
Aus der Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie,
Campus Charité Mitte der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Zirkulierende RANK-Ligand-Konzentrationen beim multiplen Myelom

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Andrea Goerke

aus Koblenz

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. O. Sezer

2. Prof. Dr. med. H. Riess

3. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. R. Manz

Datum der Promotion: 30.01.2009

Inhaltsverzeichnis

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. Einleitung | 6 |
| 1.1 Multiples Myelom..... | 6 |
| 1.2 Klassifikation | 6 |
| 1.3 Therapie | 8 |
| 1.4 Knochenstoffwechsel beim multiplen Myelom..... | 8 |
| 1.5 Bisphosphonate | 10 |
| 1.6 Neue Parameter zur frühzeitigen Erfassung von Knochenumbauprozessen | 11 |
| 1.7 OPG/RANKL System | 12 |
| 1.8 Messung von OPG/RANKL bei Patienten | 14 |
| 1.8.1 OPG..... | 14 |
| 1.8.2 sRANKL (soluble RANKL) | 14 |
| 1.8.3 tRANKL (total RANKL)..... | 15 |
| 1.9 Aktuelle Fragestellung..... | 15 |
| 2. Patienten und Methoden | 17 |
| 2.1 Patienten | 17 |
| 2.2 Immunoassay | 19 |
| 2.2.1 Probenvorbereitung | 19 |
| 2.2.2 Verdünnungsreihe..... | 19 |
| 2.2.3 Konjugation mit Fängerantikörper und OPG | 20 |
| 2.2.4 Inkubation mit Detektionsantikörper..... | 20 |
| 2.2.5 Substratkonjugation | 20 |
| 2.2.6 Spektrophotometrische Detektion | 20 |
| 2.3 Statistik..... | 21 |
| 2.3.1 Deskriptive Statistik..... | 21 |
| 2.3.2 Stadienvergleiche | 22 |
| 2.3.3 Longitudinale Vergleiche (vor und nach Therapie)..... | 22 |
| 2.3.4 Univariate Überlebensanalyse | 22 |
| 2.3.5 Multivariate Überlebensanalyse..... | 23 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3. Ergebnisse | 24 |
| 3.1 Patientencharakteristika | 24 |
| 3.1.1 Altersverteilung | 24 |
| 3.1.2 Zusätzliche krankheitsrelevante Parameter mit prognostischer Bedeutung... 24 | |
| 3.1.3 Serum tRANKL-Werte..... | 25 |
| 3.2 Vergleich der Serum tRANKL-Konzentrationen zwischen verschiedenen Krankheitsstadien | 26 |
| 3.2.1 MM-Patienten versus Kontrollgruppe..... | 26 |
| 3.2.2 MGUS versus MM und MGUS versus MM Stadium I (Durie und Salmon) | 27 |
| 3.2.3 MM Patienten im Stadium I versus Stadium II versus Stadium III..... | 28 |
| 3.2.4 Symptomatisches MM versus „smoldering“ MM | 29 |
| 3.2.5 ISS Stadium I versus Stadium II versus Stadium III..... | 30 |
| 3.2.6 Patienten mit Osteolysen versus Patienten ohne Osteolysen..... | 31 |
| 3.3 Longitudinale Vergleiche vor versus nach Chemo- und Bisphosphonattherapie.... | 32 |
| 3.3.1 Patienten vor und nach Chemo- und Bisphosphonattherapie | 33 |
| 3.3.2 Abfall von Serum tRANKL und Ansprechen auf die Therapie | 33 |
| 3.4 Korrelation von tRANKL mit prognostischen Faktoren beim MM | 34 |
| 3.5 Prognostische Bedeutung | 35 |
| 3.5.1 Univariate Überlebensanalyse | 35 |
| 3.5.2 Multivariate Überlebensanalyse..... | 39 |
| 4. Diskussion | 41 |
| 4.1 Zelluläre Interaktionen im Knochenmarkmikromilieu beim multiplen Myelom | 41 |
| 4.2 Rolle der Osteoklasten | 41 |
| 4.3 Marker der osteolytischen Knochendestruktion..... | 42 |
| 4.4 RANKL/OPG-Verhältnis bei verschiedenen Erkrankungen | 44 |
| 4.5 RANKL beim multiplen Myelom..... | 45 |
| 4.6 Messung von RANKL im Serum..... | 45 |
| 5. Zusammenfassung und Ausblick | 50 |
| 6. Abkürzungen | 51 |

| | |
|--------------------------------------------|----|
| 7. Literatur | 52 |
| 8. Danksagung | 64 |
| 9. Lebenslauf | 65 |
| 10. Eidesstattliche Erklärung | 66 |

1. Einleitung:

1.1 Multiples Myelom

Das multiple Myelom (MM) ist eine maligne B-Zell-Neoplasie, die auf einer klonalen Proliferation von Plasmazellen im Knochenmark beruht. Mit einer Häufigkeit von vier Neuerkrankungen pro Jahr auf 100.000 Einwohner stellt das MM die zweithäufigste maligne hämatologische Erkrankung dar. Die klonale Plasmazellvermehrung führt zur Bildung monoklonaler Immunglobuline der Klassen IgG, IgA, IgD beziehungsweise der Leichtketten kappa oder lambda, die sich als Serum- oder Urinparaprotein (Bence-Jones-Myelom) mittels Elektrophorese oder Immunfixation detektieren lassen. Beim nicht-sekretorischen MM findet sich lediglich eine Plasmazellvermehrung, jedoch ohne messbare Paraproteinsekretion. Die malignen Plasmazellen breiten sich im Knochenmark aus und verursachen Symptome durch die Verdrängung der Hämatopoese, die Bildung von Paraproteinen sowie durch die Interaktion mit Zellen des Knochenmarkmikromilieus, insbesondere durch die Aktivierung von Osteoklasten, was zur verstärkten Knochenresorption und zur Bildung von osteolytischen Läsionen führt. Der osteolytischen Knochendestruktion kommt bei der Erkrankung eine besondere Bedeutung zu. Über 80% der Patienten weisen bereits bei Diagnosestellung Osteolysen auf (Kyle et al. 2003). Im weiteren Verlauf der Erkrankung entwickeln nahezu alle Patienten Skelettmanifestationen. Das multiple Myelom führt damit häufiger zu ossären Läsionen als andere maligne Erkrankungen. Bevorzugt betroffen sind die Knochen, die blutbildendes Knochenmark enthalten, wie Brust- und Lendenwirbel, Schädel, Rippen, Schultergürtel, Becken sowie proximale Bereiche der Extremitäten. Die Knochenbeteiligung trägt wesentlich zur Beeinträchtigung der Lebensqualität der Patienten bei.

1.2 Klassifikation

Zur Einschätzung der Prognose und Festlegung der Behandlungsindikation des multiplen Myeloms wurden verschiedene Klassifikationssysteme entwickelt, von denen die Klassifikation nach Durie und Salmon (Durie, Salmon 1975) noch am weitesten verbreitet zur Anwendung kommt.

Die von uns hauptsächlich verwendete Einteilung wurde im Jahre 2003 von der International Myeloma Working Group (IMWG, International Myeloma Working Group 2003, Tabelle 1) publiziert und unterscheidet ein symptomatisches MM, das behandlungsbedürftig ist, das nicht behandlungsbedürftige „smoldering“ MM sowie die monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS).

Tabelle 1: Klassifikation der International Myeloma Working Group

| Bezeichnung | Kriterien |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| MGUS | M-Protein im Serum < 30 g/l Klonale Plasmazellen im Knochenmark < 10% Kein Gammopathie-assoziiertes Endorganschaden |
| „Smoldering“ MM | M-Protein im Serum \geq 30 g/l Klonale Plasmazellen im Knochenmark \geq 10% Kein Myelom-assoziiertes Endorganschaden |
| Symptomatisches MM | M-Protein im Serum und/oder Urin Klonale Plasmazellen im Knochenmark > 90% Plasmazellen mit aberrantem Phänotyp (Durchflusszytometrie) Myelom-assoziiertes Endorganschaden |

Diese Klassifikation führt als wesentliches Kriterium den myelombedingten Endorganschaden, das heißt Anämie, Niereninsuffizienz, Hyperkalzämie oder Osteolysen ein und leitet daraus eine Therapieindikation ab. Die bisherigen Klassifikationen ermöglichen zwar die Differenzierung zwischen asymptomatischen und symptomatischen Patienten, vernachlässigen jedoch neuere prognostisch relevante Parameter, die bereits im Frühstadium der Erkrankung erkennbar sein können, die für das Risikoprofil des Patienten eine Rolle spielen.

Die ISS-Klassifikation (International Staging System, Greipp et al. 2005, Tabelle 2) stellt für Patienten mit einem behandlungsbedürftigen Myelom eine prognostische Stratifikation dar, die auf den prognostisch relevanten Faktoren β 2-Mikroglobulin und Albumin basiert.

Die frühzeitige Berücksichtigung des myelombedingten Endorganschadens sowie neuer Prognosefaktoren stellt ein wesentliches Kriterium in der modernen, risikoadaptierten Therapie des MM dar.

Tabelle 2: Klassifikation gemäß International Staging System (ISS)

| ISS-Stadium | Kriterien |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| I | β 2-Mikroglobulin < 3,5 mg/l und Albumin > 3,5 g/dl |
| II | β 2-Mikroglobulin-Wert < 3,5 mg/l und Albumin < 3,5 g/dl oder β 2-Mikroglobulin 3,5- 5,5 mg/l |
| III | β 2-Mikroglobulin-Wert > 5,5 mg/l |

1.3 Therapie

Da es sich beim multiplen Myelom um eine mit bisherigen, konventionellen Therapien unheilbare Erkrankung handelt, ist die Behandlung im Wesentlichen auf eine Verlängerung des Überlebens und eine Verbesserung der Lebensqualität gerichtet. Während asymptotische Patienten keine systemische Chemotherapie erhalten, da sie prognostisch davon nicht profitieren (Hjorth et al. 1993), sind Patienten mit myelombedingten Endorganschäden behandlungsbedürftig.

Sofern keine Kontraindikation vorliegt, erhalten Patienten unter 60 Jahren eine Hochdosischemotherapie (HDCT) mit autologer Stammzelltransplantation, nachdem gezeigt werden konnte, dass dadurch das Überleben gegenüber der konventionellen Chemotherapie signifikant verlängert wird (Attal et al. 1996, Barlogie et al. 1999). Für Patienten, bei denen eine HDCT nicht in Frage kommt, gilt Melphalan und Prednison (MP) noch als Standardtherapie (Alexanian et al. 1969). Neuere Substanzen, wie Proteasominhibitoren oder IMiDs (immunomodulatory drugs, immunmodulierende Substanzen) wurden bereits in den letzten Jahren in die Therapie eingeführt. Patienten mit Osteolysen werden zur Prävention von skelettalen Komplikationen begleitend mit Bisphosphonaten behandelt. Bei Knochendestruktionen, die Beschwerden verursachen, kann eine strahlentherapeutische oder chirurgische Intervention erwogen werden.

1.4 Knochenstoffwechsel beim multiplen Myelom

Die Knochendestruktion stellt eines der wichtigsten Charakteristika des multiplen Myeloms dar. Als mögliche Folge des gesteigerten Knochenabbaus kann es zu skelettalen Komplikationen, wie zum Beispiel pathologischen Frakturen, Spinalkompression oder Hyperkalzämie kommen. Skelettale Ereignisse treten bei mehr als der Hälfte der Myelompatienten auf.

Der osteolytischen Knochendestruktion liegt ein Ungleichgewicht zwischen der Osteoklasten- und der Osteoblastenaktivität im Knochenmark zugrunde. Die Untersuchung der Interaktionen zwischen Myelomzellen, Knochenzellen und Stromazellen des Knochenmarkmikromilieus hat in den letzten Jahren wesentlich zum Verständnis der Biologie des MM beigetragen und bildet derzeit einen Schwerpunkt der Myelomforschung. Die Interaktion von Myelomzellen mit den Zellen des Knochenmarkmikromilieus wird durch verschiedene lösliche Faktoren über parakrine oder autokrine Sekretionsmechanismen vermittelt. Verschiedene Zytokine, wie IL-3, IL-6 und IL-11 können zwar die Knochenresorption stimulieren (Lee et al. 2004, Kurihara et al. 1990, Ahlen et al. 2002), da sie jedoch keine Korrelation zur Schwere der Knochendestruktion oder zu anderen Parametern der Knochenresorptionsaktivität zeigen, stehen sie pathophysiologisch nicht im Vordergrund. Zu den wichtigsten Osteoklasten-aktivierenden Faktoren (OAF) beim multiplen Myelom gehören drei Gruppen von Mediatoren: Der Receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL), die Chemokine makrophage inflammatory protein (MIP)-1 α und MIP-1 β und stromal derived factor-1 α (SDF-1 α). Dem Receptor activator of nuclear factor κ B (RANK), seinem Liganden RANKL und dessen Gegenspieler Osteoprotegerin (OPG) kommt dabei eine Schlüsselfunktion zu. Sowohl die Osteoklasten als auch aus der Knochenmatrix freigesetzte Faktoren begünstigen ihrerseits das Wachstum der Myelomzellen, so dass eine Art Circulus vitiosus entsteht.

Wie histomorphologische Daten gezeigt haben, kann der pathologische Knochenabbau bereits Jahre vor der radiologischen Nachweisbarkeit von Osteolysen einsetzen (Bataille et al. 1990). Der „Goldstandard“ zum Nachweis von Osteolysen ist die röntgenologische Untersuchung des Skeletts. Die Magnetresonanztomographie (MRT) stellt eine ergänzende Routineuntersuchung dar, da sie das sensitivere Nachweisverfahren für die Darstellung der Knochenbinnenstrukturen und des Knochenmarks ist und pathologische Veränderungen bereits aufzeigen kann, wenn die Röntgenuntersuchung noch unauffällig ist (Dimopoulos et al. 2000, Mariette et al. 1999).

1.5 Bisphosphonate

Bisphosphonate sind potente Inhibitoren der Osteoklasten-vermittelten Knochenresorption und werden daher zur Behandlung von Knochenmetastasen eingesetzt (Fleisch 2002). Aufgrund ihrer hohen Affinität zum Kalziumphosphat lagern sie sich bevorzugt an der Knochenoberfläche an. Bisphosphonate dienen der Prävention von skelettalen Komplikationen (Laakso et al. 1994, McCloskey et al. 1998, Berenson et al. 1996, Berenson et al. 1998, Rosen et al. 2001, Rosen et al. 2003) und sind derzeit gemäß internationaler Leitlinien, zum Beispiel Guidelines der American Society of Oncology (ASCO), beim multiplen Myelom bei Vorliegen einer Osteolyse oder bei diffuser Osteopenie empfohlen (Berenson et al. 2002, Kyle et al. 2007).

Die eigentliche Wirkung der Bisphosphonate beruht in vivo vor allem auf der Hemmung der Osteoklastenrekrutierung und -aktivität (Clohisi et al. 2001, Sato et al. 1991, Rogers et al. 2002, Flanagan et al. 1991). Darüber hinaus hemmen sie die Anlagerung der Osteoklasten an die Knochenmatrix, führen zu einer Apoptose (Hughes et al. 1995, Selander et al. 1996) und können die Produktion von Zytokinen beeinflussen (Sauty et al. 1996).

Ferner gibt es Hinweise aus präklinischen Daten auf antitumoröse Effekte dieser Substanzen, wie zum Beispiel die Hemmung der Proliferation von Myelomzellen, die Induktion einer Apoptose (Derenne et al. 1999, Aparicio et al. 1998, Sezer et al. 2003b), die Hemmung der Angiogenese (Wood et al. 2002), die Reduktion der Myelommasse und eine geringere Ausbildung von Osteolysen unter Zoledronat (Yacoby et al. 2002, Croucher et al. 2003, Sezer et al. 2003b).

Von besonderem Interesse sind darüber hinaus präklinische Daten, die einen positiven Einfluss des Bisphosphonates Zoledronat auf das Ungleichgewicht zwischen RANKL- und OPG zeigten (Pan et al. 2004). Durch eine frühzeitige Hemmung der Osteoklastenaktivität könnte so möglicherweise die Entstehung und Progression der Knochenläsionen des multiplen Myeloms gehemmt werden (Yacoby et al. 2002, Croucher et al. 2003, Sezer et al. 2003b).

Die Bisphosphonattherapie mit Zoledronat oder Pamidronat beim MM ist derzeit für die Behandlung von Patienten mit nachgewiesener Knochenbeteiligung zugelassen und wird von diesem Zeitpunkt an lebenslänglich in vierwöchentlichen Abständen durchgeführt. Ob eine frühzeitige Bisphosphonattherapie für Patienten im Stadium I nach Durie und Salmon

von Nutzen ist, wird derzeit in einer randomisierten Studie an unserem Zentrum geprüft. Bislang sind keine Parameter verfügbar, mit deren Hilfe ein Monitoring der Bisphosphonattherapie möglich ist oder die Hinweise für eine Therapiepause oder Dosisreduktion liefern (Kyle et al. 2007). Dies wäre zur Einschätzung der Effektivität einer Bisphosphonattherapie, wie auch zur Vermeidung potentieller Nebenwirkungen dieser Behandlung, hilfreich.

