

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

DISSERTATION

Beeinflussung der Interaktion von Myelomzellen und Stromazellen
durch Hemmung von CD 38 mittels des monoklonalen Antikörpers
Daratumumab

The influence of inhibition of CD 38 with the monoclonal antibody
Daratumumab
on interaction between myeloma cells and stroma cells

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Małgorzata Lienhart
aus Krakau

Datum der Promotion: 30.11.2023

INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	I
TABELLENVERZEICHNIS	II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
ZUSAMMENFASSUNG.....	VI
ABSTRACT	VIII
1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Multiples Myelom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Klinisches Bild.....	1
1.1.3 Therapie	2
1.1.4 Pathogenese.....	3
1.2 Mesenchymale Stromazellen im Knochenmark (BMSC)	4
1.2.1 Allgemeine Biologie	4
1.2.2 Veränderungen bei Multiplem Myelom	4
1.3 Monoklonale Anti-CD-38-Antikörper	6
1.3.1 Physiologische und pathologische Rolle von CD38	6
1.3.2 Stellung in der Therapie von Multiplem Myelom	7
1.3.3 Wirkmechanismen auf der molekularen und zellulären Ebene	8
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	8
2. MATERIAL UND METHODEN.....	10
2.1 Tabellen und Verzeichnisse	10
2.2 Material in der Zellkultur.....	15
2.2.1 Herkunft des Zellmaterials und ethische Aspekte.....	15
2.2.2 Gewinnung des Zellmaterials.....	15
2.2.3 Daratumumab	15
2.3 Zellkultur	16
2.3.1 Gewinnung mononukleärer Zellen mittels Ficoll-Gradientenzentrifugation	16
2.3.3 Kultivierung von adhärennten Zellen	17
2.3.4 Kultivierung von Zellen in Suspension	18
2.3.5 Kokultivierung von BMSC und MM-Zellen	18
2.3.5.1 Kokultivierung mit vorbehandelten MM-Zellen.....	18
2.3.5.2 Kokultur ohne Vorbehandlung der MM-Zellen.....	19
2.3.6 Einfrieren der Zellen	19
2.3.7 Auftauen der Zellen	19
2.4 Molekulargenetik	20
2.4.1 Isolierung von RNA mit Trizol.....	20

2.4.2	Quantifizierung von isolierter RNA mittels Spectrophotometrie	20
2.4.3	Elektrophorese von Nukleinsäuren	21
2.4.4	Primer Design und Testung	21
2.4.5	Reverse Transkription	22
2.4.6	Real-time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)	23
2.4.7	Sequenzierung der RNA mittels Oxford Nanopore Technologie	23
2.5	Auswertung der erhobenen Daten	24
2.5.1	Quantifizierung der Vitalparameter in der Zellkultur.....	24
2.5.2	PCR.....	25
2.5.3	Statistische Analyse	25
3.	ERGEBNISSE.....	26
3.1	Charakteristika der Versuchsgruppen.....	26
3.2	Patientencharakteristika.....	27
3.3	Einfluss verschiedener Zellkulturbedingungen auf die Vitalparameter der BMSC.....	28
3.3.1	Vitalparameter in den einzelnen Versuchsgruppen	28
3.3.3	Kokultivierung mit vorbehandelten MM-Zellen	32
3.3.4.	Behandlung mit Daratumumab.....	34
3.4	Einfluss verschiedener Zellkulturbedingungen auf die Vitalparameter der MM-Zellen.	35
3.4.1	Vitalparameter in den einzelnen Versuchsgruppen	35
3.4.2	Kokultivierung mit den BMSC.....	38
3.4.3	Vorbehandlung MM-Zellen mit Daratumumab vor der Kokultivierung.....	40
3.4.4.	Behandlung mit Daratumumab.....	41
3.5	Einfluss verschiedener Zellkulturbedingungen auf die relative Genexpression	43
3.5.1	Charakteristika der Versuchsgruppen.....	43
3.5.2	Zielgene.....	43
3.5.3	Genexpressionsniveau in der Gesamtpopulation der BMSC	44
3.5.4	Kokultivierung mit den MM-Zellen	44
3.5.5	Kokultivierung mit vorbehandelten MM-Zellen	45
3.5.6.	Behandlung mit Daratumumab.....	45
3.6	Globale Genexpressionsanalyse mittels Oxford Nanopore Technologie.....	49
4.	DISKUSSION	52
4.1	Bewertung der angewandten Methodik.....	52
4.1.1	Zellmaterial	52
4.1.2	Auswahl der Zielgene.....	52
4.1.3	Aussagekraft der statistischen Testung.....	54
4.2.	Effekte auf der zellulären Ebene.....	54
4.2.1	Kokultur	54
4.2.2	Behandlung mit monoklonalen Anti-CD38-Antikörpern.....	56
4.2.3	Vorbehandlung mit Daratumumab.....	57
4.3.	Molekulare Veränderungen der BMSC	57
4.3.1.	CC-Chemokinligand 2	57
4.3.2	Zyklische ADP-Ribose-Hydrolase (CD38).....	58

4.3.3 Sirtuin-3	59
4.3.4 Sirtuin-1	60
4.3.5 Tumorprotein p53	61
4.3.6 Interferon Regulatory Factor 2 Binding Protein 2.....	62
4.3.7 Interleukin-6	62
4.3.8 Beta-2 Mikroglobulin.....	63
4.4 Veränderungen in der globalen Expressionsanalyse	64
4.5 Fazit und Ausblick	66
LITERATURVERZEICHNIS	IX a
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	XX
LEBENS LAUF	XXI
DANKSAGUNG.....	XXIII
BESCHEINIGUNG ÜBER DIE STATISTISCHE BERATUNG	XXIV

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Interaktionen zwischen BMSC und MM im Tumormicroenvironment im Knochenmark	6
Abb. 2: Vitalität der BMSC in den einzelnen Gruppen.....	29
Abb. 3: Absolute Wachstumsrate der BMSC in den einzelnen Gruppen	30
Abb. 4: Relative Wachstumsrate der BMSC in den einzelnen Gruppen.....	30
Abb. 5: Vitalität der BMSC in Abhängigkeit vom Kulturtyp.....	31
Abb. 6: Wachstumsraten der BMSC in Abhängigkeit vom Kulturtyp	32
Abb. 7: Vitalität der BMSC in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der MM-Zellen vor der Kokultur mit BMSC	33
Abb. 8: Wachstumsraten der BMSC in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der MM-Zellen vor der Kokultur mit BMSC.....	33
Abb. 9: Vitalität der BMSC in Abhängigkeit von der Behandlung mit Daratumumab	34
Abb. 10: Wachstumsraten der BMSC in Abhängigkeit von der Behandlung mit Daratumumab	35
Abb. 11: Vitalität der MM-Zellen in den einzelnen Gruppen.....	36
Abb. 12: Absolute Wachstumsrate der MM-Zellen in den einzelnen Gruppen	37
Abb. 13: Relative Wachstumsrate der MM-Zellen in den einzelnen Gruppen.....	38
Abb. 14: Vitalität der MM-Zellen in Abhängigkeit vom Kulturtyp	39
Abb. 15: Wachstumsraten der MM-Zellen in Abhängigkeit vom Kulturtyp	39
Abb. 16: Vitalität der MM-Zellen in Abhängigkeit von der Vorbehandlung vor der Kokultur mit BMSC.....	40
Abb. 17: Wachstumsraten der MM-Zellen in Abhängigkeit von der Vorbehandlung vor der Kokultur mit BMSC.....	41
Abb. 18: Vitalität der MM-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung mit Daratumumab	42
Abb. 19: Wachstumsraten der MM-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung mit Daratumumab ..	42
Abb. 20: Quantitative Analyse der Genexpression in der gesamten Population der BMSC.....	44
Abb. 21: Relative Expression der Zielgene in den mono- und kokultivierten BMSC.....	46
Abb. 22: Relative Expression der Zielgene in BMSC kokultiviert mit vorbehandelten und nicht vorbehandelten MM-Zellen	47
Abb. 23: Relative Expression der Zielgene in den BMSC mit und ohne Behandlung mit Daratumumab	48
Abb. 24: Volcano plot der differentiell exprimierten Gene aus dem Vergleich zwischen mit Daratumumab behandelten und unbehandelten Kokulturen	49
Abb. 25: Gene mit signifikant erhöhter Expression in den mit MM kokultivierten BMSC nach Behandlung mit Anti-CD38 Antikörper und die biologischen Pathways	51
Abb. 26: Klassifikation der Gene mit veränderter Expression in den BMSC im Multiplen Myelom nach der Ontologie laut der Fatigo Plattform.....	53
Abb. 27: Netzwerk der durch die Zielgene kodierte Proteine.....	54
Abb. 28: Gesamtnetzwerk der durch die untersuchten Gene kodierte Proteine	65

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Anwendung von Anti-CD38-Antikörpern in der Behandlung von MM	7
Tabelle 2: Zelllinien	10
Tabelle 3: Puffer	10
Tabelle 4: Chemikalien	11
Tabelle 5: Medikamente	12
Tabelle 6: Enzyme	12
Tabelle 7: Medien für Zellkultur	12
Tabelle 8: Kits	13
Tabelle 9: Verwendete Geräte	13
Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien	14
Tabelle 11: Zusammensetzung von RT- Mix	22
Tabelle 12: Zusammensetzung von Mastermix	23
Tabelle 13: Versuchsgruppen BMSC	26
Tabelle 14: Versuchsgruppen MM	27
Tabelle 15: Klinische Daten der Knochenmarkspendenden	28
Tabelle 16: Versuchsgruppen nach Kulturdesign und Fallzahl	43
Tabelle 17: Statistisch signifikante Gene und ihre biologische Funktion	50

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA (Anti-Anti)	Antibiotikum/Antimykotikum
ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	acquired immune deficiency syndrome
AK	Antikörper
ALL	akute lymphatische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
AS	Aminosäure
AST	autologe/allogene Stammzelltransplantation
ATRA	all- <i>trans</i> -Retinsäure
β2M	beta-2- Mikroglobulin
BMSC	bone marrow mesenchymal stroma cell
bp	Basenpaare
CAS	Chemical Abstracts Service
CCL2	CC-Chemokinligand-2
CD	Cluster of differentiation
cADP	Cyclisches Adenosindiphosphat
cDNA	complementary DNA
CFU	Colony-forming-units
CFU-F	Colony Forming Units-Fibroblasten
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CT	Computertomographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	fetal bovine serum, (dt.) fetales Kälberserum
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GVHD	Graft-Versus-Host-Disease
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen – DR Isotyp

HLA-DR	Human Leukocyte Antigen – DR Isotyp
Ig	Immunglobulin
IgH	Immunglobulin-Schwerkette
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IMWG	International Myeloma Working Group
IQR	Interquartilbereich
IRF2BP2	Interferon-regulatorische Faktor 2-Bindungsprotein 2
ISS	Multiple Myeloma International Staging System
KI	Konfidenzintervall
Max	Maximum
Med	Median
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MHC	major histocompatibility complex
Min	Minimum
MM	Multiples Myelom
MNC	mononukleäre Zellen
MRT	Magnetresonanztomographie
Mw	Arithmetischer Mittelwert
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADP	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ND	Neudiagnose
NF- κ B	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGS	Next Generation Sequencing
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NK	Natural Killer
PBS	phosphate buffered saline, (dt.) phosphatgepufferte Salzlösung
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	runs per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

RT	reverse transcription
SD	Standard deviation, (dt.) Standardabweichung
SIRT1	Sirtuin-1
SIRT3	Sirtuin-3
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor Necrosis Factor
TP53	Tumorprotein p53
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLA	Verly late antigen
WHO	World Health Organisation

ZUSAMMENFASSUNG

Einleitung. Das Multiple Myelom (MM) ist eine unheilbare maligne Plasmazelldyskrasie mit einer insgesamt schlechten Prognose. Die mesenchymalen Stromazellen (BMSC) aus dem MM-Knochenmark zeigen im Vergleich mit den gesunden BMSC aberrante Sekretionsprofile sowie veränderte Genexpression. Die Interaktionen zwischen den Tumorzellen und den BMSC spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Multiplen Myeloms. Durch die Sekretion tumorfördernder Faktoren (v.a. Interleukin-6) unterstützen sie das Tumorwachstum sowie tragen zur Entstehung von Resistenzen gegen Chemotherapeutika bei. Daratumumab ist ein monoklonaler Antikörper gegen CD38, der in der Therapie des MM eingesetzt wird. Die Wirkmechanismen von Daratumumab umfassen eine direkte Apoptoseinduktion, Fc-vermittelte Zytotoxizität und Phagozytose sowie Immunmodulation. Diese Arbeit untersucht den Einfluss von Daratumumab auf die BMSC und ihre Interaktionen mit den Myelomzellen in vitro.

Methoden. Die primären mesenchymalen Stromazellen vom MM-Knochenmark sowie die gesunde BMSC-Zelllinie HS-5 wurden unter verschiedenen Bedingungen kultiviert: Monokultur, Kokultur mit MM-Zelllinien, Kokultutur mit vorbehandelten MM-Zellen, Behandlung mit Daratumumab. Nach der Kultivierung wurden die Vitalparameter Vitalität, absolute Wachstumsrate und relative Wachstumsrate bestimmt. Danach erfolgte die RNA-Isolierung. Anschließend wurde mittels qPCR die Genexpression von IL-6, CD38, SIRT1, SIRT3, TP53, CCL2, IRF2BP2 und B2M in den BMSC quantifiziert.

Ergebnisse. Die BMSC zeigten reduzierte Vitalparameter in der Kokultur sowie bei Behandlung mit Daratumumab. Die MM-Zellen zeigten in der Kokultur signifikant erhöhte Wachstumsraten im Vergleich zur Monokultur. Neben der Behandlung führte auch die Vorbehandlung zum nicht signifikanten Anstieg der Vitalparameter der MM-Zellen. Die mit MM kokultivierten BMSC exprimierten signifikant mehr CD38, SIRT3 und CCL2. Unter der Behandlung mit Daratumumab ist die Expression von CD38, TP53, CCL2 gestiegen, jedoch nicht signifikant.

Diskussion. Die Verschlechterung der Vitalparameter durch die Kokultur mit den MM-Zellen korreliert mit der reduzierten Expansionskapazität. Damit ist auch die erhöhte Expression von

SIRT3 und CD38 plausibel, die die Alterungs- und Seneszenzprozesse modulieren. Die vermehrte Expression des proinflammatorischen CCL2 in der Kokultur zeigt die Rolle der BMSC in der Etablierung des Tumormicroenvironments. Die nicht signifikante Wirkung von Daratumumab auf die BMSC ist durch ihre geringe Expression von CD38 erklärbar. Der leicht negative Einfluss der Behandlung auf die Vitalparameter geht mit zellulärem Stress einher, der sich jedoch nicht einheitlich in der Genexpression abbildete. Insgesamt zeigt diese Arbeit die zentrale Rolle der Interaktionen zwischen Tumor und Stroma und ihre Resultate suggerieren, dass sie das Tumormicroenvironment stärker als die medikamentösen Interventionen beeinflussen können.

ABSTRACT

Introduction. Multiple myeloma (MM) is a malignant plasma cell disorder with a poor prognosis. The bone marrow stromal cells (BMSC) from patients with MM have been shown to differ from their healthy counterparts in the secretion profile and gene expression. The interactions between the tumor and the BMSC play an important role for the pathogenesis of multiple myeloma. Due to secretion of supportive factors (especially interleukin-6) BMSC promote tumor growth and can contribute to acquiring drug resistance in MM. Daratumumab is a monoclonal antibody against CD38 used in the anti-cancer therapy of MM. Its mechanisms of action include direct apoptosis induction, Fc-dependent cytotoxicity and phagocytosis, as well as immunomodulatory effects. This study investigated in vitro the impact of daratumumab on the BMSC beneath their interactions with MM cells.

Methods. Primary BMSC from myeloma patients and the healthy stromal cell line HS-5 were cultivated under different conditions: monoculture, coculture with MM cell lines, coculture with pretreated MM-cells, treatment with daratumumab. Following the cultivation vital parameters (vitality, absolute and relative growth ratio) were measured. Afterwards the RNA isolation proceeded. Finally qPCR was performed to quantify the gene expression levels of IL-6, CD38, SIRT1, SIRT3, TP53, CCL2, IRF2BP2 and B2M in the BMSC.

Results. Coculture with MM cells and treatment with daratumumab reduced the vital parameters of BMSC. The cocultivated MM cells showed significantly increased growth ratios in comparison with the monoculture. Both, the treatment and pretreatment, increased (non significantly) the vital parameters of the MM cells. A significantly higher expression of CD38, SIRT3 and CCL2 was found in cocultivated BMSC. The treatment with daratumumab led to increased expression of CD38, TP53, CCL2, however not significantly.

Discussion. Reduced vital parameters of cocultivated BMSC correlate with their reduced expansion capacity. This observation corresponds furthermore with the higher expression of CD38 and SIRT3, both involved in aging und senescence. The increased expression of proinflammatory CCL2 in the coculture shows the role of the BMSC in establishing of the tumor microenvironment. Not significant treatments' effects on the BMSC can be explained by their low CD38 expression. Daratumumab can cause cellular stress condition resulting in lower

vital parameters, but this phenomenon was not clearly detectable on the molecular level. All results considered, the presented central role of the interactions between myeloma and BMSC suggests that this interplay has more impact on the tumor microenvironment than the drug treatment.

1. EINLEITUNG

1.1. Multiples Myelom

1.1.1 Epidemiologie

Das Multiple Myelom, genannt auch Morbus Kahler, gehört zu den malignen hämatologischen Neoplasien und ist durch klonale Vermehrung mutierter reifer Plasmazellen im Knochenmark charakterisiert. Nach den Kriterien der WHO wird das MM zu den B-Zell-Lymphomen gezählt. Laut Daten vom Robert-Koch-Institut lag die Inzidenz des MM in Deutschland im Jahr 2016 bei 6910 Neuerkrankungen (davon 3000 Frauen, 3910 Männer), wobei das mittlere Erkrankungsalter 74 Jahre bei Frauen, 72 Jahre bei Männern betrug [1]. Damit gilt das Multiple Myelom in Deutschland als dritthäufigste Bluterkrankung nach Leukämien und Non-Hodgkin-Lymphomen [2]. Das mediane Gesamtüberleben der Patienten mit einem diagnostizierten Multiplen Myelom liegt in Deutschland bei 5,9 Jahren [3]. Bei mehr als 75% der Erkrankten steht der Tod im nachweisbaren Zusammenhang mit dem MM, davon sterben ca. 40% an den Folgen des Krankheitsprogresses, während bei ca. 20% eine therapieassoziierte Todesursache (v.a. Infektionen) festgestellt wird [3].

1.1.2 Klinisches Bild

Klinisch manifestiert sich das Multiple Myelom meistens unspezifisch durch Anämie, Knochenschmerzen, Fatigue, unklaren Gewichtsverlust, Infektneigung sowie eingeschränkte Nierenfunktion [4]. Die Diagnostik umfasst außer einer Anamnese und einer körperlichen Untersuchung noch ein Blutbild, eine Bestimmung von Laborparametern im Serum und Urin, eine Knochenmarkspunktion sowie eine Bildgebung (CT, MRT). Beim Multiplen Myelom unterscheidet man anhand von den Kriterien der International Myeloma Working Group (IMWG) folgende Formen dieser Erkrankung [5]: schwelendes Myelom (asymptomatisch, nach aktuellen Leitlinien Empfehlung zur regelmäßigen Kontrollen gemäß dem Prinzip „watch & wait“), symptomatisches Multiples Myelom, solitäres Plasmozytom (isolierter Plasmazelltumor, keine systemische Manifestation) und Plasmazell-Leukämie ($\geq 20\%$ Plasmazellen im peripheren Blut) [5]. Als Vorstufe vom MM gilt die Monoklonale Gamopathie

unklarer Signifikanz (MGUS) mit einer Progressionsrate von 1% pro Jahr [6]. Die Diagnose des Multiplen Myeloms wird nach der Definition der IMWG gestellt, wenn Folgendes zutrifft [5, 7]. Infiltrationsrate von klonalen Plasmazellen im Knochenmark beträgt $\geq 10\%$ oder histologisch gesichertes Plasmozytom und eins der Myelom-definierenden SliM-CRAB-Kriterien wird erfüllt:

- Nachweis von **Endorganschaden**, die der Proliferationsstörung der Plasmazellen zuzuordnen sind (CRAB): (C) Hyperkalzämie: Calcium $> 2,75$ mmol/l ($> 10,5$ mg/dl) oder $> 0,25$ mmol/l oberhalb des oberen Normwertes, (R) Niereninsuffizienz: Serumkreatinin $\geq 2,0$ mg/dl (> 173 μ mol/l) oder GFR < 40 ml/min (A) Anämie: Hämoglobin $< 10,0$ g/dl ($< 6,21$ mmol/l) oder $\geq 2,0$ g/l ($> 1,24$ mmol/l) unterhalb des unteren Normwertes, (B) Knochenbeteiligung: Nachweis mindestens einer ossären Läsion in der Bildgebung
- Myelom-definierende **Biomarker**: klonaler Plasmazellgehalt im Knochenmark $> 60\%$ (zytologisch und histologisch), freier Leichtkettenquotient im Serum > 100 (betroffene/nicht betroffene Leichtkette), > 1 fokale Läsion > 1 cm in der MRT Bildgebung

1.1.3 Therapie

Die Therapie des Multiplen Myeloms umfasst eine Chemotherapie, die autologe (bzw. allogene) Stammzelltransplantation, eine Erhaltungstherapie sowie supportive osteoprotektive Therapie. Heutzutage werden in der Pharmakotherapie vom MM folgende Substanzen angewendet: Immunmodulatoren (Lenalidomid, Thalidomid), Antikörper (Daratumumab, Elotuzumab) Zytostatika (Bendamustin, Cyclophosphamid, Doxorubicin, Melphalan, Pomalidomid, Panobinostat), Glucocorticoide (Dexamethason, Prednison/Prednisolon), Proteasom-inhibitoren (Bortezomib, Carfilzomib, Ixazomib). Darüber hinaus erfolgt die Osteoprotektion mit Bisphosphonaten oder Denosumab. Die Chemotherapie wird meistens in Kombination von 2-4 Medikamenten durchgeführt, Monotherapien haben eine Bedeutung in der Erhaltungstherapie nach Stammzelltransplantation sowie in der Drittlinientherapie. Trotz dynamischen Entwicklungen im Bereich der Pharmakotherapie, bleibt das MM mit einer relativen 5-Jahre-Überlebensrate von 45-48% immer noch unheilbar [1].

1.1.4 Pathogenese

Die Pathogenese des MM beruht auf komplexen Veränderungen in der genetischen Landschaft der Plasmazellen. Furukawa und Kikuchi postulieren, dass chromosomale Translokationen zusammen mit der Hyperploidie (insb. Chromosom 11), die während der somatischen Hypermutation und dem Klassenwechsel entstehen, der Pathogenese des MM zugrunde liegen [8]. Laut Rajkumar weist das MM in 40% der Fälle Trisomien auf, während bei den meisten restlichen Fällen die Translokation im Locus 14q32, dem kodierenden Bereich der Immunoglobulin-Schwerkette (IgH) dominiert [9]. Bei einem kleinen Teil der Patienten werden sowohl Trisomien als auch Translokationen des o.g. Locus gefunden [9]. Diese genetischen Veränderungen resultieren in Deregulierung von D-Cyclinen, was durch die beschleunigte G1/S-Phasentransition zum Wachstumsvorteil sowie genetischer Instabilität führt. Demzufolge erwerben die betroffenen Plasmazellen weitere Aberrationen, dazu gehören v.a. DNA-Hypomethylierung, Ras-Mutationen, c-Myc-Überexpression, chromosomale Aberrationen [8]. Man unterscheidet zwischen primären (Trisomien, IgH Translokationen), die bereits in der Phase von MGUS vorkommen, und sekundären zytogenetischen Aberrationen, die im Laufe der Erkrankung zusätzlich erworben werden. Rajkumar und Rajan unterteilen die bisher bekannten häufigsten genetischen Aberrationen nach dem Risikoprofil [9, 10]: Standardrisiko- Trisomien, t(11;14) (q13;q32) , t(6;14) (p21;q32). Hochrisiko- t(4;14) (p16;q32) , t(14;16) (q32;q23), t(14;20) (q32;q11), Gain(1q21) , Del(17p).

Die NGS-basierten Studien zeigen, dass die malignen Zellen eine intraklonale Heterogenität aufweisen, die bereits bei MGUS auftritt [11]. Die Subklonen evolvieren, erwerben neue Mutationen folgend damit dem Darwinschen Modell der verzweigten Evolution [12]. Daraus ergibt sich ein Alternativmodell zu der früher angenommenen linearen Tumorevolution in MM [8]. Die Evolution der Subklone ergibt neue Phänotypen, wobei die Subklone, die zum Zeitpunkt der Diagnose nicht dominant waren, später eine entscheidende Rolle bei Medikamentenresistenz, Krankheitsprogress oder Transformation in die Plasmazelleukämie spielen [8, 13].

1.2 Mesenchymale Stromazellen im Knochenmark (BMSC)

1.2.1 Allgemeine Biologie

Die BMSC bilden eine heterogene Gruppe, deren Hauptmerkmale die Fähigkeit zur Differenzierung in mindestens einen der ausreifen Zelltypen und Zellerneuerungskapazität sind [14]. Sie haben eine fibroblastenähnliche Morphologie, können adhären sowie CFU (colony-forming-units) bilden. Exprimiert durch BMSC werden: CD10, CD13, CD29, CD44, CD49e, CD73, CD90, CD92, CD105, CD146, CD166, SSEA4, Stro-1 [15]. Die Internationale Gesellschaft für Zelltherapie hat minimale Kriterien für die Klassifizierung der Zellen als BMSC definiert: Adhäsion zur Plastikoberfläche der Zellkulturflasche unter Standardbedingungen, Expression von CD105, CD73 und CD90 bei gleichzeitiger Abwesenheit von CD45, CD34, CD11b or CD14, CD79 α oder CD19 HLA-DR auf der Zelloberfläche sowie die Fähigkeit zur Differenzierung in Osteoblasten, Chondrozyten, Adipozyten [16]. Der Anteil der BMSC an mononukleären Zellen im Knochenmark beträgt 0,01-0,001 % [17]. Physiologisch spielen die BMSC eine essentielle Rolle in der Etablierung und Aufrechterhaltung des hämatopoetischen Microenvironment im Knochenmark, die Sicherstellung sowie Regulierung der Hämatopoese durch die sezernierten Zytokine [15, 18-22]. Darüber hinaus sind die BMSC Forschungsobjekte in der regenerativen Medizin, jedoch gibt es lediglich experimentelle Therapien (z.B in GvHD oder nach einem Schlaganfall) [15, 23].

1.2.2 Veränderungen bei Multiplem Myelom

Die BMSC bilden als wesentliche Akteure zusammen mit Osteoblasten, Osteoklasten und Proteinen der extrazellulären Matrix das Microenvironment im Knochenmark [24]. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass sich die BMSC von gesunden Individuen von den BMSC der Patienten mit MM unterscheiden [25-27]. Außer den veränderten Expressionsniveaus von Zytokinen, Wachstums- und Transkriptionsfaktoren sowie miRNA zeigen sie ein Seneszenz-artiges Profil mit einer reduzierten proliferativen und Differenzierungskapazität [28-30]. Gleichzeitig unterstützen sie weiterhin die Hämatopoese [26]. Ein Teil der Aberrationen manifestiert sich explizit in Anwesenheit der MM-Zellen [31-33]. Der veränderte Phänotyp von MM-BMSC, der zur Etablierung von Tumor-förderndem Microenvironment im

Knochenmark führt, entsteht infolge von direkten und indirekten Interaktionen zwischen MM und BMSC Zellen [29]. Diese Interaktionen basieren auf der NF- κ B- abhängigen Expression von Adhäsionsmolekülen, für die der direkte Zellkontakt und die durch Stromazellen produzierten Zytokine essentiell sind [8]. Es wird postuliert, dass die MM-Zellen die gesunden BMSC zu MM-BMSC konditionieren, damit sie das Wachstum von malignen Zellen beeinflussen [29]. Die Veränderungen bleiben in den MM-BMSC auch in der Abwesenheit der MM-Zellen bestehen, weil die Aberrationen teilweise unabhängig vom Einfluss der MM-Zellen entstehen [26, 29]. In den malignen B-Zellen spielen sich die durch die BMSC hervorgerufenen Effekte auf drei Ebenen ab: Expression von antiapoptotischen Faktoren, Aktivierung von Onkogenen und metabolische Veränderungen [34]. Die Interaktionen zwischen BMSC und MM-Zellen tragen zur Proliferation, Überleben, Migration und Chemotherapeutikaresistenz des Tumors bei. Darüber hinaus fördern sie auch die Osteoklastengnese sowie Angiogenese im Tumormicroenvironment [29].

Die pathologische Rolle der BMSC ist zudem auch in anderen malignen hämatologischen Neoplasien bekannt. Liang und Song berichteten in diesem Kontext vom Schutz vor Apoptose über den Signalweg NF κ B, vermehrter Adhäsion und Invasion durch das VLA-4 im Non-Hodgkin-Lymphom [15]. In den akuten Leukämien förderten die BMSC ein besseres Tumorsurvival sowie erhöhte Medikamentenresistenz durch Aktivierung von Notch und Wnt Signalwege, während sie in den chronischen Leukämien die Zellmigration, eine Reduktion von T-Zellzahl und Stimulation von regulatorischen T-Zellen durch Sezenerierung von Interlukinen oder Wachstumsfaktoren unterstützten [15]. Im Gegensatz dazu bewirkte eine Infusion von BMSC von gesunden Spendern bei einer akuten GVHD besseres Outcome durch Vermittlung von T-Zell-Anergie, Suppression von T-Zell-Differenzierung und Stimulation von regulatorischen T-Zellen [15]. In den nicht-malignen hämatopoetischen Erkrankungen sprachen Liang und Song von einer „Hypofunktion“ der BMSC, die die Hämatopoese nicht ausreichend unterstützen [15].

