

Aus der
Medizinischen Klinik und Poliklinik II
Direktor: Prof. Dr. med. Hermann Einsele

Herstellung und Evaluation genetisch veränderter Masernviren zur spezifischen Infektion und
Elimination primärer maligner Plasmazellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Horst-Dieter Hummel
aus Metzingen

November 2009

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch
Referent: Prof. Dr. med. Hermann Einsele
Koreferent: Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies

Tag der mündlichen Prüfung: 2.9.2010

Der Promovend ist Arzt.

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis.....	
II. Abkürzungsverzeichnis.....	
1 EINLEITUNG	1
1.1 MULTIPLES MYELOM.....	1
1.1.1 <i>Definition</i>	1
1.1.2 <i>Epidemiologie</i>	2
1.1.3 <i>Ätiologie und Pathogenese</i>	2
1.1.4 <i>Klinische Charakteristika</i>	8
1.1.5 <i>Diagnosekriterien für das Multiple Myelom</i>	12
1.1.6 <i>Stadieneinteilung</i>	13
1.1.7 <i>Therapie</i>	15
1.1.8 <i>Onkolytischen Viren und deren Kombination mit immuntherapeutischen Ansätzen</i>	30
1.2 MASERN	33
1.2.1 <i>Historische und epidemiologische Übersicht</i>	33
1.2.2 <i>Klassische akute Masern</i>	34
1.2.3 <i>Komplikationen und Folgeerkrankungen</i>	35
1.3 DAS MASERNVIRUS	38
1.4 AUFGABENSTELLUNG UND ZIEL DER ARBEIT	44
2 MATERIAL UND METHODEN.....	45
2.1 MATERIAL	45
2.1.1 <i>Zellen</i>	45
2.1.2 <i>Viren</i>	46
2.1.3 <i>Zellkulturmedien und Zusätze</i>	47
2.1.4 <i>Chemikalien, Puffer und Lösungen</i>	47
2.1.5 <i>Kits</i>	49
2.1.6 <i>Antikörper</i>	49
2.1.7 <i>Plastikware und Verbrauchsmaterial</i>	50
2.1.8 <i>Geräte</i>	51
2.1.9 <i>Nukleotide</i>	53
2.2 METHODEN.....	54
2.2.1 <i>Zellkultur</i>	54
2.2.2 <i>Molekularbiologische Methoden</i>	58
2.2.1 <i>Viruskultur</i>	61
2.2.3 <i>Proteinbiochemische Methoden</i>	63
2.2.4 <i>Infektionen mit MV</i>	66
2.2.5 <i>Apoptosenachweis</i>	66

3	ERGEBNISSE	68
3.1	BINDUNGSMUSTER DES MONOKLONALEN MURINEN ANTIKÖRPERS WUE-1	68
3.2	EXPRESSION DER MV-REZEPTOREN	71
3.3	KLONIERUNG DES REKOMBINANTEN MV-WUE	72
3.3.1	<i>Klonierung des chimären H-Proteins.....</i>	<i>72</i>
3.3.2	<i>Transfektionsexperimente mit dem chimären H-Protein.....</i>	<i>73</i>
3.3.3	<i>Klonierung des kompletten Genoms von MV-Wue</i>	<i>74</i>
3.4	RESCUE DES MV-WUE	75
3.4.1	<i>Anti-His-tag single chain Rezeptorexpression von Vero His Zellen.....</i>	<i>75</i>
3.4.2	<i>Transfektion von 293-3-46 Zellen und Overlay von Vero His Zellen.....</i>	<i>75</i>
3.4.3	<i>Propagierung von MV-Wue auf Vero His</i>	<i>75</i>
3.5	WESTERN BLOT DER H-PROTEINE VON MV-EGFP UND MV-WUE	76
3.6	SPEZIFISCHE INFEKTION PRIMÄRER MYELOMZELLEN DURCH MV-WUE	77
3.7	PROPAGIERUNG VON MV-WUE IN PRIMÄREN MYELOMZELLEN	79
3.8	MV-WUE REDUZIERT SPEZIFISCH DIE ZELLZAHL CD138+/WUE-1 BINDENDER ZELLEN ABER NICHT DIE MYELOISCHER ZELLEN UND MYELOISCHER PROGENITORZELLEN (CD33+).....	80
3.9	DIE MIT MV-WUE SPEZIFISCH INFIZIERTEN PRIMÄREN MM-ZELLEN WERDEN APOPTOTISCH	82
4	DISKUSSION	84
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	94
6	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	95
7	TABELLENVERZEICHNIS	96
8	LITERATURVERZEICHNIS	97
9	DANKSAGUNG	127
10	LEBENS LAUF	
11	PUBLIKATONSVERZEICHNIS	

II. Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
Aqua dest.	<i>(lat.)</i> aqua destillata <i>(dt.)</i> destilliertes Wasser
Art.-Nr.	Artikelnummer
ASZT	Autologe Stammzelltransplantation
ATV	<i>(engl.)</i> advanced trypsin-versene
b2M	β2- Mikroglobulin
bar	Bar
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
C	Bezeichnung eines Masernvirusproteins
°C	Grad Celcius
CALGB	Cancer and Leukemia Group B (CALGB)
CCP	<i>(CD46) (engl.)</i> complement control protein
CCT	konventionelle Chemotherapie
CD	<i>(in Verbindung mit einer Zahl und ggf. mit einem Buchstaben)</i> <i>(engl.)</i> cluster of differentiation
cDNA	<i>(engl.)</i> complementary desoxyribonucleic acid <i>(dt.)</i> komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDV	<i>(engl.)</i> canine distemper virus
CR	complete remission, komplette Remission
CRAB	calcium- induced, renal insufficiency, anemia oder bone lesions
CRP	C-reaktives Protein
d	<i>(lat.)</i> dies <i>(dt.)</i> Tag(e)
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]oktan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle
DEPC	Diethylpyrrolidiniumcarbonat
Dex	Dexamethason
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DLI	Donor lymphocyte infusion

DMSO	Dimethylsulfoxid
DMV	<i>(engl.)</i> dolphin morbillivirus
DNA	<i>(engl.)</i> desoxy-ribonucleic acid <i>(dt.)</i> Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dT	Desoxythymidin
dt.	deutsch
EBMT	European Group for Blood and Marrow Transplantation
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECOG	Eastern Cooperative Oncology Group
Edm	<i>(Bezeichnung eines Virusisolats) (engl.)</i> Edmonston
EDTA	<i>(engl.)</i> ethylenediaminetetraacetic acid <i>(dt.)</i> Ethylendiamintetraessigsäure
ECL	<i>(engl.)</i> enhanced chemoluminescence
EFS	event free survival
EKG	Elektrokardiogramm
EPO	Erythropoetin
et al.	<i>(lat.)</i> et alii (<i>oder</i>) et aliae <i>(dt.)</i> und andere (<i>oder</i>) und weitere
E_x	Extinktion bei einer Wellenlänge von x nm
F_x	Fusionsprotein (<i>eventuell unter Angabe der Untereinheit x</i>)
FACS	<i>(engl.)</i> fluorescence-activated cell scan <i>(dt.)</i> fluoreszenzaktivierte Zytometrie (<i>oder</i>) Durchflusszytometrie
FCS	<i>(engl.)</i> fetal calf serum <i>(dt.)</i> fetales Kälberserum
FDG- PET	Fluor-Deoxyglykose – Positronen- Emissions-Tomografie
FISH	Fluorescence in situ hybridisation
FITC	<i>(engl.)</i> fluorescent isothiocyanate
fw	<i>(engl.)</i> forward
g	<i>(bei Mengenangaben)</i> Gramm
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GvHD	Graft versus host disease
Gy	Gray
h	<i>(lat.)</i> hora(-ae) <i>(dt.)</i> Stunde(n)

H	Hämagglutinin
HBSS (<i>engl.</i>)	Hanks' balanced salt solution
HBSS ⁽⁻⁾	HBSS ohne Calcium- und Magnesiumionen
HD	Hochdosis (-chemotherapie)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hg.	Herausgeber
HHV 8	Humanes Herpes Virus 8
HLA	<i>(engl.)</i> human leukocyte antigen <i>(dt.)</i> Humanes Leukozytenantigen
HLA	<i>x</i> HLA-Klasse- <i>x</i>
HRPO	<i>(engl.)</i> horseradish peroxidase <i>(dt.)</i> Meerrettichperoxidase
IFM	Intergroup Francophone du Myelome
IFN- α	Interferon- α
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin(e)
IgG x	Immunglobulin G (<i>eventuell unter Angabe der Subklasse x</i>)
IL	Interleukin
IL-1 β	Interleukin-1 β
IMID	immunmodulatorische Substanzen
ISS	International Staging System
ITSM	<i>(SLAM) (engl.)</i> immunoreceptor tyrosine-based switch motif
IU	<i>(engl.)</i> international unit(s) <i>(dt.)</i> internationale Einheit(en)
J	Joule
kb	Kilobasenpaare
kda	Kilodalton
KLSHV	Kaposi- Sarkom-assoziiertes Herpes Virus
l	Liter
LCDD	light-chain deposition disease
LDH	Laktatdehydrogenase
Len	Lenalidomid
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mAb	<i>(engl.)</i> monoclonal antibody

	<i>(dt.)</i> monoklonale(-r/-n) Antikörper(s)
MCP	<i>(engl.)</i> membrane cofactor protein <i>(dt.)</i> Membran-Cofaktor-Protein
M. D.	<i>(engl.)</i> medical doctor <i>(dt.)</i> Doktor der Medizin
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MEM	<i>(engl.)</i> minimum essential medium
µg	Mikrogramm
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mM	Millimolar
MM	Multiplres Myelom
mock	<i>(Scheinviruspräparation ohne Virus)</i>
MOI	<i>(engl.)</i> multiplicity of infection
MRD	Minimal residual disease
MRT	Magnetresonanztomografie
MV	Masernvirus
MVD	microvessel density
MV-EGFP	Masernvirus mit Expressionskassette für EGFP
MV-Wue	Masernvirus mit Expressionskassette für scFvWue
N	Nukleokapsid
n. b.	nicht bekannt
n. Chr.	nach Christus
nCR	near CR
nm	Nanometer
NP-40	<i>(Bezeichnung eines Detergens)</i>
Nr.	Nummer
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika / Antiphlogistika
ORR	Overall response rate
OS	Overall survival
PBMC	<i>(engl.)</i> peripheral blood mononuclear cells
PBS	<i>(engl.)</i> phosphate-buffered saline

	(<i>dt.</i>) phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS ⁽⁻⁾	PBS ohne Calcium- und Magnesiumionen
PCR	(<i>engl.</i>) polymerase chain reaction (<i>dt.</i>) Polymerase-Kettenreaktion
PDV	(<i>engl.</i>) phocine distemper virus
PFS	Progression free survival
pfu	(<i>engl.</i>) plaque forming unit (<i>dt.</i>) plaque-bildende Einheit
pH	(<i>lat.-griech.</i>) pondus Hydrogenii
PI	Propidiumiodid
PMV	(<i>engl.</i>) porpoise morbillivirus
POEMS	<i>polyneuropathy, organomegaly, endokrinopathy, monoclonal gammopathy, skin changes</i>
PPRV	(<i>frz./engl.</i>) peste-des-petits-ruminants virus
PR	Partiale Remission
%	Prozent
rev	(<i>engl.</i>) reverse
Rev	Revlimid (Handelsname, entspricht Lenalidomid)
RIC	reduced intensity conditioning (regimen)
RNA	(<i>engl.</i>) ribonucleic acid (<i>dt.</i>) Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROTI	related organ or tissue impairment
RPE	R-Phycoerythrin
rpm	(<i>engl.</i>) rounds per minute (<i>dt.</i>) Umdrehungen pro Minute
RPMI	(<i>Bezeichnung eines Kulturmediums</i>) Roswell Park Memorial Institute
RPV	(<i>engl.</i>) rinderpest virus
RT-PCR	(<i>engl.</i>) reverse transcription polymerase chain reaction (<i>dt.</i>) Polymerase-Kettenreaktion nach reverser Transkription
s	Sekunde(n)
S	Sedimentationskoeffizient nach Svedberg
scFv	single chain Antikörper
scFv Wue	single chain Antikörper basierend auf Wue-1
SCID	severe combined immunodeficiency

SCR	(CD46) (engl.) short consensus repeat
SDS	(engl.) sodium dodecyl sulfate (dt.) Natriumdodecylsulfat
SLAM	(engl.) signaling lymphocytic activation molecule
SSPE	Short tau inversion recovery
STP	(CD46) (engl.) serin-threonin-prolin-rich domain
SV40	(engl.) Simian (vacuolating) virus 40
SWOG	Southwest Oncology Group
SZT	Stammzelltransplantation
TAE	(engl.) Tris-Acetate-EDTA
TBI	Total body irradiation
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Thal	Thalidomid
TLR2	(engl.) toll-like receptor 2 (dt.) Toll-ähnlicher Rezeptor 2
TM	(engl.) trade mark
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TRAIL	tumor necrosis factor-related apoptosis- inducing ligand
TRM	Treatment related mortality
TTP	Time to progression
U	(engl.) unit(s) (dt.) Einheit(en)
UNICEF	(engl.) United Nations International Children's Emergency Fund (oder) United Nations Children's Fund
UV	Ultraviolettlicht
V	(als Einheit einer Zahl) Volt
V	(Bezeichnung eines Masernvirusproteins)
Vel	Velcade
VGPR	very good partial remission
(v/v)	(engl.) volume per volume (dt.) Volumen pro Volumen
vWF	von-Willebrand-Faktor
WHO	(engl.) World Health Organization (dt.) Weltgesundheitsorganisation
Wue-1	monoklonaler muriner Antikörper spezifisch für Plasmazellen

(w/v)	(<i>engl.</i>) weight per volume (<i>dt.</i>) Gewicht pro Volumen
x	(in Verbindung mit einer Zahl) -fach

1 EINLEITUNG

1.1 Multiples Myelom

1.1.1 Definition

Das Multiple Myelom (MM) ist eine disseminierte klonale Erkrankung der B- Zellreihe, wobei die B-Lymphozyten (B-Zellen) zu Plasmazellen ausreifen, die normalerweise langsam proliferieren und eine abnorme Menge an Immunglobulinen (Ig) oder Ig-Fragmenten produzieren. Die klinischen Manifestationen sind sehr heterogen und beinhalten eine Tumorbildung, monoklonale Ig Produktion, Herabsetzung der Ig-Sekretion normaler Plasmazellen mit der Folge einer Hypogammglobulinämie, Beeinträchtigung der Hämatopoese, Osteolysen, Hyperkalzämie und renale Dysfunktion. Symptome werden durch einen Tumormasseneffekt, durch Zytokine, die durch die Tumorzellen selbst, aber auch durch andere Zellen des sogenannten Mikromilieus (microenvironment) wie Knochenmarkstromazellen als Antwort auf die Adhärenz der MM Zellen freigesetzt werden, durch die im Übermaß gebildeten Ig (M-Protein) und deren Ablagerung in Organen wie bei der AL (amyloid-light chain) Amyloidose und bei der Erkrankung durch die Ablagerung der Leichtketten (light-chain deposition disease, LCDD) hervorgerufen.

Das MM gehört zur Gruppe der Plasmazellerkrankungen. Diese schließen klinisch benigne Verlaufsformen ein, wie die essentielle monoklonale Gammopathie, seltene Krankheitsbilder wie die Castleman Erkrankung und die α -Schwerketten Erkrankung (α -heavy-chain disease), die Makroglobulinämie, das solitäre Plasmozytom mit einer hohen Chance auf Heilung, wenn es in weichem Gewebe auftritt, aber auch die häufigste maligne Entität, das Multiple Myelom, das mit konventioneller Chemotherapie nicht kurabel ist. All diese Störungen haben bestimmte morphologische Charakteristika der beteiligten Plasmazellen gemeinsam, die meistens mit einer Produktion von Ig Molekülen vergesellschaftet sind. Während die meisten Plasmazellerkrankungen auf der Expansion eines einzigen Zellklons beruhen mit einer daraus resultierenden monoklonalen Proteinsekretion, sind jedoch auch oligoklonale oder auch polyklonale Proteinveränderungen zu beobachten wie bei der Castleman Erkrankung.

1.1.2 Epidemiologie

In den westlichen Ländern gehen ca. 1% aller durch Krebserkrankungen bedingter Todesfälle auf eine Erkrankung durch ein MM zurück, in den USA sind ungefähr 20% aller hämatologischer Neoplasien durch das MM bedingt. Circa 30/100.000 Personen über 25 Jahren haben ein MM, im Verhältnis sind mit 55% etwas mehr Männer als Frauen betroffen. Das mittlere Alter der Patienten liegt bei 65 Jahren, allerdings wurde im Verlauf der zurückliegenden 60 Jahren ein Trend hin zu vermehrtem Auftreten eines MM bei Patienten unter 55 Jahre beobachtet. Patienten unter 40 Jahre machen jedoch nur 3% aller MM Patienten aus. Bezüglich der Inzidenz bestehen klare ethnische Unterschiede: Schwarze erkranken doppelt so häufig als Weiße, in der asiatischen Bevölkerung ist die Inzidenz am geringsten (Bergsagel *et al.*, 1995).

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Ätiologisch sind ionisierende Strahlen 15 bis 20 Jahre nach der Strahlenexposition als Risikofaktor bekannt (Atombombenopfer, berufliche Exposition). Ein Zusammenhang mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen oder bestimmten Infektionen sowie der Exposition mit Schadstoffen wird diskutiert, gilt aber derzeit nicht als gesichert. Das humane Herpes Virus-8 (HHV-8, Kaposi- Sarkom-assoziiertes Herpes Virus (KLSHV)) spielt in der Pathogenese des Lymphoms des Pleuraspaltes, des Kaposi-Sarkoms und der Castleman Erkrankung eine Rolle. Derzeitige Forschungsbemühungen beschäftigen sich mit entzündlichen Veränderungen des Knochenmarkmikromilieus, die zum Fortschreiten einer essentiellen monoklonalen Gammopathie zu einem MM beitragen könnten. Eine genetische Disposition kann angesichts der ethnischen Inzidenzunterschiede sowie der Berichte über familiär gehäuftes Auftreten bei Verwandten ersten Grades eines Erkrankten vermutet werden (Riedel *et al.*, 1992, Ichimaru *et al.*, 1982, Gramenzi *et al.*, 1991, Rettig *et al.*, 1997, Bourget *et al.*, 1993, Bataille *et al.*, 1997, Lynch *et al.*, 2001, Segel *et al.*, 2004).

Das MM entwickelt sich wahrscheinlich meistens aus einer ebenso mit steigendem Alter zunehmenden prämaligen Vorstufe, der sogenannten „Monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz“ (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS), die bei etwa einem Prozent der Erwachsenen über 25 Jahren nachgewiesen werden kann und in ca. einem Prozent pro Jahr in ein MM übergeht (Kyle *et al.*, 2002). Die Entwicklung eines de novo MM, ohne dieses „Vorläuferstadium“, wird nur für eine kleine Gruppe von Patienten

postuliert, bei der diese Erkrankung in sehr frühem Alter (< 30 Jahre) auftritt. Obwohl das MGUS sehr effizient über einen simplen Bluttest nachgewiesen werden kann, ist es derzeit nicht möglich, vorherzusagen, bei welchem Patienten es zu einer Progression zu einem MM kommt oder vielmehr eine solche zu verhindern. Sowohl beim MGUS als auch beim MM werden dieselben monoklonalen Immunglobuline gebildet (Idiotyp), bei MM lässt sich allerdings im Gegensatz zum MGUS eine klonale Plasmazellvermehrung im Knochenmark von > 10% nachweisen sowie ggf. das Vorliegen von Osteolysen, einer Nierenschädigung, Anämie oder Hyperkalzämie. Man geht davon aus, dass diese Progression eines MGUS zu einem Multiplen Myelom optional nochmals über eine indolente Zwischenstufe verläuft, das sogenannte „smouldering MM“, das durch einen stabilen intramedullären Tumorzellgehalt von >10% jedoch durch keine der bei einem behandlungsbefürchtigen Multiplen Myelom vorliegenden Komplikationen wie z.B. Osteolysen charakterisiert ist. Das Vorliegen von somatischen Hypermutationen in den Genabschnitten Ig variablen Region der Plasmazellen bei Patienten mit MGUS und MM legt nahe, dass die maligne Transformation in einer B-Zelle aufgetreten ist, die die Differenzierungsschritte in einem Keimzentrum durchlaufen hat (Kuehl *et al.*, 2002, Bergsagel *et al.*, 2001, Barlogie *et al.*, 1989, Hallek *et al.*, 1998, MacLennan *et al.*, 1991). Danach wandern die MM-Zellen exklusiv in das Knochenmarkmilieu, das sie zum Überleben und zur Expansion benötigen. Erst im weiteren Verlauf der Erkrankung ist die Wahrscheinlichkeit für einen extramedullären Befall höher. Zu diesem Zeitpunkt ist dann eine Etablierung von MM Zelllinien möglich (Okuno *et al.*, 1991, Durie *et al.*, 1985). Sowohl bei Krankheitsbeginn als auch später können Zellen mit MM-Klon-typischen Rearrangements im peripheren Blut der MM Patienten auftreten und nachgewiesen werden (Bast *et al.*, 1982, Berenson *et al.*, 1987, Mellstedt *et al.*, 1982, Pilarski *et al.*, 2001, Pilarski *et al.*, 1985, Ruiz-Arguelles *et al.*, 1984, Berenson *et al.* 1989, Corradini *et al.*, 1993, Billadeau *et al.*, 1993, Chen *et al.*, 1972) und so zu einer Dissemination der Erkrankung führen. Bei MGUS ist eine intraklonale Variation viel häufiger zu beobachten (Zandecki *et al.*, 1997) als bei etabliertem MM, bei dem diese typischerweise nicht auftritt (Billadeau *et al.*, 1993, Chen *et al.*, 1996, Bakkus *et al.*, 1992, Vescio *et al.*, 1995).

Mittels FISH (Fluoreszenz in situ Hybridisierung) (Zandecki *et al.*, 1996, Taberero *et al.*, 1996) und molekulargenetischen Untersuchungen konnten fünf primäre immer wiederkehrende chromosomale Rearrangements identifiziert werden, die die IgH Translokationen mit einschließen: 11q13, Cyclin D1 (Janssen *et al.*, 2000, Robillard *et al.*, 2003, Avet-Loiseau *et al.*, 2003); 4p16.3, Fibroblasten Wachstumsfaktor (FGF)-R3 und MM SET (Chesi *et al.*, 1998, Richelda *et al.*, 1997, Intini *et al.*, 2001, Chesi *et al.*, 2001); 6p21, Cyclin D3 (Shaughnessy *et al.*, 2001); 16q23, c-MAF (Chesi *et al.*, 1998), 20q11, MAF-B

(Hanamura *et al.*, 2001). Diese machen nahezu 40 Prozent aller genetischer Abnormalitäten bei MM Patienten aus, vor allem bei solchen mit nicht-hyperdiploiden Zytogenetikbefunden (Fonseca *et al.*, 2002). Diese Translokationen resultieren aus Fehlern in der IgH Rekombination im Verlauf der B-Zell Entwicklung in den Keimzentren und wurden sogar im Stadium der monoklonalen Gammopathie zusammen mit RB-1 Deletionen nachgewiesen (Dao *et al.*, 1994, Avet-Loiseau *et al.*, 1999, Drach *et al.*, 1995, Zandecki *et al.*, 1995, Rasillo *et al.*, 2003). Komplexe unbalancierte Translokationen (c-myc) oder Insertionen, die oftmals multiple Chromosomen einbeziehen, stellen sekundäre genetische Veränderungen dar (Greil *et al.*, 1991, Ernst *et al.*, 1988, Sawyer *et al.*, 2001, Shou *et al.*, 2000, Avet-Loiseau *et al.*, 2001). Mutationen von ras (Ernst *et al.*, 1988, Neri *et al.*, 1989, Corradini *et al.*, 1993) oder p53 (Neri *et al.*, 1993, Drach *et al.*, 1998, Schultheis *et al.*, 1999, Mazars *et al.*, 1992, Corradini *et al.*, 1994, Preudhomme *et al.*, 1992, Ackermann *et al.*, 1998, Teoh *et al.*, 1997) entwickeln sich in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung. Obwohl der Chromosomensatz von MM Zellen gemäß den Daten aus DNA durchflußzytometrischen (Latreille *et al.*, 1980) und FISH Analysen (Zandecki *et al.*, 1996) fast immer aneuploid ist, findet sich bei noch unbehandelten Patienten passend zur hypoproliferativen Natur des MM und der Abhängigkeit vom Knochenmarkstroma ein hoher Anteil (65-70%) an normalen diploiden Metaphasenkaryotypen (Latreille *et al.*, 1982, Caligaris-Cappio *et al.*, 1991, Sawyer *et al.*, 1995). Das verbleibende Drittel der noch therapienaiven MM Patienten hat oftmals komplexe zytogenetische Abweichungen, die durchschnittlich elf verschiedene Chromosomen umfassen. Die Bestimmung der in vitro mitotischen Kapazität der MM-Zellen in Abwesenheit des normalerweise vorliegenden Knochenmarkmilieus, bei der man zunächst davon ausging, dass sie einen wesentlichen Mangel der konventionellen Zytogenetik darstelle, definiert eine MM-Entität, die stromaunabhängig proliferieren kann und somit auf eine sehr schlechte Prognose hindeutet (Shaughnessy *et al.*, 2003).

Einen überaus wichtigen Fortschritt auf dem Gebiet der MM-Genetik stellte die Anwendung der Methode der Genexpressionsprofilierung (gene expression profiling) anhand von hochreinen aufbereiteten CD138+ Plasmazellen dar (Zhan *et al.*, 2002, Claudio *et al.*, 2002, Magrangeas *et al.*, 2003, Zhan *et al.*, 2003). Auf diese Weise konnten Plasmazellen aus dem Knochenmark und normale Plasmazellen, nicht aber monoklonale Gammopathie MM-Zellen gut voneinander unterschieden werden (Davies *et al.*, 2003). Genexpressionslevel wurden mit der Addition, Deletion und Translokation von genetischem Material assoziiert, wodurch z.B. Cyclin D3 als neue Translokation definiert werden konnte. In Voruntersuchungen an 200 MM Patienten, die eine Tandem-Hochdosis-Chemotherapie bekommen hatten, konnte mittels Geneexpressionsprofilen Gene identifiziert werden, die einen höheren prognostischen

Stellenwert besaßen als die Standardprognoseparameter einschließlich der Zytogenetik. Die Methode der Genprofilierung wurde auch auf Knochenmarkbiospien angewandt, die das gesamte Knochenmark beinhalten. Nach zusätzlicher Analyse der dazugehörigen gereinigten CD138+ MM-Zellen, zeigte sich, dass die Signatur des Mikromilieus in Abhängigkeit vom gefundenen Genprofil der MM-Zellen unterschiedlich verändert war (Shaughnessy, Rasmussen *et al.*, 2003, Shaughnessy, Tian *et al.*, 2003).

Für die Erforschung der Biologie des MM sind die Entdeckung des Interleukin (IL)-6 als Myelomwachstums- und Überlebensfaktor (Kawano *et al.*, 1988, Suematsu *et al.*, 1992) und die Erkenntnis der Stromazellabhängigkeit von herausragender Bedeutung (Grigorieva *et al.*, 1998). So besteht eine für die MM-Zellen essentielle durch Zelladhäsion vermittelte Wechselbeziehung (cross-talk) zwischen den malignen Plasmazellen, die mit Rezeptoren für eine Vielzahl von wachstumsfördernden Zytokinen und Chemokinen, v.a. IL-6, IL-15, Insulin-like Wachstumsfaktor (insulin-like growth factor, IGF-1) und Hepatozytenwachstumsfaktor (hepatocyte growth factor, HGF) ausgestattet sind und verschiedenen Kompartimenten der Umgebung (Tinhofer *et al.*, 2000, Xu *et al.*, 1997, Borset *et al.*, 1996, Tricot *et al.*, 2000). Ein Kennzeichen für das Erreichen des Stadiums einer Plasmazelle in der B-Zelldifferenzierung, das CD138 Antigen (Syndecan-1), wird in die Umgebung abgegeben und in der extrazellulären Matrix reichlich abgelagert, wo es wachstumsfördernde und proangiogenetische Zytokine abfangen kann und so zur Progression und Invasion des MM beitragen kann. Tatsächlich sind die löslichen Syndecan-1 Levels von prognostischer Bedeutung. Wachstums- und Überlebenssignale werden via PI3/AKT, STAT 3 und RAS/MAPK sowie NF-κB (nuclear factor-κB) Signalwege vermittelt. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass die Interaktion der MM-Zelle mit dem Knochenmarkmikromilieu wichtige Aufschlüsse für das Verständnis der Krankheitsprogression oder der Chemotherapieresistenz ermöglicht aber auch neue Wege für innovative Therapieoptionen eröffnet (Dhodapkar *et al.*, 1998, Aref *et al.*, 2003, Seidel *et al.*, 2000, Feinmann *et al.*, 1999, Mitsiades *et al.*, 2002, Ge *et al.*, 2000, Hideshima *et al.*, 2001, Pene *et al.*, 2002, Damiano *et al.*, 1999).

Osteolytische Knochenläsionen stellen ein wesentliches Kennzeichen der fortgeschrittenen MM-Erkrankung dar und liegen bei 70-80% der Patienten vor. Die Läsionen resultieren aus einer Imbalance in Anzahl als auch Funktion von Osteoklasten und Osteoblasten. Der zugrunde liegende Mechanismus umfasst eine Osteoklastenaktivierung durch die Rezeptoraktivierung durch den NF-κB Liganden (RANKL), das Makrophagen-inflammatorische Protein (MIP)-1α/β Chemokin sowie die IL-3 Achse. Die Expression von RANKL auf Stromazellen ist nach Kontakt mit MM-Zellen drastisch erhöht, wohingegen

dessen Decoy-Rezeptor (decoy, engl. Falle) Osteoprotegerin (OPG) supprimiert und zusätzlich durch Syndecan-1 vermittelte Internalisierung in MM-Zellen inaktiviert ist. MIP-1 α , das von MM-Zellen gebildet wird, fördert direkt die Reifung von Vorläuferzellen zu Osteoklasten, die zudem durch eine MIP-1 α induzierte RANKL Expression durch Stromazellen aktiviert werden, was in eine verstärkte Knochenresorption mündet. DKK1 und FRZB, die von MM- Zellen exprimiert und auch sezerniert werden, interferieren mit dem WNT- Singaltransduktionsweg und inhibieren auf diesem Weg die Osteoblastenreifung und aggravieren somit die Knochendestruktion (Bataille *et al.*, 1989, Tian *et al.*, 2003). Einige dieser Signalwege können durch den Einsatz von Decoy-Rezeptoren für RANKL (OPG und RANK-Fc) zielgerichtet beeinflusst werden. Im SCID-hu Mausmodell ist die Verabreichung dieser Moleküle mit der Prävention der osteolytischen Knochenkrankung und der Inhibition des MM- Zellproliferation assoziiert. Es lässt sich somit zusammenfassen, dass eine ausgeprägte Wechselbeziehung von MM-Zellen und Osteoklasten besteht, wobei die MM-Zellen die Bildung von Osteoklasten unterstützen und andererseits deren Aktivität wiederum das Überleben und Wachstum der malignen Plasmazellen befördert (Pearse *et al.*, 2001, Body *et al.*, 2003).

Ein therapeutisch relevanter Aspekt der Biologie des MM ist die Resistenz der MM-Zellen gegen Apoptose, die angesichts der hypoproliferativen Natur des MM ein wichtiger Mechanismus ist, der zur steigenden Tumorlast führt. Bcl-2, Bcl-x_L und vor allem mcl-1 werden sowohl in MM- Zelllinien als auch in klinischen Isolaten exprimiert und funktionieren durch den intrinsischen Signalweg über die Freisetzung von mitochondrialen Bestandteilen (Cytochrom C, SMAC), die die Caspase 9 aktivieren und so zur Apoptose führen können. Der extrinsische Apoptose induzierende Signalweg umfasst die TNF-Rezeptor Familie (tumor necrosis factor) und deren Liganden TNF, Fas Ligand und TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand). Die Todesrezeptoren 4 und 5, die sowohl auf MM-Zelllinien als auch auf primären MM-Zellen exprimiert sind, könne durch den Ligand TRAIL aktiviert werden. Dieser Vorgang kann durch die Expression von TRAIL Decoy-Rezeptoren wie OPG geblockt werden. Die Sequestrierung von OPG durch lösliches Syndecan-1 kann auch MM-Zellen vor der TRAIL-Aktivierung schützen. Ein in diesem Zusammenhang wichtiges Prinzip ist, dass die relativen Levels von pro- und antiapoptotischen Molekülen, die in der Zelle autonom oder aber im Kontext der Interaktion MM-Zelle-Knochenmarkmikromilieu funktionieren, die Wirkung potentiell letaler Signale bestimmen. Die Effektivität der Therapie ist durch Charakteristika der Tumorgenetik, der sogenannten Zelladhäsion-medierten Wirkstoffresistenz (cell adhesion-mediated drug resistance, CAM-DR) und durch epigenetische Veränderungen bestimmt, was therapeutisch ausgenutzt werden

kann (Feinmann *et al.*, 1999, Hamilton *et al.*, 1991, Petterson *et al.*, 1992, Fenton *et al.*, 2003).

Hinsichtlich der Oberflächenexpression von Antigenen auf normalen und malignen Plasmazellen liefert die aktuelle Literatur unterschiedliche Angaben v.a. bezüglich der Expression von CD19, CD20, CD56, CD28 oder Mucin 1 (Anderson *et al.*, 1983, Berenson *et al.*, 1998, Robillard *et al.*, 1998, Brossart *et al.*, 2001, Treon *et al.*, 1999). Demzufolge erscheint es schwierig, normalen oder malignen Plasmazellen einen bestimmten Phänotyp zuzuschreiben, so dass die Entwicklung von Immuntherapien für das MM hierdurch beeinträchtigt wird. Wie oben bereits erwähnt, werden während der Differenzierung bei B-Lymphozyten charakteristische Veränderungen in der Oberflächenexpression von Antigenen beobachtet. Plasmazellen existieren in mindestens zwei verschiedenen Subpopulationen, zum einen als frühe lymphoplasmozytoide Plasmazelle und zum anderen als reife Plasmazelle (Terstappen *et al.*, 1990). Diese beiden Populationen erscheinen phänotypisch unterschiedlich, exprimieren jedoch beide stark CD38 und CD138. Im Gegensatz zu reifen PZ, exprimieren lymphoplasmozytoide PZ CD22, CD35 und IgE Rezeptoren auf der Oberfläche. Subpopulationen von reifen normalen PZ hingegen zeigen einen sehr heterogenen Phänotyp. Sie können frühe B-Zellantigene (CD19, CD20, CD10), myeloide Antigene (CD13, CD33), HLA-DR (D-related human leukocyte antigen), sehr verbreitete hämatopoetische Antigene (CD45) oder Adhäsionsmoleküle (CD11b, CD11c) exprimieren (Moscinski *et al.*, 1994).

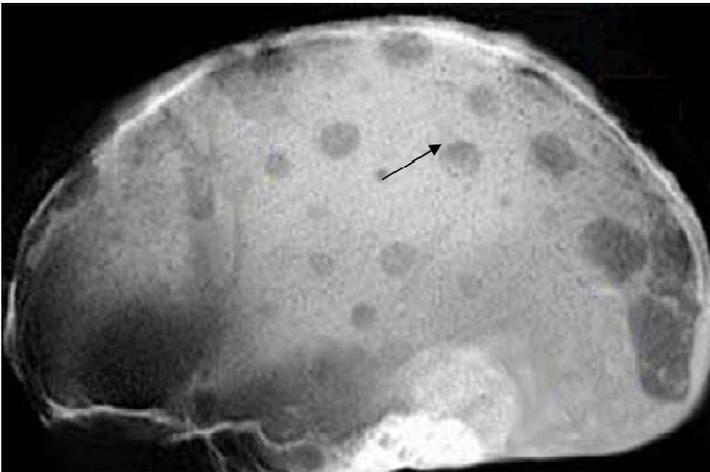
In den vergangenen Jahren wurden zusätzlich zu diesen typischen PZ-Markern einige Antikörper, die als spezifisch für PZ-Antigene unklarer Funktion gelten, beschrieben. Hierzu zählen PCA-1 und PCA-2 (Anderson *et al.*, 1983), PC-1 (Anderson *et al.*, 1984), R1-3 (Gonchoroff *et al.*, 1986), 8A, 62B1, 8F6 (Tazzari *et al.*, 1987), MM4 (Tong *et al.*, 1987), MPC-1 (Huang *et al.*, 1993) oder HM1.24 (Ozaki *et al.*, 1998, 1997, 1999, Ohtomo *et al.*, 1999, Rew *et al.*, 2005, Jalili *et al.*, 2005, Goto *et al.*, 1994, Chiriva-Internati *et al.*, 2003). Es zeigte sich jedoch, dass keiner dieser Antikörper spezifisch für Plasmazellen war und oftmals zytoplasmatische Antigene erkannt wurden.

Maligne PZ zeigen eine ähnliche Heterogenität in ihrem Immunphänotyp wie ihre gesunden Pendanten in Bezug auf die verschiedenen Entwicklungsstadien. Trotz der großen Übereinstimmung der Antigenexpression von gesunden und malignen PZ, gibt es auch Unterschiede. So ist z.B. CD56 auf manchen MM-Zellen stark exprimiert, während es auf normalen PZ nicht vorkommt.

1.1.4 Klinische Charakteristika

Patienten mit Multiplem Myelom besitzen Plasmazellen mit abnormalen morphologischen und zytogenetischen Charakteristika, die im Knochenmark proliferieren. Histologisch bestehen Hinweise auf abnormale Knochenumbauprozesse (bone remodelling) (Bataille *et al.*, 1997). Die häufigsten klinischen Symptome beim MM lassen sich auf eine progrediente Akkumulation von MM-Zellen im Knochenmark mit nachfolgender Interaktion von MM-Zellen und dem Knochenmarkmikromilieu zurückführen, wobei hierbei der Zell-Zell-Kontakt, Adhäsionsmoleküle und Zytokine eine Rolle spielen. Dies führt zu einer Störung der normalen Knochenmarkfunktion mit Anämie, Leukopenie und Thrombopenie mit der entsprechenden Symptomatik von Müdigkeit, verringerter Leistungsfähigkeit und Dyspnoe, Infektanfälligkeit und Blutungsneigung. Zusätzlich kommt es zu einer Knochendestruktion in Form einer diffusen Osteoporose bzw. einer lokalisierten Schädigung des Knochens in Form von lytischen Knochenläsionen (Osteolysen), die Schmerzen verursachen (Durie *et al.*, 2001). Bei den meisten Patienten kann man multiple Osteolysen an den Stellen des Skeletts finden, an denen auch Nester von MM-Zellen zu finden sind. Diese ausgestanzten Läsionen („punch out lesions“) können radiologisch nachgewiesen werden (Abb.1 a und b) (Tricot *et al.*, 2000).

a



b



Abbildung 1 Typische Osteolysen, die durch ein Multiples Myelom hervorgerufen wurden

a) Die Röntgenaufnahme des Schädels zeigt das typische Bild eines sogenannten "Schrotschussschädels".

b) Schädelkalotte eines Patienten nach Obduktion mit multiplen Osteolysen

Die Schmerzen, die bei MM-Patienten auftreten, liegen oftmals in vertebrealen Kompressionsfrakturen begründet, die an Stellen auftreten, die infolge von Osteopenie oder aber typischerweise aufgrund lytischer Osteoläsionen auftreten und sowohl auf eine exzessive

Osteoklastenaktivität (Cozzolino *et al.*, 1989, Garrett *et al.*, 1987) als auch auf eine Inhibition der kompensatorischen osteoblastischen Funktion zurückzuführen sind (Bataille *et al.*, 1989). Lokalisierte Schmerzen können zudem durch ein regionales Tumorwachstum mit Kompression des Rückenmarks und spinaler Kompression hervorgerufen werden. Auch infolge von Amyloidablagerungen kann es bei den betroffenen Patienten an verschiedenen Stellen zu Schmerzen kommen, wie z.B. bei einem amyloid-assoziierten Karpaltunnelsyndrom.

Eine Anämie in unterschiedlicher Ausprägung betrifft mehr als zwei Drittel aller Patienten mit MM. Als Mechanismus hierfür spielt die Überexpression von Fas Ligand, MIP-1 α und TRAIL durch die MM-Zellen und die hierdurch getriggerten Todessignale in unreifen Erythroblasten eine Rolle. Die meisten Patienten reagieren für den Grad der bei ihnen vorliegenden Anämie unzureichend auf die Gabe von Erythropoetin (EPO). Das ungenügende Ansprechen auf EPO-Gaben kann möglicherweise auf die in hohem Maße produzierten Zytokine wie IL-1 und TNF- β aber auch auf eine erhöhte Serumviskosität zurückgeführt werden. Zusätzlich wird auch eine Überexpression von IL-6 durch Knochenmarkstromazellen, normalen akzessorischen Zellen und Tumorzellen zur Anämie der MM-Patienten beitragen. Auf das hohe Level an IL-6 und dessen thrombopoetische Teilwirkung ist wahrscheinlich im Gegenzug zurückzuführen, dass viele MM-Patienten keine signifikante manifeste Thrombozytopenie haben, wenn nicht zusätzliche andere Faktoren diese begünstigen (Silvestris *et al.*, 2002).