1.6 Neue Parameter zur frühzeitigen Erfassung von Knochenumbauprozessen

Aufgrund der Tatsache, dass die Knochendestruktion beim multiplen Myelom einerseits der radiologischen Nachweisbarkeit vorausgeht und sich dieser teilweise entzieht, andererseits für den Patienten jedoch von großer klinischer und prognostischer Relevanz ist, kommt einer frühzeitigeren Detektion des Knochenabbaus eine außerordentliche Bedeutung zu. Da das Ausmaß der Knochenresorption nicht unmittelbar mit anderen Kriterien der Krankheitsaktivität, wie zum Beispiel den Paraproteinspiegeln korreliert ist, gilt das Interesse insbesondere den biochemischen Parametern der Knochenresorption.

Neben den mineralisierten Anteilen besteht das Knochengewebe zu 25% aus organischen Bestandteilen, die als Osteoid bezeichnet und von den Osteoblasten gebildet werden. Neben Glykoproteinen enthält die organische Knochenmatrix zu 90-95% Kollagen. Im Knochengewebe findet sich fast ausschließlich Kollagen Typ I, das als fibrilläres Kollagen die Struktur einer Triplehelix besitzt und aus drei α -helikalen Proteinketten besteht. Beim Metabolismus von Typ I Kollagen werden als Zeichen der osteolytischen Aktivität neben dem relativ unspezifischen Hydroxyprolin auch spezifische Abbauprodukte der Kollagen-Quervernetzung, so genannte Crosslinks, sowie amino- und carboxyterminale Telopeptide freigesetzt.

Zur Messung von Kollagenabbauprodukten stehen verschiedene kommerziell erhältliche Immunoassays zur Verfügung. Für die c-terminalen Degradationsprodukte carboxyterminales Kollagen Typ I (CTX), carboxyterminales Typ I Kollagen Telopeptid (ICTP) und für die n-terminalen Degradationsprodukte aminotermiales Kollagen Typ I (NTx) sowie für die Brückenproteine Desoxypyridinolin (DPD)-crosslinks konnte bereits eine Korrelation mit dem Ausmaß der radiologisch detektierbaren Knochendestruktion gezeigt werden (Eriksen et al. 1993, Abildgaard et al. 1997, Corso et al. 2001, Abildgaard

et al. 2000). ICTP zeigte darüber hinaus signifikante, stadienspezifische Unterschiede sowie eine prognostische Relevanz beim multiplen Myelom (Fonseca et al. 2000, Jakob et al. 2002). Für ICTP konnte ferner gezeigt werden, dass bei Myelompatienten, bei denen konventionell radiologisch keine Osteolysen nachweisbar waren, eine Korrelation mit pathologischen Veränderungen im MRT bestand (Jakob et al. 2003).

Während die Messung von Kollagenabbauprodukten einen Endpunkt in der Knochenresorption erfasst, könnte die Messung von Faktoren, die die Osteoklasten- oder Osteoblastenaktivität modulieren, möglicherweise zusätzliche Informationen über einen früheren Schritt der gesteigerten osteolytischen Aktivität liefern. Neue Parameter, die die momentane Knochenstoffwechselaktivität widerspiegeln, könnten daher von besonderer Bedeutung für die Beurteilung der myelombedingten Knochendestruktion und für die Therapieentscheidung sein.

1.7 OPG/RANKL System

Im pathologischen Knochenstoffwechsel nimmt das RANK/RANKL/OPG System eine zentrale Rolle ein. RANKL konnte in jüngster Zeit als ein wesentlicher Osteoklastenaktivierender Faktor identifiziert werden. RANKL, der wie RANK und OPG zur Tumor necrosis factor (TNF)-Superfamilie gehört, wird hauptsächlich von Osteoblasten und Knochenmarkstromazellen, aber auch von T-Zellen (Kong et al. 1999b), glatten Muskelzellen der Koronararterien (Hofbauer et al. 2001) und auf Endothelzellen (Collin-Osdoby et al. 2001, Ishida et al. 2002) exprimiert und liegt in einer membranständigen oder einer löslichen Form vor. RANKL bindet an den RANK-Rezeptor auf Osteoklastenvorläuferzellen und Osteoklasten und fördert dadurch neben der Proliferation und Differenzierung der Vorläuferzellen auch die Aktivierung und das Überleben der reifen Osteoklasten (Lacey et al. 1998). Diese Wirkung wird von OPG, das in erster Linie von Osteoblasten gebildet wird, antagonisiert, indem OPG an RANKL bindet und es neutralisiert (Simonet et al. 1997) und damit die Osteoklastenreifung hemmt (Abbildung 1). Unter normalen Umständen gewährleistet die balancierte Expression von RANKL/OPG den Erhalt und kontinuierlichen Umbau der Knochenmasse.

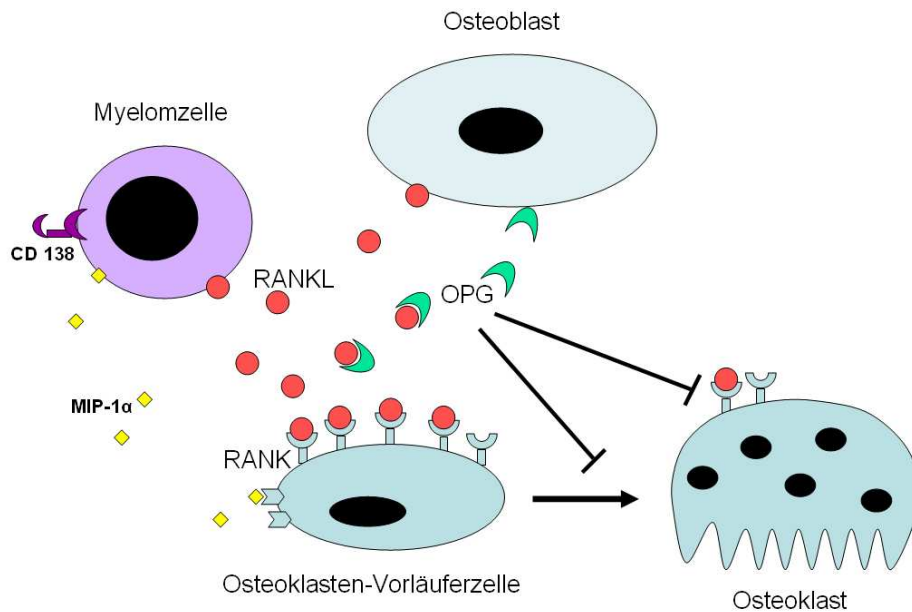


Abbildung 1: Interaktion von Myelomzelle, Osteoklasten-Vorläuferzelle, Osteoklast und Osteoblast via RANK, RANKL, OPG und MIP-1 α .

Im Tiermodell ließ sich an RANKL-Knockout-Mäusen zeigen, dass eine Imbalance zu Gunsten von OPG zu einer schweren Osteopetrose (Kong et al. 1999a) führt. Bei OPG-defizienten Mäusen hingegen kommt es zu einer ausgeprägten Osteopenie (Bucay et al. 1998). Kürzlich konnte durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Myelomzellen selbst RANKL exprimieren und somit eine direkte Osteoklasten-Aktivierung im Knochenmarkmikromilieu vermitteln (Sezer et al. 2002a, 2002b; Abbildung 1).

Darüber hinaus bewirken die malignen Plasmazellen eine vermehrte Expression von RANKL auf Stromazellen (Pearse et al. 2001) und eine Verminderung von OPG. Dies erfolgt durch eine Bindung von OPG an Syndecan-1, welches auf der Oberfläche der Myelomzellen überexprimiert wird, und anschließende Internalisierung sowie lysosomalen Abbau (Standal et al. 2002). Dadurch verschieben die Myelomzellen selbst das physiologische Gleichgewicht zwischen RANKL und OPG zugunsten von RANKL und damit in Richtung eines gesteigerten Knochenabbaus (Sezer et al. 2003a, Bruno et al. 2004).

Neben RANKL kommt auch MIP-1 α eine Bedeutung bei der Osteoklastenaktivierung zu. Es wird von Myelomzellen sezerniert und wirkt chemotaktisch auf Vorläuferzellen der Osteoklasten (Abbildung 1).

1.8 Messung von OPG/RANKL bei Patienten

Durch eine Messung von RANKL und OPG als zentrale Steuerungselemente des Knochenstoffwechsels könnte es gelingen, eine Störung in diesem System zu detektieren und Hinweise auf eine gesteigerte osteolytische Aktivität zu erhalten, bevor bildgebende Verfahren dies gestatten. Für Patienten mit einem derartigen Risikoprofil kann der Nutzen einer frühzeitigen therapeutischen Intervention untersucht werden, wie es beispielsweise derzeit im Rahmen der Deutschen Studiengruppe Multiples Myelom in Zusammenarbeit mit der Ostdeutschen Studiengruppe Hämatologie und Onkologie für den Einsatz von Bisphosphonaten beim MM im Stadium I geschieht (Leitung: Prof. Dr. O. Sezer und Prof. Dr. M. Freund).

1.8.1 OPG

Zur Messung von OPG beim MM liegen bereits publizierte Daten vor, die jedoch teilweise widersprüchlich sind. So berichten Corso et al. von einer Erhöhung der Serumspiegel (Corso et al. 2004), andere Autoren von einer Verminderung von OPG (Seidel et al. 2001, Lipton et al. 2002, Terpos et al. 2003) bei zunehmender Knochenbeteiligung, so dass die Rolle dieses Parameters mit dem derzeit verfügbaren Messsystem noch unklar ist.

1.8.2 sRANKL (soluble RANKL)

RANKL, das zunächst als membranständiges Protein exprimiert wird, wird durch die Metalloprotease-Disintegrin TNF- α Convertase (TACE) in die lösliche Form sRANKL überführt (Lacey et al. 1998, Lum et al. 1999). Während das membrangebundene Protein die physiologische Form zu sein scheint, bildet sich das lösliche sRANKL vornehmlich bei pathologisch gesteigertem Knochenstoffwechsel. Die Datenlage zur Messung von sRANKL bei Patienten mit MM ist sehr spärlich. Lediglich Terpos et al. beschrieben einen Anstieg von sRANKL bei Myelompatienten sowie eine Korrelation von sRANKL mit dem Knochenabbau (Terpos et al. 2003). Diese Ergebnisse konnten wir und einige andere

Arbeitsgruppen (Kruk et al. 2002) für den überwiegenden Teil unserer Patienten im Frühstadium des Myeloms oder mit MGUS nicht bestätigen, weil der sRANKL-Wert mit dem bisher verfügbaren ELISA-Test (sRANKL ELISA KIT, Immundiagnostik, Bensheim, Deutschland) bei dem größten Teil der Myelompatienten nicht messbar war.

1.8.3 tRANKL (total RANKL)

Das gesamte zirkulierende RANKL (tRANKL) setzt sich aus OPG-gebundenem und freiem RANKL zusammen. Ein neuer Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA) (total sRANKL ELISA, Immundiagnostik, Bensheim, Deutschland) bietet nun die Möglichkeit zum Nachweis des totalen, das heißt des freien und OPG-gebundenen RANKL. Dazu werden verdünnte Serum-Proben mit einem anti-tRANKL-Fängerantikörper und einem Peroxidase-markierten anti-OPG-Antikörper inkubiert. Die quantitative Bestimmung der tRANKL-Konzentration erfolgt durch die Messung der Extinktion nach Farbumschlag durch Zugabe eines farbmarkierten Peroxidasesubstrats. Aufgrund der neuen sensitiveren Nachweismethode stellt sich die Frage, ob RANKL im Serum mit Hilfe des tRANKL-Tests bei einer größeren Patientenzahl messbar ist als mit dem bisherigen sRANKL-Test und ob sich eine klinische Relevanz in Bezug auf Ausmaß der Knochendestruktion, Ansprechen oder Prognose ergibt.

1.9 Aktuelle Fragestellung

Bislang sind weder beim MM noch bei anderen malignen Erkrankungen mit Knochenbeteiligung Daten publiziert worden, die mit dem neuen tRANKL-Test erhoben wurden. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob tRANKL bei Patienten mit MM messbar ist und ob sich die Werte von einem Normalkollektiv sowie von Patienten mit MGUS unterscheiden. Außerdem soll evaluiert werden, ob die Höhe des tRANKL-Wertes mit dem Ausmaß der Knochendestruktion oder dem Krankheitsstadium des MM korreliert. Ferner sind potentielle Veränderungen von tRANKL bei Patienten im Stadium II und III nach Durie und Salmon unter Chemo- und Bisphosphonattherapie von Bedeutung. Zusammenfassend sollen damit in dieser Arbeit die Fragen geklärt werden, ob sich tRANKL als Marker einer verstärkten Knochenresorption eignet, ob sich unter der Therapie

relevante Veränderungen ergeben und ob der Parameter eine prognostische Bedeutung für das Gesamtüberleben der Patienten besitzt.

2. Patienten und Methoden:

2.1 Patienten

In der vorliegenden Arbeit wurden Serum- und Plasmaproben von insgesamt 133 Individuen mit MGUS (n= 20), multiplen Myelom der Stadien I bis III nach Durie und Salmon (n= 93) sowie von gesunden Probanden (n= 20) verwendet. Die Altersverteilung der Patienten reichte von 37 bis 85 Jahren mit einem Median von 62 Jahren. Die Proben stammten von 64 weiblichen und 69 männlichen Personen. Von den 93 Patienten mit MM hatten 48 mindestens eine Osteolyse und 45 keine Knochenbeteiligung.

In Anlehnung an die hauptsächlich verwendeten und oben beschriebenen Stadieneinteilungen wurden die Patienten jeweils gemäß der Klassifikation nach Durie und Salmon, nach International Myeloma Working Group- und nach ISS-Klassifikation analysiert. Dabei verteilten sich die Patienten wie folgt: Es befanden sich 28 Patienten im Stadium I, 6 Patienten im Stadium II und 59 Patienten im Stadium III gemäß Klassifikation von Durie und Salmon. Die Patienten im Stadium II und III nach Durie und Salmon erhielten entsprechend der Standardvorgehensweise eine Chemotherapie. Nach der neuen ISS-Klassifikation waren 25 Patienten im ISS- Stadium I, 22 Patienten im Stadium II und 17 Patienten im Stadium III. Bei einem von 65 Patienten mit symptomatischem MM war keine Zuordnung gemäß ISS aufgrund fehlender β 2-Mikroglobulin-Werte möglich. Als Kontrolle diente eine Gruppe von 20 gesunden Probanden. Eine Übersicht zu den Patientencharakteristika befindet sich in Tabelle 3.

Zusätzlich wurden krankheitsrelevante klinische Daten erhoben: Alter, Immunglobulin-Typ (Ig-Typ), Deletion 13q14, β 2-Mikroglobulin, C-reaktives Protein (CRP), Albumin, Plasmazell-Infiltration, ISS-Stadium und Überlebenszeit. Darüber hinaus wurden das Therapieregime und der Remissionsstatus nach stattgehabter Therapie erfasst.

Tabelle 3: Patientencharakteristika

| | n= | Median (Spannweite) |
|------------------------------------------------------------|-----------|----------------------------|
| Individuen gesamt | 133 | |
| Geschlecht | | |
| Weiblich | 64 | |
| Männlich | 69 | |
| Alter in Jahren | | |
| Gesamt | | 63 (37- 85) |
| Gesunde Probanden (n= 20) | | 58 (37- 71) |
| Patienten (n= 113) | | 62 (37- 85) |
| MGUS (n= 20) | | 62 (37- 74) |
| MM (n= 93) | | 64 (37- 85) |
| Kontrollgruppe (gesunde Probanden) | 20 | |
| MGUS | 20 | |
| MM-Patienten nach Durie und Salmon-Klassifikation | | |
| I | 28 | |
| II | 6 | |
| III | 59 | |
| MM-Patienten nach IMWG-Klassifikation | | |
| „Smoldering“ MM | 28 | |
| Symptomatisches MM | 65 | |
| Symptomatische MM-Patienten nach ISS-Klassifikation | | |
| I | 25 | |
| II | 22 | |
| III | 17 | |
| Knochenläsionen | | |
| Keine Osteolysen | 45 | |
| ≥ 1 Osteolyse | 48 | |

Die Entnahme aller Blutproben erfolgte nach Erstvorstellung beziehungsweise vor Therapieeinleitung nach Aufklärung und mit dem Einverständnis der Probanden. Für die Entnahme und für die Verwendung der Proben lag ein Ethikvotum der Ethikkommission der Charité vor.

