

Aus dem Interfakultären Institut für Zellbiologie
der Universität Tübingen
Abteilung Immunologie

HLA-Ligandomanalyse des Multiplen Myeloms

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Simon Dieter Walz

2017

Aus dem Interfakultären Institut für Zellbiologie
der Universität Tübingen
Abteilung Immunologie

HLA-Ligandomanalyse des Multiplen Myeloms

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Simon Dieter Walz

2017

Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Stevanović

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Grünebach

3. Berichterstatter: Professor Dr. M. Schmitt

Tag der Disputation: 13.06.2017

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	
1. Einleitung	1
1.1. Das Multiple Myelom	1
1.1.1. Definition und Entstehung des Multiplen Myeloms	1
1.1.2. Das klinische Bild, Diagnosekriterien und Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms	2
1.1.3. Therapie des Multiplen Myeloms	4
1.1.3.1. Allgemeine Therapiepfade in der Behandlung des MMs	4
1.1.3.2. Medikamente in der Therapie des Multiplen Myeloms	5
1.1.3.2.1. Immunmodulatorische Substanzen in der Behandlung des MMs	5
1.1.3.2.2. Monoklonale Antikörper in der Behandlung des MMs	6
1.1.3.2.3. Proteasomen-Inhibitoren in der Behandlung des MMs	7
1.2. Das Immunsystem und Krebs-Immuntherapie	9
1.2.1. Das Immunsystem im Überblick.....	9
1.2.2. Der HLA-Klasse I- und II-Komplex	11
1.2.2.1. Aufbau und Funktion von HLA-Klasse I.....	11
1.2.2.2. Aufbau und Funktion von HLA-Klasse II.....	12
1.2.3. Antigenprozessierung und -präsentation auf HLA-Klasse I	14
1.2.4. Die Interaktion zwischen HLA-Klasse I und dem T-Zell-Rezeptor der CD8 ⁺ zytotoxischen T-Zellen.....	15
1.2.5. Tumورimmunologie	16
1.2.5.1. Krebserkennung durch das Immunsystem	17
1.2.5.2. Tumorabwehr durch das Immunsystem	18
1.2.5.3. <i>Immunoediting</i> - und <i>Immune escape</i> -Mechanismen.....	18
1.2.6. Immuntherapeutische Ansätze und ihr Einsatz in der Behandlung des Multiplen Myeloms.....	20
1.2.6.1. Allogene Stammzelltransplantation und Donor-Lymphozyten- Infusion	20
1.2.6.2. Adoptiver T-Zell-Transfer und CAR-T-Zellen.....	20
1.2.6.3. NK-Zell-Therapie	21

1.2.6.4. Immun-Checkpoint-Inhibitoren	22
1.2.6.5. Vakzinierung	23
1.3. Ziele der Arbeit.....	24
2. Material und Methoden	26
2.1. Chemikalienliste	26
2.2. Geräteliste	27
2.3. Verbrauchsmaterialien	28
2.4. Probenmaterial und Zellkultur.....	28
2.4.1. Zelllinien	28
2.4.1.1. U266	29
2.4.1.2. MM.1S	29
2.4.1.3. JJN3	29
2.4.1.4. RPMI8226.....	29
2.4.1.5. LP-1	29
2.4.2. Primäre Proben von Patienten und gesunden Spendern.....	29
2.4.2.1. Primäre Proben von Patienten mit Multiplem Myelom.....	30
2.4.2.1.1. Isolierung von PBMCs von Patienten mit Multiplem Myelom mittels Dichtegradientenzentrifugation	30
2.4.2.1.2. Isolierung von BMNCs von Patienten mit Multiplem Myelom	30
2.4.2.2. Primäre Proben gesunder Spender.....	31
2.4.2.2.1. Isolierung von BMNCs und Granulozyten gesunder Spender	31
2.4.3. Zellkultur.....	31
2.4.3.1. Kultivierung der MCLs	31
2.4.3.2. Kultivierung primärer Myelomzellen	32
2.5. Behandlung von Myelomzelllinien und primären Myelomzellen mit Carfilzomib	32
2.5.1. Behandlungsschema.....	32
2.6. Quantifizierung der HLA-Klasse I- und DR-Moleküle auf der Zelloberfläche verschiedener hämatologischer Zellpopulationen	33
2.6.1. Durchflusszytometrie.....	33

2.6.2. Verwendete Antikörper.....	34
2.6.3. <i>Gating</i> -Strategie zur Identifikation bzw. Immunphänotypisierung der einzelnen Zellpopulationen	34
2.6.4. <i>Bead</i> -basierte Quantifizierung von HLA-Molekülen an der Zelloberfläche.....	35
2.7. Identifikation HLA-Klasse I- und DR-gebundener Peptide auf der Zelloberfläche von Myelomzellen und Definition von „Myelom-assoziierten Antigenen“	36
2.7.1. HLA-Ligandomanalyse	37
2.7.1.1. Aufschluss der Zellen	37
2.7.1.2. Immunaффinitätschromatographie mittels BrCN-Säulen.....	37
2.7.1.3. Massenspektrometrische Analyse der isolierten Peptide mittels LC-MS/MS	39
2.7.2. <i>Label-free</i> Quantifizierung zur Analyse von HLA-Ligandomveränderungen unter Carfilzomib-Behandlung.....	40
2.7.3. Definition der vom HLA-Ligandom abgeleiteten „Myelom-assoziierten Antigene“	41
2.8. Immunogenitätsanalysen der neu definierten vom HLA-Ligandom abgeleiteten „Myelom-assoziierten Antigene“	41
2.8.1. Stimulation von PBMCs mit den neu definierten Myelom-assoziierten Peptiden	42
2.8.2. IFN- γ -ELISPOT-Assay	42
2.9. Verwendete Software	43
3. Ergebnisse	44
3.1. Analyse der HLA-Expression und des HLA-Ligandoms von Myelomzellen	44
3.1.1. HLA-Oberflächenexpression auf Myelomzellen und Zellen des hämatopoetischen Systems	45
3.1.1.1. HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression von Myelomzellen und autologen Zellen des hämatopoetischen Systems aus dem Knochenmark von Myelom-Patienten.....	45

3.1.1.2. HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression von Zellen des hämatopoetischen Systems aus dem Knochenmark gesunder Spender	46
3.1.1.3. HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression von Myelomzellen im Vergleich zu normalen Plasmazellen.....	48
3.1.1.4. Zusammenhang der HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression auf Myelomzellen mit Patientencharakteristika	49
3.1.1.5. HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression auf humanen Myelomzelllinien	51
3.1.2. HLA-Ligandomanalyse von primären Myelomzellen, Myelomzelllinien, BMNCs und Granulozyten gesunder Spender	51
3.1.2.1. HLA-Ligandomanalyse von primären Myelomzellen	52
3.1.2.2. HLA-Ligandomanalyse von Myelomzelllinien	53
3.1.2.3. HLA-Ligandomanalyse von BMNCs und Granulozyten gesunder Spender	53
3.1.2.4. Identifikation von Myelom-exklusiven HLA-Liganden und Definition neuer, vom HLA-Ligandom abgeleiteter, Myelom-assoziiierter Antigene	55
3.1.2.5. Vergleich der HLA-Ligandome von primären Myelomzellen und Myelomzelllinien	62
3.1.2.6. Vergleich des HLA-Klasse I- und HLA-Klasse II-Ligandoms von primären Myelomzellen und Myelomzelllinien	62
3.1.2.7. Identifikation von HLA-Liganden aus bereits beschriebenen Myelom-assoziierten Antigenen	64
3.1.3. Testung der neu definierten Myelom-assoziierten Antigene auf Immunogenität	66
3.1.3.1. Ergebnisse der IFN- γ ELISPOT-Analysen nach 12 Tagen Peptidstimulation	66
3.2. Einfluss des Proteasomen-Inhibitors Carfilzomib auf die HLA-Expression und Peptidpräsentation von Myelomzellen.....	67
3.2.1. HLA-Oberflächenexpression auf Myelomzellen unter dem Einfluss des Proteasomen-Inhibitors Carfilzomib	67

3.2.1.1. HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression auf Myelomzellen aus MCLs unter der Behandlung mit Carfilzomib	68
3.2.1.1.1. HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression auf Myelomzellen aus MM.1S unter der Behandlung mit Carfilzomib	68
3.2.1.1.2. HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression auf Myelomzellen aus U266 unter der Behandlung mit Carfilzomib	69
3.2.1.1.3. HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression auf Myelomzellen aus RPMI8226 unter der Behandlung mit Carfilzomib	69
3.2.1.1.4. HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression auf Myelomzellen aus JJN3 unter der Behandlung mit Carfilzomib.....	70
3.2.1.2. HLA-Klasse I-Oberflächenexpression auf primären Myelomzellen aus dem KM von Myelom-Patienten unter <i>in vitro</i> -Behandlung mit Carfilzomib.....	70
3.2.1.2.1. HLA-Klasse I-Oberflächenexpression auf primären Myelomzellen aus dem KM von Myelom-Patienten unter der Behandlung mit Carfilzomib	71
3.2.1.3. HLA-Klasse I- Oberflächenexpression auf primären Myelomzellen aus dem KM von Myelom-Patienten unter <i>in vivo</i> -Behandlung mit Carfilzomib.....	71
3.2.2. Veränderung der Peptidpräsentation auf Myelomzellen unter dem Einfluss des Proteasomen-Inhibitors Carfilzomib.....	72
3.2.2.1. HLA-Ligandomanalyse von Myelomzelllinien unter der Behandlung mit Carfilzomib.....	72
3.2.2.2. Veränderung der identifizierten HLA-Liganden auf Myelomzellen unter der Behandlung mit Carfilzomib	74
3.2.2.3. Veränderung der Präsentation von HLA-Klasse I-Liganden durch Carfilzomib in Abhängigkeit vom HLA-Allotyp	81
4. Diskussion	85
4.1. Quantitative HLA-Expressionsanalyse	87
4.1.1. Methode zur HLA-Oberflächenexpressionsanalyse.....	87
4.1.2. Gesunde Spender im Vergleich zu Myelom-Patienten	88

4.2. Qualitative HLA-Ligandomanalyse primärer Myelomzellen und Myelomzelllinien sowie Immunogenitätsprüfung neuer Myelom-assoziierter Antigene	90
4.2.1. HLA-Ligandomanalyse	91
4.2.1.1. Verarbeitetes Probenmaterial	91
4.2.1.2. Affinitätschromatographie mit nachfolgender massenspektrometrischer Sequenzanalyse	92
4.2.2. HLA-Ligandomanalyse primärer Myelomzellen und von Myelomzelllinien	93
4.3. Der Einfluss von Carfilzomib auf die HLA-Oberflächenexpression und das HLA-Ligandom	96
4.3.1. Methode zur Behandlung von Myelomzelllinien und primären Myelomzellen mit Carfilzomib.....	97
4.3.2. HLA-Oberflächenexpression von Myelomzellen unter der Behandlung mit Carfilzomib	98
4.3.3. Quantitative und qualitative HLA-Ligandomanalyse von MCLs unter der Behandlung mit Carfilzomib	99
5. Zusammenfassung.....	102
6. Literaturverzeichnis	103
7. Eigenanteil	129
7.1. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	129
8. Publikationen.....	131
9. Danksagung.....	132

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
Abb	Abbildung
ADCC	Antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität
AG	Arbeitsgruppe
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BM	Kochenmark-Probe
BMNC	Mononukleäre Knochenmarkzellen
CAR	Chimerischer Antigenrezeptor
Car	Carfilzomib
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CHAPS	<i>3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate</i>
CIP	<i>Cancer immunoguiding program</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
DC	Dendritische Zelle
DDA	<i>Data dependent acquisition</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EL	Erythrozyten-Lyse
ELISPOT	Enzyme linked immunospot
EMA	European Medicines Agency
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FBS	Fetales Kälberserum

Abkürzung	Erklärung
FDR	<i>False discovery rate</i>
FGFR3	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 3
FSC	<i>Forward Scatter</i>
G	Granulozyten-Probe
GW	Grenzwert
HD	Hochdosis
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HV	Gesunder Spender
ID	Peptididentifikation
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFA	Inkomplettes Freund-Adjuvans
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IMDM	<i>Iscove's modified Dubeccos's Medium</i>
IMiDs	Immunmodulatorische Substanzen
IMWG	<i>International Myeloma Working Group</i>
IRF4	Interferon-regulierender Faktor 4
ISS	Internationales <i>Staging</i> -System
ITAM	Immunoreceptor tyrosin-based activation motif
KM	Knochenmark
LFQ	<i>Label free quantitation</i>
MCL	Myelomzelllinie
MDSC	Myeloide Suppressorzelle
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter
MM	Multiples Myelom
MRD	Minimale Resterkrankung
N	Anzahl

Abkürzung	Erklärung
na	Nicht anwendbar
nb	Nicht beurteilbar
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
ns	Nicht signifikant
OvCa	Ovarialkarzinom
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
Pen	Penicillin
PI	Proteasomen-Inhibitor
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
SCT	Stammzelltransplantation
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
siRNA	<i>Small interfering ribonucleic acid</i>
SLAMF7	<i>Signaling lymphocyte activation molecule family member 7</i>
SMM	<i>Smoldering Myeloma</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
Strep	Streptomycin
SynPep	Synthetisches Peptid
Tab	Tabelle
TAP	Transporter associated with antigen presentation
TCR	T-Zell-Rezeptor
TFA	Trifluoressigsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
UPN	<i>Uniform patient number</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation

1. Einleitung

1.1. Das Multiple Myelom

1.1.1. Definition und Entstehung des Multiplen Myeloms

Das Multiple Myelom (MM) ist eine maligne Erkrankung, die vornehmlich durch Vermehrung reifer Plasmazellen im Knochenmark und die monoklonale Produktion von kompletten Immunglobulinen bzw. deren Fragmenten charakterisiert ist [1]. Laut Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation (WHO) zählt das MM zu den reifzelligen B-Zell-Lymphomen [2]. Es stellt etwa 1% aller maligner Erkrankungen und etwa 10% der hämatologischen Neoplasien dar [3]. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei etwa 70 Jahren [4]. Die Überlebensrate nach 5 Jahren lag in Deutschland zwischen 2008 und 2011 bei 53,8% [5].

Die Entstehung des MMs basiert auf einer Veränderung des genetischen Materials in Plasmazellen und einer Veränderung des Mikromilieus im Knochenmark [6]. Als Ausgangspunkt besteht eine prä-maligne, asymptomatische Vermehrung von monoklonalen Plasmazellen von unter 10% im Knochenmark, die monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS). Mit einer Wahrscheinlichkeit von 1% pro Jahr schreitet die Erkrankung über das *Smoldering Myeloma* (SMM), das durch eine Knochenmarksinfiltration von mehr als 10% Plasmazellen ohne Myelom-typische Symptomatik gekennzeichnet ist, bis zum Multiplen Myelom fort [7]. Etwa 73% der Patienten mit SMM entwickeln innerhalb von 15 Jahren Myelom-typische Symptome, welche den Übergang in ein MM kennzeichnen [8]. Das Endstadium der Erkrankung stellt die Plasmazelleukämie mit mehr als 20% zirkulierenden Plasmazellen im peripheren Blut dar [9]. Bereits in den frühen, prä-malignen Vorläufererkrankungen treten bestimmte chromosomale Veränderungen wie Translokationen, Hyperdiploidie sowie eine erhöhte Cyclinexpression in Plasmazellen auf. Die Translokation t(4;14), welche die für Immunglobuline kodierenden Abschnitte von Chromosom 14 auf Chromosom 4 transloziert, führt zu einer aberranten Expression der Gene MMSET und FGFR3, die ein onkogenes Potential besitzen und besteht häufig bereits in Plasmazellen bei

MGUS [3, 10]. Im Verlauf kommen weitere Translokationen hinzu, die besonders MYC (8q24), MAFB (20q12) und IRF4 (6p25) betreffen. Ab der klinischen Diagnose MM wurden Mutationen in RAS, FGFR3, und p53 sowie Dysregulation von MYC nachgewiesen, die eine Schlüsselrolle für die Progression zu spielen scheinen (Abb.1). Auch das Mikromilieu im Knochenmark spielt hinsichtlich der Progression der Erkrankung eine bedeutende Rolle. Es kommt zu einer veränderten Knochenresorption, zu einer aberranten Angiogenese sowie zu einer gestörten Interaktion zwischen Plasmazellen und Knochenmark [3, 11, 12].

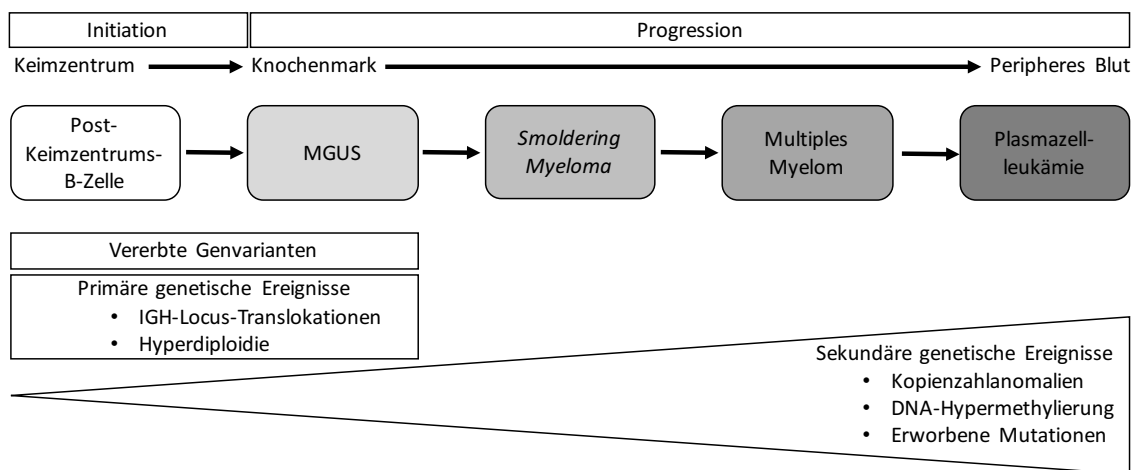


Abbildung 1: Initiation und Progression des Multiplen Myeloms durch genetische Ereignisse; IGH, schwere Kette des Immunglobulins; modifiziert nach Morgan et al. [13]

1.1.2. Das klinische Bild, Diagnosekriterien und Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms

Typische Symptome, die bei der Erstdiagnose eines Multiplen Myeloms auffallen sind Knochenschmerzen, Leistungsminderung, Infektionen, Hyperkalziämie, Nierenfunktionsverschlechterung, schäumender Urin und Gewichtsverlust. In bis zu 40% der Fälle sind die Patienten jedoch symptomfrei [14-16].

Zu den Diagnosekriterien des MMs zählen eine Knochenmarkinfiltration klonaler Plasmazellen von mindestens 10% sowie ein nachgewiesenes, monoklonales Protein in Serum oder Urin. Mindestens eines dieser Kriterien in Kombination mit Endorganschäden entsprechend der CRAB-Kriterien muss zur

Diagnosestellung erfüllt sein [17]. Die *CRAB*-Kriterien setzen sich aus den oben beschriebenen klinischen Symptomen Hyperkalziämie (C), Nierenfunktionsstörung (R), Anämie (A) und Knochenschmerzen (B) zusammen.

Die Stadieneinteilung erfolgt anhand zweier unterschiedlicher Systeme. Die Klassifikation nach Durie und Salmon lässt anhand klinischer Parameter indirekte Rückschlüsse auf die relative Tumormasse zu; eine Prognose für den jeweiligen Patienten kann daraus jedoch nicht abgeleitet werden (Tab.1) [18, 19].

Tabelle 1: Stadieneinteilung nach Durie und Salmon, modifiziert nach www.onkopedia.com [20]

	Stadium I alle Kriterien sind erfüllt	Stadium II	Stadium III mind. 1 Kriterium ist erfüllt
Hämoglobin	> 10 g / dl	weder Stadium I noch III	< 8,5 g / dl
Serumkalzium	normal		erhöht
Knochen	normale Struktur oder ein solitärer Herd (Röntgen)		fortgeschrittene Läsionen
Myelomprotein	IgG < 50 g / l (Serum) IgA < 30 g / l (Serum) Bence Jones Protein < 4 g / 24 h (Urin)		IgG > 70 g / l (Serum) IgA > 50 g / l (Serum) Bence Jones Protein > 12 g / 24 h (Urin)
Nierenfunktion	Zusatzbezeichnung A Kreatinin ≤ 2 mg/dl		Zusatzbezeichnung B Kreatinin > 2 mg/dl

Mittels der Stadieneinteilung nach dem Internationalen *Staging*-System (ISS; Tab.2) lassen sich Patienten in 3 unterschiedliche prognostische Subgruppen unterteilen [19, 20].

Tabelle 2: Stadieneinteilung nach dem Internationalen *Staging* System (ISS), modifiziert nach www.onkopedia.com [20]

	Serumkonzentration
Stadium 1	β 2-Mikroglobulin ≤ 3,5 mg/l und Albumin ≥ 3,5 g/dl
Stadium 2	weder Stadium I noch Stadium III
Stadium 3	β 2-Mikroglobulin > 5,5 mg/l

Mittels der Risikostratifizierung (Tab.3) der *International Myeloma Working Group* (IMWG), die aus einer Kombination der bisherigen Einteilungssysteme

mit zytogenetischen Veränderungen und Patientenmerkmalen besteht, soll eine individualisiertere Therapie, die den jeweiligen Bedürfnissen der Risikogruppe entspricht, ermöglicht werden [21].

Tabelle 3: Risikostratifizierung nach der Konsensusentscheidung der IMWG, modifiziert nach Chng et. al [21]

	Hochrisiko	Standardrisiko	Niedriges Risiko
	alle Kriterien sind erfüllt		alle Kriterien sind erfüllt
ISS	ISS II/III		ISS I/II
Zytogenetik	t(4;14) oder 17p13 del	weder Hochrisiko noch niedriges Risiko	Fehlen von t(4;14), 17p13 del und +1q21
Patientenalter			< 55

1.1.3. Therapie des Multiplen Myeloms

Die Therapieindikation eines MMs wird maßgeblich durch die Klinik des Patienten beeinflusst. Bei MM-Patienten, die eine Myelom-typische Symptomatik hinsichtlich der *CRAB*-Kriterien aufweisen, sollte eine Therapie eingeleitet werden. Ziel der Therapie ist die bestmögliche Remission mit rascher Symptomkontrolle sowie Normalisierung der Myelom-bedingten Komplikationen [20]. Patienten, die keine Myelom-typische Symptomatik zeigen, sollten engmaschig kontrolliert werden, da bisher kein Vorteil einer frühen Therapieeinleitung nachgewiesen werden konnte [6, 8, 22, 23]. Eine Ausnahme stellen Patienten mit Hochrisiko-SMM dar. Hier konnte für den frühen Einsatz von Lenalidomid/Dexamethason ein signifikant verlängertes progressionsfreies Intervall und Gesamtüberleben gezeigt werden [23].

1.1.3.1. Allgemeine Therapiepfade in der Behandlung des MMs

Nach Indikationsstellung zur Therapieeinleitung bei MM-Patienten werden diese anhand des biologischen Alters und ihrer jeweiligen Komorbiditäten in stammzelltransplantationsfähig oder -unfähig eingeteilt.

Die derzeit einzige kurative Behandlungsoption des MMs stellt die allogene Stammzelltransplantation (SCT) dar [24]. Diese kann jedoch aufgrund der jeweiligen Komorbiditäten und des Mangels an passenden Spendern häufig nicht durchgeführt werden und zählt derzeit nicht zur Erstlinientherapie.

Das Ziel der Verlängerung der progressionsfreien und Gesamtüberlebenszeit kann am ehesten durch eine Melphalan-Hochdosis-Therapie (Melphalan-HD) mit nachfolgender autologer SCT erreicht werden. Hierfür wird, auch abhängig von der Zytogenetik, eine Induktion mit einer Kombination aus Proteasomen-Inhibitor (PI), vor allem Bortezomib, immunmodulatorischen Substanzen (IMiDs), meist Lenalidomid, und Kortison durchgeführt. Zwei bis acht Wochen nach Beendigung der Induktionstherapie werden dann autologe Stammzellen gesammelt gefolgt von einer Konditionierung mittels HD-Melphalan und anschließender Rückgabe der autologen Stammzellen [20, 25, 26].

Ist die Stammzelltransplantation keine Option kommt je nach den jeweiligen Komorbiditäten des Myelom-Patienten eine medikamentöse Induktionstherapie mit verschiedenen Kombinationen aus Proteasomen-Inhibitoren, IMiDs, Alkylantien und Kortison zum Einsatz [20].

Eine generelle Empfehlung zur Erhaltungstherapie besteht derzeit nicht. In Studien konnten für bestimmte Patientengruppen positive Ergebnisse für eine Erhaltungstherapie mit Lenalidomid, Bortezomib oder Thalidomid gezeigt werden [20, 27-30].

Zusätzlich kommen ergänzende Therapiemaßnahmen wie beispielsweise die Bestrahlung von frakturgefährdenden Osteolysen oder extramedullären Manifestationen des MMs zum Einsatz. Bei Knochenbeteiligung können Bisphosphonate verabreicht werden. Das Nebenwirkungsprofil der Bisphosphonate, insbesondere die Kiefernekrose, kann durch spezielle Maßnahmen, wie vorherige zahnärztliche Sanierung des Zahnstatus, deutlich verringert werden [31, 32].

1.1.3.2. Medikamente in der Therapie des Multiplen Myeloms

1.1.3.2.1. Immunmodulatorische Substanzen in der Behandlung des MMs

Ein bedeutender Bestandteil in der Behandlung des MMs sind immunmodulatorische Substanzen, die vom Glutaminsäurederivat Thalidomid abstammen [33]. Thalidomid erlangte in den 1950er und 60er Jahren traurige Berühmtheit, da es, als Antiemetikum und Sedativum in der Schwangerschaft

eingesetzt, als Nebenwirkung Fehlbildungen an mesenchymalen Geweben der Feten verursachte [34].

IMiDs weisen mehrere Wirkungen auf, die in der Behandlung des MM von Interesse sind. Zum einen wirken IMiDs durch Hemmung der TNF α -Produktion anti-inflammatorisch und besitzen zusätzlich eine anti-angiogenetische Wirkung [35, 36]. Zum anderen verursachen IMiDs den namensgebenden immunmodulatorischen Effekt, der sowohl das adaptive als auch das angeborene Immunsystem betrifft, bestehend aus der Co-Stimulation bereits aktivierter T-Zellen, einer Herunterregulation regulatorischer T-Zellen sowie einer gesteigerten Proliferation natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) [33, 37-39]. Durch die Weiterentwicklungen, Lenalidomid und Pomalidomid, konnten einige der Wirkungen deutlich gesteigert werden und zusätzlich der Effekt auf das Mikromilieu des MMs im Knochenmark (KM), insbesondere die Verminderung der MM-Zell/Knochenmarkstroma-Interaktion, gesteigert werden [33].

1.1.3.2.2. Monoklonale Antikörper in der Behandlung des MMs

Neuere Therapieansätze des MMs beinhalten monoklonale Antikörper wie Elotuzumab und Daratumumab. Die Substanzen werden derzeit in Studien bei Myelom-Patienten in der Erstlinie und im Rezidiv nach vorangegangener Therapie eingesetzt [40].

Der humanisierte rekombinante monoklonale IgG1-Antikörper Elotuzumab bindet an das auf MM- und Plasmazellen exprimierte *signaling lymphocyte activation molecule* (SLAMF7) und vermittelt eine Antikörper-vermittelte Zerstörung der Zielzelle (ADCC) sowie eine gesteigerte NK-Zell-Aktivität gegen Myelomzellen [40-42]. Für Elotuzumab konnte in der Phase III-Studie ELOQUENT-2 in Kombination mit Lenalidomid und Dexamethason ein signifikant verlängertes progressionsfreies Intervall gezeigt werden, wohingegen eine Monotherapie mit Elotuzumab keinen klinischen Nutzen erbrachte [40, 43, 44]. Im Gegensatz dazu zeigte Daratumumab, ein humaner monoklonaler IgG1 κ -Antikörper gegen CD38, in einer Phase I/II-Studie auch in der Monotherapie vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich der Ansprechrate und des progressionsfreien Intervalls [40, 45]. Die Oberflächenexpression von CD38 auf Myelomzellen ist besonders hoch im Vergleich zu anderen

myeloischen und lymphatischen Zellen, wengleich auch diese CD38 exprimieren [46]. Durch Bindung von Daratumumab an CD38 wird sowohl eine ADCC als auch eine Komplement-vermittelte Zerstörung der Zielzelle initiiert [47].

1.1.3.2.3. Proteasomen-Inhibitoren in der Behandlung des MMs

Mit der Zulassung der Proteasomen-Inhibitoren Bortezomib und später auch Carfilzomib haben PIs seit 2004 Einzug in die Therapie des MMs in Europa erhalten [49, 50]. Die Medikamentengruppe der PIs greift in das Ubiquitin-Proteasom-System ein, das durch Degradation von Proteinen in Zellen maßgeblich an der Erhaltung der zellulären Homöostase sowie an der Oberflächenpräsentation von Antigenen beteiligt ist [51-55]. Das 26S-Proteasom selbst besteht aus einem fassförmigen, proteolytischen 20S-Komplex und zwei regulatorischen 19S-Komplexen, welche die zu degradierenden polyubiquitinierten Proteine binden und dem 20S-Komplex zuführen. Die proteolytische Aktivität der 20S-Komplexes setzt sich aus einer durch die β_1 -Untereinheit ausgeführten Caspase-

ähnlichen, einer durch die β_2 -Untereinheit ausgeführten Trypsin-ähnlichen und einer durch die β_5 -Untereinheit ausgeführten Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität zusammen (Abb.2) [54, 56, 57].

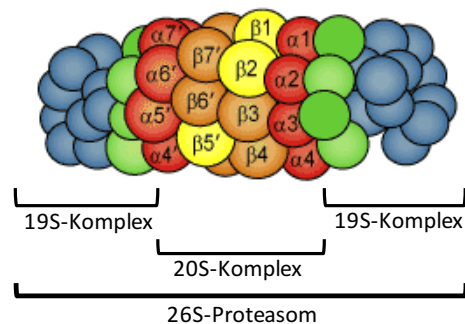


Abbildung 2: Das 26S-Proteasom bestehend aus zwei regulatorischen 19S-Komplexen und dem proteolytischen 20S-Komplex, der die β_1 -, β_2 - und β_5 -Untereinheit enthält; modifiziert nach www.Bostonbiochem.com [48]

Der Erstgenerations-PI Bortezomib erhielt 2004 die Zulassung in Europa als Monotherapie zur Behandlung von Myelom-Patienten, deren Erkrankung unter mindestens einer Vortherapie progredient verlief und die eine autologe SCT durchlaufen hatten oder dafür nicht in Frage kamen. Im Verlauf wurde die Zulassung als Kombinationstherapie mit Dexamethason oder Dexamethason und Thalidomid unter anderem auch auf die Induktionstherapie vor allogener SCT ausgeweitet [49]. Sowohl bei zuvor unbehandelten Myelom-Patienten als auch bei Patienten im Rezidiv nach vorheriger Therapie konnte ein signifikant

verlängertes progressionsfreies Intervall sowie Gesamtüberleben für Bortezomib-beinhaltende Therapien gezeigt werden [58-61]. Die häufigsten durch Bortezomib verursachten Nebenwirkungen sind gastrointestinale Symptome, Fatigue, Anämie, Thrombozytopenie und vor allem periphere Neuropathie [54, 61]. Das zur Gruppe der Boronate gehörende Bortezomib bindet reversibel an das Proteasom und inhibiert dort hauptsächlich die Chymotrypsin- und Caspase-ähnliche Aktivität sowie in geringerem Ausmaß auch die Trypsin-ähnliche Aktivität [62].

Als erster Zweitgenerations-PI wurde Carfilzomib im November 2015 als Kombinationstherapie mit Lenalidomid und Dexamethason durch die *European Medicines Agency* (EMA) für die Behandlung von Myelom-Patienten, die zuvor mindestens eine Therapie erhalten hatten, in Europa zugelassen [50]. In oben genannter Kombination trug Carfilzomib zu einem signifikant verlängerten progressionsfreien Überleben gegenüber der Standardtherapie (Lenalidomid plus Dexamethason) bei [63]. Carfilzomib als Monotherapie konnte das Gesamtüberleben im Vergleich zu niedrig dosierten Kortikosteroiden mit oder ohne Cyclophosphamid nicht signifikant steigern, wenngleich die objektive Ansprechrates und der klinische Nutzen gesteigert wurden [64, 65]. Verglichen mit der derzeitigen Standardtherapie aus Bortezomib und Dexamethason für Myelom-Patienten im Rezidiv, erbrachte die Kombination aus Carfilzomib in Kombination mit Dexamethason ein signifikant verlängertes progressionsfreies Überleben [66]. Selbst Myelom-Patienten deren Vortherapie Bortezomib enthielt und die darauf refraktär waren oder einen Rückfall erlitten, zeigten in 17% der Therapieversuche mit Carfilzomib ein Ansprechen [67].

Carfilzomib gehört zur Gruppe der Epoxyketone und inhibiert, im Gegensatz zu Bortezomib, irreversibel und selektiv die β_5 -Untereinheit des Proteasoms. Somit bewirkt Carfilzomib vor allem eine Hemmung der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität und nur in geringem Ausmaß eine Beeinflussung der Trypsin- und Caspase-ähnlichen Aktivität [54, 68, 69].

Insgesamt zeigt Carfilzomib ein ähnliches Nebenwirkungsspektrum wie Bortezomib, also vor allem Blutbildveränderungen und Infektionsneigung,

jedoch tritt die periphere Neuropathie, die für Bortezomib häufig dosislimitierend ist, deutlich seltener auf [54, 70].

1.2. Das Immunsystem und Krebs-Immuntherapie

Das Immunsystem dient der Abwehr von Pathogenen, die von außen in den Organismus eindringen oder zur Beseitigung veränderter Zellen, die im Körper selbst entstehen. In der Krebs-Immuntherapie werden Teile des menschlichen Immunsystems genutzt, um einen Anti-Tumoreffekt zu induzieren oder zu verstärken.

1.2.1. Das Immunsystem im Überblick

Das menschliche Immunsystem besteht aus einer äußeren Barriere, einem angeborenen Teil, der die erste Abwehrreihe nach dem Eindringen von Pathogenen bildet und einem adaptiven Teil, der hochspezifisch agiert und zu einer Art immunologischem Gedächtnis führt [71, 72].

Die äußere Barriere des Menschen, die das Eindringen von Pathogenen verhindern soll, besteht aus der Haut bzw. der Schleimhaut und den darauf sezernierten Stoffen, wie zum Beispiel β -Defensine der Haut und Lunge oder α -Defensine des Darms, die Pathogene an der Vermehrung hindern oder direkt zerstören können sowie teils aus einer Besiedlung durch harmlose Mikroorganismen. Überwinden Pathogene diese Barriere, kommt zunächst das angeborene Immunsystem zum Einsatz. Dieses besteht sowohl aus zellulären als auch aus löslichen Bestandteilen. Die Zellen des angeborenen Immunsystems sind vor allem phagozytierende Zellen wie neutrophile Granulozyten, Monozyten bzw. Makrophagen sowie dendritische Zellen (DC). Diese DCs stellen durch Antigenpräsentation eine Verbindung zum adaptiven Immunsystem her. Weitere zelluläre Bestandteile stellen basophile und eosinophile Granulozyten sowie Mastzellen aber auch natürliche Killerzellen dar, die eine Rolle bei der Abwehr intrazellulärer Erreger und von Tumorzellen spielen. Die lösliche Komponente des angeborenen Immunsystems besteht aus Komplementfaktoren, die in Anwesenheit von mikrobiellen Oberflächen bzw. Antikörpern kaskadenartig aktiviert werden, um diejenigen Zellen mittels des sogenannten „*membrane attack*“-Komplexes zu zerstören, sowie aus die

Immunantwort unterstützenden Akute-Phase-Proteinen und richtungsweisenden Chemokinen. Zytokine, die vor allem von Immunzellen gebildet werden, steuern die Immunantwort und vermitteln zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem [71, 72].

Zum adaptiven Immunsystem werden sowohl die zellulären Anteile, also B- und T-Lymphozyten, sowie die löslichen, von B-Zellen produzierten Antikörper gezählt. B-Lymphozyten sind in der Lage spezielle dreidimensionale Oberflächenstrukturen auf Zellen zu erkennen, wohingegen T-Zellen zur Erkennung ihres Antigens die Präsentation auf humanen Leukozyten-Antigenen (HLA) benötigen. Alle Lymphozyten unterliegen in ihrem Reifungsprozess einer strengen Kontrolle, um eine sichere Unterscheidung zwischen körpereigenen und -fremd zuverlässig gewährleisten zu können. Im Thymus differenzieren T-Zellen zu zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen, die vor allem auf HLA-Klasse I präsentierte intrazelluläre Antigene erkennen, oder zu unterschiedlichen $CD4^+$ T-Helferzellen (T_H1 -, T_H2 -, T_H17 -, T_{Reg} -Zellen). Die zytotoxischen T-Zellen dienen der Abtötung von malignen oder virusbefallenen Zellen. $CD4^+$ T-Helferzellen dagegen regen nach Erkennung ihres über HLA-Klasse II präsentierten Antigens, vornehmlich durch dendritische Zellen und B-Zellen, aktivierte B-Lymphozyten zur Produktion von Immunglobulinen an, aktivieren NK-Zellen, zytotoxische T-Zellen und Phagozyten und koordinieren die Immunantwort durch Zytokinproduktion. B-Lymphozyten reifen im Knochenmark und werden in peripheren lymphatischen Geweben, wie zum Beispiel in Lymphknoten, durch Antigenkontakt aktiviert. Durch die Interaktion zwischen T-Helferzelle und B-Zelle wird die Art der zu produzierenden Antikörper festgelegt. Zunächst teilen sich die aktivierten B-Zellen mehrfach, um dann zu Plasmazellen auszureifen, die anschließend hochspezifische, monoklonale Antikörper produzieren. Eine Antwort durch das adaptive Immunsystem führt zur Entwicklung Antigen-spezifischer Gedächtniszellen, die bei erneutem Antigenkontakt eine schnellere Immunreaktion generieren können [71, 72].

Das angeborene und das adaptive Immunsystem sind nicht als separate Komponenten zu sehen, sondern als interaktive Partner die sich gegenseitig unterstützen [71, 72].

1.2.2. Der HLA-Klasse I- und II-Komplex

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) wird beim Menschen durch mehr als 200 Gene, die auf Chromosom 6 liegen, kodiert. Das Genprodukt des Haupthistokompatibilitätskomplexes des Menschen, auch HLA genannt, wird als polygene und sehr polymorphe Proteinstruktur auf der Zelloberfläche der meisten kernhaltigen, menschlichen Zellen exprimiert und präsentiert den T-Zellen Peptidfragmente aus dem Zellinneren oder zuvor internalisierter Partikel. Durch Kontakt der so präsentierten Peptidfragmente, auch HLA-Liganden genannt, mit dem T-Zell-Rezeptor sowie durch Kontakt weiterer Co-Rezeptoren auf den Zelloberflächen werden T-Zellen aktiviert und zu ihrer Subgruppenspezifischen Aktivität angeregt [71-73].

1.2.2.1. Aufbau und Funktion von HLA-Klasse I

Derzeit sind mit HLA-A, -B und -C 3 klassische MHC-Klasse I-Genprodukte, die ubiquitär auf kernhaltigen menschlichen Zellen sowie auf Thrombozyten vorkommen, bekannt. Weitere HLA-Klasse I-Moleküle sind HLA-E, -G und -F, die derzeit als weniger polymorph und/oder nicht ubiquitär präsentiert anzusehen sind [74]. Die klassischen HLA-Klasse I-Moleküle werden kodominant exprimiert. Für HLA-Klasse I besteht ein ausgeprägter Polymorphismus durch welchen derzeit 3.399 unterschiedliche HLA-A-, 4.242 HLA-B- und 2.950 HLA-C-Allele bekannt sind und ständig neue Allele entdeckt werden (Stand April 2016) [75]. Aufgrund des Polymorphismus der HLA-Klasse I-Allele, werden so meist 6 unterschiedliche HLA-Klasse I-Moleküle exprimiert. Ein HLA-Klasse I-Molekül besteht aus einer 45 kDa schweren α -Kette, die als Glykoprotein in der Zellmembran verankert ist, und einem löslichen, nicht polymorphen und auch nicht im MHC-Locus kodierten, 12 kDa schweren β_2 -Mikroglobulin. Die Peptidbindungstasche der HLA-Klasse I-Moleküle wird durch die extrazelluläre α_1 - und α_2 -Domäne der α -Kette gebildet und bindet 8-11 Aminosäuren lange Peptide (Abb.3) [76].

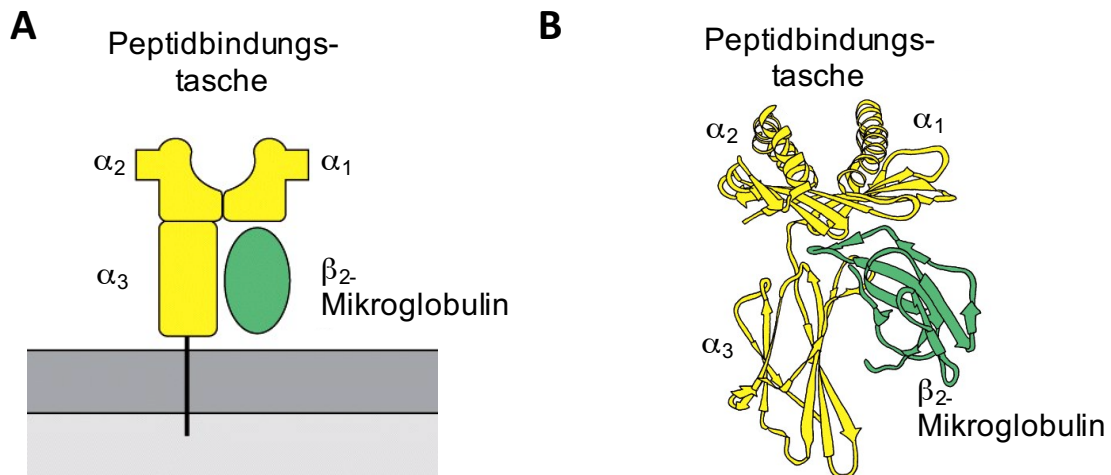


Abbildung 3: Schematischer Aufbau des HLA-Klasse I-Moleküls mit α -Kette (gelb), deren Untereinheiten und dem β_2 -Mikroglobulin (grün) sowie der Peptidbindungstasche **[A]**. Schematische Darstellung der Struktur des HLA-Klasse I-Moleküls **[B]**. Modifiziert nach Parham, The Immun System [77].

Jeder HLA-Allotyp besitzt eine eigene Bindungsspezifität, an welche definierte Verankerungsreste der zu präsentierenden Peptide binden. Die Bindung an sich besteht zum einen aus Wasserstoffbrücken an den Amino- und Carboxyenden des Peptides mit den unveränderten Bereichen der Peptidbindungstasche und zum anderen durch nicht kovalente Wechselwirkungen mit polymorphen Bereichen der Peptid-bindenden Furche [78, 79]. Ohne gebundenes Peptid, welches einen Bestandteil des HLA-Klasse I-Komplexes darstellt, ist der Komplex auf der Zelloberfläche nicht stabil [71].

HLA-Klasse I-Moleküle präsentieren zytotoxischen T-Zellen vor allem Peptide, die im Zellinneren hergestellt werden; somit werden Selbstantigene, aber auch Virus- oder Tumorpeptide präsentiert. Die aktivierte T-Zelle tötet nach Erkennung die präsentierende Zelle ab. Werden zu wenige HLA-Klasse I-Moleküle an der Zelloberfläche exprimiert erfolgt unabhängig von den präsentierten Peptiden eine Elimination der Zelle durch NK-Zellen [72].

1.2.2.2. Aufbau und Funktion von HLA-Klasse II

Im Gegensatz zu HLA-Klasse I-Molekülen werden HLA-Klasse II-Moleküle nicht ubiquitär sondern ausschließlich auf professionellen Antigen-präsentierenden Zellen wie dendritischen Zellen, Makrophagen und B-Zellen sowie auf aktivierten T-Zellen exprimiert. HLA-Klasse II-Moleküle präsentieren

hauptsächlich extrazelluläre Peptide, die zuvor über unterschiedliche Mechanismen in die Zelle aufgenommen und prozessiert wurden.

Die Bestandteile dieser Moleküle sind ebenfalls in der MHC-Region kodiert. Auch für die HLA-Klasse II-Genprodukte HLA-DR, -DQ, -DP, -DM und -DO aus der MHC-Region 2 besteht mit derzeit 3.743 unterschiedlichen Allelen ein ausgeprägter Polymorphismus (Stand April 2016) [75].

Das MHC-Klasse II Molekül besteht aus zwei nicht kovalent gebundenen, die Zellmembran durchspannenden Ketten, die sich jeweils in zwei Domänen unterteilen. Die Peptidbindungsfurche wird von der α_1 - und der β_1 -Untereinheit gebildet, und stellt sich im Gegensatz zur Bindungstasche der HLA-Klasse I an den Enden offen dar, was die Möglichkeit der Anlagerung von dreizehn oder mehr Aminosäuren langen Peptiden bietet (Abb.4).

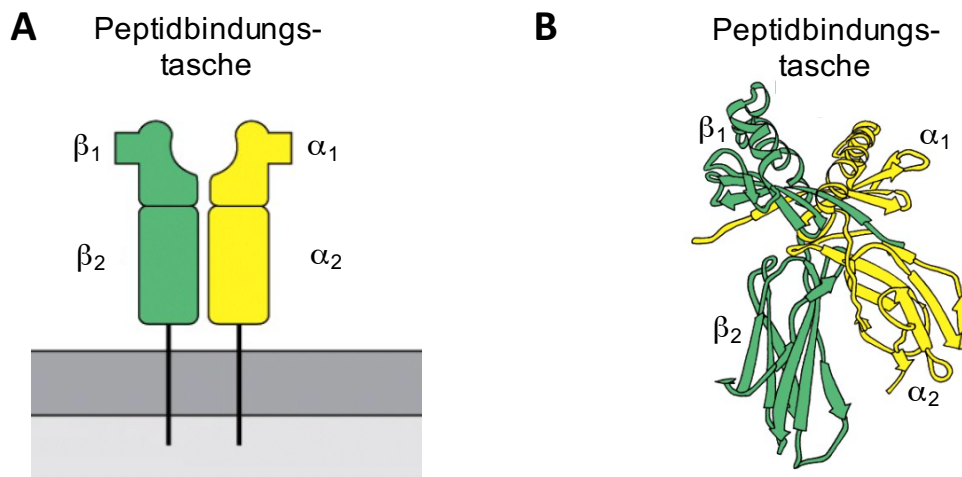


Abbildung 4: Schematischer Aufbau des HLA-Klasse II-Moleküls mit α -Kette (gelb) und β -Kette (grün), deren Untereinheiten sowie der Peptidbindungstasche **[A]**. Schematische Darstellung der Struktur des HLA-Klasse II-Moleküls **[B]**. Modifiziert nach Parham, The Immun System [77].

Die Liganden der HLA-Klasse II liegen in ausgestreckter Konformation in der Bindungsfurche. Die Verankerung findet durch Seitengruppen der Peptide in den Taschen der Bindungsfurchen, sowie durch Interaktionen zwischen dem Peptidrückgrat und konservierten Seitenketten der Peptidbindungsfurche statt. Die Taschen können ein größeres Spektrum an Seitenketten aufnehmen als im HLA-Klasse I-Molekül, sodass eine genaue Definition der Verankerungsreste für HLA-Klasse II-Liganden schwerer fällt [71, 72, 79, 80].

Diese Peptide werden CD4⁺ T-Helferzellen präsentiert, die den Komplex aus Peptid und HLA-Klasse II-Molekül erkennen und daraufhin durch Zytokinausschüttung koordinierende Aufgaben in der Immunantwort wahrnehmen [72].

1.2.3. Antigenprozessierung und -präsentation auf HLA-Klasse I

Im Jahre 1990 gelang es erstmals die an MHC-Klasse I gebundenen Peptide der Zelloberfläche einer Tumorzelllinie aufzureinigen und mittels Edmann-Abbau zu sequenzieren [81]. Bereits früher war bekannt, dass auf HLA-präsentierte Peptidfragmente auf der Zelloberfläche durch T-Zellen erkannt werden können. Im Zuge dieser Entdeckung wurden erste Sequenzmotive definiert, durch welche Peptide im HLA verankert werden. Auf HLA-Klasse I werden vornehmlich Peptide aus intrazellulären Proteinen präsentiert. Bei normalen Zellen werden so Peptide aus intakten, nativen Proteinen/Antigenen (Antigenprozessierung) an der Zelloberfläche für T-Zellen präsentiert (Antigenpräsentation), die in der Regel keine Immunantwort auslösen. Bei virusinfizierten oder Tumorzellen werden zusätzlich virusspezifische oder Tumorpeptide aus dem Zytosol präsentiert [72, 79].