Im Rahmen einer Erkrankung mit dem MM entsteht eine Beeinträchtigung der renalen Funktion am häufigsten nach Erschöpfung der tubulären Resorptionskapazität durch eine Ablagerung von Leichtketten, was zu einer interstitiellen Nephritis führt. Durch eine Hyperkalzämie und Hyperkalzurie kann es zudem zu Volumenverlust, prärenalen Azotämie sowie Kalziumablagerungen in den renalen Tubuli kommen, was ebenso in eine interstitielle Nephritis münden kann. Eine Leichtkettenproteinurie kann zudem mit einer AL-Amyloidose assoziiert sein, die sich zunächst typischerweise als nephrotisches Syndrom manifestiert, später allerdings auch in eine Niereninsuffizienz übergehen kann. Die AL-Amyloidose ist am weitesten verbreitet bei Patienten mit λ Leichtketten-MM und da vor allem bei denjenigen, die λ Leichtkettenproteine haben, die Ig variable Regionen enthalten, die zur λ VI Leichtkettengruppe gehören. Die sogenannte Ig-LCDD (light-heavy chain deposit disease), eine Erkrankung, die vor allem mit κ Leichtketten-MM assoziiert ist, wird sehr wahrscheinlich in ihrer Häufigkeit deutlich unterschätzt, was auch auf die nur sehr schwach detektierbaren Proteinlevel zurückzuführen ist. Nichtsdestotrotz führt diese auch zu einer Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Eine Tumordinfiltration der Nieren bei

MM-Patienten ist ungewöhnlich, ist allerdings bei vergrößerten Nieren auch in Betracht zu ziehen. Viel häufiger ist in diesem Falle aber das Vorliegen einer AL-Amyloidablagerung als Ursache der Vergrößerung zu sehen. Studien anhand von IL-6 transgenen Mäusen zeigen, dass konstitutiv hohe Level an IL-6 in der Leber zu Dysproteinämie und zu einer protrahierten Akut-Phase-Reaktion führen kann, was der renalen Pathologie wie bei MM-Patienten vergleichbar ist. In der Ätiologie der Nephropathie bei MM spielt zudem der unbedachte Einsatz von Medikamenten und von Kontrastmittel eine nicht unerhebliche Rolle. In diesem Zusammenhang sind nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAR) und Bisphosphonate zu nennen, die zum einen im Falle der NSAR häufig vor Diagnosestellung über längere Zeit in hohem Maße zur Schmerzlinderung eingesetzt werden und zum anderen wie bei den Bisphosphonaten nach erfolgter Diagnose des öfteren zu schnell appliziert werden (für Pamidronat weniger als 2 Stunden und für Zoledronat weniger als 30 min) (Solomon *et al.*, 1991, Alexanian *et al.* 1990).

Bei MM sind insbesondere Mängel in der zellulären Immunantwort für die wiederkehrenden Infektionen verantwortlich. Der dieser Beeinträchtigung zugrunde liegende Mechanismus ist bis dato nicht klar, obzwar diese sicherlich durch die Expression von Tumor-Nekrose-Faktor β (TNF- β) und Fas Ligand durch die MM-Zelle mit erklärt werden kann. Bekannt ist zudem, dass bei MM-Patienten eine eingeschränkte humorale Immunantwort besteht und niedrige Spiegel an polyklonalen Serumimmunglobulinen vorliegen. Aus diesem Grunde sind MM-Patienten für bakterielle Infektionen wie z.B. durch *Streptococcus pneumoniae*, suszeptibel, die normalerweise durch Antikörper opsoniert werden können (Ullrich *et al.*, 1982, Jacobson *et al.*, 1986, Broder *et al.*, 1975).

Fokale neurologische Defizite werden i.a. durch ein regionales Tumorwachstum verursacht, das Rückenmark- oder Hirnnervenfunktionen beeinträchtigt. Polyneuropathien werden im Rahmen von perineuronaler, perivaskulärer (Vasa vasorum) Amyloidablagerungen oder als Teil eines POEMS Syndroms beobachtet (*polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, monoclonal gammopathy, skin changes*). Die humoralen und zellulären Mechanismen, die dieses Syndrom medieren, sind nicht geklärt (Waldenstrom *et al.*, 1978).

Hyperviskosität tritt bei weniger als 10% der MM-Patienten auf. Bei der Waldenström Makroglobulinämie ist diese deutlich höher, aufgrund der zehnfach höheren Inzidenz des MM wird man allerdings trotzdem mehr Patienten mit Hyperviskosität bei MM in der klinischen Praxis sehen. Aufgrund der eingeschränkten Rheologie ergeben sich zerebrale, pulmonale, renale und andere Organdysfunktionen. Hyperviskosität ist oftmals mit Blutungen assoziiert. Obwohl eine generelle Korrelation zwischen dem Auftreten klinischer Symptome und der relativen Serumviskosität besteht, ist das Verhältnis zwischen den Serumimmunglobulin-

spiegeln und den Symptomen bei den Patienten nicht konsistent. Diese Beobachtung ist wahrscheinlich mit den unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften der verschiedenen Ig-Molekülklassen und -subklassen zu erklären. So neigen IgA-Moleküle dazu, Polymere zu bilden, was dazu führt, dass Patienten mit IgA-MM deutlich häufiger hypervisköses Serum aufweisen und auch in fast 25% klinische Zeichen von Hyperviskosität aufweisen. Unter den Patienten mit IgG-MM haben diejenigen mit der IgG3 Subklasse das höchste Risiko, ein Hyperviskositätssyndrom zu entwickeln (Pruzanski *et al.*, 1972, Somer *et al.*, 1975).

Blutungen werden bei IgG MM-Patienten in 15%, bei IgA MM-Patienten in 30% berichtet. In der Literatur werden als ursächlich hierfür Anoxie und Thrombosen in den kapillären Bereichen des Gefäßsystems, perivaskuläre Amyloidablagerungen und/oder erworbenen Koagulopathien wie Faktor X Defizienz genannt. Eine Thrombozytopenie spielt im Gegensatz dazu in der ersten Phase der MM-Erkrankung sogar bei hochgradiger Knochenmarkinfiltration durch MM-Zellen keine große Rolle. Therapieassoziierte thrombembolische Ereignisse treten in Zusammenhang mit dem Einsatz von neueren Substanzen bei Thalidomid und in geringerem Maße bei Lenalidomid vor allem in Kombination mit Doxorubicin und Dexamethason auf. Die Anzahl dieser unerwünschten Ereignisse lässt sich durch den Einsatz niedermolekularen Heparins deutlich senken, was insbesondere in der ersten Phase der Therapie bei noch großer Tumorlast wichtig ist (Perkins *et al.*, 1970, Zangari *et al.*, 2002).

Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose ist das Vorliegen einer Plasmazelleukämie ($>2000/\mu\text{l}$) mit weniger als 1% der Fälle sehr selten. Mit fortgeschrittenem Erkrankungsverlauf allerdings wird diese in bis zu 5% der MM-Patienten beobachtet. Durchflußzytometrisch können jedoch bei den meisten MM-Patienten geringe Mengen an zirkulierenden Plasmazellen gemessen werden (Garcia *et al.*, 1999). Auch die Häufigkeit anderer extramedullärer Manifestationen nimmt mit der Dauer der Krankheitskontrolle durch die Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation und neuere Therapeutika wie Bortezomib zu. Bei unauffälligem Knochenmarkbefund und gleichzeitig ansteigendem Wert der Serumlaktatdehydrogenase (Serum-LDH) ist eine extramedulläre MM-Manifestation in der Leber, Milz, Brust, Pleura, in Lymphknoten, Nieren, Meningen oder an der Haut zu vermuten und ein Diagnostik mittels Sonografie, CT oder MRT, PET und ggf. Biopsie einzuleiten. Eine extramedulläre Erkrankung ist nahezu immer mit Zeichen der Dedifferenzierung der MM-Zellen assoziiert, wie komplexe zytogenetische Aberrationen, hoher Plasmazell-Labeling Index und einer immunoblastischen Morphologie der MM-Zellen.

Tabelle 1 Häufigkeit der Symptome bei Multiplem Myelom

Symptome und Laborwerte	Häufigkeit (%)
M- Gradient in der Immunfixation des Serums oder des Urins	97
Plasmazellen im Knochenmark >10%	90
M- Gradient in der Standardelektrophorese	80
M- Protein im Urin	75
Knochenschmerzen (Wirbelsäule, Thorax, weniger häufig der langen Röhrenknochen)	65
Anämie	65
Schwäche und Fatigue	50
IgG	50
Niereninsuffizienz	20
Hyperkalzämie	20
IgA	20
nur Leichtketten	20

1.1.5 Diagnosekriterien für das Multiple Myelom

Die Diagnose des MM gilt als gesichert, wenn alle drei folgenden Kriterien vorliegen (International Myeloma Working Group, 2003):

1. >10% Plasmazellen im Knochenmark (Aspirationszytologie) und/oder Nachweis eines Plasmozytoms (Histobiopsie). Bei asekretorischer Erkrankung sind >30% Plasmazellen im Knochenmark gefordert
2. im Serum und/oder im Urin nachweisbares monoklonales Protein (Immunfixationselektrophorese)
3. Vorliegen einer/von:
 - Hyperkalzämie und/oder
 - Niereninsuffizienz (Kreatininwert >173 mmol/l oder >2mg/dl) und/oder
 - Anämie (Hb-Wert <10g/dl oder 2g/dl unter Norm) und/oder
 - Knochenläsionen (bei solitärer Osteolyse sind >30% Plasmazellen im Knochenmark gefordert, bei Osteoporose ist der Nachweis von Wirbelkörperfrakturen gefordert)

Die „International Myeloma Working Group“ hat zudem Kriterien publiziert, die eine symptomatische und somit auch behandlungsbedürftige Erkrankung beschreiben. Diese wurden im Akronym CRAB (*calcium- induced, renal insufficiency, anemia* oder *bone lesions*) zusammengefasst:

Kalzium- induziert:	Serumkalium $>0,25$ mmol/l über der oberen Normgrenze oder $>2,75$ mmol/l
Niereninsuffizienz:	Kreatinin > 173 mmol/l
Anämie:	Hb 2 g/dl unter der unteren Normgrenze oder <10 g/dl
Knochen:	Osteolysen oder Osteoporose mit Kompressionsfrakturen (MRT oder CT Befunde)
Andere:	symptomatische Hyperviskosität, Amyloidose, wiederholte bakterielle Infektionen (>2 Episoden innerhalb von 12 Monaten)

1.1.6 Stadieneinteilung

Sobald die Diagnose eines MM gestellt wurde, sollte die Erfassung des Stadiums erfolgen. Studien zur Messung der *in vitro* Produktion von Ig durch MM-Zellen haben zu einer klinisch anwendbaren Methode geführt, die die Tumorzellmasse abzuschätzen vermag. Dieses Stagingssystem, das hauptsächlich auf Standardbestimmungen im Labor beruht, wurde von Salmon und Durie entwickelt (Tabelle 2) und über 30 Jahre angewandt. Unter anderem aufgrund des Interpretationsspielraumes von lytischen Knochenläsionen wurde ein neues Stagingssystem entwickelt, das auf besser messbaren objektiven Parametern beruht. Dieses Internationale Staging System (ISS) basiert auf den weltweit erhobenen Daten von 11.000 Patienten. Anhand von nur zwei einfach bestimmbar Parametern, dem $\beta 2M$ und dem Albumin, kann eine Stratifizierung der Patienten vorgenommen werden (Tabelle 3).

Tabelle 2 Stadieneinteilung nach Salmon und Durie

Stadium	Kriterien	Myelomzellen ($\times 10^{12}/m^2$ KO)
I	<u>alle folgenden Kriterien:</u> Hämoglobin > 10 g/dl Serumkalzium normal Skelettsystem röntgenologisch normal oder nur solitärer Herd IgG < 5 g/dl bzw. IgA < 3 g/dl Bence-Jones-Proteinurie < 4 g/24 h	< 0,6
II	<u>weder I noch III</u>	0,6-1,2
III	<u>mindestens eines der folgenden Kriterien:</u> Hämoglobin < 8,5 g/dl Serumkalzium erhöht Multiple Osteolysen oder generalisierte strähnige Osteoporose IgG > 7 g/dl bzw. IgA > 5 g/dl Bence-Jones-Proteinurie > 12 g/24 h	> 1,2

Tabelle 3 Stadieneinteilung International Staging System (ISS)

Stadium	Prozent an gesamten Patienten	Parameter	Medianes Überleben bei therapienaiven MM- Pat.
I	28%	$\beta 2M < 3,5$ $ALB \geq 3,5$	62
II	39%	$\beta 2M < 3,5$ $ALB < 3,5$ oder $\beta 2M 3,5 - 5,5$	44
III	33%	$\beta 2M > 5,5$	29

1.1.7 Therapie

In der Geschichte des MM wurden u.a. Rhabarberpillen und Infusionen mit Orangenschalenextrakten eingesetzt. 1947 berichtete Alwall, dass der Einsatz von Urethan zu einer Reduktion des Serumglobins, einem Anstieg des Hämoglobins, einer Normalisierung der Proteinurie und dem Abfall des Plasmazellgehaltes im Knochenmark eines MM-Patienten führte. Urethan wurde infolge dieses Erfolges zur Standardtherapie für die darauffolgenden 15 Jahre. 1966 randomisierten Holland *et al.* 83 Patienten unabhängig von der Anzahl der Vortherapien in die Arme Urethan vs. Plazebo bestehend aus Kirschen und Sirup mit Colageschmack. In dieser Studie konnte kein Unterschied im Ansprechen oder Überleben gesehen werden. Blokhin *et al.* berichteten 1958 vom Ansprechen bei 3 von 6 Patienten, die Sarcolysin (Melphalan) bei MM erhalten hatten. Bergsagel *et al.* konnte dies 1962 mit einer signifikanten Ansprechrate bei 8 von 24 Patienten bestätigen (Robert *et al.*, 2008).

Grundsätzlich ist mit der symptomatischen Therapie spezifischer Komplikationen auch möglichst auch eine systemische Chemotherapie einzuleiten, die die Tumorlast des Patienten reduziert. Hierbei stellen die autologe Stammzelltransplantation, und in zunehmendem Maße die Therapie mit neueren Medikamenten, den sogenannten „new drugs“ wie Thalidomid mit den immunmodulatorischen Medikamenten (IMiD) als dessen Derivate und Lenalidomid als deren Vertreter, Bortezomib oder in bestimmten Fällen v.a. im Rahmen von Studien die allogene Stammzelltransplantation die wichtigsten Behandlungsmaßnahmen dar (siehe Abbildung 2). Die Strahlentherapie eignet sich zur lokalen Tumorkontrolle und Schmerzbehandlung. Zur supportiven Behandlung stehen z.B. Bisphosphonate, Opioide und Steroide zur Verfügung. Bluttransfusionen oder die Substitution mit Erythropoetin sowie die Applikation von Immunglobulinen werden bei Anämie oder zur Therapie und Prophylaxe bei Patienten mit symptomatischem sekundärem Antikörpermangelsyndrom eingesetzt. In klinischen Studien werden neue Substanzen auf deren therapeutischen Nutzen überprüft, wobei der Proteaseinhibitor Bortezomib und das Thalidomidderivat Lenalidomid auch bei bereits vielfach vorbehandelten Patienten beträchtliche Wirksamkeit haben. Bei pathologischen Frakturen langer Röhrenknochen empfiehlt sich eine chirurgische Intervention, bei Wirbelkörperimpressionen kann eine Kypho- bzw. Vertebroplastie schmerzlindernd und stabilisierend sein.

Seit der Einführung des Kombinationsschemas Mephalan und Prednisolon (MP) durch Alexanian (Alexanian-Schema) in den 1960er Jahren war dieses über Jahrzehnte die Standardchemotherapie bei MM. Die MP-Kombination ist in der Lage, bei 40-60% der unbehandelten MM-Patienten eine Remission zu induzieren. Die mediane Dauer der

Remission für diese Patienten ist 2 Jahre und das mediane Überleben 3 Jahre. Mit weniger als 10% kompletten Remissionen (CR) und dem unvermeidlichen Wiederauftreten der Erkrankung wird deutlich, dass eine inhärente Medikamentenresistenz die Hauptursache für das Fehlen von Langzeitremissionen oder gar Heilung ist. Im Verlauf der letzten Jahrzehnte wurden viele Chemotherapieprotokolle mit MP verglichen. Die Oxford Myeloma Trialists' Group führte eine Metaanalyse von 27 für Kombinationschemotherapie (CCT) versus MP randomisierten klinischen Studien an insgesamt über 6000 Patienten durch. Es ergab sich zwar eine signifikant höhere Remissionsrate für die CCT (60,0 vs. 53,4%), jedoch keinen Überlebensvorteil (siehe Tabelle 4). Für die häufig eingesetzte Kombinationschemotherapie VAD liegt kein prospektiver Vergleich mit MP vor; ein prospektiver unizentrischer Vergleich VAD vs. Dexamethason- Monotherapie ergab ein um 15% erhöhtes Ansprechen für VAD, jedoch keine Erhöhung der Remissions- oder Überlebensrate (Alexanian *et al.*, 1992). Auch mit VBAMDex konnte keine Verbesserung erreicht werden (Peest *et al.*, 1995).

Abbildung 2 Zeittafel der Therapieentwicklungen beim Multiplen Myelom

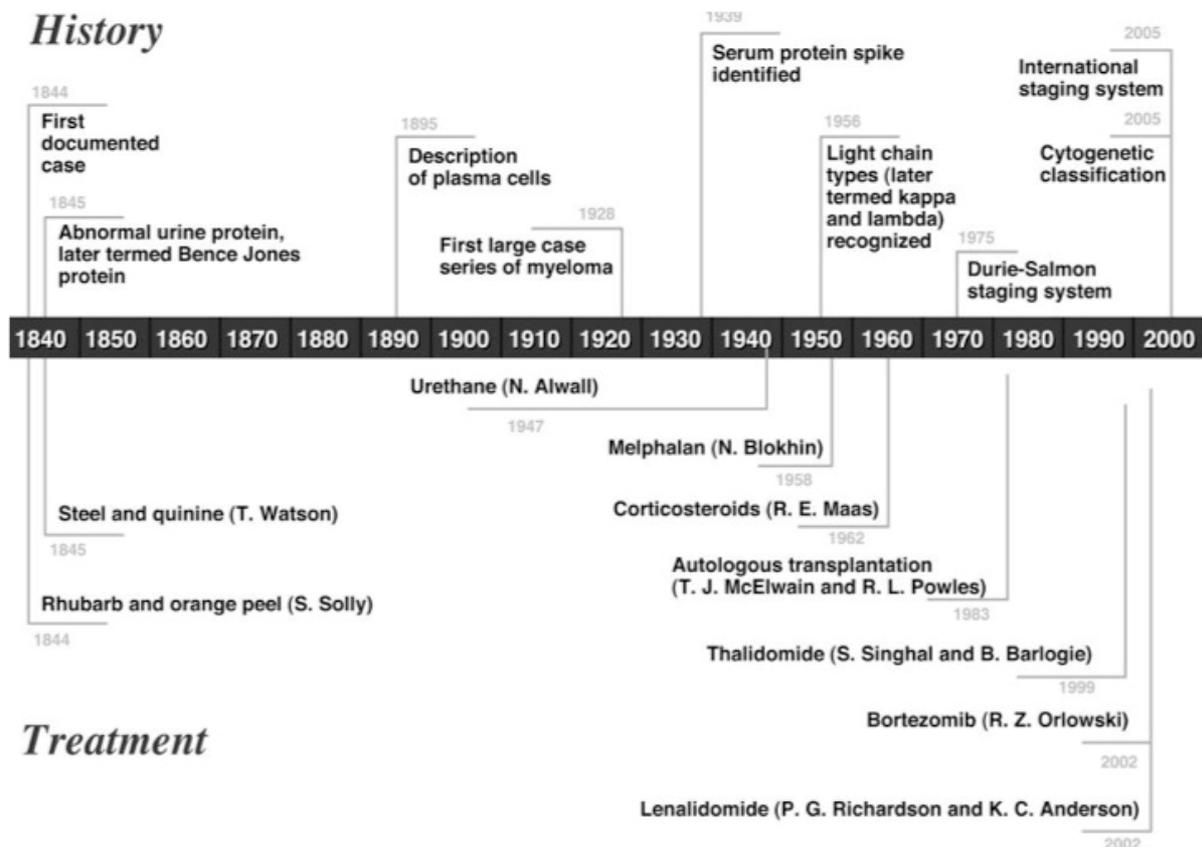


Tabelle 4 Vergleich Alexanianschema mit anderen Polychemotherapieprotokollen

Autor	Protokoll	Patientenzahl (n)	Remissionsrate (%)	Überleben (Monate)
Argentinien (Benson <i>et al.</i>)	MeCCMVP	105	46	41
	MP	129	38	39
CALGB (Cooper <i>et al.</i>)	MCBP	156	56	29
	MCBPA	157	44	26
	MP	146	47	33
Kanada (Cassuto <i>et al.</i>)	MCBP	116	47	31
	MP	125	31	28
Dänemark (Hansen <i>et al.</i>)	M2	31	45	21
	VMP	32	73	30
	MP	33	58	21
ECOG (Alexanian <i>et al.</i>)	M2	134	74	31
	MP	131	53	30
Finnland (Kildahl-Anderson <i>et al.</i>)	MOCCA	64	75	41
	MP	66	54	45
Norwegen (Cohen <i>et al.</i>)	M2	33	76	33
	MP	34	67	33
SECSG (Palva <i>et al.</i>)	BCP	186	49	36
	MP	187	52	36
Italien (Boccardo <i>et al.</i>)	VMCP-VBAP	158	77	32
	MP	146	64	37

Die Rolle der Induktionstherapie bei hämatologischen Neoplasien ist, eine möglichst komplette Remission (CR) zu erzielen. Im Falle von akuten Leukämien ist die erste Bedingung für das Erreichen eines Langzeitüberlebens das Erreichen einer CR nach Induktionstherapie. Beim MM hingegen war das Erzielen einer CR lange Zeit ein so selten erreichtes Therapieergebnis, dass es nicht das Ziel der initialen Therapie war und der Begriff der Induktionstherapie in diesem Zusammenhang oftmals gar nicht verwendet wurde (Harousseau *et al.*, 2008).

Der prognostische Einfluß einer CR wurde erst nach der Einführung der Hochdosischemotherapie (HD) mit autologer Stammzelltransplantation (ASZT) diskutiert. Das MM ist eine der hämatologischen Neoplasien, für die eine Dosisintensivierung gezeigt werden konnte. Hieraus ergab sich, dass das MM im Jahre 2005 die Erkrankung war, bei der die Indikation für eine autologe Stammzelltransplantation sowohl in Europa als auch in den USA am häufigsten gestellt wurde. Die ASZT ist nicht kurativ und die meisten Patienten erleiden im Mittel einen Rückfall nach 3 Jahren. Neuere Medikamente wie Thalidomid,

Lenalidomid oder Bortezomib wurden zur Verbesserung in die in weiteren Studien zu prüfenden Therapieprotokolle integriert und zeigen bereits gute Resultate (Reece *et al.*, 2007). Für Patienten unter 65 Jahre war die „Intergroup Francophone du Myelome (IFM)“ die erste Arbeitsgruppe, die in einer randomisierten Studie die Überlegenheit einer HD mit autologer Stammzelltransplantation (SZT) im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie (CCT) beim MM zeigen konnte. In der IFM 90 Studie konnte die HD signifikant die Rate der CR, das EFS und das OS der Patienten mit neu diagnostiziertem MM steigern (Attal *et al.*, 1996). In der Folge berichteten auch andere Gruppen von ihren Erfahrungen mit der HD. Drei Studien einschließlich der IFM 90 Studie verwendeten ein Konditionierungsprotokoll ohne oder mit einer niedrig dosierten Ganzkörperbestrahlung (total body irradiation, TBI). In diesen erwies sich die HD als fähig, das OS zu verbessern. Im Gegensatz hierzu ließ sich dieser Effekt in den anderen drei Studien, die eine hochdosierte TBI oder Hochdosis-Busulfan einsetzten, nicht nachweisen. Dieser negative Einfluß der TBI im Konditionierungsregime ließ sich auch in der Studie IFM 95 nachweisen. Aus diesen Ergebnissen wurde der Schluß gezogen, dass bei jüngeren Patienten mit Erstdiagnose MM und normaler Nierenfunktion die Durchführung einer HD mit autologer SZT als Standard empfohlen werden kann.

Die Auswertung der Daten aus der IFM 90 Studie zeigte, dass das Erreichen mindestens einer VGPR (>90% Reduktion der M-Komponente) mit einem längeren Überleben korreliert. Dies passt zu den Erfahrungen aus der Therapie anderer hämatologischer Neoplasien und zeigt, dass das Ziel bei der Induktion und Konsolidierung das Erreichen einer CR sein sollte. Die Gruppe von Bart Barlogie in Arkansas zeigte, dass ein Ansatz, die Rate an CR zu erhöhen, die Wiederholung einer intensiven Therapie darstellt. Die IFM entwickelte somit eine randomisierte klinische Studie (IFM 94), die eine versus zwei HD mit autologer SZT vergleichen sollte. In dieser Studie wurden 399 unbehandelten MM-Patienten unter 60 Jahren zwischen Mel 140 plus TBI und einer Tandem-HD, einem nur mit Mel 140 ohne TBI und später nochmals Mel 140 mit TBI randomisiert. Es konnte von einer CR-Rate von 42% bei der einmaligen HD und von 50% in der Tandem-HD Gruppe berichtet werden. Die Wahrscheinlichkeit eines 7-Jahres EFS war 10% versus 20% und die Wahrscheinlichkeit eines 7-Jahres OS 21% versus 42%. Für die Indikation und Therapieentscheidung wichtige Erkenntnisse aus dieser Studie waren zudem, dass der Überlebensvorteil von einer Tandem-HD nur bei Patienten beobachtet wurde, die keine VGPR nach der ersten HD erreicht hatten und dass die Patienten, bei denen eben jene nach einer HD festgestellt werden konnte, nicht mehr von der Wiederholung einer weiteren HD profitieren. Klinische Studien mit ähnlichem Aufbau wurden im weiteren Verlauf auch von anderen Gruppen durchgeführt. Zwei weitere konnten den Überlebensvorteil für Patienten in dieser Situation beobachten, zwei andere

hingegen konnten diesen nicht dokumentieren. Zusammenfassend lässt sich anhand dieser Daten sagen, dass eine Tandem-HD jüngerer Patienten insbesondere dann empfohlen werden kann, die nach einer HD keine VGPR erreicht haben.

Eine weitere wichtige Erkenntnis, die aus der IFM 90 Studie gezogen wurde, ist, dass wie bei anderen hämatologischen Neoplasien auch, das Erreichen einer CR ein wichtiger prognostischer Faktor ist. Patienten, die eine CR oder VGPR nach Therapie erreichten, zeigten ein signifikant längeres OS als Patienten, die nur eine partielle Remission erzielten (PR). Der prognostische Einfluß der CR wurde in der weiteren Folge durch eine Anzahl weiterer Studien bestätigt und eine kürzlich durchgeführte Metaanalyse zeigte, dass im Zusammenhang mit ASZT das maximale Therapieansprechen mit einem signifikant besseren PFS einhergeht. Der prognostische Einfluß der CR und der VGPR hatte neben der Neudefinition des Therapieansprechens (gemäß der International Myeloma Working Group) auch die Formulierung des Therapieziels zur Folge, eine möglichst hohe Rate an CR oder VGPR zu erreichen.

Nach der Etablierung der HD mit ASZT wurde eine konventionelle Chemotherapie vor der ASZT unter der Vorstellung gegeben, die Tumorlast zu reduzieren und die Sammlung der autologen Stammzellen zu erleichtern. Der Beitrag dieser Protokolle zur CR-Rate war allerdings sehr gering. Patienten, die für eine autologe SZT in Frage kommen, sollten keine Induktion mit alkylierenden Substanzen bekommen, um eine ausreichende Stammzellmobilisierung zu gewährleisten. Dexamethason mono oder in Kombination mit Vincristin und Doxorubicin (VAD-Protokoll) war lange Zeit eine Standardinduktionstherapie beim MM. Im weiteren Verlauf erbrachte zunächst wieder die ASZT eine Verbesserung der CR-Rate, in dem diese wiederholt wurde, so dass nach Tandem-Transplantation 30-45% der Patienten in CR waren. In der Auswertung der Studien, die die einfache ASZT mit der Tandem-ASZT verglichen haben, zeigte sich, dass die Güte der Tumorlastreduktion mit einem signifikant besseren PFS assoziiert war (Harousseau *et al.*, 2009).

Durch den Einsatz neuerer Substanzen wie Thalidomid (Thal), Bortezomib (Velcade, Vel) oder Lenalidomid (Revlimid, Rev bzw. Len) wurde der Beitrag der Induktionstherapie vor ASZT zur CR-Rate um ein Vielfaches erhöht. Während die erste getestete Kombination mit Thal/Dex bei deutlich erhöhtem Thromboserisiko sowie bei erheblicher Entwicklung einer Polyneuropathie keine wesentliche Steigerung der CR-Rate ermöglichte, erwiesen sich die Kombinationen mit Vel/Dex oder Len/Dex als erheblich erfolgreicher. Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass für Vel/Dex vor ASZT gezeigt werden konnte, dass sich die CR-Rate nicht nur vor ASZT sondern auch nachher deutlich steigern ließ. Erfreulicherweise zeigte sich durch den Einsatz der sogenannten „novel agents“ keine wesentliche Einschränkung der

Sammlung autologer Stammzellen. In der weiteren Folge konnte mit der Kombination von IMiDs mit Bortezomib eine nochmalige Steigerung der CR/VGPR-Rate gezeigt werden, so dass durch Kombinationen wie VTD oder VRD ca. 60-70% der behandelten Patienten eine CR bzw. eine VGPR erreichen, so dass man durchaus sagen kann: „VAD is dead“.

Sowohl in vitro als auch in vivo konnte ein synergistischer Effekt von Bortezomib mit Melphalan gezeigt werden, wohingegen die Toxizität dieser beiden Substanzen unterschiedlich ist. Vor diesem Hintergrund ist die Kombination dieser beiden Wirkstoffe eine logische Konsequenz. In einer Pilotstudie wurden 35 Patienten in einer prognostisch ungünstigen Situation definiert mit dem Nichterreichen einer PR nach Induktionstherapie (n = 26) oder dem Fehlen einer VGPR nach der ersten HD (n = 9) eingeschlossen. Bei guter Verträglichkeit des Protokolls konnte drei Monate nach der autologen SZT eine Gesamtansprechrates (overall response rate, ORR) von 63% VGPR mit 31% wahren CR verzeichnet werden. Sechs der neun Patienten, die nach der ersten HD mit Melphalan mono keine VGPR erreicht hatten, konnten eine CR (Gramenzi *et al.*, 1991) oder eine VGPR (Riedel *et al.*, 1992) erreichen. Die Daten dieser Studie zeigen, dass die Kombination von Melphalan mit Bortezomib im Vergleich zu Melphalan mono die Rate von VGPR ohne additive Toxizität deutlich erhöhen kann. Vor dem Hintergrund, dass das Erreichen einer VGPR einer der Hauptfaktoren zur Bestimmung der Prognose für das Überleben nach HD ist, sollte diese Kombination des OS ebenso verlängern.

Auf der Basis der Phase III- Studien MM-009 und MM-010 in den USA sowie Europa, Israel und Australien wurde Revlimid im Juni 2007 in Europa in Kombination mit Dexamethason für die die Behandlung von MM-Patienten zugelassen, die mindestens eine Vortherapie gehabt haben. In beiden Studien waren die CR-Rate, die TTP und auch das OS besser im Rev/Dex- Arm als bei Dexamethason alleine, so dass Anfang 2005 die Verblindung aufgehoben wurde und allen Patienten Rev/Dex angeboten wurde. Sowohl bei Patienten mit mehreren Vortherapien als auch nach Thalidomid zeigte sich eine deutlich besseres Ansprechen im Kombinationsarm als nur mit Steroiden alleine.

Bei neu diagnostizierten MM- Patienten erbrachte eine Phase-II Studie in dieser Firstline-Situation sehr gute Ergebnisse für Rev/Dex mit 91% Gesamtansprechen mit 38% CR/nCR und einem OS von 90% nach 2 Jahren. Vor dem Hintergrund dieser ermutigenden Daten wurde eine Phase-III Studie zur Evaluation von Rev/Dex initiiert.

In einer randomisierten Untersuchung der ECOG zeigte sich ein Vorteil des OS nach 1-Jahr von LowD mit Revlimid im Vergleich zu HighD-Rev (96,5% vs. 86%) mit insgesamt deutlich weniger Toxizität im lowD-Rev Arm.

Für Patienten, die nicht für eine autologe Stammzelltransplantation geeignet sind, erwies sich MPR als eine gute Möglichkeit und deutlich überlegen gegenüber MP alleine.

Wie Thalidomid wird auch Lenalidomid für eine Erhaltungstherapie überprüft. Hierzu werden zwei Phase-III randomisierte Studien durchgeführt.

In der Situation des Relaps oder des refraktären MM wurden zwei Lenalidomid-haltige Kombinationen erfolgreich getestet: RAD (Revlimid, Adriamycin und Dexamethason) und R-Dvd (Revlimid und Dexamethason), die beide ein Gesamtansprechen von ca. 80% vorweisen konnten.

Dosislimitierend erscheinen bei Lenalidomid vor allem Zytopenien mit Neutropenien und Thrombopenien. Hingegen waren Müdigkeit, Obstipation oder Polyneuropathie nicht wie bei Thalidomid vermehrt zu sehen. Angesichts der möglichen Teratogenität wird Lenalidomid streng entsprechender vorsorglicher Leitlinien verschrieben.

Für die Beantwortung der Frage, ob eine Induktionstherapie unter Einsatz der neuen Medikamente zu einem verbesserten PFS oder OS führt, ist es zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch zu früh. Sollte dies der Fall sein, so ist die ASZT als Konsolidierungstherapie nach der Induktionstherapie unter Einsatz der neuen Medikamente zu verstehen. Besonders hervorzuheben ist allerdings, dass unter dem Einsatz von Vel/Dex eine für die Prognose schlechte Zytogenetik keinen negativen Einfluß auf die CR-Rate besitzt (Lonial *et al.*, 2009).

Auch die Rolle der Erhaltungstherapie bleibt beim MM ein Gebiet, auf dem intensiv neue Forschungsansätze erarbeitet werden. Bislang sind die Daten, die für die Durchführung einer Erhaltungstherapie sprechen, weit weniger gut als gewünscht. So zeigen die meisten randomisierten klinischen Studien und Metaanalysen zum Einsatz von Interferon lediglich ein sehr moderates Ansteigen des PFS mit minimalem oder keinem Überlebensvorteil bei deutlicher Toxizität. Eine Erhaltung mit Steroiden hat eine Verlängerung des Ansprechens mit nur geringer Verlängerung des Überlebens gezeigt. Thalidomid, als Substanz mit immunmodulatorischen Eigenschaften, das bei einem Drittel der Patienten mit refraktärem MM in niedriger Dosierung aktiv ist und zudem keine Myelotoxizität verursacht, wurde als guter Kandidat für den Einsatz in der Erhaltungstherapie vor allem nach HD angesehen. Zahlreiche Gruppen haben zu dieser Fragestellung randomisierte klinische Studien aufgelegt. In der 1999 initiierten klinischen Prüfung IFM 99 02 sollte die Rolle von Thalidomid bei der Erhaltungstherapie untersucht werden. Aus dieser und anderen Studien folgt, dass eine Erhaltung mit Thalidomid die Ansprechrate, das EFS und OS signifikant verbessert und somit empfohlen werden kann. Interessant ist jedoch, dass dieser Überlebensvorteil durch Thalidomid nicht bei Patienten erreicht werden kann, die bereits in einer VGPR nach HD sind, so dass man daraus folgern kann, dass der Vorteil vielmehr durch eine weitere

Reduktion der Tumorzellmasse (Konsolidierungseffekt) als durch einen Erhaltungseffekt vermittelt wurde. Hieraus lässt sich auch eine Vermutung zu der häufig gestellten Frage nach der nötigen Länge der Erhaltungstherapie mit Thalidomid ableiten: Thalidomid könnte nach Erreichen einer VGPR im Verlauf der Erhaltungsphase abgesetzt werden, um Nebenwirkungen zu reduzieren und die Entwicklung einer Resistenz im Hinblick auf einen Rückfall zu vermeiden. Dies ist insbesondere eine wichtige Erkenntnis, da in oben beschriebener Studie 39% der Patienten die Einnahme von Thalidomid aufgrund von Nebenwirkungen wie peripherer Polyneuropathie beenden mussten. Unter anderem aus diesen Gründen erscheint Lenalidomid, ein IMiD-Derivat von Thalidomid mit deutlich höherer Anti-Myelom-Potenz und ohne neurologischer Toxizität, ein attraktiver Kandidat für den Einsatz in der Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie bei MM. Der Einsatz von Lenalidomid wird derzeit in mehreren klinischen Studien in beiden Situationen in der IFM, SWOG, CALGB in Europa und den USA untersucht (Harousseau *et al.*, 2008).

Bei älteren Patienten war über mehr als vier Jahrzehnte MP der Therapiestandard, wobei die CR-Rate nicht mehr als 5% betrug. Im Gegensatz zu jüngeren Patienten wurde bislang der günstige Einfluß einer Dosisintensivierung auf das Überleben nicht bewiesen. In der IFM 90 Studie war das OS der Patienten >60 Jahre im Arm der konventionellen Chemotherapie im Vergleich zum Hochdosisarm gleich. Im IFM 99 06 Protokoll wurden 336 Patienten älter als 65 Jahre zwischen den Möglichkeiten MP, MP plus Thalidomid (MPT) oder einer HD mit 100mg/m² randomisiert. Im Vergleich zu MP erbrachte die HD eine deutlich bessere Ansprechrate mit 41% versus 7% VGPR. Bezüglich des EFS (17 Monate bei MP versus 19 Monate bei HD) oder auch der OS (30 Monate bei MP versus 38 Monate bei HD) ergab sich kein signifikanter Unterschied. Im Vergleich zu diesen beiden Armen fiel das Ergebnis für MPT folgendermaßen aus: 49% VGPR, 30 Monate EFS und bei 56 Monaten war das mediane OS noch nicht erreicht. Hieraus folgt, dass bei älteren Patienten die HD das OS im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie nicht verbessert und nicht empfohlen werden kann. Vielmehr sollten Kombinationen gewählt werden, die eine der neuen Substanzen enthalten. Die erste Verbesserung wurde durch die Hinzunahme von Thal erzielt. In zwei randomisierten Studien konnten größere CR, CR/VGPR Raten sowie ein längeres PFS gezeigt werden. In der IFM-Studie konnte auch ein verbessertes OS beobachtet werden, wohingegen dies in der italienischen Studie nicht gezeigt werden konnte, da hier das Überleben nach Rückfall nach MPT geringer war. In einer spanischen Studie zeigten sich mit 35% CR und 45% CR/VGPR-Raten, die deutlich über denen von MP liegen. Trotz eines bislang noch kurzen Follow-up sind bereits jetzt PFS und OS besser als bei MP. In einer großen Phase-III Studie wird zudem MPR geprüft. Weiterhin zu prüfende Fragen bei älteren Patienten sind, welches die beste

Induktionstherapie ist, ob Melphalan vor allem in der Situation der Kombination zweier neuer Substanzen wie bei VRD noch nötig ist, oder über welchen Zeitraum eine Induktionstherapie gegeben werden sollte. Hier zeigen sich zwei verschiedene Strategien in den MP vs. MPT- bzw. MPV-Studien: Zum einen wurden die Therapien über eine festgelegte Anzahl von Zyklen gegeben zum anderen bis zum Relaps oder untolerierbaren Nebenwirkungen. In einer laufenden Studie mit MPR sollen diese beiden Möglichkeiten gegeneinander geprüft werden. Zudem ist bislang noch nicht geprüft worden, ob nach dem Erreichen des besten Ansprechens eine Erhaltungstherapie notwendig ist. Aktuell liegt keine randomisierte Studie vor, die den Einfluss einer Erhaltungstherapie nach Remissionsinduktion unter Verwendung neuer Substanzen geprüft hat (Palumbo *et al.*, 2006).

Bezüglich der Frage, ob Kombinationen von neuen Substanzen die Durchführung von ASZT ersetzen können, sieht die Datenlage bislang noch Vorteile für den Einsatz von neuen Substanzen in Kombination mit der zusätzlichen Durchführung einer Tandem-ASZT. Durch den Einsatz von neuen Substanzen können zwar CR-Raten erreicht werden, die mit denen nach einer ASZT vergleichbar sind, die Durchführung einer zweiten ASZT insbesondere mit einer Kombinationstherapie mit neuen Substanzen verbessert dieses Outcome allerdings erheblich, wobei das Follow-up in diesen Studien bislang noch zu kurz ist, um genauere Aussagen zu treffen. Gute Daten existieren bereits für den Einsatz von Thalidomid nach ASZT mit einem PFS von vermutlich über 4 Jahren. Erste Daten für den Einsatz von neuen Substanzen vor und nach ASZT zeigen ein EFS von 2 Jahren und ein OS von 84%. Der Einsatz einer Erhaltungstherapie nach Induktionstherapie mit neuen Substanzen ohne ASZT ist bislang noch nicht geprüft worden. Erste Ergebnisse mit einer Dauertherapie von Len/Dex zeigen jedoch sehr gute Daten für VGPR und ein PFS von 2 Jahren. Insgesamt zeigt sich die Notwendigkeit zur Prüfung der neuen Substanzen ohne und mit ASZT, insbesondere vor dem Hintergrund, dass möglicherweise eine Salvagetherapie unter Einsatz von ASZT bei Relaps nach einer Induktionstherapie mit neuen Substanzen erfolgsversprechend erscheint. Zudem könnte in diesen Studien auch die Frage beantwortet werden, welche Patienten eine frühe ASZT brauchen (Merchionne *et al.*, 2007).

