

Aus dem Institut für Translationale Pharmakologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktorin: Prof. Dr. med. Maria Grandoch

Die Effekte von Lenalidomid auf das Knochenmark-Mikromilieu des multiplen Myeloms

Dissertation

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

vorgelegt von
Romy Katharina Jochheim

2025

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

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Sören Twarock

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Rainer Haas

In tiefer Dankbarkeit gewidmet allen, die mich begleitet und ermutigt haben.

Zusammenfassung Deutsch

Das multiple Myelom (MM) ist eine bösartige Erkrankung des Knochenmarks (KM) charakterisiert durch eine Vermehrung klonaler Plasmazellen und mündend in Endorganschäden wie eine hämatopoietische Insuffizienz und Osteolysen. Zelluläre Bestandteile des KM-Mikromilieus sind Mesenchymale sowie Hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen (MSPZ und HSPZ). MSPZ sind entscheidend für die Bildung und Funktion des KM-Milieus, während HSPZ die Grundlage für die Versorgung mit reifen Blutzellen darstellen. Die Mechanismen, die zu veränderten Funktionen von MSPZ und HSPZ bei MM führen, sind nicht vollständig geklärt.

Lenalidomid, ein immunmodulierendes Medikament, spielt eine wichtige Rolle in der MM-Therapie. Studien deuten auf eine Wirkung von Lenalidomid auf MSPZ und HSPZ hin, die genauen Mechanismen sind allerdings bisher unzureichend aufgeklärt.

Ziel dieser Studie war die Analyse der Effekte von Lenalidomid auf das KM-Milieu, indem MSPZ und HSPZ aus dem KM gesunder Probanden und MM-Patienten isoliert, *in vitro* mit Lenalidomid inkubiert und funktionell sowie molekular untersucht wurden.

HSPZ von MM-Patienten unterschieden sich deutlich in Funktion und Genexpression von gesunden Kontrollen mit 199 differentiell exprimierten Genen. Eine Inkubation mit Lenalidomid kehrte die differentielle Genexpression von 30 dieser Gene wieder um und konnte so in Teilen pathologische Veränderungen revertieren. Untersuchungen der MSPZ von gesunden Probanden und MM-Patienten zeigten 1532 differentiell exprimierte Gene. Weitere Analysen wiesen auf die Beteiligung dieser Gene an der Osteogenese und der Matrix des Mikromilieus hin. Nach Lenalidomid-Inkubation traten Genexpressionsänderungen ausschließlich in MSPZ von MM-Patienten auf, u. a. bezogen auf die mitochondriale Funktion und den Energiestoffwechsel. Lenalidomid konnte die durch das MM induzierte veränderte Genexpression in 110 Genen umkehren.

Die Daten zeigen unterschiedliche Effekte von Lenalidomid je nach dem physiologischen Zustand der Zellen. Von potentieller klinischer Bedeutung ist die Umkehrung der MM-assoziierten Veränderungen der Genexpression durch Lenalidomid in HSPZ (30 Gene) und MSPZ (110 Gene), was auf eine teilweise Normalisierung der Genexpressionsprofile hindeuten könnte. Darüber hinaus konnten zahlreiche Gene und Signalwege identifiziert werden, die die eingeschränkte Osteogenese und Hämatopoiese im MM erklären können. Die identifizierten Gene bieten neue Ansätze für gezielte Therapien. Besonders *ADGRG7* könnte ein potentielles therapeutisches Ziel im Rahmen von osteolytischen Prozessen darstellen.

Zusammenfassung Englisch

Multiple Myeloma (MM) is a malignant disease of the bone marrow (BM) characterized by a proliferation of clonal plasma cells resulting in end organ damage such as haematopoietic insufficiency and osteolysis. Important cellular components of the BM microenvironment include mesenchymal and hematopoietic stem and progenitor cells (MSPC and HSPC). The latter form the basis for the lifelong supply of mature blood cells while MSPC play an essential part in the formation and function of the BM microenvironment. The underlying mechanisms that lead to a significantly altered functionality of MSPC and HSPC in MM are not yet fully understood.

Lenalidomide, an immunomodulatory drug, represents an important treatment concept for MM. Studies indicate an effect of lenalidomide on MSPC and HSPC, but the exact mechanisms remain unclear.

The aim of this study was to analyze the effects of lenalidomide on the BM milieu by isolating MSPC and HSPC from the BM of healthy volunteers and MM patients, treating them *in vitro* with lenalidomide and testing them at a molecular and functional level.

HSPC from MM patients differed significantly in function and gene expression from healthy controls with 199 differentially expressed genes. Incubation with lenalidomide reversed the differential gene expression of 30 of these genes and was thus able to partially reverse pathological changes. Investigations of MSPC from healthy volunteers and MM patients revealed 1532 differentially expressed genes. Further analyses indicated the involvement of these genes in osteogenesis and the matrix of the microenvironment. After lenalidomide incubation, gene expression changes occurred exclusively in MSPC from MM-patients, including genes related to mitochondrial function and energy metabolism. Lenalidomide was able to reverse the altered gene expression induced by MM in 110 genes.

These data show that the effect of lenalidomide on the cells varies depending on whether they originate from healthy volunteers or myeloma patients. Of potential clinical relevance is the reversal of MM-associated gene expression changes by lenalidomide in HSPC (30 genes) and MSPC (110 genes), indicating a partial normalization of expression profiles. Moreover, numerous genes and signaling pathways have been identified that may account for the impaired osteogenesis and hematopoiesis in MM. The identified genes may offer new approaches for targeted therapies. In particular ADGRG7 could represent a potential therapeutic target in the context of osteolysis.

Abkürzungsverzeichnis

A2M	Alpha-2-Macroglobulin
ADGRG7	Adhesion G Protein-Coupled Receptor G7, Adhesion G Protein-Coupled Receptor G7
ALDH1A2	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A2
Angpt-1	Angiopoietin-1
AP	Alkalische Phosphatase
ARPIN	Actin Related Protein 2/3 Complex Inhibitor
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPR1B	BMP-Rezeptor 1 B
BSP	Bone Sialoprotein
CA12	Carbonic Anhydrase 12
CAM-DR	Cellular Adhesion-Mediated Drug Resistance
CAR-Zellen	CXCL12-Abundant Reticular Zellen
CCR1	C-C Motif Chemokine Receptor 1
CD209	CD209 Molecule
CD34 ⁺ h	CD34-positive Zellen gesunder Probanden (healthy)
CD34 ⁺ m	CD34-positive Zellen von Myelom-Patienten (maligne)
CDH5	Cadherin 5
CELA2B	Chymotrypsin Like Elastase 2B
c-kit	CD117, Tyrosinkinase
CKS1B	CDC28 Protein Kinase Regulatory Subunit 1B
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CMP	Common Myeloid Progenitor
Col1α1	Kollagen Typ 1 alpha 1
CORO1B	Coronin 1B
CPD	Cumulative Population Doubling
CRBN	Cereblon
CSF1R	Colony Stimulating Factor 1 Receptor
CTSB	Cathepsin B
CTSG	Cathepsin G
CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
DAAM2	Dishevelled Associated Activator of Morphogenesis 2
Dhh	Desert Hedgehog
Dkk	Dickkopf
EGF	Epidermal Growth Factor
EIF2	Eukaryotic Translation Initiation Factor 2
ELANE	Elastase, Neutrophil Expressed
EMA	European Medicines Agency
EZM	Extrazellulärmatrix
FARP1	FERM, ARH/RhoGEF and Pleckstrin Domain Protein 1
FCGRT	Fc gamma Receptor and Transporter
FGF16	Fibroblast Growth Factor 16
FLT1	Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 1
FUT1	Fucosyltransferase 1
FZD	Frizzled
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
Gli	Glioma-Associated Oncogene
GNG12	G Protein Subunit gamma 12
GSEA	Gene Set Enrichment Analysis

GYPA.....	<i>Glycophorin A (MNS Blutgruppe)</i>
HBA2	<i>Hemoglobin Subunit alpha 2</i>
HGF.....	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HH	<i>Hedgehog</i>
HIST1H4C.....	<i>H4 Clustered Histone</i>
HNMT	<i>Histamine N-Methyltransferase</i>
HRI.....	<i>Häm-regulierte eIF2α-Kinase</i>
HSPZ	<i>Hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen</i>
IBSP	<i>Integrin Binding Sialoprotein</i>
ICAM.....	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
IFNG.....	<i>Interferon gamma</i>
IGF	<i>Insulin-like Growth Factor</i>
IGF2	<i>Insulin Like Growth Factor 2</i>
IGF2BP1.....	<i>Insulin Like Growth Factor 2 mRNA Binding Protein 1</i>
Ihh	<i>Indian Hedgehog</i>
IKZF.....	<i>IKAROS Family Zinc Finger</i>
IL.....	<i>Interleukin</i>
IMiDs	<i>Immunomodulatory Imide Drugs</i>
INHBA.....	<i>Inhibin Subunit Beta A</i>
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis</i>
IRF4	<i>IFN Regulatory Factor 4</i>
ITGA10.....	<i>Integrin Subunit alpha 10</i>
ITGA9.....	<i>Integrin Subunit Alpha 9</i>
ITGB1BP2.....	<i>Integrin Subunit Beta 1 Binding Protein 2</i>
ITGB2.....	<i>Integrin Subunit Beta 2</i>
ITGB5.....	<i>Integrin Subunit beta 5</i>
KITLG	<i>KIT-Ligand</i>
KLF1.....	<i>KLF Transcription Factor 1</i>
KM	<i>Knochenmark</i>
LAMTOR	<i>Late Endosomal Adaptor, MAPK and mTOR</i>
LAYN	<i>Layilin</i>
LMO2.....	<i>LIM Domain Only 2</i>
LRP.....	<i>Lipoprotein Receptor-related Proteins</i>
MACS.....	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
MARCO.....	<i>Macrophage Receptor with Collagenous Structure</i>
MCEMP1	<i>Mast Cell Expressed Membrane Protein 1</i>
MM.....	<i>multiple Myelom</i>
MME.....	<i>Membrane Metalloendopeptidase</i>
MSC	<i>Mesenchymal Stromal Cell</i>
MSPZ	<i>Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen</i>
MSPZh	<i>Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen gesunder Probanden (healthy)</i>
MSPZm	<i>Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten (maligne)</i>
mTOR.....	<i>Mammalian Target Of Rapamycin</i>
NES	<i>Normalized Enrichment Score</i>
NF- κ B.....	<i>Nuclear Factor 'kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-Cells</i>
NICD	<i>Notch Intracellular Domain</i>
NNMT	<i>Nicotinamide N-Methyltransferase</i>
NRP2.....	<i>Neuropilin</i>
OCN	<i>Osteocalcin</i>
OMD.....	<i>Osteomodulin</i>

OPN	<i>Osteopontin</i>
OSTN	<i>Osteocrin</i>
Osx.....	<i>Osterix</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis, dt. Hauptkomponentenanalyse</i>
PD	<i>Population Doubling</i>
PPARG	<i>Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma</i>
PPIC	<i>Peptidylprolyl Isomerase C</i>
Ptch	<i>Patched</i>
qRT-PCR.....	<i>Quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion</i>
RSP3	<i>Ribosomal Protein S3</i>
Runx2	<i>Runt-Related Transcription Factor 2</i>
SCF.....	<i>Stem Cell Factor</i>
Shh	<i>Sonic Hedgehog</i>
SHOX	<i>Short Stature Homeobox</i>
SLAMF7	<i>Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family Member 7</i>
SLAMF8	<i>Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family Member 8</i>
Smad	<i>Small Mothers Against Decapentaplegic</i>
Smo	<i>Smoothed</i>
SPARC.....	<i>Secreted Protein Acidic and Cysteine Rich</i>
SPP1	<i>Secreted Phosphoprotein 1, Osteopontin</i>
SRPX	<i>Sushi Repeat Containing Protein X-Linked</i>
TAZ	<i>Transcriptional Co-Activator with PDZ-Binding Motif</i>
TCL1A	<i>TCL1 Family AKT Coactivator A</i>
TGFBR1.....	<i>TGF-β-Rezeptor 1</i>
TGFBR2.....	<i>TGF-β-Rezeptor 2</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TNFSF15	<i>TNF Superfamily Member 15</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
TREM2	<i>Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2</i>
TRPM4.....	<i>Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 4</i>
TSPAN15.....	<i>Tetraspanin 15</i>
TUBB3.....	<i>Tubulin β 3 Class III</i>
VCAM	<i>Vascular Adhesion Molecule 1</i>
VEGF.....	<i>Vascular Endothelial Growth Factor, Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VLA-4	<i>Very Late Antigen 4</i>
VSIG4.....	<i>V-Set and Immunoglobulin Domain Containing 4</i>
Wnts.....	<i>Wingless Int</i>
YAP	<i>Yes-Associated Protein</i>

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung Deutsch	IV
Zusammenfassung Englisch	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Inhaltsverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis.....	XII
Tabellenverzeichnis.....	XIV
1 Einleitung.....	1
1.1 Das Knochenmark-Mikromilieu und die Stammzellnische.....	1
1.1.1 Die Hämatopoiese	2
1.1.2 Die Regulation der Hämatopoiese.....	3
1.1.3 Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen.....	5
1.1.4 Die Osteogenese.....	7
1.2 Hämatologische Neoplasie – Das multiple Myelom.....	10
1.2.1 Definition.....	10
1.2.2 Epidemiologie	12
1.2.3 Symptomatik.....	13
1.2.4 Therapie und klinische Anwendung von Lenalidomid	13
1.2.5 Das Tumormikromilieu des multiplen Myeloms	15
1.2.6 Die gestörte Hämatopoiese beim multiplen Myelom	18
1.2.7 Die gestörte Osteogenese beim multiplen Myelom	19
1.3 Lenalidomid und das Knochenmark-Mikromilieu: Stand der Forschung	20
1.3.1 Lenalidomid und die Hämatopoiese	22
1.3.2 Lenalidomid und die Osteogenese	23
1.4 Ziel der Arbeit	23
2 Material und Methoden.....	25
2.1 Materialien und Geräte	25
2.2 Primer	28
2.3 Herkunft der Zellen	29
2.3.1 Zelllinien	29
2.3.2 Primärzellen.....	29
2.3.3 Isolation mononukleärer Zellen aus dem Knochenmark	30
2.3.4 Generierung Mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen.....	31
2.3.5 Isolation der CD34 ⁺ -HSPZ.....	31
2.4 Zellkulturmethoden	31
2.4.1 Kultivierung der Zelllinien	31

2.4.2	Kultivierung der CD34 ⁺ Hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen	31
2.4.3	Kultivierung der Mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen	32
2.4.4	Zellzählungen	32
2.4.5	Kumulative Populationsverdopplung	33
2.5	Zellkulturexperimente	33
2.5.1	Lenalidomid	33
2.5.2	Langzeitkultur der Myelom-Zelllinien mit Lenalidomid	34
2.5.3	Colony-Forming Unit-Assay.....	35
2.5.4	Osteogene Differenzierung der Mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen	35
2.5.5	Färbung der osteogen differenzierten Mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen	36
2.5.6	Bildverarbeitung und -analyse der osteogenen Differenzierbarkeit.....	36
2.6	Molekularbiologische Methoden	37
2.6.1	RNA-Isolation	37
2.6.2	cDNA-Synthese	37
2.6.3	Quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion	38
2.6.4	RNA-Sequenzierung.....	39
2.7	Bioinformatische Auswertung 1	39
2.8	Bioinformatische Auswertung 2	39
2.9	Statistische Auswertungen	40
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Effekte von Lenalidomid auf Wachstum und Differenzierung der Myelom-Zelllinien	41
3.2	Effekte von Lenalidomid auf die Funktionalität des Knochenmark-Mikromilieus des multiplen Myeloms	43
3.2.1	Wachstum und Differenzierung der Hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen	43
3.2.2	Wachstum und Differenzierung der Mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen	45
3.3	RNA-Sequenzierungen von Hämatopoietischen sowie Mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen	46
3.3.1	Vergleich Hämatopoietischer Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten und gesunden Probanden	48
3.3.2	Hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen nach Inkubation mit Lenalidomid	55
3.3.3	Vergleich Mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten und gesunden Probanden	66
3.3.4	Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen nach Inkubation mit Lenalidomid	72
4	Diskussion.....	79

4.1	Unterschiede der Zelllinien RPMI-8226 und INA-6.....	79
4.2	Das Tumormikromilieu des multiplen Myeloms	81
4.2.1	Hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen im multiplen Myelom: Hinweise auf funktionelle Defizite und gestörte Interaktionen mit dem Knochenmark-Mikromilieu	82
4.2.2	Lenalidomid führt zur partiellen Reversion der Myelom-assoziierten differentiellen Genexpression in Hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen 85	
4.2.3	Veränderungen der Genexpression Mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten: Hinweise auf eine gestörte Osteogenese und ein tumorförderndes Milieu	89
4.2.4	Lenalidomid wirkt selektiv auf Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten und führt zur partiellen Reversion der Myelom-assoziierten differentiellen Genexpression	92
4.3	Schlussfolgerung	96
4.4	Limitationen	100
5	Literaturverzeichnis.....	101
6	Anhang.....	114
7	Danksagung	124

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Repräsentatives Schema der Hämatopoiese.	3
Abb. 2: Differenzierungspotential mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen.	6
Abb. 3: Die osteogene Differenzierung der Mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen. ...	9
Abb. 4: Diagnostische Kriterien für das multiple Myelom.	12
Abb. 5: Schema der Erstlinientherapie des multiplen Myeloms.	14
Abb. 6: Die Myelomzelle und ihre Interaktionen mit Bestandteilen des Knochenmark- Mikromilieus.	16
Abb. 7: Lenalidomid hemmt die Interaktion von Myelomzellen und mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen.	21
Abb. 8: Proliferation und Differenzierung der Myelomzelllinien nach Inkubation mit Lenalidomid.	42
Abb. 9: Proliferation und Differenzierung der CD34 ⁺ -HSPZ nach Inkubation mit Lenalidomid.	44
Abb. 10: Proliferation und Differenzierung der MSPZ nach Inkubation mit Lenalidomid.	46
Abb. 11: Hauptkomponentenanalyse der MSPZ sowie der CD34 ⁺ -HSPZ für die RNA- Sequenzierung.	47
Abb. 12: Unterschiede in der RNA-Expression von CD34 ⁺ m verglichen mit CD34 ⁺ h.	48
Abb. 13: Ergebnisse der <i>Ingenuity Pathway Analysis</i> für Hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen.	50
Abb. 14: Expression von Genen der Extrazellulärmatrix in CD34 ⁺ m verglichen mit CD34 ⁺ h. ...	51
Abb. 15: Stammzeleigenschaften in CD34 ⁺ m verglichen mit CD34 ⁺ h.	53
Abb. 16: Die Signalwege TGF- β , Hedgehog und Notch in CD34 ⁺ m verglichen mit CD34 ⁺ h.	54
Abb. 17: Anzahl differentiell exprimierter Gene in CD34 ⁺ -HSPZ nach Inkubation mit Lenalidomid.	56
Abb. 18: Ergebnisse der <i>Ingenuity Pathway Analysis</i> für Hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen nach Lenalidomid-Inkubation.	56
Abb. 19: Zell-Zell-Kommunikation und Organisation der Extrazellulärmatrix in CD34 ⁺ h und CD34 ⁺ m nach Inkubation mit Lenalidomid.	58
Abb. 20: Der Häm-Metabolismus in CD34 ⁺ -HSPZ nach Inkubation mit Lenalidomid.	59
Abb. 21: Differentielle Genexpression von c-kit und CXCR4 in CD34 ⁺ -HSPZ nach Inkubation mit Lenalidomid.	61
Abb. 22: Übersicht der differentiellen Genexpression in CD34 ⁺ m verglichen mit CD34 ⁺ h sowie nach Inkubation der CD34 ⁺ m mit Lenalidomid.	63
Abb. 23: Zusammenfassendes Schaubild der Ergebnisse der HSPZ.	66
Abb. 24: Unterschiede in der RNA-Expression von MSPZm verglichen mit MSPZh.	67
Abb. 25: Expression von Genen der Extrazellulärmatrix in MSPZm verglichen mit MSPZh. ...	68
Abb. 26: Stammzeleigenschaften in MSPZm verglichen mit MSPZh.	69
Abb. 27: TGF- β -, Wnt- und Hedgehog-Signalwege in MSPZm verglichen mit MSPZh.	70
Abb. 28: Anzahl differentiell exprimierter Gene in MSPZ nach Inkubation mit Lenalidomid. ...	73
Abb. 29: Ergebnisse der <i>Ingenuity Pathway Analysis</i> für Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen.	74

Abb. 30: Mitochondriale Genexpression und oxidative Phosphorylierung in MSPZm nach Inkubation mit Lenalidomid.....	75
Abb. 31: Übersicht der differentiellen Genexpression in MSPZm und MSPZh sowie nach Inkubation der MSPZm mit Lenalidomid.....	76
Abb. 32: Zusammenfassendes Schaubild der Ergebnisse der MSPZ.....	78
Abb. 33: Graphische Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse.....	99

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bestandteile des Knochenmark-Mikromilieus.....	2
Tabelle 2: Interaktionsmöglichkeiten der CD34 ⁺ -HSPZ mit Bestandteilen des Knochenmark-Mikromilieus.....	5
Tabelle 3: Beobachtete Veränderungen des Knochenmark-Mikromilieus des Multiplen Myeloms mit einhergehender insuffizienter Hämatopoiese.....	18
Tabelle 4: Veränderungen des Knochenmark-Mikromilieus, die zur eingeschränkten Osteogenese im Multiplen Myelom beitragen.	20
Tabelle 5: Auflistung verwendeter Primer.....	29
Tabelle 6: Patientencharakteristika der gesunden Probanden sowie der Myelom-Patienten.....	30
Tabelle 7: Zusammensetzung des Nährmediums für die Zelllinien RPMI-8226 und INA-6.	31
Tabelle 8: Zusammensetzung des Nährmediums für CD34 ⁺ -HSPZ.....	32
Tabelle 9: Zusammensetzung des Nährmediums für MSPZ.	32
Tabelle 10: Zellkulturexperimente unter Verwendung verschiedener Zellarten mit ihren jeweiligen Lenalidomidkonzentrationen.....	34
Tabelle 11: Zusammensetzung des Osteoblastendifferenzierungsmediums.	35
Tabelle 12: Zusammensetzung von Mix I und Mix II für cDNA-Synthese aus RNA.	38
Tabelle 13: Differentielle Expression von Genen der Signalwege Wnt, TGF- β , Notch und Hippo in CD34 ⁺ -HSPZ nach Lenalidomid-Inkubation.....	62
Tabelle 14: 30 Gene, deren Expression sich in CD34 ⁺ m reduziert und nach Inkubation mit Lenalidomid verstärkt darstellt.	64
Tabelle 15: Auswahl differentiell exprimierter Gene in MSPZm im Vergleich zu MSPZh mit hämato-onkologischer Relevanz.....	71
Tabelle 16: Bestandteile des mTOR-Signalwegs in MSPZm und nach Inkubation mit Lenalidomid.	75
Tabelle 17: Gene, deren Expression sich in MSPZm verstärkt und nach Inkubation mit Lenalidomid reduziert darstellt.	77

1 Einleitung

In dieser Arbeit wird aus Gründen der besseren Lesbarkeit das generische Maskulinum verwendet. Weibliche und nicht-binäre Geschlechteridentitäten sind dabei ausdrücklich mitgemeint, soweit es für die Aussage erforderlich ist.

1.1 Das Knochenmark-Mikromilieu und die Stammzellnische

Innerhalb des Knochenmarks (KM) als blutbildendes Organ befinden sich die Stammzellnischen: Sie setzen sich zusammen aus zellulären und nicht-zellulären Bestandteilen (schematisch in Tabelle 1 dargestellt) und bezeichnen spezialisierte Nischen, in denen Stamm- und Progenitorzellen verweilen [1]. Zu diesen gehören Hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ), aus denen die Blutzellen hervorgehen (Kap. 1.1.1) und die über unterschiedliche Signale aus dem KM-Mikromilieu in einem Ruhezustand gehalten oder zu Selbsterneuerung oder Differenzierung stimuliert werden, sowie Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen (MSPZ), die entscheidend zur Regulation der Hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen beitragen (Kap. 1.1.2) [2, 3].

Basierend auf aktuellen Forschungsergebnissen wurden zwei Stammzellnischen innerhalb des Knochenmarks definiert, von denen jede die HSPZ wohl auf verschiedene Weise beeinflusst (Kap. 1.1.2): Die endosteale Nische einerseits, welche sich in räumlicher Nähe zur Knochenoberfläche befindet und in der neben Zellen der osteoblastären Linie (mesenchymalen Ursprungs) und Osteoklasten circa 15 % der HSPZ verweilen [4]. Andererseits existiert zentral im Knochenmark die perivaskuläre Nische, welche weitergehend unterteilt werden kann in arterioläre sowie sinusoidale Nischen; hier befinden sich physiologischerweise circa 85 % der HSPZ [5]. Obgleich sich diese Nischen hinsichtlich ihrer Lokalisation innerhalb des Knochenmarks und ihrer zellulären Komponenten unterscheiden, sind sie als funktionell verflochtenes Gefüge zu begreifen, innerhalbdessen sich die HSPZ bewegen können [6]. Die zentrale Aufgabe der Stammzellnischen liegt in der Regulation des Zellzyklus der HSPZ: Die zellulären und nicht-zellulären Bestandteile des Knochenmarks tragen mittels extrinsischer Signale sowie direkter Zell-Zell-Kontakte entscheidend dazu bei, die HSPZ hinsichtlich ihrer Proliferation und Differenzierung zu steuern oder sie in einem physiologischen Ruhezustand zu halten (Kap. 1.1.2) [7, 8].

zelluläre Bestandteile:	Hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen Erythrozyten Lymphozyten Natürliche Killerzellen Dendritische Zellen Makrophagen Megakaryozyten Thrombozyten Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen Fibroblasten Chondroblasten Osteoblasten Osteoklasten Endothelzellen, endotheliale Vorläuferzellen Sympathische Nervenfasern, Schwannzellen
nicht-zelluläre Bestandteile:	Extrazellulärmatrix: Bestehend unter anderem aus Fibronektin, Laminin, Kollagen, Proteoglykanen, Glukosaminoglykanen Lösliche Faktoren, unter anderem: IL-1, -6, -10, -11, -15, -21 (Interleukin) VEGF (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>) Wnts (<i>Wingless Int</i>) TGF- β (<i>Transforming Growth Factor β</i>) TNF- α (<i>Tumor Necrosis Factor α</i>) IGF-1, 2 (<i>Insulin-like Growth Factor</i>)

Tabelle 1: **Bestandteile des Knochenmark-Mikromilieus.** Modifiziert nach Podar *et al.* [9]

1.1.1 Die Hämatopoiese

Die multipotenten HSPZ tragen das CD34-Membranprotein auf ihrer Zelloberfläche (CD34⁺-Zellen); aus ihnen gehen durch Differenzierung im roten Knochenmark die reifen Blutzellen des Körpers hervor. Die Hämatopoiese gliedert sich in die myeloische sowie die lymphatische Reihe (Abb. 1): Aus den HSPZ entwickeln sich über multipotente Vorläuferzellen die *Common Myeloid Progenitors* (gemeinsame myeloide Vorläufer, CMP) oder die *Common Lymphoid Progenitors* (gemeinsame lymphatische Vorläufer, CLP) [10, 11]. Über weitere Differenzierungsschritte gehen aus den CMP schließlich die Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten und Granulozyten hervor (myeloische Reihe) [10]. Die CLP differenzieren sich ebenfalls in mehreren Stufen zu B-Zellen, T-Zellen oder

natürlichen Killerzellen weiter (lymphatische Reihe) [11]. Dendritische Zellen können sowohl aus der myeloischen als auch aus der lymphatischen Reihe hervorgehen.

Die Lymphopoiese findet im Gegensatz zur Myeloipoiese nicht ausschließlich im Knochenmark statt: Die unreifen B-Zellen, die über Zwischenstadien aus den CLP hervorgehen, gelangen mit dem Blutstrom in die peripheren lymphatischen Organe, insbesondere die Milz, wo sie zu reifen B-Zellen differenzieren. Letztendlich entstehen aus den naiven, reifen B-Zellen die B-Gedächtniszellen und die langlebigen Plasmazellen, welche zurück ins Knochenmark gelangen. Diese Plasmazellen zeichnen sich physiologischerweise durch eine hohe Sekretion von Antikörpern aus und proliferieren nicht mehr.

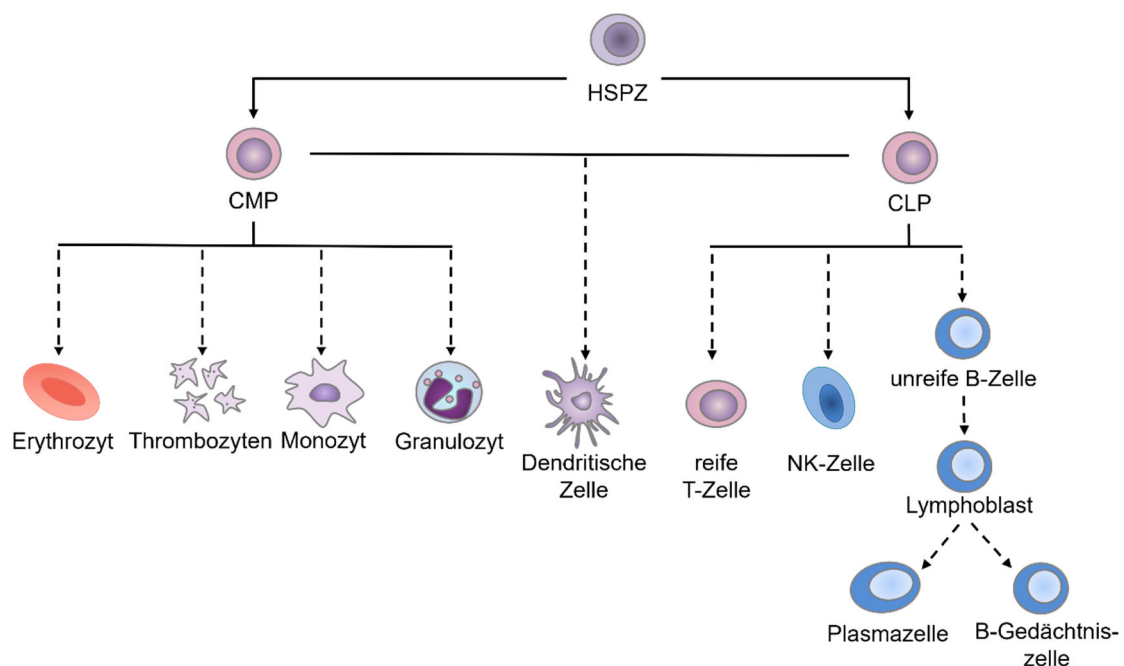


Abb. 1: **Repräsentatives Schema der Hämatopoiese.** Aus den hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen (HSPZ) gehen die *Common Myeloid Progenitors* (CMP) und die *Common Lymphoid Progenitors* (CLP) hervor. Aus diesen Zellen differenzieren im weiteren Verlauf alle reifen Blutzellen. Die gestrichelten Pfeile zeigen eine Bildung über Vor- und Zwischenstufen an. NK-Zelle = natürliche Killerzelle. Abb. erstellt mit Servier Medical Art von Servier.

1.1.2 Die Regulation der Hämatopoiese

Eine strenge Regulation der Selbsterneuerung und Differenzierung von HSPZ ist unerlässlich, um einerseits genügend Blutzellen für einen physiologisch funktionierenden Organismus zur Verfügung zu stellen und andererseits die Entstehung von Krankheiten wie Leukämien zu verhindern. Diese Regulation findet über Zell-intrinsische und Zell-extrinsische Faktoren aus den Stammzellnischen statt [12, 13]. Je

nach Bedarf des Organismus erfolgen Proliferation und Differenzierung in Tochterzellen der Hämatopoiese oder der Verbleib der HSPZ in einem Ruhezustand [14].

Die Untersuchungen zellulärer und nicht-zellulärer Bestandteile sowie der Funktion der einzelnen Nischen stellen ein komplexes Unterfangen dar. Aktuelle Daten deuten darauf hin, dass die verschiedenen Nischen unterschiedliche Wirkungen auf die HSPZ ausüben: So scheint die perivaskuläre Nische die Proliferation und Differenzierung der HSPZ anzuregen, während die endosteale Nische wohl die Rolle einnimmt, die HSPZ in einem Ruhezustand zu halten und bei Bedarf die Regeneration durch Selbsterneuerung zu unterstützen [15].

Zahlreiche im Knochenmark vorkommende Zellen und Strukturen konnten identifiziert werden, welche die HSPZ-Regulation beeinflussen und somit einen Teil der Stammzellnischen bilden. Dazu zählen unter anderem die zellulären und nichtzellulären Bestandteile des KM-Mikromilieus (Tabelle 1). Eine schematische Übersicht über wichtige regulatorische Interaktionsmöglichkeiten zwischen Zellen der Stammzellnischen und den HSPZ bietet Tabelle 2.

Molekül	Expression durch	Funktion
CXCR4 (CD184): CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4, transmembranärer G-Protein-gekoppelter Rezeptor für CXCL12 [16]	hämatopoietische und endotheliale Zellen [17]	hält HSPZ in einem Ruhezustand [18], fördert den Verbleib der HSPZ im Knochenmark [19]
CXCL12 (SDF-1 α): CXC-Motiv-Chemokin 12, spezifischer Ligand für CXCR4 [20]	Megakaryozyten, Osteoblasten, MSPZ [18, 21, 22]	
Tie-2 : Tyrosinkinase, Zelloberflächenrezeptor, Aktivierung durch Angiopoietin [23, 24]	HSPZ [23]	Angiogenese, Hämatopoiese, Adhäsion und Selbsterneuerung der HSPZ, hält HSPZ in einem physiologischen Ruhezustand [23, 25, 26]
Angpt-1 : Angiopoietin-1, Ligand für Tie-2 [23, 24]	Osteoblasten, Stromazellen [23, 27]	
c-kit (CD117): Tyrosinkinase Klasse III, Rezeptor für Kit-Ligand (SCF), Aktivierung durch Kit-Ligand [28, 29]	HSPZ [30]	Proliferation und Differenzierung der HSPZ [31]

Molekül	Expression durch	Funktion
Kit-Ligand (SCF): Stem Cell Factor, spezifischer Ligand für c-kit [28, 29]	endotheliale und perivaskuläre Stromazellen [32], Osteoblasten [33]	
Notch1 : Rezeptor für Jagged1 [34, 35]	u. a. HSPZ [36]	Überleben, Entwicklung und Differenzierung verschiedener hämatopoietischer Linien [37]
Jagged1 (CD339): Ligand für Notch1 [34, 35]	Osteoblasten, MSPZ [38]	
TGF-β-R1 : Transforming Growth Factor β Rezeptor 1, Rezeptor für TGF- β [39]	u. a. HSPZ [39, 40]	hält HSPZ in einem Ruhezustand [40, 41]
TGF-β1 : Transforming Growth Factor β 1, Ligand für TGF- β -R1 [39]	Zellen des autonomen Nervensystems, Gliazellen [40]	
Wnt-Pathway : β -Catenin-abhängiger und unabhängiger Signalweg	u. a. HSPZ [42]	steigert Proliferation und Selbsterneuerung der HSPZ, hält diese in unreifem Stadium [42]
Shh : Sonic Hedgehog Signalweg	u. a. HSPZ [43]	steigert Proliferation und Selbsterneuerung der HSPZ [43]
BMP : Bone Morphogenetic Protein Signalweg	u. a. HSPZ [44]	steigert Proliferation und Selbsterneuerung der HSPZ [44]

Tabelle 2: **Interaktionsmöglichkeiten der CD34⁺-HSPZ mit Bestandteilen des Knochenmark-Mikromilieus.** Modifiziert nach Jäger *et al.*, Geyh *et al.* [45, 46]. HSPZ = hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen, MSPZ = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen.

1.1.3 Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen

Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen (MSPZ) sind multipotente adulte Stammzellen sowie unipotente Progenitorzellen mit Differenzierungspotential zu Osteoblasten, Chondroblasten und Adipoblasten (Abb. 2) [47]. Häufig wird statt

mesenchymaler Stamm- und Progenitorzelle auch der Begriff der mesenchymalen Stromazelle verwendet (MSC = *Mesenchymal Stromal Cell*), da sich keine homogene Stammzellpopulation nach Gewinnung aus dem Knochenmark isolieren lässt [47]. Diese Zellen können aus einer Vielzahl von Geweben isoliert werden, darunter, wie für die vorliegende Arbeit geschehen, aus dem Knochenmark (KM-MSPZ) [48].

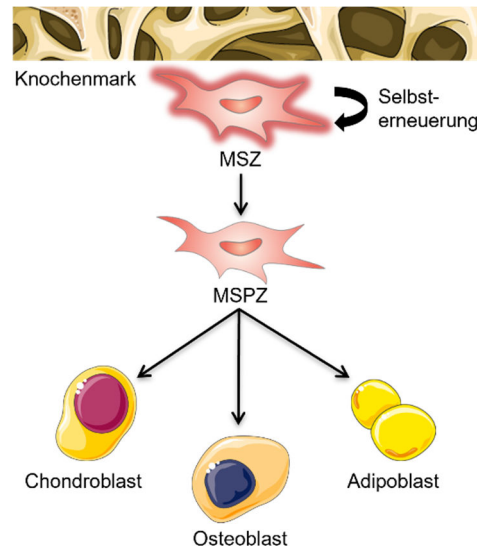


Abb. 2: **Differenzierungspotential mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen.** Schematische Darstellung der Fähigkeit zur Selbsterneuerung der mesenchymalen Stammzellen (MSZ) und deren Weiterdifferenzierung über mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen (MSPZ) hin zu ausdifferenzierten Zellen der mesodermalen Reihe. Abb. erstellt mit Servier Medical Art von Servier.

Neben ihrer Differenzierbarkeit stellen MSPZ über Expression und Sekretion wichtige Faktoren für das sie umgebende Milieu zur Verfügung: So synthetisieren KM-MSPZ und MSC verschiedene Kollagentypen, Fibronectin und Laminin und tragen somit entscheidend zur Bildung der extrazellulären Matrix (EZM) im Knochenmark bei [49]. Sowohl primäre als auch osteogen differenzierte KM-MSPZ sowie die durch sie gebildete EZM produzieren wichtige hämatopoietische Zytokine und unterstützen so maßgeblich die Hämatopoiese (Tabelle 2); das Differenzierungspotential der MSPZ sowie ihre direkten und indirekten Zell-Zell-Interaktionen stellen die Grundlagen für ein intaktes KM-Mikromilieu dar [50, 51].

Die aus KM-MSPZ hervorgehenden Osteoblasten sind Teil der endostealen Knochenmarknische und als solche zentral an der Regulation der Proliferation, Differenzierung und Migration der HSPZ beteiligt: Dies geschieht über die Sekretion verschiedener Zytokine wie CXCL12 (CXC-Motiv-Chemokin 12) [52], G-CSF

(*Granulocyte-Colony Stimulating Factor*) [53], SCF (*Stem Cell Factor*) [33] oder Angpt-1 (Angiopoietin-1) [54]. Auch Osteozyten, ausdifferenzierte Osteoblasten, kontrollieren über die Sekretion von G-CSF die HSPZ [55]. Um die Arteriolen und Sinusoide der perivaskulären Nische herum befinden sich sogenannte CXCL12-*Abundant Reticular* Zellen (CAR-Zellen), eine Subpopulation der KM-MSPZ, die insbesondere über die Sekretion von CXCL12 eine Schlüsselrolle in der HSPZ-Regulation einnimmt [56, 57].

Die zu Osteoblasten und Osteozyten differenzierten MSPZ stellen einen hochrelevanten Teil der Knochenmarknischen dar, sodass im Folgenden genauer auf die Differenzierung der MSPZ zu Osteoblasten eingegangen wird.

1.1.4 Die Osteogenese

Der organische Anteil des Knochens besteht vor allem aus Kollagen und weiteren Knochenproteinen wie Osteocalcin (OCN), Osteonectin, Osteopontin (OPN), Thrombospondin und alkalischer Phosphatase (AP), welche von Osteoblasten und ihren Vorläufern, den MSPZ, sezerniert werden [58]. In der Knochenmatrix eingemauert befinden sich ausdifferenzierte Osteoblasten, die Osteozyten. Die Knochenmasse erwachsener Menschen wird im Gesunden durch die Balance von Knochenaufbau und -abbau aufrechterhalten, wobei der Abbau von hämatopoietisch abstammenden Osteoklasten gesteuert wird.

Auf molekularer Ebene sind zahlreiche Gene und Signalwege involviert, die die Bildung der Osteoblasten sowie der Osteoklasten regulieren (Abb. 3 A). Die Differenzierungsfähigkeit der MSPZ von Osteoblasten bis hin zu Osteozyten wird schematisch in Abb. 3 B veranschaulicht. Dabei werden aufgrund der Komplexität des Themas und mit Blick auf den Fokus dieser Arbeit die folgenden Faktoren und Signalwege erläutert, die insbesondere bei der Aufrechterhaltung der Knochenmarknischen und der Regulation der Hämatopoiese sowie der Osteogenese eine wichtige Bedeutung einnehmen und die in Teilen bereits aus den vorherigen Kapiteln bekannt sind.

Mitglieder der TGF- β -Superfamilie (*Transforming Growth Factor Beta*), hierzu gehören auch die BMPs (*Bone Morphogenetic Proteins*), binden an Transmembranrezeptoren, welche daraufhin ihrerseits Smad-Proteine (*Small Mothers Against Decapentaplegic*) phosphorylieren, die dann im Zellkern Transkriptionsfaktoren aktivieren [59, 60]. Auch die MAPK (*Mitogen-Activated Proteinkinase*) ist in die Signaltransduktion der TGF- β -Superfamilie involviert [61, 62]. Aktivierte Smads stimulieren die Expression von RUNX2 (*Runt-Related Transcription Factor 2*), einem Transkriptionsfaktor, der als essentiell für

die Osteogenese gilt [63-65]. TGF- β scheint jedoch je nach Reifestadium kontroverse Wirkungen auf Osteoblasten zu haben: So ergaben einige Studien, dass TGF- β die terminale Osteoblastendifferenzierung inhibiert [66]. Die pro-osteogenen BMP-Signale werden unter anderem von EGF (*Epidermal Growth Factor*) noch signifikant verstärkt [67].

Der Notch-Signalweg wird durch die Bindung von Liganden wie *Delta-like* und *Jagged* an die extrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors aktiviert, was daraufhin zur Freisetzung der intrazellulären Domäne führt (NICD = *Notch Intracellular Domain*) [68]. Diese wandert in den Zellkern und reguliert dort Zielgene wie Hes- und Hey-Proteine [68]. Hes4 fördert die Osteogenese durch vermehrte Expression von RUNX2, OCN, OPN und BSP (*Bone Sialoprotein*) [69]. Insgesamt kann die Aktivierung des Notch-Signalwegs jedoch je nach Reifestadium der Zellen der osteoblastischen Linie heterogene Effekte ausüben: So konnten auch supprimierende Effekte von Notch auf die Osteoblastendifferenzierung nachgewiesen werden [70, 71]. Auch supprimierende (Notch1, 3) sowie unterstützende (Notch2) Aktivitäten auf die Entwicklung von Osteoklasten werden Notch zugeschrieben [72, 73].

Als Rezeptoren für Wnt-Liganden (*Wingless Int*) fungieren unter anderem FZD-Transmembranproteine (*Frizzled*) zusammen mit LRP5/6 als Korezeptoren (*Lipoprotein Receptor-related Proteins*) [74]. Die Aktivierung des FZD-Rezeptors hat zur Folge, dass β -Catenin in den Zellkern wandert, dort als Transkriptionsfaktor fungiert und weitere Transkriptionsfaktoren inklusive RUNX2 aktiviert [75].

Der Hedgehog-Signalweg wird über die Bindung von Hedgehog-Proteinen (Shh = *Sonic Hedgehog*, Ihh = *Indian Hedgehog*, Dhh = *Desert Hedgehog*) an den Ptch-Rezeptor (*Patched* Rezeptor) getriggert. Als Folge der Bindung an Ptch wird dessen Inhibition von Smo (*Smoothened* Rezeptor) unterbrochen, sodass Smo die Transkriptionsfaktoren Gli1, 2, 3 (*Glioma-Associated Oncogene*) aktiviert [76]. Diese sorgen dann für die Expression von RUNX2 [77, 78].

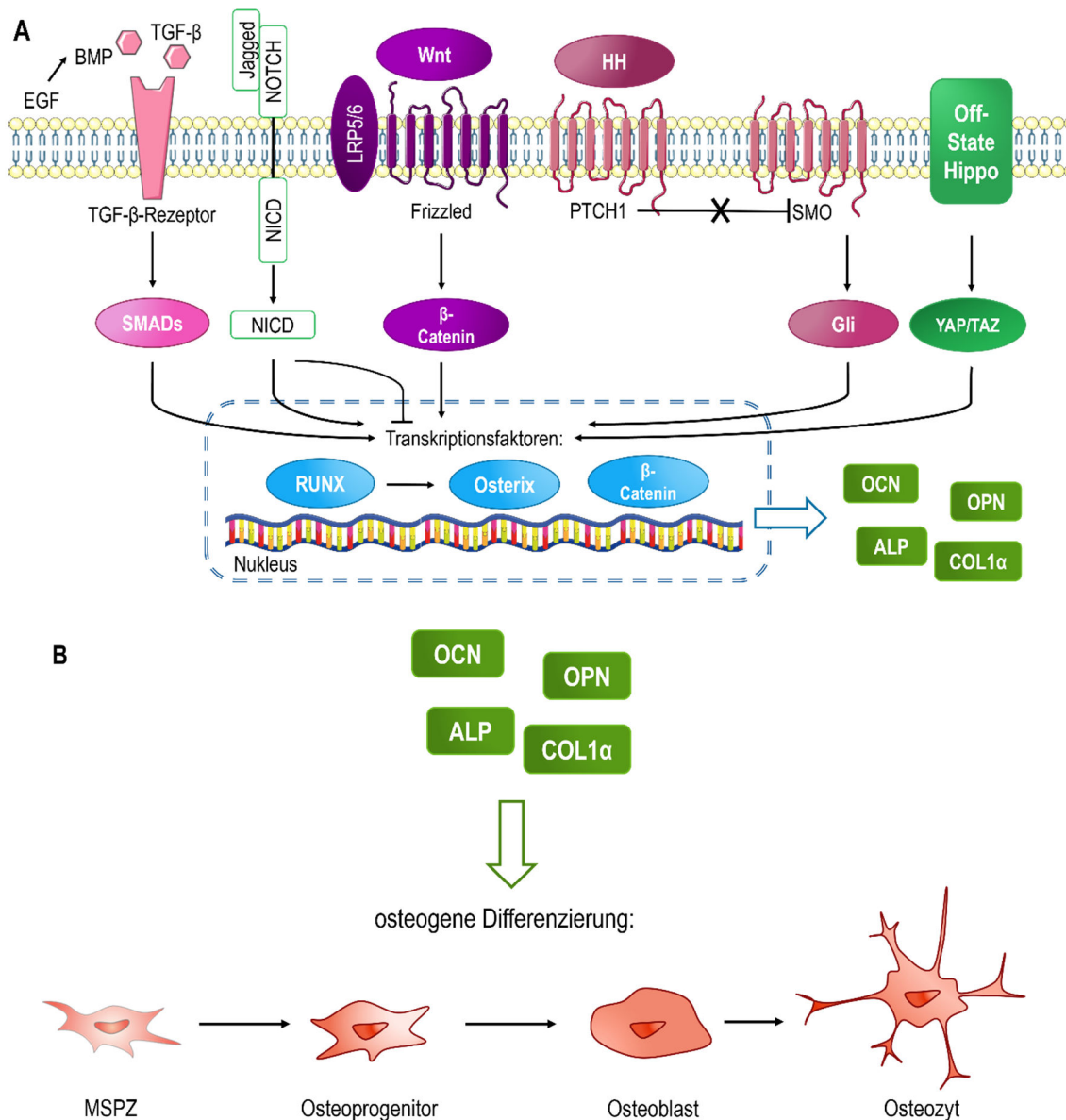


Abb. 3: **Die osteogene Differenzierung der Mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen.**

A Verschiedene Wege führen zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche dann die Genexpression von Osteocalcin, Osteopontin, alkalischer Phosphatase und Kollagen 1α induzieren. **B** Die nun sezernierten Proteine sorgen für die osteogene Differenzierung der MSPZ. MSPZ differenzieren zunächst über die Osteoprogenitorzellen zu Osteoblasten und letztlich zu den ausdifferenzierten Osteozyten. ALP (alkalische Phosphatase), BMP (*Bone Morphogenetic Proteins*), COL1α (Kollagen 1 alpha), EGF (*Epidermal Growth Factor*), Gli (*Glioma-Associated Oncogene*), HH (*Hedgehog*), NICD (*Notch Intracellular Domain*), OCN (*Osteocalcin*), OPN (*Osteopontin*), PTCH (*Patched*), RUNX (*Runt-Related Transcription Factor*), Shh (*Sonic Hedgehog*), SMADs (*Small Mothers Against Decapentaplegic*), SMO (*Smoothened*), TGF-β (*Transforming Growth Factor beta*), Wnt (*Wingless Int-1*), YAP/TAZ (*Yes-Associated Protein, Transcriptional Co-Activator with PDZ-Binding Motif*). Abb. modifiziert nach Zha et al., Amarasekara et al. [79, 80], erstellt mit Servier Medical Art von Servier.