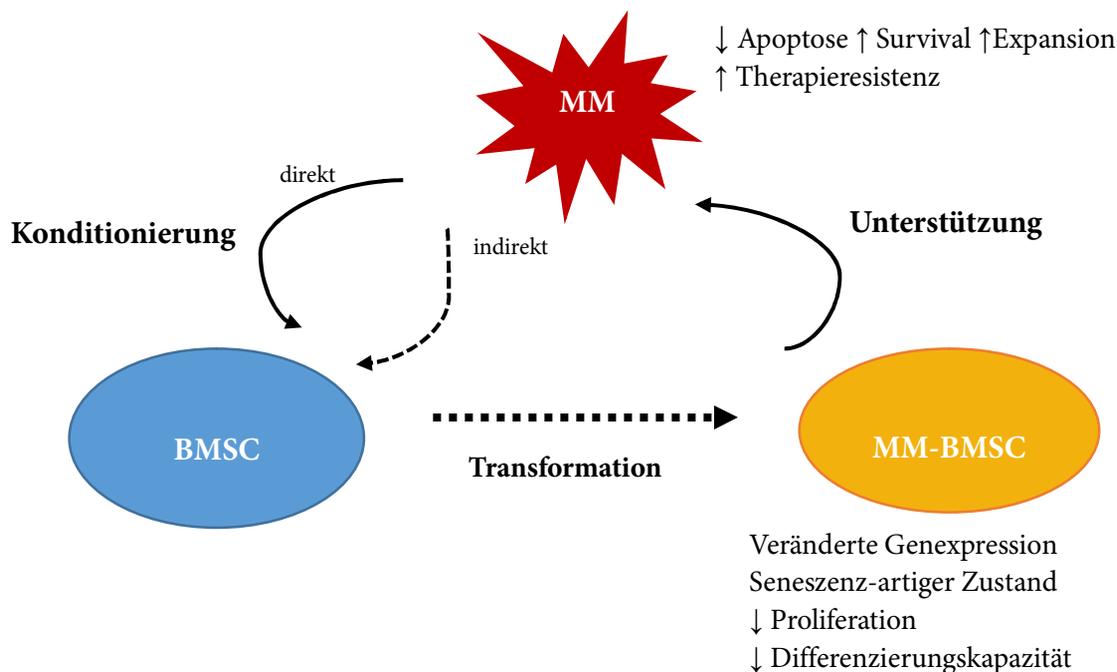


Abb. 1: Interaktionen zwischen BMSC und MM im Tumormicroenvironment im Knochenmark. Modifiziert von Xu et al. [29].

1.3 Monoklonale Anti-CD-38-Antikörper

1.3.1 Physiologische und pathologische Rolle von CD38

Das Molekül CD 38 wurde zuerst 1980 von Reinherz et al beschrieben [35]. Es zählt zu Typ II - transmembranären Glykoproteinen und kommt sowohl in der Zellmembran, als auch den inneren Membranen von Zellkern und Mitochondrien vor, wobei der Großteil der Aktivität von CD38 in dem extrazellulären Raum stattfindet [36-38]. CD38 wird auf verschiedenen Gewebetypen exprimiert, u. a. auf B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, NK-Zellen, Thrombozyten, Osteoklasten [37]. Das für CD38 kodierende Gen wurde auf dem Chromosom 4p15 lokalisiert und besitzt Bindungsstellen für T cell-specific transcription factor alpha (TCF-1 α), nuclear factor-IL-6 (NF-IL-6), and interferon responsive factor-1 (IRF-1) [39, 40]. CD38 weist zudem eine zu CD157 komplementäre Verteilung sowie homologe Struktur auf [37]. Die wichtigsten Funktionen von CD38 umfassen: Enzym im NAD-Metabolismus, Second Messenger für Synthese von cADP-Ribose, Immunabwehr bei bakteriellen Infektionen, Rolle in Alterungsprozessen, Beteiligung an der Induktion von Immuntoleranz gegenüber Sperma und Foetus [38]. Als Rezeptor ist CD38 an Proliferation und Aktivierung von T-Lymphozyten

sowie Adhäsion von zirkulierenden Lymphozyten an Endothelzellen beteiligt [36]. Außerdem kann es in unreifen B-Lymphozyten die Apoptose induzieren, während es bei den reifen B-Zellen antiapoptotisch wirkt [37]. Die Expression von CD38 zeigt eine Relevanz für die Pathogenese zahlreicher Erkrankungen u.a. HIV-Infektion, systemischen Lupus erythematodes, Diabetes mellitus Typ II, Osteoporose, soliden Tumoren und etlichen hämatologischen Neoplasien, insb. beim Multiplen Myelom [36]. Dabei zeigen sich bei den Expressionsniveaus in verschiedenen Malignomen deutliche Unterschiede [38]. Im Multiplen Myelom wird CD38 auf den malignen Plasmazellen hochexprimiert [41]. Die Expressionsniveaus dienen gleichzeitig als negative prognostische Marker [42].

1.3.2 Stellung in der Therapie von Multiplem Myelom

Die aktuelle Zulassung durch die Europäische Arzneimittel-Agentur gilt bei Daratumumab für das neu diagnostizierte MM sowie beim Rezidiv oder Medikamentenrefraktärität jeweils in Kombination mit anderen Medikamenten. Darüber hinaus wurde Daratumumab als Monotherapie in der Drittlinientherapie von MM zugelassen [43]. Außer Daratumumab existieren noch weitere Antikörper gegen CD38: Isatuximab (zugelassen für rezidivierendes/refraktäres Myelom), MOR202 (aktuell in klinischen Phase 1-2a) und TAK-079 (Phase 1 der klinischen Prüfung) [44-46].

Tabelle 1: Anwendung von Anti-CD38-Antikörpern in der Behandlung von MM

Stadium	Daratumumab	Isatuximab
ND AST	geeignet für + Bortezomib/Thalidomid/Dexamethason	
ND für AST	nicht geeignet + Lenalidomid/Dexamethason + Bortezomib/Melphalan/Prednisolon	
Rezidiv/refraktär	+ Lenalidomid/Dexamethason + Bortezomib/Dexamethason + Pomalidomid und Dexamethason	+ Pomalidomid und Dexamethason + Carfilzomib und Dexamethason
Drittlinientherapie	Monotherapie	

ND Neudiagnose, AST autologe/allogene Stammzelltransplantation

1.3.3 Wirkmechanismen auf der molekularen und zellulären Ebene

Daratumumab ist ein monoklonaler IgG1 κ - Antikörper gegen das Molekül CD38. Van de Donk et al nennen drei Hauptwirkmechanismen von Anti-CD38-Antikörper: Fc-vermittelte Effekte (Zytotoxizität, Phagozytose, Komplementaktivierung), immunmodulatorische Effekte wie Eliminierung von CD38-positiven immunsuppressiven Zellen mit Erhöhung der Zahl und Aktivität der T-Zellen sowie eine direkte Wirkung auf die MM-Zellen über Apoptoseinduktion und enzymatische Inhibierung von CD38 [47, 48]. Des Weiteren reduziert Daratumumab in Anwesenheit von Komplementfaktoren oder Effektorzellen wenige Stunden nach der Verabreichung die Expression von CD38 auf den Myelom- sowie Immunzellen (NK, Monocyten, T- und B-Lymphozyten) [49]. Außerdem werden die Komplexe aus Daratumumab und CD38 von den MM-Zellen in die Mono- und Granulozyten aktiv transferiert [49]. Die Voruntersuchungen haben gezeigt, dass die Behandlung mit der All-Transretinsäure oder dem Histon-Deacetylase-Inhibitor, Panobinostat die Wirkung von Daratumumab verstärken kann [50, 51]. Eine Abschwächung des Behandlungseffektes wurde in Anwesenheit von IL-6, primären MM-BMSC sowie Überstand von kultivierten primären MM-BMSC beobachtet [52]. Den Modulationen der Wirksamkeit von Daratumumab lag die Hoch- bzw. Herunterregulierung der CD38-Expression zugrunde [50-52].

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die mesenchymalen Stromazellen spielen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese des Multiplen Myeloms. Sie können auch bedeutend zur Entwicklung der Chemotherapeutikaresistenz beitragen und so den Progress der Erkrankung fördern [29, 53, 54]. Die Interaktionen zwischen BMSC und den MM-Zellen sind bereits der Gegenstand der aktuellen Forschung, jedoch die Frage nach den genauen Mechanismen gilt als nicht endgültig beantwortet. Darüber hinaus bleibt der Einfluss der einzelnen Anti-Myelom-Medikamente auf die BMSC weitgehend unerforscht. Zum einen soll das ubiquitär vorkommende CD38 [37] auch durch die BMSC exprimiert werden. Zum anderen gibt es Hinweise, dass das CD38 von den MM-Zellen auf die BMSC transferiert wird [75]. Dementsprechend sollte eine direkte Wirkung der monoklonalen Anti-CD38-Antikörper auf die BMSC messbar sein. Alternativ müsste man davon ausgehen, dass die Antikörper die BMSC nur indirekt über die MM-Zellen beeinflussen.

Diese Arbeit nimmt sich als Ziel, den Effekt der monoklonalen Antikörper gegen CD38 am Beispiel von Daratumumab auf die BMSC selbst sowie auf ihre Interaktionen mit den MM-Zellen explizit zu untersuchen. Analysiert werden auf der zellulären Ebene die Vitalität und die Expansionsrate unter verschiedenen Zellkulturbedingungen. Diesem wird eine molekulargenetische Untersuchung der relativen Genexpression in den gewonnenen Proben folgen. Damit wird ein Beitrag zum besseren Verständnis der Wirkung der monoklonalen Anti-CD38-Antikörper auf die Zellen des Tumorenvironments geleistet. Des Weiteren können bisher nicht bekannte Charakteristika der Interaktionen zwischen BMSC und den MM-Zellen detektiert werden, wodurch sich möglicherweise neue potentielle Therapieansätze identifizieren lassen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Tabellen und Verzeichnisse

Alle Materialien, die in der experimentellen Arbeit verwendet wurden, werden in den untenstehenden Tabellen aufgeführt.

Tabelle 2: Zelllinien

Name der Zelllinie	Zelltyp
HS-5	gesundes Knochenmarkstroma, <i>Homo sapiens</i>
KMS12-PE	Multiples Myelom, <i>Homo sapiens</i>
OPM-2	Multiples Myelom, <i>Homo sapiens</i>
U266	Multiples Myelom, <i>Homo sapiens</i>

Tabelle 3: Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
Dulbecco's PBS ohne Ca ²⁺ , ohne Mg ²⁺	8,0 g Natriumchlorid 0,2 g Kaliumchlorid 1,42 g Dinatriumhydrogenphosphat 0,27 g Kaliumdihydrogenphosphat auf 1000 ml H ₂ O	Gibco, Lonza
Lyse-Puffer	8,29 g Ammoniumchlorid, 1g Kaliumhydrogencarbonat, 0,3 g EDTA auf 1000 ml H ₂ O	selbst hergestellt

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
5x First Strand Buffer Reverse Transkription	250 mmol Trizma Hydrochlorid 375 mmol Kaliumchlorid 15 mmol Magnesiumchlorid	Invitrogen

Tabelle 4: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller	CAS-Nummer *
Antibiotikum/ Antimykotikum 100x	Gibco	
Chloroform	Merck KGaA	67-66-3
DesoxyNukleosidTriPhosphate	Thermo Fisher Scientific	
destilliertes Wasser	-	7732-18-5
Dimethylsulfoxid	Roth	67-68-5
Dithiothreitol	Invitrogen	7634-42-6
EDTA	Invitrogen	60-00-4
Ethanol	Fisher Chemical	64-17-5
Fetales Kälberserum	Gibco	
Ficoll-Paque™-Plus	GE Healthcare	156-57-0
Isopropanol	J.T.Baker	67-63-0
Nuklease-freies Wasser	Qiagen	7732-18-5
Primer random p(dN) ₆	Roche	
Trizol	Roche	9048-46-8
Trypanblau 0,4%	Gibco	72-57-1

* falls vorhanden

Tabelle 5: Medikamente

Wirkstoff	Handelsname	Hersteller	Konzentration	CAS-Nummer
Daratumumab	Darzalex [®]	Janssen	1800 mg Injektionslösung	945721-28-8
Daratumumab	Darzalex [®]	Janssen	20 mg / ml Konzentrat	945721-28-8

Tabelle 6: Enzyme

Enzym	Hersteller	CAS-Nummer*
Accutase	Gibco	
Trypsin 0,5% 10x (mit EDTA 0,2% in PBS w/o Ca ²⁺ Mg ²⁺)	Biochrom	7.07.9002
Reverse Transkriptase SuperScript [™] III	Invitrogen	
RNaseOUT [™] Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Roche	

* falls vorhanden

Tabelle 7: Medien für Zellkultur

Medium	Hersteller	Zusätze
IMDM	Biosell, Biochrom	20% FBS, 1% AA
RPMI	Corning	20% FBS, 1% AA

Tabelle 8: Kits

Kit	Bestandteile	Hersteller
RNA Screen Tape	RNA ScreenTape devices RNA ScreenTape Sample Buffer RNA ScreenTape Ladder	Agilent Technologies

Tabelle 9: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Marke/Modell
Inkubator	Binder
Kühlschrank	Liebherr Profiline
Mikroskop	Nikon Eclipse Ts2
Minishaker Vortexer	Ika MS1
Real-time PCR-System	Step One Plus Applied Biosystems
Spectrophotometer	Nanodrop 1000 Thermo Scientific
TapeStation	Agilent Technologies Agilent 4150 (G2992A)
Thermocycler	Bio-Rad C1000 Touch
Wasserbad	Julabo TW8
Werkbank	ThermoScientific MSC 1.2
Zentrifuge	Hettich Rotina 380
Zentrifuge	Eppendorf 5430R

Tabelle 10: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Deckfolie für PCR-Wellplatten	Life Technologies
Deckglas	Marienfeld
Kryoröhrchen 2 ml	Simport
Nadeln	Braun
Optical Caps	Agilent Technologies
Optical Tubes	Agilent Technologies
Optische 96-Wellplate für PCR 0,1 ml	Life Technologies
Parafilm®	Pechiney Plastic Packaging
Pasteurpipetten	Sarstedt
PCR Röhrchen 0,2 ml	Biozym
Pipettenspitzen 10 µl/100 µl/1000 µl	Biozym, Sarstedt
Reagiergefäße 0,5 ml/1ml/1,5ml/2ml	Sarstedt
Serologische Pipetten 1 ml/5 ml/10 ml/25 ml	Sarstedt
Spritzen	Becton Dickinson
Tubes 1,5 ml/2 ml	Sarstedt
Zählkammer nach Neubauer	Marienfeld
Zellkulturflaschen 25 cm ² /75 cm ² /175 cm ²	Greiner Bio-One
Zentrifugenröhrchen 15 ml/50ml	Falcon, Sarsedt

2.2 Material in der Zellkultur

2.2.1 Herkunft des Zellmaterials und ethische Aspekte

Die Patienten und Patientinnen, deren Knochenmark als Material für diese wissenschaftliche Arbeit diente, wurden in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorimmunologie der Charité behandelt. Eingeschlossen wurden Patienten mit einer gesicherten Diagnose eines Multiplen Myeloms in verschiedenen Stadien der Erkrankung: Erstdiagnose, Remission, Rezidiv. Alle Patientinnen und Patienten wurden über den Zweck und Ablauf der Intervention sowie mit ihr verbundene Risiken und Vorteile im Sinne von *informed consent* aufgeklärt (vgl. [55]). Eine schriftliche Einwilligung gemäß der Deklaration von Helsinki wurde dokumentiert. Ein Votum der Ethikkommission der Charité Nr. EA4/131/13 vom 20.06.2014 liegt vor (s. Anhang).

2.2.2 Gewinnung des Zellmaterials

Als Material dienten Punktate vom Knochenmark aus dem Beckenkamm. Die Punktationen fanden im klinischen Setting nach entsprechender Aufklärung und mit Einverständnis der Patienten und Patientinnen statt. Das aspirierte Knochenmark-Punktat wurde in einer Spritze mit ca. 10000 IE Heparin in Raumtemperatur zur weiteren Verarbeitung ins Labor transportiert.

2.2.3 Daratumumab

Für die Experimente wurde das Präparat „Darzalex[®]“ (Wirkstoff: Daratumumab) vom Hersteller Janssen verwendet. Das Medikament wurde nach dem Anstechen im Kühlschrank aufbewahrt und binnen 24h verbraucht. Laut den Vorgaben der Europäischen Arzneimittel-Agentur beträgt die klinische Dosis 16 mg/kg Körpergewicht [43]. Unter den Bedingungen der Zellkultur entspricht das 0,24 mg/ ml.

2.3 Zellkultur

2.3.1 Gewinnung mononukleärer Zellen mittels Ficoll-Gradientenzentrifugation

Ficoll ist ein Polysaccharid mit hohem Molekulargewicht [56]. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der unterschiedlichen Dichte einzelner Blutbestandteile sowie des Ficolls selbst. Nach der Zentrifugation bildet das Blutplasma die oberste Schicht, darunter befinden sich die mononukleären Zellen. Die Erythrozyten zusammen mit Granulozyten bilden wegen der höchsten Dichte ein Sediment, das durch die Ficollschicht von der Ebene der MNC getrennt wird [57]. Das Blut aus dem Knochenmarkpunktat wurde zuerst in ein Reagenzglas überführt und mit PBS im Volumenverhältnis ca. 1:1 vermischt. Danach wurde ein Falcon-Tube mit 15 ml Ficoll-PaqueTM-Plus befüllt, im weiteren Schritt mit dem verdünnten Blut überschichtet und anschließend zentrifugiert (20 min, 2000 rpm, ohne Bremse). Die mit Pasteurpipetten abgesaugten MNC wurden in ein sauberes Reagenzglas überführt, mit PBS gewaschen (dazu gegebenes PBS-Volumen war größer als das Volumen der gewonnenen Zellen), kurz mit Hilfe des Vortexmischers gemischt, dann 5 min lang bei einer Geschwindigkeit von 2000 rpm mit Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der flüssige Überstand entfernt. Zu dem Pellet wurde 1-2 ml Lysepuffer dazugegeben, mit Hilfe des Vortexmischers resuspendiert und 5 Min. lang auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt wurden ca. PBS dazugegeben, danach erfolgte eine weitere Zentrifugation (5 min, 2000 rpm, mit Bremse). Der entstandene flüssige Überstand wurde entfernt, das Zellpellet in 1000 µl PBS bzw. IMDM-Medium resuspendiert, um die Zellzahl zu bestimmen (s. Absatz 2.3.2). Nach der Zellzählung wurden die gewonnenen mononukleären Zellen in die Zellkulturflaschen überführt und nach Protokoll (s. Absatz 2.3.3) kultiviert.

2.3.2 Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität

Die Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität erfolgte mit Hilfe von Trypanblaufärbung. Trypanblau ist ein nicht membrangängiger anionischer Azofarbstoff, der an Zellproteine bindet [58]. Das Prinzip dieser Methode beruht auf dem Unterschied im Färbungsverhalten in Abhängigkeit von der Vitalität der Zelle. Die toten Zellen nehmen den Farbstoff auf, was zu einer dunkelblauen Färbung des abgestorbenen Zellkörpers führt, die unter dem Mikroskop

gut erkennbar ist. Im Gegensatz dazu lassen sich die lebendigen Zellen nicht färben, wodurch man sie als runde, helle Objekte beim Mikroskopieren identifizieren kann. Die Zellsuspension für den Färbungsvorgang wurde wie folgend hergestellt: zu 45µl Trypanblau wurden 5µl der Referenzzellsuspension dazugeben und gründlich mit dem Vortexmischer gemischt. Anschließend wurde 1µl der entstandenen Suspension auf das Objektglas einer Neubauer-Zählkammer aufgetragen und die Zellen in den 4 großen Eckquadraten manuell gezählt. Die Zellzahl (z) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$z = \frac{\text{Zahl der lebendigen Zellen} \cdot 4 \text{ Kammern}}{40} \times 10^6$$

Die Zellkonzentration (c) in der Referenzsuspension wurde nach folgender Formel berechnet:

$$c = \frac{z}{\text{Volumen}}$$

2.3.3 Kultivierung von adhärennten Zellen

Die adhärennten BMSC wurden in IMDM-Medium mit 20% FBS und 1% AA bei 37°C mit 5% CO₂ in liegenden Zellkulturflaschen kultiviert. Die aus dem Knochenmark von Patienten und Patientinnen stammenden MNC wurden nach Isolierung mittels Ficoll-Gradientenzentrifugation (s. Absatz 2.3.1) in eine 25cm²-Zellkulturflasche mit frischem Medium überführt. Nach wenigen Tagen wurde das alte Medium zusammen mit den nicht-adhärennten Zellen entfernt. Die adhärennten Zellen wurden mit PBS gewaschen, daraufhin erfolgte die Zugabe von frischem Medium. Das gleiche Procedere wurde auch für die Zelllinie HS-5 angewandt. Das Wachstum der Zellen wurde regelmäßig unter dem Mikroskop überprüft. Bei der sichtbaren Gelbverfärbung wurde das Medium gewechselt. Wenn die Fläche der Zellzuchtflasche zu mindestens 70% von den Zellen bewachsen war, wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das alte Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend zwecks Ablösung für 15 Min. mit Accutase inkubiert. Nach dieser Zeit wurde frisches Medium dazugegeben um die enzymatische Reaktion zu unterbrechen. Die Zellsuspension wurde zur weiteren Kultivierung in eine größere Zellkulturflasche (75cm² bzw. 175cm²) überführt.

2.3.4 Kultivierung von Zellen in Suspension

Die Suspensionszellen (MM) wurden in RPMI-Medium mit 20% FBS und 1% AA bei 37°C mit 5% CO₂ in senkrechter Position der Kulturflaschen kultiviert. Zuerst wurde eine Zellsuspension mit 1x10⁶ Zellen/ml in eine 25cm² Kulturflasche überführt. Bei Verfärbung des Mediums wurde die Konzentration der MM-Zellen bestimmt und die Zellsuspension verdünnt, um die Ausgangskonzentration zu erreichen. In weiteren Schritten wurden neue Kulturen angelegt, indem die Zellsuspension im Verhältnis 1:10 verdünnt wurde.

2.3.5 Kokultivierung von BMSC und MM-Zellen

In jedem Schritt der Kokultivierung wurde ein IMDM-Medium mit 20% FBS und 1% AA (Standardmedium) verwendet. Die Inkubation erfolgte stets bei 37°C mit 5% CO₂ (Standardbedingungen).

2.3.5.1 Kokultivierung mit vorbehandelten MM-Zellen

Für die Kokultivierung wurden die MM-Zelllinien (U266, KSM12-PE) und BMSC (von MM-Patienten sowie Zelllinie HS-5) benutzt. Im ersten Schritt (Tag 1) wurden die MM-Zellen in Konzentration von 1x10⁵ Zellen/ml für 72 h in IMDM-Standardmedium kultiviert. Ein Teil der Ansätze enthielt Daratumumab in Konzentration von 0,24 mg/ml, während die übrigen Ansätze ohne Medikament als Negativkontrolle dienten. Im weiteren Schritt am Tag 3 wurden die adhärenz Stromazellen nach Entfernung vom Medium, Waschen mit PBS, Ablösung mittels Accutase und Bestimmung der Zellzahl (s. Absatz 2.3.2) in die Zellkulturflaschen mit IMDM-Standardmedium eingesäht. Die Konzentration betrug dabei 2x10⁴ Zellen/ml, die Inkubationszeit mindestens 4 h unter Standardbedingungen. Am Tag 4 wurden die am Tag 1 angesetzten MM-Zellen abzentrifugiert, gezählt und in der Menge von 1x10⁵ Zellen/ml zu den vorinkubierten BMSC dazugegeben. Ein Teil der Kokulturansätze wurde im IMDM-Medium vom Tag 3 ohne Medikament inkubiert, während die übrigen Zellkulturflaschen das Daratumumab-haltige Medium vom Tag 1 enthielten. Die Kokultivierung erfolgte für weitere 72 h. Nach dieser Zeit wurden die kultivierten Zellen geerntet. Die MM-Zellen wurden abzentrifugiert, die BMSC nach Waschen mit PBS mittels Accutase abgelöst und ebenfalls abzentrifugiert. Weiterhin wurde für jede Zellfraktion einzeln die Zellkonzentration sowie die Vitalität bestimmt. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation, nach der die Zellpellets in jeweils 1 ml TRIzol resuspendiert wurden. Die entstandenen Zellsuspensionen wurden

schnell ins Kühlfach überführt und dort bei -80°C gelagert.

2.3.5.2 Kokultur ohne Vorbehandlung der MM-Zellen

Die Ansätze für die Kokultivierung bestanden aus BMSC in Konzentration von 2×10^4 Zellen/ml. Nach 4-6 h Inkubationszeit unter Standardbedingungen wurden MM-Zellen in Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml, sowie Daratumumab (0,24 mg/ml), Lenalidomid (1 $\mu\text{l/ml}$) und/oder DMSO (1 $\mu\text{l/ml}$) dazugegeben. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen für 72 h unter Standardbedingungen inkubiert. Im letzten Schritt wurden die kokultivierten Zellen geerntet, mit TRIzol vermischt und anschließend bei -80°C gelagert.

2.3.6 Einfrieren der Zellen

Um adhärente Zellen einzufrieren, wurde zuerst das Medium aus der Zellkulturflasche entfernt. Daraufhin wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Nach der Spülung wurden die Zellen mit Accutase im Brutschrank inkubiert. Nach 15 Minuten Inkubationszeit wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von IMDM-Medium unterbrochen und der Flascheninhalt bei 2000 rpm für 5 Minuten mit Bremse zentrifugiert. Dann wurde der Überstand entfernt, das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (FCS, 10% DMSO) suspendiert und anschließend schnell in ein Kryoröhrchen überführt.

Die Suspensionszellen wurden zwecks des Einfrierens zentrifugiert (2000 rpm, 5 min, mit Bremse). Nach Entfernung vom Überstand erfolgte die Suspension des Zellpellets in 1 ml Einfriermedium mit schneller Überführung in ein Kryoröhrchen.

Die Kryoröhrchen wurden zuerst in einer Kryobox bei -80°C gelagert. Nach wenigen Tagen wurden sie in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff verlagert.

2.3.7 Auftauen der Zellen

Die Kryotubes mit eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad (37°C) erwärmt, bis die Zellsuspension vollständig flüssig wurde. Die Zellen wurden in ein Zentrifugationsröhrchen mit ca. 5 ml Medium überführt und danach für 5 Min. bei 2000 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde entfernt. Daraufhin erfolgte die Resuspendierung des Zellpellets in 5 ml Medium mit anschließender Überführung in eine Zellkulturflasche.

2.4 Molekulargenetik

2.4.1 Isolierung von RNA mit Trizol

TRIZol ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, die durch den Prozess der Entproteinisierung eine Isolierung von RNA ermöglicht. Gleichzeitig können in demselben Vorgang auch DNA sowie Proteine isoliert werden [59]. Zur RNA-Isolierung wurden die Suspensionszellen abzentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml TRIZol resuspendiert. Die adhärenen Zellen wurden nach Entfernung vom Medium und Waschen in PBS durch die Zugabe von 1 ml TRIZol von der Zellkulturflasche abgelöst und anschließend in Eppi-Tubes überführt. Alternativ wurden die vorher eingefrorenen Zellsuspensionen mit TRIZol bei Raumtemperatur aufgetaut. Im zweiten Schritt wurde jeweils 200 µl Chloroform hinzugefügt, die entstandenen Suspensionen durch mehrmaliges Hoch- und Runterpipettieren vermischt. Nach 3 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte Zentrifugierung für 15 min bei 4 °C bei 11500 rpm. Das führte zur Entstehung einer Dreischichtung: die obere, wässrige Schicht enthielt RNA, während Proteine in der unteren organischen Schicht zu finden waren. Die DNA sammelte sich an der Phasengrenze [60, 61]. Der RNA-haltige Überstand wurde dementsprechend abgesaugt, nach Zugabe von 500 µl Isopropanol mit Hilfe des Vortexes vermischt und für 10 min in -20 °C inkubiert. Des Weiteren wurden die Proben erneut zentrifugiert (10 min in 4 °C, 11500 rpm). Nach der Zentrifugation wurden alle darauffolgenden Schritte auf Eis durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 800 µl 75%-Ethanollösung gewaschen, dann zentrifugiert (10 min in 4 °C, 11500 rpm). Dieser Vorgang wurde dabei 1-2 Mal wiederholt. Der letzten Zentrifugation folgte die Trocknung des Pellets in Raumtemperatur bei offenen Tubes, was ca. 30 Min. dauerte. Abschließend wurde das trockene Pellet in 26 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst.

2.4.2 Quantifizierung von isolierter RNA mittels Spectrophotometrie

Die Reinheit der isolierten RNA wurde mittels Photometrie (Wellenlänge 220 nm-750 nm) bestimmt. Diese Methode beruht darauf, dass die Nukleinsäuren spezifische Muster in Absorption von UV-Licht aufweisen. Das ermöglicht die Quantifizierung u.a. von Konzentration sowie Reinheit der isolierten Nukleinsäure. Der Messvorgang wurde gemäß der Bedienungsanleitung durchgeführt. Auf den unteren Sockel des Messgerätes wurde jeweils 1 µl

der getesteten Probe pipettiert. Nach Zudecken mit dem oberen Sockel wurde die Analyse gestartet. Als neutrale Referenz galt Nuklease-freies Wasser. Nach jeder Messung wurde der Objektträger gründlich abgewischt, um Kontaminationen mit anderen Proben zu verhindern. Die gemessenen Werte wurden von der Software in einer Tabelle automatisch zusammengestellt.

2.4.3 Elektrophorese von Nukleinsäuren

Die Qualität der aus den Zellen isolierten RNA wurde zusätzlich mittels Elektrophorese überprüft. Zu diesem Zweck wurde die TapeStation Technologie mit dem dazugehörigen Kit des Herstellers Agilent Technologies verwendet. Die Präparation der Proben erfolgte nach dem Protokoll des Produzenten. Nach Äquilibration von Sample Buffer sowie RNA wurden alle Reagenzien kurz mit dem Vortexer gemischt und zentrifugiert. In jedes Tube wurde jeweils 5 µl Sample Buffer pipettiert, danach wurde in das Tube auf der Position A1 1 µl von dem Referenzreagenz (Ladder) dazugegeben. In die übrigen Tubes wurde jeweils 1 µl von der getesteten Probe hinzugefügt. Weiterhin wurden die Ansätze mit dem Vortexer bei 2000 rpm 1 Minute lang gemischt und anschließend kurz zentrifugiert. Im weiteren Schritt erfolgte für 3 Min. bei 72 °C die Denaturierung zum Abbau sekundärer RNA-Strukturen. Nach Abkühlung und Zentrifugation wurden die Ansätze im TapeStation Gerät platziert. Im letzten Schritt wurde die automatische Analyse gestartet. Nach dem Abschluss des Messvorgangs wurden die Ergebnisse automatisch übermittelt und grafisch dargestellt.

2.4.4 Primer Design und Testung

Die Primer für die PCR wurden mit Hilfe von National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine (NCBI) entworfen. Die entsprechenden mRNA-Sequenzen wurden in der online verfügbaren Genbank von NCBI gesucht und die Primer mittels eines Online-Tools „Primer-BLAST“ designed. Dabei wurden folgende Parameter festgelegt: *Product size* 100-250 bp, *Primer melting temperature* min. 59 °C, max. 61 °C, opt. 60 °C, max difference 2 °C, *Primer size*, *Intron length range* min. 100, max. 1000, *Primer GC content (%)* min. 40%, max. 60%, *Max Self Complementarity* Any 4.00, 3' 1.00. Für alle weiteren Parameter wurden die Grundeinstellungen von „Primer-BLAST“ übernommen. Die ausgewählten Primer wurden auf die mögliche Bildung von sekundären Strukturen durch „Oligo Calc:

Oligonucleotide Properties Calculator“ überprüft. Zusätzlich erfolgte eine zusätzliche Überprüfung der Schmelztemperatur mit Hilfe von dem „NEB Tm Calculator“. Die Primerpaare wurden von der Firma BioTeZ aus Berlin hergestellt und nach der Lieferung auf die Produktspezifität in einer standardisierten qPCR-Testreaktion geprüft.