Zum jetzigen Zeitpunkt kann der Stellenwert einer CR für ein besseres PFS und OS bei MM v.a. in Zusammenhang mit einer ASZT als gesichert angenommen werden. Erste Studien bei MP vs. MP plus Thal oder Vel zeigen allerdings auch, dass ein verbessertes PFS mit einer CR/VGPR-Rate einhergeht. Das dies allerdings nicht uneingeschränkt gilt, wird in kürzlich durchgeführten Studien deutlich, in denen z.B. für Patienten mit vorbestehendem MGUS eine gute Prognose beobachtet wurde, obwohl diese nicht eine CR erreicht haben. Auf der anderen Seite können Patienten mit einer prognostisch ungünstigen Zytogenetik wie t(4;14) eine CR

erreichen aber trotzdem einen frühen Relaps erleiden. Der Einfluss des Erreichens einer CR für den weiteren Verlauf der Erkrankung hängt möglicherweise von dem Grad des Ansprechens in Relation mit der Effektivität der Therapie und dem prognostischen Subtyp des MM ab. Zusammenfassend erscheint auch beim MM das Erreichen einer zytogenetischen oder sogar einer molekularen Remission für einen günstigen Langzeitverlauf sehr wichtig zu sein (Harousseau *et al.*, 2009).

Trotz erheblicher Fortschritte bezüglich des Überlebens von Patienten, die mit einer HD behandelt wurden, kann ein sehr heterogenes Outcome dieses Patientenkollektivs beobachtet werden. Bei manchen Patienten kann der Nutzen der Therapie gar nicht evaluiert werden, da die Patienten im Intervall nach der Induktion und vor der ersten HD bereits wieder progredient sind. Jedoch selbst bei diesen Patienten, die in dieser Situation die Therapie erhalten haben, zeigen sich sehr große Unterschiede in den Therapieergebnissen. Viele Faktoren können für eine mangelnde Effektivität einer HD verantwortlich sein. Die meisten Faktoren sind sicherlich in der Biologie der Erkrankung begründet, einige Daten lassen jedoch die Vermutung zu, dass individuelle genetische Faktoren eine Rolle bei der Resistenz gegenüber einer HD spielen könnten.

Das kürzlich entwickelte Staging-System ISS lässt nicht nur für konventionell therapierte Patienten sondern auch für solche, die mit HD behandelt wurden, eine gute Vorhersage des Outcome zu, was für ISS Stadium 1,2 und 3 mit 111, 66 sowie 45 Monaten angegeben werden kann.

Bei den in dieses System eingehenden Werten für das Serum-Albumin und das Serum- β 2M handelt es sich allerdings wie bei den Parametern Tumormasse oder Niereninsuffizienz um extrinsische Faktoren, wohingegen intrinsische Faktoren der Erkrankung selbst und hier vor allem Chromosomenveränderungen ebenso in zahlreiche Studien eingegangen sind. Aufgrund der Schwierigkeit, Metaphasen beim malignen MM-Zellklon zu erzeugen, haben zahlreiche Gruppen die FISH-Methode zur Bestimmung des zytogenetischen Befundes benutzt. Mit Hilfe dieser Technik konnten einige chromosomale Veränderungen, die mit einer schlechten Prognose assoziiert sind, definiert werden: del(13), t(4;14), del(17p) oder t(14;16). In der IFM 99 Studie wurde die prognostische Bedeutung der del(13), t(4;14) und del(17p) Veränderungen an einer großen Serie von mehr als 700 Patienten mit Tandem-HD untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass alle drei chromosomale Veränderungen mit einem kürzeren Überleben assoziiert waren. Eine zudem durchgeführte multivariate Analyse, die del(13), t(4;14), del(17p), 1q Zugewinne, β 2M, Anämie, Thromozytopenie und Hypoalbuminämie berücksichtigte, erwiesen sich die drei Parameter t(4;14), del(17p) und ein hohes β 2M als unabhängige Prädiktoren eines kürzeren Überlebens. Basierend auf diesen Ergebnissen

konnten drei Patientengruppen identifiziert werden: Patienten mit geringem $\beta 2M$ (<4 mg/L) und keinem der beiden chromosomalen Abnormalitäten (35% der getesteten Patienten, wobei diese zu 85% nach 4 Jahren am Leben sind), Patienten mit hohem $\beta 2M$ und 1 oder 2 der Chromosomenveränderungen (15% der Patienten mit einem medianen OS von 19 Monaten) und den restlichen Patienten (50% der Patienten mit einem medianen OS von 4 Jahren).

Neben dem Proliferationsindex ist auch das Ansprechen auf die HD ein prognostischer Parameter, der allerdings naturgemäß erst nach der Therapie bestimmt werden kann und somit vorher nicht verwendet werden kann. Einige Studien bearbeiten unter anderem die Fragestellung nach der prognostischen Wertigkeit von genomischen Reihenuntersuchungen. So konnte das Arkansas Total Therapy II Programm an einer Zusammenstellung von 70 Genen (alternativ auch 17 Gene) Patienten mit einer raschen Progression identifizieren. Dieses Verfahren der Genexpressionsprofilierung (gene expression profiling) ist jedoch kein Standardverfahren. Zudem müssen die Daten in weiteren unabhängigen Studien validiert werden.

Die myeloablative allogene Stammzelltransplantation wurde vor ca. 30 Jahren zum ersten Mal für die Behandlung des MM eingesetzt. Die Toxizität war sehr stark, so dass in Studien, die unter anderem stark vorbehandelte Patienten rekrutierten, eine behandlungsassoziierte Mortalität (treatment related mortality, TRM) von 50% bestimmt wurde. Aus diesem Grund wurde eine myelomablative allogene SZT nur für junge Patienten unter 50 oder 55 Jahren empfohlen. Da die meisten Patienten bei MM jedoch deutlich älter sind, bleibt diese Behandlungsmodalität auf eine kleine Gruppe von Patienten beschränkt. Das Vorliegen eines HLA-identischen Geschwisters ist zudem ein einschränkendes Kriterium. Eine retrospektive Analyse der „European Bone Marrow Transplantation (EBMT) Gesellschaft zeigte ein deutlich besseres Überleben bei Patienten, die zwischen 1994 und 1998 transplantiert wurden im Gegensatz zu den Patienten, die vor 1994 auf diese Weise behandelt wurden. Ursächlich hierfür war vor allem eine bessere Patientenauswahl mit jüngeren und weit weniger vorbehandelten Patienten im Falle der frühzeitigen Durchführung einer allogenen Transplantation. Jedoch auch in den darauffolgenden Studien ergab sich leider eine zu hohe TRM. So ergab sich in einer randomisierten Studie der U.S. Intergroup mit den Armen HD und konventioneller Chemotherapie, die allein Patienten kleiner bzw. gleich 55 Jahren bei Vorliegen eines passenden Familienspenders die Möglichkeit einer myeloablativen Chemotherapie anbot, eine TRM von 53%, so dass dieser Behandlungsarm nach 36 Patienten vorzeitig geschlossen werden musste.

Eine Möglichkeit, die hohe TRM zu reduzieren, ist die T-Zell-Depletion, da viele Patienten an einer starken Graft-versus-host Erkrankung (GvHD) verstorben sind. Gute Ergebnisse wurden

an einzelnen Zentren mit einer CD6 T-Zelldepletion und einer prophylaktischen CD4 Donorlymphozyteninfusion (DLI) zur Reduktion der Rückfallwahrscheinlichkeit erzielt. Leider zeigte eine große holländische Studie mit unterschiedlichen T-Zell-Depletionsstufen sehr schlechter Ergebnisse mit hoher TRM und einer hohen Rückfallquote. Zusammenfassend kann der Einsatz einer myeloablativen allogenen SZT beim MM nur im Rahmen von klinischen Studien empfohlen werden, die neue Strategien zur Verbesserung der Effektivität und Reduktion der Toxizität evaluieren.

Langzeitergebnisse einer kleinen Patientengruppe nach myeloablativer allogener SZT zeigen ein Plateau des EFS und OS nach vier bis fünf Jahren, wenn sie die erste Phase nach der Transplantation überlebt haben. Als Ursache für dieses Plateau wird ein immunologischer Effekt der Lymphozyten des Spenders verantwortlich gemacht, der sogenannte Graft-versus-Myeloma Effekt (GvM). Beweise für die Existenz dieses Anti-Tumoreffektes ergaben sich aus Remissionen bei Patienten durch Donor Lymphozyten Infusion (DLI), die nach allogener Stammzelltransplantation einen Rückfall der Erkrankung erlitten haben. Dieser GvM-Effekt ist auch Grundlage für das Konzept der allogenen Stammzelltransplantation mit reduzierter Konditionierungsintensität (reduced-intensity conditioning, RIC), das durch eine Verringerung der dosisabhängigen Toxizität eine geringere therapieassoziierte Mortalität bei gleich bleibender Effektivität durch den GvM-Effekt erreichen soll. Eine retrospektive Analyse von 229 Patienten aus 33 Zentren der EBMT Gruppe, die eine RIC bekommen haben, konnte wichtige prognostische Faktoren definieren. In dieser Zusammenstellung war das mediane Alter 52 Jahre, 14% der Patienten waren älter als 60 Jahre, eine Situation mit unverwandtem Spender lag bei 16% der Patienten vor. Die TRM nach einem Jahr lag bei 22%, das 3-Jahres PFS (progression free survival) und das OS (overall survival) waren 21% bzw. 41%. Das 3-Jahres PFS und OS war mit 34% und 67% bei den RIC-Patienten signifikant besser, die in erster Remission transplantiert wurden. Eine multivariate Analyse der Ergebnisse erbrachte eine Assoziation eines verkürzten OS mit einer chemotherapieresistenten Erkrankung und mehr als einer autologen Transplantation. Eine chronische GvHD war mit einem besseren PFS und OS assoziiert (84% und 46% für eine begrenzte chronische GvHD im Vergleich zu 29% und 12% ohne chronische GvHD). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass RIC-Transplantationen gut durchführbar sind und in erster Remission mit ermutigendem Erfolg einsetzbar ist. Stark vorbehandelte Patienten sowie solche mit progredienter Erkrankung scheinen nicht von dieser Behandlungsmodalität zu profitieren. Ein von der EBMT zudem veröffentlichter Vergleich von 320 RIC-Patienten mit 196 myeloablativ behandelten Patienten zwischen 1998 und 2002 aus 103 Zentren zeigte einen deutlichen Unterschied in diesem retrospektiven Vergleich in der TRM nach 2 Jahren,

wobei diese für RIC bei 24% und für die myeloablative Therapie bei 37% lag. Zu erwähnen ist hierbei, dass signifikante Unterschiede zwischen diesen beiden Patientengruppen bestanden, da die RIC-Patienten mit 51 versus 45 im Mittel deutlich älter als die myeloablativ behandelten Patienten waren, öfter eine progrediente Erkrankung vorlag (28% vs. 21%) und viel häufiger eine autologe Stammzelltransplantation vorher bekommen hatte (76% vs. 11%). Diese Reduktion der TRM wurde allerdings durch einen Anstieg des Rückfallrisikos beim RIC-Ansatz aufgewogen. Hieraus resultierend ergab sich ein 3-Jahres PFS von 19% bei den RIC und 35% bei den myeloablativ behandelnden Patienten, die 3-Jahres OS-Rate lag bei 38% für die RIC und 51% für den myeloablativen Ansatz. Ein höheres Rückfallrisiko wurde zudem nach T-Zell-Depletion und hier v.a. nach Alemtuzumab-Einsatz beobachtet. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass eine RIC-Transplantation nicht bei Patienten mit fortgeschrittenem oder progredientem MM eingesetzt werden sollte, da der allogene GvM-Effekt sehr wahrscheinlich nicht ausreicht, um die Erkrankung in diesen Situation zu kontrollieren. Zudem sollte bei der RIC das Konditionierungsprotokoll und die GvHD-Prophylaxe sorgfältig ausgesucht werden, um den GvM-Effekt zu verstärken und ein Minimum an GvHD zu erzeugen. Der Einsatz von passenden Familienspendern und die Behandlung innerhalb von klinischen Studien sollte hierbei eine große Rolle spielen.

Die Durchführung einer RIC-Transplantation nach autologer Transplantation zur Tumorreduktion wird als neue Therapieoption zunehmend eingesetzt. Die prinzipielle gute Durchführbarkeit einer RIC nach einer oder zwei autologer Stammzelltransplantationen wurde durch die Arkansas-Studiengruppe gezeigt. Zusammen mit zwei weiteren Gruppen wurden CR-Raten von über 50% und einer frühen Sterblichkeit von weniger als 10% berichtet und führten zu der Planung von prospektiven Studien, die Tandem Auto-RIC mit einer Tandem-Autologen Transplantation vergleichen (Denz *et al.*, 2006).

Die monatliche Gabe eines Bisphosphonates (Pamidronat 90mg i.v. über 2-6 Stunden oder Zoledronat 4mg über 30 min) ist zu einer wichtigen Ergänzung in der Therapie der Knochenerkrankung bei MM geworden. Bisphosphonate hemmen die gesteigerte Osteoklastenaktivität und beeinflussen möglicherweise auch die Tumor-Stroma-Interaktion. Insgesamt führt dies zu einer Verlangsamung der Progression der Skelettläsionen mit einer Reduktion von Wirbelkörperfrakturen und Skelettschmerzen.

Zusätzlich wurde gezeigt, dass diese Substanzklasse Apoptose bei MM-Zellen auslösen kann und einen immunregulativen Effekt besitzt, was im Ergebnis die Verlängerung des Überlebens erklären könnte. Ob auch Patienten ohne Knochenerkrankung bei MM vom Einsatz dieser Substanzen profitieren können, ist derzeit noch ungeklärt. Beim Einsatz von Bisphosphonaten ist vor dem Hintergrund der potentiellen Nephrotoxizität und des Risikos für

Osteonekrosen des Kiefers eine regelmäßige Kontrolle der Nierenretentionsparameter und eine zahnärztliche Untersuchung vor Einleitung der Therapie empfohlen.

Neben den oben genannten neueren Medikamenten wie Lenalidomid, Thalidomid und Bortezomib werden auch andere in präklinischen und klinischen Studien evaluiert. Hierzu gehören Arsentrioxid, II-1 Rezeptorantagonisten, zyklische Depsipeptide, Farnesyltransferaseinhibitoren, p38 Mitogen-aktivierter Proteinkinaseinhibitor SCIO-469, Histondeacetylaseinhibitoren oder Heat-shock Protein 90 Inhibitoren. Bemerkenswert ist, dass diese Ansätze im Vergleich zu den etablierten Therapieverfahren selektiver Unterschiede zwischen maligner Zielzelle und gesunden Zellen ausnutzen. In einem weiteren Schritt hin zu möglichst optimaler Selektivität, die Tumorzellen zu eliminieren, wurden im Rahmen von immuntherapeutischen Ansätzen dendritische Zellen bei Vakzinierungen oder Idiotyp-spezifische T-Zellen eingesetzt – jedoch bislang ohne wirklich überzeugenden Erfolg.

Weit verbreitet ist der Einsatz von monoklonalen Antikörpern (MoAb). Ein großes Problem für diese immuntherapeutische Anwendung beim MM ist der sogenannte „Antigen escape“-Mechanismus, das heißt, dass durch das zielgerichtete Binden des monoklonalen Antikörpers an die Zellen, die das Zielantigen tragen, nur diese Zellen deletiert werden können, alle anderen Zellen des malignen Pools jedoch überleben. Insbesondere würde die auch beim MM postulierte maligne Stammzelle durch den Einsatz eines MoAbs, der nur reife MM-Zellen bindet, sehr wahrscheinlich unbehelligt bleiben. Aus diesen Überlegungen folgt, dass es von Vorteil sein könnte, mehrere Antigene gleichzeitig therapeutisch auszunutzen (Merchionne *et al.*, 2007).

In der Lymphom- oder Leukämie-therapie gehören Antikörper, die sich gegen bestimmte Oberflächenantigene richten (anti-CD20/Rituximab, anti-CD52/Alemtuzumab oder anti-CD33/Gemtuzumab), bereits heute zur Standardtherapie. Leider sind diese Antikörper jedoch zur MM- Therapie nicht in breitem Maßstab einsetzbar, da die Antigene nicht oder nur in einem geringem Prozentsatz auf MM-Zellen exprimiert werden. Antikörper wie CD38, CD40, CD54, CD138, HM1.24, NY-ESO-1, VEGF oder Id-spezifische Antikörper werden in laufenden Studien geprüft.

Weitere immuntherapeutische Ansätze umfassen bispezifische single-chain Antikörper, sogenannte „bispezifische T-cell engagers (BITES)“ oder auch chimärische T-Zellrezeptoren, die bei unterschiedlichen Antigenen und Entitäten geprüft werden (Baeuerle *et al.*, 2009).

1.1.8 Wue-1 Antigen – ein potentiell Plasmazell-spezifisches Antigen

Wie zuvor ausgeführt, ist ein großes Hindernis für die Anwendung von adoptiver Immuntherapie beim MM der Mangel an geeigneten TAA. Alle bislang definierten Marker, die auf Plasmazellen exprimiert werden, werden auch auf anderen Zelltypen exprimiert. CD138 z.B. wird auch auf Epithelzellen exprimiert, CD38 als Aktivierungsantigen ist auch auf hämatopoetischen Stammzellen vorhanden, CD56, eine N-CAM Splicevariante, ist auch auf NK-Zellen exprimiert, HM1.24 auf Stromazellen oder anderen Geweben. Typische Pan-B-Zellmarker wie CD19, CD20 oder CD22 sind auf terminal differenzierten B-Zellen entweder herunterreguliert oder völlig abwesend. Aus diesen Gründen ist die Suche von Zielmolekülen, die möglichst spezifisch auf malignen Plasmazellen exprimiert werden, ein wichtiges Ziel von Forschungsbemühungen im Bereich MM.

In der Gruppe von Dr. Axel Greiner (vormals Institut für Pathologie, Universität Würzburg) wurde der Versuch unternommen, Antikörper zu generieren, die Plasmazell-spezifisch sind. Hierfür wurden Mäuse mit der MALT-Lymphom Zelllinie H3302/88 immunisiert und hieraus nach mehrmaligem Subklonieren stabile, immunglobulinsezernierende Hybridomzelllinien erzeugt. Diese wurden auf ihre Spezifität mittels Immunhistochemie und FACS-Analyse getestet. Ein Antikörper vom IgG1-Subtyp, der Wue-1 genannt wurde, wies die gewünschten Eigenschaften auf. Wue-1 band eine bislang noch nicht definierte Membranstruktur auf normalen und malignen Plasmazellen selektiv. Immunhistochemische Färbungen normaler Tonsillen oder primärer MM-Zellen mit Wue-1 bestätigten diese Selektivität, so dass mit Wue-1 nach jetzigem Wissenstand ein monoklonaler Antikörper generiert wurde, der als Grundlage für immuntherapeutische Strategien für das MM zur Verfügung stehen könnte. Bemerkenswert erscheint in diesem Zusammenhang auch, dass die Evaluation eines bispezifischen single-chain anti-Wue-1 × CD3 Antikörpers bei in vitro Zytotoxizitätsversuchen ermutigende Resultate zeigte.

1.1.8 Onkolytischen Viren und deren Kombination mit immuntherapeutischen Ansätzen

Eine Antitumoraktivität von Viren wurde während des gesamten 20. Jahrhunderts beobachtet. Virusinfektionen gingen unerklärlichen „Spontanremissionen“ bei Krebskranken in einigen Fällen voraus. In den 50er Jahren wurden Viren zur Bekämpfung von Krebserkrankungen getestet. Aufgrund unzureichender Effektivität und Bedenken bezüglich der Toxizität wurde dieser Therapieansatz jedoch bald wieder verlassen. Die in den letzten Jahren erzielten Erfolge in der Virologie mit genetischen Manipulationen sowie der Molekular- und Zellbiologie erlaubten jedoch ein zunehmend besseres Verständnis, wie eine spezifische Infektion von Tumorzellen durch Viren ermöglicht wird und wie diese Eigenschaft optimiert werden kann. 1991 wurde in einem murinen Mausmodell die Antitumorwirkung von Herpes simples Virus (HSV) gezeigt, was das Interesse an diesem Feld neu belebte. Eine Reihe von Viren wurde auf ihr onkolytisches Potential getestet und mit einigen wurden mittlerweile klinische Studien durchgeführt.

Onkolytische Viren sind selbstreplizierend, tumorselektiv und lysieren Tumorzellen nach stattgehabter Infektion. Ihre Replikation ist abhängig von der Wirtszelle und die Unterschiede zwischen den zellulären Prozessen bei normalen und malignen Zellen sind die Grundlage für eine tumorselektive Replikation. So sind die Charakteristika der zellulären Transformation mit Veränderungen im Zellzyklus, die Aktivierung von Onkogenen, eine veränderte Rezeptorexpression oder defekte Signalwege für die Fähigkeit der onkolytischen Viren verantwortlich, vor allem in neoplastischen Zellen zu replizieren. Onkolytische Viren können sowohl wildtypisch als auch in attenuierter Form tumorselektiv sein. Zudem ist es möglich, dass die Tumorspezifität auch durch genetische Modifikationen ermöglicht oder verstärkt wird. Mit onkolytischen Viren infizierte Zellen versterben entweder durch Nekrose oder aber durch Apoptose. Insbesondere für das MV gilt, dass das Potential als onkolytisches Virus in der Therapie maligner Erkrankungen auf dem Konzept beruht, dass das Virus im Tumor die Viruslast vervielfacht und so die antitumorale Effizienz erhöht, während die Tumorselektivität ein günstiges Toxizitätsprofil ergibt, wobei gesunde Gewebe geschont werden. Nicht überlappende Wirkmechanismen und Toxizitätsprofile sollten eine Kombination mit Standardtherapien ermöglichen. Zudem ergeben sich zunehmend Erkenntnisse darüber, dass obzwar die Antitumoraktivität von onkolytischen Viren gemeinhin als durch direkte

Mechanismen der Interaktion der Viren mit den Tumorzellen vermittelt gelten, eine Tumorerkrankung zu einer effektiven Antitumorimmunantwort führen kann.

Onkolytische Viren können rasch unter Einsatz rekombinanter DNA-Techniken modifiziert werden, so dass hierdurch das Erstellen von Viren nach Bedarf ermöglicht wird. Zudem ist das Hinzufügen von zusätzlichen Genen wie Toxinen möglich. Aufgrund der Replikationsfähigkeit ist es für die Elimination einer möglichst großen Menge an Tumorzellen zudem nicht notwendig, dass alle Tumorzellen durch die Viren initial infiziert werden.

Während eine Reihe verschiedener onkolytischer Viren in präklinischen Studien getestet wurden, erfolgte bislang die klinische Prüfung nur einiger weniger Viren. Lediglich vor ungefähr 10 Jahren wurde der erste Patient in einer klinischen Studie mit onkolytischen Viren therapiert. Obwohl in der Zwischenzeit über 50 Phase I und –II Studien durchgeführt wurden, gibt es bis dato nur eine publizierte Phase III Studie.

Im Hinblick auf die Erstellung von effektiven Therapiestrategien unter Einsatz von onkolytischen Viren sind allerdings auch einige Hindernisse zu überwinden. So infizieren lokal applizierte Viren nicht notwendigerweise andere Tumormanifestationen. Systemisch gegebene Viren sind hingegen sehr anfällig für unspezifische oder auch spezifische Immunabwehrmechanismen. Sogar nachdem eine erfolgreiche Tumorerkrankung erreicht wurde, können physikalische Barrieren innerhalb des Tumors eine effektive gleichmäßige intratumorale Ausbreitung verhindern. Auch können Modifikationen, die zur Tumorselektivität und somit zur Minimierung der Toxizität beitragen, zu einer Reduktion der Antitumorpotenz beitragen. Zudem existieren erhebliche Sicherheitsbedenken in Bezug auf den Einsatz von replikationskompetenten Viren. Virale Therapien lassen sich nicht mit den gewohnten konventionellen Toxizitäten oder Dosis-Wirkungsbeziehungen beschreiben und bislang gibt es keine optimalen Dosisschemata.

Insbesondere in den letzten Jahren wurden große Fortschritte bei der Erforschung und Entwicklung vor allem eines attenuierten Masernvirusimpfstammes (Edmonston B) als onkolytisches Instrument gemacht. Dieser hat erfolgversprechende Antitumoraktivität gegen eine Reihe verschiedener Entitäten wie Multiples Myelom, Glioblastom, Ovarial- oder Prostatakarzinom gezeigt. Eine Infektion von Tumorzellen erfolgt über einen der beiden natürlichen Virusrezeptoren CD46 oder CD150, was zumeist über den Einbezug von Nachbarzellen, sogenannter Bystander-Zellen, zu einem Synzytium führt, das zahlreiche infizierte Zellen enthält, die schließlich zugrunde gehen. Obwohl dieser Stamm nicht mehr dem aktuellen Impfstamm entspricht, kann aufgrund der mit ihm gesammelten Erfahrungen bei Vakzinprogrammen von einem sehr guten Sicherheitsprofil ausgegangen werden. Aktuell werden in der Mayo Klinik (Rochester) zwei rekombinante MV dieser Art (MV-CEA und

MV-NIS) in drei verschiedenen klinischen Phase-I Studien bei Patienten mit Glioblastom, Ovarialkarzinom und Multiplem Myelom getestet. Diese sind „first in human use“ Dosiseskaltionsstudien und testen die Sicherheit der intratumoralen, intraperitonealen und intravenöse Gabe dieses MV-Stammes bei Patienten mit den oben genannten Entitäten im Falle des Multiplen Myeloms sogar in Kombination mit Cyclophosphamid. Des weiteren wurden im Zuge einer Optimierung der Spezifität des eingesetzten MV durch Mutationsstudien zunächst die Bindungsstellen des viralen Proteins für die natürlichen Rezeptoren CD46 und CD150 so verändert, dass diese Rezeptoren nicht mehr erkannt werden konnten und in einem zweiten Schritt völlig neu ausgerichtete MV-Varianten generiert, die mit Hilfe von single chain Antikörpern selektiv bestimmte z.B. tumorassoziierte Antigene erkennen. Auf diese Art wurde eine effektive Kombination von onkolytischen Viren mit diesem immuntherapeutischen Ansatz erstellt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde diesem Prinzip folgend das erste MV erzeugt, in das der nach heutigem Wissen erste für gesunde und maligne Plasmazellen spezifische Antikörper Wue-1 in Form eines single-chain Antikörpers, scFvWue, inkorporiert wurde.

1.2 Masern

1.2.1 Historische und epidemiologische Übersicht

Dem persischen Arzt und Gelehrten Al-Razi, in der abendländischen Literatur unter dem Namen Rhazes bekannt, wird die Erstbeschreibung der Masern um etwa 900 n. Chr. zu erkannt (Griffin 2001, Katz 1995, Weissbrich *et al.* 2003). Es wird angenommen, dass er in einer seiner Schriften die Pocken von den Masern deskriptiv und klinisch unterscheiden konnte (Griffin 2001).

Masern werden heute als eine relativ neue Krankheit des Menschen angesehen. Es wird vermutet, dass sie durch enges Zusammenleben von Mensch und Rind in dicht bevölkerten Gebieten des vorderen und mittleren Orients in der Zeit der ersten Hochkulturen entstanden und im 8. Jahrhundert n. Chr. über die Sarazeneninvasion nach Mitteleuropa gelangt sind (Griffin 2001, McNeill 1976, Norrby *et al.* 1992, Rolleston 1937). Es dauerte allerdings noch etwa ein Jahrtausend, bis Anderson und Goldberger Masern 1911 als eine virale Erkrankung identifizieren konnten (Anderson & Goldberger 1911), und erst nach der erfolgreichen Isolierung und Propagierung des Masernvirus 1954 durch Enders und Peebles (Enders & Peebles 1954) war es möglich, auch einen Impfstoff zur Infektionsprophylaxe zu entwickeln. Bis zur Einführung der Masernvakzine galten Masern als klassische Kinderkrankheit, waren doch 95–98 % der Kinder bis zum Alter von 18 Jahren mit dem Masernvirus infiziert (Langmuir 1962, Langmuir *et al.* 1962, Snyder *et al.* 1962). In den Vereinigten Staaten von Amerika sank die Zahl der berichteten Masernfälle nach Einführung des Masernimpfstoffs von 894.134 im Jahr 1941 um mehr als 99,7 % auf 138 im Jahr 1997 (Maldonado 2001).

Masern gehören immer noch zu einer der gefährlichsten Infektionskrankheiten des Menschen. Weltweit verstarben im Jahr 2001 etwa 750.000 Menschen, meist Kinder, an Masern. Damit gehören sie zu einer der führenden Todesursachen im Kindesalter weltweit (WHO 2002). Die Weltgesundheitsorganisation WHO und das Weltkinderhilfswerk der Vereinten Nationen UNICEF verfolgen nach der erfolgreichen, globalen Eradikation der Pocken das Ziel, auch Masern weltweit zu eliminieren. Der strategische Plan von 2001 sah vor, die mit Masern verbundenen Todesfälle bis 2005 durch konsequente Impfkampagnen zu halbieren und Masern in Amerika bis 2000, in Europa bis 2007 und im östlichen Mittelmeer bis 2010 zu eradizieren (WHO 2001). Seit 1996 sind zwar in Finnland keine autochthonen Masernerkrankungen mehr aufgetreten (Rose 2003), jedoch selbst in Ländern mit hohem medizinischem Standard erleiden diese Pläne und Bemühungen immer wieder Rückschläge. Die Masernepidemien in der ersten Hälfte des Jahres 2000 im Osten Irlands, Ende 2001 bis Mitte

2002 im Raum Coburg, Anfang bis Mitte des Jahres 2002 in Süditalien und in der ersten Hälfte des Jahres 2005 in Hessen sind beispielhaft für einen insuffizienten Durchimpfungsgrad sogar in industrialisierten Ländern (Robert-Koch-Institut 2000a/b, 2002a–c, 2003, 2005a–c). Und erst kürzlich war in einer angesehenen deutschen Tageszeitung zu lesen: „Masern breiten sich in Nordrhein-Westfalen aus“ (Frankfurter Allgemeine Zeitung, 11.05.2006).

Aktuelle epidemiologische Daten für Masern in Deutschland liegen aus den Jahren 2004 und 2005 vor (Robert-Koch-Institut 2006). Bundesweit wurden im vergangenen Jahr 2005 778 Masernerkrankungen gemeldet. Die Inzidenz belief sich auf 0,9 pro 100.000 Einwohner, wobei die altersspezifische Inzidenz bei den Einjährigen am höchsten lag. Bei zweien der erkrankten Kinder wurde eine Masernenzephalitis, bei 17 eine Pneumonie und bei elf eine Otitis media diagnostiziert, ein 14jähriges Mädchen verstarb an den Folgen einer Masernvirusinfektion. Bei 96 % der an Masern Erkrankten lagen Informationen zum Impfstatus vor, 89 % davon waren nicht geimpft. Erhebungen zum Durchimpfungsgrad aus dem Jahr 2004 belegen, dass nur 93 % der gerade eingeschulten Kinder mindestens einmal und nur 66 % auch ein zweites Mal gegen Masern geimpft worden waren.

1.2.2 Klassische akute Masern

Masern sind eine hochkontagiöse Erkrankung, deren infektiöses Agens das Masernvirus ist. Die Übertragung erfolgt aerogen als Tröpfcheninfektion über den Respirationstrakt oder gar über die Bindehaut meist schon während des Prodromalstadiums, das nach einer Inkubationszeit von 10–12 Tagen ohne klinische Zeichen einer Infektion mit uncharakteristischen katarrhalischen Symptomen wie Rhinitis, Halsschmerzen, Heiserkeit, Müdigkeit und Appetitlosigkeit beginnt. Nach 1–2 Tagen nehmen diese unspezifischen Beschwerden zu und werden von Fieber, trockenem oder bellendem Husten und einer Keratokonjunktivitis begleitet, die zu einer ausgesprochenen Lichtscheu führt. Feinkörnige, leicht erhabene, gräulich-weiße Effloreszenzen mit rötlichem Hof an der Wangenschleimhaut, die nach weiteren 2–3 Tagen in Verbindung mit einem fleckigen, dunkelroten Exanthem erscheinen, werden als Kopliksche Flecken bezeichnet und als pathogenomonisch für eine Infektion mit dem Masernvirus angesehen (Griffin 2001, Katz 1995, Maldonado 2001, Schuster & Kreth 2001). Nach einem leichten Fieberabfall geht das Prodromalstadium unter abruptem Fieberanstieg in das Exanthemstadium über. Das zunächst feinfleckige Exanthem beginnt hinter den Ohren oder an der Stirn und breitet sich makulopapulös innerhalb eines

Tages zentrifugal über den Stamm bis auf die Oberschenkel aus und erreicht nach 2–3 Tagen die Füße. Die Schwere der Erkrankung korreliert mit der Ausprägung des Ausschlags, der nur den Stamm erreichen oder sich konfluent über das ganze Integument erstrecken kann. Nicht selten zeigt sich eine milde, hämorrhagische Komponente mit Ekchymosen oder Petechien. Meist besteht zudem eine generalisierte Lymphadenopathie, bisweilen eine milde Splenomegalie. Bei der Hälfte der akut an Masern Erkrankten sind pathologische, elektroenzephalographische Veränderungen nachzuweisen, die in der Regel temporärer Natur sind. Der unkomplizierte Verlauf ist durch rasche Entfieberung und das Abblassen des Exanthems unter bräunlicher Verfärbung vier Tage nach seinem Beginn in Ausbreitungsrichtung gekennzeichnet. Während die übrigen Symptome rückläufig sind, besteht der Husten etwa eine Woche und die allgemeine Mattigkeit einige Wochen fort. Es wird eine effiziente und protektive Immunantwort ausgelöst, die eine lebenslange Immunität nach sich zieht (Griffin 2001, Katz 1995, Maldonado 2001, Panum 1938, Schuster & Kreth 2001). Die Diagnose kann wegen der charakteristischen Symptome im Rahmen einer Epidemie meist klinisch gestellt werden. Eine Leukopenie mit Erniedrigung der Granulo- wie auch der Lymphozytenzahlen ist ein typischer hämatologischer Laborbefund. Bei Einzelerkrankungen sollte die Diagnose serologisch gesichert werden. Ein Virusdirektnachweis oder eine Virusisolierung ist nur in Ausnahmefällen nötig. Häufig wird bei Erwachsenen eine hepatische Beteiligung mit Oberbauchschmerzen und einer leichten Erhöhung der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, ggf. verbunden mit einer Hyperbilirubinämie, beobachtet (Maldonado 2001, Schuster & Kreth 2001). Die Therapie ist symptomatisch, eine spezifische antivirale Therapie gibt es nicht. Eine Therapie mit Vitamin A kann eine schwere Maserninfektion bei hospitalisierten oder unterernährten Kindern positiv beeinflussen (Maldonado 2001).

1.2.3 Komplikationen und Folgeerkrankungen

Komplikationen einer Infektion mit dem Masernvirus betreffen eine Reihe von Organ-systemen. Die masernvirusinduzierte Immunsuppression kann für Monate anhalten und somit opportunistische Infektionen begünstigen oder gar latente virale oder bakterielle Infektionen reaktivieren. Otitis media oder Bronchopneumonien werden meist durch Pneumokokken, Streptokokken der Gruppe A, Staphylococcus aureus oder Haemophilus influenzae Typ B verursacht. Bronchiolitiden oder Laryngotracheobronchitiden werden nur noch selten beobachtet. Bei immunsupprimierten Patienten kann die Riesenzellpneumonie einen fatalen Verlauf nehmen. Elektrokardiographische Veränderungen können Ausdruck einer transienten myo- oder perikarditischen Komponente oder atrioventrikulärer Überleitungsstörungen sein,

sind aber meist nicht von klinischer Relevanz. Nicht ungewöhnlich hingegen sind gastrointestinale Beschwerden und Diarrhoen, die eine massive Dehydratation bewirken und vor allem in Entwicklungsländern große Probleme bereiten können. Hämostaseologische Störungen können sich sowohl als disseminierte intravasale Gerinnung mit Gangränbildung oder Verbrauchskoagulopathie im akuten Stadium als auch als thrombozytopenische Purpura erst einige Wochen nach einer Masernvirusinfektion äußern. Als Sonderform gelten die hämorrhagischen Masern oder black measles, die mit einem plötzlichen Fieberanstieg, einem konfluenten, hämorrhagischen Exanthem und Schleimhautblutungen aus Mund, Nase oder Magen-Darm-Trakt einhergehen und auf eine Dysregulation der intravasalen Gerinnung oder auf eine vaskuläre Schädigung zurückzuführen sind. Zeichen einer Enzephalitis oder Pneumonie kommen hinzu (Griffin 2001, Katz 1995, Maldonado 2001, Schuster & Kreth 2001, Weissbrich *et al.* 2003).

Besonders gefürchtet sind neurologische Komplikationen und Folgeerkrankungen. Der häufige Nachweis elektroenzephalographischer Veränderungen und pleozytöser Liquorveränderungen spricht für einen möglichen Neurotropismus des Masernvirus.

Die akute postinfektiöse Masernenzephalomyelitis ist die häufigste neurologische Komplikation, ihre Inzidenz liegt unter den an Masern Erkrankten bei 1–2:1.000. Sie beginnt im Mittel zwischen dem 3. und 9. Tag nach Auftreten des Exanthems, kann aber auch schon während der Prodromalphase der Masern oder bis zu einige Wochen nach Krankheitsbeginn mit Fieber, Kopfschmerzen, Vigilanzstörungen, zerebralen Anfällen, fokalen neurologischen Auffälligkeiten oder zentralen Koordinationsstörungen klinisch symptomatisch werden (Katz 1995, Maldonado 2001). Ätiologisch wird eine autoimmunologisch vermittelte Reaktion favorisiert, die gegen das basische Myelinprotein gerichtet ist, eine Demyelinisierung nach sich zieht und auf einem molekularen Mimikry beruhen kann (Griffin 2001, Weissbrich *et al.* 2003). Im Liquor lässt sich häufig eine milde lymphozytäre Pleozytose nachweisen, eine Eiweißerhöhung ist nicht obligat. Für die Diagnosestellung ist der klinische und zeitliche Zusammenhang mit einer Masernvirusinfektion entscheidend (Weissbrich *et al.* 2003). Die akute postinfektiöse Masernenzephalomyelitis gilt als eine ernste und gefährliche Komplikation. Sie ist mit einer Letalität von 30 % und einer Defektheilungsrate von etwa 20 % behaftet, die Verhaltensauffälligkeiten, mentale Einschränkungen, zerebrale Anfälle oder Taubheit beinhalten kann (Schuster & Kreth 2001, Weissbrich *et al.* 2003).

Die measles inclusion body encephalitis ist eine besondere Enzephalitisform, die auf einer direkten Invasion des zentralen Nervensystems mit dem Masernvirus beruht. Sie manifestiert sich klinisch nach einer Latenz von wenigen Wochen bis zu sechs Monaten bei Patienten

unter massiver Immunsuppression und führt in der Regel rasch zum Tod (Katz 1995, Schuster & Kreth 2001).

Die subakute sklerosierende Panenzephalitis ist eine sehr seltene, persistente und langsam progrediente Erkrankung des zentralen Nervensystems. Sie folgt einer Masernvirusinfektion mit einer Latenz von 6–8 Jahren, die Streuung von 2–30 Jahren allerdings ist groß. Das Erkrankungsalter liegt damit durchschnittlich zwischen 9 und 13 Jahren, selbst junge Erwachsene können betroffen sein. Seit der Einführung der Masernimpfung ist die Inzidenz der SSPE deutlich gesunken, eine Inzidenz von 1:10.000 in einer ungeimpften Population stellt dabei jedoch keine außerordentliche Seltenheit der Erkrankung dar. Der klinische Verlauf weist eine hohe Variabilität auf. Die Erkrankung manifestiert sich in Stadium I mit einem generalisierten Nachlassen intellektueller Leistungen. Chorioretinitische Veränderungen des Augenhintergrunds als Folge einer zentralnervösen Masernvirusinfektion können zu diesem Zeitpunkt mitunter schon beobachtet werden. Der Übergang in das Stadium II ist nach Wochen oder Monaten durch das Auftreten neurologischer Symptome gekennzeichnet. Fokale oder generalisierte rhythmische Myoklonien mit einer Frequenz von etwa 5–15/min sind ein charakteristisches Symptom, das mit periodischen, hochvoltigen Komplexen langsamer Wellen im Elektroenzephalogramm, den Radermecker-Komplexen, korrespondiert. Dezerebration, Ausfälle essentieller Hirnstammfunktionen und völliger Verlust kortikaler Aktivitäten sind Kennzeichen der Stadien III und IV. In 5 % der Fälle werden Spontanremissionen beobachtet, zwei Drittel der Patienten versterben in Stadium III etwa 3–5 Jahre nach Ausbruch der ersten Symptome. Die Verdachtsdiagnose kann anamnestisch und klinisch gestellt werden, die endgültige Diagnosesicherung sollte neben der serologischen Untersuchung auf erhöhter Titer masernvirusspezifischer IgM- und IgG-Antikörper unbedingt den Nachweis der intrathekalen Bildung masernvirusspezifischer IgG-Antikörper einschließen. Eine elektroenzephalographische Untersuchung kann wegweisend sein. Eine spezifische Therapie gibt es nicht, und nur die Masernschutzimpfung stellt eine wirksame Prävention der Erkrankung dar (Katz 1995, Maldonado 2001, Schuster & Kreth 2001, Weissbrich *et al.* 2003).

1.3 Das Masernvirus

Das Masernvirus ist ein umhülltes Virus mit einem nichtsegmentierten, einzelsträngigen RNA-Genom negativer Polarität. Es ist Mitglied und Namensgeber des Genus *Morbillivirus* und gehört damit der Ordnung der *Mononegavirales*, der Familie der *Paramyxoviridae* und der Unterfamilie der *Paramyxovirinae* an, die erst vor einigen Jahren zusammen mit der Unterfamilie der *Pneumovirinae* innerhalb der Familie der *Paramyxoviridae* neu gegründet wurde (International Committee on Taxonomy of Viruses 2002).

Unter dem Genus *Morbillivirus* sind weitere, phylogenetisch mit dem Masernvirus verwandte, ausschließlich tierpathogene Viren klassifiziert: das Hundestaupavirus CDV, das Delphinmorbillivirus DMV, das Seehundestaupavirus PDV, das Tümmlermorbillivirus PMV, das Peste-des-petits-ruminants-Virus PPRV und das Rinderpestvirus RPV. Eine besonders enge Verwandtschaft besteht wohl zum Rinderpestvirus (McNeill 1976).

