

Aus dem
Charité Zentrum 14 für Tumormedizin
Medizinische Klinik III, Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. E. Thiel, Campus Benjamin Franklin

Habilitationsschrift

Interaktionen von Myelomzellen mit Osteoklasten und Osteoblasten und Einfluss von Proteasominhibitoren auf den Knochenstoffwechsel bei Patienten mit multiplem Myelom

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach
Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Dr. med. Ulrike Heider
geb. am 18. Juli 1975 in Rostock

eingereicht im April 2010

Dekanin: Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich
1. Gutachter: Prof. Dr. med. Hermann Einsele
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Hartmut Goldschmidt

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1.	Multiples Myelom: Pathophysiologie und Stadieneinteilung	5
1.2.	Knochenstoffwechsel beim multiplen Myelom	6
1.3.	Interaktionen von Myelomzellen mit Osteoklasten	7
1.4.	Das RANK/ RANKL/ OPG System	7
1.5.	Interaktionen von Myelomzellen mit Osteoblasten	9
1.6.	Der β -Catenin/ Wnt-Signalweg und DKK-1	10
1.7.	Therapie des multiplen Myeloms	12
1.8.	Proteasominhibitoren	13
1.9.	Zellkulturmodelle für zelluläre Interaktionen beim multiplen Myelom	14
2	Eigene Arbeiten	17
2.1.	Einfluss von Myelomzellen auf Osteoklasten	17
2.1.1.	Korrelation der RANKL-Expression auf Myelomzellen mit der Knochenresorption bei Patienten mit multiplem Myelom	17
2.1.2.	Expression von RANKL mRNA in Plasmazellen von Patienten mit multiplem Myelom	19
2.2.	Interaktionen von Myelomzellen mit Osteoblasten	20
2.2.1.	Stimulation der Migration und Invasion von Myelomzellen durch Osteoblasten	20
2.2.2.	Expression von DKK-1 Protein und Korrelation mit dem Knochenstoffwechsel bei Patienten mit multiplem Myelom	22
2.2.3.	Serumkonzentration von DKK-1 in verschiedenen Krankheitsstadien und unter Chemotherapie	24
2.3.	Einfluss des Proteasominhibitors Bortezomib auf den Knochenstoffwechsel beim multiplen Myelom	26
2.3.1.	Bortezomib stimuliert die Osteoblastenaktivität von Myelompatienten	26
2.3.2.	Bortezomib hemmt die Osteoklastogenese und Osteoklastenaktivität	28

3	Diskussion	30
3.1.	Interaktionen von Myelomzellen mit Osteoklasten und neue Therapieansätze	30
3.2.	Interaktionen von Myelomzellen mit Osteoblasten und neue Therapieansätze	32
3.3.	Einfluss von Bortezomib auf den Knochenstoffwechsel	34
4	Zusammenfassung	37
5	Literaturverzeichnis	39
6	Danksagung	49
7	Erklärung	50

Abkürzungsverzeichnis

AP	alkalische Phosphatase
AP-1	Activator protein-1
BMP	Bone morphogenetic protein
Cbf	Core binding factor
CTX	Carboxy-terminal collagen crosslinks
DKK	Dickkopf
HDCT	Hochdosismethotherapie
HGF	Hepatocyte growth factor
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-11	Interleukin-11
IL-6	Interleukin-6
ISS	International Staging System
Krm	Kremen
LRP	Low-density lipoprotein receptor-related protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MFI	Mittlerer Fluoreszenzindex
MM	Multiple Myelom
MMP	Matrix-Metalloproteinase
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
OAF	Osteoklasten-aktivierender Faktor
OPG	Osteoprotegerin
RANK	Receptor activator of NF- κ B
RANKL	Receptor activator of NF- κ B ligand
Runx	Runt-related transcription factor
SFRP	Secreted frizzled-related protein
TACE	TNF- α converting enzyme
TCF	Transcription factor
TNF	Tumor necrosis factor
TRACP	Tartrate-resistant acid phosphatase
TRAF	Tumor necrosis factor receptor associated factor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRANCE	tumor necrosis factor-related activation induced cytokine
UPA	Urokinase plasminogen activator
VDR	Vitamin D Rezeptor
VEGF	Vascular endothelial growth factor

1. Einleitung

1.1. Multiples Myelom: Epidemiologie, Pathophysiologie und Diagnose

Das multiple Myelom (MM) ist die zweithäufigste hämatologische Neoplasie mit einer altersabhängigen Inzidenz von etwa vier Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner/ Jahr. Die Erkrankung ist durch eine klonale und unkontrollierte Proliferation von aberranten, terminal differenzierten Plasmazellen (Myelomzellen) im Knochenmark gekennzeichnet. Seltener liegt eine Expansion außerhalb des Knochenmarks vor („extramedulläres Myelom“). Als Plasmozytom im engeren Sinne wird dagegen ein lokalisierter Tumor aus malignen Plasmazellen ohne Knochenmarkinfiltration bezeichnet.

Je nach Typ des Myeloms sezernieren die atypischen Plasmazellen ein monoklonales Immunglobulin (IgG in ca. 50%, IgA in ca. 25%, selten IgD oder IgM) bzw. freie Leichtketten vom Typ kappa oder lambda (Bence-Jones-Myelom, ca. 20%), welche im Serum und/oder Urin in erhöhter Konzentration nachweisbar sind. Aufgrund einer Hemmung der Bildung polyklonaler, funktionsfähiger normaler Immunglobuline auf Prä-B-Zellebene kommt es zu einem Antikörpermangelsyndrom. Infektionen stellen die häufigste Todesursache bei dieser Erkrankung dar.

Die malignen Plasmazellen führen außerdem bei fast allen Patienten zu einem gesteigerten Knochenabbau. Dabei kann es konsekutiv zur Bildung von Osteolysen, pathologischen Frakturen, einer diffusen Osteopenie und/oder Hyperkalzämie kommen („myeloma bone disease“). Die Mechanismen dieses Phänomens werden unter 1.2. detaillierter beschrieben.

Die Diagnose des MM ist an bestimmte Kriterien gebunden und gilt als gesichert, wenn mindestens zwei der folgenden Punkte erfüllt sind [1]:

- Nachweis eines monoklonalen Paraproteins im Serum und/oder Urin
- Vorhandensein von Osteolysen im Skelettsystem
- Nachweis einer mindestens 10% Knochenmarkinfiltration durch atypische Plasmazellen

Die Stadieneinteilung des MM kann nach der Klassifikation nach Durie und Salmon erfolgen [2]. Die neuere Einteilung ist die Differenzierung zwischen asymptomatischem (smoldering) MM, das nicht behandlungsbedürftig ist, und symptomatischem, behandlungsbedürftigem MM. Letzteres besteht bei Vorliegen von Paraprotein-assoziierten Gewebe- oder Organschäden (u.a. Serum-Calcium $> 2,75$ mmol/l, Kreatinin > 2 mg/dl, Anämie mit einem Hämoglobinwert von mehr als 2 g/dl unterhalb der Normgrenze oder < 10 g/dl, Osteolysen oder Osteoporose mit Kompressionsfrakturen, u.a.) [1].

Eine neuere Stadieneinteilung nach dem International staging system (ISS), die für symptomatische Myelome gilt, berücksichtigt die Serumwerte von Albumin und β 2-Mikroglobulin und ist in erster Linie zur Abschätzung der Prognose von Bedeutung [3].

1.2. Knochenstoffwechsel beim multiplen Myelom

Die gesteigerte Knochenresorption ist das wichtigste klinische Phänomen beim multiplen Myelom. Etwa 80% der Patienten zeigen zum Zeitpunkt der Diagnose osteolytische Läsionen bzw. eine diffuse Osteopenie. Auf zellulärer Ebene (Knochenhistomorphometrie) konnte gezeigt werden, dass die Knochenresorption sogar Jahre vor der radiologischen Manifestation und dem Auftreten klinischer Symptome einsetzt. Klinisch äußert sich die gesteigerte Knochenresorption vor allem in Form von Knochenschmerzen, osteopenischen Veränderungen und pathologischen Frakturen. Diese Knochenereignisse üben einen sehr wichtigen Einschnitt in die Lebensqualität der Patienten aus. Eine Rückbildung der Osteolysen durch die Therapie gelingt selten: Studien zeigen, dass auch nach erfolgreicher Chemotherapie trotz Remission der Erkrankung eine progressive Entwicklung der Osteolysen beobachtet werden kann. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit einer rechtzeitigen Intervention in den gesteigerten Knochenmetabolismus, die ein grundlegendes Verständnis der Mechanismen der Entstehung von Osteolysen voraussetzt.

Der Knochenumbau („bone remodeling“) ist ein physiologischer Prozess, bei dem unter normalen Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen der Bildung neuer Knochensubstanz durch Osteoblasten und dem Abbau von Knochen durch Osteoklasten besteht. Beim multiplen Myelom kommt es zu komplexen Interaktionen zwischen Myelomzellen und Osteoklasten sowie Osteoblasten, die über verschiedene Zytokine gesteuert werden und zu einer z.T. exzessiven Knochenresorption mit fehlender reaktiver Knochenformation führen. Quantitative Knochenbiopsien zeigen eine vermehrte Anzahl und eine erhöhte Aktivität der Osteoklasten bei Myelompatienten [4]. Initial kann die Aktivität der Osteoblasten als Reaktion auf die Osteoklasten-Aktivierung ebenfalls ansteigen [4]. Während des weiteren Verlaufs der Erkrankung findet jedoch typischerweise eine Entkopplung der Osteoklasten- und Osteoblastenaktivität statt („uncoupling“) [5].

Kürzlich publizierte Daten legen nahe, dass ein aktiver Knochenstoffwechsel im Gegenzug die Proliferation der Plasmazellen stimuliert. So konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass ovariectomierte Mäuse mit einem gesteigerten Knochenumbau nach Injektion von Myelomzellen ein rascheres Tumorzellwachstum entwickelten als nicht ovariectomierte Tiere [6].

1.3. Interaktionen von Myelomzellen mit Osteoklasten

Ein wichtiger histologischer Befund bei Knochenbiopsien von Myelompatienten ist die vermehrte Anzahl der Osteoklasten vor allem in enger Nachbarschaft zu Plasmazellen [7]. *In vitro* Kokulturen von isolierten Präosteoklasten und Myelomzellen zeigen, dass Myelomzellen die Differenzierung der Osteoklastenvorläufer stimulieren, und dass die Osteoklasten durch direkten Zell-Zell-Kontakt auch die Proliferation und das Überleben der Myelomzellen fördern [8].

Es wurde vermutet, dass die Osteoklastenaktivität durch lokale Zytokine („Osteoklastenaktivierende Faktoren“, OAFs) reguliert wird, die von den Myelomzellen selbst und anderen Zellen der lokalen Umgebung gebildet werden [9]. Es war lange unbekannt, welche Zytokine maßgeblich daran beteiligt sind. Es wurden verschiedene Faktoren beschrieben, die beim Myelom überexprimiert werden und als potentielle OAFs galten, darunter Lymphotoxin, TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-11 [10]. Es konnte jedoch keine klare Beziehung zwischen den Proteinspiegeln dieser Faktoren und dem Ausmaß der Knochenresorption gefunden werden, bzw. gelang es nicht, den osteoklastenstimulierenden Effekt der Myelomzellen durch neutralisierende Antikörper gegen diese Faktoren signifikant zu inhibieren, so dass ihnen letztlich keine wesentliche Rolle beim myelombedingten Knochenabbau nachgewiesen werden konnte.

1.4. Das RANK/ RANKL/ OPG System

In jüngster Vergangenheit wurde ein System von Zytokinen identifiziert, das eine Schlüsselposition in der Osteoklastogenese innehat: das RANK/ RANKL/ OPG System. Der Receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) wird von Osteoklastenvorläufern und reifen Osteoklasten exprimiert und durch den RANK-Liganden (RANKL, Synonym: tumor necrosis factor-related activation induced cytokin, TRANCE) aktiviert. RANKL ist ein Mitglied der tumor-necrosis-factor (TNF) Familie [11] und wird unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich von Osteoblasten und Stromazellen gebildet. RANKL existiert in einer membrangebundenen Isoform, als sekundär lösliche Variante nach Abspaltung von der Zelloberfläche durch Metalloproteasen und TNF- α converting enzyme (TACE) und als primär lösliche Form. Die Aktivierung von RANK durch RANKL löst eine Signalkaskade in den Osteoklasten mit Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Nuclear factor kappa B (NF- κ B) und Activator Protein (AP)-1 aus, die in einer verstärkten Differenzierung und Aktivierung von Präosteoklasten resultiert [12]. Außerdem wirkt RANKL auch direkt auf reife Osteoklasten, indem es Zytoskelettveränderungen induziert und die Osteoklasten zur

Knochenresorption aktiviert [13]. Osteoprotegerin (OPG) ist ein löslicher Rezeptorantagonist von RANKL und neutralisiert dessen biologische Wirkungen [14]. Es wird von Stromazellen und Osteoblasten gebildet. Ein ausgewogenes RANKL/ OPG Verhältnis ist für eine normale Osteoklastenfunktion unabdingbar. In Tiermodellen führte eine unbalancierte Expression beider Faktoren zu ausgeprägten Skelettveränderungen. So zeigen RANKL-knockout-Mäuse eine deutliche Osteopetrose [15], während bei Tieren mit OPG-Defizienz eine Osteopenie beschrieben wurde [16]. Beim Menschen wurden ebenfalls Veränderungen der RANKL/ OPG- Ratio bei verschiedenen Knochenerkrankungen beschrieben, z.B. der postmenopausalen oder steroidinduzierten Osteoporose [17].

Es lag daher nahe, die Bedeutung dieses Zytokinsystem auch beim multiplen Myelom zu untersuchen. Pearce et al. konnten 2001 erstmals mittels Immunhistochemie und in-situ-Hybridisierung von Knochenmarkbiopsien nachweisen, dass es beim Myelom zu einer Dysregulation des RANKL/OPG-Verhältnisses im Knochenmarkmikromilieu kommt [18]. Ihre Versuche zeigten, dass Myelomzellen in Stromazellen zu einer Überexpression von RANKL und einer verminderten Expression von OPG führen.

Unsere Arbeitsgruppe untersuchte zum gleichen Zeitpunkt die Expression von RANKL in primären humanen Myelomzellen. Wir konnten mittels Durchflusszytometrie aus Knochenmarkaspiraten [19] und Immunzytochemie von Knochenmarkzytologien [20] erstmals nachweisen, dass Plasmazellen von Myelompatienten auch direkt RANKL-Protein exprimieren (Abbildung 1 und 2).