2.4.5 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription wurde durchgeführt, um aus der isolierten RNA cDNA zu synthetisieren. Im ersten Schritt wurde 1000 ng RNA mit Nuklease-freiem Wasser vermischt um das Standardvolumen von 10 µl zu erreichen. Danach wurde zu jeder Probe jeweils 1µl Random Primers und 2 µl von mM dNTPs hinzugefügt und die entstandene Mischung mit Hilfe vom Vortexer vermischt. Die Ansätze wurden bei 65 °C für 5 Min. inkubiert, danach auf 4 °C runtergekühlt. Parallel dazu wurden die übrigen Substrate vom RT-Mix (Standard-Puffer, DTT, Rnase-Inhibitor, Reverse Transkriptase) zusammengemischt. Im weiteren Schritt wurden in der Menge 7 µl pro Ansatz dazugegeben und die Ansätze für 5 Min. bei 25 °C inkubiert. Dem folgte eine weitere Inkubation bei 50 °C für 30 Minuten. Im nächsten Schritt erfolgte eine Inkaktivierung der Enzyme bei 70°C für 15 Minuten. Zum Schluss wurden die Ansätze erneut auf 4 °C runtergekühlt. Die umgeschriebene cDNA wurde in -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 11: Zusammensetzung von RT- Mix

Substrat	Menge pro Probe (µl)
5x First Standard- Puffer	4
dNTP 10mM	2
DTT 0,1M	1
Random Primers	1
RNAse-Inhibitor	1
Superscript-III-Reverse Transkriptase	1
Summe	10

2.4.6 Real-time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Tabelle 12: Zusammensetzung von Mastermix

Substrat	Menge pro Probe (μl)
Primer forward 10 μ M	0,5
Primer reverse 10 μ M	0,5
Luna Universal qPCR Master Mix	10

Zuerst wurden die Substrate des Mastermix zusammengemischt. Danach wurde eine Mischung aus 1 μ l cDNA und 8 μ l Nuklease-freiem Wasser pro Ansatz vorbereitet.

In die Wells wurden jeweils 9 μ l des cDNA Mix hineinpipettiert. Für jede Probe wurde ein technisches Duplikat sowie eine Wasserkontrolle mitgeführt. Anschließend wurden pro Ansatz 11 μ l Mastermix zu jedem Ansatz hinzugegeben. Danach wurde auf die PCR-Platte eine transparente Folie zur Abdeckung aufgetragen. Im weiteren Schritt erfolgte die Abzentrifugation. Zum Schluss wurde die Platte in dem PCR-Cycler platziert und der Amplifikationsvorgang gestartet. Die Amplifikation von Nukleinsäuren verlief in 40 Zyklen nach folgendem Schema: 95°C \rightarrow 95°C \rightarrow 58°C \rightarrow 58°C \rightarrow 95°C.

2.4.7 Sequenzierung der RNA mittels Oxford Nanopore Technologie

Die Oxford Nanopore Technologie stellt ein Next-Generation Sequencing Verfahren der dritten Generation dar. Diese Methode beruht auf der Messung der Veränderungen des Ionenstroms an den Poren, durch die die DNA-Einzelstränge durchfließen. Das Signal wird von einem Basenpentamer gemessen, dann verschiebt sich das Molekül immer weiter um jeweils ein Nukleotid. Nach jeder solchen Verschiebung erfolgt eine erneute Messung. Dadurch entsteht ein charakteristisches Muster der Veränderung des Ionenstroms auf, sodass die Sequenz der untersuchten DNA direkt in der Echtzeit ermittelt wird [62]. Die Sequenzierung des Transkriptoms wurde angewendet, um die potentiellen Zielgene für die PCR-Experimente zu identifizieren. Vor der eigentlichen Sequenzierung erfolgte Total RNA wurde aus der gesamten RNA die mRNA über polyA Anreicherung isoliert. Die gewonnene mRNA (100-120 ng) wurde in einer Bibliothek entsprechend dem Originalprotokoll SQK-

DCS109 von Oxford Nanopore Technologies [63] für die Sequenzierung aufbereitet.

Das Abgleichen der Rohdaten der cDNA-Sequenzierung erfolgte mithilfe von Minimap2 [64] gegen das Referenzgenom UCSC hg19 assembly, GRCh37 abgeglichen und annotiert. Anschließend wurde für jedes Transkript die Anzahl der überlappenden Reads (counts) mithilfe von HTSeq [65] ermittelt. Die Normalisierung sowie differentielle Expressionsanalyse erfolgte mit dem Programm Deseq2 [66] basierend auf den ausgezählten counts für jedes Transkript. Dabei wurde die FDR (false discovery rate) auf 0,1 und minimal log fold change auf 0,6 eingestellt. Statistische Analyse und paarweiser Gruppenvergleich erfolgte mit BRB Array Tools, wodurch eine Liste mit signifikant differenziell exprimierten Genen ($p < 0.05$) erstellt wurde. Differentiell exprimierte Gene aus der BRBArray Tools Analyse wurden mithilfe von RStudio (Version 2022.07.0) grafisch dargestellt.

2.5 Auswertung der erhobenen Daten

2.5.1 Quantifizierung der Vitalparameter in der Zellkultur

Der Einfluss von unterschiedlichen Bedingungen in der Zellkultur auf das Wachstum und Überleben von Zellen wurde mittels drei Parametern (weiter als Vitalparameter bezeichnet) quantifiziert:

- **Vitalität** (V), definiert als Anteil der lebendigen Zellen in der gesamten Zellpopulation am Ende des Versuchs
- **absolute Wachstumsrate** (*growth ratio total*, GR_{total}), definiert als Quotient der gesamten (lebendig und tot) Zellkonzentration am Ende des Versuchs zu der gesamten Zellkonzentration zu Beginn des Versuchs
- **relative Wachstumsrate** (*growth ratio living*, GR_{living}) definiert als Quotient der Konzentration lebendiger Zellen am Ende des Versuchs zu der Konzentration lebendiger Zellen zu Beginn des Versuchs
- Die genannten Parameter wurden immer am Ende der vorgesehenen Inkubationszeit erhoben. Zu Beginn des Experiments betrug die Vitalität der Zellen stets 100%, während die Zellkonzentration dem im Versuchsdesign vorgegebenem Wert entsprach (s. Absatz 2.3.5).

2.5.2 PCR

Der Ct-Wert wurde für jede Probe automatisch von der Software des Thermocyclers berechnet. Der Threshold für alle durchgeführten Experimente wurde postexperimentell bei 40 000 gesetzt.

Diese Berechnung der relativen Genexpression erfolgte anhand folgender Formeln [67]:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Housekeeper}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Probe}} - \Delta Ct_{\text{Kontrolle}^*}$$

$$\text{Fold} = 2^{-(\Delta\Delta Ct)}$$

* geometrischer Mittelwert der Ct -Werte in der Kontrollgruppe (keine Behandlung mit Datatumumab bzw. Monokultur bzw. keine Vorbehandlung der MM-Zellen vor der Kokultur mit den BMSC)

2.5.3 Statistische Analyse

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm IBM SPSS Statistics 27. Die Abbildungen wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 9 (relative Genexpression) und IBM SPSS Statistics 27 entworfen. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen den verglichenen Gruppen (Kokultur vs. Monokultur, Behandlung vs. keine Behandlung, Kokultur mit vorbehandelten MM-Zellen vs. Kokultur mit nativen MM-Zellen) wurde mit dem nicht-parametrischen Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test für zwei unverbundene Stichproben geprüft. Als statistisch signifikant wurden Ergebnisse mit einem p-Wert $\leq 0,05$ eingestuft.

3. ERGEBNISSE

3.1 Charakteristika der Versuchsgruppen

Um den Einfluss von ausgewählten Faktoren auf die Vitalparameter und Genexpression der Zellen zu untersuchen, wurden sie unter verschiedenen Bedingungen kultiviert. Insgesamt wurden sechs Konstellationen der Zellkulturbedingungen etabliert, die sich hinsichtlich folgender Aspekte unterschieden haben: Behandlung mit Daratumumab in Dosis 0,24mg/ml, Kokultivierung BMSC mit MM-Zellen, Vorbehandlung der Myelomzellen mit Daratumumab vor der Kokultur.

Eine Übersicht der Bedingungen und den Fallzahlen in den jeweiligen Gruppen wurde in den Tabellen 13 und 14 dargestellt. Die Bezeichnung der Gruppen A-F bzw. 1-6 wurde in der gesamten Arbeit konsequent, durchgehend verwendet.

Tabelle 13: Versuchsgruppen BMSC

Gruppe	Fallzahl	Behandlung mit Daratumumab	mit Kokultivierung mit MM	MM vorbehandelt mit Daratumumab
A	5	nein	nein	-
B	5	ja	nein	-
C	5	nein	ja	nein
D	5	ja	ja	nein
E	5	ja	ja	ja
F	4	nein	ja	ja
	$\Sigma = 29$			

Tabelle 14: Versuchsgruppen MM

Gruppe	Fallzahl	Behandlung Daratumumab	mit Kokultivierung mit BMSC	MM vorbehandelt mit Daratumumab
1	8	nein	nein	-
2	9	ja	nein	-
3	5	nein	ja	nein
4	3	ja	ja	nein
5	5	nein	ja	ja
6	4	ja	ja	ja
	$\Sigma = 34$			

3.2 Patientencharakteristika

In den Experimenten wurden neben der Zelllinie HS-5 mesenchymale Stromazellen verwendet, die aus den Knochenmarkpunktaten von drei Personen (weiter auch als Spendende bezeichnet) mit einer gesicherten Diagnose des Multiplen Myeloms stammten. Bei dem Eingriff wurden die ethischen Richtlinien stets eingehalten (s. Absatz 2.2.1). Nach Eingang des Materials ins Labor wurden die persönlichen sowie klinischen Daten der Spendenden in einer geschützten Datenbank gespeichert. Für die weitere Bearbeitung wurden die Proben mit aus Buchstaben und Nummern bestehenden Codes versehen, um die Anonymität zu gewährleisten. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose waren die Spendenden zwischen 51 und 77 Jahren (Median 58 Jahre). In drei Fällen handelte es sich um die Erstdiagnose. Eine Person zeigte eine VPGR (Very Good Partial Response) nach Therapie mit der dreifach kombinierten Chemotherapie mit Bortezomib, Cyclophosphamid und Dexamethason. Bei den untersuchten Personen wurden folgende Typen des Multiplen Myeloms festgestellt: IgD lambda, IgA kappa, Leichtkettenmyelom kappa, Leichtkettenmyelom lambda. Eine Übersicht über die klinischen Daten der Spendenden wurde in der Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Klinische Daten der Knochenmarkspendenden

Probencode	Geschlecht	Alter bei ED	Alter bei PE	Myelomtyp	Stadium ISS
V21	m	51	51	IgD lambda	II
V35	m	55	55	IgA kappa	III
V41	m	77	77	LK lambda	III
V90	w	61	69	LK kappa	III

m- männlich; w- weiblich; ED- Erstdiagnose; PE- Probenentnahme; LK- Leichtketten; ISS Internationales Staging-System

3.3 Einfluss verschiedener Zellkulturbedingungen auf die Vitalparameter der BMSC

3.3.1 Vitalparameter in den einzelnen Versuchsgruppen

Die jeweiligen Werte der Vitalparameter für die einzelnen Gruppen wurden auf den Abbildungen 2-4 dargestellt. Auf die Prüfung der statistischen Signifikanz wurde bei den kleinen Fallzahlen aufgrund der wesentlich eingeschränkten Aussagekraft verzichtet.

Insgesamt zeigten die BMSC ein gutes Überleben sowie Wachstumsmuster in der Zellkultur. Die BMSC, die ohne Daratumumab kultiviert wurden (Gruppen A, C und F), wiesen im Durchschnitt eine höhere Vitalität als die behandelten Zellen auf: 93% (Gruppe A) vs. 86% (Gruppe B) in der Monokultur bzw. 86% (Gruppe C) vs. 72% (Gruppe D) in der Kokultur mit den MM-Zellen. Die Vorbehandlung der MM-Zellen mit Daratumumab vor der Kokultivierung mit den BMSC wirkte sich im Vergleich mit der klassischen Behandlung positiv auf die Vitalität (81% vs. 72%) aus. Zwischen den beiden vorbehandelten Gruppen E und F gab es keine relevanten Unterschiede. Für die Gesamtheit der Proben lag die Untergrenze des 95%-Konfidenzintervalls bei 0,77; die Obergrenze bei 0,89. Der Interquartilbereich betrug 0,15.

Die absolute Wachstumsrate war in den unbehandelten Gruppen (A, C, F) höher als in den behandelten (B, D, E). Dieser Effekt war in der Monokultur deutlich ausgeprägter (A vs. B) als in der Kokultur (C vs. D). Zudem wurde eine negative Auswirkung der Vorbehandlung der

MM-Zellen auf die GR_{total} der kokultivierten BMSC beobachtet. Die Untergrenze des 95%-KI lag bei 4,43, die Obergrenze bei 6,05. Der IQR betrug 2,90.

In der relativen Wachstumsrate konnten wesentliche Unterschiede zwischen den nativen und behandelten BMSC beobachtet werden. Die Zugabe von Daratumumab hat diesen Parameter negativ beeinflusst. Dieser Effekt wurde durch die Vorbehandlung der MM-Zellen vor der Kokultivierung mit den BMSC zusätzlich verstärkt. Die Kokultur hat die relative Wachstumsrate ebenfalls reduziert, jedoch weniger stark als die Behandlung mit Daratumumab. Die Grenzen des 95%-KI lagen entsprechend bei 3,62 und 5,32. Der IQR nahm den Wert von 2,89 an.

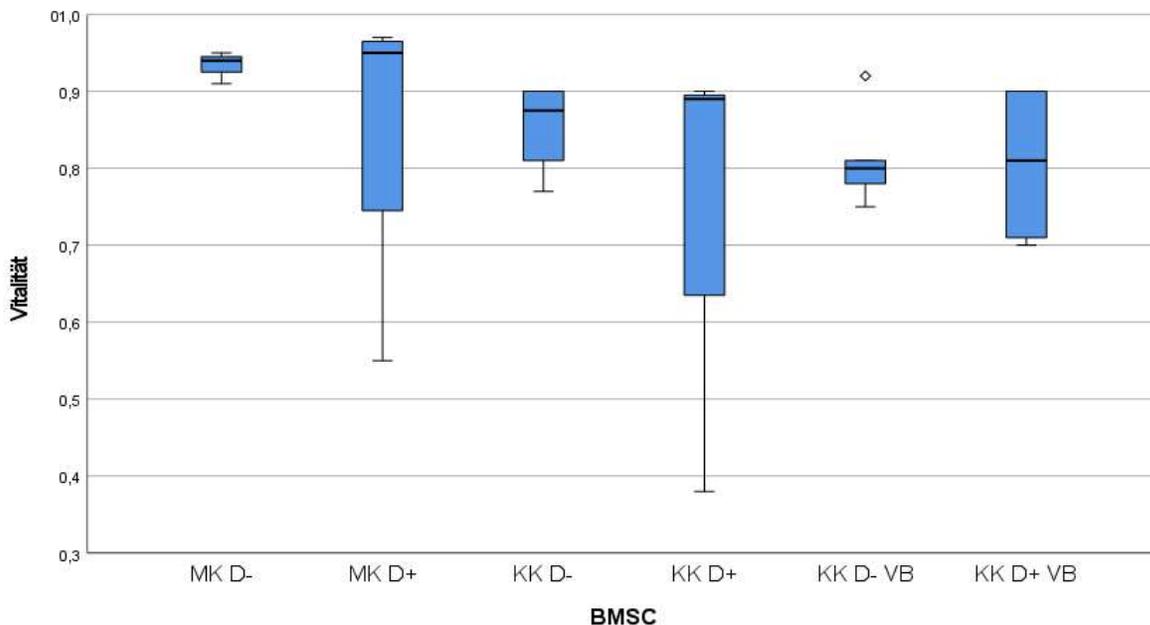


Abb. 2: Vitalität der BMSC in den einzelnen Gruppen. **A** (MK D-) Min 0,91; Max 0,95; Mw \pm SD 0,93 \pm 0,02; Med 0,94. **B** (MK D+) Min 0,55; Max 0,97; Mw \pm SD 0,86 \pm 0,20; Med 0,95. **C** (KK D-) Min 0,77; Max 0,90; Mw \pm SD 0,86 \pm 0,06 Med 0,88. **D** (KK D+) Min 0,38; Max 0,90; Mw \pm SD 0,72 \pm 0,30; Med 0,89. **E** (KK D- VB) Min 0,75; Max 0,92; Mw \pm SD 0,81 \pm 0,06; Med 0,80. **F** (KK D+ VB) Min 0,70; Max 0,90; Mw \pm SD 0,81 \pm 0,11; Med 0,81. MK Monokultur; KK Kokultur; D- keine Behandlung; D+ Behandlung mit Daratumumab; VB Vorbehandlung der MM-Zellen mit Daratumumab vor der Kokultur; Min Minimum; Max Maximum; Mw arithmetischer Mittelwert; SD Standardabweichung; Med Median.

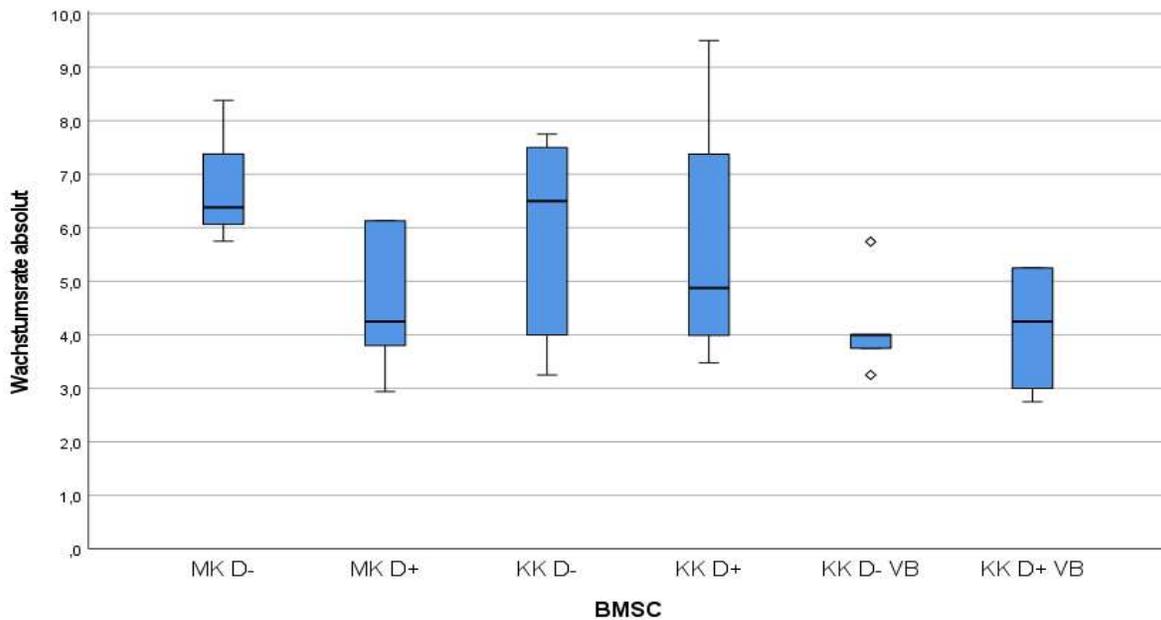


Abb. 3: **Absolute Wachstumsrate der BMSC in den einzelnen Gruppen.** A (MK D-) Min 5,75; Max 8,38; Mw \pm SD 6,84 \pm 1,37; Med 6,38. B (MK D+) Min 2,94; Max 6,13; Mw \pm SD 4,65 \pm 1,43; Med 4,25. C (KK D-) Min 3,25; Max 7,75; Mw \pm SD 5,80 \pm 2,06 Med 4,88. D (KK D+) Min 3,48; Max 9,50; Mw \pm SD 5,68 \pm 2,65; Med 4,88. E (KK D- VB) Min 3,25; Max 5,74; Mw \pm SD 4,15 \pm 0,94; Med 4,00. F (KK D+ VB) Min 2,75; Max 5,25; Mw \pm SD 4,13 \pm 1,31; Med 4,25. MK Monokultur, KK Kokultur, D- keine Behandlung, D+ Behandlung mit Daratumumab, VB Vorbehandlung der MM-Zellen mit Daratumumab vor der Kokultur. Min Minimum; Max Maximum; Mw arithmetischer Mittelwert; SD Standardabweichung; Med Median.

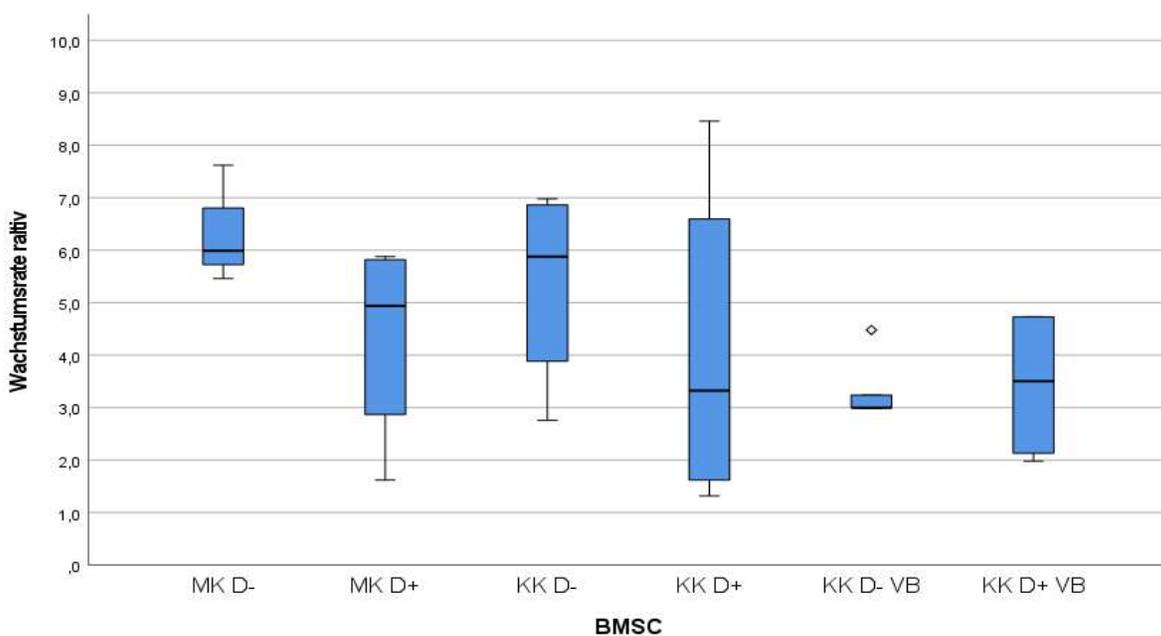


Abb. 4: **Relative Wachstumsrate der BMSC in den einzelnen Gruppen.** A (MK D-) Min 5,46; Max 7,62; Mw \pm SD 6,36 \pm 1,13; Med 5,99. B (MK D+) Min 1,62; Max 5,88; Mw \pm SD 4,35 \pm 1,99; Med 4,94. C (KK D-) Min 2,76; Max 6,98; Mw \pm SD 5,38 \pm 1,95 Med 5,88. D (KK D+) Min 1,32; Max 8,46; Mw \pm SD 4,11 \pm 3,26; Med 3,33. E (KK D- VB) Min 2,99; Max 4,48; Mw \pm SD 3,34 \pm 0,64; Med 3,00. F (KK D+ VB) Min 1,98; Max 4,73; Mw \pm SD 3,43 \pm 1,51; Med 3,51. MK Monokultur, KK Kokultur, D- keine Behandlung, D+ Behandlung mit Daratumumab, VB Vorbehandlung der MM-Zellen mit Daratumumab vor der Kokultur. Min Minimum; Max Maximum; Mw arithmetischer Mittelwert; SD Standardabweichung; Med Median.

3.3.2. Kokultivierung mit den MM-Zellen

Der Effekt der Kokultivierung mit den MM-Zellen auf die Vitalparameter von BMSC wurde untersucht, indem die Vitalparameter aller kokultivierten Versuchsgruppen (n=19) mit denen der monokultivierten Versuchsgruppen (n=10) verglichen wurden. Die gemessenen Werte der Vitalparameter für die beiden Gruppen wurden auf den Abbildungen 5-6 dargestellt. In Bezug auf die Vitalität der Zellen konnte ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,006$) zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Die Wachstumsraten, sowohl absolut als auch relativ, haben sich dagegen nicht signifikant voneinander unterschieden.

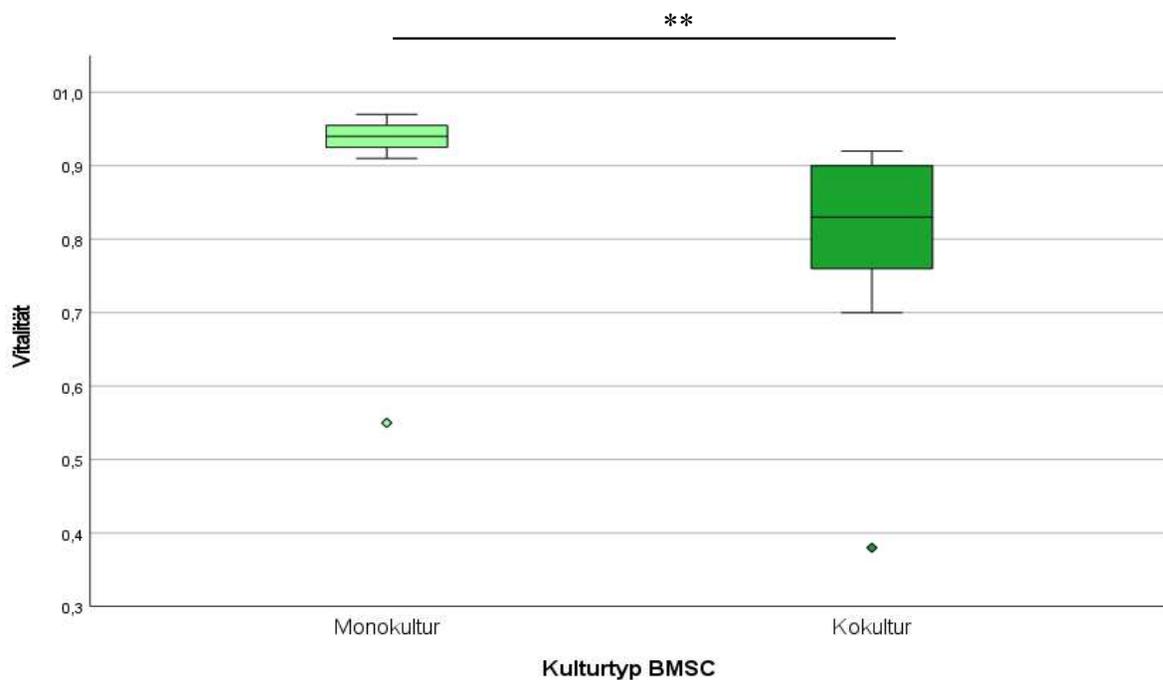


Abb. 5: Vitalität der BMSC in Abhängigkeit vom Kulturtyp. BMSC-Monokultur (n=10) Min 0,55; Max 0,97; Mw ± SD 0,89 ± 0,15; Med 0,94; IQR 0,05; 95%-KI 0,75-1,03. BMSC-Kokultur mit MM (n=19) Min 0,38; Max 0,92; Mw ± SD 0,80 ± 0,13; Med 0,83; IQR 0,15; 95%-KI 0,73-0,88. Die Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. ** Differenz mit $p < 0,01$; \diamond Ausreißer. Min Minimum; Max Maximum; Mw arithmetischer Mittelwert; SD Standardabweichung; Med Median; IQR Interquartilbereich; KI Konfidenzintervall. Die Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert.

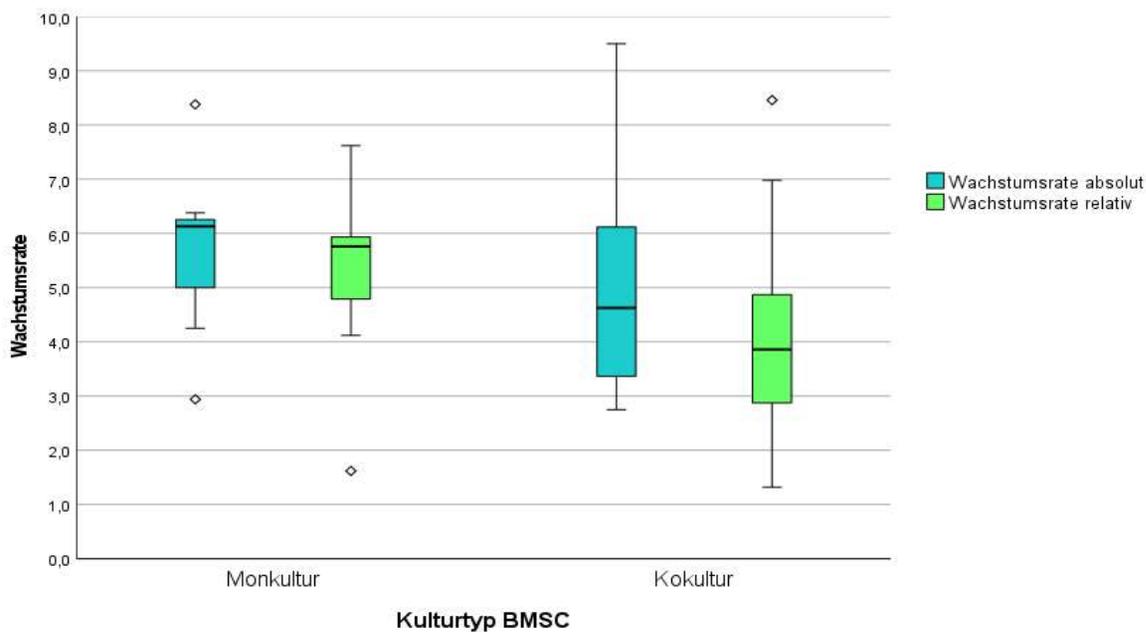


Abb. 6: Wachstumsraten der BMSC in Abhängigkeit vom Kulturtyp. BMSC-Monokultur (n=10) absolute Wachstumsrate: Min 2,94; Max 8,38; Mw \pm SD 5,47 \pm 1,73; Med 5,94; IQR 2,13; 95%-KI 4,12-7,30; relative Wachstumsrate: Min 1,62; Max 7,62; Mw \pm SD 5,20 \pm 1,88; Med 5,76; IQR 1,87; 95%-KI 3,46-6,95. BMSC-Kokultur mit MM (n=19) absolute Wachstumsrate: Min 2,75; Max 9,50; Mw \pm SD 4,94 \pm 1,85; Med 4,25; IQR 3,00; 95%-KI 3,99-6,07; relative Wachstumsrate: Min 1,32; Max 8,46; Mw \pm SD 4,02 \pm 1,98; Med 3,24 IQR 2,12; 95%-KI 3,10-5,20. Die Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. \diamond Ausreißer. Min Minimum; Max Maximum; Mw arithmetischer Mittelwert; SD Standardabweichung; Med Median; IQR Interquartilbereich; KI Konfidenzintervall.

