

Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. R. Haas

Auswirkungen einer Lenalidomid-Konsolidierungstherapie auf die
hämatopoetischen Progenitor- und Stammzellen bei Patienten mit
Multiplem Myelom

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Niklas Bernhard Heinzler
2017

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Roland Fenk

Zweitgutachter: PD Dr. med. Patric Kröpil

Meiner Familie und allen, die mich unterstützt haben

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

C. M. Wilk, N. Heinzler, A. Boquoi, R.-P. Cadeddu, T. Strapatsas, A. Dienst, F. Majidi, R. Deenen, I. Bruns, T. Schroeder, K. Köhrer, R. Haas, G. Kobbe, and R. Fenk "Lenalidomide consolidation treatment in patients with multiple myeloma suppresses myelopoieses but spares erythropoiesis." *Int. J. cancer*, 2016 Nov 15, (139(10):2343-52)

Zusammenfassung

Das Multiple Myelom ist eine weltweit verbreitete Tumorerkrankung der Plasmazelle, die nach aktuellem Forschungsstand nicht heilbar ist. Durch Einsatz von Immunomodulatoren wie Lenalidomid oder Pomalidomid in der Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie konnte die Prognose der Patienten in den letzten Jahren deutlich verbessert werden. In mehreren repräsentativen Studien konnte durch Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie mit Lenalidomid ein verlängertes progressionsfreies Überleben sowie ein verlängertes Gesamtüberleben nachgewiesen werden. Der überzeugenden antitumoralen Wirkung stehen jedoch erhebliche Nebenwirkungen, wie zum Beispiel schwere Neutropenien mit assoziierter Infektanfälligkeit, vermehrte thromboembolische Ereignisse und eine erhöhte Inzidenz von hämatologischen Sekundärmalignomen gegenüber. Eine Vielzahl dieser unerwünschten Wirkungen ist mechanistisch auf eine gestörte Funktion der hämatopoetischen Stammzelle zurückzuführen.

Ziel dieser Arbeit war daher, molekulare und funktionelle Veränderungen der hämatopoetischen Stammzellen durch eine Lenalidomidkonsolidierungstherapie zu untersuchen. Dazu wurden hämatopoetische Stammzellen aus Knochenmarksaspiraten von einer Patientenkohorte vor und nach Lenalidomidtherapie isoliert. Mit diesen Zellen wurden Genexpressionanalysen sowie Untersuchungen zu Proliferation und Differenzierung vor und nach Lenalidomidtherapie durchgeführt und anschließend die Ergebnisse verglichen. Es konnte insgesamt eine myelosuppressive Wirkung von Lenalidomid unter Aussparung der Erythropoese nachgewiesen werden. Als mögliche Mediatoren für die proerythropoetischen Effekte wurde eine Hemmung des TGF β -Signalwegs in hämatopoetischen Stammzellen durch Lenalidomid sowie eine Induktion von fetalem Hämoglobin identifiziert. Diese Erkenntnis eröffnet neue Therapieoptionen für Lenalidomid oder andere TGF β -Inhibitoren bei Patienten mit Tumoranämien, da eine pathologisch gesteigerte TGF β -Aktivität bei vielen Tumorentitäten in der Knochenmarksnische nachzuweisen ist. Hinweise auf die Entstehung von sekundären Malignomen sowie die ursächlichen Mechanismen wurden nicht gefunden.

Abkürzungen

AGAP1	<i>Ankyrin repeat and PH domain 1</i>	CDKN2C	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C</i>
AIM2	<i>Absent in myeloma 2</i>	cDNA	<i>Complementary DNA</i>
Akt-1	<i>RAC-alpha serine/threonine-protein kinase</i>	CEBPB	<i>CCAAT/enhancer-binding protein β</i>
AML	<i>Akute myeloische Leukämie</i>	CECR1	<i>Cat eye syndrome critical region protein 1</i>
APC	<i>Allophycocyanine</i>	CFU	<i>Colony forming unit</i>
AQP3	<i>Aquaporin 3</i>	CLL	<i>Chronisch lymphatische Leukämie</i>
ASZT	<i>Autologe Stammzelltransplantation</i>	CML	<i>Chronisch myeloische Leukämie</i>
BCL11A	<i>B-cell lymphoma/leukemia 11A</i>	CR	<i>Complete remission</i>
BFU	<i>Burst forming unit</i>	CXCL12	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>
BIRC3	<i>Baculoviral IAP repeat-containing protein 3</i>	CXCR4	<i>Stromal cell-derived factor 1 receptor</i>
BM	<i>Bone marrow</i>	DDB1	<i>DNA-damage-binding protein 1</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>	EKLF	<i>Erythroid Krüppel-like factor</i>
CASP1	<i>Caspase 1</i>	EPO	<i>Erythropoetin</i>
CCL5	<i>Chemokine ligand 5</i>	EPS8	<i>Epidermal growth factor receptor kinase substrate 8</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>	EPX	<i>Eosinophil peroxidase</i>
CDH1	<i>Cadherin 1</i>	ERAF	<i>Alpha-hemoglobin-stabilizing protein</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>		

ERAF	<i>Erythroid associated factor</i>	HBG	<i>Hemoglobin subunit gamma</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>	HMOX1	<i>Heme oxygenase 1</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>	HS	<i>Horse serum</i>
FCN1	<i>Ficolin 1</i>	HSC	<i>Hematopoietic stem cell</i>
FGF-2	<i>Fibroblast growth factor 2</i>	HSPC	<i>Hematopoietic stem and progenitor cell</i>
FHL2	<i>Four and a half LIM domains protein 2</i>	ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>	IgA	<i>Immunglobulin A</i>
FLA-1	<i>Fasciclin-like arabinogalactan protein 1</i>	IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
FLC	<i>Freie Leichtketten</i>	IgG	<i>Immunglobulin G</i>
FLT3L	<i>FMS-like tyrosinkinase 3 ligand</i>	IgM	<i>Immunglobulin M</i>
GATA1	<i>Globin transcription factor 1</i>	IKFZ	<i>Ikaros family zinc finger protein</i>
GBP2	<i>Guanylate binding protein 2</i>	IL	<i>Interleukin</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>	IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
GIMAP4	<i>GTPase IMAP family member 4</i>	IMiDs	<i>Immunomodulatory drugs</i>
GYPA	<i>Glycophorin A</i>	IRF4	<i>Interferon regulatory factor 4</i>
GYPB	<i>Glycophorin B</i>	ISS	<i>Internationales Staging-System</i>
GZMB	<i>Granzyme B</i>	ITGAX	<i>CD11c, Integrin alpha x</i>
Hb	<i>Hämoglobin</i>	KLF-1	<i>Krueppel-like factor 1</i>
HbF	<i>Fetales Hämoglobin</i>		

LILRB2	<i>Leukozyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member 2</i>	NSAID	<i>Nonsteroidal anti-inflammatory drug</i>
LTBP1	<i>Latent TGF-β binding protein 1</i>	p21-WAF	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>
LTCIC	<i>Long term culture initiating cell</i>	p27	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>
MDS	<i>Myelodysplastisches Syndrom</i>	p57	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C</i>
MGUS	<i>Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz</i>	PBK	<i>Lymphokine-activated killer T-cell-originated protein kinase</i>
MIP-1 α	<i>Macrophage inhibitory protein α</i>	PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
MNC	<i>Mononuclear cells</i>	PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
MNDA	<i>Myeloid cell nuclear differentiation antigen</i>	PE	<i>Phycoerythrine</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>	PerCP	<i>Peridinin-chlorophyll proteins</i>
MSC	<i>Mesenchymal stem cell</i>	PLA2G7	<i>Phospholipase A2 group 7</i>
MSR1	<i>Macrophage scavenger receptor 1</i>	PR	<i>Partial remission</i>
MUC-1	<i>Mucin 1</i>	PU.1	<i>Transcription factor PU.1</i>
MYL4	<i>Myosin light chain 4</i>	RAB38	<i>Ras-related protein Rab-38</i>
NEDD4L	<i>Neural precursor cell expressed developmentally downregulated gene 4-like</i>	RANKL	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
NET1	<i>Neuroepithelial cell-transforming gene 1 protein</i>	rB	<i>Retinoblastoma protein</i>
		RBX1	<i>RING-box 1</i>
		RHAG	<i>Rh-associated glycoprotein</i>

RHCE	<i>Blood group Rh (CE) polypeptide</i>	t-AML	Therapieassoziierte AML
RRMM	<i>Refractory or relapsed multiple myeloma</i>	t-MDS	Therapieassoziiertes MDS
SCF	<i>Stem cell factor</i>	TEK	<i>TEK tyrosin kinase</i>
SD	<i>Stable disease</i>	TGF-β	<i>Transforming growth factor β</i>
SD208	<i>2-(5-Chloro-2-fluorophenyl)-4-[(4-pyridyl)amino]pteridine</i>	TNC	<i>Total nucleated cell</i>
SDF-1	<i>Stromal cell-derived factor 1</i>	TNFAIP2	<i>TNF-α induced protein 2</i>
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i>	TNFSF10	<i>Tumor necrosis factor superfamily member 10</i>
Skp2	<i>S-phase kinase-associated protein 2</i>	TNF-α	Tumornekrosefaktor α
SMAD	Portmanteau aus SMA-Gen (<i>small body size</i>) und MAD-Gen (<i>mothers against decapentaplegic</i>)	TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
SMURF1	<i>E3 ubiquitin-protein ligase SMURF1</i>	VCAM	<i>Vascular cell adhesion protein</i>
SPI1	<i>Spi-1 Proto-Oncogene</i>	VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
TAL1	<i>T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1</i>	VGPR	<i>Very good partial remission</i>
		VLA-4	<i>Very Late Antigen-4</i>
		XK	<i>Kell blood group precursor</i>

2.8 Phospho-SMAD2 Färbung.....	25
2.9 Kryokonservierung.....	26
2.10 Statistische Auswertung.....	26
3. Ergebnisse.....	27
3.1 Patienten.....	27
3.2 Blutbild.....	28
3.3 Zytologie.....	29
3.4 Durchflusszytometrie.....	30
3.5 Proliferation.....	31
3.6 LTCIC-Assay.....	32
3.7 Colony-Forming Assay.....	32
3.8 Oligonukleotid-Microarray.....	34
3.9 Phospho-SMAD2 Färbung.....	37
4. Diskussion.....	38
4.1 Neutropenien.....	38
4.2 TGFβ-Signalweg.....	39
4.3 Fetales Hämoglobin.....	43
4.4 Sekundärmaligne.....	47
5. Schlussfolgerungen.....	53

1. Einleitung

1.1 Multiples Myelom

1.1.1 Epidemiologie

Das multiple Myelom ist eine weltweit verbreitete Tumorart im Erwachsenenalter. Jährlich werden etwa 86.000 Neuerkrankungen registriert, das entspricht einem Anteil von 0,8% aller Tumorerkrankungen weltweit. Mit einem Anteil von 0,9% an allen global registrierten Todesfällen durch Krebserkrankungen spielt das Myelom eine nicht unbedeutende Rolle. Die höchsten Inzidenzraten werden in den Industrienationen registriert [1]. In den USA erkrankten 2014 beispielsweise etwa 24.050 Patienten an einem Multiplen Myelom, das entspricht einem Anteil von 1,4% an allen neu aufgetretenen Krebserkrankungen (Quelle: SEER-Programm des National Cancer Institut). In Deutschland liegt der Anteil der Myelomerkrankungen an allen neu aufgetretenen Krebserkrankungen bei 1,0% und somit ebenfalls knapp über dem weltweiten Durchschnitt. Das mediane Erkrankungsalter liegt in Deutschland zwischen 71 und 73 Jahren, mit einer in etwa ausgeglichenen geschlechterspezifischen Verteilung (Leitlinie Multiples Myelom der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, 09/2013).

1.1.2 Pathomechanismus

Die Erkrankung gehört in der WHO-Klassifikation zu den B-Non-Hodgkin-Lymphomen und beruht auf einer monoklonalen Proliferation von Plasmazellen. Wie eine gesunde Plasmazelle produzieren und sezernieren die meisten Myelomzellen Immunglobuline und einen gewissen Anteil an freien Leichtketten, in manchen Fällen werden auch nur Leichtketten produziert. Eine Ausnahme stellen selten vorkommende asekretorische Myelome dar, die keine Immunglobuline sezernieren. Durch die Monoklonalität der Plasmazelle sind die produzierten Immunglobuline und Leichtketten spezifisch und werden als Paraprotein oder im englischen Sprachraum auch als *M-protein* bezeichnet. Am häufigsten kommen Paraproteine vom Typ IgG vor, gefolgt von IgA und reinen Leichtketten.

Die Tumorzellen proliferieren in Zellnestern im Knochenmark, ein extramedullärer Befall wird seltener beobachtet. Der Tumor führt über eine Osteoklastenaktivierung zu einem Abbau der Knochenmatrix [2]. Die Patienten werden daher häufig durch Knochenschmerzen, pathologische Frakturen und eine gestörte Calciumhomöostase mit erhöhten Plasmaspiegeln von Calcium symptomatisch. Typische Beschwerden wie Übelkeit, Muskelschwäche, Herzrhythmusstörungen und Vigilanzminderungen treten in diesem Kontext auf. Die dabei entstehenden Osteolysen befinden sich bevorzugt im Achsenskelett sowie im Schädel und sind pathognomonisch für die Erkrankung. Die Ausbreitung im Markraum führt weniger durch mechanische Verdrängung als vielmehr durch humorale Beeinflussung der Knochenmarkshomöostase zu einer Beeinträchtigung der Hämatopoese mit Reduktion von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten [3] (siehe dazu auch Abschnitt 1.1.3). Viele Patienten werden daher initial über eine Anämie, Infektanfälligkeit oder Blutungen symptomatisch. Ein extramedullärer Befall liegt bei Diagnosestellung in 7%-20% der Fälle vor [4][5]. In Autopsiestudien ist dieser Anteil deutlich höher, möglicherweise durch eine zunehmende systemische Ausbreitung im Erkrankungsverlauf bedingt oder dadurch, dass viele extramedulläre Manifestationen der Standarddiagnostik entgehen [6]. Am häufigsten sind hier Weichteilkomponenten, die von osteolytischen Herden ausgehen, seltener kommt es zu einer hämatogenen Absiedlung in Organe wie die Milz, die Niere, die Leber, die Lymphknoten, die Haut oder die Lunge. Ein Befall des ZNS ist mit 1% bei Diagnosestellung sehr selten, hier kommt es meistens zu einer Infiltration der Hirnhäute und seltener zu einem Parenchyembefall [7]. Darüber hinaus kann das multiple Myelom über unterschiedliche Mechanismen die Niere schädigen. Die „Myelomniere“ oder Cast-Nephropathie ist die häufigste Manifestation an der Niere und wird in etwa 30- 40% der Patienten gefunden [6]. Die Erkrankung beruht auf einer Ablagerung der freien Leichtketten in den Nierentubuli [8]. Physiologischerweise werden freie Leichtketten glomerulär filtriert und im proximalen Tubulus rückresorbiert. Bei einer erhöhten Produktion im Rahmen eines Myeloms erschöpft sich dieser Mechanismus und die freien Leichtketten lagern sich in den Tubuli ab. Dort führen sie zu einer

Inflamationsreaktion, die auf das Insterstitium übergreift und als Cast-Nephropathie bezeichnet wird [9].

Zudem zeigen Myelompatienten eine erhöhte Anfälligkeit für eine akute tubuläre Nekrose, die durch Dehydratation, nichtsteroidale anti-inflammatorische Agenzien (NSAID), jodhaltige Kontrastmittel oder Bisphosphonate ausgelöst werden kann. Ursache ist die Endozytose von monoklonalen Leichtketten in die Tubuluszellen, in denen diese eine zytotoxische Wirkung zeigen [10]. Eine weitere Schädigung der Niere kann durch eine Amyloidose erfolgen. Hier kommt es zu einem nephrotischen Syndrom durch Ablagerung von aus Leichtketten (AL-Amyloidose) oder Schwereketten (AH-Amyloidose) gebildetem Amyloid in den Glomeruli. Auch die Infiltration von Myelomzellen in die Niere als extramedulläre Manifestation kann Ursache eines Nierenschadens sein.

1.1.3 Interaktion mit der Knochenmarksnische

1.1.3.1 Die CD34-positive hämatopoetische Stammzelle

Das Grundgerüst des Knochenmarksstromas wird durch die sogenannten mesenchymalen Stammzellen (=MSCs) gebildet. Diese fibroblastenähnlichen multipotenten Zellen können in knochenbildende Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten differenzieren [11]. Zudem finden sich im Knochenmark hämatopoetische Stammzellen, Vorläuferzellen der myeloischen und lymphatischen Zelllinien in unterschiedlichen Differenzierungsstadien sowie reife Zellen des Immunsystems wie Monozyten, dendritische Zellen, Lymphozyten und NK-Zellen. Aus Monozyten differenzierte knochenresorbierende Osteoklasten gewährleisten ein durch hormonelle Einflüsse und parakrin sezernierte Zytokine kontrolliertes Gleichgewicht von Knochenbildung und Knochenresorption.

Die Hauptfunktion des Knochenmarks ist die Hämatopoese. Um eine suffiziente Hämatopoese zu gewährleisten und an die Anforderungen des Organismus zu adaptieren, ist das Zusammenspiel aller oben genannten Komponenten der Knochenmarksnische erforderlich. Ausgangspunkt der Blutbildung sind pluripotente hämatopoetische Stammzellen. Diese Zellen besitzen ein großes Selbsterneuerungspotenzial, damit über die gesamte Lebenszeit ein ausreichender Pool an differenzierungsfähigen hämatopoetischen Stammzellen

zur Verfügung steht. Im angloamerikanischen Sprachraum werden diese pluripotenten Zellen als LT-HSCs bezeichnet (*long-term hematopoietic stem cells*). Aus dieser Zellpopulation differenzieren multipotente Vorläuferzellen, die als ST-HSCs bezeichnet werden (*short term hematopoietic stem cells*). Die ST-HSCs besitzen ebenfalls noch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, wenn auch in geringerem Ausmaß als die LT-HSCs. Aus den ST-HSCs differenzieren die oligopotente Vorläuferzellen der myeloischen und lymphatischen Zellreihen. Zusammen mit den LT-HSCs und ST-HSCs werden diese oligopotente Vorläuferzellen als HSPCs bezeichnet (*hematopoietic stem and progenitor cells*).

Die Differenzierung in die myeloische Stammzelle wird durch die Zytokine Interleukin 1, Interleukin 3, Interleukin 6, SCF und FLT3L gesteuert. Aus der myeloischen Stammzelle entstehen letztendlich über entsprechende CFU (*colony-forming units*) und BFU (*burst-forming units*) die Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten und Monozyten. Die Differenzierung in die lymphatische Stammzelle wird hingegen überwiegend über Interleukin 7 gesteuert. Aus dieser oligopotente Stammzelle entstehen T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und NK-Zellen.

Der Oberflächenmarker CD34 ist spezifisch für die hämatopoetischen Vorläuferzellen. Er wird auf der multipotenten ST-HSC sowie auf der myeloischen und lymphatischen Stammzelle exprimiert. Zudem findet man das Molekül auf der CFU-GEMM, der BFU-E, der CFU-Meg und der CFU-GM.

Die Funktion von CD34 ist nicht gänzlich geklärt, nachgewiesen sind Funktionen beim *Homing* der hämatopoetischen Stammzellen ins Knochenmark und bei der Adhäsion der Zellen in der KM-Nische. In der klinischen Medizin wird dieser Oberflächenmarker benutzt, um im Rahmen von Stammzelltransplantationen hämatopoetische Stammzellen aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blut zu separieren.

Im Knochenmark findet man die hämatopoetischen Stammzellen in Zellnestern in enger Lagebeziehung zu anderen Zellen des Knochenmarks, die wichtig für die Regulation der Stammzellfunktion sind. Der überwiegende Anteil der Stammzellen im Knochenmark ist perivaskulär um die Sinusoide lokalisiert [12],

man spricht hier von der perivaskulären Nische. Hier befinden sich die HSCs in enger Lagebeziehung zu perivaskulären mesenchymalen Stromazellen, zu Endothelzellen und zu Nervenendigungen des sympathischen Nervensystems. Die perivaskulären mesenchymalen Stromazellen produzieren vorwiegend SCF und CXCL12. SCF bindet über den SCF-Rezeptor (CD117) an HSCs und führt zu einer Aktivierung der Tyrosinkinase c-kit [13]. Über diesen Mechanismus werden wichtige Funktionen bei der Proliferation und der Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen reguliert, zum Beispiel hemmt SCF die Apoptose in CD34-positiven HSCs [14]. Zudem führt SCF zu einer vermehrten Expression von VLA-4 und VLA-5 auf HSCs, die über Bindung an Fibronectin und VCAM-1 zu einer Adhäsion der Stammzellen in der Nische beitragen [15]. CXCL12 wird auch als *Stromal cell-derived factor 1* (SDF1) bezeichnet und wird von den HSCs über CXCR4 gebunden. Es besitzt chemotaktische Wirkung auf die HSCs [16] und erhält HSCs mit Langzeitproliferationspotenzial [17][18].

Endothelzellen in der perivaskulären Nische sezernieren mehrere weitere für die Proliferation von HSCs wesentliche Zytokine wie FGF-2, Pleiotrophin oder VEGF [19][20]. Außerdem stellen Endothelzell der Knochenmarkssinuside zusammen mit perivaskulären mesenchymalen Zellen die bedeutendste Quelle von SCF dar (zur Funktion s.o.) [12].

Sympathische Nervenendigungen in der perivaskulären Nische hemmen über Noradrenalinausschüttung die Sekretion von CXCL12 aus perivaskulären mesenchymalen Zellen [21]. Die Ausschüttung von TGF- β aus nichtmyelinisierenden Schwannzellen der sympathischen Nervenendigungen führt zudem über Aktivierung des SMAD-Signalwegs zur Erhaltung des Langzeitproliferationspotenzials der HSCs [22].

1.1.3.2 Die Myelomzelle

Für die Entstehung und Erhaltung der Erkrankung beim Multiplen Myelom spielt die Interaktion der Myelomzellen mit den Zellen der Knochenmarksnische eine entscheidende Rolle. Die Myelomzellen selber sind in der Lage Zytokine zu sezernieren, die die anderen Immunzellen und die MSCs stimulieren. Die Sekretion von TNF- α , IL-3 und MIP-1 α begünstigt die Differenzierung von Monozyten zu knochenresorbierenden Osteoklasten und fördert damit den

Knochenabbau [23][24][25]. MIP-1 α ist darüber hinaus ein wichtiger Wachstumsfaktor für die Myelomzellen [26]. TNF- α stimuliert die Sekretion von IL-6 aus MSCs und Plasmazellen [27][28]. IL-6 ist ein wichtiges Zytokin für die Pathogenese des Multiplen Myeloms, da es die Apoptose in Myelomzellen und die Differenzierung von Osteoblasten hemmt [29][30]. Durch Zell-Adhäsion der Myelomzellen an die MSCs wird die Ausschüttung weiterer für die Pathogenese essenzieller Zytokine getriggert. Die Zell-Zell-Kontakte werden durch die Adhäsionsmoleküle VCAM und ICAM auf den Stromazellen sowie VLA-4, FLA-1 und MUC-1 auf den Myelomzellen gebildet [31]. Die wichtigsten durch die MSCs sezernierten Zytokine sind das oben genannte IL-6, RANKL, IGF-1 und VEGF. RANKL spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Knochenstoffwechsels beim Multiplen Myelom. Es wird als Schlüsselprotein bei der Differenzierung von Osteoklasten angesehen und ist daher auch in therapeutischen Konzepten von Bedeutung [32][33]. Ob Myelomzellen selbst in der Lage sind osteoklastenaktivierendes RANKL auszuschütten, wird aktuell kontrovers diskutiert. IGF-1 ist ein Wachstumsfaktor für Myelomzellen [34]. Durch Sekretion von VEGF wird die Angiogenese im befallenen Knochenmark gefördert. Neuere Arbeiten haben gezeigt, dass die Ausschüttung von TGF- β durch MSCs im Knochenmarksmilieu des Multiplen Myeloms ebenfalls erhöht ist. Vermutlich wirkt TGF- β auf hämatopoetische Stammzellen und inhibiert die Erythropoese [35].

