starke Färbung renaler Tubuluszellen und Hepatozyten beobachtet werden. Die Parietalzellen des Magens in den Foveolae, Alveolarmakrophagen und respiratorisches Zylinderepithel der Lunge als auch das Schweißdrüsenepithel der Haut wiesen eine spezifische Antikörperbindung auf. Dieses Ergebnis zeigt, dass auch BCMA von verschiedenen humanen Geweben signifikant auf der Oberfläche exprimiert wird.

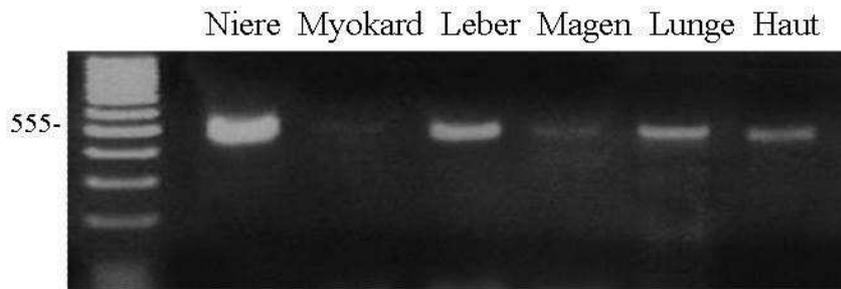


Abbildung 5: Analyse von BCMA mRNA anhand reverse-transkriptase-PCR in Lysaten verschiedener humaner Gewebe. Die Größe des gesuchten BCMA-Gens beträgt 555 Basenpaare. Die Expressionsstärke ist an der Dicke der Banden, die im Verhältnis zu der Anzahl der DNA-Kopien steht, abzulesen.

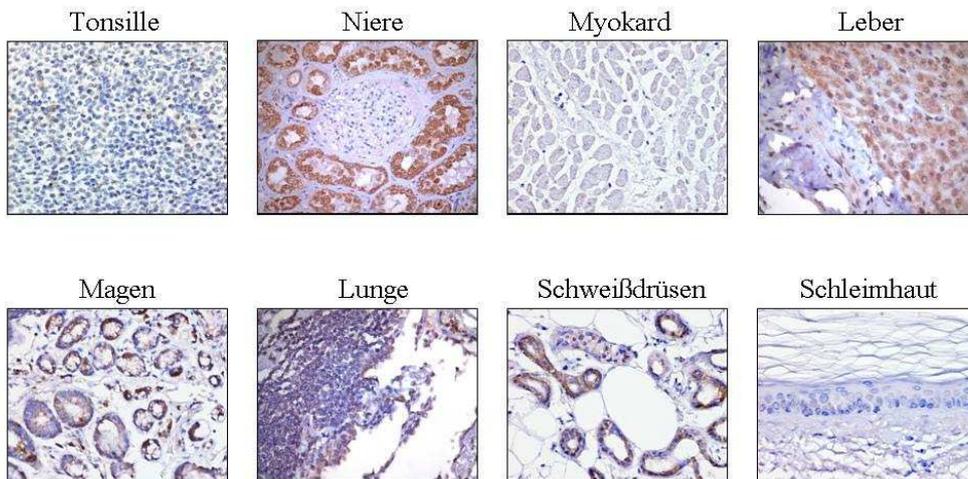


Abbildung 6. Immunhistochemische Färbung zum Nachweis der Oberflächenexpression von BCMA in verschiedenen humanen Gewebeschnitten. Immunperoxidasefärbung mit Anti-BCMA als Primärantikörper. Die Färbung des Tonsillengewebes dient als Positivkontrolle: Die BCMA-positiven Plasmazellen stellen sich dunkelbraun dar. Eine starke Expression von BCMA in den Nierentubuli und den Hepatozyten der Leber ist ebenfalls an der dunkelbraunen Färbung zu erkennen. Ebenso lassen sich die Belegzellen des Magens, das respiratorische Epithel und die Alveolarmakrophagen der Lunge und das Schweißdrüsenepithel anfärben. Keine Expression von BCMA findet sich in Myokard und Schleimhaut. Originalvergrößerung, x 400.

Zur Verfügung gestellt durch Prof. S. Gattenlöhner, Institut für Pathologie der Universität Würzburg.

5. Diskussion der Ergebnisse

5.1. Bedeutung der Rezeptorexpression auf den untersuchten Zelltypen

Die Rezeptoren BCMA und BAFF-R wurden in der Literatur bereits von mehreren Autoren als mögliche Zielantigene in der Immuntherapie maligner hämatologischer Erkrankungen, besonders des Multiplen Myeloms, diskutiert. Um ihre Eignung zu evaluieren haben wir eine breit gefächerte Analyse der Expression dieser Rezeptoren auf MM-Zellen, hämatopoetischen Zellen und auf humanen Geweben erhoben.

Beide Rezeptoren wurden teilweise signifikant auf MM-Zellen exprimiert. Ähnliche Beobachtungen wurden von verschiedenen Gruppen, wenn auch nicht anhand derselben Bandbreite an Proben, bereits gemacht:

Novak et al. untersuchten, nachdem Sie in Zellen der chronisch lymphoiden B-Zell-Leukämie eine erhöhte Expression von BAFF nachgewiesen hatten (Novak et al., 2002), als erste ein kleines Panel humaner 138+MM-Zellen sowie humaner MM-Zelllinien auf das Oberflächen-Expressionsmuster von BAFF und seinen drei Rezeptoren (Novak et al., 2004a). Neben einer verstärkten Bindung und Expression des Liganden selbst entdeckten sie, dass die untersuchten Zelllinien und frisch isolierten MM-Zellen hauptsächlich TACI und BCMA exprimierten. Für BAFF-R konnte ein sehr heterogenes Expressionsmuster festgestellt werden: Während die MM-Zelllinien und eine Probe frischer humaner MM-Zellen kein BAFF-R exprimierten, zeigten die restlichen zwei Proben ein unterschiedlich starkes Expressionsmuster. Ähnliche Beobachtungen bei weiteren B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen veröffentlichten sie wenige Monate später (Novak et al., 2004b). Hier konnte allerdings, im Gegensatz zu TACI und BAFF-R, BCMA nicht signifikant nachgewiesen werden. Auch Moreaux et al. untersuchten mehrere MM-Zelllinien sowie frische MM-Zellen auf RNA-Ebene. Die Rezeptoren konnten in den meisten untersuchten Zelllinien und den Proben ex vivo nachgewiesen werden, wiesen aber auch hier ein sehr heterogenes Expressionsmuster auf. Wie bei Novak et al. war BCMA der dominanteste Rezeptor (Moreaux et al., 2004). Eine weitere wichtige Entdeckung, die die Bedeutung des Ligand-/Rezeptorsystems für das MM hervorhebt, ist die von Bellucci et al. Sie beschrieben die Präsenz von Antikörpern gegen den Rezeptor BCMA bei Patienten mit MM, die eine sog. *Donor lymphocyte infusion*, kurz DLI, im Rahmen eines Rezidivs nach allogener Stammzelltransplantation erhalten haben (siehe 1.3.). Über den sog. *graft versus*