3.3.3 Kokultivierung mit vorbehandelten MM-Zellen

Darüber hinaus wurde untersucht, ob die Vorbehandlung der MM-Zellen mit Daratumumab vor der Kokultivierung mit den BMSC einen Einfluss auf die Vitalparameter der mit MM-Zellen kultivierten BMSC ausübt. Dazu wurden die V , GR_{total} und GR_{living} von den BMSC, die mit vorbehandelten MM-Zellen kokultiviert wurden (n=9), mit den Werten der BMSC, die mit unbehandelten MM-Zellen kokultiviert wurden (n=10), verglichen. In der Analyse wurden nur die kokultivierten Gruppen berücksichtigt, wobei zwischen den behandelten und den nicht behandelten BMSC nicht unterschieden wurde. Die Daten wurden auf den Abbildungen 7-8 veranschaulicht. Die Berechnung der statistischen Signifikanz ergab p-Werte über 0,05. Dementsprechend zeigten sich die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen als nicht signifikant.

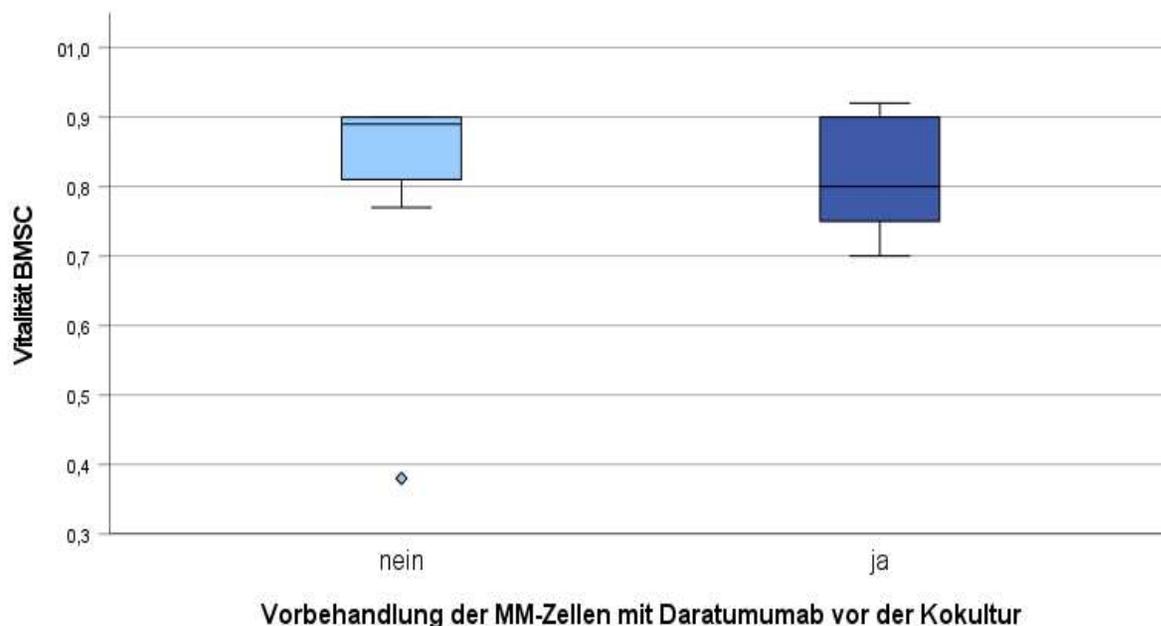


Abb. 7: Vitalität der BMSC in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der MM-Zellen vor der Kokultur mit BMSC. BMSC kokultiviert mit nicht vorbehandelten MM-Zellen (n=10) Min 0,38; Max 0,90; Mw \pm SD 0,80 \pm 0,19; Med 0,89; IQR 0,13; 95%-KI 0,62-0,97. BMSC kokultiviert mit vorbehandelten MM-Zellen (n=9) Min 0,70; Max 0,92; Mw \pm SD 0,81 \pm 0,08; Med 0,80; IQR 0,17; 95%-KI 0,75-0,87. Die Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. \diamond Ausreißer. Min Minimum; Max Maximum; Mw arithmetischer Mittelwert; SD Standardabweichung; Med Median; IQR Interquartilbereich; KI Konfidenzintervall.

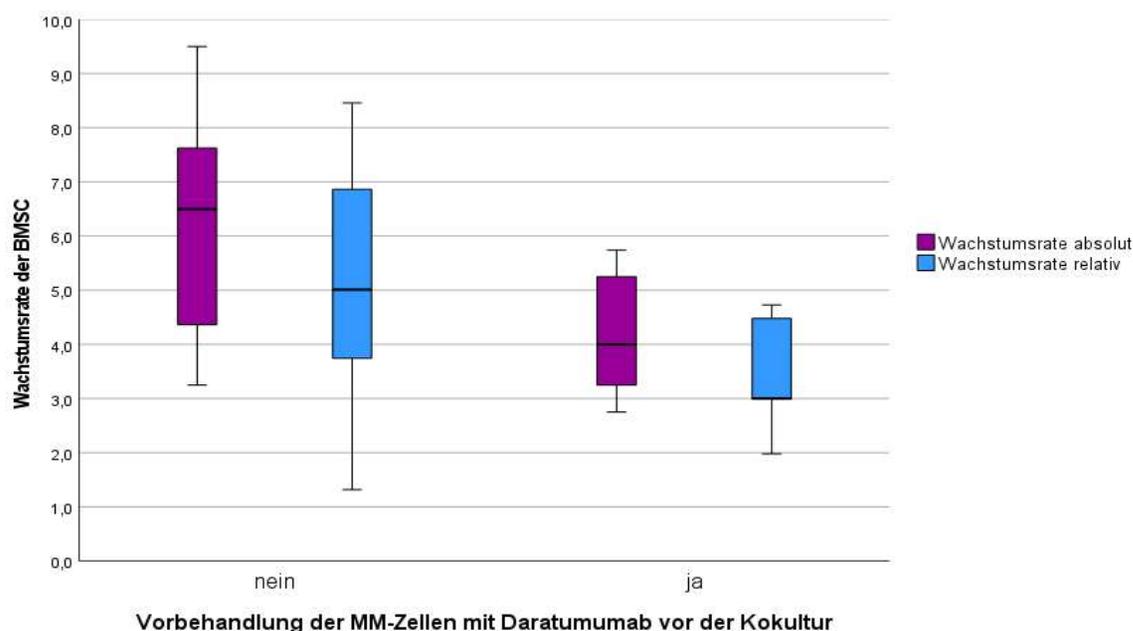


Abb. 8: Wachstumsraten der BMSC in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der MM-Zellen vor der Kokultur mit BMSC. BMSC kokultiviert mit nicht vorbehandelten MM-Zellen (n=10) absolute Wachstumsrate: Min 3,25; Max 8,38; Mw \pm SD 5,52 \pm 1,83; Med 5,75; IQR 3,44; 95%-KI 4,36-6,69; relative Wachstumsrate: Min 2,76; Max 7,62; Mw \pm SD 4,77 \pm 1,78; Med 4,75; IQR 3,56; 95%-KI 3,64-5,90. BMSC kokultiviert mit vorbehandelten MM-Zellen (n=9) absolute Wachstumsrate: Min 2,75; Max 9,50; Mw \pm SD 4,81 \pm 1,81; Med 4,50; IQR 2,88; 95%-KI 3,61-6,24; relative Wachstumsrate: Min 1,32; Max 8,46; Mw \pm SD 3,96 \pm 2,18; Med 4,43; IQR 3,78; 95%-KI 2,68-5,61. Die Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. \diamond Ausreißer. Min Minimum; Max Maximum; Mw arithmetischer Mittelwert; SD Standardabweichung; Med Median; IQR Interquartilbereich; KI Konfidenzintervall.

3.3.4. Behandlung mit Daratumumab

Die Frage nach dem Effekt einer Behandlung mit Daratumumab wurde durch den Vergleich der Vitalparameter von den mit Daratumumab behandelten BMSC (n=14) mit denen der unbehandelten BMSC (n=15) beantwortet. Dabei wurde zwischen kokultivierten und monokultivierten Versuchsgruppen nicht unterschieden. Die Ergebnisse dieser Analyse wurden auf den Abbildungen 9-10 dargestellt. Die Prüfung der statistischen Signifikanz ergab für alle gemessenen Parameter p-Werte > 0,05.

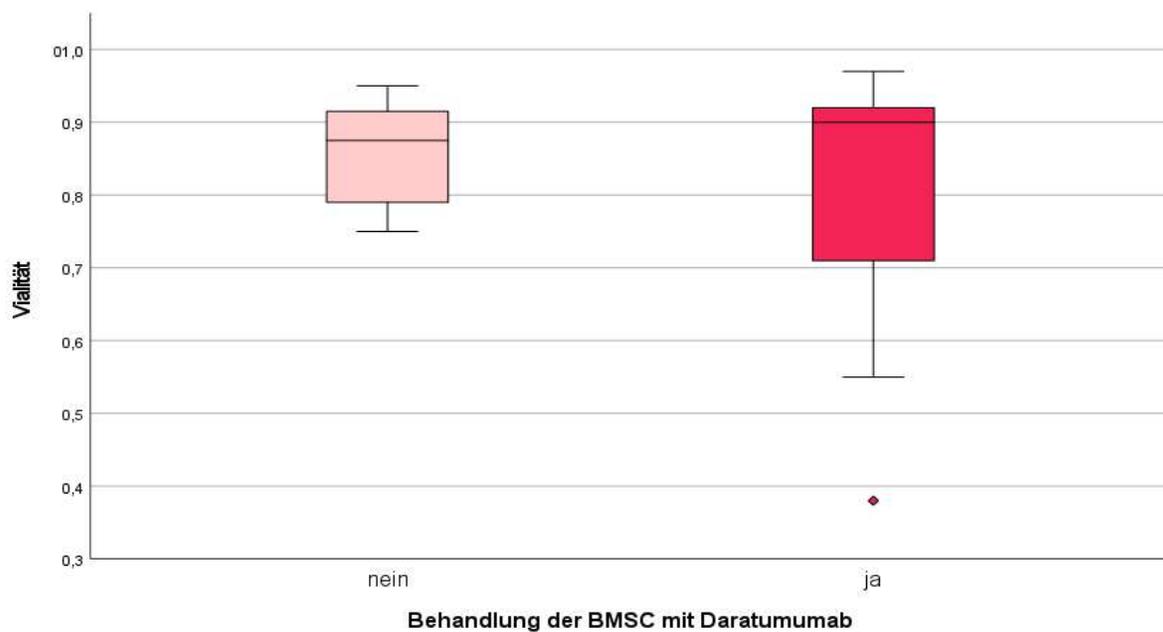


Abb. 9: **Vitalität der BMSC in Abhängigkeit von der Behandlung mit Daratumumab.** BMSC unbehandelt (n=15) Min 0,75; Max 0,95; Mw ± SD 0,86 ± 0,07; Med 0,88; IQR 0,13; 95%-KI 0,81-0,90. BMSC behandelt mit Daratumumab (n=14) Min 0,38; Max 0,97; Mw ± SD 0,80 ± 0,19; Med 0,90; IQR 0,24; 95%-KI 0,67-0,93. Die Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. ◇ Ausreißer. Min Minimum; Max Maximum; Mw arithmetischer Mittelwert; SD Standardabweichung; Med Median; IQR Interquartilbereich; KI Konfidenzintervall.

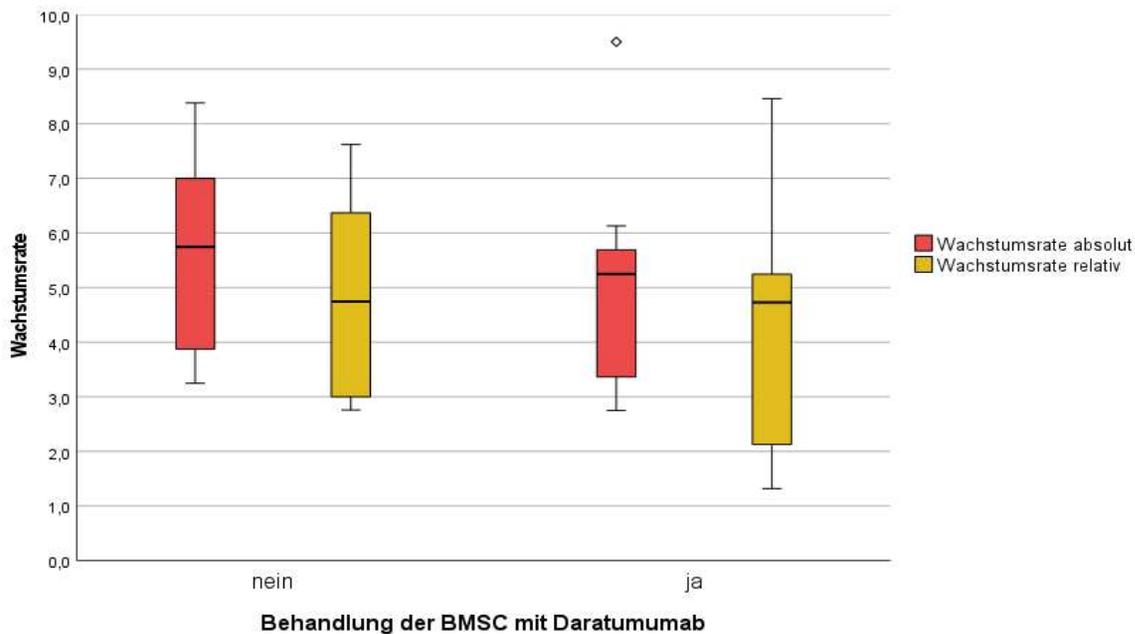


Abb. 10: **Wachstumsraten der BMSC in Abhängigkeit von der Behandlung mit Daratumumab.** BMSC unbehandelt (n=15) *absolute Wachstumsrate*: Min 3,25; Max 8,38; Mw \pm SD 5,52 \pm 1,83; Med 5,75; IQR 3,44; 95%-KI 4,36-6,69; *relative Wachstumsrate*: Min 2,76; Max 7,62; Mw \pm SD 4,77 \pm 1,78; Med 4,75; IQR 3,56; 95%-KI 3,64-5,90. BMSC behandelt mit Daratumumab (n=14) *absolute Wachstumsrate*: Min 2,75; Max 9,50; Mw \pm SD 4,81 \pm 1,81; Med 4,50; IQR 2,88; 95%-KI 3,61-6,24; *relative Wachstumsrate*: Min 1,32; Max 8,46; Mw \pm SD 3,96 \pm 2,18; Med 4,43; IQR 3,78; 95%-KI 2,68-5,61. Die Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. \diamond Ausreißer. Min Minimum; Max Maximum; Mw arithmetischer Mittelwert; SD Standardabweichung; Med Median; IQR Interquartilbereich; KI Konfidenzintervall.

3.4 Einfluss verschiedener Zellkulturbedingungen auf die Vitalparameter der

MM-Zellen

3.4.1 Vitalparameter in den einzelnen Versuchsgruppen

Für die Myelomzellen wurde ebenfalls eine entsprechende Analyse der Vitalparameter durchgeführt. Summa summarum zeigten die MM-Zellen ein gutes Überleben sowie eine relativ hohe Expansionsrate in der Zellkultur. Eine Übersicht über die jeweiligen Werte der Vitalparameter in den einzelnen Gruppen wurden auf den Abbildungen 11-13 dargestellt.

Die höchsten Vitalitätswerte zeigten die vorbehandelten und kokultivierten Myelomzellen (Gruppe 6). In den monokultivierten Gruppen war kein Unterschied zwischen den unbehandelten (Gruppe 1) und den behandelten Zellen (Gruppe 2) sichtbar. Hingegen wurde ein Effekt der Behandlung der Zellen mit Daratumumab in der klassischen (ohne

Vorbehandlung) Kokultur detektiert. Die Vorbehandlung der Myelomzellen vor der Kokultur mit den BMSC beeinflusste die Vitalität positiv, wobei die Differenz zwischen einer bestehenden Therapie und der alleinigen Vorbehandlung keine Relevanz hatte. Für die Gesamtheit der Proben lag die untere Grenze des 95%-Konfidenzintervalls bei 0,77; die obere Grenze bei 0,85. Der Interquartilbereich betrug 0,20.

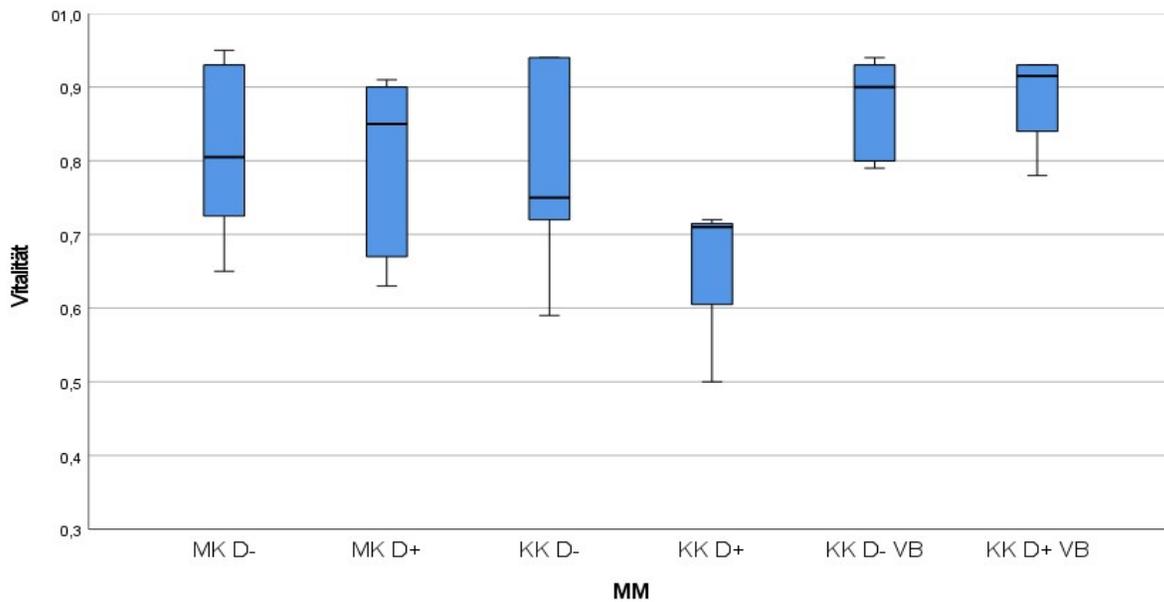


Abb. 11: **Vitalität der MM-Zellen in den einzelnen Gruppen.** **1** (MK D-) Min 0,65; Max 0,95; Mw \pm SD 0,82 \pm 0,12; Med 0,81. **2** (MK D+) Min 0,63; Max 0,91; Mw \pm SD 0,81 \pm 0,12; Med 0,85. **3** (KK D-) Min 0,59; Max 0,94; Mw \pm SD 0,79 \pm 0,15 Med 0,75. **4** (KK D+) Min 0,50; Max 0,72; Mw \pm SD 0,64 \pm 0,12; Med 0,71. **5** (KK D- VB) Min 0,79; Max 0,94; Mw \pm SD 0,87 \pm 0,07; Med 0,90. **6** (KK D+ VB) Min 0,78; Max 0,93; Mw \pm SD 0,89 \pm 0,07; Med 0,92. MK Monokultur; KK Kokultur; D- keine Behandlung; D+ Behandlung mit Daratumumab; VB Vorbehandlung der MM-Zellen mit Daratumumab vor der Kokultur; Min Minimum; Max Maximum; Mw arithmetischer Mittelwert; SD Standardabweichung; Med Median.

In Hinblick auf die absolute Wachstumsrate wurden - wie bei der Vitalität - die höchsten Werte in den vorbehandelten und kokultivierten Myelomzellen gefunden. Die mit den BMSC kokultivierten Myelomzellen zeigten im Durchschnitt höhere Werte als die MM-Zellen in der Monokultur. Der Effekt der Behandlung war in der Kokultur ohne Vorbehandlung messbar, in der Monokultur und bei der Vorbehandlung jedoch nicht. Die Grenzen des 95%-KI lagen entsprechend bei 2,85 und 4,84. Der Interquartilbereich lag bei 3,86.

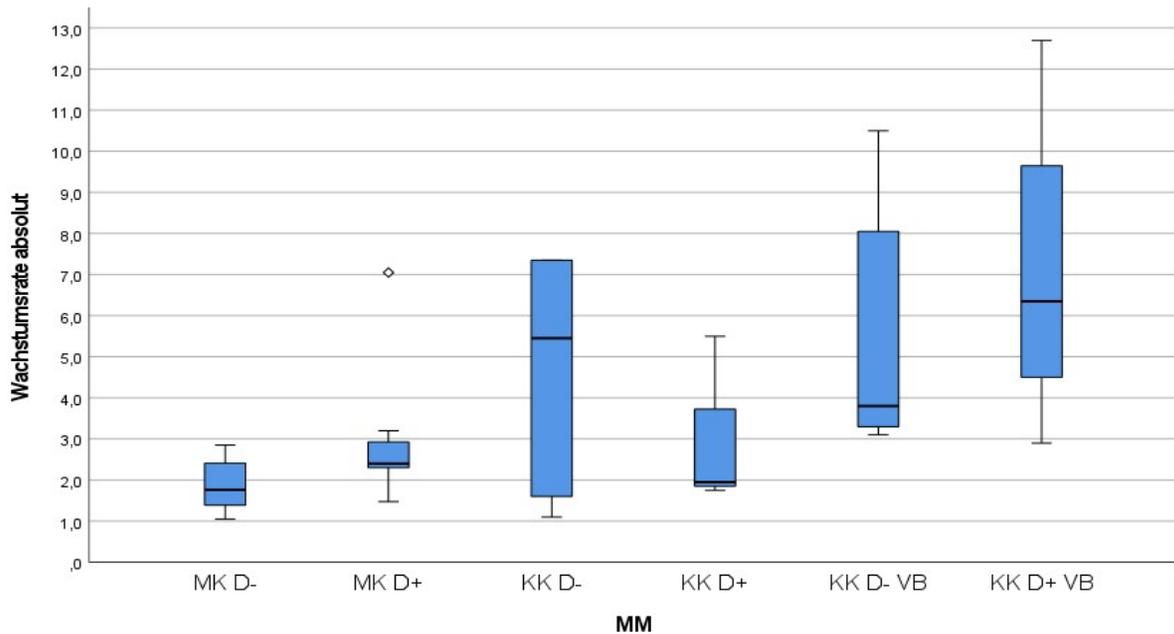


Abb. 12: **Absolute Wachstumsrate der MM-Zellen in den einzelnen Gruppen.** 1 (MK D-) Min 1,05; Max 2,85; Mw ± SD 1,88 ± 0,63; Med 1,76. 2 (MK D+) Min 1,48; Max 7,05; Mw ± SD 2,95 ± 1,62; Med 2,40. 3 (KK D-) Min 1,10; Max 7,35; Mw ± SD 4,57 ± 3,05 Med 5,45. 4 (KK D+) Min 1,75; Max 5,50; Mw ± SD 3,07 ± 2,11; Med 1,95. 5 (KK D- VB) Min 3,10; Max 10,50; Mw ± SD 5,75 ± 3,34; Med 3,80. 6 (KK D+ VB) Min 2,90; Max 12,70; Mw ± SD 7,08 ± 4,09; Med 6,35. MK Monokultur; KK Kokultur; D- keine Behandlung; D+ Behandlung mit Daratumumab; VB Vorbehandlung der MM-Zellen mit Daratumumab vor der Kokultur; Min Minimum; Max Maximum; Mw arithmetischer Mittelwert; SD Standardabweichung; Med Median.

Ebenfalls in Bezug auf die relative Wachstumsrate wiesen die vorbehandelten und kokultivierten Myelomzellen die höchsten Werte auf. Von den monokultivierten MM-Zellen zeigten die mit Daratumumab behandelten Zellen eine ausgeprägtere Expansion als die nativen Tumorzellen. Währenddessen war die Korrelation mit der Behandlung in den nicht vorbehandelten, kokultivierten MM-Zellen genau umgekehrt. Die untere Grenze des 95%-KI lag bei 2,27; die obere bei 4,12. Der IQR nahm den Wert von 2,71 an.

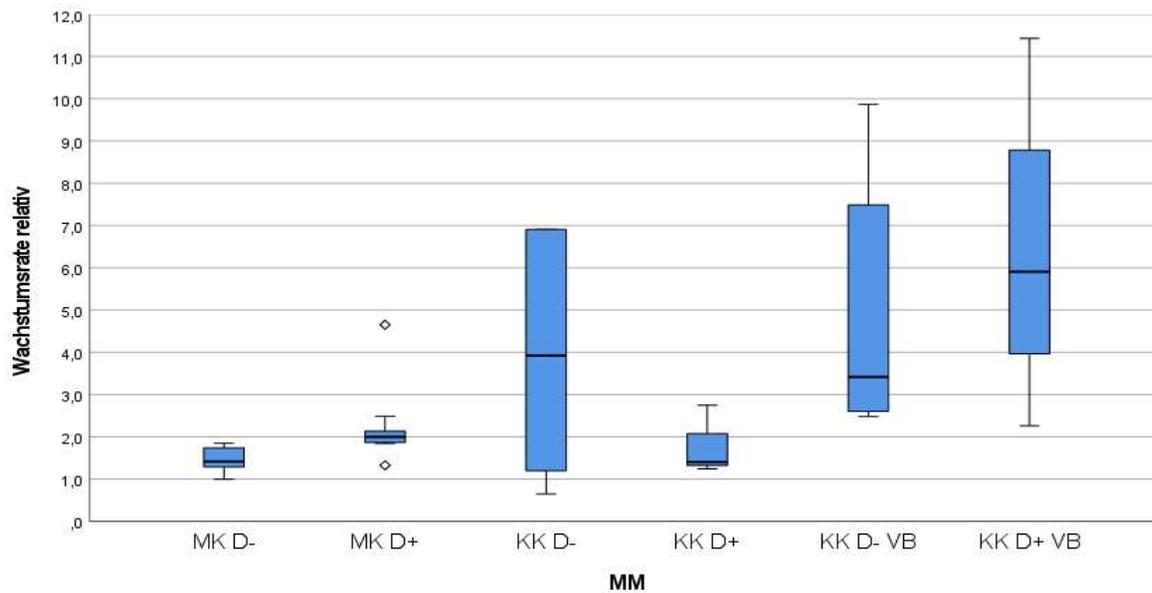


Abb. 13: **Relative Wachstumsrate der MM-Zellen in den einzelnen Gruppen.** **1** (MK D-) Min 1,00; Max 1,85; Mw \pm SD $1,47 \pm 0,29$; Med 1,42. **2** (MK D+) Min 1,33; Max 4,65; Mw \pm SD $2,27 \pm 0,95$; Med 2,00. **3** (KK D-) Min 0,65; Max 6,91; Mw \pm SD $3,92 \pm 3,00$; Med 3,92. **4** (KK D+) Min 1,24; Max 2,75; Mw \pm SD $1,80 \pm 0,83$; Med 1,40. **5** (KK D- VB) Min 2,48; Max 9,87; Mw \pm SD $5,17 \pm 3,33$; Med 3,42. **6** (KK D+ VB) Min 2,26; Max 11,43; Mw \pm SD $6,98 \pm 3,79$; Med 5,91. MK Monokultur; KK Kokultur; D- keine Behandlung; D+ Behandlung mit Daratumumab; VB Vorbehandlung der MM-Zellen mit Daratumumab vor der Kokultur; Min Minimum; Max Maximum; Mw arithmetischer Mittelwert; SD Standardabweichung; Med Median.

3.4.2 Kokultivierung mit den BMSC

Um den Effekt der Kokultivierung mit den BMSC auf die Vitalparameter der Myelomzellen zu untersuchen, wurden die Vitalparameter aller kokultivierten Versuchsgruppen (n=17) mit denen der monokultivierten Versuchsgruppen (n=17) verglichen. Es wurde zwischen behandelten und nicht behandelten Zellen nicht unterschieden. Eine Übersicht über die gemessenen Werte der Vitalparameter für die beiden Vergleichsgruppen wurde auf den Abbildungen 14-15 dargestellt. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen konnte für sowohl die absolute ($p = 0,004$) als auch die relative Wachstumsrate ($p = 0,009$) festgestellt werden. Im Gegensatz dazu ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Vitalität.

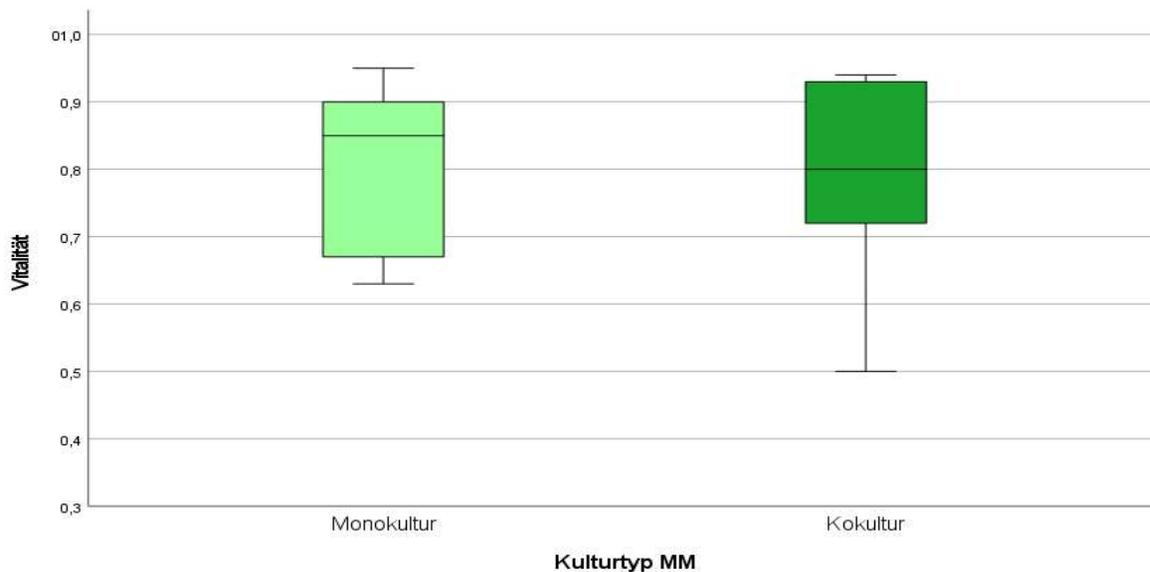


Abb. 14: **Vitalität der MM-Zellen in Abhängigkeit vom Kulturtyp.** MM-Monokultur (n=17) Min 0,63; Max 0,95; Mw \pm SD 0,81 \pm 0,11; Med 0,85; IQR 0,24; 95%-KI 0,75-0,87. MM-Kokultur mit BMSC (n=17) Min 0,50; Max 0,94; Mw \pm SD 0,81 \pm 0,13; Med 0,80; IQR 0,21; 95%-KI 0,74-0,88. Die Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Min Minimum; Max Maximum; Mw arithmetischer Mittelwert; SD Standardabweichung; Med Median; IQR Interquartilbereich; KI. Konfidenzintervall.