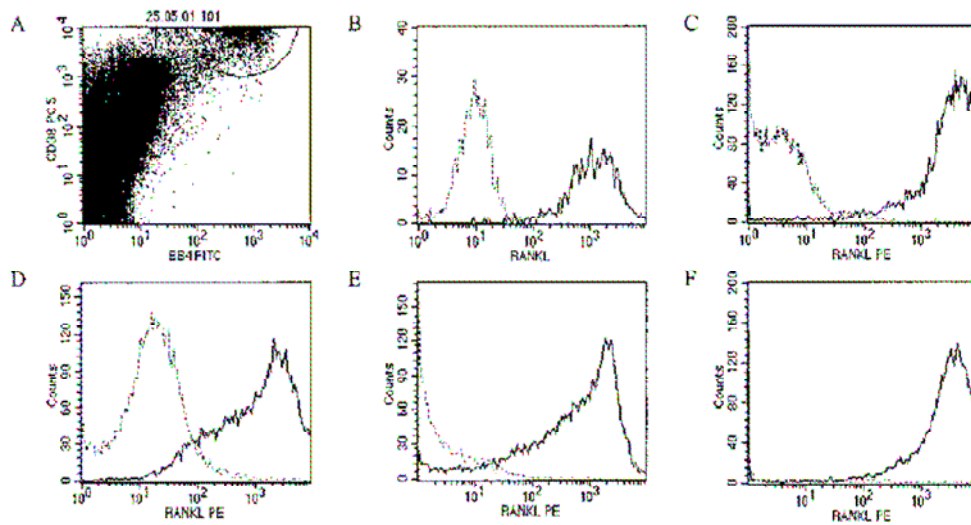


Abb. 1. RANKL-Expression auf Knochenmark-Plasmazellen von Myelompatienten mit Osteolysen. (A) Identifikation der Plasmazellen mittels CD38/B4- Expression. (B-F) RANKL- Expression (durchgezogene Linie) der Plasmazellen verglichen mit der Isotypenkontrolle (gepunktete Linie). Aus: Sezer J Clin Oncol. 2002 [19]

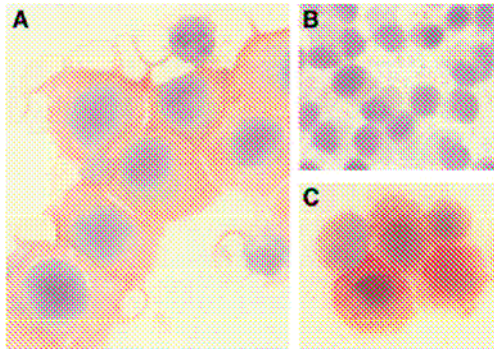


Abb. 2. RANKL-Expression: Immunzytochemie von Knochenmarkplasmazellen und Kontrollen (A) Myelomzellen aus dem Knochenmark eines Patienten mit multiplem Myelom und Osteolysen (B) Negativkontrolle: Färbung mit einem Antikörper gegen ein nichtexprimiertes Protein (Panzytokeratin). (C) Positivkontrolle: SaOs-2 Zellen (humane Osteosarkomzelllinie, die bekanntermaßen RANKL exprimiert). Aus: Sezer Blood 2002 [20]

Damit tragen sie zu einem erhöhten RANKL-Angebot im lokalen Knochenmarkmikromilieu bei und damit direkt zu einer Stimulation der Osteoklastendifferenzierung und -aktivität.

Weitere Faktoren, die von Myelomzellen produziert werden und die eine Rolle bei der Osteoklastendifferenzierung und -migration spielen, sind Macrophage inflammatory protein-1 alpha (MIP-1 α), MIP-1 β und Stromal cell derived factor (SDF)-1 α [21-23]. Deren Effekte sind jedoch - zumindest teilweise - abhängig von der RANKL/ RANK Signalübertragung [24].

1.5. Interaktionen von Myelomzellen mit Osteoblasten

Die Osteoblasten spielen eine zentrale Rolle im Knochenmetabolismus. Sie sind die knochenbildenden Zellen, können aber auch die Osteoklasten stimulieren. Der wichtigste osteoklastogene Faktor, RANKL, und sein Gegenspieler OPG werden von den Osteoblasten gebildet.

Während sich die meisten Untersuchungen der myelombedingten Knochendestruktion lange Zeit auf die Osteoklasten und deren Wechselwirkungen mit Myelomzellen konzentrierten, war der Einfluss der malignen Plasmazellen auf die Osteoblasten und deren Rolle bei der Genese der Osteolysen weniger gut untersucht. Es war bekannt, dass Knochenmarkhistologien von Patienten im Frühstadium der Erkrankung eine gesteigerte Osteoblastenzahl zeigen, während Patienten mit fortgeschrittenem Myelom eine verminderte Anzahl von Osteoblasten aufweisen. Die Serumkonzentration von Osteocalcin, einem Marker der Osteoblastenaktivität, ist bei Patienten in fortgeschrittenem Stadium ebenfalls reduziert [25].

Verschiedene *in vitro* Studien zum Einfluss von Myelomzellen auf die Differenzierung und Aktivität von Osteoblasten ergaben unterschiedliche Befunde. Karadag et al. berichteten, dass Myelomzellen die Osteoblastenformation im Knochenmark steigern [26]. Im Gegensatz dazu fanden Giuliani et al., dass humane Myelomzellen die Differenzierung von Osteoblastenvorläufern inhibieren und zu einer verminderten Expression von Osteocalcin, Alkalischer Phosphatase (ALP) und Kollagen I führen [27].

Wir etablierten ein Kokultursystem von primären, aus dem Knochenmark von Myelompatienten isolierten Plasmazellen und humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC), die Osteoblastenvorläufern entsprechen, bzw. reifen Osteoblasten aus Auswachskulturen von Knochen. In ersten Versuchen konnten wir nachweisen, dass Myelomzellen die Differenzierung von Präosteoblasten inhibieren und die Expression von Osteoblastenmarkern wie Osteocalcin hemmen (Abbildung 3).

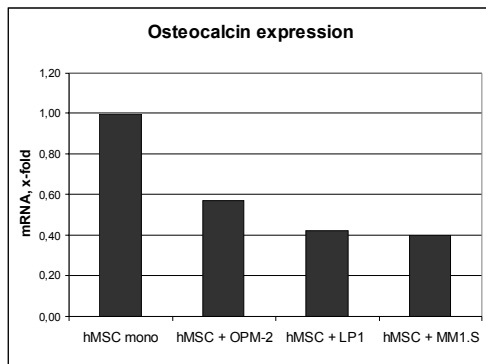


Abb. 3. Die Kokultur von Myelomzellen (Zelllinien OPM-2, LP1 und MM1.S) mit mesenchymalen Stammzellen (hMSC) führt zu einer verminderten Expression des Osteoblastenmarkers Osteocalcin, was eine verminderte Osteoblastendifferenzierung reflektiert

Im nächsten Schritt führten wir Genexpressionsanalysen in den Kokultursystemen durch, in denen sich u.a. eine negative Regulation osteoblastenspezifischer Gene und eine Hemmung des β -Catenin/Wnt-Signalweges in den Osteoblasten zeigte (siehe Punkt 1.6.). Einige der als differentiell exprimiert identifizierten Faktoren (z.B. Matrix-Metalloproteinasen) untersuchten wir in weiteren Experimenten; die Ergebnisse werden in dieser Arbeit vorgestellt.

1.6. Der β -Catenin/ Wnt-Signalweg und DKK-1

Osteoblasten entstammen mesenchymalen Stammzellen, die auch als Stammzellen für Chondrozyten, Myozyten und Adipozyten dienen. Ein maßgeblicher Signaltransduktionsweg für die Osteoblastenreifung und -funktion ist die Wnt/ β -Catenin Signaltransduktion [28]. Die Bezeichnung Wnt setzt sich aus den Abkürzungen Wg für wingless (aus Experimenten mit *Drosophila melanogaster*, in denen eine Mutation im Wg-Gen zu einer flügellosen Variante führte) und Int-1 zusammen (abgeleitet vom Int-1-Gen, mittlerweile Wnt-1 genannt). Auf molekularer Ebene kommt es zu folgenden Prozessen: Wnt Signalproteine binden an den Rezeptor Frizzled (Fz) und seinen Korezeptor Low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) 5/6, welche daraufhin inhibierend auf einen Proteinkomplex einwirken, der normalerweise intrazelluläres β -Catenin ubiquitiniert und dem proteasomalen Abbau zuführt [28]. Da Wnts also die Degradation von β -Catenin hemmen, kann dieses akkumulieren und in den Zellkern translozieren. Dort bildet β -Catenin mit dem Transkriptionsfaktor transcription factor 4 (TCF4) einen Komplex und aktiviert osteoblastenspezifische Zielgene. In Abwesenheit eines Wnt-Signals wird intrazelluläres β -Catenin ubiquitiniert und abgebaut.

Durch Antagonisierung der Wnt-Signaltransduktion werden die Osteoblastenreifung und -funktion inhibiert. Natürliche Wnt-Antagonisten können in zwei funktionelle Klassen unterteilt werden: Mitglieder der Secreted frizzled-related protein (sFRP) Klasse, die direkt an Wnts binden (und damit deren Interaktion mit dem Fz/ LRP 5/6 Rezeptorkomplex verhindern), sowie Mitglieder der Dickkopf (DKK)-Klasse, die ihre Wirkung über Bindung an den Korezeptor LRP 5/6 entfalten [29]. Das bestuntersuchte Mitglied ist DKK-1. DKK-1 inhibiert die Wnt-induzierte Stabilisierung von β -Catenin in erster Linie durch Bindung an LRP 5/6; es bildet darüber hinaus auch zusätzlich mit den transmembranären Proteinen Kremen1 (Krm1) und Kremen2 (Krm2) einen Komplex, der zur Endozytose und Abbau des Wnt-Rezeptors führt.

Störungen des Wnt/ β -Catenin Signaltransduktionsweges führen beim Menschen zu einem abnormalen Skelettphänotyp. So kommt es z.B. bei bestimmten Mutationen im LRP5-Gen, die die Funktion dieses Wnt-Korezeptors herabsetzen, zum Osteoporosis- Pseudoglioma- Syndrom, das durch eine schwere Osteoporose gekennzeichnet ist [30]. Ein weiteres Beispiel ist das High- bone-density- Syndrom mit erhöhter Knochendichte, das ebenfalls die Folge einer Mutation im LRP5-Gen ist, wobei hier die Bindung von DKK-1 an LRP5 gehemmt wird und es dadurch zu einer überschießenden Aktivität des Wnt/ β -Catenin Signalweges kommt [31, 32].

Die Rolle des Wnt-Signalweges bei der myelominduzierten Knochendestruktion wurde erstmals durch Tian et al. beschrieben. Mittels Genexpressionsanalysen aus Myelomzellen konnten sie eine

Überexpression von DKK-1 mRNA bei Patienten mit Osteolysen nachweisen [33]. *In vitro* hemmte rekombinantes humanes DKK-1 die Osteoblastenaktivität. Dieser Effekt konnte durch einen polyklonalen anti-DKK-1 Antikörper neutralisiert werden. Wir konnten ebenfalls nachweisen, dass sowohl Myelomzelllinien als auch isolierte primäre Myelomzellen DKK-1 produzieren und sezernieren, und dass DKK-1 die Differenzierung von Osteoblasten hemmt [34].

In der vorliegenden Arbeit sind die Ergebnisse eigener Untersuchungen zur Expression von DKK-1 bei Myelompatienten und zur Korrelation mit dem Knochenstoffwechsel bzw. mit verschiedenen Krankheitsstadien und Therapiesituationen dargestellt.

1.7. Therapie des multiplen Myeloms

Eine Behandlungsindikation des multiplen Myeloms besteht, wenn definierte Endorganschäden vorliegen. Dazu gehören: Knochenveränderungen (lytische Läsionen oder eine diffuse Osteopenie mit Kompressionsfrakturen), erhöhtes Serumkalzium, Niereninsuffizienz, ein Hb von 2 g/dl unter dem Normwert, ein Hyperviskositätssyndrom, das Vorliegen einer Amyloidose, eine gesteigerte Inzidenz bakterieller Infektionen oder ein extramedulläres Plasmozytom.

In diesen Fällen gilt die Hochdosischemotherapie (HDCT) mit Melphalan und nachfolgender autologer Stammzelltransplantation bei Patienten bis zu einem Alter von 65 - 70 Jahren als Erstlinientherapie der Wahl und zeigt im Vergleich zur konventionell dosierten Therapie einen deutlichen Überlebensvorteil [35].

Bei Patienten, bei denen aufgrund eines fortgeschrittenen Alters oder wegen Komorbiditäten eine HDCT nicht anwendbar ist, war Melphalan und Prednison (MP) über viele Jahre die Standardtherapie [36]. In letzter Zeit wurden eine Reihe neuer Substanzklassen als hoch wirksam bei Patienten mit multiplem Myelom beschrieben. Dazu gehören der Proteasominhibitor Bortezomib und immunmodulatorische Substanzen wie Thalidomid und sein Abkömmling Lenalidomid. Derzeit gilt die Kombination von MP mit Bortezomib (Velcade) oder Thalidomid als empfohlene Erstlinientherapie bei Älteren. Eine lange Liste von weiteren, potentiell wirksamen Substanzen steht beim multiplen Myelom für präklinische Untersuchungen oder für frühe klinische Studien zur Verfügung. Unter anderem handelt es sich dabei um Histondeacetylase-Inhibitoren und Hsp-90 Inhibitoren.

Bei Zeichen eines gesteigerten Knochenabbaus (z.B. Osteolysen, Hyperkalzämie) ist außerdem eine Behandlung mit Bisphosphonaten indiziert. Bisphosphonate sind Pyrophosphat-Analoga, die während der Mineralisation in die Oberfläche der Matrix des Knochens eingebaut werden und

sowohl zu einer Reduktion der Anzahl an Osteoklasten als auch zu einer Hemmung der Osteoklasten-Aktivität führen. Der Wert einer begleitenden Behandlung mit Pamidronat ist bei Patienten, die chemotherapiert werden, in randomisierten Studien demonstriert worden [37, 38]. Unter der Bisphosphonat-Behandlung treten signifikant seltener Skelettereignisse auf. Dennoch kommt es normalerweise nicht zu einer vollständigen Rückbildung der osteolytischen Veränderungen.

1.8. Proteasom-Inhibition als neues Therapieprinzip

Das 26S Proteasom ist eine multikatalytische Protease, die Peptide zu Fragmenten abbaut, nachdem diese in einem mehrstufigen enzymatischen Prozess mit einer Polyubiquitin-Kette markiert worden sind (sogenannte „Ubiquitinierung“). Es ist die wichtigste extralysosomale Protease der Zelle und an der posttranskriptionellen Regulation einer großen Anzahl von Proteinen beteiligt, die für Zellzykluskontrolle, Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Bedeutung sind [39]. Die Hemmung der Proteasomaktivität führt bei einer Reihe von humanen Tumorzellen zur Wachstumshemmung und Apoptose, so dass daraus ein neues und wichtiges Wirkprinzip in der Therapie maligner Erkrankungen entstanden ist [40-43].

Die erste klinisch angewendete und bisher einzig zugelassene Substanz dieser neuen Medikamentenklasse ist Bortezomib (PS-341, Velcade®). Eine große multizentrische Phase III Studie mit Bortezomib, die sogenannte APEX Studie, wurde an insgesamt 669 Patienten mit rezidiviertem multiplen Myelom durchgeführt und zeigte in den stark vorbehandelten Patienten eine Rate an kompletten und partiellen Remissionen von 38%, im Vergleich zu 18% im Kontrollarm mit Dexamethason. Die mediane Überlebenszeit verlängerte sich von 23,7 Monaten auf 29,8 Monate [44]. Auf der Basis dieser Daten wurde Bortezomib für Patienten mit rezidiviertem multiplen Myelom zugelassen. Eine andere große Studie, die VISTA-Studie, etablierte Bortezomib in der Erstlinientherapie von älteren bzw. nicht für die Transplantation geeigneten Patienten [45]. Die Studie verglich den bisherigen Standard MP mit der Kombination MP + Bortezomib und zeigte einen signifikanten Vorteil in Bezug auf das Ansprechen (CR 30% vs 4%) und auf das 3-Jahres-Überleben (72% vs 59%) zugunsten der Kombination mit Bortezomib.

Auf zellulärer Ebene führt die Hemmung der Proteasomaktivität unter anderem zu einer erhöhten Konzentration des Inhibitors von Nuclear factor kappa-B (NF-κB), dem sogenannten IκB, und damit einer verminderten Aktivität von NF-κB. NF-κB ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor, der beim multiplen Myelom konstitutiv aktiviert ist [46], und u.a. die Expression von Wachstumsfaktoren

(u.a. IL-6), Zelladhäsionsmolekülen und Anti-Apoptosefaktoren stimuliert. Damit trägt NF- κ B zur Zellproliferation und zum Überleben der malignen Plasmazellen bei. Insgesamt deuten viele Daten darauf hin, dass ein Teil der Antitumor-Wirksamkeit der Proteasominhibitoren beim multiplen Myelom auf der Hemmung der NF- κ B Aktivität beruht [47].

Die Hemmung des Proteasoms hat daneben potentiell auch Auswirkungen auf andere Zellen des Knochenmarkmikromilieus. In den Osteoklasten z.B. kommt es durch Bindung von RANKL an den transmembranären Rezeptor RANK ebenfalls zur Aktivierung von NF- κ B. Hierdurch bietet sich ein möglicher Angriffspunkt für Bortezomib. In den Osteoblasten dagegen moduliert das Ubiquitin/Proteasom-System unter anderem die Expression von intrazellulärem β -Catenin, das bei der Wnt-Signaltransduktion eine Rolle spielt, und von Runx2, einem weiteren wichtigen Transkriptionsfaktor in Osteoblasten [48]. Wir untersuchten daher den Einfluss von Bortezomib auf Osteoklasten und Osteoblasten in Zellkulturmodellen und im klinischen Kontext. Die Ergebnisse werden in der folgenden Arbeit dargestellt.

1.9. Zellkulturmodelle für zelluläre Interaktionen beim multiplen Myelom

Es wurden verschiedene Zellkulturmodelle etabliert, um primäre humane Myelomzellen, Osteoklasten, Osteoblasten und mesenchymale Stammzellen bzw. ihre Interaktionen *in vitro* untersuchen zu können.

Primäre Myelomzellen werden anhand ihrer Expression von CD138 (B-B4) identifiziert [49] und mittels immunomagnetischer Separation aus dem Knochenmark isoliert. Die Reinheit der so gewonnenen Plasmazellen liegt bei über 97%.

Die Gewinnung von Osteoklasten erfolgt aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern. CD14 positive Osteoklastenvorläufer werden immunomagnetisch selektiv angereichert, in α -Medium kultiviert und mit 25 ng/ml M-CSF und 25 ng/ml RANKL stimuliert. Unter diesen Kulturbedingungen kann man ab Tag 4 Präosteoklasten und ab Tag 28 reife Osteoklasten identifizieren (Abbildung 4). Die Zellen sind *in vitro* voll funktionsfähig und unter anderem in der Lage, Knochen (bzw. Dentin im Zellkulturmodell) zu resorbieren.

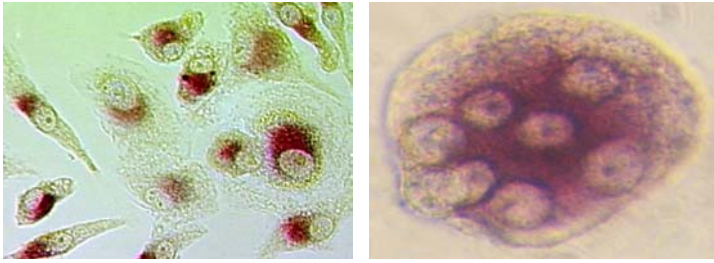


Abb. 4. Präosteoklasten nach 4 Tagen Stimulation mit M-CSF und RANKL (links) bzw. Osteoklasten nach 28 Tagen Stimulation (rechts). TRAP-Färbung. Identifizierung der Osteoclasten als mehrkernige, TRAP-positive Zellen

Die Isolierung von Osteoblasten erfolgt mittels Auswachskulturen aus Knochenfragmenten gesunder Spender. Die Zellen werden bis zur Konfluenz über einen Zeitraum von ca. 5-8 Wochen kultiviert; die Kontamination durch hämatopoetische Zellen liegt unter 0,5% [50]. Für bestimmte Versuche werden die Osteoblasten mit β -Glycerolphosphat und Ascorbat osteogen stimuliert.

Mesenchymale Stammzellen werden aus dem Knochenmark gesunder Spender auf Grund ihres Adhärenzvermögens an spezielle Kulturflaschen von anderen, nicht adhärenenten, hämatopoetischen Zellen abgetrennt und unter Zusatz von 2 ng/ml bFGF bis zur Subkonfluenz kultiviert. Die Differenzierung in Osteoblasten erfolgt durch osteogene Stimulation mittels β -Glycerolphosphat und Ascorbat, z.T. auch zusätzlich mit Vitamin D. Die Identifizierung der Zellen erfolgt durch Nachweis der alkalischen Phosphatase und der Ossifikation mittels der Von-Kossa-Färbung (Abbildung 5). Zur Validierung der Multipotenz der Stammzellen erfolgen spezielle Assays, in denen das Differenzierungspotential in Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten nachgewiesen wird.

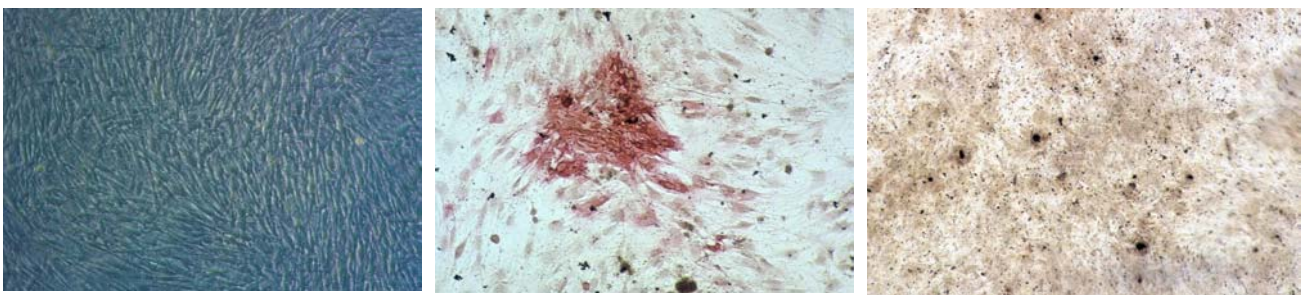


Abb. 5. Präosteoblasten nach Stimulation mit β -Glycerolphosphat und Ascorbat. Konfluente Zellen (links), immunzytochemische Färbung mit alkalischer Phosphatase (Mitte) und Von-Kossa-Färbung zur Darstellung von Calciumphosphat (rechts).

Die Kokultur von Myelomzellen mit Osteoblasten und mesenchymalen Stammzellen erfolgt unter verschiedenen Bedingungen, u.a. unter direktem Zell-Zell-Kontakt, unter räumlicher Trennung mit Hilfe von semipermeablen Membranen (Transwellsystem mit 0,45 µm Poren), bzw. unter Einsatz von Myelomzell-konditioniertem Medium.

2.1. Einfluss von Myelomzellen auf Osteoklasten

2.1.1. Korrelation der RANKL-Expression auf Myelomzellen mit der Knochenresorption bei Patienten mit multiplem Myelom

Osteoklasten und ihre Vorläuferzellen tragen auf der Oberfläche den Rezeptor RANK, der durch seinen Liganden RANKL aktiviert wird und dadurch zu ihrer Differenzierung und Aktivitätssteigerung führt. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir den Zusammenhang zwischen der Stärke der RANKL-Expression durch Plasmazellen und dem Ausmaß der Knochendestruktion bei Myelompatienten. Dazu etablierten wir einen Assay zur Quantifizierung von RANKL-Protein auf den Myelomzellen mittels Dreifarb-Durchflußzytometrie unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen humanes RANKL. Plasmazellen wurden anhand ihrer Expression von CD138 und CD38 identifiziert. Die Stärke der RANKL-Expression wurde als mittlerer Fluoreszenzindex (MFI), dem Quotienten aus Fluoreszenzintensität des gebundenen RANKL- Antikörpers und der Negativkontrolle (unspezifischer Antikörper des gleichen Isotyps), auf den gegateten Plasmazellen berechnet. Das Ausmaß der Knochendestruktion wurde konventionell-radiologisch (Röntgen Skelettstatus) bestimmt.

Wir konnten zeigen, dass Knochenmarkplasmazellen von Kontrollpersonen keine oder nur eine sehr schwache RANKL-Expression aufweisen (medianer MFI =6). Im Gegensatz dazu konnte bei allen untersuchten Myelompatienten eine deutliche extrazelluläre RANKL-Expression gefunden werden (medianer MFI =47).

Die weiteren Untersuchungen zeigten, dass Plasmazellen von Patienten mit osteolytischen Knochenläsionen deutlich mehr RANKL exprimieren (medianer MFI =60, Range 16-2494) als Myelomzellen von Personen ohne Osteolysen (medianer MFI =16, Range 6-229). Interessanterweise wiesen Patienten mit ausgedehnter Knochenmarkinfiltration nicht unbedingt eine hohe RANKL-Expression auf. So gab es Myelompatienten mit einem Knochenmarkbefall von etwa 90%, aber ohne Osteolysen, die eine sehr niedrige RANKL-Expression zeigten (MFI 9 bis 16). Andere Patienten hingegen mit geringem Infiltrationsgrad (<30%), aber pathologischem Röntgenbefund, wiesen eine hohe RANKL-Expression durch Plasmazellen auf. Dies zeigt, dass die verstärkte Osteoklastenaktivierung nicht nur allein durch die quantitative Vermehrung der Myelomzellen im Knochenmark bedingt ist, sondern von der Stärke der RANKL-Expression abhängt.

Expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand on bone marrow plasma cells correlates with osteolytic bone disease in patients with multiple myeloma

Heider U, Langelotz C, Jakob C, Zavrski I, Fleissner C, Eucker J, Possinger K, Hofbauer LC, Sezer O.

Clin Cancer Res. 2003 Apr;9(4):1436-40.

2.1.2. Expression von RANKL mRNA in Plasmazellen von Patienten mit multiplem Myelom

Wir haben in verschiedenen Arbeiten zeigen können, dass humane Myelomzellen RANKL exprimieren [19, 20]. Der Nachweis erfolgte auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie und Immunzytologie. Unsere Ergebnisse waren in Übereinstimmung mit Befunden verschiedener Arbeitsgruppen [51, 52], wogegen es andere Autoren gab, die RANKL-Protein nicht in Myelomzellen nachweisen konnten [18, 53].

Ein Diskussionspunkt war, ob der Nachweis von RANKL auf den Plasmazellen möglicherweise auf eine sekundäre Bindung des Proteins an OPG, das wiederum an Seitenketten des durch Myelomzellen exprimierten Syndecan-1 (Synonym B-B4 oder CD138) bindet, zurückzuführen ist. Die Rationale unserer Arbeit war daher, den direkten Ursprung von RANKL aus den Myelomzellen nachzuweisen. Wir untersuchten dazu die Expression von RANKL mRNA in frisch isolierten Plasmazellen aus dem Knochenmark von Myelompatienten mit Osteolysen mit Hilfe von drei verschiedenen Primerpaaren für RANKL.

Plasmazellen exprimieren im Gegensatz zu den übrigen Zellen des Knochenmarks den Antikörper CD138, der damit ihre Identifizierung und Separierung möglich macht. Die Myelomzellen wurden daher aus dem Knochenmark mittels monoklonaler anti-CD138 Antikörper, die an magnetische Beads (CD138 MicroBeads, Miltenyi Biotec, Germany) gekoppelt sind, unter Verwendung eines CS Separators (Milteyi Biotec) isoliert. Der durchflußzytometrisch bestimmte Reinheitsgrad der so gewonnenen Myelomzellen betrug mindestens 97%.

Nach Isolierung der zellulären RNA wurde eine RT-PCR für RANKL durchgeführt, wobei jede Probe parallel mit drei verschiedenen Primerpaaren untersucht wurde. Die Osteosarkomzelllinie SaOs-2, die bekanntermaßen RANKL exprimiert, diente als Positivkontrolle [54].

RANKL mRNA konnte in 94% der Myelompatienten und in den Positivkontrollen nachgewiesen werden. Dabei lieferten alle drei Primerpaare die gleichen Ergebnisse. Wir konnten damit unsere Vorergebnisse bestätigen und auch auf RNA-Ebene nachweisen, dass Myelomzellen direkt RANKL exprimieren und die Osteoklastenaktivität stimulieren können.

Expression of receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL) mRNA in human multiple myeloma cells.

Heider U, Zavrski I, Jakob C, Bängeroth K, Fleissner C, Langelotz C, Possinger K, Hofbauer LC, Viereck V, Sezer O.

J Cancer Res Clin Oncol. 2004 Aug;130(8):469-74.

2.2. Interaktionen von Myelomzellen mit Osteoblasten

2.2.1. Stimulation der Migration und Invasion von Myelomzellen durch Osteoblasten

Als zweite Zellkomponente des Knochenmarkmikromilieus untersuchten wir die Osteoblasten und ihre Interaktionen mit Myelomzellen. Dazu verwendeten wir ein Kokultursystem aus humanen Myelomzelllinien bzw. primären, frisch isolierten Myelomzellen von Patienten, und humanen Osteoblasten. Letztere wurden mittels Auswachskulturen aus Knochenfragmenten gesunder Spender isoliert. Ihre Identifizierung erfolgte anhand von morphologischen Kriterien und der immunzytochemischen Abfärbung für alkalische Phosphatase (AP). Die Mineralisation wurde mit Hilfe von Kalzifizierungsassays (von-Kossa-Färbung) dargestellt, einem späten Differenzierungsmarker der Osteoblasten, der die Funktionalität unseres Systems bestätigte. Die Kokultur der Myelomzellen mit den Osteoblasten erfolgte unter verschiedenen Bedingungen, u.a. unter direktem Zell-Zell-Kontakt, unter räumlicher Trennung mit Hilfe von semipermeablen Membranen bzw. unter Einsatz von konditioniertem Medium.

Unter anderem untersuchten wir die Rolle der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), die eine Gruppe von Endoproteinasen darstellen und u.a. bei der Entstehung von Osteolysen, aber auch bei der Migration der Myelomzellen beteiligt sind [55].

In unseren Experimenten konnten wir zeigen, dass die Osteoblasten die Expression von MMP-1 in den Myelomzellen induzieren und außerdem zu einer Hochregulation von MMP-2, Urokinase plasminogen activator (uPA) und Hepatocyte growth factor (HGF) führen. Die Myelomzellen wiederum stimulieren die Expression von MMP-1 in den Osteoblasten. MMP-1 ist am Abbau von Kollagen beteiligt, und seine Hochregulation könnte zur myelombedingten Knochendestruktion beitragen. Die Induktion von MMP-1 in den Osteoblasten erfolgte über p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), das auch ein wichtiger Regulator der Zytokinsekretion innerhalb des Knochenmarkmikroenvironments ist [56] und das Myelomzellwachstum reguliert [57].

Außerdem konnten wir in Migrations- und Invasionsassays nachweisen, dass die Osteoblasten bzw. Osteoblasten-konditioniertes Medium die Fähigkeit der Myelomzellen zur Migration und Invasion steigern. Diese Effekte konnten durch Inhibitoren von MMPs und p38 MAPK sowie durch neutralisierende Antikörper gegen HGF aufgehoben werden.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass komplexe Wechselwirkungen zwischen Myelomzellen und Osteoblasten bestehen. Dabei stimulieren die Osteoblasten unter anderem Invasion und

Migration der Myelomzellen. Diese steigern im Gegenzug die MMP-1 Produktion in den Osteoblasten und können damit zum vermehrten Knochenabbau beitragen.

Osteoblasts promote migration and invasion of myeloma cells through upregulation of matrix metalloproteinases, urokinase plasminogen activator, hepatocyte growth factor and activation of p38 MAPK.

Hecht M, Heider U, Kaiser M, von Metzler I, Sterz J, Sezer O.

Br J Haematol. 2007 Aug;138(4):446-58

2.2.2. Expression von DKK-1 und Korrelation mit dem Knochenstoffwechsel bei Patienten mit multiplen Myelom

Der wichtigste Effekt der Myelomzellen auf Osteoblasten bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung ist eine Suppression der Differenzierung von Osteoblastenvorläufern.

Seit kurzem ist bekannt, dass Myelomzellen das Protein DKK-1 verstärkt exprimieren [33]. DKK-1 ist ein Inhibitor des Wnt/ β -catenin Signalwegs, der ein Hauptsignalweg bei der Osteoblastendifferenzierung ist. Die Rationale unserer Arbeit war, die Bedeutung dieses Proteins, das bisher hauptsächlich in Zellkulturen und Tiermodellen untersucht worden war, in einem breiten Patientenkollektiv zu analysieren und neue Informationen zur potentiellen Rolle von DKK-1 als Angriffspunkt bei der Behandlung der myelominduzierten Knochenerkrankung zu gewinnen. Dazu entwickelten wir mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen DKK-1 einen ELISA und quantifizierten die DKK-1- Konzentration im Serum bei 184 unvorbehandelten Myelompatienten. Die gemessenen Spiegel korrelierten wir mit dem Vorhandensein und dem Ausmaß der radiologisch bestimmten Knochendestruktion.

Wir konnten zunächst nachweisen, dass DKK-1 im Serum reproduzierbar messbar ist. Bemerkenswerterweise besteht keine Korrelation zwischen DKK-1 und dem Serumkreatinin, das bei Patienten mit multiplen Myelom häufig im Rahmen der Nierenbeteiligung erhöht ist und daher die Serumspiegel beeinflussen könnte.

Es zeigte sich, dass die mittleren DKK-1 Serumspiegel bei Myelompatienten signifikant höher lagen als in der Kontrollgruppe (33 Patienten mit monoklonaler Gammopathie unbestimmter Signifikanz). Außerdem korrelierte die Konzentration von DKK-1 mit dem Myelomstadium nach Durie und Salmon. Schließlich konnten wir nachweisen, dass Patienten mit Osteolysen im Röntgen des Skelettsystems signifikant mehr DKK-1 im Serum aufwiesen als Patienten mit normalem Röntgenbefund (17.915 pg/ml vs. 3.114 pg/ml), und dass Serum-DKK-1 auch mit der Anzahl der Osteolysen korrelierte.

Allerdings wurden sehr hohe DKK-1 Spiegel nur von einer begrenzten Anzahl von Patienten mit Osteolysen exprimiert. Dies legt nahe, dass Myelomzellen noch weitere Faktoren bilden, die die Osteoblastenfunktion inhibieren könnten, unter anderem sFRP-2 [58]. Eine Inhibierung von DKK-1 könnte die gestörte Osteoblastendifferenzierung wiederherstellen und ist derzeit Gegenstand weiterer Forschung.

Serum concentrations of DKK-1 correlate with the extent of bone disease in patients with multiple myeloma.

Kaiser M, Mieth M, Liebisch P, Oberländer R, Rademacher J, Jakob C, Kleeberg L, Fleissner C, Braendle E, Peters M, Stover D, Sezer O, Heider U.

Eur J Haematol. 2008 Jun;80(6):490-4.

2.2.3. Serumkonzentration von DKK-1 in verschiedenen Krankheitsstadien und unter Chemotherapie

Es gibt zunehmend Daten dafür, dass eine Inhibition von DKK-1 die Osteoblastendifferenzierung steigern und die Knochendichte verbessern könnte. So wurden bereits neutralisierende anti-DKK-1-Antikörper in SCID-rab Mäusen getestet, denen zuvor Myelomzellen implantiert worden waren [59]. Unter der Behandlung zeigte sich eine gesteigerte Knochendichte und eine vermehrte Anzahl an Osteoblasten. Der Einsatz solcher Antikörper beim Menschen muss noch evaluiert werden. So ist zum einen unklar, welche Patienten von einer Inhibition von DKK-1 am meisten profitieren würden, und in welcher Situation (First-line vs. rezidierte Erkrankung) klinische Studien durchgeführt werden sollten. Die Daten von Tian et al. hatten - bei einer beschränkten Patientenzahl - vermuten lassen, dass hohe DKK-1 Spiegel auf frühe Krankheitsstadien beschränkt sein könnten [33]. Unsere eigenen Daten an 184 Myelompatienten bestätigten dies nicht und hatten dagegen eine Korrelation der DKK-1-Expression mit der Anzahl an Osteolysen und damit der Ausbreitung der Erkrankung gezeigt. Auch gab es noch keine Daten zum Einfluss der verschiedenen therapeutischen Substanzen auf die Expression von DKK-1. Um unser Verständnis über die Rolle dieses Faktors während des Krankheitsverlaufs zu verbessern, analysierten wir DKK-1 Serumspiegel bei über 100 Myelompatienten unter verschiedenen Therapien (Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation, konventionell dosierte Therapie mit Adriamycin/ Dexamethason sowie neue Therapien wie Bortezomib, Lenalidomid oder Thalidomid) und korrelierten die Ergebnisse mit dem Krankheitsstadium (unvorbehandelt vs. rezidierte Erkrankung), Anzahl der Therapien, Therapieansprechen und Art der Therapie.

Wir konnten zeigen, dass kein Unterschied in der Höhe der prätherapeutischen DKK-1 Serumspiegel zwischen unvorbehandelten und rezidierten Patienten besteht. Es besteht auch keine Korrelation zwischen der Anzahl der Vortherapien und der Expression von DKK-1. Longitudinale Verläufe bei einigen Patienten zeigten vielmehr, dass im Rezidiv deutlich höhere DKK-1 Werte auftreten können als bei Diagnose oder vor der Erstlinientherapie, und dass die DKK-1 Expression damit nicht auf bestimmte Krankheitsstadien beschränkt ist.

Bei Patienten, die auf die Therapie ansprechen (d.h. eine komplette oder partielle Remission erreichen), kommt es zu einem Abfall von DKK-1, und zwar unabhängig von der Art der Therapie. Dies ist besonders für Patienten unter Thalidomidtherapie interessant, da beschrieben worden war, dass Thalidomid zu einer Hochregulierung von DKK-1 führen könnte [60]. Die prätherapeutischen Serumspiegel von DKK-1 waren für das Therapieansprechen nicht prädiktiv. Unsere Daten gaben

damit wichtige Informationen für die Planung klinischer Studien zur DKK-1 Inhibition beim Menschen, die vor kurzem begonnen haben.

Serum concentrations of DKK-1 decrease in patients with multiple myeloma responding to anti-myeloma treatment.

*Heider U, *Kaiser M, Mieth M, Lamottke B, Rademacher J, Jakob C, Braendle E, Stover D, Sezer O.

* both authors contributed equally to this work

Eur J Haematol. 2009 Jan;82(1):31-8.

2.3. Einfluss des Proteasominhibitors Bortezomib auf den Knochenstoffwechsel beim multiplen Myelom

2.3.1. Bortezomib steigert die Osteoblastenaktivität bei Myelompatienten

Ein weiterer Schwerpunkt unserer Forschung war der Einfluss neuer Therapien auf den Knochenstoffwechsel, wobei insbesondere der Proteasominhibitor Bortezomib eine äußerst interessante Substanz darstellt. Theoretische Überlegungen, erste publizierte präklinische Experimente [61] und Ergebnisse eigener *in vitro* Versuche legen nahe, dass durch Proteasominhibition die Osteoblastenaktivität gesteigert werden kann. Dies wäre beim multiplen Myelom von großem Interesse, da es bisher keine Möglichkeit gibt, die im Rahmen der Erkrankung unterdrückte Osteoblastenfunktion zu verbessern. Bisphosphonate, die bisher zur Behandlung der myelominduzierten Knochendestruktion eingesetzt werden, wirken sich in erster Linie auf die gesteigerte Osteoklastenaktivität aus, und es ist eine wichtige klinische Beobachtung, dass sich Osteolysen auch bei vollständiger Remission der Erkrankung oder unter einer Bisphosphonattherapie nicht zurückbilden.

Bortezomib wird beim Myelom häufig eingesetzt. Um zu untersuchen, ob es klinische Hinweise für eine Osteoblastenstimulation unter Proteasominhibition gibt, quantifizierten wir in der vorliegenden Studie verschiedene spezifische Osteoblastenmarker im Verlauf einer Therapie mit Bortezomib. Als Kontrollen dienten Myelompatienten, die eine andere Chemotherapie (Adriamycin/ Dexamethason, Melphalan/ Prednison oder Thalidomid) erhielten. Analysiert wurde die knochenspezifische alkalische Phosphatase (Knochen-AP), ein Isoenzym der alkalischen Phosphatase, das zunächst in der Plasmamembran der Osteoblasten lokalisiert ist und schließlich als dimeres Glykoprotein abgespalten und in die Zirkulation freigesetzt wird. Die Serumkonzentration der Knochen-AP spiegelt damit das Ausmaß der Osteoblastenreifung und der Knochenformation wider. Außerdem quantifizierten wir Osteocalcin, ein nicht-kollagenes Protein, welches von Osteoblasten während der Mineralisationsphase gebildet wird. Der Großteil des Proteins wird in calciumgebundener Form in die Knochenmatrix eingebaut. Der Rest gelangt aus dem Knochenmilieu in den Blutkreislauf. Dort kann er als Reflektor der Osteoblastenaktivität bestimmt werden. Patienten mit multiplem Myelom zeigen verminderte Serumspiegel von Knochen-AP und Osteocalcin, verglichen mit MGUS-Patienten oder Normalpersonen [62].

Wir konnten zeigen, dass die Behandlung mit dem Proteasominhibitor zu einem signifikanten Anstieg der Knochen-AP (von 19,7 auf 30,2 U/l) und von Osteocalcin (von 6,3 auf 10,8 µg/L) führt.

Interessanterweise stieg auch bei Patienten, die hinsichtlich ihrer Myelomparameter nicht auf Bortezomib ansprachen, die Konzentration der Knochen-AP an. Dieser Befund ist wichtig, weil er darauf hindeutet, dass die erhöhte Osteoblastenaktivität ein direkter Effekt des Proteasominhibitors ist und nicht indirekte Folge einer verminderten Tumorlast.

Im Gegensatz dazu kam es in der Kontrollgruppe, d.h. bei Patienten, die eine andere Therapie erhielten, nicht zu einer signifikanten Steigerung der Osteoblastenmarker. Das zeigt, dass der Effekt auf Osteoblasten spezifisch für den Proteasominhibitor ist und bei anderen Therapien nicht in dem Ausmaß gefunden wird.

Bortezomib increases osteoblast activity in myeloma patients irrespective of response to treatment.

Heider U, Kaiser M, Müller C, Jakob C, Zavrski I, Schulz CO, Fleissner C, Hecht M, Sezer O.
Eur J Haematol. 2006 Sep;77(3):233-8.

2.3.2. Bortezomib hemmt die Osteoklastogenese und Osteoklastenaktivität

Theoretische Überlegungen geben außerdem Hinweise darauf, dass Bortezomib den Knochenabbau durch Osteoklasten hemmen könnte. Beim Myelom kommt es zur Überexpression von RANKL, das an den transmembranären Rezeptor RANK auf Präosteoklasten und Osteoklasten bindet, und damit in den Osteoklasten Tumor necrosis factor receptor associated factors (TRAFs) aktiviert [63], die ihrerseits konsekutiv NF- κ B [64], den AP-1 Signalweg [65] sowie p38 MAPK [66] stimulieren. Hierdurch bieten sich mehrere Angriffspunkte für Bortezomib, da das Proteasom-Ubiquitin-System u.a. die Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren reguliert.

Wir etablierten ein System zur Separierung und Kultivierung von Osteoklasten aus dem peripheren Blut von gesunden Spendern. Dabei wurden CD14 positive Osteoklastenvorläufer immunomagnetisch separiert und mit M-CSF und RANKL stimuliert. Für die weiteren Versuche wurden Präosteoklasten von Tag +8 und reife Osteoklasten von Tag +21 eingesetzt. Die Identifizierung und Quantifizierung der Osteoklastenreifung erfolgte mikroskopisch (TRAP-positive multinukleäre Zellen). Zur Untersuchung der Resorptionsfähigkeit erfolgte die Kultivierung von Osteoklasten auf Dentinchips sowie die Quantifizierung der beim Abbau des Dentins entstehenden Lakunen.

Wir konnten zeigen, dass Bortezomib in subapoptischen Dosen (0,1 - 1 nM) die Osteoklastendifferenzierung und die Resorptionsaktivität reifer Osteoklasten hemmt. Um die molekularen Mechanismen dieser Hemmung weiter zu untersuchen, wurden die Zellen in verschiedenen Reifungsstadien mit Bortezomib und dem I κ B Kinase Inhibitor PS-1145, der hauptsächlich zu einer Hemmung von NF- κ B führt, inkubiert. Beide Substanzen verminderten, wie erwartet, die NF- κ B Aktivität in den Zellen. Allerdings war dieser Effekt vor allem in den reifen Osteoklasten zu sehen und weniger in den Vorläuferzellen, die nur eine schwache RANK Expression zeigen.

Zusätzlich wurde durch Bortezomib der p38 MAPK Signalweg sowohl in den Präosteoklasten als auch in den reifen Zellen gehemmt. Insgesamt zeigt sich, dass Bortezomib ein potenter Inhibitor der Osteoklastenreifung und -funktion ist. Dies bestätigen auch klinische Beobachtungen, die einen Abfall der Osteoklastenmarker Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRACP) 5b und Carboxyterminales Kollagen-I-Telopeptid (CTX) bei Myelompatienten unter Bortezomibtherapie zeigen [67].

Bortezomib inhibits human osteoclastogenesis.

von Metzler I, Krebbel H, Hecht M, Manz RA, Fleissner C, Mieth M, Kaiser M, Jakob C, Sterz J, Kleeberg L, Heider U, Sezer O.

Leukemia. 2007 Sep;21(9):2025-34

3. Diskussion

3.1. Interaktionen von Myelomzellen mit Osteoklasten und neue Therapieansätze

Die gesteigerte Knochenresorption stellt ein wesentliches klinisches Problem bei Patienten mit multiplem Myelom dar. Außerdem hat sich in den letzten Jahren zunehmend die Erkenntnis durchgesetzt, dass Interaktionen der Myelomzellen mit Zellen des Knochenmarkmikromilieus auch maßgeblich an der Progression der Erkrankung beteiligt sind. Ein genaueres Verständnis dieser Interaktionen und Eingreifen in die Wechselwirkungen ist daher zunehmend in den Mittelpunkt des Forschungsinteresses gerückt.

Wir konnten in unseren Arbeiten zeigen, dass Myelomzellen durch Produktion von spezifischen Liganden und Zytokinen mit Osteoklasten und Osteoblasten interagieren. Zum einen konnten wir auf Protein- und RNA-Ebene nachweisen, dass Myelomzellen den für die Osteoklastogenese essentiellen Faktor RANKL exprimieren. Als erste Arbeitsgruppe haben wir demonstriert, dass die Stärke der RANKL-Expression auf den Myelomzellen mit dem Vorhandensein von Osteolysen korreliert. Zusätzlich wurde durch Experimente anderer Arbeitsgruppen gezeigt, dass Plasmazellen durch Adhäsion und parakrine Stimulation auch die Expression von RANKL in Stromazellen induzieren [18]. Daraus resultiert eine erhöhte Verfügbarkeit von RANKL im Knochen. Wir konnten nachweisen, dass RANKL auch im Serum von Myelompatienten messbar ist, dort im Vergleich zu Kontrollpersonen vermehrt vorliegt und sowohl mit dem ISS-Stadium als auch mit dem Vorhandensein von Osteolysen korreliert [68].

Als Gegenspieler von RANKL hemmt OPG dessen Wirkung. Durch verschiedene Mechanismen verringern Myelomzellen die lokale Verfügbarkeit von OPG im Knochenmilieu. Zum einen vermindern sie die Sekretion von OPG durch Stromazellen und Osteoblasten [18, 53], zum anderen inaktivieren sie vorhandenes OPG, indem es an eine Seitenkette des Oberflächenmoleküls Syndecan-1 bindet, das auf Myelomzellen exprimiert wird, und dadurch internalisiert und abgebaut wird [69]. Das resultierende starke Ungleichgewicht zugunsten von RANKL führt zu einer verstärkten Aktivierung von Osteoklasten (siehe Abbildung 6) [70].

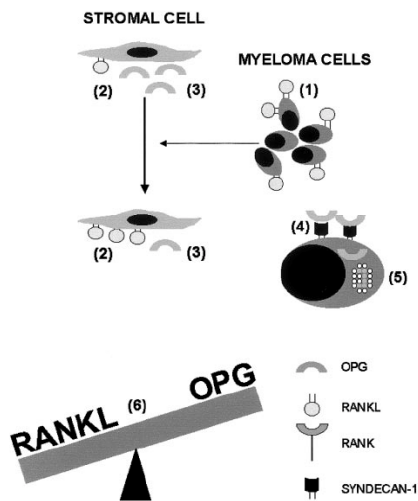


Abb. 6. Einfluss der Myelomzellen auf das RANKL-OPG System. Myelomzellen exprimieren RANKL (1) und führen zur Überexpression von RANKL durch Knochenmark-Stromazellen (2). Zusätzlich inhibieren Myelomzellen die OPG-Produktion durch Stromazellen (3). Syndecan-1 wird auf der Oberfläche von Myelomzellen exprimiert und bindet OPG (4), was zu dessen lysosomalem Abbau führt (5). Die physiologische Balance zwischen RANKL und OPG wird durch diese kombinierten Effekte verschoben (6), und die resultierende erhöhte RANKL/OPG Ratio fördert die Osteoklastenaktivierung und Entstehung von Osteolysen. (aus: Sezer Blood 2003, [70])

Mit der Beschreibung dieses Zytokinsystems wurde ein therapeutisches Ziel definiert, das zur klinischen Entwicklung von Inhibitoren gegen RANKL geführt hat. In Mausmodellen konnte zunächst gezeigt werden, dass eine Behandlung der Tiere mit rekombinantem OPG bzw. einem rekombinanten RANKL-Antikörper (RANK-Fc) die Entstehung von myelombedingten Osteolysen verhindern kann [51, 71, 72].

Erste klinische Versuche wurden mit rekombinant hergestelltem OPG (AMGN-0007) durchgeführt und zeigten sowohl bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose [73] als auch bei Patienten mit multiplem Myelom oder Knochenmetastasen bei Brustkrebs [74] einen Rückgang von Knochenresorptionsmarkern. Jedoch kam es unter Therapie zur Bildung von Antikörpern gegen OPG. Außerdem entstanden Bedenken, als entdeckt wurde, dass OPG auch andere Mitglieder der TNF-Familie binden und inaktivieren kann, u.a. den TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). Damit könnte OPG möglicherweise Tumorzellen vor der TRAIL-vermittelten Apoptose schützen und ihnen so einen Überlebensvorteil gewähren.

Es wurde daraufhin ein humaner monoklonaler IgG2-anti-RANKL-Antikörper (Denosumab) entwickelt, der mit hoher Affinität an RANKL bindet und dessen Interaktion mit RANK hemmt. Im Gegensatz zu rekombinantem OPG ist Denosumab hochselektiv und bindet nicht an andere Vertreter der TNF-Familie. Die Substanz wurde bereits in klinischen Studien an Patienten mit verschiedenen Indikationen geprüft. Erste Phase I/II Studien wurden an Personen mit multiplem Myelom bzw. Knochenmetastasen bei Mammakarzinom [75-77], Patienten mit Prostatakarzinom [78], Brustkrebspatientinnen mit Osteoporoserisiko unter antihormoneller Behandlung [79], postmenopausalen Frauen mit Osteoporose [80] und Patienten mit rheumatoider Arthritis [81] durchgeführt und zeigten eine signifikante Abnahme von Knochenabbauparametern und eine

Zunahme der Knochendichte unter Denosumab bei guter Verträglichkeit. Zwei große Phase III Studien mit 7868 bzw. 1189 postmenopausalen Frauen mit Osteoporose, denen Denosumab 60 mg subkutan alle 6 Monate appliziert wurde, zeigten ein signifikant vermindertes Frakturrisiko im Vergleich zu Placebo [82] bzw. einen höheren Knochendichtezuwachs im Vergleich zum Bisphosphonat Alendronat [83]. Eine dritte große Phase III Studie untersuchte Denosumab bei 1468 Männern mit Prostatakarzinom und unter Anti-Androgen-Behandlung und ergab einen Anstieg der Knochendichte um 5,6% unter Denosumab im Vergleich zu einer Knochendichteminderung um 1% in der Placebogruppe bei gleichzeitiger relativer Risikoreduktion der Entwicklung von Wirbelkörperfrakturen um 62% [84]. Die Zulassung der Substanz mit der angestrebten Indikation Behandlung der postmenopausalen Osteoporose bzw. Prävention der durch eine hormonablative Therapie induzierten Osteoporose bei Brust- beziehungsweise Prostatakrebs wurde beantragt und wird für 2010 erwartet. Für die Zulassung zur Prävention und Therapie der myelominduzierten Knochendestruktion (und von Knochenmetastasen anderer maligner Erkrankungen) laufen derzeit weitere klinische Studien mit einer Dosis von 120 mg Denosumab alle vier Wochen.

3.2. Interaktionen von Myelomzellen mit Osteoblasten und neue Therapieansätze

Die Myelomzellen stehen außerdem in Wechselwirkung mit den Osteoblasten, die eine zentrale Rolle im Knochenmetabolismus spielen. Wir etablierten ein funktionelles Kokultursystem aus humanen Myelomzellen und reifen Osteoblasten bzw. deren Vorläufern und konnten zeigen, dass Myelomzellen die Differenzierung von Präosteoblasten inhibieren und die Expression von Osteoblastenmarkern wie Osteocalcin und Osteopontin hemmen. In weiteren Experimenten konnten wir u.a. nachweisen, dass es durch Kokultivierung von Myelomzellen und Osteoblasten zu einem Anstieg der Expression von MMP-1 in beiden Zelltypen kommt. MMP-1 ist am Abbau der aus Kollagen bestehenden Knochenmatrix beteiligt und führt zur Bildung des Knochenabbauproduktes Carboxy-terminales Telopeptid des Typ-I-Kollagens (ICTP). ICTP kann beim multiplem Myelom vermehrt nachgewiesen werden, und unsere Arbeitsgruppe konnte u.a. zeigen, dass die Höhe der Konzentration im Serum mit dem Krankheitsstadium [85] und dem Knochenstatus [86] korreliert. Die Hochregulation von MMP-1 könnte daher zur myelombedingten Knochendestruktion beitragen. Außerdem konnten wir zeigen, dass die Osteoblasten die Fähigkeit der Myelomzellen zur Migration und Invasion steigern.

Des Weiteren untersuchten wir die Rolle von DKK-1 beim multiplen Myelom. Wie bereits in der Einleitung ausgeführt, ist DKK-1 ein Inhibitor des Wnt-Signalweges und damit der Osteoblastendifferenzierung. Eine Überexpression von DKK-1 trägt durch die verminderte Knochenneubildung maßgeblich zu einer negativen Knochenbilanz bei. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen DKK-1 dessen inhibitorische Effekte auf die Osteoblasten antagonisieren können [33].

In Vorversuchen konnten wir zunächst nachweisen, dass sowohl isolierte Plasmazellen aus dem Knochenmark von Myelompatienten als auch Myelomzelllinien das Protein DKK-1 exprimieren. Außerdem fanden wir, dass Myelompatienten im Vergleich zu Kontrollpersonen im Serum vermehrt DKK-1 aufweisen, und dass die Stärke der DKK-1 Expression sowohl mit dem Vorhandensein als auch mit dem Ausmaß der Osteolysen korreliert. Die Hemmung von DKK-1 ist damit ebenfalls ein aussichtsreicher Therapieansatz zur Behandlung der myelominduzierten Knochendestruktion, insbesondere da damit erstmals eine Substanz zur Verfügung stünde, die gezielt die Osteoblastenfunktion stimuliert und zur Knochenneubildung beitragen könnte.

Erste Versuche mit neutralisierenden Antikörpern gegen DKK-1 wurden zunächst von verschiedenen Arbeitsgruppen in Mausmodellen durchgeführt [59, 87, 88]. Dabei kam es zu einer Steigerung der Knochendichte von myelombefallenen Knochen, einer erhöhten Anzahl an Osteocalcin-exprimierenden Osteoblasten und in einem Teil der Studien auch zu einer verminderten Menge an TRAP-positiven multinukleären Osteoklasten. Es gab darüber hinaus Hinweise, dass durch Einsatz von anti-DKK-1 Antikörpern in einer Kokultur von Stromazellen und Myelomzellen das Wachstum der Tumorzellen gehemmt werden könnte, was mit einer verminderten Adhäsion zwischen Myelom- und Stromazellen sowie einer verminderten IL-6 Produktion assoziiert war [88]. Mit BHQ880, einem humanen anti-DKK-1 IgG Antikörper, wurde eine Substanz entwickelt, die zunächst in Tiermodellen, u.a in Affen getestet wurde [89] und deren Einsatz beim Menschen derzeit evaluiert wird. Bei der Planung der klinischen Studien wurde zunächst diskutiert, welche Patienten von einer Inhibition von DKK-1 am meisten profitieren würden. In unseren Untersuchungen an über 100 Myelompatienten konnten wir nachweisen, dass hohe DKK-1 Spiegel in allen Stadien der Erkrankung und unabhängig von der Art und Anzahl der Vortherapien gefunden werden können. Das ist von Bedeutung, da die Daten von Tian et al., bei einer allerdings geringen Patientenzahl, hatten vermuten lassen, dass DKK-1 nur in frühen Stadien der Erkrankung erhöht ist und möglicherweise hauptsächlich diese Patientengruppe von einer anti-DKK-1 Therapie profitieren würde.

Derzeit läuft eine aktive Phase I/II Studie bei Patienten mit rezidiviertem oder refraktärem multiplen Myelom, die BHQ880 kombiniert mit einer Standardchemotherapie (außer Bortezomib) und dem Bisphosphonat Zoledronat untersucht (www.clinicaltrials.gov, NCT00741377). Dabei werden zunächst steigende Dosen BHQ880 bis zu einem Maximum von 20 mg/kg getestet, um die maximal-tolerable Dosis (MTD) festzulegen. In der zweiten Phase werden Patienten randomisiert und erhalten zusätzlich zu ihrer Standardchemotherapie entweder BHQ880 oder Placebo. Zoledronat wird erst nach 28 Tagen dazugefügt, um Veränderungen der Knochenstoffwechselfparameter zunächst in einer bisphosphonatfreien Situation erfassen zu können. Zur Bestimmung der Wirksamkeit werden Veränderungen verschiedener Biomarker für Knochenauf- und -abbau quantifiziert. Daneben erfolgt eine Bildgebung zur radiologischen Erfassung der Knochendichteveränderungen und Osteolysen. Die Zeit bis zum Auftreten eines Knochenereignisses wird ebenfalls dokumentiert.

3.3. Einfluss der Proteasominhibition auf den Knochenstoffwechsel

Erste klinische Beobachtungen deuteten darauf hin, dass auch der Proteasominhibitor Bortezomib - neben der Wirkung auf die Myelomzellen - einen günstigen Effekt auf den Knochenstoffwechsel haben könnte.

Im Zellkulturmodell mit primären humanen Osteoklasten konnten wir erstmals zeigen, dass Bortezomib sowohl die Osteoklastendifferenzierung als auch die Resorptionsaktivität reifer Osteoklasten deutlich hemmt [90]. Die inhibitorische Wirkung von Bortezomib auf Osteoklasten wurde in weiteren Publikationen bestätigt [91, 92]. Des Weiteren beschrieben Terpos et al., dass es unter einer Therapie mit Bortezomib zu einem Abfall der Knochenresorptionsmarker TRACP 5b und CTX kommt [67] und schlussfolgerten daraus ebenfalls, dass diese Substanz zu einer Inhibierung der Osteoklastentätigkeit führt.

Unsere Arbeitsgruppe untersuchte außerdem den Verlauf von Osteoblastenmarkern unter einer Behandlung mit Bortezomib und konnte zeigen, dass es durch die Therapie zu einem Anstieg von Osteocalcin und der Knochen-AP als Zeichen einer gesteigerten Osteoblastenaktivität kommt, und zwar interessanterweise unabhängig vom Ansprechen des Myeloms auf die Behandlung. Dies ist ein wichtiger Befund, da er belegt, dass die Effekte von Bortezomib auf den Knochenstoffwechsel direkt sind, und nicht nur eine Konsequenz der Anti-Myelom-Wirkung des Proteasominhibitors.

In-vitro Experimente zum Einfluss von Proteasominhibitoren auf die Osteoblasten lieferten unterschiedliche Ergebnisse. Murray et. al berichteten, dass die Proteasominhibitoren MG-132 und Lactacystin (jeweils 5 μ M und 10 μ M) zu einer verminderten Proliferation der Osteoblasten führten [93]. Die hier eingesetzten Konzentrationen erscheinen jedoch hoch. Im Gegensatz dazu beschrieben Garrett et al. eine Stimulierung der Osteoblastenreifung, wobei hier erheblich geringere Konzentrationen (z.B. Lactacystin 0,62 - 5 μ M, MG-132 0,035 - 0,6 μ M) eingesetzt wurden [61]. Jüngste Versuche mit Bortezomib im Mausmodell zeigten ebenfalls einen Anstieg der Osteoblastenzahl und der Knochendichte unter dem Proteasominhibitor [94].

Wir konnten in unseren Zellkulturmodellen bestätigen, dass die Behandlung von Osteoblastenvorläufern mit Bortezomib zu einer gesteigerten Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Osteoblasten führt (Abbildung 7).

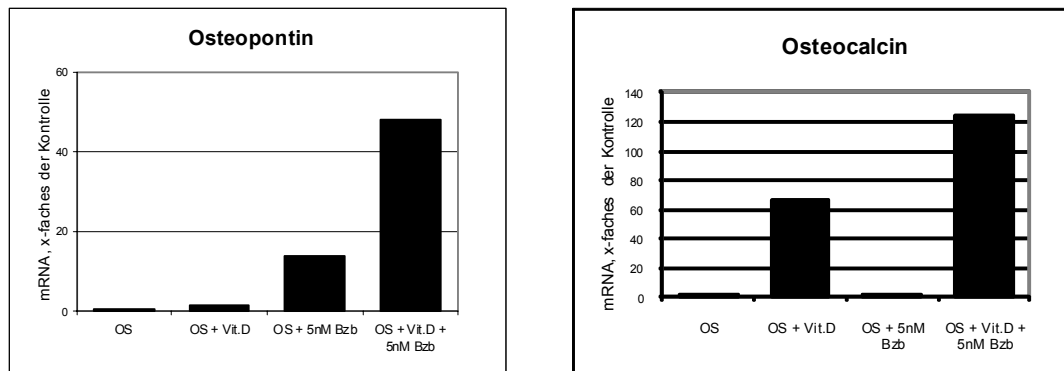


Abb. 7. Expression von Osteoblastenmarkern in mesenchymalen Stammzellen nach 4 Tagen Behandlung mit 5nM Bortezomib (Bzb). Bortezomib führt zu einer Steigerung der Osteoblastenreifung, sichtbar an der Hochregulation von Osteocalcin und Osteopontin.

Es werden verschiedene Mechanismen diskutiert, die bei der Osteoblastenstimulierung durch Bortezomib eine Rolle spielen könnten. In den Osteoblasten moduliert der Ubiquitin-Proteasom Weg u.a. die Expression von BMP-2. Garrett et al. fanden in ihren Versuchen eine erhöhte Expression von BMP-2 unter Proteasominhibitoren [61]. Auch intrazelluläres β -Catenin, das bei der Wnt-Signaltransduktion eine Rolle spielt, wird proteasomal abgebaut. Andere mögliche Erklärungen sind u.a. eine Stimulation der Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen durch die Aktivierung von Runx2/Cbfa1 [48, 95] oder eine verminderte Expression von DKK-1 durch Stromazellen nach Behandlung mit Proteasominhibitoren [96].

In unseren Versuchen fanden wir interessanterweise, dass die Kombination von Bortezomib mit Vitamin D3 synergistische stimulatorische Effekte auf die Osteoblasten hat. Während der

Osteoblastendifferenzierung wird die Transkription u.a. von Osteocalcin durch Vitamin D3 über den Vitamin D Rezeptor (VDR) Komplex stimuliert und anschließend durch Runx2 reguliert. Es liegen Daten vor, dass der VDR durch das Proteasom abgebaut wird [97], und daher Proteasominhibitoren die Expression des Vitamin D Rezeptors hochregulieren könnten. Damit gäbe es einen weiteren Mechanismus, über den Proteasominhibitoren die Osteoblastenaktivität beeinflussen und den wir in laufenden Experimenten derzeit untersuchen. Die daraus gewonnenen Informationen wären insofern von Bedeutung, als dass beim Myelom ein Vitamin D Mangel von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben wurde [98, 99], der sich dann auf den knochenaufbauenden Effekt von Bortezomib negativ auswirken könnte.

Insgesamt zeigen die verschiedenen Experimente und klinischen Beobachtungen, dass Bortezomib über mehrere Angriffspunkte den Knochenstoffwechsel bei Myelompatienten günstig beeinflusst, die Entstehung von Osteolysen mindert und potentiell sogar die Knochenneubildung fördern könnte. Dies stellt einen wesentlichen Vorteil gegenüber den bisherigen konventionellen Chemotherapien dar und lässt die Substanz insbesondere bei solchen Patienten interessant erscheinen, die einen ausgeprägten Knochenbefall aufweisen.

Abbildung 8 zeigt eine Zusammenfassung der Interaktionen zwischen Myelomzellen und Zellen des Knochenmikroenvironments und neue Interventionsmöglichkeiten.

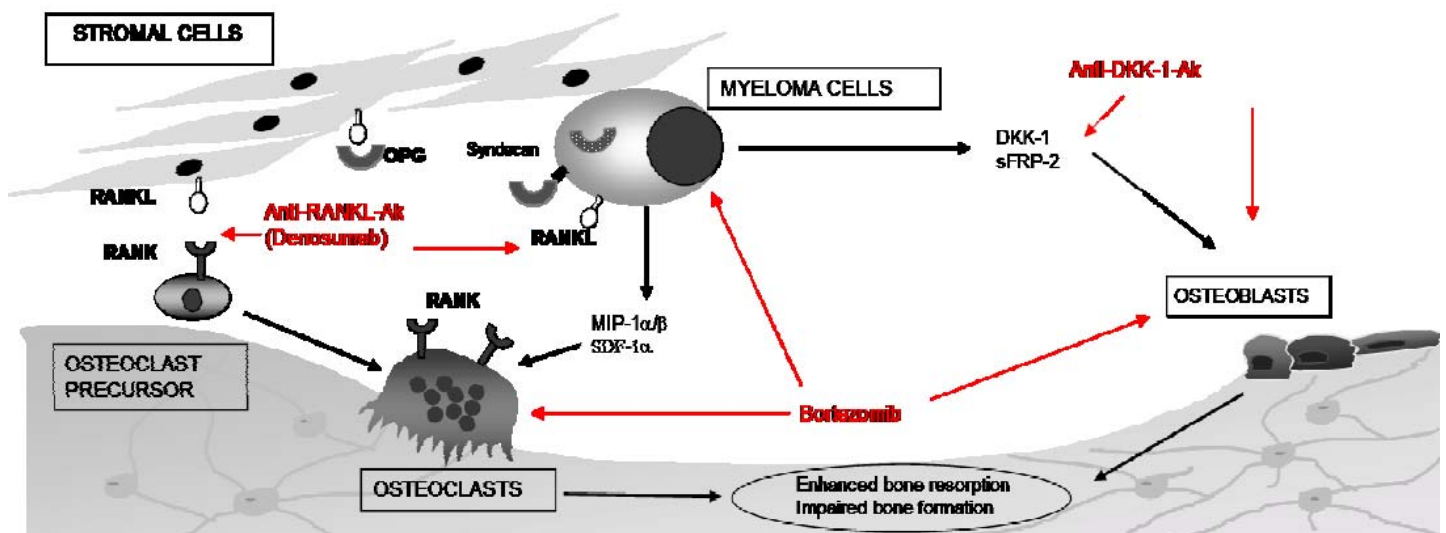


Abb. 8 Zusammenfassung der Interaktionen zwischen Myelomzellen, Osteoklasten und Osteoblasten und Interventionsmöglichkeiten durch neue Substanzen (nach: Heider Eur J Cancer 2006 [10])

4. Zusammenfassung

Komplexe Interaktionen zwischen Myelomzellen und Zellen des Knochenmarkmikromilieus führen zu einer Entkopplung der Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität mit einem gesteigerten Knochenabbau und Auftreten von Osteolysen.

Wir konnten zum einen zeigen, dass Myelomzellen RANKL exprimieren, den stärksten Aktivator der Osteoklasten, und dass die Stärke der RANKL Expression mit der Ausprägung der Knochendestruktion korreliert. Die Myelomzellen stimulieren außerdem die Bildung von RANKL durch Stromazellen und führen zum Abbau des RANKL-Antagonisten OPG. Es resultiert eine gesteigerte Osteoklastenaktivierung mit vermehrtem Knochenabbau.

Zum anderen haben wir nachweisen können, dass Myelomzellen das Protein DKK-1 sezernieren. DKK-1 ist ein Inhibitor des Wnt/ β Catenin-Signalweges, der wiederum essentiell für die Osteoblastendifferenzierung ist. Unsere Untersuchungen zeigten, dass DKK-1 bei Myelompatienten vermehrt im Serum nachweisbar ist, und dass die Stärke der Expression mit dem Vorhandensein von Osteolysen korreliert.

Die Kombination dieser Wechselwirkungen führt zu einem vermehrten Knochenabbau ohne adäquate Knochenneubildung. Im Gegenzug stimulieren die Zellen des Mikroenvironments die Proliferation und das Überleben von Myelomzellen sowie deren Migrations- und Invasionsfähigkeit. Auf der Basis dieser Daten wurden verschiedene Therapieansätze zur Behandlung der myelominduzierten Knochendestruktion entwickelt. Am weitesten fortgeschritten ist die Entwicklung eines rekombinanten Antikörpers gegen RANKL (Denosumab), der derzeit in Phase III Studien getestet wird und vor der Zulassung zur Behandlung der postmenopausalen Osteoporose bzw. Prävention der durch eine hormonablativ Therapie induzierten Osteoporose bei Brust- beziehungsweise Prostatakrebs steht. Aktuelle Studien, die zur Zulassung des Antikörpers beim multiplen Myelom führen sollen, laufen derzeit.

Die Hemmung von DKK-1 ist ein weiterer aussichtsreicher Therapieansatz zur Behandlung der myelominduzierten Knochendestruktion und bietet erstmals die Möglichkeit, auch direkt auf die Osteoblastenfunktion Einfluss zu nehmen. Aktuell aktiv ist eine Phase I/ II-Studie mit BHQ880, einem humanen anti-DKK-1 Antikörper bei rezidivierten oder refraktären Myelompatienten.

Eine Substanz, die den gesteigerten Knochenabbau beim Myelom günstig beeinflussen könnte und bei der Behandlung des Myeloms bereits eingesetzt wird, ist der Proteasominhibitor Bortezomib. Wir konnten zeigen, dass Bortezomib einerseits die Reifung und Aktivität von Osteoklasten hemmt und andererseits die Differenzierung und Funktion von Osteoblasten stimuliert.

Damit konnten neue Pathomechanismen zur Genese der Knochendestruktion beim multiplen Myelom identifiziert werden, die zur Entwicklung vielversprechender Therapieansätze der myelombedingten Knochendestruktion geführt haben und noch führen werden.

5 Literaturverzeichnis

1. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003;121(5):749-57.
2. Durie BG, Salmon SE (1975). "A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival". *Cancer* 1975;36(3):842-54.
3. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin J. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2005;23(15):3412-20.
4. Bataille R, Chappard D, Marcelli C, Dessauw P, Baldet P, Sany J, Alexandre C. Recruitment of new osteoblasts and osteoclasts is the earliest critical event in the pathogenesis of human multiple myeloma. *J Clin Invest*. 1991;88(1):62-6.
5. Heider U, Hofbauer LC, Zavrski I, Kaiser M, Jakob C, Sezer O. Novel aspects of osteoclast activation and osteoblast inhibition in myeloma bone disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;338(2):687-93. Review.
6. Libouban H, Moreau MF, Baslé MF, Bataille R, Chappard D. Increased bone remodeling due to ovariectomy dramatically increases tumoral growth in the 5T2 multiple myeloma mouse model. *Bone*. 2003;33(3):283-92.
7. Valentin-Opran A, Charhon SA, Meunier PJ, Edouard CM, Arlot ME. Quantitative histology of myeloma-induced bone changes. *Br J Haematol*. 1982;52(4):601-10.
8. Yaccoby S, Wezeman MJ, Henderson A, Cottler-Fox M, Yi Q, Barlogie B, Epstein J. Cancer and the microenvironment: myeloma-osteoclast interactions as a model. *Cancer Res*. 2004;64(6):2016-23.
9. Roodman GD. Biology of osteoclast activation in cancer. *J Clin Oncol*. 2001;19(15):3562-71. Review
10. Heider U, Fleissner C, Zavrski I, Kaiser M, Hecht M, Jakob C, Sezer O. Bone markers in multiple myeloma. *Eur J Cancer*. 2006;42(11):1544-53. Review.
11. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 1997;390(6656):175-9.
12. Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93(2):165-76.

13. Hsu H, Lacey DL, Dunstan CR, Solovyev I, Colombero A, Timms E, Tan HL, Elliott G, Kelley MJ, Sarosi I, Wang L, Xia XZ, Elliott R, Chiu L, Black T, Scully S, Capparelli C, Morony S, Shimamoto G, Bass MB, Boyle WJ. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(7):3540-5.
14. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Lüthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 1997;89(2):309-19
15. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 1999;397(6717):315-23.
16. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, Scully S, Tan HL, Xu W, Lacey DL, Boyle WJ, Simonet WS. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev*. 1998;12(9):1260-8.
17. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res*. 2000;15(1):2-12. Review.
18. Pearce RN, Sordillo EM, Yaccoby S, Wong BR, Liau DF, Colman N, Michaeli J, Epstein J, Choi Y. Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to stimulate bone destruction and promote tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:11581-11586.
19. Sezer O, Heider U, Jakob C, Eucker J, Possinger K. Human bone marrow myeloma cells express RANKL. *J Clin Oncol*. 2002;20:353-354.
20. Sezer O, Heider U, Jakob C, Zavrski I, Eucker J, Possinger K, Sers C, Krenn V. Immunocytochemistry reveals RANKL expression of myeloma cells. *Blood*. 2002;99:4646-4647.
21. Choi SJ, Cruz JC, Craig F, Chung H, Devlin RD, Roodman GD, Alsina M. Macrophage inflammatory protein-1alpha is a potential osteoclast stimulatory factor in multiple myeloma. *Blood*. 2000;96:671-675.
22. Abe M, Hiura K, Wilde J, Moriyama K, Hashimoto T, Ozaki S, Wakatsuki S, Kosaka M, Kido S, Inoue D, Matsumoto T. Role for macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Blood*. 2002;100:2195-2202.
23. Zannettino AC, Farrugia AN, Kortessidis A, Manavis J, To LB, Martin SK, Diamond P, Tamamura H, Lapidot T, Fujii N, Gronthos S. Elevated serum levels of stromal-derived

- factor-1alpha are associated with increased osteoclast activity and osteolytic bone disease in multiple myeloma patients. *Cancer Res.* 2005;65(5):1700-9.
24. Oyajobi BO, Franchin G, Williams PJ, Pulkrabek D, Gupta A, Munoz S, Grubbs B, Zhao M, Chen D, Sherry B, Mundy GR. Dual effects of macrophage inflammatory protein-1alpha on osteolysis and tumor burden in the murine 5TGM1 model of myeloma bone disease. *Blood.* 2003;102(1):311-9.
 25. Carlson K, Ljunghall S, Simonsson B, Smedmyr B. Serum osteocalcin concentrations in patients with multiple myeloma – correlation with disease stage and survival. *J Intern Med* 1992;231:133–137.
 26. Karadag A, Scutt AM, Croucher PI. Human myeloma cells promote the recruitment of osteoblast precursors: mediation by interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor. *J Bone Miner Res.* 2000;15(10):1935-43.
 27. Giuliani N, Colla S, Morandi F, Lazzaretti M, Sala R, Bonomini S, Grano M, Colucci S, Svaldi M, Rizzoli V. Myeloma cells block RUNX2/CBFA1 activity in human bone marrow osteoblast progenitors and inhibit osteoblast formation and differentiation. *Blood.* 2005;106(7):2472-83.
 28. Westendorf JJ, Kahler RA, Schroeder TM. Wnt signaling in osteoblasts and bone diseases, *Gene.* 2004;341:19–39.
 29. Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci* 2003;116:2627–34.
 30. Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GCM, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Lees Halhida M, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Jüppner H, Kim CA, Keppeler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* 2001;107:513–23.
 31. Little RD, Carulli JP, Del Mastro RG, Dupuis J, Osborne M, Folz C, Manning SP, Swain PM, Zhao SC, Eustace B, Lappe MM, Spitzer L, Zweier S, Braunschweiger K, Benchekroun Y, Hu X, Adair R, Chee L, FitzGerald MG, Tulig C, Caruso A, Tzellas N, Bawa A, Franklin B, McGuire S, Nogue X, Gong G, Allen KM, Anisowicz A, Morales AJ, Lomedico PT, Recker SM, Van Eerdewegh P, Recker RR, Johnson ML. A mutation in the LDL receptor-related protein 5 gene results in the autosomal dominant high-bone-mass trait. *Am J Hum Genet.* 2002;70(1):11-9.
 32. Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med.* 2002;346(20):1513-21.

33. Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med* 2003;349:2483–94.
34. Heider, U., Kaiser, M., Mieth, M., Lamottke, B., Rademacher, J., Jakob, C., Sezer, O. Serum concentrations of DKK-1 decrease in patients with multiple myeloma responding to therapies with bortezomib, thalidomide, lenalidomide or autologous stem cell transplantation. *Onkologie* 2008;31(suppl 4). S 180, V520
35. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, Casassus P, Maisonneuve H, Facon T, Ifrah N, Payen C, Bataille R. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Français du Myélome. *N Engl J Med*. 1996;335(2):91-7.
36. Alexanian R, Haut A, Khan AU, Lane M, McKelvey EM, Migliore PJ, Stuckey WJ Jr, Wilson HE. Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *JAMA*. 1969;208(9):1680-5.
37. Berenson JR, Lichtenstein A, Porter L, Dimopoulos MA, Bordoni R, George S, Lipton A, Keller A, Ballester O, Kovacs M, Blacklock H, Bell R, Simeone JF, Reitsma DJ, Heffernan M, Seaman J, Knight RD. Long-term pamidronate treatment of advanced multiple myeloma patients reduces skeletal events. Myeloma Aredia Study Group. *J Clin Oncol*. 1998;16(2):593-602.
38. Berenson JR, Lichtenstein A, Porter L, Dimopoulos MA, Bordoni R, George S, Lipton A, Keller A, Ballester O, Kovacs MJ, Blacklock HA, Bell R, Simeone J, Reitsma DJ, Heffernan M, Seaman J, Knight RD. Efficacy of pamidronate in reducing skeletal events in patients with advanced multiple myeloma. Myeloma Aredia Study Group. *N Engl J Med*. 1996;334(8):488-93.
39. Hershko A, Ciechanover A, Varshavsky A. Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. *Nat Med*. 2000;6(10):1073-81.
40. Naujokat C, Sezer O, Zinke H, Leclere A, Hauptmann S, Possinger K. Proteasome inhibitors induced caspase-dependent apoptosis and accumulation of p21WAF1/Cip1 in human immature leukemic cells. *Eur J Haematol*. 2000;65(4):221-36.
41. Zavrski I, Naujokat C, Niemoller K, Jakob C, Heider U, Langelotz C, Fleissner C, Eucker J, Possinger K, Sezer O. Proteasome inhibitors induce growth inhibition and apoptosis in myeloma cell lines and in human bone marrow myeloma cells irrespective of chromosome 13 deletion. *J Cancer Res Clin Oncol* 2003;129:383–391.
42. Heider U, Rademacher J, Lamottke B, Mieth M, Moebs M, von Metzler I, Assaf C, Sezer O. Synergistic interaction of the histone deacetylase inhibitor SAHA with the proteasome inhibitor bortezomib in cutaneous T cell lymphoma. *Eur J Haematol*. 2009;82(6):440-9.
43. Heider U, von Metzler I, Kaiser M, Rosche M, Sterz J, Rötzer S, Rademacher J, Jakob C, Fleissner C, Kuckelkorn U, Kloetzel PM, Sezer O. Synergistic interaction of the histone

- deacetylase inhibitor SAHA with the proteasome inhibitor bortezomib in mantle cell lymphoma. *Eur J Haematol.* 2008;80(2):133-42.
44. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, Harousseau JL, Ben-Yehuda D, Lonial S, Goldschmidt H, Reece D, San-Miguel JF, Bladé J, Boccadoro M, Cavenagh J, Dalton WS, Boral AL, Esseltine DL, Porter JB, Schenkein D, Anderson KC; Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions (APEX) Investigators. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2005;352(24):2487-98.
 45. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, Spicka I, Petrucci MT, Palumbo A, Samoiloova OS, Dmoszynska A, Abdulkadyrov KM, Schots R, Jiang B, Mateos MV, Anderson KC, Esseltine DL, Liu K, Cakana A, van de Velde H, Richardson PG; VISTA Trial Investigators. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2008;359(9):906-17.
 46. Mitsiades CS, Mitsiades N, Poulaki V, Schlossman R, Akiyama M, Chauhan D, Hideshima T, Treon SP, Munshi NC, Richardson PG, Anderson KC. Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Oncogene.* 2002;21(37):5673-83.
 47. Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, Mitsiades C, Mitsiades N, Hayashi T, Munshi N, Dang L, Castro A, Palombella V, Adams J, Anderson KC. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem.* 2002;277(19):16639-47.
 48. Bellido T, Ali AA, Plotkin LI, Fu Q, Gubrij I, Roberson PK, Weinstein RS, O'Brien CA, Manolagas SC, Jilka RL. Proteasomal degradation of Runx2 shortens parathyroid hormone-induced anti-apoptotic signaling in osteoblasts. A putative explanation for why intermittent administration is needed for bone anabolism. *J Biol Chem* 2003;278:50259–50272.
 49. Sezer O, Heider U, Zavrski I, Possinger K. Differentiation of monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma using flow cytometric characteristics of plasma cells. *Haematologica.* 2001;86(8):837-43.
 50. Lisignoli G, Cristino S, Toneguzzi S, Grassi F, Piacentini A, Cavallo C, Facchini A, Mariani E. IL1beta and TNFalpha differently modulate CXCL13 chemokine in stromal cells and osteoblasts isolated from osteoarthritis patients: evidence of changes associated to cell maturation. *Exp Gerontol.* 2004;39(4):659-65.
 51. Croucher PI, Shipman CM, Lippitt J, Perry M, Asosingh K, Hijzen A, Brabbs AC, van Beek EJ, Holen I, Skerry TM, Dunstan CR, Russell GR, Van Camp B, Vanderkerken K. Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood* 2001;98:3534–3540
 52. Mitsiades CS, Mitsiades N, Poulaki V, Hayashi T, Hideshima T, Podar K, LeBlanc R, Catley L, Tai Y, Chauhan D, Lin B, Schlossman R, Richardson PG, Munshi N, Treon SP, Anderson KC. Receptor activator of nuclear factor-kB (RANK) ligand expression in human multiple myeloma cells. *Blood* 2001;98[Suppl 1]:638

