

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie
und Tumorimmunologie am Campus Benjamin Franklin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Etablierung einer Mikrowell-Technologie zur Testung der Sus-
zeptibilität von Myelomzellen auf Therapeutika sowie auf die
Abhängigkeit von Zell-Zell-Interaktionen

Establishment of a microwell-based technology for testing the
susceptibility of myeloma cells to therapeutics and their de-
pendence on cell-cell-interaction

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Josefine Krüger

Datum der Promotion:30.11.2023.....

Vorwort

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden im Rahmen der Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie 2021 als freier Vortrag präsentiert:

Krüger J. , Blau I.-W. , Blau O. , Keller U. , Bettelli A. , Rocchi L. , Bocchi M. , Nogai A. *Establishment of a fluorescence microscopy based microwell technology (CellPly) for in vitro testing of drug response of myeloma cells.* Freier Vortrag (V421) auf der Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO 2021), 1.-4. Oktober 2021, Berlin, Deutschland

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	11
Tabellenverzeichnis	13
Abstrakt	15
Abstract	17
1. Einleitung	19
1.1. Multiples Myelom	19
1.2. Genetik des Multiplen Myeloms	23
1.3. Therapie des Multiplen Myeloms	25
1.3.1. Erstlinientherapie	25
1.3.2. Rezidivtherapie	27
1.4. Substanzen.....	28
1.4.1. Klassische Zytostatika	28
1.4.2. Glucocorticoide	29
1.4.3. Immunmodulierende Substanzen	31
1.4.4. Proteasominhibitoren	33
1.4.5. Monoklonale Antikörper	34
1.4.6. SUMO-Inhibitoren	38
1.5. Personalisierte Medizin beim Multiplen Myelom.....	39
1.6. Tumor-Microenvironment beim Multiplen Myelom.....	42
1.6.1. NK-Zellen	42
1.6.2. T-Zellen.....	43
1.6.3. Mesenchymale Knochenmarkstromazellen (BMMSC)	44
1.7. In-vitro Plattform von CellPly - Funktion und bisherige Anwendung.....	45
1.8. In-vitro Analyseinstrumente zur Response-Prädiktion.....	46
1.9. Zielsetzung der Arbeit.....	47
2. Material und Methoden	48
2.1. Materialien	48
2.2. Zellkulturtechnik.....	52

2.2.1. Zelllinien.....	52
2.2.2. Zählung der Zellen.....	52
2.2.3. Ablösung adhärenter Zellen.....	53
2.2.4. Zellpassage.....	53
2.2.5. Einfrieren von Zellen.....	53
2.2.6. Auftauen von Zellen.....	54
2.3. Probenaufbereitung.....	54
2.3.1. Ficoll -Dichtegradientenzentrifugation.....	54
2.3.2. Lyse.....	54
2.3.3. Isolation von NK-Zellen aus peripherem Blut.....	55
2.3.4. Fluoreszenzmarkierung.....	55
2.4. CellPly.....	56
2.4.1. Funktionsprinzip.....	56
2.4.2. Manuelles Protokoll.....	59
2.4.3. Automatisches Protokoll.....	61
2.4.4. PI-Restain.....	63
2.4.5. Device Reinigung.....	63
2.4.6. Bildanalyse.....	63
2.5. Untersuchung der Zelllinien innerhalb der CellPly-Plattform.....	65
2.6. Vergleich der Celltracker Calcein AM und CMAC.....	65
2.7. Calcein-AM Zytotoxizitäts-Assay.....	65
2.8. Untersuchung der in-vitro drug Response.....	66
2.9. Untersuchung des Einflusses anderer Zelltypen auf die Medikamentenwirkung.....	70
2.10. Testung auf synergistische Wirkung von Medikamentenkombinationen....	70
2.11. Korrelation zur Klinik.....	71
2.12. Statistische Auswertung.....	72
3. Ergebnisse.....	73
3.1. Viabilität der Zelllinien.....	73
3.1.1. Zelllinien in Monokultur.....	73
3.1.2. Zelllinien in Ko-Kultur.....	74
3.2. Patientencharakteristika.....	75
3.3. Calcein-AM-Zytotoxizitäts-Assay.....	78

3.4. Vergleich von Calcein AM mit CMAC	79
3.5. Viabilität von primären MM-Zellen	83
3.6. Vergleich CellPly mit Histologie und Zytologie	86
3.7. Automatisches Protokoll	87
3.8. Substanztestung an primären Myelomzellen.....	90
3.8.1. Bortezomib	91
3.8.2. Melphalan	92
3.8.3. Dexamethason.....	93
3.8.4. Lenalidomid.....	95
3.8.5. Daratumumab	97
3.8.6. Elotuzumab	97
3.9. Wirkung von SUMOi und synergistische Wirkung mit Bortezomib	99
3.10. Einfluss von NK-Zellen auf Medikamentenwirkung	103
3.11. Einfluss von BMMSC auf Medikamentenwirkung.....	108
3.12. Einfluss von T-Zellen auf Medikamentenwirkung	109
3.13. Korrelation der in-vitro-Ergebnisse zur Klinik	113
4. Diskussion	116
4.1. Zusammenfassung der Hauptergebnisse.....	116
4.2. Diskussion der Ergebnisse	118
4.2.1. Viabilität der CD138+-Zellen	118
4.2.2. Calcein AM als Apoptosemarker.....	120
4.2.3. CD138 als Marker für MM-Zellen.....	120
4.2.4. Fehlende Abbildung aller Subklone aufgrund räumlicher Heterogenität	121
4.2.5. Veränderte Tumorumgebung.....	122
4.2.6. Vergleich der in-vitro-Daten mit dem klinischen Verlauf der Patient*innen.....	122
4.2.7. Verwendbarkeit der CellPly-Plattform für die klinische Entscheidungsfindung.....	125
4.2.8. Schwankungen in der Apoptose-Messung	126
4.2.9. Einfluss von BMMSC, NK- und T-Zellen auf die Viabilität der CD138+-Zellen.....	126
4.2.10. Response-Prädiktion durch in-vitro-Testung.....	129

4.2.11. Nachteile der CellPly-Plattform verglichen mit anderen in-vitro Plattformen zur Medikamententestung	130
4.2.12. Weitere mögliche Anwendung der CellPly-Plattform	131
4.3. Fazit und Ausblick	131
Literaturverzeichnis	133
Eidesstattliche Versicherung	178
Lebenslauf	179
Publikationsliste.....	180
Danksagung.....	181
Bescheinigung Statistik	182

Abkürzungsverzeichnis

A	Antrazyklin
AA	Antibiotic-Antimycotic
Abb.	Abbildung
ADCC	antibody dependent cell-mediated cytotoxicity
ADCP	antibody-dependent cellular phagocytosis
AML	akute myeloische Leukämie
autoSZT	autologe Stammzelltransplantation
BCMA	B-cell maturation antigen
BMMSC	mesenchymale Knochenmarks-Stammzellen
C	Cyclophosphamid
CAM-IR	adhesion-mediated-immune-resistance
CAR	Chimeric antigen receptor
CCL20	CC-chemokine ligand 20
CD4+	T-Helfer-Zellen
CD8+	zytotoxische T-Zellen
CDC	complement-dependent cytotoxicity
CDC7	cell division cycle 7
CDK	Cyclin Dependent Kinase
cGAS	cyclic GMP-AMP synthase
CHK1	Checkpoint kinase 1
Co-Lok.	Co-Lokalisation
CR	complete response
CRBN	Cereblon
D	Dexamethason
Dara	Daratumumab
DDB1	Damaged DNA binding protein 1
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
Elo	Elotuzumab
ELOVL6	Fettsäuren-Elongase 6
EMM	extramedulläres Multiples Myelom
ERK	extrazellulär-signalregulierten Kinase
FACS	Fluorescence-activated cell sorting

FBS	Fetal bovine serum
FGFR3	fibroblast growth factor receptor 3
FISH	luorescence in situ hybridization
GEP	gene expression profiling
GSK3 β	Glykogen-Synthase-Kinase-3 β
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HD	healthy donor
HDT	Hochdosistherapie
HMBG1	high-mobility-gruop-box-1-Protein
HRMM	Hochrisiko Multiples Myelom
Hsp	Heat shock protein
Ig	Immunglobulin
IKZF	Ikaros family zinc finger protein
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IMiDs	immunmodulatorische Medikamente
IMWG	International myeloma working group
IRF-4	interferon regulatory factor 4
Isa	Isatuximab
ISS	International Staging system
K	Carfilzomib
k. A.	keine Angabe
KM	Knochenmark
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Melphalan
mAb	monoklonale Antikörper
MAC	membrane attack complex
MACS	Magnetic activated cell sorting
MCL 1	myeloid cell leukemia-1
MCT1	Monocarboxylat-Transporter 1
MGUS	monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
miR	microRNA

MM	Multiples Myelom
MNC	mononukleare Zellen
MR	minimal response
MRD	minimal residual disease
MRT	Magnetresonanz-Tomographie
NaCl	Natriumchlorid
NDMM	neudiagnostiziertes Multiples Myelom
NEAT1	nuclear paraspeckle assembly transcript 1
NFkB	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha
NGS	Next generation sequencing
NK-T-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ORR	overall response rate
OS	overall survival
P	Pomalidomid
PB	peripheres Blut
PBS	Phosphate Buffered Saline
PD	progressive disease
PD-1	programmed death protein 1
PD-L1	programmed death ligand 1
PFS	progression free survival
PI	Propidium Iodide
PR	partial response
PSMB5	Proteasomenuntereinheit β Typ 5
R	Lenalidomid
R-ISS	revised international staging system
RASD1	Dexamethasone-induced Ras-related protein 1
Roc	Regulator of cullins
RRMM	rezidiertes/refraktäres Multiples Myelom
s.	siehe
SD	stable disease
SEM	Standard error of mean

SENP	Sentrin-spezifischen Proteasen
SLAMF7	Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family member 7
SMM	Smoldering Multiple Myeloma
SPM	sekundäre Primärmalignität
sSLAMF7	soluble SLAMF7
STAT3	Signal transducer and activator of transcription
STING	stimulator of interferon genes
SUMO	small ubiquitin-related modifier
SUMOi	SUMO-Inhibitor
T	Thalidomid
Tab.	Tabelle
TGF- β	transforming-growth-factor- β
TNF	tumor necrosis factor
TP53	Tumorsuppressorgen 53
T _{reg}	regulatorischen T-Zellen
TTP	time to next treatment
UPR	unfolded protein response
USP12	Ubiquitin-specific-protease-12
V	Bortezomib
VEGF	vascular endothelial growth factor
VGPR	very good partial response
Viab _{norm}	normalisierte Viabilität

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aufbau der In-vitro-drug-testing-Plattform von CellPly	57
Abb. 2: Vollautomatischer Pipettierarm mit eingebauter Kamera während des Pipettierens der Zellsuspension in das Mikrodevice	58
Abb. 3: Füllung der 96-Wellplatte für Nutzung des manuellen Protokolls	60
Abb. 4: Ablauf der Zellaufbereitung im automatischen Protokoll	62
Abb. 5: Füllung der 96-Well-Platten für die erste Testung der U266 mit automatischem Protokoll	62
Abb. 6: Aufnahme eines Mikrowells zu den Zeitpunkten 0h, 12h und 24h	64
Abb. 7: Füllung der 96-Wellplatte und Varistrips für die Testung von Bortezomib, Melphalan, Dexamethason, Daratumumab, Elotuzumab und Lenalidomid im automatischen Modus	69
Abb. 8: Füllung der 96-Wellplatte und Varistrips für die Testung von Bortezomib und SUMOi mit NK-Zell-Markierung im automatischen Modus.....	71
Abb. 9: Zelllinien in Monokultur	74
Abb. 10: Darstellung der Viabilitäten der Zelllinien in Ko-Kultur.....	76
Abb. 11: Darstellung des Calcein-Release von 2 U266 Zellen	78
Abb. 12: Darstellung der Calcein-AM-Freisetzung der verschiedenen Zelltypen.....	79
Abb. 13: Vergleich von CMAC und Calcein AM bei Zelllinien	80
Abb. 14: Vergleich von CMAC und Calcein AM für KM	82
Abb. 15: Darstellung der Viabilität primärer CD138+-Zellen	85
Abb. 16: Korrelationsanalyse des Plasmazellanteils gemessen in der CellPly-Plattform zum Zeitpunkt 0h mit dem angegebenen Anteil im histopathologischen und zytologischen Befund	86
Abb. 17: Automatisches Protokoll mit U266.....	89
Abb. 18: PI-Restain	90
Abb. 19: D/R Bortezomib	92

Abb. 20: D/R Melphalan	94
Abb. 21: D/R Dexamethason	95
Abb. 22: D/R Lenalidomid	96
Abb. 23: D/R Daratumumab.....	98
Abb. 24: D/R Elotuzumab.....	99
Abb. 25: D/R SUMOi	102
Abb. 26: Synergistische Wirkung von Bortezomib und SUMOi zum jeweiligen Zeitpunkt der ausgeprägtesten Wirkung	103
Abb. 27: Viabilität der NK-Zellen	106
Abb. 28: Viabilitäten der CD138+-Zellen nach 12h (CP06) bzw. 16h (CP20, CP22, CP23) in Abhängigkeit von NK-Zellen in verschiedenen Konditionen	107
Abb. 29: Untersuchung der BMMSC in der CellPly-Plattform	110
Abb. 30: Untersuchung der T-Zellen in der CellPly-Plattform	112
Abb. 31: Klinische Korrelationen der jeweils niedrigsten an die Negativkontrolle normalisierten Viabilitäten	115

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Diagnosekriterien des MGUS, SMM und symptomatisches MM, modifiziert nach den IMWG-Kriterien	21
Tab. 2: R-ISS-Score zur Prognoseabschätzung	21
Tab. 3: Klassifikation nach Salmon & Durie	22
Tab. 4: IMWG-Response-Kriterien	22
Tab. 5: Übersicht über die wichtigsten in Deutschland zugelassenen Medikamentenkombinationen für die Rezidivtherapie des MM (Stand 11/2022).....	28
Tab. 6: Verwendete Reagenzien.....	48
Tab. 7: Verwendete Medikamente	48
Tab. 8: Verwendete Geräte.....	49
Tab. 9: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	50
Tab. 10: Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien	50
Tab. 11: Verwendete Fluoreszenzantikörper	51
Tab. 12: Verwendete Software.....	51
Tab. 13: Verwendete Zelllinien.....	52
Tab. 14: Verwendete Fluoreszenzantikörpern und ihre Anwendung	56
Tab. 15: Zuordnung der Wells der 96-Wellplatte zu den Kanälen des Mikrodevice beim manuellen Protokoll.....	60
Tab. 16: Füllung der Varistrips für die erste Testung der U266 mit automatischem Protokoll.	63
Tab. 17: Verwendete Substanzkonzentrationen und Negativkontrolle	68
Tab. 18: Zusammenfassung der Patientencharakteristika.....	76
Tab.19 Patientencharakteristika der untersuchten Knochenmarksproben und getestete Substanzen in der CellPly-Plattform	77
Tab. 20: Aufstellung der Patient*innen, deren Daten komplett oder teilweise von der Response-Analyse ausgeschlossen wurden.	84

Tab. 21: Werte des NK-Zell-Anteils, Anzahl Mikrowells mit Kontakt und Co-Lokalisation (Co-Lok) von CD138+- und CD56+/CD16+-Zellen aus der DMSO Kontrolle	104
Tab. 22: Auflistung der Proben von peripherem Blut zur NK-Zell-Isolation mit klinischen Charakteristika und isolierter NK-Zellzahl	105
Tab 23.: Werte des BMMSC-Anteils, Anzahl Mikrowells mit Kontakt und Co-Lokalisation (Co-Lok) von CD138+- und CD271+-Zellen aus der DMSO Kontrolle.....	108
Tab 24.: Werte des T-Zell-Anteils, Anzahl Mikrowells mit Kontakt und Co-Lokalisation (Co-Lok) von CD138+- und CD3+-Zellen aus der DMSO Kontrolle.....	111
Tab. 25: Auflistung der niedrigsten normalisierten Viabilität der Patient*innen für die Substanzen Bortezomib (V), Melphalan (M), Dexamethason (D), Lenalidomid (R), Daratumumab (Dara) und Elotuzumab (Elo).....	114

Abstrakt

Das Multiple Myelom (MM) ist eine hämatologische Neoplasie, für deren Therapie zahlreiche Substanzen zur Verfügung stehen. Etablierte prädiktive Marker für das individuelle Therapieansprechen fehlen. Eine personalisierte Therapieentscheidung könnte helfen, das klinische Outcome der Patient*innen zu verbessern. Die vorliegende Arbeit soll überprüfen, ob mittels der in-vitro Therapeutika-Test-Plattform der Firma CellPly eine Prädiktion des patientenindividuellen in-vivo Ansprechens auf einzelne Therapeutika möglich ist.

Innerhalb der CellPly-Plattform können Substanzen und Antikörper zu Zellkulturen automatisiert gegeben und ausgewertet werden. Dies ermöglicht eine Testung von bis zu 16 verschiedenen Konditionen pro Durchlauf mittels Fluoreszenzdetektion von Tumorzellen sowie der Apoptoserate mit anschließender bildbasierter Analyse. Die Inkubation der Zellen mit den Medikamenten findet in einem speziellen Microfluid-Device statt, welches über 16 Kanäle mit je 1200 Mikrowells verfügt. Diese können individuell ausgewertet werden.

Zur Evaluation der Methode wurden zunächst die MM-Zelllinie U266 und die Stroma-Zelllinie HS-5 untersucht und die Methodik etabliert. Anschließend wurden primäre MM-Zellen von 22 Patient*innen untersucht. Nach der Isolation der mononukleären Zellen wurden die MM-Zellen mit einem anti-CD138-Antikörper markiert und mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen Bortezomib, Melphalan, Dexamethason, Daratumumab, Elotuzumab und eines SUMO-Inhibitors (SUMOi) bis zu 48h inkubiert. Außerdem wurde mittels Markierung von NK-, T- und Stromazellen des Knochenmarkes (BMMSC) deren Einfluss auf die Viabilität der MM-Zellen mituntersucht.

Die beiden Zelllinien zeigten eine gute Viabilität innerhalb der CellPly-Plattform, wenn auch die der HS-5 niedriger war. In der Ko-Kultur zeigten beide eine signifikant schlechtere Viabilität. Die Viabilität der primären MM-Zellen zeigte sich über 24h gut, nach 48h lag sie bei Anwendung des automatischen Protokolls weiterhin im auswertbaren Bereich. Für Bortezomib, Melphalan, SUMOi und Dexamethason ließen sich gute Dosis-Wirkungsbeziehungen darstellen und ideale Response-Testparameter ermitteln. Für Daratumumab, Elotuzumab und Lenalidomid ließen sich nicht genug verwertbare Daten generieren, so dass hier keine signifikante Wirkung gemessen werden konnte. Für NK- und

T-Zellen ließ sich ein signifikant negativer Einfluss auf das MM-Überleben in-vitro eruieren. BMMSC lagen in zu geringer Menge im Knochenmark vor für eine weitere Analyse. Die Hinzunahme der klinischen Daten der Patienten zu den in-vitro-Ergebnissen zeigte keine signifikanten Korrelationen.

Mittels der CellPly-Plattform konnte die in-vitro Response für die Substanzen Bortezomib, Melphalan, SUMOi und Dexamethason dargestellt werden, zudem war der Einfluss von NK- und T-Zellen messbar. Die prädiktive Wertigkeit der in-vitro Ergebnisse zum in-vivo Outcome muss in einer größeren Patientenkohorte evaluiert werden.

Abstract

Multiple Myeloma (MM) is a hematological malignancy with many therapeutic options available. There is a lack of established predictive markers for the individual response to the different drugs. Personalized treatment decisions could improve the clinical outcomes of patients. This project shall evaluate if it is possible to predict individual in-vivo responses to several drugs by using the in-vitro drug testing-platform from CellPly.

Within the CellPly platform, substances and antibodies can be added to cell cultures in an automated manner. This allows testing of up to 16 different conditions per run by fluorescence detection of tumor cells as well as the apoptosis rate by image-based analysis. The incubation of the cells with the drugs takes place in a special microfluid device, containing 16 channels. Each channel includes 1200 microwells that can be analyzed individually. To evaluate the method, the MM-cell-line U266 and the stromal-cell-line HS-5 were examined and the automated preparation of cells by the machine was established. Subsequently, primary MM cells from 22 patients were tested. Mononuclear cells were isolated by Ficoll, MM cells were labeled with an anti-CD138 antibody and incubated with different concentrations of bortezomib, melphalan, dexamethasone, daratumumab, elotuzumab and a SUMO inhibitor (SUMOi) for up to 48h. In addition, by labeling NK-, T- and bone marrow stromal cells (BMMSC), their influence on MM cell viability was investigated.

Both cell lines showed good viability within the CellPly platform, although that of HS-5 was lower. In co-culture, both showed significantly worse viability. The viability of the primary MM cells was shown to be good over 24h and remained in the evaluable range after 48h due to application of the automated protocol. For bortezomib, melphalan, SUMOi and dexamethasone good dose-response relationships were shown, and ideal response test parameters were determined. There was no statistically significant dose-dependent effect on MM-cells seen for lenalidomide, daratumumab and elotuzumab. Regarding NK- and T-cells, a significant negative effect on MM viability was shown in-vitro for both cell types. Due to a low proportion of BMMSC in the bone marrow samples further analysis was not possible. There were no significant correlations between the clinical data of the patients and the in vitro results.

The CellPly platform could analyze the susceptibility of MM cells to bortezomib, melphalan, dexamethasone and SUMOi. Besides, the effect of NK- and T-cells could be measured. Future work will explore a larger cohort to investigate the correlation of the in-vitro data with the patient response and outcome.

1. Einleitung

1.1. Multiples Myelom

Das Multiple Myelom (MM) ist eine hämatologische Neoplasie, die zu den indolenten B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen zählt. Weltweit beträgt die altersstandardisierte Inzidenz 2,1/100.000, in Deutschland betrug sie 2018 5,4/100.000 für Männer und 3,5/100.000 für Frauen mit einem Altersgipfel von 72 bzw. 74 Jahren (1,2). Es zeigen sich Unterschiede in der geographischen Verteilung der Inzidenz, wobei die höchste unter Afroamerikanern und die niedrigste in Ostasien vorkommt. Das mediane Überleben liegt durch die Anwendung der modernen zielgerichteten Therapeutika bei etwa 6 Jahren (3).

Die Pathologie des MM besteht in der klonalen Vermehrung von malignen Plasmazellen im Knochenmark (KM). Diese sezernieren meist funktionsuntüchtige Immunglobuline oder Bruchstücke davon, welche als M-Protein mittels Serum- und Urinelektrophorese gemessen werden können. Man unterscheidet je nach sezerniertem Immunglobulin IgG- und IgA-Myelome, seltener liegen auch IgD- und IgE-Myelome vor. In etwa 20% werden nicht ganze Immunglobuline, sondern nur Leichtketten sezerniert (4).

Durch die Knochenmarksinfiltration kann es zu einer Verdrängung der physiologischen Hämatopoese und damit zu Zytopenien insbesondere der Erythropoese, aber auch anderer Zellreihen kommen. Diese können sich durch die Symptome Infektneigung (Leukopenie), Blutungsneigung (Thrombopenie) und Abgeschlagenheit (Anämie) zeigen (4). Weiterhin kann es durch eine gesteigerte Osteoklastenaktivität zu Osteolysen, pathologischen Frakturen und Knochenschmerzen kommen. Der vermehrte Knochenabbau kann außerdem eine Hyperkalzämie verursachen. Aufgrund der hohen Menge von sezernierten Immunglobulinen oder Leichtketten kann es zudem zu renalen Schädigungen kommen, welche je nach Ort und Art der Proteinablagerung als CAST-Nephropathie, AL-Amyloidose oder Leichtkettenerkrankung auftreten können. Bei renaler Ausscheidung der Leichtketten spricht man von einer Bence-Jones-Proteinurie, welche einen schäumenden Urin verursachen kann.

Die beschriebenen Endorganschäden werden als CRAB-Kriterien (Hyperkalzämie, Niereninsuffizienz, Anämie und Osteolysen) zusammengefasst und stellen eine Therapieindikation dar (s. Tab. 1). 2014 wurden diese durch die SLiM-CRAB-Kriterien ergänzt, wonach auch eine KM-Plasmazell-Infiltration von mindestens 60%, eine Leichtkettenratio > 100 oder mindestens eine Knochenläsion in der MRT ein therapiebedürftiges MM defi-

nieren (5). Diese Kriterien sagen mit hoher Wahrscheinlichkeit das Auftreten von Organ-schäden innerhalb der nächsten Jahre voraus, so dass vor Auftreten der ersten Symptome mit einer Therapie begonnen werden kann.

Die Vorstufen des MM sind die Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) und das Smoldering Myeloma (SMM). Bei beiden ist es noch nicht zu einem Endorgan-schaden gekommen, das MGUS weist dabei eine niedrigere KM-Infiltration und einen geringeren M-Protein-Spiegel als das SMM auf (s. Tab. 1). Bei ca. 3-4% der über 50-Jährigen kann ein MGUS diagnostiziert werden, die jährliche Progressrate zum MM liegt aber nur bei 1% (6–8). Somit stellt das MGUS ein prämalignes Stadium des MM dar.

Beim solitären Plasmozytom handelt es sich um eine Sonderform des MM, welches als ein solitärer Plasmazelltumor definiert ist und im Gegensatz zum MM durch Bestrahlung potenziell heilbar ist. (9)

Weitere klinische Sonderformen des MM, die mit einer schlechteren Prognose einhergehen, sind die Plasmazell-Leukämie und das extramedulläre Myelom (EMM). Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose liegt bei ca. 1,7-4,5% der Patient*innen eine extramedulläre Manifestation vor, im späteren Verlauf entwickeln bis zu 10% der Patient*innen ein EMM (10).

Die Prognose des MM wird durch das International Staging System (ISS) abgeschätzt, welches sich nach den Werten von Albumin und Beta-2-Mikroglobulin richtet und eine Aussage über die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate gibt. 2015 wurde mittels der Einführung des R-ISS die prognostische Aussagekraft verbessert, indem zusätzlich die Zytogenetik und die Laktatdehydrogenase (LDH) mit einbezogen werden (s. Tab. 2) (11). Zudem kann das MM nach Salmon & Durie klassifiziert werden, wie in Tabelle 3 aufgeführt (12). Diese Einteilung verliert jedoch zunehmend an Bedeutung, da sie keine prognostische Aussagekraft hat, sondern nur der Abschätzung der Tumormasse dient.

Zur Evaluation des Therapieansprechens sind die Response-Kriterien der International Myeloma Working Group (IMWG) etabliert (s. Tab. 4) (13). Zum Monitoring des Ansprechens wird empfohlen, unter der laufenden Therapie monatlich die Messungen des Serum- und Urin-M-Proteins und der freien Leichtketten durchzuführen, außerhalb der Therapie alle 3-4 Monate, um einen Krankheitsprogress rechtzeitig zu identifizieren (14).

Tab. 1: Diagnosekriterien des MGUS, SMM und symptomatisches MM, modifiziert nach den IMWG-Kriterien (5)

	MGUS	SMM	Symptomatisches MM
Knochenmarksinfiltration	< 10%	10-60%	≥10%
M-Protein (Serum/Urin)	< 30g/l / < 500mg/24h	≥ 30g/l / ≥ 500mg/24h	nachweisbar
Endorganschäden	keine	keine	Vorhanden (s. SLiM-CRAB)
SLiM-CRAB-Kriterien		Hinweis	
S: ≥ 60% KM-Infiltration		Nachweis von klonalen Plasmazellen	
Li: Leichtketten-Ratio ≥ 100		Betroffene Leichtkette ≥ 100mg/l	
M: ≥ 1 fokale MRT-Läsion		≥ 5mm	
C: Hyperkalzämie		Serumkalzium >2,75 mmol/l oder >0,25 mmol/l oberhalb des oberen Normwertes	
R: Niereninsuffizienz		Kreatinin > 2mg/dl oder Kreatinin-Clearance < 40ml/min	
A: Anämie		Hämoglobin < 10g/dl oder > 2g/dl unter Normwert	
B: Knochenbeteiligung		Nachweis von Osteolysen in der Bildgebung	

Tab. 2: R-ISS-Score zur Prognoseabschätzung, modifiziert nach (11)

ISS	I (alle Kriterien)	II	III (mind. 1 Kriterium)
Beta-2-Mikroglobulin	< 3,5 mg/l	Weder I noch	≥5,5 mg/l
Albumin	≥ 3,5 g/dl	III	-
R-ISS	I (alle Kriterien)	II	III (ISS und LDH oder Zytogenetik)
ISS	I	Weder R-ISS I noch III	III
LDH	normal		erhöht
Zytogenetik (FISH)	Standardrisiko		Hochrisiko - del(17p) - t(4;14) - t(14;16)
5-Jahres-Überlebensrate	82%	62%	40%

Tab. 3: Klassifikation nach Salmon & Durie, modifiziert nach (12)

Stadium	I (alle Kriterien)	II	III (mind. 1 Kriterium)
Hämoglobin	> 10g/dl	Weder I noch III	< 8,5 g/dl
Serumkalzium	normwertig		Hyperkalzämie
Osteolysen	≤1		≥ 3
M-Protein	niedrig		hoch

Tab. 4: IMWG-Response-Kriterien, vereinfacht nach (13)

Response	Zu erfüllende Bedingungen
Complete response (CR)	Negative Immunfixation in Serum und Urin, < 5% Plasmazellen im KM
Very good partial response (VGPR)	≥ 90% Reduktion des Serum M-Proteins, Urin M-Protein < 100mg/24h
Partial response (PR)	≥ 50% Reduktion des Serum M-Proteins, ≥ 90% Reduktion des Urin M-Proteins/24h oder < 200mg/24h
Minimal response (MR)	≥ 25% Reduktion des Serum M-Proteins, ≥ 50% Reduktion des Urin M-Proteins/24h
Stable disease (SD)	Keine anderen Kriterien erfüllt
Progressive disease (PD)	Mindestens 1: <ul style="list-style-type: none"> - ≥ 25% Anstieg des M-Proteins (Serum oder Urin), absoluter Anstieg ≥ 5mg/dl (Serum) bzw. >200mg/24h (Urin) - ≥ 25% Anstieg der Leichtkettendifferenz (bei nicht messbaren M-Protein), absoluter Anstieg ≥ 10mg/dl - Progredienz der Läsionen in der Bildgebung

Zudem erfolgt insbesondere im Rahmen von klinischen Studien die Erfassung der minimalen residualen Erkrankung (MRD) beim MM. Die bisherigen Daten zeigen eine gute prognostische Bedeutung einer MRD-Negativität im Sinne einer signifikanten Verlängerung des PFS (54 vs. 26 Monate) und OS (98 vs. 82 Monate) bei Patient*innen, die MRD-Negativität erreichen (15). Als diagnostische Methoden stehen dabei Next-Generation-Sequencing (NGS) und die Durchflusszytometrie zur Verfügung, für eine Etablierung in

den klinischen Alltag fehlt es jedoch bisher an einer flächendeckenden Umsetzbarkeit der erforderlichen Qualitätsstandards. Zudem liegen aktuell (Stand 11/2022) keine Daten aus prädiktiven Studien vor, die einen Vorteil von MRD-Status basierten Therapieentscheidungen belegen, so dass die MRD-Bestimmung bisher zu keinen Konsequenzen bezüglich des weiteren therapeutischen Vorgehens führt.

1.2. Genetik des Multiplen Myeloms

Das MM ist eine genetisch heterogene Erkrankung. In etwa 60% der Fälle ist die Genetik der Erkrankung durch Trisomien charakterisiert, wobei die Trisomien der Chromosomen 3 und 5 mit einer guten und die Trisomie des Chromosoms 21 mit einer schlechten Prognose einhergeht (16,17).

In etwa 45-50% der Fälle liegen Translokationen vor, die den Genlocus der schweren Kette (IgH) 14q32 miteinbeziehen (IgH-Rearrangement) (17). Mit einem Standardrisiko gehen dabei die t(11;14) und t(6;14) einher, während t(4;14), t(14;16) und t(14;20) mit einem höheren Risiko für einen schlechten Verlauf assoziiert sind (14).

Eine weitere häufige Mutation beim MM ist der Zugewinn des langen Arms von Chromosom 1 (1q21), wobei eine höhere Anzahl von Kopien mit dem Zugewinn (>3) eine ausgeprägtere Prognoseverschlechterung verursacht (18). Die häufigsten Deletionen sind die del(1p) und del(17p), welche ebenfalls beide mit einem schlechteren Outcome assoziiert sind (19). Im Falle der del(17p) liegt in etwa 40% der Fälle eine Mutation des Tumorsuppressorgens TP53 vor (20). Die biallelische TP53 Mutation stellt dabei die schwerwiegendste Veränderung bezüglich der Prognose dar (18). Bei Vorliegen von mindestens 2 (double-hit) Hochrisiko-Aberrationen verschlechtert sich die Prognose weiter (21).

Des Weiteren können Mutationen von RAS und MYC vorliegen (14).

Da die Risikostratifizierung nach R-ISS nur 3 genetische Aberrationen mit einbezieht, während jedoch eine Vielzahl weiterer genetischer Veränderungen eine prognostische Bedeutung besitzen, ist eine verbesserte Risikostratifizierung Gegenstand aktueller Forschung. Durch die wachsende Verfügbarkeit von NGS stellt Gene expression profiling (GEP) eine mögliche Methode dafür dar. Mittels der Identifikation einer bestimmten Gen-signatur, welche prognostisch relevante Gene enthält, kann ein Risikoscore für die individuellen Patient*innen erstellt werden. Beispielhaft stellten Kuiper et al. die EMC-92-gene-signature vor, mittels der anhand der Expression von 92 Genen eine Unterteilung

der Patient*innen in Hochrisiko mit einem OS von weniger als 2 Jahren und Standardrisiko erfolgte und welche erfolgreich anhand 740 neudiagnostizierter (NDMM) und 264 rezidivierter oder refraktärer (RRMM) Patient*innen validiert werden konnte (22). Unter Hinzunahme des ISS konnte die Risikostratifizierung sogar auf 4 Gruppen erweitert werden: Hochrisiko (OS 24 Monate), intermediäres Hochrisiko (OS 47 Monate), intermediäres Niedrigrisiko (OS 61 Monate) und Niedrigrisiko (OS nicht erreicht) (23). Jedoch ist die Anwendung des GEP aktuell noch mangels flächendeckender Verfügbarkeit und fehlender Etablierung einer validierten Signatur für die Risikostratifizierung limitiert.

Das MM unterliegt einer klonalen Evolution, das heißt, die Zusammensetzung aus verschiedenen Subklonen zeigt sich variabel über den Krankheitsverlauf. Keats et al. konnten zeigen, dass nur bei ca. einem Drittel der Patient*innen zum Zeitpunkt des Rezidivs eine genomische Stabilität vorherrscht, wobei es sich insbesondere um hyperdiploide Myelome handelt (24). Bei jeweils einem weiteren Drittel der Fälle kam es entweder zu einer linearen (Zugewinn von Klonen mit neuen Mutationen) oder einer verzweigten Evolution (Zugewinn und Verlust von Klonen). Beide Muster waren signifikant mit Hochrisikoaberrationen assoziiert (24). Diese Ergebnisse deuten auf die Bedeutung des Konzepts der Re-Induktion bei einem Spätrezidiv hin, da auch nach einem Rezidiv davon auszugehen ist, dass wahrscheinlich der therapiesensible Klon weiter vorhanden ist (24). In einer Arbeit von Weinhold et al. zeigte sich bei Patient*innen mit einem Rezidiv eine klare Dominanz der verzweigten Evolution, während bei einem geringeren Anteil die lineare Evolution oder einer Umverteilung der Klonanteile ursächlich für das Rezidiv war (25). Eine genetische Stabilität war nur in einem Einzelfall nachweisbar (25). Weitere Arbeiten unterstützen die Bedeutung der linearen und insbesondere der verzweigten Evolution für den Krankheitsprogress, zeigten jedoch auch das Vorhandensein genetischer Stabilität (26–28). Zudem konnte beobachtet werden, dass Patient*innen nach vorherigem Erreichen einer CR im Vergleich zur initialen Präsentation zum Zeitpunkt des Rezidivs ein sehr differentes genetisches Profil aufweisen. Dies war unabhängig von der Durchführung einer Lenalidomid-Erhaltungstherapie (28). Im Vergleich dazu konnte in derselben Arbeit beobachtet werden, dass ein stabiles Mutationsprofil nur bei Patient*innen ohne vormaliges Erreichen einer CR vorkam (28). Dies verdeutlicht den Selektionsdruck, den effektive Therapeutika auf die MM-Zellen ausüben. Dieser Mechanismus ist neben der Ansammlung neuer Mutationen ursächlich für die Rezidiventstehung, indem initial vorhandene nicht-messbare resistente Subklone nach der Therapie dominant werden (28).

Ein weiterer bedeutsamer Faktor der Pathophysiologie des MM stellt die räumliche Heterogenität der Erkrankung dar. Rasche et al. konnten in ihrer Arbeit eine genetische Varianz der MM-Zellen zwischen verschiedenen fokalen Läsionen feststellen. So zeigten sich bei 25% der Patient*innen eine Diskrepanz bezüglich des Vorliegens prognostisch schlechter Mutationen (29). Dies zeigt eine lokal begrenzte genetische Evolution der verschiedenen Klone auf, angetrieben durch die räumliche Limitation der KM-Nische. Dabei ergab sich hinsichtlich des Ausmaßes der Heterogenität kein signifikanter Unterschied zwischen Erstdiagnose und Rezidiv (29).

Diese räumliche Heterogenität spiegelt sich auch in varianten Plasmazellinfiltrationen, je nach punktierter Stelle, wider (30). Da im klinischen Alltag routinemäßig nur eine Probe des Beckenkamms entnommen wird, sind sämtliche Ergebnisse bezüglich des genetischen Profils nur auf diese fokale Läsion begrenzt.

Landau et al. konnten in ihrer Arbeit zudem zeigen, dass die räumliche Heterogenität des MM auch durch die Therapie, in diesem Fall die Melphalan-Hochdosistherapie (HDT), beeinflusst wird. In den untersuchten Proben konnte festgestellt werden, dass sich ein einziger lokalisierter Zellklon nach Überleben der HDT in kürzester Zeit im gesamten Körper ansiedeln und somit einen Progress verursachen konnte, was unter anderem durch die Erhöhung der Mutationsrate durch Melphalan gefördert wurde (31).

Ein möglicher Ansatz, um bei der genetischen Diagnostik die räumliche Heterogenität der Erkrankung zu umgehen, stellt die Liquid Biopsy dar. Dabei können zirkulierende Tumorzellen, freie Tumor-DNA, microRNA oder extrazelluläre Vesikel im peripheren Blut detektiert, isoliert und analysiert werden (32). Somit könnte auf die invasive KM-Diagnostik verzichtet werden und man erhält Daten der verschiedenen Subklone aller KM-Nischen. Jedoch gibt es bisher (Stand 11/2022) noch keine validierten und etablierten Methoden.

1.3. Therapie des Multiplen Myeloms

1.3.1. Erstlinientherapie

Als indolentes Lymphom wird das MM palliativ behandelt, eine Kuration ist bisher nicht möglich. Ein wichtiger Bestandteil der MM-Therapie stellt die autologe Stammzelltransplantation (autoSZT) dar, weshalb man im Therapie-Algorithmus zwischen transplantationsfähig und nicht-transplantationsfähig unterscheidet. Die Transplantationsfähigkeit der Patient*innen wird unter anderem anhand des Alters, aber auch an Komorbiditäten und dem Allgemeinzustand festgemacht. Trotz der Verfügbarkeit moderner zielgerichteten

Therapien mit hoher Wirksamkeit bleibt die autoSZT ein essenzieller Bestandteil der MM-Therapie, welche das PFS der Patient*innen um ca. 1 Jahr verlängern kann verglichen mit einer Therapie nach dem VRD-Schema (33).

Bei angestrebter Transplantation wird mit einer Induktionstherapie begonnen, wobei die Kombination aus Bortezomib, Cyclophosphamid und Dexamethason (VCD) etabliert ist (34,35). Weitere empfohlene Möglichkeiten stellen die Kombinationen aus Daratumumab, Bortezomib, Thalidomid und Dexamethason (Dara-VTD, CASSIOPEIA-Studie) und aus Bortezomib, Lenalidomid und Dexamethason (VRD) dar, wobei für letztere formal die Zulassung in Deutschland fehlt (Stand 11/2022) (35–37).

Zur Mobilisierung der Stammzellen kann die Kombination aus Cyclophosphamid, einem Antrazyklin und Dexamethason (CAD-Schema) oder Cyclophosphamid allein verabreicht werden, es kann aber auch eine Stammzellsammlung aus dem steady state erfolgen (38). Zusätzlich erfolgt eine Stimulation mit G-CSF und gegebenenfalls Plerixafor.

Anschließend wird den Patient*innen eine Hochdosistherapie mit Melphalan verabreicht, auf die die Rückgabe der Stammzellen folgt (39).

Die autoSZT kann als Tandemtransplantation erfolgen, welche für Patient*innen mit Hochrisikoaberrationen (HRMM) und Patient*innen mit nicht erreichter CR nach der ersten Transplantation empfohlen wird. Die Studienlage hierzu ist jedoch nicht eindeutig. Während eine prospektive Studie von Cavo et al. eine Verbesserung des OS und PFS für alle Patient*innen inklusive HRMM durch eine Tandemtransplantation zeigen konnte, gab es in der prospektiven Studie von Stadtmauer et al. keinen signifikanten Unterschied zwischen den Therapiearmen (40,41).

Eine Konsolidierungstherapie wird aufgrund eines fehlenden positiven Einflusses auf das Outcome aktuell nicht empfohlen, in Studien jedoch teilweise durchgeführt (41). An die autoSZT sollte sich eine Erhaltungstherapie von mindestens 2 Jahren anschließen, dafür ist bisher nur Lenalidomid zugelassen. Mittels einer Lenalidomid-Erhaltungstherapie kann die 7-Jahres-Überlebensrate von 50% auf 62% erhöht werden, profitieren können alle Patient*innen unabhängig von der Tiefe des Ansprechens auf die bisherige Therapie (42). Die in Deutschland nicht zugelassene Erhaltungstherapie mit Bortezomib wurde vor allem bei Patient*innen mit del(17p) empfohlen, Sonneveld et al. konnten in dieser Subgruppe eine PFS-Steigerung von 12 auf 22 Monate feststellen (43). Jedoch zeigt sich in einer retrospektiven Analyse kein Unterschied einer Erhaltungstherapie mit Lenalidomid gegen Bortezomib in dieser Patientenpopulation (44).

Patient*innen, die nicht für eine autoSZT geeignet sind, können ebenfalls eine Therapie mit VCD erhalten. Bei ausreichender Fitness der Patient*innen kann mittels Daratumumab, Lenalidomid und Dexamethason (Dara-RD) jedoch ein besseres Ansprechen erreicht werden (MAIA-Studie) (45). Weitere zugelassene Kombinationen für die Erstlinientherapie bei nicht-transplantationsfähigen Patient*innen stellen Daratumumab, Bortezomib, Melphalan und Prednisolon (Dara-VMP, ALCYONE-Studie) und VRD (SWOG-Studie) dar (46,47).

1.3.2. Rezidivtherapie

Für die Rezidivtherapie stehen beim MM zahlreiche Substanzen zur Verfügung, die wie in Tabelle 5 dargestellt in verschiedenen Mehrfachkombinationen verabreicht werden können. Bei einem späten Rezidiv kann die Primärtherapie erneut verabreicht werden. Außerdem besteht die Möglichkeit, erneut eine autoSZT durchzuführen, wenn diese in der Erstlinientherapie zu einer langanhaltenden Response geführt hat oder bisher noch nicht durchgeführt wurde. Seit 2021 ist außerdem mit Idecabtagen-Vicleucel eine CAR-T-Zell-Therapie für das MM verfügbar, die das B-cell-maturation-antigen (BCMA) als Zielstruktur nutzt (48). Neu zugelassen wurde zudem der bispezifische Antikörper Teclistamab, der an BCMA und an CD3 bindet und so eine T-Zell-spezifische Antwort gegen das MM induziert (49).

In Einzelfällen und bei vorhandenem Spender kann auch eine allogene Stammzelltransplantation in Betracht gezogen werden, aufgrund der hohen therapieassoziierten Mortalität und Morbidität und bei Fehlen einer eindeutigen Überlegenheit gegenüber einer weiteren autoSZT wird von diesem Konzept aber zunehmend abgerückt (50,51).

Für die Therapieauswahl im Rahmen der Rezidivtherapie existieren keine klaren Richtlinien, sie erfolgt basierend auf den bereits verabreichten Substanzen und der Patientenfitness. Prädiktive Marker für das individuelle Therapieansprechen fehlen bisher.

Tab. 5: Übersicht über die wichtigsten in Deutschland zugelassenen Medikamentenkombinationen für die Rezidivtherapie des MM (Stand 11/2022).

Therapieschema	Referenz
Carfilzomib, Lenalidomid, Dexamethason (KRD)	ASPIRE-Studie (52)
Elotuzumab, Pomalidomid, Dexamethason (Elo-PD)	ELOQUENT-3-Studie (53)
Elotuzumab, Lenalidomid, Dexamethason (Elo-RD)	ELOQUENT-2-Studie (54)
Daratumumab, Lenalidomid, Dexamethason (Dara-RD)	POLLUX-Studie (55)
Daratumumab, Carfilzomib, Dexamethason (Dara-KD)	CANDOR-Studie (56)
Daratumumab, Bortezomib, Dexamethason (Dara-VD)	CASTOR-Studie (57)
Daratumumab, Pomalidomid, Dexamethason (Dara-PD)	EQUULEUS-Studie (58)
Isatuximab, Pomalidomid, Dexamethason (Isa-PD)	ICARIA-Studie (59)
Isatuximab, Carfilzomib, Dexamethason (Isa-KD)	IKEMA-Studie (60)
Selinexor, Dexamethason	STORM-Studie (61)
Panobinostat, Bortezomib, Dexamethason	PANORAMA1 (62)
Ixazomib, Lenalidomid, Dexamethason	TOURMALINE-MM1-Studie (63)
Idecabtagen-Vicleucel	KarMMa-Studie (48)
Belantamab-Mafoditin	DREAMM-2-Studie (64)
Teclistamab	MajesTEC-1-Studie (49)

1.4. Substanzen

1.4.1. Klassische Zytostatika

Ein wichtiger Vertreter der klassischen Zytostatika in der Myelomtherapie ist Melphalan. Es gehört zur Gruppe der Alkylantien und ist ein Stickstofflost-Analoga. Es verfügt über zwei 2-Chloroethylgruppen, welche kovalent an Stickstoff der DNA-Base Guanin binden und somit eine Quervernetzung der DNA-Stränge bewirken (65,66). Dadurch ist die weitere Zellreplikation gestört und es kommt zur Apoptose (67).

Melphalan bewirkt außerdem eine verminderte IL-6-Produktion in den mesenchymale Knochenmarkstromazellen (BMMSC) und Osteoblasten, welches zum einem wahrscheinlich den Anti-Myelom-Effekt verstärkt, zum anderen aber auch mit einen der

Gründe der gestörten posttherapeutischen hämatopoetischen Rekonstitution durch Schädigung der KM-Nische darstellen kann (68).

Durch die in hohen Dosierungen ausgelöste Myelosuppression wird Melphalan zur Hochdosistherapie mit anschließender Stammzelltransplantation eingesetzt, wie bereits unter 1.3.1. beschrieben (69). Zu den häufigen Nebenwirkungen einer Hochdosistherapie mit Melphalan gehören Zytopenien, Infektionen und gastrointestinale Nebenwirkungen wie Nausea, Emesis und Stomatitis (33). Außerdem wurde bei Patient*innen mit Lymphom ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von sekundären Primärmalignomen (SPM) in Folge einer Melphalan-Therapie beobachtet, insbesondere handelte es sich um Akute myeloische Leukämie (AML), Myelodysplastisches Syndrom, aber auch solide Tumoren (70–72). Im Rahmen der MM-Behandlung konnte in Folge der HDT kein signifikanter Anstieg von SPM gezeigt werden, nur bei länger andauernder Melphalan-Behandlung (73–75). Ungeachtet dessen zeigt sich bei MM-Patient*innen nach Melphalan-Exposition die spezifische Mutatationssignatur SBS-MM1 und eine um 10-20% erhöhte Mutationslast (31,76).

Die Wirksamkeit von Melphalan auf MM-Zellen kann durch verschiedene Resistenzmechanismen reduziert werden. Koomen et al. konnten zeigen, dass die Resistenz nicht auf eine erhöhte Ausscheidung oder Verstoffwechslung von Melphalan zurückzuführen ist, sondern auf angepasste Stoffwechselwege zurückzuführen ist. So zeigte sich in resistente Zellen eine Erhöhung von Metaboliten des Pentose-Phosphat-Weges, die Melphalanresistenz konnte durch Blockierung des Pentosephosphatweges überwunden werden (77). Die resistenten Zellen wiesen niedrigere Level von Guanin und Guanosin auf, so dass eine verbesserte Guanin-Rückgewinnung als Anpassung an den Melphalaneinfluss zu vermuten ist (77). Zudem ist die verbesserte Antwort auf oxidativen Stress ein weiterer Resistenzmechanismus (78). Außerdem wird mittels Hochregulierung des Fanconi-Anämie-Pathways die DNA-Reparaturrate erhöht und so eine Resistenz gegenüber Melphalan erreicht (79).

Weitere klassische Zytostatika, die beim MM eingesetzt werden, sind Cyclophosphamid, Bendamustin, Doxorubicin und Etoposid.

1.4.2. Glucocorticoide

Aus der Gruppe der Glucocorticoide stellen Dexamethason und Prednisolon wichtige Substanzen in der Myelomtherapie dar. Sie wirken antiinflammatorisch, immunsuppressiv und antiproliferativ, sodass die Bildung von Entzündungsmediatoren und die Tätigkeit

von Entzündungszellen eingeschränkt wird (80,81). Dexamethason zeigt eine gute apoptotische Wirkung auf MM-Zellen, unter anderem ist dies auch bedingt durch die Inhibierung des NFκB-Weges (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha) (82,83). Aus diesen Gründen ist Dexamethason Bestandteil fast aller gängigen Therapeutika-Kombinationen, zudem kann es bei hohem Therapiedruck vor Beginn der eigentlichen Behandlung als Monotherapie gegeben werden.

Dexamethason kann eine Vielzahl von Nebenwirkungen auslösen, zu den häufigsten relevanten gehören dabei unter anderem Infektionen, Cushing-Syndrom, Osteoporose und psychiatrische Symptome wie Depressionen (81).

Trotz der insgesamt hohen therapeutischen Stärke von Dexamethason liegen insbesondere im Verlauf des MM Zellklone mit einer Resistenz gegen das Therapeutikum vor. Dies ist nicht zuletzt durch die breite Anwendung der Substanz in jeder zugelassenen Kombinationstherapie bedingt.

Die Arbeit von Pollett et al. zeigt eine Korrelation zwischen dem Vorliegen einer Dexamethason-Resistenz und der erhöhten Expression von fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3), die bei einigen Patient*innen mit einer t(4;14) vorliegt (84,85). Zudem stellten Wu et al. in ihrer Arbeit eine Hochregulation der long-non-coding RNA NEAT1 (nuclear paraspeckle assembly transcript 1) in Dexamethason-resistenten MM-Zelllinien fest, welche über eine Erniedrigung von miR-193a zu einer erhöhten Expression vom anti-apoptischen MCL1-Gen (myeloid cell leukemia-1) führt (86). Die Hochregulation von NEAT1 in primären MM-Zellen war zudem mit einer schlechteren Prognose assoziiert (86). Auch die Inaktivierung des RASD1-Gens durch Methylierung, welches durch Dexamethason aktiviert wird und das Zellwachstum inhibiert, geht mit einer Dexamethason-Resistenz einher und kann durch Demethylierung mittels 5-aza-2'-deoxycytidine überwunden werden (87–89). Eine Methylierung von RASD1 scheint mit mehrfacher Dexamethason-Applikation einherzugehen (89). Weiterhin wird das immunregulierende Protein FKP5 durch Dexamethason hochreguliert, was zur Apoptoseinduktion beiträgt und in resistenten Zelllinien gestört ist (80). Ein weiterer Resistenzmechanismus ist die Überexpression vom Heat shock protein 27 (Hsp27), wodurch die über die Aktivierung von Caspase-9 und -3 vermittelte Apoptoseinduktion verhindert wird (90). Eine Rolle spielen auch die BMMSC, welche durch die IL-6-Sekretion MM-Zellen vor der Dexamethason-induzierten Apoptose schützen (91).

1.4.3. Immunmodulierende Substanzen

Thalidomid, Lenalidomid und Pomalidomid sind die für die Myelomtherapie zugelassenen Vertreter aus der Gruppe der immunmodulierenden Substanzen (IMiDs). Thalidomid (Contergan ®) wurde in den 50er und 60er Jahren als Sedativum und bei Emesis gravidarum eingesetzt, bis sich die teratogene Wirkung der Substanz mit dem Bild der Thalidomid-Embryopathie zeigte (92). Aufgrund der antiangiogenen, antineoplastischen und immunmodulierenden Wirkung fand es jedoch Anwendung in der onkologischen Therapie und zeigte gute Wirksamkeit beim Multiplen Myelom (93). Im weiteren Verlauf wurden die Abkömmlinge Pomalidomid und Lenalidomid entwickelt.

Die Hinzunahme von Lenalidomid zu Dexamethason in der Therapie von RRMM zeigte eine Verlängerung des PFS von 4,6 Monaten zu 13,4 Monaten und des OS von 31,6 Monaten zu 38 Monaten (94). Eine Erhaltungstherapie mit Lenalidomid bei NDMM erbrachte eine PFS-Verlängerung von 23,5 Monaten zu 52,8 Monaten im Vergleich zur Placebogabe beziehungsweise Beobachtung (42).

Häufige Nebenwirkungen von Lenalidomid stellen unter anderem Pneumonie, Neutropenie, Thrombopenie, venöse Thromboembolie, Diarrhö, Muskelkrämpfe und SPM dar (42,94,95).

Lenalidomid wirkt unter anderem antiproliferativ auf hämatopoetische Tumorzellen. Der genaue Wirkmechanismus beruht auf einer Bindung an das Protein Cereblon (CRBN), welches die substratbindende Einheit eines E3-Ubiquitin-Ligase-Enzym-Komplex zusammen mit Damaged DNA binding protein 1 (DDB1), Cul4A und Regulator of cullins (Roc) bildet (96). Infolgedessen bindet Cereblon die beiden lymphoiden Transkriptionsfaktoren Ikaros (IKZF1) und Aiolos (IKZF3), was zur Ubiquitinierung und Abbau der beiden Proteine führt (97,98). Infolgedessen kommt es zur zytotoxischen und immunmodulierenden Wirkung von Lenalidomid, bewirkt durch die Herunterregulierung von interferon regulatory factor 4 (IRF-4) und c-Myc (97,99,100). Zudem stellt dieser Wirkmechanismus auch die Ursache der teratogenen Wirkung der IMiDs dar, da der E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex für die Gliedmaßenentwicklung in der Embryonalperiode eine tragende Rolle spielt (96). IKZF1 stellt zudem einen potenziellen prädiktiven Marker für das Outcome der Patient*innen dar, da eine hohe Expression häufiger mit einem ISS-Stadium III, einem schlechteren Therapieansprechen auf Lenalidomid sowie einem kürzeren PFS nach Lenalidomidtherapie einhergeht verglichen mit niedrigerer Expression (101). Dagegen zeigte sich in einer weiteren Arbeit für Pomalidomid ein umgedrehtes Verhältnis, da eine niedrigere Expression mit einem schlechteren Ansprechen einherging (102).

Da IKZF1 und IKZF3 die IL-2-Produktion durch T-Zellen unterdrücken, wird eben diese durch die IMiD-Therapie gesteigert, was wiederum zur Aktivierung von T- und NK-Zellen führt (98,103,104). Auch die Bildung von NKT-Zellen wird induziert (105).

Zudem zeigten Heider et al., dass CRBN als Ko-Chaperon die Chaperon-Aktivität von Hsp90 gegenüber verschiedener Transmembranproteine und damit deren Expression und Stabilität beeinflusst (106). Diese Interaktion ist durch Zugabe von IMiDs gestört, welches eine mögliche Erklärung für den anti-MM-Effekt und verschiedene Nebenwirkungen wie Thromboembolien und Neuropathien darstellt (106). Eine weitere antitumorale Wirkung zeigen IMiDs durch die Störung der Bindung von CRBN an die Zellmembranproteine CD147 und Monocarboxylat-Transporter 1 (MCT1), wodurch normalerweise deren Komplexbildung mit folgender proliferativen und angiogenen Wirkung gefördert wird und es so zur Destabilisierung dieses Komplexes kommt (107).

Analog zur Wirkweise der IMiDs stellen eine verminderte CRBN-Expression sowie Mutationen von CRBN und DDB1 mögliche Ursachen für die Resistenzentwicklung dar, wobei diese fast ausschließlich im Krankheitsverlauf nach IMiD-Therapie nachweisbar sind (108–111). CRBN-Aberrationen waren in der Arbeit von Gooding et al. zudem mit einem niedrigerem PFS assoziiert (111). Als CRBN-unabhängiger Mechanismus zeigte sich in Lenalidomid-resistenten Zelllinien eine verstärkte Aktivierung des tumorfördernden Transkriptionsfaktors STAT3 (Signal transducer and activator of transcription) sowie eine gesteigerte autokrine IL-6-Produktion (112).

Weiterhin ließen sich eine verstärkte Aktivierung des Wnt/ β -Catenin- und des extrazellulär-signalregulierten Kinase (ERK)-Signalweges bei Lenalidomid-resistenten MM-Zellen feststellen (113,114).

Ng et al. sahen außerdem ein vermindertes Ansprechen auf IMiDs bei Zelllinien mit Hochregulation des Mitoseregulators Cyclin Dependent Kinase 6 (CDK6), währenddessen die Inhibition von CDK6 durch Palbociclib zur Wirkverstärkung von IMiDs führte (115).

Bei ca. 1/3 der Lenalidomid-refraktäre Patient*innen kommt es zu einem Ansprechen auf Pomalidomid, so dass zusätzlich substanzspezifische Resistenzmechanismen existieren (116).

Die noch in klinischen Studien geprüften CELMoDs stellen eine Weiterentwicklung der bisherigen IMiDs dar, die ebenfalls an CRBN binden, jedoch mit einer wesentlich höheren Affinität als Lenalidomid und Pomalidomid, so dass diese möglicherweise zur Überwindung der IMiD-Resistenz führen könnten (117).

1.4.4. Proteasominhibitoren

Aus der Klasse der Proteasominhibitoren sind derzeit die Substanzen Bortezomib, Carfilzomib und Ixazomib zugelassen. Sie hemmen spezifisch die Aktivität des 26S-Proteasoms, dabei liegt bei Bortezomib eine reversible und bei Carfilzomib eine irreversible Inhibition vor (118,119). Infolgedessen ist die Proteolyse der Ubiquitin-gebundenen Proteine nicht mehr möglich, so dass sich diese in der Zelle ansammeln und eine Stressreaktion des endoplasmatischen Retikulums auslösen (unfolded protein response, UPR), welche über verschiedene Signalkaskaden zur Apoptose der Zelle führt (120,121). Durch die gesteigerte Proteasomaktivität zum Abbau von unter anderem TP53 und dem NF- κ B-Inhibitor sind die malignen Plasmazellen besonders anfällig für die Blockade des Ubiquitin-Proteasom-Systems (122). So kommt es bei Blockade zur Hemmung des NF- κ B-Weges, Herunterregulierung von Wachstumsfaktoren, Suppression von Adhäsionsmolekülen und inhibierter Angiogenese (122–125).

Ein weiterer Wirkmechanismus besteht in der Induktion der Anti-MM-Immunantwort über den cGAS (cyclic GMP-AMP synthase) /STING (stimulator of interferon genes) -Weg mit daraus folgender Typ I Interferon Antwort und T-Zell-Aktivierung (126). Die durch Bortezomib ausgelöste UPR sorgt für die Expression von Calreticulin auf apoptotischen MM-Zellen, welche so von Dendritischen Zellen phagozytiert werden (127). Im Folgenden kommt es über den cGAS/STING-Weg zu einer MM-Immunität (126).

Die Hinzunahme von Bortezomib zur Induktionstherapie von NDMM mit Rd konnte das PFS von 30 auf 43 Monate und das OS von 64 auf 75 Monate erhöhen (3). Häufige Nebenwirkungen von Bortezomib sind unter anderem periphere Neuropathien, gastrointestinale Beschwerden, Fieber, Fatigue, Herpes Zoster und Zytopenien (3,128).

Insgesamt sind Proteasominhibitoren Bestandteil zahlreicher Medikamentenkombinationen, was jedoch auch die Entstehung von Resistenzen begünstigt, denen verschiedenste Mechanismen zu Grunde liegen. Eine Rolle für die Entwicklung einer Bortezomibresistenz spielt unter anderem die Ubiquitin-specific-protease-12 (USP12), welche durch erhöhte Aktivität den Autophagie-Mediator high-mobility-group-box-1-Protein (HMGB1) deubiquitiniert und so die basale Autophagie von MM-Zellen steigert (129). So werden die Auswirkungen der Proteasom-Blockade abgemildert. Autophagie stellt einen essenziellen Bestandteil der Pathophysiologie des MM dar und ist für die Proliferation der MM-Zellen notwendig, da so die potenziell toxischen fehlerhaften monoklonalen Antikörper aus der Zelle eliminiert werden können (130).

Einen weiteren Resistenzmechanismus konnten Lipchick et al. in ihrer Arbeit herausstellen, in der sich zeigte, dass der Spiegel der Fettsäuren-Elongase 6 (ELOVL6) bei Patient*innen mit fehlendem Ansprechen auf Bortezomib niedriger war als bei denen mit Ansprechen (131). Der Mechanismus beruht hierbei auf einer reduzierten Bortezomib-bedingten ER-Stressreaktion und damit einhergehender Zytotoxizität, welcher durch Erhöhung der ELOVL6-Spiegel und damit einhergehender lipotoxischen ER-Stressreaktion reversibel war (131).

In der Arbeit von Xie et al. wurde die Entstehung von Bortezomibresistenz auf Grundlage der durch Modulation der SUMOylierung des NF- κ B-Inhibitors I κ B α ausgelöste Aktivierung von NF- κ B herausgestellt, welche durch eine Herunterregulierung des Tumorsuppressors Sentrin/SUMO-specific-protease-2 (SEN2) bedingt wird (132). Die Überexpression von SEN2 wiederum induzierte das Ansprechen auf Bortezomib (132).

Mutationen der Bindungsstelle von Bortezomib, die Proteasomenuntereinheit β Typ 5 (PSMB5), können ebenfalls eine Resistenz verursachen, welche potenziell auch den Proteasominhibitor Carfilzomib betrifft (133).

Im Rahmen der t(14;16) kann zudem auch eine initiale Proteasominhibitor-Resistenz des MM bestehen, da bei Patient*innen mit dieser Translokation oft der Transkriptionsfaktor MAF in höheren Konzentrationen vorliegt und dies mit einer Proteasominhibitor-Resistenz einhergeht (134). Durch MAF kommt es unter anderem zur erhöhten Apoptoserate bei T-Zellen (135). Dabei kommt es zusätzlich zu dem Effekt, dass unter Proteasominhibitor-Therapie der durch die Glykogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK3 β) gesteuerte Abbau von MAF gehemmt wird, was wiederum die Proteasominhibitor-Resistenz fördert (134).

1.4.5. Monoklonale Antikörper

Aus der Gruppe der monoklonalen Antikörper (mAb) stehen für die Therapie des MM zurzeit die beiden anti-CD38-Antikörper Daratumumab und Isatuximab sowie der anti-SLAMF7-Antikörper Elotuzumab zur Verfügung.

CD38 ist ein auf vielen Zelltypen vorkommendes Antigen, welches sich neben Myelomzellen auch auf anderen Blutzellen wie Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen und NK-Zellen befindet (136). Myelomzellen weisen jedoch eine besonders hohe Expression von CD38 auf. Durch Daratumumab-Bindung an MM-Zellen kommt es unter anderem über Bindung des Komplementfaktors C1q zur Aktivierung des Kom-

plementsystems, zur Bildung des membrane attack complex (MAC) und damit zur Komplement-vermittelten MM-Apoptose (complement-dependent cytotoxicity, CDC) (137). Daratumumab wirkt auch über Immunzellen gegen das MM (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC), indem der Fc γ -Rezeptor von Effektorzellen, wie zum Beispiel NK-Zellen und M1-Makrophagen, an das Fc-Fragment des mAb bindet und über die Induktion einer intrazellulären Phosphorylierung zur Lyse der MM-Zelle führt (137,138). Zusätzliche immunmodulierende Effekte zeigen Daratumumab und Isatuximab durch die Reduktion der immunsuppressiv wirkenden CD38+-Subpopulation von regulatorischen T-Zellen (T_{reg}), was eine Erhöhung der Zahl von T-Helfer und zytotoxischen T-Zellen und damit einer verstärkten T-Zell-Antwort gegen das MM zur Folge hat (139,140). Die CD38-Expression dieser T_{reg} kann durch Lenalidomid und Pomalidomid gesteigert werden (140). Zudem kommt es durch Daratumumab zur Makrophagen-vermittelten Phagozytose der Myelomzellen (antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP) (141). Daratumumab ist in zahlreichen Kombinationen sowohl für das NDMM als auch für das RRMM zugelassen und zeigt sich als sehr potente Substanz innerhalb der Therapie des MM. So konnte man in Kombination mit Lenalidomid und Dexamethason bzw. Bortezomib und Dexamethason eine Steigerung des mittleren progressionsfreien Überlebens bei RRMM von 17,5 auf 45,8 Monate bzw. von 7,1 auf 16,7 Monate erreichen (142,143). Auch in der Therapie des NDMM zeigt sich Daratumumab wirksam. Sowohl in Kombination mit VTd bei transplantationsfähigen als auch in Kombination mit Rd bei nicht-transplantationsfähigen Patient*innen konnte ein signifikant höherer Anteil an MRD-Negativität (64% vs. 44% bzw. 24,2% vs. 7,3% im FACS mit Sensitivität von 10⁻⁵) erreicht werden (37,45).

Wie viele andere Substanzen verliert Daratumumab jedoch bei fortgeschrittenen MM oder EMM die Wirksamkeit, so dass ein frühzeitiger Einsatz in der MM-Therapie propagiert wird (144). Die Metaanalyse von Giri et al. stellte eine gute Wirksamkeit auch bei HRMM fest (145).

Zu den häufigsten Nebenwirkungen zählen Infusionsreaktionen, Fatigue, gastrointestinale Beschwerden, Pyrexie, Husten, Zytopenien, periphere Ödeme, periphere sensorische Neuropathie und Infektionen der oberen Atemwege (37, 45, 55,57).

Seit 2020 ist Daratumumab auch für die subkutane Applikation zugelassen (146).

Bisher fehlen valide prospektive Daten größerer Patient*innenkollektive zur sequenziellen Gabe der beiden CD38-Antikörper Daratumumab und Isatuximab. Eine Wirkung trotz Rezidiv nach einem der beiden wäre jedoch denkbar, da sie aufgrund verschiedener

Epitope unterschiedliche Ausprägungen der verschiedenen Wirkungsmechanismen (ADCC, CDC, ADCP) vorzeigen (147). Zudem zeigt Isatuximab im Gegensatz zu Daratumumab auch eine Fc-unabhängige direkte zytotoxische Wirkung auf MM-Zellen (148). Trotz der guten Wirksamkeit kommt es im Krankheitsverlauf zur Daratumumab-Resistenz. Entsprechend der überwiegend indirekten Wirkung gegen das MM zeigt sich das Ansprechen auf Daratumumab in der Arbeit von Pick et al. unabhängig von der CD38-Expression der MM-Zellen, so dass diese nicht als prädiktiver Marker für den Therapieerfolg genutzt werden kann (144). Auch Viola et al. konnten herausstellen, dass der Verlust der CD38-Expression auf Effektor-Immunezellen mit fehlender Daratumumab-Sensitivität korrelierte, während der CD38-Verlust auf MM-Zellen wenig relevant für die Resistenzentstehung erschien (149).

Eine rückläufige CD38-Expression kann mittels Endozytose, Trogozytose oder Freisetzung von CD38-exprimierenden Mikrovesikeln vermittelt sein, welche über Adenosin-Produktion zusätzlich immunsuppressiv wirken (150–154). Die Immunsuppression führt unter anderem zur Abnahme von T-Gedächtnis-Zellen und M1-Makrophagen (155). Durch Überexpression von CD47 und der Komplement-inhibierenden Proteine CD55 und CD59 können die MM-Zellen der ADPC bzw. CDC entgehen (150,156). Zudem werden CD38+ NK-Zellen selbst Ziel der ADCC, so dass die Zellzahl unter der Therapie stark abnimmt und so die Daratumumab-Effektivität in vivo beeinflussen könnte, auch wenn in vitro die Aktivität der verbliebenden NK-Zellen einen ausreichenden Anti-MM-Effekt erzielen konnten (157). Zudem kommt es auch durch die Produktion von Survivin durch die BMMSZ zur Resistenzförderung gegen Daratumumab (158).

Das Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family member 7 (SLAMF7; auch CD319, CS1, CRACC) ist ein Protein, welches sich auf Myelomzellen, NK-Zellen, B-Zellen, bestimmten T-Zellen und Makrophagen befindet (159,160). Ähnlich wie Daratumumab zeigt auch Elotuzumab eine anti-Myelomwirkung über ADCC und ADCP. Der dahinterstehende Mechanismus beruht auf die Bindung des Fab-Teils an SLAMF7 auf den Myelomzellen und des Fc-Teils des Antikörpers an CD16 auf NK-Zellen oder Makrophagen (159,161). Er aktiviert die NK-Zellen über CD16 und bewirkt über Degranulation eine Zytotoxizität gegenüber den Myelomzellen (162). Elotuzumab kann auch eine SLAMF7-SLAMF7-Interaktion zwischen NK- und Myelomzellen herstellen (163,164). Zudem ist Elotuzumab auch in der Lage NK-Zellen direkt durch die Bindung an deren SLAMF7 zu aktivieren, was eine Zytotoxizität gegen SLAMF7+ MM-Zellen bewirkt (163).

Im Gegensatz zu Daratumumab nimmt der Anteil von NK-Zellen unter Elotuzumabtherapie jedoch kaum ab, es kommt also nicht zum zytotoxischen Effekt von NK-Zellen auf andere NK-Zellen (159,162). Bortezomib und Lenalidomid können durch Steigerung der ADCC in vitro eine synergistische Wirkung mit Elotuzumab eingehen (165,166).

Die Arbeit von Kikuchi et al. zeigte zudem die Wirksamkeit des mAb über gelöstes SLAMF7 (soluble SLAMF7, sSLAMF7), welches durch Interaktion mit dem Oberflächen-SLAMF7 eine proliferative Wirkung auf Myelomzellen zeigt (167). Durch Bindung von sSLAMF7 an Elotuzumab fiel dieser Wachstumsreiz weg (167). Verstärkt werden kann dieser Effekt durch die Zugabe von IMiDs, da deren Zielstruktur IKZF1 als Transkriptionsaktivator für SLAMF7 dient und so die Oberflächenexpression von SLAMF7 reduziert wird (167). Zudem würde sSLAMF7 potenziell als prädiktiver Marker für die Sensitivität auf eine Elotuzumabtherapie in Frage kommen (167). Ein weiterer Wirkmechanismus stellt die herabgesetzte Bindung von MM-Zellen an BMMSC dar (168).

Im Rahmen der ersten Phase-I-Studie zeigte sich keine signifikante Wirksamkeit von Elotuzumab in der Monotherapie bei RRMM (169). In der Kombinationstherapie mit Lenalidomid und Dexamethason bei Patient*innen mit RRMM konnte das mediane PFS in der ELOQUENT-2-Studie im Vergleich zur Kontrollgruppe von 14,9 Monate auf 19,4 Monate gesteigert werden, die mediane Überlebenszeit war um 4,1 Monate länger (54). Durch die Hinzunahme von Elotuzumab zu Pomalidomid und Dexamethason stieg das PFS in der ELOQUENT-3-Studie bei RRMM von 4,7 auf 10,3 Monate (53). Dagegen zeigte sich für Elotuzumab sowohl in der GMMG-HD6-Studie als auch in der SWOG-1211-Studie (beide VRD +/- Elotuzumab) kein signifikanter Vorteil bezüglich PFS oder OS innerhalb der Erstlinientherapie (170,171).

Wichtige Nebenwirkungen des Antikörpers sind Infusionsreaktionen, Durchfall, Herpes Zoster, Nasopharyngitis, Husten, Pneumonie, Infektionen der oberen Atemwege, Lymphopenie und Gewichtsverlust (53,54).

Zu den bisher noch wenig erforschten Resistenzmechanismen zählen angelehnt an die Wirkweise vor allem Veränderungen der Immunabwehr. Ein Fehlen von unreifen NK-Zellen ist assoziiert mit einem schlechteren Ansprechen auf Elotuzumab (172). Wang et al. stellten eine Reduzierung des Zytokins CCL20 (CC-chemokine ligand 20), welches eine Rolle in der Chemotaxis der Lymphozyten spielt, in resistenten Zelllinien und MM-Zellen von RRMM fest (173).

1.4.6. SUMO-Inhibitoren

Eine Form der posttranslationalen Modifikation stellt die SUMOylierung dar, bei welcher sich SUMO-Proteine (small ubiquitin-related modifier) reversibel kovalent an Lysinreste anderer Proteine binden. Darüber werden zahlreiche wichtige Vorgänge wie Zellzyklusregulation, DNA-Reparation, Proliferation und Apoptose reguliert (174,175). Dieser Prozess ist in vielen Tumorentitäten hochreguliert und stellt somit einen potenziellen therapeutischen Angriffspunkt dar. Die SUMOylierung ist über das Protoonkogen Myc reguliert und für den apoptotischen Effekt der SUMO-Inhibition ist eine hohe Myc-Expression notwendig (176–178). Auch beim Multiplen Myelom spielt die Myc-Aktivierung eine relevante Rolle in der Pathophysiologie (179). Zudem ist die SUMOylierung beim MM auch erhöht, weshalb der SUMO-Inhibition auch hier eine mögliche Therapiestrategie darstellt (180). Driscoll et al. konnten zeigen, dass beim MM und MGUS unter anderem die kodierenden Gene für das Konjugations-Enzym (E2) UBE21 und das Ligase-Enzym (E3) PIAS1 im Vergleich zu gesunden Plasmazellen hochreguliert sind und deren Expression negativ mit dem OS nach einer Melphalan-Hochdosistherapie korreliert (6-Jahre-Überleben 45% vs. 80% über Median vs. unter Median) (180). Die Inaktivierung von UBE21 konnte zudem die Strahlensensitivität von Myelom-Zelllinien erhöhen und die Adhärenz an BMMSC erniedrigen (180). Ein weiterer Mechanismus der SUMOylierung stellt der Wnt/ β -Catenin-Signalweg dar, dessen Aktivierung mit der MM-Proliferation einhergeht (181,182). β -Catenin stellt ein Substrat der SUMOylierung dar, so dass durch SUMO-Inhibition β -Catenin über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut wird und damit der Wnt/ β -Catenin-Weg blockiert wird (182). Der Prozess der SUMOylierung spielt zudem auch eine Rolle für die Ausbildung von Medikamentenresistenzen, so ist beispielsweise die Expression der Sentrin-spezifischen Proteasen (SENPs), welche für die SUMO-Loslösung und damit für die DeSUMOylierung verantwortlich sind, bei bortezomibresistenten MM-Zellen deutlich herunterreguliert (132).

Ein Vertreter aus der Gruppe der SUMO-Inhibitoren stellt TAK-981 (Subasumstat) dar, welcher die SUMO-Aktivierung über Bindung an das Aktivierungsenzym E1 (SAE) inhibiert. Im Maus-Modell und bei Testung primärer Tumorzellen zeigte sich eine Typ-I-Interferon-abhängige Aktivierung des Immunsystems über Makrophagen, T-Zellen, NK-Zellen und dendritische Zellen (183–185).

Im Rahmen von Phase-I/II-Studien wird aktuell die klinische Anwendbarkeit von TAK-981 bei fortgeschrittenen/metastasierten soliden Tumoren und Lymphomen eruiert

(NCT03648372, NCT04074330 und NCT04381650). Dabei zeigt sich bisher in Kombination mit Rituximab bei rezidivierten/refraktären aggressiven B-Zell-NHL eine ORR von 29% bei gutem Sicherheitsprofil (186).

Heynen et al. konnten sowohl im Mausmodell als auch an primären MM-Zellen in-vitro eine Wirksamkeit von TAK-981 beim MM darstellen mit einer synergistischen Wirkung mit Carfilzomib (187).

Aktuell liegen noch keine Daten zur klinischen Wirksamkeit von SUMOi beim MM vor (Stand 11/2022).

1.5. Personalisierte Medizin beim Multiplen Myelom

Trotz einer Vielzahl an neuen Erkenntnissen zur Biologie, Genetik und Resistenzmechanismen des MM fehlt es bisher an etablierten prädiktiven Markern zur Therapieauswahl der häufig eingesetzten Substanzen. Wie unter 1.2. beschrieben, unterliegt das MM einer klonalen Heterogenität sowie einer genetischen Evolution. Diese wird entscheidend durch die Therapieauswahl beeinflusst, da jedes Medikament einen Selektionsdruck auf die MM-Zellen ausübt. So besteht das Risiko bei einer suboptimalen, nicht alle Subklone angreifenden Therapie, einen aggressiven Klon zu selektieren und eine zügige Krankheitsprogression herbeizuführen oder andererseits, bei einer zu intensiven Therapie, eine Übertherapie mit Auftreten von vermeidbarer Toxizität durchzuführen. Es stellt somit eine Notwendigkeit dar, prädiktive Marker zu finden, mittels derer eine personalisierte effektive Substanzauswahl getroffen werden kann, durch die alle relevanten Klone des MM suffizient eliminiert werden können. So könnte sowohl PFS als auch die Lebensqualität der Patient*innen signifikant verbessert werden (188).

Eine mögliche Umsetzung von Biomarker-basierter Therapie stellt Venetoclax, ein Inhibitor des anti-apoptotischen Proteins bcl2, dar. Bei der Verwendung von Venetoclax in klinischen Studien zeigte sich ein Unterschied des Therapieerfolgs von Venetoclax in Abhängigkeit vom Vorhandensein einer t(11;14). So erreichten Patient*innen mit RRMM durch verschiedene Venetoclax-haltige Regime eine ORR von durchschnittlich 56% mit t(11;14) im Vergleich zu 33% ohne t(11;14) (189). Es konnte festgestellt werden, dass bei Patient*innen mit t(11;14) die bcl2-Expression wesentlich höher war als bei denen ohne (190). Aus diesem Grund wurde der Nachweis von t(11;14) in den Nachfolgestudien als Einschlusskriterium hinzugefügt (NCT03539744, NCT01794520, NCT03314181, NCT02899052).

Ein weiteres Beispiel personalisierter Medizin beim MM stellt die Anwendung von BRAF/MEK-Inhibitoren bei nachgewiesener BRAF V600E-Mutation dar, welche bei etwa 5% der Myelome, insbesondere im Rezidiv, nachweisbar ist. Im Rahmen der aktuell laufenden GMMG-BIRMA-Studie konnte so bei RRMM im Rahmen der ersten Zwischenanalyse eine ORR von 82% erreicht werden (NCT02834364) (191).

Die gezielte Therapie von bestimmten Treibermutationen im Sinne von Präzisionsmedizin wird aktuell auch in der Phase-1-Studie MyDRUG überprüft, in der Patient*innen mit RRMM zusätzlich zu Ixazomib, Pomalidomid und Dexamethason je nach Genetik eine Targeted therapy wie beispielsweise Cobimetinib bei vorliegender RAF/RAS-Mutation oder Daratumumab erhalten (NCT03732703).

Eine an die Ergebnisse der DNA- und RNA-Sequenzierung angepasste Therapie erhielten auch Patient*innen mit RRMM in der Studie von Laganà et al. mit einer ORR von 66% (192).

Zudem kann das Risikoprofil im Sinne des (R-)ISS-Stadiums oder des alleinigen Vorliegens von Hochrisiko-Aberrationen der Patient*innen zur individuellen Therapieentscheidung herangezogen werden. So gibt es Hinweise für eine Prognoseverbesserung bei Durchführung einer Tandem-Transplantation bei Patient*innen mit HRMM (40). Zudem scheint die frühe Therapie mit Bortezomib bei Vorliegen der Hochrisiko-Aberrationen del(17p) oder t(4;14) die schlechte Prognose dieses Patientenkollektivs teilweise überwinden zu können, so dass sie sich der von Patient*innen mit Standardrisiko annähert (43, 128,193). Im Rahmen der GMMG-CONCEPT-Studie wird zudem aktuell die Wirksamkeit und Verträglichkeit einer verglichen mit der Standardtherapie intensiveren Therapie mit dem Quadrupel Isatuximab, Carfilzomib, Lenalidomid und Dexamethason (Isa-KRd) bei NDMM mit ISS II/III und Hochrisiko-Aberration (del(17p), t(14;16), t(4;14) oder amp(1q21) > 3 Kopien) untersucht (NCT03104842). Die erste Interimsanalyse zeigte dabei eine ORR von 100% innerhalb der Induktionstherapie, 90% erreichten \geq VGPR und die 2-Jahres-PFS-Rate betrug 75,5% (194). Auch die OPTIMUM/MUKnine-Studie evaluierte die Effektivität einer intensiven Therapie (Daratumumab, Cyclophosphamid, Bortezomib, Lenalidomid, Dexamethason) für Ultrahochrisiko-Patient*innen (\geq 2 Hochrisikoaberrationen oder Plasmazelleukämie), die ORR betrug zum Ende der Induktion 94% mit 80% \geq VGPR (NCT03188172) (195).

Ein weiterer potenzieller therapieentscheidender Faktor stellt der MRD-Status der Patient*innen dar. So wäre es eine mögliche Idee, die Therapie bei vorliegender MRD-Negativität zu deeskalieren oder bei MRD-Positivität zu eskalieren. Eine prospektive Arbeit

konnte eine signifikante Verlängerung des PFS bei MRD-basierter Therapieentscheidung (104 vs. 62 Monate) zeigen, jedoch wurden von den insgesamt 400 Patienten nur 67 MRD-basiert behandelt (196). Bisher fehlen größere prospektive Studien, die für dieses Vorgehen einen Vorteil im PFS, OS und der Lebensqualität zeigen. Zudem ist die MRD-Diagnostik bisher nicht überall verfügbar und es fehlen einheitliche Standards (s. 1.1).

Eine weitere Möglichkeit für die Vorhersage des individuellen Therapieansprechens ist die Nutzung von GEP zur Identifikation von speziellen Gensignaturen, die mit Resistenzen gegen bestimmte Substanzen einhergehen. Bhutani et al. konnten mittels einer Signatur bestehend aus 14 Genen einen guten Prognosescore für die Wirksamkeit von IMiDs erstellen, der mit dem unterschiedlichen PFS des Patientenkollektivs aus mehreren prospektiven klinischen Studien korrelierte (197). In einer weiteren Arbeit konnte mittels einer 8-Gene-GEP-Signatur das Erreichen einer CR unter einer Thalidomid-Dexamethason-Therapie in 71% der Fälle richtig vorhergesagt werden (198). Erfolgreich zeigte sich auch eine GEP-Signatur aus 42 Genen, die mit der Tiefe des Ansprechens auf eine Proteasominhibitor-Therapie korrelierte (199). Limitierend stellt sich jedoch die niedrigere Verfügbarkeit von GEP sowie die fehlende Validierung für den klinischen Gebrauch dar.

Auch Single-cell-sequencing stellt eine mögliche Methode dar, das Therapieansprechen von Patient*innen vorherzusagen. So konnten Mitra et al. Resistenzen auf Proteasominhibitoren mit definierten Gensignaturen auf Einzelzellniveau detektieren (199).

Als nicht-invasive Diagnostik bietet die Liquid Biopsy eine weitere Analysemöglichkeit, die zudem die räumliche Heterogenität der Erkrankung überwindet. So konnte die Expression von 6 zirkulierenden microRNAs in Patient*innen mit RRMM das Outcome nach einer Rd-Therapie vorhersagen (200). Die Arbeit von Zhang et al. zeigte zudem die Verminderung von einigen exosomalen microRNAs in der Liquid Biopsy von Patient*innen mit Bortezomibresistenz (201).

Ein weiterer Ansatz ist es, mittels Proteomics Biomarker mit therapieprädiktiver Aussagekraft zu finden. Es liegen Arbeiten zu zahlreichen potenziellen Markern vor, beispielsweise konnte Ting et al. mit der Erstellung eines Biomarkerpanels bestehend aus den Proteinen Angiogenin, Clusterin, Komplementfaktor C1q, Albumin, Beta-2-Mikroglobulin, M-Protein und Leichtketten-Ratio prädiktiv das Ansprechen auf eine Bortezomib-haltige Induktionstherapie bestimmen (202). Auch eine erhöhte Expression von Apolipoprotein C-1 stellt einen möglichen Marker für Non-Responder einer Bortezomibtherapie dar (203).

Für die Vorhersage des Ansprechens auf IMiDs wurde unter anderem die Expression von CRBN untersucht, Broyl et al. konnten eine Korrelation von höheren CRBN-Leveln mit einem längeren PFS nach einer Thalidomid-Erhaltungstherapie sehen (204). Auch die Expression von IKZF1 als Marker für das Ansprechen auf IMiDs wurde experimentell evaluiert, jedoch ist die Studienlage kontrovers (101,102).

Insgesamt gibt es viele unterschiedliche Ansätze im Bereich der personalisierten Medizin beim MM, jedoch fehlt es aktuell an etablierten prädiktiven Markern zur Unterstützung der Therapieentscheidung. Dies ist neben der oft nur kleinen getesteten Patientenkohorten insbesondere durch die Anwendung von 3er und 4er Kombinationen in der MM-Therapie bedingt, da dies eine Korrelation von potenziellen Markern zum individuellen Ansprechen auf die einzelnen Substanzen wesentlich erschwert. Aus diesem Grund erscheint eine in-vitro-Testung von Einzelsubstanzen an den primären MM-Zellen als geeignete Lösung, um Korrelationen zu verschiedenen biochemischen und genetischen Markern herauszustellen. Auch beschränken sich die derzeitigen Arbeiten fast ausschließlich auf Proteasominhibitoren und IMiDs, Daten zu Biomarkern für mAb, Kortikosteroide oder eine Melphalan-Hochdosistherapie sind kaum Gegenstand aktueller Forschung.

Erschwerend kommt hinzu, dass das MM wie unter 1.2. beschrieben eine genetisch und räumlich sehr heterogene Erkrankung mit dem gleichzeitigen Vorliegen verschiedener Subklone darstellt, so dass für alle relevanten Subklone die entsprechenden prädiktiven Marker für das Therapieansprechen identifiziert werden müssten.

1.6. Tumor-Microenvironment beim Multiplen Myelom

1.6.1. NK-Zellen

NK-Zellen gehören zu den Lymphozyten und sind als Teil des angeborenen Immunsystems in der Lage, virusinfizierte und maligne entartete Zellen durch deren fehlende MHC-I-Expression zu erkennen und durch Freisetzung von Proteasen deren Apoptose zu induzieren (205).

Die NK-Zellen beim MM (MM-NK-Zellen) zeigen sich im Vergleich zu NK-Zellen gesunder Probanden (HD-NK-Zellen) in ihrer Funktion verändert. Die MM-NK-Zellen sind im Vergleich zu HD-NK-Zellen unreifer und exprimieren unter anderem niedrigere Level von CD16, was mit einer niedrigeren Zytotoxizität einhergeht (206,207). Im Verlauf der Erkrankung werden die MM-Zellen zunehmend resistenter gegenüber der NK-Zellen. So zeigt die Arbeit von Carbone et al. eine NK-Resistenz von fortgeschrittenen MM-Zellen

durch erhöhte MHC-I-Expression (208). Es konnte festgestellt werden, dass Bortezomib die MHC-I-Expression und damit auch die NK-Wirksamkeit gegen das MM steigern kann (209). Zudem zeigte die Arbeit von Pazina et al. eine negative Korrelation der SLAMF7-Expression auf NK-Zellen mit dem PFS (206).

Des Weiteren entkommen die MM-Zellen der NK-Zytotoxizität durch de-novo-Expression von programmed death protein 1 (PD-1) auf den MM-NK-Zellen, wodurch die körpereigene Tumorabwehr verhindert wird (210).

NK-Zellen spielen insbesondere bei den IMiDs, Pls, mAbs und SUMOi eine entscheidende Rolle für die MM-Wirkung und damit auch für die Resistenzentstehung (s. 1.4.3. - 1.4.6.), so dass deren Ko-Lokalisation bzw. Zell-Zell-Kontakt zu den MM-Zellen auch in der in-vitro-Testung entscheidend für Wirkdetektion ist. Die sinkende zytotoxische Wirkung der NK-Zellen auf die MM-Zellen stellt einen möglichen Grund für eine verminderte Wirkung dieser Substanzen beim fortgeschrittenen MM dar.

1.6.2. T-Zellen

T-Zellen sind eine Subpopulation der Lymphozyten und teilen sich wiederum auf in T-Helfer-Zellen (CD4+), zytotoxische T-Zellen (CD8+), regulatorische T-Zellen (T_{reg}), T-Gedächtniszellen und Natürliche Killer-T-Zellen (NK-T-Zellen). Nach Antigenerkennung über den T-Zell-Rezeptor kommt es je nach Subtyp der T-Zellen zur Apoptoseinduktion der Zielzelle, Zytokinfreisetzung und Immunmodulation (211).

Beim MM liegen sowohl quantitative als auch qualitative Veränderungen der T-Zellen vor. So kennzeichnet sich die Erkrankung durch eine niedrige periphere CD4+/CD8+-Ratio, welche im Erkrankungsverlauf weiter sinkt und mit einem schlechterem OS assoziiert ist (212). Des Weiteren zeigt sich eine Erhöhung der T_{reg} im peripheren Blut sowohl beim MM als auch bereits beim MGUS, die durch ihre immunsuppressive Wirkung die Tumorpherifation fördern (213). Mittels Expression von PD-L1 entkommen die MM-Zellen der durch die zytotoxischen T-Zellen-vermittelten Apoptose (214). Zudem wird die T-Zell-Proliferation durch die Sekretion des immunsuppressiven Zytokins transforming-growth-factor- β (TGF- β) und daraus folgender erniedrigter Sensitivität der T-Zellen gegenüber IL-2 gehemmt (215).

Auch die T-Zellen sind für den Wirkmechanismus vieler Myelommedikamente und der Resistenzentwicklung gegen diese mit verantwortlich, wie unter 1.4. beschrieben, so

dass eine Mitbetrachtung dieser Zellart bei der Wirkmessung verschiedener Substanzen sinnvoll erscheint.

1.6.3. Mesenchymale Knochenmarkstromazellen (BMMSC)

Die mesenchymale Knochenmarkstromazellen (BMMSC) bilden einen relevanten Bestandteil der Knochenmarksnische durch Produktion der Extrazellulärmatrix. Sie besitzen das Potential sich in Chondroblasten, Adipozyten und Osteoblasten zu differenzieren (216). Durch Produktion von IL-6 haben sie eine immunsuppressive Wirkung, wodurch sie für die Proliferation von Tumorzellen eine wichtige Rolle spielen (217).

BMMSC und Plasmazellen stehen über zahlreiche Wechselwirkungen miteinander in Verbindung, über die bei Plasmazellen das Überleben, die Proliferation und bei malignen Plasmazellen die Therapieresistenzentwicklung gefördert werden, während primäre Plasmazellen in Monokultur rasch in Apoptose gehen.

BMMSC und Plasmazellen durchlaufen während der Entwicklung zum Myelom vermutlich eine Ko-Evolution. Beim Myelom kommt es zwischen beiden Zelltypen durch Aktivierung des Jagged2-Notch2-Signalweges zur Abnahme der microRNA-223 in den MM-BMMSC und dadurch zur gesteigerten Produktion von VEGF und IL-6, welche die Proliferation des MM fördern (218). Die MM-BMMSC sind durch einen inflammatorischen Phänotyp gekennzeichnet, der insbesondere durch NF- κ B, tumor necrosis factor (TNF) und IL-1 β ausgelöst wird (219). Dieser Zustand ist auch durch Therapie nicht reversibel, was womöglich eine Ursache für die Rezidiventstehung darstellt (219). Durch Adhäsion von MM-Zellen an BMMSC kommt es zur adhesion-mediated-immune-resistance (CAM-IR), indem die Lyse der Tumorzellen durch CD8 $^{+}$ -Zellen verhindert wird (220). Außerdem inhibieren die MM-BMMSC die Proliferation und Zytotoxizität von zytotoxischen T-Zellen (221). Weiterhin steigt die Expression von PD-L1 durch MM-Zellen in Ko-Kultur mit BMMSC, so dass zusätzlich der Immunescape gefördert wird (222).

Die Zell-Zell-Interaktion kann durch Lenalidomid gestört werden, was unter anderem zu einer verminderten Expression von PD-L1 führt (223).

Durch die aufgeführten Vorgänge sind die BMMSC wesentlich an der Pathogenese des MM beteiligt und begünstigen die Rezidiventstehung durch Resistenzentwicklung mittels der cell-adhesion-mediated-drug-resistance (CAM-DR). Unter anderem kommt es dabei durch die integrinvermittelte Adhäsion von MM-Zellen an BMMSC zur NF- κ B-Aktivierung (224). Eine mögliche Folge dessen ist die Hochregulation von miRNA-21, deren Inhibition

wiederum einen verbesserten Anti-MM-Effekt von Dexamethason und Doxorubicin bewirkt (225). Die Arbeit von Matula et al. konnte zudem zeigen, dass der mitochondriale Transfer zwischen MM-Zellen und BMMSC unter chemotherapeutischem Einfluss deutlich ansteigt, was das Überleben der MM-Zellen fördert und so vermutlich einen möglichen Resistenzmechanismus darstellt (226). Außerdem schützen die BMMSC die MM-Zellen auch vor der durch Daratumumab ausgelösten ADCC (158).

1.7. In-vitro Plattform von CellPly - Funktion und bisherige Anwendung

Das Gerät der Firma CellPly bietet eine Microwell-basierte high-throughput Plattform zur in-vitro Testung der Response von Tumorzellen auf verschiedene Therapeutika. Grundlage dafür ist Fluoreszenz-Markierung verschiedener Zellarten sowie deren Apoptose mit anschließend automatisierter bildbasierter Analyse von Zellviabilität, Zellbewegung und Zell-Zell-Interaktionen (227). Dabei können vollautomatisiert bis zu 16 verschiedene Konditionen mit jeweils 1200 Mikrowells in einem Durchlauf gemessen werden, was eine zeit-effektive Methode mit hoher statistischer Power darstellt (227). In der Arbeit von Rocchi et al. konnten durch Testung von Blasten aus dem Knochenmark von 14 Patient*innen mit neudiagnostizierter, refraktärer oder rezidivierter AML 5 Patient*innen als Responder identifiziert werden, von denen alle eine CR erreichten. 9 Patientenproben zeigten sich dagegen resistent, von denen sich 89% auch klinisch nur mit einer SD präsentierten (228). Zudem konnte eine sehr gute Korrelation der Messung des Blastenanteils der Proben durch FACS und der CellPly-Plattform festgestellt werden ($R^2=0,99$) (227).

Neben der AML wurde die CellPly-Plattform auch bereits für das MM angewendet. In der Arbeit von Bettelli et al. konnte gezeigt werden, dass sich die Methodik zur Messung der ADCC von Daratumumab eignet (229). Dabei wurde die Daratumumab-Wirksamkeit auf die MM-Zelllinie U266 in Ko-Kultur mit MNC aus MM-KM in Abhängigkeit von der Ko-Lokalisation von MM und NK-Zellen analysiert (229). Es zeigte sich zum einem, dass bei Verwendung von MNC allein eine Ko-Lokalisationsrate von ca. 1% vorlag, welche für eine weitere statistische Analyse ausreichend war (229). Zum anderen konnte durch vergleichende Messung der Viabilität von MM-Zellen in Abhängigkeit von deren Ko-Lokalisation mit NK-Zellen eine deutliche Wirkungsabhängigkeit von diesen gezeigt werden, wobei sich in einem Fall die Wirksamkeit nur in der Ko-Lokalisationsmessung und nicht in der NK-Zell-unabhängigen Messung zeigte (229).

Bis dato (Stand 11/2022) liegen für das MM jedoch noch keine Daten für die Testung mit weiteren Substanzen oder zur Korrelation der CellPly-Messungen mit dem klinischen

Outcome der Patient*innen vor. Neben NK-Zellen wurden zudem noch keine weiteren potenziellen Effektor-Zellen innerhalb der Plattform markiert und deren Einfluss auf die Wirksamkeit der verschiedenen Medikamente untersucht. Da die Plattform auf Zellen in Suspension ausgerichtet ist, ist bisher unklar, ob auch die Kultivierung adhärenter Zellen wie der BMMSK möglich ist.

1.8. In-vitro Analyseinstrumente zur Response-Prädiktion

Für die in-vitro Testung der individuellen MM-Patientenproben mit verschiedenen Therapeutika zur Resistenzdetektion wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Methoden veröffentlicht. Unter anderem haben Walker et al. in ihrer Arbeit die Plattform MyDST vorgestellt, mit welcher FACS-basiert die Viabilität der MM-Zellen von 55 Patient*innen nach Inkubation mit Cyclophosphamid, IMiDs, Proteasominhibitoren, Dexamethason und Daratumumab gemessen wurde (230). Dabei konnte eine Sensitivität von 96% und eine Spezifität von 88% in Bezug auf die Vorhersage des klinischen Therapieerfolgs erreicht werden (230).

Giliberto et al. nutzten ebenfalls eine Multiwell-Plattform zur high-throughput-Analyse von 30 verschiedenen Substanzen und 2-3er Kombinationen aus diesen. Dadurch konnten unter anderem neue synergistische Wirkungen identifiziert werden, wie beispielsweise zwischen dem noch nicht zugelassenen Alkylanz Melflufen und dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Panobinostat (231). In zwei ähnlichen Arbeiten mit gleicher Methodik wurden neben zugelassenen Substanzen auch weitere noch in klinischen Studien befindliche Medikamente in Monotherapie getestet, wodurch potentiell gut wirksame Therapeutika identifiziert werden konnten (232,233). In allen 3 Arbeiten wurden die in-vitro Ergebnisse zudem mit den genetischen Veränderungen der MM-Zellen korreliert, welche unter anderem das besser Ansprechen auf Venetoclax bei t(11;14) und auf IMiDs sowie Proteasominhibitoren bei t(4;14) und ein schlechteres auf Dexamethason und Venetoclax bei Zugewinn von 1q21 aufzeigte (231–233). Dies zeigt das Potential von high-throughput-Response-Analysen zur Evaluation von möglichen prädiktiven Markern. Zudem erhielten in einer der Arbeiten 3 RRMM ihre folgende Therapie auf Grundlage der in-vitro-Ergebnisse und zeigten alle ein klinisches Ansprechen (233).

Eine weitere Plattform stellt MicroC3 dar, die ähnlich der CellPly-Plattform auf einem Microfluidic-device und einer Fluoreszenzbildanalyse basiert, mit welcher erfolgreich die Resistenz auf Bortezomib von 17 Patient*innen identifiziert werden konnte (234). Ähn-

lich wird auch bei der EMMA-Plattform über Immunfluoreszenz, Bildanalyse und anschließender Nutzung mathematischer Modelle das klinische Ansprechen anhand des in-vitro Testens von bis zu 31 Therapeutika prädiziert, wobei 96% der 52 Patient*innen korrekt als Responder oder Non-Responder eingestuft wurden (235).

Trotz der verschiedenen vorgestellten Plattformen zur in-vitro Messung des individuellen Therapianansprechens mit teilweise vielversprechenden Korrelationen zum klinischen Outcome hat sich bisher keine Methode zur breiten klinischen Anwendung etabliert. Ebenso existierten zum aktuellen Zeitpunkt (Stand 11/2022) keine randomisierten prospektiven Studien zur Evaluation Korrelation der in-vitro-Ergebnisse mit dem in-vivo-Outcome beim MM. Zudem bietet keine der oben genannten Plattformen die Möglichkeit gleichzeitig die Auswirkung von Zell-Zell-Kontakten zu anderen Zelltypen auf die Wirksamkeit der verschiedenen Substanzen zu analysieren.

1.9. Zielsetzung der Arbeit

Angesichts der hohen Anzahl verfügbarer Substanzen zur Behandlung des MM und gleichzeitigem Fehlen von etablierten prognostischen Faktoren für das Ansprechen der individuellen Patient*innen auf die jeweilige Therapie ist das Ziel dieser Arbeit die Überprüfung der Anwendbarkeit der CellPly-Technologie zur Prädiktion des individuellen Therapieansprechens in-vivo durch Testung von Myelomzellen in-vitro. Dabei werden als Vertreter der Substanzgruppen Lenalidomid, Bortezomib, Dexamethason, Melphalan, E-lotuzumab und Daratumumab eingesetzt.

Aufgrund der unter 1.4.4. beschriebenen Beteiligung der SUMOylierung bei der Resistenzentwicklung gegen Bortezomib ist eine Überwindung eben dieser mittels Zugabe von SUMOi denkbar. Die vorliegende Arbeit soll überprüfen, ob sich die CellPly-Plattform für die präklinische Testung neuer potenzieller Therapeutika eignet und ob eine synergistische Wirkung von Bortezomib und SUMOi darstellbar ist. Verwendet wird hierfür der Vertreter Subasumstat.

Die T- und NK-Zellen sowie BMMSC spielen für viele Medikamente eine entscheidende Rolle im Wirkmechanismus und der Resistenzentstehung, so dass der Einfluss der Zell-Zell-Kontakte mit den Myelomzellen auf die Therapeutika-Suszeptibilität miterfasst werden soll.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

Tab. 6: Verwendete Reagenzien

Name	Hersteller
Accutase - Enzyme Cell Detachment Medium	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific (MA, USA)
Antibiotic-Antimycotic (100X), Gibco (AA)	Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
Aqua ppi	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Biocoll® Trennlösung	Biochrom GmbH (Berlin, Deutschland)
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Erythrocyte Lysis Buffer EL	Quiagen (Venlo, Niederlande)
Fetal bovine serum (FBS)	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich, Merck KGaA (Deutschland)
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Lonza Bioscience (Basel, Schweiz)
MACSxpress® Whole Blood NK Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
NaCl 0,9%	B. Braun (Melsungen, Deutschland)
Phosphate Buffered Saline (PBS), ohne Kalzium and Magnesium	Lonza Bioscience (Basel, Schweiz)
RPMI 1640 Medium, GlutaMAX™ Supplement, Gibco	Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
Sodium hypochlorite solution, 10%	Sigma-Aldrich, Merck KGaA (Deutschland)
Trypan Blue solution 0.4%	Thermo Fisher Scientific (MA, USA)

Tab. 7: Verwendete Medikamente

Name	Hersteller
Bortezomib (10mM)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA (Deutschland)
Daratumumab	Janssen-Cilag GmbH (Neuss, Deutschland)
Dexamethason (10mM)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA (Deutschland)
Elotuzumab	Bristol Myers Squibb™ (NY, USA)
Lenalidomid (10mM)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA (Deutschland)
Melphalan (10mM)	Sigma-Aldrich, Merck KGaA (Deutschland)
TAK-981 (10mM)	Takeda Pharmaceutical Company Limited (Tokyo, Japan)

Tab. 8: Verwendete Geräte

Name	Hersteller
Accu Pipette	Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
CellPly SUM-T1Z	CellPly s.r.l. (Bologna, Italy)
Gefrierschrank -20°C	Liebherr (Biberach, Germany)
Gefrierschrank -80°C	Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
Inkubator, Heraeus Instruments	Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
Kühlschrank Profiline, 2-8°C	Liebherr (Biberach, Germany)
MACSxpress	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Mikroskop AxioStar	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
Mikroskop Axiovert 10	Carl Zeiss AG (Oberkochen, Deutschland)
Neubauer-Zählkammer	BRAND GmbH (Wertheim, Deutschland)
Pipette 0,5-10µl	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Pipette 200-1000µl, Finnpipette	Thermo LabSystems, Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
Pipette 20-200µl	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Pipette 2-20µl	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Sterilbank, Typ: CA/REV 3	Clean Air Supplies Deutschland GmbH (Haan, Deutschland)
Wasserbad	Köttermann GmbH (Uetze, Deutschland)
Zentrifuge, Heraeus Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific (MA, USA)

Tab. 9: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
96-Well-Cell Culture Plate	Corning Incorporated- Life Science (Kennebunk, USA)
Biohazard Disposal Bags	Sigma-Aldrich, Merck KGaA (Deutschland)
CO-RE Tips (50µl; 300ul)	HAMILTON (Bonaduz, Schweiz)
Deckgläschen	Laboindustria S.p.A. (PD, Italy)
Eppendorfgefäße (0,5ml; 1,5ml)	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Falcon-Tubes (15ml, 50ml)	Corning Incorporated- Life Science (Kennebunk, USA)
Kryoröhrchen (1,8ml)	Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
Microdevices	CellPly s.r.l. (Bologna, Italy)
Nunc™ 96-Well MicroWell™ Platte, Polypropylen	Thermo Fisher Scientific (MA, USA)
Parafilm	Pechiney (Lyon, Frankreich)
Pasteurpipette (3,5ml)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen (10µl, 1000µl)	Biozym Scientific (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Pipettenspitzen (2-200µl; 1250µl)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Removable 8 Well PCR Tube Strip	Azenta Life Sciences (MA, USA)
Serologische Pipetten (5ml, 10ml)	Corning Incorporated- Life Science (Kennebunk, USA)
X-Pierce™ film	Sigma-Aldrich, Merck KGaA (Deutschland)
Zellkulturflaschen (25cm ³)	Corning Incorporated- Life Science (Kennebunk, USA)
Zellkulturflaschen (75cm ³)	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)

Tab. 10: Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien

Name	Zusammensetzung
Einfriermedium	Kulturmedium+10%DMSO
HS-5-Kulturmedium	IMDM+10%FBS+1%AA
U266-Kulturmedium	RPMI+10% FBS +1%AA
MNC-Kulturmedium	RPMI+20% FBS +1%AA

Tab. 11: Verwendete Fluoreszenzantikörper

Name	Hersteller
Alexa Fluor® 488 anti-human CD3 Anti-body	BioLegend (CA, USA)
Calcein AM (1mM)	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific (MA, USA)
BV421 Mouse Anti-Human CD16, Clone 3G8 (RUO)	BD Horizon™ (NJ, USA)
CD271 (NGF Receptor) Monoclonal Antibody (ME20.4), Alexa Fluor® 488	eBioscience™, Thermo Fischer Scientific (MA, USA)
BV421 Mouse Anti-Human CD56, Clone NCAM16.2 (RUO)	BD Horizon™ (NJ, USA)
CellTracker™ Blue CMAC Dye (10mM)	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific (MA, USA)
Mouse Anti Human CD138 Alexa Flour®647	Bio-Rad Laboratories Ltd. (Watford, UK)
Propidium Iodide (200µM)	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific (MA, USA)

Tab. 12: Verwendete Software

Software	Entwickler
CELLPLY CS	CellPly s.r.l. (Bologna, Italy)
GraphPad Prism 9	GraphPad Software Inc. (CA, USA)
ImageJ	NIH (MD, USA)
LabVIEW	National Instruments (TX, USA)
Microsoft Excel	Microsoft Corporation (WA, USA)
ply.control	CellPly s.r.l. (Bologna, Italy)

2.2. Zellkulturtechnik

2.2.1. Zelllinien

Tab. 13: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	HS-5 (CRL-11882™)	U266 (TIB-196™)
Beschreibung	H. sapiens, Knochenmarksstroma, gesund	H. sapiens, B-Lymphozyten aus peripherem Blut, MM
Art	adhärent	Suspension
Medium	IMDM + 20% FBS + 1% AA	RPMI + 10% FBS + 1% AA
Passagen	2x/Woche, im Wechsel 1:5 bzw. 1:8	2x/Woche, 200.000 Zellen/ml
Kulturbedingungen	37°C, 5% CO ₂	37°C, 5% CO ₂
ZK-Flasche	T75 mit 10ml Medium	T75 mit 16ml Medium
Zentrifugation	1200rpm 4 Minuten	600rpm 4 Minuten

2.2.2. Zählung der Zellen

Zum Zählen der Zellen wurde eine Neubauer-Zählkammer und die Färbung mit Trypanblau genutzt. Trypanblau ist ein anionischer Diazofarbstoff, der aufgrund seiner Molekülgröße nur von abgestorbenen Zellen mit nicht mehr intakter Zellmembran aufgenommen wird, wodurch eine mikroskopische Einschätzung der Zellviabilität ermöglicht wird. Dafür wurden 12,5µl Zelllösung mit 37,5µl einer 20%igen Trypanblau-Lösung versetzt. Davon wurden 10µl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Dann wurden die Zellen in allen vier Eckquadraten gezählt und mithilfe der Formel 1 wurde die Konzentration der Zellen berechnet.

Formel 1:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{4 (\text{Anzahl gezählter Quadrate})} * 4 (\text{Verdünnungsfaktor}) * 10^4$$

2.2.3. Ablösung adhärenter Zellen

Für die Passage der adhärenenten HS-5-Zellen wurden diese zuerst mittels Accutase gelöst, welches ein Gemisch aus proteolytischen und kollagenolytischen Enzymen darstellt. Dafür wurde zuerst das Zellkulturmedium aus der Zellkulturflasche entfernt, die Zellen einmal mit 5ml PBS gewaschen und schließlich mit 1,5ml Accutase benetzt. Die Zellkultur wurde dann für 15 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend wurde entweder die Reaktion durch Mediumzugabe zur Passage beendet oder die Zelllösung mit 5ml PBS gewaschen und anschließend bei 1200rpm für 4 Minuten zentrifugiert, wenn diese für ein Experiment genutzt wurden.

2.2.4. Zellpassage

Für die Passage der HS-5 wurden diese wie in 2.2.3. beschrieben zunächst gelöst und anschließend im wie unter 2.2.1. angegebenen Verhältnis gesplittet. Anschließend wurde die Zellkulturflasche mit frischem Kulturmedium auf 10ml aufgefüllt.

Für die Passage der Suspensionszellen der Linie U266 wurden diese zunächst komplett bei 600rpm für 4 Minuten zentrifugiert, mit frischem Medium resuspendiert und wie in 2.2.2. beschrieben gezählt. Das entsprechende Volumen mit 3,2 Mio. Zellen wurde erneut bei 600rpm für 4 Minuten zentrifugiert und mit 16ml frischem Kulturmedium für eine Konzentration von 200.000 Zellen/ml rekultiviert.

2.2.5. Einfrieren von Zellen

Als Einfriermedium wurde das entsprechende Kulturmedium mit zusätzlich 10% DMSO genutzt. DMSO verhindert die Ausbildung von Eiskristallen, so dass es als Gefrierschutzmittel dient. Zum Einfrieren wurden die adhärenenten Zellen wie in 2.2.3. beschrieben zunächst gelöst, mit PBS gewaschen und gezählt. Die Suspensionszellen wurden, wie bei der Passage, zunächst mit neuem Kulturmedium versetzt und anschließend gezählt.

Beide Zellarten wurden in dem vorgekühlten Einfriermedium mit einer Zielkonzentration von 4-6 Mio. Zellen/ml suspendiert, in ein Kryoröhrchen umgefüllt und rasch bei -80°C eingefroren. Einige Tage später wurden die Kryoröhrchen in Stickstoffcontainer umgelagert.

2.2.6. Auftauen von Zellen

Für das Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und die Zelllösung dann mit 9ml Kulturmedium gemischt und zentrifugiert, um das zytotoxische DMSO zu entfernen. Anschließend wurde das Zellpellet in neuem Kulturmedium gelöst, gezählt und in eine T25-Zellkulturflasche überführt und dann entsprechend des Wachstumes passagiert.

2.3. Probenaufbereitung

2.3.1. Ficoll -Dichtegradientenzentrifugation

Für die Untersuchung der primären Myelomzellen wurden KM-Aspirate mit EDTA-Zusatz von 22 Patient*innen am Tag der Entnahme verarbeitet. Es lag ein positives Ethikvotum sowie von allen Patient*innen eine unterschriebene Einverständniserklärung vor. Im ersten Schritt wurden die mononukleären Zellen aus den Proben mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll isoliert. Dies ist ein Copolymer aus Saccharose und Epichlorhydrin, welches eine höhere Dichte besitzt als mononukleäre Zellen und eine niedrigere als Erythrozyten und polymorphkernige Zellen. Dadurch kommt es bei der Zentrifugation zur Trennung dieser beiden Fraktionen. Dafür wurde das Knochenmark im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt. Bis zu 4ml dieser Mischung wurde dann auf jeweils 3ml Ficoll in mehreren 15ml Falcon-Röhrchen langsam pipettiert, ohne dass es zu einer Vermischung der beiden Phasen kam. Anschließend wurden die Proben für 15 Minuten bei 2000rpm ohne Bremse zentrifugiert und dann die Schicht der MNC mithilfe einer Pasteurpipette in ein neues Röhrchen transferiert. Die Zellen wurden dann mit der dreifachen Menge an PBS gewaschen und für 5 Minuten bei 2000rpm zentrifugiert.

2.3.2. Lyse

Falls sich im Zellpellet nach der Dichtegradientenzentrifugation noch sichtbar vorhandene Erythrozyten befanden, wurde dieses mit 5ml Lysepuffer für 5 Minuten inkubiert und dabei regelmäßig durchgemischt. Der Lysepuffer wurde durch eine Zentrifugation bei 1400rpm für 4 Minuten entfernt. Dieser Vorgang wurde insgesamt maximal zweimal durchgeführt, um eine gute Viabilität der empfindlichen Myelomzellen zu gewährleisten. Nach Abschluss der Lyse wurden die Zellen mit 7ml PBS und einer Zentrifugation bei 1200rpm für 4 Minuten gewaschen und anschließend in Kulturmedium gelöst.

2.3.3. Isolation von NK-Zellen aus peripherem Blut

Zur Isolation von NK-Zellen wurde das MACSxpress® Whole Blood NK Cell Isolation Kit von Miltenyi Biotec verwendet, welches eine Negativselektion von NK-Zellen ermöglicht. Grundlage dessen sind an magnetische Beads gekoppelte monoklonale Antikörper gegen alle Blutzellen außer NK-Zellen, die im Kit in lyophilisierter Form vorliegen und zur Verwendung in 7,5ml des mitgelieferten Puffers A rekonstituiert werden müssen. Für die Isolation wurde peripheres Blut mit EDTA-Zusatz eines Myelom-Patienten und eines gesunden Spenders entnommen und anschließend mit den gelösten Beads und dem Puffer B im Verhältnis 4:1:1 gemischt. Es folgte eine Inkubation über 5 Minuten bei Raumtemperatur unter regelmäßigem Schwenken. Danach wurde das geöffnete Röhrchen für 15 Minuten im MACSxpress® Separator platziert, wobei sich die markierten Zellen an den dem Magneten zugewandten Seiten dem Röhrchen anhaften und die Erythrozyten am Boden sedimentieren. So konnte der Überstand mit den isolierten NK-Zellen anschließend abpipettiert werden und bei 300xg für 10 Minuten zentrifugiert werden. Vor weiterer Verwendung wurde das Pellet einmalig wie unter 2.3.2. beschrieben lysiert, um restliche Erythrozyten zu entfernen und schließlich wurden die Zellen wie unter 2.2.2. beschrieben gezählt.

2.3.4. Fluoreszenzmarkierung

Die Zelllinien oder MNC wurden nach entsprechender Aufbereitung gezählt und die benötigte Zellmenge wurde mittels Zentrifugation (MNC: 1200rpm für 4 Minuten) isoliert. Dann folgte die Markierung mit einem Celltracker (CMAC oder Calcein AM) entsprechend Tab. 14 und anschließendem Auswaschen. Im nächsten Schritt wurden außerdem die gewünschten weiteren Zelltypen mit den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die jeweiligen Vorgehensweisen sind ebenfalls in Tab. 14 aufgeführt.

Der Apoptosemarker PI wurde direkt in die finalen Zelllösungen in die Wells gegeben und verblieb ohne Auswaschen in den einzelnen Konditionen.

Tab. 14: Verwendete Fluoreszenzantikörpern und ihre Anwendung

Fluoreszenzfarbstoff	Fluoreszenzfilter	Markierte Zellen	Verwendete Konzentration	Inkubation	Auswaschen
Calcein AM	FITC	Alle Lebenden	175nM in PBS	35min bei 37°C	1x mit PBS
CMAC	DAPI	Alle Lebenden	7µM in RPMI	40min. bei 37°C	1x mit Kulturmedium
Propidium Iodide (PI)	TRITC	Alle Apoptotischen	5µM in Kulturmedium	Direkt in Wells	-
Anti-CD138	CY5	CD138+ Myelomzellen	1:20 in PBS	15 Minuten bei 37°C	1x mit PBS und 1x mit Kulturmedium
Anti-CD16	DAPI	NK Zellen	1:40 in PBS	15 Minuten bei 37°C	1x mit PBS und 1x mit Kulturmedium
Anti-CD56	DAPI	NK Zellen	1:40 in PBS	15 Minuten bei 37°C	1x mit PBS und 1x mit Kulturmedium
Anti-CD271	FITC	Stromazellen	1:20 in PBS	15 Minuten bei 37°C	1x mit PBS und 1x mit Kulturmedium
Anti-CD3	FITC	T-Zellen	1:20 in PBS	15 Minuten bei 37°C	1x mit PBS und 1x mit Kulturmedium

2.4. CellPly

2.4.1. Funktionsprinzip

Die in-vitro Testung wurde unter Nutzung des Geräts der Firma CellPly durchgeführt, in welchem Temperatur, CO₂-Gehalt und Luftfeuchtigkeit individuell für die idealen Kulturbedingungen eingestellt werden können. In den folgenden Experimenten wurde immer bei 37°C, 5% CO₂ und 92% Luftfeuchtigkeit gearbeitet. Die Abbildung 1 zeigt alle Komponenten des Gerätes sowie das Mikrodevices.

Das Mikrodevice verfügt über 16 Mikrokanäle mit jeweils 1200 Mikrowells und einer Abflusskammer. Die Mikrowells befinden sich unter den Mikrokanälen und sind nach oben

und unten geöffnet (227). An der Unterseite der Mikrowells entsteht nach Füllung mit Medium eine Grenzfläche zwischen Luft und Flüssigkeit, an der die Zellen haften bleiben, so dass innerhalb der Plattform mehrere Inkubations- und Waschschriffe durchgeführt werden können, ohne die Zellen aus den Mikrowells zu spülen.

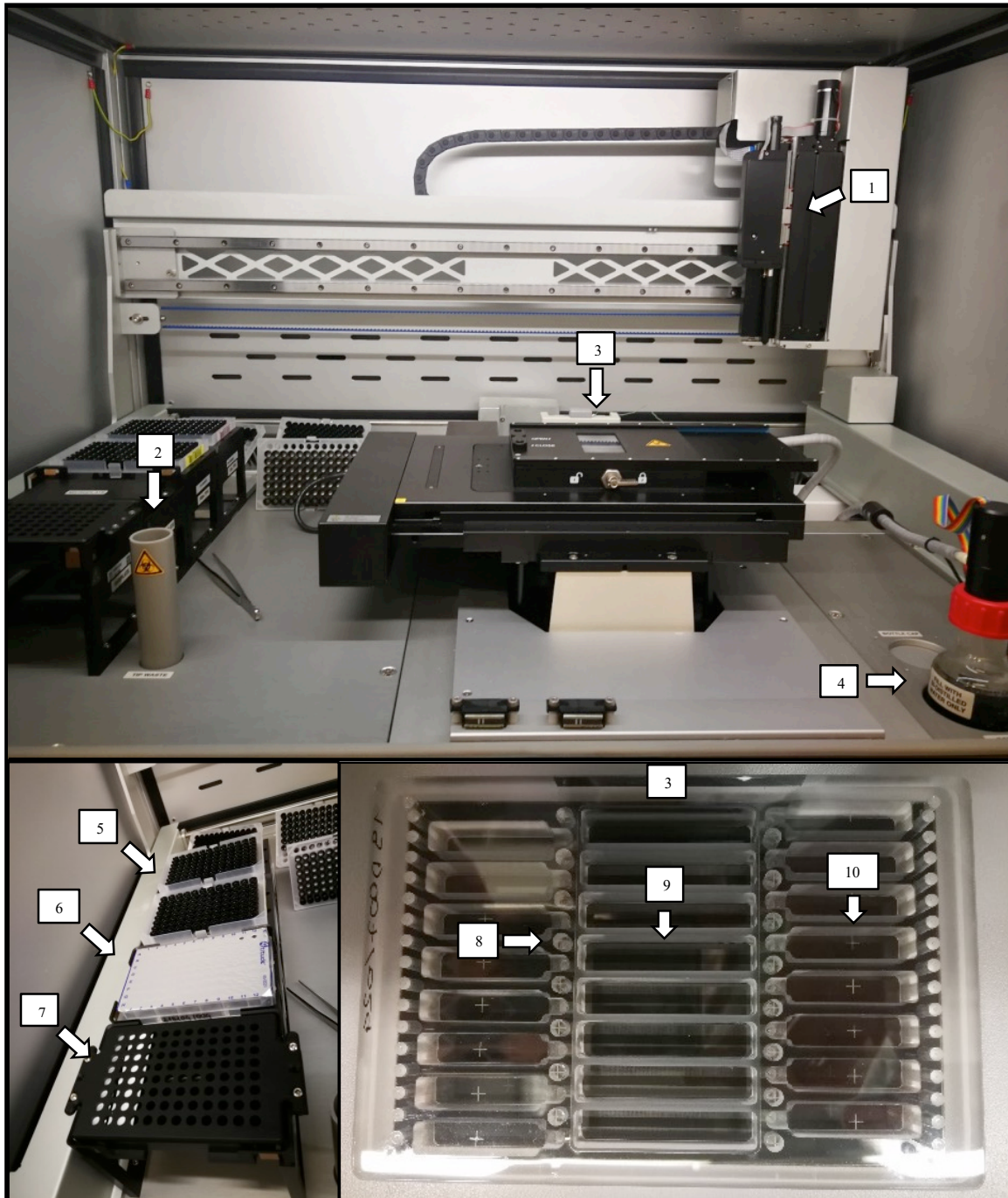


Abb. 1: Aufbau der In-vitro-drug-testing-Plattform von CellPly. Pipettierarm (1), Abwurfbehältnis (2), Wasserflasche (4), 50µl und 300µl Pipettenspitzen (5), 96-Well-Platte (6), Varistrips (7) und Mikrodevice (3) mit Einlassöffnung (8), Mikrokanal (9) und Abfluss (10).

Alle Vorgänge im Gerät werden softwaregesteuert mittels durch CellPly entwickelter und zur Verfügung gestellter Skripte durchgeführt. Durch den in allen drei Achsen beweglichen Pipettierarm werden dabei vollautomatisch festgelegte Volumina von Zellen und Medium in die einzelnen Kanäle des Devices pipettiert. Im Pipettierarm ist zudem die Kamera mit 4 verschiedenen Fluoreszenzfiltern (DAPI, FITC, TRITC, CY5) verbaut, welche anschließend die Mikrowells zu ausgewählten Zeitpunkten bildlich dokumentiert. Dabei wird neben den Fluoreszenzaufnahmen auch eine Hellfeldaufnahme gemacht, diese dienen später der bildbasierten Analyse.

Die Anwendung der Plattform kann mittels eines manuellen oder automatischen Protokolls erfolgen, welches sich auf die manuelle oder automatische Zellaufbereitung bezieht.



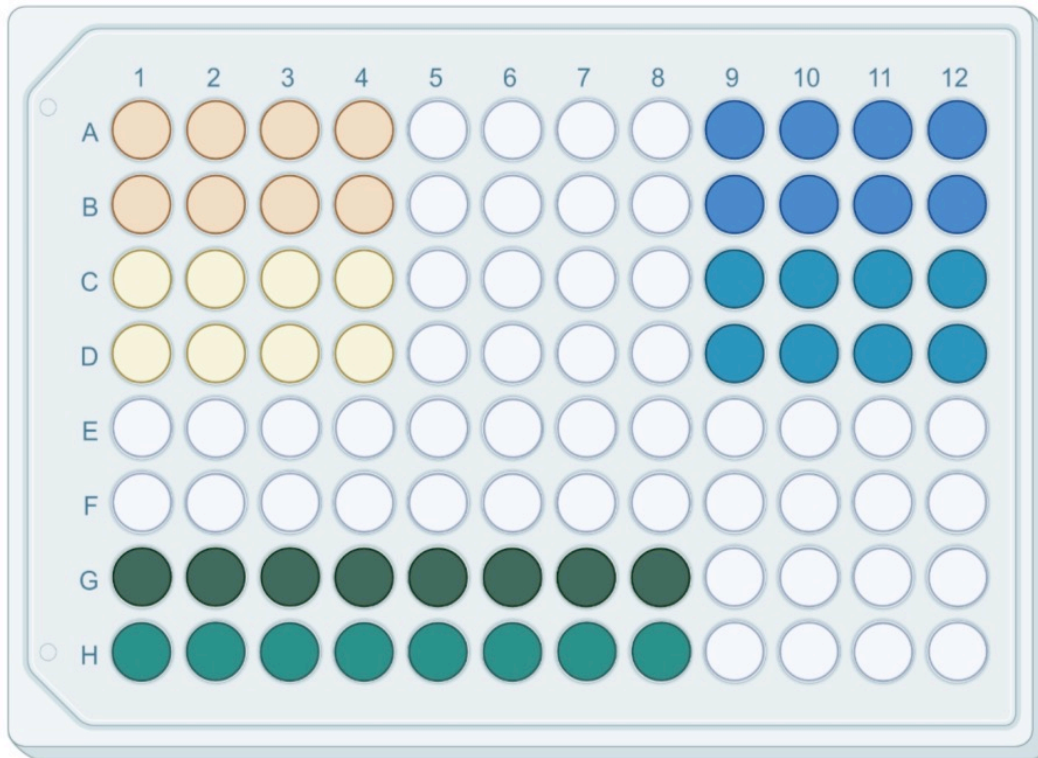
Abb. 2: Vollautomatischer Pipettierarm mit eingebauter Kamera während des Pipettierens der Zellsuspension in das Mikrodevice

2.4.2. Manuelles Protokoll

Für die Etablierung der Methode wurden zuerst die idealen Bedingungen zur Inkubation und Substanztestung mittels manuellen Protokolls ermittelt, da in diesem alle Parameter einfach in jedem Experiment variiert und angepasst werden können. Dies wurde genutzt, um die Anwendbarkeit der Methode für die Zelllinien (HS-5 und U266) und auch primäre Zellen hinsichtlich der Viabilität und der Responseanalyse initial zu evaluieren.

Bei Anwendung des manuellen Protokolls wurde die benötigte Zellmenge wie unter 2.3.4. beschrieben mit einem Celltracker und gegebenenfalls weiteren Fluoreszenz-Antikörpern markiert. Anschließend wurden die benötigten Zellmengen dem Schema der Abbildung 3 folgend in die 96-Wellplatte übertragen und anschließend für 3 Minuten bei 1400rpm zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands folgte die Resuspension der Zellen in 50µl Kulturmedium, welches zusätzlich 5µM PI und die zu testenden Substanzen enthielt. Weitere 60µl des Kulturmediums mit PI und Testsubstanz ohne Zellen und 220µl PBS wurden wie in Abbildung 3 zu sehen in die 96-Wellplatte pipettiert. Es müssen immer 8 oder 16 Kanäle genutzt werden, nicht benötigte Wells wurden mit reinem Medium gefüllt. Am Ende wurde die 96-Wellplatte mit einem sterilen Aufkleber inklusive Pipettieröffnungen bedeckt. Die Platte wurde dann für 20 Minuten im Gerät inkubiert, damit sich die Lösungen der Umgebungstemperatur anpassen konnten.

Nach Ablauf der 20 Minuten wurde zuerst ein Skript zur automatischen Kalibrierung der Bildaufnahmen gestartet, danach ein Skript zum Umpipettieren der vorbereiteten Lösungen aus der Wellplatte in das Mikrodevice. Dabei wird zuerst PBS in den Abfluss des Device pipettiert, um die Flusseigenschaften in den Kanälen zu verbessern. Danach folgt die initiale Befüllung der Kanäle mit dem zellfreien Medium, um eine Flüssigkeitsbasis für die bessere Verteilung der danach folgenden Zelllösungen zu garantieren. Zuletzt werden die Zelllösungen transferiert. Abschließend wurde das Skript zur automatischen Bildgebung gestartet, bei dem je nach Experiment zwischen den Zeitpunkten 0h und 48h mehrere Aufnahmen der Mikrowells angefertigt wurden.



8 Kanäle/ 16 Kanäle	A1-B4 bzw. C1-D4/ A1-D4	A9-B12 bzw. C9-D12/ A9-D12	G1-G8 bzw. H1-H8/ G1-H8
Füllmenge	50µl	60µl	220µl
Inhalt	Fluoreszenzmarkierte Zellen + Kulturmedium+ PI + ggf. Medikamente/H ₂ O ₂	Kulturmedium + PI + ggf. Medikamente/H ₂ O ₂	PBS

Abb. 3: Füllung der 96-Wellplatte für Nutzung des manuellen Protokolls. Abbildung erstellt mit BioRender.com

Tab. 15: Zuordnung der Wells der 96-Wellplatte zu den Kanälen des Mikrodevice beim manuellen Protokoll

Well	Kanal	Well	Kanal	Well	Kanal	Well	Kanal
A1	A	B1	E	C1	I	D1	M
A2	B	B2	F	C2	J	D2	N
A3	C	B3	G	C3	K	D3	O
A4	D	B4	H	C4	L	D4	P

2.4.3. Automatisches Protokoll

Für die Arbeit mit dem automatischen Protokoll wurden vorgefüllte Varistrips mit den Medikamenten und Fluoreszenzantikörpern und 96-Wellplatten mit Medium und PBS genutzt, in die nur die Zelllösungen hinzugefügt werden mussten. Dabei wurde immer jeweils 300µl einer Zelllösung mit 3 Mio. Zellen/ml in Kulturmedium in die Wells A11 und A12 pipettiert.

Nach Platzierung der mit Zellen gefüllten 96-Wellplatte und der Varistrips im Gerät, musste in diesem Modus nur ein Skript gestartet werden, welches Kalibrierung, Pipettieren, Inkubation und Bildgebung enthielt. Wie in Abbildung 4 zu sehen, wurden dabei nach Befüllung mit Medium zuerst die Zellen in das Device transferiert und dann sequenziell mit dem Celltracker, anti-CD138 und gegebenenfalls weiteren Fluoreszenz-Antikörpern markiert und jeweils gewaschen. Danach wurden die Medikamente in der jeweiligen Dosierung und PI zugegeben. Die Bildgebung startete im Anschluss zu ausgewählten Zeitpunkten zwischen 0h und 48h. Nach 24 Stunden wurde zum Ausgleich der Verdunstung das Kulturmedium mit dem jeweiligen Medikament nachgefüllt.

Zunächst wurde die Anwendung des automatischen Protokolls mit U266 und 3 Wiederholungen von jeweils 4 Konzentrationen Melphalan getestet, um sicher zu stellen, dass es keine Fehler im Skript gibt und die Standardabweichung zwischen den Wiederholungen gering ist. Die entsprechenden Füllungen der Wellplatte sowie der Varistrips sind in Abbildung 5 und Tabelle 16 aufgeführt.

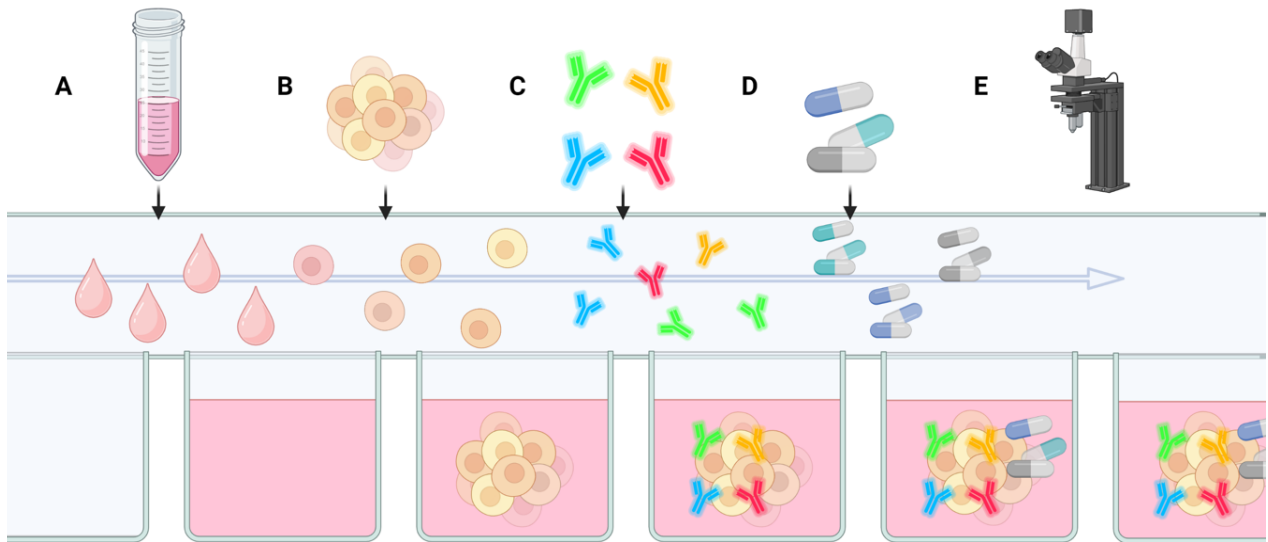


Abb. 4: Ablauf der Zellaufbereitung im automatischen Protokoll. Dargestellt ist ein Mikrochannel mit Mikrorells im Querschnitt. **A:** Verteilung des Mediums im Prefill, **B:** Zugabe der Zellen, **C:** Zugabe der Fluoreszenzantikörper mit anschließender Inkubation und Auswaschen, **D:** Zugabe der Testsubstanzen in der jeweiligen Konzentration, **E:** Inkubation über bis zu 48h und Bildgebung zu festgelegten Zeitpunkten. Abbildung erstellt mit BioRender.com

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	RPMI_PLAN (prefill) 420 uL	RPMI_PLAN (prefill) 420 uL	RPMI_PLAN (CMAC) 420 uL	RPMI_PLAN (CMAC) 420 uL	RPMI_PLAN (CMAC) 420 uL						CELLS 300 uL	CELLS 300 uL
B	PBS (RINSE_1) 420 uL	PBS (Abs) 420 uL	PBS (RINSE_2) 420 uL	PBS (RINSE_2) 420 uL	PBS (RINSE_2) 420 uL	PBS (RINSE_2) 420 uL	RPMI_10 (RINSE_3) 420 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL
C	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL
D	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL
E	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL	RPMI_10 351 uL									
F												
G												
H												

Abb. 5: Füllung der 96-Well-Platten für die erste Testung der U266 mit automatischem Protokoll. RPMI_10= RPMI 10% FBS 1% AA

Tab. 16: Füllung der Varistrips für die erste Testung der U266 mit automatischem Protokoll.

Varistrip 1	A	B	C	D	E	F	G	H
Inhalt	CMAC	CD138	PI	PI	PI	PI	PI	-
Konzentration	10mM	200µg/mL 1:1	200µM	200µM	200µM	200µM	200µM	-
Volumen	10µl	25µl	120µl	120µl	120µL	120µL	120µL	-
Varistrip 3	A	B	C	D	E	F	G	H
Inhalt	Melphalan	Melphalan	DMSO	DMSO	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂		
Konzentration	10mM	10mM	/	/	200mM	200mM		
Volumen	15µL	15µL	50µL	50µL	50µL	50µL		

2.4.4. PI-Restain

Bei Nutzung des automatischen Protokolls fand zudem ein PI-Restain nach 24 und 48 Stunden PI statt, um eine schlechtere Apoptosedetektion aufgrund der im zeitlichen Verlauf sinkenden Fluoreszenzemission zu verhindern. Dabei wurde jeweils vor und nach der PI-Auffrischung die Apoptose bildbasiert gemessen (24h+ und 48h+) um den Effekt des PI-Restains auf die Genauigkeit der Apoptoserate zu evaluieren.

2.4.5. Device Reinigung

Bei Nutzung von nur 8 Kanälen wurde das Mikrodevice für eine zweite Benutzung gereinigt. Dafür wurde manuell in jeden Kanal 100µl einer 3% Natriumhypochlorit-Lösung pipettiert und nach 5 Minuten wurde jeder Kanal 3-mal mit 100µl destilliertem Wasser durchgespült. Zuletzt wurde die Flüssigkeit aus jedem Kanal und Abfluss abpipettiert.

2.4.6. Bildanalyse

Als Grundlage der Analyse dienen die aufgenommenen Bilder der verschiedenen Zeitpunkte. Das Mikroskop fährt dabei automatisiert die einzelnen Kanäle ab und fotografiert dabei immer gleichzeitig 48 Mikrowells in der Reihenfolge Hellfeld, DAPI, FITC, CY5 und TRITC. Insgesamt werden pro Kanal von den 1200 Mikrowells nur 480 aufgenommen und ausgewertet, da der Lichtreiz, der bei jeder Aufnahme auftritt, für die Zellen potenziell toxisch ist. Zudem ist die Aufnahme der Mikrowells ein zeitintensives Vorgehen, welches bereits bei 480 Mikrowells und 16 Kanälen über eine Stunde andauert. Technisch wäre derzeit die Beobachtung und Analyse von bis zu 900 Mikrowells möglich, in den Experimenten dieser Arbeit wurde jedoch nur der Standard von 480 genutzt, um die Viabilität der sensiblen Zellen nicht zu beeinträchtigen.

Mithilfe der Analysesoftware Labview werden die fluoreszenzmarkierten Zellen und ihre Bewegung über die 24h oder 48h detektiert. Zudem wird wie in Abbildung 6 zu sehen der Abstand zwischen den verschiedenen Zellen gemessen, um die Mikrowells mit direktem Zell-Zell-Kontakt zwischen Effektor- und Tumor-Zellen zu identifizieren.

Für die Auswertung kann zum einem die Zellviabilität in allen Mikrowells eines Kanals mit einer bestimmten Kondition gemessen werden, aber auch speziell nur in den Mikrowells, in denen es einen direkten Zell-Zell-Kontakt gibt. Dies ermöglicht insbesondere eine genaue Erkennung der ADCC, bei der neben der Target- auch die Effektorzelle unbedingt vorhanden sein muss.

Für die anschließende Auswertung der Zellviabilität stehen theoretisch 2 Ansätze zur Verfügung: Es kann kanalübergreifend die Viabilität als Einzelwert ermittelt werden oder es kann der Mittelwert aus den einzelnen Viabilitäten aller Mikrowells eines Kanals berechnet werden. Für die Analysen der vorliegenden Arbeit wurde die zweite Variante gewählt, da diese eine hohe statistische Power bietet und die Mikrowells unabhängig voneinander sind.

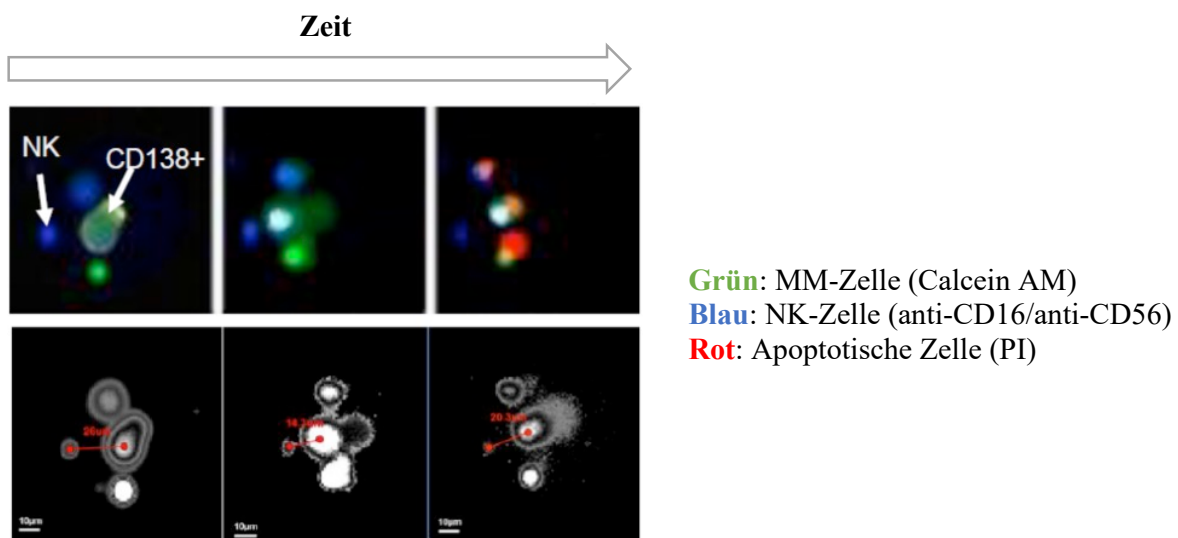


Abb. 6: Aufnahme eines Mikrowells zu den Zeitpunkten 0h, 12h und 24h. Markiert sind U266-Zellen (Zielzellen) und NK-Zellen (Effektorzellen). Im Rahmen der Bildanalyse werden die verschiedenen Zelltypen je nach Fluoreszenzsignal detektiert und deren Abstand zueinander vermessen. Die NK-Zelle nähert sich der MM-Zelle bis zum Herstellen eines Zell-Zell-Kontaktes. Nach 24h emittiert die MM-Zelle ein rotes Fluoreszenzsignal, welches die Apoptose dieser Zelle markiert. Abbildung zur Verfügung gestellt von CellPly.

2.5. Untersuchung der Zelllinien innerhalb der CellPly-Plattform

In der ersten Phase der Methodenetablierung wurde zunächst die Anwendbarkeit der CellPly-Plattform für die Zelllinien U266 und HS-5 untersucht. Dabei wurde das manuelle Protokoll verwendet und die Zellen wie unter 2.4.2. beschrieben vorbereitet und in die 96-Wellplate aufgebracht. Die beiden Zelllinien wurden zunächst in Monokulturen in den Konzentrationen 3-7 Millionen Zellen/ml für HS-5 und 2 und 5 Millionen Zellen/ml für die U266 über 24h bzw. 48h inkubiert und bezüglich ihrer Viabilität untersucht. Zudem wurde der Zellverlust im Rahmen der Zellüberführung von der 96-Wellplatte in das Mikrodevice für beide Zelltypen vergleichend untersucht.

Im nächsten Schritt wurde die Abhängigkeit der Zellviabilität beider Zelllinien von der jeweils anderen im Rahmen von Ko-Kultivierung analysiert. Dafür wurden die Verhältnisse HS-5: U266 von 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:10, 5:1 und 10:1, sowie Monokulturen der beiden Zelltypen über 24h im entsprechenden Kulturmedium der überwiegenden Zelllinie inkubiert. Für die Auswertung wurden zum einem die Mittelwerte aller Viabilitäten beider Zelltypen aller Mikrowell eines Kanals mit einer Kondition miteinander verglichen und zum anderem kanalübergreifend alle Mikrowells mit nur einem Zelltyp im Vergleich zu denen mit beiden Zelltypen.

2.6. Vergleich der Celltracker Calcein AM und CMAC

Zur Evaluation des am besten geeigneten Celltrackers für die Testung wurden die Zellen der Zelllinien HS-5 und U266 sowie primäre MNC und speziell CD138+-Zellen teilweise mit Calcein AM und mit CMAC wie in 2.3.4. beschrieben markiert. Anschließend wurden die beiden Untergruppen hinsichtlich Anzahl detektierter Zellen pro Mikrowell und Viabilität verglichen.

2.7. Calcein-AM Zytotoxizitäts-Assay

Calcein-Acetomethyl (Calcein-AM) diffundiert durch Zellmembranen lebender Zellen und wird intrazellulär durch Esterasen in das lipophobe fluoreszierende Calcein umgewandelt (236). Nach Apoptose wird der Fluoreszenzfarbstoff durch die Auflösung der Zellmembran freigesetzt, was innerhalb der CellPly-Plattform gemessen werden kann. In der Literatur wird beschrieben, dass diese Freisetzung quantifiziert und als Maß für die Apoptose von Zellen genutzt werden kann (236,237). Somit könnte auf die Nutzung von PI verzichtet werden, wodurch ein weiterer Fluoreszenzfilter zur Verfügung stände. Die Evaluation der Eignung von Calcein-AM zur zusätzlichen Verwendung als Apoptosemarker erfolgte

mittels Calcein-AM-Zytotoxizitäts-Assay. Dafür wurden U266, HS-5, MNC und primäre CD138+-Zellen sowohl mit Calcein-AM als auch mit PI wie unter 2.3.4. beschrieben markiert und in Negativ- und Positivkontrolle, sowie mit verschiedenen Medikamentendosierungen getestet. Für die Quantifizierung der Freisetzung von Calcein-AM wurden zwei verschiedene Formeln getestet, um zu überprüfen, ob mittels Normalisierung an die jeweilige Kondition zum Zeitpunkt 0h (Formel 2) oder an die Negativkontrolle (Formel 3) ein besseres Ergebnis erreicht werden kann.

Anschließend wurde die Calcein AM Freisetzung mit dem Anteil PI-positiver Zellen korreliert.

Formel 2:

$$\text{CalceinAM Freisetzung [\%]} = 100 - \left(\frac{\text{CalceinAM Intensität } t_x \text{ Kondition}_y}{\text{CalceinAM Intensität } t_0 \text{ Kondition}_y} * 100\% \right)$$

Formel 3:

$$\text{CalceinAM Freisetzung [\%]} = 100 - \left(\frac{\text{CalceinAM Intensität } t_x \text{ Kondition}_y}{\text{CalceinAM Intensität } t_0 \text{ Negativkontrolle}} * 100\% \right)$$

2.8. Untersuchung der in-vitro drug Response

Für die Evaluation der Detektierbarkeit der einzelnen Medikamenteneffekte innerhalb der CellPly-Plattform wurden zunächst Melphalan, Dexamethason und Bortezomib in jeweils 4 verschiedenen Konzentrationen und korrespondierender Negativkontrolle an der Zelllinie U266 getestet. Dabei wurde das automatische Protokoll angewendet, um gleichzeitig die Umsetzbarkeit dieses für das MM zu testen. Die Begrenzung auf diese Substanzen erfolgte, da nur bei diesen Therapeutika ein Effekt bei Inkubation mit der Zelllinie allein ohne weitere Effektorzellen des Knochenmarks zu erwarten ist. Als bekannterweise dexamethasonresistente Zelllinie soll mittels der Testung von Dexamethason an der U266 die Resistenzdetektion der CellPly-Plattform mitüberprüft werden (238). Von den U266 wurden jeweils 300µl mit einer Konzentration von 3 Mio. Zellen/ml in die Wells A11 und A12 einer wie in Abbildung 7 dargestellten vorbereiteten 96-Wellplatte gegeben. Zusätzlich wurden zwei nach dem in Abbildung 7 gezeigten Schema gefüllte Varistrips im Gerät platziert, Es folgte der Start des automatischen Skripts mit Bildaufnahmen zu den Zeitpunkten 0h, 12h, 24h, 24h+, 36h, 48h und 48h+.

Für die Testung von primären Zellen wurden zunächst 10 Patient*innen mittels des manuellen Protokolls getestet, die verwendeten Medikamentenkonzentrationen sowie korrespondierenden Negativkontrollen sind in Tabelle 17 aufgeführt. Die ausgewählten Konzentrationen orientierten sich dabei primär an der maximalen Plasmakonzentration nach Applikation der jeweiligen Substanz im Patienten. Ziel war die Eingrenzung der idealen Testkonzentration für jede Substanz für die Übertragung in das automatische Protokoll. Die Inkubation erfolgte initial nur über 24h, ab Patient CP11 wurde sie auf 48h erweitert zur Evaluation des längeren Beobachtungszeitraums.

Im Weiteren wurde das automatische Protokoll auch für die MNC angewendet. Nach der Isolation der MNC und Lyse wurden jeweils 300µl der Zelllösung mit einer Konzentration von 3 Mio. Zellen/ml in die Wells A11 und A12 der vorbereiteten 96-Wellplatte gegeben. Dabei wurden 4 Patient*innen nach dem beschriebenen Vorgehen bei der U266 und Bortezomib, Dexamethason und Melphalan getestet. Drei weitere Patient*innen wurden auf 4 verschiedene Konzentrationen von Daratumumab, Elotuzumab und Lenalidomid sowie korrespondierender Negativkontrolle mit dem automatischen Protokoll untersucht, die Viabilitätsanalyse erfolgte zu den Zeitpunkten 0h, 12h, 24h+, 36h und 48h+. Die Füllung der entsprechenden 96-Wellplatten und Varistrips ist in der Abbildung 7 gezeigt.

Für die einzelnen Konzentrationen wurde zu den verschiedenen Zeitpunkten jeweils die normalisierte Viabilität ($Viab_{norm}$) der CD138+-Zellen nach Formel 4 berechnet, welche die Grundlage für die Erstellung der Dosis-Wirkungskurven darstellte.

Zusätzlich wurden die Proben auch mit 10mM H₂O₂ als Positivkontrolle inkubiert, um die Korrektheit der Apoptosemessung zu kontrollieren.

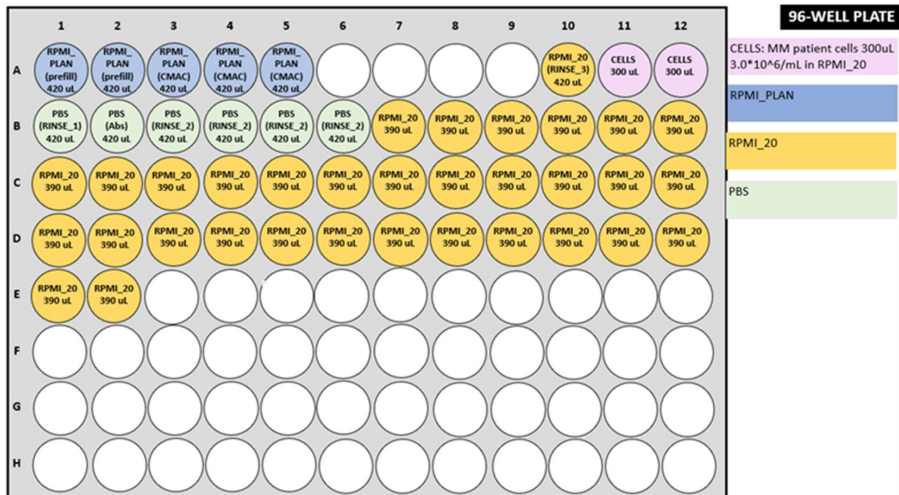
Formel 4:

$$Viabilität_{norm} = \frac{Viabilität_{Substanz \times Konzentration \ y}}{Viabilität_{Negativkontrolle}}$$

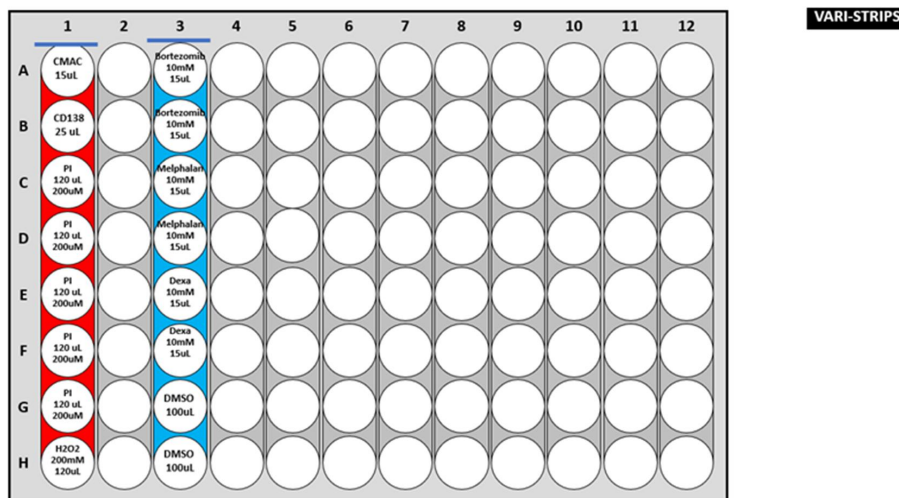
Tab. 17: Verwendete Substanzkonzentrationen und Negativkontrolle

Substanz	Getestete Konzentrationen	Negativkontrolle
Bortezomib	0,78nM; 3,125nM; 7,5nM; 12,5nM; 15nM; 50nM; 200nM	DMSO
Melphalan	0,23µM; 0,94 µM; 3,75µM; 7,5µM; 15µM; 30µM; 60µM	DMSO
Lenalidomid	0,4µM; 1,875µM; 2µM; 3,75µM; 7,5µM; 10µM; 15µM; 30µM; 50µM	DMSO
Dexame- thason	0,016µM; 0,08µM; 0,4µM; 1µM; 2µM; 10µM; 50µM; 100µM	DMSO
Daratu- mumab	0,1µg/ml; 1µg/ml; 10µg/ml; 100µg/ml	Aqua ppi.
Elotuzumab	18,75µg/ml; 37,5µg/ml; 75µg/ml; 150µg/ml	Aqua ppi.
Subasumstat	0,01µM; 0,1µM; 1µM	DMSO

A



B



C

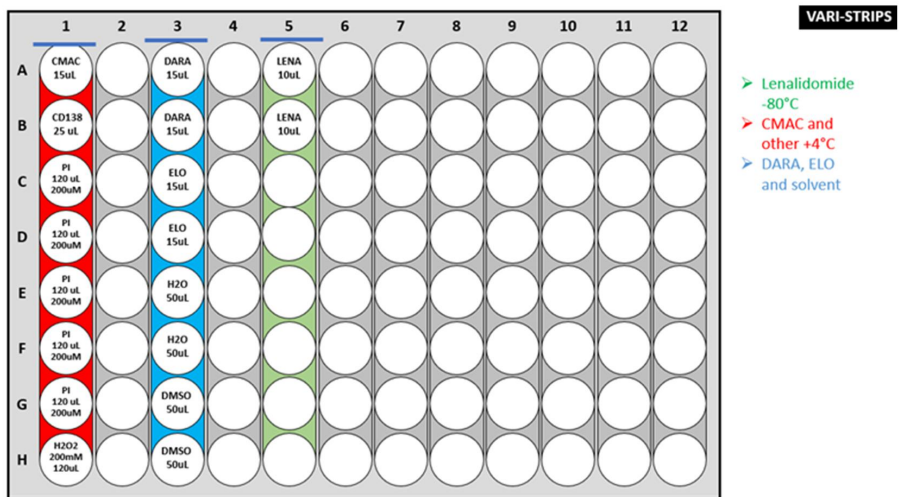


Abb. 7: **A:** Füllung der 96-Wellplatte für die Testung von Bortezomib, Melphalan, Dexamethason, Daratumumab, Elotuzumab und Lenalidomid im automatischen Modus. RPMI_20= RPMI +20% FBS + 1% AA. **B:** Füllung der Varistrips für die Testung von Bortezomib, Melphalan und Dexamethason. **C:** Füllung der Varistrips für die Testung von Daratumumab, Elotuzumab und Lenalidomid.

2.9. Untersuchung des Einflusses anderer Zelltypen auf die Medikamentenwirkung

Zur Testung der Abhängigkeit der MM-Viabilität von anderen Zelltypen wurden MNC mit den Fluoreszenzantikörpern gegen CD3 für T-Zellen, CD16 und CD56 für NK-Zellen und CD271 für BMMSC markiert. Dies erfolgte zunächst für alle Zelltypen im manuellen Protokoll, in dem die MNC mit den entsprechenden Fluoreszenzantikörpern wie in 2.3.4. beschrieben markiert wurden. Für die NK-Zellen erfolgte auch eine Analyse bei Nutzung des automatischen Protokolls parallel zur Wirksamkeitsanalyse von SUMOi. Dafür wurden die Antikörper gegen CD16 und CD56 in dem Varistrip vorbereitet (s. Abbildung 8) und die Schritte der Inkubation und anschließender Auswaschung in das Skript hinzugefügt.

Anschließend wurde geprüft, ob der Gehalt des jeweiligen Zelltypes im primären nicht angereicherten Patientenmaterial hoch genug ist, um eine für eine statistische Analyse ausreichend hohe Anzahl an Mikrowells mit Ko-Lokalisation und Zellkontakt zwischen Myelomzellen und Effektorzelle zu erreichen. Ein weiterer relevanter Aspekt war die Interferenz des Fluoreszenzsignals der Effektorzellen mit den anderen Fluoreszenzsignalen.

In der Analyse wurden dann jeweils die Myelomviabilitäten pro Mikrowell zwischen denen mit und denen ohne Ko-Lokalisation beziehungsweise Zell-Zell-Kontakt mit einer Effektorzelle miteinander verglichen (229).

2.10. Testung auf synergistische Wirkung von Medikamentenkombinationen

Für die Testung des SUMOi wurde aufgrund in der Literatur beschriebenen synergistischen Wirkung mit Proteasominhibitoren neben der alleinigen Inkubation auch eine Kombination mit Bortezomib untersucht. Dafür wurden primäre CD138+-Zellen von 4 Patient*innen über 48h mit Bildanalyse aller 8h mit Bortezomib und SUMOi jeweils allein und in Kombination inkubiert. Das automatische Protokoll wurde verwendet und jeweils 300µl der Zelllösung mit einer Konzentration von 3 Mio. Zellen/ml in die Wells A11 und A12 der vorbereiteten 96-Wellplatte gegeben. Die Füllung der 96-Wellplatte und der Varistrips ist der Abbildung 8 zu entnehmen. Für die Kombinationstherapie wurden die niedrigeren Konzentrationen von 3,125nM und 12,5nM für Bortezomib und 0,01µM und 0,1µM für SUMOi gewählt, da die synergistische Wirkung am ehesten im Bereich der niedrigeren Konzentrationen zu erwarten ist. Im Rahmen der Analyse wurden dann die Apoptoseraaten der Monotherapie mit der der verschiedenen Kombinationen verglichen.

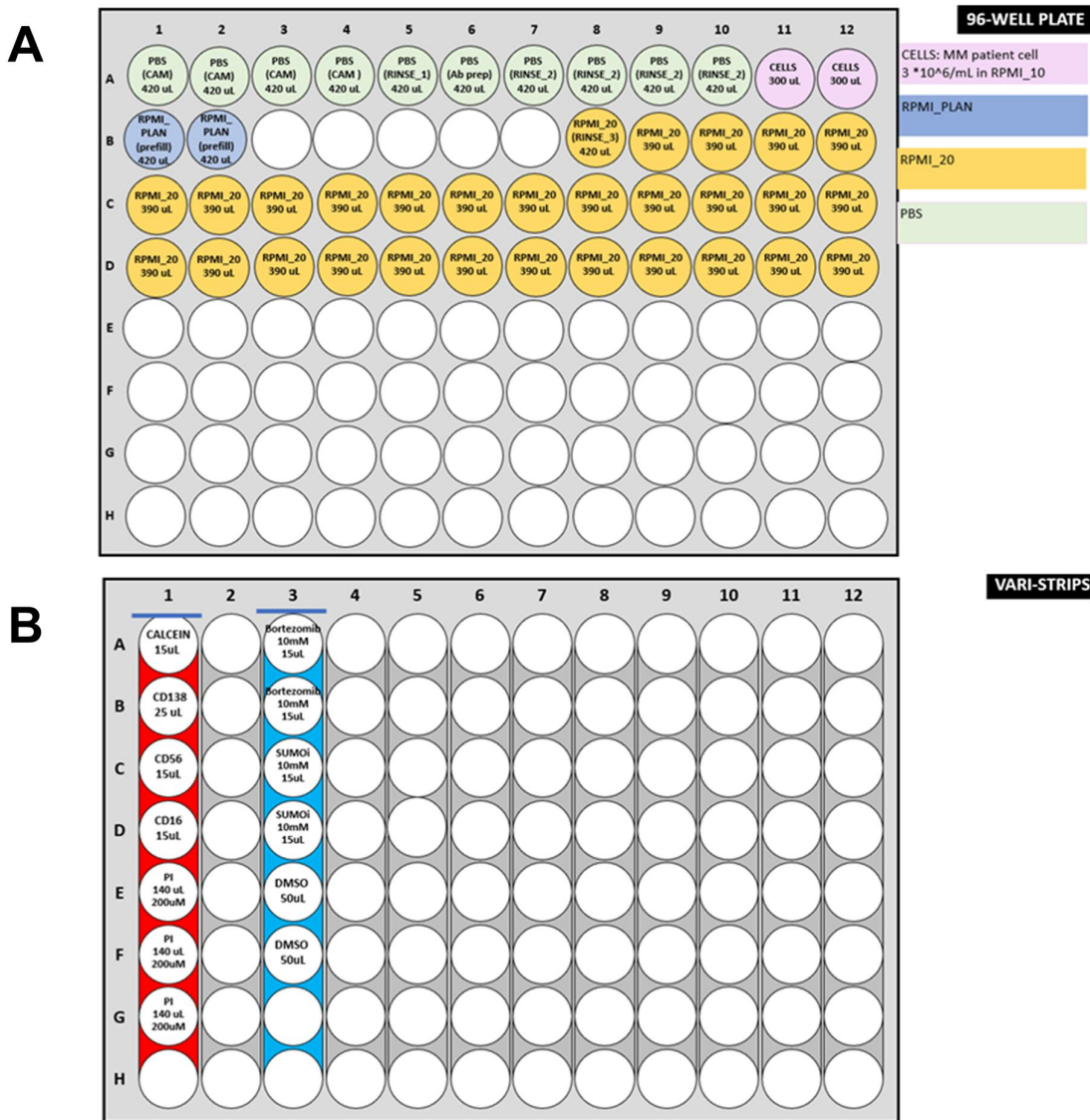


Abb. 8: **A:** Füllung der 96-Wellplatte für die Testung von Bortezomib und SUMOi mit NK-Zell-Markierung im automatischen Modus. RPMI_20= RPMI +20% FBS + 1% AA. **B:** Füllung der Varistrips für die Testung von Bortezomib und SUMOi mit NK-Zell-Markierung.

2.11. Korrelation zur Klinik

Für die Korrelation der in-vitro mit den in-vivo Daten wurde das jeweils die niedrigste Viab_{norm} mit den klinischen Parametern R-ISS, Anzahl an Vortherapien und Therapienaktivität zur getesteten Substanz korreliert. Weiterhin wurde die Plasmazellinfiltration der Histologie und Zytologie mit dem Anteil CD138+-Zellen in der CellPly-Plattform der Patient*innen verglichen.

2.12. Statistische Auswertung

Die Datengeneration aus den Bilddateien wurde durch Microsoft Excel durchgeführt. Zur statistischen Auswertung sowie zur Erstellung von Grafiken wurde die Statistiksoftware GraphPad Prism verwendet. Zur graphischen Darstellung wurde immer der Mittelwert mit dem SEM verwendet. Beim Vergleich zwei verschiedener Konditionen der Mann-Whitney-Test verwendet, bei mehr als 2 Konditionen fand der Kruskal-Wallis-Test mit Dunn's multiplen Vergleichen Anwendung. Korrelationsanalysen wurden mittels einfacher linearer Regression durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Viabilität der Zelllinien

3.1.1. Zelllinien in Monokultur

Zur Evaluation der Anwendbarkeit der CellPly-Plattform für das MM wurde im ersten Schritt die Viabilität der MM-Zelllinie U266 und der Stromazelllinie HS-5 über einen Zeitraum bis zu 48h in verschiedenen Konzentrationen in Monokultur getestet.

In der Monokultur zeigte die U266 eine gute Viabilität über 24h, diese war bei einer Zellkonzentration von 2 Millionen Zellen/ml signifikant höher als bei 5 Millionen Zellen/ml ($p < 0,001$). Auch in einer Negativkontrolle mit 0,6% DMSO betrug die Viabilität nach 48h noch 60,1%.

Die Viabilität der HS-5 zeigte sich im Vergleich schlechter, nach 24h lag sie mit einem Mittelwert von 77,0% bei einer Zellkonzentration von 4 Millionen/ml signifikant am höchsten ($p < 0,001$). Die schlechtere Viabilität der HS-5-Zelllinie liegt vermutlich darin begründet, dass es sich um adhärente Zellen handelt und die CellPly-Plattform mit ihren offenen Mikrowells primär für Suspensionszellen konstruiert ist. Dies zeigt sich auch beim Blick auf den Zellverlust beim Übertragen der Zellsuspensionen in das Mikrodevice. Wie in Abbildung 9 zu sehen, ist die durchschnittliche Konzentration von Zellen pro Kanal bei den HS-5-Zellen deutlich niedriger als bei gleichen oder auch niedrigeren Ausgangskonzentrationen von U266-Zellen.

Die Testung der Monokulturen zeigte für beide Zelllinien eine gute Viabilität, die insbesondere bei den U266 auch nach 48h für eine weitere Analyse hinsichtlich der Messung der Wirkung von Therapeutika als ausreichend hoch erachtet wurde. Die Analysen der Monokulturen zeigen zudem, dass für Stromazellen eine höhere Ausgangszellkonzentration notwendig ist, um ähnliche Zellzahlen im Device zu detektieren wie bei den Myelomzellen.

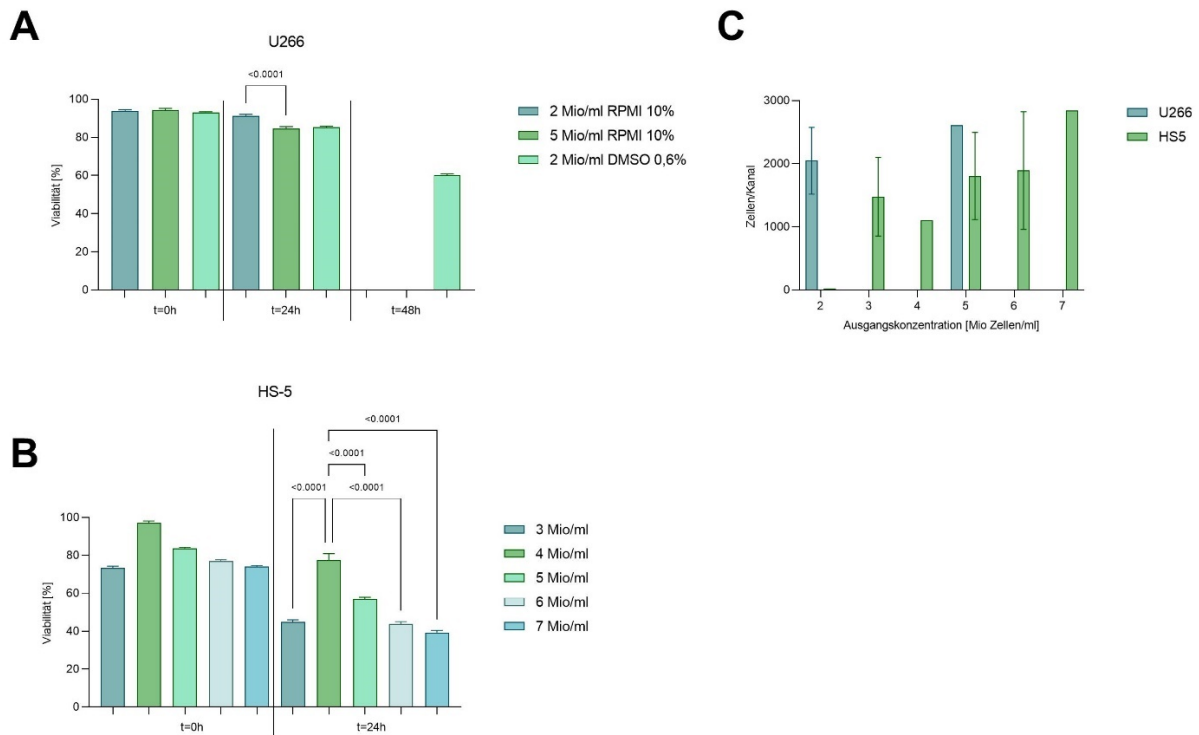


Abb. 9: Zelllinien in Monokultur. Jeweils Darstellung der Mittelwerte mit SEM. **A:** Viabilität U266 in Monokultur in den Konzentrationen 2 Mio. Zellen/ml (n=2) und 5 Mio. Zellen/ml (n=1) in RPMI 10% FBS und 2 Mio. Zellen/ml in DMSO 0,6% über 24h bzw. 48h mit CMAC als Celltracker. Mann-Whitney-Test zum Vergleich der Konzentrationen 2 Mio. Zellen/ml und 5 Mio. Zellen/ml in RPMI 10%; **B:** Viabilität HS-5 in Monokultur in den Konzentrationen 3-7 Mio. Zellen/ml in IMDM 10% FBS über 24h mit CMAC als Celltracker. Kruskal-Wallis-Test zum Vergleich der Konzentrationen mit Dunn's multiplen Vergleichen; **C:** Darstellung der detektierten Zellen pro Kanal in Abhängigkeit von der verwendeten Ausgangszellkonzentration zum Zeitpunkt t=0h.

3.1.2. Zelllinien in Ko-Kultur

Nach erfolgreicher Kultivierung der Zelllinien in Monokultur in der CellPly-Plattform sollte im nächsten Schritt die Ko-Kultivierung beider Zelltypen hinsichtlich des Einflusses auf die Viabilität untersucht werden. Dafür erfolgten vergleichende Kultivierungen in Monokultur und in Ko-Kultur in den Verhältnissen Stroma: Plasmazellen 10:1, 5:1, 1:1, 1:5 und 1:10.

In der Viabilitätsanalyse der U266-Zellen auf Kanalebene ausgehend von den gewählten Verhältnissen in den Ausgangszelllösungen zeigte sich ein signifikant besseres Outcome nach 24h beim Vergleich der Monokultur zur Ko-Kultur unabhängig vom gewählten Verhältnis in den Ausgangskonzentrationen (88,9% vs. 90,0%-98,8%; $p < 0,05$). Am besten stellte sich das Verhältnis von Stroma- zu Plasmazellen von 5:1 mit einer Viabilität von

98,80% und einer signifikanten Überlegenheit zu den Verhältnissen 1:5 und 1:10 dar ($p < 0,05$).

Bei der Analyse der Viabilität pro Mikrowell in Abhängigkeit von der Ko-Lokalisation einer Stromazelle ergab sich eine signifikant schlechtere Viabilität der U266 in Ko-Kultur (87,3% vs. 91,8%; $p = 0,0006$).

Für die HS-5 zeigte sich in der kanalbasierten Analyse nur ein signifikanter Viabilitätsunterschied zwischen der Monokultur und der Ko-Kultur mit dem Verhältnis 1:1 (58,1% vs. 36,9%; $p < 0,0001$), für die restlichen Ko-Kulturen bestand kein signifikanter Unterschied. Das Verhältnis 1:1 zeigte sich auch im Vergleich zu den anderen Verhältnissen am schlechtesten ($p < 0,05$). Mit 71,4% ergab das Verhältnis Stromazellen: Plasmazellen von 5:1 die beste Viabilität, jedoch nur mit einem statistisch signifikanten Unterschied zur schlechtesten Kondition 1:1 ($p < 0,0001$).

Bei Betrachtung der Viabilität in Abhängigkeit einer Ko-Lokalisation einer Myelomzelle im Mikrowell zeigte sich wie bei der U266 eine schlechtere Viabilität in der Ko-Kultur (36,1% vs. 56,6%; $p < 0,0001$).

Die Experimente der Ko-Kulturen konnten einen Einfluss der verschiedenen Zelltypen auf die Viabilität der jeweils anderen zeigen. Es ergaben sich Differenzen zwischen den Analysen auf Kanal- und Mikrowellebene mit deutlicherem Einfluss der Ko-Kultur in der per-Mikrowellanalyse, was auf eine Abweichung der Zell-Verhältnisse im Mikrodevice im Vergleich zur Ausgangszelllösung hinweist.

3.2. Patientencharakteristika

Für die Testung der CellPly-Plattform an primären Myelomzellen wurden EDTA-KM-Proben von 22 Patient*innen untersucht. Die klinischen Charakteristika der Patient*innen sind der Tabelle 19 zu entnehmen.

Die Patientenpopulation hatte ein medianes Alter von 68 Jahren mit einer Spanne von 46-82 Jahren. Von den 22 Patient*innen waren 5 (22,7%) weiblich und bei 10 (45,5%) lag ein RRMM vor. Die Patient*innen mit RRMM erhielten im Median 2 Vortherapien (Spanne: 1-5) und hatten einen Abstand zur Vortherapie von 0-13 Monaten. Bei den meisten Patient*innen lag ein MM des Typ IgG ($n = 16$; 72,7%) vor, gefolgt von Leichtketten-Myelom ($n = 4$; 18,2%) und IgA ($n = 2$; 9,1%). Bezüglich des R-ISS war die Verteilung auf I, II, III und fehlende Angabe 4 (18,2%), 10 (45,5%), 3 (13,6%) und 5 (22,7%).

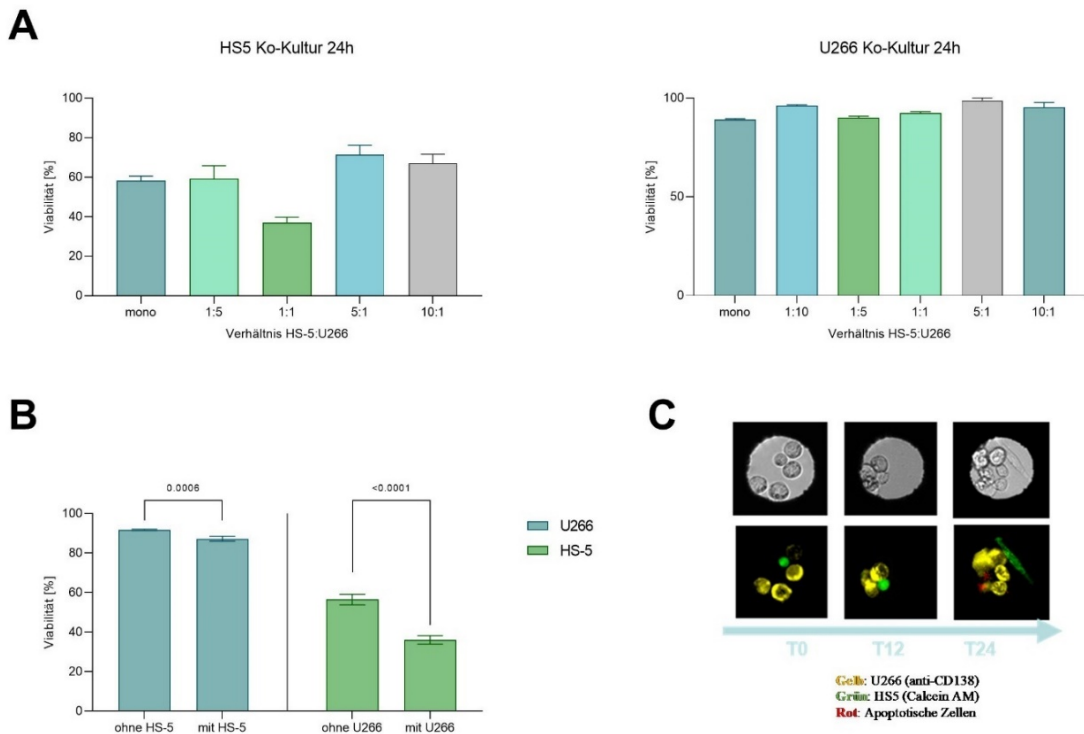


Abb. 10: Darstellung der Viabilitäten der Zelllinien in Ko-Kultur. Zusammengefasste Ergebnisse aus 3 Experimenten; **A:** Darstellung der Viabilitäten von U266 und HS-5 nach 24h auf Kanalebene mit Differenzierung der verschiedenen Zellverhältnisse in den Ausgangskonzentrationen. Darstellung der Mittelwerte mit SEM; **B:** Darstellung der Mittelwerte mit SEM der Viabilitäten pro Mikrowell in Abhängigkeit von der Ko-Lokalisation des jeweils anderen Zelltyps, Mann-Whitney-Test; **C:** Mikroskopaufnahmen eines Mikrowells über 24h mit Fluoreszenzmarkierung der U266, HS-5 und der Apoptose.

Tab. 18: Zusammenfassung der Patientencharakteristika

		CellPly-Patient*innen
Gesamtanzahl Patient*innen		22
Alter [Jahre]		
	Median (Spanne)	68 (46-82)
Weiblich	abs. (%)	5 (22,73)
R-ISS	abs. (%)	
	I	4 (18,18)
	II	10 (45,45)
	III	3 (13,64)
	k. A.	5 (22,73)
Myelomtyp	abs. (%)	
	IgG	16 (72,73)
	IgA	2 (9,09)
	LK	4 (18,18)
NDMM	abs. (%)	12 (54,55)
Anzahl Vortherapien bei RRMM		
	Median (Spanne)	2 (1-5)
Abstand Vortherapie		
	Spanne [Monate]	0-13

Tab.19 Patientencharakteristika der untersuchten Knochenmarksproben und getestete Substanzen in der CellPly-Plattform. m=männlich, w= weiblich, V=Bortezomib, M=Melphalan, D=Dexamethason, R=Lenalidomid, Dara=Daratumumab, Elo=Elotuzumab, S=SUMOI

Patienten-ID	Alter [Jahre]	Geschlecht	NDMM /RRMM	R-ISS	Salmon & Durie	Myelomtyp	Plasmazell-infiltration Histologie	Anzahl Vortherapien	Abstand zur letzten Therapie	CellPly getestete Substanzen						
										V	M	D	R	Dara	Elo	S
CP03	54	m	RRMM	II	III	IgA lambda	10%	1	unter Therapie					x		
CP04	46	w	NDMM	II	IIIA	IgG kappa	80%	-	-			x				
CP05	78	m	RRMM	III	IIIB	IgG lambda	k. A.	1	2,5 Monate	x	x					
CP06	65	m	NDMM	II	IIIA	IgG kappa	80%	-	-				x		x	
CP07	82	w	RRMM	III	IIA	IgG kappa	70%	2	13 Monate	x	x					
CP08	68	m	RRMM	I	IIA	IgA kappa	80%	4	2 Monate	x		x				
CP09	68	m	NDMM	II	IIA	IgG lambda	90%	-	-		x					
CP10	77	m	NDMM	k. A. (ISS III)	IIIB	LK kappa	80%	-	-		x					
CP11	78	m	RRMM	k. A.	IA	IgG kappa	k. A.	4	unter Therapie	x						
CP13	64	m	NDMM	I	IIIA	LK kappa	90%	-	-	x	x					
CP16	67	w	NDMM	II	IIA	IgG kappa	95%	-	-	x						
CP17	68	w	NDMM	II	III	LK kappa	80%	-	-	x	x					
CP18	65	m	NDMM	II	IIIA	IgG kappa	90%	-	-	x	x					
CP19	58	m	NDMM	II	IIIA	LK kappa	50%	-	-	x	x					
CP20	69	m	RRMM	III	IIIA	IgG lambda	<5%	1	1 Monat	x						x
CP21	69	m	NDMM	II	IA	IgG kappa	40%	-	-	x	x					
CP22	50	m	NDMM	I	IIIA	IgG lambda	30%	-	-	x						x
CP23	65	m	RRMM	k. A. (ISS I)	IIIA	IgG kappa	70%	2	1,5 Monate	x						x
CP24	77	m	RRMM	k. A.	IIIB	IgG lambda	2%	2	7 Tage	x						x
CP25	54	m	RRMM	k. A. (ISS II)	II	IgG kappa	20%	2	<4 Wochen				x	x		
CP26	81	m	NDMM	I	IIIA	IgG kappa	15%	-	-				x	x		x
CP27	69	w	RRMM	II	IIIA	IgG lambda	80%	5	3 Wochen				x	x	x	x

3.3. Calcein-AM-Zytotoxizitäts-Assay

Um zu überprüfen, ob sich der Celltracker Calcein AM auch als Apoptosemarker innerhalb der CellPly-Plattform nutzen lässt, wurde ein Calcein-AM-Zytotoxizitäts-Assay durchgeführt. Dafür wurden U266, HS-5 und MNC sowohl mit Calcein AM als auch mit PI markiert. Mittels zwei verschiedener Formeln (s. 2.7.) wurde die Calcein-AM-Freisetzung berechnet und auf eine Korrelation mit der PI-Positivität überprüft.

Wie in Abbildung 12 dargestellt, konnte für alle getesteten Zelltypen (U266, HS-5, MNC, primäre CD138+-Zellen) mit keiner der beiden angewendeten Formeln eine hinreichende Korrelation zwischen der PI-Positivität und der Calcein-AM-Freisetzung ermittelt werden. Die Werte von R^2 lagen zwischen 0,04475 und 0,6325. Keine der Formeln zeigte sich überlegen im Vergleich zu der anderen. Zudem stellt sich dar, dass auch innerhalb eines Zelltypes die Standardabweichung der Calcein-AM-Intensität hoch war und sich somit nicht für eine standardisierte Apoptosemessung innerhalb der CellPly-Plattform eignet. Insbesondere die durch PI detektierte Apoptose von CD138+-Zellen wich stark von der mittels des Assays berechneten ab.

Zudem zeigte sich, dass bei Testung von sehr zytotoxischen Konditionen wie H_2O_2 10mM bereits bei der ersten Messung das Fluoreszenzsignal im Vergleich zur Negativkontrolle stark reduziert war und außerdem im weiteren Verlauf bei 700-1000 stagnierte (s. Abbildung 12).

Die Fluoreszenzdetektion der CellPly-Plattform ist somit nicht akkurat genug, um die Intensitätsdifferenz der Calcein-AM-Fluoreszenz als Maß für die Apoptose zu nutzen. Somit stellt PI den besseren Apoptosemarker für die hier verwendete Methode dar.

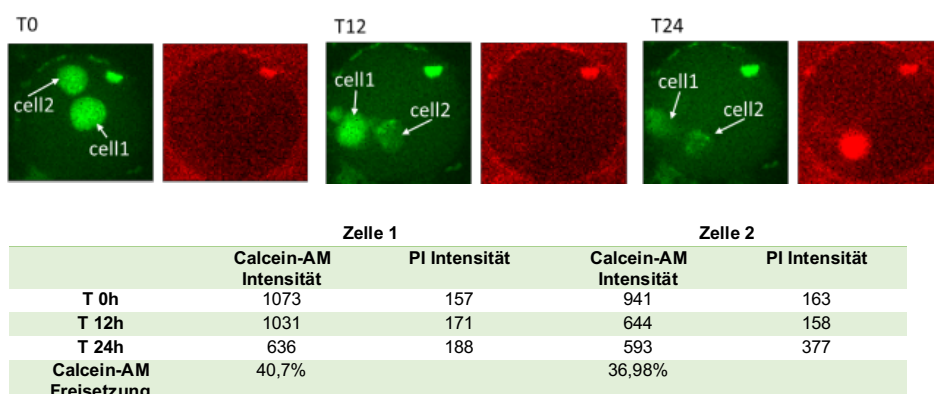


Abb. 11: Darstellung des Calcein-Release von 2 U266 Zellen in RPMI 10% FBS über 24h mit Calcein AM-Intensität im FITC-Filter (grün) und PI-Intensität im TRITC-Filter (rot). Bei beiden Zellen ist eine Abnahme der Calcein-AM-Intensität zu sehen. Zelle 2 hat von Beginn an ein niedrigeres Fluoreszenzsignal. Nach 24h ist ein PI-Signal der Zelle 2 zu sehen, die Zelle ist apoptotisch.

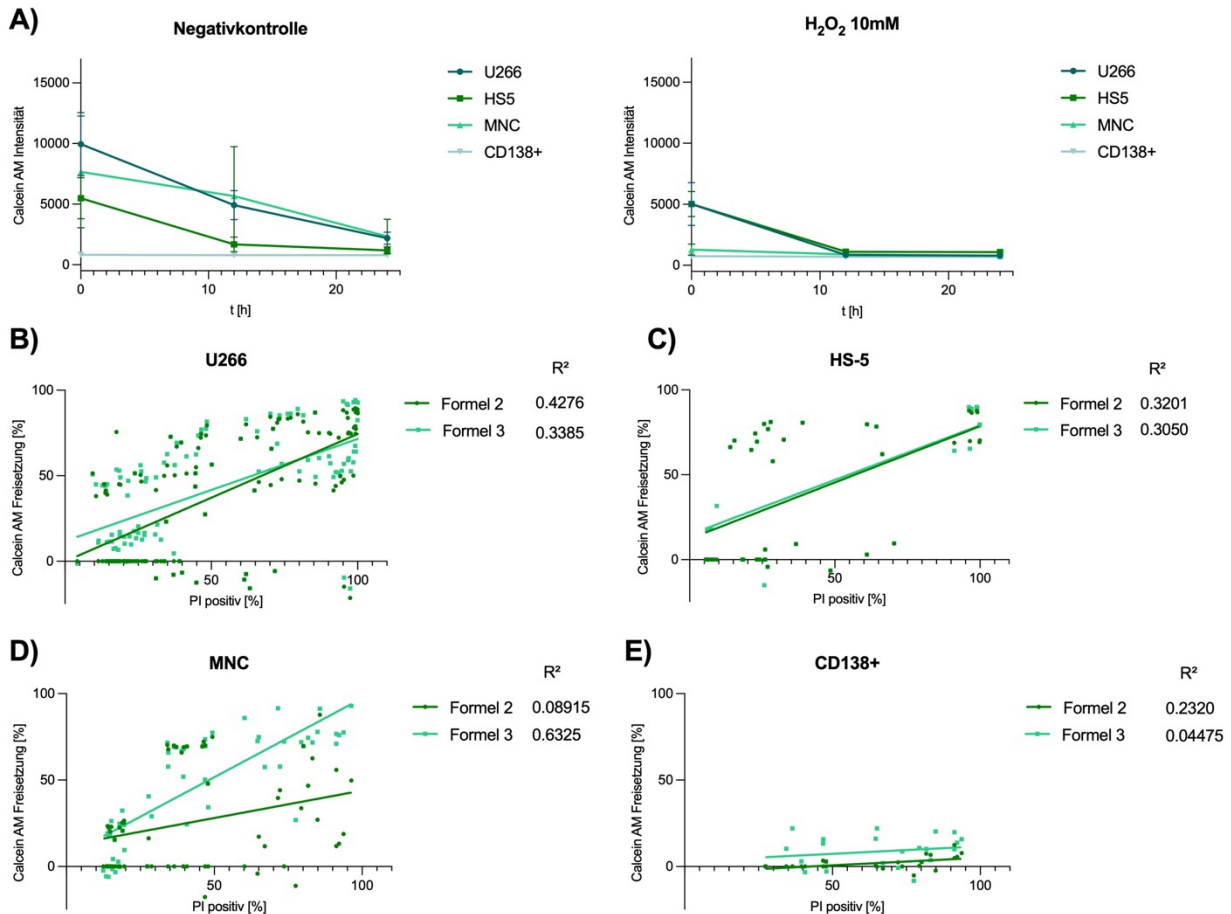


Abb. 12: Darstellung der Calcein-AM-Freisetzung der verschiedenen Zelltypen. **A:** Absolute Calcein-AM-Intensität in der Negativkontrolle (RPMI 10% FBS, IMDM 10% FBS bzw. DMSO) und in der Positivkontrolle (10mM H₂O₂); **B-E:** Korrelation der relativen Calcein-AM-Freisetzung berechnet nach Formel 2 und 3 zum Anteil der PI-positiven Zellen. Berechnung von R^2 mittels einfacher linearer Regression.