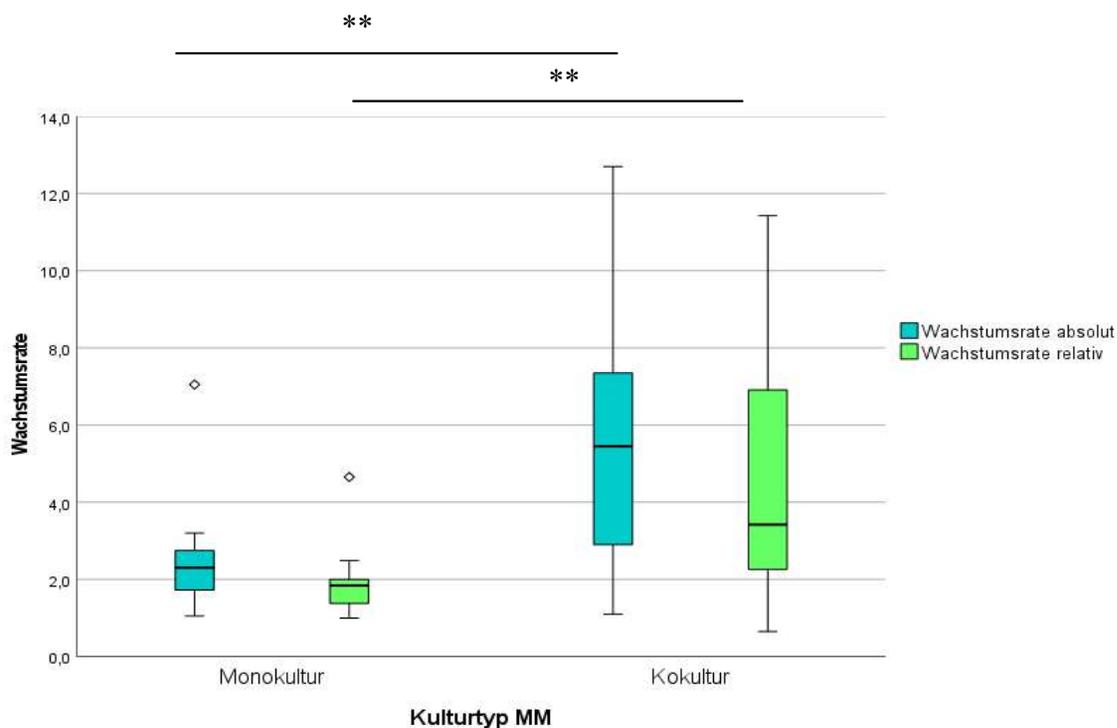


Abb. 15: **Wachstumsraten der MM-Zellen in Abhängigkeit vom Kulturtyp.** MM-Monokultur (n=17) absolute Wachstumsrate: Min 1,05; Max 7,05; Mw \pm SD 2,44 \pm 1,34; Med 2,30; IQR 1,20; 95%-KI 1,76-3,13; relative Wachstumsrate: Min 1,00; Max 4,65; Mw \pm SD 1,89 \pm 0,81; Med 1,84; IQR 0,69; 95%-KI 1,48-2,31. MM-Kokultur mit BMSC (n=17) absolute Wachstumsrate: Min 1,10; Max 12,70; Mw \pm SD 5,24 \pm 3,38; Med 5,45; IQR 4,93; 95%-KI 3,55-6,93; relative Wachstumsrate: Min 0,65; Max 11,43; Mw \pm SD 4,49 \pm 3,21; Med 3,42 IQR 5,08; 95%-KI 2,84-6,14. Die Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. ** Differenz mit $p < 0,01$; \diamond Ausreißer. Min Minimum; Max Maximum; Mw arithmetischer Mittelwert; SD Standardabweichung; Med Median; IQR Interquartilbereich; KI. Konfidenzintervall.

3.4.3 Vorbehandlung MM-Zellen mit Daratumumab vor der Kokultivierung

Des Weiteren wurde analysiert, inwiefern die Vorbehandlung der MM-Zellen mit Daratumumab vor der Kokultivierung mit den BMSC die Vitalparameter der Myelomzellen beeinflussen kann. Für diesen Zweck wurden die vorbehandelten, kokultivierten MM-Zellen (n=9), mit den nicht vorbehandelten, kokultivierten MM-Zellen (n=8) miteinander verglichen. In der Analyse wurden zwischen den während der Kokultivierung behandelten und den nicht behandelten BMSC nicht unterschieden. Eine Zusammenfassung der erhobenen Messwerte wurde auf den Abbildungen 16-17 dargestellt. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zeigten sich als statistisch nicht signifikant.

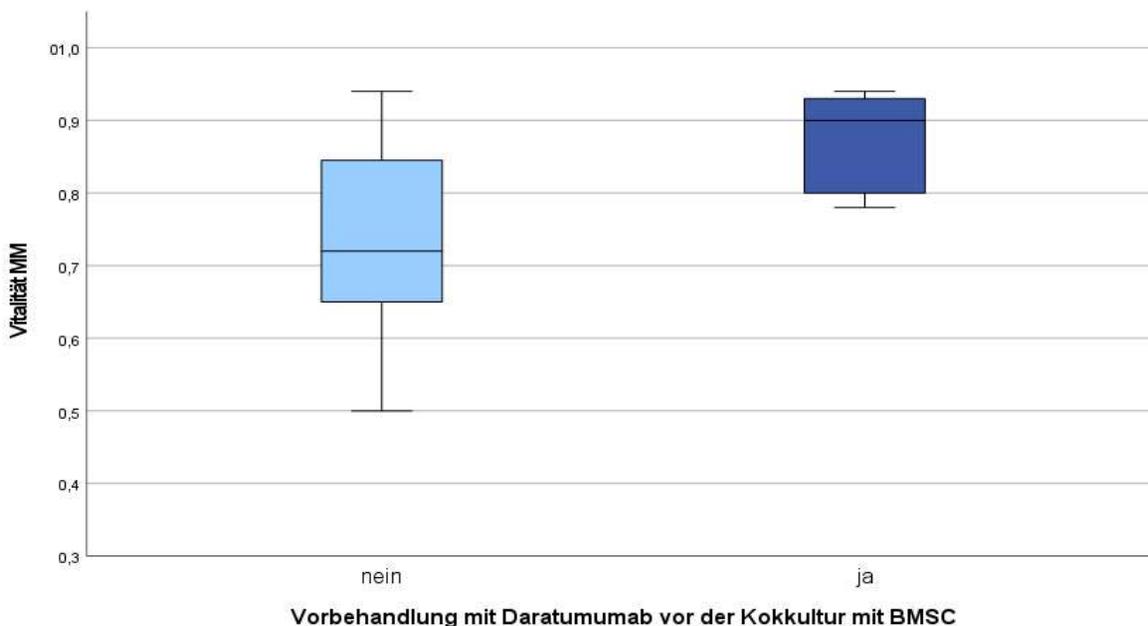


Abb. 16: **Vitalität der MM-Zellen in Abhängigkeit von der Vorbehandlung vor der Kokultivierung mit BMSC.** Nicht vorbehandelte MM-Zellen (n=8) Min 0,50; Max 0,94; Mw \pm SD 0,73 \pm 0,15; Med 0,72; IQR 0,27; 95%-KI 0,61-0,86. Vorbehandelte MM-Zellen (n=9) Min 0,78; Max 0,94; Mw \pm SD 0,88 \pm 0,07; Med 0,90; IQR 0,14; 95%-KI 0,83-0,93. Die Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Min Minimum; Max Maximum; Mw arithmetischer Mittelwert; SD Standardabweichung; Med Median; IQR Interquartilbereich; KI Konfidenzintervall.

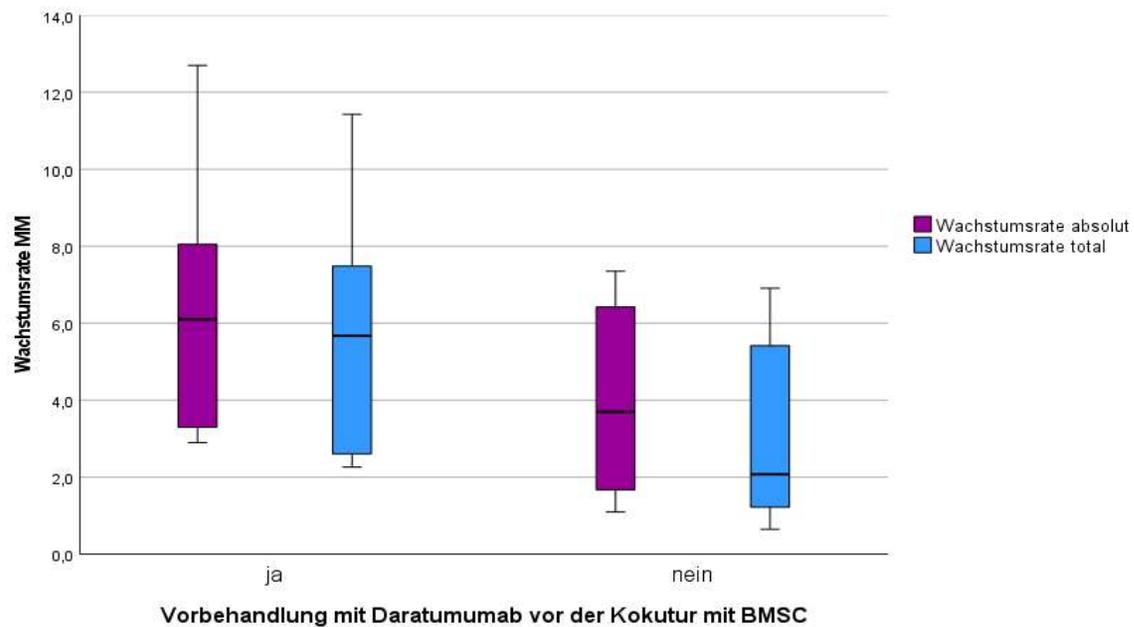


Abb. 17: Wachstumsraten der MM-Zellen in Abhängigkeit von der Vorbehandlung vor der Kokultur mit BMSC.

Nicht vorbehandelte MM-Zellen (n=8) *absolute Wachstumsrate*: Min 1,10; Max 7,35; Mw \pm SD 4,01 \pm 2,68; Med 3,70; IQR 5,25; 95%-KI 1,77-6,25; *relative Wachstumsrate*: Min 0,65; Max 6,1; Mw \pm SD 3,12 \pm 2,56; Med 2,08; IQR 4,95; 95%-KI 0,99-5,26. Vorbehandelte MM-Zellen (n=9) *absolute Wachstumsrate*: Min 2,90; Max 12,70; Mw \pm SD 6,34 \pm 3,51; Med 6,10; IQR 6,08; 95%-KI 3,64-9,04; *relative Wachstumsrate*: Min 2,26; Max 11,43; Mw \pm SD 5,71 \pm 3,36; Med 5,67; IQR 6,13; 95%-KI 3,12-8,29. Die Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Min Minimum; Max Maximum; Mw arithmetischer Mittelwert; SD Standardabweichung; Med Median; IQR Interquartilbereich; KI Konfidenzintervall.

3.4.4. Behandlung mit Daratumumab

Eine vergleichende Analyse der Vitalparameter der mit Daratumumab behandelten (n=16) und der unbehandelten (n=18) MM-Zellen sollte den Effekt der medikamentösen Behandlung in vitro untersuchen. Zwischen den kokultivierten und den monokultivierten Versuchsgruppen wurde an dieser Stelle nicht unterschieden. Die Resultate wurden auf den Abbildungen 18-19 präsentiert. Keine der festgestellten Differenzen erreichte das Niveau der statistischen Signifikanz.

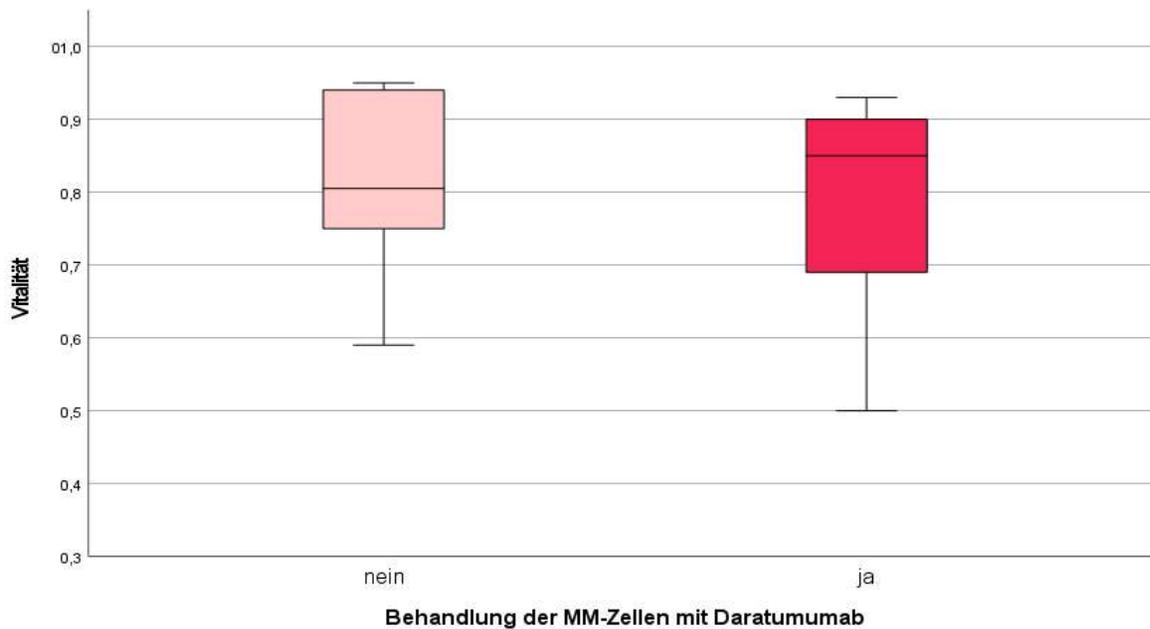


Abb. 18: **Vitalität der MM-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung mit Daratumumab.** MM unbehandelt (n=18) Min 0,59; Max 0,95; Mw \pm SD 0,82 \pm 0,12; Med 0,81; IQR 0,20; 95%-KI 0,77-0,88. MM behandelt mit Daratumumab (n=16) Min 0,50; Max 0,93; Mw \pm SD 0,80 \pm 0,13; Med 0,85; IQR 0,22; 95%-KI 0,73-0,87. Die Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Min Minimum; Max Maximum; Mw arithmetischer Mittelwert; SD Standardabweichung; Med Median; IQR Interquartilbereich; KI Konfidenzintervall.

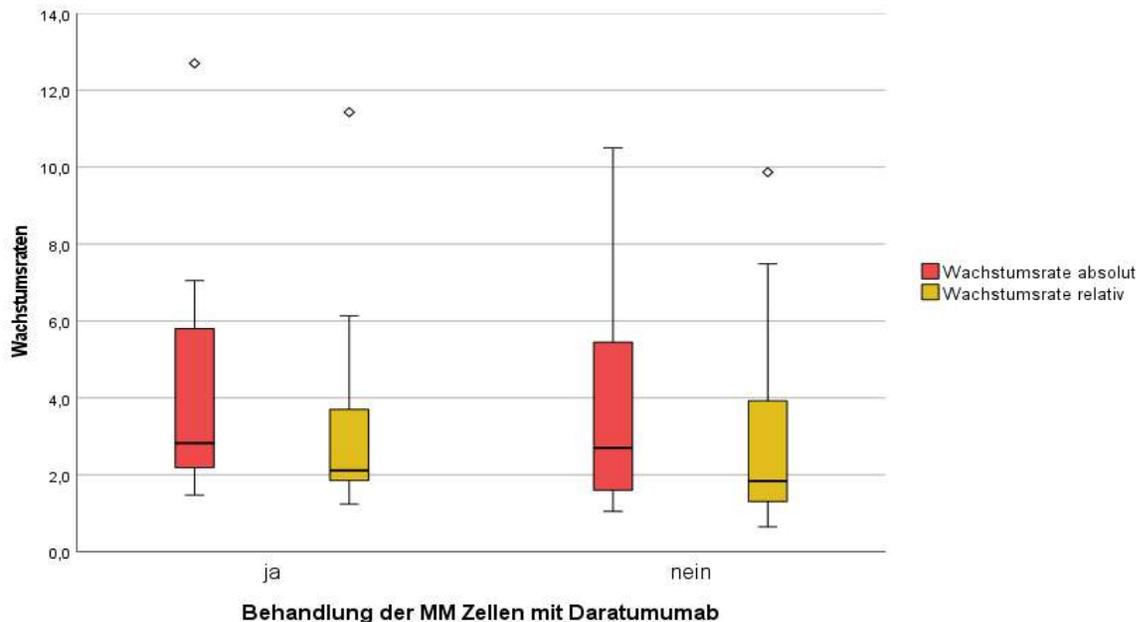


Abb. 19: **Wachstumsraten der MM-Zellen in Abhängigkeit von der Behandlung mit Daratumumab.** MM unbehandelt (n=18) absolute Wachstumsrate: Min 1,05; Max 10,50; Mw \pm SD 3,70 \pm 2,83; Med 2,70; IQR 4,38; 95%-KI 2,30-5,11 relative Wachstumsrate: Min 0,65; Max 9,87; Mw \pm SD 3,18 \pm 2,73; Med 1,84; IQR 1,37; 95%-KI 1,82-4,54. MM behandelt mit Daratumumab (n=16) absolute Wachstumsrate: Min 1,48; Max 12,70; Mw \pm SD 4,00 \pm 2,95; Med 2,83; IQR 3,82; 95%-KI 2,43-5,57; relative Wachstumsrate: Min 1,24; Max 11,43; Mw \pm SD 3,21 \pm 2,65; Med 2,11; IQR 2,33; 95%-KI 1,79-4,62. Die Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. \diamond Ausreißer. Min Minimum; Max Maximum; Mw arithmetischer Mittelwert; SD Standardabweichung; Med Median; IQR Interquartilbereich; KI Konfidenzintervall.

3.5 Einfluss verschiedener Zellkulturbedingungen auf die relative Genexpression

3.5.1 Charakteristika der Versuchsgruppen

Die Untersuchung der Genexpression wurde für siebzehn von den im Punkt 3.1 beschriebenen Proben der BMSC durchgeführt. Die Zusammensetzungen und Fallzahlen der Versuchsgruppen wurden in der Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Versuchsgruppen nach Kulturdesign und Fallzahl

Gruppe	Bedingungen	Fallzahl (n)
A	MK D-	4
B	MK D+	4
C	KK D-	1
D	KK D+	3
E	KK D+ VB	1
F	KK D- VB	4
Summe		17

MK Monokultur; KK Kokultur; D- keine Behandlung; D+ Behandlung mit Daratumumab; VB Vorbehandlung der MM-Zellen mit Daratumumab vor der Kokultur

3.5.2 Zielgene

Experimentell untersucht wurde die Expression folgender Zielgene: IL-6 (Interleukin-6), CD38 (Cluster of Differentiation 38), SIRT1 (Sirtuin-1), SIRT 3 (Sirtuin-3), TP53 (Tumor Protein 53), CCL2 (CC-Chemokinligand 2), IRF2BP2 (Interferon Regulatory Factor 2 Binding Protein), B2M (β 2-Mikroglobulin). Als Housekeeping Gen wurde GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) ausgewählt, dessen Expression (Ct Wert) die Referenz für die Berechnung der relativen Expression darstellte.

3.5.3 Genexpressionsniveau in der Gesamtpopulation der BMSC

Das Expressionsniveau der untersuchten Gene wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion quantifiziert. Von allen Targets zeigte das Housekeeper-Gen GAPDH das höchste Expressionsniveau. Am wenigsten exprimiert von den BMSC wurde das CD38. Die Expression der einzelnen Gene in der Gesamtpopulation der BMSC wurde auf der Abbildung 20 detailliert präsentiert.

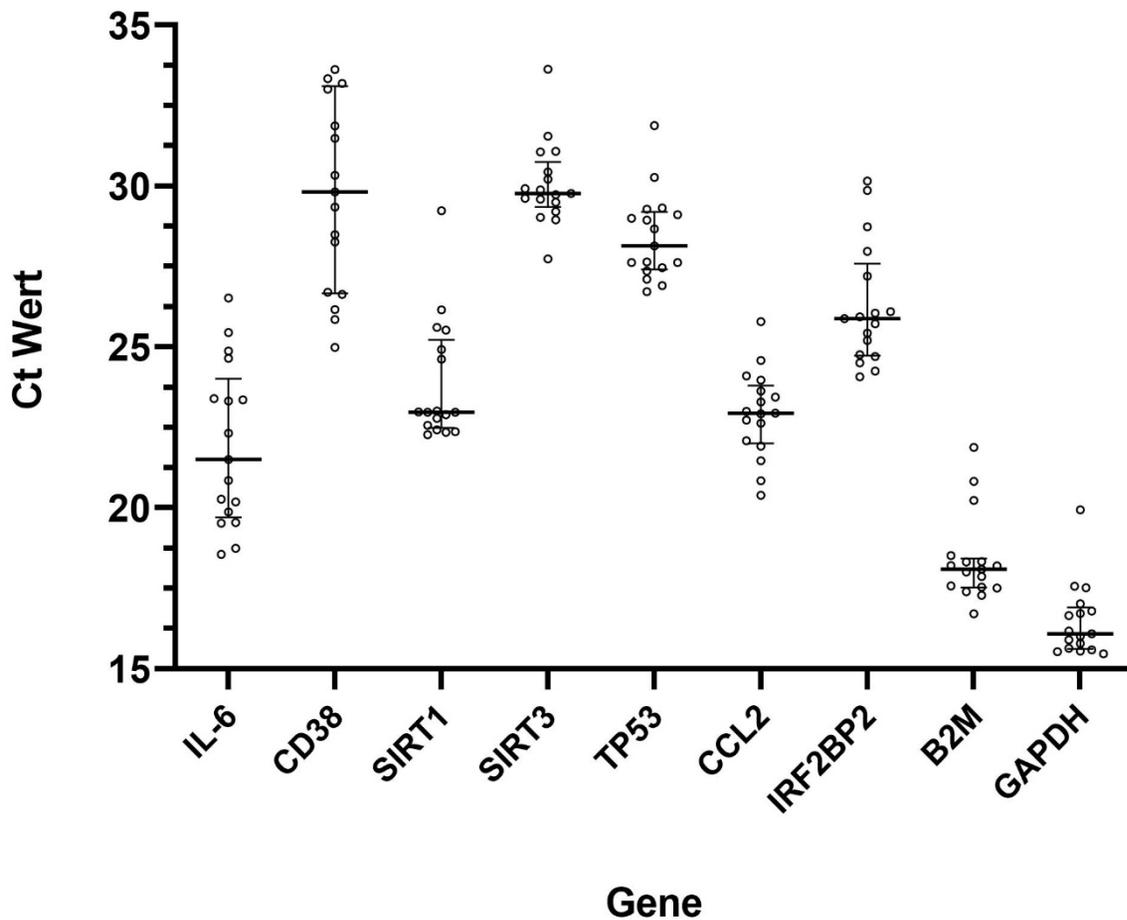


Abb. 20: Quantitative Analyse der Genexpression in der gesamten Population der BMSC. X-Achse: Gene v. l. n. r. IL6, CD38, SIRT1, SIRT3, TP53, CCL2, IRF2BP2, B2M, GAPDH. Y-Achse: Ct Werte mit Median und IQR.

3.5.4 Kokultivierung mit den MM-Zellen

Die mit den Myelomzellen kokultivierten BMSC zeigten im Vergleich mit den monokultivierten BMSC eine erhöhte Expression von CD38, SIRT1, SIRT3 TP53 sowie CCL2. Dagegen waren IL-6,

IRF2BP2 und B2M in der Monokultur vermehrt exprimiert. Eine statistische Signifikanz der Differenz im Expressionsniveau konnte für CD38 ($p=0,000$), SIRT3 ($p=0,015$) sowie CCL2 ($p=0,004$) festgestellt werden. Für die anderen Gene waren die jeweiligen Unterschiede statistisch nicht signifikant. Die relative Genexpression in der Mono- und Kokultur wurde vergleichend auf der Abbildung 21 dargestellt.

3.5.5 Kokultivierung mit vorbehandelten MM-Zellen

Die Vorbehandlung der Myelomzellen mit Daratumumab vor der Kokultivierung mit den BMSC resultierte in einem Anstieg der Expression von CD38, SIRT1, SIRT3, CCL2 und B2M. Im Gegensatz dazu hat sie bei IL-6, TP53 sowie IRF2BP2 einen negativen Einfluss auf das Expressionsniveau ausgeübt. Die Prüfung der statistischen Signifikanz ergab für alle gemessenen Parameter p -Werte $> 0,05$. Somit konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt werden. Die relative Genexpression in Abhängigkeit von der Vorbehandlung der MM-Zellen wurde vergleichend auf der Abbildung 22 dargestellt.

3.5.6. Behandlung mit Daratumumab

In den mit Daratumumab behandelten BMSC wurde eine Erhöhung der Expressionsrate von CD38, SIRT3 sowie TP53 beobachtet. Hingegen bewirkte der Antikörper eine reduzierte Expression von IL6, SIRT1, CCL2, IRF2BP2 und B2M. Die berechneten p -Werte lagen bei allen Genen über dem Signifikanzniveau von 0,05. Damit waren die beobachteten Differenzen statistisch nicht signifikant. Die relative Genexpression in Abhängigkeit von der Behandlung mit dem Medikament wurde vergleichend auf der Abbildung 23 dargestellt.

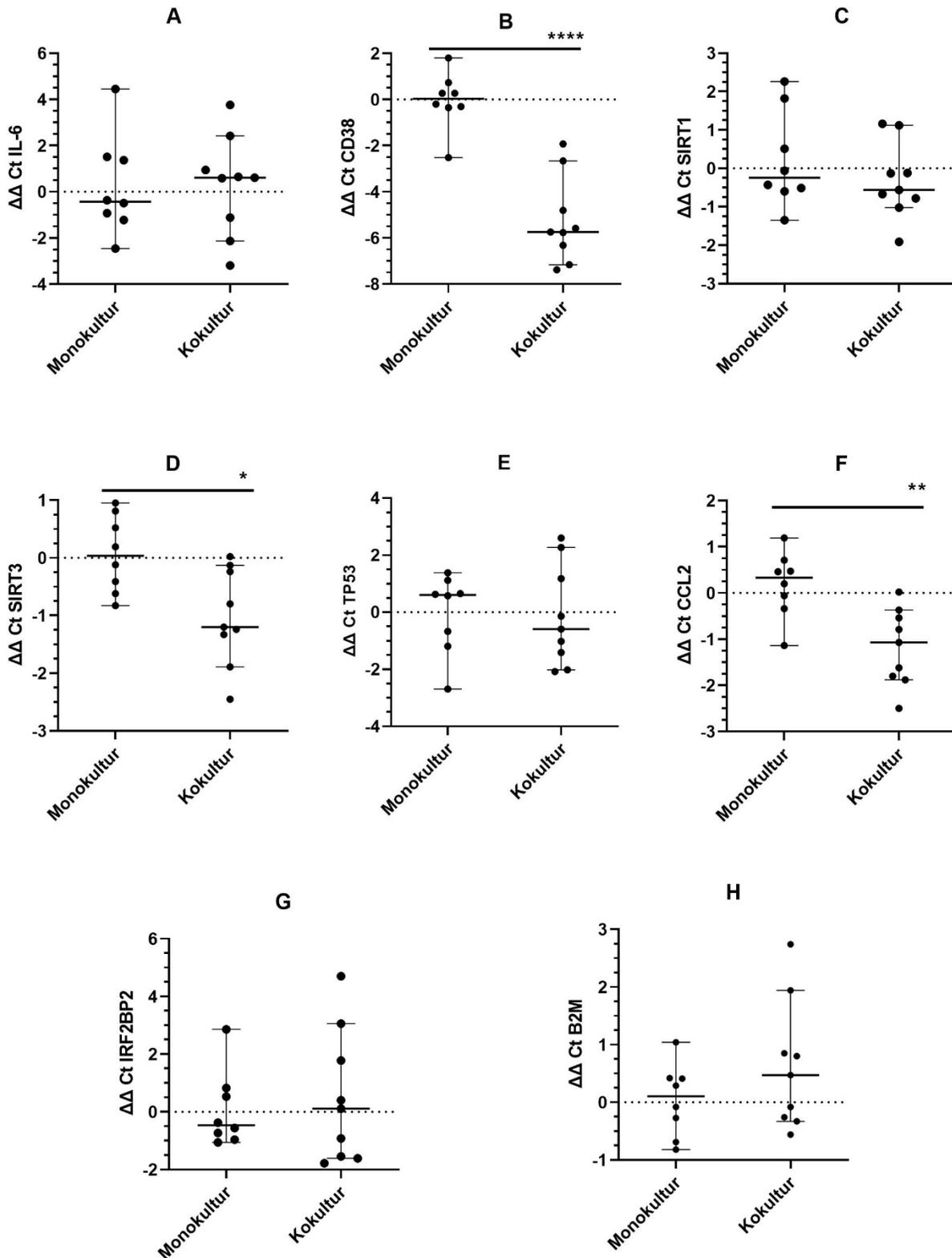


Abb. 21: **Relative Expression der Zielgene in den mono- und kokultivierten BMSC.** IL-6 (A), CD38 (B), SIRT1 (C), SIRT3 (D), TP53 (E), CCL2 (F), IRF2BP2 (G), B2M (H). X -Achse: Kulturtyp. Y-Achse: $\Delta\Delta$ Ct normiert auf Expression von Housekeeper-Gen (GAPDH) mit Median und 95% KI. Die Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. * p < 0,05 ** p < 0,01 **** p < 0,0001

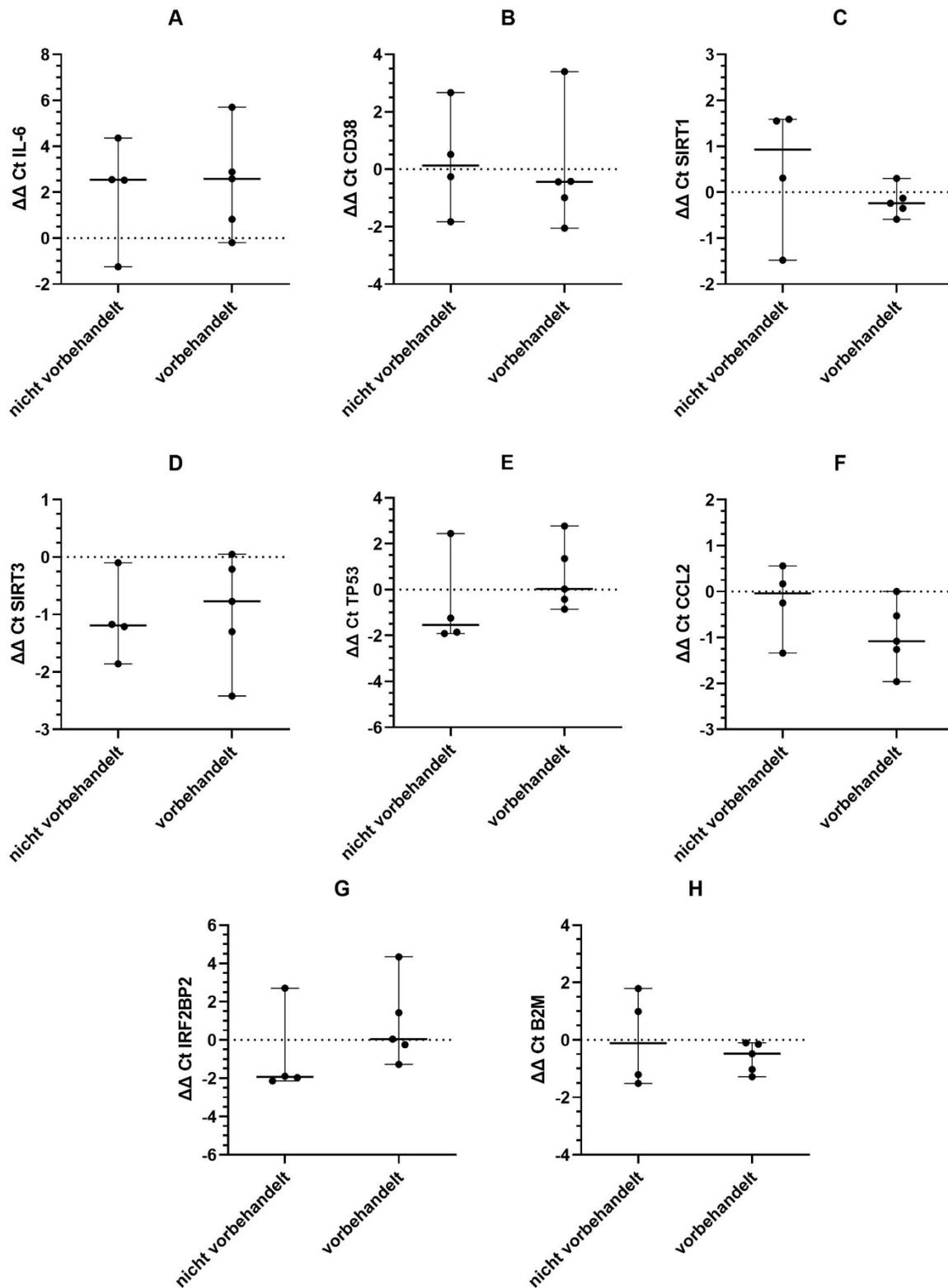


Abb. 22: **Relative Expression der Zielgene in BMSC kokultiviert mit vorbehandelten und nicht vorbehandelten MM-Zellen.** IL-6 (A), CD38 (B), SIRT1 (C), SIRT3 (D), TP53 (E), CCL2 (F), IRF2BP2 (G), B2M (H) X – Achse: Kulturbedingungen. Y-Achse: $\Delta\Delta$ Ct normiert auf Expression von Housekeeper-Gen (GAPDH) mit Median und 95% KI. Die Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert.