Die Untereinheiten des HLA-Klasse I-Komplexes werden während ihrer Synthese direkt in das endoplasmatische Retikulum (ER) abgegeben. Erst dort verbinden sich beide Ketten und formen die Peptidbindungstasche. Somit besteht nie ein Kontakt dieser Peptidbindungstasche mit im Zytosol befindlichen Peptiden. Dies bedingt jedoch auch einen Transport der im Zytosol prozessierten Peptide. Den größten Anteil der zu präsentierenden Peptide liefert ein multikatalytischer, fassähnlicher Proteasenkomples, das Proteasom. Es besteht aus 28 Untereinheiten, die in 4 Ringen angeordnet sind. Zuvor durch Polyubiquitinierung markierte Proteine werden ins Innere der Ringe, dem aktiven Zentrum, geleitet und dort durch die proteolytischen Untereinheiten zu kurzen Peptiden gespalten, um anschließend freigesetzt zu werden [82, 83]. Diese Peptide werden anschließend mittels des TAP-Komplexes, ein Heterodimer aus TAP-1 und -2 in der Membran des ERs, ATP-abhängig ins ER befördert [84]. Wie auch HLA-Klasse I-Moleküle bevorzugt der TAP-Komplex Peptide einer Länge von 8-11 Aminosäuren und einem hydrophoben oder

basischen Aminosäurerest am Carboxyende [71, 85]. Da ein nicht mit Peptid beladenes HLA-Klasse I-Molekül nicht stabil an der Zelloberfläche präsentiert werden kann, spielt der Vorgang der Bindung des Peptides in die Bindungstasche eine bedeutende Rolle. Daran sind im ER mehrere Proteine mit Chaperonfunktion beteiligt. Calnexin ist an der Verbindung der α -Kette und des β_2 -Mikroglobulins beteiligt und lagert sich daraufhin dem MHC-Klasse I-Ladungskomplex an. Dieser besteht außerdem aus Tapasin, welches eine Brücke zwischen TAP und α : β_2 -Mikroglobulin-Heterodimer herstellt, aus der Thioloxydoreduktase Erp57 und aus dem TAP-Komplex selbst [86, 87]. Die Hauptaufgabe dieses Ladekomplexes scheint in der Erhaltung des richtigen Zustandes des α : β_2 -Mikroglobulin-Heterodimers und der Kontrolle einer möglichst starken Bindung des Peptides zu liegen. Nach der Bindung des Peptides löst sich das beladene HLA-Molekül vom MHC-Klasse I-Ladungskomplex und wird vollständig gefaltet aus dem ER über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert [71, 72, 79].

1.2.4. Die Interaktion zwischen HLA-Klasse I und dem T-Zell-Rezeptor der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen

Alle T-Zellen besitzen dem FAB-Fragment des Immunglobulins ähnelnde T-Zell-Rezeptoren (TCR), welche der Antigenerkennung HLA-präsentierter Peptide auf der Zelloberfläche dienen. Jede T-Zelle besitzt etwa 30.000 identische TCRs, die sich aus einer TCR- α - und einer TCR- β -Kette zusammensetzen. Eine kleine Untergruppe von 1-10% der T-Zellen im Blut besitzt anstelle der α : β -Heterodimere γ : δ -TCRs, deren Funktion in der Erkennung von nicht HLA-präsentierten unkonventionellen Antigenen wie den Stressmolekülen MICA und MICB sowie der Erkennung nicht-peptidischer Antigene aus der Isoprenoidbiosynthese besteht [79, 88, 89]. Im weiteren Verlauf wird aufgrund der eminenten Wichtigkeit in der Antigenerkennung und Bekämpfung von Tumorzellen ausschließlich auf α : β -TCRs eingegangen [71, 79].

Das α : β -Heterodimer besitzt eine variable Region, die drei hypervariable Bindungsstellen bietet (*complementarity determining region*, CDR), welche der hochspezifischen Antigenerkennung dienen, sowie eine konstante Region,

welche unter anderem die TCR-Ketten über Disulfidbrücken miteinander verbindet. Die hohe Diversität der Antigenerkennung liegt, ähnlich wie bei den Immunglobulinen, in der somatischen Rekombination der variablen Region, bei begrenzter Anzahl an Genen, begründet. Beide TCR-Ketten durchdringen die Lipiddoppelschicht mittels einer hydrophoben Transmembrandomäne und einem kurzen intrazellulären Schwanzstück [71, 79]. Da der TCR alleine keine Signaltransduktion auslösen kann, setzt er sich in Wirklichkeit aus dem α : β -Heterodimer und CD3, bestehend aus je einer γ - und δ -Kette und je zwei ϵ - und ζ -Ketten, zusammen. CD3 bietet an seiner intrazellulären Domäne 10 ITAMs (*immunoreceptor tyrosin-based activation motifs*), welche nach Aktivierung des TCRs durch die Kinase Lck phosphoryliert werden, um anschließend die Kinase ZAP-70 zu binden. Bei zytotoxischen T-Zellen wird durch Bindung des Korezeptors CD8 an HLA-Klasse I die Interaktion mit dem TCR verstärkt und zugleich eine räumliche Nähe der Kinase Lck mit den ITAMs hergestellt, die somit phosphoryliert werden können. Zudem wird die wenig affine Bindung des TCRs an die Zielstruktur durch die Bindung des Korezeptors verstärkt. Das an die ITAMs gebundene ZAP-70 selbst induziert TCR-abhängige Signalwege, die letztendlich zur Wanderung der Transkriptionsfaktoren NF κ B, AP-1 und calciumabhängig auch NFAT in den Zellkern führen [72, 79].

Zytotoxische T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr intrazellulärer Krankheitserreger und in der Kontrolle entarteter Zellen. Aktivierte CD8⁺ zytotoxische T-Zellen können die Zielzelle nach Antigenkontakt mittels Freisetzung zytotoxischer Stoffe abtöten. Dazu gehören Granzyme, Perforin und Granlysin. Darüber hinaus besitzen aktivierte CD8⁺ zytotoxische T-Zellen den membranständigen FAS-Liganden, der an der Zielzelle die Apoptose einleiten kann. Zudem werden Zytokine wie beispielsweise Interferon- γ produziert, was die virale Replikation hemmt, Makrophagen aktiviert und die Expression von HLA-Klasse I fördert [71, 79].

1.2.5. Tumorimmunologie

Um die Entstehung eines Tumors oder einer Leukämie zu verhindern, besitzt der menschliche Körper mehrere Schutzmechanismen, die dazu dienen sollen

mutierte DNA zu erkennen beziehungsweise diese zu reparieren, um einer unkontrollierten Proliferation der betroffenen Zellen vorzubeugen. Da trotz dieses Schutzmechanismus entartete Zellen entstehen können, wird der menschliche Organismus zusätzlich durch das Immunsystem überwacht [90]. Die sogenannte Immunüberwachung wird besonders bei immunsupprimierten oder immundefizienten Menschen deutlich, die deutlich häufiger an bestimmten Neoplasien erkranken [72, 91, 92].

1.2.5.1. Krebserkennung durch das Immunsystem

Da der Ursprung der entarteten Zellen in körpereigenen Zellen liegt, bestehen sie zum größten Teil aus körpereigenen Proteinen, gegen welche das autologe Immunsystem aufgrund zentraler und peripherer Toleranzmechanismen nur schwer oder gar nicht vorgehen kann. Durch genetische und epigenetische Veränderungen sowie genetische Instabilität in entarteten Zellen entstehen Antigene, die sich entweder quantitativ oder qualitativ von denen normaler Zellen unterscheiden. Es werden somit für die entartete Zelle charakteristische HLA-Liganden aus Antigenen präsentiert, die entweder als Tumor-assoziierte oder Tumor-spezifische Antigene bezeichnet werden. Als Tumor-assoziierte Antigene werden nicht-mutierte Quellproteine bezeichnet, aus welchen HLA-Liganden quantitativ verändert, meist vermehrt präsentiert werden. HLA-Liganden aus Tumor-spezifische Antigenen entstammen Quellproteinen eines die Entartung verursachenden Virus, aus einer Mutation im Quellprotein selbst oder aus einem Genprodukt, welches in einem offenen Leseraster der DNA codiert liegt, das bei normalen Zellen nicht zugänglich ist [93]. Tumor-spezifische Antigene können im Gegensatz zu Tumor-assoziierten Antigenen, deren Erkennung durch die „Selbst-Toleranzmechanismen“ erschwert wird, vom Immunsystem leichter als Fremdartigen erkannt werden. Durch Überschreiten von Gewebsbarrieren bzw. metastatische Absiedelungen entstehen entzündliche Reaktionen, die bei gleichzeitiger Präsentation dieser Tumorantigene eine effektive Immunreaktion auslösen können [72].

1.2.5.2. Tumorabwehr durch das Immunsystem

Die bei der Immunüberwachung als verändert erkannten Zellen werden durch verschiedene Mechanismen eliminiert. Einen großen Anteil tragen CD8⁺ zytotoxische T-Zellen in Kooperation mit T-Helferzellen und B-Zellen dazu bei, die an HLA-Klasse I gebundene Antigene auf diesen veränderten Zellen erkennen und diese durch Freisetzung oben genannter Substanzen zerstören [94]. An der Zelloberfläche veränderter Zellen gebundene Antikörper führen zudem durch Bindung an CD16 auf NK-Zellen und Makrophagen mittels ADCC zur Elimination der veränderten Zelle oder aktivieren das Komplementsystem [72, 95].

Ein bekannter Mechanismus veränderter Zellen der Immunüberwachung zu entkommen, ist, wie unten beschrieben, die verminderte Präsentation der Selbstantigene durch Herunterregulation der MHC-Klasse I-Moleküle. Dieses *missing self* wiederum veranlasst NK-Zellen diese Zellen abzutöten [96]. Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung von NK-Zellen kann durch Bindung von MICA (*major histocompatibility complex class I chain related A*), das von einigen maligne transformierten Zellen präsentiert wird, an NKG2D der NK-Zellen erfolgen [72, 97].

1.2.5.3. Immunoediting- und Immune escape-Mechanismen

Trotz intaktem Immunsystem gelingt es manchen entarteten Zellen der Immunüberwachung zu entkommen. Die Mechanismen, durch welche diese Zellen der Überwachung entkommen sind, stellen keine aktiven Prozesse dar; viel mehr unterliegen die sich schnell teilenden neoplastischen Zellen einem starken Selektionsdruck. Ausschließlich die erfolgreich die Immunüberwachung umgehenden neoplastischen Zellen führen zu einer klinisch bemerkbaren Erkrankung [72].

Die Theorie des „*Immunoediting*“ ist ein neuerer Ansatz von Dunn et al. aus dem Jahre 2004 der die Theorie der Immunüberwachung weiterentwickelte und den Einfluss der Immunreaktion gegen den Tumor für dessen Entwicklung in den Mittelpunkt stellt [98]. Demnach kommt es in einer ersten Phase zur Vernichtung der neu entstandenen Tumorzellen. In der zweiten Phase entsteht

ein Gleichgewicht zwischen neu gebildeten und eliminierten Tumorzellen. Die neoplastischen Zellen können hier also nicht vollständig eliminiert werden, das Immunsystem schränkt das Tumorwachstum jedoch ein. In der dritten Phase bleiben nur noch die entarteten Zellen übrig, die dem hohen Selektionsdruck standgehalten haben und die Eigenschaften besitzen dem Immunsystem zu entkommen. Nach dieser Entwicklung, auch „*Immune escape*“ genannt, können Tumoren nun proliferieren und klinisch manifest werden. Diese Entwicklung der Tumorentstehung erklärt damit auch die häufig beschriebene immunologische Toleranz gegenüber Tumorantigenen im klinisch manifesten Stadium der malignen Erkrankungen [72].

Dem „*Immune escape*“ von Tumoren liegen mehrere mögliche Mechanismen zugrunde. Die für die Erkennung durch zytotoxische T-Zellen bedeutende Präsentation der HLA-Liganden aus Tumorantigenen auf HLA-Klasse I kann in entarteten Zellen herunterreguliert sein. Dieser Mechanismus kann beispielsweise durch Mutationen oder Deletion im β 2-Mikroglobulin, aber auch durch verringerten Transport der beladenen HLA-Klasse I-Moleküle an die Zelloberfläche verursacht werden. Da nur komplette und beladene HLA-Klasse I-Moleküle an der Zelloberfläche stabil präsentiert werden können, kann die Veränderung, die zur verringerten Präsentation führt, bereits in der Peptidprozessierung im Proteasom oder im Peptidtransportweg beispielsweise durch TAP begründet liegen [72, 99-101]. Maligne, entartete Zellen besitzen ein instabileres Genom als normale Zellen; somit kommt es häufiger zu Mutationen oder zum Verlust spezifischer Antigene, was die Erkennung durch das Immunsystem erschwert [72]. Ein weiterer *Escape*-Mechanismus von Tumoren ist die Veränderung der Umgebung. Durch Produktion von Zytokinen wie TGF- β oder IL-10 wird die Toleranz der T-Zellen erhöht und die Entzündungsreaktion unterdrückt [72, 102-105]. Durch Produktion von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) wird die Proliferation Antigen-spezifischer T-Zellen gehemmt [106]. Außerdem wurden in einigen Tumoren vermehrt das Immunsystem unterdrückende Zellen wie regulatorische T-Zellen und sogenannte *myeloid-derived suppressor cells* (MDSC) entdeckt [72, 107-110]. Einige Tumorzellen

besitzen die Fähigkeit T-Zellen mittels Präsentation des FAS-Liganden zur Apoptose zu veranlassen und dadurch zu eliminieren [72, 111, 112].

1.2.6. Immuntherapeutische Ansätze und ihr Einsatz in der Behandlung des Multiplen Myeloms

Nachdem das MM viele Jahre als wenig immunogen galt, zeigten vielversprechenden Ergebnisse nach allogener SCT in den 1980er Jahren ein anderes Bild auf [113]. In den vergangenen Jahren erhielten, mit dem Einsatz der IMiDs beginnend über Proteasomen-Inhibitoren und monoklonale Antikörper wie z.B. Daratumumab, immer mehr Substanzen Einzug in die Therapie des MMs, die das Immunsystem beeinflussen. Seit kurzem werden zusätzlich bzw. im Anschluss an die autologe SCT immunologisch basierte Therapien in Studien erforscht, da hier ein ideales Zeitfenster für eine effektive T-Zellantwort zu liegen scheint [114].

1.2.6.1. Allogene Stammzelltransplantation und Donor-Lymphozyten-Infusion

Die allogene Stammzelltransplantation stellt die erste unspezifische Immuntherapie des Multiplen Myeloms dar. Mit der Transplantation eines komplett neuen Immunsystems eines Spenders soll eine Elimination noch residual verbliebener Myelomzellen durch den sogenannten *Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt (graft versus leukemia effect)* erzielt werden [115].

Bei Patienten, die nach allogener Stammzelltransplantation ein Rezidiv erleiden oder eine unzureichende Funktion ihres Transplantats haben, besteht zudem die Möglichkeit erneut Lymphozyten des Stammzellspenders zu infundieren (Donor-Lymphozyten-Infusion), um das neue T-Zell-Kompartiment zu stärken und die Antitumor-Immunität zu verbessern [114].

1.2.6.2. Adoptiver T-Zell-Transfer und CAR-T-Zellen

Die Transfusion von T-Lymphozyten, die *ex vivo* kultiviert und vermehrt bzw. modifiziert wurden, wird im Allgemeinen als adoptiver T-Zell-Transfer bezeichnet und bietet vielversprechende Möglichkeiten in der Behandlung von Neoplasien und Infektionserkrankungen [116]. Eine Art des adoptiven T-Zell-

Transfers beschreibt Nanoon et al. 2015, indem er das KM der Myelom-Patienten infiltrierende T-Lymphozyten *ex vivo* expandiert und mittels anti-CD3/CD28 Beads und Interleukin 2 aktiviert, um diese den Patienten am dritten Tag nach autologer SCT zu reinfundieren. Er konnte zeigen, dass selbst nach einem Jahr eine Myelom-spezifische Immunität im KM nachzuweisen war und das progressionsfreie Intervall deutlich verlängert werden konnte [114, 117].

Eine weitere Methode des adoptiven T-Zell-Transfers in der Behandlung des MMs stellt die Einbringung von T-Zellen mit chimärischem Antigenrezeptor (CAR-T-Zellen) in Myelom-Patienten dar. Diese T-Zellen besitzen einen genetisch veränderten, hochspezifischen T-Zell-Rezeptor, dessen kodierende Sequenz mittels retroviraler Vektoren eingebracht wurden. Neuere Fallberichte zeigten die Induktion einer Remission in Patienten mit Rezidiv nach allogener SCT mittels allogener CAR-T-Zellen gegen CD19, wobei der Wirkmechanismus im MM, dessen Myelomzellen vorwiegend kein CD19 an der Zelloberfläche exprimieren, noch nicht vollkommen erklärt werden konnte [118]. Derzeit bestehen klinische Studien, welche die Wirksamkeit von CAR-T-Zellen gegen die κ -Leichtkette, CD138 und das Lewis-Antigen Y prüfen. CAR-T-Zellen in der Behandlung des MMs gegen BCMA, CS1 und CD38 befinden sich momentan noch in präklinischen Studien [114, 119-121].

1.2.6.3. NK-Zell-Therapie

NK-Zellen besitzen eine natürliche Aktivität gegen MM-Zellen und spielen in der immunologischen Krankheitskontrolle eine bedeutende Rolle [114, 122-124]. Die MM-Zellen entwickeln jedoch Evasionsmechanismen, durch welche sie der NK-Zell-Kontrolle entkommen [125-128]. Durch Modulation an einem NK-Zell-Rezeptor (*inhibitory killer immunoglobulin-like receptor*) mittels monoklonalen Antikörpern konnte die *ex vivo* Zytotoxizität der NK-Zellen gegen MM-Zellen jedoch gesteigert werden [129]. *Ex vivo* expandierte autologe, allogene oder aus Nabelschnur-Blut entnommene NK-Zellen waren sicher in der Anwendung und zeigten in den meisten Fällen in Patienten MM-spezifische zytolytische Aktivität [114, 130, 131].

1.2.6.4. Immun-Checkpoint-Inhibitoren

Mit der Entwicklung der Immun-Checkpoint-Inhibitoren eröffneten sich ganz neue Horizonte für die gesamte Krebs-Immuntherapie [132]. Die Proteine CTLA-4 und PD-1 werden als Immun-Checkpoint-Rezeptoren bezeichnet. CTLA-4 wird verstärkt auf der Zelloberfläche aktivierter T-Zellen exprimiert, um durch seinen hemmenden Effekt eine überschießende Reaktion des Immunsystems zu kontrollieren. CTLA-4 bindet das von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) exprimierte CD80 und CD86, was zur Beendigung der Stimulation der T-Zelle durch die APC führt und somit frühzeitig in die Immunantwort eingreift [72]. Als erster Checkpoint-Inhibitor wurde *Ipilimumab* 2011 durch die EMA zur Behandlung des fortgeschrittenen Melanoms zugelassen. Durch antagonistische Wirkung des Antikörpers an CTLA-4 besitzt *Ipilimumab* durch Eingreifen in die frühe T-Zell Aktivierung einen anti-tumoralen Effekt [133]. Zudem kann *Ipilimumab* CD16⁺ „nicht-klassische“ Monozyten aktivieren, was in *ex vivo* Ansätzen zur ADCC-vermittelten Lyse von regulatorischen T-Zellen führte [134]. PD-1 wird ebenfalls von aktivierten T-Zellen an der Zelloberfläche exprimiert und dient der Beendigung der T-Zellantwort [72]. Dies machen sich einige Tumorzellen zunutze indem sie den entsprechenden Liganden auf ihrer Zelloberfläche exprimieren und somit der Immunantwort entkommen. Durch Inhibition dieser beiden Immun-Checkpoints kann die Immunreaktion gegen die Tumorzellen in der Folge ungehemmter ablaufen. Den klinischen Nutzen dieser neuen Ansatzpunkte zeigten bahnbrechende Erfolge in der Behandlung des fortgeschrittenen Melanoms, des fortgeschrittenen Nierenzellkarzinoms sowie des Lungenkarzinoms mit jeweils positiven Effekten auf das Gesamtüberleben der Patienten [135-137]. Obwohl die PD-1-Expression auf T-Zellen bei gleichzeitig hoher PD-L1-Expression auf autologen Plasmazellen von Myelom-Patienten als überdurchschnittlich hoch detektiert wurde, konnte der PD-1-Antikörper *Nivolumab* als Monotherapie des MM keine überzeugenden Ergebnisse liefern [114, 138-140]. In refraktären Myelom-Patienten oder im Rückfall zeigte der PD-1-Inhibitor *Pembrolizumab* in Kombination mit dem IMiD *Lenalidomid* jedoch vielversprechende Ansprechraten [114, 141]. Aktuell laufen zahlreiche weitere

Studien, die die Wirkung der Checkpoint-Inhibitoren sowohl in der Erstlinientherapie als auch im Rezidiv des MMs untersuchen.

1.2.6.5. Vakzinierung

Das Grundprinzip der Tumor-Vakzinierung liegt in der Induktion einer Tumorspezifischen T-Zell-Antwort, durch welche neoplastische Zellen nebenwirkungsarm zerstört werden können. Durch diese Vakzinierung sollen neben T-Effektor-Zellen ebenfalls Tumor-spezifische Gedächtniszellen induziert werden, um eine langanhaltende Tumorkontrolle induzieren zu können. Derzeit kommen zur Immunisierung beispielsweise DNA-Plasmide, RNA- oder Peptid-Vakzine aber auch Tumor-assoziierte Proteine und sogar ganze Tumorzellen zum Einsatz. Bedeutend für die Entwicklung einer Tumor-Vakzine ist die genaue Kenntnis der Tumor-assoziierten Antigene sowie die Applikationsform und, wenn benötigt, auch deren geeigneter Vektor. Geeignete Vektoren stellen beispielsweise Viren dar, da nach Infektion einer Zelle und der Erkennung durch das Immunsystem sowohl Viruspeptide, aber auch die eingebauten Tumor-assoziierten Antigene über APCs präsentiert werden können. Auch *ex vivo* mit Antigenen beladene und aktivierte DCs mit nachfolgender autologer Retransfusion kommen zum Einsatz, um eine langanhaltende Tumorkontrolle zu induzieren. Die Effektivität der Vakzinierung mit Tumor-assoziierten Peptiden kann durch die Kombination mit den Adjuvantien inkomplettes Freund-Adjuvans (IFA) oder Toll-like-Rezeptor-Agonisten gesteigert werden [72, 79, 142, 143].

Auch wenn der Ansatz der Tumor-Vakzinierung in der Behandlung des MMs vielversprechend erscheint, gibt es derzeit jedoch nur wenige Ansätze hierzu.

Schmitt et al. und Greiner et al. zeigten, dass eine subkutan applizierte Peptidvakzine aus RHAMM-Peptiden eine Immunantwort u.a. in Myelom-Patienten induzieren konnte und positive klinische Effekte zeigte [144, 145].

Rosenblatt et al. berichtete 2013 über die Vakzinierung mittels Hybridomen aus Myelomzellen und autologen dendritischen Zellen der MM-Patienten im Anschluss an eine autologe SCT. In der Folge konnte ein prozentualer Anstieg der CD4⁺, sowie der CD8⁺ Myelom-spezifischen T-Zellen beobachtet werden. So konnte durch die Vakzinierung bei 24% der Studienteilnehmer ein partielles

Ansprechen in ein komplettes Ansprechen bzw. nahezu komplettes Ansprechen gesteigert werden. Diese vielversprechenden Ergebnisse werden derzeit in der BMT-CTN 1401 Phase II/III- Studie weiter getestet [114, 146].

1.3. Ziele der Arbeit

Das Multiple Myelom ist derzeit die dritthäufigste hämatologische Neoplasie mit knapp 6.000 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland [20]. Durch intensive Behandlung kann bei einer großen Zahl der Erkrankten eine Remission erreicht werden. Neuere therapeutische Ansätze liefern ermutigende Ergebnisse hinsichtlich der Dauer des progressionsfreien Intervalls. Leider erleiden nahezu alle Patienten trotz intensiver Therapie einen Rückfall und das MM bleibt derzeit in den meisten Fällen unheilbar.

In den vergangenen Jahren wurden in der Behandlung des MMs, wie oben beschrieben, verschiedene, zumeist T-Zell-basierte immuntherapeutische Ansätze entwickelt, um das progressionsfreie Intervall zu verlängern und das Gesamtüberleben verbessern zu können [114]. Neben einem funktionellen T-Zell-Kompartiment ist für eine klinisch-effektive Immuntherapie das Vorhandensein und die Kenntnis immunologisch relevanter Tumor-assoziiertes Antigene, die auf den malignen Zellen der Patienten über humane Leukozytenantigene (HLA) natürlich präsentiert werden, eine unabdingbare Voraussetzung. Die wenigen derzeit bekannten Myelom-assoziierten Antigene basieren zumeist auf computer-basierten Vorhersagemodellen. Eine direkte Analyse HLA-präsentierter Antigene auf der Oberfläche primärer Myelomzellen wurde bislang noch nicht beschrieben.

Aus diesem Grund besteht die zentrale Aufgabe dieser Arbeit in der direkten Identifikation der HLA-präsentierten Peptide primärer Myelomzellen, des sogenannten HLA-Ligandoms, aus dem Knochenmark von Myelom-Patienten mit dem Ziel neue, natürlich präsentierte Myelom-assoziierte Peptide zu definieren. Um eine ausreichende HLA-Expression auf Myelomzellen für diese Analysen zu bestätigen, soll die absolute Expression der HLA-Moleküle auf Myelomzellen mittels einer Durchflusszytometrie-basierten HLA-Quantifikation bestimmt werden. Die Isolation und Identifizierung der HLA-Liganden erfolgt

dann mittels Immunpräzipitation mit nachfolgender massenspektrometrischer Peptidsequenzierung. Im Anschluss sollen die neu definierten Myelom-assoziierten Peptide hinsichtlich ihrer Immunogenität mittels T-Zellstimulationsexperimenten untersucht werden.

Einen idealen Zeitpunkt für T-Zell-basierte Immuntherapieansätze für Myelom-Patienten stellt, unter anderem aufgrund des vorteilhaften Effektor zu Zielzell-Verhältnisses, das MRD-Setting bzw. die Erhaltungstherapie dar. Hier muss mit einer Veränderung der HLA-Expression sowie besonders des HLA-Ligandoms durch die Vortherapie gerechnet werden. Da das Proteasom, welches für die Antigenprozessierung verantwortlich ist, in der Therapie des MMs häufig inhibiert wird, soll im Rahmen dieser Arbeit zudem ein *in vitro*-Modell zur Beobachtung der Veränderungen der HLA-Oberflächenexpression sowie des HLA-Ligandoms unter Behandlung mit dem Zweitgenerations-PI Carfilzomib etabliert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalienliste

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Chemikalien

Produkt	Abkürzung	Hersteller
3-[(3cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate	CHAPS	AppliChem
7-Aminoactinomycin D	7-AAD	BioLegend
7-B6-1-Biotin Antikörper		MabTech
Acetonitril		Aventor Performance Materials B.V.
Alexa Fluor 700 anti-human Ig light chain κ Antibody		BioLegend
APC Mouse Anti-Human CD34		BD Bioscience
APC-Cy7 Mouse Anti-Human CD3		BD Bioscience
Biocoll Separating Solution		Biochrom
Brilliant Violet 421 anti human CD138 (Syndecan-1) Antibody		BioLegend
Brilliant Violet 711 anti human CD19 Antibody		BioLegend
Carfilzomib	Car	Universitätsapotheker
CNBr-activated-Sepharose		GE Healthcare
cOmplete Protease inhibitor cocktail tablets		Roche Diagnostics
Dimethylsulfoxid	DMSO	Merck
Dulbecco's Modified Eagle Medium	DMEM	Gibco
ELIPSOT Platte		MerckMillipore
Erythrocyte lysis buffer	EL Buffer	Qiagen
ExtrAvidine-Alkaline Phosphatase		Sigma Life Science
Fetal Bovin Serum	FBS	Gibco, Life technologies
Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/FITC, Goat F(ab') ₂ , Code F0479		Dako
IgG Isotyp Kontrolle		BioLegend
Interleukin 2	IL-2	R&D Systems
Interleukin 4	IL-4	R&D Systems
Interleukin 7	IL-7	Promokine
Iscove's modified Dubeccos's Medium	IMDM	Gibco, Life technologies
L-Glutamin		Immunologie Tübingen
L243		Immunologie Tübingen
Mouse anti human IFN- γ (1-D1K) Antikörper		MabTech
PE anti-human CD20 Antibody		Biolegend

Produkt	Abkürzung	Hersteller
PE-Cy7 Mouse Anti-Human CD38		BD Bioscience
Penicillin/Streptomycin	Pen/Strep	SIGMA Life Science
PerCP/Cy5.5 anti-human Ig light chain λ Antibody		BioLegend
Phosphatgepufferte Salzlösung	PBS	Gibco, Life technologies
Qifikit		DAKO
Roswell Park Memorial Institute 1640	RPMI1640	Gibco, Life technologies
SIGMAFast BCIP/NBT	BCIP/NBT	Sigma Life Science
Synthetisches Peptid	SynPep	Immunologie Tübingen
Trifluoressigsäure	TFA	Fluka
Trypanblau		Merck
Tween	Tween	Roth
W6/32		Immunologie Tübingen
β -Mercaptoethanol		Fluka

2.2. Geräteliste

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
-80°C Gefrierschrank	Skadi
Biofuge fresco	Heraeus
Brutschrank	Binder
ELISPOT-Analyzer S6 Ultra V	CTL
Kühlschrank	Liebherr
LSR Fortessa	BD Bioscience
LTQ Orbitrap XL	Thermo Scientific
Lyophilisator KF-2-110	H. Saur
Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech
Neubauer Zählkammer	Marienfeld-Superior
Pipetboy	Integra
Pipetten Discovery Comfort	HTL Lab Solutions
Potter RB18	Rotwerk
Rührer MR 3001 K	Heidolph
Schüttler KS250basic	IKALabortechnik
Sonifier 250	Branson
Sorval RC 5C Plus	Du Pont
Sterilbank Technoflow	Integra Bioscience
Ultimate 3000	Nionex
Ultraschallbad Sonorex Super RK 514 BH	Bandelin
Ultrspec 3000	Pharmacia Biotech
Vortex Mixer	neoLab
Waage AC 211S	Sartorius
Wärmebad	GFL

2.3. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
24 Well-Plattel	Cellstar, Greiner Bio-One
6 Well-Platte	Cellstar, Greiner Bio-One
96 Well-Platte	Cellstar, Greiner Bio-One
Amicon ultra 10 kDa	Millipore
ELISPOT-Platte MAHABN4510	MerckMillipore
Eppendorftube 0,5 ml	Eppendorf
Eppendorftube 2 ml	Eppendorf
Falcon 15 ml	Falcon, Corning Incorporated
Falcon 50 ml	Cellstar, Greiner Bio-One
Küvetten 10 x 4 x 45 mm	Sarstedt
Low Binding Pipettenspitzen	DeckWorks, Corning Incorporated
Lowbind-Eppendorftube 0,5 ml	Eppendorf
Pipettenspitzen 1000 µl	Tipone, StarLab
Pipettenspitzen 10 µl	Tipone, StarLab
Pipettenspitzen 200 µl	Tipone, StarLab
Spitzen für Pipetboy 10 ml	Falcon, Corning Incorporated
Spitzen für Pipetboy 25 ml	Falcon, Corning Incorporated
Spitzen für Pipetboy 5 ml	Falcon, Corning Incorporated
Sterilfilter 22 µm Poren	neoLab
Zellkulturflasche groß	Cellstar, Greiner Bio-One
Zellkulturflasche klein	Cellstar, Greiner Bio-One
Zellkulturflasche mittel	Cellstar, Greiner Bio-One
ZipTip Pipettenspitzen	Merck Millipore

2.4. Probenmaterial und Zellkultur

Für die Durchführung der Experimente wurden ausschließlich die hier aufgeführten Proben verwendet.

2.4.1. Zelllinien

Die Myelomzelllinie U266 war im Labor der Abteilung Immunologie in Tübingen verfügbar. Die Myelomzelllinien MM.1S, JJN3, RPMI8226 und LP-1 wurden freundlicherweise durch die AG Salih (Medizinische Klinik II, Universitätsklinikum Tübingen, CCU Translationale Immunologie, Deutsches Konsortium für translationale Krebsforschung German Cancer Consortium (DKTK), Prof. Dr. med. Helmut Salih) bereitgestellt.

2.4.1.1. U266

Die humane Myelomzelllinie (MCL) U266 wurde 1968 aus dem peripheren Blut eines 53-jährigen Mannes mit IgE sezernierendem MM etabliert [147, 148].

2.4.1.2. MM.1S

Die humane Myelomzelllinie MM.1S wurde aus dem peripheren Blut eines 42-jährigen Mannes mit IgA- λ Leichtketten sezernierendem MM etabliert [149, 150].

2.4.1.3. JJN3

Die humane Myelomzelllinie JJN-3 ist ein Subklon der Zelllinie JJN-1, die 1987 aus dem Knochenmark einer 57-jährigen Frau, welche an einer Plasmazelleukämie (IgA1 κ) litt, etabliert wurde [151, 152].

2.4.1.4. RPMI8226

Die humane Myelomzelllinie RPMI8226 wurde 1966 aus dem peripheren Blut eines 66-jährigen Mannes mit IgG- λ Leichtketten sezernierendem MM etabliert [153, 154].

2.4.1.5. LP-1

Die humane Myelomzelllinie LP-1 wurde 1986 aus dem peripheren Blut einer 56-jährigen Frau mit einer leukämischen Transformation bei IgG MM etabliert [155, 156].

2.4.2. Primäre Proben von Patienten und gesunden Spendern

Die zur Analyse der HLA-Oberflächenexpression und HLA-Ligandomanalyse verwendeten primären Proben stammen aus Blutentnahmen und Knochenmarkpunktionen von Patienten mit MM, bereitgestellt durch die Abteilung für Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums in Tübingen. Vergleichende primäre Knochenmark-Proben von gesunden Spendern stammen von Patienten, bei welchen die Implantation einer Hüfttotalendoprothese im Kreisklinikum Calw-Nagold, Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie (Klinikverbund Südwest) durchgeführt wurde

(Kooperationsvereinbarung „Wissenschaftliche Untersuchung an Knochenmark gesunder Spender“). Allen Probanden, bei denen keine HLA-Typisierung vorlag wurden 9 ml peripheres Blut zur HLA-Typisierung entnommen, durchgeführt durch das HLA-Labor der Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Universitätsklinik Tübingen.

Vor der Probenentnahme wurden alle Patienten über die Durchführung der Entnahmen und die Ziele der Studie aufgeklärt und erteilten ihr schriftliches Einverständnis. Ein positives Ethikvotum 142/2013BO2 mit dem Titel „HLA Ligandom-Analyse des Multiplen Myeloms“ der zuständigen Ethikkommission liegt vor.

2.4.2.1. Primäre Proben von Patienten mit Multiplem Myelom

2.4.2.1.1. Isolierung von PBMCs von Patienten mit Multiplem Myelom mittels Dichtegradientenzentrifugation

Die PBMCs von Myelom-Patienten wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation in Anlehnung an das von Boyum et al. etablierte Protokoll aus Frischblutproben isoliert [157]. Hierfür wurde das Frischblut im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt. Anschließend wurden 15 ml Lymphozytenseparationsmedium mit 30 ml des Frischblut-PBS-Gemisches in einem 50 ml Falconröhrchen überschichtet und 30 min bei 2000 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Mit einer 10 ml-Pipette wurde der Lymphozytenring abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen und jeweils bei 1400 rpm mit Bremse zentrifugiert. Zur Quantifizierung viabler Zellen wurden 10 µl der Probe mit Trypanblau gefärbt und mittels Neubauerzählkammer händisch gezählt. Je 2×10^7 viable PBMCs wurden in 2 ml Einfriermedium (FBS/DMSO im Verhältnis 9:1) bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

2.4.2.1.2. Isolierung von BMNCs von Patienten mit Multiplem Myelom

Die BMNCs aus den KM-Proben von Patienten wurden mittels Erythrozytenlyse (EL) gewonnen. In Anlehnung an das Herstellerprotokoll wurde das Knochenmarkspirat im Verhältnis 1:5 mit EL-Puffer (Qiagen) gemischt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Der

Überstand wurde verworfen, das Pellet erneut mit EL-Puffer im Verhältnis 1:2 gemischt, 10 min auf Eis inkubiert und daraufhin 10 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Zellpellet 2-3 mal mit PBS gewaschen. Diese Zellen wurden entweder als Zellpellet oder in Einfriermedium bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert [158].

2.4.2.2. Primäre Proben gesunder Spender

2.4.2.2.1. Isolierung von BMNCs und Granulozyten gesunder Spender

Die Isolierung der BMNCs und der Granulozyten wurde wie oben beschrieben entweder mittels Dichtegradientenzentrifugation oder Erythrozyten-Lyse durchgeführt

2.4.3. Zellkultur

Die MCLs U266, MM.1S, JJN3, LP-1 und RPMI8226 wurden in Anlehnung an die Angaben der „Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ (DSMZ) bzw. ATCC kultiviert [148, 150, 152, 154, 156]. Primäre BMNCs bzw. Myelomzellen wurden entsprechend den MCLs kultiviert.

2.4.3.1. Kultivierung der MCLs

Die im flüssigen Stickstoff gelagerten, vital eingefrorenen Zellen wurden in Nährlösung aufgetaut und entsprechend der Angaben der DSMZ bzw. ATCC ausgesät. Als Nährlösung wurden RPMI1640, IMDM, DMEM und FBS im von der DSMZ bzw. ATCC empfohlenen Verhältnis gemischt (Tab. 7). Diesen Medien wurden je 100 IU/l Penicillin und Streptomycin sowie 2 mmol Glutamin beigemischt.

Tabelle 7: Nährlösung der einzelnen MCLs nach der Empfehlung der DSMZ bzw. der ATCC [148, 150, 152, 154, 156]

Myelomzelllinie	Nährlösung
U266	90% RPMI1640; 10% FCS
MM.1S	90% RPMI1640; 10% FCS
JJN3	40% DMEM; 40% IMDM; 20% FCS
RPMI8266	90% RPMI1640; 10% FCS
LP-1	80% IMDM; 20% FCS

Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und je nach Wachstum entsprechend der Angaben der DSMZ bzw. ATCC geteilt und weiter inkubiert [148, 150, 152, 154, 156]. Anschließend wurden die Zellen bei 1400 rpm abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und entweder direkt weiterverarbeitet oder in Einfriermedium bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

2.4.3.2. Kultivierung primärer Myelomzellen

Die bei -80°C gelagerten primären Myelomzellen wurden in Nährlösung aufgetaut. Als Nährlösung diente RPMI1640, IMDM und FBS im Verhältnis 4:4:2. Diesem Medium wurden je 100 IU/l Penicillin und Streptomycin sowie 2 mmol Glutamin beigemischt. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ für mindestens 24 h bis zur weiteren Verarbeitung inkubiert.

2.5. Behandlung von Myelomzelllinien und primären Myelomzellen mit Carfilzomib

Um den Einfluss des Proteasomen-Inhibitors Carfilzomib auf die HLA-Oberflächenexpression und -präsentation zu untersuchen, wurden MCLs und primäre Myelomzellen einer *in vitro*-Behandlung mit Carfilzomib unterzogen.

2.5.1. Behandlungsschema

Kultivierte Zellen aus MCLs bzw. primären BMNC mit Myelomzellen wurden für eine Stunde in einer 100 nM Carfilzomiblösung bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert [159]. Zum Vergleich wurden Zellen aus der jeweiligen Kultur mit dem entsprechenden Volumen der Trägerlösung von Carfilzomib, 5% Glukoselösung, in gleicher Weise inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit PBS gewaschen, um die physiologische Elimination zu simulieren, bei 1400 rpm zentrifugiert und in neuem Kulturmedium aufgenommen. Danach wurden die Zellen entweder für 24 oder 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ rekultiviert und im Anschluss als Zellpellet bzw. in Einfriermedium bei -80°C gelagert bis die Analyse der HLA-Oberflächenexpression bzw. des HLA-Ligandoms durchgeführt wurde (Abb.5).

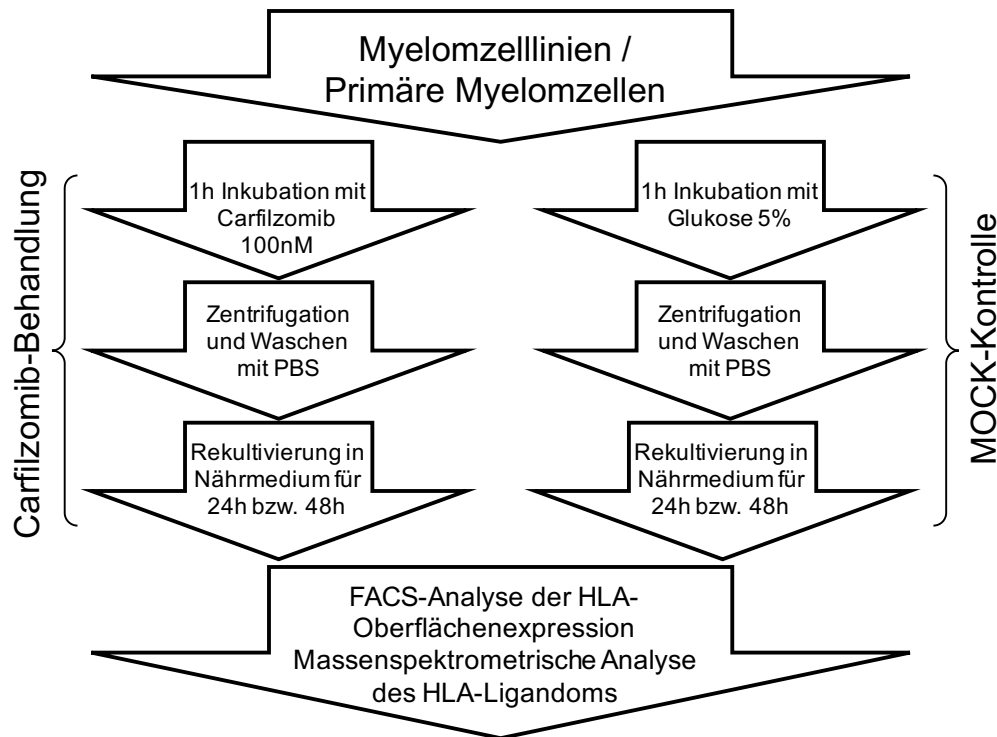


Abbildung 5: Behandlungsschema von Myelomzellen aus Myelomzelllinien und primären BMNCs mit Carfilzomib. MOCK, Kontrollfraktion; FACS, Durchflusszytometrie.

2.6. Quantifizierung der HLA-Klasse I- und DR-Moleküle auf der Zelloberfläche verschiedener hämatologischer Zellpopulationen

2.6.1. Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie können Zellen, die einzeln durch einen Laserstrahl wandern, gezählt werden und durch die Streuung des Laserstrahls, die durch sensible Photodetektoren gemessen wird, hinsichtlich ihrer Größe und Granularität beurteilt werden. Durch zuvor aufgebrachte fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen spezifische Oberflächenmarker können diejenigen Zellen sichtbar gemacht werden, die das Oberflächenmerkmal tragen. Dies gelingt durch an die Antikörper gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe, die durch den Laserstrahl zur Emission von Licht angeregt werden. Dieses emittierte Licht wird wiederum von sensiblen Photodetektoren aufgefangen. Aufgrund des so entstandenen zweidimensionalen Signals lassen sich Zellpopulationen von Schritt zu Schritt immer genauer unterteilen [160].

2.6.2. Verwendete Antikörper

Zur Unterscheidung zwischen toten und vitalen Zellen wurde 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) verwendet. Die zur Immunphänotypisierung der einzelnen Zellpopulationen verwendeten Fluorochrome sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Fluorochrome der zur Immunphänotypisierung primärer Knochenmarkszellen verwendeten Antikörper

Antigen	Fluorochrom
CD138	BV421
CD19	BV711
CD20	PE
CD38	PeCy7
CD34	APC
CD3	APCCy7
kappa Leichtkette	AF700
lambda Leichtkette	PerCP/Cy5.5

Zur Quantifizierung der HLA-Klasse I- bzw. HLA-DR-Oberflächenantigene wurden die Antikörper W6/32 bzw. L243 als primärer und folgend als sekundärer Antikörper der polyklonale F(ab')₂-Antikörper, *Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/FITC*, verwendet.

2.6.3. Gating-Strategie zur Identifikation bzw. Immunphänotypisierung der einzelnen Zellpopulationen

Die BMNCs wurden im ersten Schritt bezüglich ihrer Größe und Granularität beurteilt (Abb.6A). In den folgenden Schritten wurden weiter nur einzelne bzw. lebende Zellen betrachtet (Abb.6B+C). Daraufhin wurde die CD3⁺ T-Zell-Population definiert und ohne diese weitergearbeitet (Abb.6D). Im nächsten Schritt wurde die CD19⁺CD20⁺ B-Zell-Fraktion definiert und unter Ausschluss dieser fortgefahren (Abb.6E). Aus den verbliebenen Zellen wurden sowohl die CD34⁺CD38⁻ hämatopoetischen Progenitorzellen als auch die CD38⁺CD138⁺ Plasmazellfraktion separat dargestellt (Abb.6F+G). Um eine möglichst reine Myelomzellpopulation untersuchen zu können wurden aus der Plasmazellfraktion je nach Leichtkettenrestriktion des diagnostizierten MMs diejenigen Zellen gesondert betrachtet, die für die κ- bzw. λ-Leichtkette positiv waren (Abb.6H).

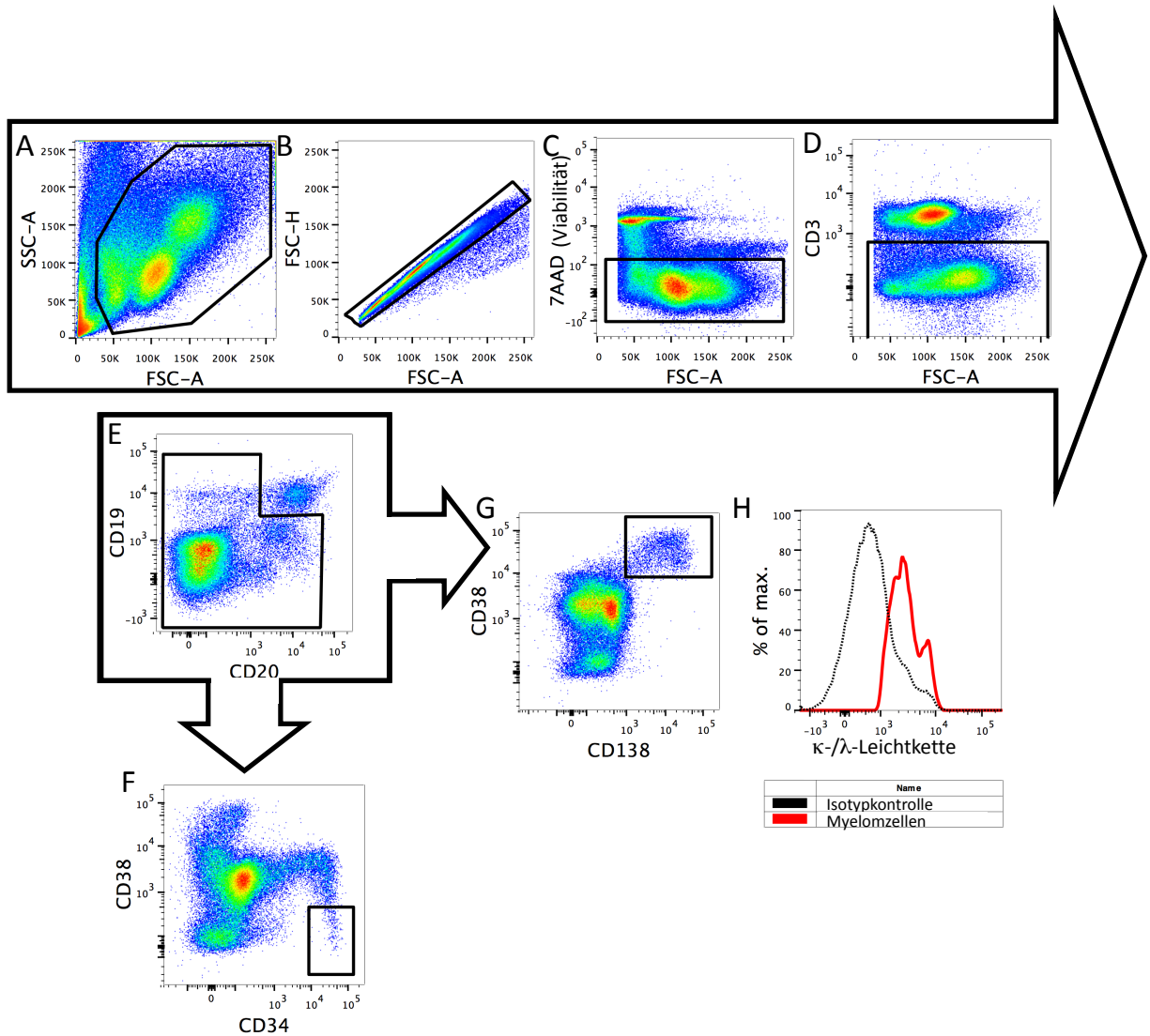


Abbildung 6: Gating-Strategie zur Immunphänotypisierung verschiedener Zellpopulationen. SSC, Side Scatter; FSC, Forward Scatter; CD, Cluster of differentiation.

2.6.4. Bead-basierte Quantifizierung von HLA-Molekülen an der Zelloberfläche

Die HLA-Oberflächenexpression der einzelnen Zellpopulationen wurde mittels QIFIKIT[®] gemessen. Dieses wurde entsprechend den Herstellerangaben verwendet und alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt [161]. Die BMNCs bzw. Myelomzelllinien wurden zunächst mit dem panspezifischen HLA-Klasse I-Antikörper W6/32, dem HLA-DR-spezifischen monoklonalen Antikörper L243 und der Immunglobulin G Isotyp-Kontrolle in Sättigungskonzentration

inkubiert [162]. Anschließend wurden sowohl die Zellen als auch die im Kit enthaltenen Kügelchen (*Beads*) mit dem sekundären polyklonalen F(ab')₂-Antikörper, ebenfalls in Sättigungskonzentration, inkubiert. Durch die fest definierte Anzahl an Bindungsstellen auf den künstlichen *Beads* und die Fluoreszenzintensität im FITC-Kanal konnte so eine Kalibrierkurve für die HLA-Quantifizierung konstruiert werden. Mittels nachfolgender direkter Oberflächenmarkierung der BMNCs mit dem oben genannten Antikörper-Panel konnten die einzelnen Zellpopulationen immunphänotypisch unterschieden werden; die HLA-Oberflächenexpression der einzelnen Zellpopulationen wurde durch die Fluoreszenzintensität im FITC-Kanal im Vergleich zur Kalibrierkurve ermittelt [163, 164].