Das Masernviruspartikel ist ein pleomorphes Virion mit einer variablen Größe von 100–300 nm. Seine Hülle besteht aus einer Lipiddoppelschicht und den beiden viralen Oberflächenproteinen. Das Hämagglutininprotein ist ein glykosyliertes Transmembranprotein vom Typ II und von etwa 80 kDa Größe, das in der Virushülle oder an der Zelloberfläche als Homotetramer vorliegt. Es bindet an den zellulären Rezeptor und determiniert somit den Tropismus des Masernvirus. Das Fusionsprotein ist ein glykosyliertes Transmembranprotein vom Typ I und von etwa 60 kDa Größe. Aus dem Vorläuferprotein F₀ wird in die beiden Untereinheiten F₁ und F₂ gespalten, die einen über eine Disulfidbrücke verbundenen funktionellen Komplex bilden. Als Homotrimer ist er in Anwesenheit des H-Proteins für die Fusion der Virus- und der Wirtszellmembran essentiell. An der Innenseite der Virushülle stabilisiert das 37 kDa große Matrixprotein M mindestens eines der beiden viralen Oberflächenproteine und vermittelt die Vernetzung von Hülle und Nukleokapsid. Dabei scheinen auch Aktinfilamente eine Rolle zu spielen, die von der infizierten Zelle stammen und bei der Knospung im Viruspartikel verbleiben (Griffin 2001, Horikami & Moyer 1995).

Die virale, nichtsegmentierte, einzelsträngige RNA negativer Polarität ist in einem helikalen Ribonukleoprotein eingebettet. Das 60 kDa große Nukleokapsidprotein bildet mit der viralen RNA einen stabilen Komplex, schützt sie vor dem enzymatischen Abbau durch zelluläre Nukleasen und moduliert ihre Replikation. Ein weiterer Bestandteil des Ribonukleokapsidkomplexes ist das mit etwa 250 kDa größte virale Protein, das Large-Protein, das zusammen mit dem 70 kDa großen Phosphoprotein die viruseigene RNA-abhängige RNA-Polymerase bildet. Das C- und das V-Protein sollen die Masernvirusrepli-

kation regulieren und für die Masernvirusvirulenz unerlässlich sein (Griffin 2001, Horikami & Moyer 1995).

Das Genom umfasst innerhalb der 15.894 Nukleotide sechs Gene für die Strukturproteine und eine nichttranslatierte Region von etwa 1.000 Nukleotiden. Das Phosphoproteingencodiert für das P-, das C- und das V-Protein (Griffin 2001).

Die Adsorption des Virus an die Wirtszelle ist der erste Schritt des Infektionszyklus. Das Virus bindet dabei in der Regel spezifisch an ein zelluläres Oberflächenmolekül, das für bestimmte Aufgaben und Funktionen im Wirtsorganismus verantwortlich ist. Für das Masernvirus konnten in der Vergangenheit zwei Oberflächenmoleküle als zelluläre Rezeptoren identifiziert werden: das *membrane cofactor protein* (MCP oder CD46) und das *signaling lymphocytic activation molecule* (SLAM oder CD150).

CD46 gehört zur Familie der Komplementrezeptoren und ist ein ubiquitär exprimiertes Glykoprotein, das die autologe Komplementaktivierung reguliert und körpereigene Zellen schützt, indem es die Komplementfaktoren C3b und C4b bindet und zur Inaktivierung freigibt. Eine verminderte Expression von CD46 führt zu einer erhöhten Empfindlichkeit und Anfälligkeit der Zellen gegenüber einer komplementvermittelten Lyse (Horikami & Moyer 1995, Liszewski *et al.* 1991, Oglesby *et al.* 1992, Loveland *et al.* 1993, Schnorr *et al.* 1995). CD46 wird ubiquitär auf allen humanen Körperzellen mit Ausnahme der Erythrozyten exprimiert (Cole *et al.* 1985). Das Ausmaß seiner Expression auf der Zelloberfläche kann innerhalb des Organismus, abhängig von der Zellart, sehr stark variieren (Ogata *et al.* 1997, Seya *et al.* 1990). Beim Menschen werden durch Vererbung und alternatives Spleißen hauptsächlich vier Isoformen exprimiert (Riley-Vargas *et al.* 1994). Abbildung 3 bietet eine schematische Darstellung der vier wesentlichen Isoformen von humanem CD46.

CD46 wurde 1993 als zellulärer Rezeptor für attenuierte Masernvirusstämme beschrieben und bestätigt (Dörig *et al.* 1993, Nanche *et al.* 1993). Weitere Experimente zeigten daraufhin, dass für die Bindung des Hämagglutininproteins die beiden äußeren CCP- bzw. SCR-Domänen 1 und 2 ausreichen, während die Komplementbindung über die CCP- bzw. SCR-Domänen 2–4 vermittelt wird (Buchholz *et al.* 1997, Casasnovas *et al.* 1999, Manchester *et al.* 1995, Manchester *et al.* 2000a). Jede der humanen Hauptisoformen von CD46 kann als Rezeptormolekül fungieren (Gerlier *et al.* 1994, Manchester *et al.* 1994, Varior-Krishnan *et al.* 1994). Virulente Masernvirusstämme und klinische Masernvirusisolate vermögen CD46 nicht oder nur in Ausnahmefällen mit sehr geringer Affinität zu binden, rein CD46-exprimierende Zellarten werden daher nicht oder nur wenig effizient infiziert (Bartz *et al.* 1998, Buckland & Wild 1997, Erlenhoefner *et al.* 2002, Hsu *et al.* 1998, Manchester *et al.* 2000b, Ono *et al.* 2001, Tanaka *et al.* 1998, Tatsuo *et al.* 2000a). Das Ausmaß der Expression

von CD46 an der Oberfläche von Wirtszellen kann durch Masernviren biphasisch moduliert werden. Allein der Kontakt der Wirtszelle mit CD46-interagierenden Masernvirusstämmen oder entsprechend infizierten Zellen führt zu einer frühen, die durch die Infektion der Wirtszelle einsetzende Virusreplikation zu einer endgültigen Herabregulation von CD46 von ihrer Oberfläche (Bartz *et al.* 1998, Schneider-Schaulies *et al.* 1995a). Die Fähigkeit eines Masernvirusstamms zur Herabregulation von CD46 kann dabei auf wenige Aminosäuren in der Sequenz des Hämagglutininproteins reduziert werden (Bartz *et al.* 1996, Lecouturier *et al.* 1996, Hsu *et al.* 1998). Einem molekularen Magneten gleich dient CD46 ebenfalls als zellulärer Rezeptor für eine Reihe humanpathogener Erreger: *Streptococcus pyogenes* (Okada *et al.* 1995), *Neisseria gonorrhoeae* und *meningitidis* (Kallstrom *et al.* 1997), Humanes Herpesvirus 6 (Santoro *et al.* 1999), viele Adenoviren der Gruppen B und D (Gaggar *et al.* 2003, Marttila *et al.* 2005, Segerman *et al.* 2003) und uropathogene *Escherichia coli* (Li *et al.* 2006).

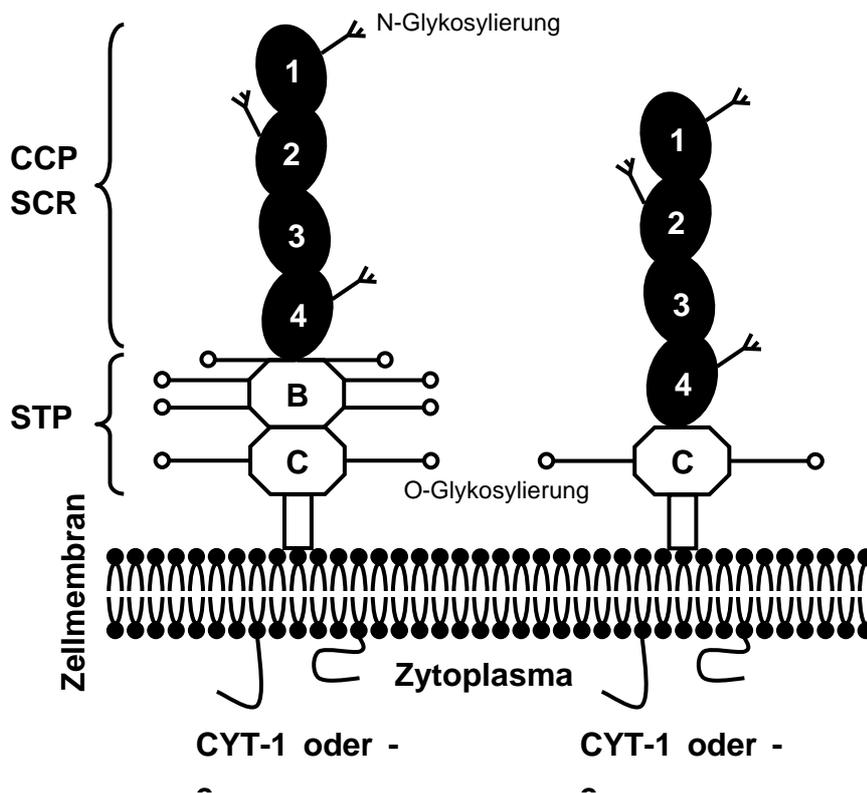


Abbildung 3 Schematische Darstellung der vier humanen Hauptisoformen von CD46

Schematische Darstellung der vier humanen Hauptisoformen von CD46, die sich durch eine variable Expression der juxtamembranen, O-glykosylierten Domänen STP und der zyttoplasmatischen Enden CYT-1 oder -2 unterscheiden (modifiziert nach Riley-Vargas *et al.* 2004). Schematische Darstellung der vier humanen Hauptisoformen von CD46

SLAM hingegen ist ein immunmodulierendes Glykoprotein, das der CD2-Untergruppe der Immunglobulin-Superfamilie angehört und konstitutiv an der Oberfläche unreifer Thymozyten, T-Gedächtniszellen, einem Teil B-Lymphozyten und von aus Monozyten generierten dendritischen Zellen exprimiert wird (Cocks et al. 1995, Sidorenko & Clark 1993). Das Expressionsniveau von SLAM ist bei der Untergruppe der T-Helfer-1-Zellen um ein Vielfaches höher als bei T-Helfer-2-Zellen (Hamalainen et al. 2000). Eine Induktion von SLAM wird bei aktivierten B- und T-Lymphozyten, dendritischen Zellen und Monozyten beobachtet (Cocks et al. 1995, Minagawa et al. 2001, Ohgimoto et al. 2001, Polacino et al. 1996, Punnonen et al. 1997, Sidorenko & Clark 1993). SLAM wird in vier verschiedenen Isoformen exprimiert: zwei membrangebundene Formen mit verschieden langer zytoplasmatischer Domäne sowie einer löslichen und einer zytoplasmatischen Form (Cocks et al. 1995). Stimulatorische Aktivität besitzen neben der membrangebundenen auch lösliche Formen von SLAM (Punnonen et al. 1997). SLAM kann auch mit niedriger Affinität als Selbstligand fungieren (Mavaddat et al. 2000). Monoklonale, SLAM-spezifische Antikörper vermögen eine multimodale Aktivierung von B- und T-Lymphozyten auszulösen (Cocks et al. 1995, Sidorenko & Clark 1993). Eine schematische Darstellung von SLAM ist in Abbildung 4 dargestellt.

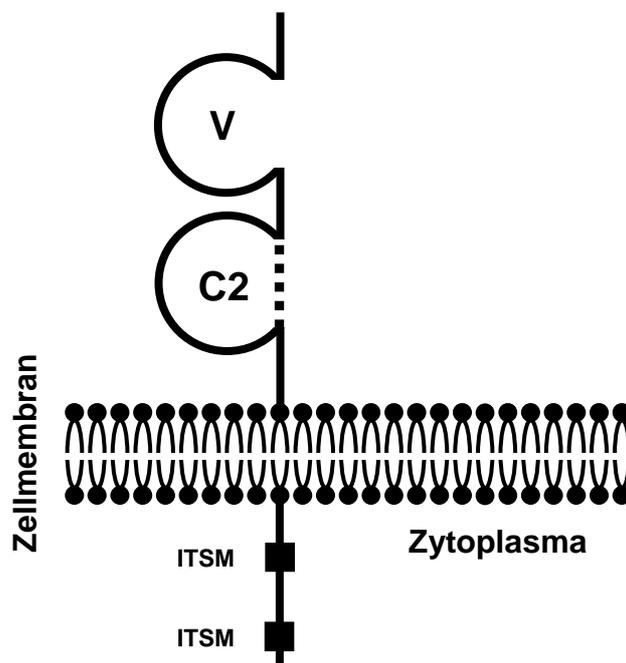


Abbildung 4 Schematische Darstellung der membrangebundenen Form von SLAM

Schematische Darstellung der membrangebundenen Form von SLAM, das durch eine variable distale Domäne V und eine konstante proximale Domäne C2 gekennzeichnet ist. Das zytoplasmatische Ende mit den zwei tyrosinhaltigen Motiven ITSM ist für die intrazelluläre Signalübertragung notwendig (modifiziert nach Sidorenko & Clark 2003). Schematische Darstellung der membrangebundenen Form von SLAM

CD150 aus der SLAM-Gruppe wurde erstmals 2000 als zellulärer Rezeptor für attenuierte und virulente Masernvirusstämme beschrieben und im Jahr darauf bestätigt (Erlenhoefer *et al.* 2001, Hsu *et al.* 2001, Tatsuo *et al.* 2000b). Es scheint niederaffin mit Impf- und hochaffin mit Wildtypstämmen zu interagieren (Erlenhofer *et al.* 2002, Ono *et al.* 2001b). Für die Masernvirusbindung ist die äußere, variable Domäne V essentiell (Ohno *et al.* 2003, Ono *et al.* 2001a). Auch CD150 wird von der Oberfläche der Wirtszelle nach Kontakt oder Infektion mit Masernviren herabreguliert (Erlenhoefer *et al.* 2001, Tanaka *et al.* 2002, Welstead *et al.* 2004). Wegen seiner immunmodulierenden Funktion und seiner Interaktion mit Masernviren wird SLAM eine bedeutende Rolle bei der masernvirusinduzierten Immunsuppression zugeschrieben (Dhiman *et al.* 2004, Hahm *et al.* 2003, Hahm *et al.* 2004, Sidorenko & Clark 2003). Die biologische Bedeutung des immunmodulierenden Moleküls SLAM wird umso mehr bewusst, dass Mutationen oder Deletionen des die Funktion von SLAM kontrollierenden SLAM-assoziierten Proteins den schweren Immundefekt des lymphoproliferativen Syndroms verursachen (Nichols *et al.* 2005).

Die Eintrittspforte für Masernviren in den menschlichen Organismus bilden der obere und untere Respirationstrakt, vermutlich auch die konjunktivalen Schleimhäute. Über einen noch nicht in Gänze geklärten Pathomechanismus wird das Masernvirus über infizierte mukosale Makrophagen und dendritische Zellen in die lokalen, drainierenden Lymphknoten transportiert. Von hier aus breitet sich das Virus in einer ersten Virämiephase in das gesamte retikuloendotheliale System, hier besonders in weitere Lymphknoten und die Milz, und den übrigen Respirationstrakt aus. Im lymphatischen Gewebe und an den epithelialen Oberflächen des Respirationstrakts entstehen Warthin-Finkeldey-Zellen, Riesenzellen mit eosinophilen, zytoplasmatischen Einschlusskörperchen. In einer zweiten Virämiephase breitet sich das Virus nun endgültig systemisch aus und befällt Haut, Schleimhäute, Lunge, Gastrointestinaltrakt, Leber, Nieren und Harnblase. Das Virus repliziert dort vorwiegend in Endothelzellen, Epithelzellen oder Monozyten. Eine Entzündungsreaktion mit Vasodilatation, Permeabilitätserhöhung und Ödembildung, mononuklärer Infiltration und Infektion des umgebenden Gewebes ist die Folge (Griffin 2001, Katz 1995, Weissbrich *et al.* 2003).

Die Symptome der Prodromalphase werden durch die systemische Infektion und die Zerstörung der epidermalen Schutzschicht der nasopharyngealen und tracheobronchialen Schleimhäute gekennzeichnet. Die apikale Freisetzung replizierter Masernviren fördert deren weitere epitheliale Ausbreitung und führt zu einer effizienten Infektiosität des Patienten (Weissbrich *et al.* 2003).

Histopathologisch scheint die initiale Infektion von dermalen, kapillären Endothelzellen bei der Entstehung des charakteristischen makulopapulösen Exanthems die entscheidende Rolle zu spielen. Einzelne Berichte gehen von der Ausbreitung der Infektion auf epidermale Keratinozyten aus (Griffin 2001, Takahashi *et al.* 1996). Eher scheint jedoch eine Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ eine perikapilläre zytotoxische Entzündungsreaktion auszulösen, die zur Ödembildung, Epithelzellnekrose und mononukleärer Infiltration und damit zu den typischen Effloreszenzen führt (Kimura *et al.* 1975, Weissbrich *et al.* 2003).

Die pathogenetischen Faktoren für die Entstehung neurologischer Komplikationen sind noch weitgehend unbekannt. Ursächlich für die Entstehung der akuten postinfektiösen Masernenzephalomyelitis wird eine autoimmunologisch vermittelte Reaktion favorisiert, die gegen das basische Myelinprotein gerichtet ist, eine Demyelinisierung nach sich zieht und möglicherweise auf einem molekularen Mimikry beruht (Griffin 2001, Weissbrich *et al.* 2003). Die neuropathologische Begutachtung bei der *measles inclusion body encephalitis* zeigt eine massive Ansammlung eosinophiler, aus Nukleokapsid bestehender Einschlusskörperchen in Neuronen und glialen Zellen. Durch eine fehlerhafte Replikation und Mutationen im Masernvirusgenom werden keine kompletten und damit infektiösen Masernviruspartikel vervielfältigt. Die intrazerebrale Ausbreitung der Ribonukleoproteinkomplexe wird durch mögliche interzelluläre Mikrofusionen erklärt (Weissbrich *et al.* 2003). Bei der subakuten sklerosierenden Panenzephalitis wird neuropathologisch eine diffuse Enzephalitis der grauen und weißen Substanz vorgefunden. Endothelzellen, Neurone, Astrozyten, Oligodendrozyten und mikrogliale Zellen beherbergen dabei große Nukleokapsideinschlüsse. Der pathogenetische Ablauf dieser progredienten Erkrankung ist trotz intensiver Bemühungen noch weitgehend unbekannt. Eine defiziente Masernvirusreplikation sowie eine Immunantwort scheinen zu einer langsamen interneuronalen Ausbreitung von Masernvirusproteinen zu führen, die nicht von einem speziellen neurotrophen Masernvirusstamm, sondern von einem an sich normalem Wildtypstamm stammen (Griffin 2001, Weissbrich *et al.* 2003).

1.4 Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit

Mit den bislang vorhandenen Möglichkeiten ist das Multiple Myelom auch nach deutlichen Fortschritten in der Therapie eine meist unheilbare Erkrankung. Vor diesem Hintergrund ist die Suche nach neuen therapeutischen Optionen und somit auch das Erschließen neuer Kombinationsmöglichkeiten auf dem Weg, eine möglichst langfristige Krankheitskontrolle bzw. langanhaltende oder dauerhafte krankheitsfreie Zeit für den betroffenen Patienten zu erreichen, eine essentielle Voraussetzung. Im Zuge dieser Bemühungen erscheint u.a. der Ansatz, maligne Plasmazellen spezifisch mit onkolytischen Viren zu infizieren und eliminieren, vielversprechend.

Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, basierend auf dem attenuierten Edmonston B Masernvirusstamm, ein neues rekombinantes pseudotypisiertes Masernvirus zu klonieren, das selektiv primäre MM Zellen infiziert und abtötet, indem ein mutiertes H- Protein verwendet wird, das nicht mehr zur Interaktion mit den natürlichen Rezeptoren CD46 oder CD150 in der Lage ist und das zusätzlich mit einem single chain Antikörper verbunden ist, scFvWue, der MM Zellen spezifisch bindet. Mit Hilfe eines etablierten Rescuesystems aus cDNA sollen in vitro replikationskompetente Virionen erstellt werden und geprüft werden, in wie weit diese vorgenommenen Veränderungen die Fähigkeit zur effizienten Replikation und Produktion infektiöser Viren in vitro beeinflussen. Zur funktionellen Testung des neuen rekombinanten Virus MV-Wue, soll die Spezifität des Virus für diese malignen Zellen in Infektionsexperimente unter Verwendung von primären MM Zellen gezeigt sowie der Mechanismus der Ablation identifiziert werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Zellen

Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien waren im Labor von Dr. Topp verfügbar oder wurden vom Labor von Steven J. Russell, Molecular Medicine Program, Mayo Clinic Rochester, zur Verfügung gestellt.

Tabelle 5 Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Medium	Herkunft
293-3-46	embryonale, humane Nierenzelllinie stabil mit N- und P-Protein sowie mit T7 RNA Polymerase transfiziert	DMEM mit 10% FCS mit 1,2 mg/ml G418	Radecke et al., 1995
Vero His	Fibroblastenzelllinie (Niere) der afrikanischen grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>)	DMEM mit 10% FCS mit Penicillin und Streptomycin	Nakamura et al., 2005
U266	Multiple Myelom Zelllinie	RPMI mit 10% FCS mit Penicillin und Streptomycin	Nilsson et al., 1970
CHO	Epithelzelle (Ovar) des Chinesischen Hamsters (<i>Cricetulus griseus</i>)	DMEM mit 5% FCS	Puck et al., 1958
CHO-CD46	Epithelzelle (Ovar) des Chinesischen Hamsters (<i>Cricetulus griseus</i>) transfiziert mit CD46	DMEM mit 5% FCS	Dörig et al., 1993
CHO-CD150 (synonym ist CHO-SLAM)	Epithelzelle (Ovar) des Chinesischen Hamsters (<i>Cricetulus griseus</i>) transfiziert mit CD150	DMEM mit 5% FCS	Erlenhoefer et al., 2001

NIH3T3	transfiziert mit CD40 L	50% F12 Medium und 50% DMEM mit 10% FCS, 1% L-Glutamin, 10 mmol/l HEPES-Puffer, 15ug/ml Gentamycin und 200ug/ml G418	Urashima et al., 1995
--------	-------------------------	--	-----------------------

Primäre Zellen

Primäre MM Zellen wurden aus Knochenmarkproben von MM Patienten isoliert, die im Rahmen der erforderlichen Diagnostik gewonnen wurden. Primäre B-Zellen wurden aus dem Blut freiwilliger Spender gewonnen. Einzelheiten zur Isolation und Kultivierung siehe bei Methoden.

2.1.2 Viren

Die in dieser Arbeit verwendeten Viren wurden entweder selbst hergestellt bzw. wurden vom Labor von Steven J. Russell, Molecular Medicine Program, Mayo Clinic Rochester zur Verfügung gestellt. Beide rekombinanten Viren exprimieren das Reportergen EGFP von einer zusätzlichen Transkriptionseinheit, die vor der kodierenden Sequenz des viralen Nukleokapsids lokalisiert ist (Duprex *et al.*, 1999)

Tabelle 6 Viren

Virus	Verwendeter Rezeptor	Anzucht auf	Herkunft
MV-EGFP	CD 46 und SLAM	Vero	Duprex <i>et al.</i> , 1999
MV-Wue	Ligand des Wue-1 monoklonalen Ak	Vero His	Hummel <i>et al.</i> , 2009

2.1.3 Zellkulturmedien und Zusätze

- RPMI 1640	Art.-Nr. 51800-043, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- DMEM	Art.-Nr. 31885-023, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- IMDM	Art.-Nr. 31980-022, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- FKS	Art.-Nr. 16000-044, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Humanserum	gewonnen von freiwilligen Spendern, gepoolt
- Penicillin/Streptomycin	Art.-Nr. 15140-163, Invitrogen, Karlsruhe Deutschland
- Glutamin	Art.-Nr. A12221, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Na-Pyruvat	Art.-Nr. 11360-039, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Il-6	Art.-Nr. 206-IL-010, R&D, MN, USA
- IL-4	Art.-Nr. 204-IL-010, R&D, MN, USA
- Cyclosporin A	Art.-Nr. C1832, Sigma-Aldrich, Deutschland
- Geniticin-G418	Art.-Nr. 10131-027, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.4 Chemikalien, Puffer und Lösungen

Selbst erstellte Lösungen oder Puffer sind ohne Herstellerangaben aufgelistet:

Ficoll- Paque	Art.-Nr. 17-1440-02, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
DMSO	Art.-Nr. A-994.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einfriermedium	10% FBS und 10% DMSO
6 fach Ladepuffer für Gele	Art.-Nr. R0611, MBI Fermentas
Ethidiumbromid 1%	Art.-Nr. E2028, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Propidiumiodid	Art.-Nr. P4170, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
PBS	Art.-Nr. 10010-031, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Art.-Nr. 15250-061, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	Art.-Nr. 25300-062, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Versene	Art.-Nr. 15040-033, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Art.-Nr. 15510-027, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
EDTA- Lösung	Art.-Nr. 15575-020, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TAE- Puffer (50×)	242 g Tris- Base 57,1 ml Essigsäure 100 ml EDTA (0,5M, pH8) Ad 1l H ₂ O

Blockierpuffer	(5 % (w/v) Magermilchpulver ad TBS-T-Puffer)
destilliertes Wasser	Molekulare Innere Medizin, Würzburg, Deutschland
FACS-Puffer	0,4 % (w/v) BSA, 0,02 % (w/v) Natriumazid in 1.000 ml PBS ⁽⁻⁾
EPES	(Art.-Nr. 9105.3), Roth, Karlsruhe, Deutschland
Laemmli-Probenpuffer	7,0 ml Tris-HCl 4x mit pH 6,8, 1,0 g SDS, 3,0 ml Glycerin, 1,2 mg Bromphenolblau, 2,0 ml β -Mercaptoethanol, Aqua dest. ad 10 ml Endvolumen) Neutralrotlösung 1,6 % (w/v)
Lysispuffer	1,0 % (v/v) NP-40 Alternative, 125 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1 mM EDTA sowie 1 Tablette Proteaseinhibitor pro 50 ml Endvolumen ad Aqua dest. und pH 7,4)
PBS-T-Puffer	0,05 % (v/v) TWEEN® 20 ad PBS und pH 7,4)
Proteingellaufpuffer	3,03 % (w/v) Tris-Base, 14,4 % (v/v) Glycin, 1,0 % (w/v) SDS ad Aqua dest.)
TAE-Puffer	2 M Tris, 0,57 % (v/v) Essigsäure, 0,6 M EDTA ad Aqua dest. und pH 8,0)
TBS-Puffer	25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl ad Aqua dest. und pH 7,4)
TBS-T-Puffer	25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) TWEEN® 20 ad Aqua dest. und pH 7,4)
Triton X-100 0,25 % (v/v)	2,5 ml Triton X-100 in 1.000 ml PBS ⁽⁻⁾ oder PBS)
Waschpuffer A	20 mM NaH ₂ PO ₄ , 20 mM NaHPO ₄ ad Aqua dest. und pH 7,4)
Western-Blot-Puffer I	0,3 M Tris-HCl, 20 % (v/v) Methanol ad Aqua dest. und pH 10,4)
Western-Blot-Puffer II	0,025 M Tris-HCl, 20 % (v/v) Methanol ad Aqua dest. und pH 7,4)
Western-Blot-Puffer III	0,025 M Tris-HCl, 20 % (v/v) Methanol, 0,04 M Aminocaprinsäure ad Aqua dest. und pH 9,4)
BSA (Fraktion V)	Art.-Nr. 160069, ICN Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Essigsäure	Art.-Nr. A0820), AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Entwicklungs- und Fixierlösung	Kodak, Stuttgart, Deutschland
Ethanol absolut	Art.-Nr. A3693, AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Glutardialdehyd (~50 % (v/v) in Wasser)	Art.-Nr. 4995.1), Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver Instant	Saliter, Obergünzburg, Deutschland
Methanol	Art.-Nr. 106009, Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid	Art.-Nr. S-2002, Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid	Art.-Nr. A2942, AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Art.-Nr. A3813, AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Proteinstandard Kaleidoscope	Art.-Nr. 161-0324, Bio-Rad, München, Deutschland
Prestained Standards	
Proteinstandardlösung 1,0 mg/ml	Art.-Nr. P-0914, Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure-Maßlösung 1 M	Art.-Nr. A1434, AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tris	Art.-Nr. A1086, AppliChem, Darmstadt, Deutschland

2.1.5 Kits

Taq PCR Kit	Art.-Nr. E5000S, NEB, Ipswich, MA, USA
Rapid Cloning Kit	Art.-Nr. LIG1-1KT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
QIAEX II Gel Extraction Kit	Art.-Nr. 20021, Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit	Art.-Nr. 27106, Qiagen, Hilden, Deutschland
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Art.-Nr. 12362, Qiagen, Hilden, Deutschland
Fugene Transfection Kit	Art.-Nr. 04709691001, Roche, Basel, Schweiz
One Shot TOP 10	Art.-Nr. C4040-10, Invitrogen, Paisley, UK
CD138 Micro Beads	Art.Nr. 130-051-301, Miltenyi Biotech, Gladbach, Deutschland
CD33 Micro Beads	Art.Nr. 130-045-501, Miltenyi Biotech, Gladbach, Deutschland
Mycoplasma Detection Kit	Art.Nr. 11296744001, Roche, Basel, Schweiz

2.1.6 Antikörper

Eine Übersicht über die monoklonalen Primär- und polyklonalen Sekundärantikörper zeigt Tabelle 7 unter Angabe der Antigenspezifität, der Klonbezeichnung, der Zielspezies, der Herkunftsspezies und des Isotyps. Einige dieser aufgelisteten Antikörper waren ursprünglich am Institut für Virologie und Immunbiologie entwickelt, kloniert und benannt worden.

Tabelle 7 Antikörper

Antikörper (Art.-Nr.)	Klon (Herkunft)	Zielmolekül	Zielspezies	Herkunfts- spezies	Isotyp
CD46	13/42 (Prof. J. Schneider- Schaulies)	CD46	Mensch	Maus	IgG1
CD150 (SLAM)	5C6 (Prof. J. Schneider- Schaulies)	CD150	Mensch	Maus	IgG1
Affini Pure F(ab)2 Fragment (115-096-008)	polyklonal (Jackson ImmunoResearch)	Fc Anteil der Maus schweren Kette des Maus IgG	Maus	Ziege	F(ab)2 Fragment
Wue-1	Balb-c/ NSO-D Maus Hybridomzell-linie; (Prof. Greiner, Heidelberg)	Bislang noch nicht identifi- zierter Ligand	Mensch	Maus	IgG1
CD33 (C2385-02K)	3H1234 (Biomol)	CD33	Mensch	Maus	IgG1
CD138 (ABIN 249226)	B-B4 (Antibodies online)	CD138	Mensch	Maus	IgG1
Annexin V (ab14147)	aN5 (Abcam)	Annexin V	Mensch	Maus	IgG1

2.1.7 Plastikware und Verbrauchsmaterial

0,5-/ 1,5-/ 2-ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Deutschland
5 ml/ 10 ml/ 25 ml/ 50 ml Pipetten	Costar, Deutschland
Sterilfilter	Millipore, Deutschland
Zellschaber	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Deckgläser	Superior Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Durchflusszytometrierohrchen	Art.-Nr. RE03, Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Einmalhandschuhe	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einmalskalpelle	Zentrallager der Universität Würzburg,
Gelträger	Molekulare Innere Medizin, Würzburg, Würzburg
Kämme verschiedener Größe	Molekulare Innere Medizin, Würzburg,

Kryokonservierungs- röhrchen	Art.-Nr. 122 2XX, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Nitrozellulosetransfermembran	Protran® 0,45 µm, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Pasteurpipetten	Nalge Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Pipettenspitzen	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Röntgenfilme	Kodak, Stuttgart, Deutschland
Einmalküvetten UVette®	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Whatman-Papier Typ GB002	Art.-Nr. 013151, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Zellkulturflaschen Cellstar™ mit Filter, Größen 25 cm ² oder 50 ml (Art.-Nr. 690 175), 75 cm ² oder 250 ml (Art.-Nr. 668 175), 175 cm ² oder 550 ml (Art.-Nr. 660 175) oder 175 cm ² oder 650 ml (Art.-Nr. 661 175), Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland	
Zellkulturplatten 6 Wells	Art.-Nr. 657 160, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten Costar® 12 Wells	Art.-Nr. 3512, Corning, Corning, New York, USA
15-ml-Zentrifugenröhrchen	Art.-Nr. 188 261, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
50-ml-Zentrifugenröhrchen	Art.-Nr. 227 261, Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

2.1.8 Geräte

Gelelektrophoresekammer	Institutswerkstatt
Lichtmikroskop	Leitz
Neubauerzählkammer	Marienfeld
Sterilwerkbank	Nuaire
Vortexer	GLW
Wasserbäder	GFL
Zentrifugen	Eppendorf, Hettich, Sorvall
Digitalkamera	Canon

Analysewaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav 23	MELAG Medizintechnik, Berlin, Deutschland
BioPhotometer 6131	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Blottingapparatur	Molekulare Innere Medizin, Würzburg, Deutschland
Brutschränke 33 und 37 °C	Heraeus, Hanau, Deutschland
Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACScan™ mit Software	
Lysis II™ und CellQuest™	
Eismaschine AF30	Scotsman, Mailand, Italien
Fluoreszenzmikroskop	Aristoplan
Kühlschrank 4 °C	Siemens, München, Deutschland
	Bauknecht, Schorndorf, Deutschland
Magnetheizrührer Ikamag RCT	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Mikrowellengerät	Panasonic, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	Wiss.-Techn. Werkstätten, Weilheim, Deutschland
Rotoren JA-10 und JA-20	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Wippschüttler	Edmund Bühler, Tübingen, Deutschland
Standzentrifuge J2-MC	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Standzentrifuge Rotixa KS	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Thermal Cycler DNA 480	Perkin Elmer, Boston, Massachusetts, USA
Tiefkühltruhe –80 °C	Revco, Asheville, North Carolina, USA
Tiefkühlschrank –20 °C	Siemens, München, Deutschland
	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Tischzentrifuge Millifuge	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Vortexer	
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland

2.1.9 Nukleotide

Als Mono- und Oligonukleotide sowie als DNA-Standard-Leitern fanden die folgenden Substanzen und Produkte Verwendung:

dNTP Mixes 2 mM Art.-Nr. R0241, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Art.-Nr. SM0243, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder Art.-Nr. SM0313, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Primerpaare für scFv Wue-1 Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Tabelle 8 Oligonukleotide

Bezeichnung	5'-3' Sequenz
Wue-for	GATATCCAGCTGA
Wue-rev	GTGGCAGAGGAGG

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle verwendeten Zellen wurden in Brutschränken bei 37°C und 5% CO₂ enthaltender, wasserdampfgesättigter Luft kultiviert. Die verwendeten Medien wurden mit Natriumhydrogencarbonat gepuffert und mit Antibiotika (Penicillin/ Streptomycin oder G418) versetzt.

Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde eine Vitalfärbung mit Trypanblau durchgeführt. Dazu wurden aus einer Zellsuspension 10 µl abgenommen und mit 90 µl Trypanblaulösung gemischt. 10 µl dieser Suspension wurden anschließend in eine Neubauerzählkammer gegeben. Lebende Zellen bleiben ungefärbt, während tote Zellen den Farbstoff aufnehmen können. Mit Hilfe des Lichtmikroskops wurde die Zahl der ungefärbten (lebenden) Zellen ermittelt. Die Gesamtzahl in der vorhandenen Suspension konnte mit Hilfe des Kammerfaktors errechnet werden. Die Zellsuspension wurde anschließend entsprechend der gewünschten Zellzahl verdünnt und eingesetzt.

Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung der verwendeten Zellen wurden die Zellen zunächst abzentrifugiert (5 min, 1200 rpm). Das gewonnene Zellpellet wurde in kaltem FCS resuspendiert und mit dem gleichen Volumen Einfriermedium versetzt. Die Zellen wurden zunächst für eine Stunde bei -20°C eingefroren und anschließend auf -80°C überführt. Adhärente Zellen wurden in einer Konzentration von $7,5 \times 10^6$ bis 1×10^7 Zellen pro Milliliter eingefroren, Suspensionszellen wurden dagegen in einer Konzentration von mindestens 1×10^7 pro Milliliter eingefroren. Zum langfristigen Lagern wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Reaktivierung wurden die Zellen schnell bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, mit Überschuss an Kulturmedium gewaschen und in frischem Medium ausgesät.

Mykoplasmentest

Alle verwendeten Zelllinien wurden regelmäßig auf Mykoplasmen getestet. Der Test wurde gemäß des Protokolls für Mycoplasma Detection Kit, Roche, (Bestell-Nr.: 11296744001) durchgeführt. Sobald eine Charge kontaminiert war, wurde diese verworfen und eine auf Mykoplasmen negativ getestete Charge der gewünschten Zelllinie für die erforderlichen Experimente benutzt.

Zellkultur adhärenter Zelllinien

Adhärente Vero-Zellen (African green monkey kidney Zellen) und Vero His-Zellen (African green monkey kidney Zellen, die einen anti His- tag single chain Antikörper exprimieren) wurden in DMEM Medium mit 10% FCS und Penicillin/ Streptomycin kultiviert. Nach der Ausbildung konfluenter Zellrasen wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin abgelöst. Zur weiteren Kultivierung wurden sie in frische Zellkulturschalen in einer Verdünnung zwischen 1:5 und 1:10 in frischem Medium wieder ausgesät.

Die Zelllinie 293-3-46 wurde in DMEM Medium mit 10% FCS und Penicillin/ Streptomycin kultiviert. Nach Erreichen der gewünschten Konfluenz wurden die Zellen mit 5 ml Versene gewaschen und mit 1 ml Versene zur Ablösung gebracht. Die Zellen wurden in einer 1:15 Verdünnung wieder in Kulturflaschen ausgesät.

Die Zelllinien CHO parental (Chinese hamster ovarian Zellen), CHO-CD46 und CHO-CD150 wurden in RPMI 1640 mit 10% FCS und 5 ml Penicillin/ Streptomycin kultiviert. Nach der Ausbildung konfluenter Zellrasen wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin abgelöst. Zur weiteren Kultivierung wurden sie in frische Zellkulturschalen in einer Verdünnung zwischen 1:5 und 1:10 in frischem Medium wieder ausgesät.

Zellkultur von Suspensionszelllinien

Die humane Multiple Myelom Zelllinie U266 wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig, Deutschland erworben. Die wurde in RPMI 1640 mit 10% FCS und Penicillin/ Streptomycin kultiviert. Die Zellen wurden ein bis zweimal wöchentlich für 5 Minuten bei 300 g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 ml frischem Medium resuspendiert und die Zellen in einer 1:5 bis 1:10 Verdünnung in neuen Zellkulturflaschen ausgesät.

Zellkultur von primären Multiplen Myelomzellen und primären B- Zellen

Knochenmarkproben wurden von Plasmozytompatienten nach ausführlichem Aufklärungsgespräch mit schriftlicher Einverständniserklärung bei Routineknochenmarkbiopsien, die im Rahmen der Therapie vorgesehen waren, gewonnen. Die nukleären Zellen wurden über eine Ficoll Gradientenzentrifugation isoliert. Primäre MM Zellen wurden in RPMI 1640 mit 20% nicht hitzeinaktiviertem FCS mit 5 ml Glutamin, 5 ml Na-Pyruvat, 5 ml Penicillin/ Streptomycin und 4ng/ml Il-6 kultiviert. Eine Passagierung erfolgte nicht.

Primäre B-Zellen wurden in IMDM mit 10% gepooltem humanem Serum mit 4ng/ml Il4 Ciclosporin A kultiviert.

Isolierung humaner primärer mononukleärer Zellen aus Vollblut oder Knochenmark

Bei primären mononukleären Zellen aus Blut (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) oder Knochenmark handelt es sich um eine Mischpopulation aus T-, B-, NK-Zellen und Monozyten. Blut oder Knochenmark wurden 1:1 mit PBS verdünnt und 30 ml dieser Suspension wurden auf 15 ml Ficoll Paque, das bereits in einem 50 ml Röhrchen vorgelegt war, vorsichtig aufgeschichtet. Bei der anschließenden Dichtegradientenzentrifugation (30 min, 2 min Anlauf, 2 min Auslauf, 400 g, RT) wurden die enthaltenen zellulären Bestandteile entsprechend ihrer unterschiedlichen Dichte aufgetrennt. Die entstandene Interphase wurde abgenommen, in 50 ml Röhrchen überführt. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit PBS mit und ohne EDTA- Zusatz (10 min, 300g, RT). Im Anschluß erfolgte die Bestimmung der Zellzahl und die Charakterisierung der PBMC-Population bzw. der mononukleären Zellen, die aus dem Knochenmark gewonnen wurden, mittels Durchflußzytometrie.

Generierung von CD40 B Zellen

8×10^6 cells PBMC wurden nach Isolierung über Ficoll-Paque in einer Kokultur mit der adhärennten Zelllinie NIH3T3 gehalten, die stabil den humanen CD40 Liganden exprimierte und mit 96 Gy bestrahlt wurde. Der Kulturansatz erfolgte in einer 6-well Platte mit 4 ml IMDM Medium mit 10% gepooltem humanem Serum, 4ng/ml Il-4 und 0,7ug/ml Ciclosporin A. Die expandierenden Zellen wurden alle 3-4 Tage in eine neue Kokultur mit frischem Medium inklusive obig genannter Zusätze und frischen NIH3T3-Zellen ausplattiert.