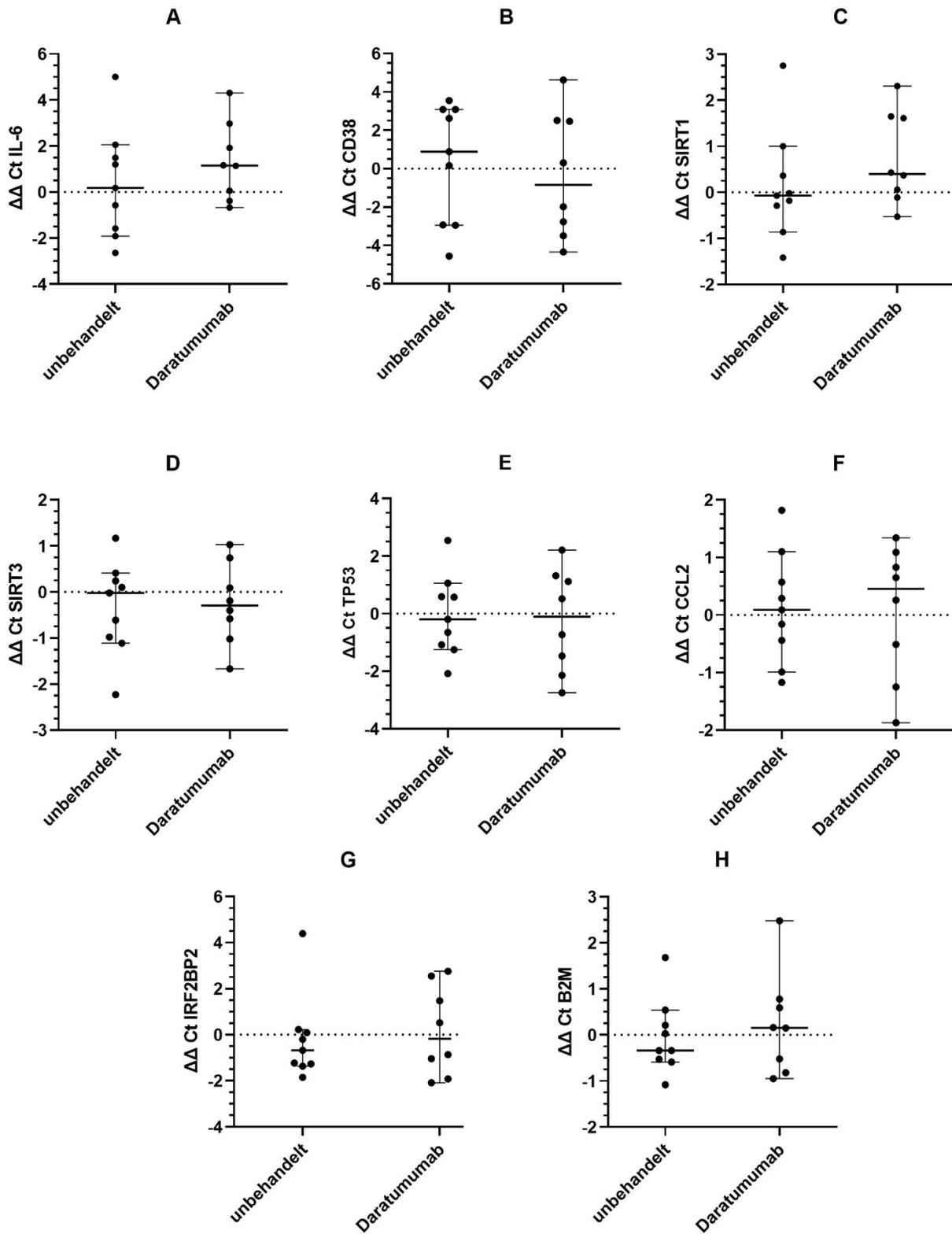


Abb. 23: **Relative Expression der Zielgene in den BMSC mit und ohne Behandlung mit Daratumumab.** IL-6 (A), CD38 (B), SIRT1 (C), SIRT3 (D), TP53 (E), CCL2 (F), IRF2BP2 (G), B2M (H) X -Achse: Behandlungstyp. Y-Achse: $\Delta\Delta$ Ct normiert auf Expression von Housekeeper-Gen (GAPDH) mit Median und 95% KI. Die Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert.

3.6 Globale Genexpressionsanalyse mittels Oxford Nanopore Technologie

In der globalen Analyse der RNA-Expression mittels Oxford Nanopore Technologie wurden die mit MM kokultivierten BMSC analysiert. Dabei wurde die Testgruppe mit Daratumumab behandelt, während die Kontrollgruppe eine native Kokultur ohne Medikamente darstellte. Die untersuchten Proben (vier Paare) wurden unter identischen Bedingungen kultiviert.

Insgesamt zeigten sich bei elf Genen statistisch signifikante ($p \leq 0,05$) Unterschiede in der Expression. Bei all diesen Genen wurde eine erhöhte Expression festgestellt. Die Ergebnisse der NGS-basierten Expressionsanalyse wurden auf Abbildung 24 dargestellt. Da die Gene sehr kleine Fold Change Werte hatten, wurde bei der Darstellung das Threshold für FoldChange von -0.6 und 0.6 auf jeweils -0.1 und 0.1 geändert, um die Unterschiede besser zu veranschaulichen. Bei CCL2 zeigte sich eine wesentlich erhöhte Expression (über 0.6 Fold Change), die ebenfalls statistisch signifikant war.

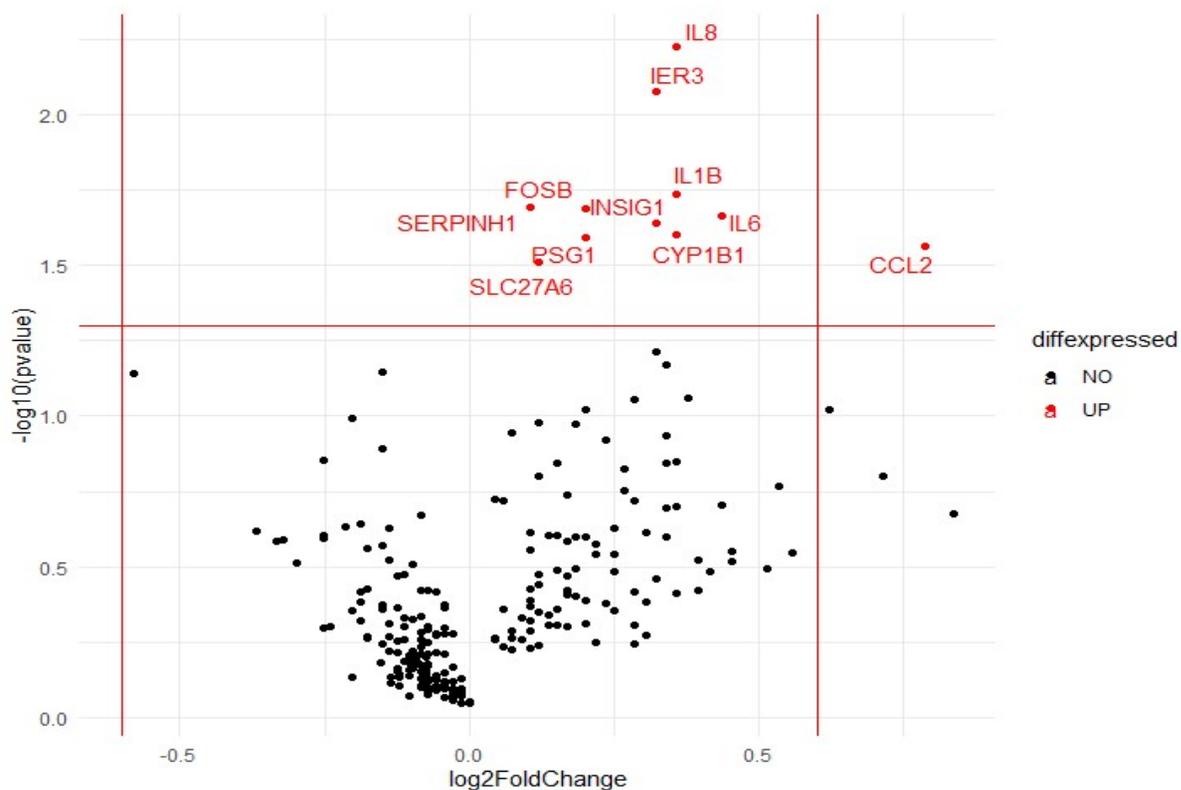


Abb. 24: **Volcano plot der differentiell exprimierten Gene aus dem Vergleich zwischen mit Daratumumab behandelten und unbehandelten Kokulturen.** Gene mit signifikant erhöhter Expression in behandelten Kulturen sind rot markiert und entsprechend des fold changes und des Signifikanzniveaus (p-value) logarithmisch aufgetragen. Die horizontale rote Linie markiert signifikante Unterschiede ($p < 0.05$). Vertikale rote Linien markieren Bereiche von einer mehr als zweifachen Erhöhung ($\log_2(\text{FC}) \geq 0.6$) bzw. Verringerung ($\log_2(\text{FC}) \leq -0.6$) der Genexpression.

Die biologische Funktion (nach String, <https://string-db.org>) der relevanten Gene wurde in der Tabelle 17 dargestellt.

Tabelle 17: Statistisch signifikante Gene und ihre biologische Funktion anhand der Datenbank String

Gen	p-Wert	Funktion
IL8	0,0059826	Chemotaxis, Neutrophilenaktivierung, proinflammatorisch
IER3	0,0084194	Schutz vor Apoptose
IL1B	0,0183855	Potentes proinflammatorisches Zytokin, Neutrophilenaktivierung, Lymphozytenaktivierung, Stimulation der Kollagensynthese
SERPINH1	0,0202698	Chaperonprotein, Kollagensynthese
FOSB	0,0204771	Protoonkogen, Untereinheit des Transkriptionsfaktors ap-1
IL6	0,0217548	Potente Induktion der Akuten Phase, finale Differenzierung der B-Zellen, onkogen bei MM
INSIG1	0,0229982	Cholesterinsynthese, Lipidhomöostase
CYP1B1	0,0250901	Cytochromenzym, NADPH-abhängige Oxidierung
PSG1	0,0256486	Schwangerschaft-spezifisches Beta-1-Glykoprotein, Immunglobulin
CCL2	0,0273791	Chemotaxis, verstärkt die anti-Tumor Aktivität der Monocyten,
SLC27A6	0,0306933	Lipidtransport, Acyl-CoA-Synthese

In der Ingenuity Pathway Analysis (IPA) zeigte sich eine relevante Überschneidung mit dem IL-17-vermittelten Signalweg. Auch in anderen Signalwegen wie IL-6-, HMGB1 (high mobility group protein B1) oder TREM1 (triggering receptor expressed on myeloid cells-1) Pathways wurde eine Übereinstimmung mit den relevant hochregulierten Genen gefunden.

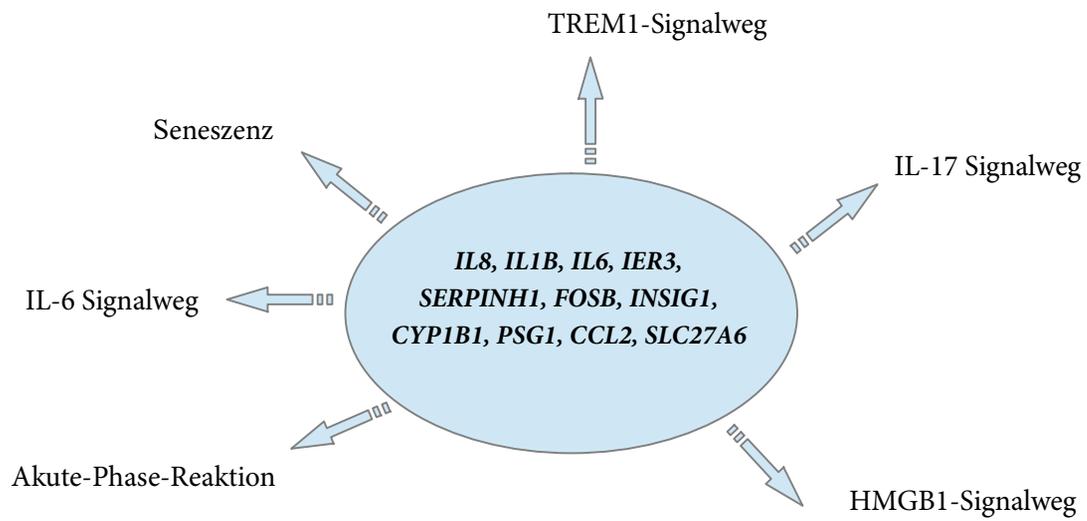


Abb. 25: Gene mit signifikant erhöhter Expression in den mit MM kokultivierten BMSC nach Behandlung mit Anti-CD38 Antikörper und die biologischen Pathways, in denen sie eine Rolle spielen. Die Analyse der relevanten Pathways erfolgte mittels Ingenuity Pathway Analysis.

4. DISKUSSION

4.1 Bewertung der angewandten Methodik

4.1.1 Zellmaterial

Der Prozess der Gewinnung und Expandierung von BMSC aus den Knochenmarkspunktaten verlief in mehreren Etappen. Wie Corre et al. feststellten, ist die Proliferation der Stromazellen vom Alter der Spendenden abhängig [25]. Außerdem zeigten die Colony Forming Units-Fibroblasten (CFU-F) der Stromazellen von Myelomkranken eine signifikant reduzierte Expansionsfähigkeit im Vergleich mit den gesunden BMSC [25]. Durch den geringen Anteil an BMSC im Knochenmark sowie ihr langsames Wachstum betrug die Kultivierungszeit, bis eine für die Experimente notwendige Zellzahl erreicht wurde (meistens Passage 4 oder 5), im Durchschnitt 4-5 Wochen. Diese lange Inkubationsperiode war mit einem erhöhten Risiko für Kontaminationen verbunden, die zum Verlust des Zellmaterials geführt haben. Darüber hinaus wurde bei manchen BMSC während der Kultivierung ein Wachstumsstopp beobachtet, der ebenfalls die Verwendbarkeit der von den Myelomkranken gewonnenen BMSC eingeschränkt hat. All das führte dazu, dass in einem Teil der Experimente stellvertretend die Zelllinie HS-5 verwendet wurde. Diese eignet sich laut NGS-basierten Untersuchungen von Adamo et al. als Modell für BMSC zur Erforschung von den Interaktionen zwischen Tumorzellen und Stromazellen [68]. Die Verwendung einer Zelllinie ermöglichte einerseits die Gewinnung der biologischen Replikate in mehreren Versuchsreihen, um die Reproduzierbarkeit der Resultate zu prüfen und zu gewährleisten. Andererseits konnte sie auch eine eingeschränkte biologische Varianz der Proben demonstrieren, die an dieser Stelle erwähnt werden sollte.

4.1.2 Auswahl der Zielgene

Der Einfluss der Medikamente auf die Stromazellen wurde bisher nicht ausreichend untersucht, wodurch kein direkter Vergleich mit derartigen Voruntersuchungen möglich war.

Die Wahl der Zielgene wurde auf der Basis der verfügbaren Literatur getroffen. Corre et al. identifizierten über 100 Gene, deren Expression in den BMSC der Myelomkranken sich von der in den BMSC der gesunden Knochenmarkspendenden unterschieden hat [25]. Die aberrant exprimierten Gene wurden in 7 Cluster wie auf der Abbildung 26 dargestellt klassifiziert [25].

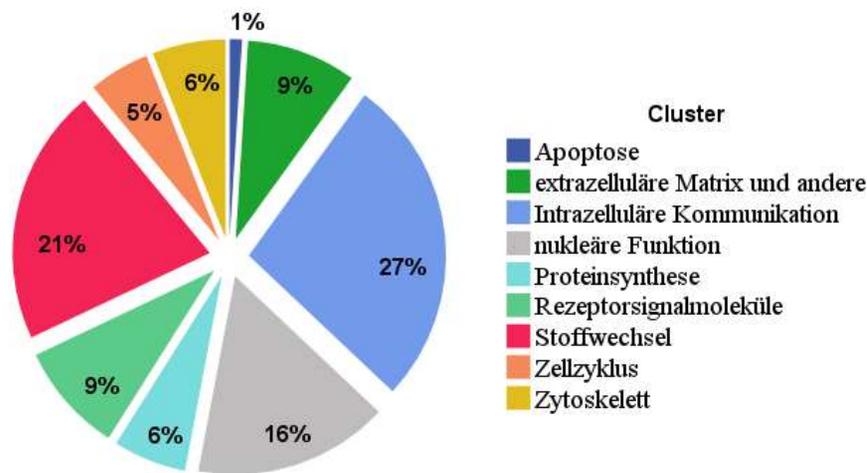


Abb. 26: Klassifikation der Gene mit veränderter Expression in den BMSC im Multiplen Myelom nach der Ontologie laut der Fatigo Plattform. Modifiziert von Corre et al. [25].

Die ausgewählten Zielgene sollten den metabolischen Status der BMSC sowie die durch die Interaktionen mit den Myelomzellen verursachten Veränderungen abbilden. Sie stellten eine Stichprobe dieser Merkmale dar: proinflammatorische Zytokine (IL-6, CCL2), metabolischer Status der Zelle (SIRT1, SIRT3), Modulation der Apoptose (TP53, IRFBP2) und selbstverständlich das Targetmolekül von den Antikörpern (CD38). Darüber hinaus spielen sie eine Rolle in der Onkogenese als Onkogene und/oder Tumorsuppressoren (SIRT3, SIRT1, p53, IRF2BP2, B2M). Durch die pleiotropen Effekte und bekannt aberrante Expressionsmuster im Multiplen Myelom kann ihnen eine besondere Rolle in der Pathogenese dieser malignen Erkrankung zugeordnet werden. Außerdem bilden beinahe alle untersuchten Gene untereinander biologische Netzwerke. Die Beziehungen zwischen den Proteinprodukten der jeweiligen Zielgene wurden mit Hilfe der frei zugänglichen bioinformatischen Plattform „String“ (<https://string-db.org/>) erforscht und auf der Abbildung 27 dargestellt.

Nichtsdestotrotz sollten in der Zukunft weitere Gene im Kontext der Therapieansätze im Tumormicroenvironment untersucht werden. Auch wenn die aktuell eingesetzten Medikamente gegen das Multiple Myelom eine zusätzliche Wirkung gegen die Bestandteile der Tumornische im Knochenmark zeigen, besteht ein Bedarf an weiteren Therapien, die gezielt die Tumor-Knochenmark-Interaktionen inhibieren würden [69, 70].

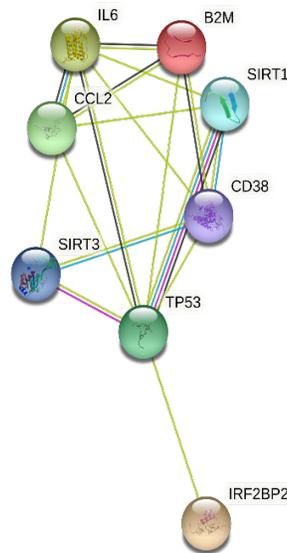


Abb. 27: **Netzwerk der durch die Zielgene kodierte Proteine.** B2M Beta2-Mikroglobulin, CCL2 ,CC-Chemokinligand 2, CD38 Cluster of Differentiation 38, IL6 Interleukin-6, IRFBP2 Interferon Regulatory Factor 2 Binding Protein 2, SIRT1 Sirtuin-1, SIRT3 Sirtuin-3, TP53 Tumorprotein 53. Hellgrün: Beziehungen gefunden im Text Mining, blau: Interaktionen bekannt aus den Datenbanken, rosa: experimentell bestimmte Interaktionen, schwarz: Koexpression. Generiert und übernommen von String (<https://string-db.org/cgi/network?taskId=b6CL0y5qIMBW&sessionId=bVokv9YRKWCI>, Zugang am 14.12.2020).

4.1.3 Aussagekraft der statistischen Testung

Die statistische Signifikanz hängt im Wesentlichen von der Fallzahl (n) ab. Bei der erreichten Fallzahl muss die Aussagekraft der statistischen Testung als teilweise eingeschränkt angesehen werden. Die festgestellten Unterschiede zwischen den verglichenen Gruppen können relevant sein, auch wenn der berechnete p-Wert über dem Signifikanzniveau von 0,05 lag.

4.2. Effekte auf der zellulären Ebene

4.2.1 Kokultur

Die kokultivierten BMSC wiesen eine signifikant reduzierte Vitalität sowie (nicht signifikant) reduzierte Wachstumsraten im Vergleich mit den monokultivierten BMSC auf. Damit

korreliert die verminderte Expansionskapazität der Stromazellen aus dem Myelommilieu, die von Corre et al. beobachtet wurde [25]. Reagan und Ghobrial schrieben zudem von einer langsameren Proliferation dieser Zellen, die, verglichen mit den gesunden BMSC, im Zusammenhang mit einer geringeren Expression der Rezeptoren für Wachstumsfaktoren und einer vermehrter Expressierung der proinflammatorischen Zytokine stand [71]. Des Weiteren wurde von Berenstein et al. ein Seneszenz-artiger Phänotyp mit Zellzyklusarrest in der S-Phase in den BMSC der Myelomkranken festgestellt [32]. Allerdings zeigte sich dort ein umgekehrter Zusammenhang: Die mit den MM-Zellen kokultivierten BMSC wiesen im Vergleich mit den monokultivierten eine Reduktion der Seneszenz sowie des Zellzyklusarrestes auf [32], wobei in dieser Untersuchung vorwiegend die BMSC von den Myelomkranken in verschiedenen Krankheitsstadien analysiert wurden. Außerdem wurden die Kranken vor der Probenentnahme mit unterschiedlichen Medikamenten behandelt und das Experiment selbst beinhaltete keine Behandlung in vitro. Die wesentlichen Unterschiede im Experimentdesign (Zellpopulation, Behandlung in vitro) können somit die abweichenden Ergebnisse plausibilisieren. Fairfield et al. beobachteten im Gegensatz dazu eine Induktion des Seneszenz-artigen Phänotyps in den Knochenmarkadipozyten während der Kokultur mit dem MM-Zellen [72]. Darüber hinaus zeigten sie, dass der Kontakt mit den Myelomzellen vor der Differenzierung einen ebenfalls Seneszenz-artigen Phänotyp in sich differenzierenden mesenchymalen Stammzellen bewirken kann [73]. Dieser Phänotyp mit seinem Seneszenzaspekt könnte eine Erklärung für die reduzierte Vitalität und Wachstum der mit den Myelomzellen kokultivierten BMSC liefern. Ebenfalls kann zudem die alters- und myelombedingte Verminderung der Proliferation der BMSC (s. Absatz 4.1.1) ursächlich sein. Dieser Sachverhalt korreliert zudem mit der konkordant erhöhten Expression der Gene (CD38, SIRT3), die in den Alterungsprozessen eine relevante Rolle spielen, in den kokultivierten BMSC. Anders als die BMSC zeigten die kokultivierten Myelomzellen eine signifikant erhöhte Wachstumsrate im Vergleich mit der Monokultur. Der positive Einfluss der BMSC auf die Expansion der Myelomzellen wurde bereits in verschiedenen Experimenten bewiesen [15, 29]. Corre et al. zeigten zusätzlich, dass die BMSC des Multiplen Myeloms das Tumorstadium signifikant besser unterstützen als die gesunden Zellen [25]. Garrido et al. detektierten, dass der direkte Kontakt der primären AML-Zellen mit der Zelllinie HS-5 sowohl die Proliferation als auch die Vitalität der Tumorzellen gefördert hat [74]. Darüber hinaus

bewirkte er bei den Leukämiezellen eine Inhibierung der kultur- sowie medikamentenbedingten Apoptose [69]. Die Ergebnisse dieser Dissertation stehen im Einklang mit den aufgeführten Resultaten aus den Vorarbeiten. Der tumorfördernde Einfluss der BMSC konnte hier erneut detektiert werden und bestätigt die aktuell geltende Meinung.

4.2.2 Behandlung mit monoklonalen Anti-CD38-Antikörpern

Die Vitalparameter der BMSC, die mit Anti-CD-38-Antikörpern behandelt wurden, fielen schlechter (nicht signifikant) als die der unbehandelten Zellen aus. Laut den bisher bekannten Forschungsergebnissen wird CD38 auf der Oberfläche der BMSC jedoch kaum bzw. nicht exprimiert [75]. Für einen monoklonalen Antikörper gegen CD38 wie Daratumumab ist es dementsprechend anzunehmen, dass eine direkte Wirkung des Medikamentes auf die BMSC aufgrund des fehlenden Zielmoleküls sehr eingeschränkt oder sogar nicht existent sein kann. Die beobachteten Effekte lassen sich am ehesten durch folgende indirekte Wirkmechanismen erklären. Zum einen sind die CD38-Moleküle nach der Kokultivierung mit MM-Zellen auf der Oberfläche von BMSC detektierbar [75], wodurch sich ein Target für den Antikörper ergäbe [75]. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass die Wirkung von monoklonalen Anti-CD-38-Antikörpern indirekt die Moleküle (z. B. Integrine) beeinflusst, die die Interaktionen zwischen den Myelomzellen und den Stromazellen vermitteln. Das könnte sich potentiell auf die Vitalparameter der betroffenen BMSC auswirken. Des Weiteren kann die reduzierte Vitalität sowie Expansionsfähigkeit während der Behandlung eine Folge des zellulären Stresses sein, der durch den Zusatz der zytotoxischen Substanz in das Kulturmedium zustande kam. Wider Erwarten konnte kein signifikanter Behandlungseffekt von monoklonalen Anti-CD-38-Antikörpern in der Myelompopulation gezeigt werden. Lediglich in der Kokultur ohne Vorbehandlung war eine Reduzierung der Vitalparameter während der Behandlung im Vergleich zur Kontrolle sichtbar. De Haart et al. berichteten von einer BMSC-induzierten Resistenz gegen Daratumumab, die auf der Induktion der Survivin-Expression in den Myelomzellen durch die Interaktionen mit den BMSC beruhte [53]. Dieser Zusammenhang konnte hier nicht reproduziert werden, weil die Behandlung mit Daratumumab in der Monokultur die Vitalparameter der Myelomzellen nicht wesentlich mehr als in der Kokultur beeinträchtigt hat. Ein möglicher Grund dafür ist der postulierte zelluläre Stress, hervorgerufen durch die Kokultur mit MM und das Medikament, der zur Insuffizienz der

BMSC in ihrer tumorsupportiven Rolle führen konnte. Die Dosierung des Medikamentes sollte der in dem klinischen Setting entsprechen. Die in den Experimenten verwendete Dosis war höher als die in den bekannten Vorarbeiten [53, 76-79], deswegen ist sie als Ursache des ausbleibenden Behandlungseffektes nicht plausibel. Neben den anderen Myelomzelllinien wurde auch die Zelllinie U266 verwendet, um die biologische Vielfalt, die innerhalb des Multiplen Myeloms auftritt, abzubilden. Ihre Zellen exprimieren jedoch laut Ghose et al. wenig CD38 [79]. Die Verwendung dieser Zelllinie konnte durch die Verzerrung der ermittelten Werte für den ausbleibenden Behandlungserfolg zusätzlich ursächlich sein.

4.2.3 Vorbehandlung mit Daratumumab

Die Vorbehandlung der Myelomzellen mit monoklonalen Anti-CD-38-Antikörpern vor der Kokultur hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Vitalparameter weder von den Stromazellen noch der Myelomzellen. Die dezente Verschlechterung der Vitalwerte der BMSC wurde auch in diesem Fall am ehesten durch die Beeinträchtigungen der alternden und ggf. seneszenten Zellen durch zusätzliche Manipulationen (Kokultur mit „gestressten“ Myelomzellen, Behandlung) verursacht. Die Myelomzellen haben hingegen eine leichte Verbesserung der Vitalparameter gezeigt. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen kann eine gewisse Adaptation an den Stressfaktor bzw. Induktion der Resistenzmechanismen sein, die in der Kokultur durch die Interaktionen mit den Stromazellen verstärkt wurde. Die Stärke dieses Effektes war jedoch gering. Es scheint dementsprechend keine Rolle zu spielen, welches Behandlungsdesign in vitro angewendet wird. Des Weiteren spricht das, genauso wie die in den obigen Absätzen beschriebenen Zusammenhänge zwischen den Interventionen und ihren Auswirkungen, für die zentrale Stellung der Tumor-Stroma-Interaktionen, die die Effekte der medikamentösen Behandlung dominieren oder sogar antagonisieren können, wie es von Reagan et al. beschrieben wurde [71].