2.7. Identifikation HLA-Klasse I- und DR-gebundener Peptide auf der Zelloberfläche von Myelomzellen und Definition von „Myelom-assoziierten Antigenen“

Um eine effektive und zugleich nebenwirkungsarme T-Zell-basierte Immuntherapie entwickeln zu können, ist die Kenntnis der exklusiv auf Tumorzellen befindlichen Zielstrukturen von großer Bedeutung. Eine mögliche Zielstruktur auf Myelomzellen stellen HLA-gebundene Peptide, sogenannte HLA-Liganden dar. Um diese Zielstrukturen zu identifizieren wurde eine klassische HLA-Ligandenisolierung von Myelomzelllinien, BMNCs von Myelom-Patienten und gesunden Spendern sowie an Granulozyten gesunder Spender durchgeführt, welche üblicherweise aus dem Aufschluss der Zellen, der nachfolgenden Immunpräzipitation durch Affinitätschromatographie mittels HLA-Klasse I- und -DR-spezifischer Antikörper und letztlich der Lösung der Peptide durch Elution und Ultrafiltration besteht [81, 162, 165]. Anschließend wurden die Aminosäuresequenzen der einzelnen Peptide und deren Quellproteine mittels Massenspektrometrie und Datenbankabgleich identifiziert. Durch den Abgleich der Peptide von Myelomzellen mit den Peptiden von BMNCs sowie Granulozyten gesunder Spender und einer bereits vorhandenen Datenbank aus Peptiden von PBMCs gesunder Spender konnten daraufhin exklusiv in Myelom-Patienten präsentierte Peptide identifiziert werden.

2.7.1. HLA-Ligandomanalyse

2.7.1.1. Aufschluss der Zellen

Zum Aufschluss der Zellen wurde zunächst ein doppelt konzentrierter Lysepuffer bestehend aus 33ml PBS, einer Tablette Proteaseinhibitor und 400 mg CHAPS, hergestellt. Die Lyse der Zellen erfolgte bei 4°C im Kühlraum. Das bei -80°C gelagerten Zellpellet wurde mit 1ml doppelt konzentriertem Lysepuffer aufgetaut und mit 1 ml einfach konzentriertem Lysepuffer mittels *Potter* schonend aufgeschlossen. Nach erneuter Zugabe von 1 ml einfach konzentriertem Lysepuffer wurde die Probe für eine Stunde langsam gerührt. Zum weiteren Aufschluss der Zellmembran wurde die Lösung für 2 Minuten sonifiziert (50%, Stufe 5), um dann erneut unter Zugabe von 1 ml einfach konzentriertem Lysepuffer über eine Stunde langsam gerührt zu werden. Im Anschluss wurde das Zelllysate zur Entfernung des Zelldetritus in 15 ml Falconröhrchen bei 4°C und 4000 rpm für 99 min zentrifugiert. Zur weiteren Aufreinigung wurde der Überstand sterilfiltriert (Porengröße 22 µm) [79, 165].

2.7.1.2. Immunaffinitätschromatographie mittels BrCN-Säulen

Im ersten Schritt wurden die BrCN-Säulen zur Affinitätschromatographie bei 4°C hergestellt. Zur Isolierung der HLA-Klasse I- bzw. HLA-DR-Moleküle mit gebundenem Peptid aus dem wie oben beschrieben hergestellten Lysat wurde entweder der panspezifische anti-human IgG_{2A} HLA-Klasse I-Antikörper W6/32 oder der HLA-DR-spezifische Antikörper L243 verwendet [162]. Für die Affinitätschromatographie wurden pro Milligramm verwendetem Antikörper aktiviert. Das Sepharose/HCl-Gemisch wurde im Folgenden bei 4°C und 400 rpm ohne Bremse zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurde pro 40 mg Sepharose 1mg Antikörper und Kopplungspuffer hinzugegeben (t_0), für 120 Minuten unter Rotation inkubiert und erneut abzentrifugiert (4°C, 400 rpm, 4 min, ohne Bremse, t_{120}). Die Kopplungseffizienz wurde durch photometrische Konzentrationsbestimmung bei 280nm zum Zeitpunkt t_0 und t_{120} aus dem Überstand erhoben und musste bei einer erfolgreichen Kopplung bei mindestens 95% liegen.

Durch Inkubation mit 0,2 M Glycin für 60 min unter Rotation wurden freie Bindungsstellen der Sepharose blockiert. Die Sepharose wurde nun erneut abzentrifugiert (4°C, 400 rpm, 4 min, ohne Bremse) und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die Sepharose mit gekoppeltem Antikörper in Chromatographiesäulen überführt, sodass pro Milliliter des ursprünglichen Zellpellets ein Milligramm gekoppelter Antikörper je Säule vorhanden war. Die Chromatographiesäulen wurden nun für 30 Minuten mit einfach konzentriertem Aufschlusspuffer unter linearem Fluss mit 2 ml/min äquilibriert.

Anschließend wurde das System vom Aufschlusspuffer befreit ohne dass das Sepharosebett trocken lief. Das System wurde dabei mit dem Zelllysat befüllt und bei einer Laufrate von 1-2 ml/min für mindestens 12 Stunden zyklisiert. Daraufhin wurde der Zyklus wieder linearisiert, das Lysat gesammelt und bei -20°C für mögliche weitere Experimente asserviert. Das Sepharosebett wurde zuerst für 30 Minuten mit einer Laufrate von 1-2 ml/min mit PBS, dann für 60 Minuten mit einer Laufrate von 1-2 ml/min mit ddH₂O gewaschen und schließlich trocken laufen gelassen.

Im folgenden Schritt wurden die Antikörper-HLA-Peptid-Komplexe durch Säurebehandlung eluiert. Hierzu wurden die trockenen Säulen im ersten Schritt mit 40 µl TFA 0,2% und 1 µl TFA 10% je 40 mg der Sepharose auf dem Schüttler für 20 Minuten inkubiert. Zur Vermeidung einer Kontamination mit Polyethylenglycol wurden Hamiltonspritzen verwendet und die später verwendeten Zentrifugen-Filtereinheiten (Amicon) mit TFA 0,2% gewaschen. Das Eluat wurde nach dem ersten Elutionsschritt in ein 15 ml-Falconröhrchen gepumpt. Im Folgenden wurden sieben weitere Elutionsschritte mit 40 µl TFA 0,2% je 40 mg der Sepharose und einer Inkubationszeit von je mindestens 10 Minuten auf dem Rüttler durchgeführt.

Das gesamte Eluat wurde dann bei -80°C gefroren und gefriergetrocknet (Lyophilisation). Die Lyophilisation führt durch Sublimation zu einem direkten Verdampfen des gefrorenen Lösungsmittels ohne in eine flüssige Phase übergegangen zu sein, während die enthaltenen Peptide zurückbleiben. Das Lyophilisat wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert [79].

Im folgenden Schritt wurde das Lyophilisat in 400 µl Lösungsmittel aus TFA 0,2% und Acetonitril 50% aufgenommen, mittels Ultraschallbad und Vortexer gelöst und bei 4000 rpm 7 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand wiederum in die vorbereitete Zentrifugen-Filtereinheit gefüllt. Die zur Ultrafiltration dieser Lösung verwendete Zentrifugen-Filtereinheit ließ lediglich Molekulargewichte bis 10 kDa passieren. Diese Lösung wurde bei 4°C und 13000 rpm für 5-10 Minuten zentrifugiert bis das gesamte Volumen ultrafiltriert war. Mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 0,8-1,1 kDa bei HLA-Klasse I-gebundenen Peptiden und 1-3 kDa bei HLA-DR-gebundenen Peptiden können lediglich diese Peptide den Ultrafilter passieren, während die HLA-Klasse-1- α -Kette mit 45 kDa sowie das β_2 -Mikrogolulin (16 kDa), die HLA-DR α - und β -Kette (34 kDa) und IgG-Antikörper (H-Kette 50 kDa; L-Kette 25 kDa) den Filter nicht passieren konnten [160, 166, 167]. Das Ultrafiltrat wurde daraufhin mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge auf 30 µl eingeeengt. Anschließend wurde das eingeeengte Ultrafiltrat mittels ZipTip-Pipettenspitzen entsprechend der Herstellerangaben entsalzt, konzentriert und in Autosampler-Vials überführt, um nach erneuter Einengung der weiteren massenspektrometrischen Analyse zugeführt werden zu können.

2.7.1.3. Massenspektrometrische Analyse der isolierten Peptide mittels LC-MS/MS

Der HLA-Ligandenextrakt wurde anschließend mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-gekoppelter Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) auf einem LTQ Orbitrap XL-Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) analysiert. Dazu wurden die Peptide zuerst mittels *online* gekoppelter Flüssigchromatographie (RSLCnano) mit dem Ultimate 3000 RSLC Nano UHPLC-System (Dionex) aufgetrennt. Diese Auftrennung gelingt durch die unterschiedliche starke Wechselwirkung der zu messenden Peptide mit der Trennsäule und der verschiedenen Löslichkeit der Peptide in Acetonitril, wodurch Peptid-spezifische Retentionszeiten entstehen. Hierfür wurde eine Flüssigchromatographie-Säule 50 µm x 25 cm *PepMap rapid separation* (Thermo Fisher Scientific) und ein Acetonitril-Gradient von 2,4% bis 32% über

einen Zeitraum von 90 Minuten verwendet. Die freigesetzten Peptide wurden anschließend massenspektrometrisch identifiziert.

Mittels Massenspektrometrie können Ionen in der Gasphase, welche hier durch kollisionsinduzierte Dissoziation erzeugt wurden, hinsichtlich ihrer Molekülmasse beurteilt werden. In einem Massenanalysator werden Ionen bezüglich ihres Masse/Ladungsquotienten (m/z) qualitativ und der relativen Menge semiquantitativ analysiert [79]. Durch die Nacheinanderschaltung zweier Analysatoren können ausgewählte Massen abgetrennt, fragmentiert und daraufhin sehr selektiv identifiziert werden [168]. Die dazu verwendete Methode ist eine datenabhängige Aufnahme (*data dependent acquisition*, DDA), welche die fünf abundantesten Vorläuferionen des Übersichtsscans zur Fragmentierung auswählt. Die Auswertung der Massenspektrometriedaten erfolgte mit Hilfe der Software ProteomeDiscoverer (ThermoFisher), welche die Ergebnisse der Mascot-Suchmaschine (Matrix Science, London, UK) mit der Swiss-Prot Datenbank (20.279 bewertete Proteinsequenzen; Stand Sept. 2013) integriert. Die Rate falscher Zuordnungen (*False Discovery Rate* (FDR)) wurde mittels *Percolator*-Algorithmus abgeschätzt und bei 5% festgeschrieben [169]. Die Protein-Interferenz wurde ausgeschaltet, um die Annotation der Peptide in mehreren Proteinen zu ermöglichen. Die Peptidlängenbeschränkung wurde für HLA-Klasse I Peptide auf 8-12 Aminosäuren und für HLA-Klasse II Peptide auf 12-25 Aminosäuren festgesetzt. Mittels SYFPEITHI und NetMHC 3.4, welche in einer hausinternen und erweiterten Datenbank vereint sind, wurde die HLA-Annotation der identifizierten Peptide durchgeführt [170]. Alle Proben wurden jeweils in fünf technischen Replikaten untersucht [164, 171].

2.7.2. Label-free Quantifizierung zur Analyse von HLA-Ligandomveränderungen unter Carfilzomib-Behandlung

Um die Veränderungen des HLA-Ligandoms des MMs unter der Behandlung mit Carfilzomib nicht nur qualitativ sondern auch quantitativ zu erfassen, wurde die Abundanz der HLA-präsentierten Peptide im Rahmen dieser Arbeit mittels markierungsfreier massenspektrometrischer Quantifizierung (*label-free quantitation*, LFQ) bestimmt. Hierzu wurden die HLA-Ligandenextrakte aus dem

oben beschriebenen MCL-Modell nach Carfilzomib-Behandlung *in vitro* verwendet. Zu den Zeitpunkten vor der Behandlung sowie 24 bzw. 48 Stunden nach Behandlung der Myelomzellen mit Carfilzomib wurde eine HLA-Ligandenanalyse der jeweiligen biologischen Triplikate durchgeführt. Entsprechend wurde mit den MOCK-behandelten Proben verfahren. Diese insgesamt 15 verschiedenen Proben ermöglichten eine quantitative, longitudinale Analyse des HLA-Ligandomes. Für die LFQ-Analyse wurden die einzelnen Peptidmengen einer MCL zu verschiedenen Behandlungszeitpunkten und biologischen Replikaten normalisiert und in fünf technischen Replikaten massenspektrometrisch analysiert.

2.7.3. Definition der vom HLA-Ligandom abgeleiteten „Myelom-assoziierten Antigene“

Die massenspektrometrisch identifizierten Peptide wurden nur bei passendem HLA-Motiv für den HLA-Allotyp der Proben zur weiteren Analyse verwendet.

In dieser Arbeit wurde die in der Abteilung Immunologie etablierte Strategie zur Identifizierung Tumor-assoziierten Antigene primär basierend auf der differenziellen Analyse der HLA-präsentierten Peptide und ihrer Quellproteine genutzt. Grundvoraussetzung hierfür ist neben der tiefgreifenden Analyse der HLA-Ligandome der interessierenden Tumorentität die parallele Untersuchung der HLA-Ligandome korrespondierender und nicht-korrespondierender Normalgewebe, welche als Negativkontrollen dienen [163, 171]. Als Myelom-assoziierte Antigene wurden nur diejenigen Proteine definiert, aus denen Peptide exklusiv auf mindestens 26,7% der Myelomproben detektiert wurden, was einer FDR von 4,1% entsprichtⁱ [163, 164, 171]. Für die FDR-Berechnung wurden virtuelle Ligandome *in silico* definiert. Hierfür wurden aus der Gesamtheit aller tatsächlich identifizierter Peptide der Myelom- und gesunden Vergleichsproben zufällige Ligandome erstellt. Die Generierung dieser virtuellen Ligandome wurde 1000 Mal wiederholt. Durch den Vergleich dieser virtuellen Ligandome und den daraus definierten falsch positiv Myelom-assoziierten Peptiden mit den tatsächlich identifizierten Myelom-assoziierten Peptiden, konnte die FDR für jede Präsentationsfrequenz in den Myelomproben berechnet werden [171].

2.8. Immunogenitätsanalysen der neu definierten vom HLA-Ligandom abgeleiteten „Myelom-assoziierten Antigene“

Um die Immunogenität der HLA-Liganden (aus neu definierten Myelom-assoziierten Antigenen) in Myelom-Patienten zu untersuchen wurde der ursprünglich durch Czerkinsky et al. etablierte, hochsensitive *enzyme linked immospot assay* (ELISPOT-assay) verwendet. Mit dieser Methode kann, durch zuvor stimulierte T-Zellen, nach Antigenkontakt sezerniertes IFN- γ , welches an einer Membran immobilisiert wird, nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden Peptid-stimulierte PBMCs von Myelom-Patienten und gesunden Blutspendern verwendet und ähnlich wie zuvor durch Widenmeyer et al. und Berlin et al. beschrieben im IFN- γ -ELISPOT untersucht. Die Peptidpräsentation erfolgte hierbei durch in den Gesamt-PBMCs enthaltenen Antigen-präsentierende Zellen [163, 164, 172, 173].

2.8.1. Stimulation von PBMCs mit den neu definierten Myelom-assoziierten Peptiden

Die PBMCs von Patienten wurden in T-Zell-Medium für insgesamt 12 Tage kultiviert. Als T-Zell-Medium diente IMDM mit humanem Serum im Verhältnis 10:1; je 100 IU/l Penicillin und Streptomycin sowie β -Mercaptoethanol wurden hinzugefügt. Je $5-6 \cdot 10^6$ Zellen wurden an Tag 0 und 1 mit Interleukin 4 und 7 und an den Tagen 3, 5, 7 und 9 mit Interleukin 2 stimuliert. An Tag 1 wurden die Zellen zusätzlich mit den zu untersuchenden Peptiden, synthetisch hergestellt durch die Abteilung Immunologie, in einer Konzentration von jeweils 1 μ g Peptid/ml stimuliert.

2.8.2. IFN- γ -ELISPOT-Assay

Zur Vorbereitung wurde eine 96-Well-Nitrozellulose-Platte mit Anti-IFN- γ -Antikörpern (1-D1K, MabTech) für 24 Stunden beschichtet und anschließend mit 10% humanem Serum geblockt. Die Analysen der zu testenden Peptide sowie die Positiv- und Negativkontrollen wurden in Duplikaten durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde eine Mischung aus häufig erkannten EBV-Epitopen (BRLF₁₀₉₋₁₁₇ YVLDHLIVV [A*02], EBNA3₄₇₁₋₄₇₉ RLRAEAQVK [A*03], EBNA3₂₄₇₋₂₅₅ RPPIFIRRL [B*07], BZLF1₁₉₀₋₁₉₇ RAKFKQLL [B*08], EBNA6₁₆₂₋₁₇₁

AEGGVGWRHW [B*44]) sowie die Peptide EBNA4₃₉₉₋₄₀₈ AVFDRKSDAK [A*11], BZLF1₁₂₂₋₁₃₀ VQTAAAVVF [B*15], EBVG₈₁₋₈₉ IEDPPFNSL [B*40] und das CMV-Epitop IE1₃₂₋₄₁ ATTFLQTMLR [A*68] verwendet. Als Negativkontrolle dienten die von gesunden HLA-Ligandomen abgeleiteten Peptide FAR2₆₃₋₇₁ KLFKVKVEV [A*02], LDLRAP1₁₂₃₋₁₃₁ KMHDKVFAY [A*03], TRAF7₃₇₈₋₃₈₇ GSYDPQQIFK [A*11], ERN1₄₁₂₋₄₂₀ ENAPTTVSR [A*68], CD36₃₉₄₋₄₀₂ KPSEKIQVL [B*07], EMC9₇₂₋₈₁ AQAGLVVAGY [B*15] und HDGF₁₇₇₋₁₈₅ GEEKEAATL [B*40].

Die 12 Tage vorstimulierten PBMCs wurden mit dem jeweils zu testenden Peptid (1 µg/ml) auf der Platte für 24 Stunden bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die PBMCs abgewaschen und die Platte mit dem sekundären Antikörper 7-B6-1-Biotin für 2 Stunden im Dunkeln inkubiert. In der Folge wurden die Platten erneut gewaschen und mit ExtrAvidin-Alkalin Phosphatase für 1 Stunde inkubiert, um daraufhin erneut gewaschen und mit BCIP/NBT für 7 Minuten im Dunkeln inkubiert zu werden. Um den Färbeprozess zu stoppen wurden die Platten anschließend mit destilliertem Wasser gewaschen und über Nacht getrocknet. Die Spots wurden mittels des ImmunoSpot S5 Analyzer maschinell ausgewertet. Entsprechend der *cancer immunoguiding program guidelines (CIP)* wurde die T-Zell-Antwort auf das jeweilige Peptid als positiv gewertet, wenn mehr als 10 Spots pro Well detektiert wurden und der Mittelwert der Spots in den Peptidwells mindestens dreifach über dem Mittelwert der Spots in den Negativkontrollen lag [163, 164, 174].

2.9. Verwendete Software

Zur Auswertung der Ergebnisse, zur Erstellung der Graphiken und zur statistischen Berechnung wurde folgende Software verwendet.

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Software

Software	Hersteller
FlowJo 7.2	FlowJo
Graphpad Prism 6	GraphPad Software
LTQ Tune Plus Version 2.5.5	Thermo
Microsoft PowerPoint 2011	Microsoft
Mircosoft Excel 2011	Microsoft,
ProteomeDiscoverer 1.4	Thermo Fisher
R-Skript	open source

3. Ergebnisse

3.1. Analyse der HLA-Expression und des HLA-Ligandoms von Myelomzellen

Tabelle 10 zeigt die Patientencharakteristika aller Myelom-Patienten, deren Proben für die HLA-Quantifizierung und die HLA-Ligandomanalyse verwendet wurden.

Tabelle 10: Patientencharakteristika. Zytogenetisches Risiko analog der IMWG Risikostratifizierung [21]; UPN, *uniform patient number*; nb, nicht bestimmbar; Q, HLA-Quantifikation; L, HLA-Ligandomanalyse; modifiziert nach Walz et al. [164]

UPN	Geschlecht	Alter	ISS Stadium	Durie & Salmon	Leichtketten-Restriktion	Zytogenetisches Risiko	Vortherapie	Experiment
1	m	62	3	3B	lambda	hoch	ja	Q; L
2	w	55	2	1A	keine	standard	nein	L
3	w	69	2	3B	kappa	standard	nein	L
4	m	72	3	3A	kappa	standard	nein	L
5	m	54	2	3A	kappa	niedrig	nein	L
6	m	60	3	3B	lambda	hoch	nein	L
7	w	39	3	3A	kappa	standard	nein	L
8	w	73	3	3B	lambda	nb	nein	L
9	m	52	3	1B	kappa	nb	nein	L
10	m	47	1	3A	kappa	standard	nein	L
11	w	72	2	3A	kappa	hoch	ja	Q
12	w	68	2	3A	kappa	standard	nein	Q
13	m	74	1	3A	kappa	standard	nein	Q
14	w	50	1	3A	lambda	standard	nein	Q
15	m	62	1	3A	kappa	standard	ja	Q
16	m	74	3	2B	kappa	standard	ja	Q
17	m	68	1	3A	kappa	nb	ja	Q
18	m	73	1	1A	kappa	standard	ja	Q
19	w	70	1	1A	kappa	standard	nein	Q
20	w	53	3	3A	kappa	standard	nein	Q
21	m	59	2	3A	lambda	standard	ja	Q
22	m	57	1	1A	kappa	standard	ja	Q
23	w	65	3	1A	lambda	standard	ja	Q
24	m	76	2	3A	lambda	standard	ja	Q
25	w	74	2	2A	kappa	standard	ja	Q
26	w	67	1	3A	lambda	standard	ja	Q
27	m	50	1	1A	lambda	nb	ja	Q
28	m	70	3	3A	lambda	nb	nein	Q
29	m	75	1	3A	kappa	standard	ja	Q

3.1.1. HLA-Oberflächenexpression auf Myelomzellen und Zellen des hämatopoetischen Systems

Im Folgenden werden die Ergebnisse der oben beschriebenen Durchflusszytometrie-basierten, absoluten HLA-Quantifikation von primären Myelomzellen und Zellen des hämatopoetischen Systems aus dem Knochenmark, sowohl von Patienten mit Multiplem Myelom (n=20) als auch von gesunden Spendern (n=15), dargestellt. Außerdem werden die Ergebnisse der HLA-Oberflächenexpressionsanalyse von 5 humanen Myelomzelllinien gezeigt.

Tabelle 11: Oberflächenmarker von Myelomzellen und von Zellen des hämatopoetischen Systems, die zur durchflusszytometrischen Analysen in dieser Arbeit genutzt wurden.

Zellpopulation	Oberflächenmarker
Myelomzellen	CD38 ⁺ ; CD138 ⁺ ; κ ⁺ /λ ⁺
Plasmazellen	CD38 ⁺ ; CD138 ⁺
Hämatopoetische Progenitorzellen	CD34 ⁺ ; CD38 ⁻
B-Lymphozyten	CD19 ⁺ ; CD20 ⁺
T-Lymphozyten	CD3 ⁺

3.1.1.1. HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression von Myelomzellen und autologen Zellen des hämatopoetischen Systems aus dem Knochenmark von Myelom-Patienten

Die HLA-Klasse I-Oberflächenexpressionsanalyse von CD38⁺CD138⁺ κ⁺/λ⁺ Myelomzellen zeigte eine heterogene Expression von 119.500 bis 849.500 HLA-Klasse I-Molekülen pro Zelle mit einer mittleren Molekülzahl von 416.000 ± 54.000 pro Zelle (Abb.7A).

Die HLA-Klasse I-Oberflächenexpression der Myelomzellen lag dabei signifikant höher als diejenige auf autologen CD34⁺CD38⁻, hämatopoetischen Progenitorzellen mit einer mittleren HLA-Klasse I-Expression von 204.000 ± 32.500 je Zelle, CD19⁺CD20⁺ B-Lymphozyten (198.500 ± 20.500) sowie auf CD3⁺ T-Lymphozyten (167.500 ± 15.500; alle p < 0.05; ungepaarter t-Test; Abb.7A).

Die Oberflächenexpression für HLA-DR lag auf allen untersuchten Zellpopulationen deutlich unter der HLA-Klasse I-Oberflächenexpression. So konnten mittlere HLA-DR-Molekülzahlen je Zelle von 27.000 ± 7.000 auf $CD38^+CD138^+$ Myelomzellen, 35.000 ± 5.000 auf $CD34^+CD38^-$ hämatopoetischen Progenitorzellen, 104.000 ± 7.000 $CD19^+CD20^+$ auf B-Lymphozyten und 18.000 ± 13.000 auf $CD3^+$ T-Lymphozyten detektiert werden (Abb.7B).

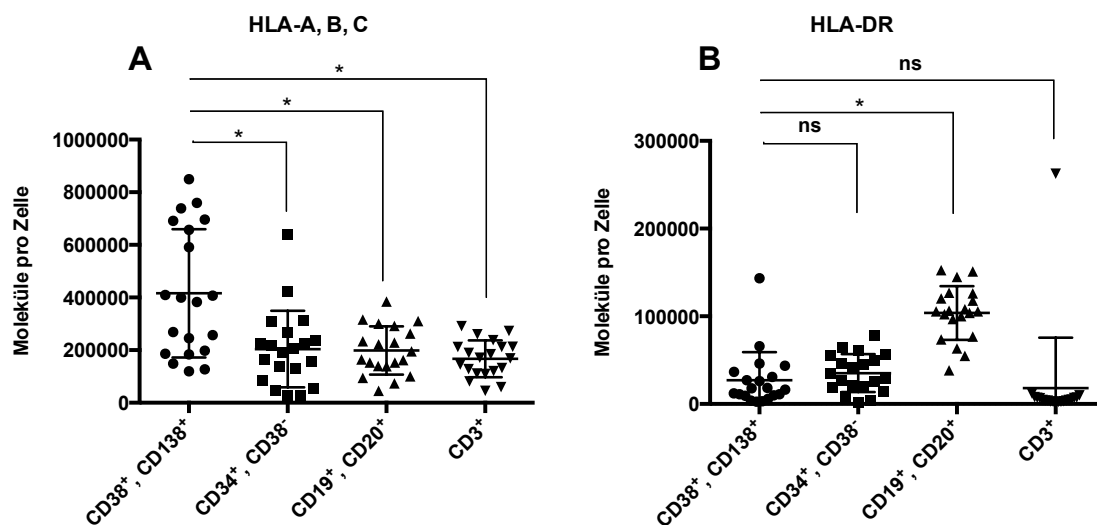


Abbildung 7: HLA Klasse I- [A] und DR- [B] Oberflächenexpression auf $CD38^+CD138^+$ Myelomzellen sowie auf autologen $CD34^+CD38^-$ hämatopoetischen Progenitorzellen, $CD19^+CD20^+$ B-Lymphozyten und $CD3^+$ T-Lymphozyten aus dem Knochenmark von Myelom-Patienten (n=20). ns, nicht signifikant; *, $p < 0.05$; modifiziert nach Walz et al. [164].

Weder autologe hämatopoetische Progenitorzellen noch T-Lymphozyten unterschieden sich signifikant hinsichtlich ihrer HLA-DR-Oberflächenexpression verglichen mit Myelomzellen; einzig B-Lymphozyten zeigten signifikant erhöhte HLA-DR-Molekülzahlen gegenüber autologen Myelomzellen (Abb.7B; $p < 0.05$) [164].

3.1.1.2. HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression von Zellen des hämatopoetischen Systems aus dem Knochenmark gesunder Spender

Die Untersuchung der HLA-Klasse I-Oberflächenexpression auf Zellen des hämatopoetischen Systems aus dem Knochenmark gesunder Spender erbrachte eine mittlere HLA-Molekülzahl von 291.500 ± 25.500 pro Zelle auf

normalen $CD38^+CD138^+$ Plasmazellen, 256.500 ± 20.500 auf $CD34^+CD38^-$ hämatopoetischen Progenitorzellen, 181.500 ± 21.500 auf $CD19^+CD20^+$ B-Lymphozyten und 192.500 ± 28.000 auf $CD3^+$ T-Lymphozyten (Abb.8A) [163]. Damit lag die HLA-Klasse I-Oberflächenexpression auf normalen $CD38^+CD138^+$ Plasmazellen signifikant höher als auf autologen $CD19^+CD20^+$ B- und $CD3^+$ T-Lymphozyten ($p < 0.05$; ungepaarter t-Test). Zwischen normalen $CD38^+CD138^+$ Plasmazellen und $CD34^+CD38^-$ autologen hämatopoetischen Progenitorzellen konnte kein signifikanter Unterschied in der mittleren HLA-Klasse I-Molekülzahl auf der Zelloberfläche beobachtet werden (Abb.8A).

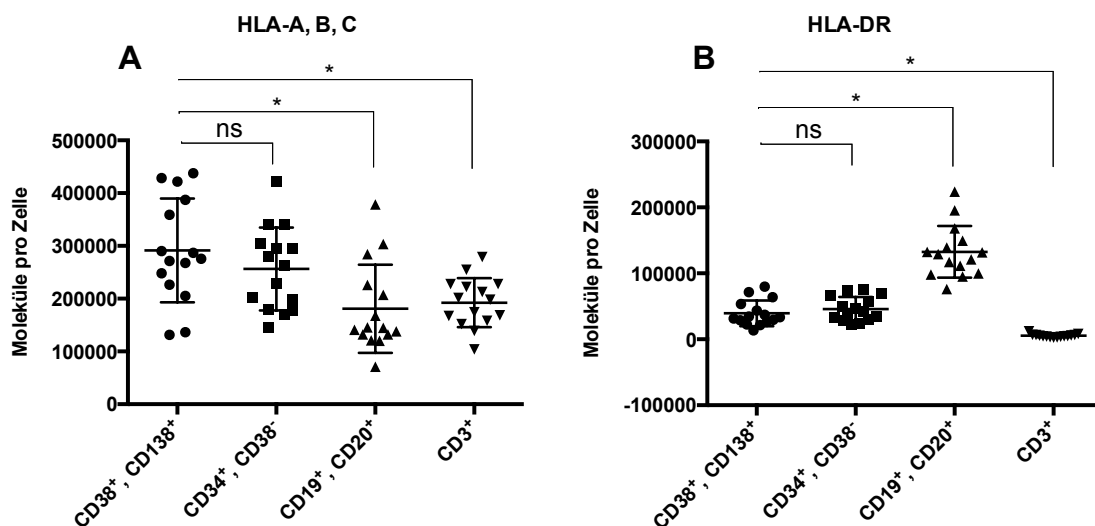


Abbildung 8: HLA Klasse I- [A] und DR- [B] Oberflächenexpression auf $CD38^+CD138^+$ Plasmazellen sowie auf autologen $CD34^+CD38^-$ hämatopoetischen Progenitorzellen, $CD19^+CD20^+$ B-Lymphozyten und $CD3^+$ T-Lymphozyten aus dem Knochenmark gesunder Spender. ns, nicht signifikant; *, $p < 0.05$.

Auch bei den Zellen des hämatopoetischen Systems gesunder Spender lag die HLA-DR-Oberflächenexpression mit mittleren HLA-DR-Molekülzahlen von 39.500 ± 5.000 auf normalen $CD38^+CD138^+$ Plasmazellen, 46.000 ± 4.500 auf $CD34^+CD38^-$ hämatopoetischen Progenitorzellen, 132.500 ± 10.000 auf $CD19^+CD20^+$ B-Lymphozyten und 5.500 ± 500 auf $CD3^+$ T-Lymphozyten deutlich unterhalb der HLA-Klasse I-Oberflächenexpression (Abb.8B). Die HLA-DR-Oberflächenexpression auf normalen $CD38^+CD138^+$ Plasmazellen war signifikant höher verglichen mit autologen $CD3^+$ T-Lymphozyten jedoch signifikant niedriger als auf $CD19^+CD20^+$ B-Lymphozyten (jeweils $p < 0.05$; ungepaarter t-Test). Wie auch für HLA-Klasse I bestand auch hinsichtlich der

mittleren HLA-DR-Molekülzahl auf CD38⁺CD138⁺ Plasmazellen im Vergleich zu autologen CD34⁺CD38⁻ hämatopoetischen Progenitorzellen kein signifikanter Unterschied (Abb.8B) [164].

3.1.1.3. HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression von Myelomzellen im Vergleich zu normalen Plasmazellen

Die HLA-Klasse I-Oberflächenexpression auf CD38⁺CD138⁺ Myelomzellen stellte sich wie oben bereits beschrieben sehr heterogen dar, lag im Mittel pro Zelle aber signifikant höher als auf CD38⁺CD138⁺ normalen Plasmazellen aus dem Knochenmark gesunder Spender, die im analysierten Kollektiv insgesamt homogenere HLA-Klasse I-Molekülzahlen zeigten (Abb.9A, $p < 0.05$; ungepaarter t-Test). Hinsichtlich der HLA-DR-Oberflächenexpression bestand kein signifikanter Unterschied (Abb.9B) [164].

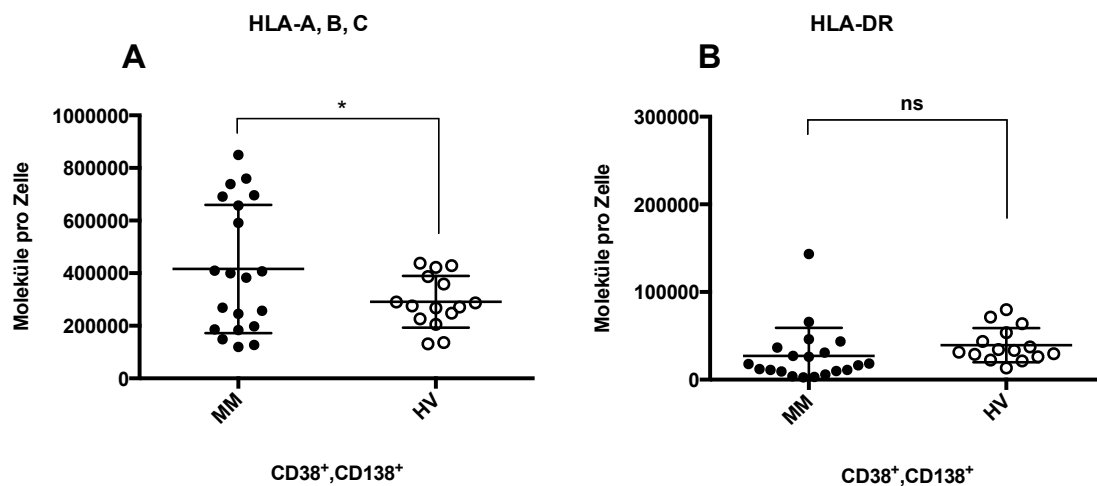


Abbildung 9: HLA Klasse I- [A] und DR- [B] Oberflächenexpression auf CD38⁺CD138⁺ Myelomzellen (n=20) im Vergleich zu CD38⁺CD138⁺ normalen Plasmazellen aus dem Knochenmark gesunder Spender (n=15). MM, Multiples Myelom; HV, gesunder Spender; ns, nicht signifikant; *, $p < 0.05$; modifiziert nach Walz et al. [164].

Für die übrigen untersuchten Zellpopulationen des hämatopoetischen Systems aus dem Knochenmark von Myelom-Patienten verglichen mit der entsprechenden Zellpopulation in gesunden Spendern ergab sich lediglich für die HLA-DR-Oberflächenexpression auf CD19⁺CD20⁺ B-Lymphozyten ein signifikanter Unterschied (Abb.10E, $p < 0.05$; ungepaarter t-Test). Die übrigen Zellpopulationen zeigten weder in der HLA-Klasse I- noch in der HLA-DR-Oberflächenexpression signifikante Unterschiede (Abb.10) [164].

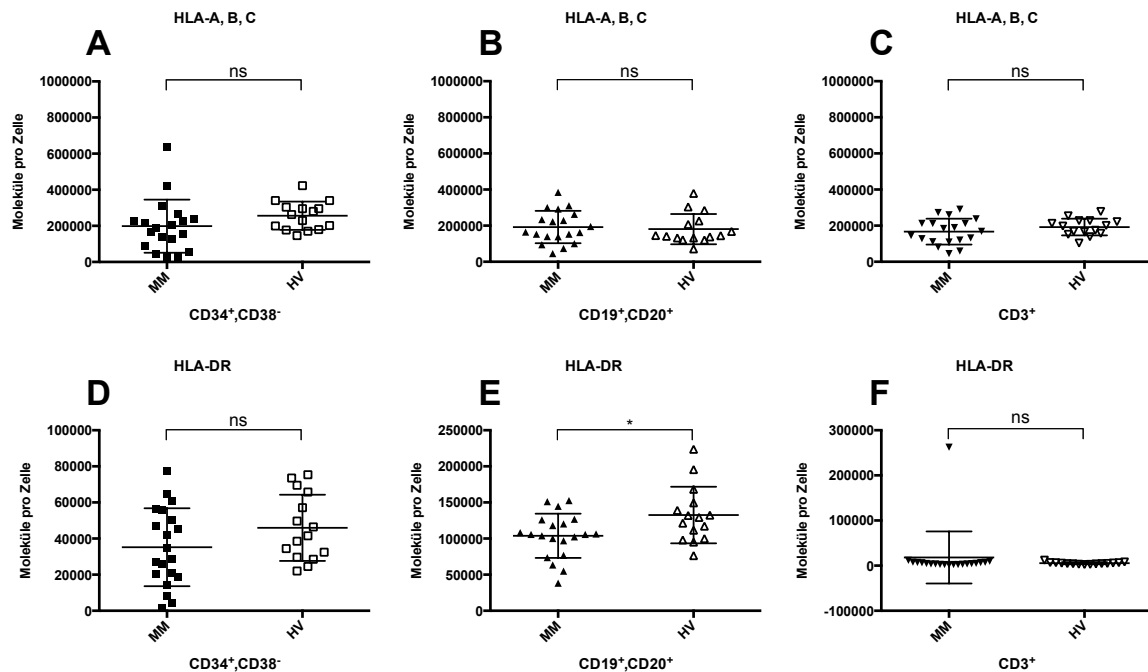


Abbildung 10: HLA Klasse I- [A-C] und DR- [D-F] Oberflächenexpression auf $CD34^+CD38^-$ hämatopoetischen Progenitorzellen, $CD19^+CD20^+$ B-Lymphozyten und $CD3^+$ T-Lymphozyten aus dem Knochenmark von Myelom-Patienten und gesunden Spendern. MM, Multiples Myelom; HV, gesunder Spender; ns, nicht signifikant; *, $p < 0.05$.

3.1.1.4. Zusammenhang der HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression auf Myelomzellen mit Patientencharakteristika

Um Unterschiede in der HLA-Expression in Abhängigkeit von verschiedenen Charakteristika der Myelompatienten zu untersuchen, erfolgte die Korrelation der HLA-Oberflächenexpression mit dem Alter, dem Geschlecht, den Stadien sowie der Risikostratifizierung der untersuchten Myelompatienten.

Die HLA-Oberflächenexpression auf Myelomzellen aus dem Knochenmark von Myelom-Patienten zeigte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Alter und Geschlecht der Patienten (Tab.12). Auch in den gängigen Stadieneinteilungen wie Durie & Salmon und dem Internationalen *Staging*-System (ISS) bestand, soweit auswertbar, kein signifikanter Unterschied in der HLA-Oberflächenexpression. Hinsichtlich krankheitsspezifischer Charakteristika wie Leichtkettenrestriktion, Risikostratifizierung nach den Kriterien der *International Myeloma Working Group* und Vorthherapie konnten, soweit auswertbar, in keiner

Kohorte signifikante HLA-Oberflächenexpressionsunterschiede detektiert werden (Tab.12) [21, 164].

Tabelle 12: Zusammenhang zwischen Patientencharakteristika und der HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression aus dem Knochenmark von Myelom-Patienten. P-Werte wurden nur für Gruppen >3 Patienten berechnet. ISS, Internationales *Staging*-System; ns, nicht signifikant; na nicht anwendbar; modifiziert nach Walz et al. [164].

	Anzahl der MM-Patienten (N=20)	HLA-Klasse I		HLA-DR	
		Mittelwert ± SEM (Moleküle/Zell)	p-Wert	Mittelwert ± SEM (Moleküle/Zell)	p-Wert
Geschlecht					
weiblich	8	469.000 ± 88.000	ns (0,44)	32.000 ± 16.500	ns (0,66)
männlich	12	380.500 ± 70.500		24.000 ± 6.000	
Alter (Median = 68)					
< 68	10	423.500 ± 63.500	ns (0,89)	26.500 ± 6.000	ns (0,95)
≥ 68	10	408.500 ± 92.000		27.500 ± 13.500	
ISS					
1	10	416.500 ± 85.500	ns (0,45/0,29/0,83)	32.500 ± 13.000	ns (0,86/0,32/0,38)
2	5	526.000 ± 101.000		29.000 ± 10.500	
3	5	304.000 ± 85.500		15.000 ± 8.000	
Durie & Salmon					
1	5	491.000 ± 109.000	ns (na/na/0,44)	14.000 ± 1.500	ns (na/na/0,16)
2	2	403.000 ± 254.500		38.500 ± 7.500	
3	13	389.000 ± 68.000	ns (0,34)	30.500 ± 11.000	ns (0,59)
Leichtkettenrestriktion					
Kappa	12	372.000 ± 63.000		23.000 ± 4.000	
Lambda	8	481.500 ± 98.500	na	33.000 ± 17.500	na
Risiko					
Standard	15	392.000 ± 62.000		29.500 ± 9.500	
hoch	2	480.000 ± 211.000		16.000 ± 10.000	
unbekannt	3	492.500 ± 183.000		23.000 ± 10.500	
Vortherapie					
Ja	14	473.000 ± 69.500	ns (0,11)	23.000 ± 5.000	ns (0,56)
Nein	6	282.000 ± 55.000		37.000 ± 22.000	

3.1.1.5. HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression auf humanen Myelomzelllinien

Die 5 untersuchten humanen MCLs zeigten ebenfalls eine sehr heterogene HLA-Oberflächenexpression mit im Mittel 132.500 ± 47.500 Molekülen/Zelle für HLA-Klasse I und 58.500 ± 24.000 HLA-DR-Molekülen je Zelle (Abb.11A+B). Damit lag die HLA-Klasse I-Oberflächenexpression im Mittel deutlich niedriger und die HLA-DR-Expression im Durchschnitt höher als auf primären Myelomzellen.

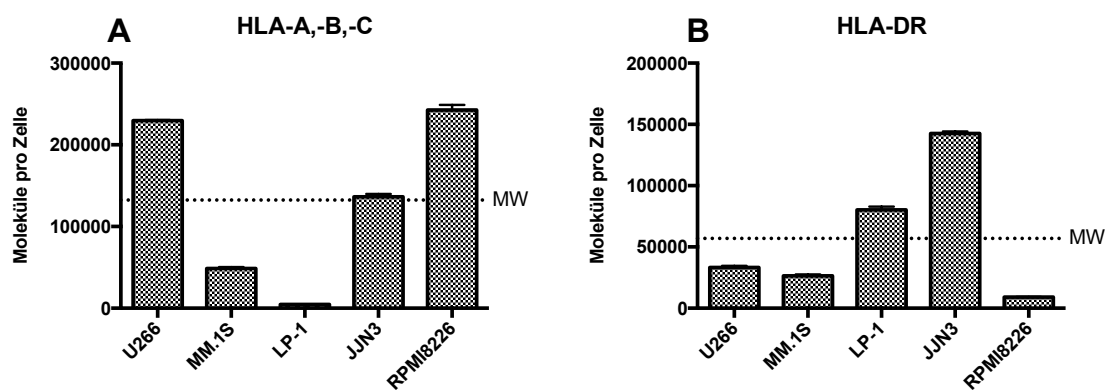


Abbildung 11: HLA Klasse I- [A] und DR- [B] Oberflächenexpression auf Myelomzellen aus Myelomzelllinien. MW, Mittelwert.

Zusammenfassend konnte die durchflusszytometrische HLA-Oberflächenexpressionsanalyse zeigen, dass ein Verlust oder eine Herunterregulation von HLA-Molekülen auf Myelomzellen keine Rolle spielt. Vielmehr zeigte sich sogar eine signifikant höhere HLA-Klasse I-Expression auf primären Myelomzellen im Vergleich zu normalen Plasmazellen. Die HLA-DR-Expression zeigte sich insgesamt deutlich niedriger als die HLA-Klasse I-Expression, sodass hier mit einer schlechteren Ausbeute bei der nachfolgenden HLA-Ligandenisolation gerechnet wurde.

3.1.2. HLA-Ligandomanalyse von primären Myelomzellen, Myelomzelllinien, BMNCs und Granulozyten gesunder Spender

Hier werden die Ergebnisse der oben beschriebenen HLA-Ligandenisolation mittels Immunpräzipitation mit nachfolgender massenspektrometrischer Analyse der Liganden dargelegt. Es wurden KM-Proben von Myelom-Patienten (n=10),

Myelomzelllinien (n=5) und Vergleichsproben gesunder Spender (BMNC n=10; Granulozyten n=5) untersucht.

3.1.2.1. HLA-Ligandomanalyse von primären Myelomzellen

Bei der HLA-Ligandomanalyse der Knochenmarkproben von insgesamt zehn unterschiedlichen Myelom-Patienten wurden sowohl HLA-Klasse I- als auch HLA-DR-Liganden untersucht. Im Median konnten so 1.176 HLA-Klasse I-Liganden aus 995 Quellproteinen und 409 HLA-DR-Liganden aus 175 Quellproteinen je Knochenmarkprobe identifiziert werden (Tab.13).

Tabelle 13: Anzahl der Identifizierten HLA-Klasse I- und II- Liganden mit den zugehörigen Quellproteinen aus Knochenmarkproben von Myelom-Patienten. GW, Grenzwert; IDs, Peptidentifikationen; UPN, *uniform patient number*, modifiziert nach Walz et al. [164].

Primäre Myelomproben	Zellzahl [10 ⁸ Zellen]	HLA-Typisierung	Identifizierte Peptide		Identifizierte Quellproteine	
			HLA-Kl. I	HLA-KL. II	HLA-Kl. I	HLA-KL. II
			GW>100IDs	GW>100IDs		
UPN1	3,5	A*26, A*30, B*15, B*42	128	<GW	175	<GW
UPN2	0,7	A*01, A*24, B*18, B*08	270	<GW	338	<GW
UPN3	12,0	A*02, A*01, B*08, B*37	314	443	263	172
UPN4	1,8	A*02, A*33, B*15, B*18	1.963	125	1703	175
UPN5	12,1	A*03, A*26, B*40, B*55	1.829	409	1608	216
UPN6	8,5	A*02, A*24, B*07, B*27	1.203	239	1137	157
UPN7	1,2	A*02, A*03, B*07, B*35	381	<GW	442	<GW
UPN8	13,0	A*24, A*25, B*39, B*40	2.054	1.055	1559	287
UPN9	30,0	A*02, B*07, B*44	1.296	930	1099	330
UPN10	3,5	A*03, A*33, B*07	1.148	283	890	131
Median			1.176	409	995	175
[Spannweite]			[128-2.054]	[125-1.055]	[175-1.703]	[131-330]

Insgesamt konnten 9.003 unterschiedliche HLA-Klasse I-Liganden aus 4.581 Quellproteinen und 4.328 unterschiedliche HLA-Klasse II-Liganden aus 597

Quellproteinen beschrieben werden. Das hier untersuchte Patientenkollektiv deckt mit 20 unterschiedlichen HLA-A- und -B-Allotypen über 99% der HLA-A- und -B-Restriktion der kaukasischen Bevölkerung ab [164].

3.1.2.2. HLA-Ligandomanalyse von Myelomzelllinien

Die fünf hier untersuchten Myelomzelllinien U266, MM.1S, LP-1, JJN3 und RPMI8226 lieferten im Median 2.485 HLA-Klasse I-Liganden aus 2.026 Quellproteinen und 953 HLA-Klasse II-Liganden aus 509 Quellproteinen (Tab.14). So wurden auf den Myelomzelllinien insgesamt 10.993 unterschiedliche HLA-Klasse I-Liganden aus 6.027 Quellproteinen und 1.813 unterschiedliche HLA-Klasse II-Liganden aus 1.415 Quellproteinen identifiziert [164].

Tabelle 14: Anzahl der identifizierten HLA-Klasse I und DR Liganden mit den zugehörigen Quellproteinen auf Myelomzelllinien. GW, Grenzwert; IDs, Peptididentifikationen; modifiziert nach Walz et al. [164].

Zelllinie	Zellzahl [10 ⁸ Zellen]	HLA- Typisierung	Identifizierte Peptide		Identifizierte Quellproteine	
			HLA-KI. I	HLA-KL. II	HLA-KI. I	HLA-KL. II
			GW>100IDs	GW>100IDs		
U266	35	A*02, A*03, B*07, B*40	3.924	953	3.049	509
MM.1S	20	A*23, A*24, B*18, B*42	1.240	490	1.163	271
LP-1	19	A*02, A*03, B*07, B*18	962	1.433	1.033	556
JJN3	14	A*03, A*33, B*07, B*14	2.603	1.718	2.239	669
RPMI8226	8	A*30, A*68, B*15	2.485	163	2.026	188
Median			2.485	953	2.026	509
[Spannweite]			[962-3924]	[163-1.055]	[1.033-3.049]	[188-669]

3.1.2.3. HLA-Ligandomanalyse von BMNCs und Granulozyten gesunder Spender

Zum Vergleich der HLA-Ligandome primärer Myelomzellen und Myelomzelllinien mit entsprechenden Proben gesunder Spender wurde eine HLA-Ligandomanalyse von Zellen des hämatopoetischen Systems (BMNCs)

aus Knochenmarkaspiraten von 10 gesunden Spendern und von Granulozyten aus dem peripheren Blut von 5 gesunden Spendern durchgeführt (Tab.15).