Isolierung primärer Myelomzellen und mononukleärer Vorläuferzellen

durch CD138 bzw. CD33 Beads

1×10^7 Zellen, die nach einer Ficoll Dichtezentrifugation aus einem Knochenmarkbiopsat eines Myelompatienten gewonnen wurden, wurden in 90 μ l MACS-Puffer (PBS mit 0,5% BSA und 2 mM EDTA, 4°C) aufgenommen, mit 20 μ l CD 138 Beads versetzt, gemischt und für 15 min bei 4°C inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschrift, wobei für je 1×10^7 Zellen 2 ml MACS-Puffer verwendet wurde. Die Suspension wurde für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 500 μ l MACS- Puffer aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde auf eine in der entsprechenden Magnetvorrichtung eingespannten mit 5 ml MACS-Puffer äquilibrierten für dieses Kit vorgesehene Säule (z.B. LS) gegeben. Der Durchlauf, der den CD138 negativen Zellen entspricht, wurde zur späteren Qualitätskontrolle mittels FACS asserviert. Nach dreimaligem Waschen der Säule mit je 3 ml MACS-Puffer, wurde diese aus dem Magneten entnommen und mit 5 ml MACS-Puffer durchgespült. Diese erhaltene Zellsuspension wurde für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert und die Zellzahl mit Trypanblau wie oben beschrieben bestimmt. Für die Bestimmung der Reinheit der isolierten primären MM-Zellen wurde zu jeder Probe eine FACS-Färbung mittels CD138 PE Antikörpers sowie einer Isotypenkontrolle durchgeführt.

Entsprechend diesem Vorgehen wurden auch CD33+ Zellen gewonnen.

Durchflußzytometrie (FACS)

Die Durchflußzytometrie ist eine Methode, mit der verschiedene optische Eigenschaften von Zellen gleichzeitig quantifiziert werden können. Zum einen kann ihre relative Größe (Vorwärtsstreulicht, FSC), zum anderen ihre Granularität bestimmt werden (Seitwärtsstreulicht, SSC). Die Granularität der Zellen gibt dabei Aufschluß über deren interne Komplexität. Weiterhin können spezifische Fluoreszenzen und deren Intensitäten gemessen werden. Die zu messenden Zellen werden dabei in einer Trägerflüssigkeit aufgenommen und durch verschiedene Strömungen innerhalb des Durchflußzytometers voneinander getrennt; dadurch können sie einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt werden. Zelluläre Proteine können intra- oder extrazellulär mit spezifischen Antikörpern detektiert werden. Die Antikörper sind dazu mit Fluorochromen markiert, die durch Licht unterschiedlicher Wellenlänge angeregt werden können. Dabei wird die Energie zunächst vom Fluorochrom absorbiert. Bei der späteren Abgabe dieser Energie wird Licht längerer Wellenlänge emittiert, das durch verschiedene Filter detektiert werden kann. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten verhalten sich dabei proportional zur Anzahl der auf der Zelle

gebundenen Fluorochrome. Zur Analyse der aufgenommenen Daten werden die gemessenen optischen Signale (Photonen) in elektrische Signale (Spannungspulse) umgewandelt und digitalisiert (Bioscience, 2004).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenzfärbungen wurden in einem Becto-Dickinson FACS-ScanTM und FACS-CaliburTM unter Verwendung der LysisIITM-Software aufgenommen und mittels der Cellquest-SoftwareTM ausgewertet.

Es wurden für eine FACS-Färbung ca. 250000 Zellen pro Färbung eingesetzt. Diese wurden in einem Gesamtvolumen von 200 µl mit den jeweiligen Antikörpern 30 min auf Eis inkubiert. Die Antikörper wurden dabei in Verdünnungen eingesetzt, die den Angaben des Herstellers entsprechen. Im Fall der vom Institut für Virologie hergestellten Antikörper wurde die optimale Konzentration durch Kontrollfärbungen festgestellt. Nach der Inkubation wurden die Ansätze mit FACS-Puffer gewaschen. Bei den Färbungen, die einen Zweitantikörper erforderten, wurde die erforderliche Menge des Antikörpers in 200 µl eingesetzt, nochmals 30 min inkubiert und nochmals gewaschen. Pro Färbung wurden 20000 morphologisch intakte und vitale Zellen aufgenommen. Zur Kontrolle der Hintergrundfärbung und Kompensation bei Mehrfachfärbungen wurden entsprechende Isotypantikörperfärbungen eingesetzt.

In der Tabelle 7 werden alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper aufgeführt und eine Auswahl von wichtigen Eigenschaften genannt.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR wird vorhandene DNA oder aus RNA gewonnene cDNA mit Hilfe von Oligonukleotid- Primern amplifiziert. Eine PCR gliedert sich in drei Schritte:

- I. Denaturierung der doppelsträngigen DNA
- II. Anlagerung der Primer an die einzelsträngigen DNA (Annealing)
- III. Synthese der doppelsträngigen DNA zwischen den Primern (Elongation)

Nach einem initialen Denaturierungsschritt von 5 Minuten bei 94°C folgt der erste Zyklus der dreistufigen Amplifikation. Im zweiten Schritt (Annealing) wird durch das Absenken der Temperatur die Hybridisierung der im Überschuß vorhandenen Primer an die einzelsträngige DNA ermöglicht. Anschließend wird die Temperatur erneut erhöht; dadurch beginnt die Polymerase mit dem Einbau der freien Nukleotide zwischen den Primern. Die entstehende doppelsträngige DNA ist ein vollständiges Duplikat der Ausgangs-DNA. Durch mehrfache Wiederholung des Zyklus wird die Menge der DNA exponentiell vermehrt. Abschließend

wird die Polymerase inaktiviert, das entstandene Produkt kann bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert werden. Für alle in dieser Arbeit durchgeführten PCR´s wurde das Taq PCR Kit Art.-Nr, E5000S, NEB, Ipswich, MA, USA gemäß des Protokolls verwendet.

Reaktionsbedingungen:

Amplifikation des scFvWue:

1. 94°C, 5 min
2. 94°C, 45 s
3. 60°C, 45 s
4. 72°C, 60 s

Die Amplifikationen erfolgte in 25 Wiederholungen der Schritte 2. bis 4. Im Anschluß erfolgte die Auftragung auf ein Elektrophoresegel, die Reinigung des Amplifikats wurde gemäß des Protokolls des Gelextraktionskits durchgeführt (siehe Kits).

Abschließend erfolgte eine Sequenzierung. Es wurde nur mit als korrekt bestimmter cDNA weitergearbeitet.

Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden geladene Moleküle in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgt je nach Größe des erwarteten Produkts in Gelen mit verschiedenen Agarosekonzentrationen. Zusätzlich wird dem Gel der bei UV-Licht fluoreszierende Farbstoff Ethidiumbromid beigemischt, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Im Anschluß an die Elektrophorese können die Fragmente unterschiedlicher Größe mit UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Die bei den verschiedenen PCR-Reaktionen entstandenen Produkte wurden je nach Größe in 1 bis 2% ige Agarosegelen aufgetrennt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose unter Kochen in einer Mikrowelle in 50 bis 100 Milliliter TAE-Puffer gelöst. Je nach Volumen wurde dem Gel 5 bis 10 Mikroliter 1%ige Ethidiumbromidlösung zugegeben. Nach der Polymerisation des Agarosegels wurden 5 µl des PCR-Produkts mit 1 µl 6 fach Probenpuffer gemischt und in die Taschen des Gels pipettiert. Zur Identifizierung der Fragmentgrößen wurde auf jedes Gel zusätzlich 5 Mikroliter eines Markers mit definierten Fragmentgrößen aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 100 Volt für 30-60 Minuten. Anschließend konnten die Amplifikate durch UV-Licht sichtbar gemacht und bestimmt werden.

Restriktionsenzymverdau

Restriktionsenzyme oder auch Endonukleasen, die DNA an bestimmten Sequenzen spezifisch schneiden können, sind Teil eines Systems, das Bakterien dazu benutzen, um sich gegen Fremd-DNA zu schützen. Mit Hilfe dieser Enzyme erkennen und hydrolysieren sie fremde DNA an einer Tetra- bis Oktanukleotidfolge, die in der Bakterien-DNA durch Methylierung von Einzelbasen modifiziert sein kann. Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Ansätze zum Restriktionsenzymverdau wurden in einem Gesamtvolumen von 15 µl in 1,5 ml Ependorffgefäßen angesetzt. Ein Ansatz beinhaltet:

1. gewünschte Menge an DNA
2. 1,5 µl für das Enzym bzw. die Enzymkombination geeigneten Puffer
3. 0,5 µl Enzym
4. ad 15 µl mit Wasser

Der Ansatz wurde für mindestens eine Stunde bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluß wurde dieser mit Ladepuffer im Verhältnis 1:6 gemischt und mit Hilfe einer Gelelektrophorese analysiert.

Klonierung

Die Basis für MV-Wue ist das rekombinante Virus p(+)MV-EGFP, in dieser Arbeit vereinfachend MV-EGFP genannt, das einen ORF für EGFP beinhaltet, die natürlichen MV-Rezeptoren CD46 und CD150 erkennt und leicht auf Vero Zellen propagiert werden kann, die CD46 exprimieren. Die cDNA für scFvWue (Micromet, München, Deutschland) wurde mittels PCR amplifiziert. SfiI/NotI-Fragmente dieses Genabschnittes wurden in-frame in den pTNH6aa Shuttle Vektor eingefügt, der Alaninsubstitutionen an den Aminosäureresten 481 und 533 des H-Proteins enthält.

Teil des H-Proteins ist zudem ein His-tag (H×6), das die Interaktion von MV-Wue mit der Zelllinie Vero-His ermöglicht, die einen scFv anti His stabil exprimiert. Das PacI/SpeI Fragment dieses Konstruktes wurde in die korrespondierende Stelle von MV-EGFP eingefügt.

Gelextraktion

Die Gelextraktion wurde gemäß des Herstellerprotokolls des QIAEX II Gel Extraction Kits von Qiagen durchgeführt.

Transformation von Bakterien

Für die Transformation von DNA wurden die die One Shot TOP 10 Bakterien von Invitrogen gemäß des Herstellerprotokolls verwendet.

Mini und Maxi-Preparation von DNA

Die Amplifikation von DNA wurde mit Hilfe der Bakterien Top 10 One Shot von Invitrogen und den Mini- und Maxi-Prep Kits von Qiagen wurde gemäß der Herstellerprotokolle durchgeführt.

2.2.1 Viruskultur

Rescue von MV-Wue

Um den Rescue von MV-Wue durchzuführen, wurde das System verwendet, das von Nakamura *et al.*, 2005 in Nature Biotechnology beschrieben wurde. Hierzu wurden 293-3-46 Zellen (Radecke *et al.*, 1995) mit Plasmiden kotransfiziert, die das volle Genom des MV-Wue und der Viruspolymerase L enthalten. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C wurden die transfizierten 293-Zellen auf zuvor ausplattierte Vero His Zellen gegeben. Nach 3-5 Tagen konnten kleine EGFP positive Fusionszonen beobachtet werden, die die Infektion von Vero His Zellen mit MV-Wue anzeigten. Diese Synzytien wurden gepickt, mit 2×10^5 Vero His Zellen in einem 1,5 ml Eppendorf- Gefäß 2 Stunden bei 37°C inkubiert und im Anschluß ausplattiert und kultiviert. Im Anschluß wurden die Virusstocks wie nachfolgend beschrieben erstellt.

Der Rescue und die Propagierung von MV-EGFP wurden gemäß Radecke *et al.*, 1995 durchgeführt.

Präparation von Virusstocks

Die in dieser Arbeit verwendeten Viren wurden auf adhärennten Vero-Zellen bzw. Vero-His-Zellen gezüchtet. Die unterschiedliche Verwendung der Zelllinien ist auf die Nutzung verschiedener Rezeptoren der einzelnen Viren zurückzuführen.

Für die Produktion des rekombinanten MV-EGFP und des MV-Wue mit neu ausgerichteter Spezifität wurde ein konfluenter Verozellrasen (ca. 2×10^7 Zellen/ 550 ml Zellkulturflasche) mit einer MOI (Multiplicity of Infektion) von 0,01 infiziert. Dazu wurde das vorhandene Medium abgesaugt. Das entsprechende Volumen Virussuspension wurde in 10 Milliliter

MEM, ohne FBS pro Flasche aufgenommen und auf die Zellen pipettiert. Die Zellkulturflaschen wurden dann für eine Stunde bei 20°C auf einer Wippe inkubiert, bevor das Virus-Inokulum wieder entfernt und durch frisches DMEM mit 5% FBS (20ml/Flasche) ersetzt wurde. Die weitere Kultur erfolgte bei 37°C. Sobald 80 bis 90% der Zellen einen zytopathischen Effekt (cytopathic effect, CPE) zeigten, wurde das Medium von den Zellen entfernt und diese in 2 ml/Flasche PBS über Nacht bei -20°C eingefroren. Nach dem schnellen Wiederauftauen der Kulturen wurde der verbliebene Zellrasen mit einem Zellschaber gelöst und die Suspension in 50ml Rörchen überführt. Um zellassoziertes Virus freizusetzen und Zelltrümmer zu entfernen, wurde für 15 Minuten bei 0°C und $1000 \times g$ zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C gelagert. Parallel zur Anzucht der Viren wurden die nicht-infizierten Zellen (Vero oder Vero His) kultiviert und so präpariert wie für die Präparation der Virusstocks beschrieben aufgearbeitet. Diese Präparationen dienten als Mockkontrollen.

Bestimmung des Virustiters

Zur Bestimmung des Virustiters wurde die TCID₅₀ (tissue culture infectious dose) bestimmt. Diese gibt die Verdünnung einer virushaltigen Lösung an, die ausreicht, um 50% der Zellen zu infizieren. Für eine Endpunkttitration wurden 5×10^4 Vero bzw. Vero His Zellen pro well in einer 96-well Platte ausgesät und über Nacht kultiviert. Von den zu titrierenden Viruspräparationen wurde eine Verdünnungsreihe (1:10) in RPMI ohne FBS hergestellt. Pro Verdünnungsstufe wurden acht wells der 96-well Zellkulturplatte mit jeweils 100 Mikroliter Virusverdünnung versetzt, die Zellen wurden anschließend für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dem Absaugen des Mediums wurde in jedem well 100 Mikroliter RPMI 1640 mit 5% FFBS gegeben. Nach drei und fünf Tagen Kultur wurde lichtmikroskopisch die Anzahl der wells bestimmt, die einen CPE aufwiesen. Anhand dieser Werte konnte die TCID₅₀ mit Hilfe der Formeln nach Spearman und Kärber (Formel 1 und 2) (Kärber, 1931; Spearman, 1908) berechnet werden.

$$\log TCID_{50} = x_{p=1} + \frac{1}{2} d - d \sum p$$

Formel 1: Formel zur Bestimmung der 50% Endpunkttitration

$x_{p=1}$: dekadischer Logarithmus der höchsten Verdünnungsstufe, bei der noch in allen Ansätzen ein CPE sichtbar ist, d : dekadischer Logarithmus des Verdünnungsfaktors, p : Anteil an CPE positiven wells pro Verdünnungsstufe,

$\sum p$: Summer aller p ab der Verdünnungsstufe $x_{p=1}$ und den p -Werten aller höheren Verdünnungen mit beobachtetem CPE. Berechnet wird der dekadische Logarithmus der Verdünnungsstufe, bei der 50% der Ansätze einen CPE aufweisen.

$$SE \log TCID_{50} = \sqrt{d^2 \sum p(1-p)/n-1}$$

Formel 2: Formel zur Berechnung des Standardfehlers der TCID50

d : dekadischer Logarithmus der Verdünnungsstufe, p : Anteil an CPE positiven wells pro Verdünnungsstufe, n : für die Anzahl der wells pro Verdünnungsstufe

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wird mit dem Bicinchoninsäuretest durchgeführt. Dieser Test nutzt die Reduktion von zweiwertigem zu einwertigem Kupfer durch die Anwesenheit von Proteinen. Die einwertigen Kupferionen werden dann durch Bicinchoninsäure in violetten Komplexen gebunden, deren maximale Absorption bei 562 nm liegt und gegenüber einer Proteinstandardlösung photometrisch gemessen werden kann. Dabei verhält sich der Absorptionsgrad direkt proportional zur Proteinkonzentration.

Für die Durchführung des Tests werden 50 µl der zu messenden Probe mit 2,0 ml einer Verdünnung von 1:50 Kupfer-II-Sulfat-Lösung in Bicinchoninsäure versetzt, gemischt, für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. In einer Kunststoffküvette wird nun die Absorption bei 562 nm gegenüber zwei Eichlösungen photometrisch bestimmt Als Nullwert wird ein Ansatz mit 50 µl PBS anstatt der zu messenden Probe hergestellt. Von einer Proteinstandardlösung mit einer definierten Proteinkonzentration werden 10 µl in einem Ansatz photometrisch gemessen und als weiterer Eichwert verwendet. Mit dem vorhandenen Photometer können die entsprechenden Parameter eingegeben und automatisch die Proteinkonzentrationen in den Proben berechnet werden.

Gelelektrophorese von Proteinen

Die Gelelektrophorese dient zur Auftrennung und Aufkonzentrierung des durch Zelllyse erhaltenen Proteingemischs und damit als Grundlage für die anschließende Western-Blot-Analyse. Die 1970 beschriebene Methode der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nutzt hierbei verschiedene Besonderheiten (Laemmli 1970). Eingebettet in eine Polyacrylamidmatrix werden die Proteine durch die Präsenz von Natriumdodecylsulfat zylindrisch aufgefaltet, von einer negativ geladenen Hülle umgeben und elektrophoretisch nach ihrer linearen Größe aufgetrennt. Die Verwendung eines diskontinuierlichen Gelsystems erlaubt eine Aufkonzentration verschiedener Proben an der Grenze zwischen einem Sammel- und einem Trenngel, die sich durch verschiedene pH-Werte unterscheiden und in denen Glycinionen in ungleichen Ladungszuständen vorliegen.

Die eigentliche Gelelektrophorese von Proteinen wird in einer Matrix mit einer Konzentration von 10 % (w/v) Acryl-/Bisacrylamid durchgeführt. Für zwei mittelgroße Trenngel von je knapp 16 ml Volumen werden folgende Substanzen und Reagentien gemischt: 10,75 ml Acryl-/Bisacrylamid 30 % (w/v), 8,0 ml Tris-HCl 1,5 M und pH 8,9, 12,75 ml Aqua dest. und 160 µl SDS 20 % (w/v). Mit Zugabe von 280 µl Ammoniumpersulfat 10 % (w/v) und 10 µl TEMED wird die Polymerisation eingeleitet, die Trenngellösung möglichst blasenfrei bis auf etwa 4,5 cm unterhalb der Glasplattenkanten einer mittleren Gelelektrophoreseapparatur gegossen und vorsichtig mit Butanol überschichtet und abgedichtet. Der Abschluss der Polymerisation ist nach 30-60 min bei Raumtemperatur erreicht. Nun wird das polymerisierte Trenngel gründlich von Butanol befreit und mit dem Sammelgel überschichtet, das aus folgenden Substanzen und Reagentien besteht: 1,25 ml Acryl-/Bisacrylamid 30 % (w/v), 1,25 ml Tris-HCl 1,0 M und pH 6,8, 6,0 ml Aqua dest. und 50 µl SDS 20 % (w/v). Mit Zugabe von 100 µl Ammoniumpersulfat 10 % (w/v) und 10 µl TEMED wird erneut die Polymerisation eingeleitet, ein Kamm für die Auftragstaschen eingesetzt und 30 min bei Raumtemperatur abgewartet.

Für die weitere Vorbereitung wird die Gelelektrophoreseapparatur mit einfach konzentriertem Proteingellaufpuffer gefüllt und auch die Auftragstaschen damit blasenfrei ausgespült. Nun werden pro Auftragstasche 50 µg der zu untersuchenden Proteinproben mit Aqua dest. auf ein Volumen von 45 µl aufgefüllt, mit 15 µl Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Sodann können die Auftragstaschen mit 10 µl des Kaleidoskopproteinmarkers und 60 µl der Proben beladen werden, bevor an die Apparatur eine Stromstärke von 16 mA angelegt und für etwa 12–15 h solange beibehalten wird, bis eine

übersichtliche Verteilung der Proteinstandards mit Fokus auf das zu detektierende Protein erreicht ist. Dieses Gel kann nun für die Western-Blot-Analyse verwendet werden.

Western-Blot

Die durch die Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteine werden in einem elektrischen Feld einer Blottingapparatur auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dabei wird von der unten liegenden Anode zur oben liegenden Kathode der Aufbau wie folgt vorgenommen: drei mit Western-Blot-Puffer I getränkte Lagen Whatman-Papier, zwei mit Western-Blot-Puffer II getränkte Lagen Whatman-Papier, eine in Western-Blot-Puffer II äquilibrierte Nitrozellulosemembran, gefolgt vom ebenfalls in Western-Blot-Puffer II äquilibrierten Polyacrylamidgel, vier mit Western-Blot-Puffer III getränkte Lagen Whatman-Papier. Eventuell auftretende Luftblasen werden mit einer Glaspipette ausgerollt. Bei einer Stromstärke von 140 mA findet nun der Transfer über 60 min statt, eine erste Kontrolle ist durch Sichtbarwerden der Markerbanden auf der Nitrozellulosemembran möglich.

Unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran werden nun in einer Wanne auf einem Wippschüttler mit 10–20 ml Magermilchpulver enthaltenden Blockierpuffers über 60 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C besetzt. Nach einem Waschschrift von etwa 5 min mit 20 ml TBS-T-Puffer wird die Nitrozellulosemembran mit dem spezifisch bindenden Antikörper in zuvor getesteten Verdünnungen, je nach Proteinkonzentration und Reinheit bei 1:40 und 1:400 liegend, in 10 ml Blockierpuffer über Nacht bei 4 °C schwenkend inkubiert. Am darauf folgenden Tag kann der Überstand entfernt und die Nitrozellulosemembran mit jeweils 20 ml PBS-T-Puffer einmal für 10 min und dreimal für 5 min bei Raumtemperatur gewaschen und geschwenkt werden.

Zur Visualisierung der Bindungsstellen des Primärantikörpers wird nun ein System aus der Meerrettichperoxidase und einem Substrat, das durch die Enzymwirkung in eine Photonen emittierende Substanz umgewandelt wird. Dazu wird die Nitrozellulosemembran mit einem 1:1.000 verdünnten, peroxidasekonjugierten Sekundärantikörper in 10 ml Blockierpuffer über höchstens 60 min bei Raumtemperatur schwenkend inkubiert. Anschließend wird die Transfermembran dreimal mit jeweils 20 ml TBS/T-Puffer und einmal mit 20 ml TBS-Puffer für jeweils 5 min bei Raumtemperatur gewaschen und geschwenkt, bevor die Membran kurz luftgetrocknet und die eigentliche Enzymreaktion mit dem ECLTM-Reagenz gestartet wird. Dazu werden die ECLTM-Lösungen 1 und 2 in gleichen Teilen zu einem Volumen von etwa 5 ml gemischt und in einem kleinen Gefäß für 60 min bei Raumtemperatur mit der Nitrozellulosemembran in Verbindung gebracht. Nach kurzer Trocknungsphase wird der

Nitrozellulosemembran ein lichtgeschützter Röntgenfilm exponiert, der durch die emittierten Photonen für 10, 20, 30 oder 60 min geschwärzt wird. Anschließend kann der Röntgenfilm entwickelt, fixiert, gespült und analysiert werden.

2.2.4 Infektionen mit MV

Verschiedene stabil transfizierte CHO-Zelllinien, eine MM Zelllinie, U266 sowie primäre MM Zellen standen zur Verfügung, um die Rezeptorbindungseigenschaften bzw. den Eintritt unterschiedlicher Masernviren über verschiedene Rezeptoren zu untersuchen.

Die Zellen wurden in einer Konzentration von 3×10^4 Zellen pro well einer 24-well Zellkulturplatte ausgesät und über Nacht kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit 200 μ l/well einer Viruspräparation in entsprechendem Zellkulturmedium ohne FBS infiziert (1 Stunde bei 37°C). Anschließend wurde die Virussuspension von den Zellen entfernt, die Zellen einmal mit 1 ml/well PBS gewaschen und frisches Medium mit 10% FBS auf die Zellen gegeben (1 ml/well). Die Zellen wurden für 24 bis 72 Stunden kultiviert. Zum Nachweis der Infektion, wurden die Zellen auf eine Expression von EGFP durchflusszytometrisch untersucht.

2.2.5 Apoptosenachweis

In apoptotischen Zellen wird relativ früh im Apoptoseprozeß das Membranphospholipid Phosphatidylserin (PS) von der inneren zur äußeren Seite der Plasmamembran transloziert. Annexin V bindet an PS und somit an Zellen, die PS exponieren. Durch Kopplung von Annexin V an ein Fluorochrom wie z.B. FITC können die apoptotischen Zellen direkt in der Durchflusszytometrie gemessen werden. Da auch nekrotische Zellen PS exponieren, wird die Annexin V-Färbung mit einer Propidiumiodid (PI)-Färbung kombiniert. Bei Verlust der Membranintegrität als Zeichen von Nekrose bzw. später Apoptose kann PI in die Zelle eindringen. Das PI-Signal wird ebenfalls durchflusszytometrisch bestimmt. Anhand der Färbungskombinationen lässt sich somit unterscheiden zwischen vitalen Zellen (Annexin V-negativ, PI-negativ), frühapoptotischen Zellen (Annexin V-positiv, PI-negativ) und nekrotischen (bzw. spätapoptotischen) Zellen (Annexin V-positiv, PI-positiv).

Zur Färbung mit einem Annexin V-Cy5 Antikörper und Propidiumiodid (PI) wurden 5×10^5 Zellen einmal mit PBS/10% FBS gewaschen, 15 min mit einer Lösung von Annexin V-Cy5 und Annexin Färbepuffer (10 mM Hepes/NaOH (pH 7,4), 140 mM NaCl, 5 mM CaCl_2) bei

Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit einer Lösung von PI (1µg/ml) unmittelbar vor der Analyse mit Durchflußzytometrie gefärbt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Bindungsmuster des monoklonalen murinen Antikörpers Wue-1

Als Voraussetzung dafür, dass maligne Plasmazellen durch die genetisch modifizierten Masernviren spezifisch erkannt und zerstört werden können, ist eine spezifische Interaktion des MV mit der Zielzelle erforderlich. In einer Arbeit von Prof. Greiner (vormals Pathologie Würzburg, jetzt Gemeinschaftspraxis am Institut für Pathologie und Zytologie des Klinikum Deggendorf) zeigte sich ein spezifisches Binden des monoklonalen Antikörpers Wue-1 an gesunde und maligne Plasmazellen. In Kooperation mit Prof. Axel Greiner wurden im Rahmen der aktuellen Arbeiten mit Wue-1 nochmals immunhistochemische Färbungen an hämatologischen und nicht- hämatologischen Geweben angefertigt (siehe Tabelle 9 und 10) sowie im Rahmen dieser Arbeit durchflußzytometrische Analysen (Abbildung 5) von primären Knochenmarkbiopsien von Myelompatienten durchgeführt. Sowohl die immunhistochemischen als auch die durchflußzytometrischen Ergebnisse zeigten eine große Spezifität der Bindung von Wue-1 für maligne Plasmazellen. Neben der Bindung von Wue-1 an gesunde Plasmazellen und einer sehr leichten Anfärbbarkeit von sekretorischen Epithelien konnte keine weitere Bindung beobachtet werden. Wie in Tabelle 9 gezeigt, ließen sich unter den untersuchten hämatologischen Neoplasien lediglich diejenigen gut mit Wue-1 anfärben, die eine Plasmazelldifferenzierung besitzen, das Multiple Myelom und Zellen des M. Waldenström.

Ein bemerkenswerter Aspekt bei der Auswertung der immunhistochemischen und durchflußzytometrischen Analyse der Bindung von Wue-1 ist, dass alle untersuchten Myelomproben den monoklonalen Antikörper banden, unabhängig davon, wie ausgeprägt die Patienten vorbehandelt waren, d.h. für die Anfärbbarkeit mit Wue-1 spielte es keine Rolle, ob ein Patient noch völlig therapienaiv war oder aber ein Rezidiv nach Tandem-Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation erlitten hatte. Diese Eigenschaft zusammen mit der spezifischen homogenen Bindung von Wue-1 auf primären Myelomproben lassen diese Interaktion als eine für weitere therapeutische Strategien vielversprechende erscheinen.

Tabelle 9 **Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von hämatologischen Proben mit Wue-1**

Lymphom	positiv/gesamt
Multiples Myelom/ Plasmozytom	(50/51)
M. Waldenström	(14/15)
diffus- großzell. B-Zell Lymphom	(1/13)
follikuläres Lymphom	(0/23)
Mantelzelllymphom	(0/10)
Burkitt Lymphom	(0/5)
B-Zell Leukämie (B-CLL)	(0/13)
M. Hodgkin	(0/21)

Tabelle 10 Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von nicht-hämatologischen Proben sowie normalem peripherem Blut und Plasmazellen mit Wue-1

Gewebe	Bindung von Wue-1
peripheres Blut / Plasmazellen	- +
Leber	-
Niere	-
Herz	-
Muskel	-
Haut	-
Blase	-
Ovarien	-
Testis	-
sekretorische Epithelien und gastrointestinale Gewebe	schwach

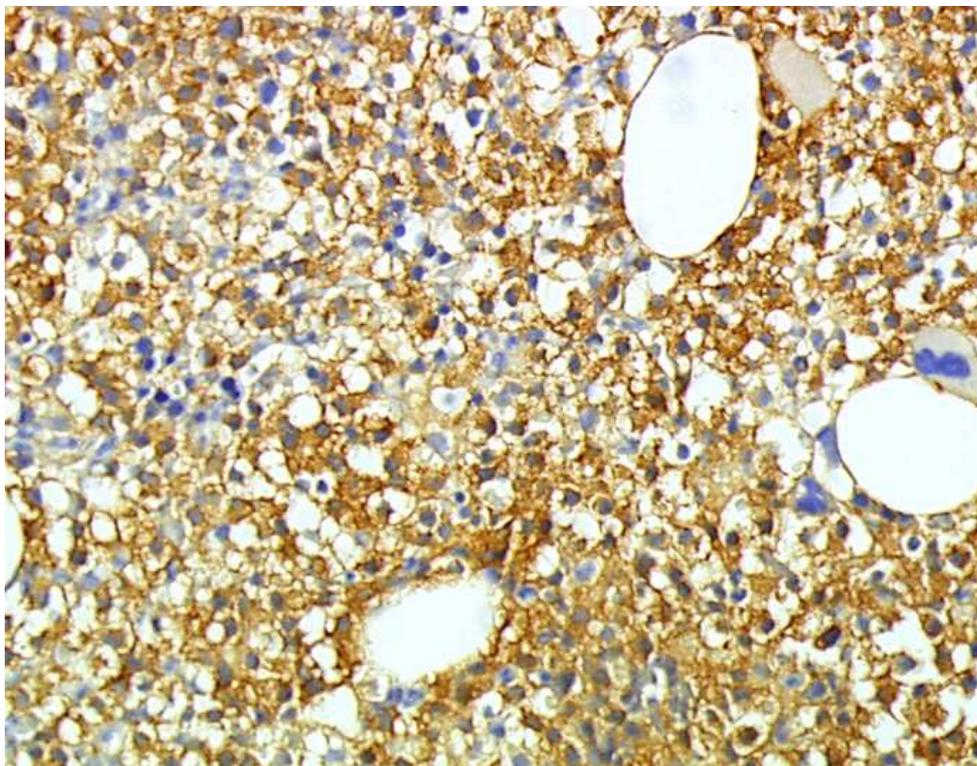


Abbildung 5 Immunhistochemische Färbung primärer maligner Plasmazellen durch Wue-1

3.2 Expression der MV-Rezeptoren

Die Analyse des Expressionsmusters der natürlichen MV- Rezeptoren auf den Zielzellen, den MM Zellen, erfolgte mittels FACS. Eine Expression von CD 46 konnte sowohl bei CD138 + Zellen, der heterogenen Gruppe der CD138- Zellen sowie auf mit CD40L expandierten gesunden B- Zellen gemessen werden. Die letztere Zellpopulation trug wie zu erwarten auch CD150 auf der Oberfläche, wohingegen die primären MM Proben dieses Antigen nicht exprimierten.

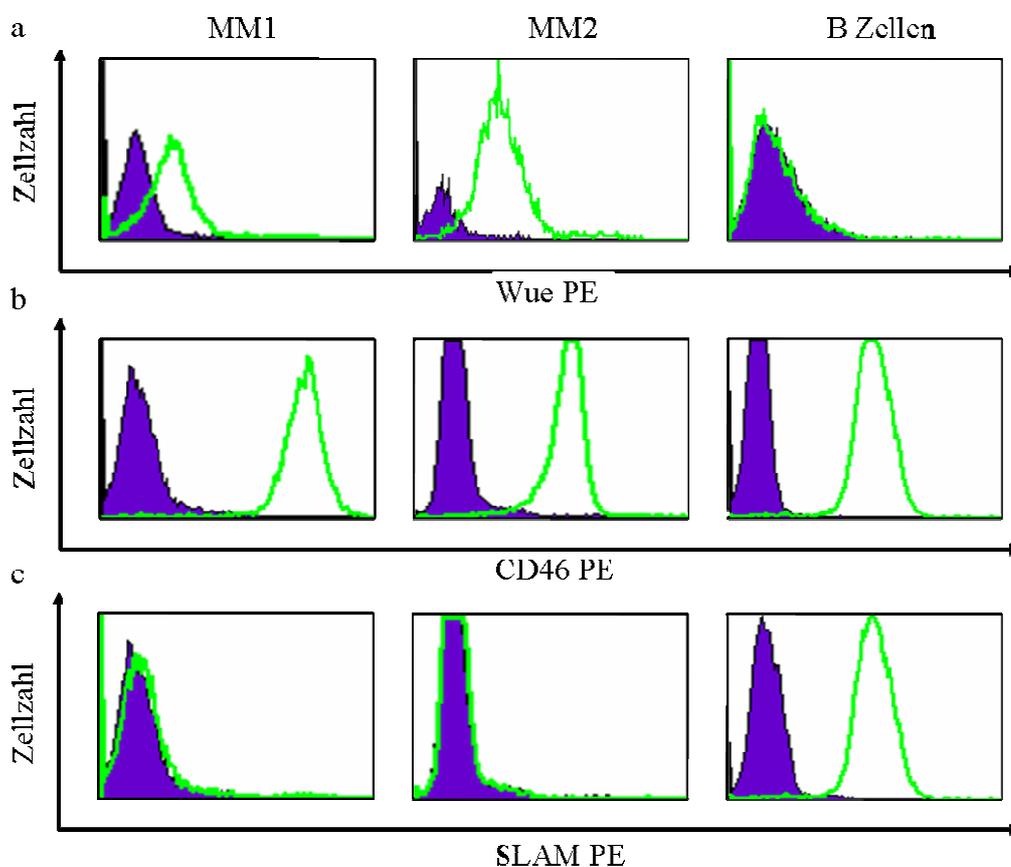


Abbildung 6 FACS-Färbung mit Wue-1, CD46 und CD150 zweier primärer MM Proben und primärer CD40 L aktivierter B-Zellen

3.3 Klonierung des rekombinanten MV-Wue

3.3.1 Klonierung des chimären H-Proteins

Grundlage zur Herstellung des rekombinanten MV-Wue, der die spezifische Interaktion von Wue-1 mit malignen Plasmazellen für ein selektives Erkennen der Myelomzellen ausnutzen kann, war ein Masernvirus (MV-EGFP_{aa}), das sich vom Vakzinenstamm Edmonston B ableitet. Hierbei handelt es sich ebenfalls bereits um ein rekombinantes Virus, das erstens für EGFP kodiert, so dass infizierte Zellen unter UV-Licht grün fluoreszieren bzw. dass eine gute Detektierbarkeit im FACS möglich ist, zweitens ein H-Protein beinhaltet, das so mutiert wurde, dass ein Erkennen der natürlichen MV-Rezeptoren CD46 und CD150 nicht mehr möglich ist und drittens eine kleine DNA-Sequenz besitzt, die für ein His-tag kodiert, um die Propagierung auf modifizierten Vero His Zellen ermöglichen zu können, die einen anti-His tag-single chain Antikörper exprimieren. MV-EGFP_{aa} wurde in einem nachfolgenden Schritt so modifiziert, dass die cDNA für einen single chain Antikörper, der basierend auf der Sequenz von Wue-1 erstellt wurde (scFvWue, zur Verfügung gestellt von Micromet, München), in frame an das Hemagglutinin (H) Protein kloniert wurde. Hierzu wurden zunächst PCR-Amplifikate eines von den Restriktionsschnittstellen Sfi I und Not I flankierten Fragmentes des scFvWue erstellt. Zudem wurde ein Restriktionsverdau des mutierten H-Proteins durchgeführt (H_{aa}). Nach Ligation wurde dieses modifizierte H- Protein (H_{aa}-Wue) als Plasmid-DNA innerhalb des Shuttlevektors pTNH6aa in Bakterien transformiert und ein geeigneter Klon durch Kontrollverdau mit Sfi I und Not I und nachfolgende Sequenzierung ermittelt.

3.3.2 Transfektionsexperimente mit dem chimären H-Protein

Die erste funktionelle Überprüfung des neuen rekombinanten H-Proteins erfolgte mittels Transfektionsexperimenten. Hierbei wurden parentale CHO-Zellen (CD46 und CD150/SLAM negativ), CHO-Derivate, die entweder CD46 oder SLAM exprimierten bzw. die Myelomzelllinie U266 eingesetzt. Als zu transfizierenden DNA wurde für jeden Ansatz immer eine Plasmid-DNA verwendet, die für das F- Protein des MV kodiert, so dass mit dem additiv ebenso wie nachfolgend beschriebenen H-Protein bei entsprechender Spezifität eine Fusion von Zellen im Ansatz zustande kommen konnte. Je nach Ansatz wurde zusätzlich entweder das H- Protein verwendet, das wie bei MV-EGFP CD46 und SLAM erkennt oder eines, das für CD46 und SLAM blind ist und zusätzlich mit dem scFvWue-1 single chain Antikörper fusioniert wurde bei MV-Wue. Wie in Abb. 7 an der EGFP-Expression zu sehen, konnte unter Verwendung des H-Proteins des MV-EGFP eine starke Fusion all derjenigen Zelllinien gesehen werden, die einen natürlichen MV- Rezeptor exprimieren (CHO-CD46, CHO- SLAM und U266). Im Gegensatz dazu konnten durch die Kotransfektion von F mit dem modifizierten H-Protein des MV-Wue wie erwartet keine Synzytien von CHO-CD46 und CHO-SLAM gesehen werden. In der MM-Zelllinie U266, die den monoklonalen Wue-1 bindet, konnte hingegen mit diesem Ansatz eine effiziente Synzytienbildung gesehen werden.

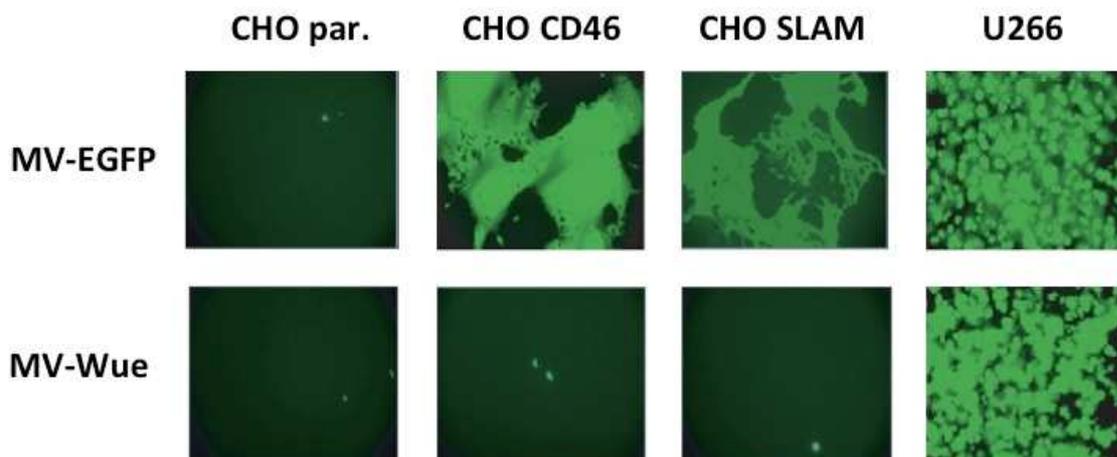


Abbildung 7 **Kotransfektionsexperimente mit nicht mutiertem und mutiertem H-Proteinen**
 Kotransfektionsexperimente mit dem nicht mutierten H-Protein von MV-EGFP in der oberen Reihe bzw. dem mutierten und mit scFvWue-1 versehenen rekombinanten MV-Wue in der unteren Reihe mit den jeweiligen Zelllinien CHO parental, CHO-CD46, CHO-SLAM sowie U266.

3.3.3 Klonierung des kompletten Genoms von MV-Wue

Über einen Restriktionsverdau mit Pac I und Spe I wurde die für H_{aa}-Wue kodierende Plasmid-DNA in die Gesamt-cDNA (backbone) des Virus kloniert. Nach einem Kontrollverdau mit PacI/SpeI sowie einer Kontrollsequenzierung konnte diese cDNA des rekombinanten neu mittels Expression des scFv Wue gegen maligne Plasmazellen ausgerichteten MV-Wue zum Rescue eingesetzt werden.