myeloma-Effekt der Spenderlymphozyten werden so verbleibende Tumorzellen eliminiert, doch auch humorale Mechanismen gegen Myelomantigene aktiviert. Bei diesen Patienten konnten anti-BCMA Antikörper nachgewiesen werden, die mit auf der Zelloberfläche exprimiertem BCMA reagierten – ein weiterer Hinweis für die Hochregulierung von BCMA auf (malignen) Plasmazellen (Bellucci et al., 2005). Durch die Ergebnisse dieser Gruppen entstand die Hoffnung, in BAFF-R und BCMA geeignete Targets zur Immuntherapie des MM gefunden zu haben. Unsere Ergebnisse mit primären humanen MM-Zellen decken sich mit diesen Gruppen bezüglich der Heterogenität der Expressionsstärke und des Expressionsmusters der beiden Rezeptoren. In unseren Untersuchungen berücksichtigten wir jedoch nicht nur ein größeres Panel an MM-Proben, sondern untersuchten auch ein größeres Spektrum unterschiedlicher Zelltypen. So konnten wir zeigen, dass die Rezeptoren auf relevanten menschlichen Geweben exprimiert werden.

Auf MM-Zellen scheint die Bedeutung der Hochregulation der Rezeptoren und des Liganden BAFF in der Modulation der Proliferationskapazität und des Überlebens der malignen Zellen über den NF- κ B Signalweg zu liegen (Mackay and Schneider, 2009; Moreaux et al., 2004). Während das ausschließliche Vorkommen von BCMA auf Plasmazellen bereits bekannt war und daher eine Expression auf MM-Zellen nicht weiter verwundern vermag, ist die Expression von BAFF-R, der in früheren Stadien der B-Zelllinie exprimiert wird, außergewöhnlicher. Hier wird die Fähigkeit entarteter Zellen deutlich, neue Mechanismen, die ihnen ein Überleben ermöglichen, zu nutzen: Die Potenz des Ligand-/Rezeptorensystems, wichtige Signale für die Entwicklung der B-Zelllinie zu übermitteln, war bereits Bestandteil verschiedener Forschungen.

Die Expression von BAFF-R auf CD19⁺ B-Lymphozyten des peripheren Blutes haben wir auch durch unsere Untersuchungen bestätigt. Welche Rolle genau die signifikante Expression von BAFF-R auf aktivierten T-Lymphozyten spielt, gilt es weiter zu erforschen. Es gibt Untersuchungen die bestätigen, dass Ligand und Rezeptor von T-Zellen exprimiert werden und ihre Funktionen modulieren kann (Huard et al., 2004; Mackay and Leung, 2006; Ye et al., 2004). Die Beobachtung, dass lymphoide DCs BAFF-R bis zu 61% exprimieren, erscheint in dieser Betrachtung nicht außergewöhnlich, da sich diese Subpopulation von CD4⁺ plasmazytoiden Zellen ableitet. Da sich der Rezeptor BCMA auf all diesen untersuchten Zelltypen nicht nachweisen ließ, konnte davon ausgegangen werden, dass sich seine Expression, wie auch bisher von anderen Autoren beschrieben, auf Plasmazellen und ihr malignes

Pendant beschränkt (Moreaux et al., 2009). Nachdem BAFF-R durch den immunhistochemischen Nachweis in Hirngewebe am Institut für Pathologie in Würzburg als geeignetes Target wegfiel, fokussierten sich unsere weiteren Untersuchungen auf BCMA. Da die Expression von BCMA im hämatopoetischen Kompartiment spezifisch nur auf (malignen) Plasmazellen zu finden war, überraschte der Nachweis in dem Großteil der untersuchten humanen Gewebe: Sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf der Oberfläche von Niere, Leber, Lunge, Magen und Haut konnte BCMA nachgewiesen werden. Interessant zu ermitteln wäre, ob die Rolle, die diese Rezeptoren in den untersuchten Geweben spielen, der Rolle in der B-Zelllinie ähnelt.

5.2. Relevanz der Selektivität von monoklonalen Antikörpern

Da weder BCMA noch BAFF-R selektiv von hämatopoetischen Zellen und MM-Zellen exprimiert werden, stellt sich die Frage, wie sinnvoll die Entwicklung einer *targeted therapy* mit diesen Zielantigenen wäre.

Die Grundlagen der Tumorselektivität monoklonaler Antikörper (mAbs) unterscheidet sich grundlegend von der anderer Therapien. Chemotherapeutika und Bestrahlungstherapien gründen ihre Selektivität durch die Eigenschaft gesunder Zellen, die Toxizität, unabhängig von der Spezifität der Substanz zu ihrem Zielmolekül, zu tolerieren. Diese Art der Selektivität findet sich auch bei mAbs, deren Aufgabe in der Blockade ihrer Zielstruktur liegt, beispielsweise bei Trastuzumab (anti-HER2) (Lin et al., 2005). Dennoch hängt bei allen mAbs ein Großteil der Selektivität von der Spezifität der Bindung an das jeweilige Antigen ab. Die Antigene müssen dabei nicht komplett auf das Tumorgewebe beschränkt, sondern dort relativ überexprimiert sein. Dies ist auch der Fall bei HER2: Es wird von 20-30% aller Mammakarzinome exprimiert, jedoch auch zu einem geringen Anteil auf fast allen normalen Körperzellen. Trotzdem besitzt der mAb Trastuzumab nur eine sehr geringe Toxizität. Die Selektivität dieses die Rezeptorfunktion blockierenden Antikörpers leitet sich allein aus der Abhängigkeit der Tumorzelle von der Rezeptoraktivität ab, die wichtige Wachstumssignale übermittelt. Wird der Wachstumsfaktorrezeptor Her2 jedoch, wie bei mit Anthrazyklinen vorbehandelten Patienten, auf Herzmuskelzellen hochreguliert, kann die Anwendung von Trastuzumab kardiotoxische Nebenwirkungen nach sich ziehen (Lin et al., 2005).