Tabelle 15: Anzahl der Identifizierten HLA-Klasse I- und II-Liganden mit den zugehörigen Quellproteinen auf KM-Zellen und Granulozyten gesunder Spender. GW, Grenzwert; IDs, Peptidentifikationen; modifiziert nach Walz et al. [164].

Proben	Zellzahl [10 ⁸ Zellen]	HLA- Typisierung	Identifizierte Peptide		Identifizierte Quellproteine	
			HLA-KI. I	HLA-KI. II	HLA-KI. I	HLA-KI. II
			GW>500/>200	GW>100IDs		
BM1	7,0	A*02, A*24, B*07, B*50	781	<GW	676	<GW
BM2	5,0	A*03, A*30, B*13, B*18	479	230	488	149
BM3	5,0	A*23, A*25, B*44, B*49	223	<GW	225	<GW
BM4	16,0	A*03, A*11, B*35, B*38	238	122	242	76
BM5	9,0	A*03, A*68, B*27, B*44	377	<GW	443	<GW
BM6	4,0	A*03, A*68, B*40	101	<GW	166	<GW
BM7	0,6	A*01, A*26, B*08, B*44	361	142	396	158
BM8	4,0	A*02, A*02, B*40, B*44	580	<GW	582	<GW
BM9	3,0	A*02, B*35, B*51	1.058	325	950	209
BM10	5,0	A*11, A*24, B*08, B*44	748	145	630	118
G1	2,0	A*02, A*11, B*35, B*44	1.808	637	1.371	237
G2	1,0	A*02, A*32, B*07, B*44	405	268	402	127
G3	2,0	A*01, A*25, B*37, B*57	634	168	461	105
G4	4,0	A*02, A*11, B*41, B*56	557	364	554	228
G5	19,0	A*01, A*02, B*44, B*57	1.549	166	1.218	173
Median			557	199	488	154
[Spannweite]			[101-1808]	[122-637]	[166-1371]	[76-237]

Zusätzlich wurden HLA-Ligandomdaten von PBMCs 30 gesunder Spender aus der hauseigenen Ligandomdatenbank implementiert. So konnten insgesamt

20.171 unterschiedliche HLA-Klasse I-Liganden aus 7.729 Quellproteinen und 2.899 HLA-Klasse II-Liganden aus 889 Quellproteinen als Vergleichsproben genutzt werden [164].

3.1.2.4. Identifikation von Myelom-exklusiven HLA-Liganden und Definition neuer, vom HLA-Ligandom abgeleiteter, Myelom-assoziierter Antigene

Um die tatsächlich Myelom-assozierten Antigene zu identifizieren, wurden nun die Ligandomdaten der Myelomkohorte, bestehend aus Knochenmarkproben von Myelom-Patienten und Myelomzelllinien, mit den Ligandomdaten der Kohorte gesunder Spender (10 BMNC, 5 Granulozyten, 30 PBMC) verglichen. So konnten 2.412 Quellproteine für HLA-Klasse I und 1.135 Quellproteine für HLA-Klasse II als Myelom-exklusiv beschrieben werden (Abb.12) [164].

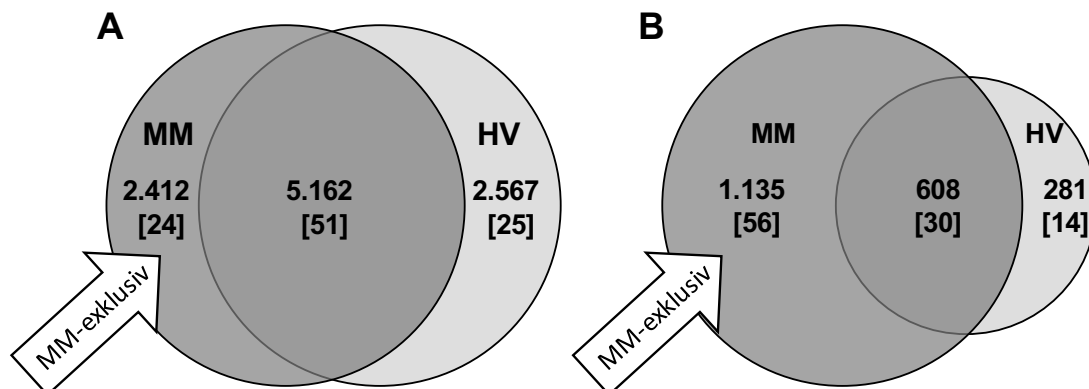


Abbildung 12: Vergleich des HLA-Klasse I- [A] bzw. HLA-Klasse II- / -DR-Ligandoms [B] der Myelomkohorte mit dem HLA-Ligandom der Kohorte gesunder Spender auf der Ebene der Quellproteine. MM, Myelomkohorte; HV, gesunder Spender; Zahl, Anzahl unterschiedlicher Quellproteine; [%].

Von diesen Myelom-exklusiven Antigenen waren diejenigen, die mehrfach auf unterschiedlichen Myelomproben identifiziert werden konnten, besonders interessant. In dieser Arbeit wurde basierend auf bioinformatischen FDR-Berechnungen (durchgeführt durch Linus Backert und Daniel Kowalewski [164]) ein Antigen als Myelom-assoziert definiert, wenn Peptide aus diesem Antigen auf $\geq 26,7\%$ (FDR < 5%) der untersuchten Proben identifiziert wurden, was einer Identifikation auf mindestens 4 unterschiedlichen Myelom-Proben

entsprach. So konnten insgesamt 58 Antigene repräsentiert durch 202 Peptide als neue Myelom-assoziierte HLA-Klasse I-Antigene definiert werden (Tab.16, Abb.13A). Für Antigene die Peptide auf HLA-DR präsentieren, musste die Identifikation auf mindestens 50% der untersuchten Myelom-Proben erreicht werden, um eine FDR < 5% gewährleisten zu können. Somit konnte hier lediglich ein Antigen, repräsentiert durch 67 verschiedene Peptide/Längenvarianten, als neues Myelom-assoziiertes HLA-DR-Antigen definiert werden (Tab.16, Abb.13B) [164].

Tabelle 16: Ligandom-abgeleitete Myelom-assoziierte HLA-Klasse I-Antigene und Peptide [A] bzw. Ligandom-abgeleitete Myelom-assoziierte HLA-DR-Antigene und Peptide [B]; MM, Myelom-Proben; MCL, Myelomzelllinie; modifiziert nach Walz et al. [164].

A.

Antigene/Quellprotein, Peptide	Anzahl positiver Myelomproben [Frequenz der Repräsentation %]	Anzahl positiver primärer MMs / MCLs [Frequenz der Repräsentation %]	HLA Zuordnung
TXNDC11 thioredoxin domain containing 11	9 [60]	5 [50] / 4 [80]	
AHSEQLQAL	2	1 / 0	B*39
EITEVALEY	1	1 / 0	A*26
HPKQPEPSA	1	0 / 1	B*42:01
HPKQPEPSAT	1	0 / 1	B*42:01
IPAKPPVSF	6	3 / 3	B*07:02, B*42:01
IPAKPPVSFF	1	1 / 0	B*07:02
KEFAAIVDV	1	1 / 0	B*40
RAKDVIIIPAK	1	0 / 1	A*03
RPHGGKSL	2	1 / 1	B*07, B*42:01
YILDPKQAL	2	2 / 0	A*02
MOGS mannosyl-oligosaccharide glucosidase	6 [40]	2 [20] / 4 [80]	
APKYGSYNVF	1	0 / 1	B*42:01
ERFEKTFQL	1	1 / 0	B*39
FISGHTSEL	1	0 / 1	A*02
FLWDEGFHQL	1	0 / 1	A*02:01
KPRPPQGL	2	0 / 2	B*07:02, B*42:01
KPRPPQGLVR	1	1 / 0	B*07
LKIPISIEF	1	0 / 1	B*15
RPFHGWTSL	1	0 / 1	B*07:02
VPAEGVRTA	1	1 / 0	B*55
VTDGKEVLL	1	0 / 1	A*02
FNDC3B fibronectin type III domain containing 3B	6 [40]	3 [30] / 3 [60]	
DLRPATDYHVR	2	1 / 1	A*33
GPFSQFIKA	1	1 / 0	B*55
ILWETVPSM	2	1 / 1	A*02:01
RPGPPTRPL	1	0 / 1	B*07:02
SESLPVRTL	3	2 / 1	B*40:01
SIYRGPSHTYK	2	1 / 0	A*03
SPKSNDSDL	1	0 / 1	B*42:01
THAAEDIVYTL	1	1 / 0	B*39:01
NUDT14 nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 14	5 [33,3]	3 [30] / 2 [40]	
GELIEVVHL	1	1 / 0	B*40
SPYLRPLTL	4	2 / 2	B*07:02
SLC1A5 solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5	5 [33,3]	2 [20] / 3 [60]	
AENAPSKEVL	1	1 / 0	B*40
FVFPGELL	4	1 / 3	A*02:01
SFLDLARNIF	1	0 / 1	A*24:02
ARHGAP11A Rho GTPase activating protein 11A	5 [33,3]	1 [10] / 4 [80]	
KTQLLPTSK	1	1 / 0	A*33
SKDEARSSF	1	0 / 1	B*15
TASPLVKSV	1	0 / 1	C*12
EYGHIPSF	1	0 / 1	A*24:02
FNFLRNVS	1	0 / 1	B*08:01
LADHTVHVL	1	0 / 1	A*02:01
BHLHA15 basic helix-loop-helix family, member a15	5 [33,3]	3 [30] / 2 [40]	
QHYQQQQV	1	0 / 1	B*15:10

Antigene/Quellprotein, Peptide	Anzahl positiver Myelomproben [Frequenz der Repräsentation %]	Anzahl positiver primärer MMs / MCLs [Frequenz der Repräsentation %]	HLA Zuordnung
RYSTQIHSF	3	2 / 1	A*24:02
TEAQPQGH	1	1 / 0	B*40
LRRC47 leucine rich repeat containing 47	5 [33,3]	2 [20] / 3 [60]	
LPQLHSLVL	1	0 / 1	B*07
MDLQPGNALKR	1	0 / 1	n.a.
PELGPLPAL	3	2 / 1	B*18, B*40
PPP2R3C protein phosphatase 2, regulatory subunit B", gamma	5 [33,3]	2 [20] / 3 [60]	
DEVLLQKL	1	1 / 0	B*18
KPKDPLKISL	3	1 / 2	B*07
LYDVAGQGYL	1	0 / 1	B*24:02
SLX1A SLX1 structure-specific endonuclease subunit homolog A (S. cerevisiae)	5 [33,3]	3 [30] / 2 [40]	
GETAFAFHL	2	1 / 1	B*40:01
LAHVGPRL	3	1 / 2	A*02:01
LPPPPHVPL	2	1 / 1	B*07:02
BAZ2B bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B	5 [33,3]	3 [30] / 2 [40]	
RQYPEVIKY	1	1 / 0	B*39
SPAHPKQTL	2	1 / 1	B*07
GEVQDLLVRL	3	2 / 1	B*40
NOC2L nucleolar complex associated 2 homolog (S. cerevisiae)	5 [33,3]	2 [20] / 3 [60]	
DLNFPEIKR	1	0 / 1	A*03
EQLYDLTLEY	1	1 / 0	B*39
GKVVQENSAY	1	0 / 1	B*15
REEGTPLTL	1	0 / 1	B*40:01
RKDEDRKQF	1	0 / 1	B*15
SPQAETREA	1	1 / 0	B*55
BTN3A1 butyrophilin, subfamily 3, member A1	4 [26,7]	1 [10] / 3 [60]	
YPVFRILT	2	1 / 1	B*07
IADPFFRSA	1	0 / 1	C*03:04
ILRDGITAGK	1	0 / 1	A*03:01
TNFRSF13B tumor necrosis factor receptor superfamily, member 13B	4 [26,7]	2 [20] / 2 [40]	
SPALPGLKL	4	2 / 2	B*07
NPC1 Niemann-Pick disease, type C1	4 [26,7]	0 [0] / 4 [80]	
GEVAPSMFL	1	0 / 1	B*40:01
IQILHQVL	1	0 / 1	B*15
RVFPYSVFY	3	0 / 3	A*03:01
SHITRAFTV	1	0 / 1	B*15
TKFGGIVVL	1	0 / 1	B*15
VDNIFILVQ	2	0 / 2	n.a.
MRPS12 mitochondrial ribosomal protein S12	4 [26,7]	1 [10] / 3 [60]	
RLGPPKRPPR	1	0 / 1	A*30
RPQLKGVVL	3	1 / 2	B*07
NUPL2 nucleoporin like 2	4 [26,7]	0 [0] / 4 [80]	
FKSPAASSF	1	0 / 1	B*15
SVYSPVKKK	2	0 / 2	A*03
SYLNSVQRL	1	0 / 1	A*24:02
CREB3 cAMP responsive element binding protein 3	4 [26,7]	2 [20] / 2 [40]	
AEQEIARLVL	1	0 / 1	B*40:01
KEGLILPETL	1	0 / 1	B*40:01
LEKEGLIL	2	2 / 0	B*40
LPAEHGVL	1	0 / 1	B*07
TBC1D4 TBC1 domain family, member 4	4 [26,7]	3 [30] / 1 [20]	
DSFERSNSL	1	0 / 1	A*68:02
TEVIFKVAL	3	3 / 0	B*18, B*40
RAD1 RAD1 checkpoint DNA exonuclease	4 [26,7]	0 [0] / 4 [80]	
AFIQAGIFQEF	1	0 / 1	A*23:01
IQAGIFQEF	1	0 / 1	B*15
KPSTKALVL	2	0 / 2	B*07
SPMPGTLTAL	1	0 / 1	B*07
NBN nibrin	4 [26,7]	3 [30] / 1 [20]	
DLFRYNPYLKR	2	1 / 1	A*03
RYNPYLKR	1	1 / 0	A*33
SPTKLPSI	1	1 / 0	B*55
TLKSGDGITF	1	1 / 0	B*15
WFS1 Wolfram syndrome 1	4 [26,7]	2 [20] / 2 [40]	
RPRAPGPQ	4	2 / 2	B*07
WHSC1 Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1	4 [26,7]	3 [30] / 1 [20]	
ASNPSNPRPSK	1	1 / 0	A*30:01
KAMEAASSL	2	1 / 1	A*02
SLLEQGLVEA	1	1 / 0	A*02
ASS1 argininosuccinate synthase 1	4 [26,7]	3 [30] / 1 [20]	

Antigene/Quellprotein, Peptide	Anzahl positiver Myelomproben [Frequenz der Repräsentation %]	Anzahl positiver primärer MMs / MCLs [Frequenz der Repräsentation %]	HLA Zuordnung
DRYLLGTSL	1	0 / 1	B*27
KQHGIPIV	1	1 / 0	B*27
NIGQKEDFEEA	3	3 / 0	A*02
RLQSKVTAK	1	1 / 0	A*03
SMNVQGDYEPT	1	1 / 0	A*02
CYC1 cytochrome c-1	4 [26,7]	2 [20] / 2 [40]	
HSMDFVAYR	1	0 / 1	A*03
KPYPNSEAARA	1	1 / 0	B*55
KVMLSALGML	1	1 / 0	A*02
RKLAYRPPK	1	0 / 1	B*15
SIRRGFQVYK	1	0 / 1	A*03
PDIA4 protein disulfide isomerase family A, member 4	4 [26,7]	2 [20] / 2 [40]	
AKRFDVSGY	1	0 / 1	B*15
KEENGLVL	1	1 / 0	B*40
RPRKAFLLLL	2	1 / 1	B*07, B*42:01
LAP3 leucine aminopeptidase 3	4 [26,7]	1 [10] / 3 [60]	
DVNNIGKYR	2	1 / 1	A*03
KTEVHIRPK	1	0 / 1	A*03:01
LLRFSQDNA	1	0 / 1	A*02:01
LRFSQDNA	1	0 / 1	C*07
NMDLMRADM	1	0 / 1	A*02
KDEL2 KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 2	4 [26,7]	1 [10] / 3 [60]	
RYLDLFTSF	2	1 / 1	A*24:02
YLYITKVLK	2	0 / 2	A*03:01
SLC1A4 solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4	4 [26,7]	0 [0] / 4 [80]	
DALGAGILHHL	1	0 / 1	A*02
GKYIFASIL	1	0 / 1	B*15
LAFPGEMLL	3	0 / 3	A*02
P49770 EIF2B2 eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 2 beta, 39kDa	4 [26,7]	2 [20] / 2 [40]	
NEDFSFHY	1	1 / 0	B*18
NEVIMTIGF	3	1 / 2	B*18:01
RVNKKVIIGTK	1	0 / 1	A*03:01
SERPINH1 serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1	4 [26,7]	2 [20] / 2 [40]	
DTQSGSLLFIGR	2	1 / 1	A*03
FFKPHWDEKF	1	1 / 0	A*24
KLSSLILM	1	0 / 1	A*02:01
DAP3 death associated protein 3	4 [26,7]	0 [0] / 4 [80]	
ALWGRITLK	2	0 / 2	A*03
FAYPAIRYL	3	0 / 3	A*02
IRF9 interferon regulatory factor 9	4 [26,7]	1 [10] / 3 [60]	
APFQGDQRSL	2	1 / 1	B*07
DVAEPYKVY	1	1 / 0	A*25
TPEQQAAIL	1	0 / 1	B*07
NAE1 NEDD8 activating enzyme E1 subunit 1	4 [26,7]	2 [20] / 2 [40]	
GRYPGVSNY	1	1 / 0	B*27
IESHPDNAL	2	1 / 1	B*40
SHTPWIVII	1	0 / 1	B*15
Q53HL2 CDCA8 cell division cycle associated 8	4 [26,7]	1 [10] / 3 [60]	
RVAKTNSLR	2	0 / 2	A*03:01
TPAVGRLEV	4	1 / 3	B*07, B*42:01
KIAA1217 KIAA1217	4 [26,7]	3 [30] / 1 [20]	
DVPDHIIAY	1	1 / 0	A*03
IEVEAVRF	1	1 / 0	B*18
KYPDSLPTL	1	1 / 0	A*24
SPPPPPPPP	1	0 / 1	B*07
MED27 mediator complex subunit 27	4 [26,7]	1 [10] / 3 [60]	
RPKAQPTTL	4	1 / 3	B*07, B*42:01
MRPL55 mitochondrial ribosomal protein L55	4 [26,7]	1 [10] / 3 [60]	
RQFWTRTKK	2	0 / 2	A*03:01
TVKATGPAL	2	1 / 1	A*02
TMEM126B transmembrane protein 126B	4 [26,7]	1 [10] / 3 [60]	
EIIKKNFDY	1	1 / 0	A*26
EIIKKNFDYLR	1	0 / 1	A*03
MHGQPSPSL	1	0 / 1	B*15
VPLPPKGRVL	1	0 / 1	B*42:01
CMTR1 cap methyltransferase 1	4 [26,7]	1 [10] / 3 [60]	
GAKASTTSL	1	0 / 1	C*03:03
IHILDVVL	1	0 / 1	B*15
SFDDAFKADS	1	0 / 1	n.a.
VFDVLDGEEM	1	0 / 1	A*24
YLFAVNIKL	1	1 / 0	A*02

Antigene/Quellprotein, Peptide	Anzahl positiver Myelomproben [Frequenz der Repräsentation %]	Anzahl positiver primärer MMs / MCLs [Frequenz der Repräsentation %]	HLA Zuordnung
MB21D1 Mab-21 domain containing 1	4 [26,7]	1 [10] / 3 [60]	
DIKDTDVImKR	2	1 / 1	A*33
NEFPVFDEF	1	0 / 1	B*18:01
RLKPFYLVPK	2	0 / 2	A*03
CSNK2A1 casein kinase 2, alpha 1 polypeptide	4 [26,7]	1 [10] / 3 [60]	
KILKPVKKK	2	0 / 2	A*03
RYFKGPELL	2	1 / 1	A*24
COG1 component of oligomeric golgi complex 1	4 [26,7]	2 [20] / 2 [40]	
KLGWLSSMTK	1	1 / 0	A*03
LPKDVSPYQA	1	1 / 0	B*55
RYSPVLSRF	1	0 / 1	A*24:02
SPALKRLDL	1	0 / 1	B*07:02
SPRQALTFD	1	0 / 1	B*07:02
MZB1 marginal zone B and B1 cell-specific protein	4 [26,7]	3 [30] / 1 [20]	
MRLSLPLL	3	2 / 1	B*27
MRLSLPLLLL	3	2 / 1	B*27
SELVYTDVL	2	2 / 0	B*40
TP53INP1 tumor protein p53 inducible nuclear protein 1	4 [26,7]	3 [30] / 1 [20]	
VAALAAHTTF	2	2 / 0	A*24
IEHPSMSVY	2	1 / 1	B*18
HSH2D hematopoietic SH2 domain containing	4 [26,7]	1 [10] / 3 [60]	
KLPLPLPPRL	2	0 / 2	B*07
SHSHVGYTL	2	1 / 1	B*39
UBL7 ubiquitin-like 7	4 [26,7]	1 [10] / 3 [60]	
GPRPITQSEL	3	1 / 2	B*07
TPSSRPASL	3	0 / 3	B*07
SPATC1L spermatogenesis and centriole associated 1-like	4 [26,7]	1 [10] / 3 [60]	
KLRELTQRY	1	0 / 1	A*03
YVFPVTRTL	3	1 / 2	A*02
YYLNEIQSF	2	1 / 1	A*24
SEMA4A sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4A	4 [26,7]	3 [30] / 1 [20]	
DIQDPGVPR	1	1 / 0	A*33
FLFQLLQLL	1	1 / 0	A*02
SEFDFFERL	2	1 / 1	B*18:01, B*40
VPLTRVSGGAA	1	0 / 1	B*42:01
LIME1 Lck interacting transmembrane adaptor 1	4 [26,7]	2 [20] / 2 [40]	
AASPVVAEY	3	1 / 2	A*24
LAALPGVSL	1	0 / 1	A*02
RALDVDSGPL	1	1 / 0	A*02
SETD8 SET domain containing (lysine methyltransferase) 8	4 [26,7]	2 [20] / 2 [40]	
ALKKPIK GK	1	0 / 1	A*03
KDARKGPLVP	2	1 / 1	B*07
SRGDFVVEY	3	1 / 2	C*07
DYRK4 dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 4	4 [26,7]	1 [10] / 3 [60]	
KPQPRPQTL	3	1 / 2	B*07
YPDSKDLTM	1	0 / 1	B*07
BFAR bifunctional apoptosis regulator	4 [26,7]	0 [0] / 4 [80]	
KAVNPGRSL	2	0 / 2	A*02
SPRLSLLYL	2	0 / 2	B*07
TFLPFIHTI	1	0 / 1	A*23:01
NDUFAF4 NADH dehydrogenase (ubiquinone) complex I, assembly factor 4	4 [26,7]	1 [10] / 3 [60]	
APRHPSTNSL	4	1 / 3	B*07
APRHPSTNSLL	2	0 / 2	B*07
CRLS1 cardiolipin synthase 1	4 [26,7]	1 [10] / 3 [60]	
ALDPLADKILI	1	0 / 1	A*02:01
DLLDGFAR	2	1 / 1	A*03
TRIGLAPVL	1	0 / 1	B*15
ZBTB21 zinc finger and BTB domain containing 21	4 [26,7]	0 [0] / 4 [80]	
PTENFSLPVL	1	0 / 1	A*02
RPRPPVLSV	2	0 / 2	B*07
YHAPPLSAITF	1	0 / 1	B*15
DOLK dolichol kinase	4 [26,7]	1 [10] / 3 [60]	
FAQIISVALI	2	1 / 1	A*02
IIFDRPLLY	2	0 / 2	A*03
SNX14 sorting nexin 14	4 [26,7]	1 [10] / 3 [60]	
KYESIRLLF	2	1 / 1	A*24
LLFPYILPPK	2	0 / 2	A*02

B.

Antigene/Quellprotein, Peptide	Anzahl positiver Myelomproben [Frequenz der Repräsentation %]	Anzahl positiver primärer MMs / MCLs [Frequenz der Repräsentation %]
TFCR Transferrin receptor protein 1	7 [58,3]	2 [28,5] / 5 [100]
AAFPFLAYSGIPAVS	1	0 / 1
AFPFLAYSGIPAVS	1	0 / 1
AIGVLIYmDQTKFPIVN	1	0 / 1
ASPLLYTLIEKtm	1	0 / 1
ATWTIQGAANALSGDV	1	0 / 1
DFTGTIKLLNENSY	1	0 / 1
DFTGTIKLLNENSYVP	1	0 / 1
DFTGTIKLLNENSYVPR	1	0 / 1
DFTGTIKLLNENSYVPRE	1	0 / 1
DFTGTIKLLNENSYVPREA	1	0 / 1
DFTGTIKLLNENSYVPREAG	1	0 / 1
DFTGTIKLLNENSYVPREAGSQ	1	0 / 1
DFTGTIKLLNENSYVPREAGSQKDE	1	0 / 1
DSTDFTGTIKLLNENSYVPR	1	0 / 1
DSTDFTGTIKLLNENSYVPRE	1	0 / 1
EIKILNIFGVIK	1	0 / 1
FTGTIKLLNENSY	1	0 / 1
FTGTIKLLNENSYVPR	1	0 / 1
FTGTIKLLNENSYVPRE	1	0 / 1
GEPLSYTRFSLAR	1	0 / 1
GEPLSYTRFSLARQ	2	0 / 2
GEPLSYTRFSLARQVDG	1	0 / 1
GLPNIPVQTISRAAA EKLFGNm	1	0 / 1
GLPNIPVQTISRAAA EKLFGNmE	1	0 / 1
GTIKLLNENSYVP	1	0 / 1
GTIKLLNENSYVPR	1	0 / 1
GTSNFKVSASPLLYT	1	0 / 1
GTSNFKVSASPLLYTL	1	0 / 1
IERIPELNKVARAAAEVAG	1	0 / 1
IGVLIYmDQTKFPIVN	1	0 / 1
IKLLNENSYVPR	1	0 / 1
IPELNKVARAAAEVA	1	0 / 1
PELNKVARAAAEVAG	1	0 / 1
IPELNKVARAAAEVAGQF	2	0 / 2
IPVQTISRAAA EKLFG	1	0 / 1
IPVQTISRAAA EKLFGN	1	0 / 1
IPVQTISRAAA EKLFGNm	1	0 / 1
IPVQTISRAAA EKLFGNmE	1	0 / 1
KEIKILNIFGVIK	1	0 / 1
KEIKILNIFGVIKG	1	0 / 1
LDSTDFTGTIKLLNENSYVPR	1	0 / 1
LPNIPVQTISRAAA EKLFG	1	0 / 1
LPNIPVQTISRAAA EKLFGN	1	0 / 1
LPNIPVQTISRAAA EKLFGNm	1	0 / 1
LPNIPVQTISRAAA EKLFGNmE	1	0 / 1
LSKVWRDQHFKIQ	1	0 / 1
NPGGYVAYSKAATVTG	2	0 / 2
NPGGYVAYSKAATVTGK	2	0 / 2
NSVIIVDKNGRLV	4	2 / 2
RIPELNKVARAAAEVA	1	0 / 1
RIPELNKVARAAAEVAG	1	0 / 1
RIPELNKVARAAAEVAGQ	1	0 / 1
STDFTGTIKLLNENSYVPR	1	0 / 1
STDFTGTIKLLNENSYVPRE	1	0 / 1
SVIIVDKNGRLV	4	2 / 2
TDFTGTIKLLNENSYVPR	1	0 / 1
TDFTGTIKLLNENSYVPRE	1	0 / 1
TGTIKLLNENSY	1	0 / 1
TGTIKLLNENSYV	1	0 / 1
TGTIKLLNENSYVP	1	0 / 1
TGTIKLLNENSYVPR	1	0 / 1
TGTIKLLNENSYVPRE	1	0 / 1
TIKLLNENSYVP	1	0 / 1
TIKLLNENSYVPR	1	0 / 1
TSNFKVSASPLLYT	1	0 / 1
TSNFKVSASPLLYTL	1	0 / 1
YHFLSPYVSPKESPF	1	0 / 1

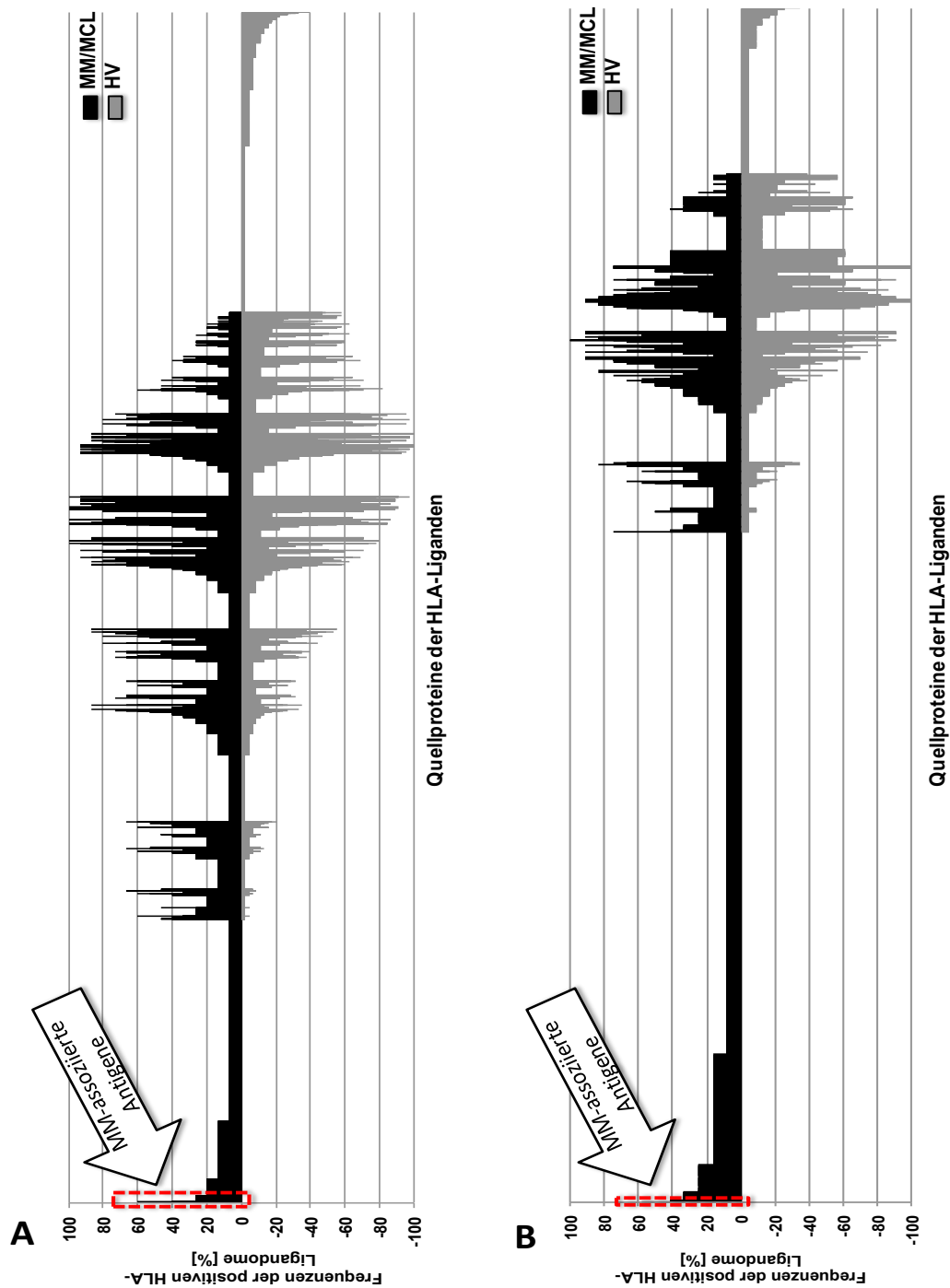


Abbildung 13: Vergleichende Analyse der identifizierten HLA-Klasse-I [A] und HLA-Klasse II-Antigene [B] auf Ebene der Quellproteine, basierend auf der Frequenz ihrer Präsentation in unterschiedlichen Ligandomen. Die Frequenzen der Präsentation des jeweiligen Quellproteins (x-Achse) in der MM/MCL-Kohorte (schwarz, n=15) und der HV-Kohorte (grau, n=45) sind auf der y-Achse aufgezeichnet. Myelom-exklusive Präsentation findet sich in den Graphen links; der gestrichelte rote Kasten zeigt die 58 Quellproteine für HLA-Klasse I-Antigene [A] und das eine HLA-DR-Antigen [B] (FDR <5%) an, die als vom Ligandom abgeleitete Myelom-assoziierte Antigene definiert werden konnten. MM, Multiples Myelom; MCL, Myelomzelllinie; HV, gesunder Spender; modifiziert nach Walz et al. [164].

3.1.2.5. Vergleich der HLA-Ligandome von primären Myelomzellen und Myelomzelllinien

Um die Ähnlichkeit der primären Myelomproben und der analysierten Myelomzelllinien zu untersuchen erfolgten Vergleichsanalysen sowohl der identifizierten HLA-Liganden als auch der zugehörigen Quellproteine.

Beim Vergleich der auf HLA-Klasse I präsentierten Peptide zwischen primären Myelomzellen und Myelomzelllinien zeigten sich 2.413 unterschiedliche Peptide und damit 14% der insgesamt detektierten HLA-Liganden auf beiden Zellentitäten repräsentiert. 37% der insgesamt detektierten HLA-Liganden wurden ausschließlich auf primären Myelomzellen und 49% ausschließlich auf Myelomzelllinien detektiert (Abb.14A).

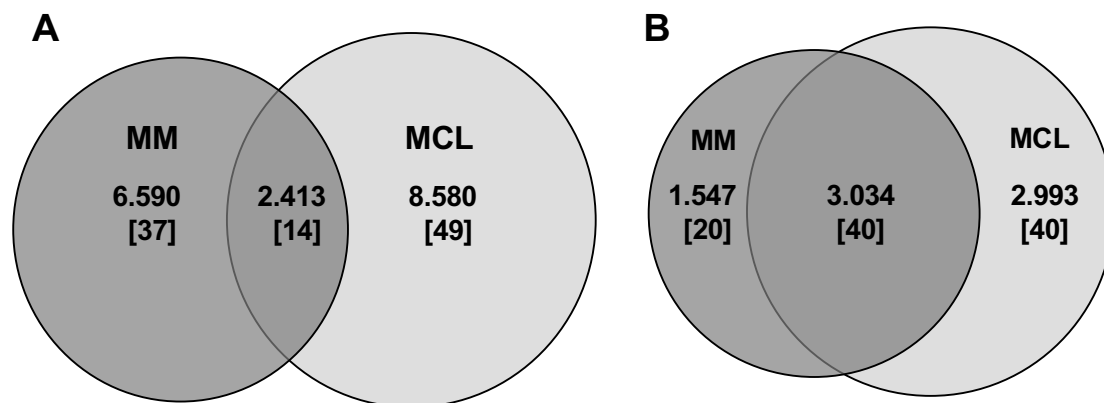


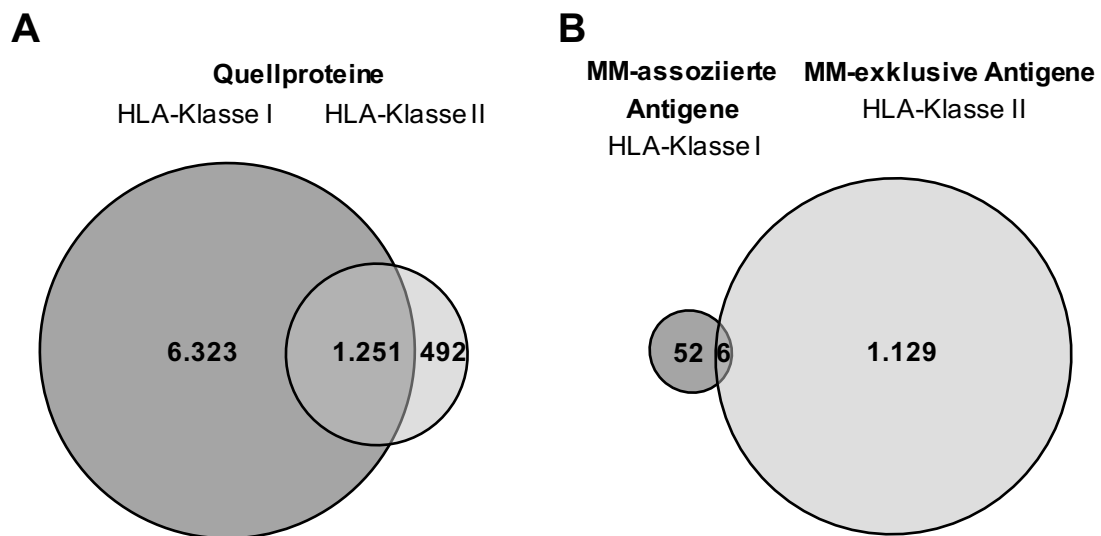
Abbildung 14: [A] Vergleich der HLA-Klasse I-Liganden von primären Myelomzellen und Myelomzelllinien. [B] Vergleich der zugehörigen Quellproteine der HLA-Klasse I-Liganden von primären Myelomzellen und MCL. MM, primäre Myelomzellen; MCL, Myelomzelllinie; Zahlen; Anzahl unterschiedlicher HLA-Klasse I-Liganden bzw. Quellproteine; [%].

Die insgesamt 17.583 identifizierten HLA-Klasse I-Liganden auf primären Myelomzellen und Myelomzelllinien stammten aus 7.574 unterschiedlichen Quellproteinen. 40% dieser Quellproteine waren in Form von unterschiedlichen Peptiden auf verschiedenen HLA-Klasse I-Allotypen sowohl auf primären Myelomzellen als auch auf Myelomzelllinien repräsentiert (Abb.14B).

3.1.2.6. Vergleich des HLA-Klasse I- und HLA-Klasse II-Ligandoms von primären Myelomzellen und Myelomzelllinien

Die Vergleichsanalyse der HLA-Klasse I- und II-Quellproteine der Myelomkohorte (primäre Myelomproben und MCL) ergab insgesamt 1.251

Quellproteine aus denen sowohl HLA-Klasse I- als auch HLA-Klasse II-Liganden identifiziert wurden (Abb.15A).



-

Abbildung 15: [A] Vergleichsanalyse der in der Myelomkohorte identifizierten HLA-Klasse I- und HLA Klasse II-Quellproteine. [B] Vergleichsanalyse der MM-assoziierten HLA-Klasse I-Antigene mit den MM-exklusiven HLA-Klasse II-Antigenen. Modifiziert nach Walz et. al. [164].

Um aus den neu definierten HLA-Klasse I Myelom-assoziierten Antigenen, diejenigen Antigenen zu identifizieren aus denen auch HLA-Klasse II-Liganden identifiziert wurden führten wir eine Vergleichsanalyse der 58 HLA-Klasse I Myelom-assoziierten Quellproteinen mit allen Myelom-exklusiven HLA-Klasse II-Quellproteinen durch. So konnten insgesamt 6 Antigenen, die durch 31 Peptide auf HLA-Klasse II präsentiert wurden, als HLA-Klasse I-und -II-übergreifende, möglicherweise synergistische Myelom-assoziierte Antigenen definiert werden (Tab.17, Abb.15B) [164].

Tabelle 17: Myelom-assoziierte HLA Klasse II-Antigene mit zugehörigen HLA-Klasse II-Liganden, die gleichzeitig in den neu definierten HLA-Klasse-I Myelom-assoziierten Antigenen beinhaltet waren; MM, Multiples Myelom; HLA, humanes Leukozytenantigen; modifiziert nach Walz et al. [164].

Quellprotein/ HLA-Klasse-II Ligand	Anzahl der positiven MM-Proben [%]
SLC1A5 solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5	2 [13.3]
AIILEAVNLPVDH	1
APVGIMFLVAGKIV	1
APVGIMFLVAGKIVE	1
AVFIAQLSQSLDF	1
EGNPLLKHYRGPAGDA	1
EGNPLLKHYRGPAGDAT	1
GNPLLKHYRGPAGDA	1
NPLLKHYRGPAGDA	1
NPLLKHYRGPAGDAT	1
NPC1 Niemann-Pick disease, type C1	2 [13.3]
LPVLLSYIGPSVNK	1
MPDDSYmVDYFKSISQ	1
MPDDSYmVDYFKSISQY	1
PVLLSYIGPSVNK	1
PDIA4 protein disulfide isomerase family A, member 4	2 [13.3]
DGDDVIIIIGVFKGESDPAY	1
ENGVLVNDANFDNFV	1
GYPTIKILKKGQAVDYE	1
GYPTIKILKKGQAVDYEG	1
NGVLVNDANFDNFV	1
YPTIKILKKGQAVD	1
YPTIKILKKGQAVDY	1
YPTIKILKKGQAVDYE	1
KDEL2 KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 2	2 [13.3]
mNIFRLTGDSLH	1
VGGLSFLVNHDFS	1
VPVGGLSFLVNHDFF	1
VPVGGLSFLVNHDFFS	1
VPVGGLSFLVNHDFFSP	1
VPVGGLSFLVNHDFFSPL	1
VPVGGLSFLVNHDFFSPLS	1
SLC1A4 solute carrier family 1 (glutamate/neutral amino acid transporter), member 4	1 [6.7]
IVDRTTTAVNVEG	1
IVDRTTTAVNVEGDA	1
SERPINH1 serpin peptidase inhibitor, clade H (heat shock protein 47), member 1, (collagen binding protein 1)	1 [6.7]
SLGGKATTASQAKAV	1

3.1.2.7. Identifikation von HLA-Liganden aus bereits beschriebenen Myelom-assoziierten Antigenen

In den vergangenen Jahren wurden einige Antigene als vielversprechende Ziele für die T-Zell-basierte Immuntherapie des MMs definiert [175]. Auf den analysierten Proben (10 primäre Myelom-Patienten, 5 MCLs, 45 HVs) konnten HLA-präsentierte Peptide aus 22 der 25 hier beschriebenen Antigenen

identifiziert werden (Abb.16). Es wurden keine HLA-präsentierten Peptide aus den Antigenen Dickkopf-1, CD138 und PASD1 identifiziert.

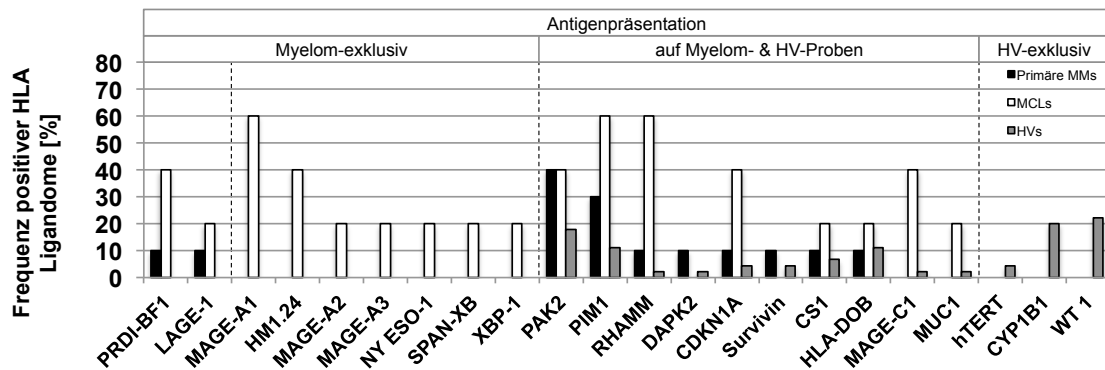


Abbildung 16: Literaturantigene und ihre Präsentation im HLA-Ligandom von primären Myelomzellen, MCLs und Proben gesunder Spender. MM, Multiples Myelom; MCL, Myelomzelllinie; HV, gesunder Spender; modifiziert nach Walz et al. [164].

HLA-Liganden aus den 22 identifizierten Antigenen wurden zu 41% Myelom-exklusiv präsentiert wobei lediglich PRDI-BF1 und LAGE-1 Myelom-exklusive Präsentation auf primären Myelomproben zeigten. 45% der Antigene wurden sowohl auf Myelomproben als auch auf Proben gesunder Spender identifiziert. HLA Liganden aus hTERT, CYP1B1 und WT-1 (14%) wurden exklusiv auf den Proben gesunder Spender identifiziert (Abb.16).

Betrachtet man die 9 in der Literatur beschriebenen Antigene, deren HLA-Liganden Myelom-exklusiv präsentiert wurden, zeigt sich, dass lediglich 22% der Antigene auf primären Myelom-Proben vorkommen, wohingegen der Großteil von 78% der Antigene ausschließlich auf Myelomzelllinien identifiziert

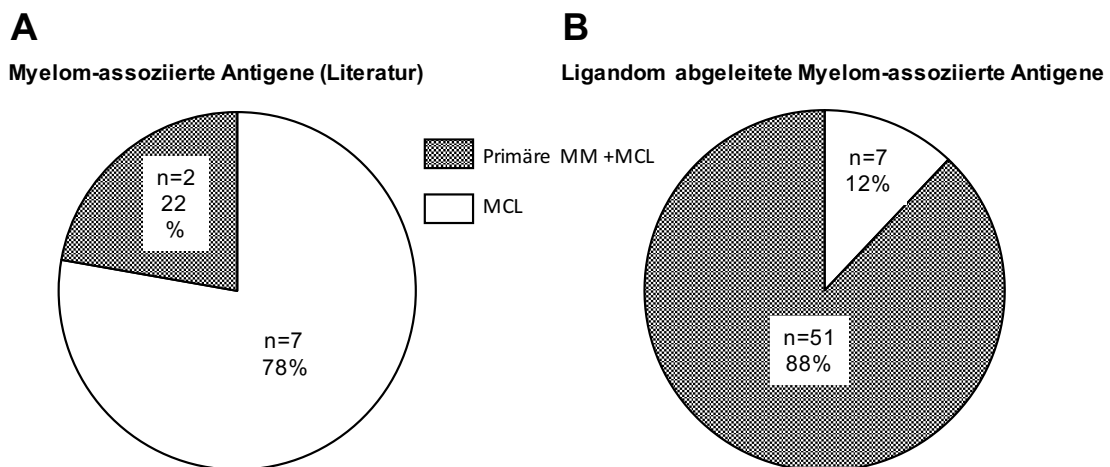


Abbildung 17: Repräsentation der Myelom-assoziierten Antigene (Literatur [A], Ligandom-abgeleitet [B]) im HLA-Ligandom primärer Myelom-Proben und von Myelomzelllinien. n, Anzahl; modifiziert nach Walz et al. [164].

wurde (Abb.17A). Im Gegensatz dazu wurden HLA-Liganden aus 51 (88%) der 58 im Rahmen dieser Arbeit neu definierten vom Ligandom abgeleiteten Myelom-assoziierten Antigene auch auf primären Myelomzellen identifiziert (Abb.17B) [164].

3.1.3. Testung der neu definierten Myelom-assoziierten Antigene auf Immunogenität

Um die Immunogenität einiger der neu definierten Myelom-assoziierten Antigene zu untersuchen wurden IFN- γ ELISPOTs durchgeführt. Hierzu wurden zunächst HLA-gepaarte PBMCs von Myelompatienten oder gesunden Spendern mit für 12 Tage, wie oben beschrieben, mit dem entsprechenden Peptid stimuliert.

3.1.3.1. Ergebnisse der IFN- γ ELISPOT-Analysen nach 12 Tagen Peptidstimulation

Insgesamt wurden 25 Peptide/HLA Liganden unterschiedlicher HLA Restriktion in IFN- γ ELISPOTs nach 12 Tagen Peptidstimulation getestet. Davon waren 11 Peptide HLA-A*02-, 2 Peptide HLA-A*03-, 1 Peptid HLA-A*11-, 1 Peptid HLA-

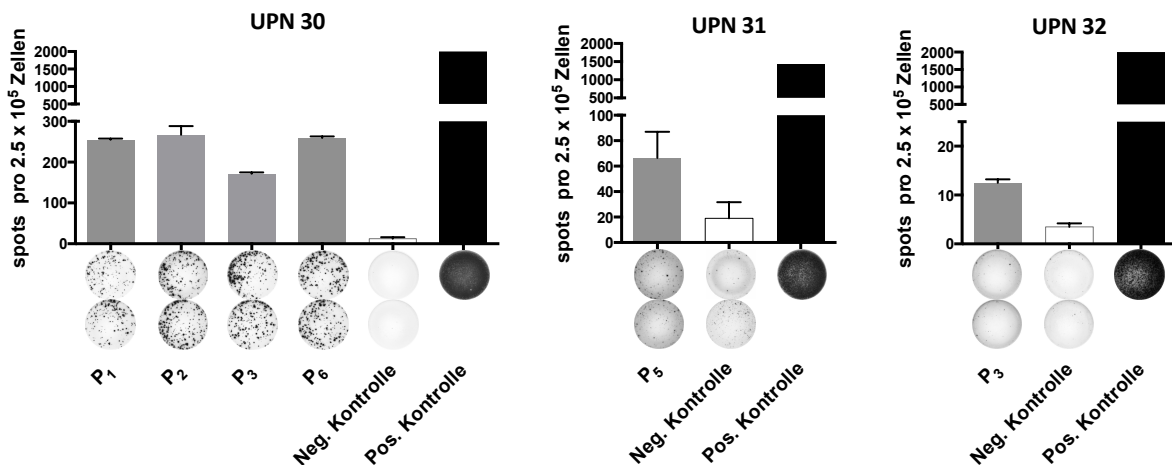


Abbildung 18: Beispiele positiver IFN- γ ELISPOTs für die oben beschriebenen Myelom-assoziierten T-Zell-Epitope in einzelnen Myelom-Patienten. Die häufig erkannten EBV-Antigene BRLF1 YVLDHLIVV (A*02), EBNA3 RLRAEAQVK (A*03), EBNA3 RPPFIRRL (B*07), BZLF1 RAKFKQLL (B*08), EBNA6 AEGGVGWRHW (B*44) wurden im Mix als Positivkontrolle verwendet. Von gesunden Spendern abgeleitete Peptide FAR2 KLFKVKKEV (A*02) und CD36 KPSEKIQVL (B*07) dienen als Negativkontrolle; UPN, *uniform patient number*; P, Peptid; modifiziert nach Walz et al. [164].