Bei YAP/TAZ (*Yes-Associated Protein, Transcriptional Co-Activator with PDZ-Binding Motif*) handelt es sich um transkriptionelle Koaktivatoren, deren Aktivierung vom Hippo-Kinasekern abhängt: Ist der Hippo-Signalweg inaktiv, können YAP/TAZ im Zellkern akkumulieren und verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren [81]. Durch Stabilisierung von β -Catenin macht YAP einen essentiellen Bestandteil der Osteogenese aus [82]. Allerdings existieren auch für YAP widersprüchliche Forschungsergebnisse, die dem Protein teilweise einen hemmenden Einfluss auf die Osteogenese zusprechen [83].

RUNX2 ist ein essentieller Transkriptionsfaktor für die Osteoblastendifferenzierung, Matrixproduktion und Mineralisierung während der Knochenformation. Diese Effekte werden ausgeübt durch Stimulation von Knochenmatrixproteinen wie Osteocalcin, Osteopontin, Kollagen Typ 1 alpha 1 (Col1 α 1), alkalische Phosphatase und Knochensialoprotein (BSP, Abb. 3) [84-86]. RUNX2 aktiviert auch den Transkriptionsfaktor Osterix (Osx) [87], welcher ebenfalls Col1a1 [88], BSP [89], OPN, OCN und AP induziert [90].

Insgesamt sind diese Wege jedoch keineswegs als unabhängige, gänzlich voneinander abgeschlossene Signalkaskaden zu betrachten, vielmehr bedingen und beeinflussen sich die jeweiligen Signale gegenseitig [91, 92].

1.2 Hämatologische Neoplasie – Das multiple Myelom

Das koordinierte Zusammenspiel aus zellulären und nicht-zellulären Bestandteilen der Knochenmarknische ist entscheidend für den reibungslosen Ablauf von Hämatopoiese sowie Osteogenese im Organismus. Ist dieser Ablauf gestört, kann dies in verschiedenen Krankheiten münden – eine davon ist das multiple Myelom (MM), welches im Folgenden aufgrund seiner Relevanz für die vorliegende Arbeit genauer erläutert wird.

1.2.1 Definition

Die *Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie* definiert das MM als eine hämatologische Neoplasie, die sich durch die unkontrollierte Vermehrung klonaler Plasmazellen mit Infiltration des Knochenmarks kennzeichnet. Die durch die Erkrankung entstehenden Endorganschäden äußern sich insbesondere durch osteolytische Knochenläsionen sowie eine hämatopoietische Insuffizienz; auch ein sekundärer Immundefekt kann auftreten [93].

Als ausdifferenzierte B-Lymphozyten besteht die Aufgabe der Plasmazellen in der Sekretion von Immunglobulinen, welche aus je zwei identischen Schwerketten und Leichtketten bestehen. Die durch die Erkrankung entarteten Plasmazellen produzieren nun vermehrt monoklonale Immunglobuline oder deren Leichtketten (*Bence-Jones-Proteine*), welche einerseits ihre ursprüngliche Funktion der Immunabwehr nicht mehr wahrnehmen können und andererseits zusätzliche Nebenwirkungen verursachen, wie beispielsweise Nephropathien. Durch die ungehinderte Proliferation der Plasmazellen kann es außerdem zu einer Verdrängung der restlichen blutbildenden Zellen im Knochenmark kommen [93].

Tritt eine Plasmazellproliferation lokal ohne systemische Beteiligung auf, spricht man von einem sogenannten Plasmozytom, einer Sonderform des MM. Dieses kann sich im Knochenmark oder als extramedulläres Plasmozytom manifestieren [94]. Mehr als die Hälfte der Patienten mit einem singulären Plasmozytom des Knochenmarks entwickeln im Krankheitsverlauf ein MM [95].

Die Diagnose des MM erfolgt nach den Kriterien der *International Myeloma Working Group* und beinhaltet die in Abb. 4 aufgelisteten Kriterien. Der „freie Leichtketten-Quotient“ bezieht sich dabei auf den Quotienten aus beteiligter und nicht-beteiligter Leichtkette (Quotient valide ab einer Menge der monoklonalen Leichtketten von mindestens 100 mg/l) [93].

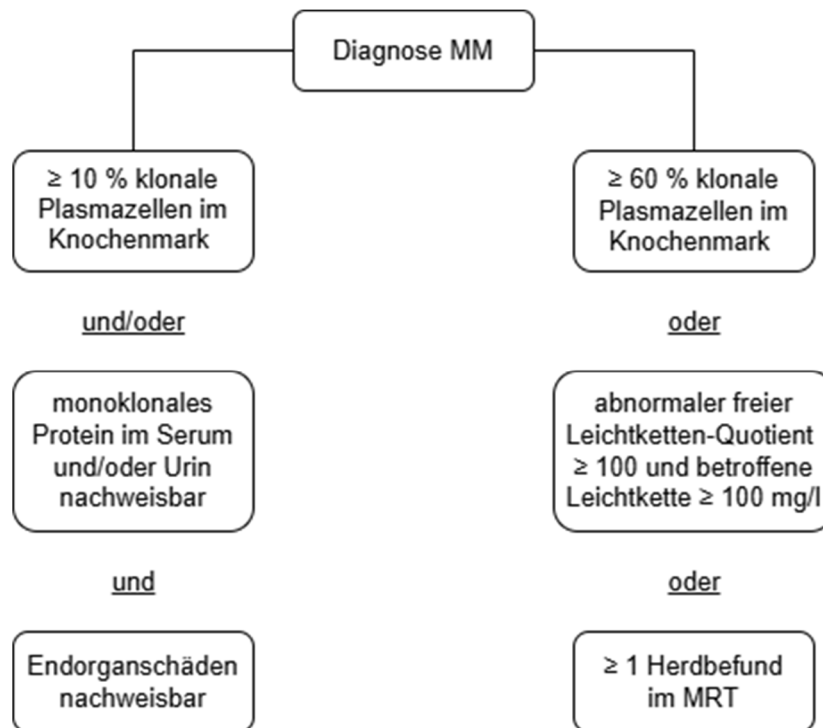


Abb. 4: **Diagnostische Kriterien für das multiple Myelom.** MM = multiples Myelom. Modifiziert nach Kortüm *et al.* [93] und erstellt mit www.diagrams.net.

Die Endorganschäden werden dabei durch die sogenannten *CRAB*-Kriterien definiert:

- **C**alcium: Hyperkalzämie und/oder
- **R**enal: Niereninsuffizienz und/oder
- **A**nämie und/oder
- **K**nochen (engl. **B**one): Knochendestruktion [96].

1.2.2 Epidemiologie

Nach dem Non-Hodgkin-Lymphom und den Leukämien gilt das MM als die dritthäufigste hämatologische Malignität in Deutschland. Im Jahr 2020 erkrankten über 6.700 Menschen in Deutschland neu am MM und über 4.000 Menschen mit MM-Erkrankung verstarben [97]. Weltweit erkrankten im Jahr 2018 fast 160.000 Menschen neu, im selben Jahr verstarben weltweit über 106.000 Menschen an der Erkrankung [98]. Das Risiko zu erkranken steigt mit zunehmendem Alter rapide an: Nur etwa 1,5 % aller Erkrankungen treten vor dem 45. Lebensjahr auf [99]. Bis zum Jahr 2040 wird aufgrund des demographischen Wandels mit einem Anstieg der Inzidenz in Deutschland um etwa 30 % auf circa 8.500 Neuerkrankungsfälle im Jahr gerechnet [93]. Die relative Überlebensrate nach fünf Jahren liegt bei ca. 56-58 %, nach zehn Jahren bei ca. 38 %

[97]. Damit gehört die Krankheit zu den 15 Krebsarten in Deutschland, die am häufigsten zu Todesfällen führen [97].

1.2.3 Symptomatik

Es kommt erkrankungsbedingt zu zahlreichen Osteolysen, welche zu Knochenschmerzen, Spontanfrakturen sowie hyperkalzämischen Krisen führen. Durch Ablagerung von Kalzium und Leichtketten in den Nierentubuli oder der Basalmembran der Glomeruli entwickeln 50 % der Patienten eine Niereninsuffizienz bis hin zur Dialysepflichtigkeit. Weiterhin entstehen Zytopenien, insbesondere Anämien, die sich zunächst durch Müdigkeit und Abgeschlagenheit äußern, sowie ein Antikörpermangel-Syndrom mit erhöhter Infektanfälligkeit. Bei zusätzlicher Thrombozytopenie kommt es zu erhöhter Blutungsneigung.

1.2.4 Therapie und klinische Anwendung von Lenalidomid

Eine Therapieindikation besteht bei einer symptomatischen MM-Erkrankung im Rahmen eines der *CRAB*-Kriterien (s. o.) oder bei der Erfüllung eines der sogenannten SLiM-Kriterien:

- **S**echzig: monoklonale Plasmazellen im KM ≥ 60 %
- **L**eichtkette (engl. *Light Chain*): freie Leichtketten ≥ 100 mg/l und Leichtketten-Quotient ≥ 100
- **M**RT: mindestens 1 fokale Läsion ≥ 5 mm [93].

Für die Erstlinientherapie empfiehlt die Fachgesellschaft zur Diagnostik und Therapie hämatologischer und onkologischer Erkrankungen in der deutschen Leitlinie zum MM folgendes Schema, aus welchem auch die Relevanz von Lenalidomid in der Behandlung des MM hervorgeht (Abb. 5):

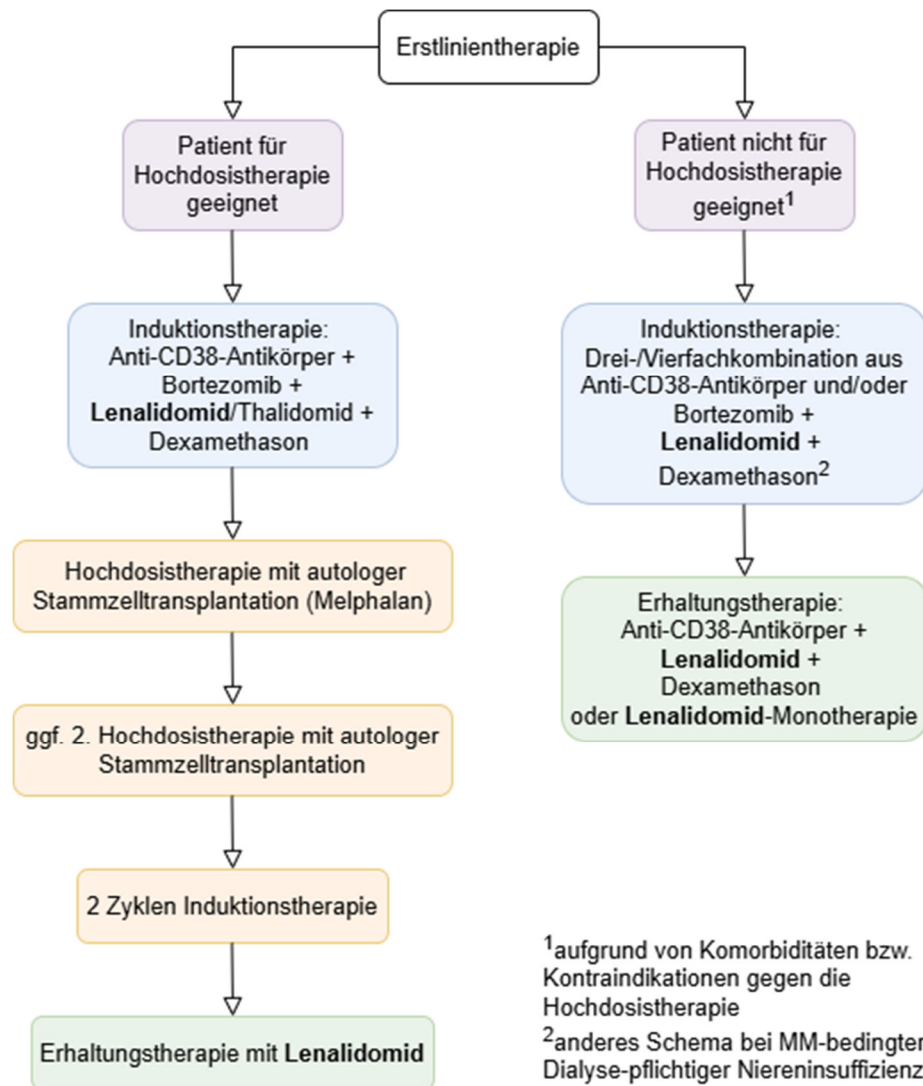


Abb. 5: **Schema der Erstlinientherapie des multiplen Myeloms.** Modifiziert nach Kortüm *et al.* [93] und erstellt mit www.diagrams.net.

Mit dem Wissen um die Invasivität sowie die systemischen Folgen einer Erkrankung am MM wird deutlich, dass eine effektive Therapie derselben essentiell ist beim Versuch, den Fortschritt der Krankheit zu verlangsamen. Eine der bekannten Therapiemöglichkeiten ist Lenalidomid, ein Thalidomid-Analogon, welches zu den immunmodulierenden Substanzen (IMiDs, *Immunomodulatory Imide Drugs*) gehört [93]. Das Arzneimittel ist unter dem Namen *Revlimid*® (Celgene, Summit, New Jersey, USA) zur Behandlung des MM, myelodysplastischer Syndrome, des Mantelzell-Lymphoms und des Follikulären Lymphoms seit 2007 in der EU zugelassen [100]. Es wird als Kapsel oral verabreicht, bis die Erkrankung nicht mehr kontrolliert werden kann oder die Nebenwirkungen ein Fortführen der Therapie nicht mehr zulassen [100].

Die *European Medicines Agency* (EMA) schätzt zahlreiche Nebenwirkungen von *Revlimid®* bei Behandlung des MM als sehr häufig ein, darunter: Neutropenie, Leukopenie, Anämie, Thrombozytopenie, Entzündungen der oberen und unteren Atemwege inklusive Husten sowie Gastroenteritis [100]. Es wird außerdem diskutiert, ob die Rate neuer primärer Neoplasien, wie beispielsweise des myelodysplastischen Syndroms oder der akuten myeloischen Leukämie, unter Lenalidomid-Therapie erhöht ist [101, 102].

Lenalidomid bewies in einer Studie als Monotherapie in der Erhaltungstherapie bei neudiagnostizierten Patienten nach erfolgter autologer Stammzelltherapie eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens auf 52,8 Monate verglichen mit 23,5 Monaten in den Kontrollgruppen [102]. Auch in einer britischen Studie zeigte sich ein erhöhtes progressionsfreies Überleben von 39 Monaten unter Lenalidomidtherapie verglichen mit 20 Monaten in der Kontrollgruppe [103].

Ähnliche Ergebnisse konnten durch Lenalidomid in Kombination mit Dexamethason bei Patienten mit refraktärem oder rezidivierendem MM im Vergleich zur Kontrollgruppe erzielt werden: Sowohl die Zeit bis zur Progression der Erkrankung als auch das Therapieansprechen und das Gesamtüberleben wurden durch Lenalidomid signifikant verlängert [104, 105].

Wenngleich das MM noch immer unheilbar ist, so konnte in den letzten Jahrzehnten doch ein beachtlicher Fortschritt in der Therapie erzielt werden: Kumar *et al.* führen dies vor allem auf die Einführung der autologen Stammzelltherapie (USA 1996) und neuer Medikamente (USA Thalidomid 1999, Bortezomib 2003, Lenalidomid 2005) zurück [106].

1.2.5 Das Tumormikromilieu des multiplen Myeloms

Angesichts der physiologischen Bedeutung der Knochenmarknischen ergibt sich, dass beim MM – einer Erkrankung, die mit der Infiltration des Knochenmarks durch maligne Plasmazellen einhergeht – dem KM-Mikromilieu eine zentrale Rolle im Krankheitsprozess zukommt. In diesem Zusammenhang rücken die Interaktionen zwischen Myelomzellen und hämatopoetischen bzw. mesenchymalen Stamm- und Vorläuferzellen zunehmend in den Fokus wissenschaftlicher Untersuchungen. Schematisch sind diese Interaktionen in Abb. 6 dargestellt.

Das KM-Mikromilieu nimmt eine essentielle Rolle für das Wachstum, Überleben und die Resistenz der MM-Zellen gegenüber Medikamenten ein: Die MM-Zellen sowie weitere Zellen des KM-Mikromilieus, insbesondere die MSPZ, sezernieren Zytokine und

Wachstumsfaktoren, die auf Proliferation, Überleben, Migration und Therapieresistenz der MM-Zellen einen erheblichen Einfluss ausüben [9, 107]. Die Sekretion dieser Faktoren wird dabei verstärkt durch Zell-Zell-Kontakte sowie durch positive *Feedback*-Mechanismen, bei denen die Sekretion eines Stoffs die eines weiteren begünstigt [9].

Die malignen Zellen scheinen sich hierbei etablierter Achsen der Knochenmarknischen zu bedienen und somit die fein regulierte Kommunikation innerhalb dieser zu stören und aus dem Gleichgewicht zu bringen. Dabei leisten vor allem die MSPZ, aber auch die anderen Zellen des Knochenmarks wie Osteoblasten, Osteoklasten, Endothelzellen, Stromazellen, Fibroblasten, Adipozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und Lymphozyten einen Beitrag zur Pathogenese des MM [108].

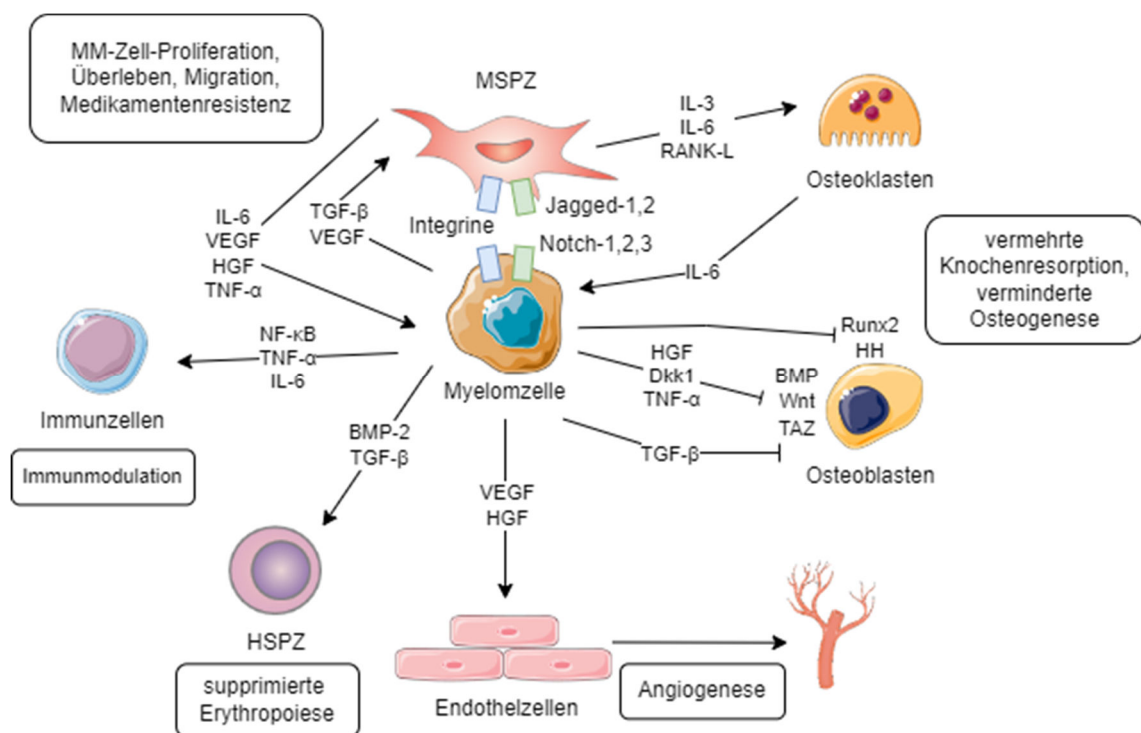


Abb. 6: Die Myelomzelle und ihre Interaktionen mit Bestandteilen des Knochenmark-Mikromilieus. BMP (Bone Morphogenetic Proteins), Dkk1 (Dickkopf 1), HGF (Hepatocyte Growth Factor), HH (Hedgehog), HSPZ (hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen), IL (Interleukin), MM (multiples Myelom), MSPZ (mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen), NF- κ B- (Nuclear Factor 'kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-Cells), RANK-L (RANK-Ligand), RUNX2 (Runt-Related Transcription Factor), TAZ (Transcriptional Co-Activator with PDZ-Binding Motif), TGF- β (Transforming Growth Factor beta), TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), Wnt (Wingless Int-1). Abb. modifiziert nach Podar *et al.* [9] und erstellt mit Servier Medical Art von Servier und www.diagrams.net.

Die Ansiedlung der malignen Plasmazellen im Knochenmark wird unter anderem über den Chemokinrezeptor CXCR4 und seinen Liganden CXCL12 reguliert [109], der auch auf den Verbleib der HSPZ im KM einen entscheidenden Einfluss ausübt (Kap. 1.1.2). Über diese Achse können die MM-Zellen, die CXCR4 auf ihrer Oberfläche tragen, mit den Zellen der Knochenmarknische in Verbindung treten [110], da CXCL12 von MSPZ, Endothelzellen, Osteoblasten und MM-Zellen selbst exprimiert wird [52, 111-113].

Die MM-Zellen sind hierbei auf die Präsenz der im Knochenmark vorkommenden Zellen angewiesen [9]: So heften sich die MM-Zellen zunächst innerhalb des Knochenmarks an, indem sie mit den MSPZ und Extrazellulärproteinen wie Fibronektin und Kollagen über Adhäsionsmoleküle interagieren (u. a. VLA-4 = *Very Late Antigen 4*, CD44, ICAM = *Intercellular Adhesion Molecule 1*, VCAM = *Vascular Cell Adhesion Molecule*) [108, 114]. Diese Adhäsion wirkt sich auf die Krankheitsprogression und ihre Prognose aus, beispielsweise indem eine durch Medikamente induzierte Apoptose verhindert und somit ein Überlebensvorteil der neoplastischen Zellen generiert wird (sogenannte CAM-DR = *Cellular Adhesion-Mediated Drug Resistance*) [115, 116].

Über die Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie die direkte Zelladhäsion werden sowohl in den Tumorzellen als auch in den MSPZ Signalkaskaden aktiviert. Dies führt unter anderem zu einer gesteigerten Sekretion proliferativer, antiapoptotischer und chemotaktischer Zytokine, dazu gehörend IL-6 (Interleukin-6), CXCL12, IGF-1 (*Insulin-Like Growth Factor*), TNF- α (*Tumor Necrosis Factor alpha*), NF- κ B- (*Nuclear Factor 'kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-Cells*) und VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), welche wiederum den Fortschritt der Erkrankung begünstigen [108, 114, 117]. Die von den MSPZ sezernierten Stoffe triggern auch Aktivierungswege wie Jagged/Notch, welche mit vermehrter Proliferation der MM-Zellen und verstärkter IL-6-Sekretion assoziiert werden [118]. Die Produktion von VEGF durch die MSPZ regt die Angiogenese an, wodurch das Sauerstoffangebot für die Myelomzellen gesteigert wird. Eine hohe Kapillardichte als Indikator für Angiogenese korreliert klinisch mit fortschreitender Erkrankung und einer schlechteren Prognose [119].

Aufgrund der aktivierten Signalkaskaden sezernieren neben den MSPZ, T-Zellen, gesunden B-Zellen und Monozyten auch die malignen Plasmazellen selbst vermehrt IL-6, was wiederum die Zytokinproduktion der MSPZ erhöht [120]. Es entsteht ein positiver *Feedback*-Mechanismus, der die Krebszellen bei der Proliferation und ihrem Widerstand gegenüber apoptotischen Signalen unterstützt [121-123].

Insgesamt führen die Adhäsionsprozesse zu einer festen Verankerung der Krebszellen im Knochenmark, wo eine kontinuierliche Stimulation mit den für sie wichtigen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen gewährleistet ist [124].

Angesichts des Ursprungs des MM im Knochenmark ist davon auszugehen, dass Störungen der zellulären und molekularen Kommunikation innerhalb der Knochenmarknischen die physiologischen Prozesse der Hämatopoiese und Osteogenese erheblich beeinträchtigen. Diese pathophysiologischen Prozesse werden in den folgenden Kapiteln behandelt.

1.2.6 Die gestörte Hämatopoiese beim multiplen Myelom

Bei Erstdiagnose des MM wird bei 73 % der Patienten bereits eine Anämie festgestellt [125], circa 40 % stellen sich mit Fatigue-Symptomen aufgrund der Anämie vor [93]. Das Vorhandensein der Anämie gilt als ausreichendes Kriterium für eine Behandlungsindikation. Der exakte Ablauf hinter der unterdrückten Hämatopoiese ist bisher nicht gänzlich erforscht [126]. Bekannte Mechanismen sind unter anderem direkte zytotoxische Effekte der MM-Zellen auf HSPZ [127, 128] sowie die physische Verdrängung der HSPZ aus ihrer Stammzellnische im Knochenmark durch infiltrierende MM-Zellen [129].

Veränderung im MM	Auswirkung auf die Hämatopoiese
veränderte Aktinstruktur, reduzierte CD44-Expression der HSPZ [126]	reduzierte Adhäsion und Migration der HSPZ [126]
vermehrte TGF- β -Aktivität in HSPZ, am ehesten bei erhöhter Sekretion durch Plasmazellen und MSPZ [126]	supprimierte Erythropoiese, antiproliferative Effekte auf HSPZ [126]
reduzierte EPO-Produktion bei Nephropathie [130]	Apoptose EPO-abhängiger HSPZ [131, 132]
erhöhte Hepcidin-Sekretion durch vermehrte BMP2-Produktion von MM-Zellen [133]	hemmt Eisenaufnahme für Hämoglobinproduktion [132]

Tabelle 3: **Beobachtete Veränderungen des Knochenmark-Mikromilieus des Multiplen Myeloms mit einhergehender insuffizienter Hämatopoiese.** BMP = *Bone Morphogenic Protein*, EPO = Erythropoietin, HSPZ = hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen, MSPZ = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen, TGF- β = *Transforming Growth Factor β* .

Bereits bekannte respektive diskutierte Veränderungen, die zu der Entstehung einer Anämie bei Patienten mit MM beitragen, sind schematisch in Tabelle 3 dargestellt.

Bruns *et al.* beschrieben im Knochenmark von MM-Patienten nicht nur einen quantitativ verminderten Anteil an HSPZ, sondern auch eine qualitative funktionelle Beeinträchtigung. Diese zeigte sich insbesondere mit Blick auf die Selbsterneuerungskapazität als auch auf die proliferative Aktivität der HSPZ mit einem verminderten Migrations- und Adhäsionspotential und vermehrtem Zellzyklusarrest verglichen mit HSPZ gesunder Spender [126]. Bruns *et al.* berichten darüber hinaus von einer signifikant eingeschränkten Unterstützung der HSPZ durch MSPZ von MM-Patienten. Dieser Effekt konnte durch TGF- β -Blockade rückgängig gemacht werden.

Bruns *et al.* gehen davon aus, dass die HSPZ der MM-Patienten keinen malignen Phänotyp per se besitzen und fanden heraus, dass bei Transplantation von MM-HSPZ in gesundes Knochenmark die Differenzierungsfähigkeiten der HSPZ wiederhergestellt waren. Dies spricht dafür, dass die MM-HSPZ einer reversiblen funktionellen Störung bedingt durch MM-verursachte Einflüsse auf das Mikromilieu erliegen [126].

1.2.7 Die gestörte Osteogenese beim multiplen Myelom

Die Auswirkungen invadierender MM-Zellen im Knochenmark spiegeln sich außerdem in einer Manipulation der Knochensubstanz wider. Insgesamt trägt das durch das MM veränderte KM-Mikromilieu zu einer verminderten Osteoblastenaktivierung und verstärkten Osteoklastenbildung mit gesteigerter Fähigkeit ihrerseits zur Knochenresorption bei [134, 135].

Für MSPZ von MM-Patienten im Vergleich zu MSPZ gesunder Spender wurden verminderte osteogene sowie adipogene und chondrogene Differenzierungskapazitäten beschrieben. Die Zellen proliferierten insgesamt langsamer und gingen früher in einen Zellzyklusarrest über [126].

Einige der erforschten Mechanismen, die zur Entstehung der sogenannten *Myeloma Bone Disease* (dt. Myelom-Knochenkrankheit) beitragen, bei der Patienten über einen massiven Knochenabbau klagen, sind in Tabelle 4 dargestellt. Dabei wird deutlich, dass die verschiedenen Signalwege, die bereits in Kapitel 1.1.4 über die Osteogenese erläutert wurden, im Mikromilieu des MM Veränderungen unterliegen, die zu einer Einschränkung der Osteogenese führen.

Veränderter Signalweg im MM	Knochenstoffwechsel im MM
BMP-Inhibition durch vermehrt exprimiertes HGF [136]	
TGF- β -induzierte Unterbrechung der Osteoblastendifferenzierung im MM-Mikromilieu [137]	
vermehrte Aktivierung von Notch-Isoformen, die die Osteoklastogenese stimulieren [138]	vermehrte Osteoklastenentwicklung
Wnt-Antagonisierung durch Dkk1 [139, 140]	inhibierte Osteoblastenentwicklung
HH-Inhibition durch Gli-Inhibition [141]	
unterdrückte TAZ-Expression durch TNF- α	
unterdrückte RUNX2-Aktivität [142]	

Tabelle 4: **Veränderungen des Knochenmark-Mikromilieus, die zur eingeschränkten Osteogenese im Multiplen Myelom beitragen.** BMP = *Bone Morphogenic Protein*, Dkk = *Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor*, Gli = *Glioma-associated Oncogene*, HGF = *Hepatocyte Growth Factor*, HH = *Hedgehog*, RUNX = *Runt-related Transcription Factor*, TAZ = *Transcriptional Co-Activator with PDZ-Binding Motif*, TGF- β = *Transforming Growth Factor β* , TNF- α = *Tumor Necrosis Factor α* , Wnt = *Wingless Int.*

1.3 Lenalidomid und das Knochenmark-Mikromilieu: Stand der Forschung

Die IMiDs besitzen pleiotrope Eigenschaften, die sie gegen das MM einsetzbar machen. Die Ergebnisse bisheriger Studien weisen auf immunmodulatorische [143, 144] sowie antiangiogenetische [145] und antiproliferative [146] Wirkmechanismen hin. Diese werden in Abb. 7 veranschaulicht.

Ein zentraler Bestandteil des Wirkmechanismus von Lenalidomid besteht in der Unterbrechung der Interaktionen zwischen malignen Plasmazellen und der Knochenmarknische: So wird insbesondere die Zytokinproduktion sowie die Expression der Adhäsionsmoleküle durch Lenalidomid deutlich heruntergefahren [123]. Es erfolgt einerseits eine direkte Hemmung der Adhäsion von MM-Zellen an MSPZ über eine Reduktion der CXCL12-Sekretion von MSPZ, sodass die CXCR4/CXCL12-Achse (Kap. 1.2.5) nicht mehr greifen kann [147]. Daneben reguliert Lenalidomid die Expression verschiedener für das Überleben der Tumorzellen wichtiger Zytokine herunter, die auch

in der Inflammation eine Rolle spielen (darunter IL-6, IL-1 β , IGF-1, VEGF und TNF- α) [148-151]. Folglich reduziert sich die Anzahl an Adhäsionsmolekülen wie VCAM1 und ICAM1 für die Interaktion zwischen MM-Zellen und MSPZ [152]. Mittels dieser Inhibierungen sowie der Herunterregulation der verschiedenen Zytokine und löslichen Faktoren schafft es Lenalidomid, einen entscheidenden Teil des positiven *Feedback*-Mechanismus zu durchbrechen, der die Proliferation und den Überlebensvorteil der malignen Plasmazellen fördert [153].

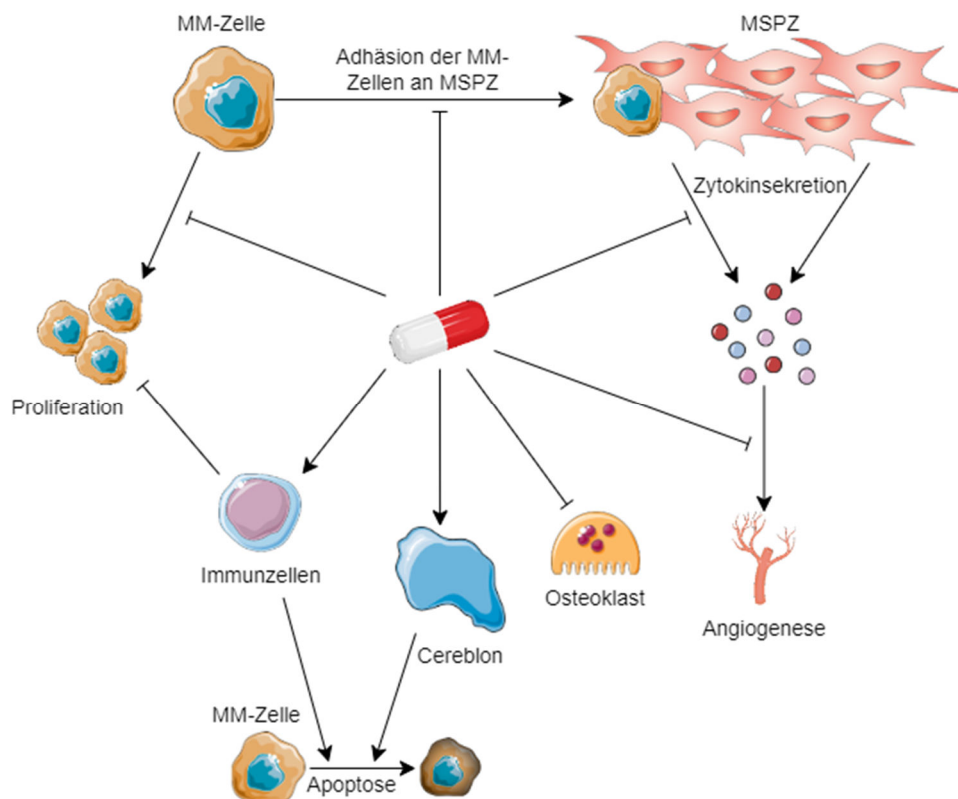


Abb. 7: Lenalidomid hemmt die Interaktion von Myelomzellen und mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen. Unter Lenalidomidbehandlung wird die Zytokin-Sekretion aus MM-Zellen sowie MSPZ erheblich eingeschränkt. Dies hat einerseits eine verminderte Adhäsion von Myelomzellen an die MSPZ sowie andererseits eine fehlende Unterstützung der Proliferation der Tumorzellen und der Angiogenese zur Folge. Der positive *Feedback*-Mechanismus, mit dem die Myelomzellen ihre eigene Proliferation und ihr Überleben sichern, wird so unterbrochen. Lenalidomid unterstützt Cereblon bei der Ubiquitinierung von Aiolos und Ikaros. T-Zellen und natürliche Killerzellen werden aktiviert und üben Antitumoreffekte aus. MM-Zelle = Myelomzelle, MSPZ = Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen. Abb. erstellt mit Servier Medical Art von Servier und www.diagrams.net.

Die reduzierte Adhäsion von Tumorzellen an MSPZ entzieht den MM-Zellen die proliferativen und antiapoptotischen Signale, sodass Lenalidomid ebenfalls dazu

beitragen kann, die CAM-DR zu überwinden und somit wieder das Ansprechen der Patienten auf weitere Medikamente zu steigern [154].

Als essentielles Zielprotein von Lenalidomid wurde Cereblon (CRBN) identifiziert, eine Schlüsselkomponente des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes [155]. Durch Bindung von Lenalidomid wird die durch CRBN induzierte Ubiquitinierung und daraus folgende Degradierung der Zinkfingerproteine Aiolos (IKZF3) und Ikaros (IKZF1) verstärkt [156, 157]. IKZF1 und IKZF3 spielen eine wichtige Rolle bei der B-Zell-Differenzierung und sind in MM-Patienten vermehrt exprimiert [158]. Der Abbau von IKZF1 und IKZF3 scheint zytotoxische Effekte auf die Myelomzellen auszuüben, insbesondere durch Herabregulierung der Proteine *IFN Regulatory Factor 4* (IRF4) sowie MYC [159, 160].

Lenalidomid und andere IMiDs können auch bei Patienten mit einer Resistenz gegenüber der konventionellen Chemotherapie und Rezidiven unter Therapie eingesetzt werden [93]; doch auch gegenüber Lenalidomid kann es zu einer Resistenzentwicklung kommen. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind noch nicht gänzlich geklärt. Einen Beitrag dazu leisten unter anderem Veränderungen im KM-Mikromilieu [161], das Hyaluronsäure-Bindeprotein CD44 [162], Cereblon-Mutationen und eine verstärkte IL-6-Sekretion [163].

1.3.1 Lenalidomid und die Hämatopoiese

Die Hämatopoese gehört zu den zentralen Funktionen des Knochenmarks, wird jedoch im Rahmen des MM infolge der malignen Infiltration erheblich beeinträchtigt. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob und in welchem Ausmaß Lenalidomid die Hämatopoese beeinflusst.

Wilk *et al.* untersuchten in einer Studie, wie sich eine sechsmonatige Lenalidomidbehandlung auf die Hämatopoese von Patienten nach Chemotherapie und Stammzelltransplantation auswirkt. Hierbei fanden sie bei gleichbleibender Zahl an CD34⁺-HSPZ eine Verschiebung mit einer verminderten Myelopoese und einer erhöhten Erythropoese unter Lenalidomidbehandlung *in vivo*. Darüber hinaus beschrieben sie ein erhöhtes fetales Hämoglobin mit folglich unreiferen erythroiden Zellen [164]. Ferner konnten sie zeigen, dass eine Lenalidomidtherapie durch eine Blockade des TGF- β -Signalwegs, welcher die HSPZ in einem Ruhezustand hält (s. 1.1.2), die Erythropoese fördert [164]. Als weiterer Mechanismus der Förderung der Erythropoese wird die supprimierte TNF- α -Produktion unter Lenalidomid diskutiert, welches die Erythropoese inhibiert [165-167].

Konträr dazu sahen Koh *et al.* unter Pomalidomid-Behandlung (ein weiteres IMiD und Thalidomid-Analogon) *in vitro* in HSPZ aus gesunden Spendern eine Verlagerung hin zu verstärkter Myelopoiese und unterdrückter Erythropoiese, unter anderem durch Herunterregulierung von GATA1 (GATA Bindeprotein 1, einem essentiellen regulatorischen Protein der Erythrozytenentwicklung und -funktion [168]) [169].

Insgesamt fällt bei ungefähr 5 % der Patienten unter Lenalidomid-Behandlung eine Anämie als Nebenwirkung auf [170]. Im klinischen Alltag wird teilweise eine Besserung der Anämie mit einem Anstieg des Hämoglobin-Werts unter Lenalidomid-Behandlung beobachtet [171], wobei unklar ist, ob Lenalidomid direkte pro-hämatopoietische Effekte ausübt oder ob indirekte Effekte durch eine Reduktion der Tumorlast überwiegen.

1.3.2 Lenalidomid und die Osteogenese

Ein Großteil der MM-Patienten klagt über osteolytische Knochenläsionen, die nicht nur Schmerzen und einen Stabilitätsverlust verursachen, sondern auch weitere systemische Folgen nach sich ziehen, beispielsweise durch einen erhöhten Calcium-Gehalt im Blut und daraus folgender Nierenfunktionseinschränkung (Kap. 1.2.3). Daher ist eine mögliche medikamentöse Verlangsamung oder sogar Unterbrechung des Knochenabbaus von großer therapeutischer Relevanz.

Ein günstiger Effekt Lenalidomids auf den Knochenstoffwechsel wird durch verschiedene Publikationen dargestellt: So hemmt Lenalidomid die Bildung von Osteoklasten und damit die Knochenresorption [172-174]. Ob Lenalidomid hingegen auch die Osteogenese fördert, wird kritisch diskutiert: Es existieren sowohl einige Fallberichte und *in vitro* Studien, die eine induzierte Knochenbildung durch Lenalidomid beschreiben [175, 176], als auch solche, die für Lenalidomid lediglich die Hemmung der Osteoklastenbildung ohne pro-osteogene Effekte nachweisen konnten [177].

Neben einer direkten Inhibition der Osteoklastenreifung und ihrer Aktivierung [178] wurde außerdem unter Lenalidomidbehandlung eine reduzierte Aktivierung des Notch-Signalwegs über die MSPZ beobachtet, was zu erhöhter Expression osteogener Proteine führte [176].

1.4 Ziel der Arbeit

Das KM-Mikromilieu spielt eine entscheidende Rolle bei der Proliferation und dem Überleben der MM-Zellen im Knochenmark sowie für den Fortschritt der Erkrankung. Ein Großteil der MM-Patienten leidet bereits bei Erstdiagnose oder im Verlauf der Erkrankung an einer Anämie sowie an osteolytischen Knochenläsionen. Die

Mechanismen, die hierzu führen, sind bisher noch nicht gänzlich verstanden (Kapitel 1.2.6 und 1.2.7). Mit dieser Arbeit soll ein Beitrag zu einem besseren Verständnis der Pathogenese hinter Anämie und Knochenläsionen sowie den generellen Veränderungen des KM-Mikromilieus bei MM-Patienten geleistet werden, um Abläufe ausfindig zu machen, die zukünftig womöglich in Therapien unterdrückt werden könnten. Hierfür werden HSPZ sowie MSPZ von MM-Patienten mit HSPZ und MSPZ von gesunden Probanden hinsichtlich ihrer funktionellen und molekularbiologischen Eigenschaften verglichen.

Lenalidomid stellt ein essentielles Medikament in der Behandlung des MM dar, welches sowohl das progressionsfreie als auch das gesamte Überleben der Patienten nachweislich verlängert. Inwiefern Lenalidomid auf die EZM des Knochenmarks und dabei insbesondere auf die dort ansässigen HSPZ und MSPZ und damit auf die Hämatopoiese und Osteogenese wirkt, ist bisher noch nicht gänzlich beschrieben. Somit ist das Ziel dieser Arbeit, die Effekte von Lenalidomid auf HSPZ und MSPZ von MM-Patienten und somit auch auf das KM-Mikromilieu des MM zu untersuchen. Hierfür werden HSPZ und MSPZ von MM-Patienten mit Lenalidomid inkubiert und dann funktionell und molekularbiologisch mit nativen Zellen verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

Name	Hersteller
Allgemeine Materialien und Chemikalien	
Aqua dest. (destilliertes Wasser)	Fresenius Kabi AG, Homburg
Cryo.s™ Einfrierröhrchen (2 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
Eppendorf Tubes (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Falconröhrchen (15 ml, 50 ml) CELLSTAR®	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Formaldehyd (4 %)	Otto Fischer GmbH, Saarbrücken
Formaldehyd (Methanol Free, 10 % UltraPure)	PolySciences Inc., Warrington, PA USA
PBS pH 7,3	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
SafeSeal-Tips® Premium Line	Biozym, Hamburg
Schottflaschen	DURAN Group GmbH, Wertheim
Stripette® Corning® Costar®	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
Spezifische Materialien und Chemikalien zur MNC-Isolation/CD34⁺- & CD138⁺- Selektion	
Biocoll Separating Solution (Ficoll)	Biochrom AG, Berlin
CD34 ⁺ -MicroBead Kit (human)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD138 ⁺ -MicroBead Kit (human)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure, 0,5 M)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
Humanes Serumalbumin (HSA 5 %)	CSL Behring GmbH, Hattersheim
LSM 1077 Separationsmedium	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Lysepuffer	Zenralapotheke Uniklinik Düsseldorf
MACS® Separation Columns (25 LS Columns)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MidiMACS Magnetischer Zellseparator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Pre-Separation-Filter 0,2 µm	Partec, Münster

Spezifische Materialien und Chemikalien Zellkultur/Zellkulturexperimente	
β-Glucosephosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
Alizarinrot	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
Bottle-Top-Filter (150 ml) Unitear® Corning Inc.	Corning Costar, NY USA
Braun Inject 20 ml mit Luer-Lock	B. Braun, Meisungen
Dexamethason	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, low glucose 1 g/l, high glucose 4,5 g/l)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
FBS (Fetal Bovine Serum)	Biochrom AG, Berlin
FLT3 (FMS-related Tyrosine Kinase 3)	Peprtech, Rocky Hill, NJ USA
Hydrocortison	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
Interleukin-3 (IL-3)	Peprtech, Rocky Hill, NJ USA
Interleukin-6 (IL-6)	Peprtech, Rocky Hill, NJ USA
Lenalidomid ≥ 95 %	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methylzellulose MethoCult H4434 Classic	StemCell Technologies, Vancouver, Kanada
Minisart® Spritzenvorsatzfilter 0,45 µm	Satorius AG, Göttingen
Myelocult H5100	StemCell Technologies, Vancouver, Kanada
Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
RPML-1640 (Roswell Park Memorial Institute)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
SCF (Stem Cell Factor)	Peprtech, Rocky Hill, NJ USA
ThinCert™ für 6-Wellplatten	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Zellkulturplatten adhärente Zellen (6-, 12-, 24-Well)	Corning Costar, NY USA
Zellkulturplatten Suspensionszellen (6-, 12-, 24-Well)	Corning Costar, NY USA
Zellkulturflaschen adhärente Zellen (T25 cm ² , T75 cm ²)	Corning Costar, NY USA
Zellkulturflaschen Suspensionszellen (T25 cm ² , T75 cm ²)	Corning Costar, NY USA

Spezifische Materialien und Chemikalien Molekularbiologie	
10 mM dNTP Mix (Desoxyribonukleotidtriphosphate)	Invitrogen™ by life technologies, Carlsbad, USA
5x First Strand Buffer	Invitrogen™ by life technologies, Carlsbad, USA
Ambion® DEPC-Treated Water	Invitrogen™ by life technologies, Carlsbad, USA
DTT 0,1 M (Dithiothreitol)	Invitrogen™ by life technologies, Carlsbad, USA
Eppendorf PCR-Gefäße 0,2 ml	Eppendorf, Hamburg
Ethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol absolut	Merck, Darmstadt
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer (50 µM)	Invitrogen™ by life technologies, Carlsbad, USA
PCR-Reaktionsplatte (96-Well)	Applied Biosystems, Warrington, UK
Phusion® High-Fidelity PCR Kit, Taq DNA Polymerase	Finnzymes/Thermo Scientific, Schwerte
Power SYBR Green PCR Mastermix	Applied Biosystems, Warrington, UK
QIA Shredder	QIAGEN, Hilden
RNase-Free DNase Set	QIAGEN, Hilden
RNaseOUT™ (40 U/µl)	Invitrogen™ by life technologies, Carlsbad, USA
RNeasy Micro Kit	QIAGEN, Hilden
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA
SuperScript® II System for RT PCR (200 U/ µl)	Invitrogen™ by life technologies, Carlsbad, USA
Geräte	
Biofuge® fresco Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Brutschränke/Inkubatoren: Heraeus HERA cell	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Eppendorf Mastercycler® gradient	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop: ZEISS Axiovert 25	ZEISS, Oberkochen
Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

PCR Plattenzentrifuge PerfectSpin P	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Pipetus® Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pippette: Eppendorf Research®	Eppendorf, Hamburg
StepOne Plus™ Real-Time PCR System	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Vortexer REAX top	Heidolph Instruments, Schwabach
Zellzählgerät: CASY® Cell Counter and Analyser System Model TT	OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen

Software

EndNote X9	Clarivate Analytics, Boston, MA, USA
ND-1000 V 3.5.2	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
ImageJ/Fiji	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
BioVoxxel Toolbox	BioVoxxel, Ludwigshafen am Rhein
Office Home & Student 2016 (Excel, Word)	Microsoft, Redmond, WA, USA
GraphPad Prism Version 8.0.0 für Windows	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
SPOT Basic Image Capture Software	Diagnostic Instruments, Inc., Sterling Heights, MI USA
StepOne Software v2.1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

2.2 Primer

Die verwendeten Primer wurden vom hämatologischen Forschungslabor des Universitätsklinikums Düsseldorf unter wissenschaftlicher Leitung von Frau Dr. Stefanie Geyh zur Verfügung gestellt.