3.4. Vergleich von Calcein AM mit CMAC

Zur Evaluation des besser geeigneten Celltrackers für das in-vitro drug testing wurden zunächst die beiden Zelllinien HS-5 und U266 mit CMAC und Calcein AM markiert und dann hinsichtlich der Viabilität und Anzahl detektierter Zellen pro Mikrowell miteinander verglichen.

Die Viabilität der HS-5 unterscheidet sich nach 24h nicht signifikant zwischen den beiden Celltrackern. Für die U266 konnte eine insgesamt schlechte Viabilität nach 24h festgestellt werden, was vermutlich auf eine Kontamination zurückzuführen ist. Trotz dessen lässt sich für die U266 eine deutlich schlechtere Viabilität bei Verwendung von Calcein AM feststellen (63,6% vs. 34,1%; $p < 0,0001$).

Für den Vergleich der detektierten Zellen pro Mikrowell wurden die Zellen sequenziell erst mit Calcein AM und im Anschluss mit CMAC markiert. Für die Analyse wurden dann

die Zellen im FITC-Filter (Calcein AM) und im DAPI-Filter (CMAC) gemessen. Dabei zeigte sich für HS-5 eine signifikant leicht höhere Detektion der Zellen pro Mikrowell bei Verwendung von Calcein AM (0h: 9,4 vs. 10,3; $p < 0,0001$ und 24h: 3,5 vs. 3,7; $p = 0,0038$). Bei den U266-Zellen konnte nur zum Zeitpunkt 0h ein signifikanter Unterschied festgestellt werden zugunsten von CMAC (3,3 vs. 3; $p = 0,0118$).

Bei Betrachtung des Stain-Index der beiden Celltracker zeigt sich für Calcein AM initial eine über das 10fache stärkere Fluoreszenzemission, die jedoch bereits nach 12h enorm abnimmt und sich dann im Bereich derer von CMAC befindet.

Im Vergleich zeigen beide Celltracker eine gleichwertige Zelldetektion beider Zelllinien auch nach 24h. Während die Viabilität der HS-5 durch Calcein AM nicht beeinflusst wird, zeigt die U266 unter Verwendung von Calcein AM eine deutlich schlechtere Viabilität.

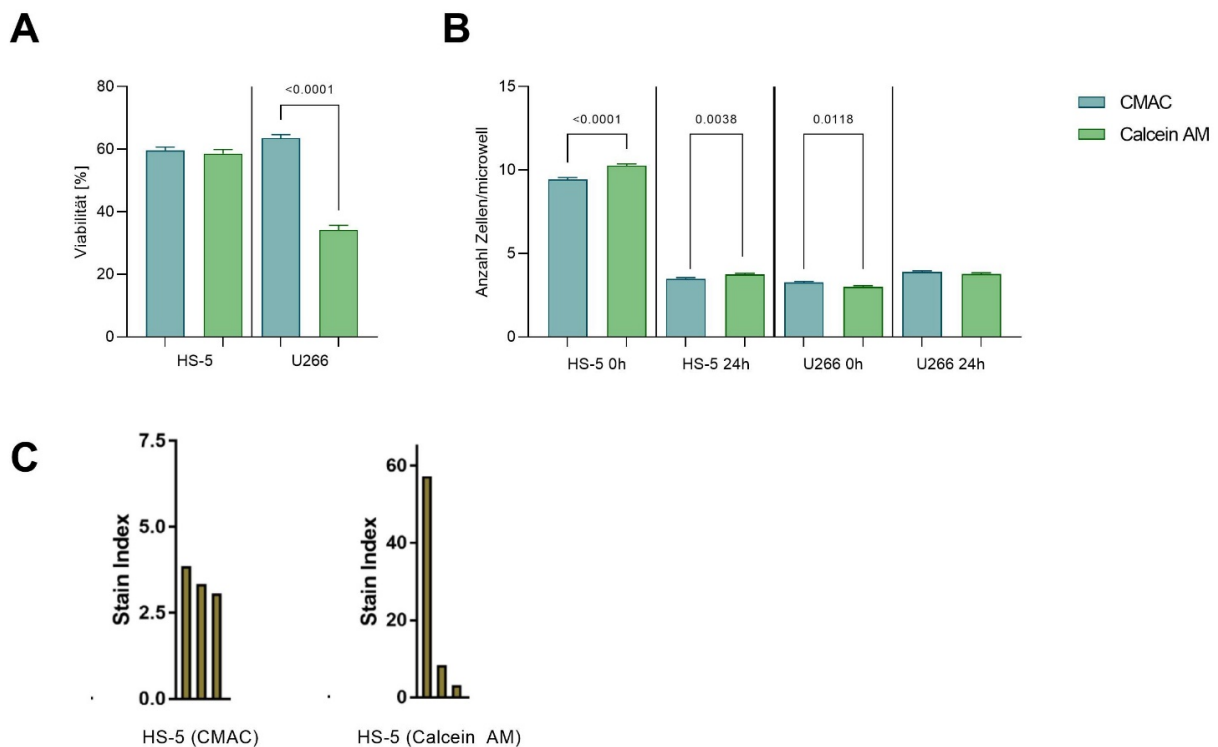


Abb. 13: Vergleich von CMAC und Calcein AM bei Zelllinien. **A:** Viabilität von HS-5- und U266-Zellen Negativkontrolle zum Zeitpunkt 24h in Abhängigkeit des verwendeten Celltrackers. Darstellung der Durchschnittswerte mit SEM aus 3 Experimenten. 5 Mio. Zellen/ml in Ausgangskonzentration. Mann-Whitney-Test zeigt keine signifikanten Unterschiede der Viabilität. **B:** Vergleichende Darstellung der durchschnittlichen Anzahl detektierter Zellen pro Mikrowell mit SEM in Abhängigkeit des Celltrackers zum Zeitpunkt 0h. Ausgangskonzentrationen: 5 Mio. Zellen/ml (HS-5) und 2 Mio. Zellen/ml (U266). Mann-Whitney-Test zum Vergleich zwischen den Celltrackern. **C:** Darstellung des Stain-Index beider Celltracker zu den Zeitpunkten 0h, 12h, 24h. Zur Verfügung gestellt von CellPly Srl.

Um zu überprüfen, inwiefern sich die Resultate des Celltracker-Vergleichs auch auf primäre Myelomzellen beziehen lassen, wurde bei Patient CP04 ebenfalls ein Viabilitäts- und Zelldetektionsvergleich durchgeführt.

Es war festzustellen, dass bereits nach 12h ein signifikanter Viabilitätsunterschied zwischen den beiden Celltrackern vorlag mit Überlegenheit von CMAC (57,8% vs. 37,6%; $p < 0,0001$), welcher sich nach 24h weiter vergrößerte (48,7% vs. 16,4%; $p < 0,0001$). Bezüglich der Zelldetektionsraten gab es bei Betrachtung der gesamten MNC keinen signifikanten Unterschied. Bei isolierter Analyse der CD138+-Zellen zeigte sich zum Zeitpunkt 0 eine höhere Erkennungsrate pro Mikrowell durch CMAC (0,7 vs. 0,4; $p < 0,0001$), während nach 24h mehr Zellen pro Mikrowell durch Calcein AM detektiert werden konnten (0,8 vs. 1; $p < 0,0001$). Während die detektierte Zellzahl bei Verwendung von CMAC konstant blieb, stieg sie bei Calcein AM nach 24h von durchschnittlich 0,4 Zellen/Mikrowell auf 1 Zelle/Mikrowell an ($p < 0,0001$). Dies könnte auf Interferenzen bzw. Autofluoreszenz im FITC-Kanal hinweisen.

Somit stellte sich CMAC auch bei der Untersuchung der primären Myelomzellen als vorteilhafter dar, da im Vergleich zu Calcein AM bessere Viabilitätsdaten vorlagen und sich die Zelldetektionen konstanter darstellten.

Im weiteren Verlauf wurde Calcein AM insbesondere bei Verwendung der Fluoreszenzantikörper anti-CD16 und anti-CD56 verwendet, da diese wie CMAC im DAPI-Filter gemessen werden. Bei der Viabilitätsanalyse aller untersuchten KM-Proben zeigte sich für die CD138+-Zellen unter Nutzung des manuellen Protokolls ebenfalls eine bessere Viabilität bei CMAC mit einem Unterschied von 62,5% vs. 11,4% nach 24h ($p < 0,0001$). Unter dem automatischen Protokoll war dieser Effekt nur in den ersten 12-18h sichtbar, während nach 24h kein Unterschied vorlag. Nach 48h zeigten die mit Calcein AM markierten Zellen eine signifikant bessere Viabilität (53,9% vs. 13,1%; $p < 0,0001$). Es ist somit anzunehmen, dass der negative Einfluss von Calcein AM durch den Aufbereitungsprozess im manuellen Protokoll bedingt ist, möglicherweise stellt die Inkubation in PBS statt in Kulturmedium wie bei CMAC eine Ursache dar.

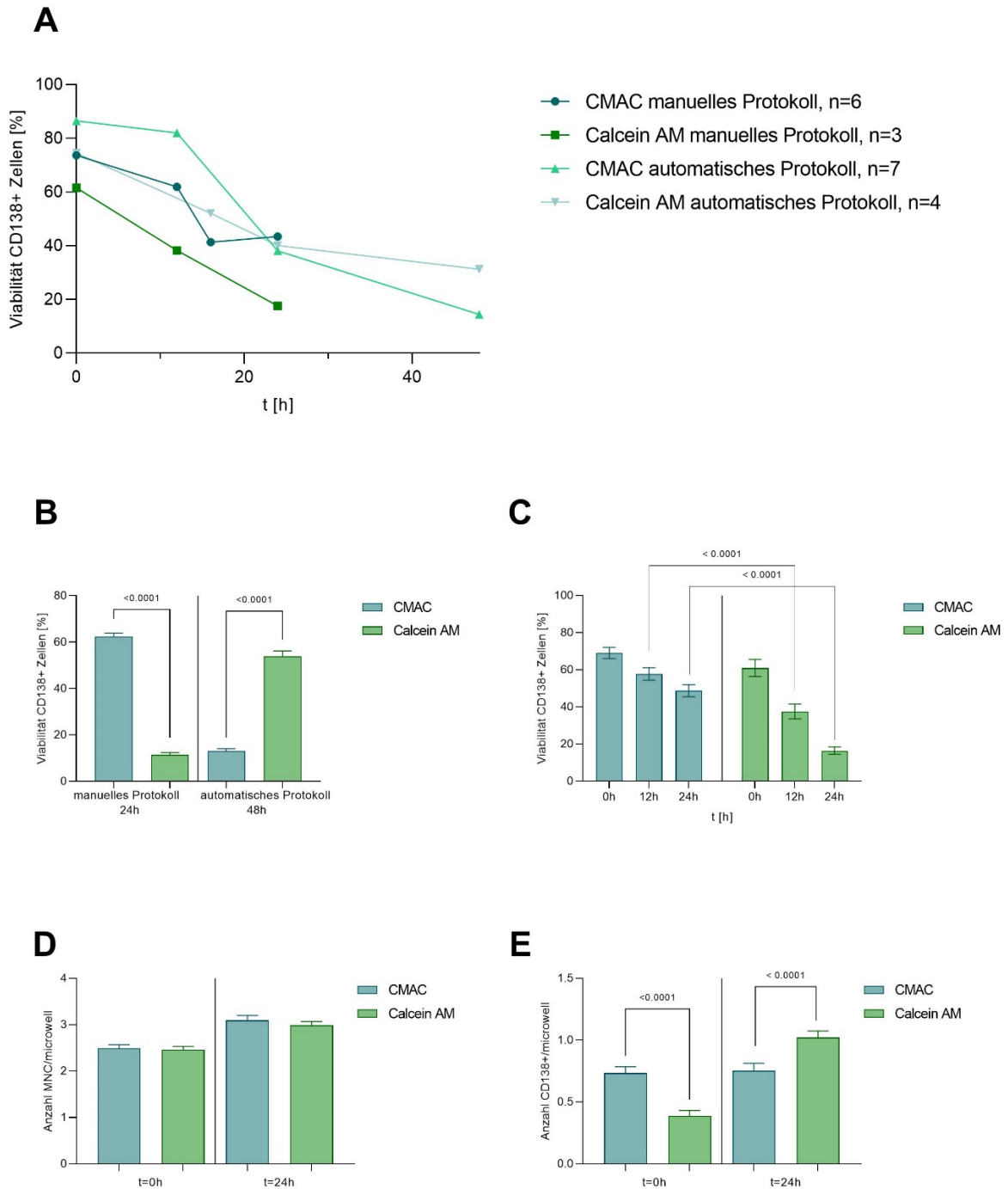


Abb. 14: Vergleich von CMAC und Calcein AM für KM, jeweils Daten aus der Negativkontrolle. **A:** Vergleich der Viabilität in Abhängigkeit von manuellem oder automatischem Protokoll. Dargestellt sind die Mittelwerte der durchschnittlichen Viabilitäten der CD138+-Zellen pro Mikrowell in der jeweiligen Gruppe; **B:** Vergleich der Viabilität in Abhängigkeit von manuellem oder automatischem Protokoll. Dargestellt sind die Mittelwerte aller Viabilitäten der CD138+-Zellen pro Mikrowell in der jeweiligen Gruppe, Mann-Whitney-Test; **C:** Vergleich Viabilität der CD138+ Zellen bei Patient CP04. Mann-Whitney-Test; **D-E:** Vergleich der detektierten MNC und CD138+-Zellen pro Mikrowell bei Patient CP04 zum Zeitpunkt 0 und 24h, Mann-Whitney-Test.

3.5. Viabilität von primären MM-Zellen

Zur Einschätzung der Eignung der Daten für die weitere Analyse hinsichtlich der Dosis-Wirkungs-Beziehungen der getesteten Substanzen wurde jeweils von jeder Probe die Viabilität in der Negativkontrolle und der Erfolg der Apoptosedetektion in der Positivkontrolle untersucht.

Wie in Abbildung 15 zu sehen, zeigte sich unter Verwendung des manuellen Protokolls für NDMM und RRMM eine gute Viabilität der CD138+ bis 24h mit einer durchschnittlichen Viabilität von 41,9% (NDMM) bzw. 38,1% (RRMM). Nach 48h war die Viabilität 2,7%, wobei diese Messung nur bei Patient CP13 (NDMM) vorgenommen wurde. Eine Ausnahme bildet Patient CP07 (RRMM), wo bereits initial eine Viabilität von nur 35,9% vorlag und nach 24h auf 5,0% sank. Ursächlich ist hier am ehesten eine schlechte Probenqualität. Zwei Patient*innen wurden beim manuellen Protokoll zudem unter laufender Therapie untersucht (CP03: Lenalidomid, CP11: EloPomDex), die beide einen Plasmazellanteil <5% in der Plattform und eine verminderte Viabilität aufwiesen. Insbesondere bei Patient CP03 lag die Apoptoserate der CD138+-Zellen bereits zu Beginn bei durchschnittlich 100%, bei CP11 lag die Viabilität initial bei 56,8% und nach 24h bei 41,4%.

Durch die Umstellung auf das automatische Protokoll und damit einhergehend der Einsparung multipler zellschädlicher Zentrifugationsschritte konnte die Viabilität der CD138+ auch nach 48h erhöht werden. So lag die durchschnittliche Viabilität nach 24h bei 45,8% (NDMM) bzw. 42,6% (RRMM) und nach 48h bei 24,0% (NDMM) bzw. 27,0% (RRMM). Zu beachten ist dabei, dass bei einem NDMM und 3 RRMM keine Daten mehr einschließlich dem Zeitpunkt 24h vorlagen, da es zum Zellverlust durch Leckage der Kanäle kam. Auch in diesem Protokoll wurde ein Patient unter laufender Therapie untersucht (CP24: Vd), welcher ebenfalls eine hohe Apoptoserate aufwies mit initial 57,1% und 100% nach 24h.

Zur Kontrolle der korrekten Apoptosemessung wurde bei den Patient*innen mit erfolgter Positivkontrolle (H₂O₂ 10mM) die normalisierte Viabilität berechnet. Bei den Patient*innen CP07, CP08 (in Kontrolle mit Zusatz von anti-CD271), CP10, CP18 und CP21 lagen ab bestimmten Zeitpunkten Werte über 100% vor (s. Abb. 15), welche eine höhere Apoptose in der Negativkontrolle verglichen mit der Positivkontrolle implizieren würde. Somit kam es zu diesen Zeitpunkten zu keiner korrekten Apoptosemessung.

Aufgrund von niedriger Viabilität oder falscher Apoptosemessung wurden von den 22 untersuchten Proben insgesamt 5 komplett und 3 ab bestimmten Zeitpunkten von der weiteren Analyse ausgeschlossen, eine detaillierte Aufstellung findet sich in Tabelle 20. Bei

Patient CP17 lag der Grund des Analyseausschlusses in einem CD138-Verlust nach 12h bei initialem Anteil von 21,7%.

Bei Verwendung des automatischen Protokolls konnte auch nach 48h eine gute Viabilität der primären Myelomzellen erreicht werden, so dass eine weitere Analyse hinsichtlich der Response auf verschiedene Substanzen möglich war. Aufgrund bereits initial erhöhter Apoptoserate bei refraktären Patient*innen unter Therapie, waren diese nicht für eine Analyse mit der CellPly-Plattform geeignet. Bei einem Abstand von mindestens 3 Wochen zur letzten Therapie erreichten die CD138+-Zellen normale Viabilitätsdaten. Aufgrund der Fehleranfälligkeit der Apoptosemessung durch die Plattform sollte immer eine Positivkontrolle durchgeführt werden, um die entsprechenden Daten von der Analyse auszuschließen.

Tab. 20: Aufstellung der Patient*innen, deren Daten komplett oder teilweise von der Response-Analyse ausgeschlossen wurden.

ID	Zeitpunkte	Grund für Ausschluss
CP03	Alle	Viabilität, Apoptosemessung
CP07	Alle	Viabilität, Apoptosemessung
CP08	Mit anti-CD271 ab 24h	Apoptosemessung
CP10	Alle	Apoptosemessung
CP17	Alle	Keine CD138+ ab 12h
CP18	Ab 48h	Apoptosemessung
CP21	Ab 24h	Apoptosemessung
CP24	Alle	Viabilität

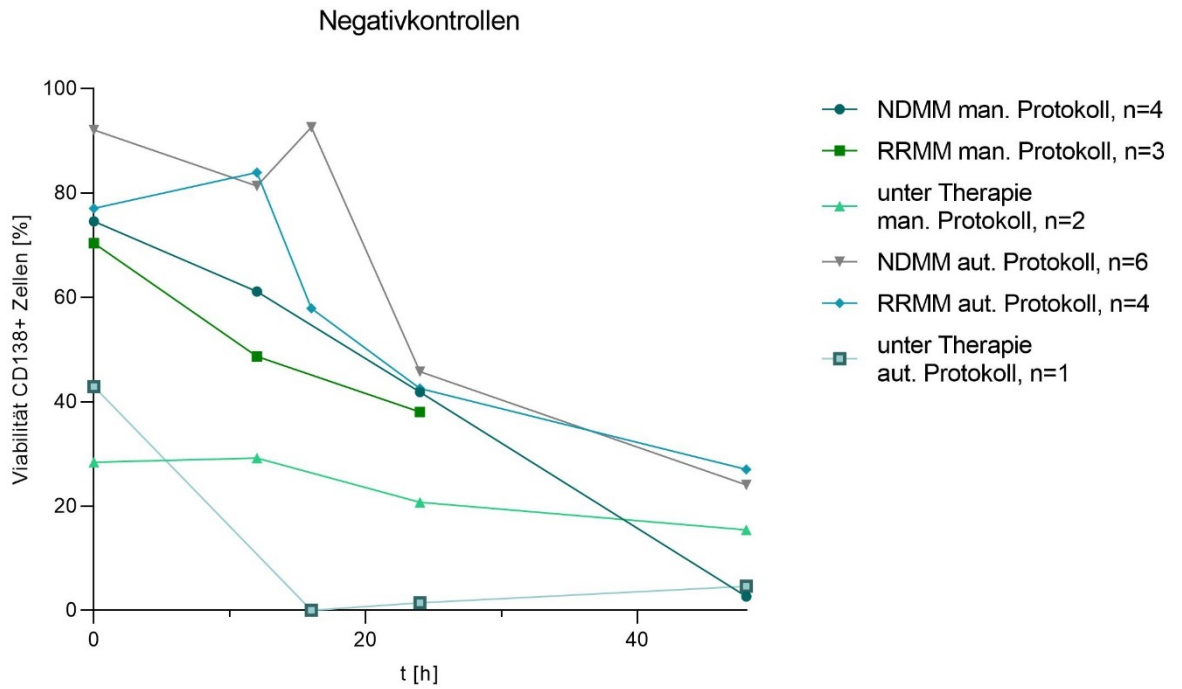
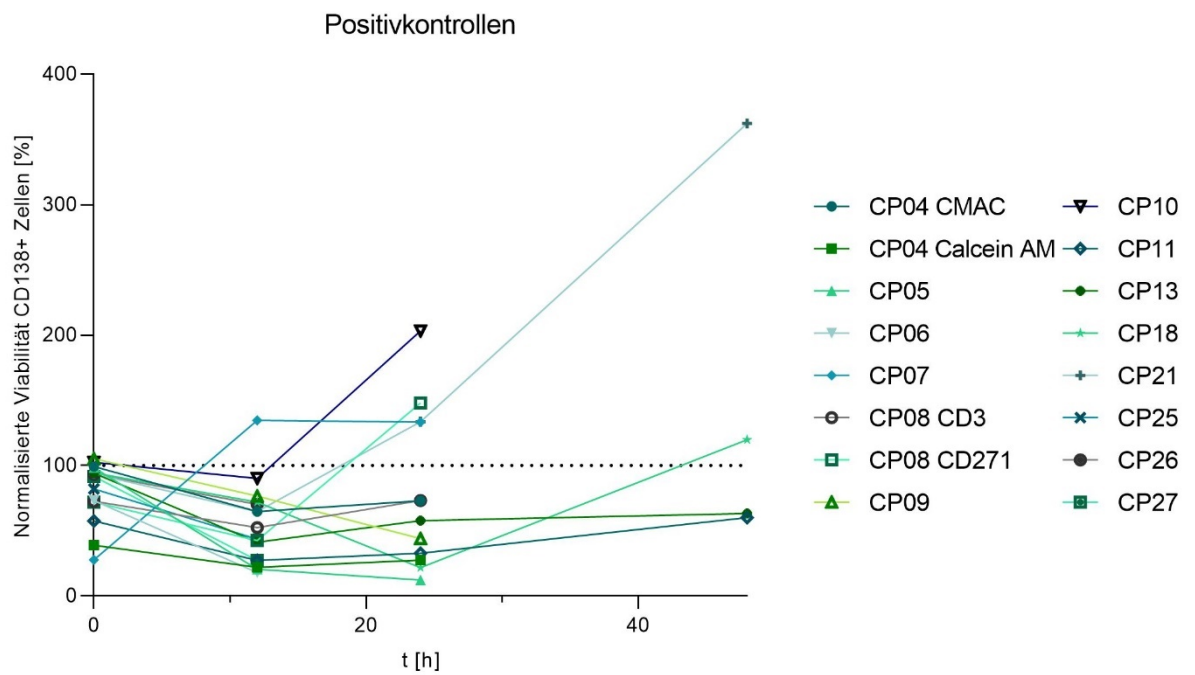
A**B**

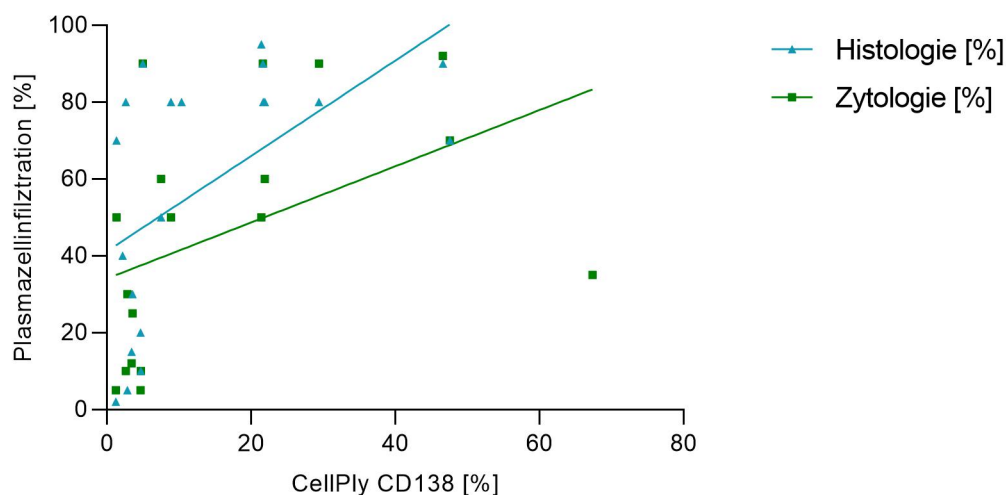
Abb. 15: Darstellung der Viabilität primärer CD138+-Zellen; **A:** Viabilität in Negativkontrollen unterteilt nach automatischem und manuellem Protokoll sowie nach Myelomstatus; **B:** An Negativkontrolle normalisierte Viabilität der Positivkontrollen.

3.6. Vergleich CellPly mit Histologie und Zytologie

Um zu überprüfen, wie aussagekräftig die innerhalb der CellPly-Plattform untersuchten Myelomzellen sind, wurde eine Korrelationsanalyse des Plasmazellanteils in der Plattform mit dem der histopathologischen und zytologischen Untersuchung durchgeführt.

Wie in Abbildung 16 zu sehen, korrelierten die durch CellPly gemessenen Anteile der CD138+- Zellen nicht mit den Plasmazellinfiltrationen der Histologie und Zytologie, da unabhängig von dem tatsächlichen Anteil innerhalb der CellPly-Plattform bei der Hälfte aller Patient*innen nur ein CD138+-Anteil von <5% gemessen wurde. Mittels einfacher linearer Regression wurde R^2 bestimmt, welches bei 0,2977 (Histologie) bzw. 0,2039 (Zytologie) lag.

Somit ist der Anteil der durch die CellPly-Plattform detektierten und damit untersuchten Myelomzellen sehr gering.



	Histologie [%]	Zytologie [%]
R squared	0.2977	0.2039

Abb. 16: Korrelationsanalyse des Plasmazellanteils gemessen in der CellPly-Plattform zum Zeitpunkt 0h mit dem angegebenen Anteil im histopathologischen und zytologischen Befund. Einfache lineare Regression.

3.7. Automatisches Protokoll

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit des automatischen Protokolls für das MM wurde dies zunächst mit U266-Zellen durchgeführt. Dafür wurden die U266 einmal mit einem Triplet von 4 verschiedenen Melphalankonzentrationen und einmal mit jeweils 4 verschiedenen Konzentrationen von Melphalan, Bortezomib und Dexamethason inkubiert. Anschließend erfolgte eine Auswertung hinsichtlich Viabilität, Dosis-Wirkungsbeziehung der Substanzen, Reliabilität und Effekt des PI-Restains.

Bei der Testung von 3 Replikaten verschiedener Melphalan-Dosierungen zeigten sich für die Konzentrationen 7,5 μ M, 15 μ M und 30 μ M nach 48h signifikante Unterschiede zwischen den Viabilitäten der einzelnen Replikate (s. Abb. 17). Den größten Unterschied erreicht dabei Melphalan 30 μ M (9,1% vs. 32,3%; $p < 0,0001$). Trotz der Unterschiede zeigten aber alle Replikate ein Ansprechen auf Melphalan nach 48h. Bei DMSO und Melphalan 60 μ M kam es zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den drei Replikaten. Unter Verwendung des automatischen Protokolls konnte für die Zelllinie U266 eine Sensitivität nach 24h auf Bortezomib und Melphalan mit entsprechenden Dosis-Wirkungskurven dargestellt werden, für Melphalan zeigte sich eine Wirkungssteigerung nach 48h. Dabei waren die Unterschiede in den Apoptoseraten für Bortezomib bei den Konzentrationen 50nM und 200nM, für Melphalan bei allen Konzentrationen statistisch signifikant. Für die Substanz Dexamethason zeigte sich in den getesteten Konzentrationen eine leicht höhere Viabilität als in der Negativkontrolle auch nach 48h, so dass hier eine Resistenz angenommen werden konnte.

Der im automatischen Protokoll enthaltene PI-Restain nach 24h und 48h zeigte wie in Abb. 18 dargestellt eine signifikante Verbesserung der Apoptosedetektion für U266-Zellen, welche sich insbesondere in der Positivkontrolle mit H₂O₂ nach 24h darstellte (Viabilität 31,3% vs. 6,6%; $p < 0,0001$). Lediglich die Werte nach 48h in der Positivkontrolle wiesen keinen signifikanten Unterschied auf, hier lag jedoch bereits vor dem PI-Restain eine sehr hohe Apoptoserate vor. Durchschnittlich konnte die Apoptoseerkennung um 7,0% (DMSO) bzw. 21,2% (H₂O₂) nach 24h gesteigert werden. Dieser Effekt zeigte sich auch für primäre CD138⁺-Zellen, bei denen die Apoptoserate nach 24h nach dem PI-Restain um 32,0% (Negativkontrolle) bzw. 25,0% (Positivkontrolle) höher war. Sowohl für die U266 als auch die primären Myelomzellen konnte auch nach 48h eine Differenz von durchschnittlich mehr als 6% festgestellt werden. Aufgrund der fehlenden Vergleichbar-

keit der absoluten Viabilitätszahlen zwischen den 3 verschiedenen Patientenproben, erfolgte für die CD138+-Zellen nur die Darstellung der jeweiligen Differenzen, bei welcher die 3 Werte nicht für signifikante Unterschiede reichten.

Die Anwendung des automatischen Protokolls bei der U266 zeigte einen guten Outcome im Sinne von gut messbaren Dosis-Wirkungsbeziehungen. So konnte ein Ansprechen der U266 auf Bortezomib und Melphalan nach 24h und eine Resistenz gegenüber Dexamethason gemessen werden. Bezüglich der Reliabilität weist auch das automatische Protokoll noch relevante Schwankungen in der Apoptosemessung insbesondere in Bereich der intermediären Apoptose auf. Durch das PI-Restaining konnte eine bessere Apoptoseerkennung erzielt werden, die sich auch beim PI-Restain der primären Myelomzellen zeigt.

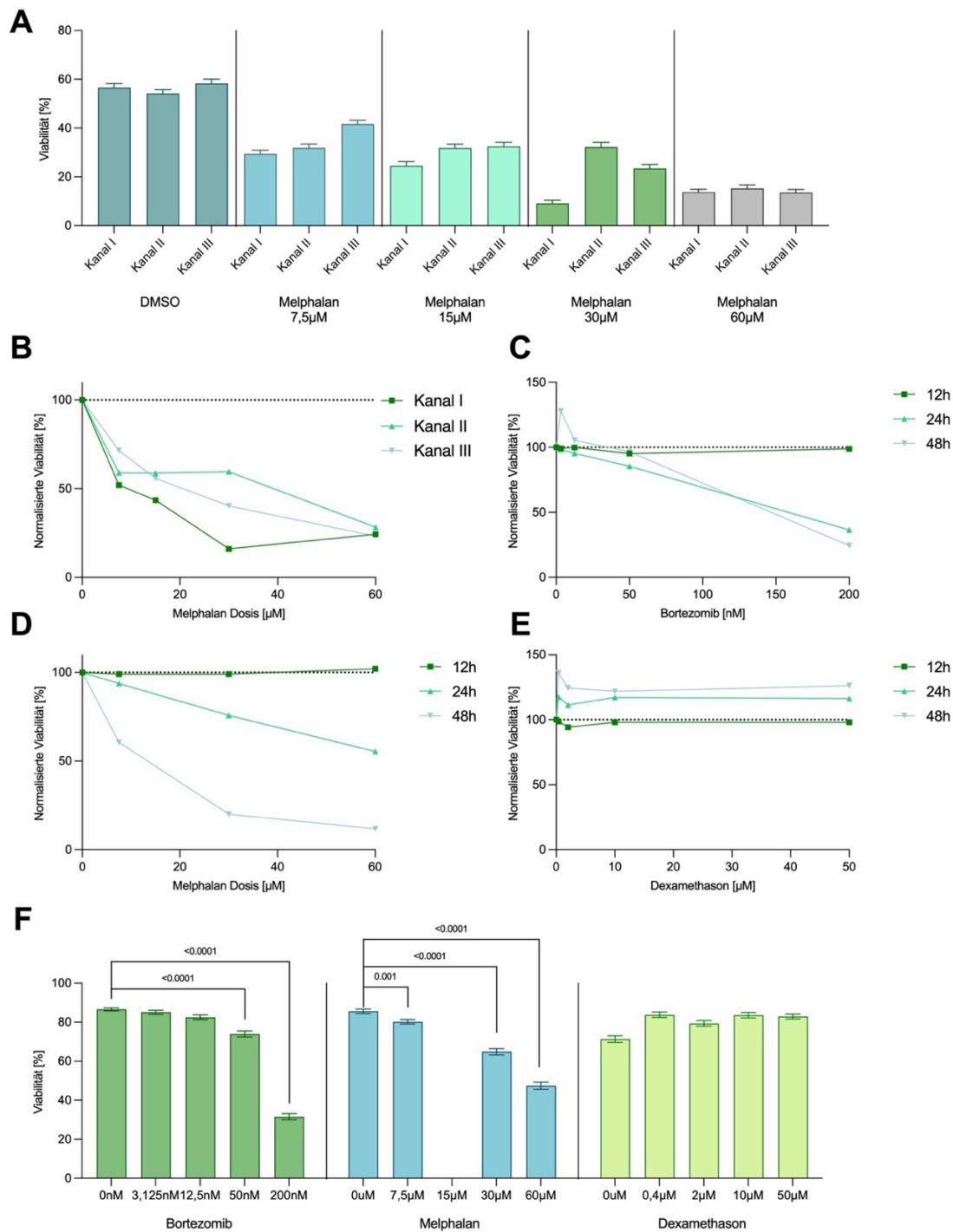


Abb. 17: Automatisches Protokoll mit U266. **A:** Darstellung der Mittelwerte der Viabilität mit SEM nach 48h der Negativkontrolle und 4 Melphalankonzentrationen, jeweils gemessen in 3 verschiedenen Kanälen. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiplen Vergleichen. **B:** Dosis-Wirkungskurven für Melphalan zum Zeitpunkt 48h mit an Negativkontrolle normalisierter Viabilität, durchgeführt in 3 verschiedenen Kanälen. **C-E:** Dosis-Wirkungskurven für Bortezomib, Melphalan und Dexamethason mit an Negativkontrolle normalisierter Viabilität. **F:** Absolute Viabilitäten zum Zeitpunkt 24h der Substanzen in den verschiedenen Konzentrationen. Leakage bei Melphalan 15μM. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiplen Vergleichen. Kein Test auf statistische Signifikanz bei Dexamethason, da Werte höher als bei Negativkontrolle.

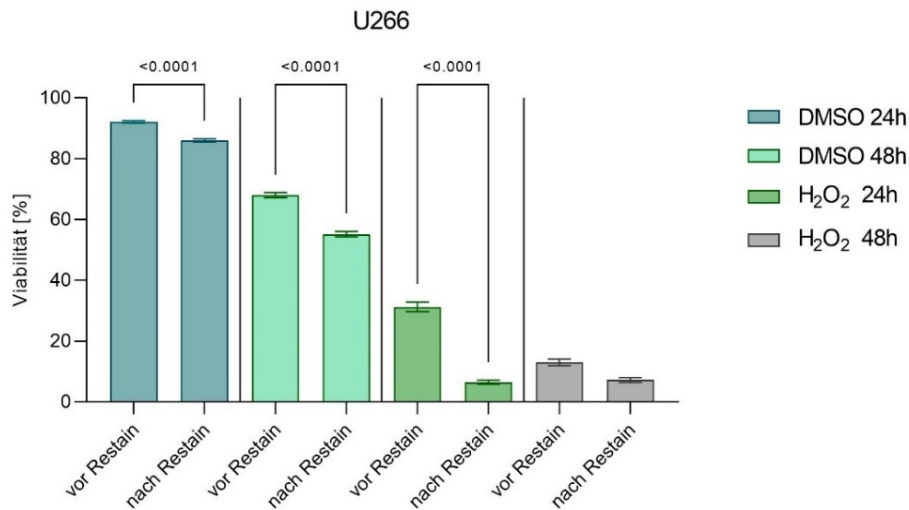
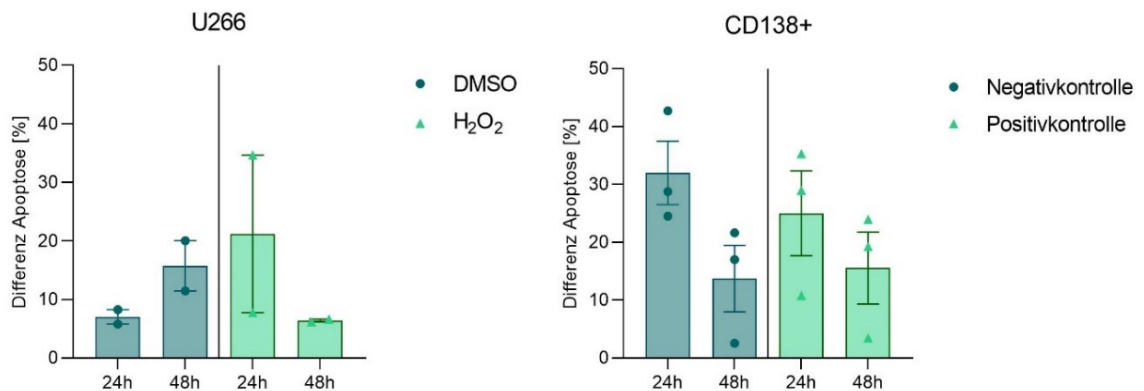
A**B**

Abb. 18: PI-Restain. **A:** Absolute Viabilitäten von U266 vor und nach PI-Restain aus 2 Experimenten. Kuskall-Wallis-Test; **B:** Darstellung der Differenzen der absoluten Apoptoseraten vor und nach PI-Restain. U266: n=2, CD138+: n=3

3.8. Substanztestung an primären Myelomzellen

Für das in-vitro-drug-testing der primären Myelomzellen wurden diese innerhalb der CellPly-Plattform mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen Bortezomib, Melphalan, Dexamethason, Lenalidomid, Daratumumab und Elotuzumab bis zu 48h inkubiert. Ziel der Untersuchung war es, die ideale Testkonzentration und den optimalen Analysezeitpunkt für jede Substanz zu eruieren mit der Fragestellung, ob für die Substanzen ein Resistenz-Screening-Panel erstellt werden könnte, mit jeweils nur einer aussagekräftigen Konzentration und einem festen Analysezeitpunkt.

3.8.1. Bortezomib

Insgesamt wurden 9 Patient*innen auf Bortezomib getestet, davon waren 8 auswertbar. Es erreichten 7 Patient*innen eine normalisierte Viabilität unter 90% (CP05, CP11, CP13, CP16, CP18, CP19, CP21), was als zumindest teilweise sensibel betrachtet wurde. Wie den Dosis-Wirkungskurven in Abb. 19 zu entnehmen, lag das beste Ansprechen patientenindividuell nach 12h (CP13, CP21), 24h (CP05, CP18) oder nach 48h (CP11, CP16, CP19) vor, wobei nicht von allen Patient*innen Daten zu allen Zeitpunkten vorlagen aufgrund der unter 3.5 beschriebenen Probleme bei der Apoptosemessung.

Ausgehend von den Dosis-Wirkungskurven wurden die Konditionen mit einer $Viab_{norm} < 90\%$ hinsichtlich eines signifikanten Unterschieds der absoluten Viabilitäten zur Negativkontrolle untersucht. Nach 24h lagen bei CP05 für die Konzentrationen 12,5nM und 50nM (79,1% vs. 26,5%; $p < 0,0001$ bzw. 79,1% vs. 18,3%; $p < 0,0001$) und bei CP18 für die Konzentrationen 50nM und 200nM (53,8% vs. 25,0%; $p < 0,0001$ bzw. 53,8% vs. 20,1%; $p < 0,0001$) signifikante Viabilitätsunterschiede vor. CP16 erreichte nach 48h einen signifikanten Viabilitätsunterschied bei der Konzentration 50nM (17,1% vs. 2,3%; $p < 0,0001$). Bei Patient CP19 lag das beste Ansprechen bei 200nM nach 48h mit einer $Viab_{norm}$ von 41,7% vor mit Erreichen des Signifikanzniveaus (27,4% vs. 11,4%; $p = 0,0418$). Zusätzlich lagen auch nach 24h für die Konzentrationen von 50nM und 200nM signifikante Unterschiede vor, wenn auch mit geringerem Ansprechen auf die Substanz (61,7% vs. 48,2%; $p = 0,0033$ bzw. 61,7% vs. 53,5%; $p = 0,0457$). Bei CP13 zeigten die Konzentrationen 3,125nM und 12,5nM nach 12h Wirkung, davon stellte aber nur zweitere einen signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle dar (47,9% vs. 42,8%; $p = 0,0407$). Bei den übrigen Patient*innen mit partieller Sensibilität lag das jeweils beste Ansprechen bei 200nM nach 12h für CP21 (74,5% vs. 57,3%; $p = 0,5711$) und bei 50nM nach 48h für CP11 (15,4% vs. 12,7%; $p > 0,9999$).

Bei der Probe von CP08 lag die $Viab_{norm}$ immer über 90%, so dass eine in-vitro-Resistenz vorlag.

Für Bortezomib stellte somit die Konzentration 50nM nach 24h einen guten Screeningwert dar, da hier die meisten signifikanten Responses erreicht werden konnten.

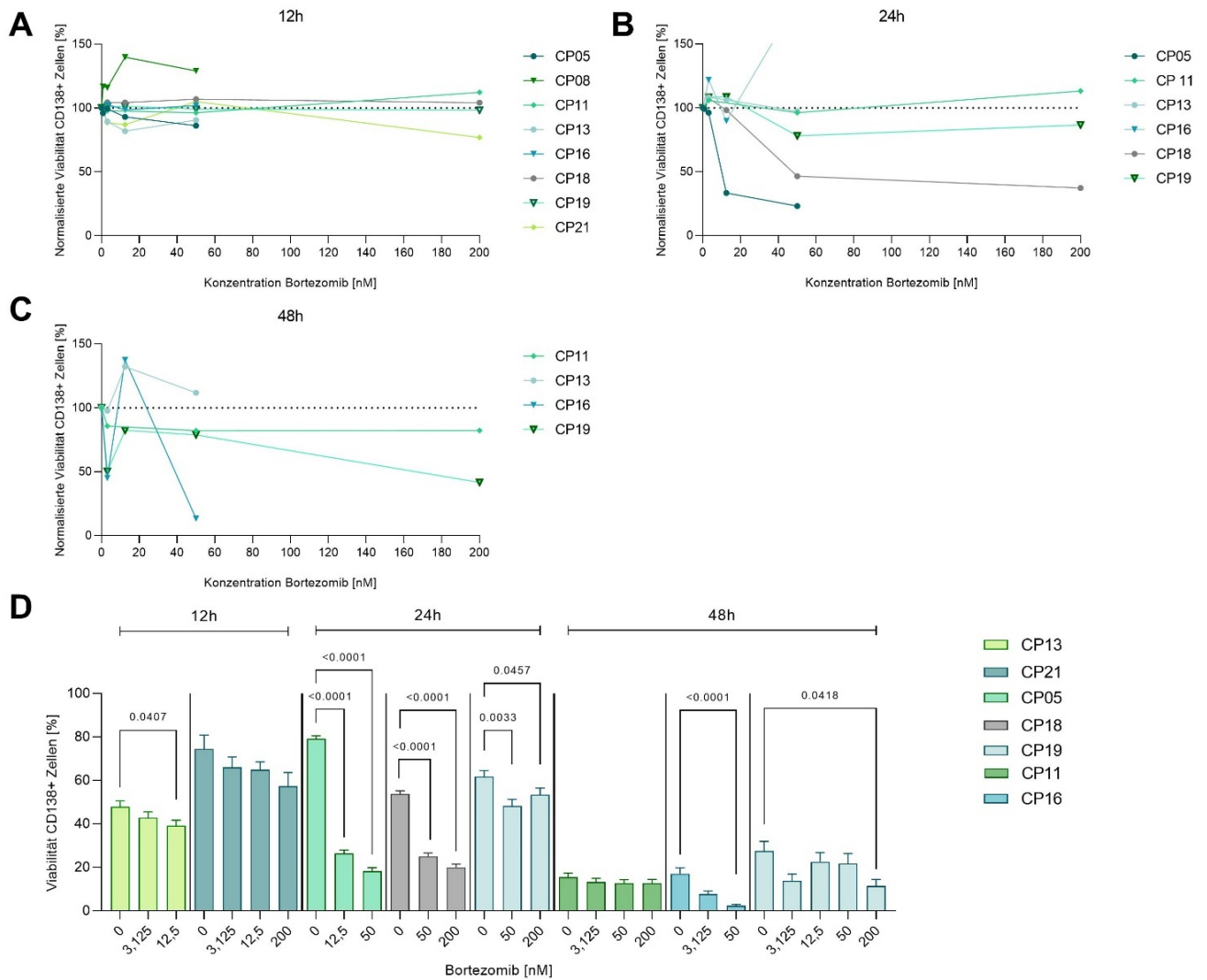


Abb. 19: D/R Bortezomib. Cave: Bei CP05 0,05% DMSO, bei CP19 0,5% DMSO, CP11 0,6% DMSO. **A-C:** Dosis-Wirkungskurven mit an Negativkontrolle normalisierter Viabilität für die Zeitpunkte 12h, 24h und 48h. **D:** Viabilitäten aller Konditionen mit normalisierter Viabilität <90% und entsprechender Negativkontrolle. Darstellung der Mittelwerte + SEM. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiplen Vergleichen.

3.8.2. Melphalan

Melphalan wurde an 11 Proben getestet, 8 eigneten sich zur weiteren Auswertung. Bei 7 Patient*innen kam es in mindestens einer Konzentration zur normalisierten Viabilität unter 90% (CP05, CP09, CP11, CP13, CP16, CP18, CP19).

Den Dosis-Wirkungskurven in Abbildung 20 ist zu entnehmen, dass es auch bei Melphalan patientenindividuell nach 24h (CP05, CP09, CP18) oder nach 48h (CP11, CP16) zur jeweils höchsten Apoptoserate kam. Auch hier ist zu beachten, dass nicht für alle Patient*innen eine Messung über 48h durchgeführt wurde.

In der weiteren Analyse wurden die Konditionen mit einer normalisierten Viabilität unter 90% auf Signifikanz überprüft.

Dabei zeigten sich signifikante Viabilitätsunterschiede nach 24h für CP05 bei einer Konzentration von 15 μ M (79,1% vs. 60,0%; $p < 0,0001$), für CP09 bei den Konzentrationen 3,75 μ M ($p < 0,0001$), 15 μ M ($p < 0,0001$), 30 μ M ($p = 0,0002$) und 60 μ M ($p < 0,0001$) sowie für CP19 bei den Konzentrationen 15 μ M ($p < 0,0001$), 30 μ M ($p = 0,0029$) und 60 μ M ($p < 0,0001$). Das beste Ansprechen zeigte CP19 nach 24h und CP13 nach 48h jeweils bei einer Konzentration von 7,5 μ M, jedoch ohne signifikante Unterschiede zur Negativkontrolle. Ebenso zeigte sich bei CP11 und CP16 nach 48h 15 μ M am wirksamsten, jedoch ohne Erreichen des Signifikanzniveaus.

Bei CP21 lag die $Viab_{norm}$ immer über 90%, so dass eine in-vitro-Resistenz vorlag.

In Zusammenschau der Ergebnisse stellte die Konzentration 15 μ M mit Messung nach 24h den zuverlässigsten Marker für das Ansprechen auf Melphalan dar.

3.8.3. Dexamethason

Für die Testung von Dexamethason standen 7 Proben zur Verfügung, von denen 5 zur weiteren Analyse geeignet waren. Alle Proben erreichten bei bestimmten Konzentrationen eine normalisierte Viabilität unter 90% und waren somit zumindest teilweise sensibel gegenüber der Substanz.

Die unter Abbildung 21 zu sehenden Dosis-Wirkungs-Kurven zeigen für alle Proben ein gutes Ansprechen nach 24h, die bei CP13 und CP19 durchgeführten Messungen nach 48h zeigten eine weitere Steigerung der Apoptoserate. Bei CP21 lagen aufgrund von inkorrekten Apoptosemessungen nur die Werte nach 12h vor, die bereits eine $Viab_{norm}$ von bis zu 82,6% zeigten.

Die weitere Prüfung der Konzentrationen mit einer $Viab_{norm}$ unter 90% zeigte für die Patient*innen CP05, CP13, CP18 und CP19 nach 24h signifikante Viabilitätsabfälle im Vergleich zur Negativkontrolle. Die notwendige Konzentration war dabei sehr variabel, so hatten bei CP05 bereits die Konzentration 0,016 μ M (79,1% vs. 64,2%; $p < 0,0001$) und bei CP19 die Konzentration 0,4 μ M (61,7% vs. 47,2%; $p = 0,0040$) die größte Wirkung, während bei CP13 erst eine signifikante und auch stärkste Wirkung bei einer Konzentration von 10 μ M (18,1% vs. 4,4%; $p < 0,0001$) zu sehen war. Im Gegensatz dazu zeigten CP05 und CP19 bei höheren Konzentrationen ($\geq 0,4\mu$ M bzw. $\geq 2\mu$ M) keine signifikante Response mehr. CP18 sprach auf alle getesteten Konzentrationen (0,4 μ M-50 μ M) an mit einem Maximum bei 50 μ M (55,7% vs. 24,0%; $p < 0,0001$).

Die Experimente zeigten somit keine ideale Testkonzentration für Dexamethason, lediglich stellte der Zeitpunkt nach 24h einen aussagekräftigen Messpunkt für die Responseanalyse dar.

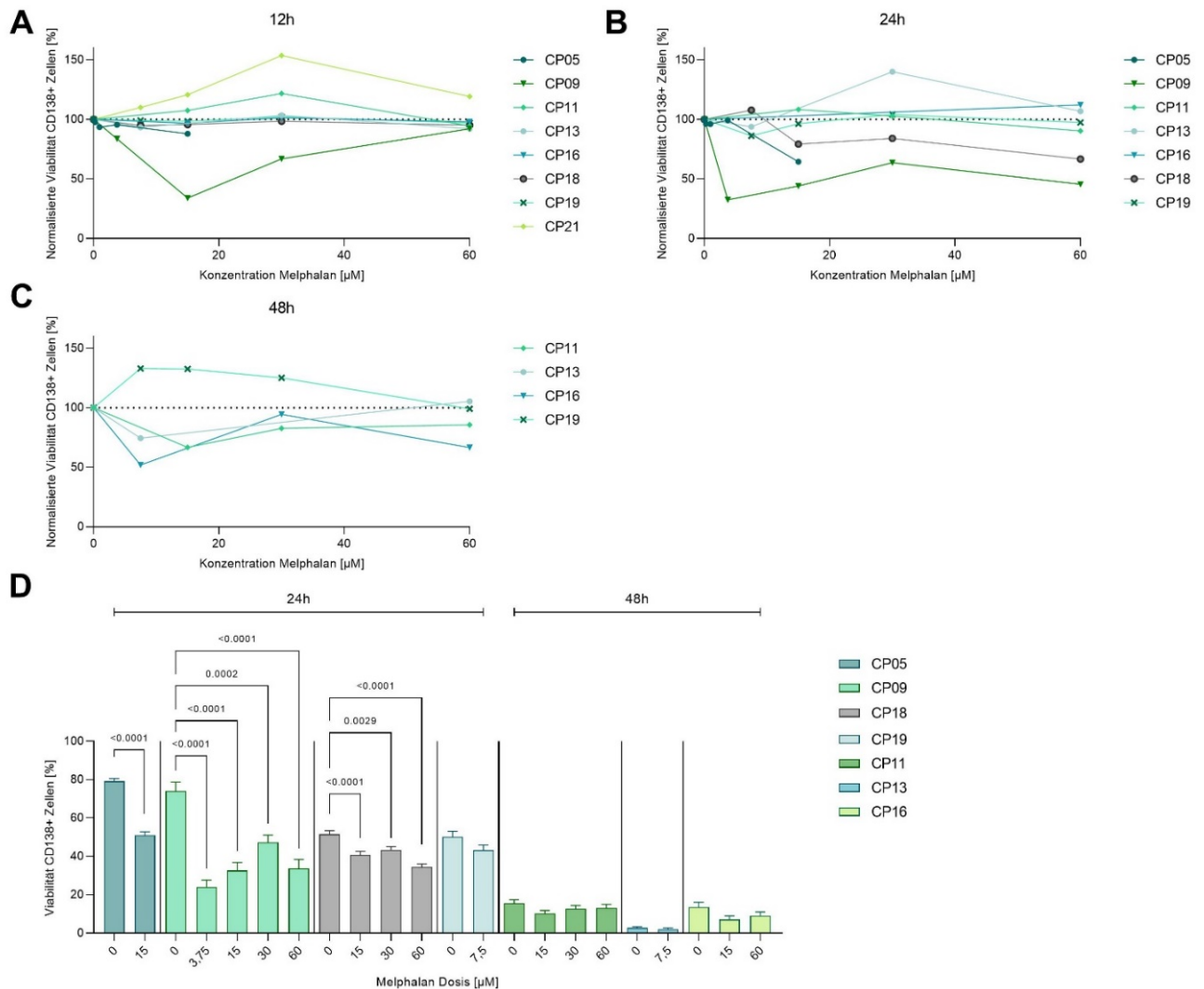


Abb. 20: D/R Melphalan. Cave: Bei CP05 0,05% DMSO, bei CP13 0,0005% DMSO. **A-C:** Dosis-Wirkungskurven mit an Negativkontrolle normalisierter Viabilität für die Zeitpunkte 12h, 24h und 48h. **D:** Viabilitäten aller Konditionen mit normalisierter Viabilität $<90\%$ und entsprechender Negativkontrolle. Darstellung der Mittelwerte + SEM. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiplen Vergleichen bzw. Mann-Whitney-Test.

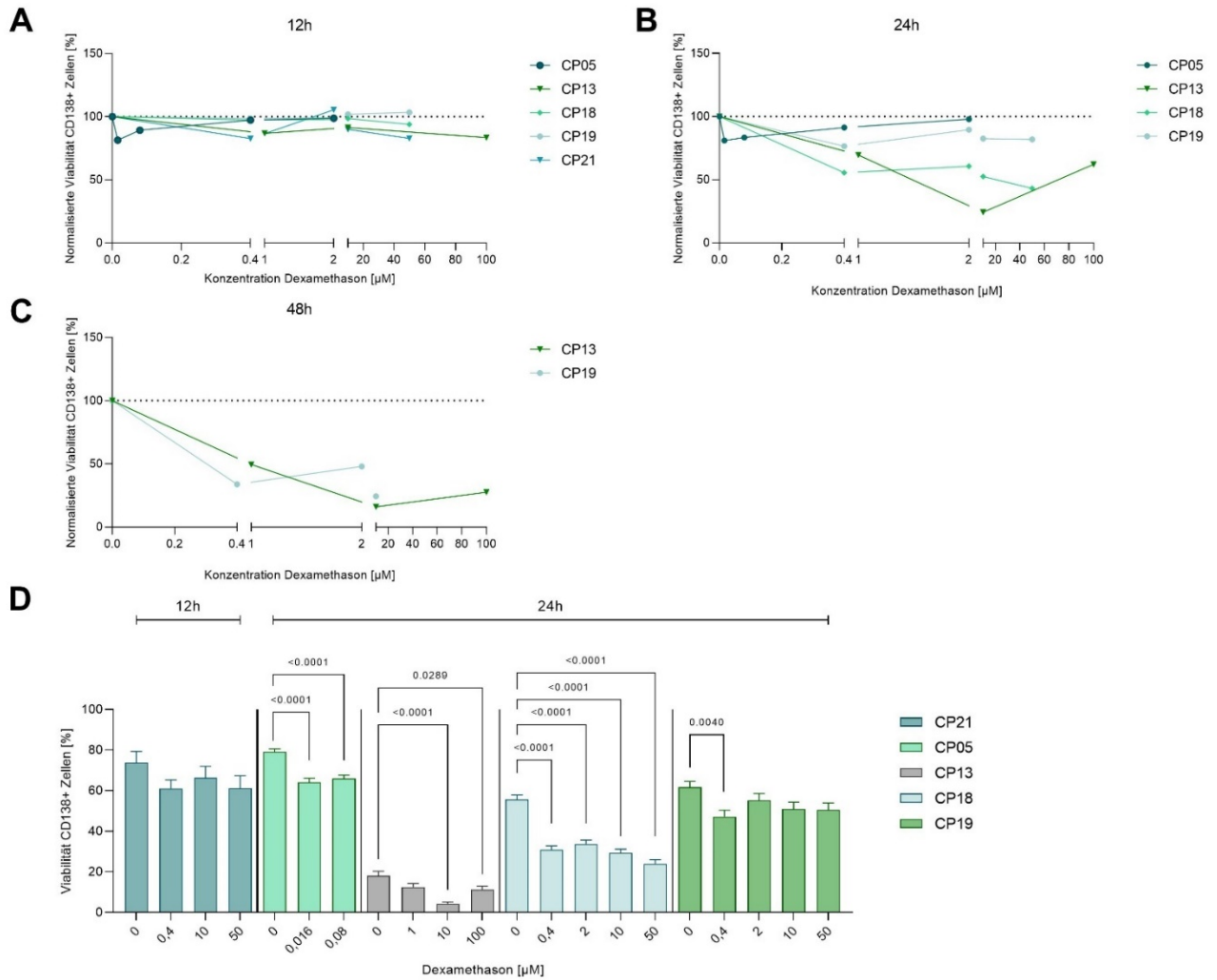


Abb. 21: D/R Dexamethason. Cave: Bei CP05 0,05% DMSO. **A-C:** Dosis-Wirkungskurven mit an Negativkontrolle normalisierter Viabilität für die Zeitpunkte 12h, 24h und 48h. **D:** Viabilitäten aller Konditionen mit normalisierter Viabilität <90% und entsprechender Negativkontrolle. Darstellung der Mittelwerte + SEM. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiplen Vergleichen.

3.8.4. Lenalidomid

Zur Einschätzung der Beurteilbarkeit der Lenalidomid-Wirkung durch die CellPly-Plattform wurden 6 Patient*innen untersucht, von denen CP07 aufgrund der schlechten Viabilität nicht ausgewertet werden konnte. Insgesamt erreichten 4 Patient*innen in mindestens einer Kondition eine $Viab_{norm}$ unter 90%. Aufgrund von Leckage und Fehler in der Apoptose-Messung konnten von den Patient*innen CP08, CP25, CP26 und CP27 nur Werte vom Zeitpunkt 12h ausgewertet werden. Für CP04 konnte eine Inkubation über 24h durchgeführt werden, welche wie in Abbildung 22 zu sehen zu einem Ansprechen führte, während nach 12h kein Effekt messbar war.

Bei weiterer Auswertung der Daten mit einer $Viab_{norm}$ unter 90% zeigte sich nach 12h nur bei CP26 für die Konzentration 10 μ M ein signifikanter Viabilitätsunterschied (53,0% vs. 33,3%; $p=0,0472$). Nach 24h erreichte auch CP04 eine signifikante Lenalidomid-Wirkung in den Konzentrationen 1,875 μ M (56,6% vs. 43,3%; $p=0,0184$) und 7,5 μ M ((56,6% vs. 45,1%; $p=0,0370$). Bei CP25 zeigte sich die stärkste Wirkung bei 50 μ M, für CP08 wurde nur die Konzentration 10 μ M getestet, beide erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau.

Für CP27 lag die $Viab_{norm}$ immer über 90%, so dass eine in-vitro-Resistenz vorlag.

Aufgrund der wenigen signifikanten Daten ließ sich für Lenalidomid keine Aussage zur idealen Testkonzentration oder idealem Testzeitpunkt treffen.