4.3. Molekulare Veränderungen der BMSC

4.3.1. CC-Chemokinligand 2

Das Protein CCL2 (C-C Motif Chemokine Ligand 2), bezeichnet auch als „chemotaktischer Tumorfaktor“, wird sowohl von den Tumorzellen selbst als auch von den Zellen des

Tumormicroenvironments (u.a. Stromazellen) sezerniert [80]. Die Vorarbeiten detektierten neben der ausgeprägten Fähigkeit zur Chemoattraktion auch einen proinflammatorischen Effekt von CCL2 [80]. Darüber hinaus kann CCL2 die Proliferation, Tumordinvasion und Metastasierung fördern [81]. Eine Hochexpression von CCL2 wurde in fortgeschrittenen und metastasierten Tumoren gefunden [81]. Tang und Amar zeigten zudem, dass der Tumorsuppressor p53 die Aktivität signifikant reduzieren kann, indem er an den CCL2-Promotor bindet [82]. Des Weiteren stellten Li et al. eine erhöhte Expression von CCL2 nicht nur in den malignen Plasmazellen selbst, sondern auch in sämtlichen Zellen des Myelom-Knochenmarks fest [83]. Dabei wurde eine höhere CCL2-Expression in den CD138-negativen Zellen als in den primären Myelomzellen detektiert [83]. Zusätzlich beobachteten sie, dass die BMSC der Myelomkranken mehr CCL2 (sowohl mRNA als auch Protein) als die gesunden BMSC exprimierten [83].

Gemäß diesen Erkenntnissen erscheint die in dieser Arbeit gefundene signifikant erhöhte Expression von CCL2 in den mit Myelom kokultivierten BMSC plausibel. Sie korreliert auch mit dem bekannten proinflammatorischen Effekt der Zytokine, der für die Tumorexpansion von großer Bedeutung ist [84]. Darüber hinaus unterstützt sie die postulierte zentrale Rolle der direkten Myelom-Stroma-Zellkontakte für die Etablierung der tumorfördernden Interaktionen zwischen den beiden Zellpopulationen [29, 31]. Die Behandlung mit monoklonalen Anti-CD-38-Antikörpern bewirkte hingegen lediglich einen kaum messbaren Unterschied in der Expression von CCL2, was mit der eingeschränkten Wirksamkeit des Medikaments auf die Stromazellen erklärbar ist. Der antagonistische Einfluss von p53 auf die Expression von CCL2 konnte nur im Falle der Kokultur mit den vorbehandelten Myelomzellen bestätigt werden, jedoch war die Effektstärke sehr gering ausgeprägt. In den übrigen Vergleichen wurde eine konkordant erhöhte Expression beider Gene gefunden.

4.3.2 Zyklische ADP-Ribose-Hydrolase (CD38)

Auch wenn das CD38 von zahlreichen Zellen exprimiert wird, findet man auf den BMSC kein bzw. sehr geringe Mengen von CD38 [31, 37]. Wie Marlein et al. mittels Durchflusszytometrie feststellten, bewirkt die Kokultur der Myelomzellen mit den BMSC eine Reduktion der Expression von CD38 auf den Tumorzellen mit gleichzeitiger Detektierbarkeit dieses Moleküls auf den BMSC [75]. Dies war mit dem CD38-abhängigen Mitochondrientransfer von den

Stromazellen in die Myelomzellen über die sog. „tumor-derived tunneling nanotubes“ verbunden [75]. Es ist dementsprechend möglich, dass die Myelomzellen die Genexpression von CD38 anregen, um den eigenen metabolischen Status zu optimieren. Diese Hypothese kann von der erhöhten Expression des CD38 in den kokultivierten BMSC unterstützt werden. Des Weiteren zeigten Camacho-Prereira et al., dass die CD38-Expression mit der Fortschreitung der Alterungsprozesse steigt [85]. Die Regulierung des metabolischen Status durch das CD38 erfolgte über einen SIRT-3 abhängigen Mechanismus [85]. Diese Resultate korrelieren mit der konkordant erhöhten Genexpression von CD38 und SIRT3 in den kokultivierten BMSC, deren Vitalparameter schlechter als die der monokultivierten Stromazellen waren. Dieser Zusammenhang geht auch mit der von Corre et al. verminderter Expansion der Colony Forming Units-Fibroblasten aus dem Knochenmark der Myelomkranken [25] einher und suggeriert dementsprechend die Funktion der beiden Proteine in den Alterungs- und Seneszenzprozessen.

Dagegen spricht jedoch die Tatsache, dass bei der Behandlung mit monoklonalen Anti-CD-38-Antikörpern, die eine Verschlechterung der Vitalparameter der Stromazellen bewirkte, der Expressionsanstieg von CD38 mit einer minimal reduzierten Expression von SIRT3 verbunden war. Dieser Effekt war jedoch nicht stark ausgeprägt.

4.3.3 Sirtuin-3

Die mitochondriale Deacetylase SIRT3 ist dank der Fähigkeit zur Regulierung anderer Proteine in zahlreichen Prozessen der Energiegewinnung (oxidative Phosphorylierung, Krebs-Zyklus, Harnstoffzyklus, β -Oxidation) involviert [86]. Dadurch spielt sie eine wichtige Rolle für das metabolische Gleichgewicht der Zelle, schützt vor dem durch die reaktiven Sauerstoffspezies hervorgerufenen oxidativen Stress und fungiert als Tumorsuppressor [86]. In etlichen Tumoren wurde entweder eine reduzierte Expression oder eine Deletion von SIRT3 gefunden, jedoch in anderen Karzinomen zeigte sich SIRT3 mit seiner erhöhten Expression als Onkogen [86].

Allegra et al. haben eine Reduktion der Genexpression von SIRT3 bei MM-Kranken im Vergleich mit Gesunden festgestellt [87]. Zusätzlich waren die niedrigen Konzentrationen von SIRT3 mit fortgeschrittenen Krankheitsstadien sowie einem oxidativen Ungleichgewicht („redox imbalance“) verbunden [87]. Berenstein zeigte, dass die BMSC der Myelomkranken

weniger SIRT3 als die BMSC der gesunden Individuen exprimierten [33]. Außerdem führte dort die Kokultur der Stromazellen mit den Myelomzellen zu einer erhöhten Expression von SIRT3 im Vergleich mit der Monokultur [33]. Diese Beobachtungen korrelieren mit den Resultaten dieser Arbeit. Die Kokultur mit den MM-Zellen resultierte hier ebenfalls in einer signifikant vermehrten Genexpression von SIRT3 in den BMSC. Eine (nicht signifikant) verminderte SIRT3-Expression zeigte sich im Gegensatz dazu bei der Behandlung der BMSC mit monoklonalen Anti-CD-38-Antikörpern sowie bei Vorbehandlung der MM-Zellen vor der Kokultur. Womöglich setzten diese Interventionen keinen ausreichenden Reiz zur Induktion des zellulären Stresses, um auf diesem Weg die Expression von SIRT3 hochzuregulieren.

4.3.4 Sirtuin-1

Das Protein SIRT1, eine im Nucleus ansässige Deacetylase, hat durch die Modulation des Zellmetabolismus einen Einfluss auf die metabolischen Enzyme, Transkriptionsfaktoren, Apoptose, DNA-Reparatur sowie Seneszenz der Zelle [86, 88]. Es kann auch das Wachstum und die Mortalität der Zellen beeinflussen [88]. Chalkiadaki und Guarente berichteten von der Doppelrolle des SIRT1 als Onkogen und Tumorsuppressor [86]. In den alternden Zellen führt die Aktivierung von SIRT1 durch die Inhibierung der p53-induzierten Apoptose und Seneszenz zur Anfälligkeit für neoplastische Transformation [89]. Eine Überexpression von SIRT1 wurde sowohl in den soliden als auch in den hämatopoetischen Malignomen (u.a. AML, Lymphome) gefunden [88, 90, 91]. Gleichzeitig wurde bei anderen Tumoren (z.B. Myelodysplastisches Syndrom) eine reduzierte Expression von SIRT1 beobachtet [86, 91]. Eine Inhibierung von SIRT1 supprimiert die Zellproliferation und induziert die Apoptose der Krebszellen [88]. Im Colonkarzinom zeigte sich jedoch ein gegensätzlicher Effekt: SIRT1 bewirkte eine Suppression der Tumorbildung und gleichzeitig förderte es die medikamentös induzierte Apoptose [92]. Das Expressionsmuster von SIRT1 war zudem sehr heterogen [92], daher postulierten Kabra et al. die Pleiotropie der Effekte von SIRT1 in der Karzinogenese [92]. Chauhan et al. zeigten, dass die Behandlung mit einem SIRT1-Antagonisten sich negativ auf das Wachstum der Myelomzellen auswirkte und noch zusätzlich ihre Apoptose induzierte [93]. Darüber hinaus postulierten Huang et al., dass SIRT1 nicht nur die Tumorzellen, sondern auch das gesamte Microenvironment reguliert [91]. Im Ovarialkarzinom zeigte SIRT1 in den

Stromazellen eine tumorfördernde Wirkung durch die Verstärkung der Tumor-Stroma-Interaktionen [94]. Im Gegensatz dazu hat das SIRT1 von den Tumorzellen einen negativen Einfluss auf das Tumorwachstum ausgeübt [94]. Diese Resultate von Shin et al. korreliert mit der erhöhten Expression von SIRT1 in den kokultivierten BMSC verbunden mit dem besseren Survival der kokultivierten Myelomzellen. Diese Beobachtung unterstützt auch die Hypothese zu dem onkogenen Potential von SIRT1 in alternden Zellen, da die kokultivierten BMSC schlechtere Vitalparameter aufwiesen und möglicherweise eine Transformation unter dem Einfluss der Myelomzellen durchliefen [89]. Des Weiteren kann die leichte Reduktion der Expression bei Behandlung ein Hinweis auf die proapoptotische Wirkung des Medikamentes sein.

4.3.5 Tumorprotein p53

Der Transkriptionsfaktor p53 wird lediglich unter Stressbedingungen vermehrt exprimiert [95]. Die Aktivierung von p53 ruft mehrere tumorsuppressive Effekte hervor: Zellzyklusarrest, Apoptoseinduktion, Seneszenz, Hemmung der Angiogenese [96]. Des Weiteren kann p53 auf dem nicht kanonischen Weg den zellulären Metabolismus, Autophagie sowie Nekrose beeinflussen [96]. Die Expression p53 wird von SIRT1 negativ beeinflusst [91]. Ong et al. betonten die Rolle der SIRT1-p53-Achse in den Alterungsprozessen und Onkogenese, die je nach Lokalisation und Zelltyp entweder onkogen oder tumorsuppressiv wirkt [89]. Während ca. 50% der Malignome direkt eine Mutation von p53 aufweisen, wird die Funktion des p53 in den übrigen Karzinomen durch indirekte Mechanismen beeinträchtigt [95]. Im Multiplem Myelom ist p53 bekannterweise über diverse molekulare Mechanismen (Mutationen, Deletion 17p, Promotermethylierung, aberrante Expression der regulierenden miRNAs) dysreguliert [96-98]. Die Mutationen von p53 sind eher selten, wobei ihre Häufigkeit mit dem Tumorprogress steigt [95]. Da die Aktivierung des TP53 mit zellulärem Stress und onkogenen Prozessen verbunden ist, scheint eine veränderte Expression dieses Gens in den BMSC des Tumormicroenvironmentes plausibel. Diese Vermutung hat sich bei der Kokultivierung mit den Myelomzellen sowie Behandlung mit den monoklonalen Anti-CD-38-Antikörpern bestätigt, die als Stressfaktoren für die BMSC betrachtet werden können. Auch die im Vergleich mit der Kontrolle schlechteren Vitalparameter der behandelten und kokultivierten Stromazellen können hier in Zusammenhang mit der leicht erhöhten Expression von p53

gebracht werden. Der Einfluss des SIRT1 auf die Expression von TP53, erwähnt von Huang et al. [91], konnte bei der Behandlung und Vorbehandlung reproduziert werden [91]. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der Kokultur eine konkordant erhöhte Expression beider Gene.

4.3.6 Interferon Regulatory Factor 2 Binding Protein 2

Der Nuklearfaktor IRF2BP2 kann die Expression anderer Gene direkt regulieren [99]. Es spielt eine Rolle in der Zelldifferenzierung, Zellzyklus, Apoptose, Angiogenese, Entzündungsreaktion und Immunität [99]. Die häufigste Translokation beim MM, t(11;14)(q13;q32), betrifft das IRF2BP2 Gen mit einer hohen Penetranz von 75% [100]. Bereits im MGUS fungiert IRF2BP2 als Tumor-assoziiertes Antigen [101]. Koeppel et al. haben zudem IR2BP2 als Zielgen für das TP53 identifiziert [102]. Die Behandlung mit Chemotherapeutika Actinomycin D und Doxorubicin bewirkte eine Hochregulierung von IRF2BP2 und förderte einen Zellzyklusarrest anstatt der p53-vermittelten Apoptose, die bei der Ausschaltung von IRF2BP2 gestiegen ist [102]. Die Autoren postulierten daraus, dass IRF2BP2 die Schwelle für die Apoptoseinduktion durch p53 erhöht und auf diesem Weg die Aktivität von p53 moduliert [102]. Diese Zusammenhänge konnten hier nicht reproduziert werden. TP53 und IRF2BP2 zeigten eine konkordante Expression lediglich im Vergleich zwischen den Kokulturen mit den vorbehandelten Myelomzellen und den Kokulturen ohne Vorbehandlung. In der Zusammenstellung Monokultur versus Kokultur sowie Behandlung versus keine Behandlung wurde ein gegenteiliger Effekt beobachtet. Die ausbleibende Induktion von IRF2BP2 nach einer Behandlung mit Chemotherapeutika kann mit der fehlenden Wirkung von den monoklonalen Anti-CD-38-Antikörpern auf die BMSC erklärt werden. Darüber hinaus exprimierten die Zellen mit schlechteren Vitalparametern weniger IRF2BP2, was gegen den von Koeppel et al. postulierten IRF2BP2-induzierten Zellzyklusarrest [102] spricht. Insgesamt konnte in dieser Arbeit trotz den Hinweisen aus der Literatur keine besondere Rolle von IRF2BP2 in den BMSC bei Multiplem Myelom gezeigt werden.

4.3.7 Interleukin-6

Das Interleukin-6 ist ein potentes inflammatorisches Zytokin, das sowohl das Wachstum als auch die Proliferation der malignen Zellen stark fördert [29]. Es gilt sogar als der potenteste Wachstumsfaktor für die Myelomzellen [103]. Zudem besitzt IL-6 die Fähigkeit zur Hemmung der p53-induzierten Apoptose [104]. Jasroita et al. fanden erhöhte IL-6-Spiegel bei neu

diagnostizierten Myelomen, Rezidiven und bei ausbleibendem Behandlungserfolg [105]. Corre et al. indentifizierten einen Anstieg der Expression von IL-6 in den BMSC der Myelomkranken und postulierten seine Rolle in den Tumor-Stroma-Interaktionen [25]. Li et al. stellten ebenfalls eine erhöhte Expression von IL-6 in den mit Myelom-konditioniertem Medium kultivierten BMSC im Vergleich zu gesunden BMSC und zeigten ihren positiven Einfluss auf die Telomerenlänge [106]. Arnulf et al. und Zdzisinska et al. zeigten jeweils, dass BMSC der Myelomkranken vermehrt IL-6 sezernieren [26, 31]. Uchiyama et al. fanden heraus, dass die direkten Zell-Zell-Kontakte zwischen den Myelom- und Stromazellen die Sekretion von IL-6 durch die BMSC triggern [107]. In dieser Arbeit konnten die genannten Korrelationen nicht gezeigt werden. Die Expression von IL-6 sowohl in den Kokulturen als auch bei der Behandlung mit den monoklonalen Anti-CD-38-Antikörpern war leicht reduziert im Vergleich mit den Kontrollen. Des Weiteren konnte auch der Zusammenhang zwischen dem IL-6-Spiegel mit der Vitalität der Myelomzellen nicht reproduziert werden. Eine denkbare Erklärung dafür ist der Einsatz der Zelllinie HS-5, die aus gesundem Knochenmark hervorgeht. Möglicherweise war die Kokultivierungszeit nicht ausreichend, um die Expression von IL-6 zu induzieren. Eine weitere Ursache kann eine technische Limitation der durchgeführten qPCR sein, die trotz Optimierung sämtlicher Parameter wie Temperatur, Primerspezifität, Reagenzienkonzentration in diesem Fall nicht auszuschließen ist. Nichtsdestotrotz konnte ein Anstieg der Expression von p53 bei gleichzeitig verminderter Expression von IL-6 in der Kokultur sowie bei der Behandlung mit den monoklonalen Anti-CD-38-Antikörpern detektiert werden, was mit den Resultaten von Lotem und Sachs [104] korreliert.

4.3.8 Beta-2 Mikroglobulin

Das β 2-Mikroglobulin bildet ein Teil des MHC der Klasse I [108]. Es wird von allen Zellen mit einem Zellkern exprimiert, deswegen dient es auch als Referenzgen (Housekeeper) in den Untersuchungen der Genexpression [108]. Darüber hinaus verfügt dieses Protein über ein onkogenes Potential, erhöhte Konzentrationen von β 2-Mikroglobulin wurden in akuten und chronischen inflammatorischen Erkrankungen, Malignomen sowie viralen Infektionen gefunden [109]. Im Multiplen Myelom stellt der Serumspiegel von β 2-Mikroglobulin eines der Kriterien des internationalen Stagingystems (ISS) dar, wodurch dieses Protein eine klinische

Relevanz bekommt [110]. Nach dem heutigen Kenntnisstand kann β 2M das Zellwachstum sowohl positiv als auch negativ beeinflussen [108]. Dieses Phänomen tritt auch bei Multiplem Myelom auf. Bataille et al. detektierten erhöhte Sekretion von β 2-Mikroglobulin bei Multiplem Myelom, deren Niveau mit der Tumorlast, -progress sowie Typ korrelierte [111]. Als Quelle dieser vermehrten Sekretion wurden die Myelomzellen selbst postuliert [111]. Min et al. zeigten jedoch diesbezüglich, dass β 2-Mikroglobulin das Wachstum der Myelomzellen inhibieren kann [112]. Paradoxe Weise wiesen die Antikörper gegen das β 2M einen zu β 2M synergistischen Effekt [112]. Gleichzeitig konnten die durch hohe Konzentrationen von β 2M induzierte Caspase-bedingte Apoptose und der Zellzyklusarrest durch das Interleukin-6 supprimiert werden [112]. Die hohen IL-6-Spiegel, die die tumorsuppressiven Effekte von β 2-Mikroglobulin antagonisierten, hingen laut den Autoren mit den Tumor-Stroma-Interaktionen zusammen [112]. Wie Nomura et al. feststellten, kann das von den Tumorzellen sezernierte β 2M das Wachstum und Survival der mesenchymalen Zellen (BMSC, Osteoklasten, Osteoblasten) im Knochenmark fördern und somit zur Entstehung von Knochenmetastasen beitragen [108]. In den BMSC bewirkt das β 2M durch die Hochregulierung anderer Proteine wie IL-6 oder VEGF einen Anstieg der Proliferation [108]. Nomura et al. postulierten daraus die Rolle des β 2-Mikroglobulins in den sich gegenseitig verstärkenden Interaktionen zwischen den mesenchymalen Stammzellen und den Tumorzellen [108]. Des Weiteren beschrieben Hofbauer et al. die Initiation der Entzündungsreaktion in den Myelom-assoziierten Makrophagen durch das β 2-Mikroglobulin [113]. In dieser Arbeit konnte die Synergie von β 2M und IL-6 zum Teil reproduziert werden. Beide Proteine zeigten eine konkordant leicht (nicht signifikant) reduzierte Expression sowohl in den kokultivierten als auch in den mit Daratumumab behandelten BMSC. Im Falle der Kokultur mit den vorbehandelten Myelomzellen wurde im Gegensatz zu IL-6 ein leichter Anstieg der Genexpression von β 2M detektiert. Alle der genannten Effekte waren nicht stark ausgeprägt. Eine mögliche Ursache kann hier eine nicht ausreichend starke Stimulation bzw. eine zu kurze Einwirkzeit der Stimuli sein.

4.4 Veränderungen in der globalen Expressionsanalyse

Die Gene, die in den NGS-Experimenten eine statistisch signifikant hochregulierte Expression gezeigt haben, spielen eine Rolle in der Vermittlung der inflammatorischen Reaktion oder in

den metabolischen Prozessen in der Zelle. Die MM-Zellen induzieren in den BMSC eine Transformation, die zu einer Veränderung des metabolischen sowie sekretorischen Profils führt. Auf diese Weise entsteht ein tumorförderndes Milieu, das therapeutisch nur schwer erreichbar ist und wesentlich zur Progression der Erkrankung beiträgt. Diese Phänomene wurden bereits in den Vorarbeiten gezeigt [15, 27].

Die meisten der untersuchten Gene bilden ein biologisches Netzwerk, was zusätzlich auf die Komplexität der durch MM und die Behandlung mit den monoklonalen Anti-CD-38-Antikörpern induzierten Veränderungen in den BMSC hinweist. Die Gene und ihre proinflammatorischen Produkte scheinen dabei eine zentrale Rolle zu spielen, wobei auch eine Aberration des Stoffwechsels sichtbar wird. Das wurde auf der Abbildung 28 dargestellt.

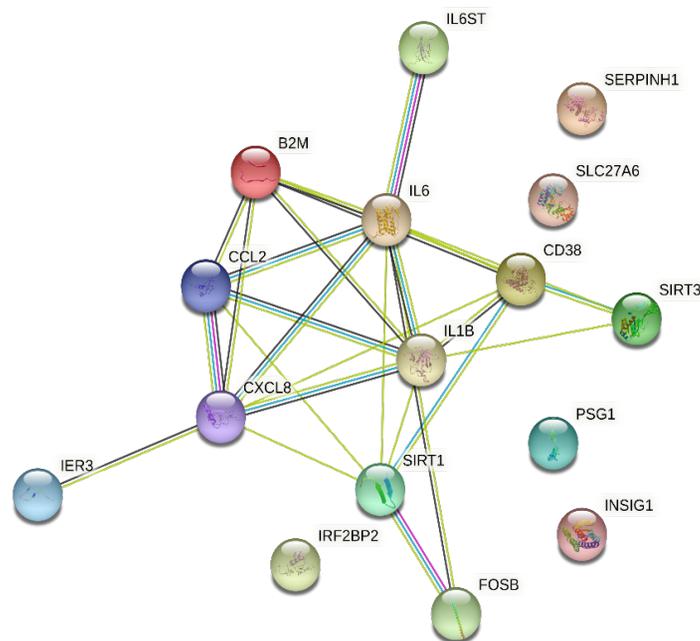


Abb. 28: **Gesamtnetzwerk der durch die untersuchten Gene kodierten Proteine.** Hellgrün: Beziehungen gefunden im Text Mining, blau: Interaktionen bekannt aus den Datenbanken, rosa: experimentell bestimmte Interaktionen, schwarz: Koexpression. Generiert und übernommen von String (<https://string-db.org/cgi/network?taskId=b6CL0y5qIMBW&sessionId=bVokv9YRKWCI>, Zugang am 30.06.2022).

Die Zytokine aus der IL-17-Familie spielen eine zentrale Rolle in der Kontrolle der Entzündungsreaktion bei einer Infektion sowie tragen zur Entstehung zahlreicher Autoimmunerkrankungen und chronischen Entzündungen bei. Das korreliert mit dem Zustand der chronischen Entzündung, der sich in der Tumornische im Knochenmark etabliert [34]. Das IL-6 spielt erwiesenermaßen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese des Multiplen Myeloms [103] und dessen erhöhte Expression kann durch den pathogenen Einfluss der

Tumorzellen unter Stressbedingungen in Anwesenheit des Medikaments erklärt werden. Die Seneszenz der BMSC wurde als Folge einer Beeinflussung durch Myelomzellen von Berenstein beschrieben [33]. Die Signalwege HMGB1 und TREM1 können laut Wang et al. die Proliferation und Differenzierung der Zellen, Angiogenese und Metastasierung in den Tumormodellen induzieren [114]. Laut diesen Autoren sind HMGB1 sowie TREM1 auch potentielle Zielmoleküle für onkologische Therapien [114]. Außerdem vermitteln und modulieren sie die inflammatorischen Immunreaktionen [115, 116], was ebenfalls mit der tumorbedingten chronischen Inflammation im Tumormicroenvironment korreliert. Zusätzlich scheinen die monoklonalen Anti-CD-38-Antikörper die Entstehung dieser Entzündungsreaktion akut zu verstärken. Die Ergebnisse der PCR-Experimente konnten kaum direkte Wirkung der Anti-CD38-Antikörper auf die BMSC zeigen. Deswegen können die durch Daratumumab hervorgerufenen Effekte auf die Genexpression in den BMSC indirekt über die Wirkung des Medikaments auf die MM-Zellen erklärt werden. Die Apoptose-induzierende Wirkung des Medikaments verursacht zellulären Stress in den MM-Zellen, der wiederum über die Tumor-Stroma-Interaktionen die akute Reaktion in den Tumor-assoziierten BMSC induzieren kann. Der Effekt von den monoklonalen Anti-CD-38-Antikörpern war jedoch nicht stark ausgeprägt, auch wenn es statistisch signifikant war.

4.5 Fazit und Ausblick

Diese Arbeit hat gezeigt, dass der monoklonale Anti-CD38-Antikörper Daratumumab in vitro keinen signifikanten Effekt auf die mesenchymalen Stromazellen hat. Die wahrscheinlichste Erklärung dafür scheint die geringe Expression von CD38 auf den BMSC zu sein, dementsprechend fehlt es in den BMSC an den Zielmolekülen für den monoklonalen Antikörper. Dennoch reagieren die BMSC auf die Behandlung der Myelomzellen mit monoklonalen Anti-CD38-Antikörpern, indem sie ihr Expressionsprofil verändern und die Gene mit proinflammatorischen Produkten vermehrt exprimieren. Auf diese Art und Weise unterstützen sie die Myelomzellen mit dem Ziel, das tumorfördernde Milieu aufrechtzuerhalten.

Die Vorbehandlung der Myelomzellen vor der Kokultivierung mit den BMSC wies ebenfalls keinen relevanten Einfluss auf die BMSC auf, was die zentrale Rolle der Interaktionen des Tumors mit den Stromazellen hervorhebt. Diese Behauptung wird weiter von der Signifikanz

der Unterschiede zwischen den mono- und kokultivierten Zellen (sowohl BMSC als auch MM) unterstützt, die einen zusätzlichen Hinweis darauf liefert, dass die interzellulären Interaktionen eine größere Bedeutung als die äußeren Umweltfaktoren (z.B. Chemotherapeutika) für das Tumormilieu spielen. Gleichzeitig leistet diese Erkenntnis einen Beitrag zum Verständnis, warum diese Interaktionen über den gesamten Krankheitsverlauf bestehen bleiben und zusätzlich die Resistenzen gegen Medikamente fördern können [47, 71, 117, 118]. Zweifelsohne besteht ein Bedarf an weiterer Forschung über die Wirkung der Anti-Myelom-Medikamente auf das Tumormicroenvironment mit einem besonderen Fokus auf die BMSC. Erforscht sollte unter Zellkulturbedingungen der Einfluss von Medikamentenkombinationen, so wie sie in dem klinischen Setting eingesetzt werden. In Hinblick auf die monoklonalen Antikörper wäre eine gezielte Untersuchung der BMSC von Myelomkranken vor und nach der Therapie von großer Bedeutung. Darüber hinaus sollte auch die Expression weiterer Gene untersucht werden. Der Einsatz von NGS-Methoden zur Identifikation der Targetgene sowie der Single-cell Analyse [119] wäre dabei sehr wünschenswert. Die Resultate solcher Studien könnten als Richtungsweiser für die Entwicklung neuer Medikamente gegen das Multiple Myelom dienen, die auf die Interaktionen zwischen den Krebszellen und den Zellen des Knochenmarkmilieus direkt abzielen. Dies würde neue therapeutische Möglichkeiten eröffnen und somit zu einer wesentlichen Verbesserung der nach wie vor ungünstigen Prognose bei dieser Erkrankung beitragen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Robert Koch-Institut. Krebs in Deutschland für 2015/2016. Multiples Myelom. 2017 https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/kid_2019_c90_multiples_myelom.pdf?__blob=publicationFile. Accessed March 16, 2021.
2. Gerecke C., Fuhrmann S., Striffler S., Schmidt-Hieber M., Einsele H. & Knop S. The Diagnosis and Treatment of Multiple Myeloma. *Dtsch Arztebl Int.* 2016. 113(27-28): p. 470-6.
3. Mai E.K., Haas E.M., Lucke S., Lopprich M., Kunz C., Pritsch M., Knaup-Gregori P., Raab M.S., Schlenzka J., Bertsch U., Hillengass J. & Goldschmidt H. A systematic classification of death causes in multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 2018. 8(3): p. 30.
4. Kyle R.A., Gertz M.A., Witzig T.E., Lust J.A., Lacy M.Q., Dispenzieri A., Fonseca R., Rajkumar S.V., Offord J.R., Larson D.R., Plevak M.E., Therneau T.M. & Greipp P.R. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc.* 2003. 78(1): p. 21-33.
5. Rajkumar S.V., Dimopoulos M.A., Palumbo A., Blade J., Merlini G., Mateos M.V., Kumar S., Hillengass J., Kastritis E., Richardson P., Landgren O., Paiva B., Dispenzieri A., Weiss B., LeLeu X., Zweegman S., Lonial S., Rosinol L., Zamagni E., Jagannath S., Sezer O., Kristinsson S.Y., Caers J., Usmani S.Z., Lahuerta J.J., Johnsen H.E., Beksac M., Cavo M., Goldschmidt H., Terpos E., Kyle R.A., Anderson K.C., Durie B.G. & Miguel J.F. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014. 15(12): p. e538-48.
6. Kyle R.A. & Rajkumar S.V. Monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2005. 18(4): p. 689-707.
7. Wörmann B., Driessen C., Einsele H., Goldschmidt H., Gunsilius E., Kortüm M., Kröger N., Ludwig H., Mügge L.-O., Naumann R., Pritzkeleit R., Röllig C., Scheid C., Taverna C., Weisel K., Weißinger F. Multiples Myelom. 2018 <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/multiples-myelom/@@guideline/html/index.html#litID0EMWCI>. Accessed March 19, 2021.
8. Furukawa Y. & Kikuchi J. Molecular pathogenesis of multiple myeloma. *Int J Clin Oncol.* 2015. 20(3): p. 413-22.
9. Rajkumar S.V. Multiple myeloma: 2020 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol.* 2020. 95(5): p. 548-567.
10. Rajan A.M. & Rajkumar S.V. Interpretation of cytogenetic results in multiple myeloma for clinical practice. *Blood Cancer J.* 2015. 5: p. e365.
11. Walker B.A., Wardell C.P., Melchor L., Brioli A., Johnson D.C., Kaiser M.F., Mirabella F., Lopez-

- Corral L., Humphray S., Murray L., Ross M., Bentley D., Gutierrez N.C., Garcia-Sanz R., San Miguel J., Davies F.E., Gonzalez D. & Morgan G.J. Intraclonal heterogeneity is a critical early event in the development of myeloma and precedes the development of clinical symptoms. *Leukemia*. 2014. 28(2): p. 384-390.
12. Greaves M. & Maley C.C. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012. 481(7381): p. 306-13.
 13. Hebraud B., Caillot D., Corre J., Marit G., Hulin C., Leleu X., Lode L., Wetterwald M., Dib M., Rodon P., Voillat L., Royer B., Voog E., Fitoussi O., Stoppa A.M., Garderet L., Kolb B., Maigre M., Boullanger N., Allangba O., Karlin L., Daguindau N., Legros L., Sohn C., Joubert M.V., Lenain P., Facon T., Attal M., Moreau P. & Avet-Loiseau H. The translocation t(4;14) can be present only in minor subclones in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2013. 19(17): p. 4634-7.
 14. Le Blanc K. & Ringden O. Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol*. 2006. 18(5): p. 586-91.
 15. Liang X. & Song E. The role of bone marrow stromal cells in blood diseases and clinical significance as a crucial part of the hematopoietic microenvironment. *Annals of Blood*. 2020. 5.
 16. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D. & Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006. 8(4): p. 315-7.
 17. Jones E.A., Kinsey S.E., English A., Jones R.A., Straszynski L., Meredith D.M., Markham A.F., Jack A., Emery P. & McGonagle D. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum*. 2002. 46(12): p. 3349-60.
 18. Miura Y., Gao Z., Miura M., Seo B.M., Sonoyama W., Chen W., Gronthos S., Zhang L. & Shi S. Mesenchymal stem cell-organized bone marrow elements: an alternative hematopoietic progenitor resource. *Stem Cells*. 2006. 24(11): p. 2428-36.
 19. Sacchetti B., Funari A., Michienzi S., Di Cesare S., Piersanti S., Saggio I., Tagliafico E., Ferrari S., Robey P.G., Riminucci M. & Bianco P. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007. 131(2): p. 324-36.
 20. Mendez-Ferrer S., Michurina T.V., Ferraro F., Mazloom A.R., Macarthur B.D., Lira S.A., Scadden D.T., Ma'ayan A., Enikolopov G.N. & Frenette P.S. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010. 466(7308): p. 829-34.
 21. Shiozawa Y., Havens A.M., Pienta K.J. & Taichman R.S. The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites.

- Leukemia. 2008. 22(5): p. 941-50.
22. Anthony B.A. & Link D.C. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends Immunol.* 2014. 35(1): p. 32-7.
 23. Kuroda S. & Houkin K. Translational challenge for bone marrow stroma cell therapy after stroke. *Front Neurol Neurosci.* 2013. 32: p. 62-8.
 24. Pagnucco G., Cardinale G. & Gervasi F. Targeting multiple myeloma cells and their bone marrow microenvironment. *Ann N Y Acad Sci.* 2004. 1028: p. 390-9.
 25. Corre J., Mahtouk K., Attal M., Gadelorge M., Huynh A., Fleury-Cappellesso S., Danho C., Laharrague P., Klein B., Reme T. & Bourin P. Bone marrow mesenchymal stem cells are abnormal in multiple myeloma. *Leukemia.* 2007. 21(5): p. 1079-88.
 26. Arnulf B., Lecourt S., Soulier J., Ternaux B., Lacassagne M.N., Crinquette A., Dessoly J., Sciaini A.K., Benbunan M., Chomienne C., Femand J.P., Marolleau J.P. & Larghero J. Phenotypic and functional characterization of bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients with multiple myeloma. *Leukemia.* 2007. 21(1): p. 158-63.
 27. Garderet L., Mazurier C., Chapel A., Ernou I., Boutin L., Holy X., Gorin N.C., Lopez M., Doucet C. & Lataillade J.J. Mesenchymal stem cell abnormalities in patients with multiple myeloma. *Leuk Lymphoma.* 2007. 48(10): p. 2032-41.
 28. Andre T., Meuleman N., Stamatopoulos B., De Bruyn C., Pieters K., Bron D. & Lagneaux L. Evidences of early senescence in multiple myeloma bone marrow mesenchymal stromal cells. *PLoS One.* 2013. 8(3): p. e59756.
 29. Xu S., De Veirman K., De Becker A., Vanderkerken K. & Van Riet I. Mesenchymal stem cells in multiple myeloma: a therapeutical tool or target? *Leukemia.* 2018. 32(7): p. 1500-1514.
 30. Xu S., Cecilia Santini G., De Veirman K., Vande Broek I., Leleu X., De Becker A., Van Camp B., Vanderkerken K. & Van Riet I. Upregulation of miR-135b is involved in the impaired osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from multiple myeloma patients. *PLoS One.* 2013. 8(11): p. e79752.
 31. Zdzisinska B., Bojarska-Junak A., Dmoszynska A. & Kandefer-Szerszen M. Abnormal cytokine production by bone marrow stromal cells of multiple myeloma patients in response to RPMI8226 myeloma cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* 2008. 56(3): p. 207-21.
 32. Berenstein R., Blau O., Nogai A., Waechter M., Slonova E., Schmidt-Hieber M., Kunitz A., Pezzutto A., Doerken B. & Blau I.W. Multiple myeloma cells alter the senescence phenotype of bone marrow mesenchymal stromal cells under participation of the DLK1-DIO3 genomic region. *BMC Cancer.* 2015. 15: p. 68.

33. Berenstein, R., Tumorzell-Stroma-Interaktionen beim Multiplen Myelom. 2016. Dr. rer. nat. thesis, Technische Universität, Berlin.
34. Mangolini M. & Ringshausen I. Bone Marrow Stromal Cells Drive Key Hallmarks of B Cell Malignancies. *Int J Mol Sci.* 2020. 21(4).
35. Reinherz E.L., Kung P.C., Goldstein G., Levey R.H. & Schlossman S.F. Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980. 77(3): p. 1588-92.
36. van de Donk N.W., Janmaat M.L., Mutis T., Lammerts van Bueren J.J., Ahmadi T., Sasser A.K., Lokhorst H.M. & Parren P.W. Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond. *Immunol Rev.* 2016. 270(1): p. 95-112.
37. Deaglio S., Mehta K. & Malavasi F. Human CD38: a (r)evolutionary story of enzymes and receptors. *Leuk Res.* 2001. 25(1): p. 1-12.
38. Hogan K.A., Chini C.C.S. & Chini E.N. The Multi-faceted Ecto-enzyme CD38: Roles in Immunomodulation, Cancer, Aging, and Metabolic Diseases. *Front Immunol.* 2019. 10: p. 1187.
39. Nakagawara K., Mori M., Takasawa S., Nata K., Takamura T., Berlova A., Tohgo A., Karasawa T., Yonekura H., Takeuchi T. & et al. Assignment of CD38, the gene encoding human leukocyte antigen CD38 (ADP-ribosyl cyclase/cyclic ADP-ribose hydrolase), to chromosome 4p15. *Cytogenet Cell Genet.* 1995. 69(1-2): p. 38-9.
40. Ferrero E. & Malavasi F. Human CD38, a leukocyte receptor and ectoenzyme, is a member of a novel eukaryotic gene family of nicotinamide adenine dinucleotide+-converting enzymes: extensive structural homology with the genes for murine bone marrow stromal cell antigen 1 and aplysian ADP-ribosyl cyclase. *J Immunol.* 1997. 159(8): p. 3858-65.
41. Lin P., Owens R., Tricot G. & Wilson C.S. Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *Am J Clin Pathol.* 2004. 121(4): p. 482-8.
42. Ishikawa H. & Kawano M.M. Biological significance of heterogeneity in human myeloma cells. *Int J Hematol.* 1998. 68(4): p. 363-70.
43. European Medicines Agency. Darzalex. Product information. Anhang I Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels. 2016 https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/darzalex-epar-product-information_de.pdf. Accessed March 3, 2021.
44. European Medicines Agency. Sarclisa. Product Infomation. Anhang I Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels. 2020 https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/sarclisa-epar-product-information_de.pdf. Accessed March 16, 2021.

45. Raab M.S., Engelhardt M., Blank A., Goldschmidt H., Agis H., Blau I.W., Einsele H., Ferstl B., Schub N., Rollig C., Weisel K., Winderlich M., Griese J., Hartle S., Weirather J., Jarutat T., Peschel C. & Chatterjee M. MOR202, a novel anti-CD38 monoclonal antibody, in patients with relapsed or refractory multiple myeloma: a first-in-human, multicentre, phase 1-2a trial. *Lancet Haematol.* 2020. 7(5): p. e381-e394.
46. Fedyk E.R., Zhao L., Koch A., Smithson G., Estevam J., Chen G., Lahu G., Roepcke S., Lin J. & McLean L. Safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of the anti-CD38 cytolytic antibody TAK-079 in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2020. 86(7): p. 1314-1325.
47. van de Donk N. & Usmani S.Z. CD38 Antibodies in Multiple Myeloma: Mechanisms of Action and Modes of Resistance. *Front Immunol.* 2018. 9: p. 2134.
48. van de Donk N. Immunomodulatory effects of CD38-targeting antibodies. *Immunol Lett.* 2018. 199: p. 16-22.
49. Krejcik J., Frerichs K.A., Nijhof I.S., van Kessel B., van Velzen J.F., Bloem A.C., Broekmans M.E.C., Zweegman S., van Meerloo J., Musters R.J.P., Poddighe P.J., Groen R.W.J., Chiu C., Plesner T., Lokhorst H.M., Sasser A.K., Mutis T. & van de Donk N. Monocytes and Granulocytes Reduce CD38 Expression Levels on Myeloma Cells in Patients Treated with Daratumumab. *Clin Cancer Res.* 2017. 23(24): p. 7498-7511.
50. Nijhof I.S., Groen R.W., Lokhorst H.M., van Kessel B., Bloem A.C., van Velzen J., de Jong-Korlaar R., Yuan H., Noort W.A., Klein S.K., Martens A.C., Doshi P., Sasser K., Mutis T. & van de Donk N.W. Upregulation of CD38 expression on multiple myeloma cells by all-trans retinoic acid improves the efficacy of daratumumab. *Leukemia.* 2015. 29(10): p. 2039-49.
51. Garcia-Guerrero E., Gogishvili T., Danhof S., Schreder M., Pallaud C., Perez-Simon J.A., Einsele H. & Hudecek M. Panobinostat induces CD38 upregulation and augments the antimyeloma efficacy of daratumumab. *Blood.* 2017. 129(25): p. 3386-3388.
52. Ogiya D., Liu J., Ohguchi H., Kurata K., Samur M.K., Tai Y.T., Adamia S., Ando K., Hideshima T. & Anderson K.C. The JAK-STAT pathway regulates CD38 on myeloma cells in the bone marrow microenvironment: therapeutic implications. *Blood.* 2020. 136(20): p. 2334-2345.
53. de Haart S.J., Holthof L., Noort W.A., Minnema M.C., Emmelot M.E., Aarts-Riemens T., Doshi P., Sasser K., Yuan H., de Bruijn J., Martens A.C., van de Donk N.W., Lokhorst H.M., Groen R.W. & Mutis T. Sepantronium bromide (YM155) improves daratumumab-mediated cellular lysis of multiple myeloma cells by abrogation of bone marrow stromal cell-induced resistance. *Haematologica.* 2016. 101(8): p. e339-42.

54. de Haart S.J., van de Donk N.W., Minnema M.C., Huang J.H., Aarts-Riemens T., Bovenschen N., Yuan H., Groen R.W., McMillin D.W., Jakubikova J., Lokhorst H.M., Martens A.C., Mitsiades C.S. & Mutis T. Accessory cells of the microenvironment protect multiple myeloma from T-cell cytotoxicity through cell adhesion-mediated immune resistance. *Clin Cancer Res.* 2013. 19(20): p. 5591-601.
55. Finkelstein D., Smith M.K. & Faden R. Informed consent and medical ethics. *Arch Ophthalmol.* 1993. 111(3): p. 324-6.
56. Noble P.B. & Cutts J.H. Separation of blood leukocytes by Ficoll gradient. *Can Vet J.* 1967. 8(5): p. 110-1.
57. Jaatinen T. & Laine J. Isolation of mononuclear cells from human cord blood by Ficoll-Paque density gradient. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2007. Chapter 2: p. Unit 2A 1.
58. Carl Roth *. Trypanblau (C.I.23850), 10 g. 2021 <https://www.carlroth.com/at/de/vitalfarbstoffe/trypanblau-%28c-i-23850%29/p/cn76.1>. Accessed January 27, 2021.
59. Rio D.C., Ares M., Jr., Hannon G.J. & Nilsen T.W. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harb Protoc.* 2010. 2010(6): p. pdb prot5439.
60. Chomczynski P. & Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987. 162(1): p. 156-9.
61. Hummon A.B., Lim S.R., Difilippantonio M.J. & Ried T. Isolation and solubilization of proteins after TRIzol extraction of RNA and DNA from patient material following prolonged storage. *Biotechniques.* 2007. 42(4): p. 467-70, 472.
62. Eisenstein M. An ace in the hole for DNA sequencing. *Nature.* 2017. 550(7675): p. 285-288.
63. Oxford Nanopore Technologies. Direct cDNA Sequencing. Available from: https://community.nanoporetech.com/protocols/direct-cdna-sequencing_sqk-dcs109/checklist_example.pdf. Accessed August 12, 2022.
64. Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics.* 2018. 34(18): p. 3094-3100.
65. Anders S P.P., Huber W. HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics.* 2015;31(2):166-169.
66. Love M.I., Huber W. & Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014. 15(12): p. 550.
67. Pfaffl M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001. 29(9): p. e45.
68. Adamo A., Delfino P., Gatti A., Bonato A., Takam Kamga P., Bazzoni R., Ugel S., Mercuri A.,

- Caligola S. & Krampera M. HS-5 and HS-27A Stromal Cell Lines to Study Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Support to Cancer Development. *Front Cell Dev Biol.* 2020. 8: p. 584232.
69. Lomas O.C., Tahri S. & Ghobrial I.M. The microenvironment in myeloma. *Curr Opin Oncol.* 2020. 32(2): p. 170-175.
70. Kawano Y., Moschetta M., Manier S., Glavey S., Gorgun G.T., Roccaro A.M., Anderson K.C. & Ghobrial I.M. Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Immunol Rev.* 2015. 263(1): p. 160-72.
71. Reagan M.R. & Ghobrial I.M. Multiple myeloma mesenchymal stem cells: characterization, origin, and tumor-promoting effects. *Clin Cancer Res.* 2012. 18(2): p. 342-9.
72. Fairfield H., Dudakovic A., Khatib C.M., Farrell M., Costa S., Falank C., Hinge M., Murphy C.S., DeMambro V., Pettitt J.A., Lary C.W., Driscoll H.E., McDonald M.M., Kassem M., Rosen C., Andersen T.L., van Wijnen A.J., Jafari A. & Reagan M.R. Myeloma-Modified Adipocytes Exhibit Metabolic Dysfunction and a Senescence-Associated Secretory Phenotype. *Cancer Res.* 2021. 81(3): p. 634-647.
73. Fairfield H., Costa S., Falank C., Farrell M., Murphy C.S., D'Amico A., Driscoll H. & Reagan M.R. Multiple Myeloma Cells Alter Adipogenesis, Increase Senescence-Related and Inflammatory Gene Transcript Expression, and Alter Metabolism in Preadipocytes. *Front Oncol.* 2020. 10: p. 584683.
74. Garrido S.M., Appelbaum F.R., Willman C.L. & Banker D.E. Acute myeloid leukemia cells are protected from spontaneous and drug-induced apoptosis by direct contact with a human bone marrow stromal cell line (HS-5). *Exp Hematol.* 2001. 29(4): p. 448-57.
75. Marlein C.R., Piddock R.E., Mistry J.J., Zaitseva L., Hellmich C., Horton R.H., Zhou Z., Auger M.J., Bowles K.M. & Rushworth S.A. CD38-Driven Mitochondrial Trafficking Promotes Bioenergetic Plasticity in Multiple Myeloma. *Cancer Res.* 2019. 79(9): p. 2285-2297.
76. Ma X., Wong S.W., Zhou P., Chaulagain C.P., Doshi P., Klein A.K., Sprague K., Kugelmass A., Toskic D., Warner M., Miller K.B., Lee L., Varga C. & Comenzo R.L. Daratumumab binds to mobilized CD34+ cells of myeloma patients in vitro without cytotoxicity or impaired progenitor cell growth. *Exp Hematol Oncol.* 2018. 7: p. 27.
77. Li S., England C.G., Ehlerding E.B., Kuttyreff C.J., Engle J.W., Jiang D. & Cai W. ImmunoPET imaging of CD38 expression in hepatocellular carcinoma using (64)Cu-labeled daratumumab. *Am J Transl Res.* 2019. 11(9): p. 6007-6015.
78. Nakamura A., Suzuki S., Kanasugi J., Ejiri M., Hanamura I., Ueda R., Seto M. & Takami A.

- Synergistic Effects of Venetoclax and Daratumumab on Antibody-Dependent Cell-Mediated Natural Killer Cytotoxicity in Multiple Myeloma. *Int J Mol Sci.* 2021. 22(19).
79. Ghose J., Viola D., Terrazas C., Caserta E., Troadec E., Khalife J., Gunes E.G., Sanchez J., McDonald T., Marcucci G., Kaur B., Rosenzweig M., Keats J., Rosen S., Krishnan A., Satoskar A.R., Hofmeister C.C. & Pichiorri F. Daratumumab induces CD38 internalization and impairs myeloma cell adhesion. *Oncoimmunology.* 2018. 7(10): p. e1486948.
 80. Hao Q., Vadgama J.V. & Wang P. CCL2/CCR2 signaling in cancer pathogenesis. *Cell Commun Signal.* 2020. 18(1): p. 82.
 81. Nagarsheth N., Wicha M.S. & Zou W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2017. 17(9): p. 559-572.
 82. Tang X. & Amar S. p53 suppresses CCL2-induced subcutaneous tumor xenograft. *Tumour Biol.* 2015. 36(4): p. 2801-8.
 83. Li Y., Zheng Y., Li T., Wang Q., Qian J., Lu Y., Zhang M., Bi E., Yang M., Reu F., Yi Q. & Cai Z. Chemokines CCL2, 3, 14 stimulate macrophage bone marrow homing, proliferation, and polarization in multiple myeloma. *Oncotarget.* 2015. 6(27): p. 24218-29.
 84. Klein B. & Bataille R. Cytokine network in human multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1992. 6(2): p. 273-84.
 85. Camacho-Pereira J., Tarrago M.G., Chini C.C.S., Nin V., Escande C., Warner G.M., Puranik A.S., Schoon R.A., Reid J.M., Galina A. & Chini E.N. CD38 Dictates Age-Related NAD Decline and Mitochondrial Dysfunction through an SIRT3-Dependent Mechanism. *Cell Metab.* 2016. 23(6): p. 1127-1139.
 86. Chalkiadaki A. & Guarente L. The multifaceted functions of sirtuins in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015. 15(10): p. 608-24.
 87. Allegra A., Innao V., Polito F., Oteri R., Alibrandi A., Allegra A.G., Oteri G., Di Giorgio R.M., Musolino C. & Aguenouz M. SIRT2 and SIRT3 expression correlates with redox imbalance and advanced clinical stage in patients with multiple myeloma. *Clin Biochem.* 2021. 93: p. 42-49.
 88. Simmons G.E., Jr., Pruitt W.M. & Pruitt K. Diverse roles of SIRT1 in cancer biology and lipid metabolism. *Int J Mol Sci.* 2015. 16(1): p. 950-65.
 89. Ong A.L.C. & Ramasamy T.S. Role of Sirtuin1-p53 regulatory axis in aging, cancer and cellular reprogramming. *Ageing Res Rev.* 2018. 43: p. 64-80.
 90. Bradbury C.A., Khanim F.L., Hayden R., Bunce C.M., White D.A., Drayson M.T., Craddock C. & Turner B.M. Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of

- expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia*. 2005. 19(10): p. 1751-9.
91. Huang F.T., Sun J., Zhang L., He X., Zhu Y.H., Dong H.J., Wang H.Y., Zhu L., Zou J.Y., Huang J.W. & Li L. Role of SIRT1 in hematologic malignancies. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2019. 20(5): p. 391-398.
 92. Kabra N., Li Z., Chen L., Li B., Zhang X., Wang C., Yeatman T., Coppola D. & Chen J. SirT1 is an inhibitor of proliferation and tumor formation in colon cancer. *J Biol Chem*. 2009. 284(27): p. 18210-7.
 93. Chauhan D., Bandi M., Singh A.V., Ray A., Raje N., Richardson P. & Anderson K.C. Preclinical evaluation of a novel SIRT1 modulator SRT1720 in multiple myeloma cells. *Br J Haematol*. 2011. 155(5): p. 588-98.
 94. Shin D.H., Choi Y.J., Jin P., Yoon H., Chun Y.S., Shin H.W., Kim J.E. & Park J.W. Distinct effects of SIRT1 in cancer and stromal cells on tumor promotion. *Oncotarget*. 2016. 7(17): p. 23975-87.
 95. Teoh P.J. & Chng W.J. p53 abnormalities and potential therapeutic targeting in multiple myeloma. *Biomed Res Int*. 2014. 2014: p. 717919.
 96. Herrero A.B., Rojas E.A., Misiewicz-Krzeminska I., Krzeminski P. & Gutierrez N.C. Molecular Mechanisms of p53 Deregulation in Cancer: An Overview in Multiple Myeloma. *Int J Mol Sci*. 2016. 17(12).
 97. Jovanovic K.K., Escure G., Demonchy J., Willaume A., Van de Wyngaert Z., Farhat M., Chauvet P., Facon T., Quesnel B. & Manier S. Deregulation and Targeting of TP53 Pathway in Multiple Myeloma. *Front Oncol*. 2018. 8: p. 665.
 98. Flynt E., Bisht K., Sridharan V., Ortiz M., Towfic F. & Thakurta A. Prognosis, Biology, and Targeting of TP53 Dysregulation in Multiple Myeloma. *Cells*. 2020. 9(2).
 99. Ramalho-Oliveira R., Oliveira-Vieira B. & Viola J.P.B. IRF2BP2: A new player in the regulation of cell homeostasis. *J Leukoc Biol*. 2019. 106(3): p. 717-723.
 100. Ni I.B., Ching N.C., Meng C.K. & Zakaria Z. Translocation t(11;14) (q13;q32) and genomic imbalances in multi-ethnic multiple myeloma patients: a Malaysian study. *Hematol Rep*. 2012. 4(3): p. e19.
 101. Blotta S., Tassone P., Prabhala R.H., Tagliaferri P., Cervi D., Amin S., Jakubikova J., Tai Y.T., Podar K., Mitsiades C.S., Zullo A., Franco B., Anderson K.C. & Munshi N.C. Identification of novel antigens with induced immune response in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*. 2009. 114(15): p. 3276-84.

102. Koepfel M., van Heeringen S.J., Smeenk L., Navis A.C., Janssen-Megens E.M. & Lohrum M. The novel p53 target gene IRF2BP2 participates in cell survival during the p53 stress response. *Nucleic Acids Res.* 2009. 37(2): p. 322-35.
103. Klein B., Zhang X.G., Lu Z.Y. & Bataille R. Interleukin-6 in human multiple myeloma. *Blood.* 1995. 85(4): p. 863-72.
104. Lotem J. & Sachs L. Different mechanisms for suppression of apoptosis by cytokines and calcium mobilizing compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998. 95(8): p. 4601-6.
105. Jasrotia S., Gupta R., Sharma A., Halder A. & Kumar L. Cytokine profile in multiple myeloma. *Cytokine.* 2020. 136: p. 155271.
106. Li S., Jiang Y., Li A., Liu X., Xing X., Guo Y., Xu Y., Hao Y. & Zheng C. Telomere length is positively associated with the expression of IL6 and MIP1alpha in bone marrow mesenchymal stem cells of multiple myeloma. *Mol Med Rep.* 2017. 16(3): p. 2497-2504.
107. Uchiyama H., Barut B.A., Mohrbacher A.F., Chauhan D. & Anderson K.C. Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood.* 1993. 82(12): p. 3712-20.
108. Nomura T., Huang W.C., Zhau H.E., Josson S., Mimata H. & Chung L.W. beta2-Microglobulin-mediated signaling as a target for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem.* 2014. 14(3): p. 343-52.
109. Li L., Dong M. & Wang X.G. The Implication and Significance of Beta 2 Microglobulin: A Conservative Multifunctional Regulator. *Chin Med J (Engl).* 2016. 129(4): p. 448-55.
110. Greipp P.R., San Miguel J., Durie B.G., Crowley J.J., Barlogie B., Blade J., Boccadoro M., Child J.A., Avet-Loiseau H., Kyle R.A., Lahuerta J.J., Ludwig H., Morgan G., Powles R., Shimizu K., Shustik C., Sonneveld P., Tosi P., Turesson I. & Westin J. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2005. 23(15): p. 3412-20.
111. Bataille R., Grenier J. & Combes T. In vitro production of beta 2 microglobulin by human myeloma cells. *Cancer Invest.* 1988. 6(3): p. 271-7.
112. Min R., Li Z., Epstein J., Barlogie B. & Yi Q. Beta(2)-microglobulin as a negative growth regulator of myeloma cells. *Br J Haematol.* 2002. 118(2): p. 495-505.
113. Hofbauer D., Mougiakakos D., Broggini L., Zaiss M., Buttner-Herold M., Bach C., Spriewald B., Neumann F., Bisht S., Nolting J., Zeiser R., Hamarsheh S., Eberhardt M., Vera J., Visentin C., De Luca C.M.G., Moda F., Haskamp S., Flamann C., Bottcher M., Bitterer K., Volkl S., Mackensen A., Ricagno S. & Bruns H. beta2-microglobulin triggers NLRP3 inflammasome activation in tumor-associated macrophages to promote multiple myeloma progression. *Immunity.* 2021.

- 54(8): p. 1772-1787 e9.
114. Wang X., Xiang L., Li H., Chen P., Feng Y., Zhang J., Yang N., Li F., Wang Y., Zhang Q., Li F. & Cao F. The Role of HMGB1 Signaling Pathway in the Development and Progression of Hepatocellular Carcinoma: A Review. *Int J Mol Sci.* 2015. 16(9): p. 22527-40.
 115. Chen R., Kang R. & Tang D. The mechanism of HMGB1 secretion and release. *Exp Mol Med.* 2022. 54(2): p. 91-102.
 116. Prufer S., Weber M., Sasca D., Teschner D., Wolfel C., Stein P., Stassen M., Schild H. & Radsak M.P. Distinct signaling cascades of TREM-1, TLR and NLR in neutrophils and monocytic cells. *J Innate Immun.* 2014. 6(3): p. 339-52.
 117. Nefedova Y., Landowski T.H. & Dalton W.S. 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(6): p. 1175-82.
 118. Nefedova Y., Cheng P., Alsina M., Dalton W.S. & Gabilovich D.I. Involvement of Notch-1 signaling in bone marrow stroma-mediated de novo drug resistance of myeloma and other malignant lymphoid cell lines. *Blood.* 2004. 103(9): p. 3503-10.
 119. Lei Y, Tang R, Xu J, Wang W, Zhang B, Liu J, Yu X, Shi S. Applications of single-cell sequencing in cancer research: progress and perspectives. *J Hematol Oncol.* 2021. 14(1): p. 91

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Malgorzata Lienhart, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Beeinflussung der Interaktion von Myelomzellen und Stromazellen durch Hemmung von CD 38 mittels des monoklonalen Antikörpers Daratumumab“ bzw. „The influence of inhibition of CD 38 with the monoclonal antibody Daratumumab on interaction between myeloma cells and stroma cells“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

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

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

_____ Datum

_____ Unterschrift

LEBENS LAUF

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

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich von Herzen bei allen Personen bedanken, die mir mein Medizinstudium und die Vollendung dieser Promotion ermöglicht haben.

Mein großer Dank geht zuerst an Prof. Dr. med. Igor-Wolfgang Blau für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie die Überlassung dieses spannenden und herausfordernden Promotionsthemas.

Bei Dr. Olga Blau möchte ich mich ganz besonders für die umfangreiche Betreuung während der gesamten Arbeit an der Anfertigung dieser Dissertation bedanken. Ihre großzügige Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei den verschiedensten Anliegen haben mich an jeder Etappe meiner Arbeit begleitet und wesentlich zum erfolgreichen Abschluss dieses Vorhabens beigetragen.

Hier sei auch Dr. med. Klaus Axel Nogai gedankt, dessen Leidenschaft für sein Fachgebiet die Inspiration zur Wahl dieses Promotionsthemas war. Ihm danke ich auch für die Bereitstellung der Knochenmarkpunktate sowie viele konstruktive Ideen und die fachliche Ko-Betreuung.

Einen großen Beitrag zur Vollendung dieser Promotionsarbeit verdanke ich M. Sc. Ekaterina Slonova, die mich mit ihrem umfangreichen Fachwissen und Erfahrung bei der Planung sowie Durchführung der molekularbiologischen Versuche fachlich begleitet und unterstützt hat. Ihr danke ich auch für die Durchführung und Auswertung der NGS-Experimente.

An dieser Stelle gilt mein Dank auch Dipl.-Biol. Marlies Wächter für die hervorragende Einarbeitung in die Technik der Zellkultur. Ihre Expertenerfahrung sowie wertvolle Ratschläge haben wesentlich zum Gelingen der Zellkulturexperimente beigetragen.

Ich danke hier auch allen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe für die angenehme und motivierende Atmosphäre. Ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit haben mich in dieser intensiven Zeit begleitet.

Des Weiteren möchte ich mich bei der AG Bullinger, insbesondere Dr. Anna Dolnik, für die Durchführung und Auswertung der NGS-Experimente bedanken. An dieser Stelle sei auch AG Damm und AG Hansmann für die hilfreichen Ratschläge sowie den kollegialen Austausch gedankt.

Das Medizinstudium sowie die Vollendung dieser Dissertation wären ohne die Unterstützung seitens meiner Familie nicht möglich gewesen. Mein großer Dank gilt meinem Ehemann Johannes Lienhart, der mir stets treu zur Seite stand. An dieser Stelle bedanke ich mich besonders bei meiner Mutter, die mich in dieser Zeit moralisch und finanziell unterstützt hat. Georg Schwach danke ich für die sprachliche Korrektur. Auch meinen Geschwistern, Schwiegereltern und Großeltern danke ich herzlich für die Ermutigungen und alle motivierenden Worte, die ebenfalls zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

BESCHEINIGUNG ÜBER DIE STATISTISCHE BERATUNG



CharitéCentrum für Human- und Gesundheitswissenschaften

Charité | Campus Charité Mitte | 10117 Berlin

Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie (iBikE)

Direktor: Prof. Dr. Geraldine Rauch

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

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



Name, Vorname: Lienhart, Malgorzata
Emailadresse: malgorzata.lienhart@charite.de
Matrikelnummer: 220084
PromotionsbetreuerIn: Prof. Dr. med. Igor-Wolfgang Blau
Promotionsinstitution / Klinik: Medizinischen Klinik mit
Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumormunologie

Bescheinigung

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

- Termin 1: 18.08.2021

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

- Median und IQR bei schiefen Verteilungen angeben
- Gruppenvergleiche von numerischen Merkmalen können mit Boxplots dargestellt werden
- Nicht nur P-Wert sondern auch Konfidenzintervalle angeben
- Bei nicht normalverteilten Variablen nichtparametrische Tests verwenden

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

Datum:

Name des Beraters/ der Beraterin:

Unterschrift Beraterin, Institutsstempel


UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN
Institut für Biometrie und
klinische Epidemiologie
Campus Charité Mitte
Charitéplatz 1 | D-10117 Berlin
10117, Reinhardtstr. 58