Alle Blutproben wurden innerhalb von einer Stunde nach der Venenpunktion bearbeitet. Dafür wurde das Vollblut zunächst für 10 Minuten bei 200xg zentrifugiert und das Serum beziehungsweise Plasma anschließend bei -70°C gelagert. Die Proben wurden erst unmittelbar vor den Messungen aufgetaut.

2.2 Immunoassay

Zur Ermittlung der Konzentration von tRANKL in den Serumproben wurde ein „Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay“ (ELISA) verwendet (total sRANKL ELISA, Immundiagnostik, Bensheim, Deutschland). Es handelte sich um einen Sandwich-ELISA Test, bei dem auf Mikrotiterplatten, die mit einem monoklonalen anti-tRANKL-Fängerantikörper beschichtet waren, das in den Proben enthaltene freie und OPG-gebundene tRANKL gebunden wurde. Durch Zugabe von OPG wurde das freie tRANKL abgesättigt. Nach Zugabe eines Enzym-konjugierten polyklonalen anti-OPG-Antikörpers und Substratzugabe erfolgte ein Farbumschlag, der spektrophotometrisch detektiert wurde. Die Intensität des Farbumschlags war proportional zur jeweiligen tRANKL-Konzentration in der Probe.

2.2.1 Probenvorbereitung

Die Serumproben wurden für die Analyse zunächst aufgetaut und erst weiterverarbeitet, wenn sie Raumtemperatur (18-26°C) erreicht hatten. Anschließend wurden sie mit dem Probenverdünnungspuffer im Verhältnis 1:100 verdünnt, unmittelbar vor der Verarbeitung nochmals gut gemischt und in Doppelbestimmungen analysiert. Serumproben, bei denen sich die gemessenen tRANKL-Werte unter der Nachweisgrenze befanden, wurden in einem Wiederholungsversuch in geringerer Verdünnung nachbestimmt.

2.2.2 Verdünnungsreihe

Zuerst wurden die Reagenzien gemäß Testanleitung vorbereitet. Dafür wurde das Waschpufferkonzentrat im Verhältnis 1:10 mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Für die Erstellung der Standardkurve wurde rekombinantes humanes tRANKL-Lyophilisat in vier Verdünnungen (S1 bis S4) wie folgt mit Probenverdünnungspuffer (PVP) gemischt:

S1= Standardkonzentrat,

S2= 100 µl S1 + 200 µl PVP,

S3= 100 µl S2 + 200 µl PVP,

S4= 100 µl S3 + 200 µl PVP,

S0= PVP.

2.2.3 Konjugation mit Fängerantikörper und OPG

Je 50 µl der vorbereiteten Proben, Kontrollen sowie der Standardlösungen wurden in zwei benachbarte Vertiefungen der 96-Well-Mikrotiterplatten pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von jeweils 50 µl OPG-Lösung in alle Vertiefungen.

Die Mikrotiterplatten wurden abgedeckt und für 16-24 Stunden bei 2-8°C inkubiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Plattenvertiefungen mit jeweils 250 µl Waschpuffer gespült und die Mikrotiterplatten vorsichtig auf saugfähigem Papier ausgeklopft. Insgesamt erfolgten fünf derartige Waschvorgänge, um ungebundenes Substrat zu entfernen.

2.2.4 Inkubation mit Detektionsantikörper

Im nächsten Schritt wurden je 100 µl Konjugat, das aus einem Peroxidase-markierten anti-OPG-Antikörper bestand, in alle Vertiefungen pipettiert. Nach Abdeckung der Mikrotiterplatte erfolgte eine weitere Inkubation für zwei Stunden bei 2-8°C. Anschließend wurde wieder der Inhalt der Vertiefungen verworfen und fünf Mal mit je 250 µl Waschpuffer wie oben beschrieben gespült.

2.2.5 Substratkonjugation

Nach dem letzten Waschgang erfolgte die Zugabe von jeweils 100 µl des farbmarkierten Peroxidasesubstrats Tetramethylbenzidin (TMB) in jede Vertiefung. Im Anschluss daran wurde die Mikrotiterplatte für 20 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur (18-26°C) unter Lichtausschluss inkubiert und dann die Enzymreaktion abgestoppt durch Zugabe von 50 µl Schwefelsäure in jede Vertiefung. Dies bewirkte einen Farbumschlag von blau nach gelb.

2.2.6 Spektrophotometrische Detektion

Die entstandene chromogene Verbindung wurde photometrisch gemessen. Die Bestimmung der Extinktion erfolgte umgehend nach Zugabe der Stopplösung bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm in einem Mikrotiterplattenphotometer. Die Intensität der Farbe war dem Gehalt an tRANKL direkt proportional. Eine schematische Darstellung des Testprinzips findet sich in Abbildung 2.

Parallel zur Probenmessung wurde eine Standardkurve mit rekombinantem humanem tRANKL-Protein erstellt, aus der sich die Konzentrationen der Proben durch Übertrag der gemessenen Werte in die Kurve ermitteln ließen. Auf der so entstandenen Eichkurve wurde auf der x-Achse die Konzentration von tRANKL gegen die zugehörige optische Dichte im ELISA-Test auf der y-Achse aufgetragen. Die untere Nachweisgrenze lag bei 0,61 pmol/l, die obere bei 1800 pmol/l. Die Intraassay- und die Interassay-Varianzen wurden jeweils mit <10% angegeben.

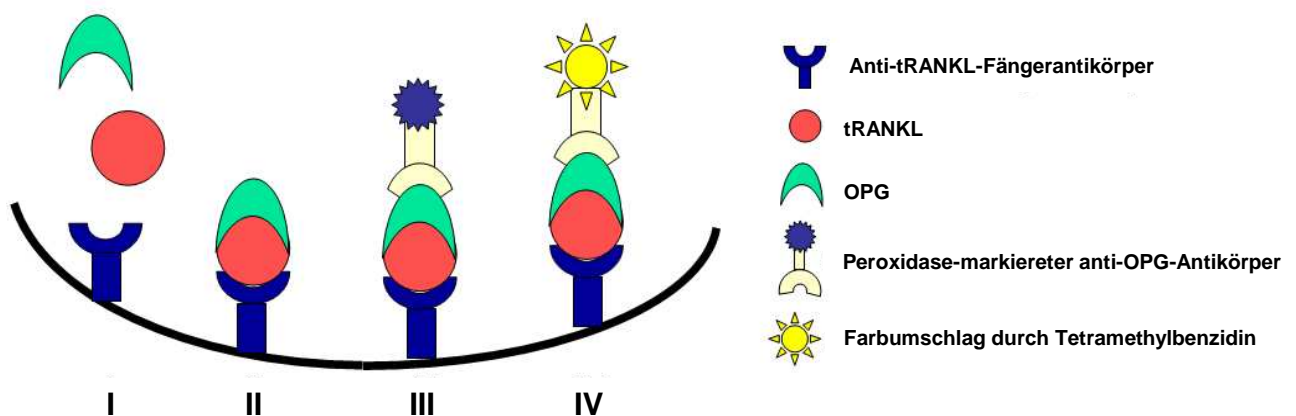


Abbildung 2: Testprinzip: Mikrotiterplatte mit hochaffinem anti-tRANKL-Fängerantikörper nach Zugabe der Serumprobe und OPG-Lösung (I), nach dem 1. Inkubationsschritt (II), nach Zugabe des Peroxidase-markierten anti-OPG-Antikörpers und dem 2. Inkubationsschritt (III) sowie nach Enzymreaktion mit Farbumschlag (IV).

2.3 Statistik

Zur statistischen Datenanalyse wurde die SPSS-Software Version 11.5 (SPSS Inc., USA) verwendet. Das Signifikanzniveau für die verschiedenen Tests lag bei $p < 0,05$.

2.3.1 Deskriptive Statistik

Mittels einer exploratorischen Datenanalyse wurden Medianwerte und Spannweiten für die Altersverteilung und Verteilung der tRANKL-Werte in den verschiedenen Gruppen berechnet.

2.3.2 Stadienvergleiche

Da die Parameter in der Patientenkohorte nicht normal verteilt waren, wurden die Vergleiche unabhängiger Parameter jeweils nichtparametrisch mit dem U-Test nach Mann-Whitney beziehungsweise dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Bei abhängigen Stichproben kam der nichtparametrische Wilcoxon-Test zur Anwendung.

Für Gruppenvergleiche der tRANKL-Konzentrationen zwischen zwei Stichproben wurde der Mann-Whitney U-Test verwendet. Es wurden jeweils Patientengruppen in verschiedenen Stadien verglichen: Gesunde Probanden versus Myelompatienten, MGUS versus MM, MGUS versus „smoldering“ MM, „smoldering“ MM versus symptomatisches MM sowie Patienten mit Osteolysen versus ohne Osteolysen. Bei der Analyse von mehr als zwei Stichproben wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Dies erfolgte beim Vergleich der Myelompatienten gemäß Klassifikation nach Durie und Salmon Stadium I versus Stadium II versus Stadium III sowie beim Vergleich MM gemäß ISS Klassifikation Stadium I versus II versus III.

2.3.3 Longitudinale Vergleiche (vor und nach Therapie)

Bei abhängigen Stichproben, wie dem Vergleich der tRANKL-Konzentrationen vor versus nach Therapie, kam der nichtparametrische Wilcoxon-Test zur Anwendung.

2.3.4 Univariate Überlebensanalyse

Für die univariate Überlebensanalyse wurden die tRANKL-Messwerte nach dem Medianwert der jeweiligen Kohorte dichotomisiert, das heißt nach dem Medianwert der Messwerte aller Patienten für die Überlebensanalyse in der gesamten MM-Gruppe und nach dem Medianwert der Patienten mit symptomatischem MM für die Überlebensanalyse in dieser Gruppe. Zusätzlich wurden cut-off-Werte mittels einer ROC-Analyse in Bezug auf das Überleben ermittelt. Außerdem wurden die bekannten prognostisch relevanten Faktoren Alter, Ig-Typ, ISS-Stadium, β 2-Mikroglobulin, CRP, Albumin und Plasmazell-Infiltrationsgrad nach den in der Literatur beschriebenen cut-off-Werten untersucht. Es wurden jeweils die medianen Überlebenszeiten der beiden Patientengruppen sowie die Überlebenswahrscheinlichkeiten nach der Kaplan-Meier-Methode berechnet. Der Vergleich der Überlebenskurven erfolgte mit dem Log-Rank-Test.

2.3.5 Multivariate Überlebensanalyse

Zur weiteren Analyse wurde tRANKL unter Einbeziehung der Faktoren, die in der univariaten Analyse signifikant waren, in einer multivariaten Überlebensanalyse bei Patienten mit symptomatischem MM untersucht. Die Parameter wurden mittels der multivariaten Cox Proportional-Hazards Regression (Cox 1972) in einem schrittweise rückwärts ausschließenden Modell untersucht.

3. Ergebnisse:

3.1 Patientencharakteristika

Es wurden 113 Seren von Patienten mit MGUS, multiplen Myelom sowie von 20 gesunden Probanden gemessen. Die Proben wurden von 1999 bis 2005 in der Klinik für Hämatologie und Onkologie bei Erstvorstellung der Patienten sowie im Blutspendedienst am Campus Charité Mitte gesammelt.

3.1.1 Altersverteilung

Der Altersmedian lag für die gesamte Kohorte bei 63 Jahren (Spannweite 35 bis 85 Jahre), für die Kontrollgruppe bei 58 Jahren (Spannweite 37 bis 71 Jahre), für MGUS bei 62 Jahren (Spannweite 37 bis 74 Jahre) und für die Myelompatienten bei 64 Jahren (Spannweite 37 bis 85 Jahre, siehe Tabelle 3).

Das Alter der Kontrollgruppe war mit einem Median von 58 Jahren etwas niedriger als das der MGUS- (Median 62 Jahre) und der MM-Patienten (Median 64 Jahre). Es zeigte sich jedoch keine Korrelation zwischen Alter und Serum tRANKL-Werten ($r= 0,10$; $p= 0,40$).

3.1.2 Zusätzliche krankheitsrelevante Parameter mit prognostischer Bedeutung

Von den zusätzlich erhobenen krankheitsrelevanten klinischen Daten Deletion 13q14, β 2-Mikroglobulin, CRP und Albumin waren nicht für alle Patienten Werte verfügbar (siehe Tabelle 4). Als cut-off-Werte für die Dichotomisierung der Daten wurden die in der Literatur beschriebenen cut-off-Werte von 5,5 und 3,5 mg/l für β 2-Mikroglobulin (Greipp et al. 2005), 0,6 mg/dl für CRP (Bataille et al. 1992) sowie 3,5 g/dl für Albumin (Greipp et al. 2005) gewählt. Die Anzahl der symptomatischen MM-Patienten mit Werten oberhalb beziehungsweise unterhalb der genannten cut-off-Werte ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Prognostische Faktoren bei Patienten mit symptomatischem multiplen Myelom

| | n= | Median (Spannweite) |
|------------------------------------|-----------|----------------------------|
| Deletion 13q14 | 58 | |
| FISH+ | 18 | |
| FISH- | 40 | |
| β2-Mikroglobulin (mg/l) | 63 | 3,60 (1,20- 40,80) |
| ≤ 5,5 | 46 | |
| > 5,5 | 17 | |
| ≤ 3,5 | 30 | |
| > 3,5 | 33 | |
| CRP (g/dl) | 57 | 0,5 (0,05- 19,00) |
| ≤ 0,6 | 29 | |
| > 0,6 | 28 | |
| Albumin (g/dl) | 63 | 3,90 (1,90- 4,97) |
| ≤ 3,5 | 19 | |
| > 3,5 | 44 | |
| Plasmazell-Infiltration (%) | 64 | |
| ≤ 33 | 17 | |
| > 33 | 47 | |
| ISS | 64 | |
| I | 25 | |
| II | 22 | |
| III | 17 | |

3.1.3 Serum tRANKL-Werte

Serum tRANKL war bei 38 von 133 Proben mit dem empfohlenen Verdünnungsverhältnis 1:100 unter dem Detektionslimit nicht messbar. Drei von 133 Proben lagen über der oberen Nachweisgrenze. Die 38 Proben, bei denen sich die ermittelten tRANKL-Werte unter der Nachweisgrenze befanden, wurden in einem Wiederholungsversuch in einfacher Verdünnung nachbestimmt. Hierbei lagen letztlich noch 17 von 38 Proben unter der Nachweisgrenze, so dass insgesamt 17 von 133 unter dem Detektionslimit lagen. Die Proben mit nicht detektierbaren Werten unter der Nachweisgrenze verteilten sich in erster Linie auf die Gruppen der gesunden Spender (4/20), MGUS (5/20) und Patienten mit „smoldering“ MM (7/28), während bei Patienten mit symptomatischem MM nur 1 von 65 Proben unter der Nachweisgrenze lag. Eine Übersicht der tRANKL-Werte (Median und Spannweite) findet sich in Tabelle 5.

Tabelle 5: tRANKL-Werte für Kontrollen, MGUS, MM-Stadium I-III (Durie und Salmon), „smoldering“ MM, symptomatisches MM und ISS Stadien I-III

| Patienten | n= | tRANKL(pmol/l) | |
|------------------------------------------------|-----|----------------|----------------|
| | | Median | Spannweite |
| Kontrollgruppe | 20 | 75,1 | 0,61- 235,46 |
| MGUS | 20 | 28,01 | 0,61- 292,54 |
| MM nach Durie und Salmon-Klassifikation | | | |
| I | 28 | 82,28 | 0,61- 597,01 |
| II | 6 | 139,83 | 1,12- 358,74 |
| III | 59 | 348,11 | 1,08- 1816,52 |
| I-III | 93 | 216,64 | 0,61- 1816,52 |
| MM nach IMWG-Klassifikation | | | |
| „Smoldering“ MM | 28 | 76,70 | 0,61- 597,01 |
| Symptomatisches MM | 65 | 287,25 | 1,08- 1816,52 |
| MM nach ISS-Klassifikation | | | |
| I | 25 | 239,19 | 1,08- 1816,52 |
| II | 22 | 250,46 | 1,12- 1800 |
| III | 17 | 701,67 | 58,10- 1816,52 |
| Gesamt | 133 | 131,12 | 0,61- 1816,52 |

3.2 Vergleich der Serum tRANKL-Konzentrationen zwischen verschiedenen Krankheitsstadien

3.2.1 MM-Patienten versus Kontrollgruppe

Für den Vergleich der tRANKL-Serumkonzentrationen zwischen den Gruppen mit gesunden Probanden, Patienten mit MGUS, MM-Patienten im Stadium I bis III nach Durie und Salmon sowie mit „smoldering“ MM und symptomatischem MM konnten alle 133 Messungen einbezogen werden. Der Median für Serum tRANKL lag in der Kontrollgruppe (n= 20) bei 75,1 pmol/l (Spannweite 0,61 bis 235,46; siehe Tabelle 6) und in der Gruppe der MM-Patienten im Stadium I-III bei 216,64 pmol/l (Spannweite 0,61 bis 1816,52). Im Mann-Whitney-U-Test war Serum tRANKL bei Patienten mit MM signifikant höher als bei gesunden Kontrollpersonen ($p < 0,001$; Abbildung 3).