Antigene müssen also nicht komplett tumorspezifisch sein, solange ihre Expression bis zu einem gewissen Maß auf Gewebe beschränkt ist, die keine überlebenswichtigen Funktionen besitzen. Dies ist auch der Fall bei den gängigen mAbs gegen hämatologische Krebserkrankungen. So zieht beispielsweise eine Behandlung mit Rituximab (anti-CD20) durch das Vorkommen der Zielstruktur auf allen B-Lymphozyten eine nur relativ milde Lymphopenie mit konsekutiver Infektionsneigung nach sich, die prophylaktisch antibiotisch behandelt wird.

Einen weiteren Punkt dafür, dass Antigenspezifität allein nicht ausschlaggebend für den Therapieeffekt ist, stellt die gesteigerte Empfänglichkeit von Tumorzellen für mAbs im Gegensatz zu Normalgewebe dar. Viele Tumore weisen eine gesteigerte Permeabilität und Retention von Antikörpern auf. Die Effektivität des anti-CD33 Calicheamicin-Konjugats Gemtuzumab korreliert beispielsweise nicht ausschließlich mit der Expressionsstärke seines spezifischen Antigens. Die Zytotoxizität beruht eher auf der gesteigerten Endozytose des mAbs und einer hohen proliferativen Aktivität der Leukämiezellen, welche die Empfindlichkeit für Calicheamicin heraufsetzt (Lin et al., 2005).

Doch auch das Gegenteil kann der Fall sein- Bindungsstärken von Antikörpern gegen ein bestimmtes Antigen sind bei Tumoren, die dieses Antigen verstärkt exprimieren, plötzlich herabgesetzt. Grund dafür kann sein, dass Tumorzellen im Rahmen der Prozessierung von Proteinen häufig eine stärkere Glykosylierung aufweisen als gesundes Gewebe. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist MUC-1, ein sog. *cancer testis antigen*. Die „nackte“, nicht glykosylierte Form des Proteins zeigt ein anderes Bindungsverhalten von Antikörpern als die glykosylierte Variante, die bei Tumoren gehäuft auftritt. Antikörper gegen MUC-1 sollten also, um eine verbesserte Selektivität zu erzielen, als Eigenschaft eine verstärkte Bindung von glykosyliertem MUC-1 aufweisen. Gleichzeitig kann so eine Bindung an gesundes Gewebe reduziert werden (Karsten et al., 2005). Die Möglichkeit einer Glykosylierung von BCMA und BAFF-R besteht auch bei Zellen des Multiplen Myelom- eine verbesserte Selektivität könnte möglicherweise durch einen Antikörper gegen ein glykosyliertes Epitop der Proteine erreicht werden, das so nicht auf normalem Körpergewebe vorkommt.

Die Möglichkeiten einer Antikörpertherapie mit den Zielantigenen BCMA und BAFF-R sind also trotz der mangelnden Selektivität von MM-Zellen nicht pauschal zu verwerfen. Ein Mechanismus der mAb-Therapie tötet Tumorzellen durch die sog. *antibody dependent cellular cytotoxicity* (ADCC). Dabei werden die Immunglobuline

auf der Zelloberfläche gebunden, über die Interaktion ihrer FC-Domäne mit dem FC-Rezeptor der NK-Zellen und Monozyten eine zytolytische Kaskade in Gang gesetzt oder die Tumorzelle wird phagozytiert. Andere Mechanismen beruhen auf der Beladung von mAbs mit Toxinen oder Radionukliden, die nach Internalisierung die Tumorzelle abtöten (Lin et al., 2005). Diese Form der Therapie wäre durch die fehlende selektive Bindung von Myelomzellen mit BAFF-R und BCMA als Zielantigene nicht möglich, da lebensgefährliche Organschädigungen die Folge wären: Allein die starke Expression von BCMA auf Nierentubuli würde die bei Myelompatienten ohnehin beeinträchtigte Nierenfunktion möglicherweise ausschalten. Wie bereits angesprochen, gibt es jedoch auch mABs, die nicht direkt zytotoxisch wirken, sondern eine für die Tumorzelle wichtige Rezeptorfunktion blockieren. Beispielsweise seien hier wieder Trastuzumab (anti-HER2) und Cetuximab (anti-EGFR) genannt, die den Tumor von wichtigen Wachstumssignalen abkoppeln. Tumorzellen können eine essentielle Abhängigkeit von diesen Rezeptorfunktionen entwickeln, während andere Körperzellen, die ebenfalls diesen Rezeptor exprimieren, unabhängig von ihnen sind. Da BAFF auch an Myelomzellen wichtige Wachstumssignale übermittelt und anti-apoptotisch wirkt (Moreaux et al., 2004), könnte eine Blockade des Liganden oder seiner Rezeptoren inhibitorisch auf die Proliferationskapazität der malignen Zellen wirken oder sie angreifbarer für Chemotherapeutika machen (Moreaux et al., 2004). BAFF- oder seinen NF κ -B-Signalweg blockierende Substanzen wurden für eine mögliche Behandlung von anderen B-Zell-Neoplasien und Autoimmunerkrankungen bereits entwickelt (Moreaux et al., 2004). Um eine Rezeptorblockade zu erwägen muss jedoch die Frage geklärt werden, welche Bedeutung BAFF-R und BCMA auf den untersuchten gesunden Körpergeweben zukommt. Zudem nutzen entartete Zellen meist nicht nur einen Mechanismus zur Proliferation, sondern es handelt sich um ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren, so dass eine Blockade der Rezeptoren allein keinen großen Einfluss auf die Proliferationskapazität der Tumorzellen hätte. Es bleibt eine spannende Aufgabe, BAFF und seine Rezeptoren noch näher zu betrachten: Der Rezeptor TACI beispielsweise wurde bei unseren Untersuchungen nicht berücksichtigt, doch auch er wird auf MM-Zellen exprimiert und seine Rolle für ihr Überleben in neueren Untersuchungen diskutiert (Moreaux et al., 2009).

5.3. Ausblicke

Von „magischen Kugeln“ träumte Paul Ehrlich vor über hundert Jahren als Beschreibung für eine Substanz, die spezifisch ihr Ziel angreift. Der Einsatz monoklonaler Antikörper ist bisher der erfolgreichste Versuch einer zielgerichteten Therapie ohne viele Nebeneffekte, und wird in vielen Fällen bald zu den Standardtherapien in Hämatologie und Onkologie gehören. Es gibt aber neben ihrer Entwicklung viele weitere Ansätze wie Tumorstimmulierung, die in vitro-Generierung tumor-spezifischer T-Zellen oder die Entwicklung spezifischer T-Zell aktivierender Antikörper (Bargou et al., 2008). So wird auch die Entwicklung neuer Immuntherapien und die Suche nach neuen Zielantigenen für eine *targeted therapy* des Multiplen Myeloms die Forschung noch einige Zeit beschäftigen- genauso wie das komplexe Zusammenspiel von BAFF und seinen Rezeptoren.

6. Zusammenfassung

Bei den Rezeptoren BAFF-R und BCMA handelt es sich um Mitglieder der TNF-Familie, die mit ihrem Liganden BAFF eine wichtige Rolle in der Homöostase und der Entwicklung der B-Zelllinie spielen. Mehrere Autoren zeigten bereits einen Zusammenhang dieses Ligand-/Rezeptorsystems mit der Proliferationskapazität und dem Überleben hämatopoetischer maligner Zellen auf. Die Expression dieser Rezeptoren als auch die Antikörperbildung gegen BCMA bei Patienten mit Multiplen Myelom (MM), die eine Lymphozytenspende erhalten hatten, führte zu der Annahme, dass BAFF-R und BCMA wichtige Zielantigene für die Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers als Immuntherapeutikum des Multiplen Myeloms darstellen könnten. Um Ihre Eignung näher zu evaluieren, haben wir eine breit gefächerte Analyse der Expression von BAFF-R und BCMA auf hämatopoetischen und primären MM-Zellen und auf verschiedenen humanen Geweben vorgenommen. Wir konnten zeigen, dass BAFF-R auf B- und T-Lymphozyten und lymphoiden Dendritischen Zellen als auch in sehr unterschiedlicher Stärke auf primären MM-Zellen exprimiert wird. BCMA, dessen Expression bisher nur auf (malignen) Plasmazellen bekannt war, konnte nur auf primären MM-Zellen nachgewiesen werden. Nachdem BAFF-R durch die Entdeckung seiner Expression auf Hirngewebe als mögliches *target* für weitere Untersuchungen wegfiel, fokussierten wir uns auf das weitere Expressionsprofil von BCMA. Durch RT-PCR und immunhistochemische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass auch BCMA nicht selektiv von Plasmazellen oder ihrem malignen Pendant, sondern auch signifikant auf relevanten humanen Geweben wie Niere und Leber exprimiert wird. Eine *targeted therapy* mit diesen beiden Rezeptoren als Zielantigene ist somit weitestgehend ausgeschlossen, da eine Therapie mit einem monoklonalen Antikörper keine Selektivität für MM-Zellen besäße und somit die Gefahr einer Schädigung lebenswichtiger Organe nach sich ziehen könnte.

7. Literaturverzeichnis

Adamopoulou, E., Diekmann, J., Tolosa, E., Kuntz, G., Einsele, H., Rammensee, H.G., and Topp, M.S. (2007). Human CD4+ T cells displaying viral epitopes elicit a functional virus-specific memory CD8+ T cell response. *J Immunol* 178, 5465-5472.

Alexanian, R., Haut, A., Khan, A.U., Lane, M., McKelvey, E.M., Migliore, P.J., Stuckey, W.J., Jr., and Wilson, H.E. (1969). Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *JAMA* 208, 1680-1685.

Attal, M., and Harousseau, J.L. (1999). Autologous peripheral blood progenitor cell transplantation for multiple myeloma. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol* 12, 171-191.

Attal, M., Harousseau, J.L., Facon, T., Guilhot, F., Doyen, C., Fuzibet, J.G., Monconduit, M., Hulin, C., Caillot, D., Bouabdallah, R., et al. (2003). Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med* 349, 2495-2502.

Attal, M., Harousseau, J.L., Stoppa, A.M., Sotto, J.J., Fuzibet, J.G., Rossi, J.F., Casassus, P., Maisonneuve, H., Facon, T., Ifrah, N., et al. (1996). A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N Engl J Med* 335, 91-97.

Attal, M., Huguette, F., Schlaifer, D., Payen, C., Laroche, M., Fournie, B., Mazieres, B., Pris, J., and Laurent, G. (1992). Intensive combined therapy for previously untreated aggressive myeloma. *Blood* 79, 1130-1136.

Avery, D.T., Kalled, S.L., Ellyard, J.I., Ambrose, C., Bixler, S.A., Thien, M., Brink, R., Mackay, F., Hodgkin, P.D., and Tangye, S.G. (2003). BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest* 112, 286-297.

Baker, K.P. (2004). BLyS--an essential survival factor for B cells: basic biology, links to pathology and therapeutic target. *Autoimmun Rev* 3, 368-375.

Bargou, R., Leo, E., Zugmaier, G., Klinger, M., Goebeler, M., Knop, S., Noppeney, R., Viardot, A., Hess, G., Schuler, M., et al. (2008). Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science* 321, 974-977.

Barlogie, B., Jagannath, S., Vesole, D.H., Naucke, S., Cheson, B., Mattox, S., Bracy, D., Salmon, S., Jacobson, J., Crowley, J., et al. (1997). Superiority of tandem autologous transplantation over standard therapy for previously untreated multiple myeloma. *Blood* 89, 789-793.

Barratt-Boyes, S.M. (1996). Making the most of mucin: a novel target for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 43, 142-151.