1.1.4 Einteilung und Stadien

Im Allgemeinen werden 4 unterschiedliche Erscheinungsformen des Multiplen Myeloms unterschieden. Die monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS), das *smoldering myeloma*, das symptomatische Multiple Myelom und die Plasmazelleukämie. Nach neusten Erkenntnissen geht jedem Myelom eine MGUS als Vorphase voraus [36]. Diese Erscheinungsform zeigt eine messbare Gammopathie mit einem definierten Paraprotein von unter 3g/100ml im Serum. Der Knochenmarksanteil an Plasmazellen liegt allerdings im Normbereich (< 10%) und es liegen keine Endorganschäden vor. Beim *smoldering myeloma* hingegen liegen die Serumspiegel des Paraproteins über 3g/100ml und der Plasmazellanteil im Knochenmark bei $\geq 10\%$, jedoch ohne nachweisbare

Endorganschäden. Im Gegensatz dazu zeigen sich beim symptomatischen Myelom Endorganschäden in Form von Osteolysen, einem erhöhtem Serumkreatinin als Ausdruck eines Nierenschadens, einem erniedrigtem Hb oder einem erhöhtem Serumcalcium. Die Plasmazelleukämie ist eine aggressive Form der Erkrankung mit einer schlechten Prognose. Sie kann primär auftreten oder sich sekundär im Rahmen eines bestehenden Multiplen Myeloms entwickeln. Charakteristisch für die Plasmazelleukämie ist eine Ausschwemmung von Plasmazellen ins periphere Blut (>20% der kernhaltigen Zellen im Blut).

Zur Einteilung des Schweregrades eines Multiplen Myeloms existieren 2 unterschiedliche Klassifizierungssysteme, zum einen die Klassifikation nach Salmon/Durie [37] und zum anderen die ISS-Klassifikation [38]. Bei der Klassifikation nach Salmon/Durie werden 3 Stadien unterschieden, wobei der Hämoglobinspiegel, das Serumcalcium, die Anzahl der Osteolysen, der Paraproteinspiegel im Serum und die Leichtkettenausscheidung im 24h-Urin berücksichtigt werden (siehe Abb. 1). Die Buchstaben A (Kreatinin < 2 mg/dl) oder B (> 2mg/dl) werden als Ausdruck einer Nierenschädigung ergänzt.

Salmon/Durie	I	II	III
Hämoglobin	> 10 g/dl		< 8,5 g/dl
Serumcalcium	normwertig		> 3mg/dl
Anzahl der Osteolysen	≤ 1		> 1
Serum M-Protein			
IgG	< 50 g/l		> 70 g/l
IgA	< 30 g/l		> 50 g/l
Leichtketten im Sammelurin	< 4 g/24h		>12 g/24h

Abb. 1: **Klassifikation nach Salmon/Durie**

Bei der ISS-Klassifikation werden die Höhe des β 2-Mikroglobulins im Serum und das Albumin im Serum zur Einteilung in 3 Stadien herangezogen (siehe Abb. 2).

ISS Stadium	I	II	III
Serum-Albumin	> 35 g/l		
β 2-Mikroglobulin	< 3,5 mg/l		> 5,5 mg/l

Abb. 2: **ISS-Klassifikation**

Dem Stadium 2 werden in beiden Systemen Patienten zugeordnet, die weder die Kriterien des Stadiums I noch des Stadiums III erfüllen.

1.1.5 Diagnose

Obligat für die Diagnose eines Multiplen Myeloms ist der Nachweis einer pathologischen Plasmazellproliferation im Knochenmark, das in den meisten Fällen über eine Punktion des Beckenkammes gewonnen wird. Die auf diese Weise gewonnenen Plasmazellen können zudem auf genetische Veränderungen untersucht werden. Das Paraprotein wird aus dem Serum oder dem Urin mittels Elektrophorese und Immunfixation charakterisiert. Zudem wird eine Quantifizierung des IgG-, IgM und IgA-Spiegels sowie der freien Leichtketten empfohlen. Um die Anzahl und Ausdehnung der Osteolysen und einen möglichen extramedullären Befall zu erfassen, wird ein *Low-Dose* Ganzkörper-CT empfohlen, eine konventionelle Bildgebung nach dem Pariser-Schema ist durch die CT nahezu obsolet. Fakultativ kann eine FDG-PET-CT oder ein MRT durchgeführt werden, insbesondere bei Verdacht auf einen extramedullären Befall.

Folgende Laborparameter sollten erhoben werden, um Endorganschäden zu diagnostizieren und eine Klassifikation zu ermöglichen: Blutbild mit Differenzialblutbild, Serumelektrolyte, Nierenretentionsparameter, Albumin im Serum und β 2-Mikroglobulin im Serum.

1.1.6 Therapie

Zur Therapie des Multiplen Myeloms wurden in den Anfängen unterschiedliche klassische Chemotherapeutika wie z.B. Cyclophosphamid oder Urethan eingesetzt [39][40]. In den 60er und 70er Jahren wurden erste Studien mit dem 1953 entdeckten Melphalan durchgeführt, hierunter lag das mediane Überleben bei etwa 2 Jahren [41]. Limitierend für die Maximaldosis des Melphalans und somit den Therapieerfolg war die Knochenmarkstoxizität des Melphalans bei hoher Dosierung.

Ende der 90er Jahre wurden erste Studien veröffentlicht, bei denen die Melphalandosis gesteigert werden konnte, indem die Knochenmarkstoxizität durch eine autologe Stammzelltransplantation (ASZT) kompensiert wurde. In einer Studie zwischen 1990 und 1993 konnte gezeigt werden, dass eine Hochdosistherapie mit $140\text{mg}/\text{m}^2$ und eine fraktionierte Ganzkörperbestrahlung mit 8Gy die Wahrscheinlichkeit eines 5-Jahres-Überlebens von 12% auf 52% verbesserte ($p=0,03$)[42]. Child et al. applizierten zwischen 1993 und 2000 in einem Kollektiv von 401 Patienten bei 201 Patienten eine Melphalandosis von $200\text{mg}/\text{m}^2$ gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation (ASZT). Gegenüber dem damals geltenden Therapiestandard verlängerte sich das mediane Überleben von 42,3 Monaten auf 54,1 Monate ($p=0,04$) [43]. Aufgrund dieser und weiterer Studien wurde dieses Regime zum Therapiestandard für Patienten unter 65 Jahren.

Daher wird bei Patienten unter 65 Jahren und ohne Komorbiditäten eine 3-phasige Therapie bestehend aus Induktion, Hochdosistherapie mit autologer Stammzelltransplantation und anschließender Konsolidierung/Erhaltung durchgeführt. In der Induktionsphase werden 2-fach, 3-fach oder 4-fach-Kombinationen eingesetzt, die zum Beispiel die Substanzen Bortezomib, Dexamethason, Cyclophosphamid, Lenalidomid, Adriamycin/Doxorubicin oder Thalidomid enthalten [44]. Nach Hochdosistherapie und Stammzelltransplantation werden Substanzen wie immunomodulatorische Medikamente (= IMiDs)[45][46] oder Bortezomib [47][48] als Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie eingesetzt.

Die Hochdosistherapie mit Melphalan erfolgt in einer Dosierung von $200\text{mg}/\text{m}^2$ Körperoberfläche. Bei Patienten über 65 Jahren kann die Gesamtdosis des

Melphalans auf zwei zeitlich getrennte Applikationen mit jeweils 100mg/m² aufgeteilt werden, um Nebenwirkungen zu reduzieren. Manche Patienten mit relevanten Komorbiditäten und hohem Alter sind aufgrund der Nebenwirkungen für eine Hochdosis + ASZT primär nicht geeignet. Bei diesen Patienten wird meist Melphalan in einer reduzierten Dosis in Kombination mit Dexamethason appliziert. Die Kombination dieses Regimens mit neueren Substanzen wie Bortezomib oder IMiDs als Triple-Therapie hat in Studien ein verlängertes progressionsfreies Überleben gezeigt [49][50].

Neben der medikamentösen Therapie kommen beim Multiplen Myelom Strahlentherapien zum Einsatz, um symptomatische lokale Befunde zu therapieren (z.B. frakturgefährdete Wirbelkörper).

Darüber hinaus erhalten die Patienten Bisphosphonate um den pathologisch gesteigerten Knochenabbau zu hemmen [51] und einen *best supportive care*.

1.1.7 Prognose

Das Multiple Myelom ist trotz vieler neuer Therapiestrategien nicht heilbar. Neben dem initialen Erkrankungsstadium (ISS oder Salmon/Durie) ist die Prognose vor allem davon abhängig, ob die Patienten einer Hochdosistherapie mit ASZT zuzuführen sind. Zwei große randomisierte Studien zeigten nach Hochdosischemotherapie gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation und einer Erhaltungstherapie eine 3-Jahres-Überlebensrate von 88% nach Transplantation [46] sowie eine 4-Jahres-Überlebensrate von 73% nach Transplantation [52].

Patienten, die einer Hochdosistherapie + ASZT nicht zugänglich sind, haben eine deutlich schlechtere Prognose. Ein gängiges Therapieregime bei diesen Patienten ist exemplarisch die Kombination von Bortezomib + Melphalan + Dexamethason, hier liegt die 5-Jahres-Überlebensrate nach Diagnosestellung in einer repräsentativen Studie bei 46% [49] und damit deutlich unter den Überlebensraten einer Hochdosistherapie + ASZT.

1.2. Lenalidomid

1.2.1 Einleitung

Lenalidomid ist ein Derivat des Piperidindions Thalidomid und ist seit 2004 unter dem Handelsnamen Revlimid© auf dem Markt. In den USA und in Europa ist es für die Behandlung des therapierefraktären und rezidierten Multiplen Myeloms sowie für transfusionspflichtige myelodysplastische Syndrome mit 5q-Mutation zugelassen. Im folgenden Abschnitt sollen die Wirkmechanismen beim Multiplen Myelom sowie der aktuelle Stellenwert in der Therapie des Myeloms dargestellt werden.

1.2.2 Wirkmechanismus

Der Wirkmechanismus von Lenalidomid beruht auf mehreren unterschiedlichen Mechanismen. Zum einen wird das Tumorwachstum direkt durch Beeinflussung des Zellzykluses gehemmt. Zum anderen hemmt das Medikament die Angiogenese, moduliert die Zytokinsekretion des Knochenmarksstromas und die zelluläre Immunantwort.

P21-WAF

Für die direkte Wirkung von Lenalidomid auf den Zellzyklus spielt der Tumorsuppressor p21-WAF eine entscheidende Rolle. An zwei unterschiedlichen Zelllinien und an aus Patienten gewonnenen BM-HSPCs konnte nach Therapie mit Lenalidomid eine vermehrte Expression von p21 nachgewiesen werden [53][54]. p21-WAF inhibiert eine große Anzahl von cyclinabhängigen Kinasen, z.B. CDK2, CDK4 und CDK6 und hemmt somit die Phosphorylierung von rB, woraus letztendlich ein Zellzyklusarrest in der G1-S Übergangsphase resultiert.

Cereblon

Mehrere kürzlich veröffentlichte Arbeiten haben eine zentrale Rolle des Moleküls Cereblon bei der Wirkung von Lenalidomid nachgewiesen [55][56]. Lenalidomid und andere Immunmodulatoren wie Thalidomid und Pomalidomid binden an Cereblon und bilden einen Ubiquitin-Ligase-Komplex namens CRBN-CRL4. Dieser Komplex führt in Myelomzellen zu einer vermehrten

proteasomalen Degradation der Proteine Ikaros (IKZF 1) und Aiolos (IKZF3). Beide Proteine sind wichtige lymphozytäre Proliferationsfaktoren und die Lenalidomid-vermittelte Degradation führt zu einer Proliferationshemmung der Myelomzellen [55][56]. Darüber hinaus hemmen IKZF1 und IKZF3 in T-Lymphozyten die IL-2 Sekretion. Dieser Effekt wird durch Lenalidomid aufgehoben, woraus eine erhöhte IL2-Produktion und darüber eine Verschiebung von TH2 zu TH1-Lymphozyten resultiert [56][57]. An Zebrafischen konnte gezeigt werden, dass der CRBN-CRL4-Komplex auch für die teratogenen Effekte (Hemmung des Extremitätenwachstums) von Thalidomid verantwortlich ist [58]. Dieser Nebeneffekt des Thalidomids ist klinisch durch den Contergan-Skandal in den 60er Jahren zu beobachten gewesen.

Angiogenese

Sowohl in vitro als auch im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass Lenalidomid dosisabhängig zu einer Hemmung der Neovaskularisation führt. Als Ursache wurde zum einen eine verminderte Expression von Hypoxie-induziertem Faktor 1 α in Endothelzellen des Knochenmarks gefunden. Dieser Faktor wird in hohen Konzentrationen unter den hypoxischen Bedingungen des befallenen Knochenmarks in Myelomzellen und in Endothelzellen gebildet und führt zu einer vermehrten Expression von VEGF und letztendlich zu einer Neovaskularisation [59][60].

Zum anderen konnte gezeigt werden, dass Lenalidomid nicht nur die VEGF-Bildung hemmt, sondern auch die Signaltransduktion des VEGF direkt [60]. Dieser Effekt wird über eine Hemmung der Phosphorylierung des VEGF Signaltransduktors Akt-1 in Endothelzellen vermittelt und hat zur Folge, dass die Endothelzellen durch externes VEGF (aus Myelomzellen und MSCs) ebenfalls nicht mehr stimuliert werden.

Zytokinsekretion

Wie im Abschnitt 1.1.3 erwähnt, spielt die Interaktion der Myelomzellen mit Zellen des Knochenmarksstromas eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Multiplen Myeloms. Durch Interaktion von Myelomzellen und Stromazellen,

werden verschiedene Zytokine vermehrt sezerniert, darunter TNF- α , IL-6 und RANKL. Lenalidomid inhibiert die Sekretion dieser genannten Zytokine aus MSCs. Zum Beispiel konnte mittels *Realtime*-PCR nachgewiesen werden, dass Lenalidomid die mRNA-Produktion von TNF α -mRNA in MSCs um 35% reduziert [61]. Eine reduzierte Sekretion von IL-6, das die Apoptose von Myelomzellen hemmt, konnte ebenfalls nachgewiesen werden [62]. Die Reduktion der RANKL-Konzentration durch Lenalidomid im Knochenmarksstroma inhibiert die Differenzierung von Osteoklasten und stoppt auf die Weise die Entstehung von Osteolysen [63].

Zelluläre Immunantwort

Wie zuvor erwähnt wird über die Cereblon-vermittelte Degradation von Ikoaros und Aiolos die IL-2 Expression erhöht und darüber T-Lymphozyten aktiviert und die Immunantwort von TH2 zu TH1-Lymphozyten verschoben [56][57]. Zudem führen Lenalidomid und andere IMiDs zu einer NK-Aktivierung, die als essentieller Bestandteil der Wirkung angesehen wird [64]. Lenalidomid inhibiert die Funktion von regulatorischen T-Zellen und deren Entstehung aus mononukleären Vorläuferzellen [65]. Mehrere andere Arbeiten haben gezeigt, dass die damit verbundene Verschiebung des Treg/TH17-Verhältnisses eine antitumorale Wirkung auf Myelomzellen besitzt [66].

1.2.3 Lenalidomid in der Behandlung des Multiplen Myeloms

Bei der Therapie des Multiplen Myeloms wurde Lenalidomid erstmals in der Therapie von rezidierten Erkrankungen oder bei nicht vorhandenem Therapieansprechen einer Primärtherapie eingesetzt (*refractory or relapsed multiple myeloma* = RRMM). Zwei im Jahr 2007 veröffentlichte Studien, die MM-009 und die MM-010, testeten Lenalidomid plus Dexamethason bei RRMM gegen eine Kontrollgruppe, die lediglich Dexamethason erhielt [67][68]. Beide Studien zeigten deutlich bessere Ansprechraten in der Gruppe mit Lenalidomid (CR 14,1% bzw. 15,9% vs. 0,6% bzw. 3,4%) und ein verbessertes Gesamtüberleben (z.B. 29,6 Monate vs. 20,2 Monate bei MM-009). Eine im Jahre 2009 veröffentlichte Folgearbeit, die das Kollektiv beider Studien erfasste, zeigte ein signifikant besseres Gesamtüberleben von 38 Monaten unter

Lenalidomid gegenüber 31,6 Monaten in der Placebogruppe ($p=0,045$) [69]. Inspiriert durch diese Ergebnisse wurden Studien entwickelt, um den Stellenwert von Lenalidomid in der Therapie des unbehandelten Myeloms zu evaluieren. Patienten, die mit dem als Standard geltenden Therapieregime bestehend aus Induktion und Hochdosistherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation behandelt wurden, sollten durch eine anschließende Erhaltungstherapie mit Lenalidomid ein besseres *outcome* erhalten. Exemplarisch werden hier Daten aus 2 großen Studien aus dem Jahr 2012 dargestellt [45][46]. Attal et al. und McCarthy et al. konnten in Studien mit 614 bzw. 460 Patienten durch eine Erhaltungstherapie mit Lenalidomid ein verlängertes medianes progressionsfreies Überleben gegenüber einem Placebo nachweisen (41 Monate vs. 23 Monate [Attal]; 46 Monate vs. 27 Monate [McCarthy]). McCarthy et al. konnten sogar einen signifikanten Gesamtüberlebensvorteil von 88% gegenüber 80% in der Placebogruppe nach 36 Monaten nachweisen ($p=0,03$). In der Studie von Attal et al zeigte sich kein Überlebensvorteil.

Eine weitere Studie, die MM-015, untersuchte den Einfluss einer Lenalidomid-Erhaltungstherapie bei Patienten, die einer Hochdosischemotherapie aufgrund des Alters oder von Komorbiditäten nicht zugeführt werden konnten [50]. Nach einer Induktionstherapie mit Melphalan + Prednisolon (MP) oder zusätzlich Lenalidomid (MPR) wurden die Patienten einer Erhaltungstherapie unterzogen oder erhielten ein Placebo. Auch hier zeigt sich ein erhöhtes medianes progressionsfreies Überleben unter Lenalidomid-Erhaltung (31 Monate) gegenüber MPR (14 Monate) oder MP (13 Monate) ohne Erhaltung. Dieser Vorteil konnte nur für Patienten unter 75 Jahren nachgewiesen werden. Bezüglich des Gesamtüberlebens zeigte sich kein signifikanter Vorteil der Erhaltungstherapie mit Lenalidomid.

Auch in der Induktionstherapie bei unbehandelten Erkrankungen wurde Lenalidomid in Kombinationstherapien getestet. Eine Studie, die Lenalidomid in Kombination mit Dexamethason gegen ein Placebo mit Dexamethason als Induktionstherapie getestet hat, konnte keinen Vorteil bezogen auf das Gesamtüberleben nachweisen. Zudem zeigte der Lenalidomid-Arm mehr Nebenwirkungen [70]. Eine andere Studie testete eine Kombination aus

Cyclophosphamid + Lenalidomid + Dexamethason gegen Cyclophosphamid + Bortezomib + Dexamethason. Das Therapieansprechen war im Bortezomib-Arm deutlich besser bei geringeren Nebenwirkungen, wobei sich kein Unterschied in Bezug auf das Gesamtüberleben zeigte [71]. Insgesamt deuten die Studienergebnisse darauf hin, dass Lenalidomid in der Induktion eher eine untergeordnete Rolle spielt, da Substanzen wie Bortezomib eine höhere Effektivität beim Erreichen einer Remission besitzen. In der Erhaltungstherapie jedoch zeigt Lenalidomid eine ungleich bessere Langzeitverträglichkeit sowie Wirksamkeit und kann daher erfolgreich eingesetzt werden.

1.2.4 Nebenwirkungen

Im Folgenden werden die häufigsten durch Lenalidomid hervorgerufenen Nebenwirkungen aufgeführt. Dazu zählen Neutropenien, Infektanfälligkeit, thromboembolische Ereignisse und die Entstehung von sekundären Malignomen.

Neutropenien werden in 4 Schweregrade unterteilt, von denen bei klinischen Studien meistens nur Neutropenien vom Grad 3 ($< 1000/\mu\text{l}$) und vom Grad 4 ($< 500/\mu\text{l}$) als relevante Nebenwirkung erfasst werden. In mehreren Studien, die Lenalidomid in unterschiedlichen Kontexten getestet haben, konnten vermehrt Neutropenien festgestellt werden. In einer Studie zur Erhaltungstherapie nach autologer Stammzelltransplantation mit einem großen Patientenkollektiv entwickelten 32% der Patienten unter Lenalidomid eine Neutropenie Grad 3 und 13% eine Neutropenie Grad 4 verglichen mit 12% bzw. 3% in der Placebogruppe ($p < 0,001$) [46]. Ursache für die Neutropenien ist wahrscheinlich eine verminderte Expression des Transkriptionsfaktor PU.1 in CD34+ HSPC durch die Therapie mit Lenalidomid, die zu einer Reifungsstörung der granulopoetischen Vorläuferzellen führt [72].

Mehrere Studien, die Lenalidomid in der Erhaltungstherapie gegen einen Placebo testeten, konnten einen erhöhten Anteil an schweren bzw. lebensbedrohlichen Infektionen (Grad 3 und Grad 4) unter Lenalidomidtherapie nachweisen. Exemplarisch zeigten in einer Studie zur Erhaltungstherapie nach autologer Stammzelltransplantation in einem Kollektiv von 608 Patienten 13%

der 306 Patienten im Lenalidomid-Arm eine schwere Infektion verglichen mit nur 5% der 302 Patienten im Placebo-Arm [45]. Ursache der Infektanfälligkeit sind zum einen die oben genannten Neutropenien, zum anderen führt die Substanz zu unterschiedlichen Immunmodulationen (siehe Abschnitt 1.2.2), deren Auswirkung auf das Immunsystem zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht gänzlich erforscht sind.

Der Anteil thromboembolischer Ereignisse ist unter Lenalidomidtherapie verglichen mit einem Placebo signifikant erhöht. Bei Erhaltungstherapien lag der Anteil in einer repräsentativen Studie bei 6% unter Lenalidomid vs. 2% in der Placebogruppe ($p=0,01$) [45]. Weitere Studien deuten darauf hin, dass insbesondere Patienten über 65 Jahren und ohne Prophylaxe mit niedermolekularen Heparinen gefährdet sind [73]. Der Grund für die erhöhte Thromboseneigung ist möglicherweise die PU.1 vermittelte Reifungsstörung von Granulozyten. Die dadurch vermehrt auftretenden Promyelozyten enthalten in ihren Granula große Mengen des prothrombotischen Cathepsin G, welches für die vermehrt auftretenden Thrombosen verantwortlich sein könnte. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Lenalidomid und das simultan verabreichte Dexamethason die Zirkulation von endothelialen Stressmarkern und prothrombotischen Faktoren im peripheren Blut erhöht [74].

Zwei große im Jahre 2012 veröffentlichte Studien zur Erhaltungstherapie mit Lenalidomid zeigten alle in einem relativ kurzen *Follow-up* eine deutlich erhöhte Inzidenz von Sekundärmalignomen [45][46]. Die erhöhte Inzidenz betraf sowohl hämatologische Sekundärmalignome mit 3,5% bzw. 4% unter Lenalidomid vs. 0,4% bzw. 2% als auch solide Sekundärmalignome mit 4,3% bzw. 3% unter Lenalidomid vs. 2,2% bzw. 1%. Eine Meta-Analyse aus dem Jahr 2014, die insgesamt 2620 mit Lenalidomid behandelte Patienten erfasste, konnte eine erhöhte Inzidenz von sekundären hämatologischen Neoplasien nicht aber von soliden Tumoren nachweisen [75]. Eine wichtige Erkenntnis dieser Studie war zudem, dass die Sterblichkeit der Patienten durch das Myelom oder andere Nebenwirkungen der Therapie deutlich höher war, als die Sterblichkeit durch Sekundärmalignome. Daher überwiegt nach Risiko-Nutzen-Abwägung der Nutzen einer Lenalidomidtherapie dem Risiko durch Sekundärmalignome.