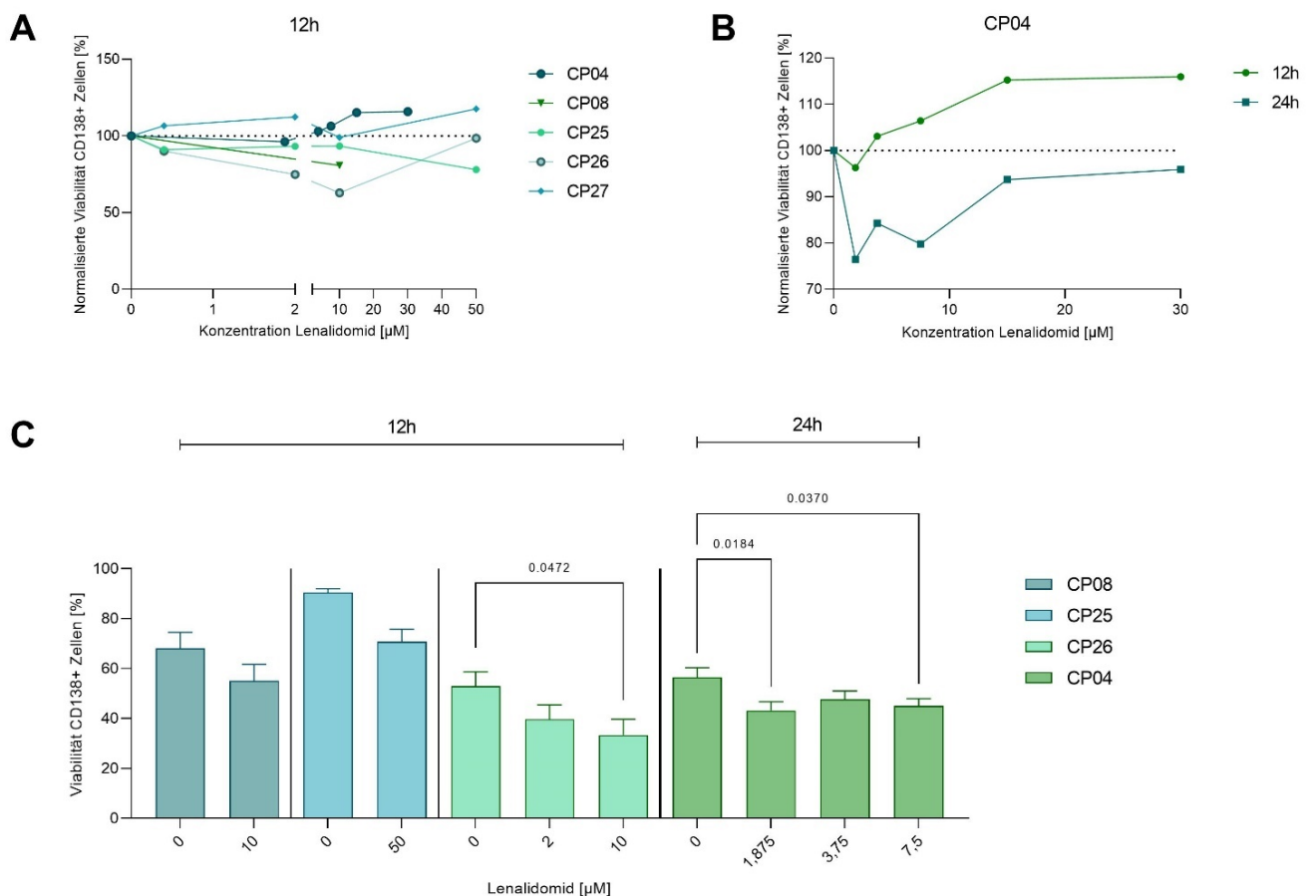


Abb. 22: D/R Lenalidomid. Cave: Bei CP8 0,3% DMSO & CD271 (kein 24h), technische Probleme nach 24h: keine CD138 mehr. **A:** Dosis-Wirkungskurven mit an Negativkontrolle normalisierter Viabilität für den Zeitpunkt 12h. **B:** Dosis-Wirkungskurven von CP04 mit an Negativkontrolle normalisierter Viabilität für die Zeitpunkte 12h und 24h. **C:** Viabilitäten aller Konditionen mit normalisierter Viabilität <90% und entsprechender Negativkontrolle. Darstellung der Mittelwerte + SEM. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiplen Vergleichen bzw. Mann-Whitney-Test.

3.8.5. Daratumumab

Daratumumab konnte an 5 Patient*innen getestet werden, aufgrund der hohen CD138+-Mortalität bei CP03 musste dieses Experiment jedoch von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. Aufgrund von Leckage und Fehler in der Apoptosemessung konnten von den Patient*innen CP25, CP26 und CP27 nur Werte vom Zeitpunkt 12h ausgewertet werden.

Alle 4 Patient*innen erreichten mindestens einmal eine $Viab_{norm}$ unter 90%, bei CP06 war dies jedoch nur nach 48h nachzuweisen. Unter diesen Konditionen stellten sich nur die Konzentrationen 0,1 μ g/ml und 1 μ g/ml bei CP25 (90,6% vs. 60,7%; $p=0,0018$ bzw. 90,6% vs. 34,4%; $p<0,0001$) und 100 μ g/ml nach 48h bei CP06 (4,5% vs. 0,8%; $p=0,0077$) als signifikant dar. Bei CP26 stellte sich ebenfalls die Konzentration 100 μ g/ml und bei CP27 0,1 μ g/ml als wirksamste Konzentrationen heraus, jedoch mit insignifikanten Unterschieden zur Negativkontrolle.

Aufgrund der wenigen signifikanten Daten ließ sich für Daratumumab ebenso keine Aussage zur idealen Testkonzentration oder idealem Testzeitpunkt treffen.

3.8.6. Elotuzumab

Die Testung von Elotuzumab wurde an 5 Proben durchgeführt, wobei CP03 aufgrund der schlechten CD138+-Viabilität nicht ausgewertet werden konnte. Aufgrund von Leckage und Fehler in der Apoptosemessung konnten von den Patient*innen CP25, CP26 und CP27 nur Werte vom Zeitpunkt 12h ausgewertet werden.

3 der 4 Patient*innen erreichten mindestens einmal eine $Viab_{norm}$ unter 90%, bei CP06 war dies jedoch nur nach 48h nachzuweisen. Die einzige signifikante Wirkung fand sich bei CP25 bei der Konzentration 150 μ g/ml (90,6% vs. 62,2%; $p=0,0010$). Bei CP26 stellte die Konzentration 37,5 μ g/ml und bei CP06 ebenfalls 150 μ g/ml die wirksamste Konzentration dar, jedoch mit einem Signifikanzniveau von $p > 0,05$.

Aufgrund der wenigen signifikanten Daten ließ sich für Elotuzumab somit keine Aussage zur idealen Testkonzentration oder idealem Testzeitpunkt treffen.

Bei der Testung der verschiedenen Substanzen innerhalb der CellPly-Plattform an primären Myelomzellen zeigte sich für Bortezomib, Melphalan und Dexamethason eine gute Anwendbarkeit. So stellte für alle 3 Substanzen der Zeitpunkt 24h eine gute Grundlage zur Response-Analyse dar und für Bortezomib und Melphalan konnten zudem gute Test-

konzentrationen festgestellt werden, bei denen die meisten Patient*innen in-vitro ein signifikantes Ansprechen zeigten (50nM bzw. 15µM). Für die Substanzen Lenalidomid, Daratumumab und Elotuzumab lagen aufgrund von verschiedenen Fehlerquellen nicht genug Daten zur Auswertung vor, um die idealen Testbedingungen zu eruieren.

Insgesamt konnte bei allen Substanzen festgestellt werden, dass es zu großen Schwankungen der Apoptosemessung kommt mit normalisierten Viabilitäten über 100% in einzelnen Konzentrationen, was eine mangelnde Akkuratheit der Plattform darstellt. Ebenso ließen sich nicht immer eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehungen feststellen, so dass die Daten der Responseanalyse der CellPly-Plattform eher qualitativen statt quantitativen Charakters haben. So kann nur eine dichotome Einteilung in sensibel und resistent erfolgen, eine quantitative Aussage zur Response-Tiefe ist nicht möglich.

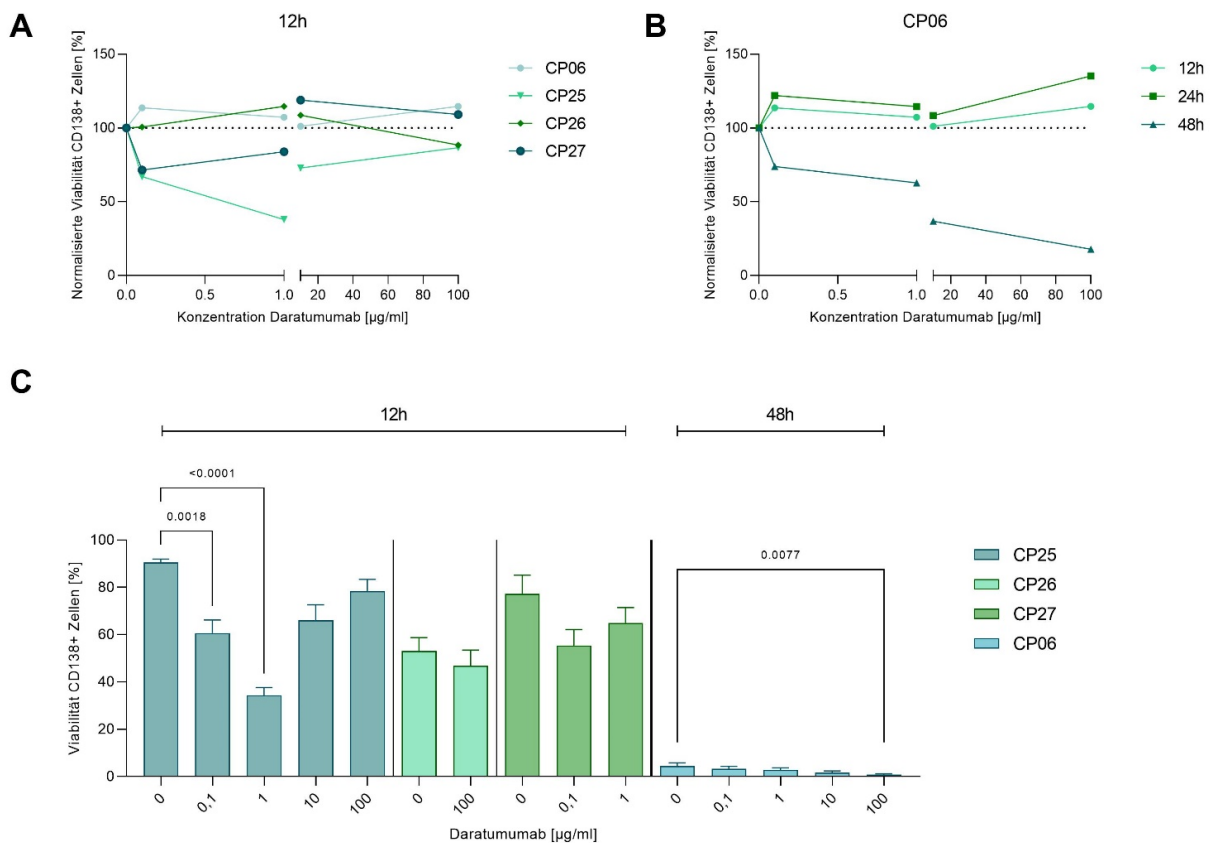


Abb. 23: D/R Daratumumab. Cave: Bei CP25-27 DMSO 0,5% da bessere Viab., technische Probleme nach 24h: keine CD138 mehr. **A:** Dosis-Wirkungskurven mit an Negativkontrolle normalisierter Viabilität für den Zeitpunkt 12h. **B:** Dosis-Wirkungskurven von CP06 mit an Negativkontrolle normalisierter Viabilität für die Zeitpunkte 12h, 24h und 48h. **C:** Viabilitäten aller Konditionen mit normalisierter Viabilität <90% und entsprechender Negativkontrolle. Darstellung der Mittelwerte + SEM. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiplen Vergleichen bzw. Mann-Whitney-Test.

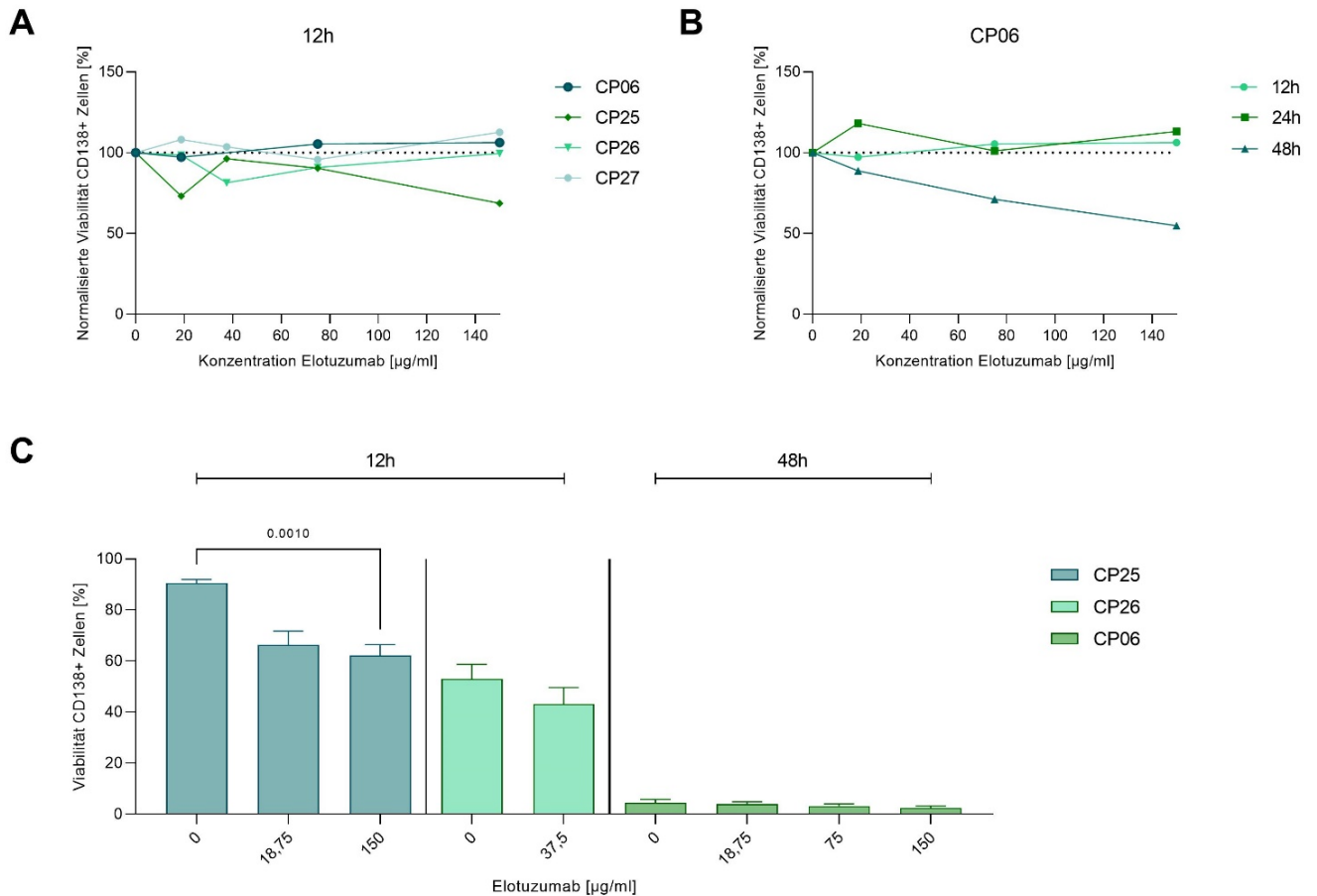


Abb. 24: D/R Elotuzumab. Cave: Bei CP25-27 DMSO 0,5% da bessere Viab., technische Probleme nach 24h: keine CD138 mehr. **A:** Dosis-Wirkungskurven mit an Negativkontrolle normalisierter Viabilität für den Zeitpunkt 12h. **B:** Dosis-Wirkungskurven von CP06 mit an Negativkontrolle normalisierter Viabilität für die Zeitpunkte 12h, 24h und 48h. **C:** Viabilitäten aller Konditionen mit normalisierter Viabilität <90% und entsprechender Negativkontrolle. Darstellung der Mittelwerte + SEM. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiplen Vergleichen bzw. Mann-Whitney-Test.

3.9. Wirkung von SUMOi und synergistische Wirkung mit Bortezomib

Subasumstat stellt als Vertreter der SUMO-Inhibitoren eine noch nicht zugelassene Substanz mit potenziellem Nutzen in der Therapie von Patient*innen mit MM dar. Zur Überprüfung einer in-vitro Wirksamkeit des SUMOi beim MM wurden 5 Proben mit Subasumstat inkubiert, dies erfolgte als Monotherapie wie auch bei 4 der 5 Proben in Kombination mit Bortezomib um auf das Vorhandensein einer synergistischen Wirkung testen.

Von den untersuchten Proben konnte eine aufgrund eingeschränkter CD138+-Viabilität (CP24) nicht weiter untersucht werden. In 3 Experimenten konnte eine $Viab_{norm}$ von unter 90% in mindestens einer Kondition erreicht werden (CP06, CP20, CP22). Aufgrund von

Leckage lagen von CP20 nur Daten bis zum Zeitpunkt nach 16h vor. Während die Viab_{norm} von unter 90% bei CP06 und CP20 bereits nach 12h bzw. 16h erreicht wurde, lag diese bei CP22 erst nach 48h vor. CP23 zeigte sich in-vitro resistent gegenüber dem SUMOi.

Die weitere Analyse zeigte für CP06 für die Zeitpunkte 12h, 24h und 48h das beste Ansprechen auf 0,01µM mit jeweils signifikanten Viabilitätsunterschieden (s. Abb. 25). Nach 24h und 48h zeigte sich auch die Konzentration 0,1µM als signifikant wirksam. Für CP20 lagen nur Daten zum Zeitpunkt 16h vor, da zeigte sich nur die Konzentration 1µM wirksam mit einem signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle (58,8% vs. 38,0%; $p=0,0222$). Die einzige wirksame Kondition bei CP22 stellte die Konzentration 0,1µM nach 48h dar, die zudem signifikant war (62,3% vs. 26,9%; $p<0,0001$).

Zur Überprüfung, ob sich eine synergistische Wirkung zwischen den beiden Substanzen SUMOi und Bortezomib durch die CellPly-Plattform darstellen lässt, wurden die Viabilitäten von CP20, CP22 und CP23 unter der Medikamentenkombination mit der Negativkontrolle und den beiden Substanzen allein verglichen. Für die Signifikanztestung wurde die Kombination jeweils mit den 3 anderen Konditionen verglichen. Wie in Abbildung 26 zu sehen, steigerte die Hinzunahme von Bortezomib in allen 3 Fällen die Wirkung des SUMOi im Vergleich zur Monotherapie, jedoch erreichte jeder der Patient*innen zu einem anderen Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied. Bei CP22 war die ausgeprägteste synergistische Wirkung nach 32h zu sehen, wo die Kombination beider Substanzen die höchste Apoptoserate erreichte (Viabilität SUMOi mono vs. Bortezomib mono vs. Kombi: 61,2% vs. 47,9% vs. 37,8%), dabei stellt sich die Kombination jedoch nur signifikant besser als SUMOi mono dar ($p=0,0008$). Bei CP23 war die Viabilität unter Bortezomib allein niedriger als unter der Kombination (16,9% vs. 32,1%; $p=0,0028$), zum Zeitpunkt nach 24h war die Kombination aber besser als SUMOi allein (32,1% vs. 53,9%; $p<0,0001$). CP22 und CP23 zeigten beide ein signifikantes Ansprechen auf Bortezomib allein, dessen Wirkung durch die Hinzunahme von SUMOi tendenziell verschlechtert bzw. unverändert blieb. CP20 zeigte im Gegensatz dazu kein Ansprechen auf Bortezomib mono, die größte Wirkung zeigte sich nach 16h hier für die Kombination, jedoch insignifikant ($p=0,0646$).

Bei Betrachtung der Dosis-Wirkungskurven zeigte sich, dass die Wirksamkeit von SUMOi durch die Hinzunahme von Bortezomib gesteigert werden kann, insbesondere in den niedrigen Dosierungen 0,01µM und 0,1µM, die nach 16h allein noch keine Wirkung zeig-

ten. Bei Hinzunahme von Bortezomib in der Konzentration 12,5nM konnte die größte Differenz erzielt werden. Bei Normalisierung der Kombinationen an die Monotherapie mit Bortezomib zeigte sich konzentrationsübergreifend eine bessere Wirksamkeit von Bortezomib allein, bis auf die bereits beschriebene Kombination von 12,5nM Bortezomib und 0,1µM sowie 1µM SUMOi bei CP20, die jedoch ohne Erreichen des Signifikanzniveaus bestanden. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich in keiner Konzentration ein Ansprechen auf Bortezomib, während bei CP22 und CP23 Bortezomib allein bereits ab einer Konzentration von 3,125nM (CP22) bzw. in der Konzentration 12,5nM eine deutliche Apoptosesteigerung erreichen konnte.

In Zusammenschau der Ergebnisse stellte die Konzentration 0,1µM gemessen nach 48h einen guten Marker für das Ansprechen auf Subasumstat dar. Die synergistische Wirkung mit Bortezomib lässt sich nicht eindeutig abbilden, da keine signifikanten Unterschiede zur Monotherapie erreicht werden konnten. Wie bereits unter 3.8. beschrieben, ist eine quantitative Einschätzung der in-vitro-Response mittels der CellPly-Plattform kaum möglich. Die widersprüchliche bessere Viabilität unter der Kombination verglichen mit Bortezomib allein lässt sich entweder auf die fehlende Korrelation zwischen Wirkstärke und in-vitro-Viabilität zurückführen, könnte aber auch durch eine mögliche Wirkabschwächung von Bortezomib durch SUMOi bei Bortezomib-sensiblen MM-Zellen erklärt sein. Bei in-vitro Resistenz gegen Bortezomib konnte ein Wirkeintritt durch SUMOi-Zugabe erreicht werden, wenn auch insignifikant. In anderen Arbeiten konnte ein signifikanter Synergismus zwischen den beiden Substanzen gezeigt werden, auf dies wird in der Diskussion näher eingegangen.

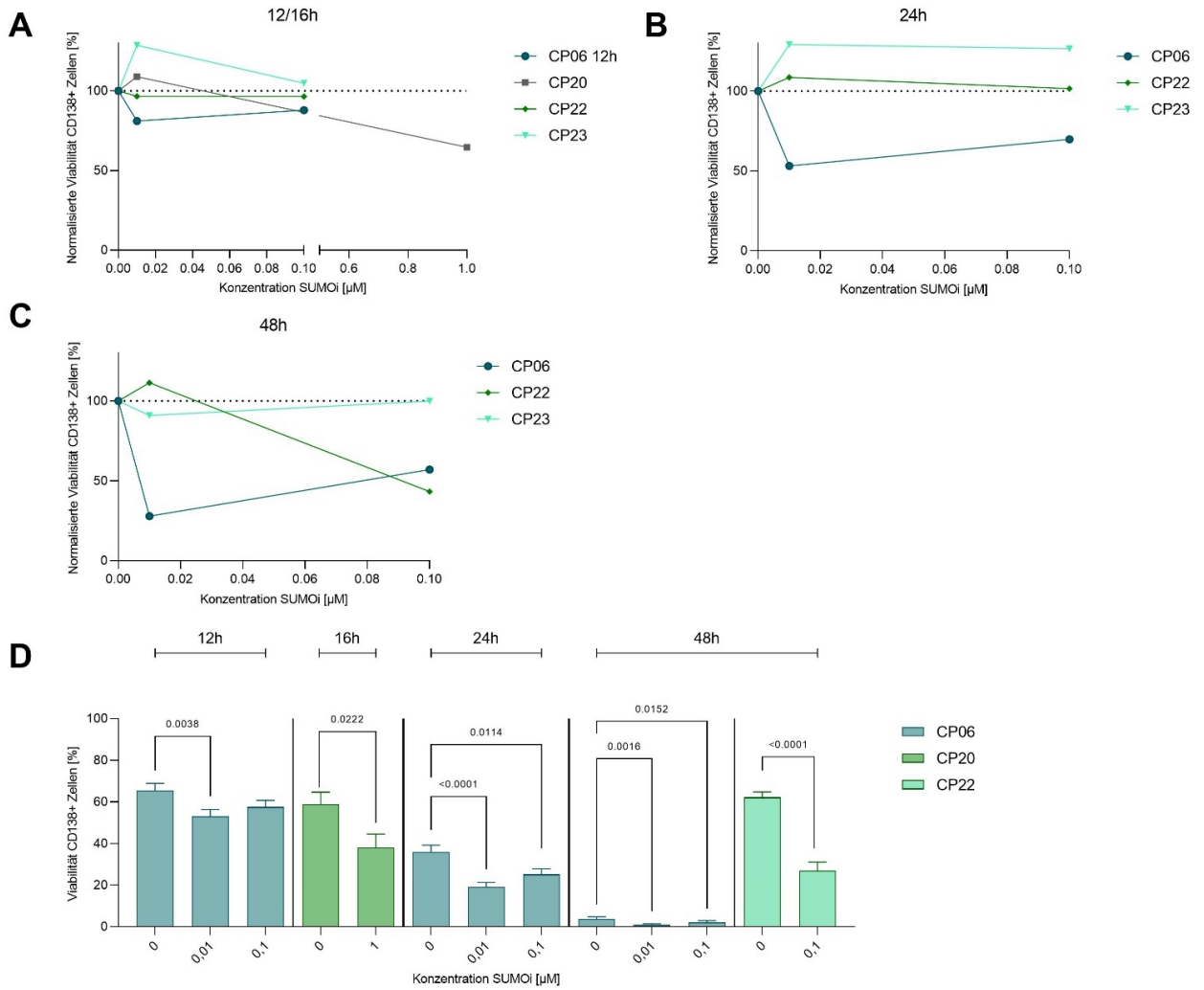


Abb. 25: D/R SUMOi. **A-C:** Dosis-Wirkungskurven mit an Negativkontrolle normalisierter Viabilität für die Zeitpunkte 12h (CP06) bzw. 16h, 24h und 48h. **D:** Viabilitäten aller Konditionen mit normalisierter Viabilität <90% und entsprechender Negativkontrolle. Darstellung der Mittelwerte + SEM. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiplen Vergleichen bzw. Mann-Whitney-Test.

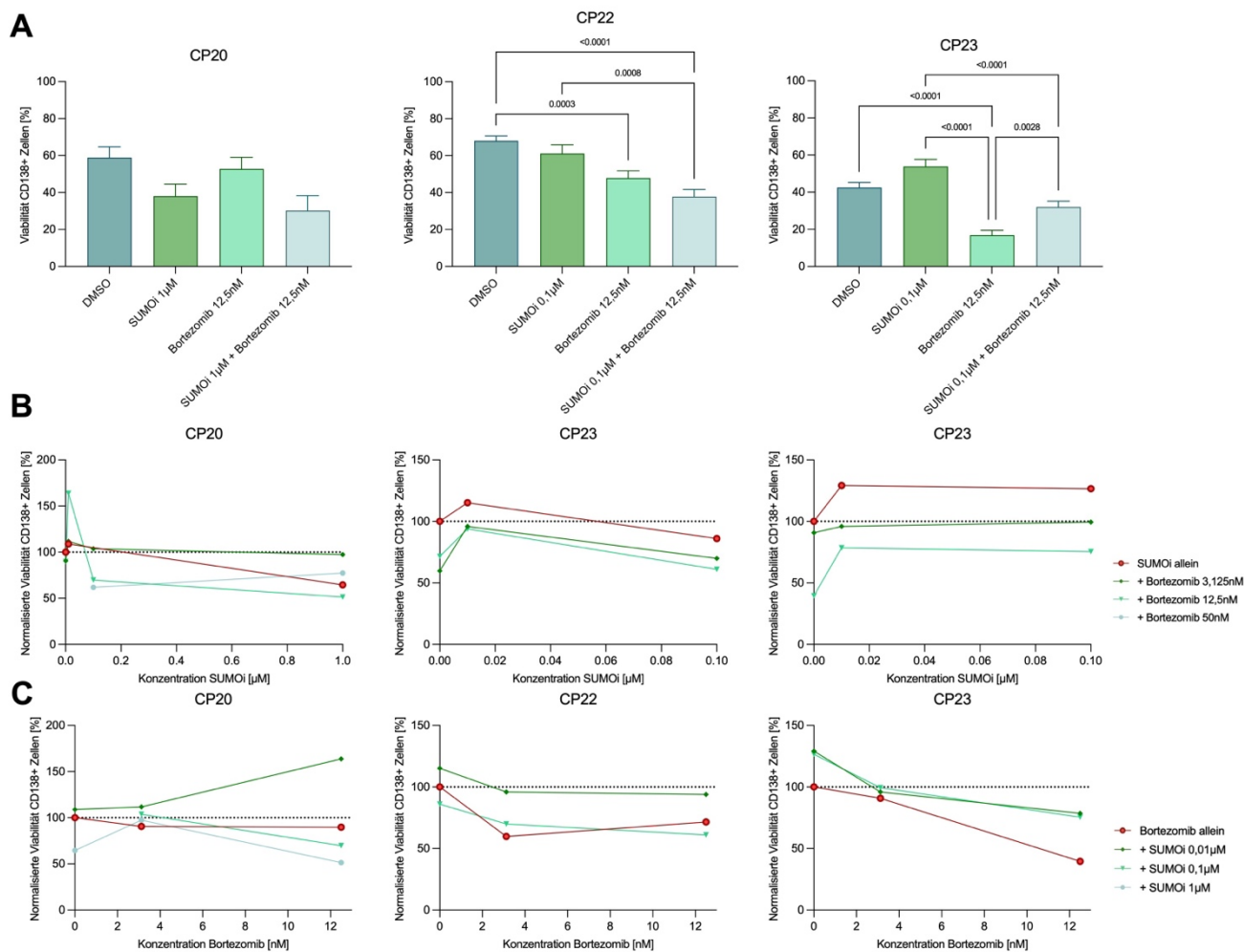


Abb. 26: Synergistische Wirkung von Bortezomib und SUMOi zum jeweiligen Zeitpunkt der ausgeprägtesten Wirkung: CP20 nach 16h, CP22 nach 32h und CP23 nach 24h. **A:** Viabilitäten der Negativkontrolle, SUMOi und Bortezomib jeweils allein und in Kombination, Darstellung der Mittelwerte + SEM. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiplen Vergleichen. **B:** Dosis-Wirkungskurven mit an Negativkontrolle bzw. für Kombinationen an SUMOi-mono normalisierter Viabilität für SUMOi allein und in Kombination mit Bortezomib. **C:** Dosis-Wirkungskurven mit an Negativkontrolle bzw. für Kombinationen an Bortezomib-mono normalisierter Viabilität für Bortezomib allein und in Kombination mit SUMOi.

3.10. Einfluss von NK-Zellen auf Medikamentenwirkung

Zur Beurteilung der Eignung der CellPly-Plattform zur Analyse des Einflusses von NK-Zellen auf die Wirkung verschiedener Myelomtherapeutika, wurden diese mittels anti-CD16- und anti-CD56-Antikörper bei den Patient*innen CP06, CP20, CP22 und CP23 markiert. Es folgte eine Analyse hinsichtlich des Anteils von NK-Zellen im KM, deren Viabilität sowie der Myelom-Viabilität in Abhängigkeit von der Co-Lokalisation von NK-Zellen.

Der initiale Anteil der NK-Zellen an den MNC betrug 8,3-12,5%, wodurch es bei den 4 Patient*innen über alle Zeitpunkte verteilt zu 15-200 Mikrowells mit einer Co-Lokalisation pro Kanal kam (s. Tab. 21). Die meisten Mikrowells mit einer Co-Lokalisation lagen durchschnittlich zu den Zeitpunkten 0h und 16h vor. Während bei allen Co-Lokalisationen bei den Patient*innen CP20, CP22 und CP23 auch ein Zell-Zell-Kontakt zu den Myelomzellen vorlag, war dies bei CP06 nur bei durchschnittlich 3 Mikrowells pro Zeitpunkt der Fall.

Tab. 21: Werte des NK-Zell-Anteils, Anzahl Mikrowells mit Kontakt und Co-Lokalisation (Co-Lok) von CD138+- und CD56+/CD16+-Zellen aus der DMSO Kontrolle. * bei CP22 und CP23 wurde die Negativkontrolle in 2 Kanälen durchgeführt ** CP06 nach 12h, CP20 nach 16h

	CP06			CP20		
Zeitpunkt	Anteil NK-Zellen [%]	Anzahl Mikrowells Kontakt	Anzahl Mikrowells Co-Lok.	Anteil NK-Zellen [%]	Anzahl Mikrowells Kontakt	Anzahl Mikrowells Co-Lok.
T0h	8,74	2	36	8,3	24	24
T12/16h**	9,77	4	16	13,17	17	17
T24h	8,36	6	15	-	-	-
T48h	5,18	0	17	-	-	-
	CP22*			CP23*		
T0h	12,5	390	390	12,2	113	113
T16h	26,91	400	400	14,29	168	168
T24h	13,71	324	324	10,75	148	148
T48h	13,52	239	239	9,96	44	44

Wie der Abbildung 27 zu entnehmen, zeigten die NK-Zellen eine gute Viabilität, sie befand sich in den Negativkontrollen nach 24h zwischen 55,4% und 83,7%. Es kam zu keiner Apoptoseinduktion durch die Substanzen SUMOi, Daratumumab, Elotuzumab oder Bortezomib.

Beim Vergleich der Viabilitäten der CD138+-Zellen in Mikrowells mit und ohne NK-Zellen zeigte sich sowohl in den Negativkontrollen als auch bei allen getesteten Substanzen nach 12h (CP06) bzw. 16h (CP20, CP22, CP23) ein negativer Effekt der NK-Zellen auf das MM-Überleben. Dieser Effekt zeigte sich patientenindividuell teils bereits deutlich in der Negativkontrolle (CP06, CP20; jeweils $p < 0,05$). Wie in Abbildung 28 dargestellt, war dieser Einfluss auch bei Elotuzumab und SUMOi (CP06) bzw. bei Bortezomib und SUMOi (CP20) zu sehen (jeweils $p < 0,05$). Bei CP20 fiel zudem auf, dass bei Betrachtung der Mikrowells ohne NK-Zellen kein Ansprechen auf SUMOi zu sehen war (75,6% vs. 65,2%;

p= 0,3788), während erst bei Analyse der Mikrowells mit NK-Zellen eine Viabilitätsminde-
 rung durch SUMOi deutlich wurde (26,3% vs. 4,0%; p=0,0213).

Bei CP22 zeigte sich nur ein minimaler Einfluss der NK-Zellen auf die Myelomzellen ohne
 Erreichen einer Signifikanz, die größte Differenz zeigt sich bei Zugabe von Bortezomib
 (70,4% vs. 57,7%; p=0,1043). Bei CP23 war der Effekt der NK-Zellen ausgeprägter, je-
 doch ebenfalls ohne signifikante Unterschiede. Die größte Wirkung ergab sich bei Inku-
 bation mit SUMOi (68,9% vs. 49,3%; p=0,0941).

Mittels der CellPly-Plattform war eine gute Detektion der NK-Zellen und deren Effekt auf
 die Viabilität von Myelomzellen möglich. Es zeigte sich eine Patienten- und keine Sub-
 stanzabhängigkeit bezüglich des negativen Einflusses von NK-Zellen auf das Überleben
 der Myelomzellen. Bei Patient*innen mit gegen das MM wirksamen NK-Zellen (CP06,
 CP20) konnte eine signifikante Apoptosesteigerung neben der Negativkontrolle auch für
 Elotuzumab, SUMOi und Bortezomib festgestellt werden.

Da nicht bei allen Patient*innen ein hoher Anteil von NK-Zellen im KM vorhanden war
 und es dadurch zu einer geringeren Anzahl von Mikrowells mit einer Ko-Lokalisation kam,
 sollte überprüft werden, ob mittels MACS-Isolation von NK-Zellen aus peripherem Blut
 (PB) eine Anreicherung der KM-Proben möglich erscheint. Dafür wurden 2 Proben von
 PB mit EDTA-Zusatz untersucht, aufgrund des Einflusses von Myelomtherapeutika auf
 die NK-Zellzahl wurde eine Probe eines Patienten mit RRMM (CP14) und eine Probe
 eines gesunden Probanden (CP15) getestet.

Wie der Tabelle 22 zu entnehmen, konnten bei dem MM-Patienten mehr NK-Zellen
 (0,23/nl PB) als bei dem gesunden Probanden (0,09/nl PB) isoliert werden.

Durch die NK-Isolation aus PB mittels MACS konnte erfolgreich eine ausreichende
 Menge von NK-Zellen für die potenzielle Anreicherung des KM gewonnen werden, so
 dass eine bessere Analyse des NK-Einflusses auf die Myelomzellen möglich wäre.

Tab. 22: Auflistung der Proben von peripherem Blut zur NK-Zell-Isolation mit klinischen Charakteristika
 und isolierter NK-Zellzahl. HD= Gesunder Proband, PB= peripheres Blut

ID	Alter	Geschlecht	Zuordnung	Isolierte NK-Zellen/nl PB
CP14	59	m	RRMM	0,23
CP15	23	w	HD	0,09

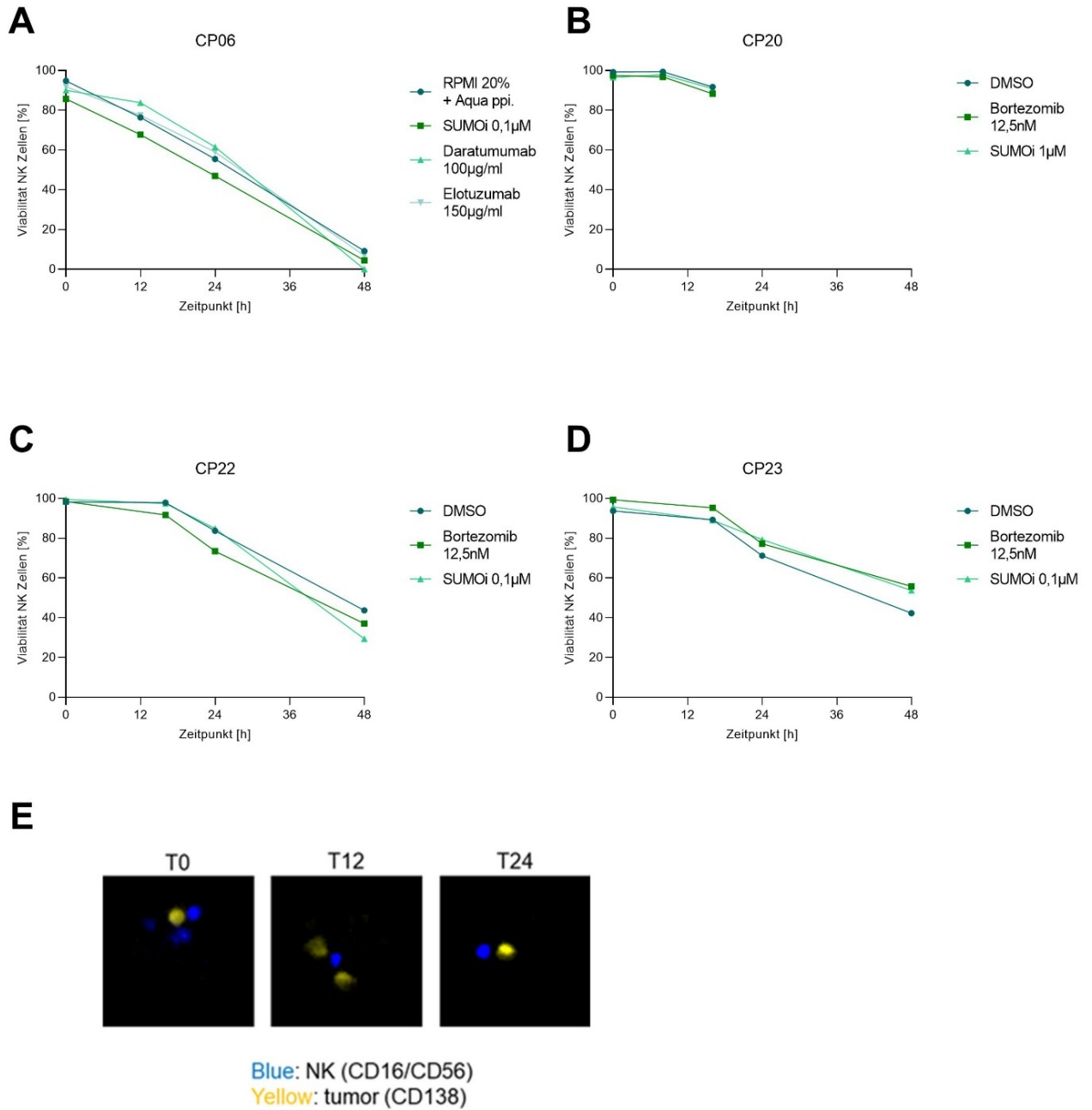


Abb. 27: Viabilität der NK-Zellen. **A-D:** Viabilitäten der Negativkontrolle und den Substanzen SUMOi, Daratumumab, Elotuzumab und Bortezomib über 48h der Patient*innen CP06, CP20, CP22 und CP23. **E:** Mikroskop-Aufnahme eines Mikrowells mit NK-Zellen (blau) und einer CD138+-Zelle (gelb) über 24h.

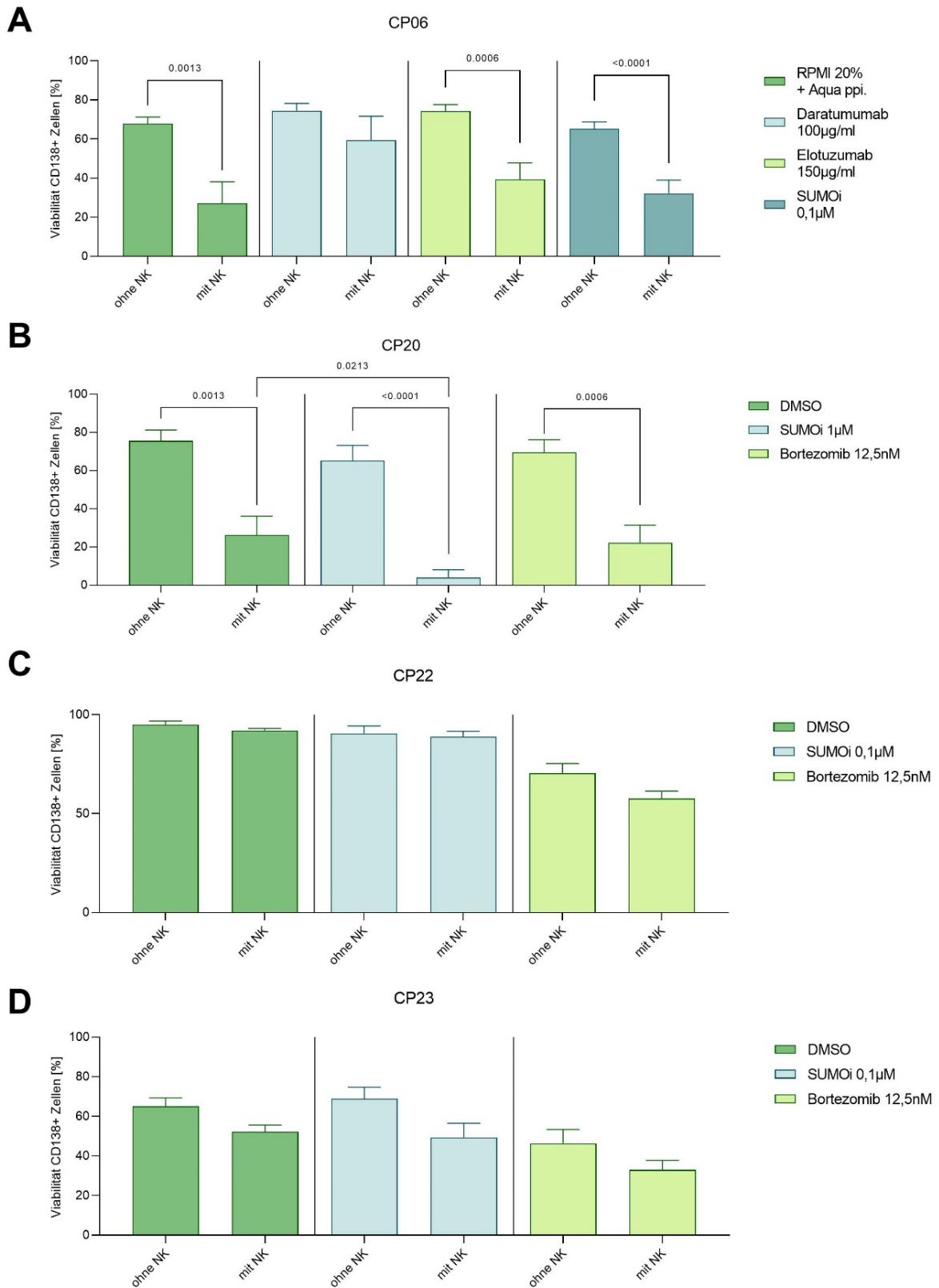


Abb. 28: A-D: Viabilitäten der CD138+-Zellen nach 12h (CP06) bzw. 16h (CP20, CP22, CP23) in Abhängigkeit von NK-Zellen in verschiedenen Konditionen, Darstellung der Mittelwerte + SEM. Mann-Whitney-Test.

3.11. Einfluss von BMMSC auf Medikamentenwirkung

Zur Evaluation, ob mittels der CellPly-Plattform eine Beurteilung des Einflusses der BMMSC auf die Myelomviabilität und auf die Wirksamkeit verschiedener Therapeutika vorgenommen werden kann, wurden bei den Patient*innen CP08, CP09, CP10 und CP13 mittels anti-CD271-Antikörper die BMMSC markiert. Es folgte die Auswertung hinsichtlich Menge an BMMSC im KM, deren Viabilität und Einfluss auf die Myelomviabilität und Wirkung von Bortezomib, Melphalan und Dexamethason und Lenalidomid.

Die BMMSC ließen sich gut mittels des gewählten anti-CD271-Fluoreszenzantikörpers identifizieren. Es kam jedoch zu Interferenzen mit dem TRITC-Signal des PI, weshalb 2 der 4 Experimente von den Viabilitätsanalysen ausgeschlossen werden mussten (CP08 ab 24h, CP10 komplett).

Wie der Tabelle 23 zu entnehmen, waren insgesamt nur 0,58-2,21% der MNC zum Zeitpunkt 0h CD271 positiv, so dass es über die gesamte Inkubationsdauer nur 1-15 Mikrowells mit einer Ko-Lokalisation und 0-2 mit Zell-Zell-Kontakt zu MM-Zellen gab.

Tab 23.: Werte des BMMSC-Anteils, Anzahl Mikrowells mit Kontakt und Co-Lokalisation (Co-Lok) von CD138+- und CD271+-Zellen aus der DMSO Kontrolle.

	CP08			CP09		
Zeitpunkt	Anteil BMMSC [%]	Anzahl Mikrowells Kontakt	Anzahl Mikrowells Co-Lok.	Anteil BMMSC [%]	Anzahl Mikrowells Kontakt	Anzahl Mikrowells Co-Lok.
T0h	0,91	0	1	4,96	1	11
T12h	3,25	0	3	2,81	0	9
T24h	9,25	1	10	1,78	0	2
T48h	-	-	-	-	-	-
	CP10			CP13		
T0h	2,21	0	10	0,86	0	5
T12h	2,56	1	15	0,70	0	2
T24h	1,33	1	8	0,91	2	5
T48h	-	-	-	0,72	2	5

Die BMMSC zeigten eine patientenindividuelle, aber tendenziell eher schlechte Viabilität. So betrug die Viabilität nach 12h in den Negativkontrollen nur noch 61,2% (CP08), 33,3% (CP09) und 30,2% (CP13). Die steigende Viabilität bei CP09 nach 24h auf 60,8% war am ehesten durch die Interferenzen mit dem PI-Signal bedingt. Innerhalb des auswertbaren

Zeitraums von 12h zeigte sich kein negativer Einfluss der Substanzen Bortezomib, Melphalan, Lenalidomid und Dexamethason auf die Viabilität der BMMSC.

Die geringe Anzahl an Mikrowells mit Co-Lokalisation oder Zell-Zell-Kontakt und die Probleme bei der Apoptosemessung machten nur bei CP09 eine Analyse hinsichtlich des Einflusses der BMMSC auf das Überleben der CD138+-Zellen unter Melphalangabe möglich. Wie in Abbildung 29 zu sehen, war die Viabilität in der Negativkontrolle in den Mikrowells mit einer Co-Lokalisation von BMMSC schlechter als ohne (42,6% vs. 69,8%). Dies zeigte sich auch unter Zugabe von 60µM Melphalan (33,3% vs. 65,5%). Signifikant waren diese Unterschiede aufgrund der geringen Anzahl von Mikrowells mit Co-Lokalisation (jeweils 9) nicht.

Die CellPly-Plattform zeigte sich ungeeignet für eine Beurteilung des Einflusses der BMMSC auf die Myelomzellen, da diese in einem zu geringen Anteil in den KM-Aspiraten vorlagen und zudem eine schlechte Viabilität aufwiesen. Zudem kam es durch den anti-CD271 Antikörper zu Interferenzen mit dem Apoptosesignal, so dass hier die Auswertung stark beeinträchtigt wurde.

3.12. Einfluss von T-Zellen auf Medikamentenwirkung

Um zu überprüfen, ob sich die CellPly-Plattform zur Beurteilung eines Einflusses der T-Zellen auf die Wirksamkeit der verschiedenen Therapeutika eignet, wurden diese bei den Patient*innen CP08 und CP13 mittels anti-CD3-Antikörper markiert. Es folgte die Auswertung hinsichtlich Menge an T-Zellen im KM, deren Viabilität und Einfluss auf die Myelomviabilität sowie die Wirkung von Bortezomib.

Die Detektion der T-Zellen mittels des anti-CD3-Fluoreszenzantikörpers über die CellPly-Plattform war erfolgreich, es kam jedoch zu Interferenzen mit dem TRITC-Signal der apoptotischen Zellen, so dass die Apoptosedaten der vorliegenden Experimente eingeschränkt zu beurteilen waren.

Im Knochenmark waren bei CP08 29,46% und bei CP13 25,27% der Zellen zum Zeitpunkt 0h CD3 positiv, in Abhängigkeit der Myelominfiltration gab es über den gesamten Beobachtungszeitraum jeweils 43 (CP08) bzw. 151 (CP13) Mikrowells mit einer Co-Lokalisation und 7 (CP08) bzw. 25 (CP13) mit Kontakt der beiden Zelltypen (s. Tab. 24). Das jeweilige Maximum erreichten beide Patient*innen für die Co-Lokalisation zum Zeitpunkt 0h und für den Kontakt zum Zeitpunkt 12h und 24h (CP08) bzw. 0h (CP13).

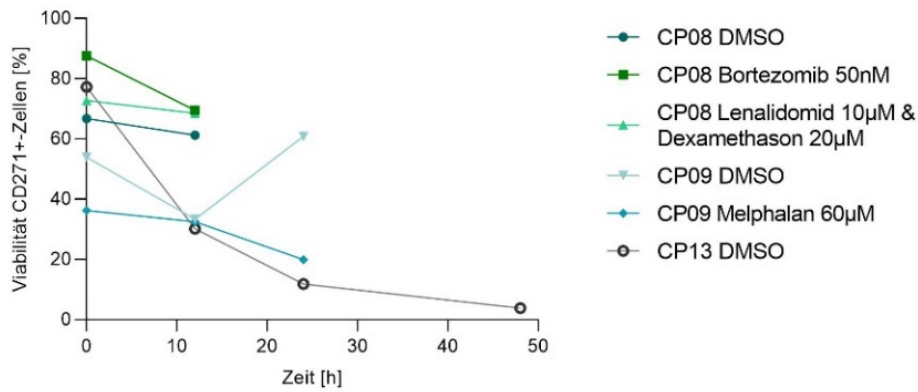
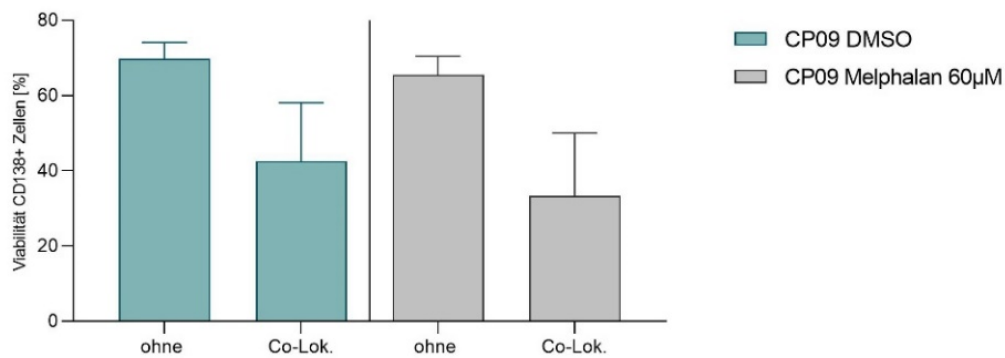
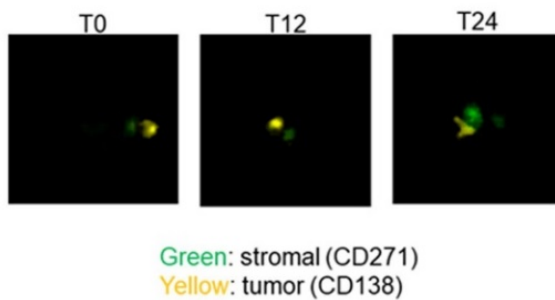
A**B****C**

Abb. 29: Untersuchung der BMMSC in der CellPly-Plattform. **A:** Darstellung der Viabilitätskurven der BMMSC von CP08, CP09 und CP13 mit DMSO oder Bortezomib, Melphalan oder Lenalidomid+Dexamethason. **B:** Viabilitäten der CD138+-Zellen nach 12h in Abhängigkeit von BMMSC, Darstellung der Mittelwerte + SEM. Mann-Whitney-Test. **C:** Mikroskop-Aufnahme eines Mikrowells mit einer BMMSC (grün) und einer CD138+-Zelle (gelb) über 24h.

Tab 24.: Werte des T-Zell-Anteils, Anzahl Mikrowells mit Kontakt und Co-Lokalisation (Co-Lok) von CD138+- und CD3+-Zellen aus der DMSO Kontrolle.

Zeitpunkt	CP08			CP13		
	Anteil T-Zellen [%]	Anzahl Mikrowells Kontakt	Anzahl Mikrowells Co-Lok.	Anteil T-Zellen [%]	Anzahl Mikrowells Kontakt	Anzahl Mikrowells Co-Lok.
T0h	29,46	7	55	25,27	25	151
T12h	47,35	11	52	18,18	23	114
T24h	43,99	11	43	9,28	17	67
T48h	-	-	-	6,04	16	44

Die Viabilität der T-Zellen in der Negativkontrolle zeigte sich patientenindividuell unterschiedlich und lag im ähnlichen Bereich wie der von primären Myelomzellen (CP08: 56,5%; CP13: 28,2%). Es bestand bei CP08 keine schlechtere Viabilität durch die Zugabe von 50nM Bortezomib (53,6%).

Für den Einfluss der T-Zellen auf die Myelomviabilität wurden die Mikrowells nach 24h je nach Vorhandensein von T-Zellen und dem Bestehen eines Zell-Zell-Kontakts zu den Myelomzellen einzeln analysiert und miteinander verglichen. Wie in Abbildung 30 zu sehen, war sowohl in den Negativkontrollen von CP08 und CP13 als auch bei Zugabe von 50nM Bortezomib die höchste Apoptoserate in den Mikrowells mit Zell-Zell-Kontakt zu finden, gefolgt von den Mikrowells mit Co-Lokalisation. Die beste Viabilität hatten die Myelomzellen in den Mikrowells ohne T-Zellen. Signifikant stellte sich aber nur der Viabilitätsunterschied zwischen Co-Lokalisation und keine T-Zellen bei CP13 (10,8% vs. 17,8%; $p=0,0080$) und zwischen Kontakt und keine T-Zellen bei CP08 mit 50nM Bortezomib (0,0% vs. 34,1%; $p=0,0434$) dar. Bei Vergleich der Viabilitäten von CP08 zwischen Negativkontrolle und Bortezomib war sichtbar, dass es in den Mikrowells ohne T-Zellen kein Ansprechen auf die Substanz gibt (35,37% vs. 34,06%). Erst bei Analyse der Mikrowells mit Zell-Zell-Kontakt von Tumor- und T-Zellen ist ein Effekt des Bortezomibs zu sehen (8,0% vs. 0,0%; $p>0,9999$)

T-Zellen lagen in ausreichend hoher Menge im KM der MM-Patient*innen vor, um genug Mikrowells mit Co-Lokalisation und Zell-Zell-Kontakt zu CD138+-Zellen für eine weitere Auswertung zu erreichen. Sie zeigten eine ähnliche Viabilität wie die Myelomzellen ohne negativen Einfluss durch Bortezomib. Es konnten teils signifikant höhere Apoptoseraten der CD138+-Zellen durch Co-Lokalisation und Kontakt mit bzw. zu T-Zellen festgestellt werden, sowohl in der Negativkontrolle als auch bei Hinzugabe von Bortezomib.

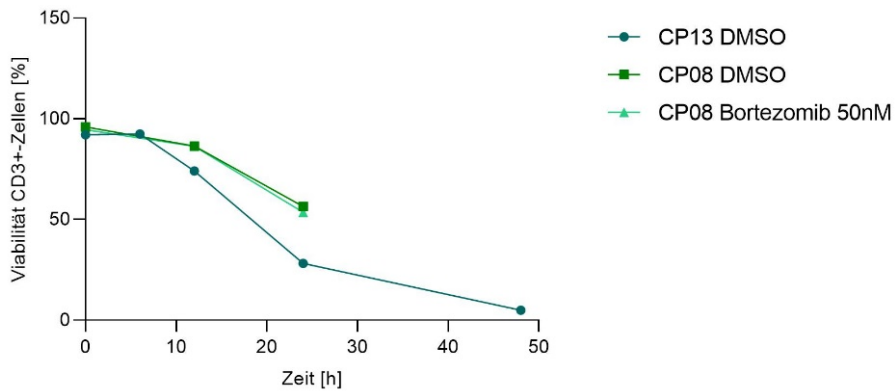
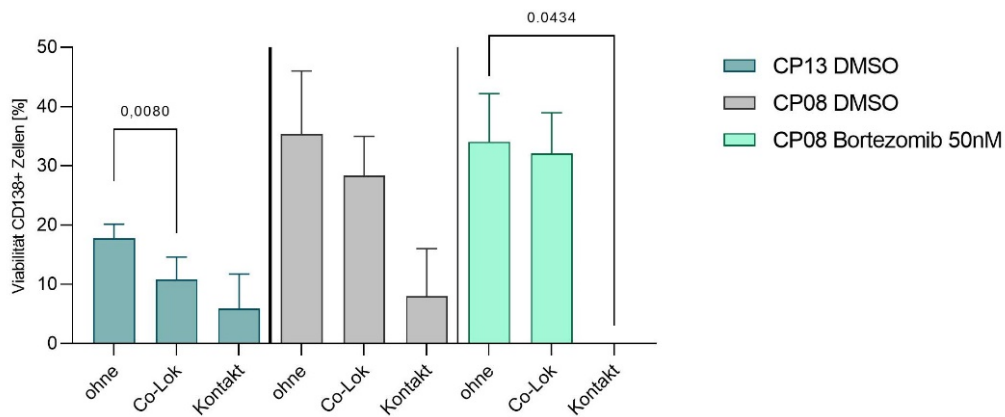
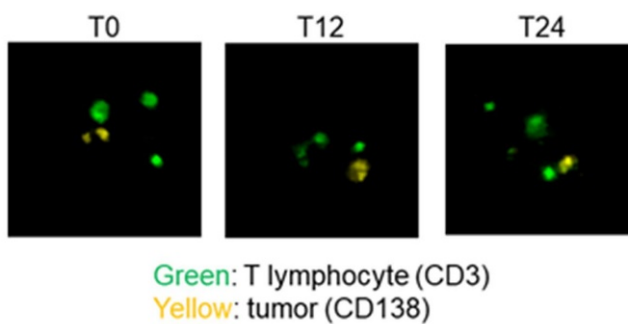
A**B****C**

Abb. 30: Untersuchung der T-Zellen in der CellPly-Plattform. **A:** Darstellung der Viabilitätskurven der T-Zellen von CP08 und CP13 mit DMSO bzw. Bortezomib 50nM. **B:** Viabilitäten der CD138+-Zellen nach 24h in Abhängigkeit von T-Zellen, Darstellung der Mittelwerte + SEM. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiplen Vergleichen. **C:** Mikroskop-Aufnahme eines Mikrowells mit T-Zellen (grün) und CD138+-Zellen (gelb) über 24h.

3.13. Korrelation der in-vitro-Ergebnisse zur Klinik

Um die in-vitro-Daten in einen klinischen Kontext zu setzen, wurden sie mit den klinischen Charakteristika Anzahl Vortherapien, Vortherapie mit der jeweiligen Substanz und R-ISS korreliert. Eine Korrelation zur klinischen Response zu den einzelnen Medikamenten war nicht möglich, da die Patient*innen zum einen Kombinationstherapien erhielten, so dass das klinische Ansprechen den einzelnen Substanzen nicht zuzuordnen ist. Zum anderen gab es nur wenige Überschneidungen der getesteten mit den applizierten Therapeutika. Bei Betrachtung der Anzahl an Vortherapien zeigte sich wie der Tabelle 25 zu entnehmen für Patient*innen ohne Vortherapien mit 59,0% ein hoher Anteil an Responses ($Viab_{norm} < 70\%$), welcher bei Patient*innen mit 1-2 Vortherapien bei 62,5% und bei Patient*innen mit >2 Vortherapien nur bei 14,3% lag. Dagegen war der Anteil von fehlenden Responses ($Viab_{norm} > 90\%$) bei den Patient*innen mit >2 Vortherapien mit 42,9% am höchsten, bei 1-2 Vortherapien lag er bei 0,0% und bei keiner Vortherapie bei 4,6%. Bei Analyse der individuellen Substanzen mit Vorliegen von mindestens 2 Werten pro Kategorie zeigte sich wie in Abbildung 31 zu sehen für Bortezomib eine durchschnittliche $Viab_{norm}$ von 99,0% bei >2 Vortherapien im Vergleich zu 51,8% bei keiner und 50,8% bei 1-2 Vortherapien. Auch für Lenalidomid, Daratumumab und Elotuzumab zeigten sich höhere Viabilitäten bei mindestens einer Vortherapie verglichen mit keiner (86,0% vs. 69,7%; 54,8% vs. 53,2%; 82,3% vs. 68,1%). Bei Melphalan zeigten die Patient*innen mit mindestens 1 Vortherapie ein besseres Ansprechen (65,6% vs. 70,3%). Alle Differenzen stellten sich jedoch als insignifikant dar aufgrund der geringen Datenmenge.