- Batten, M., Groom, J., Cachero, T.G., Qian, F., Schneider, P., Tschopp, J., Browning, J.L., and Mackay, F. (2000). BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes. *J Exp Med* 192, 1453-1466.
- Bellucci, R., Alyea, E.P., Chiaretti, S., Wu, C.J., Zorn, E., Weller, E., Wu, B., Canning, C., Schlossman, R., Munshi, N.C., et al. (2005). Graft-versus-tumor response in patients with multiple myeloma is associated with antibody response to BCMA, a plasma-cell membrane receptor. *Blood* 105, 3945-3950.
- Bence, J. (1848). On a new substance occurring in the urine of a patient with mollities ossium. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London (Biology)*.
- Blokhin, N., Larionov, L., Perevodchikova, N., Chebotareva, L., and Merkulova, N. (1958). [Clinical experiences with sarcolysin in neoplastic diseases.]. *Ann N Y Acad Sci* 68, 1128-1132.
- Bossen, C., and Schneider, P. (2006). BAFF, APRIL and their receptors: structure, function and signaling. *Semin Immunol* 18, 263-275.
- Brice, P., Marolleau, J.P., Pautier, P., Makke, J., Cazals, D., Dombret, H., D'Agay, M.F., Benbunan, M., and Gisselbrecht, C. (1996). Hematologic recovery and survival of lymphoma patients after autologous stem-cell transplantation: comparison of bone marrow and peripheral blood progenitor cells. *Leuk Lymphoma* 22, 449-456.
- Child, J.A., Morgan, G.J., Davies, F.E., Owen, R.G., Bell, S.E., Hawkins, K., Brown, J., Drayson, M.T., and Selby, P.J. (2003). High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med* 348, 1875-1883.
- Chu, V.T., Enghard, P., Riemekasten, G., and Berek, C. (2007). In vitro and in vivo activation induces BAFF and APRIL expression in B cells. *J Immunol* 179, 5947-5957.
- Coiffier, B., Lepage, E., Briere, J., Herbrecht, R., Tilly, H., Bouabdallah, R., Morel, P., Van Den Neste, E., Salles, G., Gaulard, P., et al. (2002). CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med* 346, 235-242.
- Crawley, C., Iacobelli, S., Bjorkstrand, B., Apperley, J.F., Niederwieser, D., and Gahrton, G. (2007). Reduced-intensity conditioning for myeloma: lower nonrelapse mortality but higher relapse rates compared with myeloablative conditioning. *Blood* 109, 3588-3594.
- Crawley, C., Lalancette, M., Szydlo, R., Gilleece, M., Peggs, K., Mackinnon, S., Juliusson, G., Ahlberg, L., Nagler, A., Shimoni, A., et al. (2005). Outcomes for reduced-intensity allogeneic transplantation for multiple myeloma: an analysis of prognostic factors from the Chronic Leukaemia Working Party of the EBMT. *Blood* 105, 4532-4539.
- Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., et al. (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351, 337-345.

Cunningham, D., Paz-Ares, L., Milan, S., Powles, R., Nicolson, M., Hickish, T., Selby, P., Treleavan, J., Viner, C., Malpas, J., et al. (1994). High-dose melphalan and autologous bone marrow transplantation as consolidation in previously untreated myeloma. *J Clin Oncol* 12, 759-763.

Dalrymple, J. (1846). On the microscopical character of mollities ossium. *Dublin Quarterly Journal of Medical Science* 1846.

Darce, J.R., Arendt, B.K., Wu, X., and Jelinek, D.F. (2007). Regulated expression of BAFF-binding receptors during human B cell differentiation. *J Immunol* 179, 7276-7286.

de Castro-Carpeno, J., Belda-Iniesta, C., Casado Saenz, E., Hernandez Agudo, E., Feliu Batlle, J., and Gonzalez Baron, M. (2008). EGFR and colon cancer: a clinical view. *Clin Transl Oncol* 10, 6-13.

Durie, B.G., Kyle, R.A., Belch, A., Bensinger, W., Blade, J., Boccadoro, M., Child, J.A., Comenzo, R., Djulbegovic, B., Fantl, D., et al. (2003). Myeloma management guidelines: a consensus report from the Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation. *Hematol J* 4, 379-398.

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

Einsele, H., Schafer, H.J., Hebart, H., Bader, P., Meisner, C., Plasswilm, L., Liebisch, P., Bamberg, M., Faul, C., and Kanz, L. (2003). Follow-up of patients with progressive multiple myeloma undergoing allografts after reduced-intensity conditioning. *Br J Haematol* 121, 411-418.

Einsele, H., and Straka, C. (2004). Multiples Myelom: Hochdosistherapie und Stammzelltransplantation. *Der Onkologe* 12, 832-842.

Ellis, J.H., Barber, K.A., Tutt, A., Hale, C., Lewis, A.P., Glennie, M.J., Stevenson, G.T., and Crowe, J.S. (1995). Engineered anti-CD38 monoclonal antibodies for immunotherapy of multiple myeloma. *J Immunol* 155, 925-937.

Elsawa, S.F., Novak, A.J., Grote, D.M., Ziesmer, S.C., Witzig, T.E., Kyle, R.A., Dillon, S.R., Harder, B., Gross, J.A., and Ansell, S.M. (2006). B-lymphocyte stimulator (BLyS) stimulates immunoglobulin production and malignant B-cell growth in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood* 107, 2882-2888.

Francisco, J.A., Schreiber, G.J., Comereski, C.R., Mezza, L.E., Warner, G.L., Davidson, T.J., Ledbetter, J.A., and Siegall, C.B. (1997). In vivo efficacy and toxicity of a single-chain immunotoxin targeted to CD40. *Blood* 89, 4493-4500.

Fu, L., Lin-Lee, Y.C., Pham, L.V., Tamayo, A., Yoshimura, L., and Ford, R.J. (2006). Constitutive NF-kappaB and NFAT activation leads to stimulation of the BLyS survival pathway in aggressive B-cell lymphomas. *Blood* 107, 4540-4548.

Gahrton, G., Tura, S., Ljungman, P., Blade, J., Cavo, M., De Laurenzi, A., Facon, T., Gratwohl, A., Michallet, M., Nikoskelainen, J., et al. (1995). An update of prognostic factors for allogeneic bone marrow transplantation in multiple myeloma using matched sibling donors. European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Stem Cells* 13 Suppl 2, 122-125.

Gao, G., Liang, X., Jiang, J., Zhou, X., Huang, R., Chu, Z., and Zhan, Q. (2009). A systematic review and meta-analysis of immunochemotherapy with rituximab for B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Acta Oncol*, 1-11.

Gattenloehner, S., Vincent, A., Leuschner, I., Tzartos, S., Muller-Hermelink, H.K., Kirchner, T., and Marx, A. (1998). The fetal form of the acetylcholine receptor distinguishes rhabdomyosarcomas from other childhood tumors. *Am J Pathol* 152, 437-444.

Gianni, A.M., Bregni, M., Siena, S., Orazi, A., Stern, A.C., Gandola, L., and Bonadonna, G. (1990). Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor reduces hematologic toxicity and widens clinical applicability of high-dose cyclophosphamide treatment in breast cancer and non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 8, 768-778.

Gross, J.A., Dillon, S.R., Mudri, S., Johnston, J., Littau, A., Roque, R., Rixon, M., Schou, O., Foley, K.P., Haugen, H., et al. (2001). TACI-Ig neutralizes molecules critical for B cell development and autoimmune disease. impaired B cell maturation in mice lacking BLYS. *Immunity* 15, 289-302.