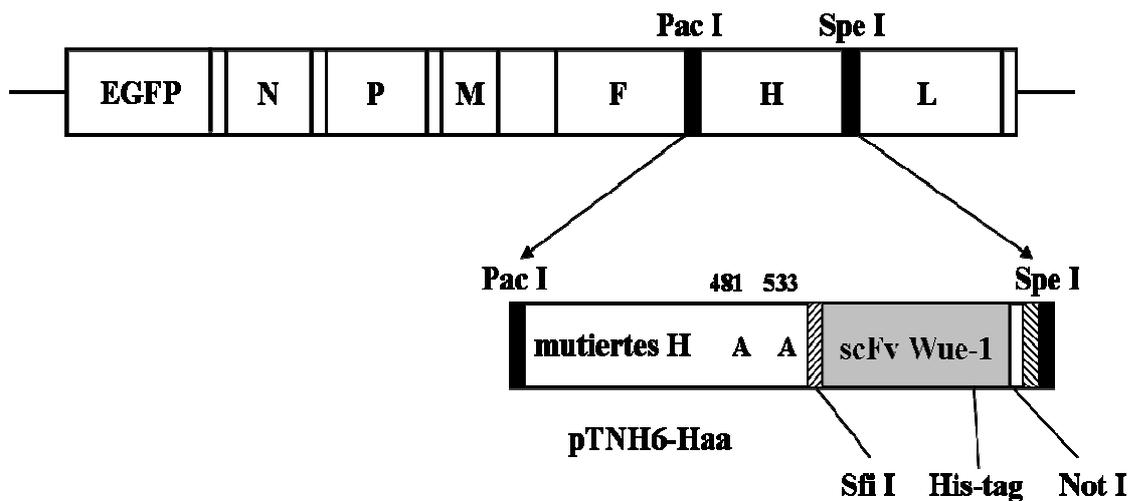


Abbildung 8 Schematische Darstellung der vollständigen cDNA von MV-Wue

3.4 Rescue des MV-Wue

3.4.1 Anti-His-tag single chain Rezeptorexpression von Vero His Zellen

Die Herstellung vollständiger replikationskompetenter Virionen (Rescue) von MV-Wue aus cDNA kann nur erfolgen, wenn für dieses Virus susceptible Zellen zur Verfügung stehen. Da MV-Wue zu keiner Interaktion mehr mit CD46- bzw. CD150 exprimierenden Zellen fähig ist, musste eine neue Zelllinie erstellt werden, die über eine neue Rezeptor-Ligand-Interaktion ein Andocken und im weiteren Verlauf eine Infektion mit MV-Wue ermöglicht. Hierzu wurde die Vero-His Zelllinie verwendet, die einen anti-His tag single chain Antikörper (α His-scFv) stabil exprimiert. Vor dem Einsatz für den Rescue und die anschließende Propagierung wurde eine Kontrolle der Expression des α His-scFv im FACS durchgeführt. Hierzu wurde eine Färbung mittels eines HA- Antikörpers durchgeführt. Es konnte eine homogene starke Expression des α His-scFv auf der Oberfläche der Vero His Zellen gemessen werden.

3.4.2 Transfektion von 293-3-46 Zellen und Overlay von Vero His Zellen

Transfektion und Overlay erfolgten gemäß der Beschreibung im Abschnitt Methoden. Der erfolgreiche Rescue zeigt, das MV-Wue in der Lage ist, vollständig in Vero His Zellen zu replizieren.

3.4.3 Propagierung von MV-Wue auf Vero His

Für ein potentes onkolytisches Agens ist die effiziente Replikation in den Zielzellen eine wichtige Voraussetzung für dessen Einsatz. Um die Frage zu beantworten, ob die Replikationsfähigkeit und –effizienz des neuen rekombinanten Virus, MV-Wue, durch die genetischen Veränderungen negativ beeinträchtigt wurden, wurden Wachstumskurven erstellt, in denen MV-EGFP mit parentalem H-Tropismus zu CD46 und CD150 mit MV-Wue verglichen wurden. Da MV-Wue durch die Mutationen im H-Protein nicht mehr in der Lage ist, mit CD46 oder CD150 zu interagieren, wurde eine Variante der herkömmlichen Vero-Zelllinie zur Propagierung benutzt, die Vero His Zelllinie (siehe Material). Das Einfügen des scFv Wue resultiert nicht in einer Reduktion des Virustiters von MV-Wue. Sowohl bei der Messung des Titers der freien Viren als auch bei der des zell-assoziierten Virus zeigten sich

bei etwas reduzierter Kinetik mit MV-EGFP vergleichbare Endtiter (10^6 TCID₅₀/ml) (Abbildung 9).

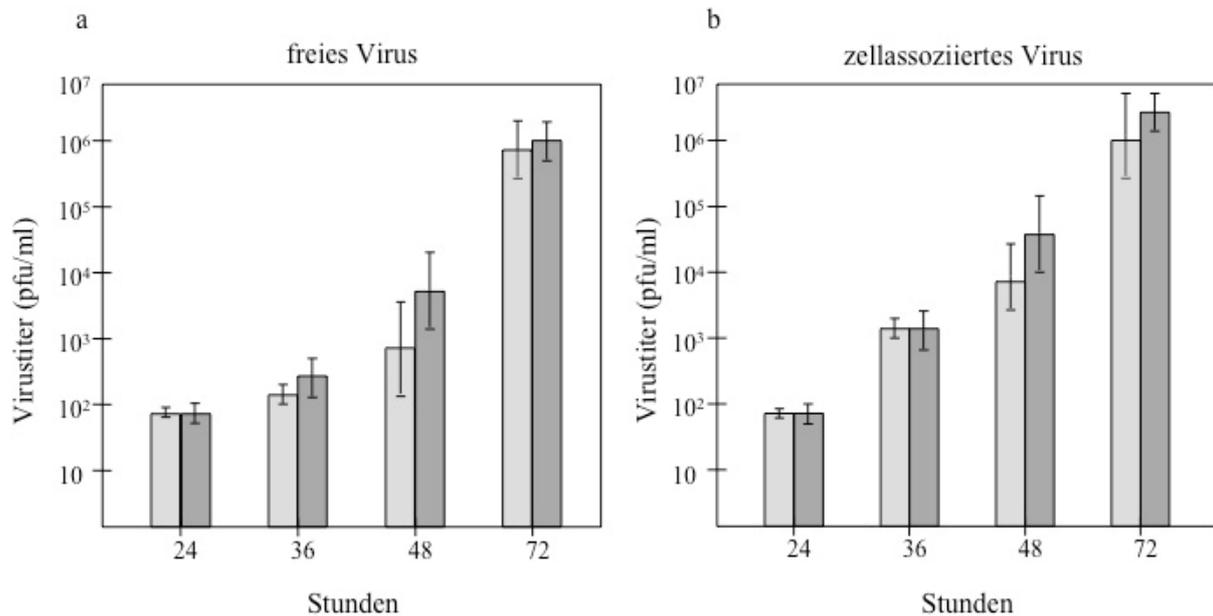


Abbildung 9 Virustiter im Überstand und zellassoziiert von (a) MV-EGFP und (b) MV-Wue

3.5 Western Blot der H-Proteine von MV-EGFP und MV-Wue

Zur Kontrolle der Herstellung replikationskompetenter Virionen von MV-Wue ist neben den Methoden des Restriktionsverdau und der Sequenzierung auf DNA-Ebene die Kontrolle mit Western Blot nach erfolgter Translation auf Proteinebene wichtig. Nach erfolgter Propagierung von MV-Wue auf Vero His Zellen wurde die Expression des scFv-Wue von MV-Wue Virionen überprüft. Abbildung 10 zeigt, dass das H-Protein des MV-Wue ein deutlich höheres Molekulargewicht als das von MV-EGFP hat. Nach der Behandlung mit der Protease FXa wurde der scFv- Wue vom chimären H-Protein des MV-Wue abgeschnitten. Das resultierende H-Protein hatte nach dieser Prozedur wieder (nach unvollständigem Verdau nicht das gesamte aufgetragene Protein) dasselbe Molekulargewicht wie das des unmodifizierten MV-EGFP. Eine Behandlung der MV-EGFP Virionen mit FXa hatte keinen Effekt auf die Größe des unmodifizierten H-Glykoproteins (Abbildung 10).

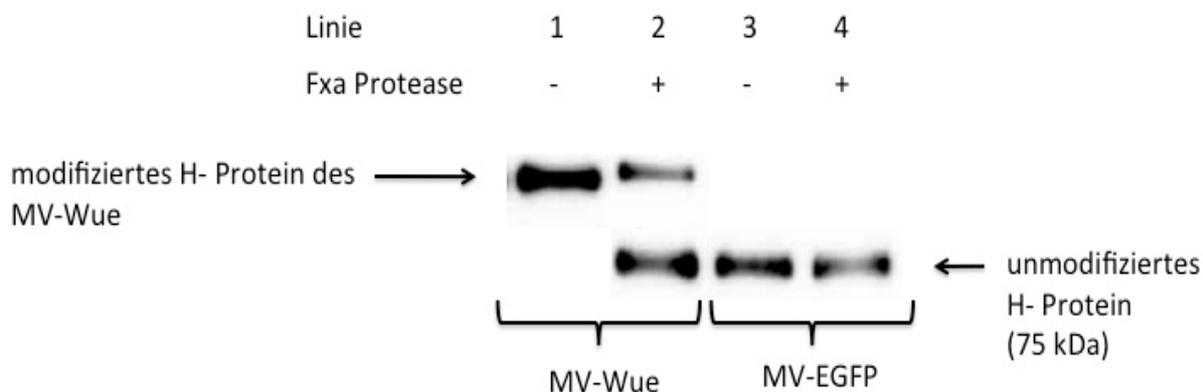


Abbildung 10 Western Blot Analyse von H und H modifiziert mit scFvWue mit Fxa-Protease

3.6 Spezifische Infektion primärer Myelomzellen durch MV-Wue

Ein für die Beurteilung der klinischen Anwendbarkeit von onkolytischen Viren wichtiger Aspekt ist deren Spezifität der Infektion einer definierten Zielzelle. Die Zielzellen des MV-Wue, primäre MM-Zellen, wurden in den folgenden Infektionsversuchen frisch aus Knochenmarkproben isoliert und sofort eingesetzt. Zur Identifikation der Zielzelle wurde die Expression von Syndecan-1 (CD138) herangezogen. Ein Teil der isolierten primären MM-Zellen wurde zur Überprüfung der Bindung von Wue-1 verwendet. Bei diesen Infektionsversuchen wurde mit Hilfe von CD138 Beads (MACS- System, Miltenyi) eine Aufreinigung der CD138+ Zellen durchgeführt. Als Negativkontrollen wurden zum einen die CD138 Negativfraktion aus der Knochenmarkprobe und zum anderen primäre CD40 Ligand aktivierte B-Zellen, als unmittelbare Vorläuferzellen der malignen Plasmazellen, eingesetzt.

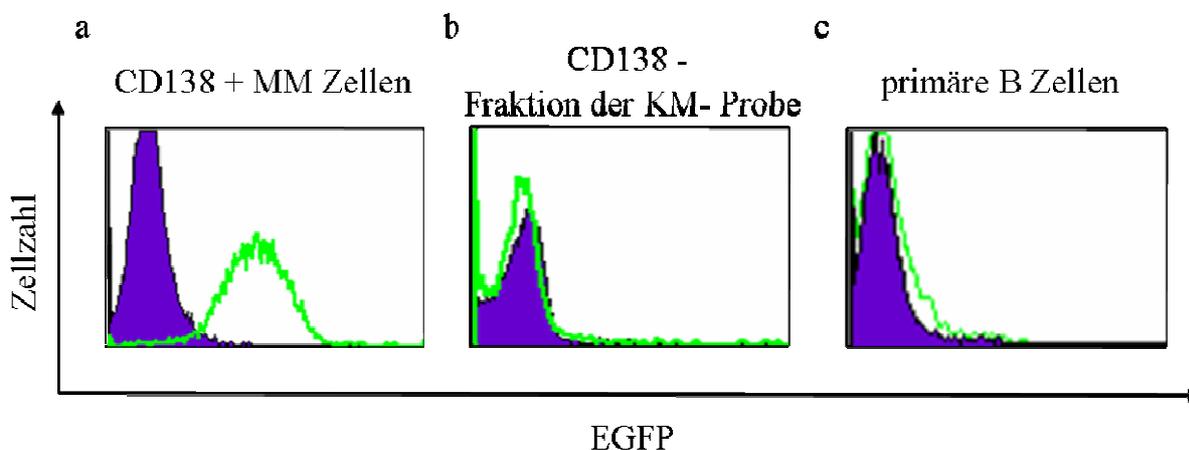


Abbildung 11 Spezifische Infektion primärer MM-Zellen durch MV-Wue

In Abbildung 11 ist ein repräsentatives Infektionsexperiment für dieses Setting gezeigt. In der Teilabbildung a ist nach Infektion mit MV-Wue eine homogene Expression von EGFP der primären MM-Zellen (CD138+ Zellen) dargestellt. Hingegen zeigen die Negativkontrollen, die CD138 – Fraktion sowie die primären B-Zellen keine EGFP Expression, demnach keine Infektion mit MV-Wue.

Zur Bestätigung, daß die Spezifität der Infektion von MM-Zellen durch MV-Wue auf der exklusiven Interaktion des scFvWue des modifizierten H von MV-Wue mit der malignen Plasmazelle beruht, wurden die primären MM-Zellen in zusätzlichen Ansätzen vor der Infektion mit MV-Wue mit dem Wue-1 monoklonalem Antikörper inkubiert. Der antikörperhaltige Überstand wurde nach 1 Stunde durch dreimaliges Waschen von den Zellen entfernt. Abbildung 12 zeigt, dass die Expression von EGFP, also die Infektion der primären MM-Zellen durch MV-Wue, unter dieser Antikörperblockade im Vergleich zur Probe mit IgG-Kontrollantikörper vorbehandelten MM-Zellen um ca. 60% zurückgegangen ist.

Im Rahmen dieser Versuche wurde die Infektion der Zielzellen mithilfe der Expression von EGFP mittels FACS überprüft. Lichtmikroskopisch ließen sich keine wesentlichen Synzytien nachweisen. Zusammenfassend kann man aus diesen Experimenten schließen, dass MV-Wue in der Lage ist, spezifisch primäre MM-Zellen zu infizieren.

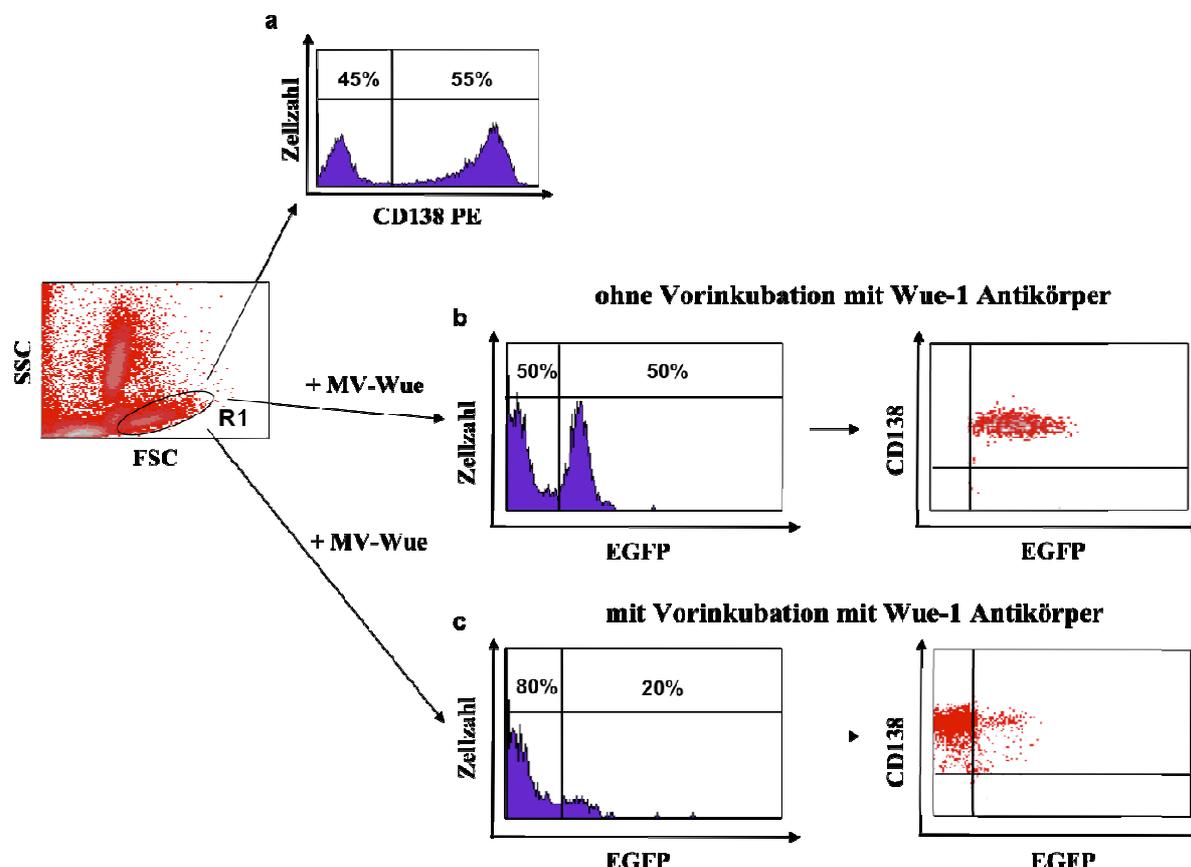


Abbildung 12 Die Infektion von primären MM-Zellen durch MV-Wue kann spezifisch durch Wue-1 MoAb geblockt werden.

3.7 Propagierung von MV-Wue in primären Myelomzellen

Eine gute Replikation von MV-Wue auf einer sehr suszeptiblen Zelllinie mit zusätzlicher Expression eines anti His-tag single chain Antikörpers erlaubt lediglich eine Aussage über die Replikationseffizienz des rekombinanten Virus in dieser speziellen Situation. Einen weiterführenden Beitrag zur funktionellen Evaluation liefert allerdings die Beantwortung der Frage, ob MV-Wue auch in der Lage ist, in primären MM-Zellen gut zu replizieren. Vor dem Hintergrund, dass für MM-Zellen die Fähigkeit zur MV-Replikation beschrieben wurde, erfolgte der Einsatz von Wue-1-bindenden/CD138+ primären MM-Zellen in den folgenden Infektionsexperimenten. Ziel dieser Versuche war es, einen Vergleich der erzielbaren Titer von MV-EGFP und MV-Wue in primären MM-Zellen in An- und Abwesenheit von Wue-1 Antikörper durchzuführen. Der zusätzliche Einsatz von Wue-1 Antikörper mit IgG-Kontrolle erfolgte, um auch in dieser Situation zu zeigen, dass nicht nur die Infektion sondern auch die Produktion von Virus der spezifischen Interaktion von scFvWue-1 mit den primären MM-Zellen unterliegt. Wie in Abbildung 13 gezeigt, sind für MV-EGFP unabhängig von der Anwesenheit des Wue-1 Antikörpers oder des IgG Kontrollantikörpers über die Zeit steigende Virustiter zu beobachten. Im Vergleich dazu konnten vergleichbar hohe Virustiter auch für MV-Wue in den Ansätzen gemessen werden, in denen entweder kein Antikörper oder der IgG Kontrollantikörper eingesetzt wurde. In Anwesenheit des Wue-1 Antikörpers hingegen zeigte sich deutlich reduzierter MV-Wue Virustiter (Reduktion um ca. 80% nach 24 h bzw. um den Faktor 100 nach 72 Stunden bei den Ansätzen, die den Virustiter im Überstand messen). Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass MV-Wue unter Verwendung von primären MM-Zellen ähnliche Virustiter wie MV-EGFP produziert. Die Produktion ist im Falle von MV-Wue, wie zuvor für die Infektion von MM-Zellen gezeigt, spezifisch für CD138+/ Wue-1 bindende Zellen.

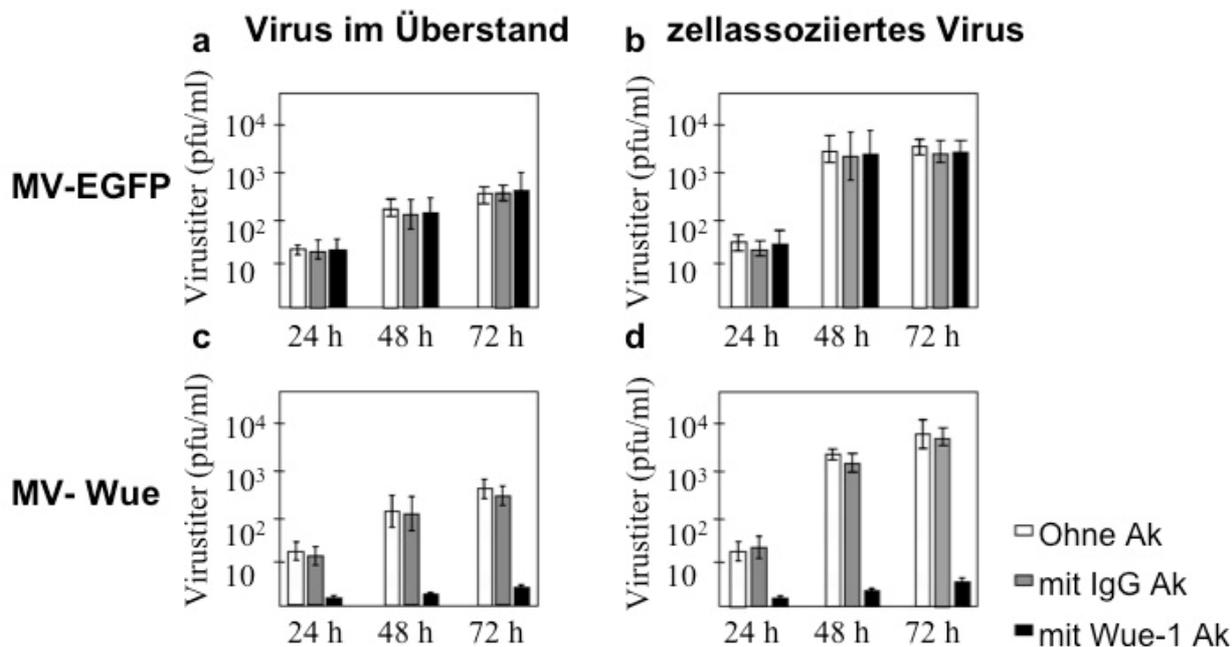


Abbildung 13 Spezifische Propagierung von MV-Wue auf primären MM-Zellen

3.8 MV-Wue reduziert spezifisch die Zellzahl CD138+/Wue-1 bindender Zellen aber nicht die myeloischer Zellen und myeloischer Progenitorzellen (CD33+)

Aufgrund des hohen Tropismus von MV für Monozyten bzw. myeloische Progenitoren wurde im nächsten Schritt die Auswirkung von MV-Wue auf diese Zellpopulation untersucht. Definiert wurden die myeloischen Zellen für diese Versuche durch die Expression von CD33, als Read-out wurde die Zellzahl über die Zeit nach Inkubation mit Mock, MV-EGFP und MV- Wue bestimmt. In Abbildung 14 sind die Frequenzen für primäre MM-Zellen im Vergleich zu denen für CD33+ Zellen 3,5 Tage nach Inkubation mit Mock, MV-EGFP und MV-Wue dargestellt. Die MM-Zellen (CD138+) sowie die CD33+ Zellen wurden jeweils von demselben Patienten durch Selektion mittels magnetischer CD138 bzw. CD33 Beads (siehe Material und Methoden) isoliert. Nach Inkubation mit MV-EGFP konnte unabhängig von der Präsenz eines Antikörpers eine starke Reduktion der Zellzahlen sowohl der CD138+ als auch der CD33+ Zellen beobachtet werden. Eine Inkubation mit MV-Wue hingegen verringerte spezifisch die Anzahl der CD138+ Zellen, die CD33+ Zellen wiesen im Vergleich zur Mock-Kontrolle keine signifikante Reduktion auf. Die Anwesenheit des IgG-Kontrollantikörpers hatte keine Auswirkung auf die bestimmten Zellzahlen beider getesteter Populationen. Im Gegensatz hierzu konnte eine deutlich geringere Reduktion der CD138+ Zellen nach Inkubation mit MV-Wue in Anwesenheit des Wue-1 Antikörpers detektiert werden. In der

weiterführenden durchflußzytometrischen Bestimmung der EGFP-Expression der mit den Viren in Kontakt gebrachten Zellpopulationen (Abbildung 15) zeigte sich, daß die Zellen in den Ansätzen EGFP exprimierten, in denen deutliche Zellzahlreduktionen bestimmt werden konnten, d.h. bei Verwendung von MV-EGFP in allen Ansätzen und bei MV-Wue massiv im Ansatz mit IgG-Kontrollantikörper. In Kontrollexperimenten zeigte sich keine signifikante Zellreduktion anderer hämatopoetischer Zellen.

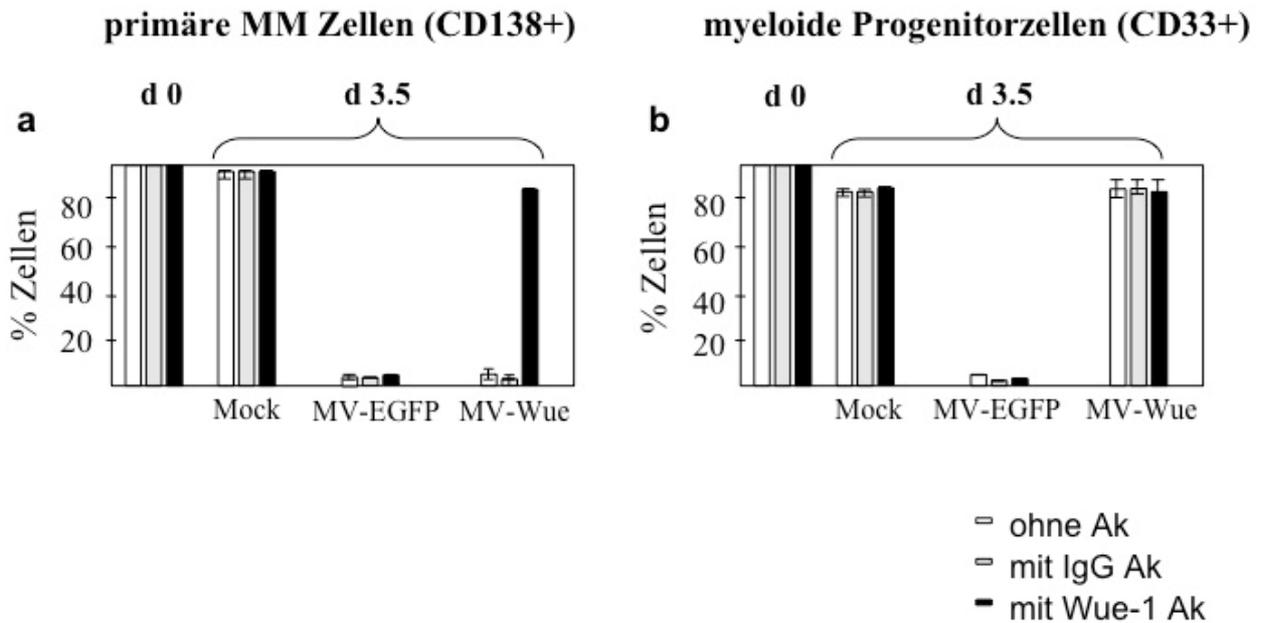


Abbildung 14 MV-Wue infiziert MM-Zellen spezifisch jedoch nicht CD33+ Zellen

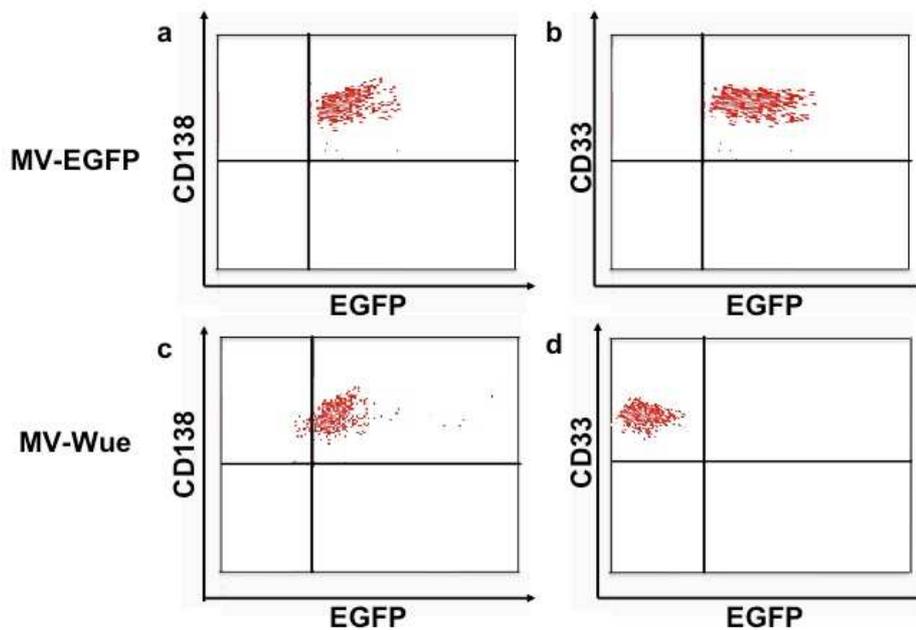


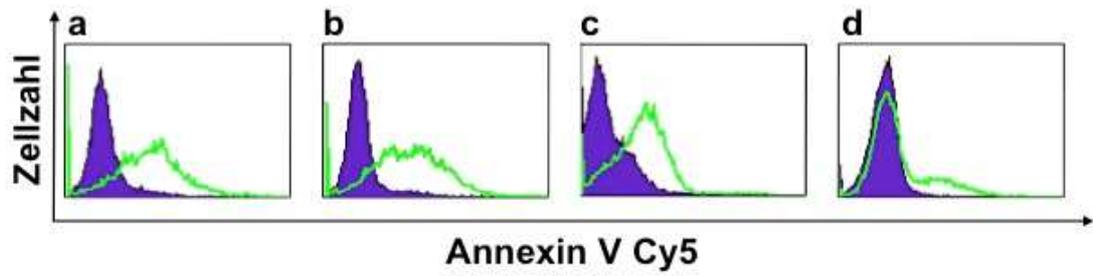
Abbildung 15 FACS Analyse der primären MM-Zellen sowie der primären CD33+ Zellen aus Versuch zu Abbildung 14

3.9 Die mit MV-Wue spezifisch infizierten primären MM-Zellen werden apoptotisch

Wie in den oben gezeigten Ergebnissen zu sehen, ist eine Infektion durch MV-Wue von primären CD138+ MM-Zellen sowie auch eine Replikation dieses modifizierten Virus in diesen Zellen möglich. Um das weitere Schicksal dieser infizierten Zellen zu untersuchen, wurde mittels Färbungen mit Annexin V und Propidiumiodid (PI) nach Induktion von Apoptose gesehen. Abbildung 16 zeigt ein repräsentatives Beispiel (insgesamt = 5) einer primären Knochenmarkprobe eines MM-Patienten mit einer annähernd 100% Infiltration von malignen Plasmazellen. 72 Stunden nach Infektion der MM-Zellen konnte sowohl für MV-EGFP als auch für MV-Wue die Induktion eines hohen Prozentsatzes Annexin V positiver und PI negativer EGFP exprimierender MM-Zellen gemessen werden. Im Falle von MV-Wue konnte der Prozentsatz apoptotischer Zellen nach Präinkubation der Zielzellen mit Wue-1 Antikörper um im Mittel 80% (+/- 16%) gesenkt werden. Diese Reduktion wurde nicht bei Verwendung von MV-EGFP beobachtet. Die Inkubation mit dem IgG-Kontrollantikörper erbrachte für beide MV-Viren keine Unterschiede in der Höhe an apoptotischen Zellen. Die Ergebnisse der Annexin V-Färbungen ohne Antikörperpräinkubation der MM-Zellen war ähnlich denen, wenn die Inkubation mit IgG- Antikörper erfolgt ist. Auf eine Darstellung wird an dieser Stelle deshalb verzichtet.

Da in der FACS-Untersuchung Synzytien nach Infektion nicht detektiert werden können, wurde auch bei diesen Versuchen mit Hilfe eines Lichtmikroskops nach diesen Formationen gesucht. Jedoch auch in diesen Experimenten konnten keine Synzytien beobachtet werden.

In der Zusammenschau der Ergebnisse zeigt sich, dass die Infektion der primären MM-Zellen mit MV-Wue nach Induktion von Apoptose in den infizierten Zellen in einer massiven Zellzahlreduktion der malignen MM-Zellen in vitro mündet.



MV	MV-EGFP	MV-EGFP	MV-Wue	MV-Wue
Präinkubation mit Wue-1 Antikörper	-	+	-	+
Präinkubation mit IgG Kontroll- antikörper	+	-	+	-

Abbildung 16 Apoptosenachweis von MV-Wue infizierten primären MM-Zellen

4 DISKUSSION

In den letzten Jahren wurden insbesondere bei Patienten unter 65 Jahre mit Multiplem Myelom gute Therapieerfolge erzielt. Insbesondere die autologe Stammzelltransplantation aber auch die Einführung neuerer Substanzen wie Lenalidomid, Thalidomid oder Bortezomib haben in verschiedenen Kombinationen zu deutlich gesteigerten CR-Raten mit verbessertem PFS und OS beigetragen. Letztendlich erscheint diese Erkrankung jedoch nach wie vor in den weit überwiegenden Fällen als nicht heilbar. Aus der Komplexität der Pathogenese und den Erfahrungen mit diesen Therapieverfahren lassen sich unter anderem zwei wichtige Erkenntnisse ableiten. Zum einen scheinen Kombinationstherapien besonders vielversprechend zu sein und zum anderen erweist sich mittlerweile die Eliminierung der minimalen Resterkrankung (minimal residual disease, MRD) vielmehr als das Erreichen einer CR alleine als die hauptsächliche Herausforderung der nächsten Jahre.

Wie auch bei anderen Entitäten liegt der Fokus der Entwicklung auf Substanzen, die möglichst spezifisch die malignen Zellen eradizieren. Im Zuge dessen sind immuntherapeutische Verfahren naturgemäß von besonderem Interesse, die allerdings in Ermangelung geeigneter therapeutisch ausnutzbarer Zielantigene auf den malignen PZ bislang keinen Stellenwert in der MM-Therapie hatten. Insbesondere die Arbeiten von Prof. Greiner mit der Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers, Wue-1, der spezifisch gesunde und maligne PZ erkennen kann, haben auf diesem Gebiet jedoch in den letzten Jahren zur Entwicklung von Ansätzen geführt, wie z.B. der eines bispezifischen Antikörpers durch Hönemann *et al.*, die eine immuntherapeutische Strategie für das MM wieder möglich erscheinen lassen. Eine spezifische Bindung von Wue-1 wurde für primäre Proben von Multiplem Myelom, Immunozytom und Lymphomen mit Plasmazelldifferenzierung beobachtet, unabhängig von den Vortherapien der Patienten. Gesundes hämatopoetisches und non-hämatopoetisches Gewebe mit Ausnahme von normalen Plasmazellen band nicht den monoklonalen Antikörper Wue-1. Diese Daten zeigen, dass mithilfe von Wue-1 die Möglichkeit gegeben ist, Myelomzellen als Zielzellen zu definieren, insbesondere im Vergleich zu CD38, einem Glykoprotein, das breit auf hämatologischen Zellen exprimiert wird, wie CD4, CD8 oder NK-Zellen, oder CD138 (Syndecan-1), das auch auf Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten oder normalen Hepatozyten exprimiert wird. Zusätzlich wurde für Wue-1 eine Proliferationsförderung von malignen Plasmazelllinien *in vitro* im Gegensatz zu normalen Plasmazellen nachgewiesen. Dies weist darauf hin, dass der Ligand von Wue-1 auf MM-Zellen einen Wachstumsvorteil für maligne Plasmazellen vermittelt, der der Downregulation dieses Liganden entgegenwirken könnte. Auch die

Stabilität der Wue-1 Bindung an die MM-Zellen, die von Patienten gewonnen wurden, die bereits mehrfach mit verschiedenen Chemotherapieprotokollen inklusive autologer Stammzelltransplantation behandelt wurden, zeigt, dass diese spezifische Interaktion von Wue-1 mit den malignen Plasmazellen nicht unter dem Druck einer Chemotherapie zu einer Downregulation des Liganden führt.

Der erfolgreiche Einsatz von monoklonalen Antikörpern im Rahmen der Therapie hochmaligner Lymphome mit Rituximab oder auch des CD19/CD3 BITE-Antikörpers (Blinatumomab/MT103) bei niedrigmalignen Lymphomen (Bargou *et al.*, 2008) oder ALL (Topp *et al.*, 2009) führt in jüngster Zeit die hervorragenden Möglichkeiten der Immuntherapie vor Augen. Die Entwicklung von MT103 zeigt u.a., dass eine möglichst enge Kopplung der „erkennenden Domäne“ (V-Regionen des anti-CD19 single chain Antikörpers) mit der „Effektordomäne“ (T-Zellen über anti-CD3 Region des bispezifischen BITE) zu einer verbesserten Effektivität des immuntherapeutischen Ansatzes führt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Verbindung von „Erkennen“ und „Effektorfunktion“ im Sinne von spezifischer Lyse der definierten Zielzelle mit der Konstruktion eines rekombinanten replikationskompetenten Masernvirus, der die single chain Variante des MoAb Wue-1 trägt, optimiert. Für den Eliminationsmechanismus der malignen Zielzellen ist auf diese Weise keine weitere Rekrutierung von Effektoren notwendig, die z.B. auch von deren Verfügbarkeit in den jeweiligen Regionen der Tumordinfiltration abhängt. Zudem sind im Rahmen des Einsatzes von BITE-Ak, wie dies für Blinatumomab gezeigt wurde, nur Memory-T-Zellen nicht aber naive T-Zellen für die Lyse wirksam.

Der Masernvirusimpfstamm Edmonston B besitzt eine Reihe vorteilhafter Eigenschaften, die ihn zu einem geeigneten Kandidaten machen, um ihn als onkolytisches Therapeutikum für das spezifische Abtöten von malignen Zellen zuzuschneiden. Der virale Zyklus des nativen und der rekombinanten Masernviren erlaubt eine effiziente Replikation und sie erreichen mit unterschiedlicher Kinetik vergleichbar hohe Virustiter. Zudem erfolgt eine effiziente Zytolyse und Ausbreitung von Zellen zu Zelle, die die Viren von einer Immunantwort abschirmen kann. Für den Edmonston B Stamm ist zusätzlich ein rekombinantes System entwickelt worden, das vielseitige genetische Modifikationen erlaubt, um Viren herzustellen, die für Tumorantigene spezifisch sind. Ein weiterer Vorteil ist die große genetische Stabilität und die seltene Rekombination der modifizierten Viren auch nach vielfachen Replikationszyklen, die konstante Veränderungen ermöglichen. Zum günstigen Sicherheitsprofil des Masernvirusimpfstammes Edmonston B gehört auch die Verfügbarkeit eines mutierten zur Interaktion mit den natürlichen Masernvirusrezeptoren CD46 und CD150 nicht mehr fähigen

H-Proteins in den rekombinanten Masernviren, was die ungewollte Infektion von Zellen und Geweben, die nicht das Zielantigen exprimieren, vermeiden lässt.

Deutliche Lücken im Verständnis der Bedingungen, unter denen der virale Tropismus für maligne Zellen optimiert werden kann, verhinderten lange größere Fortschritte in der onkolytischen Virotherapie. In den letzten Jahren wurden jedoch große Anstrengungen unternommen, v.a. auch auf molekularem Level, das Zusammenspiel von Viren und ihrer Zielzellen zu beschreiben. So konnte gezeigt werden, dass neoplastische Zellen ein hohes Potential besitzen, bereits von Natur aus onkolytische Viren gut zu replizieren, wohingegen nicht transformierte Zellen die Virusinfektion und vor allem die Virusvermehrung besser kontrollieren können. Zudem förderte die intensive Untersuchung der natürlichen onkolytischen Viren deren deutlich eingeschränkte Effektivität und auch die dosislimitierende Toxizitäten zutage, woraus sich die Notwendigkeit der Optimierung dieser Eigenschaften ergab. Sowohl in Zusammenhang mit der Frage der Effektivität als auch der Sicherheit steht das Ziel, die Spezifität eingesetzten onkolytischen Viren für die Tumorzellen zu optimieren. Im Zuge der Tumorevolution haben verschiedene genetische und epigenetische Veränderungen zu einer für die malignen Zellen einzigartigen Expression oder aber zu einer Überexpression von auch anderweitig vorhandenen Oberflächenantigenen geführt. Da die Erkennung der Zelloberfläche und der Eintritt des Virus der Schlüssel für eine produktive virale Infektion sind, sollte die Etablierung einer spezifischen Interaktion von Virus und maligner Zelle zu einer exklusiven Infektion dieser führen. Dieses Ziel wurde mit modifizierten Masernviren (MV) erreicht. Wie oben erwähnt, bindet das MV während der Infektion mit dem H- Protein an einen der beiden Rezeptoren, CD 46 oder SLAM. Nach Anfügen von single chain Antikörpern z.B. gegen CEA, CD20 oder CD38 an das H- Protein in Kombination mit der durch Mutationen im H- Protein ausgeschalteten Interaktion mit den natürlichen Rezeptoren, konnte ein für ein bestimmtes Antigen spezifisches rekombinantes MV erstellt werden. Wichtig ist zudem, dass diese genetisch modifizierten MV auch nach mehrfachen Runden der Replikation stabil sind und zu hohen Titern amplifiziert werden können.

Andere Ansätze unter Verwendung von Adenoviren ermöglichen dem Virus nicht nur ein spezifisches Binden an der Zielzelle sondern auch das Ausnutzen der zellulären Transkriptionsmaschinerie oder bestimmter Promotorelemente, die spezifisch in Tumorzellen aktiv sind. Des Weiteren kann eine tumorselektive Infektion durch ein onkolytisches Virus erreicht werden, indem die besonderen Bedingungen der Tumormikromilieus ausgenutzt werden. So gibt es Ansätze, das F-Protein des MV so zu verändern, dass es nur im Protease-reichen Tumormikromilieu zu seiner aktiven Form prozessiert werden kann.