Beim Vergleich des Ansprechens auf Bortezomib, Lenalidomid und Daratumumab in Abhängigkeit davon, ob die Patient*innen diese Substanzen bereits im Rahmen ihrer Vortherapien erhalten haben oder therapienaiv waren, zeigte sich für alle 3 Therapeutika keine signifikant unterschiedliche in-vitro Response zwischen den beiden Subgruppen. Die Zuordnung zu nicht-therapienaiv erfolgte dabei unabhängig von der unter der Therapie in-vivo erreichten besten Response und PFS.

Eine vergleichende Betrachtung des in-vitro-Ansprechens zum R-ISS war bei Bortezomib und Lenalidomid möglich. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden.

Die vergleichende Analyse mit den klinischen Charakteristika zeigte eine Tendenz zur Korrelation eines guten in-vitro-Ansprechens mit der niedrigen Anzahl an Vortherapien. Für den prognoserelevanten Parameter R-ISS und Therapienaivität konnte keine Korrelation zu den CellPly-Daten festgestellt werden.

Tab. 25: Auflistung der niedrigsten normalisierten Viabilität der Patient*innen für die Substanzen Bortezomib (V), Melphalan (M), Dexamethason (D), Lenalidomid (R), Daratumumab (Dara) und Elotuzumab (Elo).

ID	Anzahl Vortherapien	Niedrigste Viab _{norm}					
		V	M	D	R	Dara	Elo
CP04	0				76,5		
CP06	0					17,9	54,8
CP09	0		32,5				
CP13	0	81,9	74,4	16,1			
CP16	0	13,5	52,0				
CP18	0	37,3	66,7	43,1			
CP19	0	41,7	86,2	24,4			
CP21	0	77,0	110,1	82,6			
CP22	0	59,4					
CP26	0				62,9	88,5	81,4
CP05	1	23,1	64,5	81,1			
CP20	1	89,7					
CP23	2	39,6					
CP25	2				78,1	38,0	68,70
CP08	4	115,9			80,8		
CP11	4	82,2	66,8				
CP27	5				99,0	71,6	95,8

Legende:	Keine Response:	>90%	Fragliche Response:	70-90%	Response:	<70%
----------	-----------------	------	---------------------	--------	-----------	------

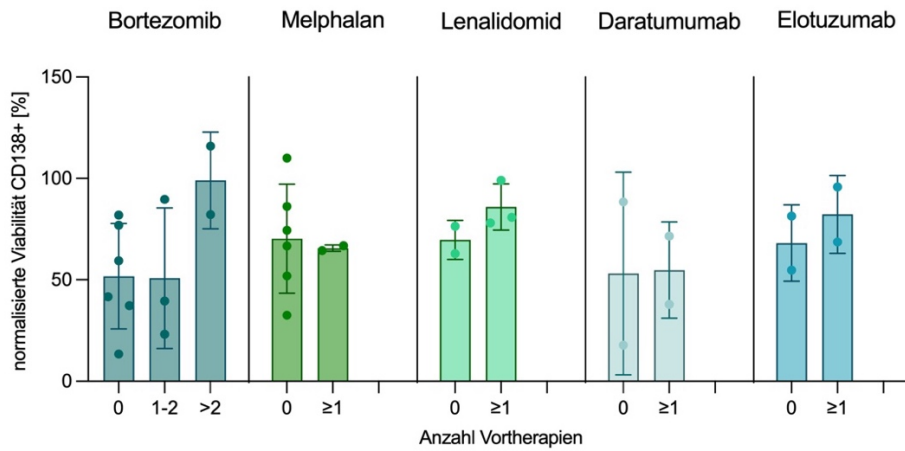
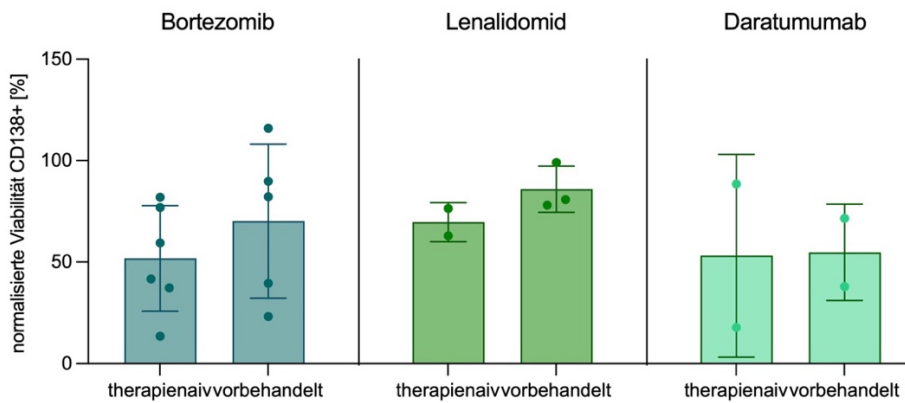
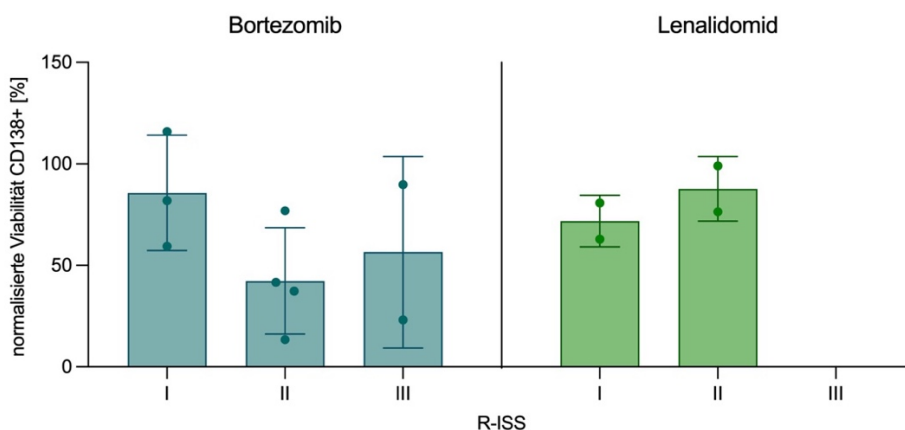
A**B****C**

Abb. 31: Korrelationen der jeweils niedrigsten an die Negativkontrolle normalisierten Viabilitäten. Jeweils Darstellung der Kategorien und Kriterien mit mindestens 2 Werten. Darstellung der Mittelwerte + SEM. Kruskal-Wallis-Test mit Dunns multiplen Vergleichen bzw. Mann-Whitney-Test. A: Korrelation mit Anzahl der Vortherapien. B: Korrelation Therapienaivität zur jeweiligen Substanz. C: Korrelation zum R-ISS.

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Zur Etablierung der CellPly-Plattform wurde diese zunächst mit der Myelom-Zelllinie U266 und der Stroma-Zelllinie HS-5 getestet. Beide zeigten in der Monokultur eine gute Viabilität, insbesondere die U266 wies auch nach 48h eine weiter auswertbar hohe Viabilität auf. Für die HS-5 zeigte sich eine deutliche Differenz zwischen der Zellzahl der initial aufbereiteten Zellen und der innerhalb des Device detektierten. Zudem wies die HS-5 eine geringere Viabilität verglichen mit der U266 auf, so dass deutlich wird, dass die CellPly-Plattform für adhärente Zellen weniger gut geeignet ist. In der Ko-Kultur zeigten beide Zelllinien eine signifikant höhere Apoptoserate beim Vorhandensein der jeweils anderen Zellart verglichen mit der Monokultur.

Die Überprüfung von Calcein AM als Apoptosemarker zeigte, dass die durch die CellPly-Plattform gemessene Freisetzung von Calcein AM weder für U266, HS-5, MNC oder primäre CD138+-Zellen mit der durch PI erkannten Apoptoserate der Zellen korrelierte. Im Vergleich mit CMAC hinsichtlich der Nutzung als Celltracker zeigten beide eine gleichwertige Zelldetektionsrate über 24h, jedoch stellte sich diese bei CMAC über den zeitlichen Verlauf als konstanter dar. Zudem zeigten sowohl U266 als auch primäre CD138+-Zellen bei Nutzung des manuellen Protokolls eine niedrigere Viabilität bei Nutzung von Calcein AM im Vergleich zu CMAC. Dieser Einfluss war jedoch nach Etablierung des automatischen Protokolls nicht mehr nachweisbar. Somit wurde CMAC als bevorzugter Celltracker festgelegt, während Calcein AM nur bei gleichzeitiger Verwendung der Fluoreszenz-Antikörper gegen CD16 und CD56 aufgrund der sonst überlappenden emittierten Wellenlängen Anwendung fand.

Die Nutzung der automatischen Zellaufbereitung durch die Plattform konnte für die U266 erfolgreich angewendet werden. Eine Dosis-Wirkungsbeziehungen zu Bortezomib, Melphalan und Dexamethason konnte dargestellt werden. Es konnte erfolgreich die Resistenz der Zelllinie gegen Dexamethason erkannt werden. Durch den Schritt des PI-Restain nach 24h und 48h wurden signifikant mehr Apoptosen erkannt, was sich auch auf die primären CD138+-Zellen übertragen ließ. Somit konnte das automatische Protokoll auch für die Testung von KM-Proben angewendet werden.

Im nächsten Schritt konnte die Anwendung der CellPly-Plattform für primäre CD138+-Zellen überprüft werden. Dafür wurden KM-Proben von 22 Patient*innen untersucht. Davon mussten insgesamt 5 Proben komplett und 3 ab 24h bzw. 48h aufgrund einer einge-

schränkten Viabilität, inakkurater Apoptosemessung oder CD138-Verlust von der weiteren Analyse ausgeschlossen werden. Die CD138⁺-Zellen zeigten nach 24h eine gute Viabilität, jedoch war diese nach 48h stark reduziert. Durch Nutzung der automatischen Zellaufbereitung durch die Plattform konnte die Zellviabilität deutlich erhöht werden, so dass auch nach 48h eine weitere Auswertung möglich war. Bei Patient*innen mit Rezidiv unter laufender Therapie war bereits initial eine erhöhte Apoptoserate zu erkennen, zudem war die Zahl der Myelomzellen im Knochenmark gering (<10%). Deshalb waren Patienten unter Therapie ungeeignet für die CellPly-Untersuchung. Ein Abstand zur Therapie von mindestens 3 Wochen zeigte sich als ausreichend für das Erreichen der durchschnittlichen in-vitro Viabilität von NDMM.

Ein Vergleich mit dem durch CellPly gemessenen Anteil CD138⁺-Zellen mit den Plasmazellinfiltrationen in der Zytologie und Histologie des KM zeigte, dass diese nicht miteinander korrelierten und durch die Plattform nur ein kleiner Bruchteil der Myelomzellen analysiert werden kann.

Bei der Testung der verschiedenen Substanzen an den primären CD138⁺-Zellen konnten für Bortezomib, Dexamethason und Melphalan Dosis-Wirkungsbeziehungen dargestellt und in-vitro Resistenzen erkannt werden. Für Bortezomib stellte sich die Konzentration 50nM mit Messung nach 24h als gute Kondition zur Resistenzanalyse dar, bei Melphalan 15µM ebenfalls nach 24h. Die Wirkung von SUMOi ließ sich am zuverlässigsten in der Konzentration 0,1µM nach 48h beurteilen. Aufgrund der großen Differenz bezüglich der idealen Responsekonzentrationen bzw. -zeitpunkte konnte für Dexamethason keine aussagekräftigen Testbedingungen herausgearbeitet werden. Bei Lenalidomid, Daratumumab und Elotuzumab konnten aufgrund zu weniger verwertbaren Daten ebenfalls keine Aussagen zu idealen Testbedingungen getroffen werden, eine gute Dosis-Wirkungs-Darstellung war hier nicht möglich.

Substanzübergreifend waren häufiger große Schwankungen in der Apoptosemessung über den Analysezeitraum zu beobachten. Die durch CellPly gewonnen Daten zeigten generell eher qualitativen statt quantitativen Charakters, es können nur dichotome Aussagen zur Response oder Resistenz getroffen werden. Dies war auch bei der Testung von SUMOi in der Kombination mit Bortezomib ersichtlich. Es konnte keine lineare Steigerung der Wirksamkeit der beiden Substanzen durch deren Kombination festgestellt werden.

Die Korrelation der in-vitro-Responsen zu klinischen Charakteristika der Patient*innen zeigte ein tendenziell besseres Ansprechen auf die Therapeutika in-vitro bei einer Anzahl

von Vortherapien ≤ 2 sowie bei Therapienaivität zu der getesteten Substanz, jedoch ohne Signifikanz. Hier wäre das Untersuchen von weiteren Patienten notwendig, um einen Zusammenhang zu belegen. Für den R-ISS konnte keine Korrelation festgestellt werden.

Bei der Untersuchung weiterer Zelltypen innerhalb der CellPly-Plattform stellten sich die NK-Zellen als gut detektierbare Effektorzellen dar. Sie lagen bei den meisten Patient*innen in ausreichender Menge im KM vor und zeigten teilweise einen signifikant negativen Einfluss auf das Überleben der Myelomzellen. Dieser war durch die Substanzen Elotuzumab, Daratumumab, SUMOi und Bortezomib nicht beeinflusst, so dass von einer patientenspezifischen intrinsischen NK-Zell-Aktivität gegen die Myelomzellen auszugehen ist. Auch T-Zellen konnten in hoher Menge im KM detektiert werden. Teils lag auch hier ein signifikant negativer Einfluss auf die Myelomviabilität vor, der sich in der Negativkontrolle und unter Bortezomib zeigte.

BMMSC lagen nur in sehr geringer Menge im KM vor mit eingeschränkter Viabilität, so dass deren Einfluss auf die Myelomzellen mittels der CellPly-Plattform nicht untersucht werden konnte.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. Viabilität der CD138+-Zellen

Ein einschränkendes Problem in der vorliegenden Arbeit stellte die schnell sinkende Viabilität der primären CD138+-Zellen über 48h dar. In anderen Arbeiten konnte eine Steigerung der Viabilität der primären MM-Zellen durch die Zugabe von IL-6 erreicht werden, da dies eine essenzielle Funktion für das MM-Überleben und -Proliferation hat (230). Dabei lag die MM-Viabilität jedoch nach 48h im ähnlichen Bereich wie in der vorliegenden Arbeit bei Nutzung des automatischen Protokolls. Die Arbeit von Zhu et al. zeigte eine gesteigerte autokrine IL-6-Produktion sowohl von Lenalidomid-resistenten MM-Zelllinien als auch von sensitiven Zellen nach Lenalidomid-Zugabe. Zudem wurden initial Lenalidomid-sensible Zelllinien nach IL-6-Zugabe resistent gegenüber der Substanz (112). Somit kommt es womöglich zu einer Beeinflussung der Sensitivität auf Substanzen durch die IL-6-Zugabe und es liegen nicht mehr die Bedingungen der natürlichen KM-Nische vor, weswegen das Ziel der vorliegenden Arbeit die Durchführung der Messung ohne Zugabe von IL-6 war.

Die Arbeit von Walker et al. verglich zudem die Viabilität von unisolierten primären Myelomzellen als Teil der MNC und isolierten CD138+ in Monokultur mit dem Ergebnis,

dass die Kultivierung der MNC, wie auch in der vorliegenden Arbeit erfolgt, einen signifikant besseren Outcome zeigte (230).

In der Arbeit von Waldschmidt et al. wurde eine 3D-Plattform zur Medikamententestung vorgestellt, in der die Viabilität der primären CD138+-Zellen durch eine Auskleidung mit HS-5-Zellen verbessert und so eine Kultur über 3 Wochen ermöglicht werden konnte (239). Auch in der Arbeit von Silva et al. wurden die isolierten primären CD138+ Zellen mit BMMSC ko-kultiviert, hier wurden jedoch kultivierte primäre BMMSC von anderen Patient*innen verwendet (235). Dadurch waren Kultur und Inkubation mit Medikamenten über 5 Tage möglich. Pak et al. zeigten zudem, dass die in-vitro Response auf Bortezomib nur mit der in-vivo Response korrelierte, wenn die primären MM-Zellen mit ihrem Tumorenvironment ko-kultiviert wurden (234).

Teilweise wurden die primären MM-Zellen vor der Inkubation mit den Therapeutika zunächst in Kulturmedium für 24h inkubiert, was womöglich nach dem durch Aufbereitung ausgelösten Zellstress eine bessere Ausgangssituation für die Responseanalyse induziert (234,235,239).

Die eingeschränkte Viabilität der Myelomzellen beschränkte nicht nur die Inkubationsdauer und die Wirksamkeitsanalyse der Substanzen, sondern machte auch eine Probenaufbereitung und Experimentdurchführung am Tag der Probenentnahme notwendig. So kann pro Gerät nur ein Patient alle drei Tage getestet werden, so dass eine breite klinische Anwendung unmöglich ist. Bei Plattformen mit besserer MM-Viabilität ist die Durchführung mit aufgetauten Proben möglich, FACS-basierte Plattformen können für mehrere Patient*innen gleichzeitig verwendet werden.

Die vorliegende Arbeit zeigte hohe Apoptoseraten bei Proben von Patient*innen unter Therapie, so dass sich diese ungeeignet für die CellPly-Testung darstellen. Jedoch handelt es sich insbesondere bei diesen Patienten mit Therapierefraktärität um eine Subgruppe mit hohem Bedarf an einer Responseprädiktion für die Therapieentscheidung.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine verminderte Viabilität bei Nutzung von Calcein AM der U266 und teils von primären CD138+-Zellen. Eine mögliche Ursache stellt die Inkubation der Zellen in PBS statt in Kulturmedium wie bei CMAC im Prozess der Zellmarkierung mit Calcein AM dar. Jedoch zeigten auch andere Arbeiten einen zytotoxischen Effekt der Substanz gegenüber humanen Tumorzelllinien und primären hämatologischen Tumorzellen, insbesondere bei niedriger Zelldichte in den Kulturen (240,241).

Ein wahrscheinlicher Mechanismus stellt die Interferenz mit mitochondrialer und nukleärer DNA dar (242). Dies unterstützt die bevorzugte Verwendung von CMAC als Celltracker um eine bessere Viabilität der Tumorzellen sicher zu stellen.

4.2.2. Calcein AM als Apoptosemarker

Bei Überprüfung der Nutzung der Freisetzung von Calcein AM als Apoptosemarker zeigte diese bei den primären CD138⁺-Zellen eine Unterschätzung der Zellapoptose verglichen mit der Apoptose-Erkennung durch die PI-Emission. Die Arbeit von Somanchi et al. konnte zeigen, dass Calcein AM teilweise nicht komplett von Tumorzellen nach NK-Zell getriggelter Zelllyse freigesetzt wurde, sondern in den Apoptosekörpern verblieb (237). Dies bestätigt die fehlende Eignung von Calcein AM als zuverlässigen Apoptosemarker. Somit stellt sich die Verwendung von verschiedenen Fluoreszenzmarkern innerhalb der CellPly-Plattform weiter reduziert dar, da durch die Notwendigkeit der Nutzung eines Celltrackers und eines Apoptosemarkers nur maximal 2 Zelltypen oder 1 Zelltyp mit nur 2 Oberflächenmarkern detektiert werden können.

4.2.3. CD138 als Marker für MM-Zellen

In der vorliegenden Arbeit zeigte der Vergleich zwischen dem durch CellPly gemessenen Anteil CD138⁺-Zellen mit der Plasmazellinfiltration in der Histologie und Zytologie große Differenzen. Dies kann zum einen auf einen möglichen Verlust von MM-Zellen im Rahmen des Aufbereitungsprozess, insbesondere der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation, zurückzuführen sein, aber auch auf die Physiologie der CD138-Expression der MM-Zellen. CD138 stellt einen sensitiven und Plasmazell-spezifischen Marker für das MM dar, jedoch existiert auch eine Subpopulation CD138-negativer (CD138^{neg}) MM-Zellen. Vorangehende Arbeiten konnten zeigen, dass die CD138^{neg} MM-Zellen durch einen unreifen Phänotyp charakterisiert sind, weshalb in der Literatur ihre Rolle als MM-„Stammzellen“ diskutiert wird (243). Es konnte eine Erhöhung von CDC7 (cell division cycle 7), CDK1 (cyclin dependent kinase 1) und CHK1 (Checkpoint kinase 1) in CD138^{neg} Zelllinien gemessen werden, welche in-vivo mit einem schlechteren OS assoziiert sind (244). Die CD138^{neg} Population ist zudem durch eine erhöhte Motilität mit einhergehender ausgeprägter Dissemination in-vitro und in-vivo geprägt (245). Zudem konnte eine geringe Wirkung von Lenalidomid auf CD138^{neg} Zelllinien beobachtet werden, während eine andere Arbeit eine erhöhte Sensitivität auf Bortezomib durch CD138-Blockade im Mausmodell zeigte (243,245). Somit konnte in der vorliegenden Arbeit nur die CD138⁺ Population

von MM-Zellen untersucht werden, während die CD138^{neg} Subpopulation unbeachtet blieb. Deren Bedeutung für die MM-Pathogenese und Resistenzentwicklung ist jedoch bisher unklar und möglicherweise sehr bedeutsam. Zudem wird CD138 auch von gesunden Plasmazellen exprimiert, die jedoch nur zu einem sehr geringen Anteil im KM vorliegen.

Weiterhin kam es in dieser Arbeit bei Patient CP17 zu einem CD138-Verlust zum Zeitpunkt nach 12h, während initial noch ein Anteil von 21,68% messbar war. Bereits die Arbeit von Jourdan et al. konnte zeigen, dass es in apoptotischen MM-Zellen zu einem schnellen Verlust von CD138 kommt (246). Die Fähigkeit der MM-Zellen zum zügigen Verlust der CD138-Expression insbesondere unter Apoptoseinduktion macht die Kombination aus CD138 und PI zur Detektion apoptotischer MM-Zellen zu einer nicht ausreichend zuverlässigen Methode. So wurde die Apoptose der MM-Zellen innerhalb der CellPly-Plattform möglicherweise unterschätzt, da die Zellen durch den CD138-Verlust nicht mehr als MM-Zellen identifiziert werden konnten. Zudem stellt dies eine mögliche Ursache der teils sehr niedrigen CD138⁺-Zellzahlen dar, da möglicherweise die Expression des Oberflächenantigens durch den Prozess des Probenverkehrs, -lagerung und -aufbereitung bereits reduziert wurde.

Für eine verbesserte in-vitro Analyse müsste demnach ein besserer Oberflächenmarker zur MM-Identifikation genutzt werden. Aktuell (Stand 11/2022) stellt CD138 jedoch weiterhin den etabliertesten Marker für das MM dar. Es gibt aber mehrere Arbeiten die weitere Oberflächenmarker wie CD229 und CD319 evaluiert haben, jedoch zeigten sich diese bezogen auf die Spezifität CD138 unterlegen (247,248). In Anlehnung an die etablierten FACS-Panels für das MM im Rahmen der MRD-Diagnostik können die MM-Zellen durch die Kombination von CD138, CD27, CD38, CD56, CD45, CD19, CD117, CD81, Leichtkette Igk und Igl zuverlässig identifiziert werden (249). In der FACS-basierten Plattform zur in-vitro Substanztestung von Walker et al. fand dieser Ansatz Anwendung, indem die MM-Zellen durch das Expressionsprofil von CD138, CD38, CD45, CD19, CD319, and CD46 und Leichtketten kappa und lambda identifiziert wurden (230). Zur Verbesserung der CellPly-Plattform müssten demnach mehr als 4 Fluoreszenzfilter nutzbar sein.

4.2.4. Fehlende Abbildung aller Subklone aufgrund räumlicher Heterogenität

Eine weitere Begrenzung der Aussagekraft des in-vitro Testens von Medikamenten beim Multiplen Myelom stellt zudem die große räumliche Heterogenität der Erkrankung dar, da bekannt ist, dass an unterschiedlichen Lokalisationen im Körper unterschiedliche Klone

vorliegen (29). In der vorliegenden Arbeit wurden nur Knochenmarksproben aus Beckenkammaspirationen untersucht, so dass möglicherweise aggressivere Klone an anderen Lokalisationen nicht miterfasst werden können.

4.2.5. Veränderte Tumorumgebung

Ein Nachteil der genutzten Mikrowell-Methode stellt die veränderte Tumorumgebung dar. Innerhalb eines Mikrowells befinden sich durchschnittlich maximal 10 Zellen, so dass durch die zufällige Verteilung der Zellen innerhalb des Mikrodevice nicht in jedem Mikrowell zur Ko-Lokalisation von MM mit allen Arten von anderen KM-Zellen kommt. Da diese jedoch zum Großteil einen relevanten Einfluss auf die Wirkweise der Medikamente haben, stellt dies eine mögliche Fehlerquelle für fehlende Wirksamkeitsmessungen dar. Statistisch gesehen sollte dieser Effekt bei Betrachtung von 480 Mikrowells pro Kondition ausgeglichen sein, eine Sicherheit darüber besteht jedoch nicht. Insbesondere die größtenteils fehlende Ko-Lokalisation mit BMMSC konnte bei Markierung dieser festgestellt werden, welche wahrscheinlich eine Mitursache der eingeschränkten MM-Viabilität in dieser Arbeit darstellt.

Des Weiteren waren in einem Mikrowell oft nur 1-2 MM-Zellen vorhanden. Dadurch lag die MM-Viabilität pro Mikrowell häufig bei 0% oder 100%, wodurch hohe Standardabweichungen entstehen. Alternativ könnte pro Kondition ein Kanal als gesamtes gemessen werden, da aber in der Regel keine Replikate innerhalb eines Experiments durchgeführt worden sind, läge dann jeweils nur ein einzelner Viabilitätswert pro Kondition vor.

4.2.6. Vergleich der in-vitro-Daten mit dem klinischen Verlauf der Patient*innen

Durch die CellPly-Plattform wurden in dieser Arbeit die Dosis-Wirkungsbeziehungen verschiedener Myelomtherapeutika anhand 22 Patientenproben dargestellt. Dabei zeigten die Patient*innen CP05, CP16, CP18, CP19, CP22 und CP23 ein gutes in-vitro Ansprechen auf Bortezomib. Bei CP16, CP18, CP19 und CP22 handelte es sich um NDMM, so dass hier auch eine Bortezomib-Sensitivität zu erwarten wäre. CP16 erreichte unter einer anschließenden VCD-Therapie jedoch nur eine SD. CP05 und CP23 erhielten dagegen Bortezomib bereits in verschiedenen Kombinationen vor dem Zeitpunkt der Testung, CP05 erreichte darunter als beste Response eine VGPR und CP23 eine SD. Bei CP05 folgte ein Früh- und bei CP23 ein Spätrezidiv, beide scheinen jedoch zumindest in-vitro weiterhin sensitiv auf die Substanz zu reagieren. Bei den Patient*innen CP13 und CP21

(beide NDMM) lag ein partielles, überwiegend aber insignifikantes Ansprechen vor, so dass hier von den in-vitro Ergebnissen eine eingeschränkte Sensitivität auf Bortezomib mit fraglicher initialer Resistenz anzunehmen ist. Einschränkend stellte sich bei CP21 jedoch der technisch bedingte reduzierte Beobachtungszeitraum von 12h dar. Die übrigen Patient*innen CP08, CP11 und CP20 zeigten eine in-vitro Resistenz gegenüber Bortezomib, die in Korrelation zum bisherigen Therapieverlauf der drei Patient*innen stand. Es handelte sich bei beiden um teils fortgeschrittene RRMM mit bis zu 4 Vortherapien, die jeweils auch Bortezomib enthielten (CP08: VAD; CP11: VCD, Dara-VD, CP20: Isa-VRd).

Für Melphalan konnten signifikante in-vitro Sensitivitäten für CP05, CP09 und CP18 und insignifikante partielle für CP19 und CP16 ermittelt werden. All diese Patient*innen waren NDMM bzw. RRMM ohne bisherige Melphalan-Therapie (CP05), so dass dies gut mit den in-vitro Ergebnissen korrelierte. Dagegen zeigten die Patient*innen CP21 und CP13 eine in-vitro Resistenz, wobei bei CP21 nur eine Analyse über 12h möglich war. CP13 zeigte auch schon gegenüber Bortezomib eine fragliche Resistenz, so dass bei diesem Patient*innen womöglich bereits initial multiple Resistenzen vorliegen könnten. Im klinischen Verlauf erreichte der Patient unter Elo-KRD und einer autoSZT eine CR. Weiterhin zeigte CP11 eine in-vitro-Resistenz gegen Melphalan, bei diesem Patienten wurde bisher keine Melphalan-haltige Therapie appliziert, jedoch handelt es sich um ein fortgeschrittenes RRMM mit 4 Vortherapien mit erwarteten multiplen Resistenzen.

Für Dexamethason lag zum Analysezeitpunkt nach 24h bei allen Patient*innen eine in-vitro Sensitivität vor. Es handelte sich um 3 NDMM (CP13, CP18, CP19) und 1 RRMM (CP05), wobei damit für CP05 trotz vorangegangener VCD-Therapie mit Frührezidiv eine fortbestehende Sensitivität gegenüber Dexamethason in-vitro festgestellt werden konnte. Da Lenalidomid aufgrund technischer Probleme bei 4 Patient*innen nur über 12h und bei nur einem über 24h getestet werden konnte, ist die Aussagekraft zur Testmöglichkeit der Substanz innerhalb der CellPly-Plattform stark beschränkt. Bei CP04 war erst nach 24h eine in-vitro-Response zu identifizieren. Ein in-vitro Ansprechen mit signifikanten Unterschieden erreichten nur CP04 und CP26, bei denen es sich um NDMM mit zu erwartender Sensitivität handelte. CP04 konnte unter einer KRD-Therapie mit autoSZT eine CR erreichen. Für CP26 lagen keine weiteren klinischen Daten zum Therapieverlauf vor. Die übrigen Patient*innen (CP08, CP25, CP27) zeigten in-vitro Resistenzen gegenüber der Substanz, bei allen handelte es sich um RRMM mit mindestens zwei Vortherapien, darunter jeweils mindestens eine Lenalidomid-haltige Kombination.

In der Testung von Daratumumab konnte eine signifikante in-vitro Sensitivität für CP06 und CP25 gezeigt werden, zudem eine insignifikante für CP27. Die vorliegenden Daten waren aufgrund technischer Probleme jedoch bei den Patient*innen CP25-CP27 auf 12h beschränkt, bei CP06 konnte eine Wirkung der Substanz erst nach 48h ermittelt werden. Interessanterweise konnte für CP25 und CP27 zumindest eine partielle Sensitivität gemessen werden, obwohl beide fortgeschrittene RRMM mit Daratumumab in der Vortherapie darstellen und beide zum Zeitpunkt der Punktion auf einen antiCD38-mAB refraktär waren. CP06 war ein Patient mit NDMM, so dass hier eine Korrelation des in-vitro-Ansprechens mit der Klinik bestand, CP26 zeigte jedoch trotz ebenfalls bestehendem NDMM kein Ansprechen auf Daratumumab.

Auch bei Elotuzumab konnten die Patient*innen CP25-CP27 nur über 12h untersucht werden, während sich bei CP06 erst nach 48h eine wenn auch insignifikante Wirkung zeigte. CP06 hatte ein NDMM, der unter einer anschließenden Elo-KRd-Therapie eine VGPR erreichen konnte. CP25 erreichte ein signifikantes in-vitro-Ansprechen, dieser Patient erhielt trotz RRM bis zum Zeitpunkt der Untersuchung noch kein Elotuzumab. Bei den beiden in-vitro resistenten Patient*innen handelte es sich um ein NDMM (CP26) und ein fortgeschrittenes RRMM (CP27). Eine mögliche Ursache für die eingeschränkte Darstellung der Elotuzumabwirkung stellt die Anwendung als Monotherapie dar. In vivo konnte für Elotuzumab nur in Kombination mit IMiDs ein Effekt in der MM-Therapie gesehen werden (169).

Insgesamt zeigte die individuelle Gegenüberstellung der jeweiligen Therapien inklusive Outcome mit den in-vitro-Ergebnisse bis auf die mAB größtenteils schlüssige Korrelationen zwischen erwarteten Resistenzen und in-vitro gemessenen. Bezüglich der mAB war dies am ehesten durch die zahlenmäßig beschränkte Datenlage bei technisch bedingter verkürzten Beobachtungszeit von 3 der 4 Patient*innen bedingt. Diese Korrelationen konnten patientenübergreifend jedoch nicht als statistisch signifikant dargestellt werden, da es sich bei den 22 Patient*innen und der Testung einer Substanz an maximal 11 auswertbaren Patient*innen um eine kleine Population handelt. Eine Korrelation mit dem klinischen Outcome der Patienten war in dieser Arbeit nicht möglich, da es zu wenige Patienten gab, die die in-vitro getesteten Substanzen auch nachfolgend in-vivo erhielten. Ein Grund dafür war, dass die Patienten unter anderem Substanzen wie Carfilzomib, Pomalidomid oder noch in klinischen Studien befindliche Substanzen erhielten, welche für die in-vitro Testung in dieser Arbeit nicht zur Verfügung standen. Um bessere Daten für eine Korrelation mit der Klinik zu generieren, müsste ein Screeningpanel mit allen relevanten

Myelomtherapeutika erstellt werden und an einer größeren Patientenpopulation getestet werden. Dabei wäre man jedoch auf eine Konzentration pro Substanz beschränkt, da nur 16 Kanäle zur Verfügung stehen. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch nur für Bortezomib, Melphalan und SUMOi passende Testkonzentrationen eruiert werden, für die anderen Substanzen lagen patientenindividuell verschiedene Konzentrationen mit bestem Ansprechen vor.

4.2.7. Verwendbarkeit der CellPly-Plattform für die klinische Entscheidungsfindung

Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit nicht gelungenen in-vitro Messung der Wirksamkeit von Lenalidomid, Daratumumab und Elotuzumab erscheint die Methode als sehr eingeschränkt für die Anwendung beim MM. Diese 3 Substanzen finden innerhalb der MM-Therapie häufig Anwendung, so dass sie durch eine Responseprädiktion in-vitro für die klinische Entscheidungsfindung mit abgedeckt werden müssen.

Eine weitere Problematik der in-vitro Resonsetestung im Allgemeinen stellt die Beschränkung der Messung auf nur die initiale Response dar. Die Dynamik der Klonselktion und Zugewinn neuer Mutationen im zeitlichen Verlauf unter einer bestimmten Therapie bleibt unberücksichtigt, obwohl diese entscheidend für den klinischen Verlauf der Patienten einschließlich PFS und OS sind.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit auch die Pharmakokinetik der Substanzen nicht wiedergespiegelt. So wird bei Lenalidomid durch die tägliche Einnahme in-vivo ein relativ konstanter Serumspiegel erreicht, während bei den mAb im Rahmen der monatlichen Applikationen ein wiederholter hoher Spitzenspiegel mit darauffolgendem langanhaltendem niedrigeren Serumspiegel vorliegt. Die Arbeit von Bohl et al. konnte ein unterschiedliches Mutationsmuster von MM-Zelllinien feststellen, in Abhängigkeit davon, ob sie kontinuierlich mit niedrigdosiertem Bortezomib oder im wöchentlichen Rhythmus kurzzeitig mit einer hohen Konzentration behandelt wurden. Nur in der zweiten Gruppe haben sich RRMM-assoziierte Mutationen finden können, die für eine Resistenzentwicklung mitverantwortlich sind (250). Da die MM-Zellen innerhalb der CellPly-Plattform mit einer konstanten Konzentration der jeweiligen Substanz inkubiert werden, lassen sich so vermutlich nicht alle Resistenzen beziehungsweise Sensitivitäten nachweisen.

Eine weitere Einschränkung der Ergebnisse ist, dass die Einteilung der in-vitro Ergebnisse in Responder und Non-Responder in Anlehnung an die bisherigen Publikationen

von CellPly zu AML und in Zusammenschau der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit getroffen wurde (227). Für eine bessere Einteilung wäre eine größere Patientenpopulation und die Korrelation zu deren klinischen Verlauf notwendig.

4.2.8. Schwankungen in der Apoptose-Messung

Bei allen Messungen der Apoptoseraten unter den verschiedenen Substanzen stellten sich diese sehr schwankend zwischen den einzelnen Konzentrationen und Zeitpunkten dar. Dies zeigt den qualitativen statt quantitativen Charakter der durch CellPly erzeugten Daten, die nur eine dichotome Einteilung in Responder und Non-Responder ermöglicht, nicht aber in Korrelation zur Wirkstärke stehen. Dies wird durch die Messung des Synergismus zwischen SUMOi und Bortezomib unterstrichen, wo sich eine schwächere Wirkung in der Kombination der beiden Substanzen darstellt, verglichen mit Bortezomib allein. Hier kann auch eine Abschwächung der beiden Substanzen bei Kombination ursächlich sein, jedoch konnte in einer anderen Arbeit der Wirksynergismus in-vitro an primären MM-Zellen gezeigt werden (187). Nur bei CP20, der sich in vitro resistent gegenüber Bortezomib zeigte, konnte ein Trend zur gesteigerten Apoptoseinduktion durch die Kombination mit SUMOi gezeigt werden.

Des Weiteren kam es auch immer wieder zu besseren Viabilitäten in den Kanälen mit den Testsubstanzen verglichen mit der Negativkontrolle, teils nach vorangegangener Response. Möglicherweise kommt es zu gestörten PI-Messungen nachfolgend an eine ausgeprägte Apoptose bei wirksamen Substanzen. Bei der Verwendung weiterer Fluoreszenzantikörper zur Markierung von T-Zellen und BMMSK kam es zudem zu Interferenzen mit dem PI-Signal, was eine eindeutige Auswertung in diesen Fällen nicht sicherstellte. All die Messungenauigkeiten führen jedoch zu der Schlussfolgerung, dass die durch die CellPly-Plattform generierten Daten nicht sicher für klinische Entscheidungsfindungen angewendet werden können.

4.2.9. Einfluss von BMMSK, NK- und T-Zellen auf die Viabilität der CD138+-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von anderen Zelltypen auf die Viabilität von MM-Zellen sowie die Wirkung verschiedener Substanzen überprüft. Für NK-Zellen konnte dabei bei zwei Patient*innen (CP06, CP20) ein signifikanter Einfluss auf die Viabilität der MM-Zellen gezeigt werden, während bei zwei anderen Patient*innen (CP22, CP23) keine Unterschiede vorlagen. Dabei handelte es sich bei den sensiblen Patient*innen um NDMM (CP06) bzw. RRMM mit nur einer Vortherapie (CP20), während es sich bei dem

NK-Zell-resistenten Patient CP23 um ein RRMM mit 2 Vortherapien handelt. Dies geht damit konform, dass MM-Zellen im Verlauf verschiedene Resistenzmechanismen gegen die Zytotoxizität von NK-Zellen entwickeln, die insbesondere beim fortgeschrittenen MM zu finden sind (208). Der Viabilitätsunterschied zwischen den Mikrowells mit und ohne NK-Zellen war bei allen 4 Patient*innen bei Hinzugabe von Elotuzumab, Daratumumab und Bortezomib in gleicher Ausprägung wie in der Negativkontrolle vorhanden. Aufgrund der Rolle der NK-Zellen in den Wirkmechanismen all dieser Substanzen wäre eine stärkere Wirkung bei der Betrachtung der Mikrowells mit NK-Zellen verglichen mit denen ohne NK-Zellen zu erwarten gewesen (137, 159,209). Die Bedeutung der NK-Zellen für die zytotoxische Wirkung der Myelomtherapeutika konnte somit mittels der CellPly-Plattform nicht dargestellt werden. Bei Hinzugabe von SUMOi zeigte sich allein bei CP20 eine NK-Zell-abhängige Wirkung der Substanz, was zum Wirkmechanismus von SUMOi über eine Aktivierung von NK-Zellen passt (183,185).

Da die Menge von NK-Zellen im KM der Patient*innen stark variiert, stellt es zudem eine Möglichkeit dar, eine MACS-Isolation von NK-Zellen aus PB vorzunehmen und das KM damit anzureichern. Damit könnte die Wahrscheinlichkeit für eine höhere Anzahl an Ko-Lokalisationen zwischen Tumor- und Effektorzellen gesteigert werden. Die vorliegende Arbeit konnte die gute Umsetzbarkeit der NK-Zell-Isolation sowohl aus MM- als auch bei HD-PB zeigen, so dass nur ein mathematisches Modell zur Berechnung der benötigten Anreicherung für eine bestimmte Ziel-Ratio aufgestellt werden müsste.

Auch gegen die T-Zell-Aktivität liegen vor allem beim fortgeschrittenen MM verschiedene Resistenzmechanismen vor (212). Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit durch die CellPly-Plattform gezeigt werden, da bei CP13 (NDMM) bereits eine signifikant erniedrigte Viabilität bei Co-Lokalisation mit T-Zellen zu Stande kam, während diese bei CP08 (RRMM, 4 Vortherapien) keine Signifikanz erreichte. Erst nach Zugabe von Bortezomib war bei Kontakt zu T-Zellen eine signifikant niedrigere Viabilität der MM-Zellen zu sehen. Damit konnte hier die für den Wirkmechanismus relevante Aktivierung der T-Zellen durch Bortezomib dargestellt werden (126).

Im Gegensatz zu den T- und NK-Zellen haben BMMSC einen proliferationsfördernden und protektiven Effekt auf MM-Zellen (218,220). Dieser konnte sich bei CP09 nicht darstellen lassen, da sowohl in der Negativkontrolle als auch bei Hinzugabe von Melphalan eine, wenn auch insignifikante, bessere Viabilität der MM-Zellen in den Mikrowells ohne

BMMSC gegeben war. Matula et al. konnten einen unter chemotherapeutischem Einfluss stark zunehmenden mitochondrialen Transfer feststellen, der zu einem verbesserten MM-Überleben führte (226). Somit wäre insbesondere unter Hinzunahme von Melphalan ein Überlebensvorteil bei BMMSC-Co-Lokalisation zu erwarten gewesen. Auch in der Arbeit von Waldschmidt et al. konnte eine verringerte Sensitivität auf Bortezomib von MM-Zelllinien und primären MM-Zellen festgestellt werden, wenn diese in Ko-Kultur mit der Stroma-Zelllinie HS-5 untersucht wurden (239). Eine mögliche Ursache für den fehlenden Nachweis dieses Effektes stellt neben dem sehr niedrigen BMMSC-Anteil im KM die Tatsache dar, dass man im KM-Aspirat mehrheitlich die noch nicht-adhärenenten, unreiferen BMMSC vorfindet, da die reiferen adhärenenten BMMSC zu stark an den Knochenbälkchen haften. Zudem zeigte sich bereits bei den HS-5 ein großer Zellverlust beim Übertragen der Zellen von der 96-Wellplatte in das Mikrodevice aufgrund der Plastikadhärenz dieses Zelltyps. Eine mögliche Maßnahme, um trotz der geringen Menge an BMMSC im KM den Effekt dieser Zellen auf die Wirksamkeit verschiedener Substanzen zu untersuchen, stellt die Anreicherung des KM mit BMMSC dar. Dafür könnten kultivierte BMMSC genutzt werden. Da die Kultivierung der BMMSC jedoch mehrere Wochen andauert, bis eine ausreichende hohe Zellmenge vorhanden ist, könnten nur BMMSC von anderen Patienten genutzt werden. Eine weniger zeitaufwendige Variante wäre die Anreicherung mit der HS-5-Zelllinie. Diese stammt jedoch von einem gesunden Menschen, so dass hier nicht myelomspezifischen Veränderungen der BMMSC vorliegen, die für die MM-Proliferation essenziell sind. Aus diesem Grund ließ sich vermutlich auch in der Ko-Kultivierung von U266 und HS-5 nur ein negativer Einfluss der Zellen aufeinander nachweisen. Die BMMSC von MM-Patient*innen weisen zahlreiche Veränderungen auf, unter anderem steigern sie durch IL-6-Sekretion die MM-Proliferation (201). Jedoch konnte in der Arbeit von Waldschmidt et al. eine verstärkte Proliferationsrate der MM-Zelllinie RPMI-8226 gesehen werden in der Ko-Kultur mit HS-5 in einer speziellen 3D-Plattform im Vergleich mit der Monokultur in dieser Plattform (239). Dieser Proliferationsanstieg zeigte sich aber im Vergleich zur Monokultur verzögert, dafür aber lang anhaltend. Somit war in der vorliegenden Arbeit möglicherweise kein Vorteil in der Ko-Kultur der beiden Zelllinien zu erkennen, da die Analyse bereits nach 24h durchgeführt wurde. Bei einer Anreicherung des KM mit BMMSC oder HS-5 geht jedoch die natürliche Zusammensetzung des Tumorenvironment verloren, was möglicherweise zu einer geringeren Korrelation der in-vitro mit den in-vivo Ergebnissen führt.

Auch für die Untersuchung der Zell-Zell-Kontaktabhängigkeit stellt die geringe Anzahl an Fluoreszenzdetektoren ein Problem dar, da beispielsweise in der vorliegenden Arbeit für die Markierung von T-Zellen nur CD3 verwendet werden konnte. Für genauere Analysen zur Abhängigkeit der T-Zellen auf die Wirkung der verschiedenen Substanzklassen wäre eine zusätzliche Differenzierung zwischen CD4+- und CD8+-Zellen interessant. Für die Identifizierung der BMMSC musste ebenfalls eine Begrenzung auf das Oberflächenprotein CD271 erfolgen, welches den spezifischsten Marker BMMSC darstellt, aber nicht von allen exprimiert wird (251). Die für die NK-Zellen gewählten Marker CD16 und CD56 sind nicht spezifisch für diese, zudem konnte aufgrund der Nutzung des gleichen Fluoreszenzkanals keine Doppelexpression erfasst werden.

4.2.10. Response-Prädiktion durch in-vitro-Testung

Während sich die CellPly-Plattform in der vorliegenden Arbeit nur eingeschränkt als geeignet für eine Response-Prädiktion beim MM darstellt, konnten für die AML gute Ergebnisse erzielt werden. Rocchi et al. konnten 83,33% der Responder und 100% der Non-Responder richtig in-vitro identifizieren (228). Bei Testung der AML kamen jedoch nur klassische Zytostatika zum Einsatz, deren Wirkung weniger komplex ist wie die modernen MM-Therapeutika und sich somit auch leichter in-vitro nachproduzieren lassen. Zudem weisen AML-Blasten eine deutlich bessere Viabilität als Myelomzellen auf, die sich nur schwer kultivieren lassen. Auch für das MM ließ sich in der vorliegenden Arbeit die Wirkung des Zytostatikums Melphalan mittels der CellPly-Testung nachweisen. Da in der Therapie der AML mehrheitlich Kombinationen aus nur zwei Substanzen Anwendungen finden, stellt sich die Korrelation der in-vitro mit den in-vivo Ergebnissen deutlich leichter dar.

Wie unter 1.8. bereits beschrieben, sind für das MM bisher verschiedene Ansätze zur in-vitro Prädiktion des individuellen Therapieansprechens untersucht wurden. In der FACS-basierten Plattform in der Arbeit von Walker et al. konnten wie in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Bortezomib und Dexamethason mit Response-Analyse nach 48h in den Konzentrationen 2,5nM bzw. 1µM gemessen werden (230). Auch für Daratumumab und Pomalidomid als IMiD-Vertreter konnten die in-vitro-Responsen nach 48h in den Konzentrationen 20nM bzw. 10µM bestimmt werden, was in der vorliegenden Arbeit nicht erreicht werden konnte. Aufgrund der größeren Patientenpopulation konnte hier zudem

eine Korrelationsanalyse der in-vitro mit den in-vivo Daten mit signifikant steigenden Proteasominhibitor- und IMiD-Resistenzen bei steigender Zahl an Vortherapien und signifikant besserem Ansprechen auf Proteasominhibitoren, IMiDs und Daratumumab in-vitro bei Therapienaivität auf die jeweilige Substanz durchgeführt werden (230). Bei einer FACS-basierten Methode wie dieser ist es jedoch nicht möglich, den Einfluss von Co-Lokalisation und Zell-Zell-Kontakt auf die Wirksamkeit der verschiedenen Substanzen mit zu untersuchen. Dies stellt eine Besonderheit der bildbasierten Mikrowellplattformen dar. Die Arbeit von Silva et al. präsentierte eine ähnliche bildbasierte Plattform wie die von CellPly, jedoch konnten durch Nutzung von 1536-Well-Plates bis zu 127 verschiedene Substanzen oder Kombinationen in Replikaten und mit jeweiliger Negativkontrolle getestet werden (235). Die Bilddaten wurden anschließend unter Hinzunahme eines mathematischen Modells ausgewertet, welches die Pharmakokinetik und die Therapieschemata der einzelnen Substanzen mit in die Berechnung der Chemosensitivität mit einbezog. Dadurch konnten für alle gängigen Myelomtherapeutika nach 96h Inkubation Aussagen zur Wirksamkeit getroffen werden mit einer Quote von 96% richtiger Zuordnung zu Responder und Non-Responder in Zusammenschau mit dem klinischen Outcome der Patient*innen (235). Eine Analyse des Einflusses weiterer Zelltypen ist hier jedoch noch ausstehend.

4.2.11. Nachteile der CellPly-Plattform verglichen mit anderen in-vitro Plattformen zur Medikamententestung

Der Nachteil der CellPly-Plattform im Vergleich zu anderen untersuchten Methoden der in-vitro Substanztestung stellt die Beschränkung auf 16 Konditionen pro Probe dar. Somit ist keine Testung aller relevanten Substanzen in verschiedenen Konzentrationen mit Negativkontrolle in Replikaten möglich, so dass trotz der hohen Anzahl Mikrowells pro Kanal nur ungenügend Daten für eine Auswertung und klinische Korrelation generiert werden können. Erschwerend kommt hinzu, dass durch fehlende Replikate und oftmals auftretende technische Probleme das Risiko eines Datenverlustes für ganze Konditionen hoch ist. Zudem war durch die beschränkte Viabilität nur eine Analyse über maximal 48h möglich, während ähnliche Arbeiten eine zuverlässige Responseanalyse erst nach 4-5 Tagen durchführten. Dies ist insbesondere bei den komplex wirkenden IMiDs essenziell, um eine Wirksamkeit der Substanz festzustellen.

Ein genereller Nachteil der ex-vivo Testung von Medikamenten ist der fehlende pharmakodynamische Aspekt. So spielen auch Faktoren wie Leberenzym polymorphismus, Medikamentenwechselwirkungen und das Mikrobiom eine bedeutende Rolle bei der Wirksamkeit von Therapeutika beim MM (252).

4.2.12. Weitere mögliche Anwendung der CellPly-Plattform

Wie in der vorliegenden Arbeit durch die Testung des SUMO_i Substrat gezeigt, liegt eine mögliche Verwendung der CellPly-Plattform in der präklinischen Phase der Medikamentenentwicklung zur primären Wirksamkeitsanalyse an Tumorzellen.

Aufgrund der Möglichkeit der Analyse der Viabilität der Tumorzellen in Abhängigkeit von potenziellen Effektorzellen ist eine Anwendung zur weiteren Erforschung der modernen zellbasierten Therapien wie CAR-T- und CAR-NK-Zellen denkbar, insbesondere im allogenen Setting.

Eine weitere denkbare Anwendung wäre das Aufzeigen neuer prädiktiver Marker für das individuelle Ansprechen auf die einzelnen Therapeutika. So könnte mittels CellPly-Testung das in-vitro Ansprechen mit Parametern wie der Zytogenetik, einzelnen Laborwerten oder Patientencharakteristika korreliert werden. Verglichen zur Korrelation dieser Parameter mit der in-vivo Response stellt sich so die Möglichkeit einer schnelleren Generierung von Daten zu bis zu 14 Substanzen pro Testung dar. Dies könnte ein hilfreicher Schritt zur Aufdeckung neuer prognostischer Faktoren sein, welche im weiteren Verlauf klinisch überprüft werden müssten.

Zudem können mittels der CellPly-Plattform schnell erste richtungsweisende Ergebnisse bei Fragestellungen zur Wirksamkeit der sequenziellen Applikation verschiedener Vertreter einer Substanzklasse herausgestellt werden, wie beispielsweise Daratumumab und Isatuximab.

4.3. Fazit und Ausblick

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die CellPly-Plattform grundsätzlich zur Anwendung beim Multiplen Myelom geeignet ist. Sowohl Tumor- als auch NK- und T-Zellen ließen sich erfolgreich darstellen. Es konnte erfolgreich die in-vitro-Response auf Bortezomib, Melphalan und Dexamethason gemessen werden. Die Lebensdauer der primären Myelomzellen war auf ca. 48h begrenzt, so dass die Viabilitätsanalyse nur innerhalb dieses Zeitraums möglich war. Dadurch konnte keine Wirkung von dem IMiDs-Vertreter Lenalidomid erfasst werden. Weiterhin war es auch nicht möglich die Wirkung der mAbs

Daratumumab und Elotuzumab darzustellen. Im Hinblick auf den hohen Stellenwert dieser 3 Substanzen in der Myelomtherapie stellt diese eine entscheidende Limitation der Plattform für die klinische Anwendung dar. Um die Analyse zu verbessern, wäre es demnach entscheidend, die Viabilität der Myelomzellen in-vitro zu verbessern, beispielsweise durch die Ko-Kultivierung mit BMMSK.

Des Weiteren ist die hohe Schwankung des Apoptosesignals kritisch im Hinblick auf die klinische Nutzung zu betrachten.

Zur Evaluation der Anwendbarkeit als prädiktiver Test wäre im weiteren Verlauf nach Optimierung der Kulturbedingungen ein Screening mit einem einheitlichen Panel mit bis zu 14 verschiedenen Substanzen in je einer Konzentration sowie einer Positiv- und Negativkontrolle von einer größeren Patientenkohorte notwendig unter Einbeziehung weiterer häufig eingesetzter Myelomtherapeutika wie Carfilzomib, Pomalidomid und Cyclophosphamid. Auf Grundlage dessen könnte die Korrelation zur Response in-vivo und weiteren Parametern wie MRD-Status, PFS und OS überprüft werden.

Insgesamt wäre jedoch eher eine Anwendung der CellPly-Plattform in der präklinischen Phase der Medikamentenentwicklung realistischer, wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt zur ersten Evaluation der Wirksamkeit neuer Substanzen wie Subasumstat auf primäre Myelomzellen. Zudem eignet sich die Plattform für weitergehende Untersuchungen zum Einfluss von T- und NK-Zellen auf die Suszeptibilität der MM-Zellen auf Therapeutika. Eine Untersuchung von Wirksynergismen bei Medikamentenkombinationen konnte mittels der CellPly-Plattform nicht durchgeführt werden. Auch ein Screening für neue potenzielle Prädiktionsmarker mittels der CellPly-Plattform scheint denkbar.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass sich die CellPly-Plattform grundsätzlich zur Untersuchung von Myelomzellen eignet, jedoch beschränkt sich der Einsatz auf die Testung von weniger komplex wirkenden Substanzen wie Bortezomib, Melphalan und Dexamethason. Zudem konnte auch die Wirkung der experimentellen Substanz SUMOi gezeigt werden, für die Darstellung synergistischer Wirkungen ist die Plattform ungeeignet. Die Evaluation des Einflusses der NK- und T-Zellen stellte sich erfolgreich dar.

Literaturverzeichnis

1. Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland für 2017/2018. 2017 [cited 2022 Jan 22]; Available from: www.krebsdaten.de/multiples-myelom
2. Ludwig Heinz, Durie Susie Novis, Meckl Angela, Hinke Axel, Durie Brian. Multiple Myeloma Incidence and Mortality Around the Globe; Interrelations Between Health Access and Quality, Economic Resources, and Patient Empowerment. *Oncologist* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2022 Jan 22];25(9):e1406. Available from: [/pmc/articles/PMC7485361/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34485361/)
3. Durie Brian GM, Hoering Antje, Abidi Muneer H, Rajkumar S Vincent, Epstein Joshua, Kahanic Stephen P, Thakuri Mohan, Reu Frederic, Reynolds Christopher M, Sexton Rachael, Orlowski Robert Z, Barlogie Bart, Dispenzieri Angela. Bortezomib with lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexamethasone alone in patients with newly diagnosed myeloma without intent for immediate autologous stem-cell transplant (SWOG S0777): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet* [Internet]. 2017;389(10068):519–27. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31594-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31594-X)
4. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Fonseca R, Rajkumar S v, Offord JR, Larson DR, Plevak ME, Therneau TM, Greipp PR. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2003/01/17. 2003;78(1):21–33. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12528874>
5. Rajkumar S Vincent, Dimopoulos Meletios A, Palumbo Antonio, Blade Joan, Merlini Giampaolo, Mateos María Victoria, Kumar Shaji, Hillengass Jens, Kastritis Efsthios, Richardson Paul, Landgren Ola, Paiva Bruno, Dispenzieri Angela, Weiss Brendan, LeLeu Xavier, Zweegman Sonja, Lonial Sagar, Rosinol Laura, Zamagni Elena, Jagannath Sundar, Sezer Orhan, Kristinsson Sigurdur Y, Caers Jo, Usmani Saad Z, Lahuerta Juan José, Johnsen Hans Erik, Beksac Meral, Cavo Michele, Goldschmidt Hartmut, Terpos Evangelos, Kyle Robert A, Anderson Kenneth C, Durie Brian GM, Miguel Jesus F San. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol*. 2014 Nov 1;15(12):e538–48.

6. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, Dispenzieri A, Kumar S, Clark RJ, Baris D, Hoover R, Rajkumar S v. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* [Internet]. 2009/01/31. 2009;113(22):5412–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19179464>
7. Dispenzieri Angela, Katzmann Jerry A, Kyle Robert A, Larson Dirk R, Melton L Joseph, Colby Colin L, Therneau Terry M, Clark Raynell, Kumar Shaji K, Bradwell Arthur, Fonseca Rafael, Jelinek DF F, Rajkumar S Vincent. Prevalence and risk of progression of light-chain monoclonal gammopathy of undetermined significance: a retrospective population-based cohort study. *The Lancet* [Internet]. 2010 May 15 [cited 2022 Jan 22];375(9727):1721–8. Available from: <http://www.thelancet.com/article/S0140673610604825/fulltext>
8. Kyle Robert A, Larson Dirk R, Therneau Terry M, Dispenzieri Angela, Kumar Shaji, Cerhan James R, Rajkumar S Vincent. Long-Term Follow-up of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2018 Jan 18 [cited 2022 Jan 22];378(3):241–9. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1709974>
9. Dimopoulos Meletios A, Moulopoulos Lia A, Maniatis Alice, Alexanian Raymond. Solitary plasmacytoma of bone and asymptomatic multiple myeloma. *Blood*. 2000 Sep 15;96(6):2037–44.
10. Bhutani Manisha, Foureau David M, Atrash Shebli, Voorhees Peter M, Usmani Saad Z. Extramedullary multiple myeloma. *Leukemia* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2022 Jan 8];34(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31776467/>
11. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, Richardson P, Caltagirone S, Lahuerta JJ, Facon T, Bringhen S, Gay F, Attal M, Passera R, Spencer A, Offidani M, Kumar S, Musto P, Lonial S, Petrucci MT, Orlovski RZ, Zamagni E, Morgan G, Dimopoulos MA, Durie BG, Anderson KC, Sonneveld P, San Miguel J, Cavo M, Rajkumar S v, Moreau P. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol* [Internet]. 2015/08/05. 2015;33(26):2863–9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26240224>

12. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* [Internet]. 1975/09/01. 1975;36(3):842–54. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1182674>
13. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, Munshi N, Lonial S, Blade J, Mateos M v, Dimopoulos M, Kastritis E, Boccadoro M, Orłowski R, Goldschmidt H, Spencer A, Hou J, Chng WJ, Usmani SZ, Zamagni E, Shimizu K, Jagannath S, Johnsen HE, Terpos E, Reiman A, Kyle RA, Sonneveld P, Richardson PG, McCarthy P, Ludwig H, Chen W, Cavo M, Harousseau JL, Lentzsch S, Hillengass J, Palumbo A, Orfao A, Rajkumar S v, Miguel JS, Avet-Loiseau H. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* [Internet]. 2016/08/12. 2016;17(8):e328–46. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27511158>
14. Rajkumar S Vincent. Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2022 Jan 8];95(5):548–67. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32212178/>
15. Munshi NC, Avet-Loiseau H, Rawstron AC, Owen RG, Child JA, Thakurta A, Sherrington P, Samur MK, Georgieva A, Anderson KC, Gregory WM. Association of Minimal Residual Disease With Superior Survival Outcomes in Patients With Multiple Myeloma: A Meta-analysis. *JAMA Oncol* [Internet]. 2016/09/16. 2017;3(1):28–35. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27632282>
16. Chretien Marie Lorraine, Corre Jill, Lauwers-Cances Valerie, Magrangeas Florence, Cleynen Alice, Yon Edwige, Hulin Cyrille, Leleu Xavier, Orsini-Piocelle Frederique, Blade Jean Sebastien, Sohn Claudine, Karlin Lionel, Delbrel Xavier, Hebraud Benjamin, Roussel Murielle, Marit Gerald, Garderet Laurent, Mohty Mohamad, Rondon Philippe, Voillat Laurent, Royer Bruno, Jaccard Arnaud, Belhadj Karim, Fontan Jean, Caillot Denis, Stoppa Anne Marie, Attal Michel, Facon Thierry, Moreau Philippe, Minvielle Stephane, Avet-Loiseau Hervé. Understanding the role of hyperdiploidy in myeloma prognosis: which trisomies really matter? *Blood* [Internet]. 2015 Dec 17 [cited 2022 Jan 23];126(25):2713–9. Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/126/25/2713/1390316/2713.pdf>
17. Kumar Shaji, Fonseca Rafael, Ketterling Rhet P, Dispenzieri Angela, Lacy Martha Q, Gertz Morie A, Hayman Suzanne R, Buadi Francis K, Dingli David, Knudson

- Ryan A, Greenberg Alexandra, Russell Stephen J, Zeldenrust Steven R, Lust John A, Kyle Robert A, Bergsagel Leif, Rajkumar S Vincent. Trisomies in multiple myeloma: impact on survival in patients with high-risk cytogenetics. *Blood* [Internet]. 2012 Mar 1 [cited 2022 Jan 23];119(9):2100–5. Available from: www.msmdart.org
18. Walker Brian A, Mavrommatis Konstantinos, Wardell Christopher P, Ashby T Cody, Bauer Michael, Davies Faith, Rosenthal Adam, Wang Hongwei, Qu Pingping, Hoering Antje, Samur Mehmet, Towfic Fadi, Ortiz Maria, Flynt Erin, Yu Zhinuan, Yang Zhihong, Rozelle Dan, Obenauer John, Trotter Matthew, Auclair Daniel, Keats Jonathan, Bolli Niccolo, Fulciniti Mariateresa, Szalat Raphael, Moreau Philippe, Durie Brian, Stewart A Keith, Goldschmidt Hartmut, Raab Marc S, Einsele Hermann, Sonneveld Pieter, San Miguel Jesus, Lonial Sagar, Jackson Graham H, Anderson Kenneth C, Avet-Loiseau Herve, Munshi Nikhil, Thakurta Anjan, Morgan Gareth. A high-risk, Double-Hit, group of newly diagnosed myeloma identified by genomic analysis. *Leukemia* 2018 33:1 [Internet]. 2018 Jul 2 [cited 2022 Jun 19];33(1):159–70. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41375-018-0196-8>
 19. Walker Brian A, Boyle Eileen M, Wardell Christopher P, Murison Alex, Begum Dil B, Dahir Nasrin M, Proszek Paula Z, Johnson David C, Kaiser Martin F, Melchor Lorenzo, Aronson Lauren I, Scales Matthew, Pawlyn Charlotte, Mirabella Fabio, Jones John R, Brioli Annamaria, Mikulasova Aneta, Cairns David A, Gregory Walter M, Quartilho Ana, Drayson Mark T, Russell Nigel, Cook Gordon, Jackson Graham H, Leleu Xavier, Davies Faith E, Morgan Gareth J. Mutational Spectrum, Copy Number Changes, and Outcome: Results of a Sequencing Study of Patients With Newly Diagnosed Myeloma. *J Clin Oncol* [Internet]. 2015 Nov 20 [cited 2022 Jan 23];33(33):3911. Available from: [/pmc/articles/PMC6485456/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26144441/)
 20. Lodé Laurence, Eveillard Marion, Trichet Valérie, Soussi Thierry, Wuillème Soraya, Richebourg Steven, Magrangeas Florence, Ifrah Norbert, Campion Loïc, Traullé Catherine, Guilhot François, Caillot Denis, Marit Gérald, Mathiot Claire, Facon Thierry, Attal Michel, Harousseau Jean Luc, Moreau Philippe, Minvielle Stéphane, Avet-Loiseau Hervé. Mutations in TP53 are exclusively associated with del(17p) in multiple myeloma. *Haematologica* [Internet]. 2010 [cited 2022 Jan 23];95(11):1973. Available from: [/pmc/articles/PMC2966923/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20614441/)

21. Costa Luciano J, Chhabra Saurabh, Medvedova Eva, Dholaria Bhagirathbhai R, Schmidt Timothy M, Godby Kelly N, Silbermann Rebecca, Dhakal Binod, Bal Susan, Giri Smith, D'Souza Anita, Hall Aric, Hardwick Pamela, Omel James, Cornell Robert F, Hari Parameswaran, Callander Natalie S. Daratumumab, Carfilzomib, Lenalidomide, and Dexamethasone With Minimal Residual Disease Response-Adapted Therapy in Newly Diagnosed Multiple Myeloma. *Journal of Clinical Oncology*. 2021 Dec 13;
22. Kuiper R, Broyl A, de Knecht Y, van Vliet MH, van Beers EH, van der Holt B, el Jarari L, Mulligan G, Gregory W, Morgan G, Goldschmidt H, Lokhorst HM, van Duin M, Sonneveld P. A gene expression signature for high-risk multiple myeloma. *Leukemia* 2012 26:11 [Internet]. 2012 May 8 [cited 2022 Feb 25];26(11):2406–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/leu2012127>
23. Kuiper Rowan, van Duin Mark, van Vliet Martin H, Broijl Annemiek, van der Holt Bronno, Jarari Laila el, van Beers Erik H, Mulligan George, Avet-Loiseau Hervé, Gregory Walter M, Morgan Gareth, Goldschmidt Hartmut, Lokhorst Henk M, Sonneveld Pieter. Prediction of high- and low-risk multiple myeloma based on gene expression and the International Staging System. *Blood* [Internet]. 2015 Oct 22 [cited 2022 Feb 25];126(17):1996–2004. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/126/17/1996/34446/Prediction-of-high-and-low-risk-multiple-myeloma>
24. Keats Jonathan J, Chesi Marta, Egan Jan B, Garbitt Victoria M, Palmer Stephen E, Braggio Esteban, van Wier Scott, Blackburn Patrick R, Baker Angela S, Dispenzieri Angela, Kumar Shaji, Rajkumar S Vincent, Carpten John D, Barrett Michael, Fonseca Rafael, Stewart A Keith, Bergsagel P Leif. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood* [Internet]. 2012 Aug 2 [cited 2022 Jan 30];120(5):1067–76. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/120/5/1067/30261/Clonal-competition-with-alternating-dominance-in>
25. Weinhold Niels, Ashby Cody, Rasche Leo, Chavan Shweta S, Stein Caleb, Stephens Owen W, Tytarenko Ruslana, Bauer Michael A, Meissner Tobias, Deshpande Shayu, Patel Purvi H, Buzder Timea, Molnar Gabor, Peterson Erich A, van Rhee Frits, Zangari Maurizio, Thanendrarajan Sharmilan, Schinke Carolina, Tian Erming, Epstein Joshua, Barlogie Bart, Davies Faith E, Heuck Christoph J, Walker Brian A, Morgan Gareth J. Clonal selection and double-hit events involving tumor

- suppressor genes underlie relapse in myeloma. *Blood*. 2016 Sep 29;128(13):1735–44.
26. Bolli Niccolo, Avet-Loiseau Hervé, Wedge David C, van Loo Peter, Alexandrov Ludmil B, Martincorena Inigo, Dawson Kevin J, Iorio Francesco, Nik-Zainal Serena, Bignell Graham R, Hinton Jonathan W, Li Yilong, Tubio Jose MC, McLaren Stuart, O'Meara Sarah, Butler Adam P, Teague Jon W, Mudie Laura, Anderson Elizabeth, Rashid Naim, Tai Yu Tzu, Shamma Masood A, Sperling Adam S, Fulciniti Mariateresa, Richardson Paul G, Parmigiani Giovanni, Magrangeas Florence, Minvielle Stephane, Moreau Philippe, Attal Michel, Facon Thierry, Futreal P Andrew, Anderson Kenneth C, Campbell Peter J, Munshi Nikhil C. Heterogeneity of genomic evolution and mutational profiles in multiple myeloma. *Nature Communications* 2014 5:1 [Internet]. 2014 Jan 16 [cited 2022 Jan 30];5(1):1–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/ncomms3997>
 27. Magrangeas F, Avet-Loiseau H, Gouraud W, Lodé L, Decaux O, Godmer P, Garderet L, Voillat L, Facon T, Stoppa AM, Marit G, Hulin C, Casassus P, Tiab M, Voog E, Randriamalala E, Anderson KC, Moreau P, Munshi NC, Minvielle S. Minor clone provides a reservoir for relapse in multiple myeloma. *Leukemia* 2013 27:2 [Internet]. 2012 Aug 9 [cited 2022 Jan 30];27(2):473–81. Available from: <https://www.nature.com/articles/leu2012226>
 28. Jones John R, Weinhold Niels, Ashby Cody, Walker Brian A, Wardell Chris, Pawlyn Charlotte, Rasche Leo, Melchor Lorenzo, Cairns David A, Gregory Walter M, Johnson David, Begum Dil B, Ellis Sidra, Sherborne Amy L, Cook Gordon, Kaiser Martin F, Drayson Mark T, Owen Roger G, Jackson Graham H, Davies Faith E, Greaves Mel, Morgan Gareth J. Clonal evolution in myeloma: the impact of maintenance lenalidomide and depth of response on the genetics and sub-clonal structure of relapsed disease in uniformly treated newly diagnosed patients. *Haematologica* [Internet]. 2019 Jun 30 [cited 2022 Jan 30];104(7):1440. Available from: [/pmc/articles/PMC6601103/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3111103/)
 29. Rasche L, Chavan SS, Stephens OW, Patel PH, Tytarenko R, Ashby C, Bauer M, Stein C, Deshpande S, Wardell C, Buzder T, Molnar G, Zangari M, Van Rhee F, Thanendrarajan S, Schinke C, Epstein J, Davies FE, Walker BA, Meissner T, Barlogie B, Morgan GJ, Weinhold N. Spatial genomic heterogeneity in multiple myeloma revealed by multi-region sequencing. *Nature Communications* 2017 8:1. 2017 Aug 16;8(1):1–11.

30. Hillengass Jens, Ellert Elena, Spira Daniel, Hemmer Stefan, Wagner Barbara, Andrulis Mindaugas, Sauer Sandra. Comparison of plasma cell infiltration in random samples of the bone marrow and osteolyses acquired by CT-guided biopsy in patients with symptomatic multiple myeloma. https://doi.org/10.1200/JCO20163415_suppl8040. 2016 May 20;34(15_suppl):8040–8040.
31. Landau Heather J, Yellapantula Venkata, Diamond Benjamin T, Rustad Even H, Maclachlan Kylee H, Gundem Gunes, Medina-Martinez Juan, Ossa Juan Arango, Levine Max F, Zhou Yangyu, Kappagantula Rajya, Baez Priscilla, Attiye Marc, Makohon-Moore Alvin, Zhang Lance, Boyle Eileen M, Ashby Cody, Blaney Patrick, Patel Minal, Zhang Yanming, Dogan Ahmet, Chung David J, Giralt Sergio, Lahoud Oscar B, Peled Jonathan U, Scordo Michael, Shah Gunjan, Hassoun Hani, Korde Neha S, Lesokhin Alexander M, Lu Sydney, Mailankody Sham, Shah Urvi, Smith Eric, Hultcrantz Malin L, Ulaner Gary A, van Rhee Frits, Morgan Gareth J, Landgren Ola, Papaemmanuil Elli, Iacobuzio-Donahue Christine, Maura Francesco. Accelerated single cell seeding in relapsed multiple myeloma. *Nat Commun* [Internet]. 2020 Jul 17 [cited 2022 Feb 6];11(1):1–10. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-17459-z>
32. Ferreira Bruna, Caetano Joana, Barahona Filipa, Lopes Raquel, Carneiro Emilie, Costa-Silva Bruno, João Cristina. Liquid biopsies for multiple myeloma in a time of precision medicine. *J Mol Med* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2022 Jun 19];98(4):513–25. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00109-020-01897-9>
33. Attal M, Lauwers-Cances V, Hulin C, Leleu X, Caillot D, Escoffre M, Arnulf B, Macro M, Belhadj K, Garderet L, Roussel M, Payen C, Mathiot C, Fermand JP, Meuleman N, Rollet S, Maglio ME, Zeytoonjian AA, Weller EA, Munshi N, Anderson KC, Richardson PG, Facon T, Avet-Loiseau H, Harousseau JL, Moreau P, Study IFM. Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. *N Engl J Med* [Internet]. 2017/04/06. 2017;376(14):1311–20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28379796>
34. Reeder CB, Reece DE, Kukreti V, Chen C, Trudel S, Hentz J, Noble B, Pirooz NA, Spong JE, Piza JG, Zepeda VHJ, Mikhael JR, Leis JF, Bergsagel PL, Fonseca R, Stewart AK. Cyclophosphamide, bortezomib and dexamethasone induction for newly diagnosed multiple myeloma: high response rates in a phase II clinical trial.

- Leukemia 2009 23:7 [Internet]. 2009 Feb 19 [cited 2022 Jan 23];23(7):1337–41. Available from: <https://www.nature.com/articles/leu200926>
35. Kumar Shaji, Flinn Ian, Richardson Paul G, Hari Parameswaran, Callander Natalie, Noga Stephen J, Stewart A Keith, Turturro Francesco, Rifkin Robert, Wolf Jeffrey, Estevam Jose, Mulligan George, Shi Hongliang, Webb Iain J, Rajkumar S Vincent. Randomized, multicenter, phase 2 study (EVOLUTION) of combinations of bortezomib, dexamethasone, cyclophosphamide, and lenalidomide in previously untreated multiple myeloma. 2012 [cited 2022 Jan 23]; Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/119/19/4375/1352994/zh801912004375.pdf>
 36. Richardson Paul G, Weller Edie, Lonial Sagar, Jakubowiak Andrzej J, Jagannath Sundar, Raje Noopur S, Avigan David E, Xie Wanling, Ghobrial Irene M, Schlossman Robert L, Mazumder Amitabha, Munshi Nikhil C, Vesole David H, Joyce Robin, Kaufman Jonathan L, Doss Deborah, Warren Diane L, Lunde Laura E, Kaster Sarah, DeLaney Carol, Hideshima Teru, Mitsiades Constantine S, Knight Robert, Esseltine Dixie Lee, Anderson Kenneth C. Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. Blood [Internet]. 2010 Aug 5 [cited 2022 Jan 23];116(5):679–86. Available from: <http://www.ClinicalTrials.gov>:
 37. Moreau Philippe, Attal Michel, Hulin Cyrille, Arnulf Bertrand, Belhadj K, Benboubker L, Béné Marie C, Broijl Annemiek, Sonneveld Pieter, et al. Bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab before and after autologous stem-cell transplantation for newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): a randomised, open-label, phase 3 study. The Lancet. 2019 Jul 6;394(10192):29–38.
 38. Giralt S, Stadtmauer EA, Harousseau JL, Palumbo A, Bensinger W, Comenzo RL, Kumar S, Munshi NC, Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, San Miguel J, Ludwig H, Hajek R, Jagannath S, Blade J, Lonial S, Dimopoulos MA, Einsele H, Barlogie B, Anderson KC, Gertz M, Attal M, Tosi P, Sonneveld P, Boccadoro M, Morgan G, Sezer O, Mateos M v, Cavo M, Joshua D, Turesson I, Chen W, Shimizu K, Powles R, Richardson PG, Niesvizky R, Rajkumar S v, Durie BG, Imwg. International myeloma working group (IMWG) consensus statement and guidelines regarding the current status of stem cell collection and high-dose therapy for multiple myeloma and the role of plerixafor (AMD 3100). Leukemia [Internet]. 2009/06/26. 2009;23(10):1904–12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pub-med/19554029>

39. Shah Nina, Callander Natalie, Ganguly Siddhartha, Gul Zartash, Hamadani Mehdi, Costa Luciano, Sengsayadeth Salyka, Abidi Muneer, Hari Parameswaran, Mohty Mohamad, Chen Yi bin, Koreth John, Landau Heather, Lazarus Hillard, Leather Helen, Majhail Navneet, Nath Rajneesh, Osman Keren, Perales Miguel Angel, Schriber Jeffrey, Shaughnessy Paul, Vesole David, Vij Ravi, Wingard John, Giralt Sergio, Savani Bipin N. Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Multiple Myeloma: Guidelines from the American Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2022 Jun 20];21(7):1155–66. Available from: <http://www.astctjournal.org/article/S1083879115001743/fulltext>
40. Cavo Michele, Gay Francesca Maria, Patriarca Francesca, Zamagni Elena, Montefusco Vittorio, Dozza Luca, Galli Monica, Bringhen Sara, Testoni Nicoletta, Grasso Mariella, Ballanti Stelvio, Tacchetti Paola, Semenzato Giampietro, Liberati Anna Marina, Benevolo Giulia, Spriano Mauro, Di Bartolomeo Paolo, Caravita di Toritto Tommaso, Palmas Angelo D, Cafro Anna Maria, Morabito Fortunato, Musto Pellegrino, Rizzi Rita, Palumbo Antonio, Sonneveld Pieter. Double Autologous Stem Cell Transplantation Significantly Prolongs Progression-Free Survival and Overall Survival in Comparison with Single Autotransplantation in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: An Analysis of Phase 3 EMN02/HO95 Study. *Blood*. 2017 Dec 7;130(Supplement 1):401–401.
41. Stadtmauer Edward A, Pasquini Marcelo C, Blackwell Beth, Hari Parameswaran, Bashey Asad, Devine Steven, Efebera Yvonne, Ganguly Siddhartha, Gasparetto Cristina, Geller Nancy, Horowitz Mary M, Koreth John, Knust Kristin, Landau Heather, Brunstein Claudio, McCarthy Philip, Nelson Courtney, Qazilbash Muzaffar H, Shah Nina, Vesole David H, Vij Ravi, Vogl Dan T, Giralt Sergio, Somlo George, Krishnan Amrita. Autologous Transplantation, Consolidation, and Maintenance Therapy in Multiple Myeloma: Results of the BMT CTN 0702 Trial. *Journal of Clinical Oncology* [Internet]. 2019 [cited 2022 Jan 23];37(7):589. Available from: </pmc/articles/PMC6553842/>
42. McCarthy Philip L, Holstein Sarah A, Petrucci Maria Teresa, Richardson Paul G, Hulin Cyrille, Tosi Patrizia, Bringhen Sara, Musto Pellegrino, Anderson Kenneth C, Caillot Denis, Gay Francesca, Moreau Philippe, Marit Gerald, Jung Sin Ho, Yu Zhinuan, Winograd Benjamin, Knight Robert D, Palumbo Antonio, Attal Michel. Le-

- nalidomide maintenance after autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: A meta-analysis. *Journal of Clinical Oncology*. 2017 Oct 10;35(29):3279–89.
43. Sonneveld P, Schmidt-Wolf IG, van der Holt B, El Jarari L, Bertsch U, Salwender H, Zweegman S, Vellenga E, Broyl A, Blau IW, Weisel KC, Wittebol S, Bos GM, Stevens-Kroef M, Scheid C, Pfreundschuh M, Hose D, Jauch A, van der Velde H, Raymakers R, Schaafsma MR, Kersten MJ, van Marwijk-Kooy M, Duehrsen U, Lindemann W, Wijermans PW, Lokhorst HM, Goldschmidt HM. Bortezomib induction and maintenance treatment in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of the randomized phase III HOVON-65/ GMMG-HD4 trial. *J Clin Oncol*. 2012/07/18. 2012;30(24):2946–55.
 44. Baertsch Marc Andrea, Mai Elias K, Hielscher Thomas, Bertsch Uta, Salwender Hans J, Munder Markus, Fuhrmann Stephan, Dührsen Ulrich, Brossart Peter, Neben Kai, Schlenzka Jana, Kunz Christina, Raab Marc S, Hillengaß Jens, Jauch Anna, Seckinger Anja, Hose Dirk, Luntz Steffen, Sonneveld Pieter, Lokhorst Henk, Martin Hans, Goerner Martin, Hoffmann Martin, Lindemann Hans Walter, Bernhard Helga, Blau Igor W, Scheid Christof, Besemer Britta, Weisel Katja C, Hänel Matthias, Dürig Jan, Goldschmidt Hartmut. Lenalidomide versus bortezomib maintenance after frontline autologous stem cell transplantation for multiple myeloma. *Blood Cancer J [Internet]*. 2021 Jan 1 [cited 2022 Oct 2];11(1):1. Available from: </pmc/articles/PMC7791127/>
 45. Facon Thierry, Kumar Shaji, Plesner Torben, Orlowski Robert Z, Moreau Philippe, Bahlis Nizar, Basu Supratik, Nahi Hareth, Hulin Cyrille, Quach Hang, Goldschmidt Hartmut, O'Dwyer Michael, Perrot Aureore, Venner Christopher P, Weisel Katja, Mace Joseph R, Raje Noopur, Attal Michel, Tiab Mourad, Macro Margaret, Frenzel Laurent, Leleu Xavier, Ahmadi Tahamtan, Chiu Christopher, Wang Jianping, Van Rampelbergh Rian, Uhlar Clarissa M, Kobos Rachel, Qi Ming, Usmani Saad Z. Daratumumab plus Lenalidomide and Dexamethasone for Untreated Myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2019 May 30;380(22):2104–15.
 46. Durie Brian GM, Hoering Antje, Abidi Muneer H, Rajkumar S Vincent, Epstein Joshua, Kahanic Stephen P, Thakuri Mohan, Reu Frederic, Reynolds Christopher M, Sexton Rachael, Orlowski Robert Z, Barlogie Bart, Dispenzieri Angela. Bortezomib with lenalidomide and dexamethasone versus lenalidomide and dexame-

- thasone alone in patients with newly diagnosed myeloma without intent for immediate autologous stem-cell transplant (SWOG S0777): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*. 2017 Feb 4;389(10068):519–27.
47. Mateos Maria Victoria, Cavo Michele, Blade Joan, Dimopoulos Meletios A, Suzuki Kenshi, Jakubowiak Andrzej, Knop Stefan, Doyen Chantal, Lucio Paulo, Nagy Zsolt, Pour Ludek, Cook Mark, Grosicki Sebastian, Crepaldi Andre, Liberati Anna Marina, Campbell Philip, Shelekhova Tatiana, Yoon Sung Soo, Iosava Genadi, Fujisaki Tomoaki, Garg Mamta, Krevvata Maria, Chen Ying, Wang Jianping, Kudva Anupa, Ukropec Jon, Wroblewski Susan, Qi Ming, Kobos Rachel, San-Miguel Jesus. Overall survival with daratumumab, bortezomib, melphalan, and prednisone in newly diagnosed multiple myeloma (ALCYONE): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*. 2020 Jan 11;395(10218):132–41.
 48. Munshi Nikhil C, Anderson Larry D, Shah Nina, Madduri Deepu, Berdeja Jesús, Lonial Sagar, Raje Noopur, Lin Yi, Siegel David, Oriol Albert, Moreau Philippe, Yakoub-Agha Ibrahim, Delforge Michel, Cavo Michele, Einsele Hermann, Goldschmidt Hartmut, Weisel Katja, Rambaldi Alessandro, Reece Donna, Petrocca Fabio, Massaro Monica, Connarn Jamie N, Kaiser Shari, Patel Payal, Huang Liping, Campbell Timothy B, Hege Kristen, San-Miguel Jesús. Idecabtagene Vicleucel in Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2021 Feb 25 [cited 2022 Jan 23];384(8):705–16. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa2024850>
 49. Moreau Philippe, Garfall Alfred L, van de Donk Niels WCJ, Nahi Hareth, San-Miguel Jesús F, Oriol Albert, Nooka Ajay K, Martin Thomas, Rosinol Laura, Chari Ajai, Karlin Lionel, Benboubker Lotfi, Mateos Maria Victoria, Bahlis Nizar, Popat Rakesh, Besemer Britta, Martínez-López Joaquín, Sidana Surbhi, Delforge Michel, Pei Lixia, Trancucci Danielle, Verona Raluca, Girgis Suzette, Lin Shun XW, Olyslager Yunsi, Jaffe Mindy, Uhlar Clarissa, Stephenson Tara, van Rampelbergh Rian, Banerjee Arnob, Goldberg Jenna D, Kobos Rachel, Krishnan Amrita, Usmani Saad Z. Teclistamab in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2022 Aug 11 [cited 2022 Oct 2];387(6):495–505. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa2203478>
 50. Bruno Benedetto, Rotta Marcello, Patriarca Francesca, Mordini Nicola, Allione Bernardino, Carnevale-Schianca Fabrizio, Giaccone Luisa, Sorasio Roberto, Omedè Paola, Baldi Ileana, Brighen Sara, Massaia Massimo, Aglietta Massimo, Levis

- Alessandro, Gallamini Andrea, Fanin Renato, Palumbo Antonio, Storb Rainer, Ciccone Giovannino, Boccadoro Mario. A Comparison of Allografting with Autografting for Newly Diagnosed Myeloma. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa065464> [Internet]. 2009 Oct 9 [cited 2022 Jan 23];356(11):1110–20. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa065464>
51. Krishnan Amrita, Pasquini Marcelo C, Logan Brent, Stadtmauer Edward A, Vesole David H, Alyea Edwin, Antin Joseph H, Comenzo Raymond, Goodman Stacey, Hari Parameswaran, Laport Ginna, Qazilbash Muzaffar H, Rowley Scott, Sahebi Firoozeh, Somlo George, Vogl Dan T, Weisdorf Daniel, Ewell Marian, Wu Juan, Geller Nancy L, Horowitz Mary M, Giralt Sergio, Maloney David G. Autologous haemopoietic stem-cell transplantation followed by allogeneic or autologous haemopoietic stem-cell transplantation in patients with multiple myeloma (BMT CTN 0102): a phase 3 biological assignment trial. *Lancet Oncol*. 2011 Dec 1;12(13):1195–203.
 52. Stewart AK, Rajkumar S v, Dimopoulos MA, Masszi T, Spicka I, Oriol A, Hajek R, Rosinol L, Siegel DS, Mihaylov GG, Goranova-Marinova V, Rajnics P, Suvorov A, Niesvizky R, Jakubowiak AJ, San-Miguel JF, Ludwig H, Wang M, Maisnar V, Minarik J, Bensinger WI, Mateos M v, Ben-Yehuda D, Kukreti V, Zojwalla N, Tonda ME, Yang X, Xing B, Moreau P, Palumbo A, Investigators Aspire. Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med* [Internet]. 2014/12/09. 2015;372(2):142–52. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25482145>
 53. M.A. Dimopoulos, D. Dytfeld, S. Grosicki, P. Moreau, N. Takezako, M. Hori, X. Leleu, R. LeBlanc, K. Suzuki, M.S. Raab, P.G. Richardson, M.P. McKiver, Y.-M. Jou, S.G. Shelat, M. Robbins, B. Rafferty, J. San Miguel. Elotuzumab plus Pomalidomide and Dexamethasone for Multiple Myeloma. Vol. 379, *New England Journal of Medicine*. 2018. p. 1811–22.
 54. Lonial S, Dimopoulos M, Palumbo A, White D, Grosicki S, Spicka I, Walter-Croneck A, Moreau P, Mateos M V, Magen H, Belch A, Reece D, Beksac M, Spencer A, Oakervee H, Orlowski RZ, Taniwaki M, Rollig C, Einsele H, Wu KL, Singhal A, San-Miguel J, Matsumoto M, Katz J, Bleickardt E, Poulart V, Anderson KC, Richardson P, Investigators Eloquent. Elotuzumab Therapy for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2015/06/03. 2015;373(7):621–31.

55. Dimopoulos MA, Oriol A, Nahi H, San-Miguel J, Bahlis NJ, Usmani SZ, Rabin N, Orlowski RZ, Komarnicki M, Suzuki K, Plesner T, Yoon SS, Ben Yehuda D, Richardson PG, Goldschmidt H, Reece D, Lisby S, Khokhar NZ, O'Rourke L, Chiu C, Qin X, Guckert M, Ahmadi T, Moreau P, Investigators Pollux. Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2016/10/06. 2016;375(14):1319–31.
56. Dimopoulos Meletios, Quach Hang, Mateos Maria Victoria, Landgren Ola, Leleu Xavier, Siegel David, Weisel Katja, Yang Hui, Klippel Zandra, Zahlten-Kumeli Anita, Usmani Saad Z. Carfilzomib, dexamethasone, and daratumumab versus carfilzomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (CANDOR): results from a randomised, multicentre, open-label, phase 3 study. *The Lancet*. 2020 Jul 18;396(10245):186–97.
57. Palumbo A, Chanan-Khan A, Weisel K, Nooka AK, Masszi T, Beksac M, Spicka I, Hungria V, Munder M, Mateos M V, Mark TM, Qi M, Schechter J, Amin H, Qin X, Deraedt W, Ahmadi T, Spencer A, Sonneveld P, Investigators Castor. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2016/08/25. 2016;375(8):754–66.
58. Chari Ajai, Suvannasankha Attaya, Fay Joseph W, Arnulf Bertrand, Kaufman Jonathan L, Ifthikharuddin Jainulabdeen J, Weiss Brendan M, Krishnan Amrita, Lentzsch Suzanne, Comenzo Raymond, Wang Jianping, Nottage Kerri, Chiu Christopher, Khokhar Nushmia Z, Ahmadi Tahamtan, Lonial Sagar. Daratumumab plus pomalidomide and dexamethasone in relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Blood* [Internet]. 2017 Aug 24 [cited 2022 Jan 23];130(8):974–81. Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/130/8/974/1404974/blood785246.pdf>
59. Attal Michel, Richardson Paul G, Rajkumar S Vincent, San-Miguel Jesus, Beksac Meral, Spicka Ivan, Leleu Xavier, Schjesvold Fredrik, Tache Jason, et al. Isatuximab plus pomalidomide and low-dose dexamethasone versus pomalidomide and low-dose dexamethasone in patients with relapsed and refractory multiple myeloma (ICARIA-MM): a randomised, multicentre, open-label, phase 3 study. *The Lancet*. 2019 Dec 7;394(10214):2096–107.
60. Moreau Philippe, Dimopoulos Meletios Athanasios, Mikhael Joseph, Yong Kwee, Capra Marcelo, Facon Thierry, Hajek Roman, Špička Ivan, Ozkalemkas Fahir, et al. Isatuximab, carfilzomib, and dexamethasone in relapsed multiple myeloma

- (IKEMA): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *The Lancet*. 2021 Jun 19;397(10292):2361–71.
61. Chari Ajai, Vogl Dan T, Gavriatopoulou Maria, Nooka Ajay K, Yee Andrew J, Huff Carol A, Moreau Philippe, Dingli David, Jagannath Sundar, et al. Oral Selinexor–Dexamethasone for Triple-Class Refractory Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2019 Aug 22 [cited 2022 Jan 23];381(8):727–38. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1903455>
 62. San-Miguel Jesús F, Hungria Vânia TM, Yoon Sung Soo, Beksac Meral, Dimopoulos Meletios Athanasios, Elghandour Ashraf, Jedrzejczak Wieslaw Wiktor, Günther Andreas, Nakorn Thanyaphong Na, Siritanaratkul Noppadol, Corradini Paolo, Chuncharunee Suporn, Lee Je Jung, Schlossman Robert L, Shelekhova Tatiana, Yong Kwee, Tan Daryl, Numbenjapon Tontanai, Cavenagh Jamie D, Hou Jian, LeBlanc Richard, Nahi Hareth, Qiu Lugui, Salwender Hans, Pulini Stefano, Moreau Philippe, Warzocha Krzysztof, White Darrell, Bladé Joan, Chen Wen Ming, de la Rubia Javier, Gimsing Peter, Lonial Sagar, Kaufman Jonathan L, Ocio Enrique M, Veskovski Ljupco, Sohn Sang Kyun, Wang Ming Chung, Lee Jae Hoon, Einsele Hermann, Sopala Monika, Corrado Claudia, Bengoudifa Bourras Rezki, Binlich Florence, Richardson Paul G. Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014 Oct 1;15(11):1195–206.
 63. Moreau P, Masszi T, Grzasko N, Bahlis NJ, Hansson M, Pour L, Sandhu I, Ganly P, Baker BW, Jackson SR, Stoppa AM, Simpson DR, Gimsing P, Palumbo A, Garderet L, Cavo M, Kumar S, Touzeau C, Buadi FK, Laubach JP, Berg DT, Lin J, di Bacco A, Hui AM, van de Velde H, Richardson PG, Group Tourmaline Mm Study. Oral ixazomib, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med* [Internet]. 2016/04/28. 2016;374(17):1621–34. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27119237>
 64. Lonial Sagar, Lee Hans C, Badros Ashraf, Trudel Suzanne, Nooka Ajay K, Chari Ajai, Abdallah Al Ola, Callander Natalie, Lendvai Nikoletta, Sborov Douglas, Suvannasankha Attaya, Weisel Katja, Karlin Lionel, Libby Edward, Arnulf Bertrand, Facon Thierry, Hulin Cyrille, Kortüm K Martin, Rodríguez-Otero Paula, Usmani Saad Z, Hari Parameswaran, Baz Rachid, Quach Hang, Moreau Philippe, Voorhees Peter M, Gupta Ira, Hoos Axel, Zhi Eric, Baron January, Piontek Trisha, Lewis

- Eric, Jewell Roxanne C, Dettman Elisha J, Popat Rakesh, Esposti Simona Degli, Opalinska Joanna, Richardson Paul, Cohen Adam D. Belantamab mafodotin for relapsed or refractory multiple myeloma (DREAMM-2): a two-arm, randomised, open-label, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2020 Feb 1;21(2):207–21.
65. Polavarapu Abhigna, Stillabower Jacob A, Stubblefield Skyler GW, Taylor William M, Baik Mu Hyun. The mechanism of guanine alkylation by nitrogen mustards: A computational study. *Journal of Organic Chemistry* [Internet]. 2012 Jul 20 [cited 2022 Feb 6];77(14):5914–21. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jo300351g>
66. Osborne MR, Lawley PD. Alkylation of DNA by melphalan with special reference to adenine derivatives and adenine-guanine cross-linking. *Chem Biol Interact.* 1993 Oct 1;89(1):49–60.
67. Povirk Lawrence F, Shuker David E. DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology.* 1994 Dec 1;318(3):205–26.
68. Rellick SL, Piktel D, Walton C, Hall B, Petros W, Fortney JE, Gencheva M, Denvir J, Hobbs G, Craig M, Gibson LF. Melphalan exposure induces an interleukin-6 deficit in bone marrow stromal cells and osteoblasts. *Cytokine* [Internet]. 2012/02/24. 2012;58(2):245–52. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pub-med/22356805>
69. Bayraktar Ulas D, Bashir Qaiser, Qazilbash Muzaffar, Champlin Richard E, Ciurea Stefan O. Fifty Years of Melphalan Use in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. 2013 [cited 2022 Feb 6]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2012.08.011>
70. Sirohi B, Cunningham David, Powles R, Murphy F, Arkenau T, Norman A, Oates J, Wotherspoon A, Horwich A. Long-term outcome of autologous stem-cell transplantation in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *Annals of Oncology.* 2008 Jul 1;19(7):1312–9.
71. Miller Jeffrey S, Arthur Diane C, Litz Craig E, Neglia Joseph P, Miller Wesley J, Weisdorf Daniel J. Myelodysplastic Syndrome After Autologous Bone Marrow Transplantation: An Additional Late Complication of Curative Cancer Therapy. *Blood.* 1994 Jun 15;83(12):3780–6.
72. Forrest DL, Nevill TJ, Naiman SC, Le A, Brockington DA, Barnett MJ, Lavoie JC, Nantel SH, Song KW, Shepherd JD, Sutherland HJ, Toze CL, Davis JH, Hogge DE.

- Second malignancy following high-dose therapy and autologous stem cell transplantation: incidence and risk factor analysis. *Bone Marrow Transplantation* 2003 32:9 [Internet]. 2003 Oct 16 [cited 2022 Feb 6];32(9):915–23. Available from: <https://www.nature.com/articles/1704243>
73. Govindarajan Rangaswamy, Jagannath Sundar, Flick James T, Vesole David H, Sawyer Jeffrey, Barlogie Bart, Tricot Guido. Preceding standard therapy is the likely cause of MDS after autotransplants for multiple myeloma. *Br J Haematol* [Internet]. 1996 Nov 1 [cited 2022 Feb 6];95(2):349–53. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2141.1996.d01-1891.x>
 74. Mailankody Sham, Pfeiffer Ruth M, Kristinsson Sigurdur Y, Korde Neha, Bjorkholm Magnus, Goldin Lynn R, Turesson Ingemar, Landgren Ola. Risk of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes after multiple myeloma and its precursor disease (MGUS). *Blood*. 2011 Oct 13;118(15):4086–92.
 75. Mahindra Anuj, Raval Girindra, Mehta Paulette, Brazauskas Ruta, Zhang Mei Jie, Zhong Xiaobo, Bird Jennifer M, Freytes César O, Hale Gregory A, Herzig Roger, Holmberg Leona A, Kamble Rammurti T, Kumar Shaji, Lazarus Hillard M, Majhail Navneet S, Marks David I, Moreb Jan S, Olsson Richard, Saber Wael, Savani Bipin N, Schiller Gary J, Tay Jason, Vogl Dan T, Waller Edmund K, Wiernik Peter H, Wirk Baldeep, Lonial Sagar, Krishnan Amrita Y, Dispenzieri Angela, Brandenburg Nancy A, Gale Robert Peter, Hari Parameswaran N. New Cancers after Autotransplantations for Multiple Myeloma. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2015 Apr 1;21(4):738–45.
 76. Rustad Even H, Yellapantula Venkata, Leongamornlert Daniel, Bolli Niccolò, Lerdgor Guy, Nadeu Ferran, Angelopoulos Nicos, Dawson Kevin J, Mitchell Thomas J, Osborne Robert J, Ziccheddu Bachisio, Carniti Cristiana, Montefusco Vittorio, Corradini Paolo, Anderson Kenneth C, Moreau Philippe, Papaemmanuil Elli, Alexandrov Ludmil B, Puente Xose S, Campo Elias, Siebert Reiner, Avet-Loiseau Herve, Landgren Ola, Munshi Nikhil, Campbell Peter J, Maura Francesco. Timing the initiation of multiple myeloma. *Nature Communications* 2020 11:1 [Internet]. 2020 Apr 21 [cited 2022 Feb 6];11(1):1–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-020-15740-9>
 77. Koomen David C, Meads Mark B, Magaletti Dario M, Guingab-Cagmat Joy D, Oliveira Paula S, Fang Bin, Liu Min, Welsh Eric A, Meke Laurel E, Jiang Zhijie, Hampton Oliver A, Tungesvik Alexandre, de Avila Gabriel, Alugubelli Raghunandan

- Reddy, Nishihori Taiga, Silva Ariosto S, Eschrich Steven A, Garrett Timothy J, Koomen John M, Shain Kenneth H. Metabolic Changes Are Associated with Melphalan Resistance in Multiple Myeloma. *J Proteome Res* [Internet]. 2021 Jun 4 [cited 2022 Jan 30];20(6):3134–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34014671/>
78. Zub Kamila Anna, de Sousa Mirta Mittelstedt Leal, Sarno Antonio, Sharma Animesh, Demirovic Aida, Rao Shalini, Young Clifford, Aas Per Arne, Ericsson Ida, Sundan Anders, Jensen Ole Nørregaard, Slupphaug Geir. Modulation of Cell Metabolic Pathways and Oxidative Stress Signaling Contribute to Acquired Melphalan Resistance in Multiple Myeloma Cells. *PLoS One* [Internet]. 2015 Mar 13 [cited 2022 Feb 6];10(3):e0119857. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0119857>
79. Chen Qing, van der Sluis Pieter C, Boulware David, Hazlehurst Lori A, Dalton William S. The FA/BRCA pathway is involved in melphalan-induced DNA interstrand cross-link repair and accounts for melphalan resistance in multiple myeloma cells. *Blood* [Internet]. 2005 Jul 15 [cited 2022 Feb 6];106(2):698–705. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/106/2/698/21349/The-FA-BRCA-pathway-is-involved-in-melphalan>
80. Rees-Unwin Karen S, Craven Rachel A, Davenport Emma, Hanrahan Sarah, Totty Nicholas F, Dring Ann M, Banks Rosamonde E, J.Morgan Gareth, Davies Faith E. Proteomic evaluation of pathways associated with dexamethasone-mediated apoptosis and resistance in multiple myeloma. *Br J Haematol* [Internet]. 2007 Nov 1 [cited 2022 Feb 6];139(4):559–67. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2141.2007.06837.x>
81. Rhen Turk, Cidlowski John A. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. <https://doi.org/10.1056/NEJMra050541> [Internet]. 2005 Oct 20 [cited 2022 Jun 20];353(16):1711–23. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmra050541>
82. de Bosscher Karolien, Berghe Wim vanden, Vermeulen Linda, Plaisance Stéphane, Boone Elke, Haegeman Guy. Glucocorticoids repress NF- κ B-driven genes by disturbing the interaction of p65 with the basal transcription machinery, irrespective of coactivator levels in the cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 2000 Apr 11 [cited 2022 Feb 13];97(8):3919–24. Available from: <https://www.pnas.org/content/97/8/3919>

83. Geiring Ulrich, Mohitt Behzad, Tomkins Gordon M. Glucocorticoid Action on Hybrid Clones Derived from Cultured Myeloma and Lymphoma Cell Lines (steroid-induced killing/dexamethasone/cytoplasmic receptors). 1972;69(11):3124–7.
84. Pollett Jonathan B, Trudel Suzanne, Stern Daniel, Li Zhixiong H, Keith Stewart A. Overexpression of the myeloma-associated oncogene fibroblast growth factor receptor 3 confers dexamethasone resistance. *Blood* [Internet]. 2002 Nov 15 [cited 2022 Feb 13];100(10):3819–21. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/100/10/3819/106332/Overexpression-of-the-myeloma-associated-oncogene>
85. Intini Daniela, Baldini Luca, Fabris Sonia, Lombardi Luigia, Ciceri Gabriella, Maiolo Anna Teresa, Neri Antonino. Analysis of FGFR3 gene mutations in multiple myeloma patients with t(4;14). *Br J Haematol* [Internet]. 2001 Aug 1 [cited 2022 Feb 13];114(2):362–4. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2141.2001.02957.x>
86. Wu Yilan, Wang Han. LncRNA NEAT1 promotes dexamethasone resistance in multiple myeloma by targeting miR-193a/MCL1 pathway. *J Biochem Mol Toxicol* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2022 Feb 6];32(1):e22008. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jbt.22008>
87. Vaidyanathan Govindan, Cismowski Mary J, Wang Guoshun, Vincent Timothy S, Brown Kevin D, Lanier Stephen M. The Ras-related protein AGS1/RASD1 suppresses cell growth. *Oncogene* 2004 23:34 [Internet]. 2004 Jun 7 [cited 2022 Feb 13];23(34):5858–63. Available from: <https://www.nature.com/articles/1207774>
88. Kempainen Robert J, Behrend Ellen N. Dexamethasone Rapidly Induces a Novel Ras Superfamily Member-related Gene in AtT-20 Cells *. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 1998 Feb 6 [cited 2022 Feb 13];273(6):3129–31. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925818937014/fulltext>
89. Nojima Masanori, Maruyama Reo, Yasui Hiroshi, Suzuki Hiromu, Maruyama Yumiko, Tarasawa Isao, Sasaki Yasushi, Asaoku Hideki, Sakai Hajime, Hayashi Toshiaki, Mori Mitsuru, Imai Kohzoh, Tokino Takashi, Ishida Tadao, Toyota Minoru, Shinomura Yasuhisa. Genomic Screening for Genes Silenced by DNA Methylation Revealed an Association between RASD1 Inactivation and Dexamethasone Resistance in Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research* [Internet]. 2009 Jul 1 [cited 2022 Feb 6];15(13):4356–64. Available from: <https://clincancerres.aacrjournals.org/content/15/13/4356>

90. Chauhan Dharminder, Li Guilan, Hideshima Teru, Podar Klaus, Mitsiades Constantine, Mitsiades Nicholas, Catley Laurence, Tai Yu Tzu, Hayashi Toshiaki, Shringarpure Reshma, Burger Renate, Munshi Nikhil, Ohtake Yasuyuki, Saxena Satya, Anderson Kenneth C. Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood* [Internet]. 2003 Nov 1 [cited 2022 Feb 6];102(9):3379–86. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/102/9/3379/17775/Hsp27-inhibits-release-of-mitochondrial-protein>
91. Grigorieva I, Thomas X, Epstein J. The bone marrow stromal environment is a major factor in myeloma cell resistance to dexamethasone. *Exp Hematol* [Internet]. 1998 Jul 1 [cited 2022 Feb 6];26(7):597–603. Available from: <https://europemc.org/article/med/9657134>
92. Miller Marilyn T, Stroömland Kerstin, Stroömland Stroö. Teratogen Update: Thalidomide: A Review, With a Focus on Ocular Findings and New Potential Uses.
93. Eema S, Inghal S, Ayesh J, Ehta M, Aman R, Esikan D, Yers An A, Aula P, Oberson R, Aul P, Ddlemon E, Unshi Ikhil M, Lias E, Naissie A, Ilson Arla W, Adhav M, Hodapkar D, Erome J, Eldis Z, Arlogie Art B. Antitumor Activity of Thalidomide in Refractory Multiple Myeloma. <http://dx.doi.org/101056/NEJM199911183412102> [Internet]. 2008 Oct 21 [cited 2022 Feb 21];341(21):1565–71. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199911183412102>
94. Dimopoulos MA, Chen C, Spencer A, Niesvizky R, Attal M, Stadtmauer EA, Petrucci MT, Yu Z, Olesnyckyj M, Zeldis JB, Knight RD, Weber DM. Long-term follow-up on overall survival from the MM-009 and MM-010 phase III trials of lenalidomide plus dexamethasone in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Leukemia* 2009 23:11 [Internet]. 2009 Jul 23 [cited 2022 Feb 21];23(11):2147–52. Available from: <https://www.nature.com/articles/leu2009147>
95. Holstein Sarah A, Jung Sin Ho, Richardson Paul G, Hofmeister Craig C, Hurd David D, Hassoun Hani, Giralt Sergio, Stadtmauer Edward A, Weisdorf Daniel J, Vij Ravi, Moreb Jan S, Callander Natalie S, van Besien Koen, Gentile Teresa G, Isola Luis, Maziarz Richard T, Bashey Asad, Landau Heather, Martin Thomas, Qazilbash Muzaffar H, Rodriguez Cesar, McClune Brian, Schlossman Robert L, Smith Scott E, Hars Vera, Owzar Kouros, Jiang Chen, Boyd Molly, Schultz Chelsea, Wilson Marcia, Hari Parameswaran, Pasquini Marcelo C, Horowitz Mary M, Shea Thomas C,

- Devine Steven M, Linker Charles, Anderson Kenneth C, McCarthy Philip L. Updated analysis of CALGB (Alliance) 100104 assessing lenalidomide versus placebo maintenance after single autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma: a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Haematol*. 2017 Sep 1;4(9):e431–42.
96. Ito Takumi, Ando Hideki, Suzuki Takayuki, Ogura Toshihiko, Hotta Kentaro, Imamura Yoshimasa, Yamaguchi Yuki, Handa Hiroshi. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science* (1979) [Internet]. 2010 Mar 12 [cited 2022 Feb 21];327(5971):1345–50. Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1177319>
 97. Lu Gang, Middleton Richard E, Sun Huahang, Naniong Mark Vic, Ott Christopher J, Mitsiades Constantine S, Wong Kwok Kin, Bradner James E, Kaelin William G. The myeloma drug lenalidomide promotes the cereblon-dependent destruction of ikaros proteins. *Science* (1979) [Internet]. 2014 Jan 17 [cited 2022 Feb 21];343(6168):305–9. Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1244917>
 98. Krönke Jan, Udeshi Namrata D, Narla Anupama, Grauman Peter, Hurst Slater N, McConkey Marie, Svinkina Tanya, Heckl Dirk, Comer Eamon, Li Xiaoyu, Ciarlo Christie, Hartman Emily, Munshi Nikhil, Schenone Monica, Schreiber Stuart L, Carr Steven A, Ebert Benjamin L. Lenalidomide causes selective degradation of IKZF1 and IKZF3 in multiple myeloma cells. *Science* (1979) [Internet]. 2014 Jan 17 [cited 2022 Jan 30];343(6168):301–5. Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1244851>
 99. Shaffer Arthur L, Emre NC Tolga, Lamy Laurence, Ngo Vu N, Wright George, Xiao Wenming, Powell John, Dave Sandeep, Yu Xin, Zhao Hong, Zeng Yuxin, Chen Bangzheng, Epstein Joshua, Staudt Louis M. IRF4 addiction in multiple myeloma. *Nature* 2008 454:7201 [Internet]. 2008 Jun 22 [cited 2022 Feb 21];454(7201):226–31. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature07064>
 100. Bjorklund CC, Lu L, Kang J, Hagner PR, Havens CG, Amatangelo M, Wang M, Ren Y, Couto S, Breider M, Ning Y, Gandhi AK, Daniel TO, Chopra R, Klippel A, Thakurta AG. Rate of CRL4CRBN substrate Ikaros and Aiolos degradation underlies differential activity of lenalidomide and pomalidomide in multiple myeloma cells by regulation of c-Myc and IRF4. *Blood Cancer Journal* 2015 5:10 [Internet]. 2015

- Oct 2 [cited 2022 Feb 21];5(10):e354–e354. Available from: <https://www.nature.com/articles/bcj201566>
101. Krönke Jan, Knop Stefan, Langer Christian. Prognostic impact of Ikaros expression in lenalidomide-treated multiple myeloma. *Oncotarget*. 2017;8(63):106163–4.
 102. Zhu Yuan Xiao, Braggio Esteban, Shi Chang Xin, Kortuem K Martin, Bruins Laura A, Schmidt Jessica E, Chang Xiu Bao, Langlais Paul, Luo Moulun, Jedlowski Patrick, LaPlant Betsy, Laumann Kristina, Fonseca Rafael, Bergsagel P Leif, Mikhael Joseph, Lacy Martha, Champion Mia D, Stewart A Keith. Identification of cereblon-binding proteins and relationship with response and survival after IMiDs in multiple myeloma. *Blood*. 2014 Jul 24;124(4):536–45.
 103. Georgopoulos Katia, Moore David D, Derfler Bruce. Ikaros, an Early Lymphoid-Specific Transcription Factor and a Putative Mediator for T Cell Commitment. *Science* (1979) [Internet]. 1992 Oct 30 [cited 2022 Feb 21];258(5083):808–12. Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.1439790>
 104. Gandhi Anita K, Kang Jian, Havens Courtney G, Conklin Thomas, Ning Yuhong, Wu Lei, Ito Takumi, Ando Hideki, Waldman Michelle F, Thakurta Anjan, Klippel Anke, Handa Hiroshi, Daniel Thomas O, Schafer Peter H, Chopra Rajesh. Immunomodulatory agents lenalidomide and pomalidomide co-stimulate T cells by inducing degradation of T cell repressors Ikaros and Aiolos via modulation of the E3 ubiquitin ligase complex CRL4CRBN. *Br J Haematol* [Internet]. 2014 Mar 1 [cited 2022 Feb 21];164(6):811–21. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/bjh.12708>
 105. Chang David H, Liu Nancy, Klimek Virginia, Hassoun Hani, Mazumder Amitabha, Nimer Stephen D, Jagannath Sundar, Dhodapkar Madhav v. Enhancement of ligand-dependent activation of human natural killer T cells by lenalidomide: therapeutic implications. *Blood* [Internet]. 2006 Jul 15 [cited 2022 Jun 20];108(2):618–21. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/108/2/618/109857/Enhancement-of-ligand-dependent-activation-of>
 106. Heider Michael, Eichner Ruth, Stroh Jacob, Morath Volker, Kuisl Anna, Zecha Jana, Lawatscheck Jannis, Baek Kheewoong, Garz Anne Kathrin, Rudelius Martina, Deuschle Friedrich Christian, Keller Ulrich, Lemeer Simone, Verbeek Mareike, Götze Katharina S, Skerra Arne, Weber Wolfgang A, Buchner Johannes, Schulman Brenda A, Kuster Bernhard, Fernández-Sáiz Vanesa, Bassermann Florian. The

- IMiD target CRBN determines HSP90 activity toward transmembrane proteins essential in multiple myeloma. *Mol Cell*. 2021 Mar 18;81(6):1170-1186.e10.
107. Eichner Ruth, Heider Michael, Fernández-Sáiz Vanesa, van Bebber Frauke, Garz Anne Kathrin, Lemeer Simone, Rudelius Martina, Targosz Bianca Sabrina, Jacobs Laura, Knorn Anna Maria, Slawska Jolanta, Platzbecker Uwe, Germing Ulrich, Langer Christian, Knop Stefan, Einsele Herrmann, Peschel Christian, Haass Christian, Keller Ulrich, Schmid Bettina, Götze Katharina S, Kuster Bernhard, Bassermann Florian. Immunomodulatory drugs disrupt the cereblon–CD147–MCT1 axis to exert antitumor activity and teratogenicity. *Nature Medicine* 2016 22:7 [Internet]. 2016 Jun 13 [cited 2022 Feb 21];22(7):735–43. Available from: <https://www.nature.com/articles/nm.4128>
 108. Kortüm K Martin, Mai Elias K, Hanafiah Nur H, Shi Chang Xi, Zhu Yuan Xiao, Bruins Laura, Barrio Santiago, Jedlowski Patrick, Merz Maximilian, Xu Jing, Stewart Robert A, Andrulis Mindaugas, Jauch Anna, Hillengass Jens, Goldschmidt Hartmut, Bergsagel P Leif, Braggio Esteban, Stewart A Keith, Raab Marc S. Targeted sequencing of refractory myeloma reveals a high incidence of mutations in CRBN and Ras pathway genes. *Blood* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2022 Feb 21];128(9):1226–33. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/128/9/1226/35773/Targeted-sequencing-of-refractory-myeloma-reveals>
 109. Franssen Laurens E, Nijhof Inger S, Couto Suzana, Levin Mark David, Bos Gerard MJ, Broijl Annemiek, Klein Saskia K, Ren Yan, Wang Maria, Koene Harry R, Bloem Andries C, Beeker Aart, Faber Laura M, van der Spek Ellen, Raymakers Reinier, Leguit Roos J, Sonneveld Pieter, Zweegman Sonja, Lokhorst Henk, Mutis Tuna, Thakurta Anjan, Qian Xiaozhong, van de Donk Niels WCJ. Cereblon loss and up-regulation of c-Myc are associated with lenalidomide resistance in multiple myeloma patients. *Haematologica* [Internet]. 2018 Jul 31 [cited 2022 Feb 21];103(8):e368. Available from: [/pmc/articles/PMC6068039/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30668039/)
 110. Neri Paola, Maity Ranjan, Keats Jonathan J, Tagoug Ines, Simms Justin, Auclair Daniel, Lonial Sagar, Bahlis Nizar J. Cereblon Splicing of Exon 10 Mediates IMiDs Resistance in Multiple Myeloma: Clinical Validation in the CoMMpass Trial. *Blood*. 2016 Jan 1;128(22):120.
 111. Gooding Sarah, Ansari-Pour Naser, Towfic Fadi, Estévez María Ortiz, Chamberlain Philip P, Tsai Kao Tai, Flynt Erin, Hirst Marissa, Rozelle Dan, Dhiman Paula, Neri Paola, Ramasamy Karthik, Bahlis Nizar, Vyas Paresh, Thakurta Anjan. Multiple

- cereblon genetic changes are associated with acquired resistance to lenalidomide or pomalidomide in multiple myeloma. *Blood* [Internet]. 2021 Jan 14 [cited 2022 Feb 13];137(2):232–7. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/137/2/232/461700/Multiple-cereblon-genetic-changes-are-associated>
112. Zhu Yuan Xiao, Shi Chang Xin, Bruins Laura A, Wang Xuewei, Riggs Daniel L, Porter Brooke, Ahmann Jonathan M, de Campos Cecilia Bonolo, Braggio Esteban, Bergsagel P Leif, Stewart A Keith. Identification of lenalidomide resistance pathways in myeloma and targeted resensitization using cereblon replacement, inhibition of STAT3 or targeting of IRF4. *Blood Cancer Journal* 2019 9:2. 2019 Feb 11;9(2):1–12.
 113. Bjorklund Chad C, Ma Wencai, Wang Zhi Qiang, Davis R Eric, Kuhn Deborah J, Kornblau Steven M, Wang Michael, Shah Jatin J, Orlowski Robert Z. Evidence of a role for activation of Wnt/ β -catenin signaling in the resistance of plasma cells to lenalidomide. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 2011 Apr 1 [cited 2022 Feb 21];286(13):11009–20. Available from: <http://www.jbc.org/article/S002192582053723X/fulltext>
 114. Ocio EM, Fernández-Lázaro D, San-Segundo L, López-Corral L, Corchete LA, Gutiérrez NC, Garayoa M, Paíno T, García-Gómez A, Delgado M, Montero JC, Díaz-Rodríguez E, Mateos M v., Pandiella A, Couto S, Wang M, Bjorklund CC, San-Miguel JF. In vivo murine model of acquired resistance in myeloma reveals differential mechanisms for lenalidomide and pomalidomide in combination with dexamethasone. *Leukemia* 2015 29:3 [Internet]. 2014 Aug 8 [cited 2022 Feb 21];29(3):705–14. Available from: <https://www.nature.com/articles/leu2014238>
 115. Ng Yuen Lam Dora, Ramberger Evelyn, Bohl Stephan R, Dolnik Anna, Steinebach Christian, Conrad Theresia, Müller Sina, Popp Oliver, Kull Miriam, Haji Mohamed, Gütschow Michael, Döhner Hartmut, Walther Wolfgang, Keller Ulrich, Bullinger Lars, Mertins Philipp, Krönke Jan. Proteomic profiling reveals CDK6 upregulation as a targetable resistance mechanism for lenalidomide in multiple myeloma. *Nature Communications* 2022 13:1 [Internet]. 2022 Feb 23 [cited 2022 Mar 16];13(1):1–13. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41467-022-28515-1>
 116. Dimopoulos Meletios A, Palumbo Antonio, Corradini Paolo, Cavo Michele, Delforge Michel, di Raimondo Francesco, Weisel Katja C, Oriol Albert, Hansson Markus, Vacca Angelo, Blanchard María Jesús, Goldschmidt Hartmut, Doyen Chantal, Kaiser Martin, Petrini Mario, Anttila Pekka, Cafro Anna Maria, Raymakers Reinier,

- San-Miguel Jesus, de Arriba Felipe, Knop Stefan, Röllig Christoph, Ocio Enrique M, Morgan Gareth, Miller Neil, Simcock Mathew, Peluso Teresa, Herring Jennifer, Sternas Lars, Zaki Mohamed H, Moreau Philippe. Safety and efficacy of pomalidomide plus low-dose dexamethasone in STRATUS (MM-010): a phase 3b study in refractory multiple myeloma. *Blood* [Internet]. 2016 Jul 28 [cited 2022 Feb 21];128(4):497–503. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/128/4/497/35405/Safety-and-efficacy-of-pomalidomide-plus-low-dose>
117. Bjorklund Chad C, Kang Jian, Amatangelo Michael, Polonskaia Ann, Katz Mark, Chiu Hsiling, Couto Suzana, Wang Maria, Ren Yan, Ortiz Maria, Towfic Fadi, Flynt J Erin, Pierceall William, Thakurta Anjan. Iberdomide (CC-220) is a potent cereblon E3 ligase modulator with antitumor and immunostimulatory activities in lenalidomide- and pomalidomide-resistant multiple myeloma cells with dysregulated CRBN. *Leukemia* 2019 34:4 [Internet]. 2019 Nov 12 [cited 2022 Feb 21];34(4):1197–201. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41375-019-0620-8>
 118. Demo Susan D, Kirk Christopher J, Aujay Monette A, Buchholz Tonia J, Dajee Maya, Ho Mark N, Jiang Jing, Laidig Guy J, Lewis Evan R, Parlati Francesco, Shenk Kevin D, Smyth Mark S, Sun Congcong M, Vallone Marcy K, Woo Tina M, Molineaux Christopher J, Bennett Mark K. Antitumor Activity of PR-171, a Novel Irreversible Inhibitor of the Proteasome. *Cancer Res* [Internet]. 2007 Jul 1 [cited 2022 Feb 25];67(13):6383–91. Available from: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/67/13/6383/533240/Antitumor-Activity-of-PR-171-a-Novel-Irreversible>
 119. Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, research J Johnson Cancer, 1999 undefined. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *AACR* [Internet]. [cited 2022 Feb 25]; Available from: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/59/11/2615.short>
 120. Lee Ann Hwee, Iwakoshi Neal N, Anderson Kenneth C, Glimcher Laurie H. Proteasome inhibitors disrupt the unfolded protein response in myeloma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 2003 Aug 19 [cited 2022 Feb 25];100(17):9946–51. Available from: <https://www.pnas.org/content/100/17/9946>
 121. Obeng Esther A, Carlson Louise M, Gutman Delia M, Harrington William J, Lee Kelvin P, Boise Lawrence H. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood* [Internet]. 2006 Jun 15 [cited 2022

- Feb 25];107(12):4907–16. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/107/12/4907/129315/Proteasome-inhibitors-induce-a-terminal-unfolded>
122. Adams Julian. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nature Reviews Cancer* 2004 4:5 [Internet]. 2004 [cited 2022 Feb 25];4(5):349–60. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc1361>
123. Hideshima T, Richardson P, research D Chauhan Cancer, 2001 undefined. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *AACR* [Internet]. [cited 2022 Feb 25]; Available from: <https://cancerres.aacrjournals.org/content/61/7/3071.short>
124. Roccaro Aldo Maria, Hideshima Teru, Raje Noopur, Kumar Shaji, Ishitsuka Kenji, Yasui Hiroshi, Shiraishi Norihiko, Ribatti Domenico, Nico Beatrice, Vacca Angelo, Dammacco Franco, Richardson Paul Gerard, Anderson Kenneth Carl. Bortezomib Mediates Antiangiogenesis in Multiple Myeloma via Direct and Indirect Effects on Endothelial Cells. *Cancer Res* [Internet]. 2006 Jan 1 [cited 2022 Feb 25];66(1):184–91. Available from: <https://aacrjournals.org/cancerres/article/66/1/184/525696/Bortezomib-Mediates-Antiangiogenesis-in-Multiple>
125. Mitsiades Nicholas, Mitsiades Constantine S, Poulaki Vassiliki, Chauhan Dharminder, Fanourakis Galinos, Gu Xuesong, Bailey Charles, Joseph Marie, Libermann Towia A, Treon Steven P, Munshi Nikhil C, Richardson Paul G, Hideshima Teru, Anderson Kenneth C. Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [Internet]. 2002 Oct 29 [cited 2022 Feb 25];99(22):14374–9. Available from: <https://www.pnas.org/content/99/22/14374>
126. Gulla Annamaria, Morelli Eugenio, Samur Mehmet K, Botta Cirino, Hideshima Teru, Bianchi Giada, Fulciniti Mariateresa, Malvestiti Stefano, Prabhala Rao H, Talluri Srikanth, Wen Kenneth, Tai Yu Tzu, Richardson Paul G, Chauhan Dharminder, Sewastianik Tomasz, Carrasco Ruben D, Munshi Nikhil C, Anderson Kenneth C. Bortezomib Induces Anti-Multiple Myeloma Immune Response Mediated by cGAS/STING Pathway Activation. *Blood Cancer Discov.* 2021 Sep;2(5):468.
127. Obeid Michel, Tesniere Antoine, Ghiringhelli François, Fimia Gian Maria, Apetoh Lionel, Perfettini Jean Luc, Castedo Maria, Mignot Grégoire, Panaretakis Theoharis, Casares Noelia, Métivier Didier, Larochette Nathanael, Van Endert Peter, Ciccosanti Fabiola, Piacentini Mauro, Zitvogel Laurence, Kroemer Guido. Calreticulin

- exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med.* 2007 Jan;13(1):54–61.
128. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, Spicka I, Petrucci MT, Palumbo A, Samoilova OS, Dmoszynska A, Abdulkadyrov KM, Schots R, Jiang B, Mateos M V, Anderson KC, Esseltine DL, Liu K, Cakana A, van de Velde H, Richardson PG, Investigators Vista Trial. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2008/08/30. 2008;359(9):906–17.
 129. Li Hui, Roy Mridul, Liang Long, Cao Wenjie, Hu Bin, Li Yanan, Xiao Xiaojuan, Wang Haiqin, Ye Mao, Sun Shuming, Zhang Bin, Liu Jing. Deubiquitylase USP12 induces pro-survival autophagy and bortezomib resistance in multiple myeloma by stabilizing HMGB1. *Oncogene* 2022. 2022 Jan 7;1–11.
 130. Milan Enrico, Fabbri Monica, Cenci Simone. Autophagy in Plasma Cell Ontogeny and Malignancy. *J Clin Immunol.* 2016 May 1;36 Suppl 1:18–24.
 131. Lipchick Brittany C, Utley Adam, Han Zhannan, Moparthy Sudha, Yun Dong Hyun, Bianchi-Smiraglia Anna, Wolff David W, Fink Emily, Liu Liang, Furdui Cristina M, Lee Jingyun, Lee Kelvin P, Nikiforov Mikhail A. The fatty acid elongase ELOVL6 regulates bortezomib resistance in multiple myeloma. *Blood Adv.* 2021 Apr 13;5(7):1933–46.
 132. Xie Hongyi, Gu Yuanliang, Wang Wenjuan, Wang Xuyao, Ye Xiaojuan, Xin Chao, Lu Mengjiao, Reddy B Ashok, Shu Peng. Silencing of SENP2 in Multiple Myeloma Induces Bortezomib Resistance by Activating NF- κ B Through the Modulation of I κ B α Sumoylation. *Sci Rep.* 2020 Dec 1;10(1).
 133. Allmeroth Kira, Horn Moritz, Kroef Virginia, Miethe Stephan, Müller Roman Ulrich, Denzel Martin S. Bortezomib resistance mutations in PSMB5 determine response to second-generation proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Leukemia* 2020 35:3. 2020 Jul 20;35(3):887–92.
 134. Qiang Ya Wei, Ye Shiqiao, Chen Yu, Buros Amy F, Edmonson Ricky, Van Rhee Frits, Barlogie Bart, Epstein Joshua, Morgan Gareth J, Davies Faith E. MAF protein mediates innate resistance to proteasome inhibition therapy in multiple myeloma. *Blood.* 2016 Dec 22;128(25):2919–30.
 135. Peng Siying, Wu Hailong, Mo Yin Yuan, Watabe Kounosuke, Pauza Mary E. c-Maf increases apoptosis in peripheral CD8 cells by transactivating Caspase 6. *Immunology.* 2009 Jun 1;127(2):267–78.

136. Glaría Estibaliz, Valledor Annabel F. Roles of CD38 in the Immune Response to Infection. *Cells* 2020, Vol 9, Page 228. 2020 Jan 16;9(1):228.
137. Weers Michel de, Tai Yu Tzu, Veer Michael S van der, Bakker Joost M, Vink Tom, Jacobs Daniëlle CH, Oomen Lukas A, Peipp Matthias, Valerius Thomas, Sloodstra Jerry W, Mutis Tuna, Bleeker Wim K, Anderson Kenneth C, Lokhorst Henk M, Winkel Jan GJ van de, Parren Paul WHI. Daratumumab, a Novel Therapeutic Human CD38 Monoclonal Antibody, Induces Killing of Multiple Myeloma and Other Hematological Tumors. *The Journal of Immunology*. 2011 Feb 1;186(3):1840–8.
138. Herter Sylvia, Birk Martina C, Klein Christian, Gerdes Christian, Umana Pablo, Bacac Marina. Glycoengineering of Therapeutic Antibodies Enhances Monocyte/Macrophage-Mediated Phagocytosis and Cytotoxicity. *The Journal of Immunology*. 2014 Mar 1;192(5):2252–60.
139. Krejcik J, Casneuf T, Nijhof IS, Verbist B, Bald J, Plesner T, Syed K, Liu K, van de Donk NW, Weiss BM, Ahmadi T, Lokhorst HM, Mutis T, Sasser AK. Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood*. 2016/05/26. 2016;128(3):384–94.
140. Feng Xiaoyan, Zhang Li, Acharya Chirag, An Gang, Wen Kenneth, Qiu Lugui, Munshi Nikhil C, Tai Yu Tzu, Anderson Kenneth C. Targeting CD38 Suppresses Induction and Function of T Regulatory Cells to Mitigate Immunosuppression in Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research*. 2017 Aug 1;23(15):4290–300.
141. Overdijk Marije B, Verploegen Sandra, Bögels Marijn, Van Egmond Marjolein, Lammerms Van Bueren Jeroen J, Mutis Tuna, Groen Richard WJ, Breij Esther, Martens Anton CM, Bleeker Wim K, Parren Paul Whi. Antibody-mediated phagocytosis contributes to the anti-tumor activity of the therapeutic antibody daratumumab in lymphoma and multiple myeloma. *MAbs*. 2015 Mar 13;7(2):311–20.
142. Spencer Andrew, Lentzsch Suzanne, Weisel Katja, Avet-Loiseau Hervé, Mark Tomer M, Spicka Ivan, Masszi Tamas, Lauri Birgitta, Levin Mark David, Bosi Alberto, Hungria Vania, Cavo Michele, Lee Je Jung, Nooka Ajay K, Quach Hang, Lee Cindy, Barreto Wolney, Corradini Paolo, Min Chang Ki, Scott Emma C, Chanan-Khan Asher A, Horvath Noemi, Capra Marcelo, Beksac Meral, Ovilla Roberto, Jo Jae Cheol, Shin Ho Jin, Sonneveld Pieter, Soong David, Casneuf Tineke, Chiu Christopher, Amin Himal, Qi Ming, Thiyagarajah Piruntha, Sasser A Kate, Schechter Jordan M, Mateos Maria Victoria. Daratumumab plus bortezomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone in relapsed or refractory multiple

- myeloma: updated analysis of CASTOR. *Haematologica*. 2018 Nov 30;103(12):2079.
143. Kaufman Jonathan L, Usmani Saad Z, San-Miguel Jesús, Bahlis Nizar, White Darrell J, Benboubker Lotfi, Cook Gordon, Leiba Merav, Ho P Joy, Kim Kihyun, Takezako Naoki, Moreau Philippe, Krevvata Maria, Pei Huiling, Ukropec Jon, Renaud Thomas, Trivedi Sonali, Kobos Rachel, Dimopoulos Meletios A. Four-Year Follow-up of the Phase 3 Pollux Study of Daratumumab Plus Lenalidomide and Dexamethasone (D-Rd) Versus Lenalidomide and Dexamethasone (Rd) Alone in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma (RRMM). *Blood*. 2019 Nov 13;134(Supplement_1):1866.
 144. Pick Marjorie, Vainstein Vladimir, Goldschmidt Neta, Lavie David, Libster Diana, Gural Alexander, Grisariu Sigal, Avni Batia, Ben Yehuda Dina, Gatt Moshe E. Daratumumab resistance is frequent in advanced-stage multiple myeloma patients irrespective of CD38 expression and is related to dismal prognosis. *Eur J Haematol*. 2018 May 1;100(5):494–501.
 145. Giri Smith, Grimshaw Alyssa, Bal Susan, Godby Kelly, Kharel Prakash, Djulbegovic Benjamin, Dimopoulos Meletios A, Facon Thierry, Usmani Saad Z, Mateos María Victoria, Costa Luciano J. Evaluation of Daratumumab for the Treatment of Multiple Myeloma in Patients With High-risk Cytogenetic Factors: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2020 Nov 1;6(11):1759–65.
 146. Mateos Maria Victoria, Nahi Hareth, Legiec Wojciech, Grosicki Sebastian, Vorobyev Vladimir, Spicka Ivan, Hungria Vania, Korenkova Sibirina, Bahlis Nizar, Flogegard Max, Bladé Joan, Moreau Philippe, Kaiser Martin, Iida Shinsuke, Laubach Jacob, Magen Hila, Cavo Michele, Hulin Cyrille, White Darrell, De Stefano Valerio, Clemens Pamela L, Masterson Tara, Lantz Kristen, O'Rourke Lisa, Heuck Christoph, Qin Xiang, Parasrampur A, Yuan Zhilong, Xu Steven, Qi Ming, Usmani Saad Z. Subcutaneous versus intravenous daratumumab in patients with relapsed or refractory multiple myeloma (COLUMBA): a multicentre, open-label, non-inferiority, randomised, phase 3 trial. *Lancet Haematol*. 2020 May 1;7(5):e370–80.
 147. Lammerts van Bueren Jeroen, Jakobs Danielle, Kaldenhoven Niels, Roza Marcel, Hiddingh Sanne, Meesters Joyce, Voorhorst Marleen, Gresnigt Elke, Wiegman Luus, Ortiz Buijsse Antonio, Andringa Grietje, Overdijk Marije B, Doshi Parul, Sasser Kate, de Weers Michel, Parren Paul WHI. Direct in Vitro Comparison of

- Daratumumab with Surrogate Analogs of CD38 Antibodies MOR03087, SAR650984 and Ab79. *Blood*. 2014 Dec 6;124(21):3474–3474.
148. Jiang H, Acharya C, An G, Zhong M, Feng X, Wang L, Dasilva N, Song Z, Yang G, Adrian F, Qiu L, Richardson P, Munshi NC, Tai YT, Anderson KC. SAR650984 directly induces multiple myeloma cell death via lysosomal-associated and apoptotic pathways, which is further enhanced by pomalidomide. *Leukemia* 2016 30:2. 2015 Sep 4;30(2):399–408.
149. Viola Domenico, Dona Ada, Gunes Emine Gulsen, Troadec Estelle, Wu Xiwei, Branciamore Sergio, McDonald Tinisha, Ghoda Lucy, Streatfield Ashish, Sanchez James F, Karanes Chatchada, Htut Myo, Rosenzweig Michael, Keats Jonathan J, Rosen Steven T, Marcucci Guido, Krishnan Amrita, Pichiorri Flavia. Immune Mediated Mechanisms of Resistance to Daratumumab. *Blood*. 2018 Nov 29;132(Supplement 1):3201.
150. Nijhof Inger S, Casneuf Tineke, Van Velzen Jeroen, Van Kessel Berris, Axel Amy E, Syed Khaja, Groen Richard WJ, Van Duin Mark, Sonneveld Pieter, Minnema Monique C, Zweegman Sonja, Chiu Christopher, Bloem Andries C, Mutis Tuna, Lokhorst Henk M, Sasser A Kate, Van De Donk Niels WCJ. CD38 expression and complement inhibitors affect response and resistance to daratumumab therapy in myeloma. *Blood*. 2016 Aug 18;128(7):959–70.
151. Funaro Ada, Primio Roberto Di, Malavasi Fabio, Reinis Milan, Trubiani Oriana, Santi Spartaco. Internalization Step CD38 Functions Are Regulated Through an. 1998;
152. Chillemi Antonella, Quarona Valeria, Zito Andrea, Morandi Fabio, Marimpietri Danilo, Cuccioloni Massimiliano, Robert Oldham J, Mark Cragg S, Bolzoni Marina, Toscani Denise, Pistoia Vito, Giuliani Nicola, Horenstein Alberto L, Sasser Kate, Malavasi Fabio. Generation and Characterization of Microvesicles after Daratumumab Interaction with Myeloma Cells. *Blood*. 2015 Dec 3;126(23):1849–1849.
153. Morandi F, Marimpietri D, Horenstein AL, Bolzoni M, Toscani D, Costa F, Castella B, Faini AC, Massaia M, Pistoia V, Giuliani N, Malavasi F. Microvesicles released from multiple myeloma cells are equipped with ectoenzymes belonging to canonical and non-canonical adenosinergic pathways and produce adenosine from ATP and NAD⁺. <https://doi.org/10.1080/2162402X20181458809>. 2018 Aug 3;7(8).

154. Krejcik Jakub, Frerichs Kris A, Nijhof Inger S, Van Kessel Berris, Van Velzen Jeroen F, Bloem Andries C, Broekmans Marloes EC, Zweegman Sonja, Van Meerloo Johan, Musters Rene JP, Poddighe Pino J, Groen Richard WJ, Chiu Christopher, Plesner Torben, Lokhorst Henk M, Kate Sasser A, Mutis Tuna, Van De Donk Niels WCJ. Monocytes and granulocytes reduce CD38 expression levels on myeloma cells in patients treated with daratumumab. *Clinical Cancer Research*. 2017 Dec 15;23(24):7498–511.
155. Neri Paola, Maity Ranjan. Single Cell Resolution Profiling Defines the Innate and Adaptive Immune Repertoires Modulated By Daratumumab and IMiDs Treatment in Multiple Myeloma (MM). *Blood*. 2017 Dec 8;130:123.
156. van Bommel Peter E, He Yuan, Schepel Ilona, Hendriks Mark AJM, Wiersma Valerie R, van Ginkel Robert J, van Meerten Tom, Ammatuna Emanuele, Huls Gerwin, Samplonius Douwe F, Helfrich Wijnand, Bremer Edwin. CD20-selective inhibition of CD47-SIRP α “don’t eat me” signaling with a bispecific antibody-derivative enhances the anticancer activity of daratumumab, alemtuzumab and obinutuzumab. *Oncoimmunology*. 2018 Feb 1;7(2).
157. Casneuf Tineke, Xu Xu Steven, Adams Homer C, Axel Amy E, Chiu Christopher, Khan Imran, Ahmadi Tahamtan, Yan Xiaoyu, Lonial Sagar, Plesner Torben, Lokhorst Henk M, Van De Donk Niels WCJ, Clemens Pamela L, Kate Sasser A. Effects of daratumumab on natural killer cells and impact on clinical outcomes in relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood Adv*. 2017 Oct 24;1(23):2105–14.
158. de Haart Sanne J, Holthof Lisa, Noort Willy A, Minnema Monique C, Emmelot Maarten E, Aarts-Riemens Tineke, Doshi Parul, Sasser Kate, Yuan Huipin, de Bruijn Joost, Martens Anton CM, van De Donk Niels WCJ, Lokhorst Henk M, Groen Richard WJ, Mutis Tuna. Sepantronium bromide (YM155) improves daratumumab-mediated cellular lysis of multiple myeloma cells by abrogation of bone marrow stromal cell-induced resistance. *Haematologica*. 2016 Aug 1;101(8):e339–42.
159. Hsi Eric D, Steinle Roxanne, Balasa Balaji, Szmania Susann, Draksharapu Aparna, Shum Benny P, Huseni Mahrukh, Powers David, Nanisetti Amulya, Zhang Yin, Rice Audie G, Van Abbema Anne, Wong Melanie, Liu Gao, Zhan Fenghuang, Dillon Myles, Chen Shihao, Rhodes Susan, Fuh Franklin, Tsurushita Naoya, Kumar Shankar, Vexler Vladimir, Shaughnessy John D, Barlogie Bart, Van Rhee Frits,

- Hussein Mohamad, Afar Daniel EH, Williams Marna B. CS1, a Potential New Therapeutic Antibody Target for the Treatment of Multiple Myeloma. *Clinical Cancer Research*. 2008 May 1;14(9):2775–84.
160. Bouchon Axel, Cella Marina, Grierson Helen L, Cohen Jeffrey I, Colonna Marco. Cutting Edge: Activation of NK Cell-Mediated Cytotoxicity by a SAP-Independent Receptor of the CD2 Family. *The Journal of Immunology*. 2001 Nov 15;167(10):5517–21.
161. Kurdi Ahmed T, Glavey Siobhan V., Bezman Natalie A, Jhatakia Amy, Guerriero Jennifer L, Manier Salomon, Moschetta Michele, Mishima Yuji, Roccaro Aldo, Dettappé Alexandre, Liu Chia Jen, Sacco Antonio, Huynh Daisy, Tai Yu Tzu, Robbins Michael D, Azzi Jamil, Ghobrial Irene M. Antibody-dependent cellular phagocytosis by macrophages is a novel mechanism of action of elotuzumab. *Mol Cancer Ther*. 2018 Jul 1;17(7):1454–63.
162. Pazina T, James AM, MacFarlane AW th, Bezman NA, Henning KA, Bee C, Graziano RF, Robbins MD, Cohen AD, Campbell KS. The anti-SLAMF7 antibody elotuzumab mediates NK cell activation through both CD16-dependent and -independent mechanisms. *Oncoimmunology*. 2017/09/22. 2017;6(9):e1339853.
163. Collins Shauna M, Bakan Courtney E, Swartzel Gina D, Hofmeister Craig C, Efebera Yvonne A, Kwon Hakju, Starling Gary C, Ciarlariello David, Bhaskar Shakti, Briercheck Edward L, Hughes Tiffany, Yu Jianhua, Rice Audie, Benson Don M. Elotuzumab directly enhances NK cell cytotoxicity against myeloma via CS1 ligation: Evidence for augmented NK cell function complementing ADCC. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2013 Dec 26;62(12):1841–9.
164. Pazina T, James AM, Colby KB, Yang Y, Gale A, Jhatakia A, Kearney AY, Graziano RF, Bezman NA, Robbins MD, Cohen AD, Campbell KS. Enhanced SLAMF7 Homotypic Interactions by Elotuzumab Improves NK Cell Killing of Multiple Myeloma. *Cancer Immunol Res*. 2019/08/23. 2019;7(10):1633–46.
165. Balasa Balaji, Yun Rui, Belmar Nicole A, Fox Melvin, Chao Debra T, Robbins Michael D, Starling Gary C, Rice Audie G. Elotuzumab enhances natural killer cell activation and myeloma cell killing through interleukin-2 and TNF- α pathways. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2015 Jan 1;64(1):61–73.
166. Van Rhee Frits, Szmania Susann M, Dillon Myles, Van Abbema Anne M, Li Xin, Stone Mary K, Garg Tarun K, Shi Ju Mei, Moreno-Bost Amberly M, Yun Rui, Balasa

- Balaji, Ganguly Bishwa, Chao Debra, Rice Audie G, Zhan Fenghuang, Shaughnessy John D, Barlogie Bart, Yaccoby Shmuel, Afar Daniel EH. Combinatorial efficacy of anti-CS1 monoclonal antibody elotuzumab (HuLuc63) and bortezomib against multiple myeloma. *Mol Cancer Ther.* 2009 Sep 1;8(9):2616–24.
167. Kikuchi Jiro, Hori Mitsuo, Iha Hidekatsu, Toyama-Sorimachi Noriko, Hagiwara Shotaro, Kuroda Yoshiaki, Koyama Daisuke, Izumi Tohru, Yasui Hiroshi, Suzuki Atsushi, Furukawa Yusuke. Soluble SLAMF7 promotes the growth of myeloma cells via homophilic interaction with surface SLAMF7. *Leukemia* 2019 34:1. 2019 Jul 29;34(1):180–95.
168. Tai Yu Tzu, Dillon Myles, Song Weihua, Leiba Merav, Li Xian Feng, Burger Peter, Lee Alfred I, Podar Klaus, Hideshima Teru, Rice Audie G, Van Abbema Anne, Jesaitis Lynne, Caras Ingrid, Law Debbie, Weller Edie, Xie Wanling, Richardson Paul, Munshi Nikhil C, Mathiot Claire, Avet-Loiseau Hervé, Afar Daniel EH, Anderson Kenneth C. Anti-CS1 humanized monoclonal antibody HuLuc63 inhibits myeloma cell adhesion and induces antibody-dependent cellular cytotoxicity in the bone marrow milieu. *Blood.* 2008 Aug 15;112(4):1329–37.
169. Zonder Jeffrey A, Mohrbacher Ann F, Singhal Seema, Van Rhee Frits, Bensinger William I, Ding Han, Fry John, Afar Daniel EH, Singhal Anil K. A phase 1, multicenter, open-label, dose escalation study of elotuzumab in patients with advanced multiple myeloma. *Blood.* 2012 Jul 19;120(3):552–9.
170. Goldschmidt Hartmut, Mai Elias K, Bertsch Uta, Besemer Britta, Haenel Mathias, Miah Kaya, Fenk Roland, Schlenzka Jana, Munder Markus, Dürig Jan, Blau Igor Wolfgang, Huhn Stefanie, Hose Dirk, Jauch Anna, Kunz Christina, Neubauer Andreas, Scheid Christof, Schroers Roland, Metzler Ivana v., Schieferdecker Aneta, Thomalla Joerg, Reimer Peter, Mahlberg Rolf, Graeven Ullrich, Kremers Stephan, Martens Uwe M, Kunz Christian, Hensel Manfred, Seidel-Glaetzer Andrea, Weisel Katja, Raab Marc Steffen, Salwender Hans. Elotuzumab in Combination with Lenalidomide, Bortezomib, Dexamethasone and Autologous Transplantation for Newly-Diagnosed Multiple Myeloma: Results from the Randomized Phase III GMMG-HD6 Trial. *Blood.* 2021 Nov 23;138(Supplement 1):486.
171. Usmani Saad Z, Hoering Antje, Ailawadhi Sikander, Sexton Rachael, Lipe Brea, Hita Sandi Fredette, Valent Jason, Rosenzweig Michael, Zonder Jeffrey A, Dhodapkar Madhav, Callander Natalie, Zimmerman Todd, Voorhees Peter M,

- Durie Brian, Rajkumar S Vincent, Richardson Paul G, Orlowski Robert Z. Bortezomib, lenalidomide, and dexamethasone with or without elotuzumab in patients with untreated, high-risk multiple myeloma (SWOG-1211): primary analysis of a randomised, phase 2 trial. *Lancet Haematol.* 2021 Jan 1;8(1):e45–54.
172. Noyes David, Alsina Melissa, Shain Kenneth H, Baz Rachid, Nishihori Taiga, Ochoa Jose, Song Jinming, Kim Jongphil, Achille Alexandra, Brayer Jason. Immune Profiles of Myeloma Tumor Microenvironment May Predict Sensitivity or Resistance to Elotuzumab. *Blood.* 2021 Nov 23;138(Supplement 1):2682.
173. Wang Huihan, Shi Hua, He Xiaowei, Liao Aijun. Downregulation of Chemokine CCL20 Involved in Myeloma Cells Resistant to Elotuzumab and Lenalidomide. *Onco Targets Ther.* 2021;14:2789.
174. Eifler Karolin, Vertegaal Alfred CO, Eifler Correspondence K, Vertegaal ACO. Mapping the SUMOylated landscape. *FEBS J.* 2015 Oct 1;282(19):3669–80.
175. Geiss-Friedlander Ruth, Melchior Frauke. Concepts in sumoylation: a decade on. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2007 8:12. 2007 Dec;8(12):947–56.
176. Hoellein Alexander, Fallahi Mohammad, Schoeffmann Stephanie, Steidle Sabine, Schaub Franz X, Rudelius Martina, Laitinen Iina, Nilsson Lisa, Goga Andrei, Peschel Christian, Nilsson Jonas A, Cleveland John L, Keller Ulrich. Myc-induced SUMOylation is a therapeutic vulnerability for B-cell lymphoma. *Blood.* 2014;124(13):2081–90.
177. Biederstädt Alexander, Hassan Zonera, Schneeweis Christian, Schick Markus, Schneider Lara, Muckenhuber Alexander, Hong Yingfen, Siegers Gerrit, Nilsson Lisa, Wirth Matthias, Dantes Zahra, Steiger Katja, Schunck Kathrin, Langston Steve, Lenhof HP, Coluccio Andrea, Orben Felix, Slawska Jolanta, Scherger Anna, Saur Dieter, Müller Stefan, Rad Roland, Weichert Wilko, Nilsson Jonas, Reichert Maximilian, Schneider Günter, Keller Ulrich. SUMO pathway inhibition targets an aggressive pancreatic cancer subtype. *Gut.* 2020 Aug 1;69(8):1472–82.
178. Kessler Jessica D, Kahle Kristopher T, Sun Tingting, Meerbrey Kristen L, Schlabach Michael R, Schmitt Earlene M, Skinner Samuel O, Xu Qikai, Li Mamie Z, Hartman Zachary C, Rao Mitchell, Yu Peng, Dominguez-Vidana Rocio, Liang Anthony C, Solimini Nicole L, Bernardi Ronald J, Yu Bing, Hsu Tiffany, Golding Ido, Luo Ji, Osborne C Kent, Creighton Chad J, Hilsenbeck Susan G, Schiff Rachel,

- Shaw Chad A, Elledge Stephen J, Westbrook Thomas F. A SUMOylation-dependent transcriptional subprogram is required for Myc-driven tumorigenesis. *Science* (1979). 2012 Jan 20;335(6066):348–53.
179. Chng WJ, Huang GF, Chung TH, Ng SB, Gonzalez-Paz N, Troska-Price T, Mulligan G, Chesi M, Bergsagel PL, Fonseca R. Clinical and biological implications of MYC activation: a common difference between MGUS and newly diagnosed multiple myeloma. *Leukemia* 2011 25:6. 2011 Apr 5;25(6):1026–35.
 180. Driscoll James J, Pelluru Dheeraj, Lefkimmatis Konstantinos, Fulciniti Mariateresa, Prabhala Rao H, Greipp Philip R, Barlogie Bart, Tai Yu Tzu, Anderson Kenneth C, Shaughnessy John D, Annunziata Christina M, Munshi Nikhil C. The sumoylation pathway is dysregulated in multiple myeloma and is associated with adverse patient outcome. *Blood*. 2010 Apr 8;115(14):2827.
 181. Derksen Patrick WB, Tjin Esther, Meijer Helen P, Klok Melanie D, Mac Gillavry Harold D, Van Oers Marinus HJ, Lokhorst Henk M, Bloem Andries C, Clevers Hans, Nusse Roel, Van Der Neut Ronald, Spaargaren Marcel, Pals Steven T. Illegitimate WNT signaling promotes proliferation of multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 20;101(16):6122.
 182. Huang He Jing, Zhou Li Li, Fu Wei Jun, Zhang Chun Yang, Jiang Hua, Du Juan, Hou Jian. β -catenin SUMOylation is involved in the dysregulated proliferation of myeloma cells. *Am J Cancer Res*. 2015;5(1):309.
 183. Nakamura Akito, Grossman Stephen, Song Keli, Idamakanti Neeraja, Shapiro Gary, Huszar Dennis. Abstract 1523: Inhibition of SUMOylation by TAK-981 induces antitumor innate immune responses by modulating macrophage and NK cell function through Type I IFN pathway activation. *Cancer Res*. 2019 Jul 1;79(13 Supplement):1523–1523.
 184. Khatyar Mithun, Song Keli, Grossman Stephen, Xega Kristina, He Xingyue, Idamakanti Neeraja, Huszar Dennis. Abstract 3252: TAK-981: A first in class SUMO inhibitor in Phase 1 trials that promotes dendritic cell activation, antigen-presentation, and T cell priming. *Cancer Res*. 2019 Jul 1;79(13 Supplement):3252–3252.
 185. Lightcap Eric S, Yu Pengfei, Grossman Stephen, Song Keli, Khatyar Mithun, Xega Kristina, He Xingyue, Gavin James M, Imaichi Hisashi, Garnsey James J, Koenig Erik, Zhang Hongru, Lu Zhen, Shah Pooja, Fu Yu, Milhollen Michael A, Hatton Beryl A, Riceberg Jessica, Shinde Vaishali, Li Cong, Minissale James, Yang Xiaofeng, England Dylan, Klinghoffer Richard A, Langston Steve, Galvin Katherine, Shapiro

- Gary, Pulukuri Sai M, Fuchs Serge Y, Huszar Dennis. A small-molecule SUMOylation inhibitor activates antitumor immune responses and potentiates immune therapies in preclinical models. *Sci Transl Med*. 2021 Sep 15;13(611):7791.
186. Assouline Sarit, Mehta Amitkumar, Phillips Tycel, Alinari Lapo, Danilov Alexey V., Doucet Stéphane, Park Steven I, Berg Deborah, Gomez-Pinillos Alejandro, Martinez Alonzo, Chao Bo, Berger Allison J, Gibbs John, Friedlander Sharon, Ward Christine K, Proscurshim Igor, Cooper Brenda W, Caimi Paolo F. TAK-981, a First-in-Class SUMO-Activating Enzyme Inhibitor, Combined with Rituximab in Adult Patients (Pts) with CD20-Positive Relapsed/Refractory (R/R) Non-Hodgkin Lymphoma (NHL): Phase 1 Data. *Blood*. 2021 Nov 23;138(Supplement 1):2488.
187. Heynen Guus JJE, Baumgartner Francis, Heider Michael, Patra Upayan, Holz Maximilian, Braune Jan, Kaiser Melanie, Schäffer Isabell, Bamopoulos Stefanos A, Ramberger Evelyn, Murgai Arunima, Ng Yuen Lam Dora, Demel Uta Margareta, Laue Dominik, Liebig Sven, Krüger Josefine, Janz Martin, Nogai Axel, Schick Markus, Mertins Philipp, Müller Stefan, Bassermann Florian, Krönke Jan, Keller Ulrich, Wirth Matthias. SUMOylation inhibition overcomes proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. *Blood Adv*. 2022 Aug 3;
188. Barlogie Bart, Mitchell Alan, van Rhee Frits, Epstein Joshua, Morgan Gareth J, Crowley John. Curing myeloma at last: defining criteria and providing the evidence. *Blood* [Internet]. 2014 Nov 13 [cited 2022 Jan 30];124(20):3043–51. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/124/20/3043/33254/Curing-myeloma-at-last-defining-criteria-and>
189. Hashim Laila, Faisal Muhammad Salman, Ahmed Zahoor, Selene Insija Ilyas, Shahzad Moazzam, Abdullah Syed Maaz, Samhoury Yazan, Yasir Muhammad, Wahab Ahsan, Ehsan Hamid, Neupane Karun, Anwer Faiz, Fazal Salman. Efficacy of Venetoclax Based Regimens in Relapsed Refractory Multiple Myeloma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Blood*. 2020 Nov 5;136(Supplement 1):39–40.
190. Touzeau C, Dousset C, Le Gouill S, Sampath D, Levenson JD, Souers AJ, Maïga S, Béné MC, Moreau P, Pellat-Deceunynck C, Amiot M. The Bcl-2 specific BH3 mimetic ABT-199: a promising targeted therapy for t(11;14) multiple myeloma. *Leukemia* 2014 28:1. 2013 Jul 17;28(1):210–2.
191. Raab Marc S, Giesen Nicola, Scheid Christof, Besemer Britta, Miah Kaya, Benner Axel, Metzler Ivana, Khandanpour Cyrus, Seidel-Glaetzer Andrea, Trautmann-Grill

- Karolin, Mechttersheimer Gunhild, Goeppert Benjamin, Stenzinger Albrecht, Goldschmidt Hartmut, Weisel Katja, Chatterjee Manik. Safety and Preliminary Efficacy Results from a Phase II Study Evaluating Combined BRAF and MEK Inhibition in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma (rrMM) Patients with Activating BRAF V600E Mutations: The GMMG-Birma Trial. *Blood*. 2020 Nov 5;136(Supplement 1):44–5.
192. Laganà Alessandro, Beno Itai, Melnekoff David, Leshchenko Violetta, Madduri Deepu, Ramdas Dennis, Sanchez Larysa, Niglio Scot, Perumal Deepak, Kidd Brian A, Miotto Riccardo, Shaknovich Rita, Chari Ajai, Cho Hearn Jay, Barlogie Bart, Jagannath Sundar, Dudley Joel T, Parekh Samir. Precision Medicine for Relapsed Multiple Myeloma on the Basis of an Integrative Multiomics Approach. *JCO Precis Oncol*. 2018 Aug 8;2018(2):1–17.
193. Avet-Loiseau Hervé, Leleu Xavier, Roussel Murielle, Moreau Philippe, Guerin-Charbonnel Catherine, Caillot Denis, Marit Gérard, Benboubker Lotfi, Voillat Laurent, Mathiot Claire, Kolb Brigitte, Macro Margaret, Campion Loïc, Wetterwald Marc, Stoppa Anne Marie, Hulin Cyrille, Facon Thierry, Attal Michel, Minvielle Stéphane, Harousseau Jean Luc. Bortezomib Plus Dexamethasone Induction Improves Outcome of Patients With t(4;14) Myeloma but Not Outcome of Patients With del(17p). *J Clin Oncol*. 2010;28:4630–4.
194. Leyboldt Lisa B, Besemer Britta, Asemissen Anne Marie, Hänel Mathias, Blau Igor Wolfgang, Görner Martin, Ko Yon Dschun, Reinhardt Hans Christian, Staib Peter, Mann Christoph, Lutz Raphael, Munder Markus, Graeven Ullrich, Peceny Rudolf, Salwender Hans, Jauch Anna, Zago Manola, Benner Axel, Tichy Diana, Bokemeyer Carsten, Goldschmidt Hartmut, Weisel Katja C. Isatuximab, carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone (Isa-KRd) in front-line treatment of high-risk multiple myeloma: interim analysis of the GMMG-CONCEPT trial. *Leukemia* 2021. 2021 Nov 3;1–4.
195. Kaiser Martin, Hall Andrew, Walker Katrina, Tute Ruth De, Roberts Sadie, Ingleson Emma, Bowles Kristian, Garg Mamta, Lokare Anand, Messiou Christina, Jackson Graham, Pratt Guy, Cook Gordon, Drayson Mark, Owen Roger, Brown Sarah, Jenner Matthew. OAB-012: Depth of response and MRD in newly diagnosed ultra high-risk myeloma and plasma cell leukemia treated with Dara-CVRd and V-MEL ASCT: results of the molecularly stratified UK OPTIMUM/MUKnine trial. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2021 Oct 1;21:S8.

196. Martinez-Lopez Joaquin, Alonso Rafael, Wong Sandy W, Rios Rafael, Shah Nina, Ruiz-Heredia Yanira, Sanchez-Pina Jose Maria, Sanchez Ricardo, Bahri Natasha, Zamanillo Irene, Poza Maria, Buenache Natalia, Encinas Cristina, Juarez Luis, Miras Fatima, Collado Luis, Barrio Santiago, Martin Thomas, Cedena Maria Teresa, Wolf Jeffrey. Making clinical decisions based on measurable residual disease improves the outcome in multiple myeloma. *J Hematol Oncol*. 2021 Dec 1;14(1):1–4.
197. Bhutani Manisha, Zhang Qing, Friend Reed, Voorhees Peter M, Druhan Lawrence J, Barlogie Bart, Sonneveld Pieter, Morgan Gareth J, Symanowski James T, Avalos Belinda R, Copelan Edward A, Usmani Saad Z. Investigation of a gene signature to predict response to immunomodulatory derivatives for patients with multiple myeloma: an exploratory, retrospective study using microarray datasets from prospective clinical trials. *Lancet Haematol*. 2017 Sep 1;4(9):e443–51.
198. Terragna Carolina, Renzulli Matteo, Remondini Daniel, Tagliafico Enrico, Di Raimondo Francesco, Patriarca Francesca, Martinelli Giovanni, Roncaglia Enrica, Masini Luciano, Tosi Patrizia, Zamagni Elena, Tacchetti Paola, Ledda Antonio, Brioli Annamaria, Angelucci Emanuele, Testoni Nicoletta, Marzocchi Giulia, Galieni Piero, Gozzetti Alessandro, Martello Marina, Dico Flores, Mancuso Katia, Cavo Michele. Correlation between eight-gene expression profiling and response to therapy of newly diagnosed multiple myeloma patients treated with thalidomide-dexamethasone incorporated into double autologous transplantation. *Ann Hematol*. 2013 Sep 10;92(9):1271–80.
199. Mitra AK, Harding T, Mukherjee UK, Jang JS, Li Y, HongZheng R, Jen J, Sonneveld P, Kumar S, Kuehl WM, Rajkumar V, Van Ness B. A gene expression signature distinguishes innate response and resistance to proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2017 Jun 30;7(6):e581.
200. Jung Seung Hyun, Lee Sung Eun, Lee Minho, Kim So Hee, Yim Seon Hee, Kim Tae Woo, Min Chang Ki, Chung Yeun Jun. Circulating microRNA expressions can predict the outcome of lenalidomide plus low-dose dexamethasone treatment in patients with refractory/relapsed multiple myeloma. *Haematologica*. 2017 Nov 1;102(11):e456–9.
201. Zhang Li, Pan Ling, Xiang Bing, Zhu Huanling, Wu Yu, Chen Meng, Guan Pujun, Zou Xingli, Valencia C Alexander, Dong Biao, Li Jianjun, Xie Liping, Ma Hongbing, Wang Fangfang, Dong Tian, Shuai Xiao, Niu Ting, Liu Ting, Zhang Li, Pan Ling,

- Xiang Bing, Zhu Huanling, Wu Yu, Chen Meng, Guan Pujun, Zou Xingli, Valencia C Alexander, Dong Biao, Li Jianjun, Xie Liping, Ma Hongbing, Wang Fangfang, Dong Tian, Shuai Xiao, Niu Ting, Liu Ting. Potential role of exosome-associated microRNA panels and in vivo environment to predict drug resistance for patients with multiple myeloma. *Oncotarget*. 2016 Apr 26;7(21):30876–91.
202. Ting Kay Reen, Henry Michael, Meiller Justine, Larkin Annemarie, Clynes Martin, Meleady Paula, Bazou Despina, Dowling Paul, O’Gorman Peter. Novel panel of protein biomarkers to predict response to bortezomib-containing induction regimens in multiple myeloma patients. *BBA Clin*. 2017 Dec 1;8:28–34.
203. Hsieh Frank Y, Tengstrand Elizabeth, Pekol Teresa M, Guercioli Roberto, Miwa Gerald. Elucidation of potential bortezomib response markers in multiple myeloma patients. *J Pharm Biomed Anal*. 2009 Jan 15;49(1):115–22.
204. Broyl Annemiek, Kuiper Rowan, Van Duin Mark, Van Der Holt Bronno, El Jarari Laila, Bertsch Uta, Zweegman Sonja, Buijs Arjan, Hose Dirk, Lokhorst Henk M, Goldschmidt Hartmut, Sonneveld Pieter. High cereblon expression is associated with better survival in patients with newly diagnosed multiple myeloma treated with thalidomide maintenance. *Blood*. 2013 Jan 24;121(4):624–7.
205. Vivier Eric, Tomasello Elena, Baratin Myriam, Walzer Thierry, Ugolini Sophie. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008 May;9(5):503–10.
206. Pazina Tatiana, Macfarlane Alexander W, Bernabei Luca, Dulaimi Essel, Kotcher Rebecca, Yam Clinton, Bezman Natalie A, Robbins Michael D, Ross Eric A, Campbell Kerry S, Cohen Adam D. Alterations of NK Cell Phenotype in the Disease Course of Multiple Myeloma. *Cancers* 2021, Vol 13, Page 226. 2021 Jan 10;13(2):226.
207. Pieper M, Scheffold C, Duwe S, Rossig C, Bisping G, Stelljes M, Tedder TF, Jurgens H, Kienast J. Impaired activating receptor expression pattern in natural killer cells from patients with multiple myeloma. *Leukemia* 2006 20:4. 2006 Jan 26;20(4):732–3.
208. Carbone Ennio, Neri Paola, Mesuraca Maria, Fulciniti Mariateresa T, Otsuki Takemi, Pende Daniela, Groh Veronika, Spies Thomas, Pollio Giuditta, Cosman David, Catalano Lucio, Tassone Pierfrancesco, Rotoli Bruno, Venuta Salvatore. HLA class I, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells. *Blood*. 2005 Jan 1;105(1):251–8.

209. Shi Jumei, Tricot Guido J, Garg Tarun K, Malaviarachchi Priyangi A, Szmania Susann M, Kellum Rachel E, Storrie Brian, Mulder Arend, Shaughnessy John D, Barlogie Bart, Van Rhee Frits. Bortezomib down-regulates the cell-surface expression of HLA class I and enhances natural killer cell-mediated lysis of myeloma. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1309–17.
210. Benson Don M, Bakan Courtney E, Mishra Anjali, Hofmeister Craig C, Efebera Yvonne, Becknell Brian, Baiocchi Robert A, Zhang Jianying, Yu Jianhua, Smith Megan K, Greenfield Carli N, Porcu Pierluigi, Devine Steven M, Rotem-Yehudar Rinat, Lozanski Gerard, Byrd John C, Caligiuri Michael A. The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood*. 2010 Sep 30;116(13):2286–94.
211. Smith-Garvin Jennifer E, Koretzky Gary A, Jordan Martha S. T Cell Activation. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:591.
212. Miguel JF San, González M, Gascón A, Moro J, Hernández JM, Ortega F, Jiménez R, Guerras L, Romero M, Casanova F, Sanz MA, Sanchez J, Portero and JA, Orfao A. Lymphoid subsets and prognostic factors in multiple myeloma. Cooperative Group for the Study of Monoclonal Gammopathies. *Br J Haematol*. 1992;80(3):305–9.
213. Beyer Marc, Kochanek Matthias, Giese Thomas, Endl Elmar, Weihrauch Martin R, Knolle Percy A, Classen Sabine, Schultze Joachim L. In vivo peripheral expansion of naive CD4+CD25high FoxP3+ regulatory T cells in patients with multiple myeloma. *Blood*. 2006 May 15;107(10):3940–9.
214. Ray A, Das DS, Song Y, Richardson P, Munshi NC, Chauhan D, Anderson KC. Targeting PD1–PDL1 immune checkpoint in plasmacytoid dendritic cell interactions with T cells, natural killer cells and multiple myeloma cells. *Leukemia* 2015 29:6. 2015 Jan 30;29(6):1441–4.
215. Cook Gordon, Campbell John DM, Carr Christine E, Boyd Kelly S, Franklin Ian M. Transforming growth factor β from multiple myeloma cells inhibits proliferation and IL-2 responsiveness in T lymphocytes. *J Leukoc Biol*. 1999 Dec 1;66(6):981–8.
216. Bianco Paolo, Riminucci Mara, Gronthos Stan, Robey Pamela Gehron. Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications. *Stem Cells*. 2001 May 1;19(3):180–92.

217. Bharti Rashmi, Dey Goutam, Mandal Mahitosh. Cancer development, chemoresistance, epithelial to mesenchymal transition and stem cells: A snapshot of IL-6 mediated involvement. *Cancer Lett.* 2016 May 28;375(1):51–61.
218. Berenstein R, Nogai A, Waechter M, Blau O, Kuehnel A, Schmidt-Hieber M, Kunitz A, Pezzutto A, Dorken B, Blau IW. Multiple myeloma cells modify VEGF/IL-6 levels and osteogenic potential of bone marrow stromal cells via Notch/miR-223. *Mol Carcinog.* 2016/03/30. 2016;55(12):1927–39.
219. de Jong Madelon ME, Kellermayer Zoltán, Papazian Natalie, Tahri Sabrin, Hofste op Bruinink Davine, Hoogenboezem Remco, Sanders Mathijs A, van de Woestijne Pieter C, Bos P Koen, Khandanpour Cyrus, Vermeulen Jessica, Moreau Philippe, van Duin Mark, Broijl Annemiek, Sonneveld Pieter, Cupedo Tom. The multiple myeloma microenvironment is defined by an inflammatory stromal cell landscape. *Nature Immunology* 2021 22:6. 2021 May 20;22(6):769–80.
220. De Haart Sanne J, Van De Donk Niels WCJ, Minnema Monique C, Huang Julie H, Aarts-Riemens Tineke, Bovenschen Niels, Yuan Huipin, Groen Richard WJ, McMillin Douglas W, Jakubikova Jana, Lokhorst Henk M, Martens Anton C, Mitsiades Constantine S, Mutis Tuna. Accessory cells of the microenvironment protect multiple myeloma from T-cell cytotoxicity through cell adhesion-mediated immune resistance. *Clinical Cancer Research.* 2013 Oct 15;19(20):5591–601.
221. Wang Y, Wu X, Hu Y. Multiple Myeloma Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Inhibit CD8+ T Cell Function in a Process that May Implicate Fibroblast Activation Protein alpha. *Iran J Immunol.* 2019/12/31. 2019;16(4):278–90.
222. Tamura H, Ishibashi M, Yamashita T, Tanosaki S, Okuyama N, Kondo A, Hyodo H, Shinya E, Takahashi H, Dong H, Tamada K, Chen L, Dan K, Ogata K. Marrow stromal cells induce B7-H1 expression on myeloma cells, generating aggressive characteristics in multiple myeloma. *Leukemia* 2013 27:2. 2012 Jul 25;27(2):464–72.
223. Görgün Güllü, Samur Mehmet K, Cowens Kristen B, Paula Steven, Bianchi Giada, Anderson Julie E, White Randie E, Singh Ahaana, Ohguchi Hiroto, Suzuki Rikio, Kikuchi Shohei, Harada Takeshi, Hideshima Teru, Tai Yu Tzu, Laubach Jacob P, Raje Noopur, Magrangeas Florence, Minvielle Stephane, Avet-Loiseau Herve, Munshi Nikhil C, Dorfman David M, Richardson Paul G, Anderson Kenneth C. Lenalidomide enhances immune checkpoint blockade-induced immune response in multiple myeloma. *Clinical Cancer Research.* 2015 Oct 15;21(20):4617–8.

224. Landowski TH, Olashaw NE, Agrawal D, Dalton WS. Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) is associated with activation of NF-kappa B (RelB/p50) in myeloma cells. *Oncogene*. 2003/04/30. 2003;22(16):2417–21.
225. Wang Xudong, Li Chang, Ju Shaoqing, Wang Yueguo, Wang Huimin, Zhong Renqian. Leukemia & Lymphoma Myeloma cell adhesion to bone marrow stromal cells confers drug resistance by microRNA-21 up-regulation Myeloma cell adhesion to bone marrow stromal cells confers drug resistance by microRNA-21 up-regulation. 2011;
226. Matula Zsolt, Mikala Gábor, Lukácsi Szilvia, Matkó János, Kovács Tamás, Monostori Éva, Uher Ferenc, Vályi-Nagy István. Stromal cells serve drug resistance for multiple myeloma via mitochondrial transfer: A study on primary myeloma and stromal cells. *Cancers (Basel)*. 2021 Jul 2;13(14):3461.
227. Rocchi Laura, Faenza Andrea, Rambelli Laura, Guadagnuolo Viviana, Marconi Giovanni, Simonetti Giorgia, Papayannidis Cristina, Padella Antonella, Pecorari Nicola, Giulianelli Luca, Biscarini Dario, Martinelli Giovanni, Guerrieri Roberto, Bocchi Massimo. Ex-Vivo Drug Response Profiling for Precision Medicine Approaches in Acute Myeloid Leukemia with the Open Microwell Microfluidic Platform. *Blood*. 2016 Jan 1;128(22):1675.
228. Rocchi Laura, Faenza Andrea, Guadagnuolo Viviana, Rambelli Laura, Marconi Giovanni, Fontana Maria Chiara, Pazzaglia Martina, Papayannidis Cristina, Simonetti Giorgia, Pecorari Nicola, Giulianelli Luca, Biscarini Dario, Bettelli Marco, Federici Michele, Ruggiano Rita, Martinelli Giovanni, Guerrieri Roberto, Bocchi Massimo. Abstract 3613: Lab-on-a-chip-based in-vitro functional profiling proves to be effective in predicting therapy outcome in AML patients. *Cancer Res [Internet]*. 2018 Jul 1 [cited 2022 Jan 5];78(13 Supplement):3613–3613. Available from: https://cancerres.aacrjournals.org/content/78/13_Supplement/3613
229. Bettelli Alice, Ruggiano Rita, Bocchi Silvia, Rocchi Laura, Faenza Andrea, Borsi Enrica, Terragna Carolina, Zamagni Elena, Martello Marina, Bettelli Marco, Rambelli Laura, Guadagnuolo Viviana, Pecorari Nicola, Giulianelli Luca, Pisani Matteo, Biscarini Dario, Cavo Michele, Guerrieri Roberto, Bocchi Massimo. Inter-Cell Networking Profiling Enables Comprehensive Characterization of Immune-Mediated Activity of Anti-CD38 Therapy through Ex-Vivo Analysis of Multiple Myeloma Patients. *Blood [Internet]*. 2019;134(Supplement_1):3372. Available from: <https://doi.org/10.1182/blood-2019-126894>

230. Walker ZJ, VanWyngarden MJ, Stevens BM, Abbott D, Hammes A, Langouet-Astrie C, Smith CA, Palmer BE, Forsberg PA, Mark TM, Jordan CT, Sherbenou DW. Measurement of ex vivo resistance to proteasome inhibitors, IMiDs, and daratumumab during multiple myeloma progression. *Blood Adv* [Internet]. 2020/04/21. 2020;4(8):1628–39. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32311014>
231. Giliberto Mariaserena, Raj Deepak B Thimiri Govinda, Cremaschi Andrea, Skånland Sigrid S, Gade Alexandra, Tjønnfjord Geir E, Schjesvold Fredrik, Munthe Ludvig A, Taskén Kjetil. Ex vivo drug sensitivity screening in multiple myeloma identifies drug combinations that act synergistically. *Mol Oncol*. 2022 Mar 1;16(6):1241–58.
232. Bonolo de Campos Cecilia, Meurice Nathalie, Petit Joachim L, Polito Alysia N, Zhu Yuan Xiao, Wang Panwen, Bruins Laura A, Wang Xuewei, Lopez Armenta Ilsen D, Darvish Susie A, Ahmann Greg J, Henderson Kimberly J, Tian Shulan, Kruse Jonas J, Stewart William M, Larsen Jeremy T, Reeder Craig B, Dingli David, Kapoor Prashant, Kumar Shaji K, Fonseca Rafael, Bergsagel P Leif, Braggio Esteban, Stewart A Keith. “Direct to Drug” screening as a precision medicine tool in multiple myeloma. *Blood Cancer Journal* 2020 10:5. 2020 May 11;10(5):1–16.
233. Majumder Muntasir Mamun, Silvennoinen Raija, Anttila Pekka, Tamborero David, Eldfors Samuli, Yadav Bhagwan, Karjalainen Riikka, Kuusanmäki Heikki, Lievonen Juha, Parsons Alun, Suvela Minna, Jantunen Esa, Porkka Kimmo, Heckman Caroline A. Identification of precision treatment strategies for relapsed/refractory multiple myeloma by functional drug sensitivity testing. *Oncotarget*. 2017;8(34):56338–50.
234. Pak Chorom, Callander Natalie S, Young Edmond WK, Titz Benjamin, Kim Kyung Mann, Saha Sandeep, Chng Kenny, Asimakopoulos Fotis, Beebe David J, Miyamoto Shigeki. MicroC3: an ex vivo microfluidic cis-coculture assay to test chemosensitivity and resistance of patient multiple myeloma cells. *Integrative Biology* [Internet]. 2015 Jun 8 [cited 2022 Feb 23];7(6):643–54. Available from: <https://academic.oup.com/ib/article/7/6/643/5199031>
235. Silva Ariosto, Silva Maria C, Sudalagunta Praneeth, Distler Allison, Jacobson Timothy, Collins Aunshka, Nguyen Tuan, Song Jinming, Chen Dung Tsa, Chen Lu, Cubitt Christopher, Baz Rachid, Perez Lia, Rebatchouk Dmitri, Dalton William, Greene James, Gatenby Robert, Gillies Robert, Sontag Eduardo, Meads Mark B,

- Shain Kenneth H. An ex vivo platform for the prediction of clinical response in multiple myeloma. *Cancer Res.* 2017 Jun 15;77(12):3336–51.
236. Neri S, Mariani E, Meneghetti A, Cattini L, Facchini A. Calcein-acetyoxymethyl cytotoxicity assay: standardization of a method allowing additional analyses on recovered effector cells and supernatants. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2001;8(6):1131–5.
237. Somanchi SS, McCulley KJ, Somanchi A, Chan LL, Lee DA. A Novel Method for Assessment of Natural Killer Cell Cytotoxicity Using Image Cytometry. *PLoS One.* 2015/10/23. 2015;10(10):e0141074.
238. Dai Xianping, Li Mengshun, Geng Feng. Omega-3 polyunsaturated fatty acids eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid enhance dexamethasone sensitivity in multiple myeloma cells by the p53/miR-34a/Bcl-2 axis. *Biochemistry (Moscow)* 2017 82:7. 2017 Jul 23;82(7):826–33.
239. Waldschmidt Johannes M, Fruttiger Stefan J, Wider Dagmar, Jung Johannes, Thomsen Andreas R, Hartmann Tanja N, Duyster Justus, Hug Martin J, Azab Kareem A, Jung Manfred, Wäsch Ralph, Engelhardt Monika. Ex vivo propagation in a novel 3D high-throughput co-culture system for multiple myeloma. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2022 May 1;148(5):1045–55.
240. Jonsson B, Liminga G, Csoka K, Fridborg H, Dhar S, Nygren P, Larsson R. Cytotoxic activity of calcein acetoxymethyl ester (Calcein/AM) on primary cultures of human haematological and solid tumours. *Eur J Cancer.* 1996/05/01. 1996;32A(5):883–7.
241. Liminga G, Nygren P, Dhar S, Nilsson K, Larsson R. Cytotoxic effect of calcein acetoxymethyl ester on human tumor cell lines: drug delivery by intracellular trapping. *Anticancer Drugs.* 1995/08/01. 1995;6(4):578–85.
242. Liminga Gunnar, Jonsson Bertil, Nygren Peter, Larsson Rolf. On the mechanism underlying calcein-induced cytotoxicity. *Eur J Pharmacol.* 1999 Nov 3;383(3):321–9.
243. Kawano Yawara, Fujiwara Shiho, Wada Naoko, Izaki Mikiko, Yuki Hiromichi, Okuno Yutaka, Iyama Kenichi, Yamasaki Hiroshi, Sakai Akira, Mitsuya Hiroaki, Hata Hiroyuki. Multiple myeloma cells expressing low levels of CD138 have an immature phenotype and reduced sensitivity to lenalidomide. *Int J Oncol.* 2012 Sep 1;41(3):876–84.
244. Wu Dong, Zhang Peihua, Li Fangmei, Shen Ying, Chen Hongli, Feng Yuandong, He Aili, Wang Fangxia. CD138- multiple myeloma cells express high level of CHK1

- which correlated to overall survival in MM patient. *Aging* (Albany NY). 2020 Nov 11;12(22):23067.
245. Akhmetzyanova Ilseyar, McCarron Mark J, Parekh Samir, Chesi Marta, Bergsagel P Leif, Fooksman David R. Dynamic CD138 surface expression regulates switch between myeloma growth and dissemination. *Leukemia* 2019 34:1. 2019 Aug 22;34(1):245–56.
246. Jourdan Michel, Ferlin Martine, Legouffe Eric, Horvathova Mira, Liautard Janny, Rossi Jean François, Wijdenes John, Brochier Jean, Klein Bernard. The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. *Br J Haematol*. 1998 Mar 1;100(4):637–46.
247. Pojero F, Flores-Montero J, Sanoja L, Perez JJ, Puig N, Paiva B, Bottcher S, van Dongen JJ, Orfao A, EuroFlow group. Utility of CD54, CD229, and CD319 for the identification of plasma cells in patients with clonal plasma cell diseases. *Cytometry B Clin Cytom*. 2015/07/02. 2016;90(1):91–100.
248. Soh Kah Teong, Tario Joseph D, Hahn Theresa, Hillengass Jens, McCarthy Philip L, Wallace Paul K. CD319 (SLAMF7) an alternative marker for detecting plasma cells in the presence of daratumumab or elotuzumab. *Cytometry B Clin Cytom*. 2021 Jul 1;100(4):497–508.
249. Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, Puig N, García-Sánchez O, Böttcher S, Van Der Velden VHJ, Pérez-Morán JJ, Vidriales MB, García-Sanz R, Jimenez C, González M, Martínez-López J, Corral-Mateos A, Grigore GE, Fluxá R, Pontes R, Caetano J, Sedek L, Del Cañizo MC, Bladé J, Lahuerta JJ, Aguilar C, Báez A, García-Mateo A, Labrador J, Leoz P, Aguilera-Sanz C, San-Miguel J, Mateos M V., Durie B, Van Dongen JJM, Orfao A. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia* 2017 31:10. 2017 Jan 20;31(10):2094–103.
250. Bohl Stephan R, Schmalbrock Laura K, Bauhuf Imke, Meyer Tatjana, Dolnik Anna, Szyska Martin, Blätte Tamara J, Knödler Sarah, Röhner Linda, Miller Denise, Kull Miriam, Langer Christian, Döhner Hartmut, Letai Anthony, Damm Frederik, Heckl Dirk, Bullinger Lars, Krönke Jan. Comprehensive CRISPR-Cas9 screens identify genetic determinants of drug responsiveness in multiple myeloma. *Blood Adv* [Internet]. 2021 May 11 [cited 2022 Jan 16];5(9):2391–402. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33950175/>

251. Álvarez-Viejo María, Menéndez-Menéndez Yolanda, Otero-Hernández Jesús. CD271 as a marker to identify mesenchymal stem cells from diverse sources before culture. *World J Stem Cells*. 2015 Mar 3;7(2):470.
252. Ahmed Nausheen, Ghannoum Mahmoud, Gallogly Molly, de Lima Marcos, Malek Ehsan. Influence of gut microbiome on multiple myeloma: friend or foe? *J Immunother Cancer*. 2020 Jun 1;8(1):576.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Josefine Krüger, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Etablierung einer Mikrowell-Technologie zur Testung der Suszeptibilität von Myelomzellen auf Therapeutika sowie auf die Abhängigkeit von Zell-Zell-Interaktionen“ / „Establishment of a microwell-based technology for testing the susceptibility of myeloma cells to therapeutics and their dependence on cell-cell-interaction“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

1. Krüger J. , Blau I.-W. , Blau O. , Keller U. , Bettelli A. , Rocchi L. , Bocchi M. , Nogai A. *Establishment of a fluorescence microscopy based microwell technology (CellPly) for in vitro testing of drug response of myeloma cells.* Freier Vortrag (V421) auf der Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie (DGHO 2021), 1.-4. Oktober 2021, Berlin, Deutschland
2. Heynen Guus JJE, Baumgartner Francis, Heider Michael, Patra Upayan, Holz Maximilian, Braune Jan, Kaiser Melanie, Schäffer Isabell, Bamopoulos Stefanos A, Ramberger Evelyn, Murgai Arunima, Ng Yuen Lam Dora, Demel Uta Margareta, Laue Dominik, Liebig Sven, Krüger Josefine, Janz Martin, Nogai Axel, Schick Markus, Mertins Philipp, Müller Stefan, Bassermann Florian, Krönke Jan, Keller Ulrich, Wirth Matthias. SUMOylation inhibition overcomes proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. *Blood Adv.* 2022 Aug 3;

Danksagung

Ich möchte an folgender Stelle all den Menschen danken, ohne deren Unterstützung das Erstellen der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen wäre:

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Igor Wolfgang Blau, Herrn Dr. med. Axel Nogai und Frau Dr. med. Olga Blau für die Überlassung des interessanten Themas, das entgegengebrachte Vertrauen und die fachliche Beratung. Die zahlreichen Anregungen, konstruktive Ideen und die engagierte Betreuung haben wesentlich zum Erstellen dieser Arbeit beigetragen.

Ein großes Dankeschön gilt auch der gesamten AG Blau für die außerordentliche Hilfsbereitschaft und freundliche Arbeitsatmosphäre, die die Durchführung der vorliegenden Arbeit sehr erleichtert haben.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. med. Axel Nogai für die Organisation und Bereitstellung der Knochenmarksproben bedanken, sowie für die Begutachtung und konstruktive Kritik der schriftlichen Arbeit.

Mein Dank gilt zudem den Kollegen von CellPly s.r.l., insbesondere Laura Rocchi, Alice Bettelli und Massimo Bocchi für die gute Zusammenarbeit, die Einarbeitung in die Methodik und die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Experimente. Die regelmäßige Beratung über die Optimierung der Methodik hat die Arbeit sehr bereichert.

Ich bedanke mich bei der Berliner Krebsgesellschaft e.V. für die finanzielle Unterstützung des Projektes.

Zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Mutter und Tsvetelina Yocheva bedanken, die mir durch deren stetige moralische Unterstützung und Motivation beim Fertigstellen dieser Arbeit immer zur Seite standen.

Bescheinigung Statistik



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE)

Direktor: Prof. Dr. Frank Konietzschke

Postanschrift:
Charitéplatz 1 | 10117 Berlin
Besucheranschrift:
Reinhardtstr. 58 | 10117 Berlin

Tel. +49 (0)30 450 562171
frank.konietzschke@charite.de
<https://biometrie.charite.de/>



Name, Vorname: Krüger, Josefine

Emailadresse: josefine.krueger@charite.de

Matrikelnummer: 221848

PromotionsbetreuerIn: Prof. Igor Wolfgang Blau

Promotionsinstitution / Klinik: Hämatologie, Onkologie und
Tumorimmunologie CBF

Bescheinigung

Hiermit bescheinige ich, dass *Frau Josefine Krüger* innerhalb der Service Unit Biometrie des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE) bei mir eine statistische Beratung zu einem Promotionsvorhaben wahrgenommen hat. Folgende Beratungstermine wurden wahrgenommen:

- *Termin 1: 17.11.2021*

Folgende wesentliche Ratschläge hinsichtlich einer sinnvollen Auswertung und Interpretation der Daten wurden während der Beratung erteilt:

- Nichtparametrische Methoden

Diese Bescheinigung garantiert nicht die richtige Umsetzung der in der Beratung gemachten Vorschläge, die korrekte Durchführung der empfohlenen statistischen Verfahren und die richtige Darstellung und Interpretation der Ergebnisse. Die Verantwortung hierfür obliegt allein dem Promovierenden. Das Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie übernimmt hierfür keine Haftung.

Datum: _____ Name des Beraters/ der Beraterin: Erin Sprünken

Unterschrift BeraterIn, Institutsstempel