Primerpaar	NM-Sequenz	Sequenzen 5'→3'	Annealing-temperatur	Produktgröße [BP]
GAPDH	NM_002046.4	fwd: TGCACCACCAACTGCTTAGC rev: ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT G	60 °C	110
c-kit	NM_000222.2	fwd: GCTCCAATGTGTGGCAGCAG rev: ACATTCAACCGTGCCATTGTG C	60 °C	199
CXCR4	NM_003467.2	fwd: GCATGACGGACAAGTACAGG C rev: GACATGGACTGCCTTGCATA GG	60 °C	131

Tabelle 5: **Auflistung verwendeter Primer.**

2.3 Herkunft der Zellen

2.3.1 Zelllinien

Es wurden die Myelom-Zelllinien RPMI-8226 und INA-6 (Leibniz-institut DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) verwendet.

2.3.2 Primärzellen

In dieser Arbeit verwendete Zellen wurden nach erteiltem Einverständnis der Patienten aus Hüftgewebe von hämatologisch gesunden Patienten, die in der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie des Universitätsklinikums Düsseldorf und des Universitätsklinikums Köln einen Hüftgelenkersatz erhielten und aus Knochenmarksbiopsien von an multiplem Myelom erkrankten Patienten des Universitätsklinikums Düsseldorf gewonnen (Studennummer des Ethikvotums der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Düsseldorf: 2019-511_1). Die Patientencharakteristika sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Hämatologisch gesunde Probanden:	CD34 ⁺ -HSPZ	MSPZ
Anzahl	4	3
Medianes Alter in Jahren (Spanne)	69,5 (59-83)	71 (35-83)
Weiblich	3	2
Männlich	1	1
Myelom-Patienten:	CD34 ⁺ -HSPZ	MSPZ
Anzahl	5	2
Medianes Alter in Jahren (Spanne)	60 (27-68)	61 (50-72)
Weiblich	2	0
Männlich	3	2

Tabelle 6: **Patientencharakteristika der gesunden Probanden sowie der Myelom-Patienten.**

2.3.3 Isolation mononukleärer Zellen aus dem Knochenmark

Zur Isolation der mononukleären Zellfraktion (MNC) aus dem Knochenmark wurde zunächst das Volumen des Knochenmarkaspirats bestimmt und auf 15 ml Ficoll (Dichte 1.077 g/ml, LSM 1077 Separationsmedium, PAA Laboratories GmbH, Cölbe) geschichtet. Durch Dichtegradientenzentrifugation ohne Bremse (835 g/ 20 min/ 20 °C) konnte eine Aufteilung des Knochenmarks in verschiedene Phasen erreicht werden. Hierbei stellte sich die MNC-Fraktion als weißer Ring unterhalb des Plasmas dar (sogenannte Interphase). Die Interphase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues 50 ml Falcon überführt und nach zweimaligem Waschen mit PBS erneut zentrifugiert (305 g, 10 min, 4 °C). Anschließend wurde das Zellpellet von möglichen Erythrozyten bereinigt. Zu diesem Zweck wurde das Pellet in 10 ml 4 °C kalter Ammoniumchlorid-Lösung resuspendiert und für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit MACS Puffer (*Magnetic Activated Cell Sorting*, 500 ml PBS + 1,5 ml HSA (5 %) + 1,5 ml EDTA (0,5 M)) gewaschen und erneut zentrifugiert (305 g, 10 min, 4 °C). Die Zellen wurden erneut in MACS resuspendiert und die Bestimmung der Zellzahl wurde am CASY® Zellzähler TTC ermittelt (2.4.4). Die aufgereinigten MNC wurden entweder zur Generierung von MSPZ (2.3.4) oder zur Isolation von CD34⁺-HSPZ (2.3.5) verwendet.

2.3.4 Generierung Mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen

Für die Generierung der MSPZ wurde das durch Dichtezentrifugation (2.3.3) gewonnene Pellet aus MNC in einer Zelldichte von $0,3 \times 10^6/\text{cm}^2$ in MSPZ-Medium (2.4.3) ausplattiert. Das Medium der Primärkulturen wurde wöchentlich gewechselt, nach circa 14-21 Tagen traten Kolonien hervor (CFU-F), welche gezählt wurden. Die Zellen wurden daraufhin geerntet, die MSPZ wuchsen als *Feederlayer* weiter. Ab Passage 3 wurden die Zellen dann für weitere Experimente verwendet.

2.3.5 Isolation der CD34⁺-HSPZ

Nach der Isolation der MNC aus dem Knochenmarkaspirat (2.3.3) wurden die Zellen zentrifugiert (300 g, 10 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Die Selektion der CD34⁺-HSPZ erfolgte durch magnetische Zellseparation mittels der MidiMACS™-Technik (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) nach dem Protokoll des Herstellers (CD34⁺ MicroBead Kit, human – MACS Cell Separation).

2.4 Zellkulturmethoden

Alle Zellen wurden unter sterilen Bedingungen bei 37 °C/ 21 % O₂/ 5 % CO₂ kultiviert.

2.4.1 Kultivierung der Zelllinien

Für die Zelllinien RPMI-8226 und INA-6 wurden jeweils Zellen mit einer Dichte von $0,03 \times 10^6/\text{cm}^2$ entsprechendem Medium (Tabelle 7) aufgenommen und im wöchentlichen Rhythmus von Montag bis Donnerstag und von Donnerstag bis Montag kultiviert. Jeweils montags und donnerstags wurde die Zellzahl bestimmt (2.4.4) und die Zellen daraufhin erneut ausplattiert oder für weitere Versuche verwendet.

Nährmedium Suspensionszelllinien	
RPMI-1640	89 %
Hitze-inaktiviertes FBS	10 %
Penicillin/Streptomycin/L-Glutamin (PSG, 100 U/ml)	1 %
Zusätzlich für INA-6: Interleukin-6	2,5 ng/ml

Tabelle 7: **Zusammensetzung des Nährmediums für die Zelllinien RPMI-8226 und INA-6.**

2.4.2 Kultivierung der CD34⁺ Hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen

CD34⁺-HSPZ wurden in MyeloCult H5100 mit Zusätzen kultiviert (Tabelle 8). Hierfür wurden die Zellen mit einer Dichte von $4.000/\text{cm}^2$ in 2 ml Medium ausplattiert. Im

Rhythmus Dienstag-Freitag wurden sie gezählt (2.4.4) und für weitere Versuche verwendet.

MyeloCult	
MyeloCult H5100	98,4 %
PSG	1 %
FLT-3	0,2 %
IL-3, IL-6, SCF, Hydrocortison	je 0,1 %

Tabelle 8: **Zusammensetzung des Nährmediums für CD34⁺-HSPZ.**

2.4.3 Kultivierung der Mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen

Für die Kultivierung der MSPZ wurden die MNC wie in 2.3.4 beschrieben in ihrem Nährmedium (Tabelle 9) ausplattiert.

Nährmedium MSPZ	
DMEM low glucose	69 %
Hitze-inaktiviertes FBS	30 %
Penicillin/ Streptomycin/ L-Glutamin (PSG, 100 U/ml)	1 %

Tabelle 9: **Zusammensetzung des Nährmediums für MSPZ.**

Bei einer Konfluenz von 70-80 % wurden die Zellen geerntet und für weitere Versuche und Analysen genutzt. Hierzu wurde zunächst das Medium aufgefangen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit PBS bedeckt und für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Beschichtung mit 1x Trypsin in PBS vor einer weiteren Inkubation von 3 Minuten bei 37 °C. Unter mikroskopisch kontrollierter Ablösung der Zellen von der Zellkulturflasche wurde die Enzymaktivität des Trypsins mittels des zu Beginn aufgefangenen Mediums abgestoppt. Nach Zentrifugation der aufgefangenen Zellen (397 g/ 7 Minuten/ 4 °C) wurden diese in frischem Medium aufgenommen und die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer gezählt bestimmt (2.4.4). Anschließend wurden die Zellen entweder neu ausplattiert oder pelletiert.

2.4.4 Zellzählungen

Die viablen Zellkonzentrationen der Suspensionszelllinien RPMI-8226 und INA-6 sowie der CD34⁺-HSPZ wurden mittels CASY-Zellzähler (OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen) ermittelt. Dieser erfasst die Zellen bei deren Durchtritt einer Messpore mittels elektrischer Signale. Lebende Zellen schließen mit ihrer unversehrten

Zellmembran den elektrischen Strom aus, während die defekte Zellmembran toter Zellen dazu nicht mehr in der Lage ist.

Die Zellzahl der adhärenenten MSPZ wurde mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau (0,4 %) gemischt und auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Abgestorbene Zellen werden hierbei durch Trypanblau angefärbt, da es deren Zellmembran durchdringt, gesunde Zellen werden nicht angefärbt. Die Zellzahl der vier Großquadrate wurde gezählt und anschließend die Gesamtzahl viabler Zellen wie folgt berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{Zellzahl (gezählt)}}{4} \times 2 \times 10.000 \times \text{Volumen (ml)}$$

2.4.5 Kumulative Populationsverdopplung

Die kumulative Populationsverdopplung (*Cumulative Population Doublings*, CPD) der ausplattierten Zellen wurde jeweils berechnet, um Wachstumskurven der Zellen erstellen und untereinander vergleichen zu können.

Für die Populationsverdopplung (PD) wird die aktuell gezählte Anzahl an Zellen (N_0) durch die jeweils zuvor ausplattierte Anzahl an Zellen (X_0) geteilt. Der Logarithmus dieser Zahl geteilt durch den Logarithmus von 2 ergibt die PD. Diese benennt die Anzahl der Populationsverdopplungen zwischen dem Zeitpunkt der Ausplattierung der Zellen und ihrer Ernte. Um die kumulative Populationsverdopplung zu ermitteln, wurden die Populationsverdopplungen durchgehend aufaddiert.

$$PD = \frac{\log(N_0/X_0)}{\log(2)}$$

$$CPD = \sum PD$$

2.5 Zellkulturexperimente

2.5.1 Lenalidomid

Lenalidomid ($\geq 95\%$ 901558-100mg, SIGMA-Aldrich) wurde nach Herstellerangaben in Dimethylsulfoxid (DMSO, SIGMA-Aldrich) gelöst. Nachfolgende Arbeitslösungen wurden ebenfalls mit DMSO angesetzt.

Björklund *et al.* nutzten für Experimente mit Lenalidomid und Myelom-Zelllinien (ANBL-6, KAS-6/1, U266, MM1.S) eine Konzentration von 10 µM [179]. Auf dieser Grundlage und um Effekte bei niedrigeren sowie höheren Konzentrationen zu untersuchen, wurden

in dieser Arbeit Lenalidomid-Konzentrationen von 5 bis 50 μM verwendet. Diese wurden für unterschiedlich lange Zeiträume in das Nährmedium der zu untersuchenden Zellen gegeben, Spezifikationen sind der Tabelle 10 zu entnehmen. Die Zellen wurden anschließend für qRT-PCR-Analysen (2.6.3), CFU-Assays (2.5.3) und osteogene Differenzierungsexperimente (2.5.4) weiterverwendet.

Zellart	Zelldichte, Medium	Lenalidomid-Konzentration	Inkubationszeit
RPML-8226 und INA-6 (für PCR-Auswertung)	1000/cm ² in 7 ml Nährmedium (2.4.1)	5, 10, 50 μM	7 Tage
CD34 ⁺ (für PCR-Auswertung)	0,05×10 ⁶ /cm ² in 2 ml MyeloCult +++++ (2.4.2)	5, 10, 50 μM	7 Tage
CD34 ⁺ (für RNA-Sequenzierung)	0,05×10 ⁶ /cm ² in 2 ml MyeloCult +++++	10 μM	4 Tage
MSPZ (für PCR-Auswertung)	0,01×10 ⁶ /cm ² in 2 ml Nährmedium (2.4.3)	5, 10, 50 μM	7 Tage
MSPZ (für RNA-Sequenzierung)	0,01×10 ⁶ /cm ² in 2 ml Nährmedium (2.4.3)	10 μM	4 Tage

Tabelle 10: **Zellkulturexperimente unter Verwendung verschiedener Zellarten mit ihren jeweiligen Lenalidomidkonzentrationen.**

2.5.2 Langzeitkultur der Myelom-Zelllinien mit Lenalidomid

Um die Wachstumskinetik der Zelllinien RPML-8226 und INA-6 unter Einfluss von Lenalidomid zu untersuchen, wurde die Lenalidomid-Arbeitslösung über 7 Wochen in graduell aufsteigender Konzentration zusätzlich zum Zellmedium hinzugefügt (modifiziert nach Yin *et al.* [180]).

Bei einer Zelldichte von jeweils 40.000/cm² in 20 ml Medium wurde mit einer Lenalidomid-Konzentration von 5 μM begonnen. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt sowie erneut Lenalidomid hinzugegeben. Bei jedem zweiten Mediumwechsel wurde die Lenalidomid-Konzentration um 1 μM erhöht, bis eine Lenalidomid-Konzentration von 10 μM erreicht wurde [179]. Als Kontrolle diente der Trägerstoff DMSO im Medium. Die endgültige DMSO-Konzentration in allen Experimenten betrug maximal 0,1 %.

Nachdem die Lenalidomid-Konzentration von 10 μM erreicht und die Zellen 7 Tage lang mit dieser kultiviert worden waren, wurden diese nachfolgend für CFU-Assays (2.5.3) weiterverwendet.

2.5.3 Colony-Forming Unit-Assay

Für den *Colony-Forming Unit-Assay* (CFU-Assay) wurden pro Kondition 1000 Zellen in 1 ml Methylcellulose aufgenommen und mit einer Zelldichte von 260/cm² als Doublette ausplattiert. Die Randwells wurden freigelassen und mit PBS befüllt, um ein Austrocknen der inneren Wells zu verhindern. Nach einer Inkubationszeit von 14 Tagen wurden die differenzierten Kolonien mikroskopisch (Axiovert 25, Zeiss, Jena 5x/0.12 Ph0) ausgewertet.

Bei der Auswertung wurden CFU-G (*Colony-Forming Unit-Granulocyte*), CFU-M (*Colony-Forming Unit-Macrophage*) und CFU-GM (*Colony-Forming Unit-Granulocyte-Macrophage*) zu „Kolonien der weißen Zellreihe“ zusammengefasst; hierunter fallen demnach Granulozyten- und Makrophagen-Kolonien. CFU-E (*Colony-Forming Unit-Erythroid*) und BFU-E (*Burst-Forming Unit-Erythroid*) wurden zu „Kolonien der roten Zellreihe“ zusammengefasst; hierunter fallen demnach Erythrozyten. CFU-GEMM (*Colony-Forming Unit-Granulocyte, Erythrocyte, Macrophage, Megakaryocyte*) wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl zu Kolonien der weißen als auch der roten Zellreihe gezählt. Dieses Vorgehen wurde gewählt, um die globale hämatopoietische Aktivität zu erfassen ohne den Fokus auf die spezifische Differenzierung zu legen.

2.5.4 Osteogene Differenzierung der Mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen

MSPZ wurden mit einer Zelldichte von 6.000/cm² ausplattiert und bei einer Konfluenz von 50 % mittels Osteoblastendifferenzierungsmedium induziert (Tabelle 11). Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt und nach 14-tägiger Differenzierung der Kalzifizierungsgrad mittels Alizarin Red nachgewiesen.

Zusatz zum Kulturmedium:	
Ascorbinsäure	50 $\mu\text{g/ml}$
β -Glycerolphosphat	10 mM
Dexamethason	10 ⁻⁷

Tabelle 11: **Zusammensetzung des Osteoblastendifferenzierungsmediums.**

2.5.5 Färbung der osteogen differenzierten Mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen

Der Grad der Kalzifizierung wurde mittels Alizarinrot nachgewiesen. Waren Zellen in die osteogene Differenzierung eingetreten, bildeten sie extrazelluläre Matrixproteine (wie Osteocalcin), in welche sich Kalziumphosphat einlagert, welches sich durch Alizarinrot rot anfärbt. Hierzu wurden die Zellen nach einem Waschschriff mit PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit eiskaltem 70 %-igen Ethanol fixiert. Es folgte ein weiterer Waschschriff mit Aqua dest. und daraufhin die 10-minütige Färbung mit Alizarinrot. Im Anschluss folgte ein fünfmaliges Waschen mit Aqua dest. Abschließend wurden die Zellen mit PBS überschichtet und unter dem Lichtmikroskop (Axiovert 25, Zeiss, Jena 5x/0.12 Ph0) ausgewertet (SPOT Basic Image Capture Software).

2.5.6 Bildverarbeitung und -analyse der osteogenen Differenzierbarkeit

Die quantitative Auswertung der osteogenen Differenzierbarkeit der MSPZ erfolgte mittels des Bildverarbeitungspakets Fiji von ImageJ [181] und der BioVoxxel Toolbox [182]. Die osteogen differenzierten Zellen wurden nach oben beschriebener Methode rot angefärbt. Zur quantitativen und objektiven Auswertung der osteogenen Differenzierung wurde die Menge der rot gefärbten Anteile sowie deren jeweilige Intensität als „integrierte Dichte“ berechnet und dann die Konditionen untereinander verglichen. Dafür wurde folgender Makrobefehl genutzt:

```
// Ordnerstruktur anlegen
original = getTitle();
path_from=getDirectory("image");
path_to=path_from+"ausgewertet_selection"+File.separator;
File.makeDirectory(path_to);

// Duplikat vom Originalbild erstellen und Farbkanäle über
Deconvolution auftrennen
selectWindow(original);
run("Duplicate...", "title=Kopie");
selectWindow("Kopie");
run("Colour Deconvolution", "vectors=RGB");

// Rote Bereiche mit Autothreshold auswählen und daraus eine Selection
erstellen
t_red="Kopie"+"-(Colour_1)";
selectWindow(t_red);
// Schwellenwert setzen
run("Auto Threshold", "method=Default");
// Maske erzeugen und anwenden
run("Create Selection");

// Selection auf Originalbild anwenden und Messung ausführen
selectWindow(original);
run("Restore Selection");
run("Measure");
```

```
// Ergebnisse zur weiteren manuellen Überprüfung abspeichern
run("Flatten");
save(path_to+original+" (red with overlay)");
close("*")
```

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 RNA-Isolation

Frisch geerntete Zellen aus der Zellkultur oder Zellen, die bereits als Pellet eingefroren waren, wurden zunächst in RLT-Puffer mit β -Mercaptoethanol (10 μ l β -Mercaptoethanol auf 1 ml RLT-Puffer) lysiert und die RNA anschließend je nach Zellzahl mit dem RNeasy Micro- oder Mini-Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert.

Die extrahierte RNA wurde in RNase-freiem Wasser eluiert und auf Eis gelagert. Die RNA-Konzentration sowie ihre Reinheit (bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von RNA) wurden mittels Nanodrop® ND 1000 ermittelt. Die RNA wurde entweder direkt für die cDNA-Synthese verwendet (Kap. 2.6.2), zur RNA-Sequenzierung genutzt (Kap. 2.6.4) oder bei -80 °C gelagert.

2.6.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden 500-1000 ng der aufgereinigten totalen RNA (Kap. 2.6.1) verwendet. Mittels Oligo dT₁₂₋₁₈ Primer sowie der Superscript II Reverse Transcriptase wurde die isolierte RNA gemäß Herstellerangaben umgeschrieben (Invitrogen, life technologies, Carlsbad, USA).

Der RNA wurde zunächst der Mix I hinzugegeben (Tabelle 12), das Gemisch wurde nach kurzer Zentrifugation fünf Minuten lang bei 65 °C im Thermocycler inkubiert und dann für eine Minute auf Eis gelagert. Anschließend wurde der Mix II hinzugefügt (Tabelle 12), bevor der Mix erneut im Thermocycler inkubiert wurde, zunächst 54 Minuten lang bei 42 °C, danach 15 Minuten lang bei 72 °C. Die fertig synthetisierte cDNA wurde dann bei -4 °C gelagert.

Mix I	
RNA (mind. 500 ng)	x μ l
Oligo dT (500 μ g/mL)	1 μ l
dNTPs (10 mM)	1 μ l
DEPC-treated water	ad 12 μ l
Endvolumen Mix I	12 μ l
Mix II	
5xFS Puffer	4 μ l
DTT (100 mM)	2 μ l
RNaseOUT (40 U/ μ L)	1 μ l
SuperScript II	1 μ l
Endvolumen Mix II	8 μ l
Endvolumen gesamt	20 μl

Tabelle 12: Zusammensetzung von Mix I und Mix II für cDNA-Synthese aus RNA.

2.6.3 Quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion

Die quantitative Realtime-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR und kann zusätzlich zur Quantifizierung der Produkte herangezogen werden. Diese Quantifizierung erfolgt mittels Fluoreszenz-Messungen, die pro Zyklus in Echtzeit (*real time*) vorgenommen werden. Dabei entsteht eine proportionale Zunahme der Fluoreszenz mit steigendem PCR-Produkt.

Es wurde der Step One Plus™ Realtime Cyclor verwendet. Außerdem verwendet wurden der Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK) sowie oligospezifische Primer zur Analyse.

Jede Kondition wurde als Duplikat in der PCR durchgeführt. Als Referenz diente das Haushaltsgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), als Negativ-Kontrolle wurde DEPC-*treated water* genutzt.

Für die Auswertung der PCR wurde die Step One Software v2 hinzugezogen. Änderungen der relativen Genexpression der untersuchten Proben wurden mittels der Δ CT-Methode errechnet:

$$\Delta CT = CT_{GAPDH} - CT_{Zielgen}$$

$$\text{relative Genexpression} = 2^{\Delta CT}$$

2.6.4 RNA-Sequenzierung

Für die RNA-Sequenzierung wurden die Proben wie in Kap. 2.6.1 beschrieben vorbereitet und bis zur Sequenzierung bei -80 °C gelagert. Die Durchführung der RNA-Sequenzierung sowie die Kontrollen der Rohdaten wurden vom Biologisch-Medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

2.7 Bioinformatische Auswertung 1

Anhand der Rohdaten der fastq-Dateien wurden die differentiellen Genexpressionen (DGE) mittels DESeq2-Daten generiert. Nach der Gruppierung der Proben entsprechend ihrer jeweiligen Versuchsbedingung wurden Multigruppenvergleiche durchgeführt und mithilfe der empirischen Analyse der DGE (Version 1.1, Cutoff = 5) statistisch bestimmt. Die sich daraus ergebenden p-Werte wurden mit Hilfe der FDR-Korrektur (*False Discovery Rate*, dt. Falscherkennungsrate) für Mehrfachtests korrigiert. Ein Gen wurde als signifikant differentiell exprimiert angesehen bei einem FDR p-Wert $\leq 0,05$ sowie einem *Fold Change* $\geq 1,5$ bzw. $\leq -1,5$. Für weitere Vorhersagen erfolgte die QIAGEN *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA, QIAGEN Inc., <https://digitalinsights.qiagen.com/IPA>) [183]. Zur Visualisierung erfolgte die Erstellung von Venn-Diagrammen. Dargestellte Gene, welche differentiell exprimiert und mit jeweiligem Fold Change angegeben wurden, wurden mittels bioinformatischer Auswertung 1 ausgewertet.

2.8 Bioinformatische Auswertung 2

DESeq2-Daten wurden zur Berechnung der differentiellen Genexpression verwendet. Plots der Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis*, PCA) und *Heatmaps* wurden in R mit den Paketen FactoMineR (1.42) und pheatmap (1.0.12) erstellt. Zur Darstellung der involvierten Gen-Sets wurden *Gene Set Enrichment Analysen* (GSEA, Broad Institute, Boston, Massachusetts) generiert. Die *Pathway-Analyse* wurde auf der *Reactome*-Website (<https://Reactome.org/>) durchgeführt. Zur Ergänzung wurde zusätzlich das R-Paket "ReactomePA" verwendet.

Zur Auswahl der in dieser Arbeit gezeigten GSEA (*Gene Set Enrichment Assays*) wurde wie folgt vorgegangen: Zunächst wurden solche Ergebnisse mit einem FDR p-Wert $\geq 0,25$ ausgeschlossen. Daraufhin wurden die signifikanten Ergebnisse nach der Relevanz für das hier untersuchte Thema gefiltert (insbesondere wurden GSEA bezüglich hämatopoietischer und osteogenetischer Eigenschaften sowie bezüglich der EZM betrachtet). Eine repräsentative Auswahl der Ergebnisse wurde in dieser Arbeit gezeigt. Bei thematisch passenden und relevanten GSEA wurden gegebenenfalls auch GSEA mit einem FDR p-Wert $\geq 0,25$ eingeschlossen; dies wurde an der entsprechenden Stelle vermerkt. Die den jeweiligen GSEA zugehörigen Gensets wurden dann mit den DESeq2-Daten (nach bioinformatischer Auswertung 1) verglichen und die jeweiligen signifikant veränderten Gene mit einem *Fold Change* $\geq 1,5$ bzw. $\leq -1,5$ tabellarisch aufgeführt.

2.9 Statistische Auswertungen

Statistische Analysen wurden mittels Prism 8 durchgeführt (GraphPad Software Inc., La Jolla, Kalifornien, USA). Jedes Zellkultur-Experiment wurde mindestens dreimal wiederholt. Quantitative Daten wurden präsentiert als arithmetisches Mittel plus oder minus Standardfehler (*Standard Error of Mean* = SEM). Statistische Unterschiede wurden mittels zweiseitigem ungepaartem studentischem t-Test ermittelt. Sie galten als signifikant ab einem p-Wert $\leq 0,05$ und wurden in Graphiken mit einem Stern markiert. Analog wurden p-Werte von $\leq 0,01$ mit zwei, p-Werte von $\leq 0,001$ mit drei Sternen markiert.

3 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit fokussiert sich auf die Veränderungen des Tumormikromilieus im Knochenmark von MM-Patienten und den hierauf ausgeübten Einfluss von Lenalidomid. Dabei wurde das Medikament Lenalidomid als zentraler Ansatz gewählt, da es zwar einen essentiellen Baustein in der Therapie des MM darstellt, seine Effekte auf das KM-Mikromilieu jedoch bisher nicht vollständig aufgeklärt sind.

Als Bestandteile des KM-Mikromilieus im MM wurden zunächst die MM-Zellen selbst, repräsentiert durch MM-Zelllinien, sowie daraufhin CD34⁺-HSPZ und MSPZ jeweils von gesunden Probanden sowie von MM-Patienten hinsichtlich ihres jeweiligen Wachstums- und Differenzierungsverhaltens nach Inkubation mit Lenalidomid untersucht.

3.1 Effekte von Lenalidomid auf Wachstum und Differenzierung der Myelom-Zelllinien

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene MM-Zelllinien verwendet: die IL-6-unabhängige RPMI-8226 sowie die IL-6-abhängige INA-6. Zunächst wurden die Zelllinien hinsichtlich ihrer Eigenschaften untersucht. Initial waren Versuche zur Dosierung und Dauer der Inkubation mit Lenalidomid erfolgt (Anhang Abb. A 1, Abb. A 2).

Die Zellen wurden in einem Langzeit-Experiment über 7 Wochen kultiviert und mit Lenalidomid oder DMSO als Kontrolle inkubiert. Mittels der Zellzahlen wurden die Populationsverdopplungen (PD, engl. = *Population Doublings*) bestimmt, die Auskunft darüber geben, wie oft die Zellen einer bestimmten Population ihre Zellzahl *in vitro* verdoppelt haben. Zweimal wöchentlich wurde die Zellzahl bestimmt, bevor die Zellen erneut ausplattiert und mit Lenalidomid oder DMSO inkubiert wurden. Dieses Protokoll wurde von Björklund *et al.* zur Erzeugung einer Resistenz der Zelllinien gegenüber Lenalidomid beschrieben [179].

Die mit Lenalidomid behandelten RPMI-8226 zeigten bereits ab Tag 14, die INA-6 ab Tag 18 ein signifikant vermindertes Wachstum im Vergleich zu ihrer jeweiligen DMSO-Kontrolle (Abb. 8 A). Ab Tag 25 zeigte sich wieder ein stetiges Wachstum auch der mit Lenalidomid behandelten Zelllinien, ein Wachstumsstopp trat nicht auf. Dieser Verlauf weist darauf hin, dass die Resistenzerzeugung nach dem Protokoll erfolgreich war.

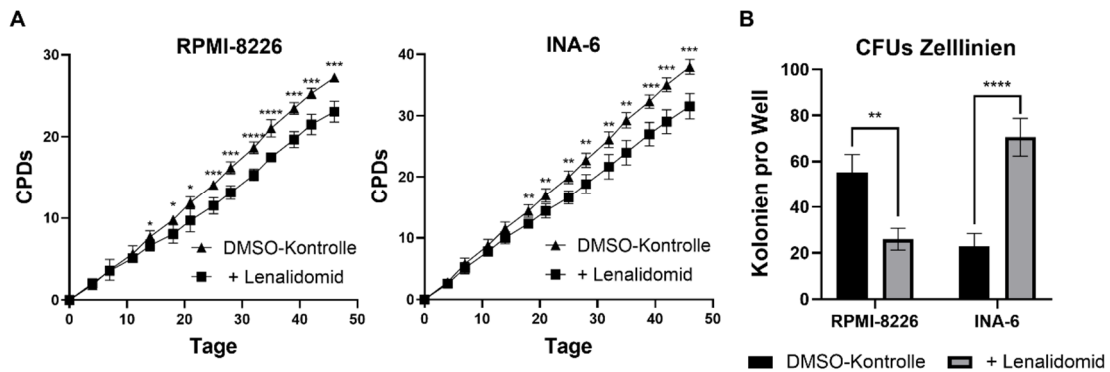


Abb. 8: **Proliferation und Differenzierung der Myelomzelllinien nach Inkubation mit Lenalidomid.** **A** Die Zelllinien RPMI-8226 (links) sowie INA-6 (rechts) wurden in einer Langzeitbehandlung mit Lenalidomid in steigenden Konzentrationen beginnend mit 5 μ M bis zu einer Endkonzentration von 10 μ M behandelt und im Hinblick auf ihre kumulativen Populationsverdopplungen (CPD) verglichen. $n = 5$. **B** Dargestellt ist die CFU-Aktivität von RPMI-8226 und INA-6 hinsichtlich der weißen Kolonien nach einer siebenwöchigen Inkubation mit Lenalidomid in steigenden Konzentrationen von 5 bis 10 μ M im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. $n = 6$ (RPMI-8226), $n = 9$ (INA-6). Dargestellt sind die Mittelwerte der kumulativen Populationsverdopplungen (A) bzw. der weißen Kolonien (B) \pm SEM. Signifikanzen wurden berechnet mit ungepaartem studentischem t-Test: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$; ****, $p < 0,0001$ im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. CFUs = *Colony Forming Units*. CPDs = kumulative Populationsverdopplungen (*Cumulative Population Doublings*).

In einem nächsten Schritt wurde die Auswirkung einer Inkubation mit Lenalidomid auf die Differenzierung der MM-Zelllinien RPMI-8226 (IL-6-unabhängig) und INA-6 (IL-6-abhängig) untersucht. Hierfür wurden die zuvor mit Lenalidomid inkubierten Zellen in Duplikaten in Methylzellulose kultiviert und nach 14 Tagen die Anzahl an gebildeten Kolonien der jeweiligen Konditionen mikroskopisch bestimmt (Abb. 8 B). Die zu erwartenden Kolonien der weißen Blutzellreihe stellten sich in den jeweiligen Zelllinien in ihrer Zahl unterschiedlich stark dar. Insbesondere präsentierten sich signifikante Unterschiede der CFU-Aktivität zwischen RPMI-8226 und INA-6 nach einer Inkubation mit Lenalidomid. Die Linie RPMI8226 zeigte nach Inkubation mit Lenalidomid im Vergleich zur DMSO-Kontrolle eine mehr als zweifach verminderte Bildung von Kolonien der weißen Zellreihe (Kolonien der weißen Blutzellreihe: DMSO-Kontrolle: 55,17 vs. Inkubation mit Lenalidomid: 26, $p = 0,0043$). Für die Linie INA-6 konnte nach Inkubation mit Lenalidomid eine dreifach erhöhte Anzahl der weißen Kolonien im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ermittelt werden (Kolonien der weißen Blutzellreihe: DMSO-Kontrolle: 23 vs. Inkubation mit Lenalidomid: 70,61, $p < 0,0001$).

Zusammenfassend wurde nach Langzeit-Inkubation der MM-Zelllinien mit Lenalidomid nach dem Protokoll von Björklund *et al.* eine Resistenz gegenüber Lenalidomid erzeugt. Die potentiell resistenten RPMI-8226 bildeten nach erneuter Lenalidomid-Inkubation signifikant weniger Kolonien der weißen Zellreihe, während die potentiell resistenten INA-6 nach erneuter Lenalidomid-Inkubation signifikant mehr Kolonien der weißen Zellreihe bildeten.

3.2 Effekte von Lenalidomid auf die Funktionalität des Knochenmark-Mikromilieus des multiplen Myeloms

Um die Effekte von Lenalidomid auf das KM-Mikromilieu des MM näher zu betrachten, wurden MSPZ sowie CD34⁺-HSPZ von gesunden Probanden und MM-Patienten hinsichtlich ihrer funktionellen Eigenschaften untersucht.

3.2.1 Wachstum und Differenzierung der Hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen

Wenngleich eine Anämie zwar eine Nebenwirkung Lenalidomids darstellt, sorgt das Medikament im klinischen Alltag oft für eine Besserung der Anämie-Symptomatik (Kap. 1.3.1). Im Folgenden wurde die Wirkung von Lenalidomid auf die Funktionalität der CD34⁺-HSPZ hinsichtlich Wachstum und Differenzierung untersucht. Als Grundlage für den Vergleich der CD34⁺-HSPZ mit und ohne Inkubation mit Lenalidomid wurden ebenfalls die Unterschiede zwischen CD34⁺-HSPZ von gesunden Probanden und von MM-Patienten untersucht.

CD34⁺-HSPZ wurden für eine Woche mit Lenalidomid oder DMSO zur Kontrolle inkubiert; daraufhin wurde die Proliferation mittels PDs verglichen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Proliferationsverhalten der CD34⁺m (CD34⁺-HSPZ von MM-Patienten) verglichen mit den CD34⁺h (CD34⁺-HSPZ von gesunden Probanden). Nach Inkubation mit Lenalidomid wurde weder für CD34⁺h noch für CD34⁺m eine signifikante Veränderung des Wachstumsverhaltens verglichen mit ihrer jeweiligen DMSO-Kontrollgruppe beobachtet (Abb. 9 A).

Um die CD34⁺-HSPZ von gesunden Probanden und MM-Patienten im Hinblick auf ihre jeweilige Differenzierungskapazität zu vergleichen, wurde ein CFU-Assay durchgeführt (Kap. 2.5.3). Hierbei zeigte sich eine signifikant verringerte Bildung von Kolonien der weißen sowie eine tendentiell verringerte Bildung von Kolonien der roten Zellreihe durch die nativen CD34⁺-HSPZ von MM-Patienten (CD34⁺m) verglichen mit den nativen CD34⁺-HSPZ gesunder Probanden (CD34⁺h, Abb. 9 B weiße Zellreihe, Abb. 9 C rote

Zellreihe). Während CD34⁺h im Schnitt 49,25 weiße Kolonien pro *Well* bildeten, waren es bei CD34⁺m mit 21,67 Kolonien pro *Well* lediglich weniger als die Hälfte ($p = 0,0261$). Im Schnitt bildeten CD34⁺h mit 20,5 Kolonien pro *Well* tendentiell mehr als dreimal so viele Kolonien der roten Zellreihe wie CD34⁺m mit 6,5 Kolonien pro *Well*, wobei dieser Sachverhalt, möglicherweise aufgrund der geringen Probenzahl, nicht signifikant war ($p = 0,0735$).

Für Lenalidomid konnte kein signifikanter Effekt auf die Bildung von Kolonien der weißen Blutzellreihe durch CD34⁺h oder CD34⁺m beobachtet werden (Abb. 9 B). Die Bildung von Kolonien der roten Zellreihe stellte sich reduziert dar (Abb. 9 C): Für CD34⁺h zeigte sich nach Inkubation mit Lenalidomid eine signifikante Verminderung der Koloniebildung (rote Kolonien pro *Well* in CD34⁺h: DMSO-Kontrolle: 3,75 vs. Lenalidomid: 0,25, $p = 0,0038$). Für CD34⁺m zeigte sich keine signifikante Beeinflussung der Bildung von Kolonien der roten Zellreihe durch eine vorherige Lenalidomid-Inkubation (rote Kolonien pro *Well* in CD34⁺m: DMSO-Kontrolle: 3,3 vs. Lenalidomid: 0,4 Kolonien).

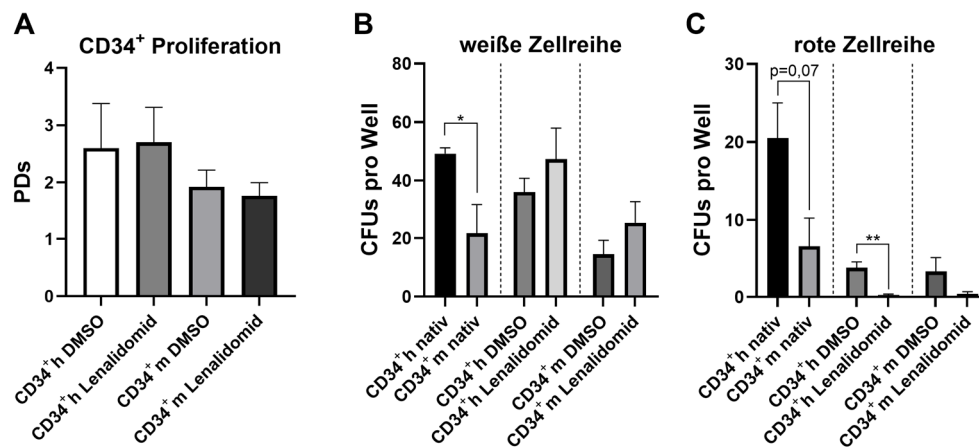


Abb. 9: **Proliferation und Differenzierung der CD34⁺-HSPZ nach Inkubation mit Lenalidomid.** Es wurde jeweils eine Lenalidomid-Konzentration von 10 μ M benutzt. **A** PDs nach einwöchiger Inkubation von CD34⁺h und CD34⁺m mit Lenalidomid bzw. DMSO. $n = 4$. **B** Mikroskopisch ermittelte Anzahl an Kolonien der weißen Zellreihe. **C** Mikroskopisch ermittelte Anzahl an Kolonien der roten Zellreihe. Dargestellt sind die Mittelwerte der Zellzahlen bzw. CFUs pro Well \pm SEM. Signifikanzen wurden berechnet mit ungepaartem studentischem t-Test: *, $p < 0,05$, **, $p < 0,01$. $n = 3$ (CD34⁺h nativ vs. CD34⁺m nativ), $n = 4$ (CD34⁺h Lenalidomid vs. DMSO), $n = 5$ (CD34⁺m Lenalidomid vs. DMSO). CD34⁺h = CD34⁺-HSPZ von gesunden Probanden (*healthy*), CD34⁺m = CD34⁺-HSPZ von Myelom-Patienten (*maligne*), CFUs = *Colony-Forming Units*, Lena = Lenalidomid, PDs = Populationsverdopplungen.

Zusammengefasst wurde kein Unterschied hinsichtlich der Proliferation von CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h beobachtet; hinsichtlich ihrer Funktionalität im CFU-Assay stellten sich CD34⁺m jedoch eingeschränkt dar mit einer signifikant reduzierten Anzahl an Kolonien der weißen sowie einer tendentiell reduzierten Anzahl an Kolonien der roten Zellreihe. Eine Inkubation mit Lenalidomid ergab keine Veränderung der Proliferation in CD34⁺h und CD34⁺m, jedoch eine signifikant eingeschränkte Bildung von Kolonien der roten Zellreihe im CFU-Assay in CD34⁺h.

3.2.2 Wachstum und Differenzierung der Mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen

MSPZ von gesunden Probanden und MM-Patienten wurden *in vitro* mit Lenalidomid in Konzentrationen von 5 bis 50 µM behandelt. Nach 7 Tagen wurde ihre Zellzahl mikroskopisch bestimmt. Es ließ sich weder für MSPZ von gesunden Probanden (MSPZh) noch für MSPZ von MM-Patienten (MSPZm) ein signifikanter Effekt auf die Populationsverdopplungen durch Lenalidomid in diesem Zeitraum feststellen (Abb. 10 A).

Weiterhin wurde die osteogene Differenzierungskapazität von MSPZ von gesunden Probanden und MM-Patienten mit und ohne vorherige Inkubation mit Lenalidomid verglichen (Kap. 2.5.4 und 2.5.5). In Abb. 10 B findet sich eine repräsentative Auswahl an Bildern der osteogen differenzierten MSPZ. Die Bilder wurden quantitativ mit der Bildverarbeitungssoftware Fiji ausgewertet, indem die integrierte Dichte der rot gefärbten, osteogen differenzierten Zellen der jeweiligen Konditionen verglichen wurde. Nach Inkubation mit Lenalidomid wurde weder für MSPZh noch für MSPZm eine relevante Beeinflussung der osteogenen Differenzierbarkeit festgestellt (Abb. 10 C).

Zusammenfassend wurde durch Inkubation mit Lenalidomid weder eine Veränderung der Proliferation der MSPZm oder MSPZh beobachtet, noch zeigte sich ein signifikanter direkter Einfluss auf die osteogene Differenzierung.

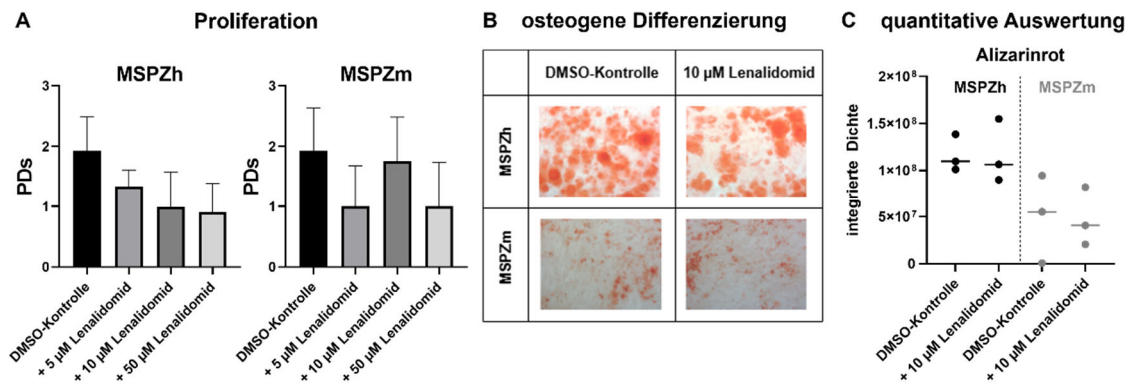


Abb. 10: Proliferation und Differenzierung der MSPZ nach Inkubation mit Lenalidomid. A Eine siebentägige Behandlung mit Lenalidomidkonzentrationen von 5, 10 und 50 µM zeigt keinen signifikanten Effekt auf das Wachstumsverhalten von MSPZ von gesunden Spendern (links, $n = 6$) und MSPZ von Myelom-Patienten (rechts, $n = 3$ für 5 µM und 50 µM Lenalidomid; $n = 5$ für DMSO-Kontrolle und 10 µM Lenalidomid). Dargestellt sind die Mittelwerte der Populationsverdopplungen \pm SEM. **B** Repräsentative Auswahl an Bildern nach induzierter Osteogenese in MSPZh (oben) und MSPZm (unten). Es wurden MSPZ von gesunden Probanden sowie von MM-Patienten (jeweils $n = 3$) mit einer Lenalidomid-Konzentration von 10 µM kultiviert und daraufhin die Osteogenese induziert, als Kontrolle diente DMSO. **C** Objektive Auswertung des Osteogenese-Assays mittels Fiji Bildverarbeitungssoftware. Nach Inkubation mit Lenalidomid wurde weder in MSPZh noch in MSPZm eine signifikante Veränderung der Osteogenese beobachtet. Die einzelnen Punkte stellen die jeweiligen Mittelwerte der berechneten integrierten Dichte der biologischen Replikate dar (jeweils $n = 3$). MSPZh = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von gesunden Probanden (*healthy*), MSPZm = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten (*maligne*), PDs = Populationsverdopplungen.

3.3 RNA-Sequenzierungen von Hämatopoietischen sowie Mesenchymalen Stamm- und Progenitorzellen

Eine Inkubation mit Lenalidomid zeigte in den bisherigen Experimenten keinen signifikanten Effekt auf das Wachstumsverhalten oder die osteogene Differenzierung von MSPZ. Hingegen gelangten signifikant veränderte funktionelle Eigenschaften der CD34⁺-HSPZ durch Inkubation mit Lenalidomid zur Darstellung. Zur weiteren Untersuchung der funktionalen Defizite von CD34⁺-HSPZ von MM-Patienten sowie der Effekte von Lenalidomid wurden im Folgenden CD34⁺-HSPZ und MSPZ auf mRNA-Ebene untersucht, um zugrundeliegende und beteiligte Gene und Signalwege zu identifizieren. Hierfür wurden CD34⁺-HSPZ und MSPZ von gesunden Probanden und MM-Patienten mit Lenalidomid inkubiert und daraufhin eine RNA-Sequenzierung durchgeführt.

Abb. 11 stellt die Hauptkomponentenanalyse (*Principal Component Analysis, PCA*) der CD34⁺-HSPZ sowie der MSPZ für die RNA-Sequenzierung mit und ohne Inkubation mit Lenalidomid dar. Hierfür wurden jeweils CD34⁺-HSPZ und MSPZ von gesunden Probanden und MM-Patienten mit Lenalidomid und in der Kontrollgruppe mit DMSO inkubiert.

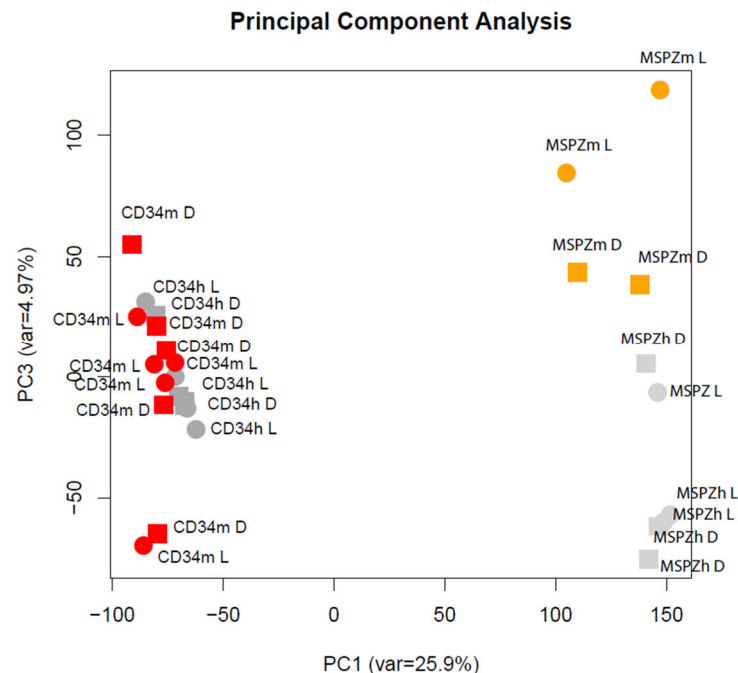


Abb. 11: **Hauptkomponentenanalyse der MSPZ sowie der CD34⁺-HSPZ für die RNA-Sequenzierung.** Hauptkomponentenanalyse oder *Principal Component Analysis*. CD34h = CD34⁺-HSPZ von gesunden Probanden (*healthy*), CD34m = CD34⁺-HSPZ von Myelom-Patienten (*maligne*). n = 4 (CD34h) und n = 5 (CD34m). MSPZh = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von gesunden Probanden (*healthy*), MSPZm = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten (*maligne*). n = 3 (MSPZh), n = 2 (MSPZm). Zusatz „D“ \triangleq Kontrollgruppe nach Inkubation mit DMSO, Zusatz „L“ \triangleq Inkubation mit Lenalidomid.

PCA kann verwendet werden, um die Dimensionalität dieser Daten zu reduzieren, indem sie in einen neuen Raum transformiert werden, der von den sogenannten Hauptkomponenten definiert wird. In der RNA-Sequenzierungs-Analyse kann PCA beispielsweise verwendet werden, um Muster in den Expressionsprofilen von Genen zu identifizieren, die auf verschiedene Bedingungen oder Phänotypen hinweisen können. Es kann auch helfen, potentielle Ausreißer oder unerwünschte technische Variationen zu erkennen, die die Interpretation der Daten beeinflussen können.