Hahne, M., Kataoka, T., Schroter, M., Hofmann, K., Irmeler, M., Bodmer, J.L., Schneider, P., Bornand, T., Holler, N., French, L.E., et al. (1998). APRIL, a new ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates tumor cell growth. *J Exp Med* 188, 1185-1190.

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

Harrison, S.J., and Cook, G. (2005). Immunotherapy in multiple myeloma--possibility or probability? *Br J Haematol* 130, 344-362.

He, B., Chadburn, A., Jou, E., Schattner, E.J., Knowles, D.M., and Cerutti, A. (2004). Lymphoma B cells evade apoptosis through the TNF family members BAFF/BLYS and APRIL. *J Immunol* 172, 3268-3279.

Huard, B., Arlettaz, L., Ambrose, C., Kindler, V., Mauri, D., Roosnek, E., Tschopp, J., Schneider, P., and French, L.E. (2004). BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation. *Int Immunol* 16, 467-475.

Ikeda, H., Hideshima, T., Fulciniti, M., Lutz, R.J., Yasui, H., Okawa, Y., Kiziltepe, T., Vallet, S., Pozzi, S., Santo, L., et al. (2009). The monoclonal antibody nBT062

conjugated to cytotoxic Maytansinoids has selective cytotoxicity against CD138-positive multiple myeloma cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 15, 4028-4037.

Jackson, G., Einsele, H., Moreau, P., and Miguel, J.S. (2005). Bortezomib, a novel proteasome inhibitor, in the treatment of hematologic malignancies. *Cancer Treat Rev* 31, 591-602.

Kapoor, P., Greipp, P.T., Morice, W.G., Rajkumar, S.V., Witzig, T.E., and Greipp, P.R. (2008). Anti-CD20 monoclonal antibody therapy in multiple myeloma. *Br J Haematol* 141, 135-148.

Karsten, U., von Mensdorff-Pouilly, S., and Goletz, S. (2005). What makes MUC1 a tumor antigen? *Tumour Biol* 26, 217-220.

Kern, C., Cornuel, J.F., Billard, C., Tang, R., Rouillard, D., Stenou, V., Defrance, T., Ajchenbaum-Cymbalista, F., Simonin, P.Y., Feldblum, S., et al. (2004). Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood* 103, 679-688.

Khubchandani, S., Czuczman, M.S., and Hernandez-Ilizaliturri, F.J. (2009). Dacetuzumab, a humanized mAb against CD40 for the treatment of hematological malignancies. *Curr Opin Investig Drugs* 10, 579-587.

Kinsella TM, Nolan GP (1996): Episomal vectors rapidly and stably produce high-titer recombinant retrovirus. *Hum Gene Ther.* 7(12):1405-13.

Kondo, E., Topp, M.S., Kiem, H.P., Obata, Y., Morishima, Y., Kuzushima, K., Tanimoto, M., Harada, M., Takahashi, T., and Akatsuka, Y. (2002). Efficient generation of antigen-specific cytotoxic T cells using retrovirally transduced CD40-activated B cells. *J Immunol* 169, 2164-2171.

Kroger, N., Sayer, H.G., Schwerdtfeger, R., Kiehl, M., Nagler, A., Renges, H., Zabelina, T., Fehse, B., Ayuk, F., Wittkowsky, G., et al. (2002). Unrelated stem cell transplantation in multiple myeloma after a reduced-intensity conditioning with pretransplantation antithymocyte globulin is highly effective with low transplantation-related mortality. *Blood* 100, 3919-3924.

Laabi, Y., Gras, M.P., Carbonnel, F., Brouet, J.C., Berger, R., Larsen, C.J., and Tsapis, A. (1992). A new gene, BCM, on chromosome 16 is fused to the interleukin 2 gene by a t(4;16)(q26;p13) translocation in a malignant T cell lymphoma. *EMBO J* 11, 3897-3904.

Lin, M.Z., Teitell, M.A., and Schiller, G.J. (2005). The evolution of antibodies into versatile tumor-targeting agents. *Clin Cancer Res* 11, 129-138.

Lokhorst, H.M., Schattenberg, A., Cornelissen, J.J., van Oers, M.H., Fibbe, W., Russell, I., Donk, N.W., and Verdonck, L.F. (2000). Donor lymphocyte infusions for relapsed multiple myeloma after allogeneic stem-cell transplantation: predictive factors for response and long-term outcome. *J Clin Oncol* 18, 3031-3037.

Macintyre, W. (1850). Case of mollities and fragilitas ossium, accompanied with urine strongly charged with animal matter. *Medical and Chirurgical Transactions of London*.

Mackay, F., and Browning, J.L. (2002). BAFF: a fundamental survival factor for B cells. *Nat Rev Immunol* 2, 465-475.

Mackay, F., and Leung, H. (2006). The role of the BAFF/APRIL system on T cell function. *Semin Immunol* 18, 284-289.

Mackay, F., and Schneider, P. (2008). TACI, an enigmatic BAFF/APRIL receptor, with new unappreciated biochemical and biological properties. *Cytokine Growth Factor Rev* 19, 263-276.

Mackay, F., and Schneider, P. (2009). Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol* 9, 491-502.

Mackay, F., Woodcock, S.A., Lawton, P., Ambrose, C., Baetscher, M., Schneider, P., Tschopp, J., and Browning, J.L. (1999). Mice transgenic for BAFF develop lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med* 190, 1697-1710.

Mallmann, P. (2006). [Breast cancer: adjuvant therapy with trastuzumab: herceptin adjuvant (HERA) Trial Study, B-31- and N9831-Study]. *Internist (Berl)* 47, 1183-1185.

Maloney, D.G., Grillo-Lopez, A.J., White, C.A., Bodkin, D., Schilder, R.J., Neidhart, J.A., Janakiraman, N., Foon, K.A., Liles, T.M., Dallaire, B.K., et al. (1997). IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 90, 2188-2195.

Maloney, D.G., Molina, A.J., Sahebi, F., Stockerl-Goldstein, K.E., Sandmaier, B.M., Bensinger, W., Storer, B., Hegenbart, U., Somlo, G., Chauncey, T., et al. (2003). Allografting with nonmyeloablative conditioning following cytoreductive autografts for the treatment of patients with multiple myeloma. *Blood* 102, 3447-3454.

Mandel, M., and Higa, A. (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53, 159-162.

McElwain, T.J., and Powles, R.L. (1983). High-dose intravenous melphalan for plasma-cell leukaemia and myeloma. *Lancet* 2, 822-824.

Mehta, J., and Singhal, S. (1998). Graft-versus-myeloma. *Bone Marrow Transplant* 22, 835-843.

Moreaux, J., Legouffe, E., Jourdan, E., Quittet, P., Reme, T., Lugagne, C., Moine, P., Rossi, J.F., Klein, B., and Tarte, K. (2004). BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone. *Blood* 103, 3148-3157.

Moreaux, J., Sprynski, A.C., Dillon, S.R., Mahtouk, K., Jourdan, M., Ythier, A., Moine, P., Robert, N., Jourdan, E., Rossi, J.F., et al. (2009). APRIL and TACI interact with

syndecan-1 on the surface of multiple myeloma cells to form an essential survival loop. *Eur J Haematol* 83, 119-129.

Musto, P., Carella, A.M., Jr., Greco, M.M., Falcone, A., Sanpaolo, G., Bodenizza, C., Cascavilla, N., Melillo, L., and Carella, A.M. (2003). Short progression-free survival in myeloma patients receiving rituximab as maintenance therapy after autologous transplantation. *Br J Haematol* 123, 746-747.

Nagorsen, D., and Thiel, E. (2007). Monoclonal antibodies in clinical hematology and oncology. *Curr Opin Investig Drugs* 8, 996-1001.

Ng, L.G., Sutherland, A.P., Newton, R., Qian, F., Cachero, T.G., Scott, M.L., Thompson, J.S., Wheway, J., Chtanova, T., Groom, J., et al. (2004). B cell-activating factor belonging to the TNF family (BAFF)-R is the principal BAFF receptor facilitating BAFF costimulation of circulating T and B cells. *J Immunol* 173, 807-817.

Novak, A.J., Bram, R.J., Kay, N.E., and Jelinek, D.F. (2002). Aberrant expression of B-lymphocyte stimulator by B chronic lymphocytic leukemia cells: a mechanism for survival. *Blood* 100, 2973-2979.

Novak, A.J., Darce, J.R., Arendt, B.K., Harder, B., Henderson, K., Kindsvogel, W., Gross, J.A., Greipp, P.R., and Jelinek, D.F. (2004a). Expression of BCMA, TACI, and BAFF-R in multiple myeloma: a mechanism for growth and survival. *Blood* 103, 689-694.

Novak, A.J., Grote, D.M., Stenson, M., Ziesmer, S.C., Witzig, T.E., Habermann, T.M., Harder, B., Ristow, K.M., Bram, R.J., Jelinek, D.F., et al. (2004b). Expression of BLyS and its receptors in B-cell non-Hodgkin lymphoma: correlation with disease activity and patient outcome. *Blood* 104, 2247-2253.

O'Connor, B.P., Raman, V.S., Erickson, L.D., Cook, W.J., Weaver, L.K., Ahonen, C., Lin, L.L., Mantchev, G.T., Bram, R.J., and Noelle, R.J. (2004). BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med* 199, 91-98.

Ono, K., Ohtomo, T., Yoshida, K., Yoshimura, Y., Kawai, S., Koishihara, Y., Ozaki, S., Kosaka, M., and Tsuchiya, M. (1999). The humanized anti-HM1.24 antibody effectively kills multiple myeloma cells by human effector cell-mediated cytotoxicity. *Mol Immunol* 36, 387-395.

Palumbo, A., Triolo, S., Argentino, C., Bringhen, S., Dominietto, A., Rus, C., Omede, P., Tarella, C., Pileri, A., and Boccadoro, M. (1999). Dose-intensive melphalan with stem cell support (MEL100) is superior to standard treatment in elderly myeloma patients. *Blood* 94, 1248-1253.

Perez, E.A., Suman, V.J., Davidson, N.E., Martino, S., Kaufman, P.A., Lingle, W.L., Flynn, P.J., Ingle, J.N., Visscher, D., and Jenkins, R.B. (2006). HER2 testing by local, central, and reference laboratories in specimens from the North Central Cancer Treatment Group N9831 intergroup adjuvant trial. *J Clin Oncol* 24, 3032-3038.

Pratt, G., Goodyear, O., and Moss, P. (2007). Immunodeficiency and immunotherapy in multiple myeloma. *Br J Haematol* 138, 563-579.

Richardson, P.G., Sonneveld, P., Schuster, M., Irwin, D., Stadtmauer, E., Facon, T., Harousseau, J.L., Ben-Yehuda, D., Lonial, S., Goldschmidt, H., et al. (2007). Extended follow-up of a phase 3 trial in relapsed multiple myeloma: final time-to-event results of the APEX trial. *Blood* 110, 3557-3560.

Riddell, S.R., and Greenberg, P.D. (1990). The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells. *J Immunol Methods* 128, 189-201.

Sasaki, Y., Casola, S., Kutok, J.L., Rajewsky, K., and Schmidt-Supprian, M. (2004). TNF family member B cell-activating factor (BAFF) receptor-dependent and -independent roles for BAFF in B cell physiology. *J Immunol* 173, 2245-2252.

Schiemann, B., Gommerman, J.L., Vora, K., Cachero, T.G., Shulga-Morskaya, S., Dobles, M., Frew, E., and Scott, M.L. (2001). An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* 293, 2111-2114.

Schneider, P., MacKay, F., Steiner, V., Hofmann, K., Bodmer, J.L., Holler, N., Ambrose, C., Lawton, P., Bixler, S., Acha-Orbea, H., et al. (1999). BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *J Exp Med* 189, 1747-1756.

Seidl, S., Kaufmann, H., and Drach, J. (2003). New insights into the pathophysiology of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 4, 557-564.

Seshasayee, D., Valdez, P., Yan, M., Dixit, V.M., Tumas, D., and Grewal, I.S. (2003). Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BLYS receptor. *Immunity* 18, 279-288.

Singh, R., and Bandyopadhyay, D. (2007). MUC1: a target molecule for cancer therapy. *Cancer Biol Ther* 6, 481-486.

Singhal, S., and Mehta, J. (2006). Multiple myeloma. *Clin J Am Soc Nephrol* 1, 1322-1330.

Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A., et al. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707-712.

Stein, R., Mattes, M.J., Cardillo, T.M., Hansen, H.J., Chang, C.H., Burton, J., Govindan, S., and Goldenberg, D.M. (2007). CD74: a new candidate target for the immunotherapy of B-cell neoplasms. *Clin Cancer Res* 13, 5556s-5563s.