53. Giuliani N, Bataille R, Mancini C, Lazzaretti M, Barille S. Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/ osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood* 2001;98:3527–3533
54. Kinpara K, Mogi M, Kuzushima M, Togari A. Osteoclast differentiation factor in human osteosarcoma cell line. *J Immunoassay*. 2000;21(4):327-40.
55. Kelly T, Børset M, Abe E, Gaddy-Kurten D, Sanderson RD. Matrix metalloproteinases in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2000;37(3-4):273-81. Review.
56. Hideshima T, Akiyama M, Hayashi T, Richardson P, Schlossman R, Chauhan D, Anderson KC. Targeting p38 MAPK inhibits multiple myeloma cell growth in the bone marrow milieu. *Blood*. 2003;101(2):703-5
57. Nguyen AN, Stebbins EG, Henson M, O'Young G, Choi SJ, Quon D, Damm D, Reddy M, Ma JY, Haghazari E, Kapoun AM, Medicherla S, Protter A, Schreiner GF, Kurihara N, Anderson J, Roodman GD, Navas TA, Higgins LS. Normalizing the bone marrow microenvironment with p38 inhibitor reduces multiple myeloma cell proliferation and adhesion and suppresses osteoclast formation. *Exp Cell Res*. 2006;312(10):1909-23.
58. Oshima T, Abe M, Asano J, Hara T, Kitazoe K, Sekimoto E, Tanaka Y, Shibata H, Hashimoto T, Ozaki S, Kido S, Inoue D, Matsumoto T. Myeloma cells suppress bone formation by secreting a soluble Wnt inhibitor, sFRP-2. *Blood*. 2005;106(9):3160-5.
59. Yaccoby S, Ling W, Zhan F, Walker R, Barlogie B, Shaughnessy JD Jr. Antibody-based inhibition of DKK1 suppresses tumor-induced bone resorption and multiple myeloma growth in vivo. *Blood* 2007;109:2106–11.
60. Knobloch J, Shaughnessy JD Jr, Ruther U. Thalidomide induces limb deformities by perturbing the Bmp/Dkk1/Wnt signaling pathway. *FASEB J* 2007;21:1410–21.
61. Garrett IR, Chen D, Gutierrez G, Zhao M, Escobedo A, Rossini G, Harris SE, Gallwitz W, Kim KB, Hu S, Crews CM, Mundy GR. Selective inhibitors of the osteoblast proteasome stimulate bone formation in vivo and in vitro. *J Clin Invest*. 2003;111(11):1771-82.
62. Corso A, Arcaini L, Mangiacavalli S, Astori C, Orlandi E, Lorenzi A, Passamonti F, Klersy C, Pascutto C, Canevari-Sciorati A, Lazzarino M. Biochemical markers of bone disease in asymptomatic early stage multiple myeloma. A study on their role in identifying high risk patients. *Haematologica*. 2001;86(4):394-8.
63. Lomaga MA, Yeh WC, Sarosi I, Duncan GS, Furlonger C, Ho A, Morony S, Capparelli C, Van G, Kaufman S, van der Heiden A, Itie A, Wakeham A, Khoo W, Sasaki T, Cao Z, Penninger JM, Paige CJ, Lacey DL, Dunstan CR, Boyle WJ, Goeddel DV, Mak TW. TRAF6 deficiency results in osteopetrosis and defective interleukin-1, CD40, and LPS signaling. *Genes Dev*. 1999;13(8):1015-24.
64. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 2003; 423: 337–342.

65. Grigoriadis AE, Wang ZQ, Cecchini MG, Hofstetter W, Felix R, Fleisch HA, Wagner EF. c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling. *Science*. 1994;266(5184):443-8.
66. Li X, Udagawa N, Takami M, Sato N, Kobayashi Y, Takahashi N. p38 Mitogen-activated protein kinase is crucially involved in osteoclast differentiation but not in cytokine production, phagocytosis, or dendritic cell differentiation of bone marrow macrophages. *Endocrinology* 2003; 144: 4999–5005.
67. Terpos E, Heath DJ, Rahemtulla A, Zervas K, Chantry A, Anagnostopoulos A, Pouli A, Katodritou E, Verrou E, Vervessou EC, Dimopoulos MA, Croucher PI. Bortezomib reduces serum dickkopf-1 and receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand concentrations and normalises indices of bone remodelling in patients with relapsed multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2006;135(5):688-92.
68. Jakob C, Goerke A, Terpos E, Sterz J, Heider U, Kühnhardt D, Ziefle S, Kleeberg L, Mieth M, Metzler I, Müller C, Sezer O. Serum levels of total-RANKL in multiple myeloma. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2009;9(6):430-5.
69. Standal T, Seidel C, Hjertner Ø, Plesner T, Sanderson RD, Waage A, Borset M, Sundan A. Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood*. 2002;100(8):3002-7.
70. Sezer O, Heider U, Zavrski I, Kühne CA, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone disease. *Blood*. 2003;101(6):2094-8.
71. Vanderkerken K, De Leenheer E, Shipman C, Asosingh K, Willems A, Van Camp B, Croucher P. Recombinant osteoprotegerin decreases tumor burden and increases survival in a murine model of multiple myeloma. *Cancer Res*. 2003;63(2):287-9.
72. Sordillo EM, Pearse RN. RANK-Fc: a therapeutic antagonist for RANK-L in myeloma. *Cancer*. 2003;97(3 Suppl):802-12. Review
73. Bekker PJ, Holloway D, Nakanishi A, Arrighi M, Leese PT, Dunstan CR. The effect of a single dose of osteoprotegerin in postmenopausal women. *J Bone Miner Res*. 2001;16(2):348-60.
74. Body JJ, Greipp P, Coleman RE, Facon T, Geurs F, Femand JP, Harousseau JL, Lipton A, Mariette X, Williams CD, Nakanishi A, Holloway D, Martin SW, Dunstan CR, Bekker PJ. A phase I study of AMG-007, a recombinant osteoprotegerin construct, in patients with multiple myeloma or breast carcinoma related bone metastases. *Cancer*. 2003;97(3 Suppl):887-92.
75. Body JJ, Facon T, Coleman RE, Lipton A, Geurs F, Fan M, Holloway D, Peterson MC, Bekker PJ. A study of the biological receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand inhibitor, denosumab, in patients with multiple myeloma or bone metastases from breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12(4):1221-8.

76. Vij R, Horvath N, Spencer A, Taylor K, Vadhan-Raj S, Vescio R, Smith J, Qian Y, Yeh H, Jun S. An open-label, phase 2 trial of denosumab in the treatment of relapsed or plateau-phase multiple myeloma. *Am J Hematol.* 2009;84(10):650-6.
77. Lipton A, Steger GG, Figueroa J, Alvarado C, Solal-Celigny P, Body JJ, de Boer R, Berardi R, Gascon P, Tonkin KS, Coleman R, Paterson AH, Peterson MC, Fan M, Kinsey A, Jun S. Randomized active-controlled phase II study of denosumab efficacy and safety in patients with breast cancer-related bone metastases. *J Clin Oncol.* 2007;25(28):4431-7.
78. Fizazi K, Bosserman L, Gao G, Skacel T, Markus R. Denosumab treatment of prostate cancer with bone metastases and increased urine N-telopeptide levels after therapy with intravenous bisphosphonates: results of a randomized phase II trial. *J Urol.* 2009;182(2):509-15
79. Ellis GK, Bone HG, Chlebowski R, Paul D, Spadafora S, Smith J, Fan M, Jun S. Randomized trial of denosumab in patients receiving adjuvant aromatase inhibitors for nonmetastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(30):4875-82.
80. Lewiecki EM, Miller PD, McClung MR, Cohen SB, Bolognese MA, Liu Y, Wang A, Siddhanti S, Fitzpatrick LA; AMG 162 Bone Loss Study Group. Two-year treatment with denosumab (AMG 162) in a randomized phase 2 study of postmenopausal women with low BMD. *J Bone Miner Res.* 2007;22(12):1832-41.
81. Cohen SB, Dore RK, Lane NE, Ory PA, Peterfy CG, Sharp JT, van der Heijde D, Zhou L, Tsuji W, Newmark R; Denosumab Rheumatoid Arthritis Study Group. Denosumab treatment effects on structural damage, bone mineral density, and bone turnover in rheumatoid arthritis: a twelve-month, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II clinical trial. *Arthritis Rheum.* 2008;58(5):1299-309.
82. Cummings SR, San Martin J, McClung MR, Siris ES, Eastell R, Reid IR, Delmas P, Zoog HB, Austin M, Wang A, Kutilek S, Adami S, Zanchetta J, Libanati C, Siddhanti S, Christiansen C; FREEDOM Trial. Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med.* 2009;361(8):756-65. Erratum in: *N Engl J Med.* 2009;361(19):1914.
83. Brown JP, Prince RL, Deal C, Recker RR, Kiel DP, de Gregorio LH, Hadji P, Hofbauer LC, Alvaro-Gracia JM, Wang H, Austin M, Wagman RB, Newmark R, Libanati C, San Martin J, Bone HG. Comparison of the effect of denosumab and alendronate on BMD and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with low bone mass: a randomized, blinded, phase 3 trial. *J Bone Miner Res.* 2009;24(1):153-61
84. Smith MR, Egerdie B, Hernández Toriz N, Feldman R, Tammela TL, Saad F, Heracek J, Szwedowski M, Ke C, Kupic A, Leder BZ, Goessl C; Denosumab HALT Prostate Cancer Study Group. Denosumab in men receiving androgen-deprivation therapy for prostate cancer. *N Engl J Med.* 2009;361(8):745-55.
85. Jakob C, Zavrski I, Heider U, Brux B, Eucker J, Langelotz C, Sinha P, Possinger K, Sezer O. Bone resorption parameters [carboxy-terminal telopeptide of type-I collagen (ICTP), amino-

- terminal collagen type-I telopeptide (NTx), and deoxypyridinoline (Dpd)] in MGUS and multiple myeloma. *Eur J Haematol.* 2002;69(1):37-42.
86. Jakob C, Zavrski I, Heider U, Bollow M, Schulz CO, Fleissner C, Eucker J, Michael R, Hamm B, Possinger K, Sezer O. Serum levels of carboxy-terminal telopeptide of type-I collagen are elevated in patients with multiple myeloma showing skeletal manifestations in magnetic resonance imaging but lacking lytic bone lesions in conventional radiography. *Clin Cancer Res.* 2003;9(8):3047-51.
 87. Heath DJ, Chantry AD, Buckle CH, Coulton L, Shaughnessy JD Jr, Evans HR, Snowden JA, Stover DR, Vanderkerken K, Croucher PI. Inhibiting Dickkopf-1 (Dkk1) removes suppression of bone formation and prevents the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *J Bone Miner Res.* 2009;24(3):425-36.
 88. Fulciniti M, Tassone P, Hideshima T, Vallet S, Nanjappa P, Ettenberg SA, Shen Z, Patel N, Tai YT, Chauhan D, Mitsiades C, Prabhala R, Raje N, Anderson KC, Stover DR, Munshi NC. Anti-DKK1 mAb (BHQ880) as a potential therapeutic agent for multiple myeloma. *Blood.* 2009;114(2):371-9.
 89. Betts AM, Clark TH, Yang J, Treadway JL, Li M, Giovanelli MA, Abdiche Y, Stone DM, Paralkar VM. The Application of Target Information and Preclinical Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling in Predicting Clinical Doses of a Dickkopf-1 Antibody for Osteoporosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010 Jan 20. [Epub ahead of print]
 90. von Metzler I, Krebbel H, Hecht M, Manz RA, Fleissner C, Mieth M, Kaiser M, Jakob C, Sterz J, Kleeberg L, Heider U, Sezer O. Bortezomib inhibits human osteoclastogenesis. *Leukemia.* 2007 Sep;21(9):2025-34.
 91. Boissy P, Andersen TL, Lund T, Kupisiewicz K, Plesner T, Delaissé JM. Pulse treatment with the proteasome inhibitor bortezomib inhibits osteoclast resorptive activity in clinically relevant conditions. *Leuk Res.* 2008;32(11):1661-8.
 92. Hongming H, Jian H. Bortezomib inhibits maturation and function of osteoclasts from PBMCs of patients with multiple myeloma by downregulating TRAF6. *Leuk Res.* 2009;33(1):115-22.
 93. Murray EJ, Bentley GV, Grisanti MS, Murray SS. The ubiquitin-proteasome system and cellular proliferation and regulation in osteoblastic cells. *Exp Cell Res.* 1998;242(2):460-9.
 94. Pennisi A, Li X, Ling W, Khan S, Zangari M, Yaccoby S. The proteasome inhibitor, bortezomib suppresses primary myeloma and stimulates bone formation in myelomatous and nonmyelomatous bones in vivo. *Am J Hematol.* 2009;84(1):6-14.
 95. Giuliani N, Morandi F, Tagliaferri S, Lazzaretti M, Bonomini S, Crugnola M, Mancini C, Martella E, Ferrari L, Tabilio A, Rizzoli V. The proteasome inhibitor bortezomib affects osteoblast differentiation in vitro and in vivo in multiple myeloma patients. *Blood.* 2007;110(1):334-8.

96. Oyajobi BO, Garrett IR, Gupta A, Flores A, Esparza J, Muñoz S, Zhao M, Mundy GR. Stimulation of new bone formation by the proteasome inhibitor, bortezomib: implications for myeloma bone disease. *Br J Haematol.* 2007;139(3):434-8.
97. Masuyama H, MacDonald PN. Proteasome-mediated degradation of the vitamin D receptor (VDR) and a putative role for SUG1 interaction with the AF-2 domain of VDR. *J Cell Biochem.* 1998;71(3):429-40.
98. Badros A, Goloubeva O, Terpos E, Milliron T, Baer MR, Streeten E. Prevalence and significance of vitamin D deficiency in multiple myeloma patients. *Br J Haematol.* 2008;142(3):492-4.
99. Ng AC, Kumar SK, Rajkumar SV, Drake MT. Impact of vitamin D deficiency on the clinical presentation and prognosis of patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Am J Hematol.* 2009;84(7):397-400

6 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Orhan Sezer, der meine gesamte klinische und wissenschaftliche Entwicklung stets wohlwollend und in einmaliger Form gefördert hat. Diese Habilitationsschrift wäre ohne seine Hilfe nicht möglich gewesen.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Eckhard Thiel, Direktor der Medizinischen Klinik III m.S. Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin Charite CBF, für die Unterstützung meiner wissenschaftlichen Projekte und klinischen Tätigkeit.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. K. Possinger, Direktor der Medizinischen m.S. Onkologie und Hämatologie CCM, an dessen Klinik ich meine Ausbildung zum Facharzt für Innere Medizin und zur Schwerpunktbezeichnung Hämatologie und internistische Onkologie absolvierte und dort den Einstieg in die medizinische Forschung erlangte.

Die vorliegenden Arbeiten wären nicht möglich geworden ohne exzellente Kollegen und Mitarbeiter der Klinik. Um nur einige – in alphabetischer Reihenfolge - zu nennen:

Dr. Claudia Fleissner, Dr. Monica Hecht, Dr. Christian Jakob, Dr. Martin Kaiser, Helga Kämmer, Dr. Holger Krebbel, Karin Marquardt, Dr. Ivana v. Metzler, Dr. Maren Mieth, Dr. Jessica Rademacher, Dr. Jan Sterz.

Sehr viel zu verdanken habe ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die meine Arbeiten stets motivierend begleitet haben.

Für die finanzielle Unterstützung meiner Forschungsarbeit danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charite

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde.
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/ Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Datum

Unterschrift