In der dargestellten Abbildung ist zu erkennen, dass die unterschiedlichen Zellarten der CD34⁺-HSPZ und MSPZ deutlich voneinander zu differenzieren sind. Die CD34⁺-HSPZ

clusterten untereinander trotz unterschiedlicher Herkunft von gesunden Probanden (dunkelgrau) oder von MM-Patienten (rot) und unabhängig von einer Inkubation mit Lenalidomid zusammen. Dagegen sind die MSPZ von MM-Patienten (gelb) eindeutig von MSPZ von gesunden Probanden (hellgrau) separiert. Eine Inkubation mit Lenalidomid erzeugt lediglich bei MSPZ von MM-Patienten einen neuen Cluster (gelbe Kreise verglichen mit gelben Quadraten).

Die Hauptkomponentenanalyse ergab also für die CD34⁺-HSPZ kaum Unterschiede zwischen Zellen von Erkrankten und gesunden Probanden oder nach Inkubation mit Lenalidomid. Bei den MSPZ zeigte sich ein starkes Clustering zwischen MSPZh und MSPZm. Nach Inkubation mit Lenalidomid zeigten sich lediglich Veränderungen des Clusterings in MSPZm, nicht aber in MSPZh.

3.3.1 Vergleich Hämatopoietischer Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten und gesunden Probanden

CD34⁺m zeigten im CFU-Assay eine signifikant reduzierte Zahl an differenzierten Kolonien sowohl der weißen als auch der roten Zellreihe im Vergleich zu CD34⁺h (Kap. 3.2.1). Um die beobachteten funktionellen Defizite genauer auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurde eine RNA-Sequenzierung der CD34⁺-HSPZ von MM-Patienten sowie von gesunden Probanden mit n = 4 (CD34⁺h) und n = 5 (CD34⁺m) durchgeführt.

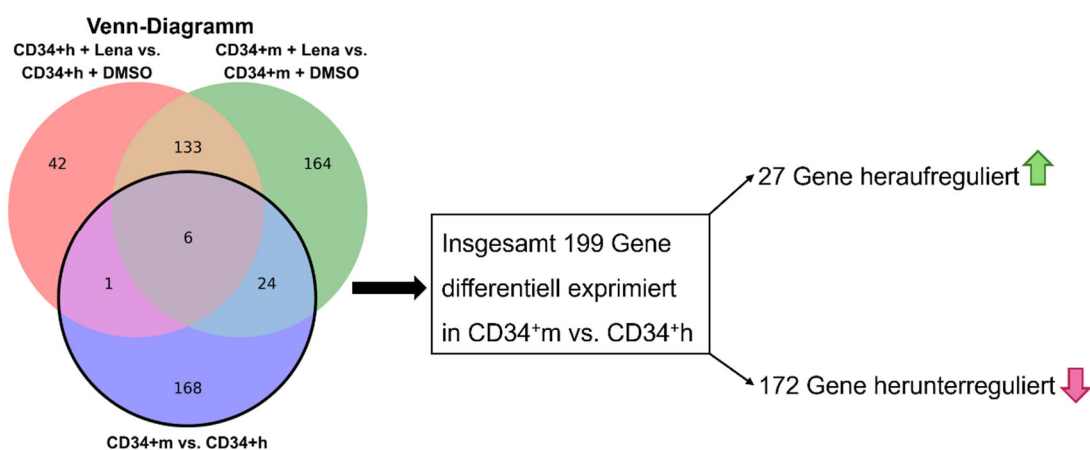


Abb. 12: **Unterschiede in der RNA-Expression von CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h.** Venn-Diagramm: Anzahl an differentiell exprimierten Genen in CD34⁺h und CD34⁺m nativ und nach Inkubation mit Lenalidomid. Das Venn-Diagramm zeigt eine Zusammenstellung der Wirkung von Lenalidomid auf CD34⁺h (roter Kreis) und CD34⁺m (grüner Kreis) sowie der generellen Unterschiede zwischen CD34⁺m und CD34⁺h (blauer Kreis) mit deren jeweiligen Überschneidungen. Signifikanz \triangleq FDR $p \leq 0,05$, *Fold Change* $\geq 1,5$ bzw. $\leq -1,5$. CD34⁺h = hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender, CD34⁺m =

hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten. Lena = Lenalidomid. $n = 4$ (CD34⁺h) und $n = 5$ (CD34⁺m).

Abb. 12 zeigt ein Venn-Diagramm, welches Daten verschiedener Vergleichsgruppen beinhaltet (Vergleich CD34⁺m und CD34⁺h sowie jeweils mit und ohne Lenalidomid). Im Folgenden lag der Fokus zunächst auf dem Vergleich der CD34⁺m mit den CD34⁺h, sodass zunächst lediglich der untere, blaue Kreis mit schwarzer Umrandung betrachtet wird. Im Venn-Diagramm präsentierte sich eine Vielzahl an differentiell exprimierten Genen (Abb. 12, $FDR \leq 0,05$, *Fold Change* $\geq 1,5$ bzw. $\leq -1,5$): Insgesamt waren in CD34⁺-HSPZ von MM-Patienten 199 Gene verglichen mit CD34⁺-HSPZ von gesunden Probanden (DMSO-behandelt) differentiell reguliert (Abb. 12 A, blauer Kreis mit Überschneidungen). Davon waren in CD34⁺m im Vergleich zu CD34⁺h 27 Gene herauf- und 172 Gene herunterreguliert. Die Top 50 der herauf- und herunterregulierten Gene befinden sich im Anhang in Abb. A 3.

Für die weitere Analyse der Daten wurde die *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA, QIAGEN®) genutzt. Diese gab unter anderem sogenannte *Top Canonical Pathways* an, also die kanonischen Signalwege, die am stärksten zwischen den Vergleichsgruppen signifikant verändert waren. Ein *Top Canonical Pathway* in der IPA bezeichnet einen biologisch charakterisierten Signalweg, der in einem Datensatz besonders stark vertreten ist und liefert Hinweise auf zentrale zelluläre Prozesse, die in der untersuchten Bedingung verändert sind. Der sogenannte *Overlap* (Überschneidung) beschreibt den Anteil der in einem Signalweg enthaltenen Gene, die auch im eigenen Datensatz differentiell exprimiert sind und gibt somit Aufschluss über die Relevanz dieses Weges im biologischen Kontext der Analyse. Weiterhin gibt die IPA sogenannte *Top Upstream Regulators* an, also vorgeschaltete Regulatoren, die von der IPA als möglicherweise verantwortlich für die beobachteten Veränderungen der Genexpression in dem Datensatz angesehen werden, mit einer Prognose bezüglich einer Aktivierung oder Inhibierung.

Die *Top Canonical Pathways* sowie die *Top Upstream Regulators* in CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h sind in Abb. 13 dargestellt und zeigten insbesondere eine Beeinflussung von Komponenten des Immunsystems.

Top Canonical Pathways

CD34 ⁺ m vs. CD34 ⁺ h	
Name	Overlap in %
Neutrophil Extracellular Trap Signalweg	7
Alternative Aktivierung von Makrophagen	7,4
Phagosomenbildung	3,5
Adhäsion und Diapedese von Granulozyten	6,3
Signalweg der S100-Familie	3

Top Upstream Regulators

CD34 ⁺ m vs. CD34 ⁺ h	
Name	vorhergesagte Aktivierung
Lipopolysaccharide	inhibiert
TCL1A	keine Vorhersage
IL10	keine Vorhersage
IFNG	keine Vorhersage
IL13	keine Vorhersage

Abb. 13: **Ergebnisse der Ingenuity Pathway Analysis** für Hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen. Dargestellt sind die *Top Canonical Pathways* (kanonische Signalwege) sowie die *Top Upstream Regulators* (vorgeschaltete Regulatoren) für CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h. *Overlap* (Überschneidung) = Anteil der Gene aus dem vorliegenden Datensatz in dem Signalweg an der Gesamtzahl der Gene dieses Signalwegs, CD34⁺h = hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender, CD34⁺m = hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten, IFNG = Interferon gamma, IL = Interleukin, TCL1A = *TCL1 Family AKT Coactivator A*.

Inwiefern die differentielle Genexpression zwischen CD34⁺m und CD34⁺h weitere funktionelle Auswirkungen hatte, wurde durch *Reactome*-Analysen veranschaulicht: Unterschiede zwischen CD34⁺m und CD34⁺h zeigten sich insbesondere mit einer Herunterregulation hinsichtlich der EZM-Organisation sowie der Zell-Zell-Kommunikation (Abb. 14 A, gelb markierte Striche).

Wir erweiterten unsere Auswertungen mit *Gene Set Enrichment Analysen* (GSEA), um die Veränderungen der Genexpression in einen größeren funktionellen Zusammenhang zu bringen. GSEA stellen bildlich solche Gene und Prozesse dar, die in einer großen Gruppe von Genen oder Proteinen signifikant herauf- oder herunterreguliert sind. Zur Interpretation der GSEA wird der *Enrichment Score* (Anreicherungswert) genutzt, welcher das Ausmaß der Anreicherung eines Gensatzes quantifiziert und damit eine Überrepräsentation von Genen angibt. Der *Normalized Enrichment Score* (NES) passt den *Enrichment Score* an die jeweilige Größe des Gen-Satzes an und wird zum Vergleich verschiedener Gen-Sets genutzt. Hier zeigte sich passend zu der *Reactome*-Analyse eine signifikant stärkere Anreicherung von Genen der EZM in CD34⁺h verglichen mit CD34⁺m mit einem hohen NES von 1,92 (FDR q-Wert = 0,009, Abb. 14 B). Selektierte Gene, welche in dem Genset des GSEA zur EZM sowie in den DESeq2-Daten signifikant (FDR $p \leq 0,05$) und mit einem *Fold Change* von $\geq 1,5$ bzw. $\leq -1,5$

differentiell exprimiert waren, sind in Abb. 14 C aufgeführt. All diese Gene wurden in CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h vermindert exprimiert.

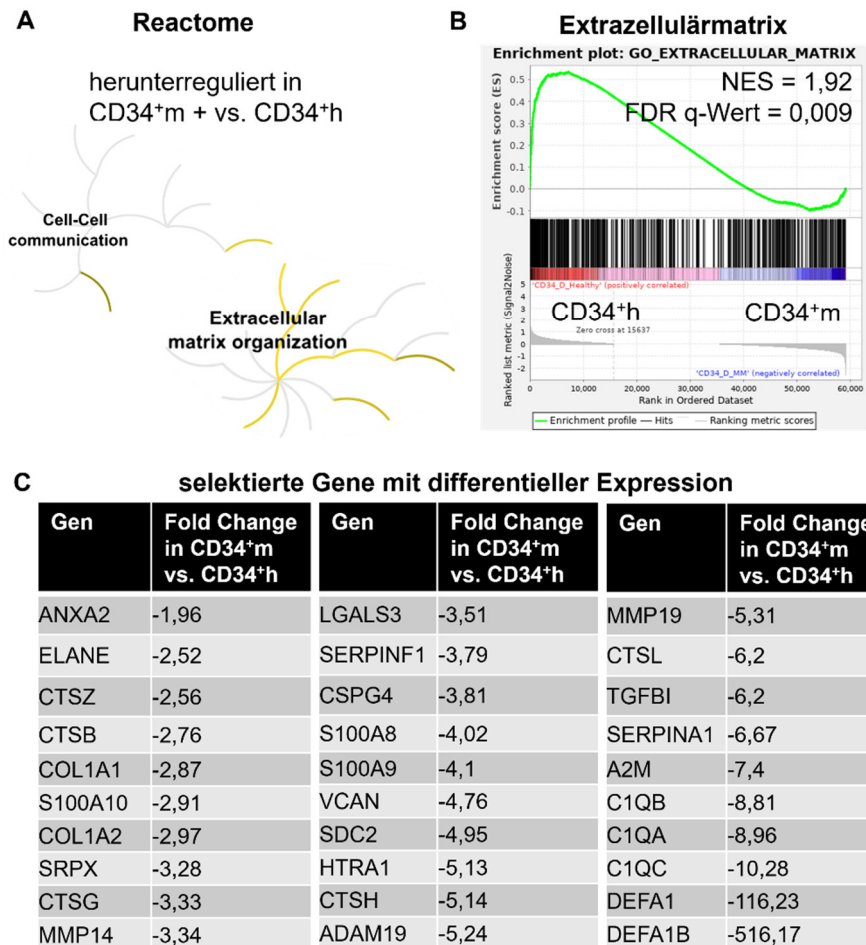


Abb. 14: Expression von Genen der Extrazellulärmatrix in CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h.

A Reactome-Analyse von herunterregulierten Prozessen der Zell-Zell-Kommunikation sowie der EZM-Organisation in CD34⁺m im Vergleich zu CD34⁺h. **B** GSEA veranschaulichen Veränderungen der EZM in CD34⁺m gegenüber CD34⁺h. NES = 1,9178, nominaler p-Wert < 0,001, FDR q-Wert = 0,0085. **C** Gene mit jeweiligem *Fold Change* hinsichtlich der EZM, welche in CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h differentiell exprimiert sind. GSEA und Gene ausgewählt nach Kap. 2.8. Signifikanz \triangleq FDR $p \leq 0,05$. Rot = CD34⁺h, blau = CD34⁺m. CD34⁺h = hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender, CD34⁺m = hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten, EZM = Extrazellulärmatrix, GSEA = *Gene Set Enrichment Analysis*, NES = *Normalized Enrichment Score*. Die aufgelisteten Genabkürzungen entsprechen den standardmäßig benutzten Abkürzungen; die vollständigen Namen der Gene können bspw. unter www.genecards.org nachgeschlagen werden und sind hier zur besseren Übersicht nicht aufgeführt. n = 4 (CD34⁺h) und n = 5 (CD34⁺m).

Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern sich CD34⁺m hinsichtlich ihrer Stammzeleigenschaften verglichen mit CD34⁺h unterscheiden. Hier kamen signifikante Veränderungen hinsichtlich der Stammzeleigenschaften der CD34⁺m verglichen mit den CD34⁺h zur Darstellung (Abb. 15 A links, NES 1,53). Diese veränderten Stammzeleigenschaften spiegelten sich ebenfalls in einem veränderten Häm-Metabolismus wider (Abb. 15 A Mitte). In der funktionellen Untersuchung der CD34⁺-HSPZ zuvor wurde eine signifikant reduzierte Koloniebildung der CD34⁺m verglichen mit den CD34⁺h im CFU-Assay beobachtet (Kap. 3.2.1). Dieser Sachverhalt wurde durch GSEA bestätigt: Es zeigte sich in CD34⁺h verglichen mit CD34⁺m eine Anreicherung von Genen des Häm-Metabolismus mit hohem NES von 1,7. Andererseits scheinen nicht nur die CD34⁺-HSPZ alleine betroffen zu sein, sondern auch die Kommunikationsachse zwischen CD34⁺-HSPZ und dem restlichen KM-Mikromilieu mit den MSPZ: So wurde eine veränderte Expression MSPZ-assoziiierter Gene beobachtet (Abb. 15 A rechts, NES 1,3; FDR q-Wert= 0,114, p-Wert \leq 0,05, aufgrund der Relevanz MSPZ-assoziiierter Gene für das Thema dieser Arbeit hier gezeigt). Spezifische, in CD34⁺m signifikant (FDR $p \leq$ 0,05) vermindert exprimierte Gene assoziiert mit Stammzeleigenschaften, Häm-Metabolismus sowie MSPZ-assoziiierter Gene stellten sich in den DESeq2-Daten dar und sind in Abb. 15 B aufgelistet (nach bioinformatischer Analyse 1, Kap. 2.7).

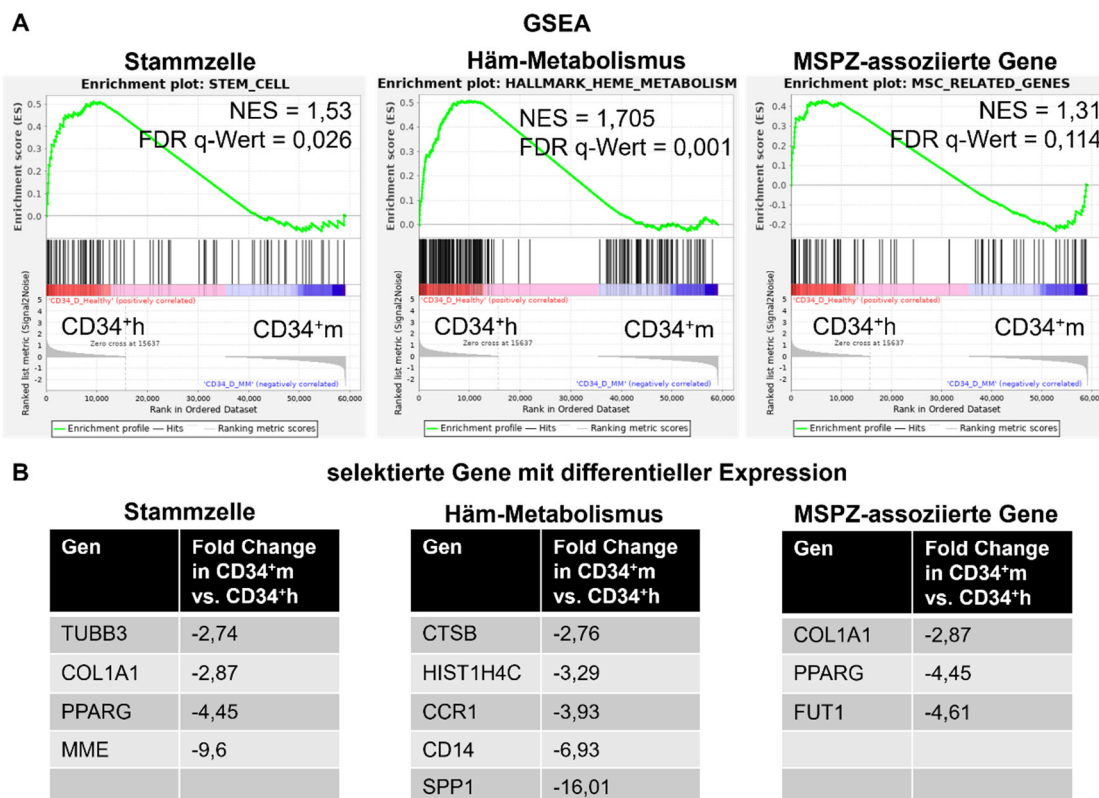


Abb. 15: **Stammzeleigenschaften in CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h.** **A** GSEA veranschaulichen Veränderungen des Knochenmark-Mikromilieus hinsichtlich der Stammzeleigenschaften, des Häm-Metabolismus sowie MSPZ-assoziiierter Gene in CD34⁺m gegenüber CD34⁺h. Stammzelle, NES = 1,527, nominaler p-Wert < 0,001, FDR q-Wert = 0,026. Häm-Metabolismus, NES = 1,705, nominaler p-Wert < 0,001, FDR q-Wert = 0,0014. MSPZ-assoziierte Gene, NES = 1,307, nominaler p-Wert = 0,03, FDR q-Wert = 0,114. **B** Gene mit jeweiligem *Fold Change* hinsichtlich der Stammzeleigenschaften, des Häm-Metabolismus und MSPZ-assoziiierter Gene, welche in CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h differentiell exprimiert sind. GSEA und Gene ausgewählt nach Kap. 2.8. Signifikanz \triangleq FDR $p \leq 0,05$. Rot = CD34⁺h, blau = CD34⁺m. CD34⁺h = hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender, CD34⁺m = hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten, GSEA = *Gene Set Enrichment Analysis*, NES = *Normalized Enrichment Score*. Die aufgelisteten Genabkürzungen entsprechen den standardmäßig benutzten Abkürzungen; die vollständigen Namen der Gene können bspw. unter www.genecards.org nachgeschlagen werden und sind hier zur besseren Übersicht nicht aufgeführt. n = 4 (CD34⁺h) und n = 5 (CD34⁺m).

Folglich stellte sich die Frage, welche Signalwege für diese Veränderungen des KM-Mikromilieus verantwortlich waren. Diesbezüglich veranschaulichten GSEA eine signifikant angereicherte Expression der folgenden, für die Abläufe im KM-Mikromilieu relevanten Signalwege in CD34⁺h im Vergleich zu CD34⁺m: TGF- β -Zielgene

(NES = 1,56, Abb. 16 A), Hedgehog (NES = 1,33) sowie Notch (NES = 1,67), welche jeweils auch für die Hämatopoiese und die Osteogenese eine Rolle spielen (Tabelle 2 in Kap. 1.1.2 und Abb. 3 in 1.1.4). Einzelne Gene der jeweiligen Signalwege mit signifikant reduzierter Genexpression in CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h sind in Abb. 16 B aufgelistet (nach bioinformatischer Analyse 1, Kap. 2.7).

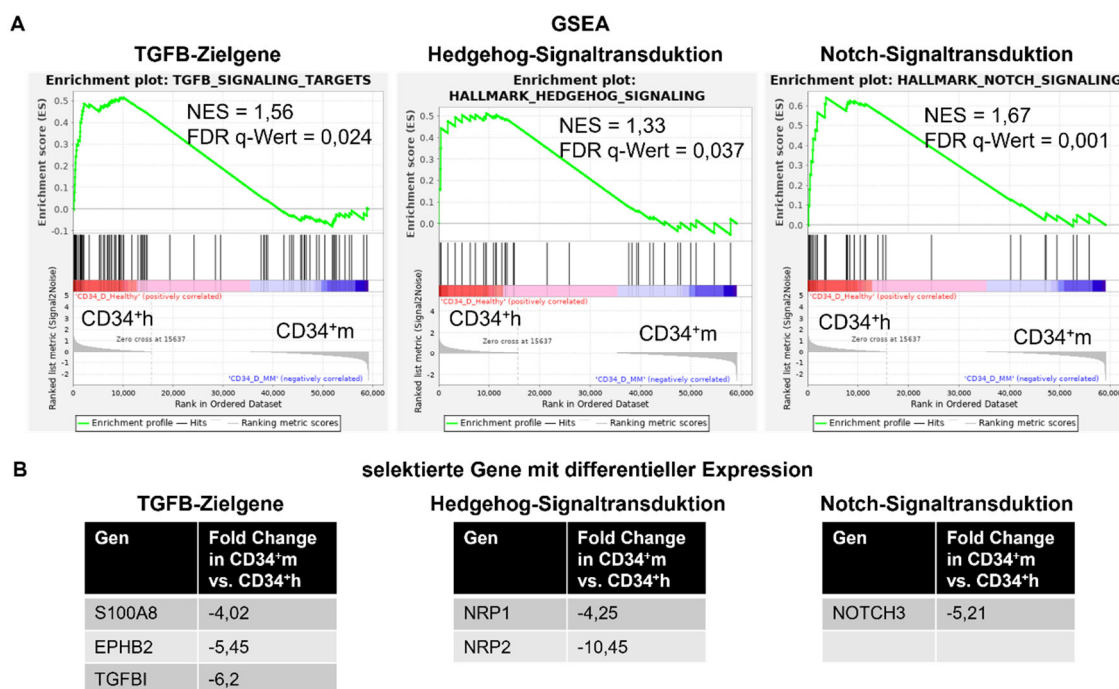


Abb. 16: Die Signalwege TGF- β , Hedgehog und Notch in CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h.

A TGF- β -Zielgene, Hedgehog-Signaltransduktion und Notch-Signaltransduktion in CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h. TGF- β -Zielgene, NES = 1,562, nominaler p-Wert < 0,001, FDR q-Wert = 0,024. Hedgehog-Signaltransduktion, NES = 1,328, nominaler p-Wert = 0,0742, FDR q-Wert = 0,037. Notch-Signaltransduktion, NES = 1,668, nominaler p-Wert = 0,003, FDR q-Wert = 0,001. Rot = CD34⁺h, blau = CD34⁺m. **B** Gene mit jeweiligem *Fold Change*, welche in CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h differentiell exprimiert sind. GSEA und Gene ausgewählt nach Kap. 2.8. Signifikanz \triangleq FDR $p \leq 0,05$. CD34⁺h = CD34⁺-HSPZ von gesunden Probanden (*healthy*), CD34⁺m = CD34⁺-HSPZ von Myelom-Patienten (*maligne*), GSEA = *Gene Set Enrichment Analysis*, NES = *Normalized Enrichment Score*, TGFB/TGF- β = *Transforming Growth Factor-beta*. Die aufgelisteten Genabkürzungen entsprechen den standardmäßig benutzten Abkürzungen; die vollständigen Namen der Gene können bspw. unter www.genecards.org nachgeschlagen werden und sind hier zur besseren Übersicht nicht aufgeführt. n = 4 (CD34⁺h) und n = 5 (CD34⁺m).

Mit den hier gefundenen Veränderungen der Genexpression lassen sich die zuvor beobachteten funktionellen Defizite der CD34⁺m verglichen mit den CD34⁺h erklären: Es zeigte sich eine signifikante Herunterregulation von Genen der EZM-Organisation sowie

der Stammzeleigenschaften, des Häm-Metabolismus und von MSPZ-assoziierten Genen. Die zugehörigen Signaltransduktionswege TGF- β , Hedgehog und Notch stellten sich ebenfalls in ihrer Genexpression verändert dar.

3.3.2 Hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen nach Inkubation mit Lenalidomid

Die Ermittlung der Unterschiede zwischen CD34⁺h und CD34⁺m diene als Grundlage für die nun untersuchten Veränderungen, die eine Inkubation mit Lenalidomid in CD34⁺h sowie CD34⁺m auslöste. Im CFU-Assay wurde bereits eine signifikante Beeinflussung der Bildung von Kolonien der roten Zellreihe durch CD34⁺h nach Lenalidomid-Inkubation beobachtet. Um die Effekte von Lenalidomid weiter zu erforschen, führten wir eine RNA-Sequenzierung von CD34⁺-HSPZ nach Lenalidomid-Inkubation durch.

Im Folgenden lag der Fokus auf den beiden Vergleichsgruppen CD34⁺h + Lenalidomid und CD34⁺m + Lenalidomid jeweils im Vergleich zu ihren Kontrollgruppen mit DMSO. Dafür werden nun von dem bereits bekannten Venn-Diagramm die oberen beiden Kreise mit schwarzer Umrandung betrachtet (Abb. 17 A). Nach Inkubation mit Lenalidomid zeigten sich insgesamt 182 Gene in CD34⁺h (roter Kreis mit Überschneidungen) und 327 Gene in CD34⁺m (grüner Kreis mit Überschneidungen) differentiell exprimiert im Vergleich zur jeweiligen DMSO-Kontrollgruppe. Ausschließlich in der jeweiligen Gruppe differentiell exprimiert zeigten sich für CD34⁺h + Lenalidomid vs. CD34⁺h + DMSO 42 Gene und für CD34⁺m + Lenalidomid vs. CD34⁺m + DMSO 164 Gene.

Es fanden sich einige Überschneidungen der differentiell exprimierten Gene in den jeweiligen Gruppen, diese sind in Abb. 17 B tabellarisch aufgeführt. Demnach führte eine Inkubation mit Lenalidomid zu einer differentiellen Expression von 133 gleichen Genen sowohl in CD34⁺h als auch in CD34⁺m. Eine Inkubation mit Lenalidomid der CD34⁺h führte zur differentiellen Expression eines Gens, welches sich auch in CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h differentiell exprimiert darstellte. Außerdem stellten sich nach Lenalidomid-Inkubation der CD34⁺m 24 Gene differentiell exprimiert dar, welche auch in CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h differentiell exprimiert wurden. Es wurden 6 Gene gefunden, die nach Lenalidomid-Inkubation sowohl in CD34⁺h als auch in CD34⁺m und die ebenfalls in CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h differentiell exprimiert wurden.

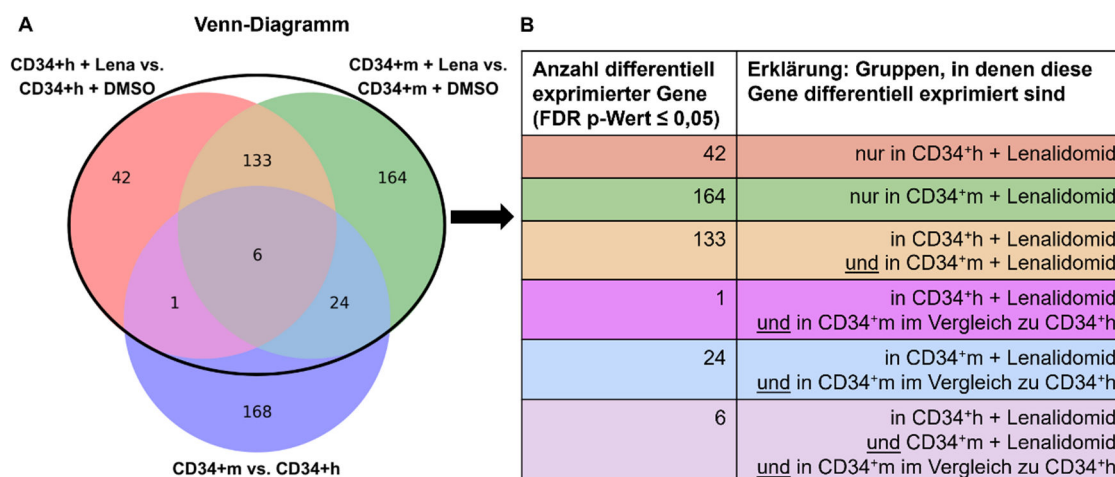


Abb. 17: **Anzahl differentiell exprimierter Gene in CD34⁺-HSPZ nach Inkubation mit Lenalidomid.** **A** Venn-Diagramm: Anzahl an differentiell exprimierten Genen in CD34⁺h und CD34⁺m nativ und nach Inkubation mit Lenalidomid. **B** Tabellarische Aufzählung der Anzahl der differentiell exprimierten Gene in CD34⁺-HSPZ nach Inkubation mit Lenalidomid in den jeweiligen Konditionen. CD34⁺h = hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender, CD34⁺m = hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten. Lena = Lenalidomid. n = 4 (CD34⁺h) und n = 5 (CD34⁺m).

Die IPA wies erneut auf eine Beeinflussung von unter anderem Komponenten des Immunsystems durch Lenalidomid-Inkubation hin. Die *Top Canonical Pathways* sowie die *Top Upstream Regulators* in CD34⁺h und CD34⁺m jeweils nach Lenalidomid-Inkubation sind in Abb. 18 dargestellt.

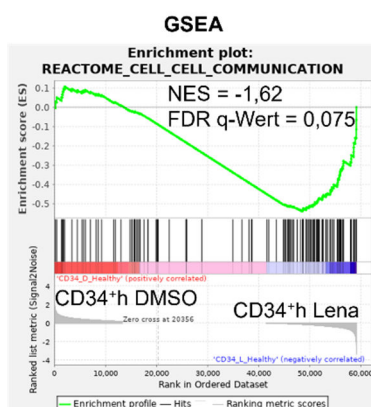
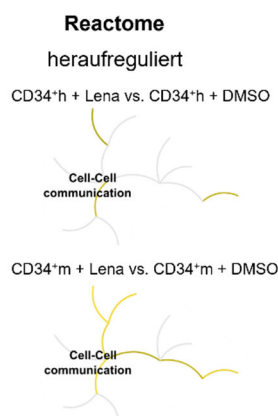
Top Canonical Pathways				Top Upstream Regulators		
CD34 ⁺ h + Lena vs. CD34 ⁺ h + DMSO		CD34 ⁺ m + Lena vs. CD34 ⁺ m + DMSO			CD34 ⁺ h + Lena vs. CD34 ⁺ h + DMSO	CD34 ⁺ m + Lena vs. CD34 ⁺ m + DMSO
Name	Overlap in %	Name	Overlap in %	Name	vorhergesagte Aktivierung	vorhergesagte Aktivierung
Hepatische Fibrose	13,4	Hepatische Fibrose	15,5	TGFB1	aktiviert	aktiviert
Aktivierung		Aktivierung		Dexamethason	aktiviert	keine Vorhersage
Sertoli-Zell-Signalgebung	11,7	Phagosomenbildung	9,8	β -Östradiol	aktiviert	aktiviert
Axonal Guidance	8,5	Adhäsion und Diapedese von Granulozyten	14,8	TNF	aktiviert	aktiviert
Signalgebung		Integrin-linked Kinase	13,5	Lipopolysaccharide	aktiviert	aktiviert
Eisenhomöostase	13,7	Signalgebung				
Signalweg						
Ethanol-Degradierung IV	33,3					

Abb. 18: **Ergebnisse der Ingenuity Pathway Analysis für Hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen nach Lenalidomid-Inkubation.** Dargestellt sind die *Top Canonical Pathways* (kanonische Signalwege) sowie die *Top Upstream Regulators* (vorgeschaltete Regulatoren) für CD34⁺h und CD34⁺m jeweils nach Lenalidomid-Inkubation verglichen mit der jeweiligen DMSO-Kontrollgruppe. *Overlap* (Überschneidung) = Anteil der Gene aus dem vorliegenden Datensatz in dem Signalweg an der Gesamtzahl der Gene dieses Signalwegs, CD34⁺h = hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender, CD34⁺m = hämatopoietische Stamm- und

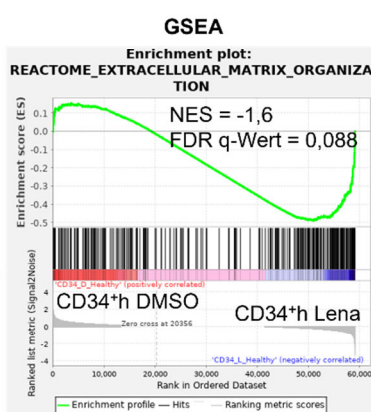
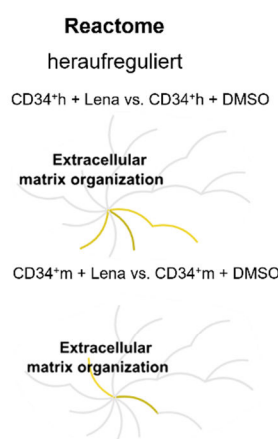
Progenitorzellen von Myelom-Patienten, TGFB1 = *Transforming Growth Factor beta 1*, TNF = *Tumor Necrosis Factor alpha*.

Im Folgenden wurde tiefergehend untersucht, inwiefern sich eine Inkubation mit Lenalidomid auf verschiedene Prozesse auswirkte. Effekte von Lenalidomid auf CD34⁺-HSPZ wurden mittels *Reactome* veranschaulicht: Heraufregulierende Effekte von Lenalidomid wirkten sich vor allem auf die Zell-Zell-Kommunikation (Abb. 19 A links, gelbe Striche) sowie die Organisation der EZM aus (Abb. 19 B links, gelbe Striche). Diese hatten sich zuvor in CD34⁺m im Vergleich zu CD34⁺h herunterreguliert präsentiert (Abb. 14 A). GSEA bestätigten eine angereicherte Expression von Genen der Zell-Zell-Kommunikation in CD34⁺h nach Lenalidomid-Inkubation im Vergleich zu der DMSO-Kontrollgruppe (NES -1,62, FDR q-Wert = 0,075, Abb. 19 A Mitte). Ebenso bestätigten GSEA eine angereicherte Genexpression von Genen der EZM-Organisation in CD34⁺h nach Lenalidomid-Inkubation im Vergleich zu der DMSO-Kontrollgruppe (NES -1,6, FDR q-Wert = 0,088, Abb. 19 B Mitte).

Es folgte im Weiteren eine genaue Analyse der einzelnen, differentiell exprimierten Gene der DESeq2-Daten. Die identifizierten Gene wurden gegenübergestellt, um entsprechende Abweichungen zwischen CD34⁺h und CD34⁺m darzustellen. Als signifikant differentiell exprimiert wurden Gene gewertet, welche bei einem FDR p-Wert von $\leq 0,05$ einen *Fold Change* von $\leq -1,5$ oder $\geq 1,5$ aufwiesen, also um das mindestens 1,5-fache mehr bzw. -1,5-fache weniger exprimiert waren als ihre DMSO-Vergleichsgruppe. Hinsichtlich der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kommunikation sowie der Organisation der EZM konnten einige Gene ausfindig gemacht werden, welche sich nach Lenalidomid-Inkubation signifikant differentiell exprimiert darstellten (Abb. 19 A und B jeweils Tabellen rechts, nach bioinformatischer Analyse 1, Kap. 2.7 und 2.8).

A Zell-Zell-Kommunikation**selektierte Gene mit differentieller Expression**

Gen	Fold Change in CD34 ⁺ h + Lena vs. CD34 ⁺ h + DMSO	Fold Change in CD34 ⁺ m + Lena vs. CD34 ⁺ m + DMSO
ACTN1		1,62
CDH5	83,89	48,77
CLDN12	2,41	2,96
NECTIN2	2,39	2,33
PXN		1,77

B Organisation der Extrazellulärmatrix**selektierte Gene mit differentieller Expression**

Gen	Fold Change in CD34 ⁺ h + Lena vs. CD34 ⁺ h + DMSO	Fold Change in CD34 ⁺ m + Lena vs. CD34 ⁺ m + DMSO
A2M		5,79
ACTN1		1,62
ADAM12	5,36	3,57
ADAMTS1	3,4	
CEACAM6		3,12
COL6A2	4,06	
CTSG		2,34
ELANE		2,57
FMOD		5,78
ITGA10	6,09	22,18
ITGB5	3,64	4,87
LAMB1	2,91	
LAMB2	4,19	3,6
LOXL1	3,25	2,35
NID1	5,07	6,93
P3H3	4,7	3,22
P4HA2		2,75
SPARC	5,12	4,34
TGFB2	9,59	47,09

Abb. 19: Zell-Zell-Kommunikation und Organisation der Extrazellulärmatrix in CD34⁺h und CD34⁺m nach Inkubation mit Lenalidomid. **A** Zell-Zell-Kommunikation: *Reactome*-Analyse in CD34⁺h und CD34⁺m nach Inkubation mit Lenalidomid, jeweils im Vergleich zu CD34⁺h und CD34⁺m DMSO-Kontrolle (links). GSEA in in CD34⁺h nach Inkubation mit Lenalidomid verglichen zu CD34⁺h nach DMS-Kontrolle, NES = -1,61682 , nominaler p-Wert < 0,001, FDR q-Wert = 0,075007 (Mitte). Selektierte Gene mit differentieller Expression in CD34⁺h und CD34⁺m nach Inkubation mit Lenalidomid im Vergleich zur jeweiligen DMS-Kontrolle (rechts). **B** Organisation der Extrazellulärmatrix: *Reactome*-Analyse in CD34⁺h und CD34⁺m nach Inkubation mit Lenalidomid, jeweils im Vergleich zu CD34⁺h und CD34⁺m DMSO-Kontrolle (links). GSEA in in CD34⁺h nach Inkubation mit Lenalidomid verglichen zu CD34⁺h nach DMS-Kontrolle, NES = -1,59739 , nominaler p-Wert < 0,001, FDR q-Wert = 0,088381 (Mitte). Selektierte Gene mit differentieller Expression in CD34⁺h und CD34⁺m nach Inkubation mit Lenalidomid im Vergleich zur jeweiligen DMS-Kontrolle (rechts). GSEA und Gene ausgewählt nach Kap. 2.8 CD34⁺h = hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen von gesunden Probanden (*healthy*). CD34⁺m =

hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten (*maligne*), GSEA = *Gene Set Enrichment Analysis*, Lena = Lenalidomid, NES = *Normalized Enrichment Score*. Die aufgelisteten Genabkürzungen entsprechen den standardmäßig benutzten Abkürzungen; die vollständigen Namen der Gene können bspw. unter www.genecards.org nachgeschlagen werden und sind hier zur besseren Übersicht nicht aufgeführt. n = 4 (CD34⁺h), n = 5 (CD34⁺m).

GSEA veranschaulichten eine signifikante und deutliche Anreicherung von Genen des Häm-Metabolismus in CD34⁺h (Abb. 20 A links, NES 2,08, FDR q-Wert < 0,001) und in CD34⁺m (Abb. 20 A rechts, NES 1,91, FDR q-Wert < 0,001) jeweils in der DMSO-Kontrollgruppe verglichen mit der Inkubation mit Lenalidomid. Dies stand im Einklang mit der eingeschränkten Bildung roter Kolonien im CFU-Assay von CD34⁺h nach Inkubation mit Lenalidomid (Kapitel 3.2.1). Es wurden zahlreiche die Hämatopoiese und den Häm-Metabolismus betreffende Gene identifiziert, welche in CD34⁺h und CD34⁺m nach Inkubation mit Lenalidomid signifikant reduziert exprimiert wurden (Abb. 20 B).

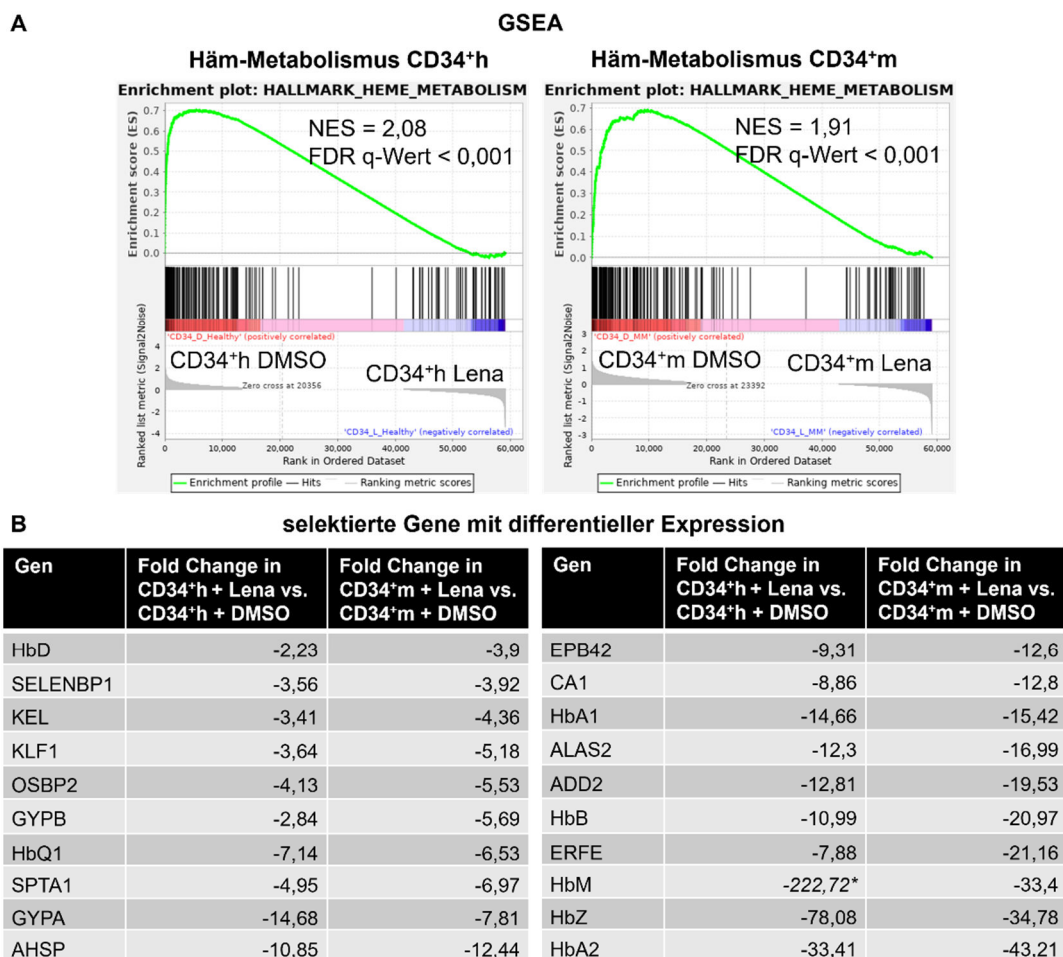


Abb. 20: **Der Häm-Metabolismus in CD34⁺-HSPZ nach Inkubation mit Lenalidomid.** A GSEA hinsichtlich des Häm-Metabolismus nach Inkubation mit Lenalidomid. Häm-Metabolismus in

CD34⁺h + DMSO vs. CD34⁺h + Lenalidomid, NES = 2,082441, nominaler p-Wert = 0,0, FDR q-Wert < 0,001. Häm-Metabolismus in CD34⁺m + DMSO vs. CD34⁺m + Lenalidomid, NES = 1,913064, nominaler p-Wert = 0,0, FDR q-Wert < 0,001. **B** Einzelne Gene bezogen auf die Hämatopoiese und den Häm-Metabolismus mit differentieller Expression in CD34⁺h und CD34⁺m nach Inkubation mit Lenalidomid verglichen mit ihren jeweiligen DMSO-Kontrollen. GSEA und Gene ausgewählt nach Kap. 2.8. Signifikanz \triangleq FDR $p \leq 0,05$, *FDR $p = 0,0567$, somit nach FDR nicht signifikant (aufgrund des *Fold Changes* dennoch hier gezeigt). CD34⁺h = hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender, CD34⁺m = hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten, GSEA = *Gene Set Enrichment Analysis*, NES = *Normalized Enrichment Score*. Die aufgelisteten Genabkürzungen entsprechen den standardmäßig benutzten Abkürzungen; die vollständigen Namen der Gene können bspw. unter www.genecards.org nachgeschlagen werden und sind hier zur besseren Übersicht nicht aufgeführt. n = 4 (CD34⁺h) und n = 5 (CD34⁺m).

Essentiell an der Proliferation und Differenzierung der CD34⁺-HSPZ und somit an der Hämatopoiese beteiligt sind auch c-kit und sein Ligand KITLG (Kit-Ligand, Kap. 1.1.2) sowie CXCR4. In der Analyse der DESeq2-Daten präsentierte sich nach Inkubation mit Lenalidomid eine verminderte Expression von c-kit in CD34⁺h und CD34⁺m nach jeweiliger Inkubation mit Lenalidomid (Abb. 21 A, nach FDR nicht signifikant, hier jedoch aufgrund der Relevanz für die Hämatopoiese bei signifikantem p-Wert dennoch dargestellt). KITLG stellte sich in CD34⁺h und CD34⁺m nach Lenalidomid-Inkubation im Vergleich zur jeweiligen DMSO-Kontrolle vermehrt exprimiert dar.

Aufgrund der zuvor beobachteten Reduktion erythropoietischer Kolonien nach Inkubation mit Lenalidomid wurden Untersuchungen von CD34⁺-HSPZ von gesunden Probanden nach Kultivierung mit 10 μ M Lenalidomid mittels qRT-PCR im Hinblick auf c-kit und CXCR4 als relevante hämatopoietische Marker angeschlossen. Die Expression der Tyrosinkinase c-kit wurde nach Inkubation mit 10 μ M Lenalidomid signifikant auf circa ein Drittel des Ausgangswerts verringert (Abb. 21 B: relative Genexpression nach Kap. 2.6.3: DMSO-Kontrolle: 0,02774 vs. Lenalidomid: 0,007222, $p = 0,0065$). Für CXCR4 zeigte sich eine nicht signifikante Tendenz zur vermehrten Expression nach Inkubation mit 10 μ M Lenalidomid (relative Genexpression nach Kap. 2.6.3: DMSO-Kontrolle: 0,01993 vs. Lenalidomid: 0,03935, $p = 0,0618$).

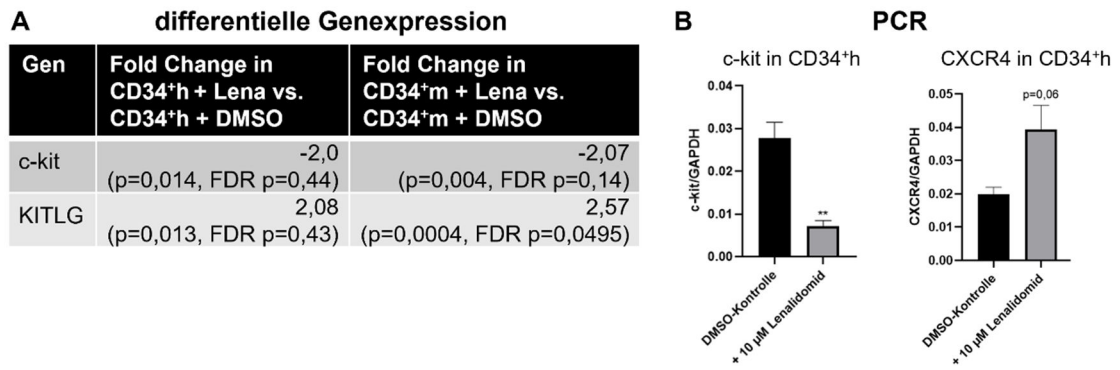


Abb. 21: **Differentielle Genexpression von c-kit und CXCR4 in CD34⁺-HSPZ nach Inkubation mit Lenalidomid.** **A** Genexpression von c-kit und KITLG in CD34⁺h und CD34⁺m nach Inkubation mit Lenalidomid im Vergleich zu ihrer jeweiligen DMSO-Kontrollgruppe in den DESeq2-Daten. n = 4 (CD34⁺h) und n = 5 (CD34⁺m). **B** Relative Expression von c-kit (links) und CXCR4 (rechts) bezogen auf GAPDH in CD34⁺h in der qRT-PCR mit und ohne Lenalidomid. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Genexpressionen (nach Kap. 2.6.3) \pm SEM. Signifikanzen wurden berechnet mit ungepaartem studentischem t-Test: **, p < 0,01 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, n = 3. CD34⁺h = hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender, CD34⁺m = hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten, CXCR4 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4, c-kit = CD117, KITLG = KIT-Ligand, qRT-PCR = quantitative *Real-Time* Polymerasekettenreaktion.