A*68-, 2 Peptide HLA-B*07-, 3 Peptide HLA-B*15-, 1 Peptid HLA-B*18- und 4 Peptide HLA-B*40-restringiert. In den IFN- γ ELISPOTs konnten T-Gedächtniszellen in Myelom-Patienten für fünf HLA-A*02- und ein HLA-B*07-restringiertes Peptid nachgewiesen werden, beispielhaft in Abbildung 18 für 3 Myelompatienten dargestellt (Tab.18, Abb.18).

Keines der hier positiv getesteten Peptide erbrachte in IFN- γ ELISPOTs aus PBMCs gesunder Spender (jeweils n=10) positive Ergebnisse [164].

Tabelle 18: Peptide, für welche T-Gedächtniszellen im IFN- γ ELISPOT aus PBMCs von MM-Patienten nachgewiesen werden konnten. MM, Multiples Myelom; P, Peptid; modifiziert nach Walz et al. [164].

	Sequenz	HLA-Restriktion	Quellprotein	Getestete MM-Patienten [Anzahl]	MM-Patienten mit nachgewiesene T-Gedächtniszellen [%]
P ₁	KAMEAASSL	A*02	MMSET	16	13
P ₂	SLLEQGLVEA	A*02	MMSET	8	13
P ₃	FVFPGELLL	A*02	SLC1A5	14	14
P ₄	FLFQLLQLL	A*02	SEMA4A	14	7
P ₅	LPPPPHVPL	B*07	SLX1A	6	17
P ₆	LAHVGPRRL	A*02	SLX1A	14	14

3.2. Einfluss des Proteasomen-Inhibitors Carfilzomib auf die HLA-Expression und Peptidpräsentation von Myelomzellen

3.2.1. HLA-Oberflächenexpression auf Myelomzellen unter dem Einfluss des Proteasomen-Inhibitors Carfilzomib

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der oben beschriebenen Durchflusszytometrie-basierten absoluten HLA-Quantifikation auf Myelomzellen unter dem Einfluss des Proteasomen-Inhibitors Carfilzomib im zeitlichen Verlauf (nach 24 h bzw. 48 h) beschrieben. Es wurden MCLs (n=4) und primäre Myelomzellen von Myelom-Patienten *in vitro* (n=7) wie oben beschrieben mit Carfilzomib behandelt; zusätzlich wurde die HLA-Oberflächenexpression auf primären Myelomzellen von zwei Myelom-Patienten vor und nach dem ersten Zyklus der Carfilzomib/Dexamethason-Behandlung *ex vivo* beobachtet.

3.2.1.1. HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression auf Myelomzellen aus MCLs unter der Behandlung mit Carfilzomib

Um einen objektiven Vergleich zu generieren wurden jeweils ein Teil der Myelomzelllinien (n=4) mit dem Proteasomen-Inhibitor Carfilzomib und ein zweiter Teil derselben Probe als MOCK-Kontrolle mit Glukose 5%, der Trägerlösung von Carfilzomib, behandelt.

3.2.1.1.1. HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression auf Myelomzellen aus MM.1S unter der Behandlung mit Carfilzomib

Durch die Behandlung mit Carfilzomib konnten nach 24 h nur noch 12,7% der Myelomzellen als viabel detektiert werden, wohingegen die Zellzahl pro ml in der MOCK-Kontrolle um 23,3% zunahm. Nach 48 h blieben die viablen Zellen in der Carfilzomib-behandelten Fraktion auf dem niedrigen Niveau stabil, dagegen sank die Dichte in der MOCK-Kontrolle leicht ab (Abb.19A). Die HLA-Oberflächenexpression auf Myelomzellen lag sowohl in der Carfilzomib-behandelten als auch in der MOCK-behandelten Fraktion zu beiden Zeitpunkten über dem Niveau vor Behandlung. Die Carfilzomib-Behandlung zeigte dabei sowohl nach 24 h als auch nach 48 h eine stärkere Modulation der HLA-Klasse I-Oberflächenexpression als die MOCK-Behandlung (Abb.19B). Für HLA-DR lag die Oberflächenexpression in der Carfilzomib-behandelten Fraktion nach 24 h deutlich höher als in der MOCK-behandelten Fraktion, nach 48 h zeigte sich ein entgegengesetztes Bild (Abb.19C) [176].

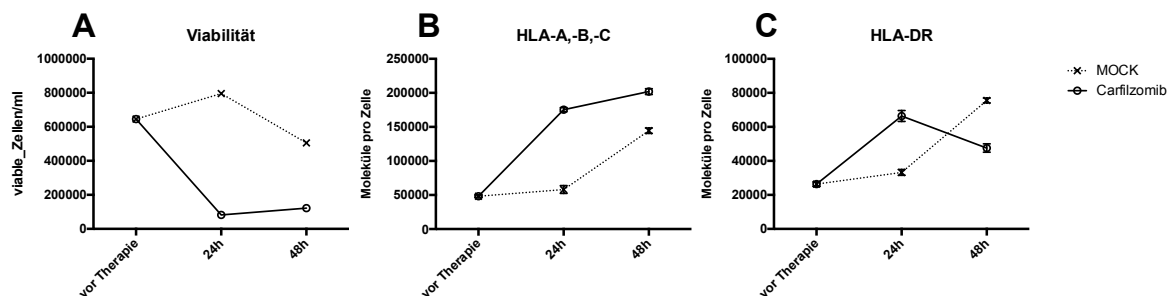


Abbildung 19: [A] Viabilität der Myelomzellen; [B] HLA-Klasse I-Oberflächenexpression pro Zelle; [C] HLA-DR-Oberflächenexpression pro Zelle; MOCK, Kontrollprobe; modifiziert nach Kowalewski/Walz et al. [176].

3.2.1.1.2. HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression auf Myelomzellen aus U266 unter der Behandlung mit Carfilzomib

Die Viabilität der Myelomzellen nahm in der Carfilzomib-behandelten Fraktion sowohl nach 24 h als auch nach 48 h ab, im Gegensatz dazu zeigte sich in der MOCK-Kontrolle eine Dichtezunahme der viablen Zellen zu beiden Zeitpunkten (Abb.20A). Für beide behandelten Fraktionen zeigte sich nach den jeweiligen Behandlungen höhere HLA-Klasse I-Molekülzahlen an der Zelloberfläche als vor Behandlung, wobei der Effekt in der Carfilzomib-behandelten Fraktion stärker ausfiel (Abb.20B). Die HLA-DR-Oberflächenexpression lag nach 24 h in beiden Fraktionen auf einem nahezu unveränderten Level. Nach 48 h zeigte die MOCK-Kontrolle eine deutlich höhere HLA-DR Oberflächenexpression als die Carfilzomib-behandelte Fraktion (Abb.20C) [176].

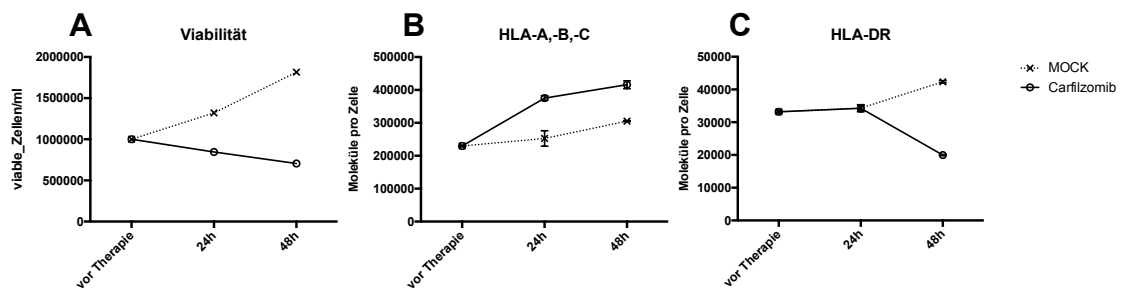


Abbildung 20: [A] Viabilität der Myelomzellen/ml; [B] HLA-Klasse I-Oberflächenexpression pro Zelle; [C] HLA-DR-Oberflächenexpression pro Zelle; MOCK, Kontrollproben.

3.2.1.1.3. HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression auf Myelomzellen aus RPMI8226 unter der Behandlung mit Carfilzomib

Die Viabilität in der Carfilzomib-behandelten und in der MOCK-behandelten Fraktion unterschied sich weder nach 24 h noch nach 48 h deutlich (Abb.21A).

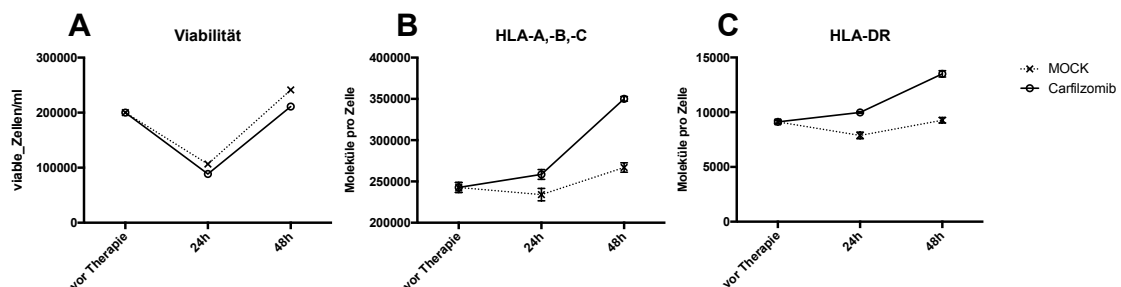


Abbildung 21: [A] Viabilität der Myelomzellen/ml; [B] HLA-Klasse I Oberflächenexpression pro Zelle; [C] HLA-DR-Oberflächenexpression pro Zelle; MOCK, Kontrollproben.

Sowohl die Oberflächenexpression der HLA-Klasse I als auch von HLA-DR lagen nach 24 h und 48 h in der Carfilzomib-behandelten Fraktion höher als in der MOCK-Kontrolle (Abb.21B,C) [176].

3.2.1.1.4. HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression auf Myelomzellen aus JJN3 unter der Behandlung mit Carfilzomib

Nach 24 h war in der Carfilzomib-behandelten Fraktion eine um 12,5% geringere Anzahl an viablen Myelomzellen zu detektieren als vor Behandlung, wohingegen die Anzahl an viablen Myelomzellen in der MOCK-Kontrolle um 43,7% zunahm (Abb.22A). Weder nach 24 h noch nach 48 h zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Oberflächenexpression von HLA-Klasse I und HLA-DR sowohl in der Carfilzomib-behandelten als auch in der Kontroll-Fraktion, wobei die jeweiligen HLA-Molekülzahlen niedriger lagen als vor Behandlung (Abb.22B,C) [176].

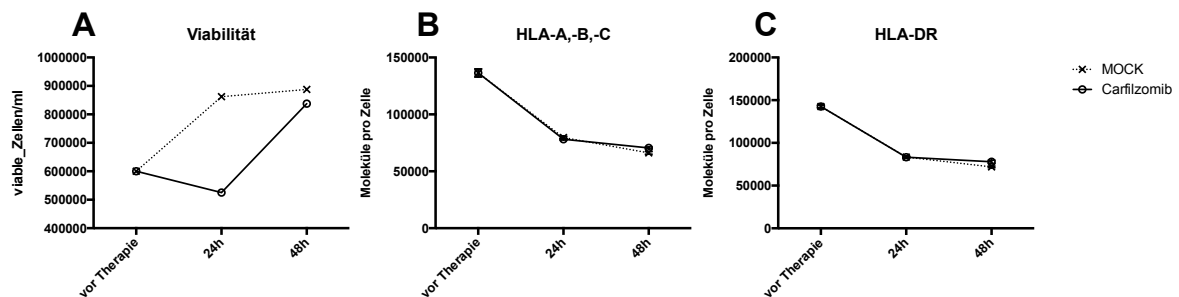


Abbildung 22: [A] Viabilität der Myelomzellen/ml; [B] HLA-Klasse I-Oberflächenexpression pro Zelle; [C] HLA-DR-Oberflächenexpression pro Zelle; MOCK, Kontrollproben.

3.2.1.2. HLA-Klasse I-Oberflächenexpression auf primären Myelomzellen aus dem KM von Myelom-Patienten unter *in vitro*-Behandlung mit Carfilzomib

Knochenmarkaspirate von Myelom-Patienten (n=7) wurden kultiviert und wie oben beschrieben mit dem Proteasomen-Inhibitor Carfilzomib behandelt.

3.2.1.2.1. HLA-Klasse I-Oberflächenexpression auf primären Myelomzellen aus dem KM von Myelom-Patienten unter der Behandlung mit Carfilzomib

Bei nahezu allen primären Proben zeigte sich unter der Behandlung mit Carfilzomib im Vergleich zur MOCK-Kontrolle sowohl nach 24 h als auch nach 48 h eine etwas niedrigere Oberflächenexpression von HLA-Klasse I-Molekülen auf Myelomzellen (Abb.23A).

Mit der geringsten HLA-Klasse I-Oberflächenexpression von knapp 180.000 HLA-Molekülen pro Zelle nach 24 h bei UPN12 kam es jedoch nie zu einem totalen Verlust der HLA-Klasse I-Moleküle auf der Zelloberfläche sondern lediglich zu einer moderaten Herunterregulation (Abb.23B) [176].

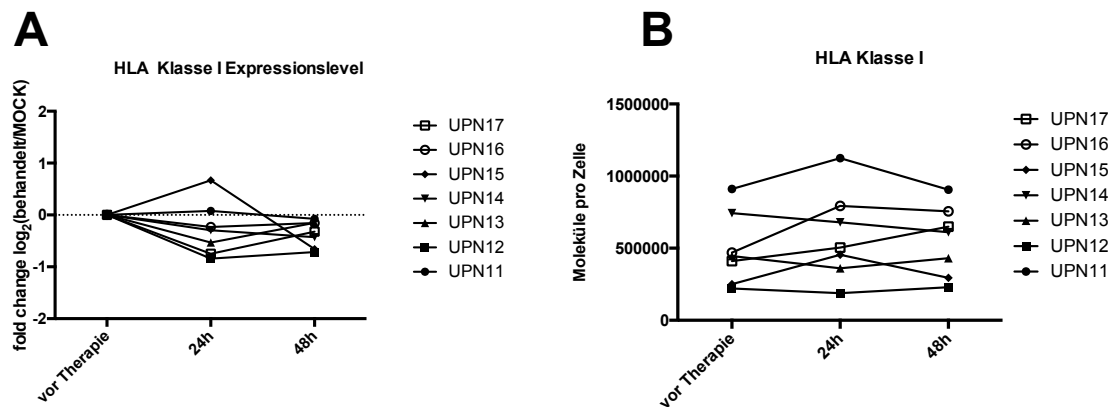


Abbildung 23: [A] Änderung der HLA-Klasse I-Oberflächenexpression auf primären Myelomzellen unter Carfilzomib-Behandlung, Bezogen auf die MOCK-Kontrolle; [B] Absolute HLA-Klasse I-Oberflächenexpression pro Zelle unter Carfilzomib-Behandlung; MOCK, Kontrollfraktion; FC, fold change; HLA, humanes Leukozytenantigen; UPN, *uniform patient number*, modifiziert nach Kowalewski /Walz et al. [176].

3.2.1.3. HLA-Klasse I- Oberflächenexpression auf primären Myelomzellen aus dem KM von Myelom-Patienten unter *in vivo*-Behandlung mit Carfilzomib

Bei 2 Patienten, die eine Behandlung mit Carfilzomib und Dexamethason erhielten, konnten sowohl vor als auch nach dem ersten Zyklus Myelomzellen aus dem Knochenmark isoliert werden. Bei UPN18 kam es nach 4 Wochen Behandlung zu einer moderaten Herunterregulation der HLA-Klasse I-Oberflächenexpression auf Myelomzellen; bei UPN13 lag die HLA-Klasse I-

Oberflächenexpression nach dem ersten Zyklus deutlich über dem Ausgangsniveau (Abb.24) [176].

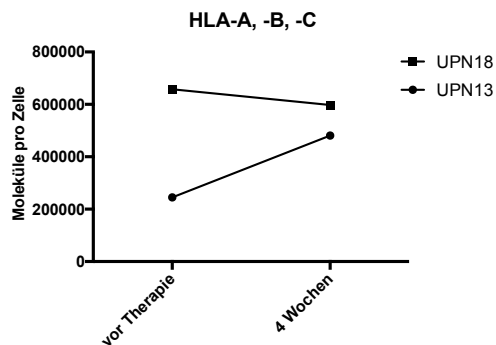


Abbildung 24: HLA-Klasse I-Oberflächenexpression auf primären Myelomzellen unter *in vivo*-Carfilzomib-Behandlung; UPN, *uniform patient number*; modifiziert nach Kowalewski/Walz et al. [176]

3.2.2. Veränderung der Peptidpräsentation auf Myelomzellen unter dem Einfluss des Proteasomen-Inhibitors Carfilzomib

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der direkten Massenspektrometrie-basierten HLA-Ligandomanalyse der Myelomzelllinie MM.1S, die nach oben genannten Schema mit Carfilzomib bzw. als Vergleich mit seiner Trägerlösung, fünfprozentiger Glukoselösung, jeweils in biologischen Triplikaten behandelt wurde, dargestellt. Ebenso erfolgte die HLA-Ligandomanalyse der MCL U266 die ebenfalls mit Carfilzomib in 3 biologischen Replikaten behandelt wurde. Als Vergleich diente hier jedoch lediglich die unbehandelte Probe zum Zeitpunkt 0. Eine MOCK-Kontrolle wurde für U266 nicht durchgeführt. Die Methode der markierungsfreien massenspektrometrischen Quantifizierung (*label-free quantitation*, LFQ) erlaubt eine semiquantitative Analyse der HLA-Klasse I Peptidpräsentation auf den jeweiligen untersuchten Zellen.

3.2.2.1. HLA-Ligandomanalyse von Myelomzelllinien unter der Behandlung mit Carfilzomib

Insgesamt konnten für die MCL MM.1S 2.575 unterschiedliche Peptide aus der HLA-Klasse I-Präparation identifiziert werden, von welchen laut NetMHC knapp 75% Binder eines HLA-Klasse I-Allotyps dieser Zelllinie (A*23:01, A*24:02, B*18:01, B*42:01, C*12:03) waren. In den unbehandelten Zellfraktionen konnten durchschnittlich 1.164 HLA-Klasse I-Liganden identifiziert werden. In der Carfilzomib-behandelten Fraktion konnten nach 24 Stunden durchschnittlich 660, nach 48 Stunden durchschnittlich 647 unterschiedliche Peptide laut

NetMHC einem der HLA-Allotypen der MCL MM.1S als Binder zugeordnet werden.

In der Kontrollfraktion wurden im Mittel nach 24 Stunden 1.207 und nach 48 Stunden 1209 unterschiedliche HLA-Klasse I-Liganden identifiziert (Abb.25). [176].

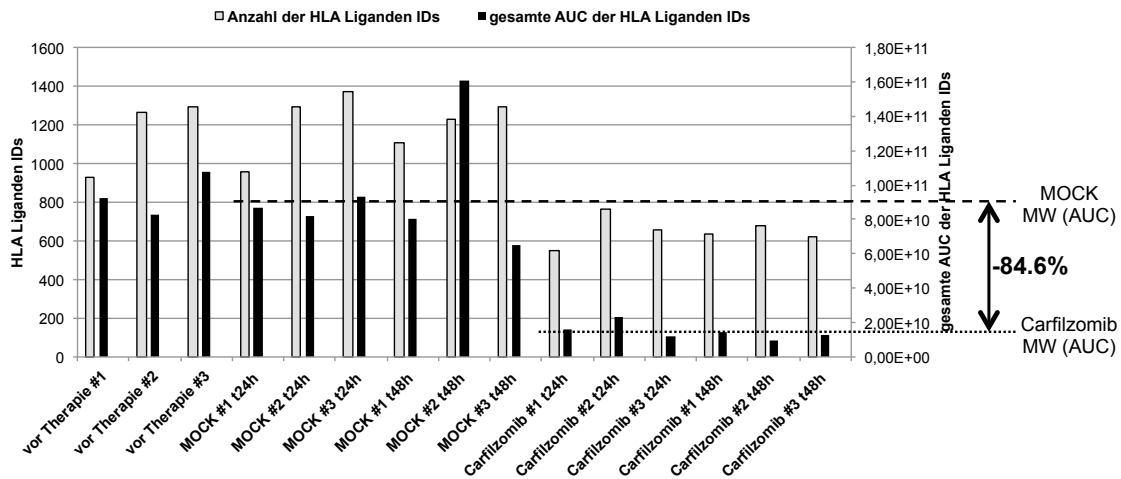


Abbildung 25: Anzahl unterschiedlicher HLA-Klasse I-Liganden der Myelomzelllinien MM.1S (grau). Relative Gesamtpeptidmenge (AUC der HLA-Liganden) in der jeweiligen Probe (schwarz). HLA, humanes Leukozytenantigen, IDs, Identifikationen; MOCK, Kontrollproben; MW, Mittelwert; AUC, *area under the curve*; modifiziert nach Kowalewski/Walz et al. [176].

604 HLA-Klasse I-Liganden konnten ausschließlich auf unbehandelten bzw. MOCK-behandelten und 333 HLA-Klasse I-Liganden ausschließlich auf Carfilzomib-behandelten Myelomzellen identifiziert werden; 971 HLA-Klasse I-Liganden waren in beiden Fraktionen detektierbar (Abb.26).

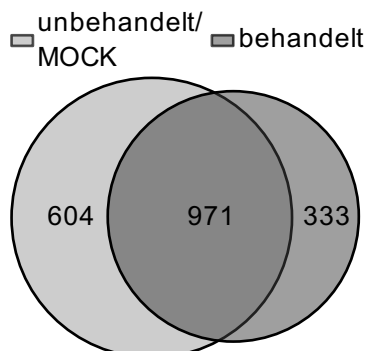


Abbildung 26: Anzahl der HLA-Klasse I-Liganden in der behandelten bzw. unbehandelten/MOCK-Fraktion. MOCK, Kontrollprobe; modifiziert nach Kowalewski/Walz et al. [176].

Für die MCL U266 konnten insgesamt 3.730 unterschiedliche Peptide aus der HLA-Klasse I-Präparation identifiziert werden, von welchen laut NetMHC mehr

als 82% Binder eines der HLA-Klasse I-Allotypen von U266 (A*02:01, A*03:01, B*07:02, B*40:01, C*07:02) waren [176].

3.2.2.2. Veränderung der identifizierten HLA-Liganden auf Myelomzellen unter der Behandlung mit Carfilzomib

Im Folgenden wurden die quantitativen Veränderungen der zuvor definierten HLA-Klasse I-Liganden und insbesondere der in den zwei untersuchten Zelllinien nachweisbaren Myelom-assoziierten Liganden unter der *in vitro*-Behandlung mit Carfilzomib beobachtet. Mittels LFQ-Analyse war es möglich in der MCL MM.1S quantitative Veränderungen für 32 der in dieser Arbeit definierten Myelom-assoziierten Peptide zu verfolgen. Auf U266 konnten 50 dieser Myelom-assoziierten Peptide identifiziert und verfolgt werden. Insgesamt konnte so mittels dieses Modells der Verlauf von 72 unterschiedlichen Myelom-assoziierten Peptiden nachverfolgt werden (Tab.19). Die große Mehrheit von 86% der verfolgbaren HLA-Klasse I-präsentierten Myelom-assoziierten Peptide zeigten im Behandlungsverlauf mit Carfilzomib im oben beschriebenen MCL-Modell bezüglich der relativen Peptidmenge keine signifikante Modulation oder wurden vermehrt präsentiert. Lediglich knapp 14% der verfolgten Myelom-assoziierten Peptide wurden signifikant vermindert präsentiert, waren aber dennoch auf der Zelloberfläche der Myelomzellen nachweisbar (Tab.19).

Tabelle 19: Regulation der Myelom-assoziierten Peptide im Verlauf der Carfilzomib-Behandlung in den einzelnen Replikaten der MCLs MM.1S und U266 mit oder ohne signifikante Regulation der relativen Peptidmenge. 0, keine signifikante Regulation; -1/blau, relative Peptidmenge signifikant herunterreguliert; 1/rot, relative Peptidmenge signifikant hochreguliert; #, Replikat; modifiziert nach Kowalewski/Walz et al. [176].

MM-assoziiertes Peptid	HLA	Quellprotein	MCL	24#1	24#2	24#3	48#1	48#2	48#3
KAMEAASSL	B*07:02	WHSC1	U266	-1	-1	-1	-1	-1	-1
KPKDPLKISL	B*07:02	PPP2R3C	U266	-1	-1	-1	0	-1	-1
RYLDLFTSF	A*24:02	KDELR2	MM.1S	-1	-1	-1	0	-1	-1
RVFPYSVIFY	A*03:01	NPC1	U266	-1	0	0	-1	-1	-1
AFIQAGIFQEF	A*23:01	RAD1	MM.1S	-1	0	-1	0	0	-1
SRGDFVVEY	C*07:02	SETD8	U266	0	-1	0	0	0	-1
IIFDRPLLY	A*03:01	DOLK	U266	0	0	0	0	0	-1
SEFDFFERL	C*12:03	SEMA4A	MM.1S	0	0	0	0	0	-1
SVYSPVKKK	A*03:01	NUPL2	U266	0	0	-1	0	0	0
YVFPGVTRL	C*12:03	SPATC1L	MM.1S	0	0	0	-1	0	0
AEQEIARLVL	B*40:01	CREB3	U266	0	0	0	0	0	0
ALWGRITLK	A*03:01	DAP3	U266	0	0	0	0	0	0
FAQIISVALI	C*12:03	DOLK	MM.1S	0	0	0	0	0	0
FAYPAIRYL	C*12:03	DAP3	MM.1S	0	0	0	0	0	0
FLWDEGFHQL	A*02:01	MOGS	U266	0	0	0	0	0	0
FVFPGELL	C*12:03	SLC1A5	MM.1S	0	0	0	0	0	0
GETAFAPHL	B*40:01	SLX1A	U266	0	0	0	0	0	0
GEVAPSMFL	B*40:01	NPC1	U266	0	0	0	0	0	0
GEVQDLLVRL	B*40:01	BAZ2A, BAZ2B	U266	0	0	0	0	0	0
GPRPITQSEL	B*07:02	UBL7	U266	0	0	0	0	0	0
IESHPDNAL	B*40:01	NAE1	U266	0	0	0	0	0	0
ILRDGITAGK	A*03:01	BTN3A1, BTN3A2, BTN3A3	U266	0	0	0	0	0	0
ILWETVPSM	A*02:01	FNDC3B	U266	0	0	0	0	0	0
IPAKPPVSF	B*07:02	TXNDC11	U266	0	0	0	0	0	0
IPAKPPVSF	B*42:01	TXNDC11	MM.1S	0	0	0	0	0	0
KAVNPGRSL	B*07:02	BFAR	U266	0	0	0	0	0	0
KILKPVKKK	A*03:01	CSNK2A1, CSNK2A3,C SNK2A3	U266	0	0	0	0	0	0
KLPLPLPPRL	A*02:01	HSH2D	U266	0	0	0	0	0	0
KLSSLILM	A*02:01	SERPINH1	U266	0	0	0	0	0	0
KPQPRPQTL	B*07:02	DYRK4	U266	0	0	0	0	0	0
KPSTKALVL	B*07:02	RAD1	U266	0	0	0	0	0	0
KTEVHIRPK	A*03:01	LAP3	U266	0	0	0	0	0	0
LAFPGEMLL	A*02:01	SLC1A4	MM.1S	0	0	0	0	0	0

MM-assoziiertes Peptid	HLA	Quellprotein	MCL	24#1	24#2	24#3	48#1	48#2	48#3
LLFPYILPPK	A*03:01	SNX14	U266	0	0	0	0	0	0
LPPPPHVPL	B*07:02	SLX1A	U266	0	0	0	0	0	0
NEFPVFDEF	B*18:01	MB21D1	MM.1S	0	0	0	0	0	0
PELGPLPAL	B*40:01	LRRC47	U266	0	0	0	0	0	0
REEGTPLTL	B*40:01	NOC2L	U266	0	0	0	0	0	0
RPFHGWTSL	B*07:02	MOGS	U266	0	0	0	0	0	0
RPGPPTRPL	B*07:02	FNDC3B	U266	0	0	0	0	0	0
RPHGGKSL	B*42:01	TXNDC11	MM.1S	0	0	0	0	0	0
RPKAQPTTL	B*07:02	MED27	U266	0	0	0	0	0	0
RPQLKGVVL	B*07:02	MRPS12	U266	0	0	0	0	0	0
RPQLKGVVL	B*42:01	MRPS12	MM.1S	0	0	0	0	0	0
RPRPPVLSV	B*07:02	ZBTB21	U266	0	0	0	0	0	0
RQFWTRTKK	A*03:01	MRPL55	U266	0	0	0	0	0	0
RVAKTNSLR	A*03:01	CDCA8	U266	0	0	0	0	0	0
RVNKVIIGTK	A*03:01	EIF2B2	U266	0	0	0	0	0	0
RYFKGPELL	A*24:02	CSNK2A1	MM.1S	0	0	0	0	0	0
RYSPLSRF	A*24:02	COG1	MM.1S	0	0	0	0	0	0
RYSTQIHSF	A*24:02	BHLHA15	MM.1S	0	0	0	0	0	0
SESLPVRTL	B*40:01	FNDC3B	U266	0	0	0	0	0	0
SPALKRDL	B*07:02	COG1	U266	0	0	0	0	0	0
SPALPGLKL	B*42:01	TNFRSF13B	MM.1S	0	0	0	0	0	0
SPRLSLLYL	B*07:02	BFAR	U266	0	0	0	0	0	0
SPRQALDF	B*07:02	COG1	U266	0	0	0	0	0	0
SPYLRPLTL	B*07:02	NUDT14	U266	0	0	0	0	0	0
SYLNSVQRL	A*24:02	NUPL2	MM.1S	0	0	0	0	0	0
TFLPFIHTI	A*23:01	BFAR	MM.1S	0	0	0	0	0	0
TPAVGRLEV	B*07:02	CDCA8	U266	0	0	0	0	0	0
TPAVGRLEV	B*42:01	CDCA8	MM.1S	0	0	0	0	0	0
TPSSRPASL	B*07:02	UBL7	U266	0	0	0	0	0	0
VPLPPKGRVL	C*12:03	TMEM126B	MM.1S	0	0	0	0	0	0
YLYITKVLK	A*03:01	KDELRL1, KDELRL2	U266	0	0	0	0	0	0
YYLNEIQSF	A*24:02	SPATC1L	MM.1S	0	0	0	0	0	0
APRHPSTNSL	B*42:01	NDUF4F4	MM.1S	0	0	1	0	0	0
NEVIMTIGF	B*18:01	EIF2B	MM.1S	0	0	0	0	1	0
RPKAQPTTL	B*42:01	MED27	MM.1S	0	0	1	0	0	0
TASPLVKSV	C*12:03	ARHGAP11A	MM.1S	0	0	0	0	1	0
EYGHIPSF	A*24:02	ARHGAP11A	MM.1S	1	1	0	0	0	0
FAYPAIRYL	A*02:01	DAP3	U266	0	0	0	1	0	1
FVFPGELLL	A*02:01	SLC1A5	U266	1	1	0	0	0	0

MM-assoziiertes Peptid	HLA	Quellprotein	MCL	24#1	24#2	24#3	48#1	48#2	48#3
KEGLILPETL	B*40:01	CREB3	U266	1	1	0	0	0	0
TPSSRPASL	B*42:01	UBL7	MM.1S	1	1	0	0	0	0
APFQGDQRS	B*07:02	IRF9	U266	0	1	1	0	1	0
APRHPSTNSL	B*07:02	NDUFAF4	U266	0	1	0	1	1	0
APRHPSTNSLL	B*07:02	NDUFAF4	U266	0	1	0	1	1	0
KPQPRPQTL	C*12:03	DYRK4	MM.1S	1	1	1	0	0	0
KPRPPQGL	B*07:02	MOGS	U266	0	0	0	1	1	1
KPRPPQGL	B*42:01	MOGS	MM.1S	1	1	1	1	0	0
IEHPSMSVY	B*18:01	TP53INP1	MM.1S	1	1	1	0	1	1
VPLTRVSGGAA	B*42:01	SEMA4A	MM.1S	1	1	1	1	1	1

Auf der Myelomzelllinie MM.1S unterlagen 14 der 32 zuvor definierten Myelom-assoziierten Liganden unter der Behandlung mit Carfilzomib in mindestens einem Replikat einer signifikanten Modulation der relativen Peptidmenge. 10 dieser 14 Myelom-assoziierten Liganden unterlagen einer Hochregulation wohingegen die restlichen 4 Liganden weniger stark exprimiert wurden. Um die Kinetik dieser 14 Myelom-assoziierten Liganden genauer betrachten zu können wurden diese detailliert über die Zeit der Behandlung mit Carfilzomib hinsichtlich ihrer relativen quantitativen Präsentation betrachtet (Abb.27). So zeigte sich, dass 10 dieser 14 Liganden ihre maximale Hoch- bzw. Herunterregulation nach 24 h Behandlung erfuhren und im Verlauf nach 48 h wieder in Richtung Ausgangswert reguliert wurden. 4 Liganden zeigten vom Zeitpunkt vor Behandlung bis 48 h nach Behandlung eine stetig ansteigende (1 Ligand) bzw. abfallende (3 Liganden) relative Präsentation (Abb.27). Auf der MCL U266 unterlagen 13 der 50 verfolgten LiTAPs einer signifikanten Modulation der relativen Peptidmenge wobei 6/50 herunterreguliert und 7/50 hochreguliert präsentiert wurden [176]. Wie bei den verfolgten Myelom-assoziierten Peptiden beobachtet, unterlag auch die große Mehrheit der gesamten verfolgten HLA-Klasse I-Liganden unter Behandlung mit Carfilzomib weder auf MM.1S noch auf U266 einer signifikanten Modulation.

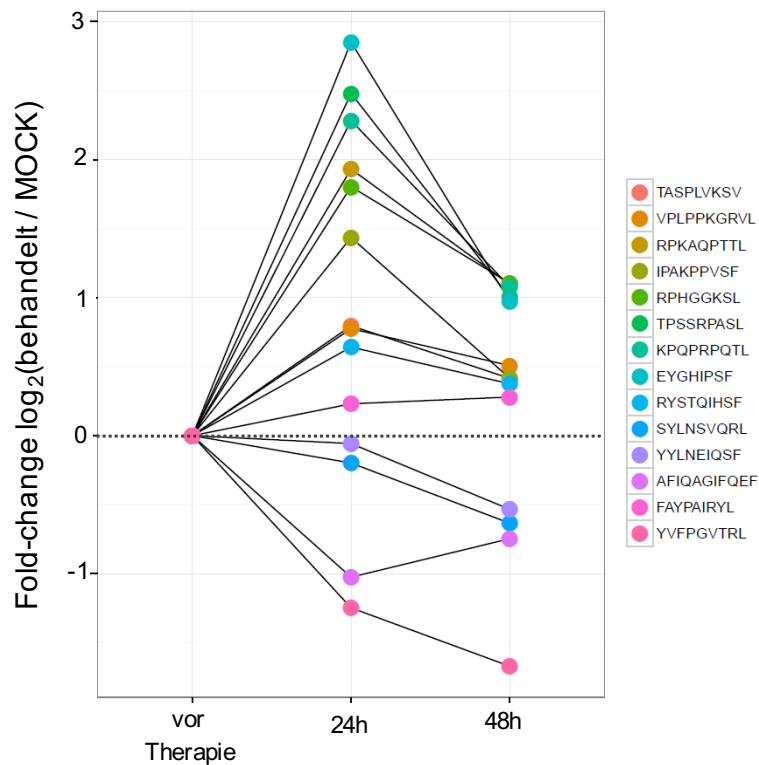


Abbildung 27: Longitudinale Analyse der Präsentation der 14 auf MM.1S detektierten Myelom-assoziierten Liganden unter Carfilzomib-Behandlung. Dargestellt ist die relative quantitative Änderung ihrer Präsentation in der Carfilzomib-behandelten im Vergleich zur MOCK-behandelten Fraktion nach 24 h und 48 h (Mittelwert über jeweils 3 Replikate). MOCK, Kontrollfraktion; modifiziert nach Kowalewski/Walz et al. [176].

Auf MM.1S blieben hierbei nach 24 h im Mittel $82,1 \pm 2,0\%$ der HLA-Klasse I-Liganden stabil präsentiert, wobei $11,5 \pm 1,3\%$ herunterreguliert und $6,3 \pm 0,8\%$ hochreguliert präsentiert wurden (Abb.28A). Nach 48 h zeigte sich mit $82,9 \pm 6,2\%$ stabil präsentierten HLA-Klasse I-Liganden ($12,1 \pm 4,1\%$ herunterreguliert; $5,0 \pm 2,3\%$ hochreguliert) ein ähnliches Bild (Abb.28B). Auch auf der Myelomzelllinie U266 konnte eine vergleichbare Modulation des HLA-Ligandoms beobachtet werden. Hier blieben nach 24 h Behandlung $88,8 \pm 0,8\%$ ($5,1 \pm 0,5\%$ herunterreguliert; $6,1 \pm 0,6\%$ hochreguliert) und nach 48 h $86,0 \pm 3,2\%$ ($9,1 \pm 3,5\%$ herunterreguliert; $5,0 \pm 1,0\%$ hochreguliert) der identifizierten HLA Klasse I-Liganden stabil präsentiert (Abb.29AB). Wurde die Regulation der HLA-Liganden auf MM.1S in den MOCK-Kontrollen im Vergleich zum Zustand vor Behandlung betrachtet, zeigte sich nach 24 h und 48 h jedoch nahezu keine Regulation ($\leq 1\%$) (Abb.28CD).

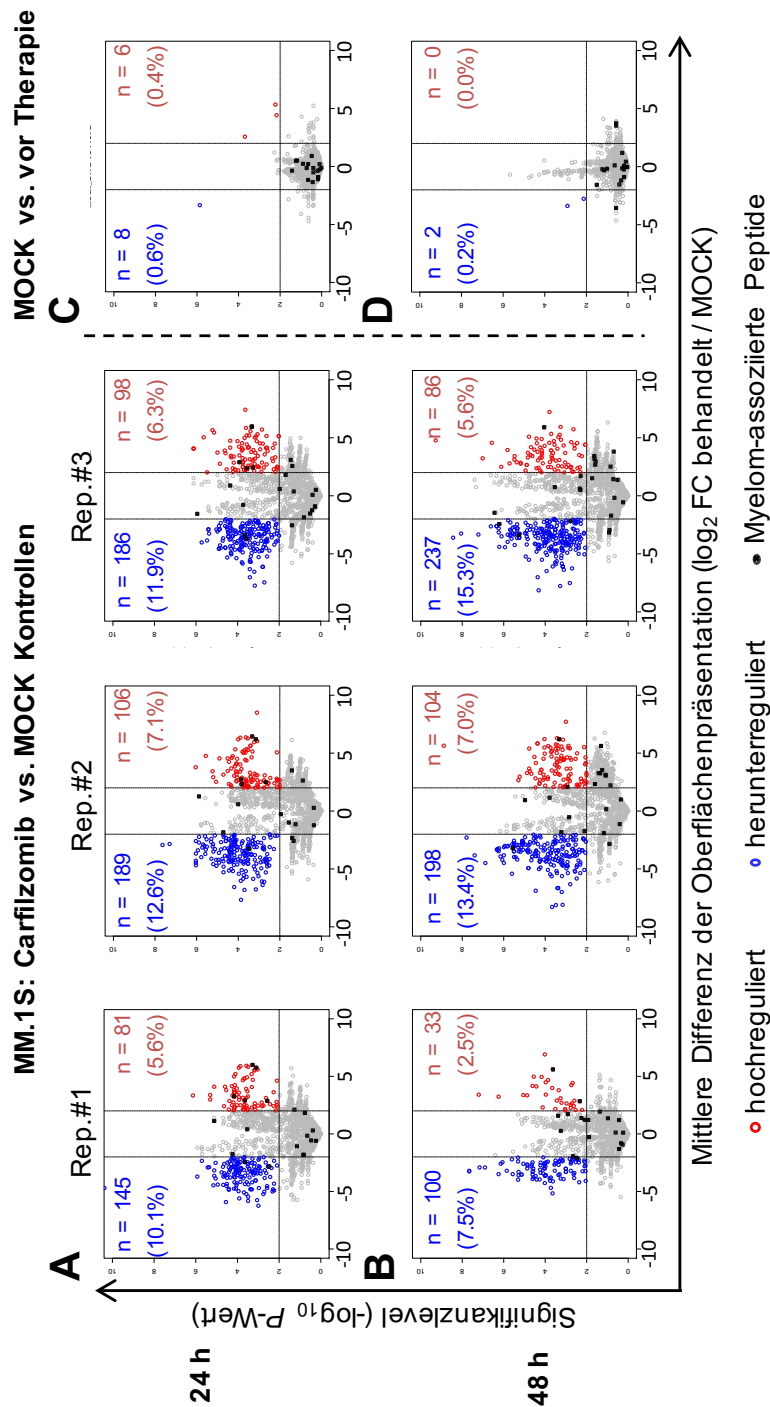


Abbildung 28: Modulation der HLA-Klasse I-Liganden auf der Myelomzelllinie MM.1S dargestellt in einem sogenannten „Vulcano-Plot“. Dargestellt ist die relative quantitative Änderung der HLA-Liganden-Präsentation von mit Carfilzomib behandelten Myelomzellen im Vergleich zu MOCK-behandelten Myelomzellen nach 24 h [A] und 48 h [B] jeweils in 3 Replikaten bzw. die Änderung der HLA-Liganden-Präsentation von MOCK-behandelten Zellen nach 24 h [C] und 48 h [D] im Vergleich zum Zustand vor Behandlung. Jeder Punkt entspricht einem HLA-Liganden. In blau sind die HLA-Liganden gezeigt die signifikant herunterreguliert sind, in rot die HLA-Liganden die signifikant hochreguliert sind (Fold change ≥ 4 , $p \leq 0.01$ nach Benjamini-Hochberg *correction*). In den oberen Ecken wird jeweils der Prozentsatz signifikant regulierter HLA-Liganden angegeben. Die schwarzen Punkte entsprechen Myelom-assoziierten HLA-Liganden. MOCK, Kontrollfraktion; Rep., Replikat; FC, fold change; modifiziert nach Kowalewski/Walz et al. [176].

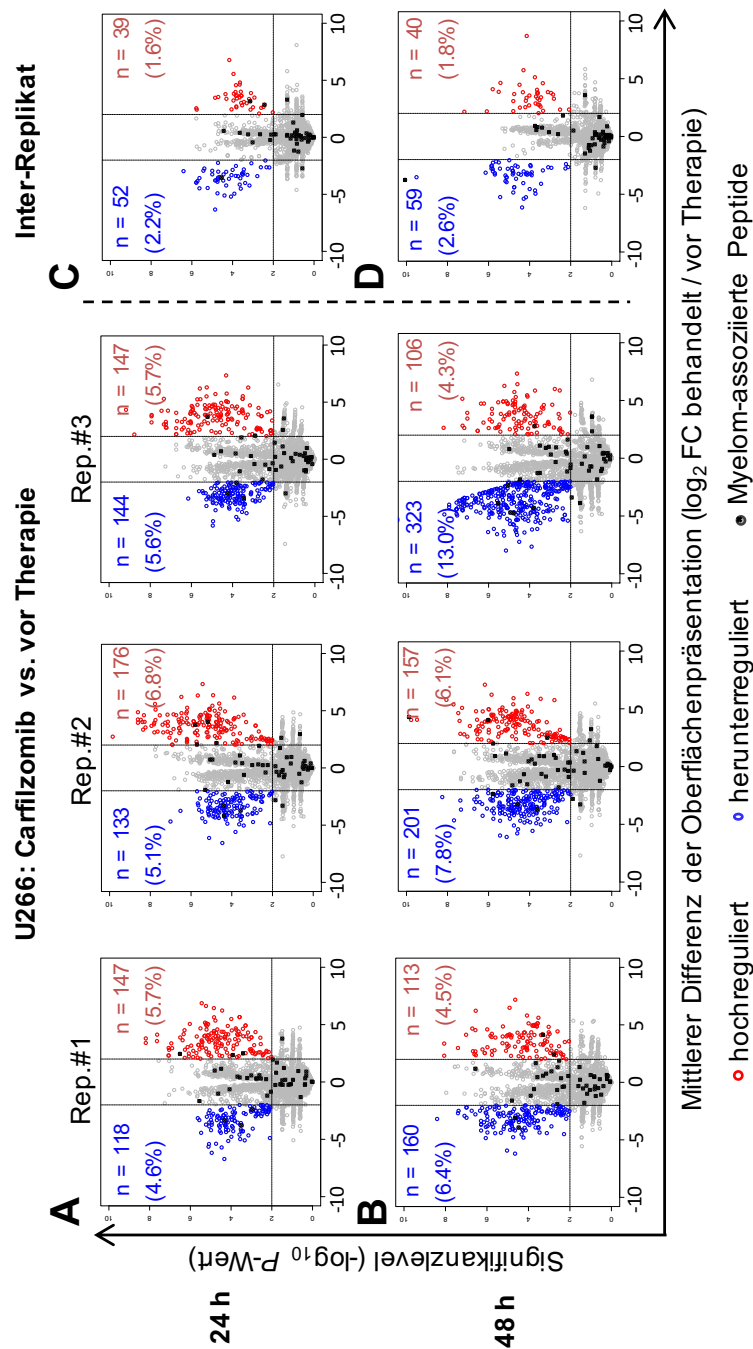


Abbildung 29: Modulation der HLA-Klasse I-Liganden auf der Myelomzelllinie U266 dargestellt in einem sogenannten „*Vulcano-Plot*“. Dargestellt ist die relative quantitative Änderung der HLA-Liganden-Präsentation von mit Carfilzomib behandelten Myelomzellen nach 24 h **[A]** und 48 h **[B]** jeweils in 3 Replikaten im Vergleich zur HLA-Liganden-Präsentation vor Behandlung bzw. die Änderung der HLA-Liganden Präsentation zwischen einzelnen Replikaten nach 24 h **[C]** und 48 h **[D]**. Jeder Punkt entspricht einem HLA-Liganden. In blau sind die HLA-Liganden gezeigt die signifikant herunterreguliert sind, in rot die HLA-Liganden die signifikant hochreguliert sind (Fold change ≥ 4 , $p \leq 0.01$ nach Benjamini-Hochberg *correction*). In den oberen Ecken wird jeweils der Prozentsatz signifikant regulierter HLA-Liganden angegeben. Die schwarzen Punkte entsprechen Myelom-assoziierten HLA-Liganden. Rep., Replikat; FC, fold change; modifiziert nach Kowalewski/Walz et al. [176].

3.2.2.3. Veränderung der Präsentation von HLA-Klasse I-Liganden durch Carfilzomib in Abhängigkeit vom HLA-Allotyp

Im ersten Schritt wurde die Verteilung der gesamten identifizierten HLA-Klasse I-Liganden in den Fraktionen Carfilzomib-behandelt und unbehandelt bzw. MOCK-behandelt auf die jeweiligen HLA-Allotypen untersucht. Hier zeigte sich bei der Myelomzelllinie MM.1S, dass nach Behandlung mit Carfilzomib ein deutlich geringerer Anteil der gesamten identifizierten HLA-Klasse I-Liganden der Allotypen HLA-A*23:01 (-5,4%) und HLA-A* 24:02 (-7,4%) detektiert werden konnte (Abb.30A).

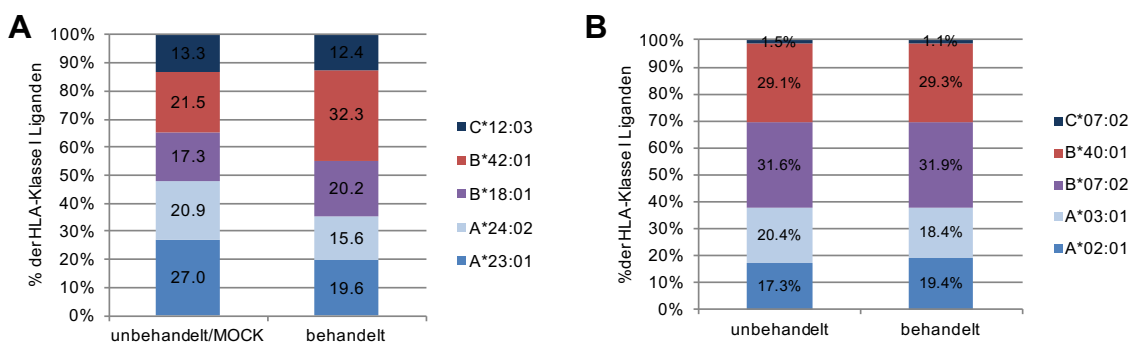


Abbildung 30: Verteilung der HLA-Liganden auf die jeweiligen HLA-Allotypen von Myelomzellen der Myelomzelllinien MM.1S **[A]** und U266 **[B]** unter Behandlung mit Carfilzomib im Vergleich zur MOCK-Kontrolle bzw. zur unbehandelten Probe. MOCK, Kontrollfraktion; modifiziert nach Kowalewski/Walz et al. [176]

Im Gegensatz dazu wurden vermehrt HLA-Klasse I-Liganden der Allotypen HLA-B*42:01 (+10,8%) und HLA-B*18:01 (+2,9%) identifiziert (Abb.30A). Für die Myelomzelllinie U266 fiel die Änderung unter Behandlung deutlich geringer aus. Hier wurden lediglich 2,1% mehr Liganden für HLA-A*02:01 und 2,0% weniger Liganden von HLA-A*03:01 identifiziert (Abb.30B) [176].

Im nächsten Schritt wurden ausschließlich die HLA-Klasse I-Liganden betrachtet, die hinsichtlich ihrer relativen quantitativen Präsentation unter Behandlung einer signifikanten Regulation unterlagen (Abb.31). Hier zeigte sich bei MM.1S dass 24 h nach Behandlung 76,3% der herunterregulierten Liganden auf die HLA-Allotypen A*23:01 (MW: $47,0 \pm 3,8\%$) und A*24:02 ($29,3 \pm 3,0\%$) entfielen. Unter den hochregulierten HLA-Klasse I-Liganden hatten 24 h nach Behandlung mit $46,4 \pm 2,4\%$ HLA-B*42:01 Liganden den

größten Anteil (Abb.31A). Ein vergleichbares Bild zeigte sich auch 48 h nach der Behandlung der Myelomzellen mit Carfilzomib (Abb.31B).

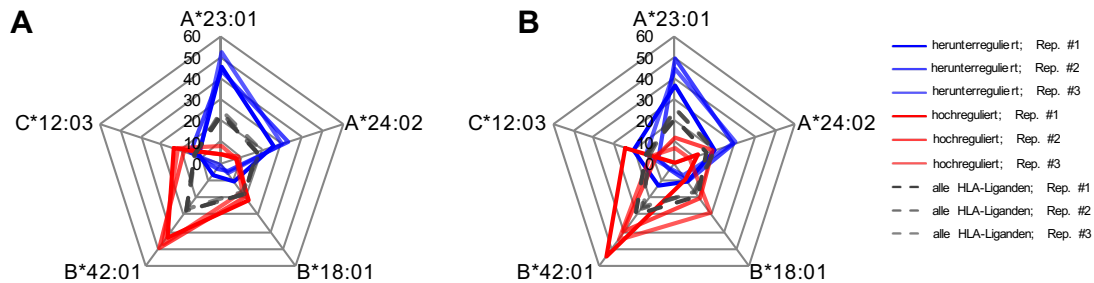


Abbildung 31: Verteilung der signifikant regulierten HLA-Klasse I-Liganden auf die jeweiligen HLA-Alloypen der Myelomzelllinien MM.1S 24 h **[A]** bzw. 48 h **[B]** nach Behandlung mit Carfilzomib. Rep., Replikat; modifiziert nach Kowalewski/Walz et al. [176].

Um einen noch genaueren Einblick zu erlangen wurden nun die relativen Peptidmengen, die auf die einzelnen HLA-Alloypen von MM.1S entfielen, betrachtet. Die relative Peptidmenge, die auf HLA-A*23:01 präsentiert wurde lag im Mittel 24 h nach der Behandlung mit Carfilzomib $62,5 \pm 1,8\%$ unter der Kontrollprobe. Auch die relative Peptidmenge, die auf HLA-A*24:02 präsentiert wurde war 24 h nach Behandlung $57,0 \pm 0,6\%$ geringer als in der Kontrollprobe (Abb.32). 48 h nach Behandlung wurde $54,7 \pm 9,0\%$ weniger HLA-A*23:01-Peptide und $49,2 \pm 7,0\%$ HLA-A*24:02-Peptide präsentiert als auf den Myelomzellen der Kontrolle (Abb.32). Für die MCL U266 konnten keine Alloyp-spezifischen Veränderungen hinsichtlich der relativen Peptidmenge identifiziert werden [176].

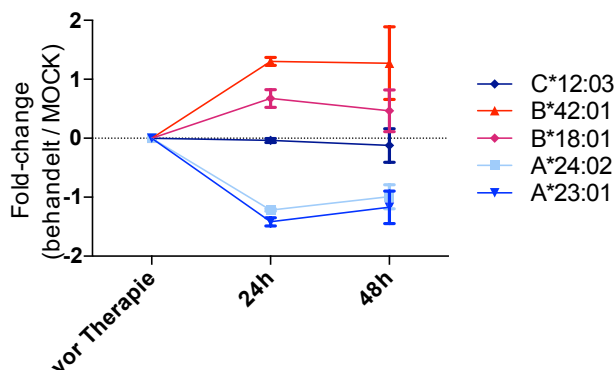


Abbildung 32: Änderung der relativen Peptidmenge aufgeteilt auf die einzelnen HLA-Alloypen der MCL MM.1S. Verglichen werden die HLA-Ligandome der Carfilzomib-behandelten mit denen der MOCK-behandelten Myelomzellen 24 h und 48 h nach der Behandlung. MOCK, Kontrollfraktion; modifiziert nach Kowalewski/Walz et al. [176].

Da die Wirkung von Carfilzomib in der Inhibition des Proteasoms liegt und dieses vor allem an der Generierung der C-terminalen Enden der HLA-

Liganden beteiligt ist, wurde der C-Terminus der HLA-Liganden näher betrachtet. Carfilzomib blockiert ganz besonders die β_5 -Untereinheit des Proteasoms, die der Chymotrypsin-ähnlichen Spaltung von Proteinen dient und somit hauptsächlich HLA-Liganden mit aromatischen C-Termini produziert. Die identifizierten HLA-Liganden wurden darum in eine Gruppe von HLA-Liganden, die durch aromatische (F;Y;W) und eine Gruppe, die durch aliphatische (I;L;M;V;T;A) C-terminale Ankeraminosäuren am HLA-Molekül gebunden werden, aufgeteilt und hinsichtlich ihrer quantitativen, relativen Peptidmenge im Verlauf der Carfilzomib-Behandlung untersucht. Hier zeigte sich, dass die relative Peptidmenge der HLA-Klasse I-Liganden mit C-terminaler aromatischer Ankeraminosäure 24 h nach der Behandlung mit Carfilzomib $42,7 \pm 2,7\%$ und 48 h nach der Behandlung $39,9 \pm 5,6\%$ niedriger gemessen wurde als in der kontrollbehandelten Probe (Abb.33).

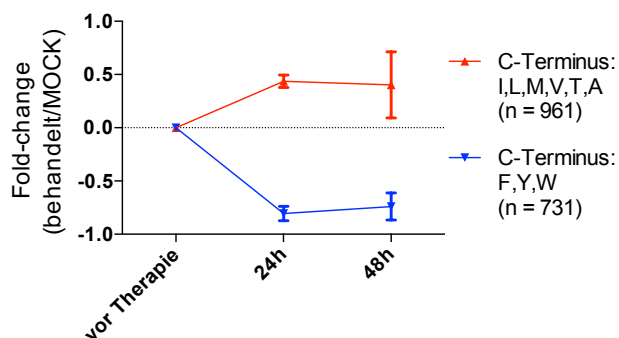


Abbildung 33: Veränderung der relativen Peptidmenge der HLA-Klasse I-Liganden auf MM.1S mit aromatischen (F;Y;W;) bzw. aliphatischen (I;L;M;V;T;A) C-terminalen Anker-Aminosäuren nach der Behandlung mit Carfilzomib im Vergleich zu Kontrollbehandelten Myelomzellen. MOCK, Kontrollfraktion; h, Stunde; modifiziert nach Kowalewski/Walz et al. [176].

Dagegen wurden 24 h nach der Behandlung eine um $35,5 \pm 5,6\%$ und 48 h nach der Behandlung eine um $35,4 \pm 29,4\%$ höhere relative Peptidmenge von HLA-Liganden mit aliphatischen C-terminalen Ankeraminosäuren gemessen (Abb.33) [176].

Auch auf der Myelomzelllinie U266 konnte beobachtet werden, dass nach Behandlung deutlich weniger HLA-Liganden mit aromatischen C-terminalen Ankeraminosäuren detektiert werden konnten. So wurde die relative Peptidmenge der HLA-Liganden mit aromatischen C-terminalen Ankeraminosäuren 24 h nach Behandlung $46,0 \pm 7,0\%$ und 48 h nach Behandlung $52,4 \pm 27,5\%$ geringer gemessen [176].

Zusammenfassend konnten unsere Analysen des HLA-Ligandoms von Myelomzellen unter Carfilzomib somit zeigen, dass es durch die Behandlung mit Carfilzomib aufgrund der selektiven Hemmung der β_5 -Untereinheit und damit der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des Proteasoms zu einer deutlich verminderten Präsentation von HLA-Liganden mit aromatischen C-Termini kommt.

4. Diskussion

Das MM als dritthäufigste hämatologische Neoplasie zeichnet sich durch die Proliferation von malignen Plasmazellen im Knochenmark und die Akkumulation von monoklonalem Protein in verschiedenen Organsystemen aus [20]. Bedeutende Fortschritte in der Behandlung des MM, einschließlich HD-Chemotherapie gefolgt von autologer SCT, sowie die Entwicklung von neuartigen immunmodulatorischen Molekülen, Proteasomen-Inhibitoren und Antikörpern, haben die Gesamtansprechrate, das progressionsfreie sowie das Gesamtüberleben deutlich verbessert [177]. Trotz dieser Erfolge liegt das 10-Jahres ereignisfreie Überleben selbst nach autologer SCT unter 20 Prozent und eine Heilung ist sehr selten [178]. Die Ursache hierfür ist insbesondere in der Persistenz einzelner maligner Plasmazellen, der sogenannten minimalen Resterkrankung (MRD), zu sehen [179]. Aus diesem Grund werden neue Therapiestrategien benötigt, um residuelle Myelom-Zellen zu eliminieren, eine dauerhafte Remission zu erzielen und das Gesamtüberleben zu verbessern.

Die T-Zell-basierte Immuntherapie stellt eine neue, vielversprechende Behandlungsoption für eine Vielzahl von Neoplasien dar. Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche T-Zell-basierte Immuntherapie ist neben einer intakten T-Zellfunktion die an HLA gebundene Präsentation von Antigenfragmenten auf entarteten Zellen. Seit einigen Jahren werden zunehmend Medikamente in der Therapie verschiedenster Neoplasien eingesetzt, die in die Antigenunspezifische Modulation und Aktivierung der T-Zell-Antwort durch z.B. Checkpoint-Blockade eingreifen. Große Erfolge mittels Checkpoint-Inhibition wurden bisher vor allem bei soliden Tumoren wie beispielsweise dem malignen Melanom, dem Bronchialkarzinom und dem Nierenzellkarzinom erzielt [180-187]. Dem gegenüber waren Versuche mittels Checkpoint-Blockade, mit der Ausnahme des klassischen Hodgkin-Lymphoms, in hämatologischen Neoplasien bislang weniger erfolgreich [139, 188-190]. Bislang konnte insbesondere für das MM kein positiver klinischer Effekt der Behandlung mittels PD-1-Blockade erzielt werden [191]. In aktuellen klinischen Studien werden weitere Checkpoint-Inhibitoren zur Erstlinien-Behandlung des MM sowie im Rezidiv evaluiert [192-194]. Trotz der bislang wenig beeindruckenden

Wirksamkeit der Antigen-unspezifischen Immuncheckpoint-Blockade scheint die T-Zell-basierte Immunüberwachung eine Rolle im MM zu spielen. Die Immunogenität von Myelomzellen wird sowohl durch Erfolge in der Behandlung mittels allogener SCT als auch durch die Assoziation klonal expandierter Tumor-infiltrierender CD8⁺ T-Zellen mit verbessertem klinischem Gesamtüberleben bekräftigt [195-198]. Des Weiteren konnten Antigen-spezifische Immuntherapieansätze wie CAR-T-Zellen, adoptiver T-Zelltransfer und Peptid-basierte Vakzinierung bereits klinische Erfolge im MM erzielen [117, 119, 120, 145, 199]. Unabdingbare Voraussetzung für eine erfolgreiche T-Zell-basierte Immuntherapie ist die Identifizierung immunologisch relevanter Tumor-assoziiertes Antigene. Zahlreiche Studien haben in den letzten Jahren Neoepitope aus Tumor-spezifischen Mutationen als dominierende Ziele der durch Checkpoint-Inhibitoren induzierten Immunantworten identifiziert [137, 200-205]. Ebenso wurde gezeigt, dass die Effektivität von Checkpoint-Inhibitoren abhängig von der Anzahl der Mutationen der Tumorerkrankung des Patienten ist [206]. Die geringere Wirksamkeit der Checkpoint-Blockade in hämatologischen Neoplasien verglichen mit soliden Tumoren könnte somit zumindest teilweise auf die niedrigere Mutations-Frequenz und dadurch weniger HLA-präsentierte Neoepitope im Vergleich zu soliden Tumoren zurückzuführen sein [206-211]. Neben Neoepitopen als vielversprechende Kandidaten für Antigen-spezifische Immuntherapieansätze konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass auch Tumor-assoziierte Selbstpeptide, die natürlich auf der Oberfläche von Tumorzellen präsentiert werden, spezifische T-Zellantworten induzieren und somit als mögliche Kandidaten für immuntherapeutische Ansätze in Frage kommen [171, 173, 212]. Die klinische Relevanz und Effektivität von Selbstpeptiden wurde bereits in zahlreichen präklinischen und klinischen Studien für verschiedenste Tumorentitäten belegt [212-219].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue, natürlich präsentierte Tumorantigene des MM identifiziert und charakterisiert sowie deren Immunogenität nachgewiesen. Ebenso wurde der Einfluss des Proteasomen-Inhibitors Carfilzomib auf diese Antigene untersucht. Im Folgenden werden die

Ergebnisse dieser Arbeit sowie die verwendeten Methoden im Kontext der aktuellen Literatur diskutiert.

4.1. Quantitative HLA-Expressionsanalyse

Eine Betrachtung der HLA-Oberflächenexpression auf Myelomzellen scheint als Vorarbeit der Entwicklung T-Zell-basierter Immuntherapien neben der Identifikation der Antigene selbst von großer Bedeutung, da eine Herunterregulation oder der Verlust der HLA-Oberflächenexpression im Allgemeinen als ein möglicher Grund des Scheiterns immuntherapeutischer Ansätze anzusehen ist [79]. Die Angaben zur minimal benötigten Menge an HLA-Klasse I-Molekülen, die zu Aktivierung einer T-Zelle benötigt werden, rangieren nach dem derzeitigen Stand der Forschung zwischen drei und einigen tausend Peptid-präsentierenden Molekülen [79, 220, 221]. Durch den *Immune escape*-Mechanismus der Herunterregulation bzw. des Verlustes der HLA-Oberflächenexpression können Tumorzellen der Immunüberwachung durch zytotoxische T-Zellen entkommen [79, 222]. Dieser Mechanismus wurde bereits für eine Vielzahl solider Tumoren beschrieben, teilweise konnte eine geringere HLA-Oberflächenexpression mit Progression bzw. schlechterer Prognose korreliert werden [79, 223-226]. Für hämatologische Erkrankungen wie beispielsweise die akute myeloische Leukämie oder die akute lymphatische Leukämie wird die quantitative HLA-Oberflächenexpression kontrovers diskutiert. Einige Arbeitsgruppen beschreiben eine Herunterregulation, andere zeigen hingegen eine unveränderte HLA-Oberflächenexpression auf neoplastischen Zellen im Vergleich zu normalen Vergleichsproben [163, 227, 228]. Eine absolute Quantifikation der HLA-Oberflächenexpression auf primären Myelomzellen ist nach unserem derzeitigen Kenntnisstand nicht bekannt.

4.1.1. Methode zur HLA-Oberflächenexpressionsanalyse

Die Methode der Durchflusszytometrie-basierten Quantifizierung von Antigenen auf der Zelloberfläche mittels des QIFIKITs[®] wurde durch H. Schuster am Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abteilung für Immunologie in Tübingen zur absoluten Quantifizierung von HLA-Molekülen auf der Zelloberfläche solider

und hämatologischer Neoplasien etabliert [163, 171, 229, 230]. Diese Methode ist den indirekten Methoden der relativen HLA-Quantifizierung mittels Immunfluoreszenz bzw. der Untersuchung der HLA-Expression auf mRNA-Ebene in ihrer Aussagekraft überlegen, da sie absolute Zahlen der HLA-Moleküle direkt von der Zelloberfläche liefert ohne Beeinflussung durch die mögliche Diskrepanz zwischen mRNA- und Oberflächenexpression [231]. In der Durchführung wurde zusätzlich zu den Herstellerangaben eine aufwändige Immunphänotypisierung der einzelnen Zellpopulationen, die anschließend eine präzise, subgruppenspezifische Analyse erlaubte, durchgeführt. Besonderes Augenmerk lag hier auf der Identifikation der Myelomzellen und der korrespondierenden Plasmazellen gesunder Spender, wobei auch B-, T- und hämatopoetische Progenitorzellen im KM von Myelom-Patienten und gesunden Spendern untersucht wurden. Nicht in allen Proben konnte die laborinterne geforderte Mindestzahl von 200 Zellen in der Auswertung der Durchflusszytometrie-Analyse zur HLA-Quantifizierung erreicht werden. Besonders bei Plasmazellen gesunder Spender, die im gesunden Knochenmark etwa 0-3% der Knochenmarkzellen ausmachen, war das Erreichen der Mindestzahl in einigen Fällen nicht möglich [232]. Um eine mögliche, unspezifische Bindung der Antikörper gegen HLA-A, -B, -C sowie -DR in der HLA-Quantifizierung zu berücksichtigen wurden IgG-Isotypkontrollen durchgeführt und in die Auswertung mit einbezogen. Die Gefahr einer insuffizienten Probenverarbeitung oder Fehlmessung wurde durch Bearbeitung und Messung aller Proben in Triplikaten und anschließender Berechnung des Mittelwertes minimiert.

4.1.2. Gesunde Spender im Vergleich zu Myelom-Patienten

Die HLA-Klasse I- und II-Oberflächenexpression spielt für eine T-Zell-basierte Immuntherapie eine bedeutende Rolle, da der Verlust oder die Herunterregulation hier einen limitierenden Faktor darstellen könnte [233]. Aus diesem Grund wurden Myelomzellen, hämatopoetische Progenitorzellen, B- und T-Zellen aus dem KM von Myelom-Patienten, entsprechende hämatopoetische Zellen aus dem KM gesunder Spender sowie Myelomzelllinien wie oben beschrieben auf ihre HLA-Oberflächenexpression untersucht. Anders als in der

Literatur für einige solide Tumoren, wie das Maligne Melanom oder das kolorektale Karzinom, aber auch hämatologische Neoplasien wie ALL und AML beschrieben, konnte auf Myelomzellen kein Verlust oder signifikante Herunterregulation der HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression nachgewiesen werden [227, 233]. In dieser Arbeit konnte sogar gezeigt werden, dass die HLA-Klasse I-Oberflächenexpression auf Myelomzellen signifikant höher lag als auf allen autologen hämatopoetischen Zellpopulationen, die hier untersucht wurden [164]. Ebenso konnte eine statistisch signifikant höhere HLA-Klasse I-Oberflächenexpression auf primären Myelomzellen im Vergleich zu Plasmazellen aus dem KM gesunder Spender detektiert werden, wenngleich die relativ breite Streuung der HLA-Klasse I-Oberflächenexpression der einzelnen MM-Proben nur eingeschränkt auf eine generell erhöhte HLA-Klasse I-Oberflächenexpression auf Myelomzellen schließen lässt. In der Literatur wird für das MM ein zugunsten proinflammatorischer Substanzen verschobenes Zytokinmilieu beschrieben, welches in soliden Tumoren beispielsweise im Nierenzellkarzinom zur Hochregulation der HLA-Expression führt [234-236]. Die weiteren untersuchten Zellpopulationen im KM zeigten erstaunlicherweise hinsichtlich HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression zwischen Myelom-Patienten und gesunden Spendern keine signifikanten Unterschiede. Die durchschnittliche absolute Anzahl der HLA-Klasse I-Moleküle auf primären Myelomzellen lag um mehr als das Dreifache über der HLA-Klasse I-Molekülzahl auf MCLs. Dieses Ergebnis zeigt Unterschiede zu beispielsweise dem uvealen Melanom, bei welchem die HLA-Expression auf primärem Tumor und entsprechender Zelllinie nahezu identisch waren [237]. Ein Grund der deutlichen Diskrepanz der HLA-Klasse I-Oberflächenexpression zwischen primären Myelomzellen und Myelomzelllinien könnte in der Etablierung der Myelomzelllinien liegen. Diese wurden zumeist aus dem peripheren Blut von Patienten mit Plasmazelleukämie etabliert, was dem terminalen Stadium der Tumorevolution des MMs entspricht und scheinbar ein verändertes Erscheinungsbild im Vergleich zum im KM residenten MM zeigt.

Die absolute Anzahl der HLA-Klasse I-Moleküle auf primären Myelomzellen lag mit über 400.000 Molekülen pro Zelle im Mittel zwei- bis dreimal höher als auf

malignen Zellen anderer hämatologischer Neoplasien wie beispielsweise AML und CLL sowie etwa fünfmal höher als auf soliden Tumoren, wie dem Ovarialkarzinom (OvCa) [163, 171, 238]. Somit scheinen Myelomzellen im Bezug auf die HLA-Klasse I-Oberflächenexpression ideale Zielzellen für eine T-Zell-basierte Immuntherapie dazustellen.

Die HLA-DR Oberflächenexpression auf primären Myelomzellen lag dagegen mit im Mittel 24.000 Molekülen pro Zelle deutlich unter dem auf CD19⁺CD5⁺ CLL-Zellen (MW > 60.000 Moleküle pro Zelle) und OvCa-Zellen (MW > 100.000 Moleküle pro Zelle) [171, 238]. Somit könnte die Identifikation und der Einsatz von HLA-Klasse II-Antigenen für T-Zell-basierte Immuntherapieansätzen in der Behandlung des MMs weniger effektiv sein als für HLA-Klasse I-Antigene.

Da eine mögliche T-Zell-basierte Immuntherapie zumeist in Kombination oder nach der Standardtherapie eingesetzt würde, spielt die Beeinflussung der HLA-Oberflächenexpression durch die Vortherapien eine bedeutende Rolle. Hier zeigte sich, dass sich die HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression zwischen Therapie-naiven und vortherapierten Patienten nicht signifikant unterschied. Auch verschiedene Patienten-spezifische Charakteristika wie Geschlecht, Alter, Krankheitsstadium nach den üblichen Stadieneinteilungssystemen, Leichtkettenrestriktion und Risikoprofil hatten keinen Einfluss auf die HLA-Oberflächenexpression der Myelomzellen. Somit scheinen weder Vortherapie der Erkrankung noch Patienten-individuelle Kriterien, zumindest im Bezug auf die HLA-Oberflächenexpression, einen limitierenden Faktor einer T-Zell-basierten Immuntherapie darzustellen. Aufgrund der ersten erfüllten Grundvoraussetzung, der ausreichenden HLA-Oberflächenexpression, wurde in der Folge eine umfassende HLA-Ligandomanalyse durchgeführt.

4.2. Qualitative HLA-Ligandomanalyse primärer Myelomzellen und Myelomzelllinien sowie Immunogenitätsprüfung neuer Myelom-assoziiertes Antigene

Unabdingbare Voraussetzung einer effektiven T-Zell-basierten Krebs-Immuntherapie ist die Identifizierung immunologisch relevanter Tumor-

assoziierter Antigene. Diese müssen auf der Zelloberfläche der Tumorzellen HLA-gebunden präsentiert und dort von T-Zellen erkannt werden, also als T-Zell-Epitope dienen. Eine Tumor-exklusive Präsentation dieser Zielstrukturen reduziert das Risiko von schweren Nebenwirkungen einer möglichen T-Zell-basierten Krebsimmuntherapie. In den letzten Jahren konnte wiederholt gezeigt werden, dass die RNA-Expression in Tumor- bzw. Leukämiezellen sowohl quantitativ als auch qualitativ nicht immer mit dem HLA-Ligandom übereinstimmt und sich in einigen Fällen sogar deutlich diskrepanz verhält [163, 239]. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit zur Identifizierung neuer Myelom-assoziierter Antigene die durch die Abteilung Immunologie des Interfakultären Institutes für Zellbiologie der Universität Tübingen etablierte Methode der direkten HLA-Ligandomanalyse mittels Immunpräzipitation und anschließender massenspektrometrischer Sequenzanalyse genutzt [165].

4.2.1. HLA-Ligandomanalyse

4.2.1.1. Verarbeitetes Probenmaterial

Zur HLA-Ligandomanalyse wurden KM-Proben von Myelom-Patienten und gesunden Spendern wie oben beschrieben analysiert. Diese KM-Proben wurden nicht weiter in einzelne Zellpopulationen separiert, da hierbei die gewünschte Mindestzellzahl (ca. 10^8 Zellen) für eine valide HLA-Ligandomanalyse deutlich unterschritten worden wäre. Insbesondere eine Isolierung von Plasmazellen aus den KM-Proben gesunder Spender war nicht möglich, da der Plasmazellanteil im gesunden KM lediglich 0-3% beträgt [232]. Im Probenkollektiv der Myelom-Patienten erfolgte keine direkte Bestimmung des Plasmazellanteils um eine möglichst große Zellzahl zur Ligandomanalyse nutzen zu können. Die Abschätzung des Plasmazellanteils in den vorliegenden Proben erfolgte basierend auf den histologischen, zytologischen und immunphänotypischen Ergebnissen der klinischen Routineuntersuchungen, die aus Proben derselben KM-Punktion erfolgten. Hier gilt jedoch zu beachten, dass maligne Plasmazellen im KM in Nestern zusammenliegen, weshalb sich der Plasmazellanteil in unterschiedlichen Proben derselben KM-Punktion deutlich different zeigen kann. Zur Analyse wurden jedoch ausschließlich KM-

Proben von MM-Patienten zugelassen, bei welchen in der klinischen Routine ein Plasmazellanteil von > 20% gemessen wurde. Um Fehler in der Auswahl Myelom-assoziiertes Antigene trotz fehlender Aufreinigung zu minimieren, wurden die MM-HLA-Ligandome mit den HLA-Ligandomen gesunder Spender verglichen und nur exklusiv auf MM-Proben identifizierte Antigene weiter untersucht. Mit der in dieser Arbeit analysierten Probenanzahl von 10 primären MM-Proben konnten HLA-Liganden aus 83% aller statistisch möglichen Quellproteine identifiziert werden [164]. Ebenso wird durch das hier analysierte Patientenkollektiv mit 20 unterschiedlichen HLA-A- und -B-Allotypen über 99% der HLA-A- und -B-Restriktionen der kaukasischen Bevölkerung abgedeckt [164]. Zusätzlich erfolgte die HLA-Ligandomanalyse von fünf MCLs, um HLA-Liganden reiner MM-Zellen analysieren zu können.

4.2.1.2. Affinitätschromatographie mit nachfolgender massenspektrometrischer Sequenzanalyse

Derzeit sind einige unterschiedliche Methoden zur HLA-Ligandenisolation bekannt. Zum einen können Peptid:HLA-Komplexe aus dem Kulturmedium von Zellen, die mit löslichem HLA-Molekül transfiziert wurden, isoliert und analysiert werden. Diese Methode spielt jedoch in der Analyse primärer Proben, die in dieser Arbeit hauptsächlich verwendet wurden, keine Rolle [165, 240]. Zum anderen können HLA-Liganden mittels milden Säuren aus dem HLA-Molekül gelöst werden und anschließend massenspektrometrisch analysiert werden. Vorteile sind hier die repetitive Durchführbarkeit in Zellkulturproben, Nachteile hingegen bestehen in der Verunreinigung des Eluates durch unspezifisch gelöste Peptide, die nicht HLA-präsentiert waren [165, 241, 242]. In dieser Arbeit wurde die seit langem in der Abteilung Immunologie etablierte Methode der HLA-Ligandenisolation mittels Immunpräzipitation der Peptid:HLA-Komplexe aus einem Zelllysats mit HLA-spezifischen Antikörpern, Elution der Peptide aus dem HLA-Molekül und nachfolgender massenspektrometrischer Sequenzanalyse durchgeführt. Diese Methode bietet die Möglichkeit HLA-Allotyp-spezifische HLA-Liganden mit hoher Reinheit auch von primären Patientenproben zu isolieren und somit ein umfassendes Bild des HLA-

Ligandoms der Probe zu gewinnen, wenngleich die Möglichkeit einer repetitiven HLA-Ligandenanalyse derselben Zellkultur nicht besteht [165]. Zur Prozessierung der massenspektrometrisch gewonnenen Spektren wurde die Software *ProteomeDiscoverer* wie oben beschrieben verwendet; durch diese Methode können ausschließlich nicht-mutierte Selbstantigene identifiziert werden, wohingegen mutierte Neoepitope nicht mit abgedeckt werden [163, 164]. Eine „4-digit“ HLA-Typisierung, die für die HLA-Annotation der einzelnen HLA-Liganden große Bedeutung besitzt, war für keinen der Myelom-Patienten verfügbar, eine „2-digit“ HLA-Typisierung war jedoch bekannt oder wurde durch das HLA-Labor der Abteilung Innere Medizin II des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt. Eine genaue HLA-Annotation der identifizierten Peptide wurde mit Hilfe von SYFPEITHI und NetMHC (sowie der im Hause erweiterten Software *Ligandosphere*) vorhergesagt und händisch validiert. Für alle Peptide, die für weiterführende Immunogenitätstestungen verwendet wurden, wurde das Spektrum des synthetischen Peptides mit dem des tatsächlichen massenspektrometrisch detektierten Peptides verglichen, um die computerbasierte Spektrenzuordnung nochmals manuell zu validieren.

Die Auswahl der Myelom-assoziierten Antigene wurde komplett HLA-Ligandom-basiert, ohne Literaturrecherche oder RNA-Expressionsanalyse, durchgeführt. Ermöglicht wurde diese rein Ligandom-basierte Auswahl mittels einer durch Daniel Kowalewski in der Abteilung Immunologie etablierten Plattform, die Antigene hinsichtlich ihrer Tumorexklusivität auf HLA-Ligandomebene sowie der Präsentationsfrequenz in den verschiedenen analysierten Proben einordnet [163]. Um eine möglichst valide Auswahl der Myelom-assoziierten Antigene zu erzielen, mussten Antigene im HLA-Ligandom von mindestens 26,7% der analysierten MM-Proben detektiert werden, was einer FDR von 4,1% entsprach [164].

4.2.2. HLA-Ligandomanalyse primärer Myelomzellen und von Myelomzelllinien

In dieser Arbeit ist es mit den oben beschriebenen Methoden erstmals gelungen Myelom-assoziierte Antigene, basierend auf natürlich präsentierten HLA-Liganden direkt von der Zelloberfläche primärer Myelomzellen und

zusätzlich auch von MCLs zu identifizieren. Basierend auf der oben beschriebenen HLA-Ligandom-Vergleichsanalyse konnten somit aus den insgesamt 7.574 Quellproteinen, die durch 17.583 HLA-Klasse I-Liganden repräsentiert waren, 58 Myelom-assoziierte Antigene identifiziert werden. Wie bereits durch die Ergebnisse der zuvor durchgeführten HLA-Quantifikation zu erwarten, konnten deutlich weniger HLA-Klasse II-Liganden (6.076) auf primären Myelomzellen und MCLs identifiziert werden. Aus diesem Grund konnte lediglich ein einziges Antigen aus den insgesamt 1.743 Quellproteinen als Myelom-assoziiertes Antigen definiert werden. Dieses Antigen war jedoch mit zahlreiche Längenvarianten durch insgesamt 67 unterschiedlichen HLA-Klasse II-Liganden repräsentiert. In der Zusammenschau des niedrigen HLA-DR-Expression und der geringen HLA-Klasse II-Ligandenausbeute und somit erschwerter Identifizierung geeigneter CD4⁺ T-Zellepitope scheint eine Fokussierung auf HLA-Klasse I-assoziierte Antigen als CD8⁺ T-Zellepitope im Multiplen Myelom empfehlenswert. Im Folgenden sollen die hier identifizierten MM-assoziierten Klasse-I-Antigene näher betrachtet werden.

Der Großteil der neu definierten Myelom-assoziierten Antigene (54 von 58) war bislang nicht im Zusammenhang mit dem MM oder dessen Tumorgenese beschrieben, wie schon für einige andere hämatologische Neoplasien beispielsweise CLL und AML oder solide Tumoren wie das Nierenzellkarzinom gezeigt wurde [163, 171, 243]. Diese Ergebnisse deuten auf ein komplexeres Zusammenwirken der zugrundeliegenden Mechanismen wie dem zellulären Proteinumsatz und der Antigenprozessierung in Tumorzellen hin [244]. Des Weiteren bekräftigt diese deutliche Mehrzahl an bisher nicht im Zusammenhang mit dem MM beschriebenen neu definierten Antigenen die verzerrte Korrelation zwischen intrazellulärer Quelle wie Proteom und mRNA und HLA-Ligandom sowie dessen isolierten Charakter [239].

Eindrucksvollerweise befanden sich nahezu keine HLA-Liganden aus bereits in der Literatur für das MM beschriebenen Antigenen unter den hier neu definierten Myelom-assoziierten Antigenen [175]. Insbesondere hier zeigt sich der deutliche Unterschied zwischen den analysierten primären Myelom-Proben und den MCLs. Während auf den primären Myelom-Proben, die letztendlich der

realen Situation im Patienten am nächsten kommen, nur zwei (PRDI-BF1, LAGE-1) der in der Literatur beschriebenen Antigene exklusiv präsentiert wurden, waren insgesamt neun (PRDI-BF1, LAGE-1, MAGE-A1, HM1.24, MAGE-A2, MAGE-A3, NY ESO-1, SPAN-XB, XBP-1) dieser Antigene exklusive auf MCLs präsentiert [175]. Dies bestätigt, wie bereits von zahlreichen Autoren postuliert, dass eine deutliche Diskrepanz zwischen primären Proben und den entsprechenden Zelllinien besteht, was die Notwendigkeit der Analyse primärer Proben, wann immer möglich, unterstreicht [164, 245, 246].

Lediglich 4 der 58 neu definierten Ligandom-abgeleiteten MM-assoziierten Antigene wurden bereits in der Literatur im Zusammenhang mit dem MM erwähnt. Hierzu gehören FNDC3B, TNFRSF13B, WHSC1 und COG1 [247-251]. Als besonders interessantes Myelom-assoziiertes Antigen ist unter anderem WHSC1, besser bekannt als MMSET, anzusehen, welches in Myelom-Patienten mit der Translokation t(4;14), einhergehend mit einer schlechteren Prognose, als überexprimiert und maßgeblich an der Pathogenese beteiligt beschrieben wird [252-259]. Dieses Protein gilt derzeit als eine vielversprechende Zielstruktur zur Therapie des MM [250, 255, 260]. HLA-Klasse I-Liganden aus dem Quellprotein MMSET konnten nicht nur in erhöhter Frequenz auf Myelomzellen von Myelom-Patienten mit Translokation t(4;14) identifiziert werden, sondern waren auch in dem HLA-Ligandom eines MM-Patienten sowie einer MCL ohne Translokation t(4,14) enthalten. Erfreulicherweise konnten T-Gedächtniszellen, die Epitope aus MMSET erkennen, mittels ELISPOT exklusiv in MM-Patienten detektiert werden. Im Gegensatz dazu waren bei gesunden Spendern keine T-Gedächtniszellen gegen die getesteten MMSET-Epitope nachweisbar. Dies deutet auf eine Myelom-abhängige T-Zellaktivierung *in vivo* selektiv in MM-Patienten hin, was die pathophysiologische Relevanz von MMSET unterstreicht. Neben den derzeit in Entwicklung befindlichen Therapieansätzen bei Myelom-Patienten mit Translokation t(4;14), die MMSET mittels „*Small Molecules*“ oder „*small interfering*“ Ribonukleinsäuren (siRNA) hemmen sollen, bieten die neu definierten Myelom-exklusiven T-Zell-Epitope aus MMSET die Möglichkeit der Entwicklung T-Zell-basierter Immuntherapien [250, 260]. Möglicherweise

müsste eine solche Behandlung nicht auf MM-Patientin mit Translokation t(4;14) begrenzt werden, da wie oben beschrieben weder die Präsentation der HLA-Klasse I-Liganden aus MMSET noch die immunologische Erkennung auf Patienten mit dem Translokationsstatus t(4;14) begrenzt war. Dies könnte zum einen durch die wiederholt berichtete, oft fehlende Korrelation zwischen Genexpression und der HLA-Ligandenpräsentation und zum anderen durch die genetische Plastizität im Krankheitsverlauf und die vorbeschriebene subklonale Verbreitung der Translokation t(4;14) in MM-Zellen erklärt werden [164, 239, 261].

4.3. Der Einfluss von Carfilzomib auf die HLA-Oberflächenexpression und das HLA-Ligandom

In den vergangenen Jahren haben Proteasomen-Inhibitoren in der Behandlung des MMs einen zunehmend bedeutenderen Platz eingenommen. Durch die Entwicklung und den Einsatz dieser Substanzen konnte sowohl das progressionsfreie Intervall verlängert als auch das Gesamtüberleben gesteigert werden [54]. Als Proteasomen-Inhibitor der zweiten Generation wurde Carfilzomib im November 2015 in Europa zur Behandlung von Patienten mit therapierefraktärem MM, die bereits mindestens zwei Vortherapien erhalten hatten, als Medikament in Kombinationstherapie zugelassen [54, 262]. In weiteren Studien wird der Einsatz von Carfilzomib als Erstlinientherapie untersucht [263, 264]. Die hauptsächliche Zielstruktur von Carfilzomib stellt die β_5 -Untereinheit des Proteasoms dar, die durch selektive, irreversible Bindung inhibiert wird. Dadurch wird besonders die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des Proteasoms inhibiert, was zur Aktivierung pro-apoptotischer und anti-proliferativer Signalwege führt. Zudem kommt es durch die Anhäufung fehlerhafter und ungefalteter Proteine zu einer Induktion von intrazellulärem Stress [159, 265, 266]. Seit geraumer Zeit ist bekannt, dass die Inhibition des Proteasoms einen direkten Einfluss auf die HLA-präsentierte Antigen-Landschaft ausübt, da das Proteasom eine zentrale Rolle in der Prozessierung von HLA-präsentierten Peptiden einnimmt. Somit kann unter anderem auch eine vom HLA-Ligandom abhängige spezifische T-Zell-Antwort beeinträchtigt

werden [55, 267-270]. Nicht zuletzt seitdem unter anderem auch Proteasomen-Inhibitoren in der Standardtherapie des MMs zum Einsatz kommen, scheint die Relevanz einer Charakterisierung des HLA-Ligandoms unter bzw. nach Proteasomen-Inhibitorbehandlung von besonderer Bedeutung, um stabil und konstant präsentierte T-Zell-Epitope für eine mögliche begleitende oder nachfolgende Immuntherapie bereitstellen zu können [176].

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde eine absolute HLA-Quantifizierung sowie eine umfassende semi-quantitative Analyse der HLA-präsentierten Peptide auf Myelomzellen unter dem Einfluss des Proteasomen-Inhibitors Carfilzomib mit Hilfe eines *in vitro* Modells durchgeführt. Dieses Modell sowie die Ergebnisse dieser Experimente werden im Folgenden diskutiert.

4.3.1. Methode zur Behandlung von Myelomzelllinien und primären Myelomzellen mit Carfilzomib

Zur Untersuchung des Einflusses von Carfilzomib auf die HLA-Oberflächenexpression sowie auf das HLA-Ligandom von Myelomzellen wurde ein bereits in der Literatur beschriebenes *in vitro*-Modell im Labor etabliert, welches mit einer Reduktion der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des Proteasoms um etwa 80 Prozent einhergehen soll [68, 159]. Hierbei wurden Zellen in Kultur für eine Stunde mit Carfilzomib behandelt und nachfolgend in frisches Kulturmedium überführt, um die Pharmakokinetik von Carfilzomib *in vivo* zu simulieren [159, 271]. Die Analyse des Einflusses von Carfilzomib auf primäre Myelomzellen musste aufgrund der geringen Zellzahl auf die HLA-Oberflächenexpression beschränkt werden, da, um eine valide Aussage treffen zu können, Versuche in biologischen Triplikaten durchgeführt wurden und zur HLA-Ligandomanalyse weder eine ausreichende Menge an MM-Zellen noch an zur Vergleichsanalyse benötigten Plasmazellen gesunder Spender zur Verfügung stand. Aus diesem Grund wurde zur Analyse der Veränderung des HLA-Ligandoms oben beschriebenes *in vitro*-Zelllinienmodell verwendet [159]. Um eine Aussage über die quantitativen Veränderungen des HLA-Ligandoms im Behandlungsverlauf treffen zu können wurde die massenspektrometrische Methode der markierungsfreien Quantifikation (LFQ) eingesetzt. Ein Vorteil dieser Methode im Vergleich zu beispielsweise „*Stable Isotope Labeling by*

Amino Acids in Cell Culture“ (SILAC) besteht darin, dass keine spezielle Markierung der Zellen vorausgesetzt ist [272-274]. Die Vorversuche zeigten, dass die Effekte der Einzeldosis Carfilzomib auf die HLA-Oberflächenexpression und auf das HLA-Ligandom nicht dauerhaft anhielten. Die gravierendsten Veränderungen waren im Mittel 24 Stunden nach der Behandlung zu beobachten, während sich in der Folge ein Trend in Richtung Ausgangspunkt zeigte. Die Beobachtung der Regeneration des Proteasoms war, entsprechend der hier beobachteten Trends, in der Literatur zuvor beschrieben worden [68]. Die Beobachtungszeitpunkte wurden daraufhin auf die drei Zeitpunkte vor der Behandlung sowie jeweils 24 und 48 Stunden nach Behandlungsbeginn festgesetzt [176].

4.3.2. HLA-Oberflächenexpression von Myelomzellen unter der Behandlung mit Carfilzomib

Der Effekt der oben beschriebenen *in vitro*-Behandlung primärer Myelomzellen sowie von Myelomzelllinien mit Carfilzomib auf die HLA-Klasse I- und DR-Oberflächenexpression war sehr heterogen. Diese Beobachtungen decken sich zumindest für die MCLs mit der in der Literatur beschriebenen sehr unterschiedlichen Sensibilität verschiedener MCLs gegenüber Proteasomen-Inhibitoren [265]. Während bei MCLs insgesamt im Mittel eher eine Tendenz zur einer erhöhten HLA-Klasse I-Oberflächenexpression verglichen mit der Kontrollprobe zu detektiert war, zeigte sich bei primären Myelomzellen eher diskret niedrigere mittlere HLA-Molekülzahlen. In früheren Analysen konnte eine starke Herunterregulation der HLA-Oberflächenexpression unter der Behandlung mit Proteasomen-Inhibitoren wie Bortezomib und Carfilzomib gezeigt werden, dieser generelle Effekt konnte in dieser Arbeit erfreulicherweise weder für eine der untersuchten primären Myelom-Proben noch für die MCLs beobachtet werden [275, 276]. Selbst bei der Myelom-Probe, die nach Herunterregulation der HLA-Klasse I-Oberflächenexpression die geringste Anzahl an HLA-Molekülen pro Zelle zeigte, waren stets mindestens 70.000 HLA-Klasse I-Moleküle pro Zelle (auf der MCL JYN3 48h nach Carfilzomib-Behandlung) messbar, sodass der Einsatz des Proteasomen-Inhibitors Carfilzomib in der Behandlung des MMs *per se* keinen Hinderungsgrund für eine T-Zell-basierte

Immuntherapie darzustellen scheint. Eine generelle Aussage ist aufgrund der heterogenen Ergebnisse dieser Arbeit sowie der widersprüchlichen Angaben in der Literatur schwer zu treffen. Eine Patienten-individuelle Untersuchung bzw. eine repräsentative Untersuchung primärer Myelomzellen von Patienten unter/nach Carfilzomib-Behandlung (*in vivo* behandelte Myelomzellen) wären von großem Nutzen und würden detaillierte Aussagen zulassen [176].

4.3.3. Quantitative und qualitative HLA-Ligandomanalyse von MCLs unter der Behandlung mit Carfilzomib

Die Veränderung des HLA-Ligandoms von Myelomzellen unter Carfilzomib-Behandlung wurde wie oben beschrieben mittels semiquantitativer, Massenspektrometrie-basierter LFQ untersucht. Hier zeigte sich eine wesentliche Veränderung des HLA-Ligandoms im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, wobei ein etwa sechsfach höherer Anteil des HLA-Ligandoms einer signifikanten Regulation unterlag als bei ähnlichen Experimenten, bei welchen primäre CLL-Zellen mit dem IMiD Lenalidomid behandelt wurden (Nelde et al., Manuskript in Vorbereitung). Die Veränderungen des HLA-Ligandoms beinhalteten den Verlust einzelner Liganden im Laufe der 48-stündigen Beobachtungsphase, die signifikant verstärkte und verminderte Präsentation bereits vor Behandlung mit Carfilzomib präsentierter HLA-Liganden sowie die Präsentation neuer, erst nach der Behandlung nachgewiesener HLA-Liganden. Die gemessenen Veränderungen des HLA-Ligandoms im Behandlungsverlauf lässt eher auf einen direkten Effekt von Carfilzomib auf die Generierung der HLA-Liganden schließen als auf einen Effekt auf einzelne Signalwege durch welche bestimmte Antigene vermehrt oder vermindert im HLA-Ligandom repräsentiert würden [176]. Diese Schlussfolgerung entstand aus der Beobachtung, dass bei der HLA-Ligandomanalyse der MCL MM.1S der Anteil der HLA-Klasse I-Liganden die HLA-A*23:01- und HLA-A*24:02-restringiert präsentiert werden, deutlich vermindert war. Da HLA-A*23:01 und HLA-A*24:02 ein identisches virtuelles Bindungsmotiv besitzen wurde die Hypothese aufgestellt, dass die beobachtete verminderte Repräsentation von HLA-A*23:01- und HLA-A*24:02-Liganden im HLA-Ligandom nach Carfilzomib-Behandlung am ehesten durch die Inhibierung der Chymotrypsin-ähnlichen

Aktivität des Proteasoms zu erklären war, welche im intakten Zustand zur Prozessierung von HLA-Liganden mit aromatischem C-Terminus führt [176, 277, 278]. Es wurde somit die Hypothese aufgestellt, dass die Carfilzomib-Behandlung zu einer selektiven Reduktion von HLA-Liganden mit einem aromatischen C-Terminus führt. Durch die Aufteilung der auf MM.1S identifizierten HLA-Liganden unter Carfilzomib-Behandlung anhand ihrer C-terminalen Reste (aromatisch vs. aliphatisch) bestätigte sich diese Hypothese, wenngleich diese Beobachtung aufgrund der gegenseitigen Abhängigkeit von HLA-Restriktion und Struktur der C-terminalen Ankeramino-säure nur mit Vorsicht zu bewerten ist [81, 176]. Ähnliche Effekte der Carfilzomib-Behandlung im Bezug auf das HLA-Ligandom der MCL U266, die eine komplett unterschiedliche HLA-Restriktion aufweist, unterstützen jedoch die oben aufgestellte Hypothese.

Zusammenfassend deuten die in dieser Arbeit analysierten Beobachtungen darauf hin, dass die Zusammensetzung des HLA-Ligandoms von Myelomzellen durch den Einsatz des Proteasomen-Inhibitors Carfilzomib sowohl in quantitativer als auch in qualitativer Sicht massiv beeinflusst wird, ganz besonders im Hinblick auf die stark verminderte Präsentation von HLA-Liganden mit aromatischem C-terminalen Ende. Um den tatsächlichen Einfluss von Carfilzomib auf die Krebs-Immunüberwachung zu beurteilen, werden weitere Experimente benötigt, die eine Aussage über die Bedeutung dieser Veränderungen für die Immunerkennung durch T-Zellen zulässt [176]. Die Auswahl von Zielstrukturen einer möglichen T-Zell-basierten Immuntherapie des MMs sollten entsprechend der gezeigten möglichen Veränderungen des HLA-Klasse I-Ligandoms getroffen werden. Trotz der oben beschriebenen massiven Veränderungen des HLA-Ligandoms unter Carfilzomib-Behandlung konnte gezeigt werden, dass die Mehrheit aller untersuchter HLA-Klasse I-Liganden, jedoch ganz besonders der Großteil der neu definierten Myelom-assoziierten HLA-Klasse I-Liganden, stabile Präsentation im Behandlungsverlauf zeigten. Außerdem konnten im Laufe der Carfilzomib-Behandlung „Carfilzomib-assoziierte“ HLA-Klasse I-Liganden identifiziert werden, also HLA-Klasse I-Liganden die vor Behandlung nicht nachweisbar waren. Die Induktion

neuer HLA-Liganden, welche als Zielstruktur einer T-Zell-basierten Immuntherapie dienen könnten, wurde bereits für weitere Medikamente, die in der Behandlung von Neoplasien zum Einsatz kommen, wie beispielsweise dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor Decitabine, beschrieben und stellen einen äußerst interessanten Ansatz für die Kombination neuer immuntherapeutischer Ansätze mit bekannten und etablierten Krebstherapien dar [279]. Die in dieser Arbeit identifizierten „Carfilzomib-assoziierten“ HLA-Klasse I-Liganden sollten in weiteren Studien hinsichtlich ihrer Eignung als T-Zell-Epitope für immuntherapeutische Ansätze in der Behandlung des MMs untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Das Multiple Myelom (MM) bleibt als dritthäufigste hämatologische Neoplasie bis heute in den meisten Fällen unheilbar. Diese Situation verlangt nach der Entwicklung neuer Therapieansätze. In dieser Arbeit sollten die Grundvoraussetzungen zur Einwicklung einer T-Zell-basierten Immuntherapie des MMs gelegt werden: Dies beinhaltete die Definition neuer Myelom-assoziiertes T-Zell-Epitope sowie die Untersuchung des Verhaltens dieser Zielstrukturen unter dem Einfluss des Proteasomen-Inhibitors (PI) Carfilzomib.