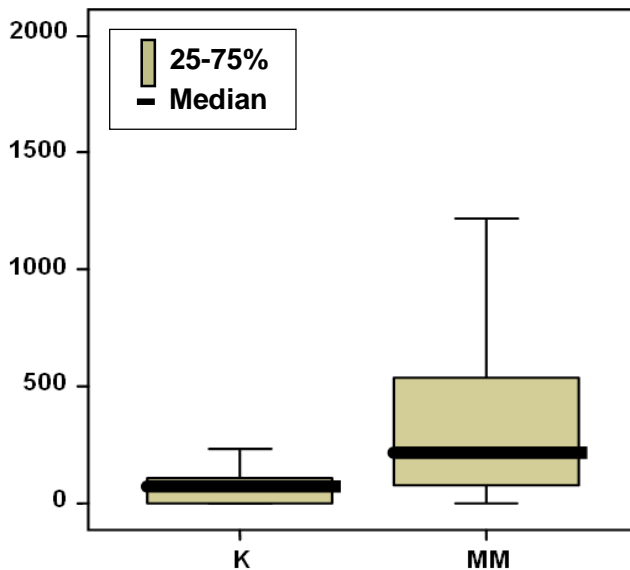


Abbildung 3: Stadienvergleich/Boxplot: Kontrolle (K) versus multiples Myelom (MM); $p < 0,001$.

3.2.2 MGUS versus MM und MGUS versus MM Stadium I (Durie und Salmon)

Im Vergleich zu der Gruppe mit MGUS zeigten sich signifikant erhöhte Serum tRANKL-Werte bei Patienten mit MM im Stadium I-III gegenüber MGUS ($p < 0,001$; Abbildung 4). Der tRANKL-Serumwert lag im Median für die MGUS-Patienten bei 28,01 pmol/l (Spannweite 0,61 bis 292,54) und für MM I-III bei 216,64 pmol/l (Spannweite 0,61 bis 1816,52).

Darüber hinaus fand sich auch ein signifikanter Unterschied zwischen MGUS und MM im Stadium I ($p = 0,013$; Abbildung 5) mit einem Medianwert von 28,01 pmol/l für MGUS versus 82,28 pmol/l (Spannweite 0,61 bis 597,01; siehe Tabelle 5) für MM im Stadium I.

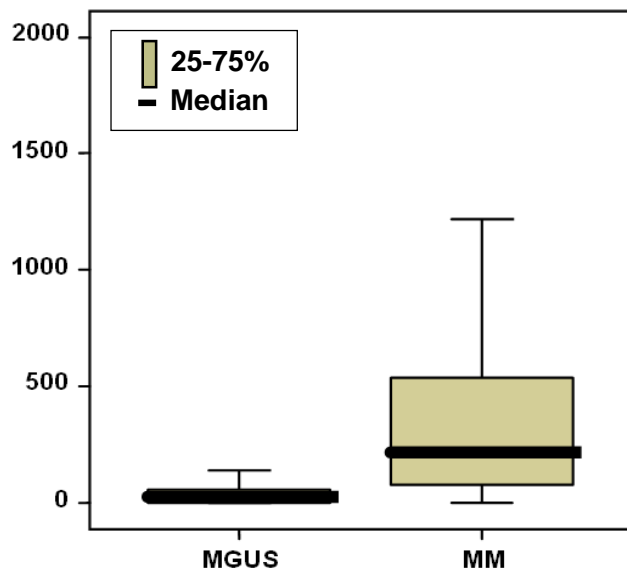


Abbildung 4: Stadienvergleich/Boxplot: MGUS versus MM; $p < 0,001$.

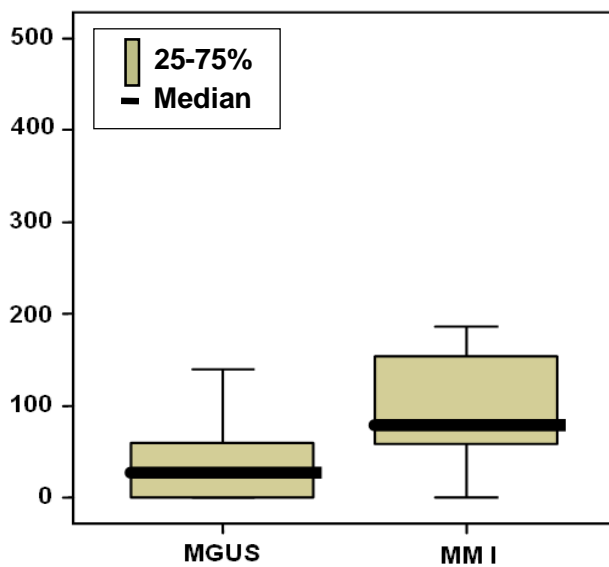


Abbildung 5: Stadienvergleich/Boxplot: MGUS versus MM I; $p = 0,013$.

3.2.3 MM Patienten im Stadium I versus Stadium II versus Stadium III

Beim Vergleich der Serum tRANKL-Werte der einzelnen MM-Stadien nach Durie und Salmon zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Werte parallel zum Krankheitsstadium MM I bis III (Abbildung 6). Die gerundeten Medianwerte ergaben dabei die folgende Verteilung: Stadium I (n= 28): 82,28 pmol/l (Spannweite 0,61 bis 597,01), Stadium II (n= 6): 139,83

pmol/l (Spannweite 1,12 bis 358,74) und Stadium III (n= 59): 348,11 pmol/l (Spannweite 1,08 bis 1816,52). Der Unterschied zwischen den Krankheitsstadien war im Kruskal-Wallis-Test signifikant ($p < 0,001$).

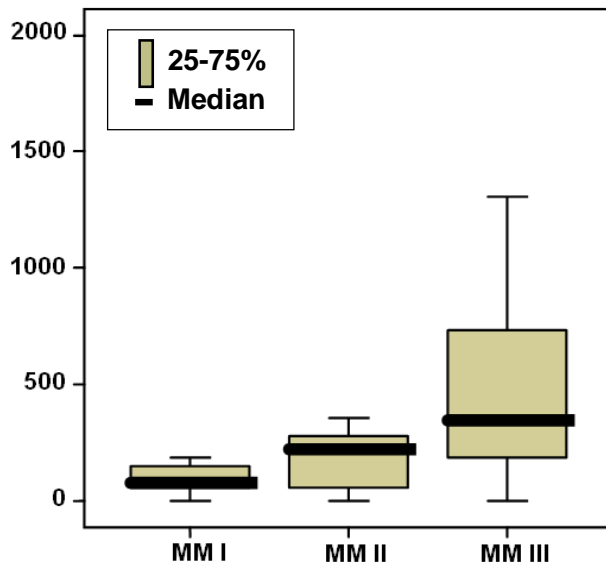


Abbildung 6: Stadienvergleich/Boxplot: MM I versus MM II versus MM III; $p < 0,001$.

3.2.4 Symptomatisches MM versus „smoldering“ MM

Auch im Vergleich zwischen den Gruppen von Patienten mit „smoldering“ MM versus symptomatischem MM zeigten sich erhöhte tRANKL-Werte bei Patienten mit symptomatischem MM. Der gerundete Medianwert für tRANKL (siehe auch Tabelle 5) lag beim „smoldering“ MM (n= 28) bei 76,70 pmol/l (Spannweite 0,61 bis 597,01) und bei symptomatischem MM (n= 65) bei 287,25 pmol/l (Spannweite 1,08 bis 1816,52). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war im Mann-Whitney-U-Test ebenfalls signifikant ($p < 0,001$; Abbildung 7).

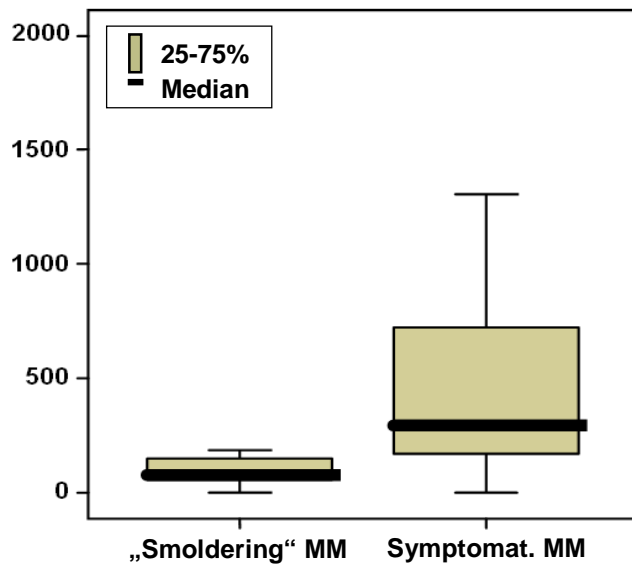


Abbildung 7: Stadienvergleich/Boxplot: „Smoldering“ MM versus symptomatisches MM; $p < 0,001$.

3.2.5 ISS Stadium I versus Stadium II versus Stadium III

Ferner wurden die Serum tRANKL-Werte bei Patienten mit symptomatischem MM nach der ISS-Klassifikation verglichen. In diese Analyse konnten 64 Patienten einbezogen werden. Ein Patient war aufgrund fehlender β 2-Mikroglobulin- und Albuminwerte nicht nach ISS klassifizierbar und konnte daher nicht für die Analyse berücksichtigt werden. Die Medianwerte waren wie folgt verteilt: ISS I (n= 25): 239,19 pmol/l (Spannweite 1,08 bis 1816,52), ISS II (n= 22): 250,46 pmol/l (Spannweite 1,12 bis 1800) und ISS III (n= 17): 701,67 pmol/l (Spannweite 58,10 bis 1816,52). Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich auch hier ein signifikanter Anstieg der tRANKL-Werte parallel zum ISS Krankheitsstadium I bis III ($p = 0,001$; Abbildung 8).

Die Ergebnisse der Stadienvergleiche sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

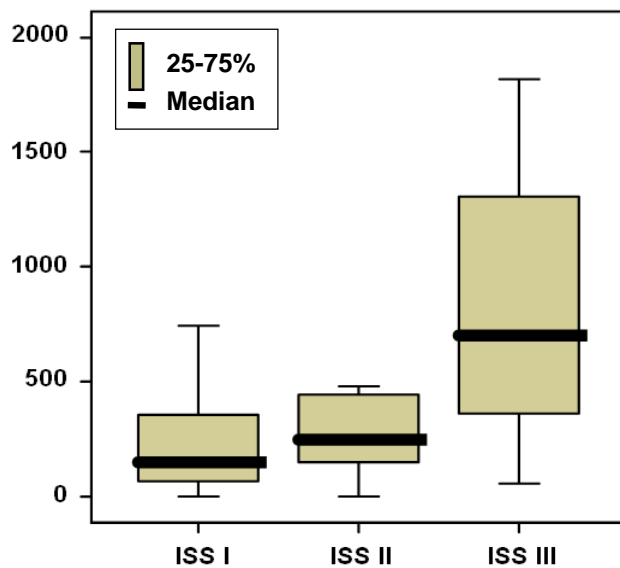


Abbildung 8: Stadienvergleich/Boxplot: ISS I versus ISS II versus ISS III; $p=0,001$.

Tabelle 6: Übersicht der Medianwerte und Spannweiten für tRANKL-Serumwerte für Kontrolle, „smoldering“ und symptomatisches MM, ISS Stadien I-III, keine Osteolysen sowie Osteolysen

| | n= | tRANKL (pmol/l) | | U-Test |
|--------------------|----|-----------------|-----------------|---------------|
| | | Median | Spannweite | |
| MGUS | 20 | 28,01 | 0,61 - 292,54 | } $p < 0,001$ |
| MM | 93 | 216,64 | 0,61 - 1816,52 | |
| „Smoldering“ MM | 28 | 76,70 | 0,61 - 597,01 | } $p < 0,001$ |
| Symptomatisches MM | 65 | 287,25 | 1,08 - 1816,52 | |
| ISS I | 25 | 239,19 | 1,08 - 1816,52 | } $p = 0,001$ |
| ISS II | 22 | 250,46 | 1,12 - 1800 | |
| ISS III | 17 | 701,67 | 58,10 - 1816,52 | |
| Keine Osteolysen | 45 | 111,53 | 0,61 - 1816,52 | } $p < 0,001$ |
| Osteolysen | 48 | 296,09 | 58,10 - 1811,01 | |

3.2.6 Patienten mit Osteolysen versus Patienten ohne Osteolysen

In einer weiteren Auswertung wurde die Korrelation der tRANKL-Werte mit dem Vorhandensein beziehungsweise dem Fehlen von Osteolysen untersucht. Dazu wurden alle Patienten mit MM (n= 93) eingeschlossen. 48 Myelompatienten wiesen zum Zeitpunkt der Probenentnahme mindestens eine Knochenläsion in der konventionellen Skelett-

Röntgenuntersuchung auf. Bei 45 Myelompatienten zeigten die Röntgenbefunde keinen Hinweis auf eine Knochenbeteiligung. Im Median lagen die tRANKL-Werte bei Patienten ohne Knochenbeteiligung bei 111,53 pmol/l (Spannweite 0,61 bis 1816,52) versus 296,09 pmol/l (Spannweite 58,1 bis 1811,01) bei Patienten mit Osteolysen. Myelompatienten mit radiologisch detektierbaren osteolytischen Knochenläsionen hatten somit höhere tRANKL-Serumspiegel als Patienten ohne Osteolysen. Im Mann-Whitney-U-Test war der Unterschied signifikant ($p < 0,001$; Abbildung 9).

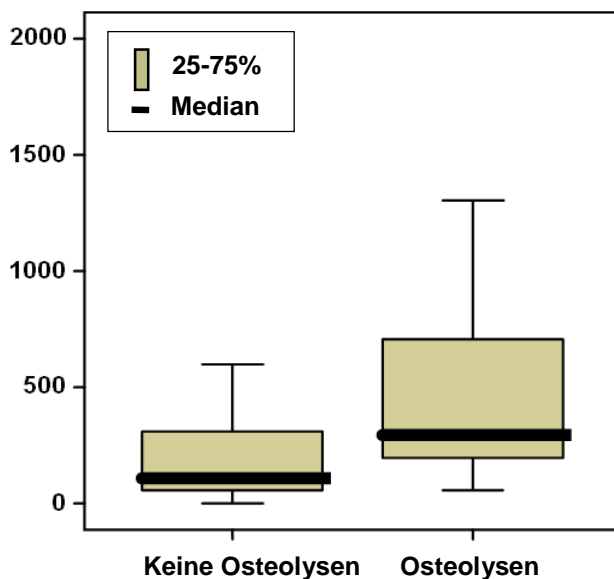


Abbildung 9: Vergleich/Boxplot: Keine Osteolysen versus Osteolysen; $p < 0,001$.

3.3 Longitudinale Vergleiche vor versus nach Chemo- und Bisphosphonattherapie

Bei 32 behandlungsbedürftigen Myelompatienten im Stadium II und III nach Durie und Salmon, die sowohl eine zytostatische Chemotherapie als auch eine monatliche i.v. Bisphosphonatgabe (BP) mit Zoledronsäure oder Pamidronat erhielten, waren Serumproben vor und nach Abschluss der Erstlinientherapie (drei bis sechs Monate nach Erstdiagnose) verfügbar. Von den 32 MM-Patienten wiesen 27 nach dem Therapieblock geringere und vier höhere tRANKL-Werte auf. Bei einem Patienten war der tRANKL-Wert vor und nach der Behandlung unverändert.

3.3.1 Patienten vor und nach Chemo- und Bisphosphonattherapie

Vor Therapieinitiierung lag der Median der Serum tRANKL-Werte bei den 32 MM-Patienten im Stadium II und III bei 361,0 pmol/l (Spannweite: 1,1-1800) und nach dem Therapieblock bei 234,1 pmol/l (Spannweite: 0,7-1800). Die Medianwerte waren nach der Behandlung mit einer Chemo- und Bisphosphonattherapie um mehr als ein Drittel gegenüber den Ausgangswerten abgefallen. Insgesamt zeigten die tRANKL-Werte nach der Behandlung einen signifikanten Abfall gegenüber den Ausgangswerten ($p < 0,001$; Abbildung 10).