Neben onkolytischem Virus und der Zielzelle inklusive Mikromilieu spielt auch das Immunsystem für die Virotherapie eine wichtige Rolle. Onkolytische Viren aktivieren sowohl die angeborene als auch die erworbene Immunabwehr. Zellen haben im Verlauf der Evolution ein ausgeklügeltes System entwickelt, wie sie eingedrungenen Viren zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion effektiv begegnen können. Diese Antwort im Rahmen der angeborenen Immunabwehr wird in weiten Teilen durch Typ I Interferone getragen, die über die Transkriptionsverstärkung von interferonstimulierten Genen (ISG) wie den MHC-Molekülen antiviral wirksam werden. Mit der Entwicklung von Tumoren sinkt die Wirkung von Interferon auf die maligne Zelle und die Expression von wichtigen ISG's geht zunehmend verloren, so dass der Tumor z.B. durch die Downregulation von MHC-Molekülen für das Immunsystem unsichtbar wird. Eine mögliche Strategie, in diesem Zusammenhang Tumorselektivität zu erreichen, ist die Selektion von besonders Interferonsensiblen Viren. Somit wird deren Replikation in der Umgebung von gesunden Zellen wirksam unterdrückt, wohingegen im Mikromilieu der Tumorzellen aufgrund der Defekte der interferonbasierenden Abwehrfunktion eine Infektion möglich wird. Daß dieser Mechanismus funktionieren kann, konnte anhand der Beispiele VSV, Myxomavirus oder Influenzavirus gezeigt werden. Weitere Ansatzpunkte für eine Unterscheidung zwischen Tumorzelle und normaler Zelle bezüglich der Virusinfektion bzw. -replikation sind die Eliminierung der PKR (Doppelstrang-RNA abhängige Proteinkinase)- Inhibition des Virus oder Modifikation der onkolytischen Viren dahingehend, dass diese nur in den zur Apoptose nicht mehr fähigen malignen Zellen replizieren.

Die Funktion des Immunsystems zur Restriktion der Replikation und Ausbreitung von eindringenden Pathogenen ist für Anwendung von onkolytischen Viren ein zweischneidiges Schwert. Zum einen verhindern diese Funktionen eine effektive Antitumorwirkung, zum anderen jedoch kann die virale Stimulation des Immunsystems mit Aktivierung einer Antitumorimmunüberwachung zu einer im Gegenteil förderlichen Wirkung führen. Insbesondere die adaptive Immunabwehr kann nach Triggerung durch freie virale Partikel oder zellassoziierte Viren über die Aktivierung von B-Zellen sowie T-Zellen zu der Produktion von antiviralen Antikörpern, Zytokinen bzw. CD8+ Zellen führen. Sowohl Daten aus verschiedenen Mausmodellen als auch aus Phase-I Studien zeigen, dass die Anwesenheit von neutralisierenden Antikörpern durchaus mit dem Erreichen einer ausreichend hohen Menge an Virus und auch einem Therapieansprechen vereinbar ist. Die Absorption von Viren durch Blutzellen oder Leberzellen sowie die komplementvermittelte Zerstörung viraler Partikel trägt hingegen zur Reduktion der Viruspartikel bei, die an den malignen Zellen ankommen. Insbesondere für MV besteht das Problem, dass durch Vakzinierungsprogramme

viele Patienten einen protektiven Antikörpertiter an neutralisierenden Antikörper im Serum aufweisen. Neuere Arbeiten zeigen hier allerdings vielversprechende Ansätze, wie durch die Anwendung von zellulären Trägern eine genügend hohe Menge an MV zu malignen Zellen gelangen können.

Insbesondere die Beschäftigung mit den verschiedenen Möglichkeiten, die Hindernisse, eine genügend große Menge an viralen Partikeln an die gewünschten Ort zu liefern, über unterschiedliche Wege der Manipulation des Immunsystems zu überwinden, hat zur Einsicht geführt, dass ein onkolytisches Virus nicht nur dann als therapeutisch effektiv gelten kann, wenn es alleine den Tumor eradiziert. Vielmehr ist die Erzeugung einer tumorspezifischen Infektion mit gleichzeitiger lokalisierter Inflammation ein wichtiger Bestandteil der Antitumorantwort.

Im Rahmen der Diskussion potentieller Nebenwirkungen erscheinen neben der Frage der getesteten Spezifität *in vitro* auch die grundsätzliche Auswahl des replikationskompetenten Vektors und auch die Applikationsweise wichtige Sicherheitsaspekte zu sein. Sowohl diese Arbeit als auch andere präklinische sowie bereits klinische Studien (s.o.) wurden mit dem Virusstamm, der in der Literatur mit Edmonston B bezeichnet wird, durchgeführt. Dies ist ein 1963 eingeführter ehemals verbreitet eingesetzter MV-Impfstamm, der bei insgesamt recht guter Verträglichkeit, insofern eine parallele Applikation mit Immunglobulinen erfolgte, seine Bedeutung mit der weiterführenden Attenuierung des Schwartz und später des Moratenstammes verlor. Die beiden letztgenannten rufen vergleichsweise weniger Impfreaktionen hervor und benötigen keine Immunglobulingabe. Angesichts der Tatsache, dass die aktuell laufenden klinischen Studien sowohl mit lokaler Applikationsweise als auch mit systemischer Anwendung mit diesem Edmonston B Stamm durchgeführt werden und diese Studien bislang nicht aufgrund einer inakzeptablen Toxizität abgebrochen wurden, kann von einer auch in der Situation eines intravenös mit MV-Partikeln behandeltem immunsupprimierten MM-Patienten guten Verträglichkeit ausgegangen werden. Es ist möglich, dass im Falle einer erfolgreichen klinischen Prüfung bei einigen Patienten im Rahmen einer kleinen Studie, vor Beginn einer ausgedehnten Testung die Diskussion über die potentielle Anwendung und Prüfung des Schwartz oder Moraten-Stammes geführt werden wird und die bislang zur Verfügung stehenden *in vitro* Daten mit dem Edmonston B Stamm unter Verwendung dieser reproduziert werden müssen, um eine ausreichende Grundlage für eine Risiko-Nutzen-Abwägung zu haben.

Abgesehen von der Ausnahme eines solitären Plasmozytoms erscheint es zur systemischen Applikation des onkolytischen MV bei Vorliegen eines MM keine sinnvolle Alternative zu geben. In diesem Zusammenhang ist die Diskussion der Rolle der angeborenen und der

erworbenen Immunantwort des Patienten insbesondere in Bezug auf die Anti-Masernantwort aber auch im Hinblick auf die Therapiesicherheit vonnöten. Der Erfolg einer Virotherapie und die Eradikation von Tumorzellen hängen von einer komplexen Interaktion zwischen viraler Replikation, Tumorzellwachstum sowie der angeborenen und erworbenen Immunabwehr ab. Das ideale onkolytische Virus sollte sich rasch aber tumorspezifisch in den malignen Zellen ausbreiten und Strategien besitzen, bestimmte Immunabwehrmechanismen zu umgehen. Drei der wichtigsten Barrieren, die das Erreichen der Zielzellen durch das onkolytische MV verhindern könnten, sind zirkulierende antivirale Antikörper, die unspezifische Aufnahme des Virus durch Milz, Leber und andere nicht-maligne Gewebe sowie der ineffektive Übergang des Virus aus den Blutgefäßen in den Tumor. Ein potentiell guter Ansatz, diese Hindernisse zu umgehen, ist die Verwendung von Zellen, die das Virus zu den Tumormanifestationen tragen. Im Zuge dessen wurden einige Zelltypen inklusive T-Zellen, Monozyten, mesenchymale Progenitorzellen und MM-Zellen selbst für diesen Zweck mit bereits recht vielversprechendem Erfolg getestet. Wichtige Kriterien, die bei der Auswahl der Zellsorte als Virusträger berücksichtigt werden sollten, sind Suszeptibilität für eine Infektion mit dem onkolytischen MV, die Protektion des Zell-Virus Komplexes gegen die Antikörpervermittelte Neutralisation, das Tumorphoming oder die Fähigkeit, Virusabkömmlinge zum Tumor zu bringen. Vorteilhaft für die klinische Anwendung beim MM ist, Zellen zu verwenden, die in großer Zahl erstellt werden können. Insbesondere durch den Einsatz von Zellträgern erscheint eine die Antitumorwirkung verbessernde Kombination aus Zelle und Virus dem jeweilig alleinigen Einsatz überlegen zu sein.

Neben den antiviralen Antikörpern erscheint die angeborene antivirale Antwort ein weiteres Hindernis zur Anwendung onkolytischer Viren zu sein. Obwohl diese bei Tumorzellen oftmals beeinträchtigt ist, könnte sie dennoch deren effiziente Verbreitung beeinträchtigen. Eine Strategie, eine effektive IFN gestützte Reaktion zu verhindern, wurde durch die Inkorporation des Wildtypgens für das P-Protein in das Genom des Impfstammes bewerkstelligt, das für die IFN-antagonisierende Wirkung bekannt ist.

Vor diesem Hintergrund und der spezifischen Bindung des monoklonalen Antikörpers Wue-1 an maligne Plasmazellen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neuer rekombinanter MV konstruiert, MV-Wue, indem eine H-Protein-Variante, die nicht mehr in der Lage ist, an die natürlichen Masernvirusrezeptoren CD46 oder CD150 zu binden, mit einem single-chain Antikörper basierend auf dem Wue-1 Antikörper, verbunden wurde. MV-Wue konnte zu ähnlich hohen Titern wie die nicht modifizierte MV-Variante (MV-EGFP) in vitro sowohl auf Vero-basierten Zelllinien als auch auf primären MM-Zellen propagiert werden. Letztere wurden spezifisch infiziert und schließlich nachweisbar über die Induktion von Apoptose

eliminiert. Diese Beobachtungen zeigten sich wie die Bindung des Wue-1 Antikörpers als unabhängig von der Anzahl der Vortherapien oder der Therapiemodalität, d.h. es spielte keine Rolle, ob der Patient, aus dessen Knochenmark die primären Zellen isoliert wurden, eine Tandem- Stammzelltransplantation oder aber therapienaiv war. In wie weit eine Herunterregulierung des potentiellen Wue-1 Antigens nach Infektion der Zielzellen mit MV-Wue zu beobachten ist, bleibt abzuwarten. Vor dem Hintergrund obig beschriebener Beobachtungen erscheint es zum jetzigen Zeitpunkt zumindest möglich, dass dies nicht in relevanter Weise erfolgt bzw. eine solche Downregulation eben just zum Zelluntergang beitragen könnte.

Im Rahmen der bislang durchgeführten Forschungsarbeiten mit dem monoklonalen Antikörper Wue-1 blieb das korrespondierende Antigen unentdeckt. Wie vor kurzem von Leonard et al., 2008, gezeigt, können vor allem neu auf ein Ziel ausgerichtete Viren vernünftig auf der Grundlage ihrer funktionellen Eigenschaften charakterisiert werden, ohne dass notwendigerweise der zelluläre Rezeptor identifiziert und definiert sein muß. Vielmehr sollte die Darstellung kohärenter funktioneller in vitro Daten die Basis für eine weiterführende Evaluation unerwünschter Wirkungen und auch des therapeutischen Potentials in den nachfolgenden Experimenten von MV-Wue in geeigneten Tiermodellen sein. Nichtsdestotrotz sollten die konsistenten funktionellen zusammen mit den immunhistochemischen Daten unter anderem auch dieser Arbeit vor dem Hintergrund dessen, dass sich das Expressionsmuster des putativen Wue-1 Antigens von den bislang beschriebenen CD-Antigenen unterscheidet und das Bindungsmuster des Wue-1 Antikörpers nicht mit dem bisher publizierter Antikörper in der B- Zelldifferenzierung normaler B-Zellen oder Plasmazellen übereinstimmt, Grund genug sein, das zu Wue-1 korrespondierende Antigen zu identifizieren und zu charakterisieren. Arbeiten zu Identifizierung, Klonierung und funktionellen Charakterisierung des WUE-1 Antigens wurden unter anderem von Dr. Sabine Friedl aus der Arbeitsgruppe von Prof. Bargou durchgeführt. WUE-1 positive Zelllinien wurden mittels Durchflußzytometrie identifiziert. Die weitere Charakterisierung des Antigens mit biochemischen Standardmethoden wie Western Blot oder Immunpräzipitation (IP) schlug jedoch fehl. Daher wurde versucht, das Antigen mit Hilfe von Expressionsklonierung und Immunselektion und dem monoklonalem anti-Wue-1 Antikörper aus einer cDNA Expressionsbibliothek zu isolieren. Die isolierten Klone wurden sequenziert und mittels Northern Blot und Durchflußzytometrie analysiert. Es stellte sich jedoch heraus, dass alle Klone unspezifische DNA Fragmente trugen. Auch durch den Einsatz eines rekombinanten chimären T-Zell Rezeptor (TCR), der den single chain Wue-1 Antikörper beinhaltet, konnte das Antigen durch Screening von MM cDNA Expressionsbibliotheken unter Verwendung von

anti-Wue-1 TCR exprimierenden Effektor (Jurkat) Zellen in Kokultur mit WUE-1+ Zielzellen und Interferon (IFN) γ ELISA Analyse nicht erreicht werden. Aus diesen Arbeiten geht hervor, dass das Wue-1-Antigen bislang nur rudimentär charakterisiert ist, z.T., da die Methoden mit Western Blot und Immunpräzipitation nicht zielführend sind. Es erscheint denkbar, dass dieses Antigen möglicherweise ein Epitop beinhaltet, das von der Konformation stark abhängig ist, dass das Epitop aus mehr als einem Proteinanteil besteht oder aber zusätzlich noch eine Kohlenhydratuntereinheit oder Kohlenhydratanteile besitzt. In Anwendungen wie FACS oder immunhistochemischen Färbungen bindet der MoAb Wue-1 mit großer Zuverlässigkeit gesunde und maligne Plasmazellen, so lange die Zellen intakt sind. Wue-1 ist niedrigaffin, sobald dieser in der Immunpräzipitation oder dem Immunpanning angewandt wird und zeigt sich im Western Blot gänzlich ungeeignet. Dies könnte durch die Zerstörung der Stelle des Wue-1 Antigens, die durch Wue-1 erkannt wird wie z.B. im Rahmen der Zellysataufbereitung, der Isolierung der des Proteins oder aber durch die Denaturierung bei der Elektrophorese, erklärt werden. Die Bindung des Ak an sein Antigen kann nicht durch Inkubation der Zellen mit Lektinen unterbunden werden und wird nicht durch die Behandlung der Wue-1 positiven Zellen mit Phospholipase C, die GPI-Anker entfernt, aufgehoben. Eine Behandlung von Serinproteasen konnte die Bindung aufheben.

In Übereinstimmung mit den bislang konsistenten funktionellen Daten, die mit unterschiedlichen Systemen (Wue-1/CD3 bispezifischer Antikörper oder chimärischer T-Zell-Rezeptor) die spezifische Interaktion des MoAb Wue-1 mit seinem bislang noch nicht identifizierten Antigen ausnutzen, zeigte sich erfreulicherweise keinerlei Diskrepanz zwischen den erhobenen immunhistochemischen Bindungsdaten für Wue-1 und den durch MV-Wue infizierten Zellpopulationen. So wurden z.B. primäre CD33+ Zellen, die als sehr suszeptibel für eine Infektion mit MV beschrieben sind sowie primäre B-Zellen als Vorläuferzellen von Plasmazellen in den Infektionsexperimenten als Negativkontrollen eingesetzt und durch das neue modifizierte Virus nicht infiziert. Da die Frequenz von Plasmazellen im peripheren Blut gesunder Donoren sehr gering ist, wurden diese Zellen nicht in den Versuchen eingesetzt. Angesichts des äußerst weitverbreiteten Einsatzes des Anti-CD20 monoklonalen Antikörpers Rituximab im Rahmen der Lymphomtherapie, die sehr gut toleriert wird, obwohl der Gabe eine lang andauernde B-Zelldepletion folgt, sollte der partielle B-Zelldefekt durch die selektive Elimination der Plasmazellen nach der Gabe von MV-Wue jedoch keine relevanten Toxizitätsprobleme erzeugen.

Ein Aspekt, der bei den Arbeiten mit dem neuen rekombinanten MV-Wue auffiel, ist die Tatsache, dass sich in den Infektionsexperimenten unter Verwendung der primären MM-Zellen keine Synzytienbildung einstellte. Wie bei anderen hüllentragenden Viren wird auch

bei MV eine Infektion über die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran vermittelt. Die Initiierung dieser Fusion wird über die Bindung des MV-H Proteins an die Rezeptoren CD46 oder CD150 eingeleitet. Dies soll eine Konformationsänderung von H aber auch des F-Proteins nach sich ziehen, im Zuge derer das hydrophobe Fusionspeptid in F exponiert wird und in die Zellmembran der Zielzelle integriert werden kann. Die nachfolgende Expression dieser Glykoproteine auf der Zelloberfläche der infizierten Zelle vermittelt wiederum die Fusion mit einer suszeptiblen Nachbarzelle, was schließlich zur Bildung von Synzytien mit mehr als 50 Zielzellen führen kann. Dieser Mechanismus ist gegenwärtig Gegenstand fortlaufender Untersuchungen, insbesondere vor dem Hintergrund, dass mindestens drei zytopathische Effekte bei MV-infizierten Zellen beschrieben sind mit eben genannten Riesenzellen, jedoch auch einzelnen runden oder aber spindelförmigen Zellen. Es wurde bislang nicht abschließend geklärt, was genau bei der Fusion passiert oder aber welchen Einfluß der Zielzelltyp auf diesen Prozeß hat. Für die Fusion von Paramyxoviren wichtig werden die richtige Menge und auch das richtige Verhältnis von H und F auf den Zellen erachtet sowie die laterale Membranamobilität dieser Proteine. In der Literatur sind replikative MV-Infektionen in verschiedenen Zelltypen ohne die Ausbildung von Synzytien beschrieben, so z.B. unter Ausbildung von Mikrofusionsporen. Zudem wird die Zytopathogenität sowie auch die Fusogenität durch die Stärke der Glykoproteininteraktion, das M-Protein oder das Ribonukleokapsid mit beeinflusst. Der Vergleich der Fusogenität verschiedener rekombinanter MV, die H-Proteine verschiedener MV-Stämme exprimierten, die unterschiedliche zusätzliche AS-Sequenzen enthielten, zeigte, dass hier ein offenbar deutlicher Zusammenhang zwischen H-Proteinsequenz und Fusogenität besteht. Auch in der Arbeit von Johnston et al. aus der Arbeitsgruppe von Prof. Sibylle Schneider-Schaulies zeigte sich anhand rekombinanter MV, dass die Ausbreitung von Zelle zu Zelle keinesfalls mit dem Vorliegen von Synzytien einhergehen muß und in den Ansätzen, die praktisch frei von Riesenzellen waren, konnten große Mengen an infektiösen Viruspartikeln gemessen werden. Zudem konnte aus den durchgeführten Experimenten der Schluß gezogen werden, dass für den Zelltropismus als auch die Virusprozessierung weitere virale Proteine außer H und F sowie auch zellspezifische Faktoren wichtig sind.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch im Rahmen dieser Arbeit gemacht, wobei ohne das Vorliegen von Synzytien eine replikative Infektion von malignen MM-Zellen durch MV-Wue gemessen wurden. Auch konnte die Induktion von Apoptose in diesen Zellen ohne Riesenzellformation gesehen werden. Möglich ist, dass sich unter Verwendung des Schwartz- oder auch des Moraten-Stammes zur Erstellung von rekombinanten MV-Wue-Varianten bei Infektion eine Riesenzellbildung einstellt. Angesichts der beschriebenen Daten für den auf

dem Edmonstonstamm beruhenden MV-Wue wäre diese Erkenntnis allerdings zumindest unter dem funktionellen Aspekt eher akademischer Natur.

Auf dem Weg zur Entwicklung eines neuen Therapieansatzes für das MM unter Verwendung eines neuen onkolytischen Virus ist nach der erfolgreichen funktionellen Testung von MV-Wue auf suszeptiblen Zelllinien und den primären Zielzellen die Prüfung in vivo mit Tiermodellen vonnöten. Drei Tiermodelle, die bislang in präklinischen Versuchen Verwendung gefunden haben, verwenden Old World und New World Primaten sowie Interferon alpha/beta Rezeptor Knockout CD 46 transgene Mäuse. Allerdings erscheinen alle für die zu untersuchende Situation einer intravenösen Gabe eines rekombinanten MV-Impfstammes nicht gut geeignet, insbesondere gibt es noch kein Modell, das auch die Verhältnisse bei Multiplem Myelom zusätzlich abbilden könnte. Vor diesem Hintergrund sind in der Folge hierzu noch weitere Arbeiten notwendig.

Hinsichtlich der drei aktuell laufenden klinischen Studien (s.o.) an der Mayo Klinik in Rochester gibt es bislang keine vorliegenden Publikationen. Laut Dr. Russell und Dr. Peng ist der Verlauf aller drei Studien bislang zufriedenstellend, wobei aktuell 20 Patienten mit Ovarial-Ca mit sieben verschiedenen Dosisleveln behandelt wurden, zwei Patienten mit Glioblastom und 7 Patienten mit Multiplem Myelom wurden in die entsprechenden Studien dieser Entitäten eingeschlossen. In Kürze ist mit einer Veröffentlichung der Daten der Ovarial-Ca Studie zu rechnen.

Die Virotherapie mit Masernviren hat sich in den letzten Jahren als ein sicherer und vielversprechender Ansatz zur Behandlung verschiedener Neoplasien entwickelt. Die klinische Testung befindet sich noch in einer frühen Phase und es bleibt bei klinischen Anwendungen zu zeigen, dass die Therapieeffektivität nicht über die Maßen durch eine vorbestehende Anti-MV Immunität beeinträchtigt wird. Erfreulicherweise erscheinen laufende Bemühungen durch den Einsatz von Zellträgern oder von immunsuppressiven Substanzen wie Cyclophosphamid den potentiellen Limitationen gut zu begegnen und versprechen ein gutes Potential, diese Therapieoption nicht als Alternative sondern als zusätzliche wirkungsvolle Kombinationsmöglichkeit zu entwickeln.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Multiple Myelom ist trotz deutlicher Fortschritte in der Therapie meist eine unheilbare Erkrankung, so dass der Erforschung neuer therapeutischer Optionen mit dem Ziel, eine möglichst langfristige krankheitsfreie Zeit für den betroffenen Patienten zu erreichen, eine wichtige Bedeutung zukommt. Hierbei erweist sich der Ansatz, maligne Plasmazellen spezifisch mit onkolytischen Viren zu infizieren und zu eliminieren, als zunehmend vielversprechend.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues rekombinantes Masernvirus kloniert, das selektiv primäre MM-Zellen infiziert und abtötet. Diese Fähigkeit basiert auf der Verwendung eines mutierten H-Proteins, das nicht mehr mit den natürlichen Rezeptoren CD46 oder CD150 interagiert und das zusätzlich mit einem single chain Antikörper (scFvWue) verknüpft ist, der MM-Zellen spezifisch bindet. Unter Verwendung eines etablierten Rescuesystems aus cDNA konnten *in vitro* replikationskompetente Virionen von MV-Wue erstellt werden. Diese vorgenommenen Veränderungen beeinflussten die Fähigkeit zur effizienten Replikation und Produktion infektiöser Viren *in vitro* nicht. Zur funktionellen Testung des neuen rekombinanten Virus MV-Wue wurde die Spezifität des Virus für primäre maligne Plasmazellen in Infektionsexperimenten gezeigt sowie der Mechanismus der Ablation als Apoptose definiert.

6 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1	Typische Osteolysen, die durch ein Multiples Myelom hervorgerufen wurden	8
Abbildung 2	Zeittafel der Therapieentwicklungen beim Multiplen Myelom	16
Abbildung 3	Schematische Darstellung der vier humanen Hauptisoformen von CD46... ..	40
Abbildung 4	Schematische Darstellung der membrangebundenen Form von SLAM.....	41
Abbildung 5	Immunhistochemische Färbung primärer maligner Plasmazellen durch Wue-1	70
Abbildung 6	FACS-Färbung mit Wue-1, CD46 und CD150 zweier primärer MM Proben und primärer CD40 L aktivierter B-Zellen	71
Abbildung 7	Kotransfektionsexperimente mit nicht mutiertem und mutiertem H-Proteinen	73
Abbildung 8	Schematische Darstellung der vollständigen cDNA von MV-Wue.....	74
Abbildung 9	Virustiter im Überstand und zellassoziiert von (a) MV-EGFP und (b) MV-Wue	76
Abbildung 10	Western Blot Analyse von H und H modifiziert mit scFvWue mit Fxa-Protease	77
Abbildung 11	Spezifische Infektion primärer MM-Zellen durch MV-Wue.....	77
Abbildung 12	Die Infektion von primären MM-Zellen durch MV-Wue kann spezifisch durch Wue-1 MoAb geblockt werden.....	78
Abbildung 13	Spezifische Propagierung von MV-Wue auf primären MM-Zellen	80
Abbildung 14	MV-Wue infiziert MM-Zellen spezifisch jedoch nicht CD33+ Zellen.....	81
Abbildung 15	FACS Analyse der primären MM-Zellen sowie der primären CD33+ Zellen aus Versuch zu Abbildung 14	81
Abbildung 16	Apoptosenachweis von MV-Wue infizierten primären MM-Zellen.....	83

7 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Häufigkeit der Symptome bei Multiplem Myelom	12
Tabelle 2	Stadieneinteilung nach Salmon und Durie	14
Tabelle 3	Stadieneinteilung International Staging System (ISS).....	14
Tabelle 4	Vergleich Alexanianschema mit anderen Polychemotherapieprotokollen	17
Tabelle 5	Zelllinien	45
Tabelle 6	Viren.....	46
Tabelle 7	Antikörper	50
Tabelle 8	Oligonukleotide	53
Tabelle 9	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von hämatologischen Proben mit Wue-1.....	69
Tabelle 10	Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von nicht-hämatologischen Proben sowie normalem peripherem Blut und Plasmazellen mit Wue-1.....	70

8 LITERATURVERZEICHNIS

Ackermann J, Meidlinger P, Zojer N et al. Absence of p53 deletions in bone marrow plasma cells of patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br Haematol*. 1998 103: 1161.

Alexanian R, Barlogie B, Dixon D. Renal failure in multiple myeloma. Pathogenesis and prognostic implications. *Arch Intern Med*. 1990; 150: 1693.

Alexanian R, Dimopoulos MA, Delasalle K and Barlogie B. Primary dexamethasone treatment of multiple myeloma. *Blood*. 1992. 80: 887-890.

Allen IV, McQuaid S, McMahon J, Kirk J, McConnell R. The significance of measles virus antigen and genome distribution in the CNS in SSPE for mechanisms of viral spread and demyelination. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996; 55 (4): 471–480.

Anderson, KC, Bates, MP, Slaughenhaupt, B, Schlossman, SF and Nadler, LM. A monoclonal antibody with reactivity restricted to normal and neoplastic plasma cells. *J Immunol* 1984. 132: 3172-3179.

Anderson JF, Goldberger J. An experimental demonstration of the presence of the virus of measles in the mixed buccal and nasal secretions. *JAMA*. 1911; 57: 476–578.

Anderson, KC, Park, EK, Bates, MP, Leonard, RC, Hardy, R, Schlossman, SF and Nadler, LM. Antigens on human plasma cells identified by monoclonal antibodies. *J Immunol* 1983. 130: 1132-1138.

Aref S, Goda T, El-Sherbiny M. Syndecan-1 in multiple myeloma: Relationship to conventional prognostic factors. *Hematology*. 2003 8: 221.

Attal M, Harousseau JL, Stoppa et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med*. 1996. 335: 91-97.

Avet-Loiseau H, Facon T, Daviet A et al. 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. Intergroupe Francophone du Myelome. *Cancer Res.* 1999;59: 4546.

Avet-Loiseau H, Garand R, Lode L, et al. Translocation t(11;14)(q13;q32) is the hallmark of IgM, IgE, and nonsecretory multiple myeloma variants. *Blood.* 2003; 101: 1570,

Avet-Loiseau H, Gerson F, Magrangeas F et al. Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma Tumors. *Blood.* 2001; 98: 3082,

Baeuerle PA, Kufer P and Bargou R. BiTE: Teaching antibodies to engage T-cells for cancer therapy. *Curr Opin Mol Ther.* 2009. 11(1): 22-30. Review.

Bakkus MH, Heirman C, Van Riet I, et al. Evidence that multiple myeloma Ig heavy chain VDJ genes contain somatic mutations but show no intraclonal variation. *Blood.* 1992; 80: 2326,

Bargou RC, Leo E, Zugmaier G et al. Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody. *Science.* 2008; 321, No. 5891: 974-977.

Barlogie B, Epstein J, Selvanayagam P et al. Plasma cell myeloma – New biological insights and advances in therapy. *Blood.* 1989; 73:865

Bartz R, Brinckmann U, Dunster LM, Rima B, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. Mapping amino acids of the measles virus hemagglutinin responsible for receptor (CD46) downregulation. *Virology.* 1996; 224 (1): 334–337.

Bartz R, Firsching R, Rima B, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. Differential receptor usage by measles virus strains. *J Gen Virol.* 1998; 79 (5): 1015–1025.

Bast EJ, van Camp B, Reynaert P et al. Idiotypic peripheral blood lymphocytes in monoclonal gammopathy. *Clin Exp Immunol.* 1982; 47:677

Bataille R et al. Multiple myeloma. *N Engl J Med.* 1997; 336:1657

Bataille R, Chappard D, Marcelli C et al. Mechanisms of bone destruction in multiple myeloma: The importance of an unbalanced process in determining the severity of lytic bone disease. *J Clin Oncol*. 1989; 7: 1909.

Bataille, R and Harousseau, JL. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 1997. 336: 1657-1664.

Bichel J, Effersoe P, Gormsen H et al. Leukemic myelomatosis (plasma cell leukemia): A review with report of four cases. *Acta Radiol*. 1952; 37:196.

Billadeau D, Ahmann G, Greipp P, et al. The bone marrow of multiple myeloma Patients contains B cell populations at different stages of differentiation that are clonally related to the malignant plasma cell. *J Exp Med*. 1993; 1023.

Berenson JR, Lichtenstein AK. Clonal rearrangement of immunoglobulin genes in the peripheral blood of multiple myeloma patients. *Br J Haematol*. 1989; 73: 425.

Berenson, JR, Vescio, RA and Said, J. Multiple myeloma: the cells of origin--a two-way street. *Leukemia* 1998. 12: 121-127.

Berenson J, Wong R, Kim K et al. Evidence for peripheral blood B lymphocyte but not T lymphocyte involvement in multiple myeloma. *Blood*. 1987; 70:1550.

Bergsagel D. The incidence and epidemiology of plasma cell neoplasms. *Stem Cells*. 1995; 13 (suppl 2):1.

Bergsagel PL, Kuehl WM. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene*. 2001; 20:5611.

Bieback K, Lien E, Klagge IM, Avota E, Schneider-Schaulies J, Duprex WP, Wagner H, Kirschning CJ, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J Virol*. 2002; 76 (17): 8729–8736.

Body JJ, Greipp P, Coleman RE et al. A phase I study of AMG-0007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. *Cancer*. 2003; 97 (suppl 3): 887.

Borset M, Hjorth-Hansen H, Seidel C et al. Hepatocyte growth factor and its receptor c-met in multiple myeloma. *Blood*. 1996; 88:3998.

Broder S, Humphrey R, Durm M et al. Impaired synthesis of polyclonal (nonparaprotein) immunoglobulins by circulating lymphocytes from patients with multiple myeloma: a role of suppressor cells. *N Engl J Med*. 1975; 293:887.

Brossart, P, Schneider, A, Dill, P, Schammann, T, Grunebach, F, Wirths, S, Kanz, L, Buhring, HJ and Brugger, W. The epithelial tumor antigen MUC1 is expressed in hematological malignancies and is recognized by MUC1-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res* 2001; 61: 6846-6850.

Bourget CC et al. Antigenic stimulation and multiple myeloma. A prospective study. *Cancer*. 1993; 72: 2148.

Brankin B, Hart MN, Cosby SL, Fabry Z, Allen IV. Adhesion molecule expression and lymphocyte adhesion to cerebral endothelium: effects of measles virus and herpes simplex 1 virus. *J Neuroimmunol*. 1995; 56 (1): 1–8.

Buchholz CJ, Koller D, Devaux P, Mumenthaler C, Schneider-Schaulies J, Braun W, Gerlier D, Cattaneo R. Mapping of the primary binding site of measles virus to its receptor CD46. *J Biol Chem*. 1997; 272 (35): 22072–22079.

Buckland R, Wild TF. Is CD46 the cellular receptor for measles virus? *Virus Res*. 1997; 48 (1): 1–9.

Caligaris-Cappio F, BERGUI L, Gregoret MG et al. Role of bone marrow stromal cells in the growth of human multiple myeloma. *Blood*. 1991; 77: 2688.

Casasnovas JM, Larvie M, Stehle T. Crystal structure of two CD46 domains reveals an extended measles virus-binding surface. *EMBO J*. 1999; 18 (11): 2911–2922.

Chen BJ, Epstein J. Circulating clonal lymphocytes in myeloma constitute a minor subpopulation of B cells. *Blood*. 1996; 87: 1972.

Chesi M, Bergsagel PL, Shonukan OO, et al. Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood*. 1998; 91:4457.

Chesi M, Brents LA, Ely SA, et al. Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor progression in multiple myeloma. *Blood*. 2001; 97: 729.

Chesi M, Nardini E, Lim RS, et al. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood*. 1998; 92: 3025.

Chiriva-Internati, M, Liu, Y, Weidanz, JA, Grizzi, F, You, H, Zhou, W, Bumm, K, Barlogie, B, Mehta, JL and Hermonat, PL. Testing recombinant adeno-associated virus-gene loading of dendritic cells for generating potent cytotoxic T lymphocytes against a prototype self-antigen, multiple myeloma HM1.24. *Blood*. 2003; 102: 3100-3107.

Claudio JO, Masih-Khan E, Tang H et al. A molecular compendium of genes expressed in multiple myeloma. *Blood*. 2002; 100: 2175.

Cocks BG, Chang CC, Carballido JM, Yssel H, de Vries JE, Aversa G. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature*. 1995; 376 (6537): 260–263.

Cole JL, Housley GA Jr, Dykman TR, MacDermott RP, Atkinson JP. Identification of an additional class of C3-binding membrane proteins of human peripheral blood leukocytes and cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985; 82 (3): 859–863.

Corradini P, Boccadoro M, Voena C, et al. Evidence for a bone marrow B cell transcribing malignant plasma cell VDJ joined to C mu sequence in immunoglobulin (IgG) – and IgA-secreting multiple myelomas. *J Exp Med*. 1993; 178: 1091.

Corradini P, Inghirami G, Astolfi M et al. Inactivation of tumor suppressor genes, p53 and Rb1, in plasma cell dyscrasias. *Leukemia*. 1994; 8: 758.

Corradini P, Ladetto M, Voena C et al. Mutational activation of N- and K-ras oncogenes in plasma cell dyscrasias. *Blood*. 1993; 81: 2708.

Cosby SL, Brankin B. Measles virus infection of cerebral endothelial cells and effect on their adhesive properties. *Vet Microbiol.* 1995; 44 (2–4): 135–139.

Cozzolino F, Torcia M, Aldinucci D. et al. Production of interleukin-1 by bone marrow myeloma cells. *Blood.* 1989; 74:380.

Csonka E, Bayer PI, Buki K, Varady G. Influence of the measles virus on the proliferation and protein synthesis of aortic endothelial and smooth muscle cells. *Acta Microbiol Hung.* 1990; 37 (2): 193–200.

Damiano JS, Cress AE, Hazlehurst LA et al. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): Role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood.* 1999; 93: 1658.

Dao DD, Sawyer JR, Epstein J et al. Deletion of the retinoblastoma gene in multiple myeloma. *Leukemia.* 1994; 8:1280.

Davies FE, Dring AM, Li C et al. Insights into the multistep transformation of MGUS to myeloma using microarray expression analysis. *Blood.* 2003; 102: 4504.

Denz U, Haas PS, Ralph Wäsch, Hermann Einsele and Monika Engelhardt. State of the art therapy in multiple myeloma and future perspectives. *Eur J Cancer.* 2006. 42: 1591-1600.

Dhiman N, Jacobson RM, Poland GA. Measles virus receptors: SLAM and CD46. *Rev Med Virol.* 2004; 14 (4): 217–229.

Dhodapkar MV, Abe E, Theus A et al. Syndecan-1 is a multifunctional regulator of myeloma pathobiology: Control of tumor cell survival, growth, and bone cell differentiation. *Blood.* 1998; 91: 2679.

Dörig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell.* 1993; 75 (2): 295–305.

Drach J, Ackermann J, Fritz E et al. Presence of a p 53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood*. 1998; 92: 802.

Drach J, Angerler J, Schuster J et al. Interphase fluorescence in situ hybridization identifies chromosomal abnormalities in plasma cells from patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 1995; 86:3915.

Drenckhahn D. 2003a.

Zellenlehre. in: Benninghoff/Drenckhahn: Anatomie. Band 1. 16. Aufl. Hg. Drenckhahn D. München/Jena: Urban & Fischer, 2003. 9–91.

Drenckhahn D. 2003b.

Epithelgewebe. in: Benninghoff/Drenckhahn: Anatomie. Band 1. 16. Aufl. Hg. Drenckhahn D. München/Jena: Urban & Fischer, 2003. 94–101.

Duprex WP, McQuaid S, Hangartner L, Billeter MA, Rima BK. Observation of measles virus cell-to-cell spread in astrocytoma cells by using a green fluorescent protein-expressing recombinant virus. *J Virol*. 1999; 73 (11): 9568–9575.

Durie, BG. Multiple myeloma: what's new. *CA Cancer J Clin*. 2001; 51: 271-272, 263.

Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment and survival. *Cancer*. 1975; 36:842.

Durie BG, Vela E, Baum V et al. Establishment of two new myeloma cell lines from bilateral pleural effusions: Evidence for sequential in vivo clonal change. *Blood*. 1985; 66: 548.

Enders JF, Peebles TC. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1954; 86 (2): 277–286.

Ernst TJ, Gazdar A, Ritz J et al. Identification of a second transforming gene, *rasn*, in a human multiple myeloma line with a rearranged *c-myc* allele. *Blood*. 1988; 72:1163.

Erlenhofer C, Wurzer WJ, Loffler S, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J Virol.* 2001; 75 (10): 4499–4505.

Erlenhofer C, Duprex WP, Rima BK, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus. *J Gen Virol.* 2002; 83 (6): 1431–1436.

Esolen LM, Takahashi K, Johnson RT, Vaisberg A, Moench TR, Wesselingh SL, Griffin DE. Brain endothelial cell infection in children with acute fatal measles. *J Clin Invest.* 1995; 96 (5): 2478–2481.

Feinman R, Koury J, Thames M et al. Role of NF-kappaB in the rescue of multiple myeloma cells from glucocorticoid-induced apoptosis by bcl-2. *Blood.* 1999; 93: 3044.

Fenton RG. Therapeutic targets, in American Society of Hematology 45th Annual Meeting and Exposition. San Diego, California, 2003.

Fonseca R, Harrington D, Oken MM, et al. Biological and prognostic significance of interphase fluorescence in situ hybridization detection of chromosome 13 abnormalities (delta13) in multiple myeloma: An eastern cooperative oncology group study. *Cancer Res.* 2002; 62: 715.

Frankfurter Allgemeine Zeitung. 11.05.2006.

Masern breiten sich in Nordrhein-Westfalen aus. Frankfurter Allgemeine Zeitung. Frankfurt, 11.05.2006.

Friedman HM, Macarak EJ, MacGregor RR, Wolfe J, Kefalides NA. Virus infection of endothelial cells. *J Infect Dis.* 1981; 143 (2): 266–273.

Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A. CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med.* 2003; 9 (11): 1408–1412.

Garcia-Sanz R, Orfao A, Gonzalez M et al. Primary plasma cell leukemia: Clinical, immunophenotypic, DNA ploidy and cytogenetic characteristics. *Blood.* 1999; 93:1032.

Garrett IR, Durie BG, Nedwin GE et al. Production of lymphotoxin, a bone-resorbing cytokine, by cultured human myeloma cells. *N Engl J Med.* 1987; 317: 526.

Ge NL, Rudikoff S. Insulin-like growth factor I is a dual effector of multiple myeloma cell growth. *Blood.* 2000; 96: 2856.

Gerlier D, Loveland B, Varior-Krishnan G, Thorley B, McKenzie IF, Roubourdin-Combe C. Measles virus receptor properties are shared by several CD46 isoforms differing in extracellular regions and cytoplasmic tails. *J Gen Virol.* 1994; 75 (9): 2163–2171.

Gonchoroff, NJ, Katzmann, JA, Garton, JP, Ruiz-Arguelles, GJ, Eilers, CR, Greipp, PR and Kyle, RA. A monoclonal antibody reactive with a subset of human plasma cells. *Br J Haematol* 1986. 62: 619-630.

Goto, T, Kennel, SJ, Abe, M, Takishita, M, Kosaka, M, Solomon, A and Saito, S. A novel membrane antigen selectively expressed on terminally differentiated human B cells. *Blood* 1994. 84: 1922-1930.

Gramenzi et al. Medical history and the risk of multiple myeloma. *Br J Cancer.*1991; 63:769.

Greil R, Fasching B, Loidl P et al. Expression of the c-myc protooncogene in multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia: An in situ analysis. *Blood.* 1991; 78: 180.

Greipp PR, San Miguel JF, Durie BG et al. A new international staging system for multiple myeloma from the International Myeloma Working Group. *Blood.* 2003; 102: 190a.

Griffin DE. Measles Virus. in: *Fields' Virology.* Hg. Knipe DM, Howley PM. 4. Aufl. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. 1401–1442.

Grigorieva I, Thomas X, Epstein J. The bone marrow stromal environment is a major factor in myeloma cell resistance to dexamethasone. *ExpHematol.* 1998; 26: 597.

Hahm B, Arbour N, Nanche D, Homann D, Manchester M, Oldstone MB. Measles virus infects and suppresses proliferation of T lymphocytes from transgenic mice bearing human signaling lymphocytic activation molecule. *J Virol.* 2003; 77 (6): 3505–3515.

- Hahm B, Arbour N, Oldstone MB. Measles virus interacts with human SLAM receptor on dendritic cells to cause immunosuppression. *Virology*. 2004; 323 (2): 292–302.
- Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: Increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood*. 1998; 91:3.
- Hamilton MS, Barker HF, Ball J et al. Normal and neoplastic human plasma cells express bcl-2 antigen. *Leukemia*. 1991; 5: 768.
- Hanamura I, Iida S, Akano Y, et al. Ectopic expression of MAFB gene in human myeloma cells carrying (14;20)(q32;q11) chromosomal translocations. *Jpn J Cancer Res*. 2001; 92: 638.
- Hamalainen H, Meissner S, Lahesmaa R. Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) is differentially expressed in human Th1 and Th2 cells. *J Immunol Methods*. 2000; 242 (1–2): 9–19.
- Harcourt BH, Rota PA, Hummel KB, Bellini WJ, Offermann MK. Induction of intercellular adhesion molecule 1 gene expression by measles virus in human umbilical vein endothelial cells. *J Med Virol*. 1999; 57 (1): 9–16.
- Harousseau JL. Induction Therapy in Multiple Myeloma. American Society of Hematology. 2008; ASH 50th Anniversary.
- Harousseau JL. Maintenance treatment in multiple myeloma. *Ann Oncol*. 2008. 19 suppl 4.
- Harousseau JL, Attal M and Avet-Loiseau H. The role of complete response in multiple myeloma. *Blood*. 2009 Jul 28. Epub ahead of print.
- Harousseau JL and Moreau P. Autologous hematopoietic stem-cell transplantation for multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2009; 360 (25): 2645-54.
- Hashimoto K, Ono N, Tatsuo H, Minagawa H, Takeda M, Takeuchi K, Yanagi Y. SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. *J Virol*. 2002; 76 (13): 6743–6749.

Hideshima T, Nakamura N, Chauchan D et al. Biologic sequelae of interleukin-6 induced P13-K/Akt signalling in multiple myeloma. *Oncogene*. 2001; 20: 5991.

Horikami SM, Moyer SA. Structure, Transcription, and Replication of Measles Virus. in: *Measles Virus*. Hg. ter Meulen V & Billeter MA. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. 1995; 35–50.

Hsu EC, Iorio C, Sarangi F, Khine AA, Richardson CD. CDw150(SLAM) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of this virus. *Virology*. 2001; 279 (1): 9–21.

Hsu EC, Sarangi F, Iorio C, Sidhu MS, Udem SA, Dillehay DL, Xu W, Rota PA, Bellini WJ, Richardson CD. A single amino acid change in the hemagglutinin protein of measles virus determines its ability to bind CD46 and reveals another receptor on marmoset B cells. *J Virol*. 1998; 72 (4): 2905–2916.

Huang, N, Kawano, MM, Harada, H, Harada, Y, Sakai, A, Kuramoto, A and Niwa, O. Heterogeneous expression of a novel MPC-1 antigen on myeloma cells: possible involvement of MPC-1 antigen in the adhesion of mature myeloma cells to bone marrow stromal cells. *Blood* 1993. 82: 3721-3729.

Hummel KB, Bellini WJ, Offermann MK. Strain-specific differences in LFA-1 induction on measles virus-infected monocytes and adhesion and viral transmission to endothelial cells. *J Virol*. 1998; 72 (10): 8403–8407.

Ichimaru M et al. Multiple myeloma among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki 1950-1976: Relationship to radiation dose absorbed by marrow. *J Natl Cancer Inst*. 1982; 69:323

International Committee on Taxonomy of Viruses. 2002. ICTVdB Index of Viruses. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/01.048.htm>.

Intini D, Baldini L, Fabris S, et al. Analysis of FGFR3 gene mutations in multiple myeloma patients with t(4;14). *Br J Haematol*. 2001; 114: 362.

Isaacson SH, Asher DM, Godec MS, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC. Widespread, restricted low-level measles virus infection of brain in a case of subacute sclerosing panencephalitis. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1996; 91 (2): 135–139.

Jacobson DR, Zolla-Pazner S. Immunosuppression and infection in multiple myeloma. *Semin Oncol*. 1986; 13: 282.

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*. 1973; 52 (11): 2745–2756.

Jalili, A, Ozaki, S, Hara, T, Shibata, H, Hashimoto, T, Abe, M, Nishioka, Y and Matsumoto, T. Induction of HM1.24 peptide-specific cytotoxic T lymphocytes by using peripheral-blood stem-cell harvests in patients with multiple myeloma. *Blood* 2005. 106: 3538-3545.

Janssen JW, Vaandrager JW, Heuser T, et al. Concurrent activation of a novel putative transforming gene, myeov and cyclin D1 in a subset of multiple myeloma cell lines with t(11;14)(q13;q32). *Blood*. 2000; 95:2691.

Johnston IC, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J, Schneider-Schaulies S. 1999. A recombinant measles vaccine virus expressing wild-type glycoproteins: consequences for viral spread and cell tropism. *J Virol*. 1999; 73 (8): 6903–6915.

Kallstrom H, Liszewski MK, Atkinson JP, Jonsson AB. Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol*. 1997; 25 (4): 639–647.

Katz M. 1995. Clinical Spectrum of Measles. in: *Measles Virus*. Hg. ter Meulen V & Billeter MA. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 1995. 1–12.

Kawano M, Hirano T, Matsuda T et al. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature*. 1988; 332: 83.

Kimura A, Tosaka K, Nakao T. Measles rash. I. Light and electron microscopic study of skin eruptions. *Arch Virol*. 1975; 47 (4): 295–307.

Kirk, J., Zhou, A.L., McQuaid, S., Cosby, S.L., and Allen, I.V. Cerebral endothelial cell infection by measles virus in subacute sclerosing panencephalitis: ultrastructural and in situ hybridization evidence. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1991; 17: 289–297.

Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma. Evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2:175.

Kyle RA et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med.* 2002; 346: 564.

Kyle RA and Rajkumar SV. ASH 50th Anniversary Review Multiple Myeloma. *Blood.* 2008 March 15; 111(6): 2962–2972.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227 (5259): 680–685.

Langmuir AD. Medical importance of measles. *Am J Dis Child.* 1962; 103: 224–226.

Langmuir AD, Henderson DA, Serfling RE, Sherman IL. The importance of measles as a health problem. *Am J Public Health.* 1962; 52 (2) Supplement: 1–4.

Latreille J, Barlogie B, Dosik, G, et al. Cellular DNA content as a marker of human multiple myeloma. *Blood.* 1980; 55: 403.

Latreille J, Barlogie B, Johnston D et al. Ploidy and proliferative characteristics in monoclonal gammopathies. *Blood.* 1982; 59: 43.

Lawrence DM, Patterson CE, Gales TL, D’Orazio JL, Vaughn MM, Rall GF. Measles virus spread between neurons requires cell contact but not CD46 expression, syncytium formation, or extracellular virus production. *J Virol.* 2000; 74 (4): 1908–1918.

Lecouturier V, Fayolle J, Caballero M, Carabana J, Cekma ML, Fernandez-Munoz R, Wild TF, Buckland R. Identification of two amino acids in the hemagglutinin glycoprotein of measles virus (MV) that govern hemadsorption, HeLa cell fusion, and CD46 downregulation: phenotypic markers that differentiate vaccine and wild-type MV strains. *J Virol.* 1996; 70 (7): 4200–4204.

Leonard, VHJ, Sinn PL, Hodge G et al. Measles virus blind to its epithelial cell receptor remains virulent in rhesus monkeys but cannot cross the airway epithelium and is not shed. *J Clin Invest.* 2008; 118: 2448-2458.

Li K, Feito MJ, Sacks SH, Sheerin NS. CD46 (membrane cofactor protein) acts as a human epithelial cell receptor for internalization of opsonized uropathogenic *Escherichia coli*. *J Immunol.* 2006; 177 (4): 2543–2551.

Liszewski MK, Post TW, Atkinson JP. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol.* 1991; 9: 431–455.

Lonial S and Cavenagh J. Emerging combination treatment strategies containing novel agents in newly diagnosed multiple myeloma. *Brit J Hematol.* 2009. 145(6):681-708.

Loveland BE, Johnstone RW, Russell SM, Thorley BR, McKenzie IF. Different membrane cofactor protein (CD46) isoforms protect transfected cells against antibody and complement mediated lysis. *Transpl Immunol.* 1993; 1 (2): 101-108.

Lynch HT et al. Familial multiple myeloma: A family study and review of the literature. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93: 1479.

MacLennan ICM, Chan EYT. The origin of bone marrow plasma cells, in *Epidemiology and Biology of Multiple Myeloma* edited by GI Orams, M Potter. 1991; p 129. Springer, Berlin.

Magrangeas F, Nasser V, Avet-Loiseau H et al. Gene expression profiling of multiple myeloma reveals molecular portraits in relation to the pathogenesis of the disease. *Blood.* 2003; 101: 4998.

Maldonado Y. Measles. in: Nelson textbook of pediatrics. Hg. Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB. 16. Aufl. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2000; 946–951.

Manchester M, Liszewski MK, Atkinson JP, Oldstone MBA. Multiple isoforms of CD46 (membrane cofactor protein) serve as receptors for measles virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 2161–2165.

Manchester M, Valsamakis A, Kaufman R, Liszewski MK, Alvarez J, Atkinson JP, Lublin DM, Oldstone MB. Measles virus and C3 binding sites are distinct on membrane cofactor protein (CD46). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92 (6): 2303–2307.

Manchester M, Nanche D, Stehle T. CD46 as a measles receptor: form follows function. *Virology*. 2000; 274 (1): 5–10.

Manchester M, Eto DS, Valsamakis A, Liton PB, Fernandez-Munoz R, Rota PA, Bellini WJ, Forthal DN, Oldstone MB. Clinical isolates of measles virus use CD46 as a cellular receptor. *J Virol*. 2000; 74 (9): 3967–3974.

Marin V, Kaplanski G, Gres S, Farnarier C, Bongrand P. Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *J Immunol Methods*. 2001; 254 (1-2): 183–190.

Marttila M, Persson D, Gustafsson D, Liszewski MK, Atkinson, Wadell G, Arnberg N. CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7. *J Virol*. 2005; 79 (22): 14429–14436.

Mavaddat N, Mason DW, Atkinson PD, Evans EJ, Gilbert RJ, Stuart DI, Fennelly JA, Barclay AN, Davis SJ, Brown MH. Signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) is homophilic but self-associates with very low affinity. *J Biol Chem*. 2000; 275 (36): 28100–28109.

Mazars GR, Prtier M, Zhang XG et al. Mutations of the p53 gene in human myeloma cell lines. *Oncogene*. 1992; 7: 1015.

Mazure G, Grundy JE, Nygard G, Hudson M, Khan K, Srail K, Dhillon AP, Pounder RE, Wakefield AJ. Measles virus induction of human endothelial cell tissue factor procoagulant activity in vitro. *J Gen Virol.* 1994; 75 (11): 2863–2871.

McChesney MB, Miller CJ, Rota PA, Zhu YD, Antipa L, Lerche NW, Ahmed R, Bellini WJ. Experimental measles. I. Pathogenesis in the normal and the immunized host. *Virology.* 1997; 233 (1): 74–84.

McLean DM, Best JM, Smith PA, Larke RP, McNaughton GA. Viral infections of Toronto children during 1965: II. Measles encephalitis and other complications. *Can Med Assoc J.* 1966; 94 (17): 905–910.

McNeill WH. *Plagues and Peoples.* 1976. New York: Anchor Books.

McQuaid S, Campbell S, Wallace IJ, Kirk J, Cosby SL. Measles virus infection and replication in undifferentiated and differentiated human neuronal cells in culture. *J Virol.* 1998; 72 (6): 5245–5250.

McQuaid S, Cosby SL. An immunohistochemical study of the distribution of the measles virus receptors. CD46 and SLAM, in normal human tissues and subacute sclerosing panencephalitis. *Lab Invest.* 2002; 82 (4): 403–409.

Meissner NN, Koschel K. Downregulation of endothelin receptor mRNA synthesis in C6 rat astrocytoma cells by persistent measles virus and canine distemper virus infections. *J Virol.* 1995; 69 (8): 5191–5194.

Mellstedt H, Holm G, Pettersson D et al. Idiotypic-bearing lymphoid cells in plasma cell neoplasia. *Clin Haematol.* 1982; 11:65

Merchionne F, Perosa F and Dammacco F. New therapies in multiple myeloma. *Clin Exp Med.* 2007. 7: 83-97.

Minagawa H, Tanaka K, Ono N, Tatsuo H, Yanagi Y. Induction of the measles virus receptor SLAM (CD150) on monocytes. *J Gen Virol.* 2001; 82 (12): 2913–2917.

Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V et al. Biologic sequelae of nuclear factor-kappaB blockade in multiple myeloma: Therapeutic applications. *Blood*. 2002; 99: 4079.

Moench TR, Griffin DE, Obriecht CR, Vaisberg AJ, Johnson RT. Acute measles in patients with and without neurological involvement: distribution of measles virus antigen and RNA. *J Infect Dis*. 1988; 158 (2): 433–442.

Moscinski, LC and Ballester, OF. Recent progress in multiple myeloma. *Hematol Oncol* 1994. 12:111-123.

Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Rabourdin-Combe C, Gerlier D. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol*. 1993; 67 (10): 6025-6032.

Neri A, Baldini L, Trecca D et al. P53 gene mutations in multiple myeloma are associated with advanced forms of malignancy. *Blood*. 1993 81: 128.

Neri A, Murphy JP, Cro L et al. Ras oncogene mutation in multiple myeloma. *J Exp Med*. 1989. 170: 1715.

Nichols KE, Ma CS, Cannons JL, Schwartzberg PL, Tangye SG. Molecular and cellular pathogenesis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunol Rev*. 2005; 203: 180–199.

Norrby E, Kovamees J, Blixenkron-Moller M, Sharma B, Orvell C. Humanized animal viruses with special reference to the primate adaptation of morbillivirus. *Vet Microbiol*. 1992; 33 (1–4): 275–286.

Palumbo A et al. Oral melphalan and prednisone chemotherapy plus thalidomide compared with melphalan and prednisone alone in elderly patients with multiple myeloma: randomised controlled trial. *Lancet*. 2006; 367: 825-831.

Pardridge WM. Blood-brain barrier biology and methodology. *J Neurovirol*. 1999; 5 (6): 556–569.

Pearse RN, Sordillo EM, Yacoby S et al. Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98: 11581.

Peest D, Deicher H, Coldewey R et al. A comparison of polychemotherapy and melphalan/prednisone for primary remission induction, and interferon-alpha for maintenance treatment, in multiple myeloma. A prospective trial of the German Myeloma Treatment Group. Eur J Cancer. 1995. 31A: 146-151.

Pene F, Claessens YE, Muller O et al. Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma. Oncogene. 2002; 21: 6587.

Petterson M, Jernberg-Wiklund H, Larsson LG et al. Expression of the bcl-2 gene in human multiple myeloma cell lines and normal plasma cells. Blood. 1992; 79: 495.

Pilarski LM, Jensen GS. Monoclonal circulating B cells in multiple myeloma. A continuously differentiating, possibly invasive, population as defined by expression of CD45 isoforms and adhesion molecules. Hematol Oncol Clin North Am. 1992; 6:297

Pilarski LM, Mant MJ, Ruether BA. Pre-B cells in peripheral blood of multiple myeloma patients. Blood. 1985; 66: 416.

Reece DE. Management of multiple myeloma: The changing landscape. Blood Reviews. 2007; 21: 301-314.

Robillard, N, Jego, G, Pellat-Deceunynck, C, Pineau, D, Puthier, D, Mellerin, MP, Barille, S, Rapp, MJ, Harousseau, JL, Amiot, M and Bataille, R. CD28, a marker associated with tumoral expansion in multiple myeloma. Clin Cancer Res. 1998; 4: 1521-1526.

Salmon SE and Cassady JR. Plasma cell neoplasm. In: De Vita V, Hellman S, Rosenberg S (eds). 1997. Cancer – Principles and Practice of Oncology. 5th ed. Lippincott-Raven, pp 2344-2387.

Silvestris F, Cafforio P, Tucci M et al. Negative regulation of erythroblast maturation by Fas-L(+)/TRAIL(+) highly malignant plasma cells : A major pathogenic mechanism of anemia in multiple myeloma. *Blood*. 2002; 99: 1305.

Solomon A, Weiss DT, Kattine AA. Nephrotoxic potential of Bence Jones proteins. *N Engl J Med*. 1991; 324: 1845.

Tazzari, PL, Gobbi, M, Dinota, A, Bontadini, A, Grassi, G, Cerato, C, Cavo, M, Pileri, S, Caligaris-Cappio, F and Tura, S. Normal and neoplastic plasma cell membrane phenotype: studies with new monoclonal antibodies. *Clin Exp Immunol* 1987; 70: 192-200.

Terstappen, LW, Johnsen, S, Segers-Nolten, IM and Loken, MR. Identification and characterization of plasma cells in normal human bone marrow by high-resolution flow cytometry. *Blood* 1990; 76: 1739-1747.

Tian E, Zhan F, Walker R et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2003; 349: 2483.

Tong, AW, Lee, JC and Stone, MJ. Characterization of a monoclonal antibody having selective reactivity with normal and neoplastic plasma cells. *Blood*. 1987; 69: 238-245.

Topp, MS et al. Blinatumomab (anti-CD19 BiTE(R)) for targeted therapy of minimal residual disease (MRD) in patients with B precursor acute lymphoblastic leukemia (ALL): Update of an ongoing Phase II study. 14th Congress of the EHA 2009, abstract no. 482

Treon, SP, Mollick, JA, Urashima, M, Teoh, G, Chauhan, D, Ogata, A, Raje, N, Hilgers, JH, Nadler, L, Belch, AR, Pilarski, LM and Anderson, KC. Muc-1 core protein is expressed on multiple myeloma cells and is induced by dexamethasone. *Blood*. 1999; 93: 1287-1298.

Tricot, G. Multiple Myeloma and Other Plasma Cell Disorders. In Hoffman, B., Shattil, Furie, Cohen, Silberstein, and McGlave (Ed.) *Hematology: Basic Principles and Practice*. Churchill-Livingstone. 2000; pp 1398-1416.

- Ogata A, Czub S, Ogata S, Cosby SL, McQuaid S, Budka H, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. Absence of measles virus receptor (CD46) in lesions of subacute sclerosing panencephalitis brains. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1997; 94 (5): 444–449.
- Oglesby TJ, Allen CJ, Liszewski MK, White DJ, Atkinson JP. Membrane cofactor protein (CD46) protect cells from complement-mediated attack by an intrinsic mechanism. *J Exp Med*. 1992; 175 (6):1547–1551.
- Ohgimoto S, Ohgimoto K, Niewiesk S, Klagge IM, Pfeuffer J, Johnston IC, Schneider-Schaulies J, Weidmann A, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. The haemagglutinin protein is an important determinant of measles virus tropism for dendritic cells in vitro. *J Gen Virol*. 2001; 82 (8): 1835–1844.
- Ohtomo, T, Sugamata, Y, Ozaki, Y, Ono, K, Yoshimura, Y, Kawai, S, Koishihara, Y, Ozaki, S, Kosaka, M, Hirano, T and Tsuchiya, M. Molecular cloning and characterization of a surface antigen preferentially overexpressed on multiple myeloma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 258: 583- 591.
- Ohno S, Seki F, Ono N, Yanagi Y. Histidine at position 61 and its adjacent amino acid residues are critical for the ability of SLAM (CD150) to act as a cellular receptor for measles virus. *J Gen Virol*. 2003; 84 (9): 2381–2388.
- Okada N, Liszewski MK, Atkinson JP, Caparon M. Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A streptococcus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92 (7): 2489–2493.
- Okuno Y, Takahashi T, Suzuki A et al. Establishment and characterization of four myeloma cell lines which are responsive to interleukin-6 for their growth. *Leukemia*. 1991; 5: 585.
- Ono N, Tatsuo H, Tanaka K, Minagawa H, Yanagi Y. V domain of human SLAM (CDw150) is essential for its function as a measles virus receptor. *J Virol*. 2001; 75 (4): 1594–1600.
- Ono N, Tatsuo H, Hidaka Y, Aoki T, Minagawa H, Yanagi Y. Measles viruses on throat swabs from measles patients use signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) but not CD46 as a cellular receptor. *J Virol*. 2001;75 (9): 4399–4401.

Ozaki, S, Kosaka, M, Harada, M, Nishitani, H, Odomi, M and Matsumoto, T. Radioimmuno-detection of human myeloma xenografts with a monoclonal antibody directed against a plasma cell specific antigen, HM1.24. *Cancer* 1998; 82: 2184-2190.

Ozaki, S, Kosaka, M, Wakatsuki, S, Abe, M, Koishihara, Y and Matsumoto, T. Immunotherapy of multiple myeloma with a monoclonal antibody directed against a plasma cell-specific antigen, HM1.24. *Blood*. 1997; 90: 3179-3186.

Ozaki, S, Kosaka, M, Wakahara, Y, Ozaki, Y, Tsuchiya, M, Koishihara, Y, Goto, T and Matsumoto, T. Humanized anti-HM1.24 antibody mediates myeloma cell cytotoxicity that is enhanced by cytokine stimulation of effector cells. *Blood*. 1999; 93: 3922-3930.

Panum PL. Observations made during the epidemic of measles on the Faroe Islands in the year 1846. *Med Classics*. 1938; 3: 829–886.

Perkins HA, MacKenzie MR, Fudenberg HH. Hemostatic defects in dysproteinemias. *Blood*. 1970; 35:695.

Polacino PS, Pinchuk LM, Sidorenko SP, Clark EA. Immunodeficiency virus cDNA synthesis in resting T lymphocytes is regulated by T cell activation signals and dendritic cells. *J Med Primatol*. 1996; 25 (3): 201–209.

Preudhomme C, Facon T, Zandecki M et al. Rare occurrence of P53 gene mutations in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1992; 81: 440.

Pruzanski W, Watt JG. Serum viscosity and hyperviscosity syndrome in IgG multiple myeloma. Report on 10 patients and a review of the literature. *Ann Intern Med*. 1972; 77:853.

Rasillo A, Taberero MD, Sanchez ML et al. Fluorescence in situ hybridization analysis of aneuploidization patterns in monoclonal gammopathy of undetermined significance versus multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Cancer*. 2003; 97: 601.

Rettig MB et al. Kaposi sarcoma-associated herpes virus infection of bone marrow dendritic cells from multiple myeloma patients. *Science*. 1997; 276 (5320): 1851.

Rew, SB, Peggs, K, Sanjuan, I, Pizzey, AR, Koishihara, Y, Kawai, S, Kosaka, M, Ozaki, S, Chain, B and Yong, KL. Generation of potent antitumor CTL from patients with multiple myeloma directed against HM1.24. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 3377-3384.

Richelda R, Ronchetti D, Baldini L, et al. A novel chromosomal translocation t(4;14)(p16.3;q32) in multiple myeloma involve the fibroblast growth-factor receptor 3 gene. *Blood.* 1997; 90: 4062.

Riedel DA et al. The epidemiology of multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1992; 6:225

Riley-Vargas RC, Gill DB, Kemper C, Liszewski MK, Atkinson JP. CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends Immunol.* 2004; 25 (9): 496–503.

Rima BK, Earle JA, Baczko K, ter Meulen V, Liebert UG, Carstens C, Carabana J, Caballero M, Celma ML, Fernandez-Munoz R. Sequence divergence of measles virus haemagglutinin during natural evolution and adaptation to cell culture. *J Gen Virol.* 1997; 78 (1): 97–106.

Robert-Koch-Institut. 2000a.

Ein aktueller Masern-Ausbruch in Irland. *Epidemiologisches Bulletin.* 2000; 7: 57.

Robert-Koch-Institut. 2000b.

Aktueller Masern-Ausbruch in Irland — Update. *Epidemiologisches Bulletin.* 2000; 19: 154.

Robert-Koch-Institut. 2002a.

Zu den aktuellen Masern-Ausbrüchen in Deutschland. *Epidemiologisches Bulletin.* 2002; 12: 101–102

Robert-Koch-Institut. 2002b.

Zu einer Masern-Epidemie im Süden Italiens. *Epidemiologisches Bulletin.* 2002; 24: 199.

Robert-Koch-Institut. 2002c.

Jahresbericht „Impfpräventable Krankheiten 2001“, Teil 1. *Epidemiologisches Bulletin.* 2002; 42: 349–353.

Robert-Koch-Institut. 2003.

Update: Masernepidemie 2002 in Italien. *Epidemiologisches Bulletin.* 2003; 1: 4–5.

Robert-Koch-Institut. 2005a.

Infektionsgeschehen von besonderer Bedeutung. *Epidemiologisches Bulletin*. 2005; 4: 30.

Robert-Koch-Institut. 2005b.

Zu einem Ausbruch von Masern in Hessen. *Epidemiologisches Bulletin*. 2005; 11: 98.

Robert-Koch-Institut. 2005c.

Zu einer aktuellen Häufung von Masern in Wiesbaden. *Epidemiologisches Bulletin*. 2005; 20: 178–179.

Robert-Koch-Institut. 2006.

Masern im Jahr 2005 und Ausbrüche in Baden-Württemberg und Nordrhein-Westfalen in der ersten Hälfte des Jahres 2006. *Epidemiologisches Bulletin*. 2006; 27: 205–211.

Robillard N, Avet-Loiseau H, Garand R, et al. CD20 is associated with a small mature plasma cell morphology and t(11;14) in multiple myeloma. *Blood*. 2003; 102: 1070.

Rolleston JD. *The history of the acute exanthemata*. 1937. London: William Heinemann.

Rose A. Measles eliminated in Finland since 1996 — will it last? *Eurosurveillance Weekly*. 2003; 1 (3): 030116. <http://www.eurosurveillance.org/ew/2003/030116.asp#2>.

Rubin LL, Staddon JM. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci*. 1999; 22: 11–28.

Ruiz-Arguelles GJ, Katzmann JA, Greipp PR, et al. Multiple myeloma: Circulating lymphocytes that express plasma cell antigens. *Blood*. 1984; 64: 352.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230 (4732):1350–1354.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2. Aufl. 1989. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santoro F, Kennedy PE, Locatelli G, Malnati MS, Berger EA, Lusso P. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell*. 1999; 99 (7): 817–827.

Sawyer JR, Lukacs JL, Thomas EL et al. Multicolour spectral karyotyping identifies new translocations and a recurring pathway for chromosome loss in multiple myeloma, *Br J Haematol*. 2001; 112: 167.

Sawyer JR, Waldron JA, Jagannath S et al. Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1995; 82: 41.

Schneider-Schaulies J, Dunster LM, Kobune F, Rima B, ter Meulen V. Differential downregulation of CD46 by measles virus strains. *J Virol*. 1995; 69 (11): 7257–7259.

Schneider-Schaulies J, Schnorr JJ, Brinckmann U, Dunster LM, Baczko K, Liebert UG, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V. Receptor usage and differential downregulation of CD46 by measles virus wild-type and vaccine strains. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 3943–3947.

Schnorr JJ, Dunster LM, Nanan R, Schneider-Schaulies J, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V. Measles virus-induced down-regulation of CD46 is associated with enhanced sensitivity to complement-mediated lysis of infected cells. *Eur J Immunol*. 1995; 25 (4): 976–984.

Schultheis B, Kramer A, Willer A et al. Analysis of p73 and p53 gene deletions in multiple myeloma. *Leukemia*. 1999; 13: 2099.

Schuster V, Kreth HW. Virusinfektionen. in: *Pädiatrie*. Hg. Speer CP, Gahr M. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag. 2001; 359–409.

Segel GB et al. Familial (inherited) leukemia, lymphoma and myeloma: an overview. *Blood Cells Mol Dis*. 2004; 32:246

Segerman A, Atkinson JP, Marttila M, Dennerquist V, Wadell G. Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor. *J Virol*. 2003; 77 (17): 9183–9191.

Seidel C, Sundan A, Hjorth M et al. Serum syndecan-1: A new independent prognostic marker in multiple myeloma. *Blood*. 2000; 95: 388.

Seya T, Hara T, Matsumoto M, Akedo H. Quantitative analysis of membrane cofactor protein (MCP) of complement. High expression of MCP on human leukemia cell lines, which is down-regulated during cell differentiation. *J Immunol*. 1990; 145 (1): 238–245.

Shaughnessy J Jr, Gabrea A, Qi Y, et al. Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma. *Blood*. 2001; 98: 217.

Shaughnessy J, Jacobson J, Sawyer J et al. Continuous absence of metaphase-defined cytogenetic abnormalities, especially of chromosome 13 and hypodiploidy, ensures long-term survival in multiple myeloma treated with Total Therapy I: Interpretation in the context of global gene expression. *Blood*. 2003; 101: 2849.

Shaughnessy J, Rasmussen E, Zhan F et al. Gene expression profiling can be used to predict EFS in myeloma patients treated with high dose Therapy and tandem stem cell transplant [abstract 662]. *Blood*. 2003; 102: 190a.

Shaughnessy J, Zhan F, Tian E et al. The non-tumor cell component of myeloma bone marrow is altered and can be used to stratify patient groups: A gene expression profiling study [abstract 823]. *Blood*. 2003; 102: 234a.

Shou Y, Martelli ML, Gabrea et al. Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 228.

Sidorenko SP, Clark EA. Characterization of a cell surface glycoprotein IPO-3, expressed on activated human B and T lymphocytes. *J Immunol*. 1993; 151 (9): 4614–4624.

Sidorenko SP, Clark EA. The dual-function CD150 receptor subfamily: the viral attraction. *Nat Immunol*. 2003; 4 (1): 19–24.

Snyder MJ, McCrumb FR Jr, Bigbee T, Schluederberg AE, Togo Y. Observations on the seroepidemiology of measles. *Am J Dis Child*. 1962; 103: 250–251.

Soilu-Hänninen M, Hänninen A, Ilonen J, Salmi A, Salonen R. Measles virus hemagglutinin mediates monocyte aggregation and increased adherence to measles-infected endothelial cells. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 1996; 185 (2): 73–80.

Somer T. Hyperviscosity syndrome in plasma cell dyscrasias. *Adv Microcirculation*. 1975; 6:1.

Staubesand J. Bau und Funktion der Blutgefäße (Vasa sanguinea). in: Benninghoff A: *Anatomie*. Hg. Drenckhahn D & Zenker W. Band 1. 15. Aufl. München/Wien/Baltimore: Urban & Schwarzenberg. 1994; 652–685.

Stins MF, Badger J, Sik Kim K. Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells. *Microb Pathog*. 2001; 30 (1): 19–28.

Suematsu S, Matsusakaa T, Matsuda T et al. Generation of plasmacytomas with the chromosomal translocation t(12;15) in interleukin 6 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992; 89:232.

Taberero D, San Miguel JF, Garcia-Sanz M, et al. Incidence of chromosome numerical changes in multiple myeloma: Fluorescence in situ hybridization analysis using 15 chromosome-specific probes. *Am J Pathol*. 1996; 149: 153.

Takeuchi K, Takeda M, Miyajima N, Kobune F, Tanabayashi K, Tashiro M. Recombinant wild-type and edmonston strain measles viruses bearing heterologous H proteins: role of H protein in cell fusion and host cell specificity. *J Virol*. 2002; 76 (10): 4891–4900.

Tanaka K, Xie M, Yanagi Y. The hemagglutinin of recent measles virus isolates induces cell fusion in a marmoset cell line, but not in other CD46-positive human and monkey cell lines, when expressed together with the F protein. *Arch Virol*. 1998; 143 (2): 213–225.

Tanaka K, Minagawa H, Xie MF, Yanagi Y. The measles virus hemagglutinin downregulates the cellular receptor SLAM (CD150). *Arch Virol*. 2002; 147 (1): 195–203.

Tatsuo H, Okuma K, Tanaka K, Ono N, Minagawa H, Takade A, Matsuura Y, Yanagi Y. Virus entry is a major determinant of cell tropism of Edmonston and wild-type strains of measles virus as revealed by vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing their envelope proteins. *J Virol.* 2000; 74 (9): 4139–4145.

Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature.* 2000; 406 (6798): 893–897.

Teoh G, Urashima M, Ogata A et al. MDM2 protein overexpression promotes proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Blood.* 1997; 90: 1982.

ter Meulen V, Muller D, Kackell Y, Katz M, Meyermann R. Isolation of infectious measles virus in measles encephalitis. *Lancet* 1972; 2: 1172–1175.

Tinhofer I, Marschitz I, Henn T et al. Expression of functional interleukin-15 receptor and autocrine production of interleukin.15 as mechanisms of tumor propagation in multiple myeloma. *Blood.* 2000; 95: 610.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979; 76 (9): 4350–4354.

Tricot G. New insights into role of microenvironment in multiple myeloma. *Lancet.* 2000; 355:248.

Urbanska EM, Chambers BJ, Ljunggren HG, Norrby E, Kristensson K. Spread of measles virus through axonal pathways into limbic structures in the brain of TAP1 *-/-* mice. *J Med Virol.* 1997; 52 (4): 362–369.

Ullrich S, Zolla-Pazner S. Immunoregulatory circuits in myeloma. *Clin Haematol.* 1982; 11: 87.

Variator-Krishnan G, Trescol-Biemont MC, Nanche D, Rabourdin-Combe C, Gerlier, D. Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored and transmembrane forms of CD46 display similar measles virus receptor properties: virus binding, fusion, and replication; down-regulation by hemagglutinin; and virus uptake and endocytosis for antigen presentation by major histocompatibility complex class II molecules. *J Virol.* 1994; 68 (12): 7891–7899.

Vescio RA, Cao J, Hong CH, et al. Myeloma Ig heavy chain V region sequences reveal prior antigenic selection and marked somatic mutation but no intraclonal diversity. *J Immunol.* 1995; 155: 2487.

Waldenstrom JG, Adner A, Gydell K et al. Osteosclerotic “plasmocytoma” with polyneuropathy, hypertrichosis and diabetes. *Acta Med Scand.* 1978; 203:297.

Weissbrich B, Schneider-Schaulies J, ter Meulen V. Measles and its neurological complications. in: *Clinical Neurovirology.* Hg. Nath A, Berger JR. New York: Marcel Dekker. 2003; 401–430.

Welstead GG, Hsu EC, Iorio C, Bolotin S, Richardson CD. Mechanism of CD150 (SLAM) down regulation from the host cell surface by measles virus hemagglutinin protein. *J Virol.* 2004; 78 (18): 9666–9674.

World Health Organization. Measles — Mortality Reduction and Regional Elimination. Strategic Plan 2001–2005. 2001. New York: World Health Organization.

World Health Organization. Deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO regions, estimates for 2001. *The World Health Report 2002, Annex Table 2.* New York: World Health Organization, 2002. 186–191.

Xie M, Tanaka K, Ono N, Minagawa H, Yanagi Y. Amino acid substitutions at position 481 differently affect the ability of the measles virus hemagglutinin to induce cell fusion in monkey and marmoset cells co-expressing the fusion protein. *Arch Virol.* 1999; 144 (9): 1689–1699.

Xu F, Gardner A, Tu Y et al. Multiple myeloma cells are protected against dexamethasone-induced apoptosis bei insulin-like growth factors. *Br J Haematol.* 1997; 97:429.

Yanagihara M, Fujii T, Mochizuki T, Ishizaki H, Sata T. Measles virus was present in the inner cell of the acrosyringium in the skin rash. *Pediatr Dermatol.* 1998; 15 (6): 456–458.

Zandecki M, Lai JL, Facon T. Multiple myeloma: Almost all patients are cytogenetically abnormal. *Br J Haematol.* 1996; 94: 217.

Zandecki M, Lai JL, Genevieve F, et al. Several cytogenetic subclones may be identified within plasma cells from patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, both at diagnosis and during the ondolent course of this condition. *Blood.* 1997; 90: 3682.

Zandecki M, Obein V, Bernardi F et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: Chromosome changes are a common finding within bone marrow plasma cells. *Br J Haematol.* 1995; 90: 693.

Zangari M, Siegel E, Barlogie B et al. Thrombogenic activity of doxorubicin in myeloma patients receiving thalidomide: Implications for therapy. *Blood.* 2002; 100:1168.

Zenker W. 1993a.

Feinstruktur des Nervengewebes. in: Benninghoff A: *Anatomie*. Hg. Drenckhahn D & Zenker W. Band 2. 15. Aufl. München/Wien/Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1993. 220–266.

Zenker W. Hüllen des Zentralnervensystems, Ventrikelauskleidung und Liquor cerebrospinalis. in: Benninghoff A: *Anatomie*. Hg. Drenckhahn D & Zenker W. Band 2. 15. Aufl. München/Wien/Baltimore: Urban & Schwarzenberg. 1993; 339–360.

Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B et al. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance and normal bone marrow plasma cells. *Blood* 99. 2002; 1745.

Zhan F, Tian E, Brumm K et al. Gene expression profiling of human plasma cell differentiation and classification of multiple myeloma based on similarities to distinct stages of late-stage B-cell development. *Blood*. 2003; 101: 1128.

9 DANKSAGUNG

Der Dank an Dr. Max Topp, bei weitem nicht nur für die Ermöglichung und Begleitung dieser Arbeit, kann nicht groß genug sein.

Ein besonderes Dankeschön richtet sich an Frau Prof. Sibylle Schneider- Schaulies, die mich wie einen eigenen Doktoranden unterstützt hat. Ein herzliches Dankeschön richtet sich an Herrn Prof. Jürgen Schneider-Schaulies für die freundschaftliche Begleitung.

Mein herzlicher Dank geht auch an Prof. Dr. Hermann Einsele für die Unterstützung und Ermöglichung der forschungsfreien Zeit, um diese Arbeit erstellen zu können.

Takafumi Nakamura, Stephen J. Russell sowie dem gesamten Laborteam des Molecular Medicine Program der Mayo Clinic Rochester danke ich herzlich für die gute Arbeitsatmosphäre und die hilfreiche Unterstützung. Selbstverständlich geht mein Dank auch an Christoph Springfeld für die zahlreichen Tischtennismatches zwischen PCR und Zellkultur.

Gabriele Kuntz und Christina Neff danke ich herzlich für ihre große Hilfe.

Mein Dank geht zudem an die Multiple Myeloma Research Foundation (MMRF) sowie an die Boehringer Ingelheim Stiftung für die Mitfinanzierung der Arbeit an diesem Projekt bzw. für das Stipendium.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie für die liebevolle und tatkräftige Begleitung.

10 LEBENSLAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname:	Hummel, Horst-Dieter
Geburtsdatum:	30.07.1977
Geburtsort:	Temeschburg (Rum.)
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand:	verheiratet

SCHULISCHER WERDEGANG

1984 - 1988	Grundschule (Uhlandschule) in Metzingen-Neuhausen
1988 - 1997	Gymnasium (Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium)in Metzingen

ZIVILDIENST

8/1997 – 8/1998	Zivildienst im Kreiskrankenhaus Reutlingen
-----------------	--

STUDIUM

10/1998 – 10/2004	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
9/2000	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
28.08.01	1. Staatsexamen
24.08.04	2. Staatsexamen
2004-2005	Studium der Humanmedizin an der Bayrischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
26.10.05	3. Staatsexamen
2.11.05	Approbation als Arzt

DISSERTATION

Herstellung und Evaluation genetisch veränderter Masernviren zur spezifischen Infektion und Elimination primärer maligner Plasmazellen
--

Würzburg, den 2.9.2010

Horst-Dieter Hummel

11 PUBLIKATONSVERZEICHNIS

BEITRÄGE ZU KONFERENZEN

2003	Horst-Dieter Hummel, Gabriele Kuntz, Christina Neff, Hermann Einsele, Max S. Topp. Spezifische Lyse von Myelomzellen vermittelt durch T- Zellen, die einen chimärischen HM1.24-spezifischen Immunrezeptor exprimieren, DGHO, 2003.
2004	Horst-Dieter Hummel, Gabriele Kuntz, Christina Neff, Hermann Einsele, Max S. Topp. Specific lysis of multiple myeloma cells by T cells engineered to express a chimeric immunoreceptor targeting HM 1.24. EBMT, 2004
2005	Horst-Dieter Hummel, Takafumi Nakamura, Steven J. Russell, Hermann Einsele, Max S. Topp. Fully Retargeted Oncolytic Measles Virus for Multiple Myeloma Therapy. Symposium at University Hospital Würzburg, Bad Brückenau, 2005
2006	Horst-Dieter Hummel, Takafumi Nakamura, Steven J. Russell, Hermann Einsele, Max S. Topp. Fully Retargeted Oncolytic Measles Virus for Multiple Myeloma Therapy. DGHO, 2006
2006	Horst-Dieter Hummel, Takafumi Nakamura, Steven J. Russell, Hermann Einsele, Max S. Topp. Fully Retargeted Oncolytic Measles Virus for Multiple Myeloma Therapy. ASH, 2006
2009	Horst-D. Hummel, Jörg C. Rath, Heinz Wiendl, Wolfgang Hetzel, Ralf C. Bargou, Klaus V. Toyka, C. Sommer, Hermann Einsele and Max S. Topp. Highdose chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in patients with treatment refractory severe acquired immune-mediated neuropathy. A single center experience. DGHO, 2009
2010	Horst-D. Hummel, Jörg C. Rath, Heinz Wiendl, Wolfgang Hetzel, Ralf C. Bargou, Klaus V. Toyka, C. Sommer, Hermann Einsele and Max S. Topp. Highdose chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation in treatment with treatment refractory severe acquired paraproteinemic neuropathy - A single center experience. EBMT, 2010

PUBLIKATIONEN

2009	Horst-Dieter Hummel, Gabriele Kuntz, Stephen J. Russell, Takafumi Nakamura, Axel Greiner, Hermann Einsele and Max S. Topp. Genetically engineered attenuated measles virus (MV-Wue) specifically infects and kills primary Multiple Myeloma cells. J Gen Virol 90 (2009), 693-701
2010	Horst-D. Hummel, Jörg C. Rath, Heinz Wiendl, Wolfgang Hetzel, Ralf C. Bargou, Klaus V. Toyka, Claudia Sommer, Hermann Einsele and Max S. Topp. Auto-SCT in severe paraproteinemic neuropathy. Bone Marrow Transplantation, advanced online publication, 2010.