1.3 Ziel der Arbeit

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden im Rahmen eines wissenschaftlichen Begleitprogramms zur LenaMain-Studie (EudraCT 2007-003945-33) durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit ist herauszufinden, welche Auswirkungen die Konsolidierungstherapie mit Lenalidomid auf die Proliferation, Differenzierung und Funktion der CD34-positiven hämatopoetischen Stammzelle hat und ob Hinweise auf die Entstehung von hämatologischen Sekundärmalignomen vorliegen. Zu diesem Zweck wurden prospektiv die CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen von Patienten aus der Lenamain-Studie auf molekularer und funktioneller Ebene untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Lenamain-Studie

Die Untersuchungen dieser Arbeit erfolgen im Rahmen des wissenschaftlichen Begleitprogrammes der LenaMain-Studie (LenaMain-Trial NCT00891384, EudraCT 2007-003945-33). Das Begleitprogramm ist im Studienprotokoll im Abschnitt 6.9.2 definiert [76]. Eine schriftliche Einverständniserklärung jedes Patienten sowie ein positives Ethikvotum für die Studie liegen vor (Aktenzeichen MC-LKP-300).

Die LenaMain-Studie ist eine prospektive Multi-Center-Studie, die die Wirkung und Nebenwirkungen von Lenalidomid in der Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie nach Hochdosischemotherapie und autologer Stammzelltransplantation bei unterschiedlichen Dosierungen untersucht. Nach Induktionstherapie und Melphalan-Hochdosistherapie gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation erhalten alle Patienten zunächst 25mg/d Lenalidomid über 6 Monate als Konsolidierungstherapie. Die Konsolidierung muss in einem Zeitfenster von 90-120 Tagen nach der autologen Transplantation beginnen. Das Lenalidomid wird dabei in 6 Zyklen à 4 Wochen eingenommen, wobei jeder Zyklus aus 21 Tagen Medikamenteneinnahme gefolgt von 7 Tagen Pause besteht. Nach der Konsolidierung werden die Patienten in 2 Studienarme randomisiert, die jeweils eine Erhaltungstherapie mit 5 mg Lenalidomid/d bzw. 25 mg Lenalidomid/d durchführen.

2.2 Zellen

Für die durchgeführten Experimente wurden CD34-positive hämatopoetische Knochenmarksstamm- und Progenitorzellen (BM-HSPC) verwendet. Die Zellen wurden von Myelompatienten gewonnen, die Lenalidomid im Rahmen der LenaMain-Studie (siehe 2.1) als Konsolidierungstherapie nach einer Hochdosis-Chemotherapie mit Melphalan und einer anschließenden autologen Stammzelltransplantation erhielten (siehe Abb. 3). Die Konsolidierungsphase erstreckte sich über 6 Zyklen à 30 Tage, also insgesamt 6 Monate. Von den Patienten wurden Knochenmarksaspirate vor und nach der

Konsolidierungstherapie akquiriert. Zur Vereinfachung wird im Nachfolgenden der Zeitpunkt vor der Konsolidierung als **t₀** und nach der Konsolidierungstherapie als **t₁** bezeichnet.

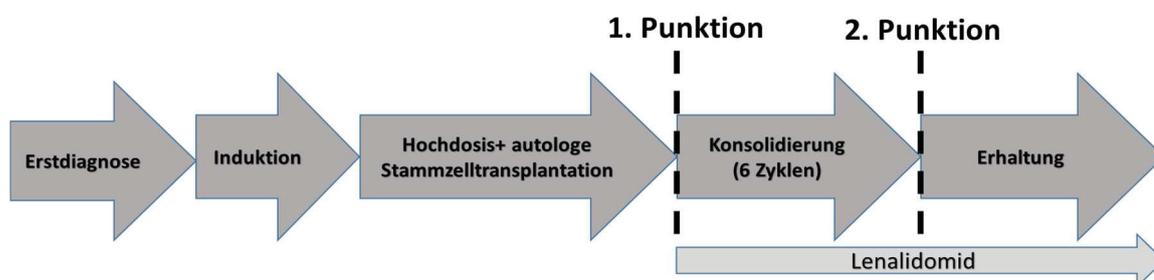


Abb.3: **Therapieschema LenaMain-Studie**

2.2.1 Isolation der CD34+ BM-HSPCs

Aus den Knochenmarksaspiraten wurden mit Hilfe des Lymphozyten-Trennmediums LM1077 (GE Healthcare, Pasching, Austria) unter Zentrifugation bei 835 G (2000 Umdrehungen/min) die mononukleären Zellen (MNCs) isoliert. Die MNCs bilden bei Zentrifugation aufgrund der spezifischen Dichte des Trennmediums eine Interphase unmittelbar oberhalb des Mediums. Die schwereren Erythrozyten sinken ab und leichtere Bestandteile, wie das Plasma oder Zelltrümmer, bleiben oberhalb der Interphase. Nach Isolation der Interphase wurden verbliebene Erythrozyten im nächsten Schritt mittels Ammoniumchlorid-Lysepuffer lysiert. Anschließend wurden in 2 Waschschritten mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bei Zentrifugation mit 305 G (1200 Umdrehungen/min) Zelltrümmer entfernt. Zur Selektion der CD34 positiven Zellen aus den so gewonnenen MNCs wurde ein immunomagnetisches Verfahren angewendet (MACS-System, Milteny Biotech, Bergisch Gladbach, Germany). Die MNCs wurden dazu zunächst mit Fc-Rezeptor-Antikörpern geblockt, um eine unspezifische Bindung von Antikörpern über das Fc-Fragment an die Fc-Rezeptoren der MNCs zu verhindern. Anschließend wurden die MNCs mit Anti-CD34-Antikörpern hybridisiert, an die Metallpartikel gekoppelt sind. Danach wurden die Zellen mit einer Trägersubstanz über eine Säule mit einer ferromagnetischen Matrix gegeben, die sich in einem Magnetfeld befindet. Nur Zellen mit gebundenen Antikörpern (CD34 positive Zellen) wurden

durch die Metallpartikel in der ferromagnetischen Matrix der Säule zurückgehalten. Nach Entfernen der Matrix aus dem Magnetfeld wurden die auf die Wiese in der Matrix zurückgehaltenen Zellen herausgewaschen.

Die isolierten CD34+ BM-HSPCs wurden abschließend mit dem CASY Counting System (Schärfe, Reutlingen, Germany) gemessen und die Zellzahlen bestimmt. Das CASY macht sich die Eigenschaft zunutze, dass die Plasmamembran einer intakten Zelle als Isolator fungiert. Über die Schwächung eines elektrischen Stromes bei Durchtritt der Zellen durch eine Pore werden die intakten Zellen gezählt und das Zellvolumen über das Ausmaß der Schwächung des Stromflusses bestimmt.

2.2.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Quantifizierung und Charakterisierung von Zellen. Die Zellen werden in einer Trägersubstanz durch eine Glaskapillare geleitet. Dort werden sie mit einem Laser bestrahlt. Über unterschiedlich lokalisierte Photodetektoren wird die Schwächung des Lichtes sowie die Streuung beim Durchtritt jeder einzelnen Zelle gemessen. Dabei misst ein gegenüber dem Laser angebrachter Photodetektor die Schwächung des Lasers beim Durchtritt der Zelle. Diese als *forward-scatter* bezeichnete Größe charakterisiert die Zellen nach dem Zellvolumen. Ein weiterer seitlich zum Strahlengang des Lasers angebrachter Detektor misst die Lichtstreuung durch die Zellen. Diese als *side-scatter* bezeichnete Größe charakterisiert die Zellen nach der Granularität, da Zellen mit stärkerer Granularität zu einer stärkeren Streuung führen. Zusätzlich können die Zellen über Fluoreszenzfarbstoffe charakterisiert werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden über Trägermoleküle an die Oberflächenproteine oder intrazelluläre Strukturen (z.B. DNA) der Zellen gebunden. Durch Bestrahlung mit dem Laser fluoreszieren die Farbstoffe in einem spezifischen Wellenlängenbereich und spezifische Photodetektoren erfassen das Signal. In einem modernen Durchflusszytometer sind mehrere dieser Detektoren für unterschiedliche Wellenlängenbereiche parallel angeordnet, sodass in einer Messung simultan mehrere Fluoreszenzfarbstoffe gemessen werden können. Dadurch können in

einer Probe zeitgleich Größe, Granularität und mehrere Oberflächenmarker der Zellen erfasst werden.

In dieser Arbeit wurde über die Durchflusszytometrie die Konzentration der BM-HSPCs in den Knochenmarksaspiraten bestimmt. Dazu wurde ein definiertes Volumen von 500 µl unbehandelten Knochenmarks abgenommen. Aus diesem Volumen wurden die Erythrozyten mittels Ammoniumchlorid-Lysepuffer entfernt, sodass nur die kernhaltigen Zellen übrig blieben (TNCs= *total nucleated cells*). Die eine Hälfte der Zellen wurde mit einem FITC-konjugierten Anti-CD-45-Antikörper und einem PE-konjugierten Anti-CD34-Antikörper gefärbt. Die andere Hälfte der Zellen wurde als Isotypenkontrolle mit dem Simultest Control IgG₁-Antikörper gefärbt, um den Anteil von unspezifisch gebundenen Antikörpern zu bestimmen (alle Antikörper von BD Biosciences, San Jose, CA).

Um das gemessene Probenvolumen in der FACS-Messung zu bestimmen, wurde eine definierte Anzahl von im FITC-Kanal detektierbaren Microbeads hinzugefügt (Beckman Coulter, Fullerton, CA). So konnte über das Verhältnis von gemessenen Microbeads zu den insgesamt in die Probe applizierten Microbeads errechnet werden, welcher Anteil der 250µl messenden Knochenmarksprobe untersucht wurde (= Probenvolumen).

Bei der Messung wurden die TNCs zunächst über ihre Erscheinung im *forward*- und *side-scatter* auf die Lymphozyten *gaget* und dann die Größe der Lymphozytenpopulation und der Anteil der CD34 positiven Zellen bestimmt. Über die Anzahl der gemessenen CD34-positiven BM-HSCs und das Probenvolumen wurde die Konzentration der BM-HSC/µl Knochenmark errechnet.

Gemessene Lymphozytenzahl x Anteil der CD34+ Zellen in der Lymphozytenpopulation / (250 µl x gemessene Microbeads /applizierte Microbeads) = CD34+ Zellen/ µl KM

Zudem wurden die mittels MACS-System isolierten CD34-positiven BM-HSCs auf ihre Reinheit überprüft. Dazu wurden je $1 \cdot 10^5$ Zellen mit CD45/CD34- und

mit Simultest Control IgG₁-Antikörpern gefärbt (s.o.). Anschließend wurde der Anteil der CD34-positiven Zellen bestimmt.

Zur Kompensation des Durchflusszytometers wurden bei allen oben genannten Versuchen MNCs mit Anti-CD-8-FITC-, Anti-CD-4-PE-, Anti-CD19-PerCP-Cy 5.5- und Anti-CD3-APC-Antikörpern gefärbt (ebenfalls BD Biosciences).

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Auswertungsprogramm von FACSCalibur.

2.3 Zytologie

Aus den gewonnenen Knochenmarksaspiraten wurden im Rahmen der klinischen Routinediagnostik Knochenmarkszytologien angefertigt. Dazu wurden die Aspireate auf Objektträger ausgestrichen und getrocknet. Anschließend erfolgte eine Färbung nach Pappenheim (Kombination aus May-Grünwald- und Giemsa-Färbung). Die Auswertung wurde unter einem Lichtmikroskop von zwei unabhängigen Hämatologen durchgeführt, von denen mindestens ein Hämatologe Facharztstandard besaß.

2.4 Proliferation

Zur Messung des Wachstumsverhaltens der BM-HSPCs wurden diese unmittelbar nach der Selektion aus dem Knochenmark über 7 Tage einer Proliferationsanalyse unterzogen. Dazu wurden $2,5 \cdot 10^5$ Zellen in 1ml I20++++ Medium aufgenommen. Bei diesem Medium handelt es sich um eine leicht abgewandelte Form eines Erhaltungsmediums für CD34-positive Stammzellen [77][78]. Der Unterschied bei dem hier verwendeten Medium ist lediglich der Zusatz von IL-6. Das Medium wird auf der Basis von IMDM hergestellt und enthält neben 20% fetalem bovines Serum (FBS) jeweils 10ng/ml SCF, Interleukin 3, Interleukin 6 und FLT3-Ligand. Die Zellen wurden anschließend bei 37°C und 5% CO₂ für 7 Tage in Kultur gehalten. Die Zellkonzentration in der Kultur wurde täglich mittels CASY Counting System (Schärfe, Reutlingen, Germany) gemessen.

2.5 LTCIC-Assay

Die Abkürzung LTCIC steht für *Long Term Culture Initiating Cell*. Mit Hilfe dieses Assays kann das Langzeitproliferationspotenzial von hämatopoetischen Stammzellen untersucht werden. In einer 5-wöchigen Kulturphase auf einem *feeder layer* aus Fibroblasten werden Zellen mit Langzeitproliferationspotenzial herausselektiert. Anschließend werden die Wells mit Methylcellulose überschichtet und die verbliebenen Zellen bilden Kolonien, die dann gezählt werden. Für den LTCIC-Assay wurden $6 \cdot 10^3$ CD34-positive Knochenmarkstammzellen in 5 ml Medium aufgenommen, wie bereits in vorangegangenen Arbeiten geschehen [3]. Das Medium setzt sich aus IMDM mit 12,5% FBS und 12,5% *horse serum* (HS) zusammen und enthält einen Zusatz aus 100U/ml Penicillin und Streptomycin, um mikrobielles Wachstum zu unterbinden. Die im Medium suspendierten Zellen wurden auf eine mit einem *fibroblast feeder layer* beschichtete 96-Well-Suspensionsplatte in 4 Verdünnungsstufen aufgetragen. Jede Verdünnungsstufe wurde dabei in 22-fachem Ansatz angefertigt. In der ersten Verdünnungsstufe gelangten 180 Zellen in jedes Well, in der zweiten 60, in der dritten 22 und in der letzten 6.

Die so präparierten Platten wurden bei 37°C und 5% CO₂ für 5 Wochen unter regelmäßigem Mediumwechsel kultiviert. Nach 5 Wochen wurde das Medium komplett entfernt und die Wells mit Methylcellulose mit 10U/ml EPO überschichtet. Die Kulturplatten wurden unter o.g. Bedingungen für weitere 2 Wochen kultiviert und im Anschluss die durch die Methylcellulose hochgewachsenen LTCIC-Kolonien unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die LTCIC-Frequenz wurde mittels des Programms L-Calc berechnet (Version 1.1, StemSoft Software).

2.6 Colony-Forming Assay

Der Colony-Forming Assay dient der Bestimmung des Differenzierungsverhaltens von humanen hämatopoetischen Stammzellen. Verschiedene Zytokine stimulieren dabei die Proliferation der hämatopoetischen Vorläuferzellen. Diese bilden Kolonien, die gezählt und den unterschiedlichen hämatopoetischen Zelllinien zugeordnet werden. Es entsteht ein repräsentatives Bild der Determination der untersuchten Stammzellen in die

unterschiedlichen hämatopoetischen Zelllinien. Der Assay wird in einer semisoliden Matrix durchgeführt, damit die proliferierten Zellen nicht aus den Kolonien migrieren und die Kolonien dadurch besser abzugrenzen sind.

Der Colony-Forming Assay wurde nach bekanntem Protokoll durchgeführt [3]. $2 \cdot 10^3$ BM-HSCs wurden nach der Aufreinigung in 2 ml Methylcellulose-Medium überführt (Methocult GF H 4434, StemCell Technologies, Grenoble, France). Dieses Medium enthält neben Methylcellulose EPO, SCF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) und IL-3. Anschließend wurden jeweils 0,5ml Methylcellulose mit Zellen in eine 24-Well-Suspensionsplatte (Greiner Bio-one, Frickhausen, Germany) überführt, sodass ein vierfacher Versuchsansatz mit einer Zellkonzentration von 500 Zellen/Well und 1000 Zellen/ml vorhanden ist. Die Platten wurden dann bei 37°C und 5% CO² für 14 Tage in Kultur gehalten. Nach 14 Tagen wurden unter dem Lichtmikroskop in jedem Well die Kolonien gezählt und nach *burst-forming-unit of erythroid* (BFU-E), *colony-forming-unit of erythroid* (CFU-E), *colonyforming-unit of granulocytes* (CFU-G) und *colony-forming-unit of granulocytes/erythroids/macrophages/megacaryocytes* (CFU-GEMM) differenziert. Die gesamte Anzahl der Kolonien in allen 4 Wells sowie der absolute und relative Anteil der o.g. Kolonien wurden errechnet.

2.7 Oligonukleotid-Microarray

Oligonukleotid-Microarrays bieten die Möglichkeit eines quantitativen Nachweises von mRNA aus kleinen Proben zur Analyse der Genexpression. Zunächst muss dabei die mRNA aus den lysierten Zellen mittels reverser Transkriptase in eine cDNA umgeschrieben und amplifiziert werden. Anschließend wird die cDNA an Oligonukleotidsonden hybridisiert, die auf einem Microchip gekoppelt sind. Jede Hybridisierung erzeugt ein elektrisches Signal, welches detektiert wird. Die für diese Arbeit verwendeten Microchips vom Typ Human Genome U133A 2.0 haben Oligonukleotidsonden für ca. 14.500 Genprodukte.

Für die Genexpressionsanalysen wurden CD34-positive BM-HSPCs nach der Aufreinigung in Buffer RLT (Quiagen, Hilden, Germany) mit 1% β -Mercaptoethanol lysiert und bei -20°C kryokonserviert. Nach dem Auftauen

wurde die freigesetzte RNA mittels dem Rneasy Micro Kit gereinigt (Quiagen, Hilden, Germany). 20 ng der RNA wurden mit dem Ovation Pico WTA System (NuGen, Leek, Netherlands) in eine cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Von der generierten cDNA wurden jeweils 5 µg nach Vorgaben des Herstellers auf den Chip Human Genome U133A 2.0 hybridisiert. Die gewonnenen Rohdaten wurden durch Herrn Rene Deenen und Herrn Karl Köhrer vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Universität Düsseldorf prozessiert. Die Auswertung erfolgte dort mittels des Programmes GeneSpring GX (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Die Daten wurden zunächst mittels des *Robust Multi-array Average* (RMA) zusammengefasst und dann einer quantilen Normalisierung unterzogen [79]. Alle Genprodukte, deren Signalintensität bei der Detektion bei mindestens 3 Patienten über dem Hintergrundsignal lag, wurden weiterführend analysiert. Nach Zuordnung zur Testgruppe (t0 oder t1) wurde eine statistische Testung mittels gepaartem T-Test durchgeführt, wobei ein p-Wert < 0,05 als signifikant angesehen wurde. Nach der Bearbeitung durch die Kollegen des BMFZ wurde eine Aufstellung mit zwischen den beiden Testgruppen (t0 und t1) signifikant different exprimierten Genen übermittelt.

Insgesamt wurden so Genexpressionsanalysen von 5 Patienten in t0 und t1 durchgeführt. Mittels des Programms *Advanced Pathway Painter* (GSA, Rostock, Germany) wurden die Gene gruppiert, um Signalwege zu identifizieren, an denen mehrere unter Lenalidomidtherapie alterierte Gene beteiligt sind. Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene wurden mittels der *Cancer Gene List* (Bushman Lab, Philadelphia, USA) identifiziert. Die Liste ist eine Zusammentragung von Genen aus mehreren großen Datenbanken und umfasst 2125 Protoonkogene und Tumorsuppressorgene.

2.8 Phospho-SMAD2 Färbung

In einer weiterführenden Analyse zu dieser Arbeit wurden Färbungen mit Phospho-SMAD2 durchgeführt. Es ist zu erwähnen, dass die daraus gezeigten Daten freundlicherweise von Fr. Dr. Boquoi aus der Klinik für Hämatologie/Onkologie des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt wurden. Für die Färbungen wurden aus konservierten

Knochenmarksstanzen von Patienten vor und nach Lenalidomid-konsolidierungstherapie Parafinschnitte angefertigt. Zudem konnten von einigen Patienten zusätzlich Knochenmarksstanzen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des Multiplen Myeloms beschafft werden. Die Phospho-SMAD2-positiven Zellen in den Schnitten wurden immunhistochemisch gefärbt und anschließend unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Es wurden die für die Phospho-SMAD2-Färbung positiven Zellen in 5 repräsentativen Feldern quantifiziert und der Mittelwert bestimmt.

2.9 Kryokonservierung

Von einigen Knochenmarkspunktaten wurde zusätzlich Zellmaterial in Einfriermedium bei -80°C sowie in RNA-Lysepuffer bei -20°C kryokonserviert, um für spätere Experimente darauf zurückgreifen zu können.

2.10 Statistische Auswertung

Für die Versuche wurden jeweils der Mittelwert sowie der Median bestimmt und der Standardfehler errechnet. Die statistische Testung erfolgte mittels eines gepaarten *student t-test* und ein p-Wert $\leq 0,05$ wurde als signifikant angesehen. Zur statistischen Auswertung des Oligonukleotid-Microarrays siehe Abschnitt 2.7. Die Grafiken wurden mittels Microsoft Excel, Microsoft PowerPoint und der FACSCalibur-Software erstellt.

3. Ergebnisse

3.1 Patienten

Für diese Arbeit wurden im Zeitraum zwischen 2010 und 2014 aus Knochenmarkspunktaten von Patienten mit Multiplem Myelom vor (t0) und nach einer 6-monatigen Lenalidomid-Konsolidierungstherapie (t1) CD34-positive BM-HSPCs gewonnen. Dabei wurde von insgesamt 29 Patienten ein kompletter Probensatz generiert. Die Patienten hatten zuvor alle eine unbehandelte Myelomerkrankung und erhielten als Erstlinientherapie eine Induktion, eine Hochdosischemotherapie sowie eine autologe Stammzelltransplantation. In einem zeitlichen Abstand von 90 bis maximal 120 Tagen nach der Transplantation erfolgte eine Konsolidierungstherapie mit Lenalidomid über 6 Monate. Das Patientenalter betrug im Median zum Start der Konsolidierungstherapie 53 Jahre (42 Jahre bis 73 Jahre). Aus dem Kollektiv waren 45% (n=13) weiblich und 55% männlich (n=16). Von den 29 Patienten hatten 41% Paraproteine vom Typ IgG, 38% vom Leichtkettentyp und 21% vom Typ IgA. Nach Salmon/Durie-Klassifikation hatten bei Diagnosestellung 3% ein Stadium 1, 14% ein Stadium 2 und 83% ein Stadium 3 (Quelle: Krankenhaus-Informationssystem). Nach ISS-Klassifikation hatten 44% ein Stadium 1, 33% ein Stadium 2 und 22% ein Stadium 3, zwei Patienten konnten aufgrund von fehlenden β 2-Mikroglobulin-Werten nicht klassifiziert werden. Ein initialer Nierenschaden nach Definition der Salmon/Durie-Klassifikation lag bei einem Patienten vor.