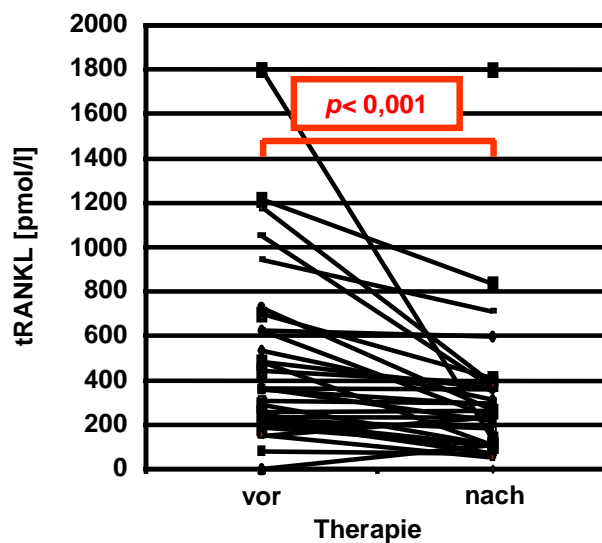


Abbildung 10: Vergleich tRANKL vor beziehungsweise nach Chemo- und Bisphosphonattherapie, $p < 0,001$.

3.3.2 Abfall von Serum tRANKL und Ansprechen auf die Therapie

Von den 32 Patienten, die eine Chemo- und Bisphosphonattherapie erhalten hatten, zeigten 22 Patienten ein Ansprechen (komplette Remission (complete remission, CR) oder eine partielle Remission (partial remission, PR)) gegenüber zehn Patienten, bei denen kein therapeutischer Effekt (keine Veränderung, no change, NC) oder eine Krankheitsprogression (progressive disease, PD) gesehen wurde. Von den Patienten, die auf die Therapie angesprochen hatten, war in 18 Fällen der tRANKL-Wert nach der Therapie abgefallen. Drei Patienten hatten nach der Behandlung höhere Werte und ein Patient wies unveränderte Werte vor und nach der Therapie auf.

Von den zehn Patienten, die auf die Therapie nicht angesprochen hatten, zeigten ebenfalls neun nach der Erstlinienchemotherapie und Bisphosphonattherapie einen Abfall und ein Patient einen Anstieg des Serum tRANKL.

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die Analyse der tRANKL-Verläufe zwar insgesamt einen signifikanten ($p < 0,001$) Abfall der Werte nach Chemo- und Bisphosphonattherapie zeigte, dass dies jedoch sowohl bei den Patienten, die auf die Therapie angesprochen hatten, als auch bei therapierefraktären Patienten der Fall war. Folglich zeigte sich keine Korrelation zwischen tRANKL-Spiegel im Serum und möglichem Ansprechen auf eine Chemo- und Bisphosphonattherapie.

3.4 Korrelation von tRANKL mit prognostischen Faktoren beim MM

In einer weiteren Analyse wurde die bivariate Korrelation von Serum tRANKL mit etablierten Parametern der Krankheitsaktivität beziehungsweise der Tumorlast bei 93 Patienten mit MM untersucht. Für die Parameter β 2-Mikroglobulin und Albumin sowie CRP waren jeweils nur 83 beziehungsweise 82 Patienten auswertbar. Patienten mit fehlenden Werten wurden ausgeschlossen.

Es zeigte sich eine signifikante Korrelation von Serum tRANKL mit den Parametern der Tumorlast, wie Knochenmark-Plasmazell-Infiltration ($r = 0,43$; $p < 0,001$) und Serum β 2-Mikroglobulin ($r = 0,26$; $p = 0,037$) sowie eine schwache Korrelation mit dem Plasma-Kreatinin ($r = 0,21$; $p = 0,044$), siehe Tabelle 7.

Tabelle 7: Korrelation von tRANKL mit Plasmazell-Infiltration im Knochenmark (PC), β 2-Mikroglobulin (β 2-MG), CRP, Albumin und Kreatinin

| | | tRANKL | PC | β 2-MG | CRP | Albumin | Kreatinin |
|--------------|----|----------------|----------------|-----------------|---------------|-----------------|---------------|
| tRANKL | n= | 93 | 92 | 63 | 57 | 63 | 91 |
| | r= | 1,000 | 0,432** | 0,264* | -0,014 | -0,043 | 0,211* |
| | p= | - | 0,000 | 0,037 | 0,919 | 0,737 | 0,044 |
| PC | n= | 92 | 112 | 62 | 56 | 62 | 90 |
| | r= | 0,432** | 1,000 | 0,418** | 0,340* | -0,288* | 0,262* |
| | p= | 0,000 | - | 0,001 | 0,010 | 0,023 | 0,013 |
| β 2-MG | n= | 63 | 62 | 63 | 57 | 62 | 63 |
| | r= | 0,264* | 0,418** | 1,000 | 0,252 | -0,349** | 0,295* |
| | p= | 0,037 | 0,001 | - | 0,059 | 0,005 | 0,019 |
| CRP | n= | 57 | 56 | 57 | 57 | 57 | 57 |
| | r= | -0,014 | 0,340* | 0,252 | 1,000 | -0,174 | 0,094 |
| | p= | 0,919 | 0,010 | 0,059 | - | 0,196 | 0,487 |
| Albumin | n= | 63 | 62 | 62 | 57 | 63 | 63 |
| | r= | -0,043 | -0,288* | -0,349** | -0,174 | 1,000 | -0,139 |
| | p= | 0,737 | 0,023 | 0,005 | 0,196 | - | 0,278 |
| Kreatinin | n= | 91 | 90 | 63 | 57 | 63 | 91 |
| | r= | 0,211* | 0,262* | 0,295* | 0,094 | -0,139 | 1,000 |
| | p= | 0,044 | 0,013 | 0,019 | 0,487 | 0,278 | - |

* Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig)

** Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig)

3.5 Prognostische Bedeutung

3.5.1 Univariate Überlebensanalyse

In der univariaten Kaplan-Meier-Analyse wurde die prognostische Bedeutung der bekannten prognostisch relevanten Faktoren Alter, Ig-Typ, Deletion 13q14, β 2-Mikroglobulin, CRP, Albumin, ISS-Stadium, und Plasmazell-Infiltrationsgrad bei Patienten mit symptomatischem MM untersucht. Zur Dichotomisierung der Daten wurden die in der Literatur beschriebenen cut-off-Werte (siehe oben) verwendet. Die mediane Beobachtungszeit lag bei 40 Monaten. Es konnte die prognostische Bedeutung der Parameter Deletion 13q14 ($p= 0,003$), β 2-Mikroglobulin ($p= 0,013$), ISS-Stadium ($p= 0,029$), und Plasmazell-Infiltrationsgrad ($p= 0,035$) für das Gesamtüberleben bestätigt werden (Abbildung 11). Für die Faktoren Alter (≤ 60 Jahre versus > 60 Jahre; $p= 0,34$), Ig-Typ ($p= 0,59$), CRP ($p= 0,16$) und Albumin ($p= 0,21$) fand sich keine signifikante prognostische Relevanz.

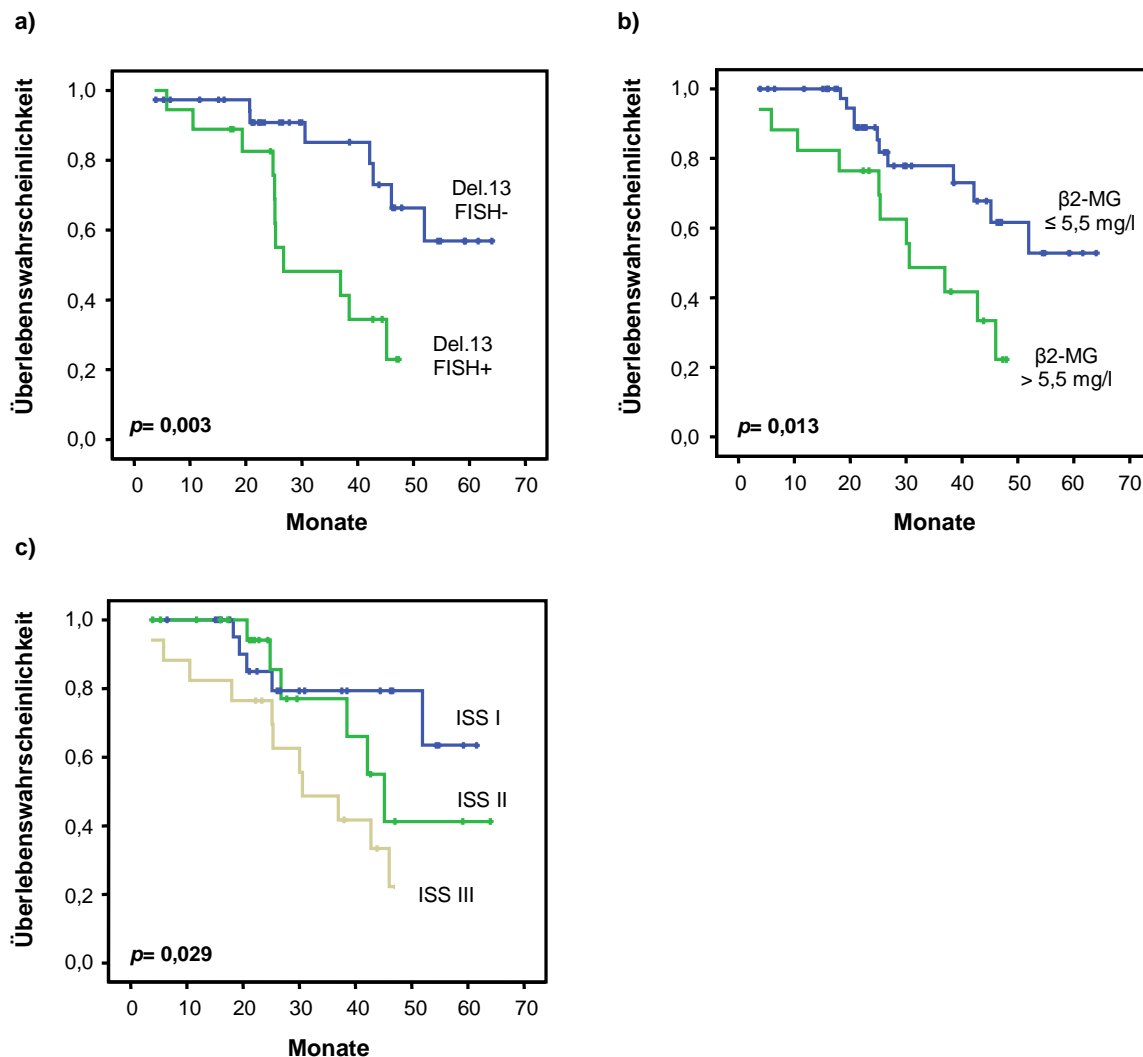


Abbildung 11: Kaplan-Meier-Überlebensfunktion bei symptomatischem MM: a) Deletion 13q14 ($p= 0,003$), b) $\beta 2$ -MG ($p= 0,013$), c) ISS I-III ($p= 0,029$).

Außerdem wurde die prognostische Bedeutung von tRANKL bei 93 Patienten mit MM der Stadien I bis III nach Durie und Salmon untersucht. Wie oben beschrieben, lag der Median der Serum tRANKL-Werte in der Gruppe der Myelompatienten bei 216,64 pmol/l.

Es zeigte sich, dass Myelompatienten mit Serum tRANKL-Werten kleiner oder gleich dem Median ein signifikant längeres Gesamtüberleben aufwiesen als Patienten mit tRANKL-Werten, die über den Medianwert erhöht waren ($p < 0,001$; Abbildung 12a). Die mediane Überlebenszeit wurde für Patienten mit tRANKL Werten $\leq 216,64$ pmol/l nicht erreicht und lag bei Patienten mit Werten $> 216,64$ pmol/l bei 43 Monaten.

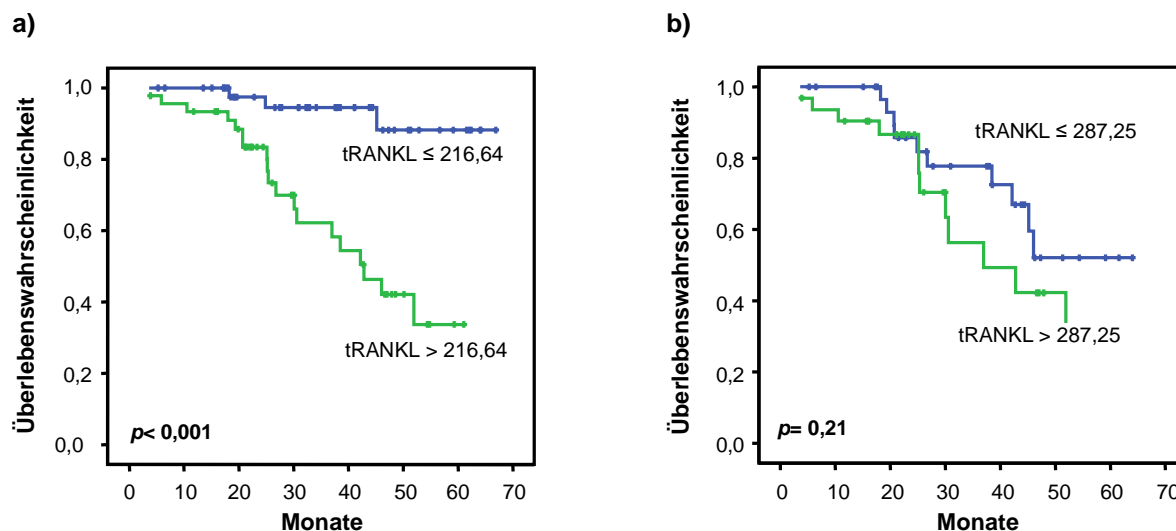
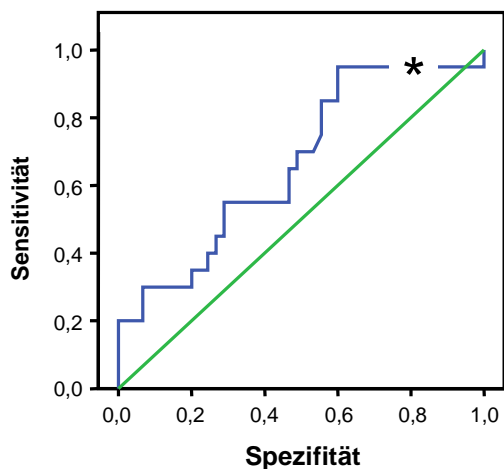


Abbildung 12: Kaplan-Meier-Überlebensfunktion bei Patienten mit MM: a) MM I-III, tRANKL dichotomisiert nach Median (216,64 pmol/l), b) symptomatisches MM, tRANKL dichotomisiert nach Median (287,25 pmol/l).

Außerdem wurde die prognostische Bedeutung von tRANKL in der Gruppe der Patienten mit symptomatischem MM untersucht. Unter Anwendung des Medianwertes der Messwerte bei Patienten mit symptomatischem MM (287,25 pmol/l) zur Dichotomisierung der Risikogruppen war tRANKL kein signifikanter prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben ($p = 0,21$; Abbildung 12b). In der ROC-Analyse konnte für diese Gruppe ein cut-off-Wert, als der Wert mit der maximalen Summe aus Sensitivität und Spezifität, von 112,8 pmol/l ermittelt werden (Abbildung 13).



ROC Koordinaten

| ROC Variable | Sensitivität | Spezifität |
|--------------|--------------|------------|
| tRANKL | | |
| * | 112,8100 | 0,950 |

Abbildung 13: ROC-Analyse für die Variable tRANKL in Bezug auf das Gesamtüberleben. Es wurde ein cut-off-Wert von 112,81 pmol/l mit einer Spezifität > 75% und Sensitivität von 95% ermittelt.

Unter Anwendung dieses cut-off-Wertes war tRANKL in der Gruppe mit symptomatischem MM ein signifikanter prognostischer Faktor ($p < 0,001$; Abbildung 14).

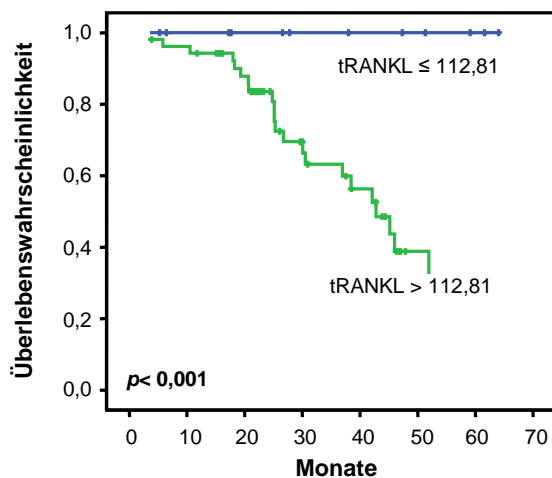


Abbildung 14: Kaplan-Meier-Überlebensfunktion für tRANKL bei symptomatischem MM, dichotomisiert nach ROC-ermitteltem cut-off-Wert (112,81 pmol/l; $p < 0,001$).