Im Folgenden wurde untersucht, welche Signalwege in CD34⁺h und CD34⁺m nach Inkubation mit Lenalidomid verändert waren und somit möglicherweise ebenfalls zu den bisher gesehenen Veränderungen der Funktionalität der CD34⁺-HSPZ hinsichtlich des Häm-Metabolismus sowie der Organisation der EZM und der Zell-Zell-Kommunikation führten. Bei der Auswertung der DESeq2-Daten fiel auf, dass insbesondere auch solche Gene nach Inkubation mit Lenalidomid differentiell exprimiert waren, welche die Signalwege Wnt, TGF- β , Notch oder Hippo betrafen. Diese Gene sind in Tabelle 13 dargestellt. Die Zuordnung der jeweiligen Gene zu den Signalwegen erfolgte über Literaturrecherche (www.genecards.org, www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov).

Wnt-Signalweg			TGF- β -Signalweg		
Gen	Fold Change in CD34 ⁺ h + Lena vs. CD34 ⁺ h + DMSO	Fold Change in CD34 ⁺ m + Lena vs. CD34 ⁺ m + DMSO	Gen	Fold Change in CD34 ⁺ h + Lena vs. CD34 ⁺ h + DMSO	Fold Change in CD34 ⁺ m + Lena vs. CD34 ⁺ m + DMSO
ROR1	18,5	-	TGFB2	9,6	47,1
WLS	4,6	-	GDF3	-	16,4
DAAM2	-	11,8	INHBA	10,4	7,7
WNT11	-	4,8	TGFB111	3,3	4,3
LBH	-	-3,2			
KREMEN1	-	-4,5			
LGR6	-	-12,1			

Notch-Signalweg			Hippo-Signalweg		
Gen	Fold Change in CD34 ⁺ h + Lena vs. CD34 ⁺ h + DMSO	Fold Change in CD34 ⁺ m + Lena vs. CD34 ⁺ m + DMSO	Gen	Fold Change in CD34 ⁺ h + Lena vs. CD34 ⁺ h + DMSO	Fold Change in CD34 ⁺ m + Lena vs. CD34 ⁺ m + DMSO
HES5	-7,7	-	AMOTL2	-	19,95
HEY1	13,3	10,4	TEAD2	18,6	18,3
HES6	-3,3	-2,7	AJUBA	3,8	4,4

Tabelle 13: Differentielle Expression von Genen der Signalwege Wnt, TGF- β , Notch und Hippo in CD34⁺-HSPZ nach Lenalidomid-Inkubation. Die dargestellten Gene sind in den entsprechenden Konditionen differentiell exprimiert: Die jeweils zweite Spalte betrifft differentiell exprimierte Gene in CD34⁺h + Lenalidomid verglichen mit CD34⁺h + DMSO, die jeweils dritte Spalte betrifft differentiell exprimierte Gene in CD34⁺m + Lena verglichen mit CD34⁺m + DMSO. Die Zuordnung der jeweiligen Gene zu den Signalwegen erfolgte über Literaturrecherche (www.genecards.org, www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov). Signifikanz \triangleq FDR $p \leq 0,05$. CD34⁺h = CD34⁺-HSPZ von gesunden Probanden (*healthy*), CD34⁺m = CD34⁺-HSPZ von Myelom-Patienten (*maligne*). Die aufgelisteten Genabkürzungen entsprechen den standardmäßig benutzten Abkürzungen; die vollständigen Namen der Gene können bspw. unter www.genecards.org nachgeschlagen werden und sind hier zur besseren Übersicht nicht aufgeführt. n = 4 (CD34⁺h) und n = 5 (CD34⁺m).

Insgesamt waren nach Inkubation mit Lenalidomid 133 gleiche Gene sowohl in CD34⁺h als auch in CD34⁺m in dieselbe Richtung differentiell exprimiert (64 Gene wurden in beiden Konditionen herauf- und 69 Gene herunterreguliert). Allerdings führte eine Lenalidomid-Inkubation auch zu unterschiedlichen Effekten auf CD34⁺m und CD34⁺h: So existierten Gene, die lediglich in einer der beiden Konditionen durch Lenalidomid beeinflusst wurden.

Im Venn-Diagramm (Abb. 12) war ersichtlich, dass Lenalidomid in CD34⁺-HSPZ von gesunden Probanden sowie von MM-Patienten auf 6 Gene wirkte, die sich auch in CD34⁺m im Vergleich zu CD34⁺h differentiell exprimiert darstellten. Hierbei fand sich eine entgegengesetzte Ausprägung der Genregulation: So wurden diese Gene durch

eine MM-Erkrankung herunterreguliert und nach Inkubation mit Lenalidomid heraufreguliert. Weiterhin fanden sich 24 Gene, die durch MM-Erkrankung herunter- und nach Inkubation mit Lenalidomid in CD34⁺m heraufreguliert waren. Insgesamt führte eine Lenalidomid-Inkubation in CD34⁺m zu einer differentiellen Expression von 30 Genen, die in CD34⁺m im Vergleich zu CD34⁺h in die gegensätzliche Richtung differentiell exprimiert wurden. Dabei wurden diese 30 Gene durch MM-Erkrankung vermindert und nach Inkubation mit Lenalidomid vermehrt exprimiert. Dieser Zusammenhang wird in Abb. 22 veranschaulicht.

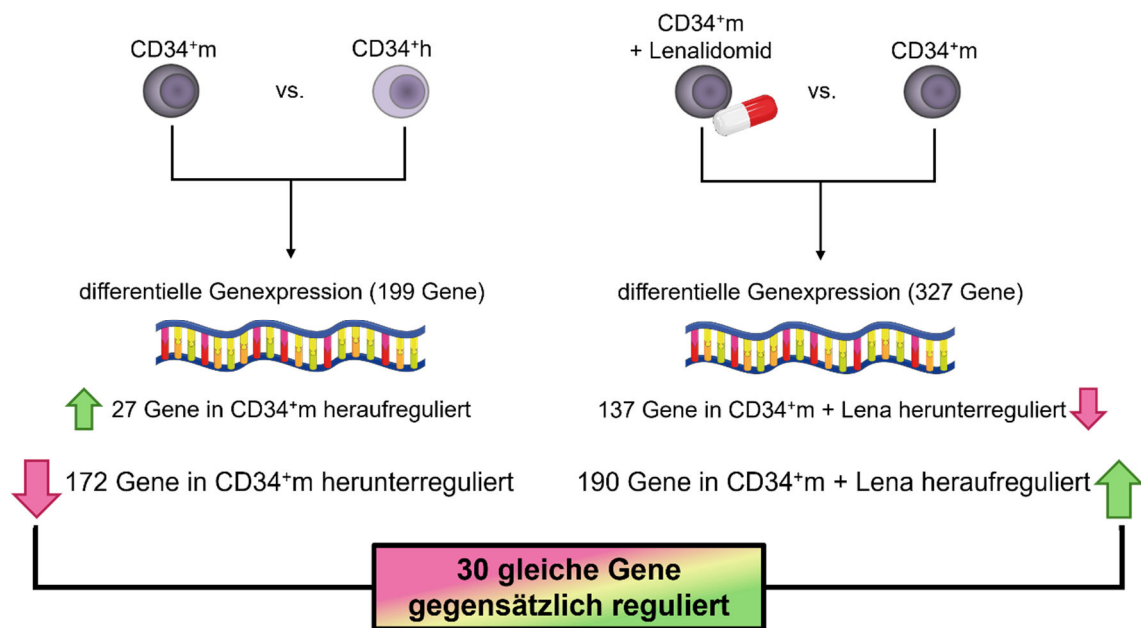


Abb. 22: **Übersicht der differentiellen Genexpression in CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h sowie nach Inkubation der CD34⁺m mit Lenalidomid.** CD34⁺h = CD34⁺-HSPZ von gesunden Probanden (*healthy*), CD34⁺m = CD34⁺-HSPZ von Myelom-Patienten (*maligne*), HSPZ = hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen, Lena = Lenalidomid. Abb. erstellt mit Servier Medical Art von Servier.

Eine genaue Auflistung der 30 Gene, welche sich in CD34⁺m heraufreguliert und in CD34⁺m nach Lenalidomid-Inkubation herunterreguliert darstellten, ist Tabelle 14 zu entnehmen. Dort befindet sich ebenfalls eine repräsentative Zuordnung der Gene zu ihrer jeweiligen Funktion. Eine Auflistung der Gene mit ihrem jeweiligen *Fold Change* befindet sich im Anhang in Tabelle A 1.

Gen	Funktion/biologische Prozesse	Gen	Funktion/biologische Prozesse
NNMT	Stoffwechsel, Methylierung [184]	CSF1R	Immunsystem, Knochenformation [185]
CELA2B	Elastase ohne katalytische Aktivität [186]	VSIG4	Immunsystem [187]
PPIC	Proteinfaltung, bindet an Cyclosporin A [188, 189]	LAYN	Hyaluronsäure-Rezeptor, Zytoskelett [190]
TREM2	Immunsystem [191], Osteoklasten [192]	FCAR	Immunsystem [193]
FARP1	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor, Wnt-Signalweg [194]	TSPAN15	Reguliert ADAM10 Transmembranprotease, Notch-Signalweg [195]
CORO1B	Zellmotilität, Aktin-Bindeprotein [196]	SLAMF8	Immunsystem, Osteogenese, Wnt-Signalweg [197]
ELANE	Elastase, Immunsystem [198]	CA12	Carboanhydrase
FCGRT	Immunsystem [199]	A2M	Proteinase-Inhibitor [200]
ARHGAP31	GTPase-Regulator [201]	GNG12	G-Protein
MCEMP1	Immunsystem [202]	MARCO	Immunsystem [203]
TRPM4	Kationenkanal, Membrandepolarisation [204]	NRP2	Osteogenese [205]
HNMT	Histamin-Methylierung [206]	DAAM2	Reguliert Wnt-Signalweg [207]
ARPIN	Zellmigration [208]	ALDH1A2	Retinolsäure-Synthese, Immunsystem [209]
SRPX	Zelladhäsion, Apoptose, Tumorsuppressorgen [210]	IL1R2	Interleukin-Rezeptor, Immunsystem
CTSG	Immunsystem [211]	CD209	Immunsystem [212]

Tabelle 14: **30 Gene, deren Expression sich in CD34⁺m reduziert und nach Inkubation mit Lenalidomid verstärkt darstellt.** Alle Gene sind in CD34⁺m im Vergleich zu CD34⁺h reduziert exprimiert (*Fold Change* $\leq -1,5$) und in CD34⁺m nach Inkubation mit 10 μ M Lenalidomid im Vergleich zu CD34⁺m mit DMSO-Kontrolle vermehrt exprimiert (*Fold Change* $\geq 1,5$). Signifikanz \triangleq FDR $p \leq 0,05$. Unter „Funktion“ in Spalte 2 ist keine vollständige Auflistung aller Funktionen und Beteiligungen des jeweiligen Gens zu finden, sondern lediglich ein Ausschnitt. A2M = *Alpha-2-Macroglobulin*, ALDH1A2 = *Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A2*, ARHGAP31 = *Rho GTPase Activating Protein 31*, ARPIN = *Actin Related Protein 2/3 Complex Inhibitor*, CA12 = *Carbonic Anhydrase 12*, CD209 = *CD209 Molecule*, CD34⁺h = CD34⁺-HSPZ von gesunden Probanden (*healthy*), CD34⁺m = CD34⁺-HSPZ von Myelom-Patienten (*maligne*), CELA2B = *Chymotrypsin Like Elastase 2B*, CORO1B = *Coronin 1B*, CSF1R = *Colony Stimulating Factor 1 Receptor*, CTSG = *Cathepsin G*; DAAM2 = *Dishevelled Associated Activator*

of Morphogenesis 2, ELANE = *Elastase, Neutrophil Expressed*, FARP1 = *FERM, ARH/RhoGEF and Pleckstrin Domain Protein 1*, FCAR = *Fc alpha Receptor*, FCGRT = *Fc gamma Receptor and Transporter*, GNG12 = *G Protein Subunit gamma 12*, HNMT = *Histamine N-Methyltransferase*, IL1R2 = *Interleukin 1 Receptor Type 2*, LAYN = *Layilin*, MARCO = *Macrophage Receptor with Collagenous Structure*, MCEMP1 = *Mast Cell Expressed Membrane Protein 1*, NNMT = *Nicotinamide N-Methyltransferase*, NRP2 = *Neuropilin 2*, PPIC = *Peptidylprolyl Isomerase C*, SLAMF8 = *SLAM Family Member 8*, SRPX = *Sushi Repeat Containing Protein X-Linked*, TREM2 = *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2*, TRPM4 = *Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 4*, TSPAN15 = *Tetraspanin 15*, VSIG4 = *V-Set and Immunoglobulin Domain Containing 4*. n = 4 (CD34⁺h) und n = 5 (CD34⁺m).

Insgesamt zeigte sich also eine signifikante Beeinflussung der Genexpression von CD34⁺m und CD34⁺h nach Lenalidomid-Inkubation, wobei diese teilweise auf dieselben Gene in CD34⁺m und CD34⁺h wirkte, teilweise auch nur auf Gene einer der beiden Gruppen. Insbesondere führte die Lenalidomid-Inkubation zur Heraufregulation der EZM-Organisation sowie der Zell-Zell-Kommunikation, welche sich zuvor in CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h herunterreguliert darstellten. Es wurden außerdem 30 Gene identifiziert, die in CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h herunterreguliert und die in CD34⁺m nach Lenalidomid-Inkubation wieder heraufreguliert wurden und die insbesondere bei Prozessen der Immunregulation, Signaltransduktion, des Metabolismus oder Zell-Zell-Interaktionen eine Rolle spielten. Passend zu der in den CFU-Assays beobachteten eingeschränkten Bildung von Kolonien der roten Zellreihe (in CD34⁺h, Kap. 3.2.1) stellten sich nach Inkubation mit Lenalidomid zahlreiche Gene des Häm-Metabolismus deutlich vermindert exprimiert dar. Weiterhin zeigten sich die Signalwege Wnt, TGF- β , Notch und Hippo durch Lenalidomid-Inkubation beeinflusst. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse zu den CD34⁺-HSPZ bietet Abb. 23.

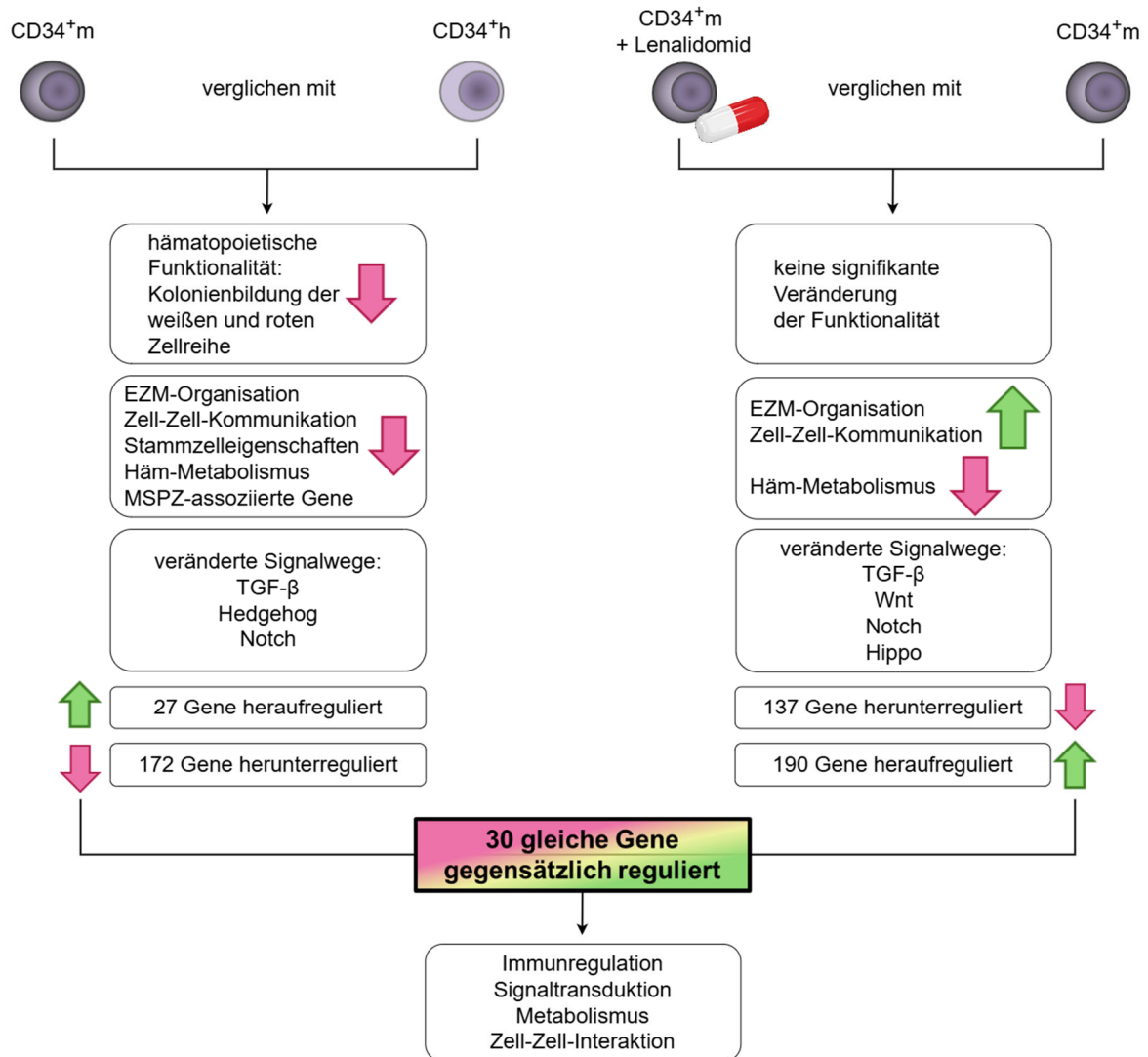


Abb. 23: **Zusammenfassendes Schaubild der Ergebnisse der HSPZ.** CD34⁺h = CD34⁺-HSPZ von gesunden Probanden (*healthy*), CD34⁺m = CD34⁺-HSPZ von Myelom-Patienten (*maligne*), EZM = Extrazellulärmatrix, MSPZ = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen, TGF-β = *Transforming Growth Factor beta*, Wnt = *Wingless Int-1*. n = 4 (CD34⁺h) und n = 5 (CD34⁺m).

Die zweite große Zellpopulation der Knochenmarknische sind die MSPZ, sodass im Folgenden die Veränderungen der MSPZ durch MM-Erkrankung sowie der Einfluss Lenalidomids auf diese Zellpopulation untersucht wurden.

3.3.3 Vergleich Mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten und gesunden Probanden

Analog zu den CD34⁺-HSPZ erfolgte zunächst die Untersuchung der Unterschiede zwischen MSPZh und MSPZm ohne Lenalidomid-Inkubation auf molekularer Ebene. Abb. 24 zeigt wie bereits für die CD34⁺-HSPZ ein Venn-Diagramm, welches Daten verschiedener Vergleichsgruppen beinhaltet (Vergleich MSPZm und MSPZh sowie

jeweils mit und ohne Lenalidomid). Für den Vergleich der MSPZm mit MSPZh wurde zunächst der untere, blaue Kreis mit schwarzer Umrandung betrachtet. Insgesamt stellten sich 1532 Gene in MSPZm im Vergleich zu MSPZh differentiell exprimiert dar (Abb. 24, blauer Kreis mit Überschneidungen, $FDR \leq 0,05$, $Fold\ Change \geq 1,5$ bzw. $\leq -1,5$): Davon waren in MSPZm im Vergleich zu MSPZh 1226 Gene herauf- und 306 Gene herunterreguliert.

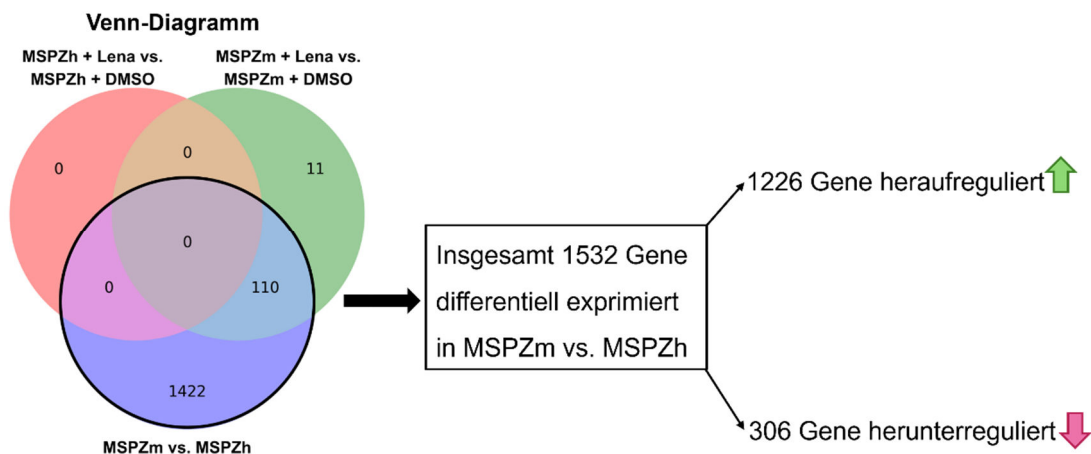


Abb. 24: **Unterschiede in der RNA-Expression von MSPZm verglichen mit MSPZh.** Venn-Diagramm: Anzahl an differentiell exprimierten Genen in CD34⁺h und CD34⁺m nativ und nach Inkubation mit Lenalidomid. Das Venn-Diagramm ist eine Zusammenstellung der differentiell exprimierten Gene nach Exposition gegenüber Lenalidomid in MSPZh (roter Kreis) und MSPZm (grüner Kreis) sowie der differentiell exprimierten Gene in MSPZm und MSPZh (blauer Kreis) mit deren jeweiligen Überschneidungen. Signifikanz $\triangleq FDR\ p \leq 0,05$, $Fold\ Change \geq 1,5$ bzw. $\leq -1,5$. Lena = Lenalidomid. MSPZh = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von gesunden Probanden (*healthy*), MSPZm = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten (*maligne*). $n = 3$ (MSPZh), $n = 2$ (MSPZm).

Bei den CD34⁺-HSPZ war bereits eine deutliche Veränderung der Genexpression bezüglich der EZM aufgefallen. Somit wurden auch die MSPZm hinsichtlich möglicher Unterschiede in der Genexpression bezüglich der EZM verglichen mit MSPZh untersucht. *Reactome*-Analysen bekräftigten Unterschiede der EZM-Organisation in MSPZm verglichen mit MSPZh (Abb. 25 A, gelbe Striche). In den GSEA stellte sich eine deutliche Anreicherung von Genen der EZM-Organisation in MSPZh verglichen mit MSPZm dar (Abb. 25 B, NES 1,73, FDR q-Wer = 0,067). Selektierte Gene, welche in dem Genset des GSEA zur EZM-Organisation sowie in den DESeq2-Daten signifikant ($FDR\ p \leq 0,05$) und mit einem *Fold Change* von $\geq 1,5$ bzw. $\leq -1,5$ differentiell exprimiert waren, sind in Abb. 25 C aufgeführt. All diese Gene wurden in MSPZm verglichen mit MSPZh vermindert exprimiert.

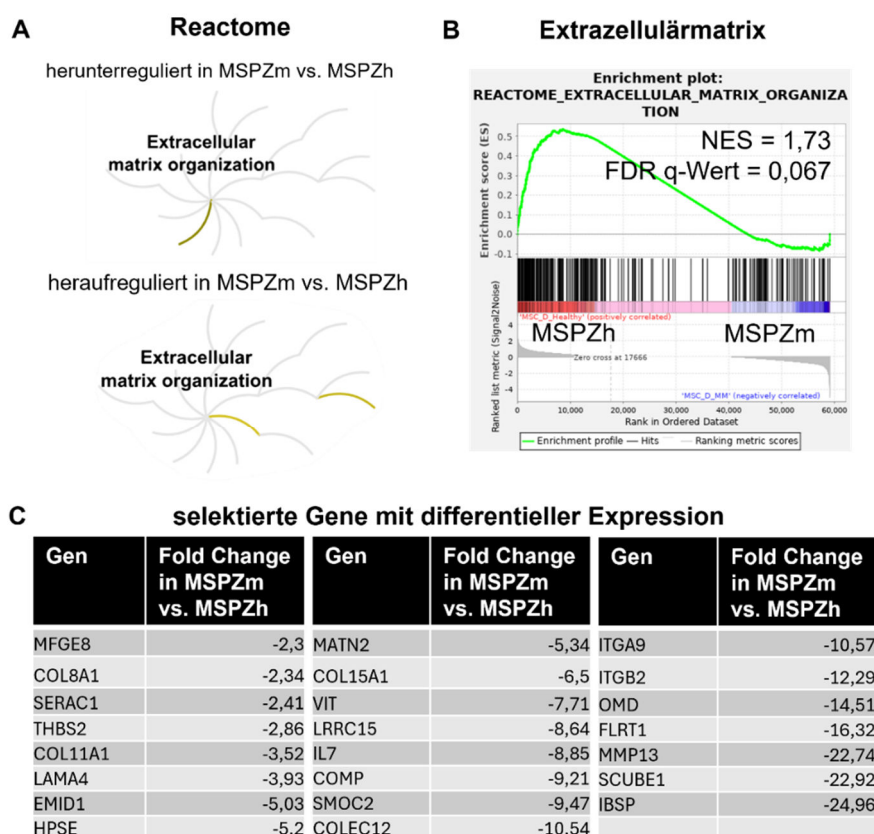


Abb. 25: **Expression von Genen der Extrazellulärmatrix in MSPZm verglichen mit MSPZh.**

A Reactome-Analyse von differentiell regulierten Prozessen der EZM-Organisation in MSPZm im Vergleich zu MSPZh. **B** GSEA veranschaulichen Veränderungen der EZM in MSPZm gegenüber MSPZh. NES = 1,7296, nominaler p-Wert < 0,001, FDR q-Wert = 0,06658. **C** Gene mit jeweiligem *Fold Change* hinsichtlich der EZM-Organisation, welche in MSPZm verglichen mit MSPZh differentiell exprimiert sind. GSEA und Gene ausgewählt nach Kap. 2.8. Signifikanz \triangleq FDR $p \leq 0,05$. EZM = Extrazellulärmatrix, GSEA = *Gene Set Enrichment Analysis*, MSPZh = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von gesunden Probanden (*healthy*), MSPZm = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten (*maligne*), NES = *Normalized Enrichment Score*. Die aufgelisteten Genabkürzungen entsprechen den standardmäßig benutzten Abkürzungen; die vollständigen Namen der Gene können bspw. unter www.genecards.org nachgeschlagen werden und sind hier zur besseren Übersicht nicht aufgeführt. n = 3 (MSPZh), n = 2 (MSPZm).

Im Folgenden wurde die Funktionalität des KM-Mikromilieus bezogen auf die MSPZ untersucht. GSEA bekräftigten eine starke Anreicherung von Genen der Stammzellsignaltransduktion in MSPZh verglichen mit MSPZm mit einem hohen NES von 2,01 (FDR q-Wert < 0,001, Abb. 26 A links) sowie eine Anreicherung von Genen der Osteogenese in MSPZh verglichen mit MSPZm, ebenfalls mit einem hohen NES von 1,8 (FDR q-Wert = 0,006, Abb. 26 A rechts). Mehrere Gene konnten identifiziert werden,

welche in MSPZm verglichen mit MSPZh differentiell reguliert waren und die an Prozessen der Stammzellsignaltransduktion oder der Osteogenese beteiligt sind (Abb. 26 B).

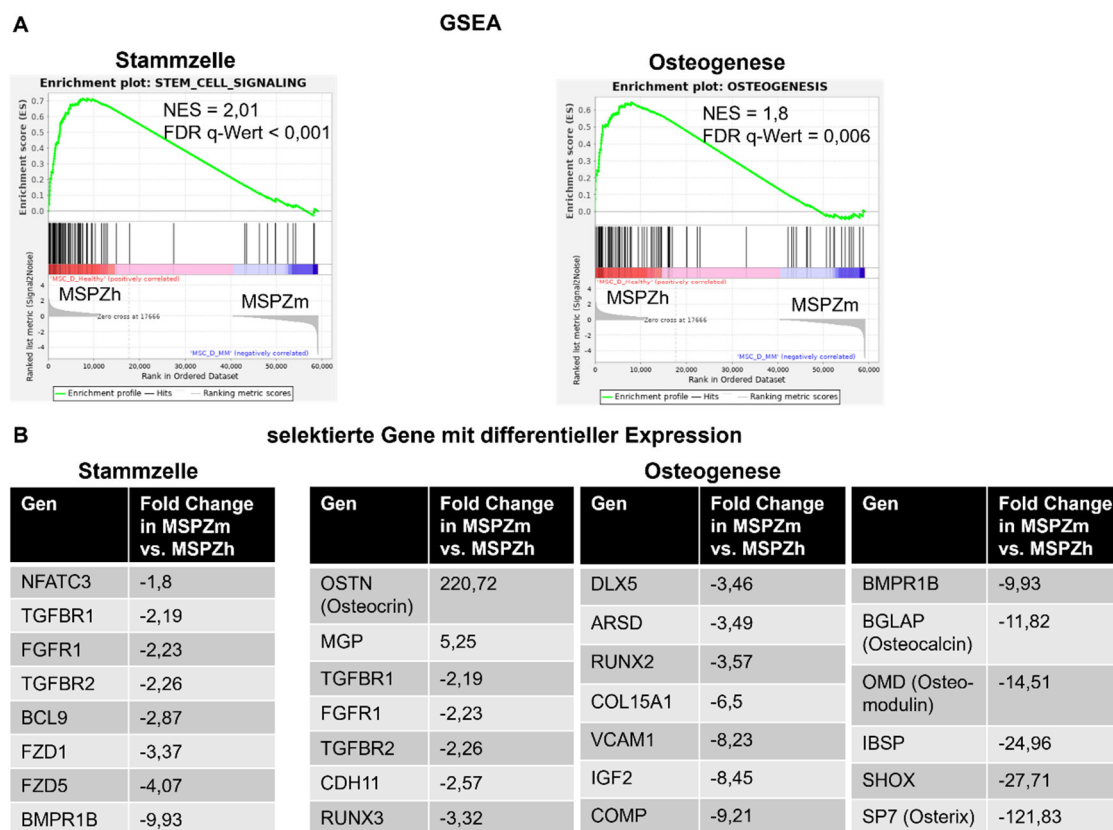


Abb. 26: **Stammzeleigenschaften in MSPZm verglichen mit MSPZh.** **A** GSEA: Stammzellsignaltransduktion, NES = 2,01, nominaler p-Wert < 0,001, FDR q-Wert < 0,001. Osteogenese, NES = 1,798, nominaler p-Wert < 0,001, FDR q-Wert = 0,0056. Rot = MSPZh, blau = MSPZm. **B** Einzelne Gene bezogen auf die Stammzellsignaltransduktion und die Osteogenese mit differentieller Expression in MSPZm verglichen mit MSPZh. GSEA und Gene ausgewählt nach Kap. 2.8. Signifikanz \triangleq FDR $p \leq 0,05$. MSPZh = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender, MSPZm = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten, GSEA = *Gene Set Enrichment Analysis*, NES = *Normalized Enrichment Score*. Die aufgelisteten Genabkürzungen entsprechen den standardmäßig benutzten Abkürzungen; die vollständigen Namen der Gene können bspw. unter www.genecards.org nachgeschlagen werden und sind hier zur besseren Übersicht nicht aufgeführt. n = 3 (MSPZh), n = 2 (MSPZm).

Im Weiteren wurde untersucht, ob für diese Veränderungen des KM-Mikromilieus unter anderem dieselben Signalwege verantwortlich sein könnten wie bereits für die CD34⁺m vermutet (Kap. 3.3.1: TGF- β , Hedgehog und Notch). Diesbezüglich veranschaulichten

GSEA eine signifikant angereicherte Expression des TGF- β -BMP-Signalwegs in MSPZh verglichen mit MSPZm mit einem NES von 1,87 (FDR q-Wert < 0,001, Abb. 27 A links). Einzelne, signifikant differentiell regulierte Gene dieses Signalwegs wurden ausfindig gemacht (Abb. 27 A, Tabelle rechts). Die Analyse der DESeq2-Daten ergab ebenfalls den Nachweis mehrerer signifikant differentiell exprimierter Gene des Wnt- sowie des Hedgehog-Signalwegs (Abb. 27 B, die Zuordnung der jeweiligen Gene zu den Signalwegen erfolgte über Literaturrecherche (www.genecards.org, www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov)).

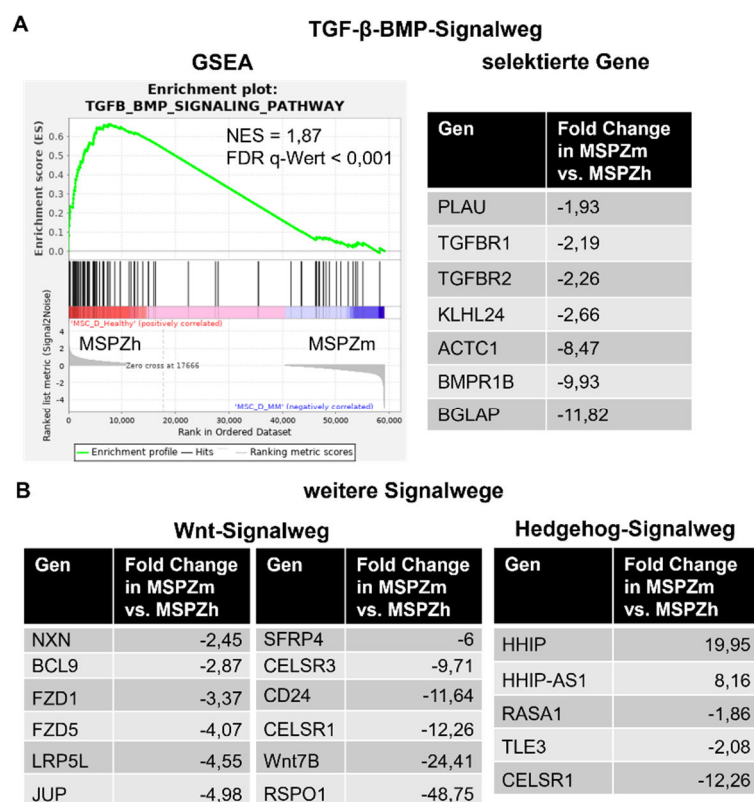


Abb. 27: **TGF- β -, Wnt- und Hedgehog-Signalwege in MSPZm verglichen mit MSPZh.** **A** TGF- β -BMP-Signalgebung in GSEA sowie einzelne Gene mit differentieller Expression in MSPZm verglichen mit MSPZh und dem jeweiligen *Fold Change*. GSEA: NES = 1,8715, nominaler p-Wert < 0,001, FDR q-Wert < 0,001. Rot = MSPZh, blau = MSPZm. GSEA und Gene ausgewählt nach Kap. 2.8. **B** Einzelne Gene mit signifikanter differentieller Genexpression in MSPZm verglichen mit MSPZh beteiligt an den Signalwegen Wnt und Hedgehog. Die Zuordnung der jeweiligen Gene zu den Signalwegen erfolgte über Literaturrecherche (www.genecards.org, www.pubmed.ncbi.nlm.nih.gov). Signifikanz \triangleq FDR $p \leq 0,05$. MSPZh = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender, MSPZm = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten, GSEA = *Gene Set Enrichment Analysis*, NES = *Normalized Enrichment Score*. Die aufgelisteten Genabkürzungen entsprechen den standardmäßig benutzten Abkürzungen; die vollständigen Namen der Gene können bspw. unter www.genecards.org

nachgeschlagen werden und sind hier zur besseren Übersicht nicht aufgeführt. n = 3 (MSPZh), n = 2 (MSPZm).

Weitere, signifikant differentiell exprimierte Gene in MSPZm verglichen mit MSPZh wurden identifiziert, welche sich nicht einem gemeinsamen Signalweg zuordnen ließen, die jedoch an verschiedenen Zellabläufen beteiligt sind. Eine Auswahl dieser befindet sich in Tabelle 15.

Gen	Beschreibung	Fold Change in MSPZm vs. MSPZh
ADGRG7	<i>Adhesion G Protein-Coupled Receptor G7</i>	3361,49
FGF16	<i>Fibroblast Growth Factor 16</i>	456,54
FLT1	<i>Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 1</i>	198,16
SLAMF7	<i>Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family Member 7</i>	97,53
ITGB1BP2	<i>Integrin Subunit Beta 1 Binding Protein 2</i>	78,1
IGF2BP1	<i>Insulin Like Growth Factor 2 MRNA Binding Protein 1</i>	13,22
LMO2	<i>LIM Domain Only 2</i>	-2,57
ITGA9	<i>Integrin Subunit Alpha 9</i>	-10,57
ITGB2	<i>Integrin Subunit Beta 2</i>	-12,29
TNFSF15	<i>TNF Superfamily Member 15</i>	-48,21

Tabelle 15: **Auswahl differentiell exprimierter Gene in MSPZm im Vergleich zu MSPZh mit hämato-onkologischer Relevanz.** Die Tabelle stellt repräsentativ differentiell exprimierte Gene in MSPZm im Vergleich zu MSPZh dar. Signifikanz \triangleq FDR $p \leq 0,05$, *Fold Change* $\geq 1,5$ bzw. $\leq -1,5$. MSPZh = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von gesunden Probanden (*healthy*), MSPZm = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten (*maligne*). n = 3 (MSPZh), n = 2 (MSPZm).

Weiterhin wurde überprüft, ob Überschneidungen von MSPZ und CD34⁺-HSPZ bezogen auf differentiell exprimierte Gene existierten. Es wurden 10 Gene identifiziert, die in MSPZ und CD34⁺-HSPZ von MM-Patienten jeweils gegenüber MSPZ sowie CD34⁺-HSPZ von gesunden Probanden differentiell exprimiert waren (Anhang Tabelle A 2).

Zahlreiche signifikante Unterschiede in der Genexpression von MSPZm verglichen mit MSPZh wurden festgestellt. Eine Vielzahl von Genen der EZM-Organisation stellte sich in MSPZm signifikant vermindert exprimiert dar. Weiterhin zeigten sich Gene der Stammzellsignalgebung sowie der Osteogenese signifikant verändert. Als betroffene Signalwege wurden TGF- β , Wnt und Hedgehog identifiziert.

Im Folgenden wurde untersucht, inwiefern sich eine Behandlung mit Lenalidomid auf die MSPZ auswirkte.

3.3.4 Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen nach Inkubation mit Lenalidomid

Die hier präsentierten Ergebnisse der Zellkulturexperimente erbrachten keinen Nachweis einer Beeinflussung der Proliferation oder Differenzierung von MSPZm oder MSPZh nach Lenalidomid-Inkubation (Kap. 3.2.2). Im Weiteren wurde untersucht, inwiefern Lenalidomid die MSPZ über eine Regulation der Genexpression beeinflusste. Daher wurden Analysen von MSPZh und MSPZm mit und ohne Lenalidomid-Inkubation auf molekularer Ebene mittels RNA-Sequenzierung angeschlossen. Für die Sequenzierung wurden n = 3 für MSPZh und n = 2 für MSPZm verwendet.

Bereits in der Hauptkomponentenanalyse (Abb. 11) zeigte sich ein unterschiedliches Clustering der MSPZ nach Inkubation mit Lenalidomid lediglich für MSPZm, nicht jedoch für MSPZh. Erneut werden nun von dem bereits bekannten Venn-Diagramm die oberen beiden Kreise mit schwarzer Umrandung betrachtet (Abb. 28 A). Es fanden sich Überschneidungen der differentiell exprimierten Gene in den jeweiligen Gruppen, diese sind in Abb. 28 B tabellarisch aufgeführt. Passend zu der Hauptkomponentenanalyse ergab die RNA-Sequenzierung nach Inkubation mit Lenalidomid keine signifikant differentiell exprimierten Gene in MSPZh (roter Kreis), jedoch eine signifikante differentielle Expression von insgesamt 121 Genen in MSPZm (grüner Kreis mit Überschneidungen). Von diesen wurden 10 Gene vermehrt und 111 Gene vermindert exprimiert. 110 dieser 121 nach Inkubation mit Lenalidomid in MSPZm differentiell exprimierten Gene stellten sich ebenfalls in MSPZm verglichen mit MSPZh differentiell exprimiert dar. 11 Gene waren ausschließlich in MSPZm nach Lenalidomid-Inkubation differentiell exprimiert (grüner Kreis ohne Überschneidung).

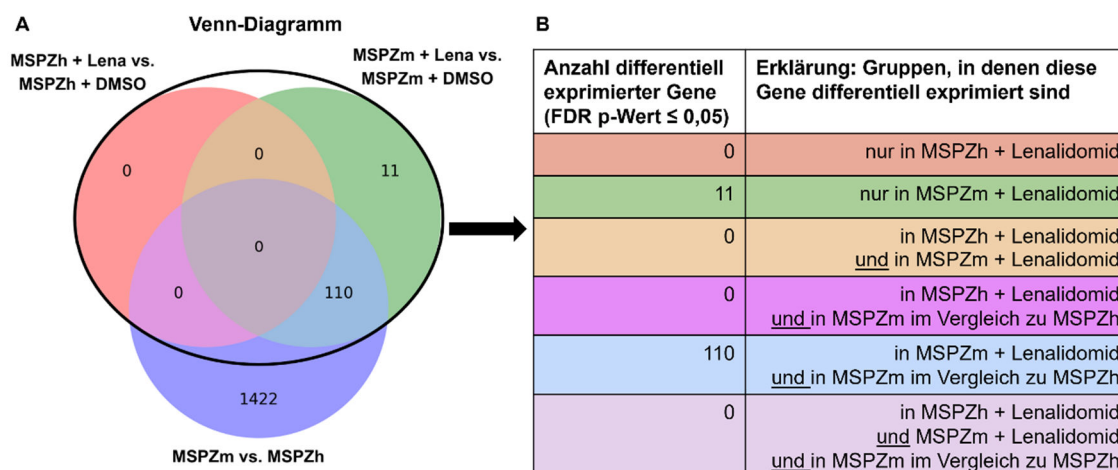


Abb. 28: **Anzahl differentiell exprimierter Gene in MSPZ nach Inkubation mit Lenalidomid.**

A Venn-Diagramm: Anzahl an differentiell exprimierten Genen in MSPZh und MSPZm nativ und nach Inkubation mit Lenalidomid. **B** Tabellarische Aufzählung der Anzahl der differentiell exprimierten Gene in MSPZ nach Inkubation mit Lenalidomid in den jeweiligen Konditionen. Lena = Lenalidomid. MSPZh = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von gesunden Probanden (*healthy*), MSPZm = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten (*maligne*). n = 3 (MSPZh), n = 2 (MSPZm).

Zur weiteren Analyse der Effekte durch Lenalidomid-Inkubation wurden die Ergebnisse und Vorhersagen der IPA betrachtet, welche in Abb. 29 dargestellt sind. Zu den *Top Canonical Pathways* gehörten die oxidative Phosphorylierung, die mitochondriale Dysfunktion, die EIF2-Signalgebung (EIF2 = *Eukaryotic Translation Initiation Factor 2*), der Sirtuin-Signalweg sowie die Östrogenrezeptor-Signalgebung. Die IPA prognostizierte eine Inhibierung von Regulatoren in MSPZm im Vergleich zu MSPZh, welche nach Inkubation mit Lenalidomid in MSPZm laut IPA aktiviert würden. Insbesondere wurden RICTOR (*Rapamycin-Insensitive Companion Of Mammalian Target Of Rapamycin*) sowie torin1 (mTOR-Inhibitor) als *Top Upstream Regulators* prognostiziert, die in MSPZ von MM-Patienten im Vergleich zu MSPZ von gesunden Probanden inhibiert, nach Inkubation mit Lenalidomid jedoch aktiviert vorhergesagt wurden. Daneben prognostizierte die IPA ST1926 und CD437 in MSPZ von MM-Patienten inhibiert, nach Inkubation mit Lenalidomid jedoch wieder aktiviert.

Top Canonical Pathways				Top Upstream Regulators			
MSPZm vs. MSPZh		MSPZm + Lena vs. MSPZm + DMSO		MSPZm vs. MSPZh		MSPZm + Lena vs. MSPZm + DMSO	
Name	Overlap in %	Name	Overlap in %	Name	vorhergesagte Aktivierung	Name	vorhergesagte Aktivierung
oxidative Phosphorylierung	47,7	oxidative Phosphorylierung	45	torin1	inhibiert	torin1	aktiviert
mitochondriale Dysfunktion	20,3	mitochondriale Dysfunktion	35,7	RICTOR	inhibiert	RICTOR	aktiviert
EIF2-Signalgebung	24,2	EIF2-Signalgebung	30,8	ST1926	inhibiert	ST1926	aktiviert
Sirtuin-Signalweg	20,5	Sirtuin-Signalweg	21,2	CD437	inhibiert	LARP1	aktiviert
FAT10-Signalweg	42,9	Örogenrezeptor-Signalgebung	15				

Abb. 29: **Ergebnisse der Ingenuity Pathway Analysis für Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen.** Dargestellt sind die *Top Canonical Pathways* (kanonische Signalwege) sowie die *Top Upstream Regulators* (vorgeschaltete Regulatoren) in den jeweiligen Vergleichen MSPZm und MSPZh sowie MSPZm + Lenalidomid und MSPZm + DMSO (Kontrolle). Auch UQCC3 wurde als *Top Upstream Regulator* in beiden Konditionen detektiert, jedoch ohne Information seitens der IPA bezüglich der vorhergesagten Aktivierung. Lena = Lenalidomid, *Overlap* (Überschneidung) = Anteil der Gene aus dem vorliegenden Datensatz in dem Signalweg an der Gesamtzahl der Gene dieses Signalwegs. EIF2 = *Eukaryotic Translation Initiation Factor 2*, MSPZh = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von gesunden Probanden (*healthy*), MSPZm = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten (*maligne*), RICTOR = *Rapamycin-Insensitive Companion Of Mammalian Target Of Rapamycin*.

Da die IPA mit RICTOR einen Bestandteil des mTOR-Signalwegs (*Mammalian Target Of Rapamycin*) und mit torin1 einen mTOR-Inhibitor als signifikant inhibiert bzw. aktiviert vorhersagte, betrachteten wir in der Analyse der DESeq2-Daten Gene des mTOR-Signalwegs genauer. Einzelne Gene des mTOR-Signalwegs stellten sich signifikant differentiell exprimiert dar (Tabelle 16). LAMTOR4 und LAMTOR5 (*Late Endosomal Adaptor, MAPK and mTOR 4, 5*) wurden durch MM-Erkrankung herauf- und nach Inkubation mit Lenalidomid in MSPZm herunterreguliert. LAMTOR2 wurde in MSPZm verglichen mit MSPZh heraufreguliert; nach Lenalidomid-Inkubation zeigte sich keine differentielle Genexpression von LAMTOR2. RICTOR präsentierte sich in keiner der Konditionen signifikant differentiell exprimiert.

Gen	Fold Change in MSPZm vs. MSPZh	Fold Change in MSPZm + Lena vs. MSPZm + DMSO
LAMTOR4	3,22	-2,61
LAMTOR5	2,33	-2,11
LAMTOR2	2,01	-

Tabelle 16: **Bestandteile des mTOR-Signalwegs in MSPZm und nach Inkubation mit Lenalidomid.** Gene aus bioinformatischer Auswertung 1. Signifikanz \triangleq FDR $p \leq 0,05$. LAMTOR = *Late Endosomal Adaptor, MAPK and mTOR*, Lena = Lenalidomid, MSPZh = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von gesunden Probanden (*healthy*), MSPZm = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten (*maligne*). $n = 3$ (MSPZh), $n = 2$ (MSPZm).

Die 121 in MSPZm nach Inkubation mit Lenalidomid differentiell exprimierten Gene betrafen insbesondere den Zellzyklus, das Zytoskelett und mitochondriale oder ribosomale Gene. Passend dazu veranschaulichten GSEA unter anderem eine signifikante Anreicherung von mitochondrialen Genen (Abb. 30 A) sowie von Genen der oxidativen Phosphorylierung (Abb. 30 B) in MSPZm nach DMSO-Kontrollbehandlung verglichen mit MSPZm nach Inkubation mit Lenalidomid. Signifikante Ergebnisse bezüglich der Stammzellsignalgebung oder der Osteogenese ergaben sich nicht.

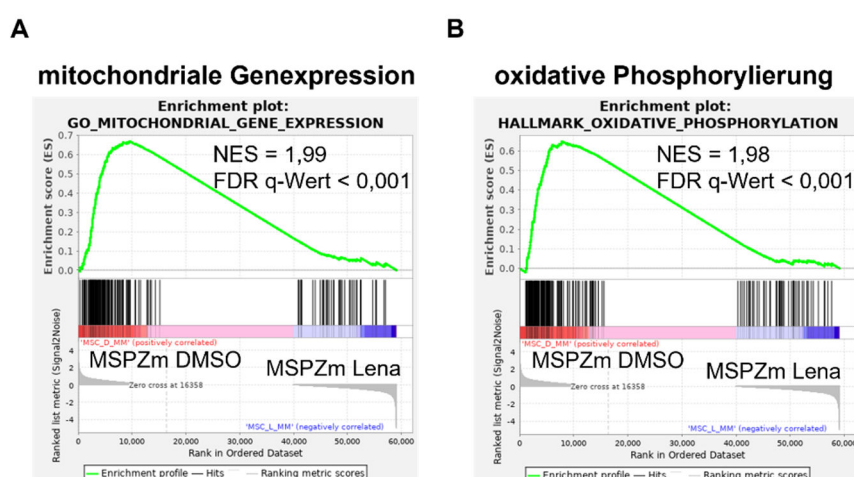


Abb. 30: **Mitochondriale Genexpression und oxidative Phosphorylierung in MSPZm nach Inkubation mit Lenalidomid.** **A** Mitochondriale Genexpression, NES = 1,9929, nominaler p-Wert < 0,001, FDR q-Wert < 0,001. **B** Oxidative Phosphorylierung, NES = 1,9836, nominaler p-Wert < 0,001, FDR q-Wert < 0,001. GSEA und Gene ausgewählt nach Kap. 2.8. Rot = MSPZm DMSO-Kontrolle, blau = MSPZm nach Lenalidomid-Inkubation mit 10 μ M. Lena = Lenalidomid, MSPZh = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen gesunder Spender,

MSPZm = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten, GSEA = *Gene Set Enrichment Analysis*, NES = *Normalized Enrichment Score*. n = 3 (MSPZh), n = 2 (MSPZm).

Die 110 Gene, die jeweils in MSPZm verglichen mit MSPZh und in MSPZm nach Lenalidomid-Inkubation verglichen mit der DMSO-Kontrollgruppe differentiell exprimiert waren, zeigten jeweils eine umgekehrte Regulation der Genexpression: In MSPZm verglichen mit MSPZh wurden 109 Gene vermehrt exprimiert, die nach Inkubation mit Lenalidomid in MSPZm vermindert exprimiert wurden; es wurde ein Gen in MSPZm verglichen mit MSPZh vermindert exprimiert, welches nach Inkubation mit Lenalidomid vermehrt exprimiert wurde. Abb. 31 dient der Veranschaulichung dieses Sachverhalts.

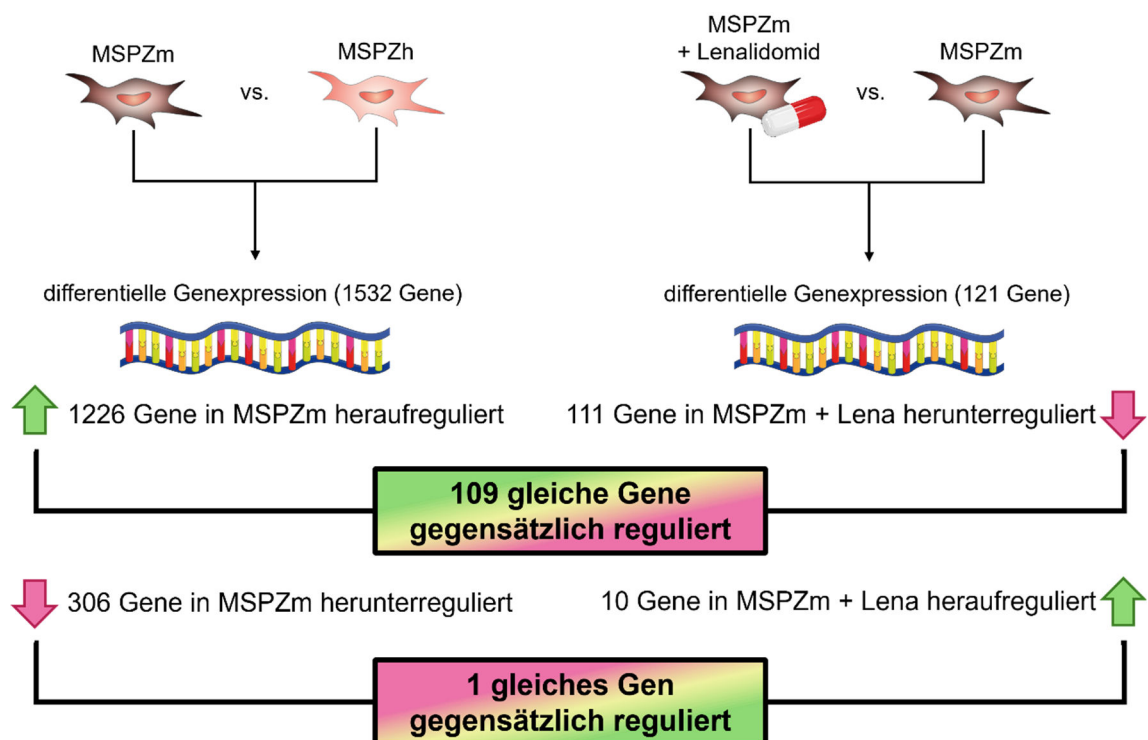


Abb. 31: **Übersicht der differentiellen Genexpression in MSPZm und MSPZh sowie nach Inkubation der MSPZm mit Lenalidomid.** Lena = Lenalidomid, MSPZh = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von gesunden Probanden (*healthy*), MSPZm = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten (*maligne*). Abb. erstellt mit Servier Medical Art von Servier.

In Tabelle 17 ist eine repräsentative Auswahl von einigen dieser 110 gegensätzlich regulierten Genen aufgeführt und nach Zugehörigkeit zu ihrer jeweiligen biologischen Funktion (repräsentativ) geordnet. Alle aufgeführten Gene wurden in MSPZm verglichen mit MSPZh vermehrt exprimiert und in MSPZm nach Inkubation mit Lenalidomid verglichen mit MSPZm nach Inkubation mit DMSO vermindert exprimiert. Eine Auflistung

aller 110 Gene inklusive *Fold Change*, die in MSPZm im Vergleich zu MSPZh in die eine Richtung und dann in MSPZm nach Inkubation mit Lenalidomid in die andere Richtung differentiell reguliert wurden, befindet sich im Anhang in Tabelle A 3.

Biologischer Prozess	Gene
mitochondriale Funktion, Energieproduktion	COX-Gene (COX7B, COX6A1, COX7A2L) NDUF-Gene (NDUFA13, NDUFB8, NDUFA2, NDUFB9) UQC2, UQC2R
mitochondriale ribosomale Proteine	MRPL-Gene (MRPL52, MRPL41, MRPL14, MRPL43, MRPL27, MRPL11, MRPL49) MRPS-Gene (MRPS15, MRPS7)
zytoplasmatische ribosomale Proteine	RPS-Gene (RPS10, RPS7, RPS18, RPS21, RPS16, RPS6, RPS9, RPS14, RPS3, RPS3A) RPL-Gene (RPL36, RPL27A, RPL29, RPL14, RPL34, RPL18A)
Protein-Degradierung	PSMB3, PSMG3 UFD1L
Zellzyklus-Regulation	CKS1B
Transkription, RNA-Prozessierung	POLR2F, POLR2G BUD31 PPIH LSM2 SNRPG PHF5A
Zellstress, Redox-Regulation	GSTO1 GPX1 PRDX5
Nukleotid-Metabolismus	NME1, NME1-NM2 DCTPP1

Tabelle 17: **Gene, deren Expression sich in MSPZm verstärkt und nach Inkubation mit Lenalidomid reduziert darstellt.** Alle Gene sind in MSPZm im Vergleich zu MSPZh verstärkt exprimiert (*Fold Change* $\geq 1,5$) und in MSPZm nach Inkubation mit 10 μM Lenalidomid im Vergleich zu MSPZm mit DMSO-Kontrolle reduziert exprimiert (*Fold Change* $\leq -1,5$). Signifikanz \triangleq FDR $p \leq 0,05$. Unter „biologischer Prozess“ in Spalte 1 ist keine vollständige Auflistung aller Funktionen und Beteiligungen des jeweiligen Gens zu finden, sondern lediglich ein repräsentativer Ausschnitt. Die Zuordnung der Gene zum jeweiligen biologischen Prozess erfolgte durch Recherche mithilfe der Datenbank www.genecards.org [213]. MSPZh = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von gesunden Probanden (*healthy*), MSPZm = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten (*maligne*). Die aufgelisteten Genabkürzungen entsprechen den standardmäßig benutzten Abkürzungen; die vollständigen Namen der Gene können bspw. unter www.genecards.org nachgeschlagen werden und sind hier zur besseren Übersicht nicht aufgeführt. n = 3 (MSPZh), n = 2 (MSPZm).

Es demaskierten sich keine Gene, auf die Lenalidomid sowohl in MSPZ als auch in CD34⁺-HSPZ wirkte. Wenngleich Lenalidomid auf CD34⁺-HSPZ und MSPZ von MM-Patienten Effekte ausübte, wurden nicht dieselben Gene in beiden Zellarten betroffen. Insgesamt wurden Effekte auf die Genexpression nach Lenalidomid-Inkubation lediglich auf MSPZm, nicht aber auf MSPZh beobachtet. Dabei führte die Lenalidomid-Inkubation in MSPZm zu einer signifikant reduzierten Expression von 109 Genen, welche zuvor durch MM-Erkrankung in MSPZm verglichen mit MSPZh vermehrt exprimiert waren. Diese Gene betrafen insbesondere mitochondriale und ribosomale Zellprozesse. Eine zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse zu den MSPZ bietet Abb. 32.

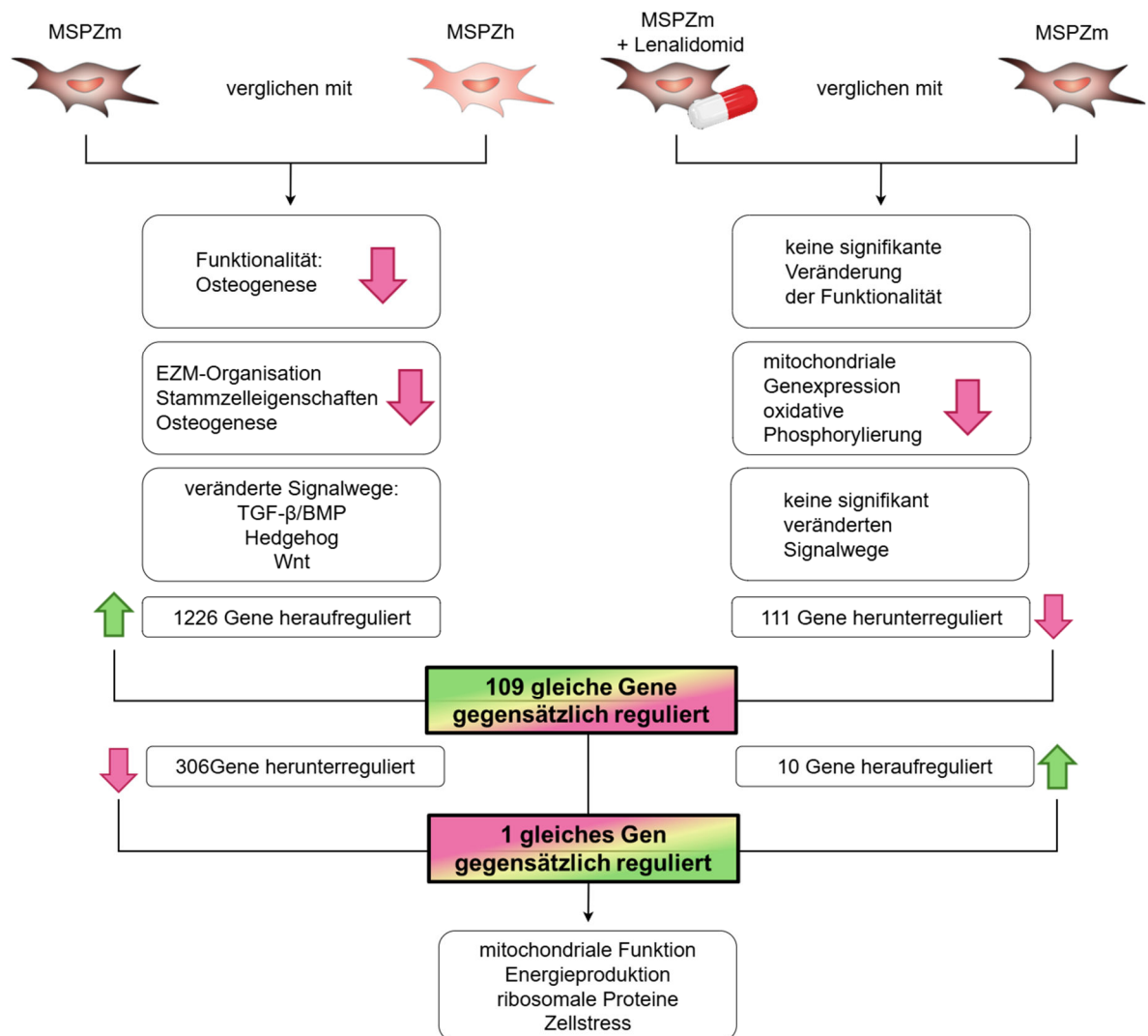


Abb. 32: **Zusammenfassendes Schaubild der Ergebnisse der MSPZ.** BMP = *Bone Morphogenetic Protein*, EZM = Extrazellulärmatrix, MSPZh = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von gesunden Probanden (*healthy*), MSPZm = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten (*maligne*). n = 3 (MSPZh), n = 2 (MSPZm), TGF-β = *Transforming Growth Factor beta*, Wnt = *Wingless Int-1*.

4 Diskussion

Das MM als maligne hämatologische Erkrankung ist wegen seiner verursachten Endorganschäden mit hoher Morbidität und Mortalität verbunden. Durch intensive Forschung konnten Mechanismen der Tumorentstehung entschlüsselt und neue Therapieansätze entdeckt werden; doch noch immer ist die Diagnose eines MM mit einer ungünstigen Prognose ohne Aussicht auf Heilung verbunden [97, 107]. In dieser Arbeit wurden Veränderungen des KM-Mikromilieus durch MM-Erkrankung untersucht sowie Wirkmechanismen des Medikaments Lenalidomid aufgedeckt, um so zu einem besseren Verständnis der Pathogenese des MM sowie der Wirkung von Lenalidomid auf das KM-Mikromilieu beizutragen.

4.1 Unterschiede der Zelllinien RPMI-8226 und INA-6

In einem Vorexperiment wurden Effekte auf das Wachstum und die Differenzierung von MM-Zelllinien nach Inkubation mit Lenalidomid ermittelt, bevor dann primäre HSPZ und MSPZ untersucht wurden. Primäre Plasmazellen aus dem Patienten machen typischerweise 48 bis 72 Stunden nach Entnahme aus dem KM-Mikromilieu den spontanen programmierten Zelltod durch. Da der antiproliferative Effekt von Lenalidomid erst nach 96 bis 120 Stunden sichtbar ist, wurden statt Primärzellen Zelllinien verwendet, um diese langfristig auf ihr Verhalten unter Inkubation mit Lenalidomid zu untersuchen [179].

Bereits Sarin *et al.* postulierten im Hinblick auf die *in vivo* Situation Unterschiede zwischen IL-6-abhängigen und IL-6-unabhängigen Zelllinien [214], sodass für unsere Experimente die IL-6-abhängige Zelllinie INA-6 sowie die IL-6-unabhängige und in der Forschung häufig genutzte Zelllinie RPMI-8226 verwendet wurden.

Bjorklund *et al.* sowie Zhu *et al.* generierten gegenüber Lenalidomid resistente MM-Zelllinien, indem sie die Zellen mit graduell steigender Lenalidomid-Konzentration über einen längeren Zeitraum kultivierten [163, 179]. In dem hier durchgeführten Langzeitexperiment wurden die Zelllinien RPMI-8226 und INA-6 unter analogen Bedingungen kultiviert, wobei sich nach anfänglich gehemmter Proliferation unter Inkubation mit Lenalidomid die Wachstumskurven der Zelllinien mit und ohne Lenalidomid-Inkubation gegen Ende des Versuchs wieder annäherten. Dementsprechend kann auch hier eine erzeugte Resistenz der Zelllinien gegenüber Lenalidomid angenommen werden.

Unsere Daten zeigten ein voneinander abweichendes Verhalten der Zelllinien RPMI-8226 und der mit IL-6 kultivierten INA-6: So konnten wir nicht nur ein stärkeres Proliferationsverhalten der INA-6 gegenüber der RPMI-8226 nachweisen; auch das Differenzierungsverhalten im CFU-Assay war unterschiedlich. Die Zelllinie RPMI-8226 generierte in der Kontrollgruppe mehr Kolonien der weißen Zellreihe als die INA-6; nach Inkubation mit Lenalidomid über 7 Wochen wurde die Koloniebildung der RPMI-8226 jedoch signifikant reduziert, wohingegen die INA-6 nach Inkubation mit Lenalidomid deutlich mehr Kolonien der weißen Zellreihe bildete. Diese in INA-6 beobachtete vermehrte Bildung von Kolonien der weißen Zellreihe kann als Ausdruck der angenommenen erzeugten Resistenz gegenüber Lenalidomid interpretiert werden, indem die Zelllinie trotz Inkubation mit Lenalidomid weiter proliferiert und sogar mehr Kolonien erzeugt als ohne Lenalidomid-Behandlung. Möglicherweise ist für diesen Sachverhalt die Hinzugabe von IL-6 bei Kultivierung der INA-6 nicht unerheblich, da IL-6 für den Krankheitsprogress sowie für eine mögliche Resistenz erzeugung des MM gegenüber Lenalidomid eine relevante Rolle einnimmt (Kap. 1.2.5, Kap. 1.3) [108, 118, 120, 163].

Diesbezüglich stellt sich die Frage, ob im Falle einer Lenalidomid-Resistenz eine Fortführung der Therapie mit Lenalidomid möglicherweise sogar pro-proliferative Effekte auf die MM-Zellen haben könnte. Belastbare klinische Daten hierzu liegen nicht vor, da das Medikament in der Regel bei Nachweis einer Resistenz abgesetzt wird. In präklinischen Studien wurde eine verstärkte Sekretion von TNF- α , IL-8 und IGF-1 von MM-Zelllinien durch Lenalidomid beobachtet, was zu einem pro-proliferativen Milieu beitragen könnte [215]. Bei Therapie-refraktären Patienten bringt eine Fortführung der Therapie in der Regel keinen weiteren Nutzen; zur Beantwortung der Frage, ob die Fortführung der Therapie potentiell schaden könnte, sind weitere präklinische und klinische Studien notwendig.

Sarin *et al.* konnten zeigen, dass verschiedene MM-Zelllinien die tatsächliche Tumorsituation im Patienten unterschiedlich gut darstellten: So belegte die in der Forschung häufig genutzte Linie RPMI-8226 einen der hinteren Plätze in ihrer Rangfolge der Übereinstimmung mit Patienten, während Zelllinien, die mit IL-6 kultiviert wurden, eine signifikant höhere Übereinstimmung zeigten [214]. Basierend auf den Ergebnissen von Sarin *et al.* kann vermutet werden, dass die Ergebnisse der Zelllinie INA-6 den tatsächlichen Gegebenheiten im Patienten stärker entsprechen als die der Linie RPMI-8226. Für zukünftige Zellkulturexperimente ist also die Auswahl der MM-Zelllinie

entscheidend; die in der Literatur häufig verwendete Zelllinie RPMI-8226 sollte vor diesem Hintergrund kritisch geprüft werden.

4.2 Das Tumormikromilieu des multiplen Myeloms

In zahlreichen Studien konnte eine Beeinflussung der MM-Zellen durch das Tumormikromilieu mit den MSPZ herausgefunden werden. Die Interaktion zwischen MM-Zellen und dem sie umgebenden KM-Mikromilieu unterstützt die Krebszellen bei Proliferation, Überleben, Therapieresistenzen, Osteoklastogenese sowie Angiogenese [216].

Doch die Zellen des Tumormikromilieus unterstützen nicht nur die Krebszellen, auch in ihren eigenen Funktionen werden sie eingeschränkt: So klagen zahlreiche MM-Patienten über eine Anämie sowie über osteolytische Knochenläsionen [125, 134, 135]. Die Pathomechanismen dahinter konnten trotz zahlreicher Studien bisher nicht vollständig aufgeklärt werden [126]. Mit dem Ziel, weitere Erkenntnisse diesbezüglich zu gewinnen, führten wir Experimente mit den Vorläufern der Erythrozyten, den CD34⁺-HSPZ, sowie mit den Vorläufern der Osteoblasten, den MSPZ, durch.

Die Einführung des immunmodulatorischen Medikaments Lenalidomid führte zu einer wesentlichen Verbesserung der Therapie und damit auch der Prognose für an MM erkrankte Patienten [102-105]. Wenngleich Lenalidomid ein häufig genutztes Mittel in der Therapie des MM darstellt, sind seine Wirkmechanismen noch nicht vollends aufgeklärt (Kap. 1.3). Die Unterbrechung des Zusammenspiels zwischen MM-Zellen und dem Tumormikromilieu stellt einen wichtigen Teil des Wirkmechanismus von Lenalidomid dar, der noch immer nicht vollständig entschlüsselt werden konnte [123]. Daher lag der Fokus dieser Arbeit auf dem Effekt von Lenalidomid auf zwei wichtige Zellpopulationen des KM-Mikromilieus und damit auch des Tumormikromilieus: CD34⁺-HSPZ sowie MSPZ, die jeweils von gesunden Probanden sowie von MM-Patienten gewonnen und mit und ohne Lenalidomid kultiviert wurden. Die vorliegende Arbeit bietet in diesem Rahmen neue Erkenntnisse zur Wirkungsweise von Lenalidomid auf das Tumormikromilieu, allen voran auf CD34⁺-HSPZ sowie MSPZ und damit auch auf Hämatopoiese und Osteogenese, an deren Störungen zahlreiche MM-Patienten leiden (Kap. 1.2.3). Diese Erkenntnisse sollen zum besseren Verständnis der Krankheit sowie der Behandlungsmöglichkeiten mit Lenalidomid beitragen.

Insgesamt untersuchten wir sowohl CD34⁺-HSPZ als auch MSPZ jeweils von gesunden Probanden und von MM-Patienten. Da bei Erkrankung an MM nicht das gesamte

Knochenmark des Körpers betroffen ist, ist davon auszugehen, dass im selben MM-Patienten MSPZ und CD34⁺-HSPZ mit den Eigenschaften der MSPZh/CD34⁺h sowie der MSPZm/CD34⁺m vorkommen. Daher interessierten wir uns zunächst für die Unterschiede von CD34⁺-HSPZ und MSPZ von gesunden Probanden verglichen mit Zellen von MM-Patienten hinsichtlich ihrer jeweiligen Funktionalität und Genexpression. In einem weiteren Schritt wurden dann die Effekte von Lenalidomid auf CD34⁺-HSPZ und MSPZ analysiert.

4.2.1 Hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen im multiplen Myelom: Hinweise auf funktionelle Defizite und gestörte Interaktionen mit dem Knochenmark-Mikromilieu

Die Anämie stellt ein häufiges Symptom bei Erstdiagnose des MM dar, zu dessen Ursprung bereits einige Erkenntnisse bestehen (Kap. 1.2.6). Um diese Erkenntnisse zu erweitern und zu einem besseren Verständnis des Pathomechanismus hinter der Anämie beizutragen, wurde die Funktionalität der CD34⁺-HSPZ von MM-Patienten mit derjenigen gesunder Probanden verglichen. Im Anschluss wurde eine jeweilige RNA-Sequenzierung durchgeführt.

Für die häufig vorkommende Anämie bei MM-Patienten wurden bereits eine physische Verdrängung der CD34⁺-HSPZ aus der Knochenmarknische sowie zytotoxische Effekte von Myelomzellen auf CD34⁺-HSPZ beschrieben [127-129]. Im hier durchgeführten CFU-Assay wurde eine signifikante Reduktion der Bildung von Kolonien der weißen sowie eine tendentielle Reduktion der Bildung von Kolonien der roten Blutzellreihen durch CD34⁺m im Vergleich zu CD34⁺h beobachtet. Dies spricht für eine eingeschränkte Funktionalität der CD34⁺-HSPZ von MM-Patienten. Durch die ausschließliche Kultivierung von CD34⁺-HSPZ im CFU-Assay konnten weder mechanische Verdrängungseffekte noch zytotoxische Einflüsse seitens der MM-Zellen wirksam werden. Auch eine möglicherweise eingeschränkte Unterstützung der Hämatopoiese durch die MSPZ kann nicht ausschließlich ursächlich für die eingeschränkte Hämatopoiese sein, da im Rahmen des CFU-Assays die von den CD34⁺-HSPZ benötigten Faktoren für die Hämatopoiese bereits hinzugefügt wurden. Dementsprechend kann durch unsere Daten gestützt davon ausgegangen werden, dass die CD34⁺m selbst durch die vorherige *in vivo* Nähe zu MM-Zellen im Hinblick auf ihre Funktionalität gestört werden, wie es auch schon Bruns *et al.* postulierten [126].

An diese Erkenntnis anschließend wurde eine genauere Untersuchung der CD34⁺-HSPZ mittels RNA-Sequenzierung durchgeführt, um bestimmte Gene ausfindig zu machen,

welche die hämatopoietischen Fähigkeiten der CD34⁺m beeinträchtigen. Bruns *et al.* beschrieben bereits Veränderungen der Genexpression zwischen CD34⁺m und CD34⁺h in ihrer *Microarray*-Untersuchung [126]. Die RNA-Sequenzierung bietet einen umfassenderen und unvoreingenommeneren Ansatz. Anders als bei *Microarrays*, die sich auf den Nachweis bekannter Transkripte beschränken, ermöglicht die RNA-Sequenzierung die Entdeckung neuer Transkripte, alternativer Spleißvorgänge und seltener Gene. Dadurch sind tiefere Einblicke in die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen von Krankheiten möglich.

Insgesamt wurden 199 differentiell exprimierte Gene in CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h detektiert. Der Abgleich mit den von Bruns *et al.* publizierten Top 10 der am stärksten herauf- sowie herunterregulierten Gene in CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h in der *Microarray*-Untersuchung zeigte keine Übereinstimmung mit den in unserer RNA-Sequenzierung signifikant differentiell exprimierten Genen.

Die IPA zeigte signifikante Unterschiede in der Expression immunregulatorischer und inflammatorischer Gene zwischen CD34⁺m und CD34⁺h. Darüber hinaus wiesen *Reactome*-Analysen auf eine Beteiligung der differentiell exprimierten Gene an Prozessen der Organisation der EZM sowie der Zell-Zell-Kommunikation hin. Außerdem konnten durch unsere Arbeit nun einzelne Gene identifiziert werden, welche durch eine differentielle Expression in CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h zu diesen Veränderungen führten. Spezifisch zeigten Gene mit Bezug zur EZM in CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h eine signifikant reduzierte Expression, was auf eine strukturelle und funktionelle Beeinträchtigung des KM-Mikromilieus durch das MM schließen lässt (Abb. 14). Damit bestätigen unsere Daten, dass eine Erkrankung am MM weitreichende Veränderungen des KM-Mikromilieus verursacht, welche auch die CD34⁺-HSPZ betreffen.

GSEA veranschaulichten signifikant veränderte Stammzeleigenschaften in CD34⁺m, wofür unter anderem die Gene TUBB3 (Tubulin β 3 Class III), COL1A1 (*Collagen Type I Alpha 1 Chain*), PPARG (*Perioxosome Proliferator Activated Receptor Gamma*) sowie MME (*Membrane Metalloendopeptidase*) mit signifikant reduzierter Expression in CD34⁺m verantwortlich waren. Diese veränderten Stammzeleigenschaften führten zu einem veränderten Häm-Metabolismus sowie einer veränderten Expression MSPZ-assoziiierter Gene mit signifikant reduzierten Expressionen von CTSB (*Cathepsin B*), HIST1H4C (H4 Clustered Histone), CCR1 (*C-C Motif Chemokine Receptor 1*), CD14, SPP1 (*Secreted Phosphoprotein 1, Osteopontin*) und FUT1 (*Fucosyltransferase 1*). Diese Veränderungen der Stammzeleigenschaften, des Häm-Metabolismus sowie

MSPZ-assoziiierter Gene können somit mitverantwortlich sein für die eingeschränkte Funktionalität des Knochenmarks in MM-Patienten, insbesondere hinsichtlich der eingeschränkten Hämatopoiese und Osteogenese. Ein veränderter Eisen-Metabolismus in MM-Zellen ist bereits bekannt [217]. Möglicherweise führt dieser zu dem veränderten Häm-Metabolismus in CD34⁺m – auch andersherum kann hingegen ein veränderter Häm-Metabolismus zu einem veränderten Eisen-Metabolismus führen.

Interessanterweise zeigte sich Osteopontin (SPP1) in CD34⁺m mit einem *Fold Change* von -16 deutlich reduziert im Vergleich zu CD34⁺h. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass Standal *et al.* erhöhte Osteopontin-Werte im Plasma von MM-Patienten feststellten und dafür die Osteopontin-Produktion in MM-Zellen verantwortlich machten [218]. Dabei nimmt Osteopontin eine unterstützende Funktion in der Proliferation der MM-Zellen ein [219]. Die reduzierte Osteopontin-Produktion in CD34⁺m könnte einen kompensatorischen Mechanismus darstellen, um tumorunterstützenden Prozessen entgegenzuwirken. Zur genaueren Charakterisierung der funktionellen Rolle von Osteopontin im MM-Mikromilieu sind weiterführende Untersuchungen erforderlich.

Bei der Suche nach signifikant veränderten Signalwegen in CD34⁺m kamen in GSEA TGF- β , Hedgehog sowie Notch zur Darstellung. Die Veränderung dieser Signalwege könnte eine potentielle Erklärung für die zuvor beobachteten veränderten Stammzeleigenschaften sowie die beeinträchtigte Hämatopoiese und Osteogenese in MM-Patienten bieten, da diese Signalwege an beiden Prozessen beteiligt sind (Kap. 1.1.2, Kap. 1.1.4). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Bruns *et al.*, welche eine vermehrte TGF- β -Produktion als Ursache für die beeinträchtigte Hämatopoiese beobachteten [126].

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass CD34⁺m funktionell beeinträchtigt sind, was sich unter anderem in einer reduzierten Koloniebildung im CFU-Assay widerspiegelte. Die RNA-Sequenzierung identifizierte 199 differentiell exprimierte Gene zwischen CD34⁺m und CD34⁺h mit besonderem Bezug zu Stammzeleigenschaften, EZM-Struktur, Immunregulation und hämatopoetischer Unterstützung. Im Vergleich zu früheren *Microarray*-Daten erweitern die hier erhobenen RNA-Seq-Daten das Verständnis der molekularen Veränderungen im KM-Mikromilieu des MM. Die deutlich reduzierte Expression verschiedener Gene, welche mit Stammzeleigenschaften, dem Häm-Metabolismus sowie dem Zusammenspiel mit MSPZ assoziiert sind, sowie Veränderungen in TGF- β -, Notch- und Hedgehog-Signalwegen deuten auf komplexe Störungen hin, die sowohl die Hämatopoiese als auch die Interaktion von CD34⁺-HSPZ

mit ihrer Umgebung betreffen. Diese Befunde liefern neue Einblicke in die Pathophysiologie der MM-assoziierten Anämie und bilden eine Grundlage für weiterführende funktionelle Studien.

Nachdem signifikante Unterschiede in CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h hinsichtlich der Funktionalität sowie der Genexpression auf RNA-Ebene festgestellt wurden, folgte die Untersuchung der Effekte einer Inkubation mit Lenalidomid auf CD34⁺-HSPZ von gesunden Probanden sowie von MM-Patienten.

4.2.2 Lenalidomid führt zur partiellen Reversion der Myelom-assoziierten differentiellen Genexpression in Hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen

Funktionale Untersuchungen der CD34⁺-HSPZ nach Inkubation mit Lenalidomid ergaben keine Auswirkung auf das Zellwachstum; auch die Bildung von Kolonien der weißen Zellreihe im CFU-Assay wurde nicht signifikant verändert. Hinsichtlich der Bildung von Kolonien der roten Zellreihe wurde hingegen eine signifikante Reduktion nach Inkubation mit Lenalidomid in CD34⁺h beobachtet. Auch in CD34⁺m stellte sich die Koloniebildung reduziert dar, diese Beobachtung war jedoch nicht signifikant – möglicherweise aufgrund der geringen Probenzahl sowie der grundsätzlich geringen Anzahl an Kolonien der roten Zellreihe in CD34⁺m (rote Kolonien pro *Well* in CD34⁺m: DMSO-Kontrolle: 3,3 vs. Lenalidomid: 0,4 Kolonien).

Wilk *et al.* untersuchten bereits CD34⁺-HSPZ von MM-Patienten vor und nach sechsmonatiger *in vivo* Inkubation mit Lenalidomid und beobachteten hinsichtlich der CFU-Aktivität eine gleichbleibende Anzahl an Kolonien der weißen Zellreihe bei gleichzeitig leicht erhöhter Anzahl an Kolonien der roten Zellreihe durch Lenalidomid [164]. Diese Diskrepanz unserer Ergebnisse mit denen von Wilk *et al.* könnte einerseits an der unterschiedlichen Dauer der Inkubation mit Lenalidomid liegen, andererseits auch daran, dass Wilk *et al.* CD34⁺-HSPZ nach *in vivo* Behandlung untersuchten, unsere CD34⁺-HSPZ jedoch *in vitro* mit Lenalidomid behandelt wurden. Auch Koh *et al.* beschreiben für Pomalidomid, ein weiteres Thalidomid-Analogon in der Gruppe der IMiDs, nach *in vitro* Behandlung passend zu unseren Ergebnissen eine reduzierte Erythropoiese im CFU-Assay in CD34⁺-HSPZ aus gesunden Spendern [169].

Die Auswertung der DESeq2-Daten ergab signifikante Effekte von Lenalidomid auf die Genexpression von CD34⁺-HSPZ. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede in der Genregulation in Abhängigkeit des physiologischen bzw. pathologischen Status der jeweiligen Zellen. In CD34⁺h beeinflusste Lenalidomid die Expression von 182 Genen,

während in CD34⁺m 327 Gene differentiell exprimiert wurden. Diese Befunde deuten darauf hin, dass die MM-Erkrankung die zelluläre Reaktivität gegenüber Lenalidomid modifiziert. In CD34⁺m kam eine erhöhte Anzahl differentiell exprimierter Gene durch Lenalidomid zur Darstellung als von gesunden Probanden. 133 gleiche Gene wurden sowohl in CD34⁺h als auch in CD34⁺m durch Lenalidomid beeinflusst und in beiden Gruppen in die gleiche Regulationsrichtung verändert (64 Gene wurden in beiden Zelltypen herauf-, 69 herunterreguliert). Dies weist einerseits auf eine überlappende, gesundheitsstatusunabhängige Wirkungskomponente des Medikaments hin, gleichzeitig aber auch auf eine krankheitsspezifisch verstärkte Sensitivität der CD34⁺m gegenüber Lenalidomid-vermittelten Veränderungen der Genexpression. Dies ist insbesondere insofern interessant, als dass Bruns *et al.* von einer reversiblen funktionellen Störung der CD34⁺-HSPZ durch MM-bezogene Einflüsse ausgehen [126]. Diese Einflüsse scheinen die CD34⁺-HSPZ jedoch insofern zu verändern, als dass die Wirkung Lenalidomids davon abhängig zu sein scheint.

Die IPA ergab vor allem Effekte von Lenalidomid auf Komponenten des Immunsystems mit einer Beeinflussung von Lipopolysacchariden, der Phagosomenbildung, der Granulozytenadhäsion und -diapedese sowie von TNF- α . Außerdem zeigten sich mit β -Östradiol und Dexamethason auch hormonelle Antworten betroffen. Diese Veränderungen könnten die MM-supportiven Vorgänge im KM-Mikromilieu stören.

Eine Inkubation mit Lenalidomid beeinflusste insbesondere die Organisation der EZM sowie die Zell-Zell-Kommunikation. *Reactome*-Analysen zeigten in CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h eine Herunterregulation der EZM-Organisation sowie der Zell-Zell-Kommunikation, wohingegen dieselben *Reactome*-Analysen nach Lenalidomid-Inkubation eine Heraufregulation dieser Prozesse ergaben. Mehrere Gene mit differentieller Genexpression nach Inkubation mit Lenalidomid, welche an der EZM-Organisation sowie der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kommunikation beteiligt sind, wurden hierzu ermittelt. Dazu gehörten unter anderem CDH5 (*Cadherin 5*), ITGA10 (*Integrin Subunit alpha 10*), ITGB5 (*Integrin Subunit beta 5*), oder SPARC (*Secreted Protein Acidic and Cysteine Rich*).

Analog zu der in unseren CFU-Assays beobachteten deutlich eingeschränkten Bildung von Kolonien der roten Zellreihe von CD34⁺h nach Inkubation mit Lenalidomid veranschaulichten GSEA signifikante Veränderungen des Häm-Metabolismus sowohl für CD34⁺h als auch für CD34⁺m. Auch hierfür wurden zahlreiche Gene mit deutlich reduzierter Expression nach Inkubation mit Lenalidomid gefunden, darunter die

Hämoglobin-Untereinheiten HbD, HbQ1, HbA1 und HbA2, HbB, HbM und HbZ. Wilk *et al.* hatten in ihren Untersuchungen teilweise eine Heraufregulation von Genen beobachtet, die sich in unseren Ergebnissen herunterreguliert darstellten [164]. Wie bereits bei den CFU-Ergebnissen ergaben sich hier Diskrepanzen zwischen den Beobachtungen von Wilk *et al.* und unseren eigenen Ergebnissen, die möglicherweise, wie oben diskutiert, durch die deutlich längere *in vivo* Exposition mit Lenalidomid in den Versuchen von Wilk *et al.* erklärt werden können.

Die Auswertung der DESeq2-Daten sowie der PCR-Analysen der CD34⁺h nach Inkubation mit Lenalidomid offenbarte eine reduzierte c-kit-Expression nach Lenalidomid-Inkubation, welche allerdings nicht nach dem FDR p-Wert signifikant war, sowie eine tendentiell erhöhte CXCR-Expression ($p = 0,06$). Aufgrund der Relevanz von c-kit für die Hämatopoiese und die Aufrechterhaltung des KM-Mikromilieus wurden diese Ergebnisse dennoch präsentiert. c-kit ist für Proliferation und Differenzierung der HSPZ zuständig, während CXCR4 die CD34⁺-HSPZ in einem Ruhezustand hält (Kap. 1.1.2). Durch eine Erhöhung von CXCR4 gepaart mit einer erniedrigten c-kit-Expression nach Inkubation mit Lenalidomid könnten die CD34⁺-HSPZ also vermehrt in einem Ruhezustand gehalten werden, was mit der zuvor beobachteten reduzierten Bildung von Kolonien der roten Blutzellreihe einhergehen würde (Kap. 3.2.1). Eine Hypothese wäre, dass die CD34⁺-HSPZ-Population so zunächst aufrechterhalten werden kann, sodass die HSPZ möglicherweise langfristig wieder vermehrt proliferieren und differenzieren können, so wie es Wilk *et al.* beschrieben.

In CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h wurde zuvor bereits eine Veränderung der Signalwege TGF- β , Wnt und Hedgehog detektiert. Nach Inkubation der HSPZ mit Lenalidomid wurde eine signifikant differentielle Expression für Gene festgestellt, welche an den Signalwegen TGF- β , Wnt, Notch und Hippo teilnehmen. Damit nimmt Lenalidomid weiteren Einfluss auf die Komposition des KM-Mikromilieus.

Pellagatti *et al.* untersuchten bereits die Effekte von Lenalidomid auf Erythroblasten aus Patienten mit *myelodysplastischem Syndrom* (MDS) und beschreiben sehr ähnliche zu den hier präsentierten Ergebnissen [220]. So fand sich bei ihnen eine Heraufregulierung von VSIG4 (*V-Set and Immunoglobulin Domain Containing 4*), INHBA (*Inhibin Subunit Beta A*) und SPARC sowie eine Herabregulierung von HBA2 (*Hemoglobin Subunit alpha 2*), GYPA (*Glycophorin A* (MNS Blutgruppe)) und KLF1 (*KLF Transcription Factor 1*) in mit Lenalidomid behandelten Erythroblasten. Diese Gene regulierte Lenalidomid auch in den hier beschriebenen Ergebnissen in den CD34⁺-HSPZ herauf respektive herunter.

Somit kann vermutet werden, dass Lenalidomid eine ähnliche Wirkung auf hämatopoietische Zellen von MM-Patienten wie auf Zellen von MDS-Patienten ausübt.

Insbesondere interessant war eine gegensätzliche Regulation der Genexpression in CD34⁺m durch MM-Erkrankung einerseits sowie nach Inkubation mit Lenalidomid andererseits: Es wurden 30 Gene in CD34⁺m verglichen mit CD34⁺h herunterreguliert, welche nach Inkubation mit Lenalidomid heraufreguliert wurden (Tabelle 14:). Hierbei könnte es sich dementsprechend um einen Wirkmechanismus von Lenalidomid handeln, bei dem Veränderungen auf RNA-Ebene, die durch die Krankheit entstehen, direkt umgekehrt werden würden. Die MM-Erkrankung könnte mit einem Funktionsverlust bestimmter Eigenschaften der CD34⁺-HSPZ assoziiert sein, bedingt durch die signifikante Herunterregulation spezifischer Gene. Nach Lenalidomid-Inkubation scheint eine gegenläufige Genexpression stattzufinden, was auf eine potentielle Wiederherstellung dieser Eigenschaften hinweisen könnte.

Zu diesen 30 gegensätzlich regulierten Genen gehörten unter anderem solche, die die bereits bekannten Signalwege betreffen: DAAM2 (*Dishevelled Associated Activator Of Morphogenesis 2*) als Schlüssel-Regulator des Wnt-Signalwegs [221], welcher durch MM-Erkrankung deutlich vermindert und nach Inkubation mit Lenalidomid genauso deutlich vermehrt exprimiert wurde; TREM2 (*Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2*) als Regulator des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs [222]; TSPAN15 (*Tetraspanin 15*) als Regulator der Metalloprotease ADAM10 und der Notch-Aktivität [223]. Auch CSF1R (*Colony Stimulating Factor 1 Receptor*), der eine essentielle Rolle in Proliferation und Differenzierung der CD34⁺-HSPZ [224] und der Knochenentwicklung spielt [225], stellte sich durch MM-Erkrankung vermindert und nach Inkubation mit Lenalidomid vermehrt exprimiert dar. Weiterhin interessant war die verminderte Expression zweier Elastasen, namentlich ELANE (*Elastase, Neutrophil Expressed*) sowie CELA2B (*Chymotrypsin Like Elastase 2B*), welche sich jeweils um das -2,5-fache (ELANE) und das -10-fache (CELA2B) reduziert in CD34⁺m im Vergleich zu CD34⁺h darstellten. Nach Inkubation mit Lenalidomid zeigte sich hingegen eine 2,5-fach (ELANE) sowie 37-fach (CELA2B) vermehrte Expression beider Gene. Unsere Daten erweiterten die Ergebnisse außerdem um spezifische, das Immunsystem betreffende Gene: Für unter anderem VSIG4, FCAR (*Fc alpha Receptor*), SLAMF8 (*Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family Member 8*), MARCO (*Macrophage Receptor with Collagenous Structure*), IL1R2 (*Interleukin 1 Receptor Type 2*) und CD209 kehrte Lenalidomid die zuvor differentielle Genexpression in CD34⁺m wieder um. Somit unterstützen diese Daten bisherige Entdeckungen, die immunmodulatorische Effekte für Lenalidomid fanden [143, 144, 226-

228] und erweitern diese um genaue Gene, welche durch Lenalidomid differentiell exprimiert wurden.

Insgesamt kehrte Lenalidomid die zuvor durch MM-Erkrankung differentielle Genexpression von 30 Genen um, die an der Regulation des Immunsystems, der EZM, der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kommunikation beteiligt sind. Für ein besseres Verständnis der Bedeutung dieser spezifischen Gene für die Entstehung und Symptomatik des MM sowie für die Wirkung von Lenalidomid bedarf es weiterer Forschung in der Zukunft.

4.2.3 Veränderungen der Genexpression Mesenchymaler Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten: Hinweise auf eine gestörte Osteogenese und ein tumorförderndes Milieu

Osteolytische Knochenläsionen gehören zu den möglichen Endorganschäden des MM und haben für den Patienten weitreichende Konsequenzen. Die vorliegende Arbeit bietet neue Erkenntnisse über die mögliche Genese der eingeschränkten Osteogenese, indem die Vorläuferzellen der Osteoblasten, die MSPZ, hinsichtlich ihrer Genexpression untersucht wurden und Zellen von MM-Patienten mit Zellen von gesunden Probanden verglichen wurden. Bereits in der Hauptkomponentenanalyse wurde aufgrund des Clusterings deutlich, dass sich MSPZh von MSPZm unterscheiden. Die RNA-Sequenzierungsanalyse stellte 1532 differentiell regulierte Gene von MSPZm verglichen mit MSPZh dar.

Reactome-Analysen veranschaulichten, dass diese differentielle Genexpression zu einer Veränderung der Organisation der EZM führte. Zahlreiche Gene wurden identifiziert, die die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beeinflussen und die eine Rolle bei der Adhäsion der MM-Zellen im Knochenmark spielen, wie unter anderem VCAM, IGF2 (*Insulin Like Growth Factor 2*), ITGA9 (*Integrin Subunit alpha 9*) und ITGB2 (*Integrin Subunit beta 2*, Kap. 1.2.5). Unsere Daten lassen die Hypothese zu, dass diese in MSPZm veränderte EZM-Organisation auch durch veränderte Stammzeleigenschaften verursacht werden kann, wie durch GSEA veranschaulicht und durch die DESeq2-Daten bestärkt.

Die Erkrankung am MM veränderte die MSPZ also offensichtlich in ihren Stammzeleigenschaften und damit in ihrer Fähigkeit zur Organisation der EZM und auch der Osteogenese: GSEA demonstrierten eine verstärkte Expression für Gene der Osteogenese in MSPZh verglichen mit MSPZm. Auch in den DESeq2-Daten konnten zahlreiche für die Osteogenese relevante Gene identifiziert werden, welche sich in MSPZm signifikant vermindert exprimiert darstellten. Darunter insbesondere zu nennen

sind Osteocalcin (OCN/BGLAP = *Bone gamma-Carboxyglutamate Gla Protein*), Osteomodulin (OMD), *Integrin Binding Sialoprotein* (IBSP), *Short Stature Homebox* (SHOX), Osterix (OSX/SP7) und Osteocrin (OSTN). Bemerkenswert war die stark vermehrte Genexpression von *Adhesion G Protein-Coupled Receptor G7* (ADGRG7) mit einem *Fold Change* von 3361,49 in MSPZm und 1639,94 in CD34⁺m im Vergleich zu MSPZ und CD34⁺-HSPZ von gesunden Probanden insbesondere insofern, als dass ADGRG7 in den Krankheiten *Osteogenesis Imperfecta* sowie *Fibrogenesis Imperfecta Ossium*, die wie das MM mit Osteopenie und Knochenschmerzen einhergehen, ebenfalls stark heraufreguliert war [229]. Somit könnte diesem Gen eine zentrale Bedeutung für die osteolytischen Läsionen durch Erkrankung an MM zukommen, dessen Wirkung möglicherweise in der Zukunft nach weiterer Forschung medikamentös unterbrochen werden könnte.

Die eingeschränkte Osteogenese in MM-Patienten ist auch von einem immunologischen Standpunkt aus zu betrachten: Osteoblasten beeinflussen die Immunaktivität im Knochenmark durch Zytokin-Signalübertragung und Unterstützung der Leukopoiese [230]. Eine Unterdrückung der Osteoblastenbildung beim MM kann somit nicht nur zu Knochenläsionen führen, sondern auch zu einer veränderten, eingeschränkten Immunabwehr mit Bildung einer tumorpermissiven Nische.

Auch Gene der Signalwege TGF- β , hier insbesondere RUNX2, sowie der Signalwege Hedgehog und Wnt waren in MSPZm im Vergleich zu MSPZh differentiell exprimiert. All diese Gene und Signalwege spielen nicht nur in Zellinteraktionen eine Rolle, sondern sind auch essentiell an der physiologischen Zusammensetzung und der Funktionalität des KM-Mikromilieus und damit auch an der Osteogenese sowie der Hämatopoiese beteiligt. Diese Dysregulation der Genexpression kann folglich zu einer gestörten EZM-Komposition führen, wie sie auch die *Reactome*-Ergebnisse zeigten, mit gestörter Kommunikation innerhalb der Knochenmarknische, wodurch die dort ablaufenden Prozesse beeinträchtigt werden. So steigern sowohl der Wnt-, als auch der Hedgehog- sowie der BMP-Signalweg die Proliferation und Selbsterneuerung der CD34⁺-HSPZ [42-44]. Werden diese Faktoren nun von MSPZm vermindert exprimiert, kann dies zu der eingeschränkten Hämatopoiese in MM-Patienten beitragen.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit bereits bekannten Ergebnissen zur eingeschränkten Osteogenese in MM-Patienten, die in Tabelle 4 (Kap. 1.2.7) beschrieben wurden und erweitern sie gleichzeitig um neu identifizierte differentiell exprimierte Gene. So fanden Standal *et al.* eine inhibierte BMP-Expression in MM-

Patienten durch vermehrte HGF-Signale aus Myelomzellen [136]. Tian *et al.* sowie Qiang *et al.* beschrieben eine Wnt-Antagonisierung durch Dkk-1, sezerniert von Myelomzellen [139, 140]. Die von uns beobachtete veränderte Expression von Genen des HH-Signalwegs könnte durch eine Gli-Inhibition durch Myelomzellen verursacht werden, wie sie Tibullo *et al.* beschrieben [141]. Die Ergebnisse von Bingzong *et al.* zeigten eine vermehrte Expression von TGF- β 1 in MSPZm im Vergleich zu MSPZh [231], wohingegen sich in unseren Ergebnissen der RNA-Sequenzierung eine Anreicherung des TGF- β -BMP-Signalwegs in MSPZh verglichen mit MSPZm darstellte. Eine solche weniger starke TGF- β 1-Signaltransduktion in MSPZm könnte die verminderte Osteogenese erklären, da RUNX2 als Zielgen von TGF- β 1 sowie BMP entscheidend an der Osteogenese beteiligt ist und bei einer verminderten TGF- β 1-Aktivität ebenfalls weniger stark aktiviert wird [63]. Eine Theorie, um die Daten von Bingzong *et al.* mit unseren Daten in Einklang zu bringen, könnte sein, dass MSPZm womöglich vermehrt TGF- β 1 für andere Zellen des KM-Mikromilieus sezernieren, selbst aber vermindert auf TGF- β 1-Signale reagieren. Passend zu dieser Theorie stellten sich in unseren Daten der TGF- β -Rezeptor 1 (TGFR1) sowie der TGF- β -Rezeptor 2 (TGFR2) und der BMP-Rezeptor 1B (BMPR1B) in MSPZm verglichen mit MSPZh signifikant vermindert exprimiert dar.

Zusätzlich zu erwähnen sei noch die deutlich verstärkte Expression von SLAMF7 (*Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family Member 7*) mit einem *Fold Change* von 97,53 in MSPZm im Vergleich zu MSPZh, da mit Elotuzumab als SLAMF7-Antikörper eine neue Therapiemöglichkeit des MM besteht (Zulassung durch die EMA im Mai 2016) [232]. SLAMF7 wird von zahlreichen hämatopoietischen Zellen exprimiert, darunter auch Immunzellen sowie MM-Zellen [233, 234]. Tai *et al.* fanden heraus, dass SLAMF7 eine wichtige Rolle bei der Adhäsion von MM-Zellen im Knochenmark einnimmt [235]. Mit Elotuzumab steht ein monoklonaler Antikörper gegen SLAMF7 zur Verfügung, der beim MM auch in Kombination mit Lenalidomid eingesetzt werden kann [236, 237]. Die Wirkungsweise von Elotuzumab über NK-Zellen und zytotoxische Effekte auf MM-Zellen ist bereits bekannt [235, 238]. Unsere Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass Elotuzumab auch über eine Interaktion mit MSPZm Effekte ausüben könnte. Unsere Daten stützen damit die Hypothese, dass Elotuzumab insbesondere auf MSPZ von MM-Patienten eine Wirkung entfalten kann, da diese SLAMF7 deutlich stärker exprimieren als MSPZh. Für ein genaueres Verständnis dieser ist weitere Forschung mit Elotuzumab und MSPZ in der Zukunft nötig.

4.2.4 Lenalidomid wirkt selektiv auf Mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten und führt zur partiellen Reversion der Myelom-assoziierten differentiellen Genexpression

Eine Beeinflussung des Knochenstoffwechsels durch Lenalidomid gilt als gesichert; Umfang und Mechanismus dieser Wirkung sind jedoch bislang unzureichend untersucht. Besonders unklar ist, ob Lenalidomid lediglich die Osteolyse hemmt oder auch aktiv die Osteogenese fördert (Kap. 1.3.2). Um neue Erkenntnisse diesbezüglich zu erlangen, prüften wir anfänglich die direkte Wirkung von Lenalidomid auf MSPZ, um dann die genetische Beeinflussung auch im Hinblick auf die Osteogenese zu betrachten.

Zunächst untersuchten wir, ob Lenalidomid die Osteogenese durch eine vermehrte Proliferation der MSPZ fördert. Hierbei stellten wir keine signifikante Beeinflussung des Zellwachstums durch Lenalidomid fest. Eine quantitative Vermehrung der osteogenetischen Vorläufer durch Lenalidomid scheint mit diesen Ergebnissen unwahrscheinlich, daher überprüften wir im Folgenden, ob Lenalidomid die Osteogenese über eine direkte Wirkung auf MSPZ fördert. Auch diese Versuche offenbarten keine signifikanten Unterschiede in der osteogenetischen Kapazität der MSPZ mit und ohne Inkubation mit Lenalidomid. Somit wurden keine Hinweise für direkte die Osteogenese fördernde Effekte von Lenalidomid auf MSPZh oder MSPZm gefunden. Damit stehen unsere Ergebnisse im Einklang mit denen von Wobus *et al.*, die bei ihren Untersuchungen mit MSPZ von gesunden Probanden ebenfalls keine Wirkung von Lenalidomid auf die Proliferation oder Differenzierungsfähigkeit der MSPZ fanden [147]. Unsere Daten erweiterten die bereits vorhandenen Ergebnisse durch die zusätzliche Untersuchung der MSPZm, welche Wobus *et al.* nicht durchführten.

Zusätzlich zu den Ergebnissen von Wobus *et al.* demonstrierten unsere Ergebnisse, dass Lenalidomid auch auf molekulargenetischer Ebene keine signifikant veränderte Genexpression in MSPZh verursachte. Die oben beschriebenen, durch MM-Erkrankung 1532 differentiell exprimierten Gene änderten die MSPZ offenbar in dem Maße, dass Lenalidomid lediglich Effekte auf MSPZm, nicht aber auf MSPZh ausübte. Dies ließ sich bereits aufgrund der Hauptkomponentenanalyse vermuten, da eine Inkubation mit Lenalidomid lediglich innerhalb der Gruppe der MSPZm ein neues Cluster zu bilden schien, nicht jedoch bei den MSPZh.

Die IPA prognostizierte, dass RICTOR als Untereinheit von mTORC2 in MSPZm inhibiert und nach Inkubation mit Lenalidomid aktiviert wurde. Eine aberrante Aktivierung des mTOR-Signalwegs, welche zum Wachstum, Überleben sowie zur Medikamentenresistenz der MM-Zellen beiträgt, ist für viele MM-Patienten bereits

bekannt [239-241]. So beschrieben Maiso *et al.* eine konstitutive Aktivierung des mTOR-Signalwegs in MM-Zellen und fanden eine deutlich verstärkte Apoptose in MM-Zellen nach Ausschalten von RICTOR durch die dadurch gestörte Adhäsion von MM-Zellen an die MSPZ [242]. Weiterhin fanden sie heraus, dass INK128, ein mTOR-Kinase-Inhibitor, die Wirkung von Lenalidomid deutlich steigerte [242]. Auch Raje *et al.* beschrieben eine synergistische Wirkung zwischen Lenalidomid und Rapamycin, einem mTOR-Inhibitor [243]. Inwiefern Lenalidomid selbst auf den mTOR-Signalweg im KM-Mikromilieu des MM wirkt, ist bisher nicht hinreichend erforscht. Für Melanom-Zellen beobachteten Felici *et al.* eine Veränderung der mTOR-Signalgebung nach Inkubation mit Lenalidomid [244], sodass eine ähnliche Wirkung auf den mTOR-Signalweg in MM-Patienten ebenfalls möglich scheint. Die Prognose der IPA, dass RICTOR im MSPZm verglichen mit MSPZh inhibiert wird, scheint somit unwahrscheinlich, da bisherige Studien von einer Aktivierung des mTOR-Signalwegs im MM ausgehen. Die Auswertung der hier erhobenen DESeq2-Daten ergab keine signifikant veränderte Genexpression von RICTOR in MSPZm.

Auch in MSPZ nach Lenalidomid-Inkubation stellte sich RICTOR trotz der Prognose der IPA nicht signifikant differentiell reguliert dar. Mit LAMTOR2, LAMTOR4 und LAMTOR5 präsentierten sich drei dem mTOR-Signalweg zugehörige Gene in MSPZm verglichen mit MSPZh vermehrt exprimiert. LAMTOR4 und LAMTOR5 stellten sich in MSPZm nach Inkubation mit Lenalidomid vermindert exprimiert dar. LAMTOR1-5 spielen als sogenannter „*Ragulator Complex*“ eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion des mTOR-Signalwegs [245, 246]. Somit scheint eine Beeinflussung des mTOR-Signalwegs durch Lenalidomid über eine differentielle Genexpression von LAMTOR4 und LAMTOR5 in MSPZ möglich zu sein. Diesbezüglich sind weitere Studien in der Zukunft notwendig, um die genaue Auswirkung einer solchen reduzierten Genexpression von LAMTOR4 und LAMTOR5 in MSPZm hinsichtlich des mTOR-Signalwegs zu untersuchen.

Im Gegensatz zu MSPZh stellten sich in MSPZm nach Exposition gegenüber Lenalidomid 121 Gene differentiell exprimiert dar. Diese Gene betrafen insbesondere den Zellzyklus, das Zytoskelett und mitochondriale und ribosomale Gene inklusive der Atmungskette mit der oxidativen Phosphorylierung. Auch die IPA identifizierte als *Top Canonical Pathways* die oxidative Phosphorylierung und eine mitochondriale Dysfunktion. Hinweise für eine direkte funktionale oder molekulargenetische Beeinflussung der Osteogenese durch Lenalidomid-Inkubation fanden sich in unseren Ergebnissen nicht.

Zu den *Top Canonical Pathways* sowohl in MSPZm verglichen mit MSPZh als auch in MSPZm nach Lenalidomid-Inkubation verglichen mit der DMSO-Kontrolle gehörte auch der eIF2-Signalweg. Zu den eIF2 α -Kinasen gehört unter anderem die Häm-regulierte eIF2 α -Kinase (HRI), welche durch Eisenmangel oder oxidativen Stress aktiviert wird und welche eine wichtige Rolle in der Erythropoiese einnimmt [247, 248]. Die hier in CD34⁺-HSPZ beobachteten Veränderungen hinsichtlich der Häm-Synthese könnten mit dem veränderten eIF2-Signalweg in Zusammenhang stehen. Der eIF2-Signalweg wurde bereits mit einer MM-Erkrankung in Verbindung gebracht: So beobachteten Burwick *et al.* eine Beeinflussung des eIF2-Signalwegs durch Dexamethason und eine durch HRI-Aktivierung induzierte Apoptose von MM-Zellen [249]. Unsere Daten weisen nun darauf hin, dass auch Lenalidomid den eIF2-Signalweg und möglicherweise darüber auch die Erythropoiese beeinflusst. Zum tiefergehenden Verständnis dieser Beeinflussung bedarf es weiterer Forschung in der Zukunft.

Zu den 121 durch Lenalidomid-Inkubation in MSPZm veränderten Genen gehörten 110 Gene, die zuvor durch MM-Erkrankung differentiell exprimiert wurden. Interessanterweise führte eine Inkubation mit Lenalidomid für jedes dieser 110 Gene zu einer umgekehrten Genexpression im Vergleich zur MM-Erkrankung: So wurden 109 Gene nach Inkubation mit Lenalidomid vermindert exprimiert, die durch MM-Erkrankung vermehrt exprimiert waren und ein Gen nach Inkubation mit Lenalidomid vermehrt exprimiert, welches durch MM-Erkrankung vermindert exprimiert wurde. Lenalidomid kehrte also die durch die MM-Erkrankung induzierten Veränderungen der Expression von 110 Genen weitgehend um. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine Schlüsselfunktion Lenalidomids in seiner Wirkung auf das MM, da durch die MM-Erkrankung verursachte Änderungen der Signaltransduktionen wieder rückgängig gemacht werden könnten. Insbesondere zeigte sich, dass Gene, die im Krankheitskontext vermehrt exprimiert wurden, nach Lenalidomid-Inkubation eine reduzierte Expression aufwiesen. Dies lässt vermuten, dass MM-bedingt erworbene, möglicherweise maligne funktionelle Eigenschaften der MSPZ durch Lenalidomid zumindest partiell aufgehoben werden könnten.

Während eine direkte Verbindung zwischen all diesen 110 Genen und einer MM-Erkrankung bisher nicht ausführlich beschrieben wurde, kann eine potentielle Relevanz dieser Gene hinsichtlich der Erkrankung nicht ausgeschlossen werden. So handelt es sich bei CKS1B (*CDC28 Protein Kinase Regulatory Subunit 1B*) um ein Gen, dessen Überexpression mit einer schlechteren Prognose in MM-Patienten assoziiert ist und dessen Genexpression in den hier vorliegenden Daten nach Lenalidomid-Inkubation

vermindert exprimiert wurde [250, 251]. Die Lenalidomid-Inkubation führte auch in RSP3 (*Ribosomal Protein S3*) zu einer Herunterregulation, nachdem dieses sich zuvor in MSPZm verglichen mit MSPZh heraufreguliert darstellte. Für RSP3 wurde eine Beteiligung am MM-Zell-Überleben und an der Medikamentenresistenz gegenüber Proteasom-Inhibitoren beschrieben [252], sodass Lenalidomid auch hierüber möglicherweise seine Wirkung im MM ausübt. Dies hat eine potentiell klinische Relevanz, da der Proteasom-Inhibitor Bortezomib als Kombinationstherapie mit Lenalidomid angewendet wird und sich so eine synergistische Wirkung von Bortezomib und Lenalidomid andeutet.

Dem „Metabolom“, also den Stoffwechseleigenschaften eines Organismus inklusive den Mitochondrien, wird beim MM ebenfalls zunehmend eine Bedeutung beigemessen [253]: In Studien wurden signifikant unterschiedliche metabolische Profile in MM-Patienten verglichen mit gesunden Probanden beobachtet [254]; eine erhöhte mitochondriale Biomasse und Funktion soll zu einer Resistenz des MM gegenüber dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib beitragen [255, 256]. Somit kann auch für die hier gefundenen differentiell exprimierten Gene der mitochondrialen Funktion und Energieproduktion eine potentielle Rolle im MM und für die Funktion von Lenalidomid angenommen werden; weitere Studien hierzu in der Zukunft sind notwendig. Bisher sind einige Medikamente mit mitochondrialer Wirkung bekannt [253]; bezüglich Lenalidomid sind mitochondriale Effekte bisher jedoch nicht ausreichend erforscht. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die Wirkung von Lenalidomid auf MSPZ zu einem großen Teil über eine Veränderung mitochondrialer Gene und damit auch der Atmungskette und der Energiegewinnung der Zelle zustande kommt. Eine Behandlung mit Lenalidomid führt zu einer metabolischen Umprogrammierung der MSPZm und beeinflusst damit möglicherweise deren Energieeffizienz und gegebenenfalls auch deren Unterstützung der MM-Zellen. Außerdem fanden wir Hinweise dafür, dass Lenalidomid Veränderungen, die zu einer Resistenz gegenüber Bortezomib führen können, revertieren und somit zu einer besseren Wirkung von Bortezomib führen könnte.

Abschließend muss bei der Betrachtung dieser Daten beachtet werden, dass für die MSPZm aufgrund einer geringen Patientenzahl während der Rekrutierungsphase mit $n = 2$ lediglich zwei biologische Replikate vorliegen. Daher ist zu erwarten, dass sich bei einer Erhöhung der Fallzahlen weitere signifikant differentiell exprimierte Gene darstellen. Dennoch ist bemerkenswert, dass trotz dieser geringen Anzahl an Replikaten bereits signifikante Ergebnisse vorliegen. Eine Fortführung der hier beschriebenen

Versuche mit einer höheren Patientenzahl in der Zukunft ist notwendig, um unsere Daten zu verifizieren und zu erweitern.

4.3 Schlussfolgerung

Wir deckten Unterschiede auf funktionaler Ebene zwischen den beiden MM-Zelllinien INA-6 und RPMI-8226 auf, die für zukünftige Forschung mit MM-Zelllinien berücksichtigt werden sollten. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Langzeit-Exposition gegenüber Lenalidomid zur Ausbildung zelllinienspezifischer Resistenzmechanismen in MM-Zelllinien führen kann, was sich in einer unterschiedlichen Koloniebildung der weißen Zellreihe nach erneuter Wirkstoffexposition widerspiegelt. Für weitere MM-Forschung mit Zelllinien ist demnach entscheidend, welche Zelllinie genutzt wird, da signifikant unterschiedliche und teilweise auch gegenteilige Ergebnisse vorliegen können. Unter Berücksichtigung bereits bekannter Daten scheint INA-6 eher den realen Gegebenheiten im MM-Patienten zu entsprechen. Diese potentiell resistente INA-6 zeigte nach erneuter Lenalidomid-Inkubation signifikant mehr gebildete Kolonien der weißen Zellreihe im CFU-Assay.

Unsere Ergebnisse bestätigten, dass sich CD34⁺-HSPZ von MM-Patienten funktionell sowie hinsichtlich ihrer Genexpression signifikant von CD34⁺-HSPZ von gesunden Probanden unterschieden. Wir erweiterten das bereits vorhandene Wissen um zahlreiche Gene, die die Knochenmarknische betreffen und sich durch Erkrankung dysreguliert darstellten. Unsere Daten bestätigen, dass eine MM-Erkrankung nicht nur reife Plasmazellen, sondern auch hämatopoietische Vorläuferzellen betrifft. Die Veränderungen auf RNA-Ebene standen in Zusammenhang mit dem Immunsystem, Stammzeleigenschaften, dem Häm-Metabolismus, MSPZ-assoziierten Genen sowie den Signalwegen TGF- β , Hedgehog und Notch und können somit zu dem deutlich veränderten KM-Mikromilieu führen.

Weiterhin zeigte sich eine deutliche Beeinflussung der Genexpression durch Lenalidomid, dessen Wirkung in Abhängigkeit des Gesundheitsstatus der Zellen variierte. Es zeigten sich ausgeprägte Effekte Lenalidomids auf CD34⁺-HSPZ, die sowohl Gene der Hämatopoiese, der Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion, der Organisation der EZM sowie des Immunsystems betrafen als auch die Signalwege Wnt, TGF- β , Notch und Hippo, die allesamt ebenfalls Funktionen für Hämatopoiese, Osteogenese, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen sowie für Inflammation und Immunsystem übernehmen. Hierbei handelt es sich um Prozesse, die ebenfalls in CD34⁺-HSPZ von MM-Patienten verglichen mit CD34⁺-HSPZ von gesunden Probanden

differentiell reguliert waren und dort für eine Neuausrichtung der Knochenmarknische sorgen könnten, um gesunde Zellen zu verdrängen oder in ihrer Funktionalität einzuschränken. Diese Effekte könnte Lenalidomid möglicherweise in Teilen umkehren, indem seine Wirkung auf genau diese Prozesse abzielt. Insgesamt wurden in CD34⁺m im Vergleich zu CD34⁺h 199 Gene differentiell exprimiert. Für 30 dieser Gene wurde nach Lenalidomid-Inkubation eine Umkehr der vorherigen differentiellen Expression durch MM-Erkrankung beobachtet. Somit kam es nach Lenalidomid-Inkubation zu einer teilweisen Reversion von Veränderungen in CD34⁺-HSPZ durch die MM-Erkrankung.

Unsere Ergebnisse zeigten ebenfalls eine krankhafte Signatur der MSPZ von MM-Patienten sowohl hinsichtlich ihrer Funktionalität, insbesondere der Osteogenese, als auch hinsichtlich des KM-Mikromilieus. GSEA bestätigten Veränderungen der Stammzeleigenschaften sowie der EZM-Organisation. Diesbezüglich identifizierten wir zahlreiche differentiell exprimierte Gene inklusive RUNX2, Osteocalcin und Osteomodulin sowie Veränderungen der Signalwege TGF- β /BMP, Wnt und Hedgehog, welche sowohl für die Osteogenese als auch für die Unterstützung der Hämatopoiese eine Rolle spielen.

Nach Lenalidomid-Inkubation der MSPZ fanden wir in der RNA-Sequenzierung eine Beeinflussung der Genexpression ausschließlich in MSPZ von MM-Patienten, nicht jedoch in MSPZ von gesunden Probanden. Insgesamt wurden in MSPZm 1532 Gene differentiell exprimiert. Auch hier fanden wir eine teilweise Reversion der vorherigen differentiellen Genexpression in MSPZm nach Lenalidomid-Inkubation: Lenalidomid kehrte in 110 Genen die zuvor durch die MM-Erkrankung differentielle Genexpression wieder um. Diese Gene spielten unter anderem eine Rolle für mitochondriale Funktion inklusive der oxidativen Phosphorylierung und damit der Energiegewinnung der Zelle. Möglicherweise nimmt diese Umkehr der zuvor durch MM-Erkrankung differentiellen Genexpression sowohl in HSPZ als auch in MSPZ eine Schlüsselfunktion im Wirkmechanismus von Lenalidomid ein.

Bemerkenswerterweise führte die Inkubation mit Lenalidomid in CD34⁺m zu einer Heraufregulation von Genen, die im Kontext der MM-Erkrankung zuvor herunterreguliert waren. Dahingegen wurde in MSPZm nach Lenalidomid-Inkubation primär eine Herunterregulation von zuvor durch MM-Erkrankung heraufregulierten Genen beobachtet. Diese Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass Lenalidomid in CD34⁺m die potentielle Wiederherstellung krankheitsbedingt verlorengegangener oder eingeschränkter Funktionen bewirkt, wohingegen es in MSPZm zur Reversion MM-

bedingt erworbener, möglicherweise maligner funktioneller Veränderungen beiträgt. Außerdem zeigte sich eine Zelltyp-spezifische Wirkung von Lenalidomid: Lenalidomid beeinflusste in CD34⁺-HSPZ und MSPZ keine gleichen Gene.

Im CFU-Assay beobachteten wir eine signifikant reduzierte Bildung von Kolonien der roten Zellreihe durch Lenalidomid in CD34⁺h. Dies lässt die Hypothese zu, dass Lenalidomid im kurzfristigen Verlauf eine bei MM-Erkrankung vorliegende Anämie möglicherweise nicht per se verbessert, sondern eine Besserung der Anämie durch die Wirkung von Lenalidomid auf das KM-Mikromilieu und die Tumorzellen selbst zustande kommt. Dies könnte allerdings dazu führen, dass es bei Therapieversagen unter Lenalidomid-Behandlung nicht nur durch den Tumorprogress, sondern auch durch die Medikation mit Lenalidomid selbst zu einer weiteren Verschlechterung der Anämie kommen könnte. Nach erzeugter Lenalidomid-Resistenz der Zelllinie INA-6 führte eine weitere Lenalidomid-Exposition der Zelllinie zu einem signifikanten Anstieg der Bildung von Kolonien der weißen Zellreihe im CFU-Assay und könnte im klinischen Kontext möglicherweise auf eine stärkere Proliferation der Tumorzellen hindeuten. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung eines konsequenten Monitorings der Lenalidomid-Therapie im Hinblick auf eine potenzielle Resistenzentwicklung und ein mögliches Therapieversagen. Eine fortgesetzte Behandlung mit Lenalidomid könnte in diesem Fall nicht nur unwirksam hinsichtlich der Tumorkontrolle sein, sondern potentiell sogar das Tumorwachstum fördern und krankheitsassoziierte Symptome wie die Anämie noch verschlechtern. Nach dieser Hypothese wäre ein schnelles Absetzen von Lenalidomid bei Hinweisen auf eine Resistenz zu empfehlen.

Insgesamt konnten wir zahlreiche Gene identifizieren, die zu der eingeschränkten KM-Funktionalität in MM-Patienten führen können und somit weitere Erkenntnisse zu den Ursachen der eingeschränkten Osteogenese und Hämatopoiese im MM beitragen. Darüber hinaus zeigten sich nach Inkubation mit Lenalidomid veränderte Genexpressionsmuster und Signalwege, die eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des KM-Mikromilieus spielen und somit sowohl für die Abwehr von MM-Zellen als auch für die KM-Funktionalität von Bedeutung sind. Unsere Ergebnisse liefern damit einen wichtigen Beitrag zum tieferen Verständnis der Wirkmechanismen von Lenalidomid im Kontext des Tumormikromilieus.

Die durch unsere Ergebnisse identifizierten, durch MM-Erkrankung differentiell exprimierten Gene könnten die Grundlage darstellen für die zukünftige Entwicklung neuer, spezifischer Therapieansätze des MM. Insbesondere die durch Lenalidomid-

Inkubation revertierten differentiell exprimierten Gene in HSPZ und MSPZ von MM-Patienten bieten einen interessanten Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen zur klinischen Relevanz. Insbesondere das Gen *ADGRG7* stellt ein vielversprechendes Ziel dar, da es sowohl in CD34⁺-HSPZ als auch in MSPZ von MM-Patienten deutlich mit jeweils sehr hohem *Fold Change* heraufreguliert und bereits mit den Krankheiten *Osteogenesis Imperfecta* sowie *Fibrogenesis Imperfecta Ossium* assoziiert wurde. Möglicherweise kommt diesem Gen eine Schlüsselfunktion hinsichtlich der Osteolysen bei MM-Erkrankung zu und könnte medikamentös beeinflusst werden, um so Osteolysen zu verhindern. Abb. 33 stellt ein zusammenfassendes Schaubild der wichtigsten Erkenntnisse dieser Arbeit dar.

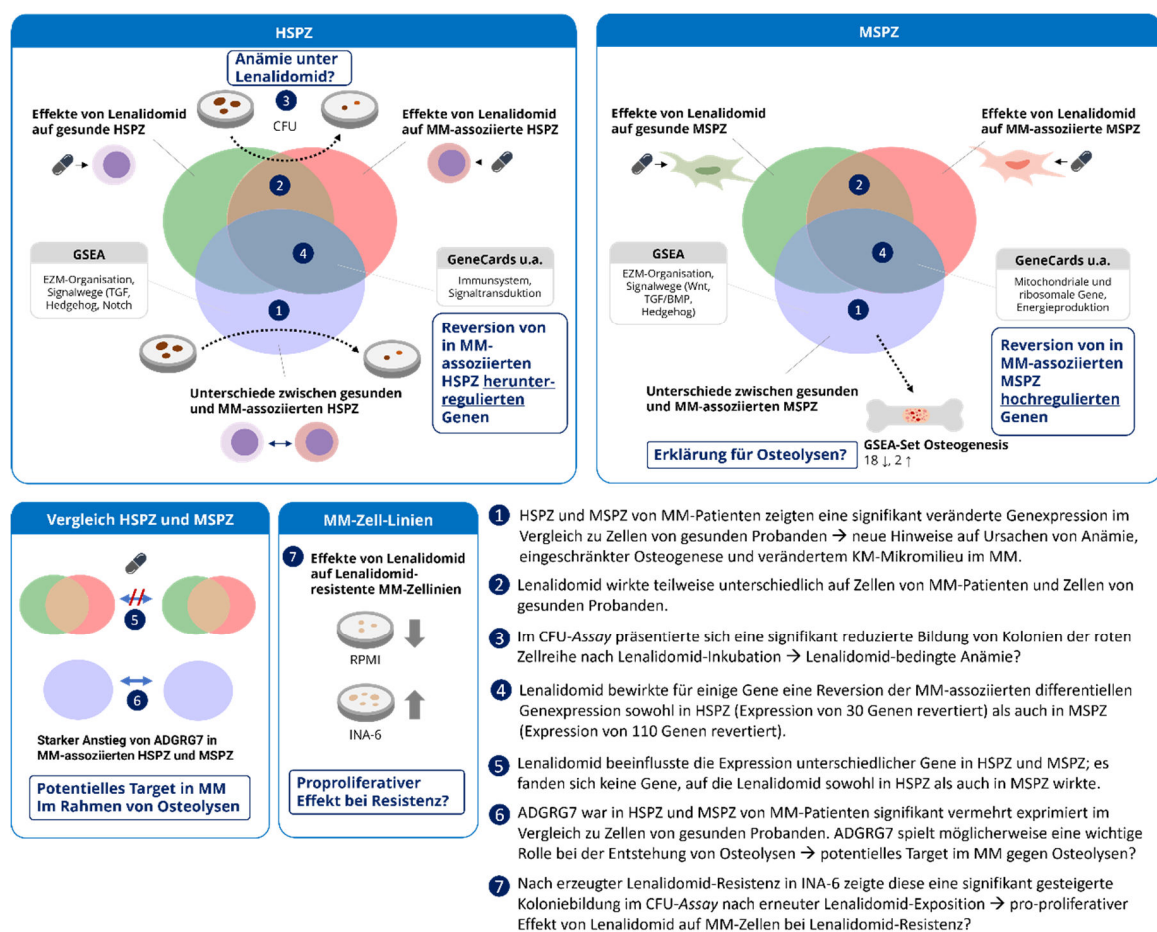


Abb. 33: **Graphische Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse.** CFU-Assay = *Colony-Forming Unit-Assay*, GSEA = *Gene Set Enrichment Analysis*, HSPZ = hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen, MM = multiples Myelom, MSPZ = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen.

4.4 Limitationen

Die Limitationen unserer Ergebnisse liegen in der geringen Probenanzahl begründet. Wenngleich unsere Daten in einigen Fällen mit bereits bekannten Daten übereinstimmten, empfehlen wir, sie in Zukunft durch eine höhere Probenanzahl zu validieren. Insbesondere für die Kondition der MSPZm ist eine Validierung mit einer höheren n-Zahl notwendig, da in der vorliegenden Arbeit für diese Kondition $n = 2$ genutzt wurde. Weiterhin handelte es sich bei den von uns genutzten Primärzellen um Zellen von Probanden, die am Universitätsklinikum Düsseldorf behandelt wurden. Somit sollte unsere hier durchgeführte *Single Center Studie* in Zukunft durch multizentrische Versuche ausgeweitet werden. In diesem Rahmen sollte auch ein *Gender Matching* sowie *Age Matching* der Patienten aus den jeweiligen Kontroll- und Behandlungsgruppen erfolgen, welches für unsere Versuche aufgrund der geringen Probenanzahl nicht durchgeführt wurde.

5 Literaturverzeichnis

1. Lo Celso, C. and D.T. Scadden, *The haematopoietic stem cell niche at a glance*. J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 21): p. 3529-35.
2. Ferraro, F., C.L. Celso, and D. Scadden, *Adult stem cells and their niches*. Advances in experimental medicine and biology, 2010. **695**: p. 155-168.
3. Baccin, C., et al., *Combined single-cell and spatial transcriptomics reveal the molecular, cellular and spatial bone marrow niche organization*. Nature cell biology, 2020. **22**(1): p. 38-48.
4. Kiel, M.J., et al., *SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells*. Cell, 2005. **121**(7): p. 1109-21.
5. Acar, M., et al., *Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal*. Nature, 2015. **526**(7571): p. 126-30.
6. Kunisaki, Y., et al., *Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence*. Nature, 2013. **502**(7473): p. 637-643.
7. Friedrich, C. and O. Kosmider, *The Mesenchymal Niche in Myelodysplastic Syndromes*. Diagnostics, 2022. **12**(7): p. 1639.
8. Méndez-Ferrer, S., et al., *Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche*. Nature, 2010. **466**(7308): p. 829-834.
9. Podar, K., D. Chauhan, and K.C. Anderson, *Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy*. Leukemia, 2009. **23**(1): p. 10-24.
10. Akashi, K., et al., *A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages*. Nature, 2000. **404**(6774): p. 193-197.
11. Kondo, M., I.L. Weissman, and K. Akashi, *Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow*. Cell, 1997. **91**(5): p. 661-672.
12. Pinho, S. and P.S. Frenette, *Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2019. **20**(5): p. 303-320.
13. Schofield, R., *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell*. Blood Cells, 1978. **4**(1-2): p. 7-25.
14. Méndez-Ferrer, S., et al., *Bone marrow niches in haematological malignancies*. Nature Reviews Cancer, 2020. **20**(5): p. 285-298.
15. Itkin, T., et al., *Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis*. Nature, 2016. **532**(7599): p. 323-8.
16. Federspiel, B., et al., *Molecular cloning of the cDNA and chromosomal localization of the gene for a putative seven-transmembrane segment (7-TMS) receptor isolated from human spleen*. Genomics, 1993. **16**(3): p. 707-12.
17. Petit, I., D. Jin, and S. Rafii, *The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis*. Trends Immunol, 2007. **28**(7): p. 299-307.
18. Bruns, I., et al., *Megakaryocytes regulate hematopoietic stem cell quiescence through CXCL4 secretion*. Nature medicine, 2014. **20**(11): p. 1315-1320.
19. Ullah, T.R., *The role of CXCR4 in multiple myeloma: Cells' journey from bone marrow to beyond*. J Bone Oncol, 2019. **17**: p. 100253.
20. Oberlin, E., et al., *The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1*. Nature, 1996. **382**(6594): p. 833-5.
21. Bakondi, B., et al., *SDF-1 α secreted by human CD133-derived multipotent stromal cells promotes neural progenitor cell survival through CXCR7*. Stem Cells Dev, 2011. **20**(6): p. 1021-9.
22. Méndez-Ferrer, S., et al., *Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations*. Nature, 2008. **452**(7186): p. 442-7.
23. Arai, F., et al., *Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche*. Cell, 2004. **118**(2): p. 149-61.

24. Davis, S., et al., *Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning*. Cell, 1996. **87**(7): p. 1161-9.
25. Puri, M.C. and A. Bernstein, *Requirement for the TIE family of receptor tyrosine kinases in adult but not fetal hematopoiesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(22): p. 12753-8.
26. Takakura, N., et al., *Critical role of the TIE2 endothelial cell receptor in the development of definitive hematopoiesis*. Immunity, 1998. **9**(5): p. 677-86.
27. Wu, Y., et al., *Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis*. Stem Cells, 2007. **25**(10): p. 2648-59.
28. Kent, D., et al., *Regulation of hematopoietic stem cells by the steel factor/KIT signaling pathway*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(7): p. 1926-30.
29. Heissig, B., et al., *Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand*. Cell, 2002. **109**(5): p. 625-37.
30. Ikuta, K. and I.L. Weissman, *Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(4): p. 1502-6.
31. Thorén, L.A., et al., *Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells*. J Immunol, 2008. **180**(4): p. 2045-53.
32. Broudy, V.C., *Stem cell factor and hematopoiesis*. Blood, 1997. **90**(4): p. 1345-64.
33. Nakamura, Y., et al., *Isolation and characterization of endosteal niche cell populations that regulate hematopoietic stem cells*. Blood, 2010. **116**(9): p. 1422-1432.
34. Oldershaw, R.A. and T.E. Hardingham, *Notch signaling during chondrogenesis of human bone marrow stem cells*. Bone, 2010. **46**(2): p. 286-93.
35. Lai, E.C., *Notch signaling: control of cell communication and cell fate*. Development, 2004. **131**(5): p. 965-73.
36. Milner, L.A., et al., *A human homologue of the Drosophila developmental gene, Notch, is expressed in CD34+ hematopoietic precursors*. Blood, 1994. **83**(8): p. 2057-62.
37. Bigas, A. and L. Espinosa, *Hematopoietic stem cells: to be or Notch to be*. Blood, 2012. **119**(14): p. 3226-35.
38. Calvi, L.M., et al., *Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche*. Nature, 2003. **425**(6960): p. 841-6.
39. Yamazaki, S., et al., *TGF-beta as a candidate bone marrow niche signal to induce hematopoietic stem cell hibernation*. Blood, 2009. **113**(6): p. 1250-6.
40. Yamazaki, S., et al., *Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche*. Cell, 2011. **147**(5): p. 1146-58.
41. Wang, H., et al., *Hierarchical organization and regulation of the hematopoietic stem cell osteoblastic niche*. Crit Rev Oncol Hematol, 2013. **85**(1): p. 1-8.
42. Reya, T., et al., *A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells*. Nature, 2003. **423**(6938): p. 409-414.
43. Bhardwaj, G., et al., *Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation*. Nature Immunology, 2001. **2**(2): p. 172-180.
44. Bhatia, M., et al., *Bone Morphogenetic Proteins Regulate the Developmental Program of Human Hematopoietic Stem Cells*. Journal of Experimental Medicine, 1999. **189**(7): p. 1139-1148.
45. Jäger, P.S., *Einfluss von myeloischen Blasten auf gesunde CD34+ hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen*. 2019, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
46. Geyh, S., *Funktionale und molekulare Analysen von Mesenchymalen Stromazellen und deren Interaktionen mit CD34+ Stamm- und Progenitorzellen*

- bei Patienten mit Myelodysplastischen Syndromen. 2013, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
47. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.
 48. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-147.
 49. Chichester, C.O., M. Fernández, and J.J. Minguell, *Extracellular Matrix Gene Expression by Human Bone Marrow Stroma and by Marrow Fibroblasts*. Cell Adhesion and Communication, 1993. **1**(2): p. 93-99.
 50. Majumdar, M.K., et al., *Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages*. J Hematother Stem Cell Res, 2000. **9**(6): p. 841-8.
 51. Verfaillie, C., et al., *Role of bone marrow matrix in normal and abnormal hematopoiesis*. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 1994. **16**(3): p. 201-224.
 52. Jung, Y., et al., *Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing*. Bone, 2006. **38**(4): p. 497-508.
 53. Taichman, R.S. and S.G. Emerson, *Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor*. Journal of Experimental Medicine, 1994. **179**(5): p. 1677-1682.
 54. Arai, F., et al., *Tie2/Angiopoietin-1 Signaling Regulates Hematopoietic Stem Cell Quiescence in the Bone Marrow Niche*. Cell, 2004. **118**(2): p. 149-161.
 55. Asada, N., et al., *Matrix-embedded osteocytes regulate mobilization of hematopoietic stem/progenitor cells*. Cell Stem Cell, 2013. **12**(6): p. 737-47.
 56. Aoki, K., et al., *Identification of CXCL12-abundant reticular cells in human adult bone marrow*. Br J Haematol, 2021. **193**(3): p. 659-668.
 57. Sugiyama, T., et al., *Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches*. Immunity, 2006. **25**(6): p. 977-88.
 58. Malaval, L., et al., *Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures*. J Cell Physiol, 1994. **158**(3): p. 555-72.
 59. Massagué, J., *TGF-beta signal transduction*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 753-91.
 60. Heldin, C.H., K. Miyazono, and P. ten Dijke, *TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins*. Nature, 1997. **390**(6659): p. 465-71.
 61. Gallea, S., et al., *Activation of mitogen-activated protein kinase cascades is involved in regulation of bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation in pluripotent C2C12 cells*. Bone, 2001. **28**(5): p. 491-8.
 62. Hanafusa, H., et al., *Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression*. J Biol Chem, 1999. **274**(38): p. 27161-7.
 63. Lee, K.S., et al., *Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(23): p. 8783-92.
 64. Komori, T., et al., *Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts*. Cell, 1997. **89**(5): p. 755-64.

65. Lee, K.S., S.H. Hong, and S.C. Bae, *Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein*. *Oncogene*, 2002. **21**(47): p. 7156-63.
66. Spinella-Jaegle, S., et al., *Opposite effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta1 on osteoblast differentiation*. *Bone*, 2001. **29**(4): p. 323-30.
67. Liu, X., et al., *Cross-talk between EGF and BMP9 signalling pathways regulates the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells*. *J Cell Mol Med*, 2013. **17**(9): p. 1160-72.
68. Zanotti, S. and E. Canalis, *Notch Signaling and the Skeleton*. *Endocr Rev*, 2016. **37**(3): p. 223-53.
69. Cakouros, D., et al., *Novel basic helix-loop-helix transcription factor hes4 antagonizes the function of twist-1 to regulate lineage commitment of bone marrow stromal/stem cells*. *Stem Cells Dev*, 2015. **24**(11): p. 1297-308.
70. Tu, X., et al., *Physiological notch signaling maintains bone homeostasis via RBPjk and Hey upstream of NFATc1*. *PLoS Genet*, 2012. **8**(3): p. e1002577.
71. Engin, F., et al., *Dimorphic effects of Notch signaling in bone homeostasis*. *Nat Med*, 2008. **14**(3): p. 299-305.
72. Bai, S., et al., *NOTCH1 regulates osteoclastogenesis directly in osteoclast precursors and indirectly via osteoblast lineage cells*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(10): p. 6509-18.
73. Fukushima, H., et al., *The association of Notch2 and NF-kappaB accelerates RANKL-induced osteoclastogenesis*. *Mol Cell Biol*, 2008. **28**(20): p. 6402-12.
74. Frenquelli, M. and G. Tonon, *WNT Signaling in Hematological Malignancies*. *Frontiers in Oncology*, 2020. **10**.
75. Gaur, T., et al., *Canonical WNT Signaling Promotes Osteogenesis by Directly Stimulating Runx2 Gene Expression**. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. **280**(39): p. 33132-33140.
76. Ingham, P.W. and A.P. McMahon, *Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles*. *Genes Dev*, 2001. **15**(23): p. 3059-87.
77. Shimoyama, A., et al., *lhh/Gli2 signaling promotes osteoblast differentiation by regulating Runx2 expression and function*. *Mol Biol Cell*, 2007. **18**(7): p. 2411-8.
78. Cai, J.Q., et al., *Sonic hedgehog enhances the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. *Cell Biol Int*, 2012. **36**(4): p. 349-55.
79. Zha, K., et al., *Recent Advances in Enhancement Strategies for Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells in Bone Tissue Engineering*. *Front Cell Dev Biol*, 2022. **10**: p. 824812.
80. Amarasekara, D.S., S. Kim, and J. Rho, *Regulation of Osteoblast Differentiation by Cytokine Networks*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021. **22**(6): p. 2851.
81. Chen, J., et al., *The Hippo pathway: a renewed insight in the craniofacial diseases and hard tissue remodeling*. *International journal of biological sciences*, 2021. **17**(14): p. 4060-4072.
82. Pan, J.-X., et al., *YAP promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation by regulating β -catenin signaling*. *Bone Research*, 2018. **6**(1): p. 18.
83. Seo, E., et al., *SOX2 Regulates YAP1 to Maintain Stemness and Determine Cell Fate in the Osteo-Adipo Lineage*. *Cell Reports*, 2013. **3**(6): p. 2075-2087.
84. Kern, B., et al., *Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(10): p. 7101-7.
85. Ducy, P., et al., *Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation*. *Cell*, 1997. **89**(5): p. 747-54.

86. Phillips, J.E., et al., *Glucocorticoid-induced osteogenesis is negatively regulated by Runx2/Cbfa1 serine phosphorylation*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 3): p. 581-91.
87. Komori, T., *Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation*. Histochem Cell Biol, 2018. **149**(4): p. 313-323.
88. Ortuño, M.J., et al., *Osterix induces Col1a1 gene expression through binding to Sp1 sites in the bone enhancer and proximal promoter regions*. Bone, 2013. **52**(2): p. 548-56.
89. Yang, Y., et al., *Transcriptional regulation of bone sialoprotein gene expression by Osx*. Biochem Biophys Res Commun, 2016. **476**(4): p. 574-579.
90. Wu, L., et al., *Osteogenic differentiation of adipose derived stem cells promoted by overexpression of osterix*. Mol Cell Biochem, 2007. **301**(1-2): p. 83-92.
91. Luo, K., *Signaling Cross Talk between TGF- β /Smad and Other Signaling Pathways*. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2017. **9**(1): p. a022137.
92. Li, L., et al., *Hedgehog signaling is involved in the BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells*. Int J Mol Med, 2015. **35**(6): p. 1641-1650.
93. Kortüm, M., et al., *Leitlinie Multiples Myelom* DGHO Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V., 2024.
94. Weber, D.M., *Solitary Bone and Extramedullary Plasmacytoma*. Hematology, 2005. **2005**(1): p. 373-376.
95. Holland, J., et al., *Plasmacytoma. Treatment results and conversion to myeloma*. Cancer, 1992. **69**(6): p. 1513-1517.
96. Rajkumar, S.V., et al., *International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma*. The Lancet Oncology, 2014. **15**(12): p. e538-e548.
97. Zentrum für Krebsregisterdaten und G.d.e.K.i.D. e.V., *Krebs in Deutschland für 2019/2020*. 2023, Robert-Koch-Institut: Berlin.
98. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2018. **68**(6): p. 394-424.
99. Zentrum für Krebsregisterdaten und G.d.e.K.i.D. e.V., *Krebs in Deutschland für 2017/2018*. 2021, Robert-Koch-Institut: Berlin.
100. European Medicines Agency. *EMA/650468/2019 - Revlimid (Lenalidomide) Übersicht über Revlimid und warum es in der EU zugelassen ist*. 2019 [20.03.2020].
101. Kotchetkov, R., et al., *Secondary primary malignancies during the lenalidomide-dexamethasone regimen in relapsed/refractory multiple myeloma patients*. Cancer Med, 2017. **6**(1): p. 3-11.
102. McCarthy, P.L., et al., *Lenalidomide Maintenance After Autologous Stem-Cell Transplantation in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: A Meta-Analysis*. Journal of Clinical Oncology, 2017. **35**(29): p. 3279-3289.
103. Jackson, G.H., et al., *Lenalidomide maintenance versus observation for patients with newly diagnosed multiple myeloma (Myeloma XI): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2019. **20**(1): p. 57-73.
104. Dimopoulos, M., et al., *Lenalidomide plus Dexamethasone for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma*. New England Journal of Medicine, 2007. **357**(21): p. 2123-2132.
105. Weber, D.M., et al., *Lenalidomide plus Dexamethasone for Relapsed Multiple Myeloma in North America*. New England Journal of Medicine, 2007. **357**(21): p. 2133-2142.
106. Kumar, S.K., et al., *Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies*. Blood, 2008. **111**(5): p. 2516-2520.
107. Kumar, S.K., et al., *Multiple myeloma*. Nature Reviews Disease Primers, 2017. **3**: p. 17046-17046.

108. Bianchi, G. and N.C. Munshi, *Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma*. Blood, 2015. **125**(20): p. 3049-3058.
109. Hargreaves, D.C., et al., *A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements*. The Journal of experimental medicine, 2001. **194**(1): p. 45-56.
110. Lapidot, T. and O. Kollet, *The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2mnull mice*. Leukemia, 2002. **16**(10): p. 1992-2003.
111. Nagasawa, T., et al., *Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1*. Nature, 1996. **382**(6592): p. 635-638.
112. Zannettino, A.C.W., et al., *Elevated Serum Levels of Stromal-Derived Factor-1 α Are Associated with Increased Osteoclast Activity and Osteolytic Bone Disease in Multiple Myeloma Patients*. Cancer Research, 2005. **65**(5): p. 1700-1709.
113. Dar, A., et al., *Chemokine receptor CXCR4–dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells*. Nature Immunology, 2005. **6**(10): p. 1038-1046.
114. Hideshima, T., et al., *Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(8): p. 585-98.
115. Damiano, J.S., et al., *Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines*. Blood, 1999. **93**(5): p. 1658-1667.
116. Hazlehurst, L.A., et al., *Adhesion to fibronectin via β 1 integrins regulates p27kip1 levels and contributes to cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR)*. Oncogene, 2000. **19**(38): p. 4319-4327.
117. Li, Z.W., et al., *NF-kappaB in the pathogenesis and treatment of multiple myeloma*. Curr Opin Hematol, 2008. **15**(4): p. 391-9.
118. Colombo, M., et al., *Multiple myeloma-derived Jagged ligands increases autocrine and paracrine interleukin-6 expression in bone marrow niche*. Oncotarget, 2016. **7**(35): p. 56013-56029.
119. Rajkumar, S.V., et al., *Bone Marrow Angiogenesis in 400 Patients with Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance, Multiple Myeloma, and Primary Amyloidosis*. Clinical Cancer Research, 2002. **8**(7): p. 2210-2216.
120. Kishimoto, T., *The biology of interleukin-6*. Blood, 1989. **74**(1): p. 1-10.
121. Terpos, E., et al., *Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma: from bench to bedside*. Blood Cancer Journal, 2018. **8**(1): p. 7.
122. Noll, J.E., et al., *Myeloma plasma cells alter the bone marrow microenvironment by stimulating the proliferation of mesenchymal stromal cells*. Haematologica, 2014. **99**(1): p. 163-171.
123. Quach, H., et al., *Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDS) in multiple myeloma*. Leukemia, 2010. **24**(1): p. 22-32.
124. Burger, J.A., et al., *The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies*. Blood, 2009. **114**(16): p. 3367-75.
125. Kyle, R.A., et al., *Review of 1027 Patients With Newly Diagnosed Multiple Myeloma*. Mayo Clinic Proceedings, 2003. **78**(1): p. 21-33.
126. Bruns, I., et al., *Multiple myeloma-related deregulation of bone marrow-derived CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cells*. Blood, 2012. **120**(13): p. 2620-30.
127. Silvestris, F., et al., *Negative regulation of erythroblast maturation by Fas-L(+)/TRAIL(+) highly malignant plasma cells: a major pathogenetic mechanism of anemia in multiple myeloma*. Blood, 2002. **99**(4): p. 1305-13.

128. Silvestris, F., et al., *Fas-L up-regulation by highly malignant myeloma plasma cells: role in the pathogenesis of anemia and disease progression*. Blood, 2001. **97**(5): p. 1155-64.
129. Moyo, T.K., et al., *Effects of Bone Marrow Infiltration By Multiple Myeloma on Erythropoiesis*. Blood, 2015. **126**(23): p. 2143-2143.
130. Beguin, Y., et al., *Erythropoiesis in multiple myeloma: defective red cell production due to inappropriate erythropoietin production*. Br J Haematol, 1992. **82**(4): p. 648-53.
131. De Maria, R., et al., *Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis*. Blood, 1999. **93**(3): p. 796-803.
132. Bouchnita, A., et al., *Bone marrow infiltration by multiple myeloma causes anemia by reversible disruption of erythropoiesis*. Am J Hematol, 2016. **91**(4): p. 371-8.
133. Maes, K., et al., *In anemia of multiple myeloma, hepcidin is induced by increased bone morphogenetic protein 2*. Blood, 2010. **116**(18): p. 3635-44.
134. Roodman, G.D., *Mechanisms of bone lesions in multiple myeloma and lymphoma*. Cancer, 1997. **80**(S8): p. 1557-1563.
135. Palumbo, A. and K. Anderson, *Multiple myeloma*. The New England journal of medicine, 2011. **364**(11): p. 1046-1060.
136. Standal, T., et al., *HGF inhibits BMP-induced osteoblastogenesis: possible implications for the bone disease of multiple myeloma*. Blood, 2006. **109**(7): p. 3024-3030.
137. Takeuchi, K., et al., *Tgf-Beta inhibition restores terminal osteoblast differentiation to suppress myeloma growth*. PLoS One, 2010. **5**(3): p. e9870.
138. Colombo, M., et al., *Notch-directed microenvironment reprogramming in myeloma: a single path to multiple outcomes*. Leukemia, 2013. **27**(5): p. 1009-1018.
139. Tian, E., et al., *The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma*. N Engl J Med, 2003. **349**(26): p. 2483-94.
140. Qiang, Y.W., et al., *Myeloma-derived Dickkopf-1 disrupts Wnt-regulated osteoprotegerin and RANKL production by osteoblasts: a potential mechanism underlying osteolytic bone lesions in multiple myeloma*. Blood, 2008. **112**(1): p. 196-207.
141. Tibullo, D., et al., *Ixazomib Improves Bone Remodeling and Counteracts sonic Hedgehog signaling Inhibition Mediated by Myeloma Cells*. Cancers (Basel), 2020. **12**(2).
142. Giuliani, N., et al., *Myeloma cells block RUNX2/CBFA1 activity in human bone marrow osteoblast progenitors and inhibit osteoblast formation and differentiation*. Blood, 2005. **106**(7): p. 2472-83.
143. Davies, F.E., et al., *Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma*. Blood, 2001. **98**(1): p. 210-6.
144. Zhu, D., et al., *Immunomodulatory drugs Revlimid (lenalidomide) and CC-4047 induce apoptosis of both hematological and solid tumor cells through NK cell activation*. Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(12): p. 1849-59.
145. Lu, L., et al., *The anti-cancer drug lenalidomide inhibits angiogenesis and metastasis via multiple inhibitory effects on endothelial cell function in normoxic and hypoxic conditions*. Microvasc Res, 2009. **77**(2): p. 78-86.
146. Mitsiades, N., et al., *Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications*. Blood, 2002. **99**(12): p. 4525-4530.
147. Wobus, M., et al., *Impact of lenalidomide on the functional properties of human mesenchymal stromal cells*. Exp Hematol, 2012. **40**(10): p. 867-76.

148. Corral, L.G., et al., *Selection of Novel Analogs of Thalidomide with Enhanced Tumor Necrosis Factor α Inhibitory Activity*. Molecular Medicine, 1996. **2**(4): p. 506-515.
149. Corral, L.G., et al., *Differential Cytokine Modulation and T Cell Activation by Two Distinct Classes of Thalidomide Analogues That Are Potent Inhibitors of TNF- α* . The Journal of Immunology, 1999. **163**(1): p. 380-386.
150. Gupta, D., et al., *Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications*. Leukemia, 2001. **15**(12): p. 1950-61.
151. Ge, N.L. and S. Rudikoff, *Insulin-like growth factor I is a dual effector of multiple myeloma cell growth*. Blood, 2000. **96**(8): p. 2856-61.
152. Terpos, E., et al., *Increased circulating VCAM-1 correlates with advanced disease and poor survival in patients with multiple myeloma: reduction by post-bortezomib and lenalidomide treatment*. Blood Cancer J, 2016. **6**(5): p. e428.
153. Hideshima, T., et al., *The role of tumor necrosis factor α in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications*. Oncogene, 2001. **20**(33): p. 4519-4527.
154. Hideshima, T., et al., *Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications*. Blood, 2004. **104**(3): p. 607-618.
155. Zhu, Y.X., et al., *Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide*. Blood, 2011. **118**(18): p. 4771-9.
156. Kronke, J., et al., *Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells*. Science, 2014. **343**(6168): p. 301-5.
157. Lu, G., et al., *The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of Ikaros proteins*. Science, 2014. **343**(6168): p. 305-9.
158. Merckenschlager, M., *Ikaros in immune receptor signaling, lymphocyte differentiation, and function*. FEBS Lett, 2010. **584**(24): p. 4910-4.
159. Nooka, A.K. and S. Lonial, *Mechanism of Action and Novel IMiD-Based Compounds and Combinations in Multiple Myeloma*. Cancer J, 2019. **25**(1): p. 19-31.
160. Stewart, A.K., *Medicine. How thalidomide works against cancer*. Science, 2014. **343**(6168): p. 256-7.
161. Robak, P., et al., *Drug resistance in multiple myeloma*. Cancer Treat Rev, 2018. **70**: p. 199-208.
162. Bjorklund, C.C., et al., *Evidence of a role for CD44 and cell adhesion in mediating resistance to lenalidomide in multiple myeloma: therapeutic implications*. Leukemia, 2014. **28**(2): p. 373-83.
163. Zhu, Y.X., et al., *Identification of lenalidomide resistance pathways in myeloma and targeted resensitization using cereblon replacement, inhibition of STAT3 or targeting of IRF4*. Blood Cancer J, 2019. **9**(2): p. 19.
164. Wilk, C.M., et al., *Lenalidomide consolidation treatment in patients with multiple myeloma suppresses myelopoiesis but spares erythropoiesis*. Int J Cancer, 2016. **139**(10): p. 2343-52.
165. Muller, G.W., et al., *Amino-substituted thalidomide analogs: potent inhibitors of TNF- α production*. Bioorg Med Chem Lett, 1999. **9**(11): p. 1625-30.
166. De Maria, R., et al., *Negative regulation of erythropoiesis by caspase-mediated cleavage of GATA-1*. Nature, 1999. **401**(6752): p. 489-93.
167. Rusten, L.S. and S.E. Jacobsen, *Tumor necrosis factor (TNF)- α directly inhibits human erythropoiesis in vitro: role of p55 and p75 TNF receptors*. Blood, 1995. **85**(4): p. 989-96.
168. Cheng, Y., et al., *Erythroid GATA1 function revealed by genome-wide analysis of transcription factor occupancy, histone modifications, and mRNA expression*. Genome Res, 2009. **19**(12): p. 2172-84.

169. Koh, K.R., et al., *Immunomodulatory derivative of thalidomide (IMiD CC-4047) induces a shift in lineage commitment by suppressing erythropoiesis and promoting myelopoiesis*. *Blood*, 2005. **105**(10): p. 3833-40.
170. Richardson, P., et al., *Lenalidomide in multiple myeloma: an evidence-based review of its role in therapy*. *Core evidence*, 2010. **4**: p. 215-245.
171. Mintzer, D.M. and S.N. Billet, *Efficacy of Lenalidomide for Treatment of Anemia in Secondary Myelodysplastic Syndrome (MDS) with Chromosome 5q Deletion*. *Blood*, 2007. **110**(11): p. 4614-4614.
172. Anderson, G., et al., *Thalidomide derivative CC-4047 inhibits osteoclast formation by down-regulation of PU.1*. *Blood*, 2006. **107**(8): p. 3098-105.
173. Terpos, E., et al., *The combination of intermediate doses of thalidomide with dexamethasone is an effective treatment for patients with refractory/relapsed multiple myeloma and normalizes abnormal bone remodeling, through the reduction of sRANKL/osteoprotegerin ratio*. *Leukemia*, 2005. **19**(11): p. 1969-76.
174. Tosi, P., et al., *First-line therapy with thalidomide, dexamethasone and zoledronic acid decreases bone resorption markers in patients with multiple myeloma*. *Eur J Haematol*, 2006. **76**(5): p. 399-404.
175. Tsuda, H., et al., *Therapy with lenalidomide plus dexamethasone-induced bone formation in a patient with refractory multiple myeloma*. *Int J Hematol*, 2012. **95**(6): p. 706-10.
176. Guo, J., et al., *Lenalidomide restores the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from multiple myeloma patients via deactivating Notch signaling pathway*. *Oncotarget*, 2017. **8**(33): p. 55405-55421.
177. Terpos, E., et al., *The combination of lenalidomide and dexamethasone reduces bone resorption in responding patients with relapsed/refractory multiple myeloma but has no effect on bone formation: final results on 205 patients of the Greek myeloma study group*. *Am J Hematol*, 2014. **89**(1): p. 34-40.
178. Breitkreutz, I., et al., *Lenalidomide inhibits osteoclastogenesis, survival factors and bone-remodeling markers in multiple myeloma*. *Leukemia*, 2008. **22**(10): p. 1925-1932.
179. Bjorklund, C.C., et al., *Evidence of a role for activation of Wnt/beta-catenin signaling in the resistance of plasma cells to lenalidomide*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(13): p. 11009-20.
180. Yin, L., et al., *MUC1-C is a target in lenalidomide resistant multiple myeloma*. *Br J Haematol*, 2017. **178**(6): p. 914-926.
181. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. *Nature Methods*, 2012. **9**(7): p. 676-682.
182. Brocher, J., *biovoxxel/BioVoxxel-Toolbox: BioVoxxel Toolbox v2.6.0*. 2023: Zenodo.
183. Krämer, A., et al., *Causal analysis approaches in Ingenuity Pathway Analysis*. *Bioinformatics*, 2014. **30**(4):523–30.
184. Peng, Y., et al., *Structural basis of substrate recognition in human nicotinamide N-methyltransferase*. *Biochemistry*, 2011. **50**(36): p. 7800-8.
185. Guo, L., et al., *Bi-allelic CSF1R Mutations Cause Skeletal Dysplasia of Dysosteosclerosis-Pyle Disease Spectrum and Degenerative Encephalopathy with Brain Malformation*. *Am J Hum Genet*, 2019. **104**(5): p. 925-935.
186. Szepessy, E. and M. Sahin-Tóth, *Inactivity of recombinant ELA2B provides a new example of evolutionary elastase silencing in humans*. *Pancreatology*, 2006. **6**(1-2): p. 117-22.
187. Liu, B., et al., *The biology of VSIG4: Implications for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases and cancer*. *Cancer Lett*, 2023. **553**: p. 215996.

188. Schneider, H., et al., *Human cyclophilin C: primary structure, tissue distribution, and determination of binding specificity for cyclosporins*. Biochemistry, 1994. **33**(27): p. 8218-24.
189. Friedman, J. and I. Weissman, *Two cytoplasmic candidates for immunophilin action are revealed by affinity for a new cyclophilin: one in the presence and one in the absence of CsA*. Cell, 1991. **66**(4): p. 799-806.
190. Bono, P., et al., *Layilin, a novel integral membrane protein, is a hyaluronan receptor*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(4): p. 891-900.
191. Colonna, M., *TREMs in the immune system and beyond*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(6): p. 445-53.
192. Cella, M., et al., *Impaired differentiation of osteoclasts in TREM-2-deficient individuals*. J Exp Med, 2003. **198**(4): p. 645-51.
193. Herr, A.B., E.R. Ballister, and P.J. Bjorkman, *Insights into IgA-mediated immune responses from the crystal structures of human FcαRI and its complex with IgA1-Fc*. Nature, 2003. **423**(6940): p. 614-20.
194. Domínguez-Berzosa, L., et al., *ANKK1 Is a Wnt/PCP Scaffold Protein for Neural F-ACTIN Assembly*. Int J Mol Sci, 2024. **25**(19).
195. Lipper, C.H., et al., *Crystal structure of the Tspan15 LEL domain reveals a conserved ADAM10 binding site*. Structure, 2022. **30**(2): p. 206-214.e4.
196. Werner, A.C., et al., *Coronin 1B Controls Endothelial Actin Dynamics at Cell-Cell Junctions and Is Required for Endothelial Network Assembly*. Front Cell Dev Biol, 2020. **8**: p. 708.
197. Wang, Y., et al., *SLAMF8 regulates osteogenesis and adipogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells via S100A6/Wnt/β-catenin signaling pathway*. Stem Cell Res Ther, 2024. **15**(1): p. 349.
198. Skokowa, J., et al., *Severe congenital neutropenias*. Nat Rev Dis Primers, 2017. **3**: p. 17032.
199. Dalakas, M.C. and P.J. Spaeth, *The importance of FcRn in neuro-immunotherapies: From IgG catabolism, FCGRT gene polymorphisms, IVIg dosing and efficiency to specific FcRn inhibitors*. Ther Adv Neurol Disord, 2021. **14**: p. 1756286421997381.
200. Matthijs, G. and P. Marynen, *A deletion polymorphism in the human alpha-2-macroglobulin (A2M) gene*. Nucleic Acids Research, 1991. **19**(18): p. 5102-5102.
201. Tcherkezian, J., et al., *The human orthologue of CdGAP is a phosphoprotein and a GTPase-activating protein for Cdc42 and Rac1 but not RhoA*. Biol Cell, 2006. **98**(8): p. 445-56.
202. Li, K., et al., *Identification and expression of a new type II transmembrane protein in human mast cells*. Genomics, 2005. **86**(1): p. 68-75.
203. Elomaa, O., et al., *Structure of the human macrophage MARCO receptor and characterization of its bacteria-binding region*. J Biol Chem, 1998. **273**(8): p. 4530-8.
204. Launay, P., et al., *TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization*. Cell, 2002. **109**(3): p. 397-407.
205. Verlinden, L., et al., *Nrp2 deficiency leads to trabecular bone loss and is accompanied by enhanced osteoclast and reduced osteoblast numbers*. Bone, 2013. **55**(2): p. 465-75.
206. Girard, B., et al., *Human histamine N-methyltransferase pharmacogenetics: cloning and expression of kidney cDNA*. Mol Pharmacol, 1994. **45**(3): p. 461-8.
207. Katoh, M., *WNT/PCP signaling pathway and human cancer (review)*. Oncol Rep, 2005. **14**(6): p. 1583-8.
208. Dang, I., et al., *The Arp2/3 inhibitory protein Arpin is dispensable for chemotaxis*. Biol Cell, 2017. **109**(4): p. 162-166.

209. Feng, T., et al., *Generation of mucosal dendritic cells from bone marrow reveals a critical role of retinoic acid*. J Immunol, 2010. **185**(10): p. 5915-25.
210. Tambe, Y., et al., *A novel apoptotic pathway induced by the drs tumor suppressor gene*. Oncogene, 2004. **23**(17): p. 2977-87.
211. Hase-Yamazaki, T. and Y. Aoki, *Stimulation of human lymphocytes by cathepsin G*. Cell Immunol, 1995. **160**(1): p. 24-32.
212. van Kooyk, Y. and T.B. Geijtenbeek, *A novel adhesion pathway that regulates dendritic cell trafficking and T cell interactions*. Immunol Rev, 2002. **186**: p. 47-56.
213. Stelzer, G., et al., *The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses*. Current Protocols in Bioinformatics, 2016. **54**(1): p. 1.30.1-1.30.33.
214. Sarin, V., et al., *Evaluating the efficacy of multiple myeloma cell lines as models for patient tumors via transcriptomic correlation analysis*. Leukemia, 2020. **34**(10): p. 2754-2765.
215. Maïga, S., et al., *Paradoxical effect of lenalidomide on cytokine/growth factor profiles in multiple myeloma*. British Journal of Cancer, 2013. **108**(9): p. 1801-1806.
216. Xu, S., et al., *Mesenchymal stem cells in multiple myeloma: a therapeutical tool or target?* Leukemia, 2018. **32**(7): p. 1500-1514.
217. Gu, Z., et al., *Decreased Ferroportin Promotes Myeloma Cell Growth and Osteoclast Differentiation*. Cancer Research, 2015. **75**(11): p. 2211-2221.
218. Standal, T., et al., *Osteopontin is an adhesive factor for myeloma cells and is found in increased levels in plasma from patients with multiple myeloma*. Haematologica, 2004. **89**(2): p. 174-82.
219. Colla, S., et al., *Human myeloma cells express the bone regulating gene Runx2/Cbfa1 and produce osteopontin that is involved in angiogenesis in multiple myeloma patients*. Leukemia, 2005. **19**(12): p. 2166-76.
220. Pellagatti, A., et al., *Lenalidomide inhibits the malignant clone and up-regulates the *SPARC* gene mapping to the commonly deleted region in 5q22.2; syndrome patients*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2007. **104**(27): p. 11406-11411.
221. Cristobal, C.D., et al., *Daam2 couples translocation and clustering of Wnt receptor signalosomes through Rac1*. J Cell Sci, 2021. **134**(2).
222. Zheng, H., et al., *TREM2 Promotes Microglial Survival by Activating Wnt/ β -Catenin Pathway*. J Neurosci, 2017. **37**(7): p. 1772-1784.
223. Koo, C.Z., et al., *The tetraspanin Tspan15 is an essential subunit of an ADAM10 scissor complex*. J Biol Chem, 2020. **295**(36): p. 12822-12839.
224. Bonifer, C. and D.A. Hume, *The transcriptional regulation of the Colony-Stimulating Factor 1 Receptor (*csf1r*) gene during hematopoiesis*. FBL, 2008. **13**(2): p. 549-560.
225. Wittrant, Y., et al., *Colony-stimulating factor-1 (CSF-1) directly inhibits receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) expression by osteoblasts*. Endocrinology, 2009. **150**(11): p. 4977-88.
226. Yamamoto, K., et al., *Anti-inflammatory modulation of human myeloid-derived dendritic cell subsets by lenalidomide*. Immunol Lett, 2019. **211**: p. 41-48.
227. Galustian, C., et al., *The anti-cancer agents lenalidomide and pomalidomide inhibit the proliferation and function of T regulatory cells*. Cancer Immunol Immunother, 2009. **58**(7): p. 1033-45.
228. Wu, L., et al., *lenalidomide enhances natural killer cell and monocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-treated CD20+ tumor cells*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(14): p. 4650-7.
229. Zhytnik, L., et al., *RNA sequencing analysis reveals increased expression of interferon signaling genes and dysregulation of bone metabolism affecting*

- pathways in the whole blood of patients with osteogenesis imperfecta. BMC Medical Genomics, 2020. **13**(1): p. 177.
230. Zhu, J., et al., *Osteoblasts support B-lymphocyte commitment and differentiation from hematopoietic stem cells*. Blood, 2007. **109**(9): p. 3706-3712.
 231. Li, B., et al., *Impairment in Immunomodulatory Function of Mesenchymal Stem Cells from Multiple Myeloma Patients*. Archives of Medical Research, 2010. **41**(8): p. 623-633.
 232. Taniwaki, M., et al., *Elotuzumab for the Treatment of Relapsed or Refractory Multiple Myeloma, with Special Reference to its Modes of Action and SLAMF7 Signaling*. Mediterr J Hematol Infect Dis, 2018. **10**(1): p. e2018014.
 233. De Salort, J., et al., *Expression of SLAM (CD150) cell-surface receptors on human B-cell subsets: From pro-B to plasma cells*. Immunology Letters, 2011. **134**(2): p. 129-136.
 234. Hsi, E.D., et al., *CS1, a potential new therapeutic antibody target for the treatment of multiple myeloma*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(9): p. 2775-84.
 235. Tai, Y.T., et al., *Anti-CS1 humanized monoclonal antibody HuLuc63 inhibits myeloma cell adhesion and induces antibody-dependent cellular cytotoxicity in the bone marrow milieu*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1329-37.
 236. Ritchie, D. and M. Colonna, *Mechanisms of Action and Clinical Development of Elotuzumab*. Clin Transl Sci, 2018. **11**(3): p. 261-266.
 237. Lonial, S., et al., *Update on elotuzumab, a novel anti-SLAMF7 monoclonal antibody for the treatment of multiple myeloma*. Expert Opin Biol Ther, 2016. **16**(10): p. 1291-301.
 238. Hsi, E.D., et al., *CS1, a Potential New Therapeutic Antibody Target for the Treatment of Multiple Myeloma*. Clinical Cancer Research, 2008. **14**(9): p. 2775-2784.
 239. Lu, Q., et al., *Multiple myeloma: signaling pathways and targeted therapy*. Mol Biomed, 2024. **5**(1): p. 25.
 240. Pene, F., et al., *Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma*. Oncogene, 2002. **21**(43): p. 6587-6597.
 241. Shi, Y., et al., *Signal pathways involved in activation of p70S6K and phosphorylation of 4E-BP1 following exposure of multiple myeloma tumor cells to interleukin-6*. J Biol Chem, 2002. **277**(18): p. 15712-20.
 242. Maiso, P., et al., *Defining the role of TORC1/2 in multiple myeloma*. Blood, 2011. **118**(26): p. 6860-70.
 243. Raje, N., et al., *Combination of the mTOR inhibitor rapamycin and CC-5013 has synergistic activity in multiple myeloma*. Blood, 2004. **104**(13): p. 4188-4193.
 244. Felici, C., et al., *Lenalidomide arrests cell cycle and modulates PD1-dependent downstream mTOR intracellular signals in melanoma cells*. Melanoma Research, 2023. **33**(5): p. 357-363.
 245. Sancak, Y., et al., *Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids*. Cell, 2010. **141**(2): p. 290-303.
 246. Bar-Peled, L., et al., *Ragulator Is a GEF for the Rag GTPases that Signal Amino Acid Levels to mTORC1*. Cell, 2012. **150**(6): p. 1196-1208.
 247. Suragani, R.N.V.S., et al., *Heme-regulated eIF2 α kinase activated Atf4 signaling pathway in oxidative stress and erythropoiesis*. Blood, 2012. **119**(22): p. 5276-5284.
 248. Chen, J.J. and S. Zhang, *Heme-regulated eIF2 α kinase in erythropoiesis and hemoglobinopathies*. Blood, 2019. **134**(20): p. 1697-1707.
 249. Burwick, N., et al., *The eIF2-alpha kinase HRI is a novel therapeutic target in multiple myeloma*. Leukemia Research, 2017. **55**: p. 23-32.

250. Shaughnessy, J., *Amplification and overexpression of CKS1B at chromosome band 1q21 is associated with reduced levels of p27Kip1 and an aggressive clinical course in multiple myeloma*. Hematology, 2005. **10 Suppl 1**: p. 117-26.
251. Zhan, F., et al., *CKS1B, overexpressed in aggressive disease, regulates multiple myeloma growth and survival through SKP2- and p27Kip1-dependent and -independent mechanisms*. Blood, 2007. **109**(11): p. 4995-5001.
252. Chen, G., et al., *Ribosomal protein S3 mediates drug resistance of proteasome inhibitor: potential therapeutic application in multiple myeloma*. Haematologica, 2024. **109**(4): p. 1206-1219.
253. Nair, R., P. Gupta, and M. Shanmugam, *Mitochondrial metabolic determinants of multiple myeloma growth, survival, and therapy efficacy*. Front Oncol, 2022. **12**: p. 1000106.
254. Steiner, N., et al., *The metabolomic plasma profile of myeloma patients is considerably different from healthy subjects and reveals potential new therapeutic targets*. PLoS One, 2018. **13**(8): p. e0202045.
255. Camiolo, G., et al., *Iron regulates myeloma cell/macrophage interaction and drives resistance to bortezomib*. Redox Biol, 2020. **36**: p. 101611.
256. Soriano, G.P., et al., *Proteasome inhibitor-adapted myeloma cells are largely independent from proteasome activity and show complex proteomic changes, in particular in redox and energy metabolism*. Leukemia, 2016. **30**(11): p. 2198-2207.

6 Anhang

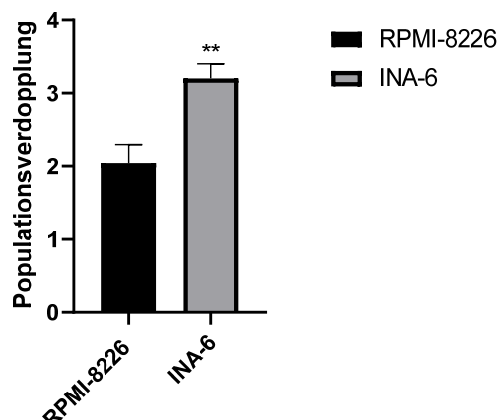


Abb. A 1: **Die Zelllinie INA-6 zeigt ein stärkeres Proliferationsverhalten als die Zelllinie RPMI-8226.** Es werden die Populationsverdopplungen zwischen den beiden Zelllinien RPMI-8226 und INA-6 in nativer Zellkultur verglichen. Hierbei stellte sich für die INA-6 mit einer durchschnittlichen Populationsverdopplung von 3,2 ein stärkeres Proliferationsverhalten im Vergleich zur RPMI-8226 mit einer durchschnittlichen Populationsverdopplung von 2,042 dar ($p < 0,01$). Dargestellt sind die Mittelwerte der Populationsverdopplungen \pm SEM. Signifikanzen wurden berechnet mit ungepaartem studentischem t-Test: **, $p < 0,01$ von INA-6 im Vergleich zu RPMI-8226, $n = 5$

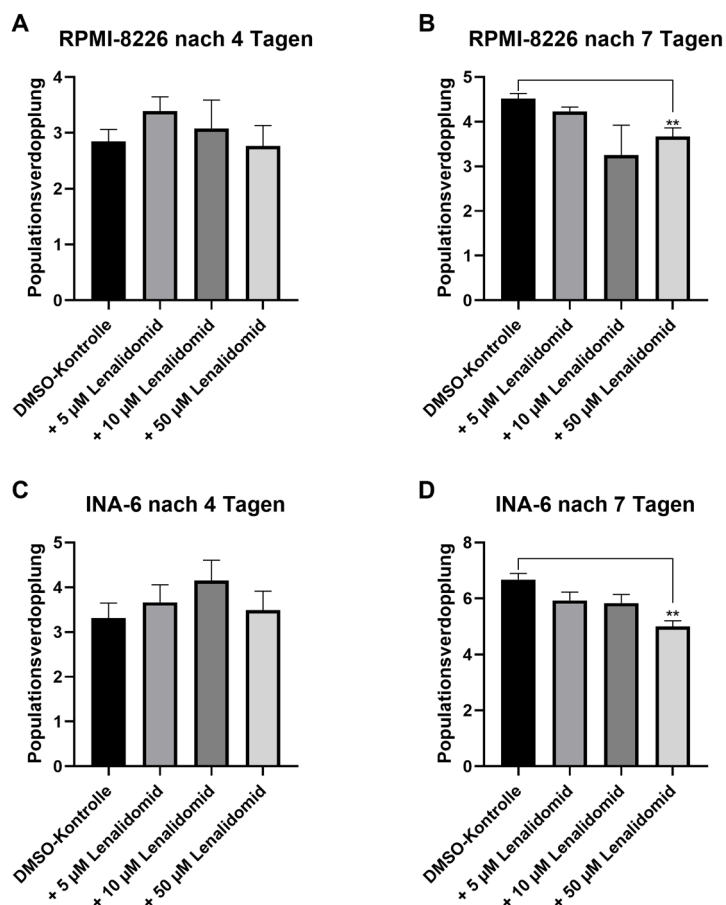


Abb. A 2: **Wachstumsverhalten der Myelom-Zelllinien nach 4 und 7 Tagen mit unterschiedlichen Lenalidomidkonzentrationen.** Gezeigt ist die jeweilige Anzahl der Populationsverdopplungen der Zelllinien RPMI-8226 und INA-6 nach 4 und 7 Tagen Kultivierung mit Lenalidomid-Konzentrationen von 5, 10 und 50 µM und der DMSO-Kontrolle. **A** RPMI-8226 nach 4 Tagen Kultur. **B** RPMI-8226 nach 7 Tagen. **C** INA-6 nach 4 Tagen. **D** INA-6 nach 7 Tagen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Populationsverdopplungen \pm SEM. Signifikanzen wurden berechnet mit ungepaartem studentischem t-Test: **, $p < 0,01$ im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, $n = 4$ (A, B), $n = 3$ (C, D).

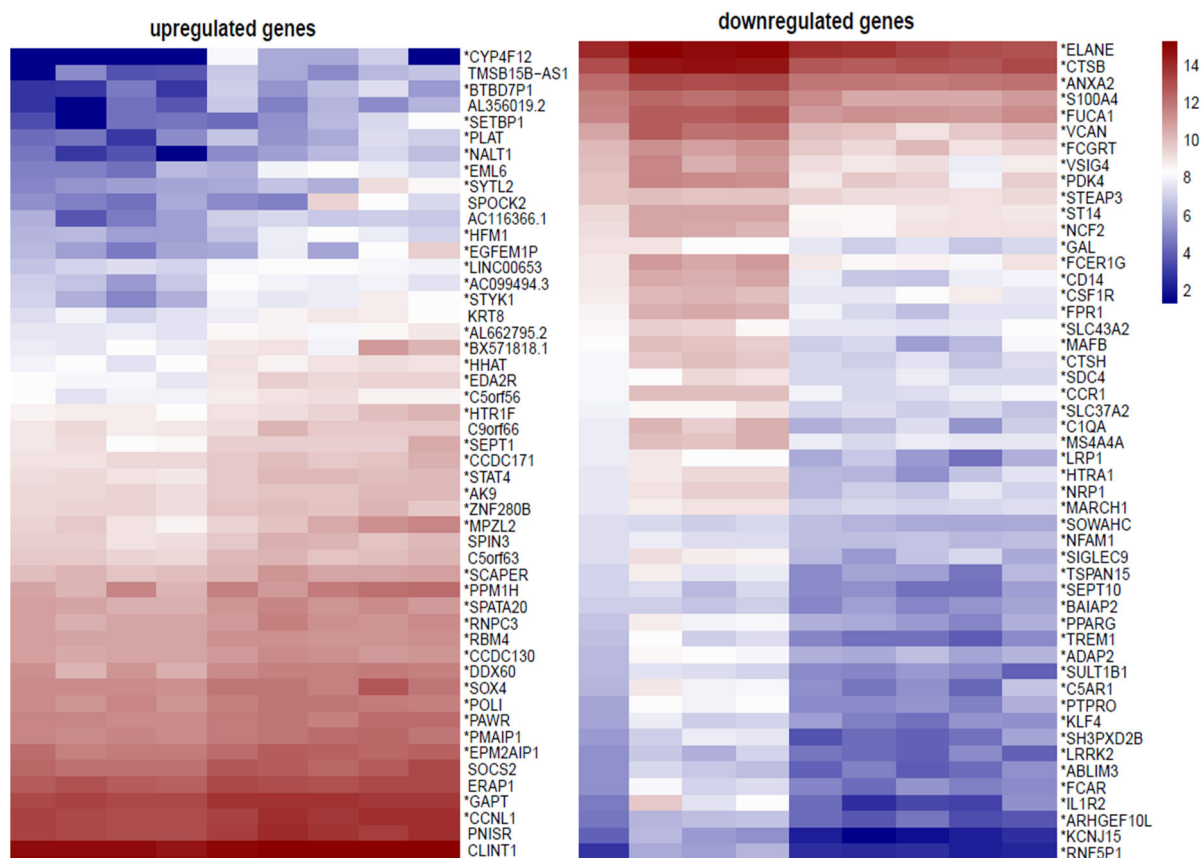


Abb. A 3: **Top 50 herauf- und herunterregulierte Gene in CD34⁺m gegenüber CD34⁺h.** Die Abbildung zeigt die Top 50 der Gene, die in hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten (CD34⁺m) im Vergleich zu hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen aus gesunden Spendern (CD34⁺h) herauf- (linke Abbildung) und herunterreguliert (rechte Abbildung) waren. Dabei repräsentieren die jeweils linken 4 Spalten CD34⁺h, während die jeweils rechten 5 Spalten CD34⁺m darstellen. Signifikanz \triangleq FDR $p \leq 0,05$. $n = 4$ (CD34⁺h) und $n = 5$ (CD34⁺m). Nach bioinformatischer Analyse 2 (Kap. 2.8).

Gen	Beschreibung	Fold Change in		
		CD34+m vs. CD34+h	CD34+h + Lenalidomid vs. CD34+h + DMSO	CD34+m + Lenalidomid vs. CD34+m + DMSO
Überschneidungen aller drei Konditionen				
NNMT	Nicotinamide N-Methyltransferase	-14,16	50,42	272,81
CELA2B	Chymotrypsin Like Elastase 2B	-10,44	17,5	37,68
PPIC	Peptidylprolyl Isomerase C	-4,78	4,54	18,89
TREM2	Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 2	-6,1	4,76	11,6
FARP1	FERM, ARH/RhoGEF And Pleckstrin Domain Protein 1	-3,58	2,6	6,24
CORO1B	Coronin 1B	-1,84	1,92	2,23
Überschneidung CD34+h + Lenalidomid vs. DMSO und CD34+m vs. CD34+h				
GAL	Galanin And GMAP Prepropeptide	-2,73	-2,98	-
Überschneidung CD34+m + Lenalidomid vs. DMSO und CD34+m vs. CD34+h				
ELANE	Elastase, Neutrophil Expressed	-2,52	-	2,57
FCGRT	Fc Gamma Receptor And Transporter	-2,56	-	2,39
ARHGAP31	Rho GTPase Activating Protein 31	-2,75	-	2,17
MCEMP1	Mast Cell Expressed Membrane Protein 1	-2,86	-	2,37
TRPM4	Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 4	-2,88	-	3,03
HNMT	Histamine N-Methyltransferase	-3,03	-	2,33
ARPIN	Actin Related Protein 2/3 Complex Inhibitor	-3,22	-	3,38
SRPX	Sushi Repeat Containing Protein X-Linked	-3,28	-	3,01

Gen	Beschreibung	<i>Fold Change in</i>		
		CD34 ⁺ m vs. CD34 ⁺ h	CD34 ⁺ h + Lenalidomid vs. CD34 ⁺ h + DMSO	CD34 ⁺ m + Lenalidomid vs. CD34 ⁺ m + DMSO
CTSG	Cathepsin G	-3,33	-	2,34
CSF1R	Colony Stimulating Factor 1 Receptor	-3,61	-	2,47
VSIG4	V-Set And Immunoglobulin Domain Containing 4	-4,05	-	4,83
LAYN	Layilin	-4,11	-	5,15
FCAR	Fc Alpha Receptor	-4,69	-	3,99
TSPAN15	Tetraspanin 15	-4,77	-	3,51
SLAMF8	SLAM Family Member 8	-5,99	-	5,96
CA12	Carbonic Anhydrase 12	-6,28	-	4,68
A2M	Alpha-2-Macroglobulin	-7,40	-	5,79
GNG12	G Protein Subunit Gamma 12	-7,57	-	4,95
MARCO	Macrophage Receptor With Collagenous Structure	-8,09	-	4,72
NRP2	Neuropilin 2	-10,45	-	5,26
DAAM2	Dishevelled Associated Activator Of Morphogenesis 2	-12,67	-	11,81
ALDH1A2	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A2	-12,69	-	14,08
IL1R2	Interleukin 1 Receptor Type 2	-22,12	-	5,61
CD209	CD209 Molecule	-23,17	-	28,32

Tabelle A 1: Gene, die sowohl in CD34⁺m als auch nach Inkubation mit Lenalidomid differentiell reguliert sind. Die dargestellten Gene unter „Überschneidungen aller drei Konditionen“ sind in den drei entsprechenden Konditionen differentiell exprimiert: CD34⁺h + Lenalidomid vs. CD34⁺h + DMSO, CD34⁺m + Lenalidomid vs. CD34⁺m + DMSO, CD34⁺m + DMSO vs. CD34⁺h + DMSO. Die dargestellten Gene unter „Überschneidung CD34⁺h + Lenalidomid vs. DMSO und CD34⁺m vs. CD34⁺h“ sowie „Überschneidung CD34⁺m + Lenalidomid vs. DMSO und CD34⁺m vs. CD34⁺h“ sind in den entsprechenden Konditionen differentiell exprimiert. Signifikanz \triangleq FDR $p \leq 0,05$, *Fold Change* $\geq 1,5$ bzw. $\leq -1,5$. CD34⁺h = CD34⁺-HSPZ aus gesunden Probanden (*healthy*), CD34⁺m = CD34⁺-HSPZ aus Myelom-

Patienten (*maligne*), HSPZ = hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen. n = 4 (CD34⁺h) und n = 5 (CD34⁺m).

Gen	Beschreibung	<i>Fold Change</i> MSPZm vs. MSPZh	<i>Fold Change</i> CD34 ⁺ m vs. CD34 ⁺ h
ADGRG7	Adhesion G Protein-Coupled Receptor G7	3361,49	1639,94
PLAT	Plasminogen Activator, Tissue Type	4,3	6,46
DSE	Dermatan Sulfate Epimerase	-2,03	-1,9
SIPA1L2	Signal Induced Proliferation Associated 1 Like 2	-3,94	-3,17
HIST1H4C	H4 Clustered Histone 3	5,12	-3,29
SGK1	Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase 1	5,36	-3,49
SLC11A1	Solute Carrier Family 11 Member 1	7,74	-4,61
CTSH	Cathepsin H	5,53	-5,14
TREM1	Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 1	-5,82	-6,2
FABP4	Fatty Acid Binding Protein 4	8,67	-7,85

Tabelle A 2: **10 Gene, die sowohl in MSPZm als auch in CD34⁺m differentiell gegenüber MSPZh und CD34⁺h exprimiert werden.** FDR $p \leq 0,05$, *Fold Change* $\geq 1,5$ bzw. $\leq -1,5$. CD34⁺h = CD34⁺-Zellen aus Gesunden (*healthy*), CD34⁺m = CD34⁺-Zellen von Myelom-Patienten (*maligne*), HSPZ = hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen, MSPZh = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von gesunden Probanden (*healthy*), MSPZm = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten (*maligne*). n = 4 (CD34⁺h) und n = 5 (CD34⁺m).

Gen	MSPZm vs. MSPZh Fold Change	MSPZm + Lenalidomid vs. MSPZm + DMSO Fold Change
NME1	6,148293528	-3,436814844
ZNHIT1	6,057658143	-4,428718821
NME1-NME2	5,978894823	-3,363693938
ZNF593	5,743715803	-3,217383041
COX7B	5,676351473	-3,849797608
MRPL52	5,415277213	-2,981737551
CHCHD2	5,399391313	-3,830760068
GSTO1	5,347271864	-3,220900345
CKS1B	5,216488125	-3,123594406
UQCC2	5,12015226	-3,656728204
EMG1_2	4,99186602	-3,341661175
RPS10	4,782138264	-3,362907518
SNRPG	4,745097295	-3,022538432
ROMO1	4,574699612	-3,428023006
RPS7	4,558491088	-3,300725171
COX6A1	4,481663004	-3,793086057
DCTPP1	4,354117373	-3,284735561
MRPS15	4,301081803	-3,526190298
SUCLG1	4,281991249	-3,605262877
PSMB3	4,233059223	-2,797390117
DCTN3	4,175722228	-3,47598958
UFD1L	4,055050714	-2,872011601
MRPL41	3,994383812	-2,978201286
PFDN5	3,987796511	-3,563692496
MRPL14	3,927488564	-2,935436846
RPS18	3,788498806	-3,941156189
COPS3	3,709796331	-3,02248302
LSM2	3,611587664	-3,056348789
EMG1_1	3,610695525	-2,842526027
STOML2	3,564884744	-3,024718123

Gen	MSPZm vs. MSPZh <i>Fold Change</i>	MSPZm + Lenalidomid vs. MSPZm + DMSO <i>Fold Change</i>
MRPL43	3,502026444	-3,447103425
ATP5J2	3,488758978	-2,484281136
RPS21	3,480802709	-2,703498878
POLR2F	3,473000331	-3,00314746
PSMG3	3,452791239	-2,699940367
BUD31	3,445346926	-3,055487984
PPIH	3,426649251	-2,659246012
NAA38	3,400314408	-2,836015752
GON7	3,392918075	-3,05664514
SRPRB	3,390863027	-2,759552934
UQCRQ	3,379440143	-2,601724398
IFI6	3,372139873	-4,913059207
NDUFA13	3,359299504	-3,169686924
RBX1	3,352884666	-2,73979601
MRPL27	3,333398802	-2,469045672
RPS16	3,278881902	-2,732383306
NXT1	3,266582957	-2,895492879
TRAPPC2L	3,248387227	-2,87145304
LAMTOR4	3,223925927	-2,608582336
RPS6	3,197133423	-3,446998992
MRPL11	3,18077684	-2,838001809
PHF5A	3,166904126	-2,964448786
NOSIP	3,148475105	-2,465490862
NSMCE2	3,122993649	-2,410126912
MRPS7	3,119569948	-2,625222991
FAM229B	3,11582262	-3,341874017
HSBP1	3,087804994	-2,631689985
ANAPC11	3,0455673	-2,383781587
RPL36	3,033177862	-2,580117556
NDUFB8	3,020856387	-2,471655936

Gen	MSPZm vs. MSPZh <i>Fold Change</i>	MSPZm + Lenalidomid vs. MSPZm + DMSO <i>Fold Change</i>
CREB3	3,003991762	-2,488650447
RPS9	2,97235317	-2,852014586
POLE4	2,946472518	-2,627426548
NDUFA2	2,923282861	-2,712987
NDUFB9	2,901297225	-2,397277439
TOMM6	2,89931399	-2,422729118
POLR2G	2,892947258	-2,453152856
LRRC75A-AS1	2,884232156	-3,189943377
COX7A2L	2,859867895	-2,959327972
ZNRD1	2,857926776	-2,819591622
MEA1	2,852963845	-2,339562724
C7orf50	2,843399271	-2,289474839
SSR2	2,768535515	-2,759729068
CRIP1	2,716669011	-2,471245777
TBCA	2,709464482	-2,258271297
NDUFB5	2,709378572	-2,742875399
RPL27A	2,678240229	-3,207687063
PDE6D	2,664492332	-2,611987616
HAX1	2,616594009	-2,303882278
GPX1	2,605292009	-2,866560009
TMEM14B	2,585568824	-2,373665015
RPS14	2,58454264	-2,652852473
ISCA2	2,573246862	-2,507836112
SCNM1	2,570828449	-2,609543582
C14orf119	2,563711278	-2,307924413
C19orf53	2,562842661	-2,324397611
RPL29	2,539466317	-2,513507621
RPS3	2,5356741	-2,881885304
TMEM14A	2,49936999	-2,540610248
WBSCR22	2,490222042	-2,224950587

Gen	MSPZm vs. MSPZh <i>Fold Change</i>	MSPZm + Lenalidomid vs. MSPZm + DMSO <i>Fold Change</i>
PRDX5	2,482718513	-2,618647737
RPL14	2,39099324	-2,576779506
NTPCR	2,388377332	-3,05839215
RPL34	2,356736697	-2,523625174
LAMTOR5	2,33002896	-2,109663353
RPSA	2,329274763	-2,405886095
CHMP5	2,324359186	-2,275673943
ACAP1	2,296536416	-4,357497404
RPS3A	2,281664967	-2,695554481
SLC50A1	2,272283536	-2,463201806
RWDD1	2,253872105	-2,227502272
SDF2	2,238375767	-2,492427105
RPL18A	2,232546141	-2,547686109
GAS5	2,214074122	-2,521226425
TMEM147	2,186402396	-2,269049494
MRPL49	1,952742668	-2,445948377
ZFAND6	1,913774965	-2,2120237
PEX2	1,859625904	-2,518074322
SSR4	1,757312385	-2,054708708
DOCK2	-2,728773148	3,654894417

Tabelle A 3: **Tabelle der 110 Gene, die sowohl in MSPZm verglichen mit MSPZh als auch nach Behandlung mit Lenalidomid in MSPZm differentiell exprimiert sind.**

Signifikanz \triangleq FDR $p \leq 0,05$, *Fold Change* $\geq 1,5$ bzw. $\leq -1,5$. MSPZh = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von gesunden Probanden (*healthy*), MSPZm = mesenchymale Stamm- und Progenitorzellen von Myelom-Patienten (*maligne*). $n = 3$ (MSPZh), $n = 2$ (MSPZm).

7 Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Dr. Sören Twarock, der maßgeblich zur Entwicklung der Themenidee und zur Interpretation der Ergebnisse beigetragen hat. Seine ansteckende Begeisterung für Forschung, seine stets produktiven und konstruktiven Anregungen sowie das überaus angenehme und wertschätzende Miteinander habe ich sehr geschätzt.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Stefanie Geyh, Leiterin des hämatologischen Forschungslabors der Universitätsklinik Düsseldorf, die mir jederzeit mit ihrem außerordentlichen Engagement und ihrer tatkräftigen Unterstützung zur Seite stand und die mich in ihrer Begeisterung für die Forschung mitgerissen hat. Ihre ausgesprochene Hilfsbereitschaft gepaart mit ihrem unerschütterlichen Optimismus haben mich stets motiviert.

Weiterhin möchte ich mich ganz herzlich bei den weiteren Mitarbeiterinnen des Forschungslabors, namentlich Frau Anne-Marie Koch, Frau Lucienne Bogun und Frau Bo Scherer bedanken, die mir oft genug ihr Ohr für Fragen und ihre Hände für Hilfe anboten. Besonders in Erinnerung bleiben die regelmäßigen Sing- und Tanzeinlagen sowie der stets gut gefüllte Vorrat an gesunden Snacks.

Herrn Professor Dr. Rainer Haas danke ich herzlich für die Mitwirkung an der Erstellung der Forschungsfrage, die produktive Diskussion der Ergebnisse und die konstruktiven und stets freundlichen Vorschläge zum weiteren Vorgehen.

Ein herzliches Dankeschön gilt auch der Jürgen-Manchot-Stiftung, da durch ihr Forschungsstipendium das Projekt möglich gemacht wurde.

Zuletzt möchte ich mich herzlich bei meiner Familie bedanken: meinen Eltern, die mich von klein auf zum Hinterfragen und kritischen Nachdenken ermutigt haben, und meinen Brüdern sowie meinem Partner für die emotionale Unterstützung und die technische Hilfe. Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Mutter, die mir immer unterstützend und kreativ zur Seite steht.