Bei der Untersuchung hämatopoetischer Zellen aus dem Knochenmark von Myelom-Patienten und gesunden Spendern zeigten primäre Myelomzellen eine signifikant erhöhte HLA-Klasse I-Oberflächenexpression im Vergleich zu gesunden Plasmazellen sowie zu autologen T-, B-Zellen und hämatopoetischen Progenitorzellen. In der folgenden massenspektrometrischen HLA-Ligandomanalyse von Myelomzellen konnten insgesamt 7.574 Antigene, repräsentiert durch 17.583 HLA-Klasse I-Liganden, identifiziert werden. 58 dieser Antigene waren exklusiv und hochfrequent im HLA-Ligandom der Myelom-Patienten durch 202 Peptide repräsentiert. Für einige dieser HLA-Liganden konnten in Myelom-Patienten spontane T-Gedächtniszell-Antworten im IFN- γ ELISPOT detektiert werden. Da in der Behandlung des MMs Inhibitoren des Proteasoms zum Einsatz kommen wurde deren Einfluss im *in vitro* Behandlungsmodell in Myelomzelllinien untersucht. Die HLA-Oberflächenexpression auf Myelomzellen zeigte sich nach der Behandlung mit Carfilzomib nicht massiv vermindert und der Großteil der Myelom-assoziierten Peptide konnte weiterhin identifiziert werden, wenngleich es zu einer deutlich verminderten Präsentation von HLA-Liganden mit C-terminalen aromatischen Aminosäuren kam.

Zusammenfassend konnte diese Arbeit den Nachweis einer ausreichenden HLA-Oberflächenexpression auf Myelomzellen erbringen und mit der Definition neuer Myelom-assoziiertes Antigene eine Grundlage für die Entwicklung neuer T-Zell-basierter Immuntherapiekonzepte für Patienten mit MM schaffen. Zudem wurden wichtige Erkenntnisse über den Einfluss von Carfilzomib auf das HLA-Ligandom der Myelomzellen gewonnen, die bei der Auswahl geeigneter Zielstrukturen für Antigen-spezifische Immuntherapien des MMs helfen können.

6. Literaturverzeichnis

1. Kyle, R.A. and S.V. Rajkumar, *Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma*. *Leukemia*, 2009. **23**(1): p. 3-9.
2. Campo, E., S.H. Swerdlow, N.L. Harris, S. Pileri, H. Stein, and E.S. Jaffe, *The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications*. *Blood*, 2011. **117**(19): p. 5019-32.
3. Kyle, R.A. and S.V. Rajkumar, *Multiple myeloma*. *Blood*, 2008. **111**(6): p. 2962-72.
4. Kristinsson, S.Y., O. Landgren, P.W. Dickman, A.R. Derolf, and M. Bjorkholm, *Patterns of survival in multiple myeloma: a population-based study of patients diagnosed in Sweden from 1973 to 2003*. *J Clin Oncol*, 2007. **25**(15): p. 1993-9.
5. Pulte, D., L. Jansen, F.A. Castro, K. Emrich, A. Katalinic, B. Holleccek, H. Brenner, and G.C.S.W. Group, *Trends in survival of multiple myeloma patients in Germany and the United States in the first decade of the 21st century*. *Br J Haematol*, 2015. **171**(2): p. 189-96.
6. Palumbo, A. and K. Anderson, *Multiple myeloma*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(11): p. 1046-60.
7. Kyle, R.A., T.M. Therneau, S.V. Rajkumar, J.R. Offord, D.R. Larson, M.F. Plevak, and L.J. Melton, 3rd, *A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(8): p. 564-9.
8. Kyle, R.A., E.D. Remstein, T.M. Therneau, A. Dispenzieri, P.J. Kurtin, J.M. Hodnefield, D.R. Larson, M.F. Plevak, D.F. Jelinek, R. Fonseca, L.J. Melton, 3rd, and S.V. Rajkumar, *Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma*. *N Engl J Med*, 2007. **356**(25): p. 2582-90.
9. Fernandez de Larrea, C., R.A. Kyle, B.G. Durie, H. Ludwig, S. Usmani, D.H. Vesole, R. Hajek, J.F. San Miguel, O. Sezer, P. Sonneveld, S.K. Kumar, A. Mahindra, R. Comenzo, A. Palumbo, A. Mazumber, K.C. Anderson, P.G. Richardson, A.Z. Badros, J. Caers, M. Cavo, X. LeLeu, M.A. Dimopoulos, C.S. Chim, R. Schots, A. Noeul, D. Fantl, U.H. Mellqvist, O. Landgren, A. Chanan-Khan, P. Moreau, R. Fonseca, G. Merlini, J.J. Lahuerta, J. Blade, R.Z. Orlowski, J.J. Shah, and G. International Myeloma Working, *Plasma cell leukemia: consensus statement on diagnostic requirements, response criteria and treatment recommendations by the International Myeloma Working Group*. *Leukemia*, 2013. **27**(4): p. 780-91.
10. Chesi, M., E. Nardini, R.S. Lim, K.D. Smith, W.M. Kuehl, and P.L. Bergsagel, *The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts*. *Blood*, 1998. **92**(9): p. 3025-34.

11. Podar, K., Y.T. Tai, B.K. Lin, R.P. Narsimhan, M. Sattler, T. Kijima, R. Salgia, D. Gupta, D. Chauhan, and K.C. Anderson, *Vascular endothelial growth factor-induced migration of multiple myeloma cells is associated with beta 1 integrin- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent PKC alpha activation*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(10): p. 7875-81.
12. Roodman, G.D., *Pathogenesis of myeloma bone disease*. *Leukemia*, 2009. **23**(3): p. 435-41.
13. Morgan, G.J., B.A. Walker, and F.E. Davies, *The genetic architecture of multiple myeloma*. *Nat Rev Cancer*, 2012. **12**(5): p. 335-48.
14. Kyle, R.A., M.A. Gertz, T.E. Witzig, J.A. Lust, M.Q. Lacy, A. Dispenzieri, R. Fonseca, S.V. Rajkumar, J.R. Offord, D.R. Larson, M.E. Plevak, T.M. Therneau, and P.R. Greipp, *Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma*. *Mayo Clin Proc*, 2003. **78**(1): p. 21-33.
15. Riccardi, A., P.G. Gobbi, G. Ucci, D. Bertoloni, R. Luoni, L. Rutigliano, and E. Ascari, *Changing clinical presentation of multiple myeloma*. *Eur J Cancer*, 1991. **27**(11): p. 1401-5.
16. Dimopoulos, M.A., E. Kastritis, L. Rosinol, J. Blade, and H. Ludwig, *Pathogenesis and treatment of renal failure in multiple myeloma*. *Leukemia*, 2008. **22**(8): p. 1485-93.
17. International Myeloma Working Group, *Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group*. *Br J Haematol*, 2003. **121**(5): p. 749-57.
18. Boyd, K.D., F.M. Ross, L. Chiecchio, G.P. Dagrada, Z.J. Konn, W.J. Tapper, B.A. Walker, C.P. Wardell, W.M. Gregory, A.J. Szubert, S.E. Bell, J.A. Child, G.H. Jackson, F.E. Davies, G.J. Morgan, and N.H.O.S. Group, *A novel prognostic model in myeloma based on co-segregating adverse FISH lesions and the ISS: analysis of patients treated in the MRC Myeloma IX trial*. *Leukemia*, 2012. **26**(2): p. 349-55.
19. Greipp, P.R., J. San Miguel, B.G. Durie, J.J. Crowley, B. Barlogie, J. Blade, M. Boccadoro, J.A. Child, H. Avet-Loiseau, R.A. Kyle, J.J. Lahuerta, H. Ludwig, G. Morgan, R. Powles, K. Shimizu, C. Shustik, P. Sonneveld, P. Tosi, I. Turesson, and J. Westin, *International staging system for multiple myeloma*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(15): p. 3412-20.
20. Onkopedia. *Multiples Myelom*. 18.06.2016]; Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/multiples-myelom/@@view/html/index.html> - litID0EKNAG.
21. Chng, W.J., A. Dispenzieri, C.S. Chim, R. Fonseca, H. Goldschmidt, S. Lentzsch, N. Munshi, A. Palumbo, J.S. Miguel, P. Sonneveld, M. Cavo, S. Usmani, B.G. Durie, H. Avet-Loiseau, and G. International Myeloma Working, *IMWG consensus on risk stratification in multiple myeloma*. *Leukemia*, 2014. **28**(2): p. 269-77.
22. Kyle, R.A., B.G. Durie, S.V. Rajkumar, O. Landgren, J. Blade, G. Merlini, N. Kroger, H. Einsele, D.H. Vesole, M. Dimopoulos, J. San Miguel, H. Avet-Loiseau, R. Hajek, W.M. Chen, K.C. Anderson, H. Ludwig, P. Sonneveld, S. Pavlovsky, A. Palumbo, P.G. Richardson, B. Barlogie, P. Greipp, R. Vescio, I. Turesson, J. Westin, M. Boccadoro, and G. International Myeloma Working, *Monoclonal gammopathy of*

- undetermined significance (MGUS) and smoldering (asymptomatic) multiple myeloma: IMWG consensus perspectives risk factors for progression and guidelines for monitoring and management.* *Leukemia*, 2010. **24**(6): p. 1121-7.
23. Mateos, M.V., M.T. Hernandez, P. Giraldo, J. de la Rubia, F. de Arriba, L. Lopez Corral, L. Rosinol, B. Paiva, L. Palomera, J. Bargay, A. Oriol, F. Prosper, J. Lopez, E. Olavarria, N. Quintana, J.L. Garcia, J. Blade, J.J. Lahuerta, and J.F. San Miguel, *Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma.* *N Engl J Med*, 2013. **369**(5): p. 438-47.
 24. Einsele, H., H.J. Schafer, H. Hebart, P. Bader, C. Meisner, L. Plasswilm, P. Liebisch, M. Bamberg, C. Faul, and L. Kanz, *Follow-up of patients with progressive multiple myeloma undergoing allografts after reduced-intensity conditioning.* *Br J Haematol*, 2003. **121**(3): p. 411-8.
 25. Giralto, S., E.A. Stadtmauer, J.L. Harousseau, A. Palumbo, W. Bensinger, R.L. Comenzo, S. Kumar, N.C. Munshi, A. Dispenzieri, R. Kyle, G. Merlini, J. San Miguel, H. Ludwig, R. Hajek, S. Jagannath, J. Blade, S. Lonial, M.A. Dimopoulos, H. Einsele, B. Barlogie, K.C. Anderson, M. Gertz, M. Attal, P. Tosi, P. Sonneveld, M. Boccadoro, G. Morgan, O. Sezer, M.V. Mateos, M. Cavo, D. Joshua, I. Turesson, W. Chen, K. Shimizu, R. Powles, P.G. Richardson, R. Niesvizky, S.V. Rajkumar, B.G. Durie, and Imwg, *International myeloma working group (IMWG) consensus statement and guidelines regarding the current status of stem cell collection and high-dose therapy for multiple myeloma and the role of plerixafor (AMD 3100).* *Leukemia*, 2009. **23**(10): p. 1904-12.
 26. Kumar, S., S. Giralto, E.A. Stadtmauer, J.L. Harousseau, A. Palumbo, W. Bensinger, R.L. Comenzo, S. Lentzsch, N. Munshi, R. Niesvizky, J. San Miguel, H. Ludwig, L. Bergsagel, J. Blade, S. Lonial, K.C. Anderson, P. Tosi, P. Sonneveld, O. Sezer, D. Vesole, M. Cavo, H. Einsele, P.G. Richardson, B.G. Durie, S.V. Rajkumar, and G. International Myeloma Working, *Mobilization in myeloma revisited: IMWG consensus perspectives on stem cell collection following initial therapy with thalidomide-, lenalidomide-, or bortezomib-containing regimens.* *Blood*, 2009. **114**(9): p. 1729-35.
 27. Shank, B.R., V.T. Brown, and R.N. Schwartz, *Multiple myeloma maintenance therapy: a review of the pharmacologic treatment.* *J Oncol Pharm Pract*, 2015. **21**(1): p. 36-51.
 28. Neben, K., H.M. Lokhorst, A. Jauch, U. Bertsch, T. Hielscher, B. van der Holt, H. Salwender, I.W. Blau, K. Weisel, M. Pfreundschuh, C. Scheid, U. Dührsen, W. Lindemann, I.G. Schmidt-Wolf, N. Peter, C. Teschendorf, H. Martin, M. Haenel, H.G. Derigs, M.S. Raab, A.D. Ho, H. van de Velde, D. Hose, P. Sonneveld, and H. Goldschmidt, *Administration of bortezomib before and after autologous stem cell transplantation improves outcome in multiple myeloma patients with deletion 17p.* *Blood*, 2012. **119**(4): p. 940-8.
 29. Sonneveld, P., H. Goldschmidt, L. Rosinol, J. Blade, J.J. Lahuerta, M. Cavo, P. Tacchetti, E. Zamagni, M. Attal, H.M. Lokhorst, A. Desai, A. Cakana, K. Liu, H. van de Velde, D.L. Esseltine, and P. Moreau,

- Bortezomib-based versus nonbortezomib-based induction treatment before autologous stem-cell transplantation in patients with previously untreated multiple myeloma: a meta-analysis of phase III randomized, controlled trials.* J Clin Oncol, 2013. **31**(26): p. 3279-87.
30. Palumbo, A., S. Bringhen, A. Larocca, D. Rossi, F. Di Raimondo, V. Magarotto, F. Patriarca, A. Levi, G. Benevolo, I.D. Vincelli, M. Grasso, L. Franceschini, D. Gottardi, R. Zambello, V. Montefusco, A.P. Falcone, P. Omede, R. Marasca, F. Morabito, R. Mina, T. Guglielmelli, C. Nozzoli, R. Passera, G. Gaidano, M. Offidani, R. Ria, M.T. Petrucci, P. Musto, M. Boccadoro, and M. Cavo, *Bortezomib-melphalan-prednisone-thalidomide followed by maintenance with bortezomib-thalidomide compared with bortezomib-melphalan-prednisone for initial treatment of multiple myeloma: updated follow-up and improved survival.* J Clin Oncol, 2014. **32**(7): p. 634-40.
 31. Dimopoulos, M.A., E. Kastritis, C. Bamia, I. Melakopoulos, D. Gika, M. Roussou, M. Migkou, E. Eleftherakis-Papaiakovou, D. Christoulas, E. Terpos, and A. Bamias, *Reduction of osteonecrosis of the jaw (ONJ) after implementation of preventive measures in patients with multiple myeloma treated with zoledronic acid.* Ann Oncol, 2009. **20**(1): p. 117-20.
 32. Terpos, E., G. Morgan, M.A. Dimopoulos, M.T. Drake, S. Lentzsch, N. Raje, O. Sezer, R. Garcia-Sanz, K. Shimizu, I. Turesson, T. Reiman, A. Jurczynszyn, G. Merlini, A. Spencer, X. Leleu, M. Cavo, N. Munshi, S.V. Rajkumar, B.G. Durie, and G.D. Roodman, *International Myeloma Working Group recommendations for the treatment of multiple myeloma-related bone disease.* J Clin Oncol, 2013. **31**(18): p. 2347-57.
 33. Quach, H., D. Ritchie, A.K. Stewart, P. Neeson, S. Harrison, M.J. Smyth, and H.M. Prince, *Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma.* Leukemia, 2010. **24**(1): p. 22-32.
 34. McBride, W.G., *Thalidomide And Congenital Abnormalities.* The Lancet, 1961. **2**(7216): p. 1359.
 35. Sampaio, E.P., E.N. Sarno, R. Galilly, Z.A. Cohn, and G. Kaplan, *Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes.* J Exp Med, 1991. **173**(3): p. 699-703.
 36. D'Amato, R.J., M.S. Loughnan, E. Flynn, and J. Folkman, *Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(9): p. 4082-5.
 37. Davies, F.E., N. Raje, T. Hideshima, S. Lentzsch, G. Young, Y.T. Tai, B. Lin, K. Podar, D. Gupta, D. Chauhan, S.P. Treon, P.G. Richardson, R.L. Schlossman, G.J. Morgan, G.W. Muller, D.I. Stirling, and K.C. Anderson, *Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma.* Blood, 2001. **98**(1): p. 210-6.
 38. LeBlanc, R., T. Hideshima, L.P. Catley, R. Shringarpure, R. Burger, N. Mitsiades, C. Mitsiades, P. Cheema, D. Chauhan, P.G. Richardson, K.C. Anderson, and N.C. Munshi, *Immunomodulatory drug costimulates T cells via the B7-CD28 pathway.* Blood, 2004. **103**(5): p. 1787-90.
 39. Galustian, C., B. Meyer, M.C. Labarthe, K. Dredge, D. Klaschka, J. Henry, S. Todryk, R. Chen, G. Muller, D. Stirling, P. Schafer, J.B. Bartlett, and A.G. Dalgleish, *The anti-cancer agents lenalidomide and*

- pomalidomide inhibit the proliferation and function of T regulatory cells.* Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(7): p. 1033-45.
40. Yee, A.J. and N. Raje. *Monoclonal Antibodies in the Treatment of Multiple Myeloma with a Focus on Elotuzumab and Daratumumab.* 2015 26.6.2016]; Available from: <http://www.hematology.org/Thehematologist/Diffusion/4495.aspx>.
 41. Collins, S.M., C.E. Bakan, G.D. Swartzel, C.C. Hofmeister, Y.A. Efebera, H. Kwon, G.C. Starling, D. Ciarlariello, S. Bhaskar, E.L. Briercheck, T. Hughes, J. Yu, A. Rice, and D.M. Benson, Jr., *Elotuzumab directly enhances NK cell cytotoxicity against myeloma via CS1 ligation: evidence for augmented NK cell function complementing ADCC.* Cancer Immunol Immunother, 2013. **62**(12): p. 1841-9.
 42. Hsi, E.D., R. Steinle, B. Balasa, S. Szmania, A. Draksharapu, B.P. Shum, M. Huseni, D. Powers, A. Nanisetti, Y. Zhang, A.G. Rice, A. van Abbema, M. Wong, G. Liu, F. Zhan, M. Dillon, S. Chen, S. Rhodes, F. Fuh, N. Tsurushita, S. Kumar, V. Vexler, J.D. Shaughnessy, Jr., B. Barlogie, F. van Rhee, M. Hussein, D.E. Afar, and M.B. Williams, *CS1, a potential new therapeutic antibody target for the treatment of multiple myeloma.* Clin Cancer Res, 2008. **14**(9): p. 2775-84.
 43. Lonial, S., M. Dimopoulos, A. Palumbo, D. White, S. Grosicki, I. Spicka, A. Walter-Croneck, P. Moreau, M.V. Mateos, H. Magen, A. Belch, D. Reece, M. Beksac, A. Spencer, H. Oakervee, R.Z. Orlowski, M. Taniwaki, C. Rollig, H. Einsele, K.L. Wu, A. Singhal, J. San-Miguel, M. Matsumoto, J. Katz, E. Bleickardt, V. Poulart, K.C. Anderson, P. Richardson, and E.-. Investigators, *Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma.* N Engl J Med, 2015. **373**(7): p. 621-31.
 44. Zonder, J.A., A.F. Mohrbacher, S. Singhal, F. van Rhee, W.I. Bensinger, H. Ding, J. Fry, D.E. Afar, and A.K. Singhal, *A phase 1, multicenter, open-label, dose escalation study of elotuzumab in patients with advanced multiple myeloma.* Blood, 2012. **120**(3): p. 552-9.
 45. Lokhorst, H.M., T. Plesner, J.P. Laubach, H. Nahi, P. Gimsing, M. Hansson, M.C. Minnema, U. Lassen, J. Krejcik, A. Palumbo, N.W. van de Donk, T. Ahmadi, I. Khan, C.M. Uhlar, J. Wang, A.K. Sasser, N. Losic, S. Lisby, L. Basse, N. Brun, and P.G. Richardson, *Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma.* N Engl J Med, 2015. **373**(13): p. 1207-19.
 46. Lin, P., R. Owens, G. Tricot, and C.S. Wilson, *Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma.* Am J Clin Pathol, 2004. **121**(4): p. 482-8.
 47. de Weers, M., Y.T. Tai, M.S. van der Veer, J.M. Bakker, T. Vink, D.C. Jacobs, L.A. Oomen, M. Peipp, T. Valerius, J.W. Slootstra, T. Mutis, W.K. Bleeker, K.C. Anderson, H.M. Lokhorst, J.G. van de Winkel, and P.W. Parren, *Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors.* J Immunol, 2011. **186**(3): p. 1840-8.
 48. BostonBiochem. 23.11.2016]; Available from: <http://www.bostonbiochem.com/products/proteasome>.

49. EMA. *VELCADE bortezomib*. 2016 [02.07.2016]; Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/000539/human_med_001130.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.
50. EMA. *KYROLIS carfilzomib*. 2016 [02.07.2016]; Available from: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/human/medicines/003790/human_med_001932.jsp&mid=WC0b01ac058001d124.
51. Adams, J., *The proteasome: structure, function, and role in the cell*. Cancer Treat Rev, 2003. **29 Suppl 1**: p. 3-9.
52. Ciechanover, A., *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway*. Cell, 1994. **79**(1): p. 13-21.
53. Ciechanover, A., *The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life*. EMBO J, 1998. **17**(24): p. 7151-60.
54. Moreau, P., P.G. Richardson, M. Cavo, R.Z. Orlowski, J.F. San Miguel, A. Palumbo, and J.L. Harousseau, *Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later*. Blood, 2012. **120**(5): p. 947-59.
55. Rock, K.L., C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang, and A.L. Goldberg, *Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules*. Cell, 1994. **78**(5): p. 761-71.
56. Ben-Nissan, G. and M. Sharon, *Regulating the 20S proteasome ubiquitin-independent degradation pathway*. Biomolecules, 2014. **4**(3): p. 862-84.
57. Groll, M., L. Ditzel, J. Lowe, D. Stock, M. Bochtler, H.D. Bartunik, and R. Huber, *Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution*. Nature, 1997. **386**(6624): p. 463-71.
58. Orlowski, R.Z., A. Nagler, P. Sonneveld, J. Blade, R. Hajek, A. Spencer, J. San Miguel, T. Robak, A. Dmoszynska, N. Horvath, I. Spicka, H.J. Sutherland, A.N. Suvorov, S.H. Zhuang, T. Parekh, L. Xiu, Z. Yuan, W. Rackoff, and J.L. Harousseau, *Randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin plus bortezomib compared with bortezomib alone in relapsed or refractory multiple myeloma: combination therapy improves time to progression*. J Clin Oncol, 2007. **25**(25): p. 3892-901.
59. Richardson, P.G., P. Sonneveld, M.W. Schuster, D. Irwin, E.A. Stadtmauer, T. Facon, J.L. Harousseau, D. Ben-Yehuda, S. Lonial, H. Goldschmidt, D. Reece, J.F. San-Miguel, J. Blade, M. Boccadoro, J. Cavenagh, W.S. Dalton, A.L. Boral, D.L. Esseltine, J.B. Porter, D. Schenkein, K.C. Anderson, and I. Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions, *Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma*. N Engl J Med, 2005. **352**(24): p. 2487-98.
60. San Miguel, J.F., R. Schlag, N.K. Khuageva, M.A. Dimopoulos, O. Shpilberg, M. Kropff, I. Spicka, M.T. Petrucci, A. Palumbo, O.S. Samoilova, A. Dmoszynska, K.M. Abdulkadyrov, R. Schots, B. Jiang, M.V. Mateos, K.C. Anderson, D.L. Esseltine, K. Liu, A. Cakana, H. van de Velde, P.G. Richardson, and V.T. Investigators, *Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma*. N Engl J Med, 2008. **359**(9): p. 906-17.

61. Kouroukis, T.C., F.G. Baldassarre, A.E. Haynes, K. Imrie, D.E. Reece, and M.C. Cheung, *Bortezomib in multiple myeloma: systematic review and clinical considerations*. *Curr Oncol*, 2014. **21**(4): p. e573-603.
62. Dick, L.R. and P.E. Fleming, *Building on bortezomib: second-generation proteasome inhibitors as anti-cancer therapy*. *Drug Discov Today*, 2010. **15**(5-6): p. 243-9.
63. Stewart, A.K., S.V. Rajkumar, M.A. Dimopoulos, T. Masszi, I. Spicka, A. Oriol, R. Hajek, L. Rosinol, D.S. Siegel, G.G. Mihaylov, V. Goranova-Marinova, P. Rajnics, A. Suvorov, R. Niesvizky, A.J. Jakubowiak, J.F. San-Miguel, H. Ludwig, M. Wang, V. Maisnar, J. Minarik, W.I. Bensinger, M.V. Mateos, D. Ben-Yehuda, V. Kukreti, N. Zojwalla, M.E. Tonda, X. Yang, B. Xing, P. Moreau, A. Palumbo, and A. Investigators, *Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma*. *N Engl J Med*, 2015. **372**(2): p. 142-52.
64. Hajek, R., R. Bryce, S. Ro, B. Klencke, and H. Ludwig, *Design and rationale of FOCUS (PX-171-011): a randomized, open-label, phase 3 study of carfilzomib versus best supportive care regimen in patients with relapsed and refractory multiple myeloma (R/R MM)*. *BMC Cancer*, 2012. **12**: p. 415.
65. Helwick, C. *Single-Agent Carfilzomib, Compared to Corticosteroids Plus Cyclophosphamide, Fails to Improve Survival in Myeloma*. 2014 03.07.2016]; Available from: <http://www.ascopost.com/issues/november-15-2014/single-agent-carfilzomib-compared-to-corticosteroids-plus-cyclophosphamide-fails-to-improve-survival-in-myeloma/>.
66. Dimopoulos, M.A., P. Moreau, A. Palumbo, D. Joshua, L. Pour, R. Hajek, T. Facon, H. Ludwig, A. Oriol, H. Goldschmidt, L. Rosinol, J. Straub, A. Suvorov, C. Araujo, E. Rimashevskaya, T. Pika, G. Gaidano, K. Weisel, V. Goranova-Marinova, A. Schwarzer, L. Minuk, T. Masszi, I. Karamanesht, M. Offidani, V. Hungria, A. Spencer, R.Z. Orlowski, H.H. Gillenwater, N. Mohamed, S. Feng, W.J. Chng, and E. Investigators, *Carfilzomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): a randomised, phase 3, open-label, multicentre study*. *Lancet Oncol*, 2016. **17**(1): p. 27-38.
67. Vij, R., D.S. Siegel, S. Jagannath, A.J. Jakubowiak, A.K. Stewart, K. McDonagh, N. Bahlis, A. Belch, L.A. Kunkel, S. Wear, A.F. Wong, and M. Wang, *An open-label, single-arm, phase 2 study of single-agent carfilzomib in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma who have been previously treated with bortezomib*. *Br J Haematol*, 2012. **158**(6): p. 739-48.
68. Demo, S.D., C.J. Kirk, M.A. Aujay, T.J. Buchholz, M. Dajee, M.N. Ho, J. Jiang, G.J. Laidig, E.R. Lewis, F. Parlati, K.D. Shenk, M.S. Smyth, C.M. Sun, M.K. Vallone, T.M. Woo, C.J. Molineaux, and M.K. Bennett, *Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome*. *Cancer Res*, 2007. **67**(13): p. 6383-91.
69. Jain, S., C. Diefenbach, J. Zain, and O.A. O'Connor, *Emerging role of carfilzomib in treatment of relapsed and refractory lymphoid neoplasms and multiple myeloma*. *Core Evid*, 2011. **6**: p. 43-57.

70. Vij, R., M. Wang, J.L. Kaufman, S. Lonial, A.J. Jakubowiak, A.K. Stewart, V. Kukreti, S. Jagannath, K.T. McDonagh, M. Alsina, N.J. Bahlis, F.J. Reu, N.Y. Gabrail, A. Belch, J.V. Matous, P. Lee, P. Rosen, M. Sebag, D.H. Vesole, L.A. Kunkel, S.M. Wear, A.F. Wong, R.Z. Orlowski, and D.S. Siegel, *An open-label, single-arm, phase 2 (PX-171-004) study of single-agent carfilzomib in bortezomib-naive patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma*. *Blood*, 2012. **119**(24): p. 5661-70.
71. Murphy, K., P. Travers, and M. Walport, *Janeway Immunologie*. Vol. 7. Auflage. 2009: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
72. Rink, L., A. Kruse, and H. Haase, *Immunologie für Einsteiger*. Vol. 2. Auflage. 2015: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
73. *Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium*. *Nature*, 1999. **401**(6756): p. 921-3.
74. Foroni, I., A.R. Couto, V.F. Bettencourt, M. Santos, and M.L.J. Bruges-Armas, *HLA-E, HLA-F and HLA-G — The Non-Classical Side of the MHC Cluster*, in *Immunology, Allergology and Rheumatology*. 2014, INTECH open sciene.
75. Anthony Nolan Research Institute, H. *HLA Alleles Numbers*. 13.07.2016]; Available from: <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>.
76. Hewitt, E.W., *The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion*. *Immunology*, 2003. **110**(2): p. 163-9.
77. Parham, P., *The Immun System*. Vol. 3ed. 2009: Garland Science, New York.
78. Bouvier, M. and D.C. Wiley, *Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules*. *Science*, 1994. **265**(5170): p. 398-402.
79. Stickel, J., *Tumorantigene des Nierenzellkarzinoms*. 2011: Südwestdeutscher Verlag für Hochschulschriften, Saarbrücken.
80. Fremont, D.H., W.A. Hendrickson, P. Marrack, and J. Kappler, *Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides*. *Science*, 1996. **272**(5264): p. 1001-4.
81. Falk, K., O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung, and H.G. Rammensee, *Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules*. *Nature*, 1991. **351**(6324): p. 290-6.
82. Goldberg, A.L., P. Cascio, T. Saric, and K.L. Rock, *The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides*. *Mol Immunol*, 2002. **39**(3-4): p. 147-64.
83. Rock, K.L., I.A. York, T. Saric, and A.L. Goldberg, *Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides*. *Adv Immunol*, 2002. **80**: p. 1-70.
84. Gorbulev, S., R. Abele, and R. Tampe, *Allosteric crosstalk between peptide-binding, transport, and ATP hydrolysis of the ABC transporter TAP*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(7): p. 3732-7.
85. Uebel, S. and R. Tampe, *Specificity of the proteasome and the TAP transporter*. *Curr Opin Immunol*, 1999. **11**(2): p. 203-8.

86. Van Kaer, L., *Accessory proteins that control the assembly of MHC molecules with peptides*. Immunol Res, 2001. **23**(2-3): p. 205-14.
87. Grandea, A.G., 3rd and L. Van Kaer, *Tapasin: an ER chaperone that controls MHC class I assembly with peptide*. Trends Immunol, 2001. **22**(4): p. 194-9.
88. Tanaka, Y., C.T. Morita, Y. Tanaka, E. Nieves, M.B. Brenner, and B.R. Bloom, *Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells*. Nature, 1995. **375**(6527): p. 155-8.
89. Wu, Y.L., Y.P. Ding, Y. Tanaka, L.W. Shen, C.H. Wei, N. Minato, and W. Zhang, *gammadelta T cells and their potential for immunotherapy*. Int J Biol Sci, 2014. **10**(2): p. 119-35.
90. Burnet, M., *Cancer; a biological approach. I. The processes of control*. Br Med J, 1957. **1**(5022): p. 779-86.
91. Vajdic, C.M. and M.T. van Leeuwen, *What types of cancers are associated with immune suppression in HIV? Lessons from solid organ transplant recipients*. Curr Opin HIV AIDS, 2009. **4**(1): p. 35-41.
92. Grulich, A.E., M.T. van Leeuwen, M.O. Falster, and C.M. Vajdic, *Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis*. Lancet, 2007. **370**(9581): p. 59-67.
93. Zarour HM, DeLeo A, Finn OJ, and e. al., *Categories of Tumor Antigens, in Holland-Frei Cancer Medicine*, Kufe DW, et al., Editors. 2003, Hamilton (ON): BC Decker.
94. Maher, J. and E.T. Davies, *Targeting cytotoxic T lymphocytes for cancer immunotherapy*. Br J Cancer, 2004. **91**(5): p. 817-21.
95. Wang, W., A.K. Erbe, J.A. Hank, Z.S. Morris, and P.M. Sondel, *NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 368.
96. Draghi, M., N. Yawata, M. Gleimer, M. Yawata, N.M. Valiante, and P. Parham, *Single-cell analysis of the human NK cell response to missing self and its inhibition by HLA class I*. Blood, 2005. **105**(5): p. 2028-35.
97. Waldhauer, I. and A. Steinle, *NK cells and cancer immunosurveillance*. Oncogene, 2008. **27**(45): p. 5932-43.
98. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 329-60.
99. Atkins, D., S. Ferrone, G.E. Schmahl, S. Storkel, and B. Seliger, *Down-regulation of HLA class I antigen processing molecules: an immune escape mechanism of renal cell carcinoma?* J Urol, 2004. **171**(2 Pt 1): p. 885-9.
100. Hicklin, D.J., F.M. Marincola, and S. Ferrone, *HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story*. Mol Med Today, 1999. **5**(4): p. 178-86.
101. Liu, Q., C. Hao, P. Su, and J. Shi, *Down-regulation of HLA class I antigen-processing machinery components in esophageal squamous cell carcinomas: association with disease progression*. Scand J Gastroenterol, 2009. **44**(8): p. 960-9.
102. Jakowlew, S.B., *Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2006. **25**(3): p. 435-57.

103. Massague, J., *TGFbeta in Cancer*. Cell, 2008. **134**(2): p. 215-30.
104. Oft, M., *IL-10: master switch from tumor-promoting inflammation to antitumor immunity*. Cancer Immunol Res, 2014. **2**(3): p. 194-9.
105. Sato, T., M. Terai, Y. Tamura, V. Alexeev, M.J. Mastrangelo, and S.R. Selvan, *Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy*. Immunol Res, 2011. **51**(2-3): p. 170-82.
106. Zou, W., *Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(4): p. 263-74.
107. Bauer, C.A., E.Y. Kim, F. Marangoni, E. Carrizosa, N.M. Claudio, and T.R. Mempel, *Dynamic Treg interactions with intratumoral APCs promote local CTL dysfunction*. J Clin Invest, 2014. **124**(6): p. 2425-40.
108. Gabilovich, D.I., V. Bronte, S.H. Chen, M.P. Colombo, A. Ochoa, S. Ostrand-Rosenberg, and H. Schreiber, *The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells*. Cancer Res, 2007. **67**(1): p. 425; author reply 426.
109. Marvel, D. and D.I. Gabilovich, *Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected*. J Clin Invest, 2015. **125**(9): p. 3356-64.
110. Mougiakakos, D., A. Choudhury, A. Lladser, R. Kiessling, and C.C. Johansson, *Regulatory T cells in cancer*. Adv Cancer Res, 2010. **107**: p. 57-117.
111. Stewart, T.J. and S.I. Abrams, *How tumours escape mass destruction*. Oncogene, 2008. **27**(45): p. 5894-903.
112. Walker, P.R., P. Saas, and P.Y. Dietrich, *Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back*. J Immunol, 1997. **158**(10): p. 4521-4.
113. Gahrton, G., S. Tura, P. Ljungman, C. Belanger, L. Brandt, M. Cavo, T. Facon, A. Granena, M. Gore, A. Gratwohl, and et al., *Allogeneic bone marrow transplantation in multiple myeloma. European Group for Bone Marrow Transplantation*. N Engl J Med, 1991. **325**(18): p. 1267-73.
114. Krishnan, A., R. Vij, J. Keller, B. Dhakal, and P. Hari, *Moving Beyond Autologous Transplantation in Multiple Myeloma: Consolidation, Maintenance, Allogeneic Transplant, and Immune Therapy*. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2016. **35**: p. 210-21.
115. Mohty, M., J.M. Boiron, G. Damaj, A.S. Michallet, J.O. Bay, C. Faucher, V. Perreau, K. Bilger, D. Coso, A.M. Stoppa, R. Tabrizi, J.A. Gastaut, M. Michallet, D. Maraninchi, and D. Blaise, *Graft-versus-myeloma effect following antithymocyte globulin-based reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation*. Bone Marrow Transplant, 2004. **34**(1): p. 77-84.
116. June, C.H., *Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic*. J Clin Invest, 2007. **117**(6): p. 1466-76.
117. Noonan, K.A., C.A. Huff, J. Davis, M.V. Lemas, S. Fiorino, J. Bitzan, A. Ferguson, A. Emerling, L. Luznik, W. Matsui, J. Powell, E. Fuchs, G.L. Rosner, C. Epstein, L. Rudraraju, R.F. Ambinder, R.J. Jones, D. Pardoll, and I. Borrello, *Adoptive transfer of activated marrow-infiltrating lymphocytes induces measurable antitumor immunity in the bone marrow in multiple myeloma*. Sci Transl Med, 2015. **7**(288): p. 288ra78.

118. Kumar, S., T. Kimlinger, and W. Morice, *Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders*. Best Pract Res Clin Haematol, 2010. **23**(3): p. 433-51.
119. Garfall, A.L., J.A. Fraietta, and M.V. Maus, *Immunotherapy with chimeric antigen receptors for multiple myeloma*. Discov Med, 2014. **17**(91): p. 37-46.
120. Garfall, A.L., E.A. Stadtmauer, and C.H. June, *Chimeric Antigen Receptor T Cells in Myeloma*. N Engl J Med, 2016. **374**(2): p. 194.
121. Pule, M., H. Finney, and A. Lawson, *Artificial T-cell receptors*. Cytotherapy, 2003. **5**(3): p. 211-26.
122. Garcia-Sanz, R., M. Gonzalez, A. Orfao, M.J. Moro, J.M. Hernandez, D. Borrego, M. Carnero, F. Casanova, A. Barez, R. Jimenez, J.A. Portero, and J.F. San Miguel, *Analysis of natural killer-associated antigens in peripheral blood and bone marrow of multiple myeloma patients and prognostic implications*. Br J Haematol, 1996. **93**(1): p. 81-8.
123. Gonzalez, M., J.F. San Miguel, A. Gascon, M.J. Moro, J.M. Hernandez, F. Ortega, R. Jimenez, L. Guerras, M. Romero, F. Casanova, and et al., *Increased expression of natural-killer-associated and activation antigens in multiple myeloma*. Am J Hematol, 1992. **39**(2): p. 84-9.
124. Uchida, A., M. Yagita, H. Sugiyama, T. Hoshino, and M. Moore, *Strong natural killer (NK) cell activity in bone marrow of myeloma patients: accelerated maturation of bone marrow NK cells and their interaction with other bone marrow cells*. Int J Cancer, 1984. **34**(3): p. 375-81.
125. Carbone, E., P. Neri, M. Mesuraca, M.T. Fulciniti, T. Otsuki, D. Pende, V. Groh, T. Spies, G. Pollio, D. Cosman, L. Catalano, P. Tassone, B. Rotoli, and S. Venuta, *HLA class I, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells*. Blood, 2005. **105**(1): p. 251-8.
126. Frassanito, M.A., F. Silvestris, P. Cafforio, N. Silvestris, and F. Dammacco, *IgG M-components in active myeloma patients induce a down-regulation of natural killer cell activity*. Int J Clin Lab Res, 1997. **27**(1): p. 48-54.
127. Nielsen, H., H.J. Nielsen, N. Tvede, K. Klarlund, B. Mansa, F. Moesgaard, and A. Drivsholm, *Immune dysfunction in multiple myeloma. Reduced natural killer cell activity and increased levels of soluble interleukin-2 receptors*. APMIS, 1991. **99**(4): p. 340-6.
128. Sawanobori, M., K. Suzuki, Y. Nakagawa, Y. Inoue, M. Utsuyama, and K. Hirokawa, *Natural killer cell frequency and serum cytokine levels in monoclonal gammopathies: correlation of bone marrow granular lymphocytes to prognosis*. Acta Haematol, 1997. **98**(3): p. 150-4.
129. Benson, D.M., Jr., C.C. Hofmeister, S. Padmanabhan, A. Suvannasankha, S. Jagannath, R. Abonour, C. Bakan, P. Andre, Y. Efebera, J. Tiollier, M.A. Caligiuri, and S.S. Farag, *A phase 1 trial of the anti-KIR antibody IPH2101 in patients with relapsed/refractory multiple myeloma*. Blood, 2012. **120**(22): p. 4324-33.
130. Szmania, S., N. Lapteva, T. Garg, A. Greenway, J. Lingo, B. Nair, K. Stone, E. Woods, J. Khan, J. Stivers, S. Panozzo, D. Campana, W.T. Bellamy, M. Robbins, J. Epstein, S. Yaccoby, S. Waheed, A. Gee, M.

- Cottler-Fox, C. Rooney, B. Barlogie, and F. van Rhee, *Ex vivo-expanded natural killer cells demonstrate robust proliferation in vivo in high-risk relapsed multiple myeloma patients*. *J Immunother*, 2015. **38**(1): p. 24-36.
131. Shah, N., L. Li, I. Kaur, J. McCarty, E. Yvon, H. Shaim, M. Muftuoglu, E. Liu, C. Sobieski, R. Z. Orlowski, L.J.N. Cooper, D.A. Lee, S. Parmar, K. Cao, C.M. Hosing, S. Ahmed, Y. Nieto, Q. Bashir, K.K Patel, C.M. Bollard, I.K. McNiece, M. Qazilbash, R.E. Champlin, K. Rezvani and E.J. Shpall. *Infusion of Ex Vivo Expanded Allogeneic Cord Blood-Derived Natural Killer Cells in Combination with Autologous Stem Cell Transplantation for Multiple Myeloma: Results of a Phase I Study*. 2015 13.12.2016]; Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/126/23/929?sso-checked=true>.
132. Couzin-Frankel, J., *Breakthrough of the year 2013*. *Cancer immunotherapy*. *Science*, 2013. **342**(6165): p. 1432-3.
133. EMA. *YERVOY Ipilimumab*. 2011 04.10.2016]; Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/002213/WC500109302.pdf.
134. Romano, E., M. Kusio-Kobialka, P.G. Foukas, P. Baumgaertner, C. Meyer, P. Ballabeni, O. Michielin, B. Weide, P. Romero, and D.E. Speiser, *Ipilimumab-dependent cell-mediated cytotoxicity of regulatory T cells ex vivo by nonclassical monocytes in melanoma patients*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(19): p. 6140-5.
135. Borghaei, H., L. Paz-Ares, L. Horn, D.R. Spigel, M. Steins, N.E. Ready, L.Q. Chow, E.E. Vokes, E. Felip, E. Holgado, F. Barlesi, M. Kohlhaufli, O. Arrieta, M.A. Burgio, J. Fayette, H. Lena, E. Poddubskaya, D.E. Gerber, S.N. Gettinger, C.M. Rudin, N. Rizvi, L. Crino, G.R. Blumenschein, Jr., S.J. Antonia, C. Dorange, C.T. Harbison, F. Graf Finckenstein, and J.R. Brahmer, *Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(17): p. 1627-39.
136. Motzer, R.J., B. Escudier, D.F. McDermott, S. George, H.J. Hammers, S. Srinivas, S.S. Tykodi, J.A. Sosman, G. Procopio, E.R. Plimack, D. Castellano, T.K. Choueiri, H. Gurney, F. Donskov, P. Bono, J. Wagstaff, T.C. Gaurer, T. Ueda, Y. Tomita, F.A. Schutz, C. Kollmannsberger, J. Larkin, A. Ravaud, J.S. Simon, L.A. Xu, I.M. Waxman, P. Sharma, and I. CheckMate, *Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(19): p. 1803-13.
137. Snyder, A., V. Makarov, T. Merghoub, J. Yuan, J.M. Zaretsky, A. Desrichard, L.A. Walsh, M.A. Postow, P. Wong, T.S. Ho, T.J. Hollmann, C. Bruggeman, K. Kannan, Y. Li, C. Elipenahli, C. Liu, C.T. Harbison, L. Wang, A. Ribas, J.D. Wolchok, and T.A. Chan, *Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(23): p. 2189-99.
138. Benson, D.M., Jr., C.E. Bakan, A. Mishra, C.C. Hofmeister, Y. Efebera, B. Becknell, R.A. Baiocchi, J. Zhang, J. Yu, M.K. Smith, C.N. Greenfield, P. Porcu, S.M. Devine, R. Rotem-Yehudar, G. Lozanski, J.C. Byrd, and M.A. Caligiuri, *The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell*

- versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody.* Blood, 2010. **116**(13): p. 2286-94.
139. Lesokhin, A.M., S.M. Ansell, P. Armand, E.C. Scott, A. Halwani, M. Gutierrez, M.M. Millenson, A.D. Cohen, S.J. Schuster, D. Lebovic, M.V. Dhodapkar, D. Avigan, B. Chapuy, A.H. Ligon, S.J. Rodig, D. Cattrly, L. Zhu, J.F. Grosso, S.Y. Kim, M.A. Shipp, I. Borrello and J. Timmerman. *Preliminary Results of a Phase I Study of Nivolumab (BMS-936558) in Patients with Relapsed or Refractory Lymphoid Malignancies.* 2014 13.12.2016]; Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/124/21/291?sso-checked=true>
140. Rosenblatt, J., B. Glotzbecker, H. Mills, B. Vasir, D. Tzachanis, J.D. Levine, R.M. Joyce, K. Wellenstein, W. Keefe, M. Schickler, R. Rotem-Yehudar, D. Kufe, and D. Avigan, *PD-1 blockade by CT-011, anti-PD-1 antibody, enhances ex vivo T-cell responses to autologous dendritic cell/myeloma fusion vaccine.* J Immunother, 2011. **34**(5): p. 409-18.
141. San Miguel, J., M.V. Mateos, J.J. Shah, E.M. Ocio, P. Rodriguez-Otero, D. Reece, N.C. Munshi, D. Avigan, Y. Ge, A. Balakumaran, P. Marinello, R.Z. Orlowski and D. Siegel. *Pembrolizumab in Combination with Lenalidomide and Low-Dose Dexamethasone for Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (RRMM): Keynote-023.* 2015 13.12.2016]; Available from: <http://www.bloodjournal.org/content/126/23/505>
142. Dranoff, G., E. Jaffee, A. Lazenby, P. Golumbek, H. Levitsky, K. Brose, V. Jackson, H. Hamada, D. Pardoll, and R.C. Mulligan, *Vaccination with irradiated tumor cells engineered to secrete murine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates potent, specific, and long-lasting anti-tumor immunity.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3539-43.
143. Slingluff, C.L., Jr., *The present and future of peptide vaccines for cancer: single or multiple, long or short, alone or in combination?* Cancer J, 2011. **17**(5): p. 343-50.
144. Greiner, J., A. Schmitt, K. Giannopoulos, M.T. Rojewski, M. Gotz, I. Funk, M. Ringhoffer, D. Bunjes, S. Hofmann, G. Ritter, H. Dohner, and M. Schmitt, *High-dose RHAMM-R3 peptide vaccination for patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome and multiple myeloma.* Haematologica, 2010. **95**(7): p. 1191-7.
145. Schmitt, M., A. Schmitt, M.T. Rojewski, J. Chen, K. Giannopoulos, F. Fei, Y. Yu, M. Gotz, M. Heyduk, G. Ritter, D.E. Speiser, S. Gnjatic, P. Guillaume, M. Ringhoffer, R.F. Schlenk, P. Liebisch, D. Bunjes, H. Shiku, H. Dohner, and J. Greiner, *RHAMM-R3 peptide vaccination in patients with acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome, and multiple myeloma elicits immunologic and clinical responses.* Blood, 2008. **111**(3): p. 1357-65.
146. Rosenblatt, J., I. Avivi, B. Vasir, L. Uhl, N.C. Munshi, T. Katz, B.R. Dey, P. Somaiya, H. Mills, F. Campigotto, E. Weller, R. Joyce, J.D. Levine, D. Tzachanis, P. Richardson, J. Laubach, N. Raje, V. Boussiotis, Y.E. Yuan, L. Bisharat, V. Held, J. Rowe, K. Anderson, D. Kufe, and D. Avigan, *Vaccination with dendritic cell/tumor fusions following autologous stem*

- cell transplant induces immunologic and clinical responses in multiple myeloma patients.* Clin Cancer Res, 2013. **19**(13): p. 3640-8.
147. Nilsson, K., H. Bennich, S.G. Johansson, and J. Ponten, *Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient.* Clin Exp Immunol, 1970. **7**(4): p. 477-89.
148. DSMZ. U266. 22.06.2016]; Available from: http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-9.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192.
149. Goldman-Leikin, R.E., H.R. Salwen, C.V. Herst, D. Variakojis, M.L. Bian, M.M. Le Beau, P. Selvanayagan, R. Marder, R. Anderson, S. Weitzman, and et al., *Characterization of a novel myeloma cell line, MM.1.* J Lab Clin Med, 1989. **113**(3): p. 335-45.
150. ATCC. MM.1S. 22.06.2016]; Available from: http://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-2974.aspx?geo_country=de - characteristics.
151. Jackson, N., J. Lowe, J. Ball, E. Bromidge, N.R. Ling, S. Larkins, M.J. Griffith, and I.M. Franklin, *Two new IgA1-kappa plasma cell leukaemia cell lines (JJN-1 & JJN-2) which proliferate in response to B cell stimulatory factor 2.* Clin Exp Immunol, 1989. **75**(1): p. 93-9.
152. DSMZ. JJN-3. 22.06.2016]; Available from: http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-541.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192.
153. Matsuoka, Y., G.E. Moore, Y. Yagi, and D. Pressman, *Production of free light chains of immunoglobulin by a hematopoietic cell line derived from a patient with multiple myeloma.* Proc Soc Exp Biol Med, 1967. **125**(4): p. 1246-50.
154. DSMZ. RPMI8226. 22.06.2016]; Available from: http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-402.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192.
155. Pegoraro, L., F. Malavasi, G. Bellone, M. Massaia, M. Boccadoro, G. Saglio, A. Guerrasio, G. Benetton, L. Lombardi, R. Coda, and et al., *The human myeloma cell line LP-1: a versatile model in which to study early plasma-cell differentiation and c-myc activation.* Blood, 1989. **73**(4): p. 1020-7.
156. DSMZ. LP-1. 22.06.2016]; Available from: http://www.dsmz.de/catalogues/details/culture/ACC-41.html?tx_dsmzresources_pi5%5BreturnPid%5D=192.
157. Boyum, A., *Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages.* Scand J Immunol, 1976. **Suppl 5**: p. 9-15.
158. Qiagen. *QIAamp Viral RNA Mini Handbook.* 2010 [cited 2016 31.03.]; Available from: <https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=c80685c0-4103-49ea-aa72-8989420e3018&lang=en>.
159. Kuhn, D.J., Q. Chen, P.M. Voorhees, J.S. Strader, K.D. Shenk, C.M. Sun, S.D. Demo, M.K. Bennett, F.W. van Leeuwen, A.A. Chanan-Khan, and R.Z. Orlowski, *Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma.* Blood, 2007. **110**(9): p. 3281-90.

160. Murphy, K., *Janeway's Immunobiology*. Vol. 8th Edition. 2012: Garland Science, New York.
161. Dako. QIFIKIT. [cited 2016 16.04.]; Available from: <http://www.dako.com/de/download.pdf?objectid=111993002>.
162. Barnstable, C.J., W.F. Bodmer, G. Brown, G. Galfre, C. Milstein, A.F. Williams, and A. Ziegler, *Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis*. Cell, 1978. **14**(1): p. 9-20.
163. Berlin, C., D.J. Kowalewski, H. Schuster, N. Mirza, S. Walz, M. Handel, B. Schmid-Horch, H.R. Salih, L. Kanz, H.G. Rammensee, S. Stevanovic, and J.S. Stichel, *Mapping the HLA ligandome landscape of acute myeloid leukemia: a targeted approach toward peptide-based immunotherapy*. Leukemia, 2015. **29**(3): p. 647-59.
164. Walz, S., J.S. Stichel, D.J. Kowalewski, H. Schuster, K. Weisel, L. Backert, S. Kahn, A. Nelde, T. Stroh, M. Handel, O. Kohlbacher, L. Kanz, H.R. Salih, H.G. Rammensee, and S. Stevanovic, *The antigenic landscape of multiple myeloma: mass spectrometry (re)defines targets for T-cell-based immunotherapy*. Blood, 2015. **126**(10): p. 1203-13.
165. Kowalewski, D.J. and S. Stevanovic, *Biochemical large-scale identification of MHC class I ligands*. Methods Mol Biol, 2013. **960**: p. 145-57.
166. Guiliano, D.B. and A.N. Antoniou, *Measuring synthesis and degradation of MHC class I molecules*. Methods Mol Biol, 2013. **960**: p. 93-108.
167. Kvist, S., K. Wiman, L. Claesson, P.A. Peterson, and B. Dobberstein, *Membrane insertion and oligomeric assembly of HLA-DR histocompatibility antigens*. Cell, 1982. **29**(1): p. 61-9.
168. Universität Köln. LC-MS/MS. [cited 2016 26.04.]; Available from: <http://www.lci-koeln.de/deutsch/veroeffentlichungen/lci-focus/lc-ms-ms-was-ist-das-eigentlich->.
169. Kall, L., J.D. Canterbury, J. Weston, W.S. Noble, and M.J. MacCoss, *Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets*. Nat Methods, 2007. **4**(11): p. 923-5.
170. Schuler, M.M., M.D. Nastke, and S. Stevanovic, *SYFPEITHI: database for searching and T-cell epitope prediction*. Methods Mol Biol, 2007. **409**: p. 75-93.
171. Kowalewski, D.J., H. Schuster, L. Backert, C. Berlin, S. Kahn, L. Kanz, H.R. Salih, H.G. Rammensee, S. Stevanovic, and J.S. Stichel, *HLA ligandome analysis identifies the underlying specificities of spontaneous antileukemia immune responses in chronic lymphocytic leukemia (CLL)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015. **112**(2): p. E166-75.
172. Czerkinsky, C.C., L.A. Nilsson, H. Nygren, O. Ouchterlony, and A. Tarkowski, *A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 109-21.
173. Widenmeyer, M., H. Griesemann, S. Stevanovic, S. Feyerabend, R. Klein, S. Attig, J. Hennenlotter, D. Wernet, D.V. Kuprash, A.Y. Sazykin, S. Pascolo, A. Stenzl, C. Gouttefangeas, and H.G. Rammensee, *Promiscuous survivin peptide induces robust CD4+ T-cell responses in*

- the majority of vaccinated cancer patients.* Int J Cancer, 2012. **131**(1): p. 140-9.
174. Britten, C.M., C. Gouttefangeas, M.J. Welters, G. Pawelec, S. Koch, C. Ottensmeier, A. Mander, S. Walter, A. Paschen, J. Muller-Berghaus, I. Haas, A. Mackensen, T. Kollgaard, P. thor Straten, M. Schmitt, K. Giannopoulos, R. Maier, H. Veelken, C. Bertinetti, A. Konur, C. Huber, S. Stevanovic, T. Wolfel, and S.H. van der Burg, *The CIMT-monitoring panel: a two-step approach to harmonize the enumeration of antigen-specific CD8+ T lymphocytes by structural and functional assays.* Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(3): p. 289-302.
175. Wang, L., N. Jin, A. Schmitt, J. Greiner, G. Malcherek, M. Hundemer, J. Mani, D. Hose, M.S. Raab, A.D. Ho, B.A. Chen, H. Goldschmidt, and M. Schmitt, *T cell-based targeted immunotherapies for patients with multiple myeloma.* Int J Cancer, 2015. **136**(8): p. 1751-68.
176. Kowalewski, D.J., S. Walz, L. Backert, H. Schuster, O. Kohlbacher, K. Weisel, S.M. Rittig, L. Kanz, H.R. Salih, H.G. Rammensee, S. Stevanovic, and J.S. StICKEL, *Carfilzomib alters the HLA-presented peptidome of myeloma cells and impairs presentation of peptides with aromatic C-termini.* Blood Cancer J, 2016. **6**: p. e411.
177. Rollig, C., S. Knop, and M. Bornhauser, *Multiple myeloma.* Lancet, 2015. **385**(9983): p. 2197-208.
178. Barlogie, B., G.J. Tricot, F. van Rhee, E. Angtuaco, R. Walker, J. Epstein, J.D. Shaughnessy, S. Jagannath, V. Bolejack, J. Gurley, A. Hoering, D. Vesole, R. Desikan, D. Siegel, J. Mehta, S. Singhal, N.C. Munshi, M. Dhodapkar, B. Jenkins, M. Attal, J.L. Harousseau, and J. Crowley, *Long-term outcome results of the first tandem autotransplant trial for multiple myeloma.* Br J Haematol, 2006. **135**(2): p. 158-64.
179. Kumar, S.K., A. Dispenzieri, M.Q. Lacy, M.A. Gertz, F.K. Buadi, S. Pandey, P. Kapoor, D. Dingli, S.R. Hayman, N. Leung, J. Lust, A. McCurdy, S.J. Russell, S.R. Zeldenrust, R.A. Kyle, and S.V. Rajkumar, *Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients.* Leukemia, 2014. **28**(5): p. 1122-8.
180. Agrawal, S., P. Statkevich, G. Bajaj, Y. Feng, S. Saeger, D.D. Desai, J.S. Park, I.M. Waxman, A. Roy, and M. Gupta, *Evaluation of Immunogenicity of Nivolumab Monotherapy and its Clinical Relevance in Patients With Metastatic Solid Tumors.* J Clin Pharmacol, 2016.
181. Tsai, K.K. and A.I. Daud, *Nivolumab plus ipilimumab in the treatment of advanced melanoma.* J Hematol Oncol, 2015. **8**: p. 123.
182. Wolchok, J.D., H. Kluger, M.K. Callahan, M.A. Postow, N.A. Rizvi, A.M. Lesokhin, N.H. Segal, C.E. Ariyan, R.A. Gordon, K. Reed, M.M. Burke, A. Caldwell, S.A. Kronenberg, B.U. Agunwamba, X. Zhang, I. Lowy, H.D. Inzunza, W. Feely, C.E. Horak, Q. Hong, A.J. Korman, J.M. Wigginton, A. Gupta, and M. Sznol, *Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma.* N Engl J Med, 2013. **369**(2): p. 122-33.
183. Robert, C., G.V. Long, B. Brady, C. Dutriaux, M. Maio, L. Mortier, J.C. Hassel, P. Rutkowski, C. McNeil, E. Kalinka-Warzocha, K.J. Savage, M.M. Hernberg, C. Lebbe, J. Charles, C. Mihalciou, V. Chiarion-Sileni,

- C. Mauch, F. Cognetti, A. Arance, H. Schmidt, D. Schadendorf, H. Gogas, L. Lundgren-Eriksson, C. Horak, B. Sharkey, I.M. Waxman, V. Atkinson, and P.A. Ascierto, *Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation*. *N Engl J Med*, 2015. **372**(4): p. 320-30.
184. Brahmer, J., K.L. Reckamp, P. Baas, L. Crino, W.E. Eberhardt, E. Poddubskaya, S. Antonia, A. Pluzanski, E.E. Vokes, E. Holgado, D. Waterhouse, N. Ready, J. Gainor, O. Aren Frontera, L. Havel, M. Steins, M.C. Garassino, J.G. Aerts, M. Domine, L. Paz-Ares, M. Reck, C. Baudelet, C.T. Harbison, B. Lestini, and D.R. Spigel, *Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non-Small-Cell Lung Cancer*. *N Engl J Med*, 2015. **373**(2): p. 123-35.
185. Herzberg, B., M.J. Campo, and J.F. Gainor, *Immune Checkpoint Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer*. *Oncologist*, 2016. Epub.
186. Grunwald, V., *Checkpoint Blockade - a New Treatment Paradigm in Renal Cell Carcinoma*. *Oncol Res Treat*, 2016. **39**(6): p. 353-8.
187. Motzer, R.J., B.I. Rini, D.F. McDermott, B.G. Redman, T.M. Kuzel, M.R. Harrison, U.N. Vaishampayan, H.A. Drabkin, S. George, T.F. Logan, K.A. Margolin, E.R. Plimack, A.M. Lambert, I.M. Waxman, and H.J. Hammers, *Nivolumab for Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase II Trial*. *J Clin Oncol*, 2015. **33**(13): p. 1430-7.
188. Ansell, S.M., S.A. Hurvitz, P.A. Koenig, B.R. LaPlant, B.F. Kabat, D. Fernando, T.M. Habermann, D.J. Inwards, M. Verma, R. Yamada, C. Erlichman, I. Lowy, and J.M. Timmerman, *Phase I study of ipilimumab, an anti-CTLA-4 monoclonal antibody, in patients with relapsed and refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(20): p. 6446-53.
189. Ansell, S.M., A.M. Lesokhin, I. Borrello, A. Halwani, E.C. Scott, M. Gutierrez, S.J. Schuster, M.M. Millenson, D. Cattry, G.J. Freeman, S.J. Rodig, B. Chapuy, A.H. Ligon, L. Zhu, J.F. Grosso, S.Y. Kim, J.M. Timmerman, M.A. Shipp, and P. Armand, *PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma*. *N Engl J Med*, 2015. **372**(4): p. 311-9.
190. Armand, P., M.A. Shipp, V. Ribrag, J.M. Michot, P.L. Zinzani, J. Kuruvilla, E.S. Snyder, A.D. Ricart, A. Balakumaran, S. Rose, and C.H. Moskowitz, *Programmed Death-1 Blockade With Pembrolizumab in Patients With Classical Hodgkin Lymphoma After Brentuximab Vedotin Failure*. *J Clin Oncol*, 2016, Epub.
191. Suen, H., R. Brown, S. Yang, P.J. Ho, J. Gibson, and D. Joshua, *The failure of immune checkpoint blockade in multiple myeloma with PD-1 inhibitors in a phase 1 study*. *Leukemia*, 2015. **29**(7): p. 1621-2.
192. U.S. National Institute of Health. *A Study of Pembrolizumab (MK-3475) in Combination With Standard of Care Treatments in Participants With Multiple Myeloma (MK-3475-023/KEYNOTE-023)*. 2016 17.09.2016]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02036502>.
193. U.S. National Institute of Health. *A Study to Determine Dose and Regimen of Durvalumab as Monotherapy or in Combination With Pomalidomide With or Without Dexamethasone in Subjects With*

- Relapsed and Refractory Multiple Myeloma*. 2016 [17.09.2016]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02616640>.
194. U.S. National Institute of Health. *A Study of Durvalumab in Combination With Lenalidomide With and Without Dexamethasone in Subjects With Newly Diagnosed Multiple Myeloma*. 2016 [17.09.2016]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02685826>.
 195. Brown, R.D., E. Yuen, M. Nelson, J. Gibson, and D. Joshua, *The prognostic significance of T cell receptor beta gene rearrangements and idiotype-reactive T cells in multiple myeloma*. *Leukemia*, 1997. **11**(8): p. 1312-7.
 196. Lodewyck, T. and J.J. Cornelissen, *Allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia: a risk-adapted approach*. *Blood Rev*, 2008. **22**(6): p. 293-302.
 197. Raitakari, M., R.D. Brown, D. Sze, E. Yuen, L. Barrow, M. Nelson, B. Pope, W. Esdale, J. Gibson, and D.E. Joshua, *T-cell expansions in patients with multiple myeloma have a phenotype of cytotoxic T cells*. *Br J Haematol*, 2000. **110**(1): p. 203-9.
 198. Shimoni, A., I. Hardan, F. Ayuk, G. Schilling, D. Atanackovic, W. Zeller, R. Yerushalmi, A.R. Zander, N. Kroger, and A. Nagler, *Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation with reduced-intensity conditioning in patients with refractory and recurrent multiple myeloma: long-term follow-up*. *Cancer*, 2010. **116**(15): p. 3621-30.
 199. Goker, H., U.Y. Malkan, H. Demiroglu, and Y. Buyukasik, *Chimeric antigen receptor T cell treatment in hematologic malignancies*. *Transfus Apher Sci*, 2016. **54**(1): p. 35-40.
 200. van Rooij, N., M.M. van Buuren, D. Philips, A. Velds, M. Toebes, B. Heemskerk, L.J. van Dijk, S. Behjati, H. Hilkmann, D. El Atmioui, M. Nieuwland, M.R. Stratton, R.M. Kerkhoven, C. Kesmir, J.B. Haanen, P. Kvistborg, and T.N. Schumacher, *Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma*. *J Clin Oncol*, 2013. **31**(32): p. e439-42.
 201. Robbins, P.F., Y.C. Lu, M. El-Gamil, Y.F. Li, C. Gross, J. Gartner, J.C. Lin, J.K. Teer, P. Cliften, E. Tycksen, Y. Samuels, and S.A. Rosenberg, *Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells*. *Nat Med*, 2013. **19**(6): p. 747-52.
 202. Tran, E., S. Turcotte, A. Gros, P.F. Robbins, Y.C. Lu, M.E. Dudley, J.R. Wunderlich, R.P. Somerville, K. Hogan, C.S. Hinrichs, M.R. Parkhurst, J.C. Yang, and S.A. Rosenberg, *Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4+ T cells in a patient with epithelial cancer*. *Science*, 2014. **344**(6184): p. 641-5.
 203. Schumacher, T., L. Bunse, S. Pusch, F. Sahm, B. Wiestler, J. Quandt, O. Menn, M. Osswald, I. Oezen, M. Ott, M. Keil, J. Balss, K. Rauschenbach, A.K. Grabowska, I. Vogler, J. Diekmann, N. Trautwein, S.B. Eichmuller, J. Okun, S. Stevanovic, A.B. Riemer, U. Sahin, M.A. Friese, P. Beckhove, A. von Deimling, W. Wick, and M. Platten, *A vaccine targeting mutant IDH1 induces antitumour immunity*. *Nature*, 2014. **512**(7514): p. 324-7.

204. Snyder, A. and T.A. Chan, *Immunogenic peptide discovery in cancer genomes*. *Curr Opin Genet Dev*, 2015. **30C**: p. 7-16.
205. Linnemann, C., M.M. van Buuren, L. Bies, E.M. Verdegaal, R. Schotte, J.J. Calis, S. Behjati, A. Velds, H. Hilkmann, D.E. Atmioui, M. Visser, M.R. Stratton, J.B. Haanen, H. Spits, S.H. van der Burg, and T.N. Schumacher, *High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4+ T cells in human melanoma*. *Nat Med*, 2015. **21**(1): p. 81-5.
206. Rizvi, N.A., M.D. Hellmann, A. Snyder, P. Kvistborg, V. Makarov, J.J. Havel, W. Lee, J. Yuan, P. Wong, T.S. Ho, M.L. Miller, N. Rekhtman, A.L. Moreira, F. Ibrahim, C. Bruggeman, B. Gasmi, R. Zappasodi, Y. Maeda, C. Sander, E.B. Garon, T. Merghoub, J.D. Wolchok, T.N. Schumacher, and T.A. Chan, *Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer*. *Science*, 2015. **348**(6230): p. 124-8.
207. Alexandrov, L.B., S. Nik-Zainal, D.C. Wedge, S.A. Aparicio, S. Behjati, A.V. Biankin, G.R. Bignell, N. Bolli, A. Borg, A.L. Borresen-Dale, S. Boyault, B. Burkhardt, A.P. Butler, C. Caldas, H.R. Davies, C. Desmedt, R. Eils, J.E. Eyfjord, J.A. Foekens, M. Greaves, F. Hosoda, B. Hutter, T. Ilcic, S. Imbeaud, M. Imielinski, N. Jager, D.T. Jones, D. Jones, S. Knappskog, M. Kool, S.R. Lakhani, C. Lopez-Otin, S. Martin, N.C. Munshi, H. Nakamura, P.A. Northcott, M. Pajic, E. Papaemmanuil, A. Paradiso, J.V. Pearson, X.S. Puente, K. Raine, M. Ramakrishna, A.L. Richardson, J. Richter, P. Rosenstiel, M. Schlesner, T.N. Schumacher, P.N. Span, J.W. Teague, Y. Totoki, A.N. Tutt, R. Valdes-Mas, M.M. van Buuren, L. van 't Veer, A. Vincent-Salomon, N. Waddell, L.R. Yates, I. Australian Pancreatic Cancer Genome, I.B.C. Consortium, I.M.-S. Consortium, I. PedBrain, J. Zucman-Rossi, P.A. Futreal, U. McDermott, P. Lichter, M. Meyerson, S.M. Grimmond, R. Siebert, E. Campo, T. Shibata, S.M. Pfister, P.J. Campbell, and M.R. Stratton, *Signatures of mutational processes in human cancer*. *Nature*, 2013. **500**(7463): p. 415-21.
208. Gros, A., M.R. Parkhurst, E. Tran, A. Pasetto, P.F. Robbins, S. Ilyas, T.D. Prickett, J.J. Gartner, J.S. Crystal, I.M. Roberts, K. Trebska-McGowan, J.R. Wunderlich, J.C. Yang, and S.A. Rosenberg, *Prospective identification of neoantigen-specific lymphocytes in the peripheral blood of melanoma patients*. *Nat Med*, 2016. **22**(4): p. 433-8.
209. Gubin, M.M., X. Zhang, H. Schuster, E. Caron, J.P. Ward, T. Noguchi, Y. Ivanova, J. Hundal, C.D. Arthur, W.J. Krebber, G.E. Mulder, M. Toebes, M.D. Vesely, S.S. Lam, A.J. Korman, J.P. Allison, G.J. Freeman, A.H. Sharpe, E.L. Pearce, T.N. Schumacher, R. Aebbersold, H.G. Rammensee, C.J. Melief, E.R. Mardis, W.E. Gillanders, M.N. Artyomov, and R.D. Schreiber, *Checkpoint blockade cancer immunotherapy targets tumour-specific mutant antigens*. *Nature*, 2014. **515**(7528): p. 577-81.
210. Stronen, E., M. Toebes, S. Kelderman, M.M. van Buuren, W. Yang, N. van Rooij, M. Donia, M.L. Boschen, F. Lund-Johansen, J. Olweus, and T.N. Schumacher, *Targeting of cancer neoantigens with donor-derived T cell receptor repertoires*. *Science*, 2016. **352**(6291): p. 1337-41.

211. Vogelstein, B., N. Papadopoulos, V.E. Velculescu, S. Zhou, L.A. Diaz, Jr., and K.W. Kinzler, *Cancer genome landscapes*. Science, 2013. **339**(6127): p. 1546-58.
212. Feyerabend, S., S. Stevanovic, C. Gouttefangeas, D. Wernet, J. Hennenlotter, J. Bedke, K. Dietz, S. Pascolo, M. Kuczyk, H.G. Rammensee, and A. Stenzl, *Novel multi-peptide vaccination in Hla-A2+ hormone sensitive patients with biochemical relapse of prostate cancer*. Prostate, 2009. **69**(9): p. 917-27.
213. Antonilli, M., H. Rahimi, V. Visconti, C. Napoletano, I. Ruscito, I.G. Zizzari, S. Caponnetto, G. Barchiesi, R. Iadarola, L. Pierelli, A. Rughetti, F. Bellati, P.B. Panici, and M. Nuti, *Triple peptide vaccination as consolidation treatment in women affected by ovarian and breast cancer: Clinical and immunological data of a phase I/II clinical trial*. Int J Oncol, 2016. **48**(4): p. 1369-78.
214. Iversen, T.Z., L. Engell-Noerregaard, E. Ellebaek, R. Andersen, S.K. Larsen, J. Bjoern, C. Zeyher, C. Gouttefangeas, B.M. Thomsen, B. Holm, P. Thor Straten, A. Mellemggaard, M.H. Andersen, and I.M. Svane, *Long-lasting disease stabilization in the absence of toxicity in metastatic lung cancer patients vaccinated with an epitope derived from indoleamine 2,3 dioxygenase*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(1): p. 221-32.
215. Noguchi, M., K. Matsumoto, H. Uemura, G. Arai, M. Eto, S. Naito, C. Ohyama, Y. Nasu, M. Tanaka, F. Moriya, S. Suekane, S. Matsueda, N. Komatsu, T. Sasada, A. Yamada, T. Kakuma, and K. Itoh, *An Open-Label, Randomized Phase II Trial of Personalized Peptide Vaccination in Patients with Bladder Cancer that Progressed after Platinum-Based Chemotherapy*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(1): p. 54-60.
216. Peoples, G.E., J.M. Gurney, M.T. Hueman, M.M. Woll, G.B. Ryan, C.E. Storrer, C. Fisher, C.D. Shriver, C.G. Ioannides, and S. Ponniah, *Clinical trial results of a HER2/neu (E75) vaccine to prevent recurrence in high-risk breast cancer patients*. J Clin Oncol, 2005. **23**(30): p. 7536-45.
217. Walter, S., T. Weinschenk, A. Stenzl, R. Zdrojowy, A. Pluzanska, C. Szczylik, M. Staehler, W. Brugger, P.Y. Dietrich, R. Mendrzyk, N. Hilf, O. Schoor, J. Fritsche, A. Mahr, D. Maurer, V. Vass, C. Trautwein, P. Lewandrowski, C. Flohr, H. Pohla, J.J. Stanczak, V. Bronte, S. Mandruzzato, T. Biedermann, G. Pawelec, E. Derhovanessian, H. Yamagishi, T. Miki, F. Hongo, N. Takaha, K. Hirakawa, H. Tanaka, S. Stevanovic, J. Frisch, A. Mayer-Mokler, A. Kirner, H.G. Rammensee, C. Reinhardt, and H. Singh-Jasuja, *Multipeptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival*. Nat Med, 2012. **18**(8): p. 1254-61.
218. Weihrauch, M.R., S. Ansen, E. Jurkiewicz, C. Geisen, Z. Xia, K.S. Anderson, E. Gracien, M. Schmidt, B. Wittig, V. Diehl, J. Wolf, H. Bohlen, and L.M. Nadler, *Phase I/II combined chemoimmunotherapy with carcinoembryonic antigen-derived HLA-A2-restricted CAP-1 peptide and irinotecan, 5-fluorouracil, and leucovorin in patients with primary metastatic colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(16): p. 5993-6001.

219. Yoshimura, K., T. Minami, M. Nozawa, T. Kimura, S. Egawa, H. Fujimoto, A. Yamada, K. Itoh, and H. Uemura, *A Phase 2 Randomized Controlled Trial of Personalized Peptide Vaccine Immunotherapy with Low-dose Dexamethasone Versus Dexamethasone Alone in Chemotherapy-naive Castration-resistant Prostate Cancer*. *Eur Urol*, 2016. **70**(1): p. 35-41.
220. Kageyama, S., T.J. Tsomides, Y. Sykulev, and H.N. Eisen, *Variations in the number of peptide-MHC class I complexes required to activate cytotoxic T cell responses*. *J Immunol*, 1995. **154**(2): p. 567-76.
221. Krogsgaard, M. and M.M. Davis, *How T cells 'see' antigen*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(3): p. 239-45.
222. Watson, N.F., J.M. Ramage, Z. Madjd, I. Spendlove, I.O. Ellis, J.H. Scholefield, and L.G. Durrant, *Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis*. *Int J Cancer*, 2006. **118**(1): p. 6-10.
223. Bukur, J., B. Malenica, C. Huber, and B. Seliger, *Altered expression of nonclassical HLA class Ib antigens in human renal cell carcinoma and its association with impaired immune response*. *Hum Immunol*, 2003. **64**(11): p. 1081-92.
224. Marincola, F.M., E.M. Jaffee, D.J. Hicklin, and S. Ferrone, *Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance*. *Adv Immunol*, 2000. **74**: p. 181-273.
225. Rolland, P., S. Deen, I. Scott, L. Durrant, and I. Spendlove, *Human leukocyte antigen class I antigen expression is an independent prognostic factor in ovarian cancer*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(12): p. 3591-6.
226. Seliger, B., T. Cabrera, F. Garrido, and S. Ferrone, *HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells*. *Semin Cancer Biol*, 2002. **12**(1): p. 3-13.
227. Brouwer, R.E., P. van der Heiden, G.M. Schreuder, A. Mulder, G. Datema, J.D. Anholts, R. Willemze, F.H. Claas, and J.H. Falkenburg, *Loss or downregulation of HLA class I expression at the allelic level in acute leukemia is infrequent but functionally relevant, and can be restored by interferon*. *Hum Immunol*, 2002. **63**(3): p. 200-10.
228. Vollmer, M., L. Li, A. Schmitt, J. Greiner, P. Reinhardt, M. Ringhoffer, M. Wiesneth, H. Dohner, and M. Schmitt, *Expression of human leucocyte antigens and co-stimulatory molecules on blasts of patients with acute myeloid leukaemia*. *Br J Haematol*, 2003. **120**(6): p. 1000-8.
229. Poncelet, P. and P. Carayon, *Cytofluorometric quantification of cell-surface antigens by indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies*. *J Immunol Methods*, 1985. **85**(1): p. 65-74.
230. Lavabre-Bertrand, T., G. Janossy, C. Exbrayat, P. Bourquard, C. Duperray, and M. Navarro, *Leukemia-associated changes identified by quantitative flow cytometry. II. CD5 over-expression and monitoring in B-CLL*. *Leukemia*, 1994. **8**(9): p. 1557-63.
231. Juul-Madsen, H.R. and L. Olsson, *Discrepancy between transcriptional products and cell surface expression of MHC class I antigens in*

- metastatic and non-metastatic Lewis lung tumor cells*. APMIS, 1990. **98**(7): p. 624-36.
232. Onkopedia. *Hämatologische Diagnostik*. 28.08.2016]; Available from: <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/haematologische-diagnostik/@@view/html/index.html>.
233. Cabrera, T., I. Maleno, A. Collado, M.A. Lopez Nevot, B.D. Tait, and F. Garrido, *Analysis of HLA class I alterations in tumors: choosing a strategy based on known patterns of underlying molecular mechanisms*. Tissue Antigens, 2007. **69 Suppl 1**: p. 264-8.
234. Romero, J.M., N. Aptsiauri, F. Vazquez, J.M. Cozar, J. Canton, T. Cabrera, M. Tallada, F. Garrido, and F. Ruiz-Cabello, *Analysis of the expression of HLA class I, proinflammatory cytokines and chemokines in primary tumors from patients with localized and metastatic renal cell carcinoma*. Tissue Antigens, 2006. **68**(4): p. 303-10.
235. Saenz-Lopez, P., C. Gouttefangeas, J. Hennenlotter, A. Concha, I. Maleno, F. Ruiz-Cabello, J.M. Cozar, M. Tallada, A. Stenzl, H.G. Rammensee, F. Garrido, and T. Cabrera, *Higher HLA class I expression in renal cell carcinoma than in autologous normal tissue*. Tissue Antigens, 2010. **75**(2): p. 110-8.
236. Zheng, M.M., Z. Zhang, K. Bemis, A.R. Belch, L.M. Pilarski, J.E. Shively, and J. Kirshner, *The systemic cytokine environment is permanently altered in multiple myeloma*. PLoS One, 2013. **8**(3): p. e58504.
237. Blom, D.J., L.R. Schurmans, I. De Waard-Siebinga, D. De Wolff-Rouendaal, J.E. Keunen, and M.J. Jager, *HLA expression in a primary uveal melanoma, its cell line, and four of its metastases*. Br J Ophthalmol, 1997. **81**(11): p. 989-93.
238. Schuster, H., *Applied immunopeptidomics - Identification and characterization of novel targets for the immunotherapy of ovarian cancer*. 2015. Dissertation, Universität Tübingen .
239. Weinzierl, A.O., C. Lemmel, O. Schoor, M. Muller, T. Kruger, D. Wernet, J. Hennenlotter, A. Stenzl, K. Klingel, H.G. Rammensee, and S. Stevanovic, *Distorted relation between mRNA copy number and corresponding major histocompatibility complex ligand density on the cell surface*. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(1): p. 102-13.
240. Prilliman, K., M. Lindsey, Y. Zuo, K.W. Jackson, Y. Zhang, and W. Hildebrand, *Large-scale production of class I bound peptides: assigning a signature to HLA-B*1501*. Immunogenetics, 1997. **45**(6): p. 379-85.
241. Storkus, W.J., H.J. Zeh, 3rd, R.D. Salter, and M.T. Lotze, *Identification of T-cell epitopes: rapid isolation of class I-presented peptides from viable cells by mild acid elution*. J Immunother Emphasis Tumor Immunol, 1993. **14**(2): p. 94-103.
242. Torabi-Pour, N., A.M. Nouri, R. Saffie, and R.T. Oliver, *Comparative study between direct mild acid extraction and immunobead purification technique for isolation of HLA class I-associated peptides*. Urol Int, 2002. **68**(1): p. 38-43.
243. Stickel, J.S., A.O. Weinzierl, N. Hillen, O. Drews, M.M. Schuler, J. Hennenlotter, D. Wernet, C.A. Muller, A. Stenzl, H.G. Rammensee, and S. Stevanovic, *HLA ligand profiles of primary renal cell carcinoma*

- maintained in metastases*. *Cancer Immunol Immunother*, 2009. **58**(9): p. 1407-17.
244. Bassani-Sternberg, M., S. Pletscher-Frankild, L.J. Jensen, and M. Mann, *Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation*. *Mol Cell Proteomics*, 2015. **14**(3): p. 658-73.
245. Cree, I.A., S. Glaysher, and A.L. Harvey, *Efficacy of anti-cancer agents in cell lines versus human primary tumour tissue*. *Curr Opin Pharmacol*, 2010. **10**(4): p. 375-9.
246. Dufour, J.M., B. Dass, K.R. Halley, G.S. Korbitt, D.E. Dixon, and R.V. Rajotte, *Sertoli cell line lacks the immunoprotective properties associated with primary Sertoli cells*. *Cell Transplant*, 2008. **17**(5): p. 525-34.
247. Kobayashi, S., T. Taki, H. Nagoshi, Y. Chinen, Y. Yokokawa, H. Kanegane, Y. Matsumoto, J. Kuroda, S. Horiike, K. Nishida, and M. Taniwaki, *Identification of novel fusion genes with 28S ribosomal DNA in hematologic malignancies*. *Int J Oncol*, 2014. **44**(4): p. 1193-8.
248. Rand, K.A., C. Song, E. Dean, D.J. Serie, K. Curtin, X. Sheng, D. Hu, C.A. Huff, L. Bernal-Mizrachi, M.H. Tomasson, S. Ailwadhi, S. Singhal, K.S. Pawlish, E.S. Peters, B.L. CH, A. Stram, D.J. Van Den Berg, C.K. Edlund, D.V. Conti, T.M. Zimmerman, A.E. Hwang, S. Huntsman, J.J. Graff, A. Nooka, Y. Kong, S.L. Pregja, S.I. Berndt, W.J. Blot, J.D. Carpten, G. Casey, L.W. Chu, W.R. Diver, V.L. Stevens, M.R. Lieber, P.J. Goodman, A.J. Hennis, A.W. Hsing, J. Mehta, R.A. Kittles, S. Kolb, E.A. Klein, C.M. Leske, A.B. Murphy, B. Nemesure, C. Neslund-Dudas, S.S. Strom, R. Vij, B.A. Rybicki, J.L. Stanford, L. Signorello, J.S. Witte, C.B. Ambrosone, P. Bhatti, E.M. John, L. Bernstein, W. Zheng, A.F. Olshan, J.J. Hu, R.G. Ziegler, S.J. Nyante, E.V. Bandera, B.M. Birmann, S.A. Ingles, M.F. Press, D. Atanackovic, M. Glenn, L. Cannon-Albright, B. Jones, G. Tricot, T.G. Martin, S.K. Kumar, J.L. Wolf, S.L. Deming, N. Rothman, A. Brooks-Wilson, S.V. Rajkumar, L.N. Kolonel, S.J. Chanock, S.L. Slager, R.K. Severson, N. Janakirman, H.J. Terebelo, E.E. Brown, A.J. De Roos, A. Mohrbacher, G.A. Colditz, G.G. Giles, J.J. Spinelli, B.C. Chiu, N.C. Munshi, K.C. Anderson, J. Levy, J.A. Zonder, R.Z. Orlowski, S. Lonial, N.J. Camp, C.M. Vachon, E. Ziv, D.O. Stram, D.J. Hazelett and W. Cozen, *A meta-analysis of multiple myeloma risk regions in African and European ancestry populations identifies putatively functional loci*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2016.
249. Xie, Z., C. Bi, J.Y. Chooi, Z.L. Chan, N. Mustafa, and W.J. Chng, *MMSET regulates expression of IRF4 in t(4;14) myeloma and its silencing potentiates the effect of bortezomib*. *Leukemia*, 2015. **29**(12): p. 2347-54.
250. Xie, Z., J. Gunaratne, L.L. Cheong, S.C. Liu, T.L. Koh, G. Huang, W.P. Blackstock, and W.J. Chng, *Plasma membrane proteomics identifies biomarkers associated with MMSET overexpression in T(4;14) multiple myeloma*. *Oncotarget*, 2013. **4**(7): p. 1008-18.
251. Zaravinos, A., P. Kanellou, G.I. Lambrou, and D.A. Spandidos, *Gene set enrichment analysis of the NF-kappaB/Snail/YY1/RKIP circuitry in multiple myeloma*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(5): p. 4987-5005.

252. Keats, J.J., C.A. Maxwell, B.J. Taylor, M.J. Hendzel, M. Chesi, P.L. Bergsagel, L.M. Larratt, M.J. Mant, T. Reiman, A.R. Belch, and L.M. Pilarski, *Overexpression of transcripts originating from the MMSET locus characterizes all t(4;14)(p16;q32)-positive multiple myeloma patients*. *Blood*, 2005. **105**(10): p. 4060-9.
253. Keats, J.J., T. Reiman, A.R. Belch, and L.M. Pilarski, *Ten years and counting: so what do we know about t(4;14)(p16;q32) multiple myeloma*. *Leuk Lymphoma*, 2006. **47**(11): p. 2289-300.
254. Keats, J.J., T. Reiman, C.A. Maxwell, B.J. Taylor, L.M. Larratt, M.J. Mant, A.R. Belch, and L.M. Pilarski, *In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression*. *Blood*, 2003. **101**(4): p. 1520-9.
255. Xie, Z. and W.J. Chng, *MMSET: role and therapeutic opportunities in multiple myeloma*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 636514.
256. Brito, J.L., B. Walker, M. Jenner, N.J. Dickens, N.J. Brown, F.M. Ross, A. Avramidou, J.A. Irving, D. Gonzalez, F.E. Davies, and G.J. Morgan, *MMSET deregulation affects cell cycle progression and adhesion regulons in t(4;14) myeloma plasma cells*. *Haematologica*, 2009. **94**(1): p. 78-86.
257. Martinez-Garcia, E., R. Popovic, D.J. Min, S.M. Sweet, P.M. Thomas, L. Zamdborg, A. Heffner, C. Will, L. Lamy, L.M. Staudt, D.L. Levens, N.L. Kelleher, and J.D. Licht, *The MMSET histone methyl transferase switches global histone methylation and alters gene expression in t(4;14) multiple myeloma cells*. *Blood*, 2011. **117**(1): p. 211-20.
258. Min, D.J., T. Ezponda, M.K. Kim, C.M. Will, E. Martinez-Garcia, R. Popovic, V. Basrur, K.S. Elenitoba-Johnson, and J.D. Licht, *MMSET stimulates myeloma cell growth through microRNA-mediated modulation of c-MYC*. *Leukemia*, 2013. **27**(3): p. 686-94.
259. Mirabella, F., P. Wu, C.P. Wardell, M.F. Kaiser, B.A. Walker, D.C. Johnson, and G.J. Morgan, *MMSET is the key molecular target in t(4;14) myeloma*. *Blood Cancer J*, 2013. **3**: p. e114.
260. Smith, E.M., K. Boyd, and F.E. Davies, *The potential role of epigenetic therapy in multiple myeloma*. *Br J Haematol*, 2010. **148**(5): p. 702-13.
261. Hebraud, B., D. Caillot, J. Corre, G. Marit, C. Hulin, X. Leleu, L. Lode, M. Wetterwald, M. Dib, P. Rodon, L. Voillat, B. Royer, E. Voog, O. Fitoussi, A.M. Stoppa, L. Garderet, B. Kolb, M. Maigre, N. Boullanger, O. Allangba, L. Karlin, N. Daguindau, L. Legros, C. Sohn, M.V. Joubert, P. Lenain, T. Facon, M. Attal, P. Moreau, and H. Avet-Loiseau, *The translocation t(4;14) can be present only in minor subclones in multiple myeloma*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(17): p. 4634-7.
262. Amgen. *European Commission Approves Extended Indication For Amgen's Kyprolis® (Carfilzomib) For The Treatment Of Relapsed Multiple Myeloma Patients*. 2016 [05.09.2016]; Available from: <http://www.amgen.com/media/news-releases/2016/07/european-commission-approves-extended-indication-for-amgens-kyprolis-carfilzomib-for-the-treatment-of-relapsed-multiple-myeloma-patients/>.
263. Dytfeld, D., J. Jasielec, K.A. Griffith, D. Lebovic, D.H. Vesole, S. Jagannath, A. Al-Zoubi, T. Anderson, K. Detweiler-Short, K. Stockerl-

- Goldstein, A. Ahmed, T. Jobkar, D.E. Durecki, K. McDonnell, M. Mietzel, D. Couriel, M. Kaminski, R. Vij, and A.J. Jakubowiak, *Carfilzomib, lenalidomide, and low-dose dexamethasone in elderly patients with newly diagnosed multiple myeloma*. *Haematologica*, 2014. **99**(9): p. e162-4.
264. Korde, N., M. Roschewski, A. Zingone, M. Kwok, E.E. Manasanch, M. Bhutani, N. Tajeja, D. Kazandjian, S. Mailankody, P. Wu, C. Morrison, R. Costello, Y. Zhang, D. Burton, M. Mulquin, D. Zuchlinski, L. Lamping, A. Carpenter, Y. Wall, G. Carter, S.C. Cunningham, V. Gounden, T.M. Sissung, C. Peer, I. Maric, K.R. Calvo, R. Braylan, C. Yuan, M. Stetler-Stevenson, D.C. Arthur, K.A. Kong, L. Weng, M. Faham, L. Lindenberg, K. Kurdziel, P. Choyke, S.M. Steinberg, W. Figg, and O. Landgren, *Treatment With Carfilzomib-Lenalidomide-Dexamethasone With Lenalidomide Extension in Patients With Smoldering or Newly Diagnosed Multiple Myeloma*. *JAMA Oncol*, 2015. **1**(6): p. 746-54.
265. Obeng, E.A., L.M. Carlson, D.M. Gutman, W.J. Harrington, Jr., K.P. Lee, and L.H. Boise, *Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells*. *Blood*, 2006. **107**(12): p. 4907-16.
266. Parlati, F., S.J. Lee, M. Aujay, E. Suzuki, K. Levitsky, J.B. Lorens, D.R. Micklem, P. Ruurs, C. Sylvain, Y. Lu, K.D. Shenk, and M.K. Bennett, *Carfilzomib can induce tumor cell death through selective inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome*. *Blood*, 2009. **114**(16): p. 3439-47.
267. Benham, A.M. and J.J. Neefjes, *Proteasome activity limits the assembly of MHC class I molecules after IFN-gamma stimulation*. *J Immunol*, 1997. **159**(12): p. 5896-904.
268. Harding, C.V., J. France, R. Song, J.M. Farah, S. Chatterjee, M. Iqbal, and R. Siman, *Novel dipeptide aldehydes are proteasome inhibitors and block the MHC-I antigen-processing pathway*. *J Immunol*, 1995. **155**(4): p. 1767-75.
269. Neefjes, J., M.L. Jongsma, P. Paul, and O. Bakke, *Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(12): p. 823-36.
270. Schwarz, K., R. de Giuli, G. Schmidtke, S. Kostka, M. van den Broek, K.B. Kim, C.M. Crews, R. Kraft, and M. Groettrup, *The selective proteasome inhibitors lactacystin and epoxomicin can be used to either up- or down-regulate antigen presentation at nontoxic doses*. *J Immunol*, 2000. **164**(12): p. 6147-57.
271. O'Connor, O.A., A.K. Stewart, M. Vallone, C.J. Molineaux, L.A. Kunkel, J.F. Gerecitano, and R.Z. Orlowski, *A phase 1 dose escalation study of the safety and pharmacokinetics of the novel proteasome inhibitor carfilzomib (PR-171) in patients with hematologic malignancies*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(22): p. 7085-91.
272. Nahnsen, S., C. Bielow, K. Reinert, and O. Kohlbacher, *Tools for label-free peptide quantification*. *Mol Cell Proteomics*, 2013. **12**(3): p. 549-56.
273. Tate, S., B. Larsen, R. Bonner, and A.C. Gingras, *Label-free quantitative proteomics trends for protein-protein interactions*. *J Proteomics*, 2013. **81**: p. 91-101.

274. Ong, S.E., B. Blagoev, I. Kratchmarova, D.B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, and M. Mann, *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics*. Mol Cell Proteomics, 2002. **1**(5): p. 376-86.
275. Shi, J., G.J. Tricot, T.K. Garg, P.A. Malaviarachchi, S.M. Szmania, R.E. Kellum, B. Storrie, A. Mulder, J.D. Shaughnessy, Jr., B. Barlogie, and F. van Rhee, *Bortezomib down-regulates the cell-surface expression of HLA class I and enhances natural killer cell-mediated lysis of myeloma*. Blood, 2008. **111**(3): p. 1309-17.
276. Yang, G., M. Gao, Y. Zhang, Y. Kong, L. Gao, Y. Tao, Y. Han, H. Wu, X. Meng, H. Xu, F. Zhan, X. Wu, and J. Shi, *Carfilzomib enhances natural killer cell-mediated lysis of myeloma linked with decreasing expression of HLA class I*. Oncotarget, 2015. **6**(29): p. 26982-94.
277. Sidney, J., S. Southwood, and A. Sette, *Classification of A1- and A24-supertype molecules by analysis of their MHC-peptide binding repertoires*. Immunogenetics, 2005. **57**(6): p. 393-408.
278. Toes, R.E., A.K. Nussbaum, S. Degermann, M. Schirle, N.P. Emmerich, M. Kraft, C. Laplace, A. Zwinderman, T.P. Dick, J. Muller, B. Schonfisch, C. Schmid, H.J. Fehling, S. Stevanovic, H.G. Rammensee, and H. Schild, *Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products*. J Exp Med, 2001. **194**(1): p. 1-12.
279. Shraibman, B., D.M. Kadosh, E. Barnea, and A. Admon, *Human Leukocyte Antigen (HLA) Peptides Derived from Tumor Antigens Induced by Inhibition of DNA Methylation for Development of Drug-facilitated Immunotherapy*. Mol Cell Proteomics, 2016. **15**(9): p. 3058-70.

7. Eigenanteil

7.1. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde am Interfakultären Institut für Zellbiologie in der Abteilung für Immunologie unter Betreuung von Prof. Dr. Stefan Stevanović angefertigt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. S. Stevanović und Dr. Juliane Stickel.

Die PBMC/BMNC-Isolierung, die Immunpräzipitation durch Affinitätschromatographie mittels BrCN-Säulen sowie die Immunogenitätstestung der HLA-Liganden im IFN- γ ELISPOT wurden nach Einarbeitung durch Dr. J. Stickel eigenständig durchgeführt.

Die synthetischen Peptide wurden durch Prof. Dr. S. Stevanović, Patricia Hristić, Nicole Bauer und Katharina Graf hergestellt.

Die Zellkultivierung der MCL wurden, nach Einarbeitung durch Claudia Falkenburger, eigenständig durchgeführt. Die Behandlung von Zellen mit Carfilzomib wurde eigenständig durchgeführt.

Die Durchflusszytometrie-basierte HLA-Quantifizierung wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Heiko Schuster durchgeführt. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Ergebnisse sowie die Berechnung der absoluten HLA-Menge wurde nach Einarbeitung durch Dr. H. Schuster eigenständig durchgeführt.

Die massenspektrometrische Analyse der Proben wurde durch Daniel Kowalewski durchgeführt. Die Probenvorbereitung sowie die Auswertung der Ergebnisse wurden nach Einarbeitung durch D. Kowalewski eigenständig durchgeführt.

Die FDR-Kalkulation zur Definition der Myelom-assoziierten Antigene sowie die Programme und Scripte zur Auswertung der LFQ-Analyse wurden durch Linus Backert erstellt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung durch Dr. J. Stickel und D. Kowalewski eigenständig.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 15.12.2016

8. Publikationen

1. **Walz S***, Stickel JS*, Kowalewski DJ, et al: The antigenic landscape of multiple myeloma: mass spectrometry (re)defines targets for T-cell-based immunotherapy. *Blood* 126:1203-13, 2015
2. Kowalewski DJ*, **Walz S***, Backert L, et al: Carfilzomib alters the HLA-presented peptidome of myeloma cells and impairs presentation of peptides with aromatic C-termini. *Blood Cancer J* 6:e411, 2016.
3. Berlin C, Kowalewski DJ, Schuster H, Mirza N, **Walz S**, et al: Mapping the HLA ligandome landscape of acute myeloid leukemia: a targeted approach toward peptide-based immunotherapy. *Leukemia* 29(3):647-59, 2015.

* geteilte Erstautorschaft

9. Danksagung

an Prof. Dr. H.-G. Rammensee für die Möglichkeit an seinem Institut zu promovieren und seine Unterstützung bei meiner Arbeit.

an Prof. Dr. S. Stevanović für die hervorragende fachliche und persönliche Betreuung sowie die Unterstützung und Anregungen während meiner Zeit in seinem Labor sowie an sein Team für die Herstellung der synthetischen Peptide.

an Dr. J. Stickel für die umfassende Betreuung meiner Doktorarbeit, die unendliche Geduld bei der Einarbeitung in diverse Methoden und Auswertungen, immer neue spannende Ideen zur Weiterentwicklung des Projektes und ein immer offenes Ohr für Fragen und Probleme.

an Prof. Dr. L. Kanz und Prof. Dr. K. Weisel für die Bereitstellung der Tumorproben.

an Prof. Dr. M. Handel und sein gesamtes Team für die Mitwirkung an der Bereitstellung gesunder Vergleichsproben.

an Prof. Dr. H.R. Salih und sein Team für die freundliche Überlassung zahlreicher Zelllinien.

an D. Kowalewski für die unendliche Geduld, die vielen Ideen und die Unterstützung nicht nur bei der massenspektrometrischen Analyse der Proben.

an Dr. H. Schuster für ein immer offenes Ohr für Fragen und Probleme, sowie die gesamte Betreuung und Einarbeitung in die durchflusszytometrischen Analysen.

an A. Nelde für die unendliche Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und zusammen mit T. Bilich für die Unterstützung bei den T-Zell-Experimenten.

an L. Backert für viele Ideen und tolle Unterstützung im Bereich der Bioinformatik.

an C. Falkenburger für die hervorragende Einarbeitung in die Zellkultur und die Mithilfe bei jeglichen Schwierigkeiten sowie die Herstellung der Massen an Zellkulturmedien.

an alle Elche, von denen jeder Einzelne durch das tolle Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft einen beträchtlichen Teil zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen hat.

an I. Jelas und T. Wolf, ohne deren Unterstützung die Durchführung meiner Doktorarbeit nicht möglich gewesen wäre.

an meine Eltern und meine Schwester für ihre unendliche, liebevolle Unterstützung in allen Belangen sowie die Möglichkeit ein sorgenfreies Studium zu absolvieren.

An Juli für das Verständnis, die motivierenden Worte und die unendliche Unterstützung, ohne dich wäre nichts wie es ist! Danke für Alles!