In einer Subgruppenanalyse wurde weiterhin untersucht, ob Patienten mit symptomatischem MM, die erhöhte tRANKL-Spiegel aufwiesen, von einer Hochdosistherapie profitierten. Während die HDCT in der gesamten Gruppe der symptomatischen MM kein prognostischer Faktor war ($p = 0,62$; Abbildung 15a), zeigte sich

in der Gruppe mit erhöhten tRANKL-Werten ein Vorteil der Hochdosistherapie ($p= 0,037$; Abbildung 15b).

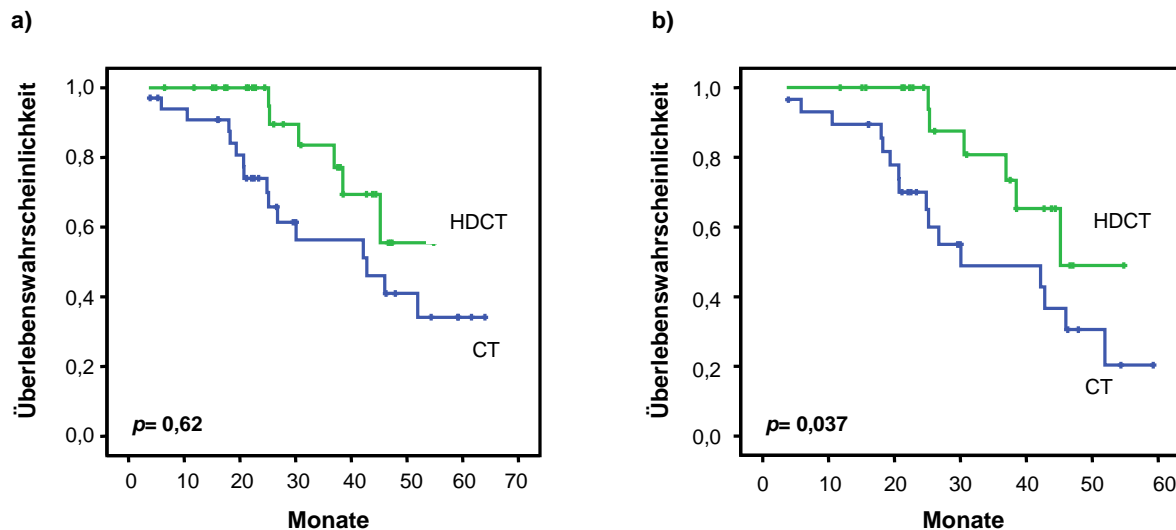


Abbildung 15: Kaplan-Meier-Überlebensfunktion für Hochdosistherapie (HDCT) bei symptomatischem MM: a) alle Patienten mit symptomatischem MM ($p= 0,62$), b) Patienten mit symptomatischem MM und erhöhten tRANKL-Werten (cut-off-Wert: 112,81 pmol/l; $p= 0,037$).

3.5.2 Multivariate Überlebensanalyse

Um die prognostische Bedeutung von tRANKL beim multiplen Myelom unter Einfluss der oben genannten klinisch relevanten Faktoren zu analysieren, wurde ein multivariates Cox-Regressionsmodell angewandt. Neben tRANKL wurden hierbei die in der univariaten Analyse signifikanten Faktoren Deletion 13q14, $\beta 2$ -Mikroglobulin, ISS-Stadium und Plasmazell-Infiltrationsgrad einbezogen. Alle oben genannten Faktoren wurden gemeinsam in die Cox-Regression eingeschlossen. In diesem Gesamtmodell konkurrierten alle Faktoren mit gleicher Gewichtung. Hierbei konnten die Parameter Deletion 13q14 und ISS als unabhängige prognostische Faktoren identifiziert werden. Im Wald-Test zeigte sich für die Deletion 13q14 eine prognostische Signifikanz von $p= 0,012$ und für ISS von $p= 0,039$. Die Hazard Ratio betrug 4,12 für das Vorliegen einer Deletion 13q14; 1,4 für das Vorliegen eines ISS-Stadiums II und 4,4 für ISS-Stadium III. Für den in der univariaten Analyse signifikanten Faktor Serum tRANKL konnte in diesem Modell keine prognostische

Signifikanz ermittelt werden. Die Ergebnisse der univariaten und multivariaten Analyse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tabelle 8: Multivariate Cox-Regressionsanalyse von tRANKL mit in der univariaten Analyse signifikanten prognostischen Faktoren

| Parameter | n= | p= (Log-Rank-Test) | p= (Wald-Test) | Relatives Risiko | 95% CI |
|-----------------------|----|-----------------------|-------------------|---------------------|-------------|
| tRANKL | | | | | |
| ≤ 112,81 pmol/l | 12 | | | - | - |
| > 112,81 pmol/l | 53 | <i>p</i> < 0,001 | <i>p</i> = 0,96 | - | - |
| Deletion 13q14 | | | | | |
| FISH - | 37 | | | 1,00 | |
| FISH + | 18 | <i>p</i> = 0,003 | <i>p</i> = 0,012 | 4,12 | 1,36- 12,48 |
| ISS-Stadium | | | | | |
| ISS I | 25 | | | - | - |
| ISS II | 22 | | | 1,40 | 0,32- 6,65 |
| ISS III | 17 | <i>p</i> = 0,029 | <i>p</i> = 0,039 | 4,40 | 1,16- 16,40 |

4. Diskussion:

4.1 Zelluläre Interaktionen im Knochenmarkmikromilieu beim multiplen Myelom

Die pathophysiologischen Prozesse der osteolytischen Knochendestruktion beim MM spielen sich im Knochenmarkmikromilieu ab. Die Erkenntnisse über die Interaktion der Myelomzellen mit Stromazellen, Endothelzellen, Osteoblasten und Osteoklasten haben in den letzten Jahren wesentlich zum Verständnis der Tumorbilogie beim multiplen Myelom beigetragen (Anderson 2003, Yaccoby et al. 2004, Hideshima et al. 2007). Die verschiedenen Signale zur Proliferation, Differenzierung, Invasion, Apoptose oder Chemoresistenz werden via direktem Zell-Zell-Kontakt sowie mittels parakriner oder autokriner Sekretion (Nefedova et al. 2003) vermittelt. Da es sich hierbei um lokal im Knochenmarkmikromilieu stattfindende Prozesse handelt, ist nicht notwendigerweise zu erwarten, dass diese Vorgänge durch Surrogatparameter im Blut reflektiert werden, wie dies zum Beispiel für verschiedene Zytokine (Andersen et al. 2005), Angiogenesefaktoren (Jakob et al. 2006), Knochenstoffwechselfparameter (Heider et al. 2006a) oder zirkulierendes Proteasom (Jakob et al. 2007) gezeigt werden konnte. So waren bisher auch keine im Serum messbaren Mediatoren bekannt, die den Prozess der Osteoklastenaktivierung widerspiegeln.

4.2 Rolle der Osteoklasten

Myelomzellen fördern die Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen zu reifen Osteoklasten, die ihrerseits das Überleben der Myelomzellen unterstützen (Mundy et al. 1974). Wesentlich für die Proliferation und Differenzierung der Osteoklastenvorläuferzellen sowie für die Aktivierung der reifen Osteoklasten ist der Mediator RANKL. Wie in den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, wird RANKL nicht nur von Osteoblasten und Knochenmarkstromazellen (Lacey et al. 1998) sondern auch von den Myelomzellen selbst exprimiert (Sezer et al. 2002a, 2002b) und induziert eine direkte Osteoklastenaktivierung im Knochenmarkmikromilieu.

Die osteolytische Knochendestruktion als ein Hauptcharakteristikum des MM ist die Folge eines Ungleichgewichts zwischen der Osteoklasten- und der Osteoblastenaktivität im

Knochenmark. Myelomzellen stimulieren hierbei die Aktivität der Osteoklasten und supprimieren die Osteoblastenfunktion (Hecht et al. 2007, Giuliani et al. 2006, Evans et al. 1992, Baitaille et al. 1991). Im Gegenzug begünstigen Osteoklasten die Progression des Myeloms direkt durch Zell-Zell-Kontakt und indirekt durch Zytokine, die während der Knochendestruktion aus der Knochenmatrix freigesetzt werden und so einen Circulus vitiosus aus Knochenabbau und Tumorzellwachstum unterhalten. Wie ebenfalls durch neuere Arbeiten der Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, lassen sich die Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität durch neue Substanzen, wie zum Beispiel Proteasominhibitoren günstig beeinflussen (Zavrski et al. 2007, Heider et al. 2006b)

4.3 Marker der osteolytischen Knochendestruktion

Im Hinblick auf das Ausmaß der osteolytischen Knochendestruktion sind die biochemischen Marker der Knochenresorption von besonderem Interesse, da andere Parameter der Krankheitsaktivität nicht mit der Knochenresorption korrelieren.

Bei den meisten Markern der Knochenresorption handelt es sich um Kollagen-Abbauprodukte wie das unspezifische Hydroxyprolin, die spezifischen Kollagen-Crosslinks, sowie die amino- und carboxyterminalen Telopeptide. Für die Marker ICTP, DPD und NTx ist eine Korrelation mit dem Ausmaß der Knochenresorption bereits beschrieben worden (Abildgaard et al. 1997, Eriksen et al. 1993, Abildgaard et al. 2000). Darüber hinaus konnten wir für ICTP signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Krankheitsstadien sowie eine prognostische Bedeutung beim multiplen Myelom zeigen (Jakob et al. 2002). Eine Übersicht zur Korrelation der Spiegel der Knochenresorptions-Marker mit klinischen Daten bei Patienten mit MM findet sich in Tabelle 9.

Die Messung von Faktoren, die bereits im Stadium der Osteoklasten- oder Osteoblastenaktivität modulierend wirken, könnte bereits in einem früheren Schritt der Knochenresorption hilfreiche Informationen liefern als die der Kollagenabbauprodukte, die einen Endpunkt in der Knochenresorption erfassen.

| Parameter | n= | Vergleich mit Kontrolle | Korrelation mit Ausmaß der Knochenbeteiligung | Prognostische Bedeutung für Überleben | Referenz |
|------------|-----|-------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| OC | 17 | NS | - | - | Nawawi et al. 1996 |
| | 109 | NS | - | Ja | Abildgaard et al. 1997 |
| | 73 | NS | Keine | Keine | Carlson et al. 1999 |
| | 313 | ↓ | Keine | Keine | Fonseca et al. 2000 |
| | 62 | ↓ | - | - | Terpos et al. 2000 |
| | 43 | NS | - | - | Woitge et al. 2001 |
| | 52 | ↓ | Keine | - | Corso et al. 2001 |
| | 38 | ↑ | Keine | - | Alexandrakis et al. 2002 |
| | 121 | ↓ | Ja | Keine | Terpos et al. 2003 |
| bALP | 17 | NS | - | - | Nawawi et al. 1996 |
| | 109 | ↑ | - | Keine | Abildgaard et al. 1997 |
| | 15 | ↓ | - | - | Withold et al. 1998 |
| | 313 | NS | Ja | Keine | Fonseca et al. 2000 |
| | 62 | ↓ | - | - | Terpos et al. 2000 |
| | 46 | ↓ | - | - | Woitge et al. 2001 |
| | 52 | NS | Keine | - | Corso et al. 2001 |
| | 38 | NS | Keine | - | Alexandrakis et al. 2002 |
| | 121 | ↓ | Keine | Keine | Terpos et al. 2003 |
| BSP | | ↑ | - | - | Woitge et al. 1999 |
| DPD | 17 | ↑ | - | - | Nawawi et al. 1996 |
| | 15 | ↑ | - | - | Withold et al. 1998 |
| | 73 | ↑ | Ja | Keine | Carlson et al. 1999 |
| | 18 | ↑ | - | - | Woitge et al. 1999 |
| | 52 | ↑ | Ja | - | Corso et al. 2001 |
| | 57 | ↑ | Ja | Keine | Jakob et al. 2002 |
| | 38 | ↑ | Ja | - | Alexandrakis et al. 2002 |
| | 34 | ↑ | Ja | - | Abildgaard et al. 2003 |
| TRACP | 17 | NS | - | - | Nawawi et al. 1996 |
| | 313 | ↑ | Keine | Keine | Fonseca et al. 2000 |
| TRACP-5b | 121 | ↑ | Ja | Keine | Terpos et al. 2003 |
| PICP | 17 | NS | - | - | Nawawi et al. 1996 |
| | 109 | NS | - | Keine | Abildgaard et al. 1997 |
| | 15 | ↓ | - | - | Withold et al. 1998 |
| | 73 | NS | Keine | Keine | Carlson et al. 1999 |
| | 313 | NS | Keine | Keine | Fonseca et al. 2000 |
| ICTP | 109 | ↑ | - | Ja | Abildgaard et al. 1997 |
| | 73 | ↑ | Ja | Ja | Carlson et al. 1999 |
| | 313 | ↑ | Ja | Ja | Fonseca et al. 2000 |
| | 57 | ↑ | Ja | Ja | Jakob et al. 2002 |
| | 34 | ↑ | Ja | - | Abildgaard et al. 2003 |
| | 103 | - | Ja | Ja | Schütt et al. 2008 |
| PIIINP | 109 | ↑ | - | Keine | Abildgaard et al. 1997 |
| PYD | 15 | ↑ | - | - | Withold et al. 1998 |
| | 18 | ↑ | - | - | Woitge et al. 1999 |
| | 38 | ↑ | Ja | - | Alexandrakis et al. 2002 |
| | 34 | ↑ | Ja | - | Abildgaard et al. 2003 |
| NTX | 18 | ↑ | - | - | Woitge et al. 1999 |
| | 62 | ↑ | - | - | Terpos et al. 2000 |
| | 57 | NS | Keine | p= 0,05 | Jakob et al. 2002 |
| | 38 | ↑ | Ja | - | Alexandrakis et al. 2002 |
| | 34 | ↑ | Ja | - | Abildgaard et al. 2003 |
| | 121 | ↑ | Ja | Keine | Terpos et al. 2003 |
| CTX | 18 | ↑ | - | - | Woitge et al. 1999 |
| sRANKL/OPG | 121 | ↑ | Ja | Ja | Terpos et al. 2003 |
| | 66 | ↑ | Ja | - | Goranova et al. 2007 |

| | | | | | |
|--------|-----|---|----|-------|----------------------|
| sRANKL | 66 | ↑ | Ja | - | Goranova et al. 2007 |
| | 121 | ↑ | Ja | Keine | Terpos et al. 2003 |

Tabelle 9: Literaturübersicht zur Korrelation verschiedener Knochenresorptionsmarker mit klinischen Daten beim MM; Kontrolle= gesunde Probanden; n= Patientenzahl, NS= nicht signifikant, - = nicht verfügbar, DPD= Desoxypyridinolin, TRACP= Tartrat-resistente saure Phosphatase, TRACP-5b= TRACP Isoform Typ 5b, OC= Osteocalcin, bALP= knochenspezifische alkalische Phosphatase, PICP= carboxyterminales Propeptid von Prokollagen Typ I, ICTP= carboxyterminales Typ I Kollagen Telopeptid, PIIINP= aminoternales Propeptid von Prokollagen Typ III, PYD= Pyridinolin, NTX= aminoternales Kollagen Typ I, CTX= carboxyterminales Kollagen Typ I, BSP= Bone-Sialoprotein, sRANKL/OPG= soluble Receptor activator of nuclear factor κ B ligand/Osteoprotegerin-Ratio, ↑= Anstieg ($p < 0,05$), ↓= Abfall ($p < 0,05$).

4.4 RANKL/OPG-Verhältnis bei verschiedenen Erkrankungen

Molekular- und zellbiologische Untersuchungen belegen, dass die gesteigerte Knochenresorptionsaktivität bei verschiedenen Erkrankungen, wie der Osteoporose, der rheumatoiden Arthritis (RA) oder dem multiplen Myelom auf Störungen des OPG/RANKL/RANK-Systems beruht (Teitelbaum 2000, Hofbauer et al. 2004). Bei rheumatoider Arthritis ließen sich als Marker der Osteoklastenaktivierung erhöhte sRANKL-Werte im Serum der Patienten gegenüber gesunden Kontrollen nachweisen (Median: 272 vs. 229 pg/ml, $p < 0,005$; Ziolkowska et al. 2002). Die Messung der sRANKL-Konzentration erfolgte hierbei mit einem ELISA-Test, der von der Arbeitsgruppe selbst entwickelt wurde. Die proinflammatorische, Zytokin-vermittelte Produktion des Knochen-protectiven OPG könnte bei der RA den Versuch einer Gegensteuerung darstellen, um die übermäßige sRANKL-Produktion zu kompensieren, was sich in einem hochregulierten, jedoch balancierten RANKL/OPG-Verhältnis widerspiegelte (Ziolkowska et al. 2002). Im Gegensatz zur RA zeigte sich bei einem Vergleich postmenopausaler (unbehandelt vs. Östrogensubstitutionstherapie) und prämenopausaler Frauen kein Unterschied hinsichtlich der Serum sRANKL-Spiegel zwischen allen Gruppen (Median: 0,84 vs. 1,37 vs. 1,55 pmol/l).