Stevenson, G.T. (2006). CD38 as a therapeutic target. *Mol Med* 12, 345-346.

Stewart, A.K., and Fonseca, R. (2005). Prognostic and therapeutic significance of myeloma genetics and gene expression profiling. *J Clin Oncol* 23, 6339-6344.

Tarte, K., Zhan, F., De Vos, J., Klein, B., and Shaughnessy, J., Jr. (2003). Gene expression profiling of plasma cells and plasmablasts: toward a better understanding of the late stages of B-cell differentiation. *Blood* 102, 592-600.

Thompson, J.S., Bixler, S.A., Qian, F., Vora, K., Scott, M.L., Cachero, T.G., Hession, C., Schneider, P., Sizing, I.D., Mullen, C., et al. (2001). BAFF-R, a newly identified TNF receptor that specifically interacts with BAFF. *Science* 293, 2108-2111.

Treon, S.P., Agus, D.B., Link, B., Rodrigues, G., Molina, A., Lacy, M.Q., Fisher, D.C., Emmanouilides, C., Richards, A.I., Clark, B., et al. (2001). CD20-Directed Antibody-Mediated Immunotherapy Induces Responses and Facilitates Hematologic Recovery in Patients With Waldenstrom's Macroglobulinemia. *J Immunother* (1991) 24, 272-279.

Venon, M.D., Roccaro, A.M., Gay, J., Moreau, A.S., Dulery, R., Facon, T., Ghobrial, I.M., and Leleu, X. (2009). Front line treatment of elderly multiple myeloma in the era of novel agents. *Biologics* 3, 99-109.

Vesole, D.H., Barlogie, B., Jagannath, S., Cheson, B., Tricot, G., Alexanian, R., and Crowley, J. (1994). High-dose therapy for refractory multiple myeloma: improved prognosis with better supportive care and double transplants. *Blood* 84, 950-956.

von Bulow, G.U., and Bram, R.J. (1997). NF-AT activation induced by a CAML-interacting member of the tumor necrosis factor receptor superfamily. *Science* 278, 138-141.

Waldschmidt, T.J., and Noelle, R.J. (2001). Immunology. Long live the mature B cell--a baffling mystery resolved. *Science* 293, 2012-2013.

Yan, M., Brady, J.R., Chan, B., Lee, W.P., Hsu, B., Harless, S., Cancro, M., Grewal, I.S., and Dixit, V.M. (2001). Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency. *Curr Biol* 11, 1547-1552.

Yang, J.C., Haworth, L., Sherry, R.M., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., Steinberg, S.M., Chen, H.X., and Rosenberg, S.A. (2003). A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* 349, 427-434.

Yang, M., Hase, H., Legarda-Addison, D., Varughese, L., Seed, B., and Ting, A.T. (2005). B cell maturation antigen, the receptor for a proliferation-inducing ligand and B cell-activating factor of the TNF family, induces antigen presentation in B cells. *J Immunol* 175, 2814-2824.

Ye, Q., Wang, L., Wells, A.D., Tao, R., Han, R., Davidson, A., Scott, M.L., and Hancock, W.W. (2004). BAFF binding to T cell-expressed BAFF-R costimulates T cell proliferation and alloresponses. *Eur J Immunol* 34, 2750-2759.

Zhang, X., Park, C.S., Yoon, S.O., Li, L., Hsu, Y.M., Ambrose, C., and Choi, Y.S. (2005). BAFF supports human B cell differentiation in the lymphoid follicles through distinct receptors. *Int Immunol* 17, 779-78

Danksagung

Für das Gelingen dieser Arbeit haben entscheidend Prof. Dr. Max Topp und die Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe, insbesondere Kai Hauschulz, Jan Diekmann und Eleni Adamopoulou unter der Leitung von Prof. Dr. Einsele von der Medizinischen Klinik II der Universität Würzburg beigetragen.

Prof. Dr. Gattenlöhner vom Institut für Pathologie hat durch seine Forschungsarbeit entscheidend mitgewirkt.

Ihnen und besonders meinen Eltern, die mich mein ganzes Studium über unterstützt und gefördert haben, gilt mein ganz besonderer Dank.

Elina Hünig

LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

Name: Elina Hünig
Beruf: Assistenzärztin in Weiterbildung Innere Medizin
Geboren: 23. August 1982 in Würzburg
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Schul Ausbildung

09/1989 – 07/1993 Gustav-Walle-Grundschule, Würzburg
09/1993 – 07/2002 Humanistisches Riemenschneider-Gymnasium, Würzburg
12/1997 – 03/1998 Deutsche Schule, Kapstadt/Südafrika
07/2002 Allgemeine Hochschulreife am Riemenschneider-Gymnasium, Würzburg

Hochschulausbildung

10/2002 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
08/2004 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Abschlussnote „gut“ (1,66)
2007 Carl-Duisberg-Stipendiatin der *Bayer Science and Education Foundation*
05/2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Staatsexamen), Abschlussnote „gut“ (2,0)

Promotion

2005 Beginn der Promotion am Institut für Molekulare Innere Medizin des Universitätsklinikums Würzburg
Thema: *Evaluation von Baff-Rezeptor und BCMA als Targets in der Immuntherapie des Multiplen Myeloms*
2006 Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, Abstractveröffentlichung in *Onkologie, International Journal for Cancer Research and Treatment*

Praktische Tätigkeiten während des Studiums

Praktisches Jahr:

02/2008 – 06/2008	Innere Medizin, Tygerberg-Hospital der Universität Stellenbosch, Kapstadt / Südafrika
06/2008 – 10/2008	Chirurgie, Asana-Spital, Menziken / Schweiz
10/2008 – 01/2009	Gynäkologie und Geburtshilfe, Frauenklinik der Universität Würzburg

Weitere Tätigkeiten:

01/2007 – 09/2007	Studentische Mitarbeiterin, Praxis Dr. med. Michael Kropp, Neurologie und Psychiatrie, Würzburg
-------------------	---

Ärztliche Tätigkeit

02/2010 – 08/2010	Assistenzärztin für Gynäkologie und Geburtshilfe am Ev. Krankenhaus Ludwigsfelde-Teltow
09/2010-09/2011	Assistenzärztin für Innere Medizin, Kardiologie am DRK- Klinikum Berlin-Köpenick
09/2011-01/2012	Assistenzärztin für Innere Medizin, Gastroenterologie am DRK- Klinikum Berlin-Köpenick

Berlin, 4. Januar 2013

Elina Hünig