Alle Patienten erhielten eine leicht unterschiedliche Induktionstherapie: 75,9% der Patienten erhielten Bortezomib + Dexamethason (n=22), 27,6% der Patienten Idarubicin + Dexamethason (n=8) und 13,8% der Patienten Bortezomib + Cyclophosphamid + Dexamethason (n=4). Bei 44,8% der Patienten (n=13) wurde aufgrund von lokalen Beschwerden zusätzlich eine Radiatio durchgeführt. Danach erfolgte bei allen Patienten eine Stammzellmobilisation mit Cyclophosphamid und anschließender Apherese der mobilisierten Zellen. Die Hochdosis-Chemotherapie mit Melphalan wurde

entweder als einmalige Therapie mit 200mg Melphalan/m² (n=22) oder bei älteren Patienten als Tandem-Transplantat mit 2 Gaben à 100mg/m² appliziert (n=7). In einigen Fällen erfolgte aufgrund eines unzureichenden Ansprechens nach einmaliger Gabe von 200 mg Melphalan/m² eine 2. Hochdosistherapie mit 200mg/m² (n=10). Die Patienten zeigten nach der Hochdosistherapie und vor Beginn der Erhaltungstherapie mit Lenalidomid mindestens eine *stable disease* (2 Patienten CR; 12 Patienten VGPR; 11 Patienten PR; 4 Patienten SD).

3.2 Blutbild

Bei Vergleich der Blutbilder vor und nach der Therapie mit Lenalidomid zeigten sich deutliche Unterschiede. Sowohl die Gesamtleukozyten als auch die neutrophilen Granulozyten waren zum Zeitpunkt t1 gegenüber t0 signifikant reduziert (siehe Abb. 4). Die Gesamtleukozytenzahl sank durchschnittlich nach 6 Zyklen Konsolidierungstherapie um 36% ($p= 1,9 \cdot 10^{-8}$). Die neutrophilen Granulozyten waren um 42% reduziert ($p= 0,001$). Die durchschnittlichen absoluten Werte für die Gesamtleukozyten zu t1 (3317 / μ l) und die neutrophilen Granulozyten (1834 / μ l) lagen unterhalb des unteren Referenzwertes des Testlabors. Ebenfalls zeigte sich ein signifikanter Abfall der Thrombozyten nach der Therapie mit Lenalidomid von durchschnittlich 194483 / μ l zu t0 auf 160724/ μ l in t1 ($p=9,9 \cdot 10^{-5}$).

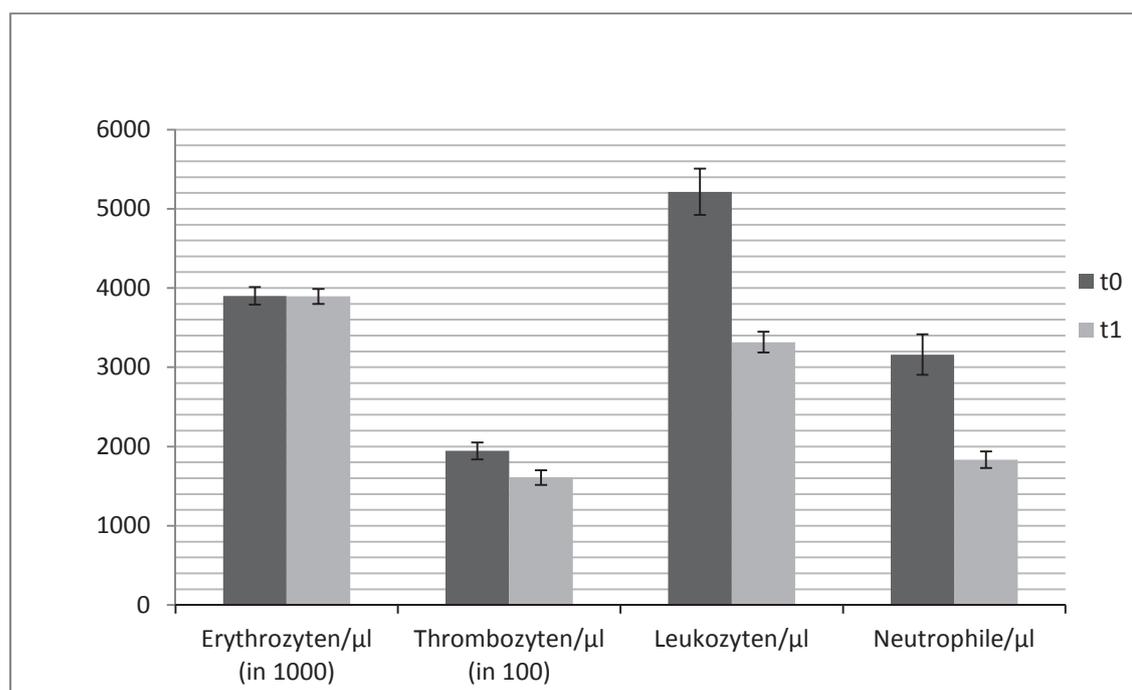


Abb.4: **Blutbild (Mittelwerte mit Standardfehler; n=29 Patienten)**

Die Erythrozytenzahl, der Hämoglobinspiegel und das Hämatokrit zeigten keine signifikanten Veränderungen. Die Erythrozytenzahl lag vor der Konsolidierungstherapie bei $3,90 \cdot 10^6 / \mu\text{l}$ und danach bei $3,89 \cdot 10^6 / \mu\text{l}$ ($p = 0,95$). Der Hämoglobinspiegel betrug 12,42 g/dl zu t0 bzw. 12,36 g/dl zu t1 ($p = 0,77$) und der Hämatokrit 38% bzw. 37% ($p = 0,35$).

3.3 Zytologie

Um zu überprüfen, ob die Reduktion der peripheren Blutzellen mit einer reduzierten Hämatopoese einhergeht, wurden aus Knochenmarkspunktaten zu t0 und t1 manuelle zytologische Untersuchungen durchgeführt (siehe Abb. 5). Korrelierend zum erniedrigten Anteil von Leukozyten und neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut zeigte sich eine signifikante Abnahme der granulopoetischen Zellen im Knochenmark von 53% in t0 auf 42% in t1 ($p = 0,03$). Der Anteil der Erythropoese war nach Lenalidomid-Therapie von 29% auf 40% erhöht, jedoch nicht signifikant, sodass lediglich von einer Tendenz gesprochen werden kann ($p = 0,066$). Der Plasmazellanteil war mit 4% vor und 4% nach Konsolidierungstherapie im Durchschnitt unverändert. Der Anteil der Blasten und Lymphozyten zeigte keine signifikante Veränderung.

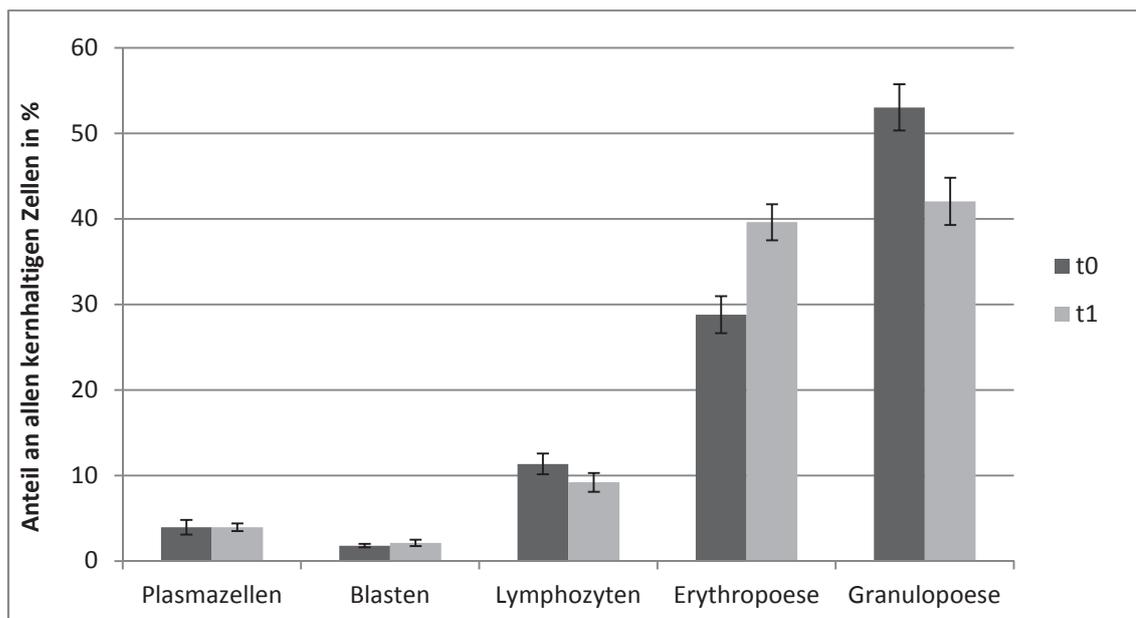


Abb.5: **Manuelle Zytologie (Mittelwerte mit Standardfehler; n=29 Patienten)**

3.4 Durchflusszytometrie

Anschließend wurde untersucht, ob die Anzahl der hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark ebenfalls durch die Lenalidomidtherapie reduziert wird. Insgesamt wurde bei 13 Patienten eine Durchflusszytometrie zur Bestimmung der Zellkonzentration im Knochenmark durchgeführt. Als Zielwert sollten in jeder Probe 30000 Lymphozyten gemessen werden. Vor Konsolidierungstherapie waren es durchschnittlich 35608 und nach 6 Zyklen 33324 Lymphozyten. Dazu mussten zu t0 im Schnitt 3335 von 38960 Microbeads gemessen werden, entsprechend einem Knochenmarksvolumen von 21,4 μl und 5824 von 38960 Microbeads zu t1, entsprechend einem Knochenmarksvolumen von 37,4 μl . Diese Ergebnisse zeigen, dass die Konzentration von Lymphozyten in den Knochenmarksaspiraten vor Konsolidierung mit Lenalidomid höher war als nach 6 Zyklen (2559/ μl vs. 1248/ μl ; $p=0,09$). Die über die FACS-Messung bestimmte Konzentration der BM-HSCs im Knochenmark zeigte eine signifikante Abnahme der CD34+ Zellen nach den 6 Zyklen Lenalidomid. Zu t0 betrug die durchschnittliche Konzentration der Zellen 117/ μl Knochenmark, zu t1 hingegen nur 39/ μl Knochenmark ($p=0,035$). Das entspricht einer relativen Reduktion der Zellen von ca. 67%.

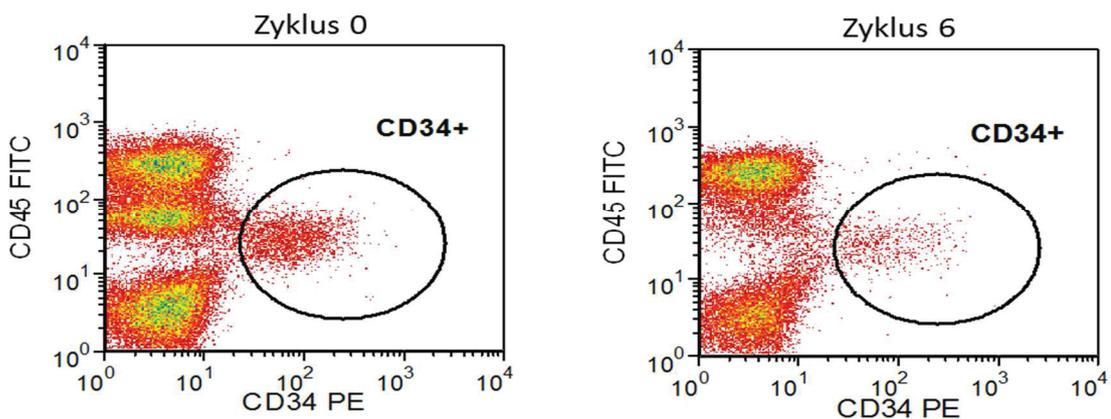


Abb.6: **Repräsentative Daten eines Patienten nach Auswertung mittels FACSCalibur**

Der relative Anteil der CD34-positiven Zellen an allen kernhaltigen Zellen des Knochenmarks sank ebenfalls nach Einnahme von Lenalidomid signifikant (vor Lenalidomid $4,88\% \pm 0,54\%$ und nach der Konsolidierungsphase $3,17\% \pm 0,44\%$ [$p=0,009$]).

3.5 Proliferation

Anschließend wurde untersucht, ob die Reduktion der hämatopoetischen Zellen im Knochenmark mit einem verminderten Proliferationspotenzial der Stammzellen einhergeht. Nach Ansetzen des Proliferations-Assays wurde zunächst eine sofortige Messung der Zellkonzentration durchgeführt, um die Ausgangskonzentration der Zellen zu bestimmen. Zum Zeitpunkt t0 betrug die durchschnittliche Konzentration der *viable cells* $2,42 \cdot 10^5/\text{ml}$ bei einer *viability* von 80,78% und zu t1 $2,01 \cdot 10^5/\text{ml}$ bei einer *viability* von 77,19%. Die initialen Zellkonzentrationen jedes einzelnen Patienten wurden als Ausgangswert genommen und das relative Wachstum bis zum Tag 7 bestimmt. Insgesamt zeigte sich beim Zellwachstum kein signifikanter Unterschied vor und nach der Einnahme von Lenalidomid. Die absolute Anzahl der *viable cells* stieg vor Lenalidomidtherapie von den initialen $2,42 \cdot 10^5$ Zellen/ml auf $1,19 \cdot 10^6/\text{ml}$. Nach Lenalidomidtherapie zeigte sich eine Zunahme von $2,01 \cdot 10^5$ Zellen/ml auf $9,93 \cdot 10^5/\text{ml}$. Das relative Wachstum zeigte bei den Patienten vor Einnahme von Lenalidomid einen Faktor von 5,98 und nach den 6 Zyklen einen Faktor von 5,18 (siehe Abb. 7; $p = 0,687$). Somit verändert die Lenalidomid-Konsolidierungstherapie über 6 Monate das Kurzzeitproliferationspotenzial der BM-HSPC nicht.

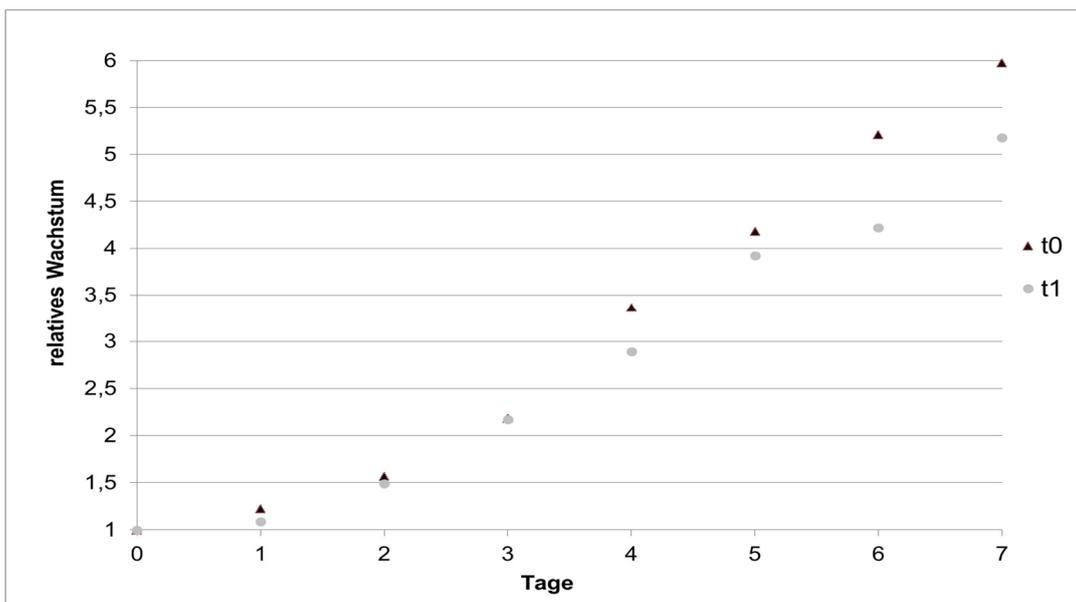


Abb.7: Relatives Wachstum der Zellzahl im Mittel (n=8 Patienten)

3.6 LTCIC

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Kurzzeitproliferationspotenzial der BM-HSPCs durch die Lenalidomid-Konsolidierungstherapie nicht beeinflusst wird, wurde mittels des LTCIC-Assays die Langzeitproliferationskapazität untersucht. Insgesamt wurden Langzeitkulturen von 8 Patienten vor und nach Konsolidierungstherapie angefertigt (n=8). Vor Lenalidomid-Konsolidierungstherapie waren durchschnittlich 14,6% der Wells mit einer Langzeitkolonie bewachsen, nach Lenalidomid-Therapie waren es 11,9%. Unter Berücksichtigung der eingesetzten Zellkonzentration pro Well ergibt sich eine LTCIC-Frequenz von 0,262% zu t0 und 0,206% zu t1 (p= 0,099). Das bedeutet vor Lenalidomidtherapie besitzt im Durchschnitt eine von 382 HSCs die Fähigkeit eine Langzeitkolonie zu bilden, nach Lenalidomidtherapie ist es eine von 485 HSCs. Folglich zeigte sich kein signifikanter Unterschied des Langzeitproliferations-potenzials durch die Lenalidomid-Konsolidierungstherapie.

3.7 Colony-Forming Assay

Die vorangegangenen Experimente zeigten, dass die hämatopoetischen Stammzellen nach Lenalidomidtherapie im Knochenmark vermindert sind, aber ein unverändertes Proliferationspotenzial besitzen. Daher sollte nun mittels Colony-forming Assay das Differenzierungspotenzial der hämatopoetischen Vorläuferzellen untersucht werden (siehe Abb. 8 und Abb. 9). Aus den insgesamt dafür eingesetzten $2 \cdot 10^3$ CD34-positiven BM-HSC bildeten sich bei den Patienten zu t0 im Durchschnitt 190 Kolonien und zu t1 im Durchschnitt 197 Kolonien. Der Anteil der CFU-G nach der Konsolidierungstherapie mit Lenalidomid war im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Therapie ebenso wie die absolute Anzahl der Kolonien reduziert. Der relative Anteil betrug im Durchschnitt $62,3\% \pm 2,9\%$ zu t0 gegenüber $59,2\% \pm 2,8\%$ zu t1 (p= 0,349) und im Median $65,2\%$ gegenüber $59,1\%$. Die absolute Kolonienzahl der CFU-G lag bei 122 ± 19 gegenüber 117 ± 14 (p= 0,826). Die erythropoetischen Vorläuferkolonien waren hingegen zu t1 im Vergleich zum Therapiestart vermehrt. Die BFU-E median mit $23,7\%$ vs. $18,7\%$ und die CFU-E im Median mit $7,2\%$ vs. $2,3\%$ vor Lenalidomid. Um Fehler in der Differenzierung zwischen

BFU-E und CFU-E bei der Auswertung zu kompensieren, wurden zusätzlich alle erythroiden Kolonien summiert. Hier zeigte sich ebenfalls eine nicht-signifikante Erhöhung nach Konsolidierungstherapie mit einem durchschnittlichen Anteil von 27,7% vor bzw. 30,7% nach Lenalidomidtherapie ($p=0,36$).

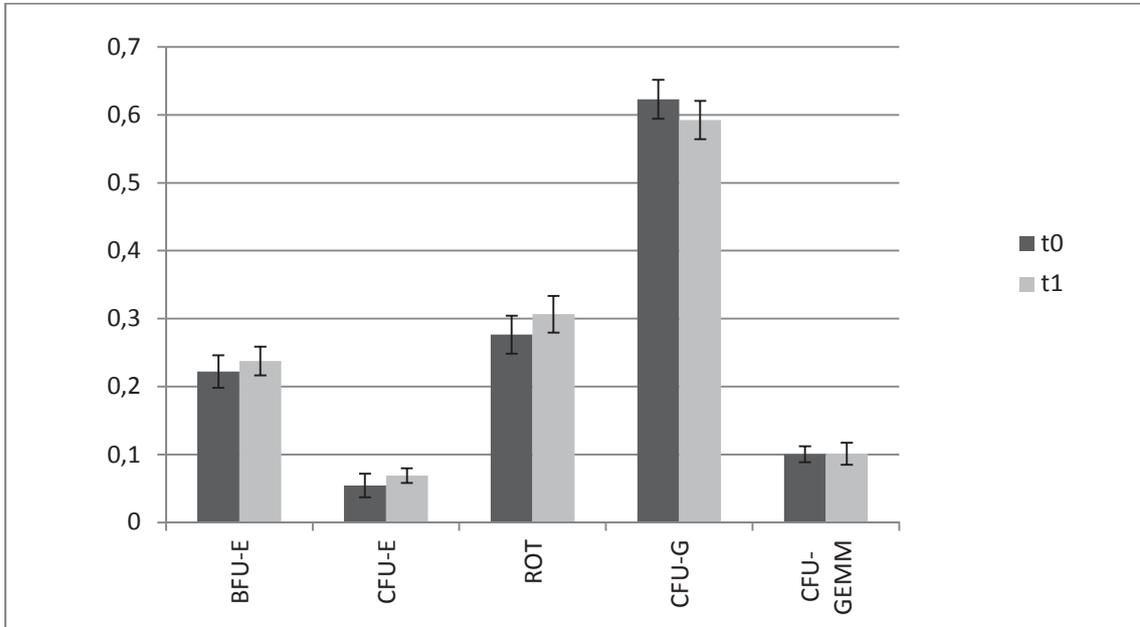


Abb.8: Anteil der Kolonien (Mittelwert mit Standardfehler; ROT entspricht der Summation der erythroiden Kolonien; n=16 Patienten)

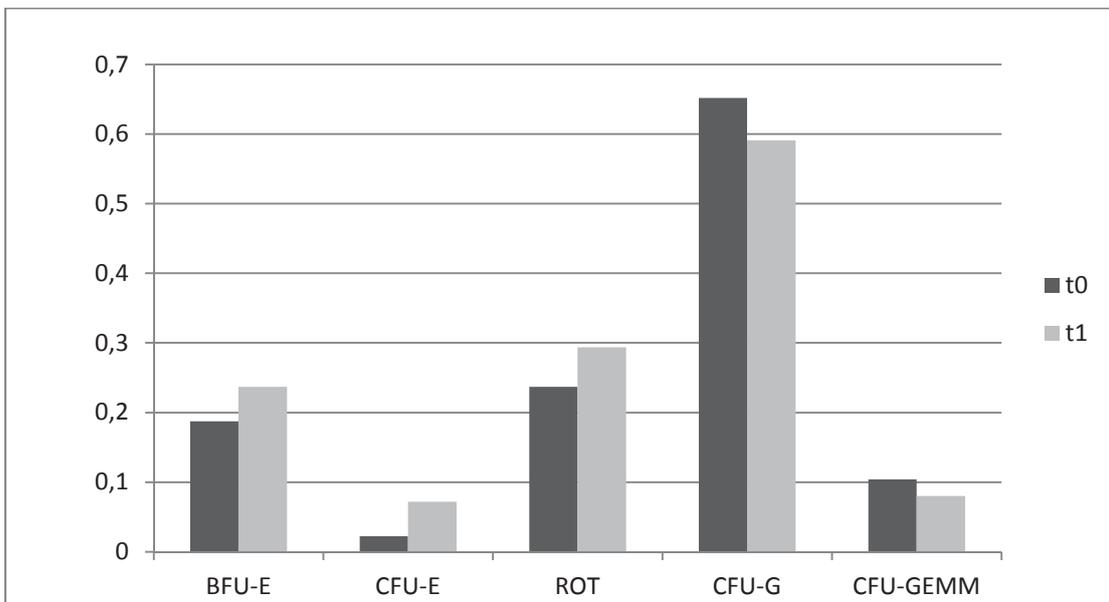


Abb.9: Medianer Anteil der Kolonien (ROT entspricht der Summation erythroiden Kolonien; n=16 Patienten)

Bei den CFU-GEMM waren keine wesentlichen Veränderungen erkennbar mit einem nahezu konstanten Anteil von $10\% \pm 1,1\%$ im Zyklus 0 beziehungsweise $10,1\% \pm 1,6\%$ im Zyklus 6 ($p= 0,97$).

Zusammenfassend zeigte sich eine Reduktion der granulozytären Vorläuferkolonien sowie Vermehrung der erythroiden Vorläuferkolonien. Da kein statistisch signifikantes Niveau erreicht wurde, kann hier lediglich von Tendenzen gesprochen werden.

3.8 Oligonukleotid-Microarray

Der eingesetzte Human Genome U133 2.0 Array kann ca.18.400 mRNAs von 14.500 unterschiedlichen humanen Genen detektieren und quantifizieren. Bei der Auswertung wurden nur signifikante Veränderungen in der Genexpression zum Zeitpunkt vor und nach der Konsolidierung mit Lenalidomid berücksichtigt. Des Weiteren wurden zunächst nur Veränderungen mit einem Faktor von ≥ 2 bzw. $\leq 0,5$ als relevant angesehen. Es wurden Genexpressionsanalysen bei 5 Patienten durchgeführt ($n=5$). Insgesamt zeigten 2.305 Gene unter der 6-monatigen Konsolidierungstherapie mit Lenalidomid signifikante Unterschiede in der Genexpression. Unter Berücksichtigung des oben genannten *cut offs* zeigten nur 151 Gene eine signifikante Veränderung.

Die mit Abstand größte Gruppe unter den 151 Genen stellten Gene mit einer Funktion in der Regulation des Immunsystems dar. Die meisten Immunmodulationen durch Lenalidomid führen zu einer immunsuppressiven Wirkung. Unter den herunterregulierten Genen befanden sich viele Gene zur Regulation der angeborenen zellulären Abwehr (z.B. *Macrophage scavenger receptor 1* [MSR1], *Cat eye syndrome critical region protein 1* [CECR1] oder *Myeloid cell nuclear differentiation antigen* [MNDA]), des Komplementsystems (*Ficolin 1* [FCN1] und *CD11c* [ITGAX]) und der Inflammation (*Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2* [TNFAIP2], *Baculoviral IAP repeat-containing protein3* [BIRC3] und *CCAAT/enhancer-binding protein beta* [CEBPB]). Vermehrt exprimiert wurden hingegen Gene, die an der Regulation der zytotoxischen Immunantwort über CD8+-T-Lymphozyten und NK-Zellen beteiligt sind, wie z.B. *Granzyme b* (GZMB) und *Lymphokine-activated killer T-cell-originated protein kinase* (PBK). Diese Ergebnisse deuten an, dass

Lenalidomid einen Großteil, insbesondere des angeborenen Immunsystems supprimiert, wohingegen die Immunantwort über zytotoxische Lymphozyten und NK-Zellen verstärkt wird.

Unter den 151 Genen waren auffallend viele proerythropoetische Gene nach Lenalidomid-Konsolidierung vermehrt exprimiert, wie *Rh-associated glycoprotein* (RHAG), Glycophorin a (GYPA), Glycophorin b (GYPB), XK, und *Alpha-hemoglobin-stabilizing protein* (ERAF). Zudem zeigte sich eine deutlich gesteigerte Expression von *Hemoglobin subunit gamma-1* (HBG1) und *Hemoglobin subunit gamma-2* (HBG2), was zu einer Produktion von Globin Gamma A/G und somit letztlich von fetalem Hämoglobin (HbF) führt. Hieraus lässt sich ableiten, dass Lenalidomid in den hämatopoetischen Vorläuferzellen die Erythropoese steigert und die Produktion von fetalem Hämoglobin induziert.

Top 10 genes upregulated				
Gene symbol	Uni-gene	Description	FC	P-value
RHAG	Hs.120950	rh-associated glycoprotein	6,26	0,0189
HBG1/HBG2	Hs.712539	hemoglobin gamma A/G	5,95	0,01376
GYPA	Hs.434973	glycophorin A (MNS blood group)	5,26	0,01474
CDH1	Hs.461086	cadherin 1, E-cadherin (epithelial)	4,72	0,00247
GYPB	Hs.654368	glycophorin B (MNS blood group)	3,91	0,03547
AGAP1	Hs.435039	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 1	3,82	0,00636
MYL4	Hs.463300	myosin, light chain 4	3,81	0,02252
GZMB	Hs.1051	granzyme B (granzyme 2, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 1)	3,81	0,00495
XK	Hs.78919	X-linked Kx blood group (McLeod syndrome)	3,77	0,00411
EPX	Hs.279259	eosinophil peroxidase	3,65	0,01618

Abb.10: Am stärksten hochregulierte Gene (FC= relativer Veränderungsfaktor)

Mehrere an der TGF- β -Signaltransduktion beteiligte Gene, wie *Latent TGF-beta binding protein* (LTBP1), *Neural precursor cell expressed developmentally*

downregulated gene 4-like (NEDD4L) und *Cadherin-1* (CDH1), zeigten eine signifikant vermehrte Expression nach der Therapie mit Lenalidomid. LTBP1 bindet extrazelluläres TGF- β und verringert somit die Menge des in der Knochenmarksnische befindlichen TGF- β [80]. NEDD4L induziert eine Ubiquitinierung von den Signaltransduktoren SMAD2/3 und führt somit zu einer Hemmung der intrazellulären Signaltransduktion von TGF- β [81]. CDH1 führt zu einer Degradation von Skp2, woraus eine Stabilisierung von p27 und somit ein Zellzyklusarrest resultiert [82]. Zusammengefasst hemmt die Lenalidomid-Therapie die TGF- β -Wirkung.

Top 10 genes downregulated

Gene symbol	Uni-gene	Description	FC	P-value
FCN1	Hs.440898	ficolin (collagen/fibrinogen domain containing) 1	5,21	0,04713
AIM2	Hs.281898	absent in melanoma 2	5,12	0,01002
MSR1	Hs.147635	macrophage scavenger receptor 1	5,09	0,00533
GIMAP4	Hs.647101	GTPase, IMAP family member 4	4,92	0,03414
CD163	Hs.504641	CD163 molecule	3,91	0,0369
PLA2G7	Hs.584823	phospholipase A2, group VII (platelet-activating factor acetylhydrolase, plasma)	3,58	0,02039
GBP2	Hs.386567	guanylate binding protein 2, interferon-inducible	3,44	0,04523
HMOX1	Hs.517581	heme oxygenase (decycling) 1	3,26	0,00035
CCL5	Hs.514821	chemokine (C-C motif) ligand 5	3,26	0,04399
LILRB2	Hs.655652	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 2	3,24	0,04809

Abb.11: 10 am stärksten herunterregulierte Gene (FC= relativer Veränderungsfaktor)

Unter den 151 Genen mit einem Veränderungsfaktor ≥ 2 und $\leq 0,5$ befanden sich mit Four and a half LIM domains protein 2 (FHL2), TEK tyrosin kinase (TEK), Neuroepithelial cell-transforming gene 1 protein (NET1), Interferon regulatory factor 4 (IRF4) und Ras-related protein Rab-38 (RAB38) nur 5 Protoonkogene, die eine signifikant erhöhte Expression nach Lenalidomidtherapie zeigen. Insbesondere FLH2 ist im Kontext der Lenalidomidtherapie von Interesse, da eine Überexpression mit einer gestörten

Myelopoese und der Entwicklung von therapieassoziierten myeloischen Leukämien vergesellschaftet ist [83][84].

3.9 Phospho-SMAD2 Färbung

Im Folgenden werden die Ergebnisse der ergänzend angefertigten Phospho-SMAD2-Färbungen dargestellt. Zum Zeitpunkt t0 waren im Durchschnitt ca. 4 Phospho-SMAD2 positive Zellen/ Sichtfeld. Nach Lenalidomidtherapie waren es 0 Zellen/Sichtfeld (jeweils n=9 Patienten). Daten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose des Multiplen Myeloms liegen von 5 Patienten aus unserem Kollektiv vor. Dort waren im Durchschnitt ca. 29 Zellen/Sichtfeld Phospho-SMAD2 positiv (n=5).

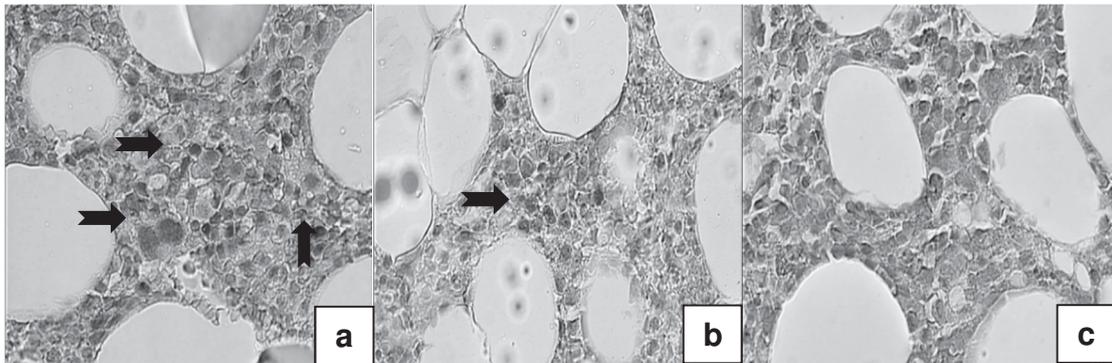


Abb.12: **Phospho-SMAD2-Färbungen**; Lichtmikroskop 40x Vergrößerung a) Erstdiagnose Myelom; b) Zeitpunkt t0; c) Zeitpunkt t1 [Pfeile kennzeichnen Phospho-SMAD2-positive Zellen]

4. Diskussion

4.1 Neutropenien

Neutropenien stellen eine schwerwiegende Nebenwirkung bei der Langzeittherapie mit Lenalidomid dar. In den ersten repräsentativen Studien zur Therapie mit Lenalidomid in der Induktions-, Konsolidierungs- und Erhaltungstherapie lag der Anteil an Grad 3 und Grad 4 Neutropenien zwischen 32% und 51% [45][46][50]. Die Neutropenien bedingen die Gabe von granulozytenstimulierenden Wachstumsfaktoren (z.B. G-CSF) und eine Dosisreduktion des Lenalidomids [85]. Häufig sind schwere Neutropenien unter Lenalidomidtherapie und daraus resultierende Infektionen sogar der Grund für einen Therapieabbruch. Daher sollten mögliche Ursachen auf molekularer und funktioneller Ebene im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. In unserem Patientenkollektiv betrug unter Lenalidomidtherapie im Durchschnitt die Reduktion der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut 42% ($p=0,001$). Die absolute Zahl der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut lag nach Lenalidomidtherapie im Durchschnitt bei 1.834/ μl . Die Gesamtleukozytenzahl war unter Lenalidomidtherapie ebenfalls signifikant reduziert. Passend zur Reduktion der Leukozyten und insbesondere der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut zeigte sich in den zytologischen Untersuchungen eine signifikante Reduktion der Granulopoese unter Lenalidomidtherapie. In den Colony-forming Assays zeigte sich lediglich eine tendenzielle Reduktion der CFU-G bei unverändertem Anteil der CFU-GEMM. Zusammenfassend sind die klinischen Parameter und die funktionellen Untersuchungen der hämatopoetischen Vorläuferzellen konkordant zu den in der Literatur beschriebenen Neutropenien unter Lenalidomidtherapie. Die zugrunde liegenden Mechanismen der Neutropenien sind bislang größtenteils unbekannt. In einer umfassenden Arbeit fanden Pal et al. heraus, dass Lenalidomid bei Applikation in vitro zu einer verminderten Expression von PU.1 in hämatopoetischen Stammzellen führt [72]. PU.1 ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor der myeloischen Differenzierung. Pal et al. konnten zeigen,

dass aus der Reduktion von PU.1 unter Lenalidomidtherapie ein Reifungsblock der Promyelozyten resultiert. In unserer Arbeit konnte übereinstimmend unter Lenalidomidtherapie eine Reduktion der Expression des SPI1-Gens, welches PU.1 kodiert, nachgewiesen werden (*fold change* 1,28). Entgegen den Ergebnissen unserer Arbeit wiesen Pal et al. in der erwähnten und einer älteren Arbeit auf funktioneller Ebene eine Zunahme myeloischer Kolonien unter Therapie mit IMiDs nach [72][86]. Diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse sind möglicherweise darauf zurückzuführen, dass im Gegensatz zu unserer Arbeit dort die Applikation der IMiDs bei den Colony-forming Assays *in vitro* erfolgte. Dabei sind Wechselwirkungen des Lenalidomid mit den Zellen der Knochenmarksnische nicht berücksichtigt. Da diese Wechselwirkungen durchaus Einfluss auf die Differenzierungs- und Proliferationskapazitäten der hämatopoetischen Stammzellen haben, ist eine systemische Applikation des Lenalidomids, wie in unserem *setting*, ein realitätsnäheres Modell.

Insgesamt zeigen sich deutliche Hinweise, dass Lenalidomid die Differenzierung granulopoetischer Vorläuferzellen hemmt und über eine verminderte PU.1-Expression zudem zu einem Reifungsblock der Promyelozyten führt. Klinisch resultieren daraus teils schwere Neutropenien, die eine relevante Nebenwirkung der Lenalidomidtherapie darstellen. Zu erwähnen ist allerdings, dass die Neutropenien nach Absetzen von Lenalidomid reversibel sind, sodass kein Langzeitdifferenzierungsschaden vorliegt.

4.2 TGFβ-Signalweg

Der *transforming growth factor beta* (TGFβ) ist ein zentraler Faktor in der pathologisch veränderten Knochenmarksnische des Multiplen Myeloms. Das größte Reservoir von TGFβ stellt die Knochenmatrix dar, man spricht hier von latentem TGFβ [87]. Beim Multiplen Myelom kommt es durch Sekretion von RANKL aus den MSCs und mutmaßlich auch aus den Myelomzellen zu einer Osteoklastenaktivierung und dadurch zu einem gesteigerten Abbau der Knochenmatrix und Freisetzung von latentem TGFβ. Weitere wichtige Quellen von TGFβ in der Knochenmarksnische sind nichtmyelinisierende Schwann-Zellen [22], Megakaryozyten [88] und die Myelomzellen selbst. TGFβ spielt in der Krankheitserhaltung des Multiplen Myeloms eine wichtige Rolle, da es die

Sekretion von IL-6 und VEGF aus MSCs stimuliert [89]. IL-6 fördert die Proliferation der Myelomzellen und hemmt die Osteoblastenproliferation, während VEGF essenziell für die Angiogenese ist (siehe 1.1.3). Des Weiteren besitzt TGF β vielseitige antiinflammatorische Effekte und hemmt die Proliferation von B-Zellen und einigen anderen Immunzellen [90]. Die dadurch resultierende Immunsuppression begünstigt das Wachstum der Myelomzellen in der pathologisch veränderten Knochenmarksnische. Auf den Myelomzellen selber sind die Oberflächenrezeptoren für TGF β herunterreguliert, um den o.g. antiproliferativen Effekten des TGF β zu entgehen [91].

Neben den oben erwähnten krankheitserhaltenden Effekten beeinflusst das TGF β in der Knochenmarksnische auch die Eigenschaften der hämatopoetischen Stammzellen. Bereits seit den frühen 1990er ist bekannt, dass TGF β über eine Wachstumshemmung zur langfristigen Stammzellerhaltung beiträgt, indem die Stammzellen in einen Ruhezustand (englisch *quiescence*) versetzt werden [92]. Ursächlich hierfür ist eine Alteration der Cytokinrezeptor-Expression sowie eine vermehrte Expression von CDK-Inhibitoren, wie zum Beispiel p57^{kip2} [93], was letztendlich in einem Zellzyklusarrest resultiert. Bruns et al. zeigten, dass nach Blockade der intrazellulären TGF β -Signaltransduktion in den CD34-positiven Stammzellen von Myelompatienten die Anzahl der LTCIC gegenüber unbehandelten Zellen signifikant erhöht werden konnte [3]. Das stützt im Umkehrschluss die Theorie, dass die pathologisch erhöhte TGF β -Konzentration in der Knochenmarksnische beim Multiplen Myelom die Proliferationskapazität der BM-HSPCs hemmt.

In der pathologisch alterierten Knochenmarksnische beim Multiplen Myelom und zahlreichen anderen Tumorerkrankungen führt die erhöhte Konzentration von TGF β zudem zu einer Hemmung der Erythropoese. Dieser Mechanismus potenziert sich mit der mechanischen Verdrängung der hämatopoetischen Stammzellen durch die Myelomzellen und führt zu schweren Anämien bei den Myelompatienten. Bei Patienten mit Multiplem Myelom konnten im Vergleich zu gesunden Spendern erhöhte Konzentrationen von TGF β im Überstand der MSCs nachgewiesen werden [3]. In den CD34 positiven Stammzellen zeigte sich durch die erhöhte TGF β -Rezeptoraktivität vermehrt SMAD2, ein wichtiger TGF β -Signaltransduktor. Die hämatopoetischen Stammzellen bildeten im

Colony-forming Assay bei diesen Patienten verglichen mit Gesunden eine reduzierte Anzahl von erythroiden Kolonien. Dass das TGF β für diese funktionelle Einschränkung verantwortlich ist, konnte durch Hemmung der TGF β -Wirkung bewiesen werden. In einer Arbeit wurde durch Zugabe von SD208 die TGF β -Signaltransduktion in hämatopoetischen Stammzellen blockiert, was zu einem Anstieg der erythroiden Kolonien im Colony-forming-Assay führte [3]. Eine andere Arbeitsgruppe setzte neutralisierende Antikörper gegen TGF β ein und konnte ebenfalls einen Anstieg der BFU-E im Colony-Forming Assay nachweisen [94]. Damit konnte der Zusammenhang zwischen einer erhöhten TGF β -Konzentrationen sowie der daraus resultierenden erhöhten Aktivität des TGF β -Signalwegs in CD34-positiven Stammzellen und einer Einschränkung in der erythropoetischen Kapazität der hämatopoetischen Stammzellen nachgewiesen werden.

In den Genexpressionsanalysen in unserem Kollektiv waren nach Lenalidomidtherapie mehrere Gene signifikant alteriert, die zu einer Hemmung des TGF β -Signalwegs beitragen. Nach Lenalidomidtherapie wurde das LTBP1-Gen deutlich vermehrt exprimiert (*fold change* 3,24). Das gleichnamige Protein, das durch das LTBP1-Gen kodiert wird, bindet TGF β in großen Mengen in der extrazellulären Matrix. Die vermehrte Expression des LTBP1-Gens unter Therapie mit Lenalidomid in den Stammzellen führt vermutlich zu einer erhöhten autokrinen Sekretion von LTBP1 durch die CD34-positiven Stammzellen und somit zu einer Reduktion der TGF β -Konzentration in der Knochenmarksnische. Das NEDD4L-Gen wurde ebenfalls nach Lenalidomidtherapie vermehrt exprimiert (*fold change* 2,04). Das Protein NEDD4L führt zu einer Ubiquitinierung von phosphoryliertem SMAD2 und SMAD3, die in der Folge proteasomal degradiert werden [81]. Somit bewirkt NEDD4L eine Hemmung der intrazellulären TGF β -Signaltransduktion in den hämatopoetischen Stammzellen. Unterhalb des von uns als Grenze definierten *fold change* von 2,0 finden sich weitere in den TGF β -Signalweg involvierte Gene, die nach Lenalidomidtherapie vermehrt exprimiert wurden. Das Gen RBX1 (*fold change* 1,31) kodiert das Protein *ring-box 1*, welches zusammen mit Cullin eine E3-Ubiquitin-Protein-Ligase (CRL) bildet. CRL deaktiviert phosphoryliertes SMAD2 und hemmt so die TGF β -Signaltransduktion [95]. Des

Weiteren wurde der SMAD-Inhibitor SMURF1 nach Lenalidomidtherapie vermehrt exprimiert (*fold change* 1,25). SMURF1 hemmt die TGF β 1-Rezeptoren über Aktivierung des inhibitorischen SMAD7 [96] und degradiert SMAD1 [97]. Zur TGF β -Superfamilie gehören mehrere weitere Substanzgruppen, die den TGF β -Signalweg über differente Rezeptoren aktivieren können. Dazu zählen unter anderem die BMPs (*bone morphogenetic proteins*), die an den BMP-Rezeptor Typ 1 und Typ 2 binden und so zu einer SMAD-Aktivierung führen. Nach Konsolidierungstherapie mit Lenalidomid wurde BMP6 vermindert exprimiert (*fold change* 1,46), das nach Bindung an den BMP-Rezeptor zu einer Aktivierung von SMAD1/5/8 führt [98].

Um eine Hemmung des TGF β -Signalwegs auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurden ergänzende phospho-SMAD2-Färbungen an Patienten aus unserem Kollektiv vor und nach Konsolidierungstherapie durchgeführt. Es zeigte sich eine Reduktion des phospho-SMAD2 durch Lenalidomidtherapie. Dadurch bestätigt sich auch auf Proteinebene die Hypothese, dass Lenalidomid inhibitorische Effekte auf die TGF β -Signaltransduktion besitzt, da phospho-SMAD2 als zentraler Effektor der Signaltransduktion fungiert.

Zusammengefasst ergeben sich aus den Daten deutliche Hinweise, dass die Lenalidomidtherapie die TGF β -Wirkung in den hämatopoetischen Stammzellen hemmt und damit der pathologisch gesteigerten TGF β -Aktivität in der Knochenmarksnische des Multiplen Myeloms entgegenwirkt. Der Effekt wird zum einen durch eine Reduktion des in der Knochenmarksnische befindlichen TGF β (durch LTBP1) und anderer Substanzen der TGF β -Superfamilie (BMP6) vermittelt, zum anderen wird über unterschiedliche Mechanismen die intrazelluläre TGF β -Signaltransduktion in den CD34-positiven Stammzellen gehemmt (NEDD4L, SMURF1, RBX1). Nun stellt sich die Frage, ob die reduzierte TGF β -Wirkung durch Lenalidomid funktionelle Auswirkungen auf die hämatopoetischen Stammzellen hat. In den von uns durchgeführten Colony-forming Assays bildeten die CD34-positiven Stammzellen nach Lenalidomidtherapie im Durchschnitt 10,8% mehr erythroide Kolonien, wobei kein statistisch signifikantes Niveau erreicht wurde ($p=0,36$). Differenziert man diese erythroiden Kolonien nach BFU-E und CFU-E so zeigt sich ein nicht-

signifikanter Anstieg der BFU-E um 7,2% ($p=0,54$) und ein ebenfalls nicht-signifikanter Anstieg der CFU-E um 27,8% ($p=0,50$). Diese Ergebnisse sind konkordant zu den Beobachtungen von Bruns et al. und Dybedal et al.[3][94], auch wenn in unserem Kollektiv lediglich von einer Tendenz gesprochen werden kann. In den durchgeführten zytologischen Untersuchungen fanden sich nach Lenalidomidtherapie ebenfalls vermehrt erythroide Vorläufer im Knochenmark. Vor der Konsolidierungstherapie mit Lenalidomid betrug der Anteil 28,8%, danach 39,6% ($p=0,066$). Da kein signifikantes Niveau erreicht wurde, kann auch hier nur von einer Tendenz gesprochen werden. Die Erythrozytenzahl im peripheren Blut, der Hämatokrit und der Hb-Wert waren nahezu unverändert.

Bezüglich des Langzeitproliferationspotenzials konnte entgegen der Arbeit von Bruns et al. keine signifikante Veränderung der Anzahl von LTCICs nach Lenalidomidtherapie nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass das Lenalidomid über andere Mechanismen als den TGF β -Signalweg weiteren Einfluss auf die Proliferation der hämatopoetischen Stammzellen nimmt. Dadurch könnten die fördernden Effekte auf die Langzeitproliferation der CD34-positiven Stammzellen durch die Suppression des TGF β -Signals, wie von Bruns et al. nachgewiesen, aufgehoben werden. Zu erwähnen in diesem Zusammenhang ist, dass unter Lenalidomidtherapie in unserer Arbeit ein signifikanter Rückgang der CD34-positiven Stammzellen im Knochenmark zu beobachten war (siehe 3.4). Welche Mechanismen hierfür ursächlich sind, konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass Lenalidomid hemmend auf den TGF β -Signalweg wirkt und damit die Suppression der Erythropoese durch das bei Myelompatienten erhöhte TGF β kompensiert. Additiv dazu konnte in anderen Arbeiten nachgewiesen werden, dass Lenalidomid selbst die Ausbildung erythroider Kolonien induziert, sodass hier ein synergistischer Effekt vorliegt [99].

4.3 Erythropoese und fetales Hämoglobin

In unserem Kollektiv konnte nach einer Konsolidierungstherapie mit Lenalidomid über 6 Monate eine vermehrte Expression von mehreren Genen

nachgewiesen werden, die auf eine gesteigerte Erythropoese hinweisen (RHAG, GYPA, GYPB, XK, ERAF, etc.). Vier dieser Gene (RHAG, GYPA, GYPB und XK) zählten sogar zu den 20 am stärksten durch die Lenalidomidtherapie alterierten Genen. Es ist nicht sicher zu differenzieren, ob hier ein Effekt der Lenalidomidtherapie gemessen wird oder lediglich die transplantierten Stammzellen regenerieren. Da das Protokoll der LenaMain-Studie einen Beginn der Lenalidomid-Konsolidierungstherapie frühestens 3 Monate nach der autologen Stammzelltransplantation vorsieht, ist aufgrund des zeitlichen Abstandes zur Hochdosismethotherapie aber eher davon auszugehen, dass es sich um Therapieeffekte des Lenalidomid handelt. Gestützt wird diese Vermutung durch mehrere Arbeiten, die ebenfalls einen fördernden Effekt auf die Erythropoese durch Behandlung mit Lenalidomid nachweisen konnten. Narla et al. behandelten CD34-positive Stammzellen von gesunden Spendern über 3 Tage in vitro mit Lenalidomid + Dexamethason [99]. Durch Genexpressionsanalysen konnte man einen Anstieg proerythropoetischer Gene nachweisen, der sich auf funktioneller Ebene durch einen Anstieg der BFU-E und CFU-E bestätigte. Übereinstimmend zeigte sich in unserem Kollektiv auf funktioneller Ebene ein nicht-signifikanter Anstieg der erythroiden Vorläuferzellen in den Colony-forming Assays (CFU-E und BFU-E) sowie ein Anstieg erythropoetischer Vorläufer in der manuellen Zytologie. Unter den alterierten Genen bei Narla et al. fanden sich Gene, die auch in unserem Kollektiv nach Lenalidomidtherapie vermehrt exprimiert wurden (RHCE [*fold change* 2,28] und AQP3 [*fold change* 2,20]). Eine andere Arbeit von Parseval et al. zeigte ebenfalls eine dosisabhängige Wachstumssteigerung von erythropoetischen Stammzellen nach Lenalidomidtherapie in vitro sowie eine korrelierende Abnahme der Apoptoserate und steigende Hämoglobinspiegel im Überstand der Zellkultur [78]. Der Hämoglobinserumspiegel und die Anzahl der Erythrozyten im peripheren Blut zeigten in unserem Kollektiv unter Therapie mit Lenalidomid in vivo keine signifikante Veränderung. Möglicherweise ist diese Beobachtung auf weitere Faktoren, wie eine ineffektive Erythropoese oder einen erhöhten Umsatz von Erythrozyten bei den Patienten zurückzuführen. Neben einer Überexpression von proerythropoetischen Genen war nach Lenalidomidtherapie auch das γ -Globulinen erheblich stärker exprimiert

(HBG1/HBG2 mit einem *fold change* von 5,95). Diese Veränderung ist Ausdruck einer Induktion von fetalem Hämoglobin (HbF) durch Lenalidomid. Das HBG1/2-Gen kodiert das Protein γ -Globulin, welches als Dimer mit 2 α -Globulinen HbF bildet. Das fetale Hämoglobin wird in der Fetalperiode gebildet, die Produktion sistiert in der Regel wenige Monate post partum. Das adulte Hämoglobin setzt sich entweder aus 2 β -und 2 α -Ketten (HbA1 98%) oder 2 δ -und 2 α -Ketten zusammen (HbA2 2%). Fetales Hämoglobin lässt sich physiologisch im adulten Organismus nur noch in geringen Mengen nachweisen (< 0,5%). Die Hypothese, dass Lenalidomid die Bildung fetalen Hämoglobins induziert, wird durch frühere Arbeiten gestützt. Parseval et. al wiesen eine deutliche dosisabhängige Zunahme des Anteils an fetalem Hämoglobin unter in vitro Therapie von hämatopoetischen Stammzellen mit IMiDs (Lenalidomid und Pomalidomid) nach [78]. Unter Therapie mit Pomalidomid wiesen Parseval et al. mittels *real time* PCR zudem eine vermehrte Expression des γ -Globingens nach, bezüglich einer Lenalidomidtherapie werden keine Daten gezeigt. Die genauen zugrundeliegenden Mechanismen der Induktion von fetalem Hämoglobin unter Lenalidomidtherapie sind noch unbekannt. Die physiologische Umstellung von fetalem zu adultem Hämoglobin ist hingegen zu großen Teilen erforscht, da die Induktion der fetalen Hämoglobinbildung ein wichtiger Ansatz bei der Therapie von Hämoglobinopathien ist. Bei der physiologischen Umstellung von fetalem zu adultem Hämoglobin spielen neben einigen Transkriptionsfaktoren überwiegend epigenetische Mechanismen eine Rolle. Als zentrale Transkriptionsfaktoren in der Regulation der fetalen und adulten Hämoglobinsynthese wurden KLF-1 und BCL11A identifiziert. Die beiden synergistischen Transkriptionsfaktoren wirken über eine Hemmung der Expression des γ -Globingens sowie einer vermehrten Expression des β -Globingens, was zu einem *switch* von fetalem zu adultem Hämoglobin führt. Der Funktionsverlust der Transkriptionsfaktoren, durch *knockout* oder Mutationen, resultiert in einer Persistenz von fetalem Hämoglobin im adulten Organismus [100][101][102]. Eine verminderte Expression von KLF-1 oder BCL11A als Erklärung für die vermehrte Expression des γ -Globingens unter Lenalidomidtherapie konnte in unserer Arbeit nicht nachgewiesen werden. KLF-1 wurde unter Lenalidomidtherapie sogar stärker exprimiert (*fold change* 1,86).

Wie bereits zuvor erwähnt, spielen epigenetische Mechanismen eine zentrale Rolle in der Regulation der fetalen Hämoglobinexpression. Insbesondere die Histon-Acetylierung und die DNA-Methylierung am γ -Globingen sind hier von Bedeutung. Die Acetylierung an Lysin-Gruppen der Histone führt zu einer Neutralisierung der positiven Ladung des Lysins. Dadurch ändert sich die Bindung der Histone zur DNA und somit die Chromatinstruktur. Folglich können Transkriptionsfaktoren an die DNA binden und die Genexpression steigt. Die Histon-Acetylierung wird physiologischerweise durch das Verhältnis von Histon-Acetyltransferasen und Histon-Deacetylasen reguliert. Eine Hemmung der Histon-Deacetylasen durch Butyrate führt zu einer stärkeren Acetylierung am γ -Globingen und dadurch zu einer stärkeren Expression von HbF [103]. Der Grad der Acetylierung am γ -Globingen korreliert also mit der Expression von HbF. Parseval et al. konnten beweisen, dass die Therapie mit IMiDs (zu denen auch Lenalidomid zählt) zu einer erhöhten Acetylierung des Histons H3 auf den γ -Globingen-Promotoren führt und sehen darin eine Erklärung der vermehrten Synthese von HbF unter Therapie mit IMiDs [78].

Ein weiterer wichtiger Mechanismus ist die DNA-Methylierung. Die Methylierung der DNA am γ -Globingen führt zu einer Suppression des Gens. In einem Mausmodell zeigten Goren et al., dass eine DNA-Methylierung am γ -Globingen in einer 20-fach verminderten Expression des γ -Globingens resultiert [104]. Im Umkehrschluss führt eine geringere Methylierung zu einer vermehrten Expression des γ -Globingens. Diesen Mechanismus nutzt man in der Therapie von β -Hämoglobinopathien mit Azacitidin. Azacitidin hemmt die DNA-Methylierung und führt damit bei den Patienten zu einer erhöhten Expression von HbF, welches die β -Hämoglobinopathie kompensiert [105]. Ein Einfluss von IMiDs auf die Methylierung der DNA des γ -Globingens konnte bislang nicht nachgewiesen werden.

Aufgrund der in dieser Arbeit gewählten Methode der Messung von Gentranskripten mittels Oligonukleotid-Arrays können epigenetische Veränderungen am γ -Globingen nicht erfasst werden. Da epigenetische Alterationen, wie im vorangegangenen Abschnitt dargestellt, eine wichtige Rolle in der Regulation der fetalen Globinsynthese einnehmen, wäre hier ein Ansatzpunkt für weiterführende Untersuchungen. Zudem sollte ein Nachweis

der erhöhten HbF-Synthese unter Lenalidomidtherapie auf Proteinebene angestrebt werden. Hierzu würden sich beispielsweise Hb-Elektrophoresen bei Patienten vor und nach Lenalidomid-Konsolidierungstherapie eignen.

4.4 Sekundärmalignome

Wie in der Einleitung erwähnt konnte bereits in mehreren großen Studien eine erhöhte Inzidenz von hämatologischen Sekundärmalignomen unter der Therapie mit Lenalidomid beobachtet werden. Die erhöhte Inzidenz konnte sowohl nach Anwendung von Lenalidomid in der Induktionstherapie [50] als auch in der Erhaltungstherapie [45] nachgewiesen werden. In einer repräsentativen Studie mit 460 Patienten, in der eine Erhaltungstherapie mit Lenalidomid gegen einen Placebo getestet wurde, traten 7 Jahre nach Studienstart bei 3,5% der Patienten unter Lenalidomid hämatologische Malignome auf, in der Kontrollgruppe nur bei 0,4% der Patienten [45]. Die hämatologischen Malignome traten median nach 28 Monaten auf. In dieser Studie und in mehreren anderen ähnlichen Studien zeigte sich insbesondere eine erhöhte Inzidenz von AML und MDS nach Lenalidomidtherapie. Aus früheren Studien ist bekannt, dass das Risiko einer sekundären AML oder eines MDS bei Patienten mit einem Multiplen Myelom auch ohne Lenalidomidtherapie generell erhöht ist. Mailankody et al. wiesen in einer Populationsstudie mit 8.740 Myelompatienten ein 11,5-fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer AML oder eines MDS im Vergleich zur Normalbevölkerung nach [106]. Als ursächlich wird zum einen das in der Therapie verwendete Alkylans Melphalan gesehen, das zu einer DNA-Schädigung in den hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen führt und so AML/MDS auslöst. Da allerdings in der Studie von Mailankody et al. auch bei 5652 Patienten mit einer nicht therapierten MGUS ein 8-fach erhöhtes Risiko eines MDS oder einer AML im Vergleich zur Normalbevölkerung bestand, scheint die Ursache nicht alleinig ein Nebeneffekt der Therapie zu sein. Vielmehr scheint die Immunmodulation des Multiplen Myeloms/MGUS selbst zur Entstehung von AML und MDS beizutragen.

Eine Lenalidomid-Erhaltungstherapie führt im Vergleich zu Therapieregimen ohne Lenalidomid zu einer weiteren Erhöhung des Risikos einer AML oder eines MDS. Exemplarisch traten in einer Studie von McCarthy et al. bei 2,6%

der Patienten nach Lenalidomid-Therapie ein MDS oder eine AML auf, in der Placebo-Gruppe waren es 0% [46]. Auch hier sind die genauen Mechanismen der kanzerogenen Effekte des Lenalidomids noch nicht abschließend erforscht. Eine Hypothese sieht die Ursache in der Hemmung des Proteins Cereblon durch Lenalidomid. Cereblon bildet einen E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex, der zur Degradation von diversen Proteinen führt. Über die Degradation von Ikaros (IKZF 1) und Aiolos (IKZF3) wird die antitumorale Wirkung des Lenalidomid vermittelt (siehe Abschnitt 1.2.2). Ein weiteres durch den Cereblon-Ubiquitin-Ligase-Komplex degradiertes Protein ist das *DNA-damage-binding-protein 1* (DDB1) [58]. DDB1 ist in der Zelle für die Reparatur von DNA-Schäden verantwortlich, die z.B. durch die Therapie mit Alkylanzien (Melphalan) entstehen. Eine vermehrte Degradation durch den Cereblon E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex führt somit zu einer Reduktion der Reparatur von DNA-Schäden und könnte für das Entstehen von MDS/AML und auch anderen Sekundärmalignomen verantwortlich sein. Klinisch hat die therapieassoziierte AML/MDS eine hohe prognostische Relevanz, da häufig komplexe zytogenetische Veränderungen der myeloischen Zellen vorliegen und das Überleben der Patienten meist nur 6 bis 12 Monate beträgt [107][108]. Vor diesem Hintergrund führten wir in unserem Kollektiv zum einen Genexpressionsanalysen vor und nach Lenalidomid-Konsolidierungstherapie und zum anderen unterschiedliche Proliferationsassays mit extrahierten BM-HSPCs durch, um die Entstehung von therapieassoziierten AML/MDS zu untersuchen. Mittels des LTCIC-Assay konnten wir zeigen, dass das Langzeitproliferationspotenzial der hämatopoetischen Stammzellen unter Lenalidomidtherapie unverändert bleibt. Ähnliche Ergebnisse wurden durch Koh et al. gezeigt, wenngleich hier nicht Lenalidomid sondern Thalidomid und Pomalidomid verwendet wurden. Einschränkend ist hier anzuführen, dass Koh et al. die IMiDs in vitro in die Zellkulturen applizierten [86]. Das Kurzzeitproliferationspotenzial der BM-HSCs wurde in unserer Arbeit mittels eines 7-tägigen Proliferationsassays in einem Stammzellerhaltungsmedium untersucht. Mit einem Wachstumsfaktor von 5,98 war das Kurzzeitproliferationspotenzial der hämatopoetischen Stammzellen vor Lenalidomid-Therapie sogar größer als nach der Konsolidierungstherapie mit

5,18, jedoch nicht auf einem signifikanten Niveau ($p=0,687$). Verhelle et al. konnten eine signifikante Steigerung des Kurzzeitproliferationspotenzials von BM-HSCs unter Therapie mit Lenalidomid und Pomalidomid nachweisen [77]. Im Gegensatz zu unserer Arbeit wurden die IMiDs von Verhelle et al. in vitro zu CD34+ hämatopoetischen Stammzellen aus dem Nabelschnurblut gesunder Patienten gegeben. Es gibt Hinweise darauf, dass Lenalidomid nach systemischer Applikation nicht nur mit den Myelomzellen und den BM-HSPCs interagiert, sondern auch Effekte auf die übrigen Zellen der Knochenmarksnische wie MSCs, Osteoblasten oder Endothelzellen hat [109][110]. Diese Effekte können sich durch die Interaktion der Nische mit den hämatopoetischen Stammzellen wiederum auf deren Proliferationseigenschaften auswirken. Mit einer Applikation des Lenalidomids in die Zellkultur in vitro sind diese Effekte folglich nicht messbar, womit die von uns gewählte Methodik der Realität näher kommt.

Zusammenfassend ergeben sich in den funktionellen Untersuchungen der BM-HSCs keine Hinweise auf eine Alteration des Proliferationspotenzials. Weitere Hinweise auf die Entstehung von t-AML/MDS sollten die durchgeführten Oligonukleotid-Arrays geben. Da die Arrays eine Vielzahl von Genen untersuchen, wurden zunächst für die t-AML/MDS relevante Gene und Gengruppen recherchiert und dann mit unserem Kollektiv abgeglichen.

Einen guten Ansatz um Veränderungen in der Genexpression zu detektieren, die bei therapieassoziierten AML/MDS auftreten, liefern Li et al. [111]. Sie nahmen sequenzielle Knochenmarksaspirate von Lymphompatienten, die eine Hochdosismethotherapie mit autologer Stammzelltransplantation erhielten. Aus den Aspiraten wurden die CD34-positiven Stammzellen isoliert und Genexpressionsanalysen durchgeführt. Das Genexpressionsprofil von Patienten, die im Verlauf nach der Transplantation eine t-AML/MDS entwickelten wurde dann mit den Proben von Patienten vor und nach Transplantation verglichen, die keine t-AML/MDS entwickelt hatten. Aus den Erkenntnissen wurde ein 38 Gene umfassender „Fingerabdruck“ generiert, der Patienten mit einem Risiko für eine t-AML/MDS bereits vor der Transplantation identifizieren kann. Der „Fingerabdruck“ wurden abschließend an einer prospektiven Kohorte von Patienten validiert. In unserem Patientenkollektiv

zeigte keines der 38 Gene des „Fingerabdrucks“ eine signifikante Veränderung nach der Konsolidierungstherapie mit Lenalidomid über 6 Monate. Genexpressionsdaten vor Hochdosistherapie lagen bei unserem Patientenkollektiv nicht vor, sodass hier ein Vergleich wie im *setting* von Li et al. nicht möglich war.

Einen weiteren Ansatz bieten Qian et al., die das Genexpressionsprofil von Patienten mit t-AML mit dem von einer gesunden Kontrollgruppe verglichen [112]. Sie fanden heraus, dass für die frühe Phase der Hämatopoese relevante Gene wie TAL1, GATA1 und EKLF bei Patienten mit einer t-AML vermindert exprimiert werden, wohingegen insbesondere Gene zur Signaltransduktion in myeloischen Zellen vermehrt exprimiert wurden (z.B. FLT3). In unserem Kollektiv zeigten sich keine signifikanten Veränderungen in der Expression der oben genannten Gene, die übereinstimmend zu Qian et al. waren. TAL1 und GATA1 wurden in unserem Kollektiv sogar nach der Lenalidomidtherapie vermehrt exprimiert.

Insgesamt waren in unserem Kollektiv nach Lenalidomidtherapie unter Berücksichtigung eines Veränderungsfaktors von ≥ 2 und $\leq 0,5$ nur 5 Protoonkogene (FHL2, IRF4, TEK, NET1 und RAB38) vermehrt exprimiert und das bei insgesamt 14.500 durch den Chip detektierten Genen. Hinsichtlich der Entstehung von t-AML und t-MDS sind von diesen Genen nur FHL2 und TEK interessant. In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von FHL2 zu einer abnormen Myelopoese führt und bei Patienten mit einer t-AML in den CD34-positiven Stammzellen nachgewiesen werden kann [83][84]. Eine erhöhte Expression der Tyrosinkinase TEK konnte ebenfalls in hämatopoetischen Stammzellen von Patienten mit akuter und chronischer myeloischer Leukämie nachgewiesen werden. Es wird jedoch vermutet, dass der TEK/Tie-2 Signalweg eine physiologische Funktion in der Regulation der Hämatopoese besitzt, sodass in unserem Kollektiv nicht zwingend von einer pathologischen Veränderung auszugehen ist, die auf die Entstehung einer therapieassoziierten AML hinweist [113].

IRF4 ist ein wichtiger B-Zell-Transkriptionsfaktor und eine Überexpression dieses Faktors findet sich in NHL, beim Morbus Hodgkin und dem Multiplen Myelom [114]. Eine erhöhte Expression von NET1 und RAB38 findet sich in

soliden Tumoren, NET1 in multiplen Tumoren, RAB38 vor allem in Malignen Melanomen und in Gliomen [115]. Insgesamt wurden 4 Tumorsuppressorgene (AIM2, BIRC3, CASP1 und TNFSF10) nach Lenalidomid-Konsolidierung vermindert exprimiert. In Zusammenhang mit myeloischen Leukämien steht von den genannten 4 Genen nur TNFSF10. Das Gen kodiert das Protein TRAIL, welches über eine Bindung an Todesrezeptoren die Apoptose in den Zielzellen initiiert. Ein herunterregulierter TRAIL-Signalweg findet sich in akuten myeloischen Leukämien und ist mit einer schlechten Prognose vergesellschaftet [116][117]. BIRC3 spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der CLL [118], die anderen genannten Tumorsuppressorgene überwiegend bei soliden Tumoren (AIM2 z.B. bei kolorektalen Karzinomen [119]).

Den 9 oben genannten Genen (5 Protoonkogene und 4 Tumorsuppressorgene), die eine Tumorentstehung begünstigen, stehen mehrere Tumorsuppressorgene gegenüber, die in unserem Kollektiv nach Lenalidomid-Konsolidierungstherapie vermehrt exprimiert waren und so eine protektive Wirkung bezüglich einer Tumorentstehung suggerieren. Eine gesteigerte Expression zeigten die Tumorsuppressorgene CDH1, CDKN2C und CEBPB, zudem war das Protoonkogen EPS8 vermindert exprimiert. Für CEBPB konnte eine antiproliferative Wirkung sowohl bei Tumorzellen einer CML [120] als auch bei AML [121] nachgewiesen werden. CDH1 ist ein Aktivator des *Anaphase Promoting Complex* [82], welches beispielsweise durch eine Therapie mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib vermehrt exprimiert wird und dadurch das Wachstum der Tumorzellen bei einer CML hemmt [122].

Zusammenfassend ergeben sich in den durchgeführten Genexpressionsanalysen keine Hinweise auf ein erhöhtes Risiko der Entstehung von Sekundärmalignomen. Einschränkend ist zu sagen, dass das Kollektiv für die Oligonukleotid-Arrays bedingt durch die hohen Kosten für die verwendeten Chips mit nur 5 Patienten relativ klein war. Außerdem können bedingt durch die gewählte Methodik viele Veränderungen, die eine Tumorentstehung begünstigen nicht erfasst werden, wie etwa Punktmutationen, Translokationen oder epigenetische Veränderungen.

Die funktionellen Untersuchungen der Proliferationskapazität hingegen wurden

an einem größeren Kollektiv durchgeführt, hier zeigten sich keine Hinweise, die im Sinne einer Tumorentstehung zu deuten sind. Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass die Effekte der Lenalidomidtherapie nur über einen kurzen Therapiezeitraum von 6 Monaten gemessen wurden, hier sind sicherlich weitere Untersuchungen nach einer längeren Therapie nötig.

5 Schlussfolgerungen

Die Ergänzung von Standardhochdosistherapie und autologer Stammzelltransplantation bei Patienten mit Multiplem Myelom durch Lenalidomid in Form einer Konsolidierungs- oder Erhaltungstherapie hat in mehreren repräsentativen Studien deutliche Vorteile hinsichtlich progressionsfreiem Intervall und Gesamtüberlebenszeit gezeigt. Diesen positiven Effekten des Lenalidomids stehen jedoch auch Nebenwirkungen gegenüber. Der Einfluss einer Lenalidomid-Konsolidierungstherapie auf die hämatopoetischen Stammzellen wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Passend zur Neutropenie und Thrombopenie im peripheren Blut der Patienten konnte mittels Durchflusszytometrie eine Abnahme der absoluten Anzahl und des relativen Anteils der CD-34 positiven hämatopoetischen Stammzellen in Knochenmarksaspiraten während einer Lenalidomidtherapie nachgewiesen werden. Das Langzeit- und Kurzzeitproliferationspotenzial der hämatopoetischen Stammzellen zeigte in mehreren durchgeführten funktionellen Tests jedoch keine Einschränkung.

Im Gegensatz zur Reduktion der hämatopoetischen Stammzellen konnte eine Steigerung der Erythropoese durch Lenalidomidtherapie nachgewiesen werden. Die Therapie führte sowohl zu einer vermehrten Expression von proerythropoetischen Genen auf molekularer Ebene als auch zu einer Zunahme erythropoetischer Vorläufer auf funktioneller Ebene. Als mögliche Ursache der gesteigerten Erythropoese identifizierten wir eine Hemmung des TGF β -Signalwegs während der Lenalidomidtherapie, die auf molekularer Ebene und auf Proteinebene nachgewiesen wurde. Die in der pathologischen Knochenmarknische des Multiplen Myeloms gesteigerte TGF β -Aktivität führt erwiesenermaßen zu einer Hemmung der Erythropoese, sodass die beobachtete Hemmung des Signalwegs diesen Effekt antagonisieren kann. Diese Erkenntnis hat translationale Bedeutung, da der TGF β -Signalweg in vielen anderen Tumorerkrankungen pathologisch gesteigert ist und somit eine Blockade des TGF β -Signals auch dort zur Therapie einer Anämie eingesetzt werden kann. Ein Beispiel hierfür ist der Einsatz des SMAD2/3-Inhibitors

Luspatercept in der Therapie des MDS [123].

Neben einer Steigerung der Erythropoese fanden wir zudem eine vermehrte Expression des γ -Globingens als Zeichen einer Induktion fetalen Hämoglobins unter Lenalidomidtherapie. Diese Beobachtung ist übereinstimmend mit mehreren vorangegangenen Arbeiten mit in vitro Applikation von Lenalidomid und eröffnet neue Therapieoptionen, beispielsweise in der Therapie von β -Hämoglobinopathien.

Beweise für eine mutagene Wirkung der Lenalidomidtherapie fanden wir in den durchgeführten funktionellen und molekularen Untersuchungen nicht.

Zusammenfassend besitzt Lenalidomid zwar myelosuppressive Nebenwirkungen, jedoch mit Aussparung der Erythropoese. Dieser Effekt wird durch eine Induktion von HbF und vor allem durch eine Hemmung des TGF β -Signals vermittelt. Beide Erkenntnisse eröffnen neue Wege einer zielgerichteten Anämietherapie bei Tumorpatienten.

- [1] N. Becker, "Epidemiology of multiple myeloma.," *Recent Results Cancer Res.*, vol. 183, pp. 25–35, Jan. 2011.
- [2] M. Colombo, K. Thümmeler, L. Mirandola, S. Garavelli, K. Todoerti, L. Apicella, E. Lazzari, M. Lancellotti, N. Platonova, M. Akbar, M. Chiriva-Internati, R. Soutar, A. Neri, C. S. Goodyear, and R. Chiaramonte, "Notch signaling drives multiple myeloma induced osteoclastogenesis.," *Oncotarget*, vol. 5, no. 21, pp. 10393–406, Nov. 2014.
- [3] I. Bruns, R.-P. Cadeddu, I. Brueckmann, J. Frobel, S. Geyh, S. Bust, J. C. Fischer, F. Roels, C. M. Wilk, F. A. Schildberg, A.-N. Hunerliturkoglu, C. Zilkens, M. Jager, U. Steidl, F. Zohren, R. Fenk, G. Kobbe, B. Brors, A. Czibere, T. Schroeder, A. Trumpp, and R. Haas, "Multiple myeloma-related deregulation of bone marrow-derived CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells," *Blood*, vol. 120, no. 13, pp. 2620–2630, Apr. 2012.
- [4] M. Varettoni, a Corso, G. Pica, S. Mangiacavalli, C. Pascutto, and M. Lazzarino, "Incidence, presenting features and outcome of extramedullary disease in multiple myeloma: a longitudinal study on 1003 consecutive patients.," *Ann. Oncol.*, vol. 21, no. 2, pp. 325–30, Feb. 2010.
- [5] P. Wu, F. E. Davies, K. Boyd, K. Thomas, S. Dines, R. M. Saso, M. N. Potter, M. E. Ethell, B. E. Shaw, and G. J. Morgan, "The impact of extramedullary disease at presentation on the outcome of myeloma.," *Leuk. Lymphoma*, vol. 50, no. 2, pp. 230–5, Feb. 2009.
- [6] K. Oshima, Y. Kanda, Y. Nannya, M. Kaneko, T. Hamaki, M. Suguro, R. Yamamoto, A. Chizuka, T. Matsuyama, N. Takezako, A. Miwa, A. Togawa, H. Niino, M. Nasu, K. Saito, and T. Morita, "Clinical and pathologic findings in 52 consecutively autopsied cases with multiple myeloma.," *Am. J. Hematol.*, vol. 67, no. 1, pp. 1–5, May 2001.
- [7] S. Marjanović, Z. Mijusković, D. Stamatović, L. Madjaru, T. Ralić, J. Trimcevic, J. Stojanović, and V. Radović, "Multiple myeloma invasion of the central nervous system.," *Vojnosanit. Pregl.*, vol. 69, no. 2, pp. 209–13, Feb. 2012.
- [8] W.-Z. Ying, C. E. Allen, L. M. Curtis, K. J. Aaron, and P. W. Sanders, "Mechanism and prevention of acute kidney injury from cast nephropathy in a rodent model.," *J. Clin. Invest.*, vol. 122, no. 5, pp. 1777–85, May 2012.
- [9] W.-Z. Ying, P.-X. Wang, K. J. Aaron, K. Basnayake, and P. W. Sanders, "Immunoglobulin light chains activate nuclear factor- κ B in renal epithelial cells through a Src-dependent mechanism.," *Blood*, vol. 117, no. 4, pp. 1301–7, Jan. 2011.
- [10] M. Li, S. Balamuthusamy, E. E. Simon, and V. Batuman, "Silencing megalin and cubilin genes inhibits myeloma light chain endocytosis and ameliorates toxicity in human renal proximal tubule epithelial cells.," *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, vol. 295, no. 1, pp. F82–90, Jul. 2008.

- [11] M. Valtieri and A. Sorrentino, "The mesenchymal stromal cell contribution to homeostasis.," *J. Cell. Physiol.*, vol. 217, no. 2, pp. 296–300, Nov. 2008.
- [12] L. Ding, T. L. Saunders, G. Enikolopov, and S. J. Morrison, "Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells.," *Nature*, vol. 481, no. 7382, pp. 457–62, Jan. 2012.
- [13] M. Ogawa, Y. Matsuzaki, S. Nishikawa, S. Hayashi, T. Kunisada, T. Sudo, T. Kina, and H. Nakauchi, "Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells.," *J. Exp. Med.*, vol. 174, no. 1, pp. 63–71, Jul. 1991.
- [14] H. T. Hassan and A. Zander, "Stem cell factor as a survival and growth factor in human normal and malignant hematopoiesis.," *Acta Haematol.*, vol. 95, no. 3–4, pp. 257–62, Jan. 1996.
- [15] C. Hart, D. Drewel, G. Mueller, J. Grassinger, M. Zaiss, L. A. Kunz-Schughart, R. Andreesen, A. Reichle, E. Holler, and B. Hennemann, "Expression and function of homing-essential molecules and enhanced in vivo homing ability of human peripheral blood-derived hematopoietic progenitor cells after stimulation with stem cell factor.," *Stem Cells*, vol. 22, no. 4, pp. 580–9, Jan. 2004.
- [16] A. Peled, I. Petit, O. Kollet, M. Magid, T. Ponomaryov, T. Byk, A. Nagler, H. Ben-Hur, A. Many, L. Shultz, O. Lider, R. Alon, D. Zipori, and T. Lapidot, "Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4.," *Science*, vol. 283, no. 5403, pp. 845–8, Feb. 1999.
- [17] Y.-S. Tzeng, H. Li, Y.-L. Kang, W.-C. Chen, W.-C. Cheng, and D.-M. Lai, "Loss of Cxcl12/Sdf-1 in adult mice decreases the quiescent state of hematopoietic stem/progenitor cells and alters the pattern of hematopoietic regeneration after myelosuppression.," *Blood*, vol. 117, no. 2, pp. 429–39, Jan. 2011.
- [18] Y. Nie, Y.-C. Han, and Y.-R. Zou, "CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells.," *J. Exp. Med.*, vol. 205, no. 4, pp. 777–83, Apr. 2008.
- [19] H. Kobayashi, J. M. Butler, R. O'Donnell, M. Kobayashi, B.-S. Ding, B. Bonner, V. K. Chiu, D. J. Nolan, K. Shido, L. Benjamin, and S. Rafii, "Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 12, no. 11, pp. 1046–56, Nov. 2010.
- [20] H. A. Himburg, J. R. Harris, T. Ito, P. Daher, J. L. Russell, M. Quarmyne, P. L. Doan, K. Helms, M. Nakamura, E. Fixsen, G. Herradon, T. Reya, N. J. Chao, S. Harroch, and J. P. Chute, "Pleiotrophin regulates the retention and self-renewal of hematopoietic stem cells in the bone marrow vascular niche.," *Cell Rep.*, vol. 2, no. 4, pp. 964–75, Oct. 2012.

- [21] Y. Katayama, M. Battista, W.-M. Kao, A. Hidalgo, A. J. Peired, S. A. Thomas, and P. S. Frenette, "Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow.," *Cell*, vol. 124, no. 2, pp. 407–21, Jan. 2006.
- [22] S. Yamazaki, H. Ema, G. Karlsson, T. Yamaguchi, H. Miyoshi, S. Shioda, M. M. Taketo, S. Karlsson, A. Iwama, and H. Nakauchi, "Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche.," *Cell*, vol. 147, no. 5, pp. 1146–58, Nov. 2011.
- [23] J. W. Lee, H. Y. Chung, L. A. Ehrlich, D. F. Jelinek, N. S. Callander, G. D. Roodman, and S. J. Choi, "IL-3 expression by myeloma cells increases both osteoclast formation and growth of myeloma cells.," *Blood*, vol. 103, no. 6, pp. 2308–15, Mar. 2004.
- [24] B. A. Scheven, J. S. Milne, I. Hunter, and S. P. Robins, "Macrophage-inflammatory protein-1alpha regulates preosteoclast differentiation in vitro.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 254, no. 3, pp. 773–8, Jan. 1999.
- [25] J. Lam, S. Takeshita, J. E. Barker, O. Kanagawa, F. P. Ross, and S. L. Teitelbaum, "TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand.," *J. Clin. Invest.*, vol. 106, no. 12, pp. 1481–8, Dec. 2000.
- [26] S. Lentzsch, M. Gries, M. Janz, R. Bargou, B. Dörken, and M. Y. Mapara, "Macrophage inflammatory protein 1-alpha (MIP-1 alpha) triggers migration and signaling cascades mediating survival and proliferation in multiple myeloma (MM) cells.," *Blood*, vol. 101, no. 9, pp. 3568–73, May 2003.
- [27] C. Lee, J.-I. Oh, J. Park, J.-H. Choi, E.-K. Bae, H. J. Lee, W. J. Jung, D. S. Lee, K.-S. Ahn, and S.-S. Yoon, "TNF α mediated IL-6 secretion is regulated by JAK/STAT pathway but not by MEK phosphorylation and AKT phosphorylation in U266 multiple myeloma cells.," *Biomed Res. Int.*, vol. 2013, p. 580135, Jan. 2013.
- [28] T. Hideshima, D. Chauhan, R. Schlossman, P. Richardson, and K. C. Anderson, "The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications.," *Oncogene*, vol. 20, no. 33, pp. 4519–27, Jul. 2001.
- [29] K. C. Anderson, R. M. Jones, C. Morimoto, P. Leavitt, and B. A. Barut, "Response patterns of purified myeloma cells to hematopoietic growth factors.," *Blood*, vol. 73, no. 7, pp. 1915–24, May 1989.
- [30] S. Kaneshiro, K. Ebina, K. Shi, C. Higuchi, M. Hirao, M. Okamoto, K. Koizumi, T. Morimoto, H. Yoshikawa, and J. Hashimoto, "IL-6 negatively regulates osteoblast differentiation through the SHP2/MEK2 and SHP2/Akt2 pathways in vitro.," *J. Bone Miner. Metab.*, vol. 32, no. 4, pp. 378–92, Jul. 2014.
- [31] H. Uchiyama and D. Chauhan, "Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion," pp. 3712–3720, 2014.

- [32] B. J. Schmiedel, C. A. Scheible, T. Nuebling, H.-G. Kopp, S. Wirths, M. Azuma, P. Schneider, G. Jung, L. Grosse-Hovest, and H. R. Salih, "RANKL expression, function, and therapeutic targeting in multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia.," *Cancer Res.*, vol. 73, no. 2, pp. 683–94, Jan. 2013.
- [33] J. A. Kim, H. J. Ihn, J.-Y. Park, J. Lim, J. M. Hong, S. H. Kim, S.-Y. Kim, H.-I. Shin, and E. K. Park, "Inhibitory effects of triptolide on titanium particle-induced osteolysis and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand-mediated osteoclast differentiation.," *Int. Orthop.*, Nov. 2014.
- [34] N. L. Ge and S. Rudikoff, "Insulin-like growth factor I is a dual effector of multiple myeloma cell growth.," *Blood*, vol. 96, no. 8, pp. 2856–61, Oct. 2000.
- [35] I. Bruns, R. Cadeddu, I. Brueckmann, J. Fröbel, S. Geyh, S. Büst, J. C. Fischer, F. Roels, C. M. Wilk, F. A. Schildberg, C. Zilkens, M. Jäger, U. Steidl, F. Zohren, R. Fenk, B. Brors, A. Czibere, T. Schroeder, A. Trumpp, R. Haas, W. Dc, J. Fro, S. Bu, A. Hu, M. Ja, and G. Kobbe, "hematopoietic stem and progenitor cells Multiple myeloma – related deregulation of bone marrow – derived CD34 \geq hematopoietic stem and progenitor cells," pp. 2620–2630, 2013.
- [36] B. M. Weiss, J. Abadie, P. Verma, R. S. Howard, and W. M. Kuehl, "A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients.," *Blood*, vol. 113, no. 22, pp. 5418–22, May 2009.
- [37] B. G. M. Durie and S. E. Salmon, "A clinical staging system for multiple myeloma correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival," *Cancer*, vol. 36, no. 3, pp. 842–854, Sep. 1975.
- [38] P. R. Greipp, J. San Miguel, B. G. M. Durie, J. J. Crowley, B. Barlogie, J. Bladé, M. Boccadoro, J. A. Child, H. Avet-Loiseau, J.-L. Harousseau, 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.*, vol. 23, no. 15, pp. 3412–20, May 2005.
- [39] J. P. LOGE and R. W. RUNDLES, "Urethane (ethyl carbamate) therapy in multiple myeloma.," *Blood*, vol. 4, no. 3, pp. 201–16, Mar. 1949.
- [40] S. L. RIVERS, R. M. WHITTINGTON, and M. E. PATNO, "Comparison of effect of cyclophosphamide and a placebo in treatment of multiple myeloma.," *Cancer Chemother. Rep.*, vol. 29, pp. 115–9, May 1963.
- [41] F. Holland, "Melphalan in Multiple Myeloma," vol. 30, no. 1, 1967.
- [42] M. Attal, J. E. A. N. U. C. H. Arousseau, A. N. N. E. A. S. Toppa, and J. E. A. N. A. S. Otto, "A PROSPECTIVE , RANDOMIZED TRIAL OF AUTOLOGOUS BONE MARROW TRANSPLANTATION AND CHEMOTHERAPY IN MULTIPLE MYELOMA," pp. 91–97, 1996.
- [43] R. G. Owen, S. E. Bell, D. Phil, K. Hawkins, M. Sc, J. Brown, M. T. Drayson, D. Ph, and P. J. Selby, "High-Dose Chemotherapy with Hematopoietic Stem-Cell Rescue for Multiple Myeloma," pp. 1875–1883, 2003.

- [44] M. Engelhardt, E. Terpos, M. Kleber, F. Gay, R. Wäsch, G. Morgan, M. Cavo, N. van de Donk, A. Beilhack, B. Bruno, H. E. Johnsen, R. Hajek, C. Driessen, H. Ludwig, M. Beksac, M. Boccadoro, C. Straka, S. Brighen, M. Gramatzki, A. Larocca, H. Lokhorst, V. Magarotto, F. Morabito, M. A. Dimopoulos, H. Einsele, P. Sonneveld, and A. Palumbo, "European Myeloma Network recommendations on the evaluation and treatment of newly diagnosed patients with multiple myeloma.," *Haematologica*, vol. 99, no. 2, pp. 232–42, Feb. 2014.
- [45] M. Attal, V. Lauwers-cances, G. Marit, D. Caillot, P. Moreau, T. Facon, A. M. Stoppa, C. Hulin, L. Benboubker, L. Garderet, O. Decaux, S. Leyvraz, M. Vekemans, L. Voillat, M. Michallet, B. Pegourie, C. Dumontet, M. Roussel, X. Leleu, C. Mathiot, C. Payen, and H. Avet-loiseau, "Lenalidomide Maintenance after Stem-Cell Transplantation for Multiple Myeloma," 2012.
- [46] P. L. McCarthy, K. Owzar, C. C. Hofmeister, D. D. Hurd, H. Hassoun, P. G. Richardson, S. Giralt, E. A. Stadtmauer, D. J. Weisdorf, R. Vij, J. S. Moreb, N. S. Callander, K. Van Besien, T. Gentile, L. Isola, R. T. Maziarz, D. A. Gabriel, A. Bashey, H. Landau, T. Martin, M. H. Qazilbash, D. Levitan, B. McClune, R. Schlossman, V. Hars, J. Postiglione, C. Jiang, E. Bennett, S. Barry, L. Bressler, M. Kelly, M. Seiler, C. Rosenbaum, P. Hari, M. C. Pasquini, M. M. Horowitz, T. C. Shea, S. M. Devine, K. C. Anderson, and C. Linker, "Lenalidomide after stem-cell transplantation for multiple myeloma.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 366, no. 19, pp. 1770–81, May 2012.
- [47] M. Cavo, L. Pantani, M. T. Petrucci, F. Patriarca, E. Zamagni, D. Donnarumma, C. Crippa, M. Boccadoro, G. Perrone, A. Falcone, C. Nozzoli, R. Zambello, L. Masini, A. Furlan, A. Brioli, D. Derudas, S. Ballanti, M. L. Dessanti, V. De Stefano, A. M. Carella, M. Marcatti, A. Nozza, F. Ferrara, V. Callea, C. Califano, A. Pezzi, A. Baraldi, M. Grasso, P. Musto, and A. Palumbo, "Bortezomib-thalidomide-dexamethasone is superior to thalidomide-dexamethasone as consolidation therapy after autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma.," *Blood*, vol. 120, no. 1, pp. 9–19, Jul. 2012.
- [48] P. Sonneveld, I. G. H. Schmidt-Wolf, B. van der Holt, L. El Jarari, U. Bertsch, H. Salwender, S. Zweegman, E. Vellenga, A. Broyl, I. W. Blau, K. C. Weisel, S. Wittebol, G. M. J. Bos, M. Stevens-Kroef, C. Scheid, M. Pfreundschuh, D. Hose, A. Jauch, H. van der Velde, R. Raymakers, M. R. Schaafsma, M.-J. Kersten, M. van Marwijk-Kooy, U. Duehrsen, W. Lindemann, P. W. Wijermans, H. M. Lokhorst, and H. M. Goldschmidt, "Bortezomib induction and maintenance treatment in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of the randomized phase III HOVON-65/ GMMG-HD4 trial.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 30, no. 24, pp. 2946–55, Aug. 2012.

- [49] J. F. San Miguel, 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, M. Delforge, B. Jiang, M.-V. Mateos, K. C. Anderson, D.-L. Esseltine, K. Liu, W. Deraedt, A. Cakana, H. van de Velde, and P. G. Richardson, "Persistent overall survival benefit and no increased risk of second malignancies with bortezomib-melphalan-prednisone versus melphalan-prednisone in patients with previously untreated multiple myeloma.," *J. Clin. Oncol.*, vol. 31, no. 4, pp. 448–55, Feb. 2013.
- [50] A. Palumbo, R. Hajek, M. Delforge, M. Kropff, M. T. Petrucci, J. Catalano, H. Gisslinger, W. Wiktor-Jędrzejczak, M. Zodelava, K. Weisel, N. Cascavilla, G. Iosava, M. Cavo, J. Kloczko, J. Bladé, M. Beksac, I. Spicka, T. Plesner, J. Radke, C. Langer, D. Ben Yehuda, A. Corso, L. Herbein, Z. Yu, J. Mei, C. Jacques, and M. A. Dimopoulos, "Continuous lenalidomide treatment for newly diagnosed multiple myeloma.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 366, no. 19, pp. 1759–69, May 2012.
- [51] K. M. Sanfilippo, B. Gage, S. Luo, K. Weilbaecher, M. Tomasson, R. Vij, G. Colditz, and K. Carson, "Comparative effectiveness on survival of zoledronic acid versus pamidronate in multiple myeloma.," *Leuk. Lymphoma*, pp. 1–7, Jul. 2014.
- [52] M. Attal, V. Lauwers-Cances, G. Marit, D. Caillot, P. Moreau, T. Facon, A. M. Stoppa, C. Hulin, L. Benboubker, L. Garderet, O. Decaux, S. Leyvraz, M.-C. Vekemans, L. Voillat, M. Michallet, B. Pegourie, C. Dumontet, M. Rousset, X. Leleu, C. Mathiot, C. Payen, H. Avet-Loiseau, and J.-L. Harousseau, "Lenalidomide maintenance after stem-cell transplantation for multiple myeloma.," *N. Engl. J. Med.*, vol. 366, no. 19, pp. 1782–91, May 2012.
- [53] L. Escoubet-Lozach, I.-L. Lin, K. Jensen-Pergakes, H. a Brady, A. K. Gandhi, P. H. Schafer, G. W. Muller, P. J. Worland, K. W. H. Chan, and D. Verhelle, "Pomalidomide and lenalidomide induce p21 WAF-1 expression in both lymphoma and multiple myeloma through a LSD1-mediated epigenetic mechanism.," *Cancer Res.*, vol. 69, no. 18, pp. 7347–56, Sep. 2009.
- [54] D. Verhelle, L. G. Corral, K. Wong, J. H. Mueller, L. Moutouh-de Parseval, K. Jensen-Pergakes, P. H. Schafer, R. Chen, E. Glezer, G. D. Ferguson, A. Lopez-Girona, G. W. Muller, H. a Brady, and K. W. H. Chan, "Lenalidomide and CC-4047 inhibit the proliferation of malignant B cells while expanding normal CD34+ progenitor cells.," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 2, pp. 746–55, Jan. 2007.
- [55] G. Lu, R. E. Middleton, H. Sun, M. Naniong, C. J. Ott, C. S. Mitsiades, K.-K. Wong, J. E. Bradner, and W. G. Kaelin, "The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of Ikaros proteins.," *Science*, vol. 343, no. 6168, pp. 305–9, Jan. 2014.
- [56] J. Krönke, N. D. Udeshi, A. Narla, P. Grauman, S. N. Hurst, M. McConkey, T. Svinkina, D. Heckl, E. Comer, X. Li, C. Ciarlo, E. Hartman, N. Munshi, M. Schenone, S. L. Schreiber, S. a Carr, and B. L. Ebert, "Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells.," *Science*, vol. 343, no. 6168, pp. 301–5, Jan. 2014.

- [57] López-Girona, D. Mendy, T. Ito, K. Miller, a K. Gandhi, J. Kang, S. Karasawa, G. Carmel, P. Jackson, M. Abbasian, a Mahmoudi, B. Cathers, E. Rychak, S. Gaidarova, R. Chen, P. H. Schafer, H. Handa, T. O. Daniel, J. F. Evans, and R. Chopra, "Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide.," *Leukemia*, vol. 26, no. 11, pp. 2326–35, Nov. 2012.
- [58] T. Ito, H. Ando, T. Suzuki, T. Ogura, K. Hotta, Y. Imamura, Y. Yamaguchi, and H. Handa, "Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity.," *Science*, vol. 327, no. 5971, pp. 1345–50, Mar. 2010.
- [59] S. Colla, P. Storti, G. Donofrio, K. Todoerti, M. Bolzoni, M. Lazzaretti, M. Abeltino, L. Ippolito, A. Neri, D. Ribatti, V. Rizzoli, E. Martella, and N. Giuliani, "Low bone marrow oxygen tension and hypoxia-inducible factor-1 α overexpression characterize patients with multiple myeloma: role on the transcriptional and proangiogenic profiles of CD138(+) cells.," *Leukemia*, vol. 24, no. 11, pp. 1967–70, Nov. 2010.
- [60] P. Storti, M. Bolzoni, G. Donofrio, I. Airoidi, D. Guasco, D. Toscani, E. Martella, M. Lazzaretti, C. Mancini, L. Agnelli, K. Patrene, S. Maïga, V. Franceschi, S. Colla, J. Anderson, a Neri, M. Amiot, F. Aversa, G. David Roodman, and N. Giuliani, "Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α suppression in myeloma cells blocks tumoral growth in vivo inhibiting angiogenesis and bone destruction.," *Leukemia*, vol. 27, no. 8, pp. 1697–706, Aug. 2013.
- [61] S. Maïga, P. Gomez-Bougie, S. Bonnaud, C. Gratas, P. Moreau, S. Le Gouill, C. Pellat-Deceunynck, and M. Amiot, "Paradoxical effect of lenalidomide on cytokine/growth factor profiles in multiple myeloma.," *Br. J. Cancer*, vol. 108, no. 9, pp. 1801–6, May 2013.
- [62] C. Chaulet, C. Croix, D. Alagille, S. Normand, A. Delwail, L. Favot, J.-C. Lecron, and M.-C. Viaud-Massuard, "Design, synthesis and biological evaluation of new thalidomide analogues as TNF- α and IL-6 production inhibitors.," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 21, no. 3, pp. 1019–22, Feb. 2011.
- [63] I. Breitkreutz, M. S. Raab, S. Vallet, T. Hideshima, N. Raje, C. Mitsiades, D. Chauhan, Y. Okawa, N. C. Munshi, P. G. Richardson, and K. C. Anderson, "Lenalidomide inhibits osteoclastogenesis, survival factors and bone-remodeling markers in multiple myeloma.," *Leukemia*, vol. 22, no. 10, pp. 1925–32, Oct. 2008.
- [64] D. Zhu, L. G. Corral, Y. W. Fleming, and B. Stein, "Immunomodulatory drugs Revlimid (lenalidomide) and CC-4047 induce apoptosis of both hematological and solid tumor cells through NK cell activation.," *Cancer Immunol. Immunother.*, vol. 57, no. 12, pp. 1849–59, Dec. 2008.
- [65] C. Galustian, 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.*, vol. 58, no. 7, pp. 1033–45, Jul. 2009.

- [66] W. M. T. Braga, D. Atanackovic, and G. W. B. Colleoni, "The role of regulatory T cells and TH17 cells in multiple myeloma.," *Clin. Dev. Immunol.*, vol. 2012, p. 293479, Jan. 2012.
- [67] D. M. Weber, C. Chen, R. Niesvizky, M. Wang, A. Belch, E. A. Stadtmauer, D. Siegel, I. Borrello, S. V. Rajkumar, A. A. Chanan-khan, S. Lonial, Z. Yu, D. Ph, J. Patin, M. Olesnyckyj, and J. B. Zeldis, "Lenalidomide plus Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma in North America," pp. 2133–2142, 2007.
- [68] M. Dimopoulos, A. Spencer, M. Attal, H. M. Prince, J. Harousseau, A. Dmoszynska, J. S. Miguel, A. Hellmann, T. Facon, R. Foà, A. Corso, Z. Masliak, M. Olesnyckyj, Z. Yu, D. Ph, J. Patin, J. B. Zeldis, and R. D. Knight, "Lenalidomide plus Dexamethasone for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma," pp. 2123–2132, 2009.
- [69] M. a Dimopoulos, C. Chen, a Spencer, R. Niesvizky, M. Attal, E. a Stadtmauer, M. T. Petrucci, Z. Yu, M. Olesnyckyj, J. B. Zeldis, R. D. Knight, and D. M. Weber, "Long-term follow-up on overall survival from the MM-009 and MM-010 phase III trials of lenalidomide plus dexamethasone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma.," *Leukemia*, vol. 23, no. 11, pp. 2147–52, Nov. 2009.
- [70] J. a Zonder, J. Crowley, M. a Hussein, V. Bolejack, D. F. Moore, B. F. Whittenberger, M. H. Abidi, B. G. M. Durie, and B. Barlogie, "Lenalidomide and high-dose dexamethasone compared with dexamethasone as initial therapy for multiple myeloma: a randomized Southwest Oncology Group trial (S0232).," *Blood*, vol. 116, no. 26, pp. 5838–41, Dec. 2010.
- [71] M. L. Khan, C. B. Reeder, S. K. Kumar, M. Q. Lacy, D. E. Reece, A. Dispenzieri, M. a Gertz, P. Greipp, S. Hayman, S. Zeldenhurst, D. Dingli, J. Lust, S. Russell, K. M. Laumann, J. R. Mikhael, P. Leif Bergsagel, R. Fonseca, S. Vincent Rajkumar, and a Keith Stewart, "A comparison of lenalidomide/dexamethasone versus cyclophosphamide/lenalidomide/dexamethasone versus cyclophosphamide/bortezomib/dexamethasone in newly diagnosed multiple myeloma.," *Br. J. Haematol.*, vol. 156, no. 3, pp. 326–33, Feb. 2012.
- [72] R. Pal, S. a Monaghan, A. C. Hassett, M. Y. Mapara, P. Schafer, G. D. Roodman, M. V Ragni, L. Moscinski, A. List, and S. Lentzsch, "Immunomodulatory derivatives induce PU.1 down-regulation, myeloid maturation arrest, and neutropenia.," *Blood*, vol. 115, no. 3, pp. 605–14, Jan. 2010.
- [73] T. Bagratuni, E. Kastritis, M. Politou, M. Roussou, E. Kostouros, M. Gavriatopoulou, E. Eleutherakis-Papaiakovou, N. Kanelias, E. Terpos, and M. A. Dimopoulos, "Clinical and genetic factors associated with venous thromboembolism in myeloma patients treated with lenalidomide-based regimens.," *Am. J. Hematol.*, vol. 88, no. 9, pp. 765–70, Sep. 2013.

- [74] R. Rosovsky, F. Hong, D. Tocco, B. Connell, C. Mitsiades, R. Schlossman, I. Ghobrial, L. Lockridge, D. Warren, G. Bradwin, M. Doyle, N. Munshi, R. J. Soiffer, K. C. Anderson, E. Weller, and P. Richardson, "Endothelial stress products and coagulation markers in patients with multiple myeloma treated with lenalidomide plus dexamethasone: an observational study.," *Br. J. Haematol.*, vol. 160, no. 3, pp. 351–8, Feb. 2013.
- [75] A. Palumbo, S. Bringhen, S. K. Kumar, G. Lupparelli, S. Usmani, A. Waage, A. Larocca, B. Van Der Holt, P. Musto, M. Offidani, M. T. Petrucci, A. Evangelista, S. Zweegman, A. K. Nooka, A. Spencer, M. A. Dimopoulos, R. Hajek, M. Cavo, P. Richardson, S. Lonial, G. Ciccone, M. Boccadoro, K. Anderson, B. Barlogie, P. Sonneveld, and P. L. McCarthy, "Second primary malignancies with lenalidomide therapy for newly diagnosed myeloma: A meta-analysis of individual patient data," *Lancet Oncol.*, vol. 15, no. 3, pp. 333–342, 2014.
- [76] L.-T. P. : RV-MM-PI-280 and V. V. 02.06.2014, *A Randomised Comparison of Daily 25 mg Versus 5 mg Lenalidomide as Maintenance Therapy After High-dose Therapy and Autologous Stem Cell Transplantation in Patients With Multiple Myeloma*. 2009.
- [77] D. Verhelle, L. G. Corral, K. Wong, J. H. Mueller, L. Moutouh-de Parseval, K. Jensen-Pergakes, P. H. Schafer, R. Chen, E. Glezer, G. D. Ferguson, A. Lopez-Girona, G. W. Muller, H. a Brady, and K. W. H. Chan, "Lenalidomide and CC-4047 inhibit the proliferation of malignant B cells while expanding normal CD34+ progenitor cells.," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 2, pp. 746–55, Jan. 2007.
- [78] L. A. M. Parseval, D. Verhelle, E. Glezer, K. Jensen-pergakes, G. D. Ferguson, L. G. Corral, C. L. Morris, G. Muller, H. Brady, and K. Chan, "Pomalidomide and lenalidomide regulate erythropoiesis and fetal hemoglobin production in human CD34 + cells," vol. 118, no. 1, 2008.
- [79] R. A. Irizarry, B. Hobbs, F. Collin, Y. D. Beazer-Barclay, K. J. Antonellis, U. Scherf, and T. P. Speed, "Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data.," *Biostatistics*, vol. 4, no. 2, pp. 249–64, Apr. 2003.
- [80] E. Krafft, P. Lybaert, E. Roels, H. P. Laurila, M. M. Rajamäki, F. Farnir, M. Myllärniemi, M. J. Day, K. Mc Entee, and C. Clercx, "Transforming growth factor Beta 1 activation, storage, and signaling pathways in idiopathic pulmonary fibrosis in dogs.," *J. Vet. Intern. Med.*, vol. 28, no. 6, pp. 1666–75, Jan. .
- [81] S. Gao, C. Alarcón, G. Sapkota, S. Rahman, P.-Y. Chen, N. Goerner, M. J. Macias, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and J. Massagué, "Ubiquitin ligase Nedd4L targets activated Smad2/3 to limit TGF-beta signaling.," *Mol. Cell*, vol. 36, no. 3, pp. 457–68, Nov. 2009.

- [82] X. Yuan, J. Srividhya, T. De Luca, J.-H. E. Lee, and J. R. Pomerening, "Uncovering the role of APC-Cdh1 in generating the dynamics of S-phase onset.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 25, no. 4, pp. 441–56, Feb. 2014.
- [83] Z. Qian, L. Mao, A. A. Fernald, H. Yu, R. Luo, Y. Jiang, J. Anastasi, P. J. Valk, R. Delwel, and M. M. Le Beau, "Enhanced expression of FHL2 leads to abnormal myelopoiesis in vivo.," *Leukemia*, vol. 23, no. 9, pp. 1650–7, Sep. 2009.
- [84] Z. Qian, J. M. Joslin, T. R. Tennant, S. C. Reshmi, D. J. Young, A. Stoddart, R. A. Larson, and M. M. Le Beau, "Cytogenetic and genetic pathways in therapy-related acute myeloid leukemia.," *Chem. Biol. Interact.*, vol. 184, no. 1–2, pp. 50–7, Mar. 2010.
- [85] S. Blumel and J. Broadway-Duren, "Approaches to Managing Safety With Lenalidomide in Hematologic Malignancies.," *J. Adv. Pract. Oncol.*, vol. 5, no. 4, pp. 269–79, Jan. .
- [86] K. Koh, M. Janz, M. Y. Mapara, B. Lemke, D. Stirling, B. Do, M. Zenke, S. Lentzsch, and I. I. Cc-, "Immunomodulatory derivative of thalidomide (IMiD CC-4047) induces a shift in lineage commitment by suppressing erythropoiesis and promoting myelopoiesis," vol. 105, no. 10, pp. 3833–3840, 2005.
- [87] J. Pfeilschifter, I. Diel, B. Scheppach, A. Bretz, R. Krempien, J. Erdmann, G. Schmid, N. Reske, H. Bismar, T. Seck, B. Krempien, and R. Ziegler, "Concentration of transforming growth factor beta in human bone tissue: relationship to age, menopause, bone turnover, and bone volume.," *J. Bone Miner. Res.*, vol. 13, no. 4, pp. 716–30, Apr. 1998.
- [88] M. Zhao, J. M. Perry, H. Marshall, A. Venkatraman, P. Qian, X. C. He, J. Ahamed, and L. Li, "Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells.," *Nat. Med.*, vol. 20, no. 11, pp. 1321–6, Nov. 2014.
- [89] M. Urashima, A. Ogata, D. Chauhan, M. Hatziyanni, M. B. Vidriales, D. A. Dederá, R. L. Schlossman, and K. C. Anderson, "Transforming growth factor-beta1: differential effects on multiple myeloma versus normal B cells.," *Blood*, vol. 87, no. 5, pp. 1928–38, Mar. 1996.
- [90] G. J. Prud'homme, "Pathobiology of transforming growth factor beta in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations.," *Lab. Invest.*, vol. 87, no. 11, pp. 1077–91, Nov. 2007.
- [91] K. E. Lambert, H. Huang, K. Mythreye, and G. C. Blobe, "The type III transforming growth factor- β receptor inhibits proliferation, migration, and adhesion in human myeloma cells.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 22, no. 9, pp. 1463–72, May 2011.
- [92] T. Soma, J. M. Yu, and C. E. Dunbar, "Maintenance of murine long-term repopulating stem cells in ex vivo culture is affected by modulation of transforming growth factor-beta but not macrophage inflammatory protein-1 alpha activities.," *Blood*, vol. 87, no. 11, pp. 4561–7, Jun. 1996.

- [93] S. Yamazaki, A. Iwama, S. Takayanagi, K. Eto, H. Ema, and H. Nakauchi, "TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation.," *Blood*, vol. 113, no. 6, pp. 1250–6, Feb. 2009.
- [94] I. Dybedal and S. E. Jacobsen, "Transforming growth factor beta (TGF-beta), a potent inhibitor of erythropoiesis: neutralizing TGF-beta antibodies show erythropoietin as a potent stimulator of murine burst-forming unit erythroid colony formation in the absence of a burst-promoting activ,," *Blood*, vol. 86, no. 3, pp. 949–57, Aug. 1995.
- [95] T. Abbas, M. Keaton, and A. Dutta, "Regulation of TGF- β signaling, exit from the cell cycle, and cellular migration through cullin cross-regulation: SCF-FBXO11 turns off CRL4-Cdt2," *Cell Cycle*, vol. 12, no. 14, pp. 2175–2182, Oct. 2014.
- [96] T. Ebisawa, M. Fukuchi, G. Murakami, T. Chiba, K. Tanaka, T. Imamura, and K. Miyazono, "Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation.," *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 16, pp. 12477–80, Apr. 2001.
- [97] H. Zhu, P. Kavsak, S. Abdollah, J. L. Wrana, and G. H. Thomsen, "A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation.," *Nature*, vol. 400, no. 6745, pp. 687–93, Aug. 1999.
- [98] C. Kersten, E. A. Sivertsen, M. E. Hystad, L. Forfang, E. B. Smeland, and J. H. Myklebust, "BMP-6 inhibits growth of mature human B cells; induction of Smad phosphorylation and upregulation of Id1.," *BMC Immunol.*, vol. 6, p. 9, Jan. 2005.
- [99] A. Narla, S. Dutt, J. R. McAuley, F. Al-Shahrour, S. Hurst, M. McConkey, D. Neuberg, and B. L. Ebert, "Dexamethasone and lenalidomide have distinct functional effects on erythropoiesis.," *Blood*, vol. 118, no. 8, pp. 2296–304, Aug. 2011.
- [100] K. Trakarnsanga, M. C. Wilson, W. Lau, B. K. Singleton, S. F. Parsons, P. Sakuntanaga, R. Kurita, Y. Nakamura, D. J. Anstee, and J. Frayne, "Induction of adult levels of β -globin in human erythroid cells that intrinsically express embryonic or fetal globin by transduction with KLF1 and BCL11A-XL.," *Haematologica*, vol. 99, no. 11, pp. 1677–85, 2014.
- [101] A. Basak, M. Hancarova, J. C. Ulirsch, T. B. Balci, M. Trkova, M. Pelisek, M. Vlckova, K. Muzikova, J. Cermak, J. Trka, D. a Dymant, S. H. Orkin, M. J. Daly, Z. Sedlacek, and V. G. Sankaran, "BCL11A deletions result in fetal hemoglobin persistence and neurodevelopmental alterations," vol. 125, no. 11, pp. 1–6, 2015.
- [102] A. E. Gallienne, H. M. P. Dreau, A. Schuh, J. M. Old, and S. Henderson, "Ten novel mutations in the erythroid transcription factor KLF1 gene associated with increased fetal hemoglobin levels in adults," *Haematologica*, vol. 97, no. 3, pp. 340–343, 2012.

- [103] H. Fathallah, R. S. Weinberg, Y. Galperin, M. Sutton, and G. F. Atweh, "Role of epigenetic modifications in normal globin gene regulation and butyrate-mediated induction of fetal hemoglobin.," *Blood*, vol. 110, no. 9, pp. 3391–7, Nov. 2007.
- [104] A. Goren, G. Simchen, E. Fibach, P. E. Szabo, K. Tanimoto, L. Chakalova, G. P. Pfeifer, P. J. Fraser, J. D. Engel, and H. Cedar, "Fine tuning of globin gene expression by DNA methylation.," *PLoS One*, vol. 1, p. e46, Jan. 2006.
- [105] R. K. Humphries, G. Dover, N. S. Young, J. G. Moore, S. Charache, T. Ley, and A. W. Nienhuis, "5-Azacytidine acts directly on both erythroid precursors and progenitors to increase production of fetal hemoglobin.," *J. Clin. Invest.*, vol. 75, no. 2, pp. 547–57, Feb. 1985.
- [106] S. Mailankody, R. M. Pfeiffer, S. Y. Kristinsson, N. Korde, M. Bjorkholm, L. R. Goldin, I. Turesson, and O. Landgren, "Risk of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes after multiple myeloma and its precursor disease (MGUS).," *Blood*, vol. 118, no. 15, pp. 4086–92, Oct. 2011.
- [107] N. Pemmaraju, D. Shah, H. Kantarjian, R. Z. Orlowski, G. M. Nogueras González, V. Baladandayuthapani, N. Jain, V. Wagner, G. Garcia-Manero, J. Shah, F. Ravandi, S. Pierce, K. Takahashi, N. Daver, A. Nazha, S. Verstovsek, E. Jabbour, M. De Lima, R. Champlin, J. Cortes, and M. H. Qazilbash, "Characteristics and outcomes of patients with multiple myeloma who develop therapy-related myelodysplastic syndrome, chronic myelomonocytic leukemia, or acute myeloid leukemia.," *Clin. Lymphoma. Myeloma Leuk.*, vol. 15, no. 2, pp. 110–4, Feb. 2015.
- [108] M. A. Gertz, E. Terpos, A. Dispenzieri, S. Kumar, R. A. Shah, R. Orlowski, E. Kastiris, M. A. Dimopoulos, and J. Shah, "Therapy-related myelodysplastic syndrome/acute leukemia after multiple myeloma in the era of novel agents.," *Leuk. Lymphoma*, pp. 1–4, Nov. 2014.
- [109] A. Bolomsky, M. Schreder, T. Meißner, D. Hose, H. Ludwig, S. Pfeifer, and N. Zojer, "Immunomodulatory drugs thalidomide and lenalidomide affect osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells in vitro.," *Exp. Hematol.*, vol. 42, no. 7, pp. 516–25, Jul. 2014.
- [110] M. Wobus, G. Benath, R. A. Ferrer, R. Wehner, M. Schmitz, L. C. Hofbauer, M. Rauner, G. Ehninger, M. Bornhäuser, and U. Platzbecker, "Impact of lenalidomide on the functional properties of human mesenchymal stromal cells.," *Exp. Hematol.*, vol. 40, no. 10, pp. 867–76, Oct. 2012.
- [111] L. Li, M. Li, C. Sun, L. Francisco, S. Chakraborty, M. Sabado, T. McDonald, J. Gyroffy, K. Chang, S. Wang, W. Fan, J. Li, L. P. Zhao, J. Radich, S. Forman, S. Bhatia, and R. Bhatia, "Altered hematopoietic cell gene expression precedes development of therapy-related myelodysplasia/acute myeloid leukemia and identifies patients at risk.," *Cancer Cell*, vol. 20, no. 5, pp. 591–605, Nov. 2011.

- [112] Z. Qian, A. A. Fernald, L. A. Godley, R. A. Larson, and M. M. Le Beau, "Expression profiling of CD34+ hematopoietic stem/ progenitor cells reveals distinct subtypes of therapy-related acute myeloid leukemia.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 23, pp. 14925–30, Nov. 2002.
- [113] A. Müller, K. Lange, T. Gaiser, M. Hofmann, H. Bartels, A. C. Feller, and H. Merz, "Expression of angiopoietin-1 and its receptor TEK in hematopoietic cells from patients with myeloid leukemia.," *Leuk. Res.*, vol. 26, no. 2, pp. 163–8, Feb. 2002.
- [114] L. Wang, Z. Q. Yao, J. P. Moorman, Y. Xu, and S. Ning, "Gene expression profiling identifies IRF4-associated molecular signatures in hematological malignancies.," *PLoS One*, vol. 9, no. 9, p. e106788, Jan. 2014.
- [115] H. Wang and C. Jiang, "RAB38 confers a poor prognosis, associated with malignant progression and subtype preference in glioma.," *Oncol. Rep.*, vol. 30, no. 5, pp. 2350–6, Nov. 2013.
- [116] L. Bolkun, D. Lemancewicz, E. Jablonska, A. Szumowska, U. Bolkun-Skornicka, W. Ratajczak-Wrona, J. Dzieciol, and J. Kloczko, "The impact of TNF superfamily molecules on overall survival in acute myeloid leukaemia: correlation with biological and clinical features.," *Ann. Hematol.*, vol. 94, no. 1, pp. 35–43, Jan. 2015.
- [117] J. U. Schmohl, T. Nuebling, J. Wild, J. Jung, T. Kroell, L. Kanz, H. R. Salih, and H. Schmetzer, "Death Receptor Expression on Blasts in AML Is Associated with Unfavorable Prognosis.," *Anticancer Res.*, vol. 35, no. 7, pp. 4043–52, Jul. 2015.
- [118] M. Shahjahani, J. Mohammadiasl, F. Noroozi, M. Seghatoleslami, S. Shahrabi, F. Saba, and N. Saki, "Molecular basis of chronic lymphocytic leukemia diagnosis and prognosis.," *Cell. Oncol. (Dordr.)*, vol. 38, no. 2, pp. 93–109, Apr. 2015.
- [119] S. Dihlmann, S. Tao, F. Echterdiek, E. Herpel, L. Jansen, J. Chang-Claude, H. Brenner, M. Hoffmeister, and M. Kloor, "Lack of Absent in Melanoma 2 (AIM2) expression in tumor cells is closely associated with poor survival in colorectal cancer patients.," *Int. J. Cancer*, vol. 135, no. 10, pp. 2387–96, Nov. 2014.
- [120] C. Guerzoni, M. Bardini, S. A. Mariani, G. Ferrari-Amorotti, P. Neviani, M. L. Panno, Y. Zhang, R. Martinez, D. Perrotti, and B. Calabretta, "Inducible activation of CEBPB, a gene negatively regulated by BCR/ABL, inhibits proliferation and promotes differentiation of BCR/ABL-expressing cells.," *Blood*, vol. 107, no. 10, pp. 4080–9, May 2006.
- [121] D. Salemi, G. Cammarata, C. Agueli, L. Augugliaro, C. Corrado, M. G. Bica, S. Raimondo, A. Marfia, V. Randazzo, P. Dragotto, F. Di Raimondo, R. Alessandro, F. Fabbiano, and A. Santoro, "miR-155 regulative network in FLT3 mutated acute myeloid leukemia.," *Leuk. Res.*, vol. 39, no. 8, pp. 883–96, May 2015.

[122] Q. Wang, H. S. Zhou, K. K. Huang, X. J. Jiang, F. Q. Wu, R. Cao, C. X. Yin, L. Bin Liao, Z. X. Zheng, H. He, R. Lin, Z. S. Yi, D. Xu, M. Yang, and F. Y. Meng, "Imatinib and bortezomib induce the expression and distribution of anaphase-promoting complex adaptor protein Cdh1 in blast crisis of chronic myeloid leukemia.," *Int. J. Oncol.*, vol. 40, no. 2, pp. 418–26, Feb. 2012.

[123] L. Bachegowda, O. Gligich, I. Mantzaris, C. Schinke, D. Wyville, T. Carrillo, I. Braunschweig, U. Steidl, and A. Verma, "Signal transduction inhibitors in treatment of myelodysplastic syndromes.," *J. Hematol. Oncol.*, vol. 6, p. 50, Jan. 2013.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Datum, Vor- und Nachname

Unterschrift