Patienten mit Prostatakarzinom und Knochenmetastasen, die bei dieser Erkrankung in der Regel osteoblastisch sind, zeigten erhöhte OPG-Serumspiegel gegenüber Patienten ohne ossäre Metastasen sowie gegenüber Patienten mit benigner Prostatahyperplasie (BPH) oder gesunden Kontrollpersonen, welche alle vergleichbare OPG-Spiegel aufwiesen. Im Gegensatz zu OPG waren die sRANKL-Werte im Serum nicht erhöht und zeigten keinen Unterschied zwischen Kontrollen, BPH und den Prostatakarzinom-Subgruppen (Jung et al. 2003). In dieser Arbeit wurde der bis dahin gängige sRANKL-Test (sRANKL-ELISA-Test,

No. KB 1014; Immundiagnostik, Bensheim, Germany) verwendet. Zum Mammakarzinom sind präklinische Daten publiziert, in denen das Vorliegen von Knochenmetastasen, die bei dieser Erkrankung häufiger osteolytisch imponieren, mit einer erhöhten RANKL-mRNA-Expression im Knochen korrelierte (Oshiba et al. 2003).

4.5 RANKL beim multiplen Myelom

Myelomzellen sind mittels verschiedener Mechanismen in der Lage, das OPG/RANKL-Gleichgewicht im Knochenmarkmikromilieu zugunsten von RANKL zu verschieben. An CD138-positiven Plasmazellen, die aus dem Knochenmark von Patienten mit multiplen Myelom sortiert wurden, konnten wir mittels Durchflusszytometrie nachweisen, dass Myelomzellen bei Patienten mit osteolytischen Knochenläsionen auf der Zelloberfläche eine signifikant höhere RANKL-Expression aufweisen als bei Patienten ohne Knochendestruktion (Heider et al. 2003).

Darüber hinaus erhöhen die Myelomzellen auch über indirekte Mechanismen die lokale RANKL-Expression, indem sie die RANKL-Expression auf Knochenmarkstroma- und Knochenmarkendothelzellen, (BMECs, bone marrow-derived endothelial cells) durch Zell-Zell-Kontakt stimulieren (Okada et al. 2003).

Aufgrund der besonderen Rolle von RANKL beim MM und der klinischen Notwendigkeit, die myelombedingte Knochendestruktion frühzeitig zu erfassen, ist es von besonderem Interesse, ob sich die lokal erhöhte RANKL-Expression im Knochenmark auch mit einer einfacheren Bestimmung im peripheren Blut erfassen lässt.

4.6 Messung von RANKL im Serum

Die bisherigen Ergebnisse zur Ermittlung der RANKL-Konzentration im peripheren Blut basieren auf der Bestimmung des löslichen, nicht-OPG-gebundenen RANKL (sRANKL). Zur Messung von sRANKL bei Patienten mit MM liegen derzeit nur wenige Daten vor. Lediglich Terpos et al. sowie kürzlich die Arbeitsgruppe um Goranova-Marinova et al. beschrieben einen Anstieg von sRANKL im Serum von Myelompatienten gegenüber gesunden Kontrollen (Terpos et al. 2003, Goranova-Marinova et al. 2007). In einer ebenfalls kürzlich erschienen Arbeit von Schütt et al. wurde ebenfalls sRANKL bei Patienten mit MM bestimmt. Im Gegensatz zu den oben genannten Arbeiten, konnte hier

keine Korrelation von sRANKL mit Krankheitsstadium, Ausmaß der Knochenbeteiligung oder dem Überleben gezeigt werden. Allerdings bestand das Patientenkollektiv überwiegend aus vorbehandelten Patienten (Schütt et al. 2008). Außerdem wurde hier ein anderer ELISA-Test als in der Arbeit von Terpos et al. verwendet.

Erste Messungen in unserem Labor zeigten, dass bei einem großen Teil der Patienten mit MM im Frühstadium oder mit MGUS die sRANKL-Werte im Serum mit dem von Terpos et al. verwendeten sRANKL-Test (sRANKL ELISA kit, Immundiagnostik, Bensheim, Deutschland) nicht messbar waren. Andere Arbeitsgruppen bestätigten diese Ergebnisse mit dem gleichen sRANKL ELISA Kit (Kruk et al. 2002). Aus diesem Grund wurde ein neuer ELISA-Test-Kit zur Messung des total-RANKL (= freies und OPG-gebundenes RANKL) entwickelt (total sRANKL ELISA, Immundiagnostik, Bensheim, Deutschland), zu dessen Einsatz bislang noch keine Daten publiziert worden sind.

Mit dem neuen ELISA-Test konnten wir im Rahmen der vorliegenden Arbeit tRANKL erstmalig bei dem überwiegenden Teil unserer Proben messen. Serum tRANKL konnte bei insgesamt 116 von 133 Proben bestimmt werden, wobei 95 Proben mit dem empfohlenen Verdünnungsverhältnis 1:100 und weitere 21 in einfacher Verdünnung gemessen wurden. Die von Kruk et al. mit dem sRANKL ELISA-Kit ermittelten Werte lagen für die Myelompatienten im Median bei 3,4 pg/ml gegenüber 5,0 pg/ml bei gesunden Kontrollen ($p= 0,01$), sRANKL war bei ca. der Hälfte der MM-Patienten mit diesem Test nicht detektierbar (Kruk et al. 2002). Terpos et al. und Goranova-Marinova et al. beschrieben ebenfalls einen Anstieg von sRANKL im Serum von Myelompatienten gegenüber gesunden Kontrollen. Die gemessenen sRANKL-Werte wurden in diesen Studien mit einem Median von 7,06 beziehungsweise 0,458 pmol/l für die Myelompatienten und 2,66 beziehungsweise 0,203 pmol/l für die Kontrollen angegeben (Terpos et al. 2003, Goranova-Marinova et al. 2007). Allerdings fanden sich in der letztgenannten Arbeit keine Angaben zum verwendeten ELISA-Test. Insgesamt zeigte sich, dass mit dem von uns verwendeten tRANKL-ELISA ein höherer Anteil von Myelompatienten messbare Werte aufwies und die Messung des total-RANKL ca. 20-fach höhere Messwerte lieferte als in den publizierten Messungen mit dem sRANKL-ELISA.

In den Gruppenvergleichen zeigte sich, dass Patienten mit MM im Median signifikant höhere tRANKL-Werte im Serum aufwiesen als gesunde Probanden oder MGUS-Patienten

(jeweils $p < 0,001$). Hierbei lag der mediane tRANKL-Wert in der Gruppe mit MGUS nicht nur signifikant unter dem Median des gesamten Kollektivs der Myelompatienten (Stadium I bis III nach Durie und Salmon) sondern auch unter dem für die Gruppe der Patienten im Stadium I. Dies deutet darauf hin, dass beim multiplen Myelom im Stadium I bereits frühzeitig eine Osteoklastenaktivierung stattfindet, die klinisch noch nicht sichtbar ist. Möglicherweise könnte die Messung von tRANKL in Zukunft ein Unterscheidungsmerkmal für die klinisch bedeutsame Differenzierung zwischen MGUS und MM im Stadium I darstellen und/oder als Surrogatparameter einer frühen osteolytischen Aktivierung im Stadium I dienen. Bei Patienten mit MM im Stadium I-III konnten wir eine Korrelation der tRANKL-Serumkonzentrationen mit dem Ausmaß der Knochenbeteiligung zeigen. Myelompatienten mit mindestens einer radiologisch detektierbaren Osteolyse wiesen signifikant höhere tRANKL-Werte auf als Patienten ohne Knochenläsionen (Median: 111,53 pmol/l versus 296,1 pmol/l; $p < 0,001$). Terpos et al. und Goranova-Marinova et al. zeigten in Übereinstimmung dazu einen Anstieg der sRANKL/OPG-Ratio parallel zum Ausmaß der Knochenbeteiligung (Terpos et al. 2003, Goranova-Marinova et al. 2007). Für sRANKL und/oder OPG allein wurde in der Arbeit von Terpos et al. keine Korrelation beschrieben. Auch Seidel et al. konnten erhöhte sRANKL-Serumspiegel bei MM-Patienten mit Knochenbeteiligung gegenüber Patienten ohne Osteolysen messen (Seidel et al. 2001). Neben der Korrelation mit der Knochenbeteiligung wies Serum tRANKL in unserer Analyse einen signifikanten Anstieg parallel zum Krankheitsstadium I-III nach Durie und Salmon sowie erstmals zum Stadium I-III nach dem ISS auf. Bei Patienten mit symptomatischem MM war tRANKL gegenüber Patienten mit „smoldering“ MM ebenfalls signifikant erhöht. Terpos et al. beschrieben zwar eine Korrelation des sRANKL/OPG Verhältnisses mit dem Krankheitsstadium nach Durie und Salmon, zu sRANKL wurden jedoch keine gesonderten Werte angegeben (Terpos et al. 2003). Goranova-Marinova et al. zeigten darüber hinaus eine signifikante Korrelation von sRANKL und sRANKL/OPG-Ratio mit dem ISS-Stadium ($p < 0,001$ jeweils; Goranova-Marinova et al. 2007).

Passend zum Anstieg von tRANKL parallel zum Krankheitsstadium, konnten wir in unserer Analyse eine signifikante Korrelation von Serum tRANKL mit Parametern der Tumorlast, wie dem Ausmaß der Plasmazell-Infiltration im Knochenmark und der β 2-Mikroglobulin-Konzentration im Serum nachweisen. Die ebenfalls ermittelte schwache Korrelation von

tRANKL mit dem Plasma-Kreatinin ist eher als Ausdruck der fortgeschrittenen Erkrankung und Nierenbeteiligung zu interpretieren. Während Terpos et al. ebenfalls eine Korrelation der sRANKL/OPG-Ratio mit der β 2-Mikroglobulin-Konzentration im Serum ($p < 0,0001$; Terpos et al. 2003) beschrieben, konnten Goranova-Marinova et al., zwar eine Korrelation mit der Plasmazell-Infiltration, nicht aber mit β 2-Mikroglobulin bestätigen (Goranova-Marinova et al. 2007).

Unabhängig von einem Ansprechen auf eine Behandlung haben wir bei 32 MM Patienten unter Chemotherapie mit konventioneller Zytostatika- und Bisphosphonattherapie einen signifikanten Abfall von tRANKL nach einem Therapieblock beobachtet. Einerseits könnte dies als ein Hinweis angesehen werden, dass eine Chemo- und Bisphosphonattherapie die tRANKL-Expression günstig beeinflusst, andererseits scheint tRANKL damit nicht als Marker für ein Therapiemonitoring in Betracht zu kommen, da es keine Unterschiede hinsichtlich eines Behandlungserfolges oder Therapieversagens detektierte.

Bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis zeigte sich eine Normalisierung der initial gegenüber gesunden Kontrollpersonen erhöhten sRANKL-Spiegel nach 14 bis 22 Wochen unter einer Anti-TNF α -Behandlung (Ziolkowska et al. 2002). Inwieweit die genannten Substanzen spezifische Effekte auf die RANKL-Expression haben, kann derzeit nicht beantwortet werden. Am wahrscheinlichsten ist der Abfall mit der therapiebedingten Abnahme der RANKL-exprimierenden Tumorzellpopulation zu erklären.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass tRANKL die Krankheitsaktivität und die Tumorzellmasse widerspiegeln. In Analogie zu den Daten mit sRANKL (Terpos et al 2003) zeigte sich in der univariaten Überlebensanalyse eine prognostische Bedeutung für tRANKL sowohl in der Gesamtgruppe aller MM, als auch erstmalig in der Gruppe der symptomatischen MM. In dem multivariaten Cox-Regressionsmodell wurden neben tRANKL die in der univariaten Analyse signifikanten Faktoren ISS-Krankheitsstadium und Deletion 13q14 einbezogen. Die Parameter Deletion 13q14 und ISS blieben in einem schrittweise ausschließenden Modell als unabhängige prognostische Faktoren übrig, während tRANKL in diesem Modell ausgeschlossen wurde. In der oben genannten Arbeit von Terpos et al. erwiesen sich nur sRANKL/OPG-Ratio, β 2-Mikroglobulin und CRP als unabhängige prognostische Parameter, wobei die erhöhte sRANKL/OPG-Ratio das größte relative Risiko darstellte. Somit konnte in unserer Untersuchung die RANKL-Konzentration im Serum zwar als

prognostischer Parameter für das Gesamtüberleben identifiziert werden, jedoch liefert tRANKL in der multivariaten Analyse keine zusätzliche prognostische Information, die über die der bekannten prognostischen Faktoren hinausging. In einer Subgruppenanalyse konnten wir jedoch zeigen, dass die HDCT bei Patienten mit erhöhten tRANKL-Werten einen Überlebensvorteil zeigte, während dies in der Gesamtgruppe aller symptomatischen MM nicht der Fall war.

Insgesamt liefern die Daten Hinweise dafür, dass tRANKL als Surrogatparameter für eine, schon im Frühstadium einsetzende, myelombedingte Osteoklastenaktivierung dienen könnte. Aufgrund des Überlebensvorteils der Patienten mit HDCT in der Subgruppe der Patienten mit erhöhten tRANKL-Werten, könnte tRANKL außerdem als ein Parameter zur Risikostratifikation in der Therapieplanung von Patienten mit symptomatischem MM evaluiert werden.

5. Zusammenfassung und Ausblick:

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass zirkulierendes tRANKL mit dem neuen ELISA-Tests im Serum bei der Mehrzahl der MM-Patienten messbar ist. Die Serum tRANKL-Konzentration ist parallel zum Krankheitsstadium und zum Ausmaß einer osteolytischen Knochenbeteiligung erhöht. Bemerkenswert erscheint, dass schon im Stadium I eine im Vergleich zu MGUS erhöhte tRANKL-Konzentration vorliegt, was in Übereinstimmung mit vorherigen Daten zu anderen Knochenstoffwechselfparametern, auf eine frühe Osteoklastenaktivierung hindeutet. Eine kombinierte Chemo- und Bisphosphonattherapie scheint einen positiven Effekt auf die RANK-Ligand Expression und somit auf die osteoklastische Knochendestruktion auszuüben.

In der univariaten Analyse ließ sich tRANKL erstmals als prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben bei Patienten mit MM im Stadium I-III und mit symptomatischem MM identifizieren. In einer Subgruppenanalyse zeigte sich ein Überlebensvorteil der HDCT bei Patienten mit erhöhten tRANKL-Werten, während dies in der Gesamtgruppe aller symptomatischen MM nicht der Fall war.

Aufgrund der Daten der vorliegenden Arbeit könnte für weiterführende Studien insbesondere eine mögliche prädiktive Bedeutung von tRANKL für die Entwicklung einer Knochenbeteiligung beziehungsweise für skelettale Ereignisse von Interesse sein.

6. Abkürzungen

| | |
|-----------|--------------------------------------------------|
| β2-MG | β2-Mikroglobulin |
| CI | Konfidenzintervall |
| CRP | C-reaktives Protein |
| CTx | carboxyterminales Kollagen Typ I |
| DPD | Desoxypyridinolin |
| FISH | Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung |
| HDCT | Hochdosischemotherapie |
| ICTP | carboxyterminales Typ I Kollagen Telopeptid |
| Ig | Immunglobulin |
| IL-6 | Interleukin-6 |
| ISS | International Staging System |
| MGUS | monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz |
| MIP | macrophage inflammatory protein |
| MM | multiplés Myelom |
| M-Protein | Monoklonales Protein |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| NTx | aminoternales Telopeptid Kollagen Typ I |
| OAF | osteoklastenaktivierender Faktor |
| OPG | Osteoprotegerin |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion |
| RANK | Receptor activator of nuclear factor κB |
| RANKL | Receptor activator of nuclear factor κB ligand |
| sRANKL | soluble RANKL |
| TACE | Metalloprotease-Disintegrin TNF-α Convertase |
| TNF | Tumor necrosis factor |
| tRANKL | total RANKL |

7. Literatur:

Abildgaard N, Bentzen SM, Nielsen JL et al. Serum markers of bone metabolism in multiple myeloma: prognostic value of the carboxy-terminal telopeptide of type I collagen (ICTP). Nordic Myeloma Study Group (NMSG). Br J Haematol 1997;96:103-10.

Abildgaard N, Glerup H, Rungby J et al. Biochemical markers of bone metabolism reflect osteoclastic and osteoblastic activity in multiple myeloma. Eur J Haematol 2000;64:121-9.

Abildgaard N, Brixen K, Kristensen JE et al. Comparison of five biochemical markers of bone resorption in multiple myeloma: elevated pre-treatment levels of S-ICTP and U-Ntx are predictive for early progression of the bone disease during standard chemotherapy. Br J Haematol 2003;120:235-42.

Ahlen J, Andersson S, Mukohyama H et al. Characterization of the bone-resorptive effect of interleukin-11 in cultured mouse calvarial bones. Bone 2002;31:242-51.

Alexanian R, Haut A, Khan AU et al. Treatment of multiple myeloma: combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. JAMA 1969;208:1680-5.

Alexandrakis MG, Passam FH, Malliaraki N et al. Evaluation of bone disease in multiple myeloma: a correlation between biochemical markers of bone metabolism and other clinical parameters in untreated multiple myeloma patients. Clin Chim Acta 2002;325:51-7.

Andersen NF, Standal T, Nielsen JL et al. Syndecan-1 and angiogenic cytokines in multiple myeloma: correlation with bone marrow angiogenesis and survival. Br J Haematol. 2005;128:210-7.

Anderson KC. Moving disease biology from the lab to the clinic. Cancer. 2003;97:796-801.

Aparicio A, Gardner A, Tu Y et al. In vitro cytoreductive effects on multiple myeloma cells induced by bisphosphonates. *Leukemia* 1998;12:220-9.

Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *NEJM* 1996;335:91-7.

Bataille R, Chappard D, Marcelli C et al. Osteoblast stimulation in multiple myeloma lacking lytic bone lesions. *Br J Haematol* 1990;76:484-7.

Bataille R, Chappard D, Marcelli C et al. Recruitment of new osteoblasts and osteoclasts is the earliest critical event in the pathogenesis of human multiple myeloma. *J Clin Invest* 1991;88:62-6.

Barlogie B, Jagannath S, Desikan KR C et al. Total therapy with tandem transplants for newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 1999;93:55-65.

Berenson JR, Lichtenstein A, Porter L et al. Efficacy of pamidronate in reducing skeletal events in patients with advanced multiple myeloma. *N Engl J Med* 1996;334:488-93.

Berenson JR, Lichtenstein A, Porter L et al. Long-term pamidronate treatment of advanced multiple myeloma patients reduces skeletal events. *J Clin Oncol* 1998;16:593-600.

Berenson JR, Hillner BE, Kyle RA et al. American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guidelines: The role of bisphosphonates in multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2002;20:3719-36.

Bruno B, Rotta M, Giaccone L et al. New drugs for treatment of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2004;5:430-42.

Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR et al. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* 1998;12:1260-8.

Carlson K, Larsson A, Simonsson B et al. Evaluation of bone disease in multiple myeloma: a comparison between the resorption markers urinary deoxypyridinoline/creatinine (DPD) and serum ICTP, and an evaluation of the DPD/osteocalcin and ICTP/osteocalcin ratios. *Eur J Haematol* 1999;62:300-6.

Clohisi DR, O'Keefe PF, Ramnaraine ML. Pamidronate decreases tumor-induced osteoclastogenesis in osteoporotic mice. *J Orthop Res* 2001;19:554-8.

Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F et al. Receptor activator of NF- κ B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulated by inflammatory cytokines and role in human osteoclastogenesis. *J Biol Chem* 2001;276:20659-72.

Corso A, Arcaini L, Mangiacavalli S et al. Biochemical markers of bone disease in asymptomatic early stage multiple myeloma. A study on their role in identifying high risk patients. *Haematologica* 2001;86:394-8.

Corso A, Dovic A, Rusconi C et al. Osteoprotegerin serum levels in multiple myeloma and MGUS patients compared with sex- and age-matched healthy controls. *Leukaemia* 2004;18:1555-7.

Cox DR. Regression models and life tables. *J R Stat Soc* 1972;34:187-220.

Croucher PI, De Hendrik R, Perry MJ et al. Zoledronic acid treatment of 5T2MM-bearing mice inhibits the development of myeloma bone disease: evidence for decreased osteolysis, tumor burden and angiogenesis, and increased survival. *J Bone Miner Res* 2003;18:482-92.

Derenne S, Amiot M, Barille S et al. Zoledronate is a potent inhibitor of myeloma cell growth and secretion of IL-6 and MMP-1 by the tumoral environment. *J Bone Miner Res* 1999;14:2048-56.

Dimopoulos MA, Moulopoulos LA, Datselis I et al. Imaging of myeloma bone disease-implications for staging, prognosis and follow-up. *Acta Oncol* 2000;39:823-7.

Durie BGM, 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* 1975;36:842-54.

Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest* 2003;111:1221-30.

Eriksen EF, Charles P, Melsen F et al. Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease: correlation with bone histomorphometry. *J Bone Mineral Res* 1993;8:127-32.

Evans CE, Ward C, Rathour L et al. Myeloma affects both the growth and function of human osteoblast-like cells. *Clin Exp Metastasis* 1992;10:33-8.

Flanagan AM, Chambers TJ. Inhibition of bone resorption by bisphosphonates: interactions between bisphosphonates, osteoclasts and bone. *Calcif Tissue Int* 1991;49:407-15.

Fleisch H. Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res* 2002;4:30-4.

Fonseca R, Trendle MC, Leong T et al. Prognostic value of serum markers of bone metabolism in untreated multiple myeloma patients. *Br J Haematol* 2000;109:24-9.

Greipp PR, San Miguel J, Durie BG et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005;23:3412-20.

Giuliani N, Rizzoli V, Roodman GD. Multiple myeloma bone disease: Pathophysiology of osteoblast inhibition. *Blood* 2006;108:3992-6.

Goranova-Marinova V, Goranov S, Pavolv P et al. Serum levels of OPG, RANKL and RANKL/OPG ratios in newly-diagnosed patients with multiple myeloma. Clinical correlations. *Haematological* 2007; 92:1000-1.

Hecht M, Heider U, Kaiser M et al. Osteoblasts promote migration and invasion of myeloma cells through upregulation of matrix metalloproteinases, urokinase plasminogen activator, hepatocyte growth factor and activation of p38 MAPK. *Br J Haematol.* 2007;138:446-58.

Heider U, Langelotz C, Jakob C et al. Expression of receptor activator of nuclear factor κ B ligand on bone marrow plasma cells correlates with osteolytic bone disease in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2003;9:1436-40.

Heider U, Fleissner C, Zavrski I et al. Bone markers in multiple myeloma. *Eur J Cancer.* 2006a;42:1544-53.

Heider U, Kaiser M, Müller C et al. Bortezomib increases osteoblast activity in myeloma patients irrespective of response to treatment. *Eur J Haematol.* 2006b;77:233-8.

Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G et al. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 2007;7:585-98.

Hjorth M, Hellquist L, Holmberg E et al. Initial versus deferred melphalan-prednisone therapy for asymptomatic multiple myeloma stage I - a randomized study. Myeloma Group of Western Sweden. *Eur J Haematol* 1993;50:95-102.

Hofbauer LC, Shui C, Riggs BL et al. Effects of immunosuppressants on receptor activator of NF-kappa B ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Comm* 2001;280:334-9.

Hofbauer LC, Kühne CA, Viereck V. The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases. *J Musculoskel Neuron Interact* 2004; 4(3):268-75.

Hughes DM, Wright KR, Uy HL et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in vitro and in vivo. *J Bone Min Res* 1995;10:1478-87.

International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003;121:749-57.

Ishida A, Fujita N, Kitazawa R et al. Transforming growth factor- β induces expression of receptor activator of NF- κ B ligand in vascular endothelial cells derived from bone. *J Biol Chem* 2002;277:26217-24.

Jakob C, Zavrski I, Heider U et al. Bone resorption parameters [carboxy-terminal telopeptide of type-I collagen (ICTP), amino-terminal collagen type-I telopeptide (NTx), and deoxypyridinoline (Dpd)] in MGUS and multiple myeloma. *Eur J Haematol*. 2002;69:37-42.

Jakob C, Zavrski I, Heider U et al. Serum levels of carboxy-terminal telopeptide of type-I collagen are elevated in patients with multiple myeloma showing skeletal manifestations in magnetic resonance imaging but lacking lytic bone lesions in conventional radiography. *Clin Cancer Res* 2003;9:3047-51.

Jakob C, Sterz J, Zavrski I et al. Angiogenesis in multiple myeloma. *Eur J Cancer*. 2006;42:1581-90.

Jakob C, Egerer K, Liebisch P et al. Circulating proteasome levels are an independent prognostic factor for survival in multiple myeloma. *Blood* 2007;109:2100-5.

Jung K, Stephan C, Semjonow A et al. Serum osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand as indicators of disturbed osteoclastogenesis in patients with prostate cancer. *J Urol* 2003;170: 2302-5.

Kong YY, Yoshida H, Sarosi I et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999a;397:315-23.

Kong YY, Feige U, Sarosi I et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature* 1999b;402:304-9.

Kruk B, Kraj M, Centkowski P et al. Osteoprotegerin and sRANKL serum levels in multiple myeloma patients. *Centr Eur J Immunol* 2002;27:129-35.

Kurihara N, Bertolini D, Suda T et al. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol* 1990;144:4226-30.

Kyle RA, Greipp PR. "Idiopathic" Bence Jones proteinuria: long-term follow-up in seven patients. *N Engl J Med*. 1982;306:564-7.

Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 2003;78:21-33.

Kyle RA, Yee GC, Somerfield MR et al. American Society of Clinical Oncology 2007 Clinical Practice Guideline Update on the Role of Bisphosphonates in Multiple Myeloma. *J Clin Oncol* 2007;25:2464-72.

Laakso M, Lahtinen R, Virkkunen P et al. Subgroup and cost-benefit analysis of the Finnish multicentre trial of clodronate in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1994;87:725-9.

Lacey DL, Timms E, Tan HL et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165-76.

Lee JW, Chung HY, Ehrlich LA et al. IL-3 expression by myeloma cells increases both osteoclast formation and growth of myeloma cells. *Blood* 2004;103:2308-15.

Lipton A, Ali SM, Leitzel K et al. Serum osteoprotegerin levels in are reduced in healthy controls and cancer patients. *Clin Cancer Res* 2002;8:2306-10.

Lum L, Wong BR, Josien R et al. Evidence for a role of a tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) -converting enzyme-like protease in shedding of TRANCE a TNF family member involved in osteoclastogenesis and dendritic cell survival. *J Biol Chem* 1999;274:13613-8.

Mariette X, Zagdanski AM, Guermazi A et al. Prognostic value of vertebral lesions detected by magnetic resonance imaging in patients with stage 1 multiple myeloma. *Br J Haematol* 1999;104:723-9.

McCloskey EV, MacLennan IC, Drayson MT et al. A randomized trial of the effect of clodronate on skeletal morbidity in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1998;100:317-25.

Mundy GR, Raisz LG, Cooper RA et al. Evidence for the secretion of an osteoclast stimulating factor in myeloma. *N Engl J Med* 1974;291:1041-6.

Nawawi H, Samson D, Apperley J et al. Biochemical bone markers in patients with multiple myeloma. *Clin Chim Acta* 1996;253:61-77.

Nefedova Y, Landowski TH, Dalton WS. Bone marrow stromal-derived soluble factors and direct cell contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms. *Leukemia* 2003;17:1175-82.

Oshiba T, Miyaura C, Inada M et al. Role of RANKL-induced osteoclast formation and MMP-dependent matrix degradation in bone destruction by breast cancer metastasis. *British J Cancer* 2003;88:1318-26.

Okada T, Akikusa S, Okuno H et al. Bone marrow metastatic myeloma cells promote osteoclastogenesis through RANKL on endothelial cells. *Clin Exp Metastasis* 2003;20:639-46.

Pan B, Farrugia AN, To LB et al. The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, influences RANKL expression in human osteoblast-like cells by activating TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Bone Mineral Res* 2004;19:147-54.

Pearse RN, Sordillo EM, Yaccoby S et al. Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:11581-6.

Rogers MJ, Gordon S, Benford HL et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer* 2002;88:2961-78.

Rosen LS, Gordon D, Kaminski M et al. Zoledronic acid versus pamidronate in the treatment of skeletal metastases in patients with breast cancer or osteolytic lesions of multiple myeloma: A phase III, double-blind, comparative trial. *Cancer J* 2001;7:377-87.

Rosen LS, Gordon D, Kaminski M et al. Long-term efficacy and safety of zoledronic acid compared with pamidronate disodium in the treatment of skeletal complications in patients with advanced multiple myeloma or breast carcinoma - a randomized, double-blind multicenter, comparative trial. *Cancer* 2003;98:1735-44.

Sato M, Grasser W, Endo N et al. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest* 1991;88:2095-105.

Sauty A, Pecherstorfer M, Zimmer-Roth I et al. Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha levels after bisphosphonates treatment in vitro and in patients with malignancy. *Bone* 1996;18:133-9.

Schütt P, Rebmann V, Brandhorst D et al. The clinical significance of soluble human leukocyte antigen class-I, ICTP, and RANKL molecules in multiple myeloma patients. *Human Immunology* 2008;69:79-87.

Seidel C, Hjertner O, Abildgaard N et al. Serum osteoprotegerin levels are reduced in patients with multiple myeloma with lytic bone disease. *Blood* 2001;98:2269-71.

Selander KS, Monkkonen J, Karhukorpi EK et al. Characteristics of clodronate-induced apoptosis in osteoclasts and macrophages. *Mol Pharmacol* 1996;50:1127-38.

Sezer O, Heider U, Jakob C et al. Human bone marrow myeloma cells express RANKL. *J Clin Oncol* 2002a;20:353-4.

Sezer O, Heider U, Jakob C et al. Immunocytochemistry reveals RANKL expression of myeloma cells. *Blood* 2002b;99:4646-7.

Sezer O, Heider U, Zavrski I et al. RANK ligand and osteoprotegerin in myeloma bone disease. *Blood* 2003a;101:2094-8.

Sezer O, Jakob C, Zavrski I et al. Bisphosphonates in early multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2003b;71:231-2.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-19.

Standal T, Seidel C, Hjertner O et al. Osteoprotegerin is bound, internalized, and degraded by multiple myeloma cells. *Blood* 2002;100:3002-7.

Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science* 2000;289:1504-8.

Terpos E, Palermos J, Tsionos K et al. Effect of pamidronate administration on markers of bone turnover and disease activity in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2000;65:331-6.

Terpos E, Szydlo R, Apperley JF et al. Soluble receptor activator of nuclear factor κ B ligand - osteoprotegerin ratio predicts survival in multiple myeloma: proposal for a novel prognostic index. *Blood* 2003;102:1064-9.

Terpos E, Mihou D, Szydlo R et al. The combination of intermediate doses of thalidomide with dexamethasone is an effective treatment for patients with refractory/relapsed multiple myeloma and normalizes abnormal bone remodeling, through the reduction of sRANKL/osteoprotegerin ratio. *Leukemia* 2005;19:1969-76.

Withold W, Arning M, Schwarz M et al. Monitoring of multiple myeloma patients by simultaneously measuring marker substances of bone resorption and formation. *Clin Chim Acta* 1998;269:21-30.

Woitge HW, Pecherstorfer M, Li Y et al. Novel serum markers of bone resorption: clinical assessment and comparison with established urinary indices. *J Bone Miner Res* 1999;14:792-801.

Woitge HW, Pecherstorfer M, Horn E et al. Serum bone sialoprotein as a marker of tumour burden and neoplastic bone involvement and as a prognostic factor in multiple myeloma. *Br J Cancer* 2001;84:344-51.

Wood J, Bonjean K, Ruetz S et al. Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302:1055-61.

Yaccoby S, Pearse RN, Johnson CL et al. Myeloma interacts with the bone marrow microenvironment to induce osteoclastogenesis and is dependent on osteoclast activity. *Br J Haematol* 2002;116:278-90.

Yaccoby S, Wezeman MJ, Henderson A et al. Cancer and the Microenvironment: Myeloma-Osteoclast Interactions as a Model. *Cancer Res* 2004;64:2016-23.

Zavrski I, Jakob C, Kaiser M et al. Molecular and clinical aspects of proteasome inhibition in the treatment of cancer. *Recent Results Cancer Res* 2007;176:165-76.

Ziolkowska M, Kurowska M, Radzikowska A et al. High levels of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor κ B ligand in serum of rheumatoid arthritis patients and their normalization after anti-tumor necrosis factor α treatment. *Arthritis & Rheumatism* 2002;46:1744-53.

8. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Professor Dr. Orhan Sezer für die Möglichkeit, in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie, Charité Campus Mitte, zu promovieren, für die freundliche Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Möglichkeit, ihn jederzeit bei Fragen anzusprechen. Darüber hinaus bedanke ich mich insbesondere bei Herrn Dr. Christian Jakob für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit, seine wissenschaftliche Unterstützung und das freundliche Arbeitsklima.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern danken, die mich während meiner gesamten akademischen Ausbildung liebevoll unterstützt haben, meinem Mann Alexander sowie meinen Kindern Kira und Armin für ihre moralische Unterstützung sowie für ihre grenzenlose Geduld.

9. Lebenslauf

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

10. Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Andrea Goerke, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Zirkulierende RANK-Ligand-Konzentrationen beim multiplen Myelom selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift