

Aus dem
Charité Centrum 14 für Tumormedizin
Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie
Campus Benjamin Franklin
Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. E. Thiel

HABILITATIONSSCHRIFT

Untersuchungen zur Pathogenese und neuen Therapiemöglichkeiten bei Plasmazell-Dyskrasien

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Innere Medizin
vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

Von

Dr. med. Martin Schmidt-Hieber

eingereicht: April 2011

Dekanin: Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Dr. Anthony D. Ho

2. Gutachter: Prof. Dr. Gottfried Dölken

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
2. Untersuchungen zur Pathogenese von Plasmazell-Dyskrasien	3
2.1. Hintergrund	3
2.2. Muster und Sequenzen zytogenetischer Aberrationen	5
2.3. Die Bedeutung der Expression von CD117 (c-Kit) durch klonale Plasmazellen (<i>Publikation I</i>)	11
2.4. Distribution und Homing CXCL12-CXCR4-regulierter Zell- Kompartimente (<i>Publikation II</i>)	23
3. Neue Therapiemöglichkeiten beim Multiplen Myelom	26
3.1. Hintergrund	26
3.2. <i>In vitro</i> Zytotoxizität von Perifosin, Bortezomib und Lenalidomid gegenüber Zelllinien und hämatopoietischen Progenitorzellen (<i>Publikationen III und IV</i>)	26
3.3. Konditionierung mit Fludarabin und Treosulfan vor allogener Stammzelltransplantation (<i>Publikationen V und VI</i>)	42
3.4. Virale Infektionen als wesentliche Komplikation nach allogener Stammzelltransplantation (<i>Publikationen VII-IX</i>)	49
4. Diskussion und Zusammenfassung	61
5. Literaturverzeichnis	67
6. Danksagung	81
7. Erklärung	82

1. Einleitung

Das Multiple Myelom, eine maligne B-Zell Erkrankung, ist in westlichen Ländern nach Non-Hodgkin-Lymphomen die zweithäufigste maligne hämatologische Erkrankung und bedingt ca. 2% aller tumorverursachten Todesfälle (Raab *et al*, 2009; Jemal *et al*, 2010). Die Inzidenzrate beträgt ungefähr 0,01%, entsprechend etwa 20 000 Neuerkrankungen jährlich in den USA (Jemal *et al*, 2010). Die monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS), eine prä maligne Vorstufe des Multiplen Myeloms, ist mit einer Prävalenz von etwa 3,2% bei über 50-Jährigen noch deutlich häufiger (Kyle *et al*, 2006; Wadhera *et al*, 2010). Das Risiko für eine Transformation eines MGUS in ein Multiples Myelom beträgt ungefähr 1% jährlich, ist allerdings von dem Vorliegen von Risikofaktoren, insbesondere dem prozentualen Anteil immunphänotypisch normaler Plasmazellen im Knochenmark abhängig (Kyle *et al*, 2002; Pérez-Persona *et al*, 2007; Pérez-Persona *et al*, 2010). Die Plasmazelleukämie gehört ebenso wie (extramedulläre) Plasmozytome zu den seltenen Formen von Plasmazell-Dyskrasien (monoklonalen Gammopathien), kann jedoch bei Patienten mit Multiplem Myelom im Krankheitsverlauf sekundär auftreten und ist meist mit einer sehr schlechten Prognose assoziiert (Sher *et al*, 2010). Trotz multimodaler Therapiekonzepte und dem Einsatz neuer Substanzen wie z.B. Lenalidomid oder Bortezomib ist die Prognose des Multiplen Myeloms mit einem mittleren Gesamtüberleben von 3-7 Jahren nach Diagnosestellung weiterhin ungünstig (Jagannath *et al*, 2007; Raab *et al*, 2009; Mateos *et al*, 2010a und b).

2. Untersuchungen zur Pathogenese von Plasmazell-Dyskrasien

2.1. Hintergrund

Auch heutzutage ist noch immer unzureichend verstanden, welche

biologischen Prozesse zum Entstehen von Plasmazell-Dyskrasien führen. Im Gegensatz zu vielen onkologischen Malignomen mit eindeutig belegten Risikofaktoren, wie beispielsweise dem Rauchen für die Entstehung des Bronchialkarzinoms, konnten epidemiologische Untersuchungen keine eindeutigen Risikofaktoren für das Auftreten von Plasmazell-Dyskrasien identifizieren. Jedoch können Multiple Myelome selten familiär gehäuft auftreten, und die Inzidenz variiert geringfügig in Abhängigkeit der Rasse und des Geschlechts (Jemal *et al*, 2010). Ebenso ist wenig bekannt, welche Faktoren den Übergang eines MGUS, als einer prämaligen, nicht therapiebedürftigen Plasmazellerkrankung, zu einem manifesten Multiplen Myelom mit den typischen Symptomen wie z.B. Frakturen, Niereninsuffizienz, Hyperkalzämie oder Hyperviskositätssyndrom bedingen. Interessanterweise zeigen jedoch auch einige Patienten mit Multiplem Myelom einen stabilen Krankheitsverlauf über viele Jahre, ohne dass es einer therapeutischen Intervention bedarf (sogenanntes „Smoldering“ oder asymptomatisches Multiples Myelom), wobei bei anderen Patienten die Erkrankung innerhalb weniger Monate zum Tod führt (Raab *et al*, 2009).

Wie bei vielen anderen Tumorerkrankungen, sind auch bei Plasmazell-Dyskrasien molekular- und zytogenetische Veränderung bei der Erkrankungsentstehung und -progression von entscheidender Bedeutung. Neben genetischen Veränderung spielt jedoch auch ein verändertes Expressionsmuster von Molekülen auf der Plasmazelloberfläche wie z.B. Adhäsionsrezeptoren vermutlich eine entscheidende Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankungen (Podar *et al*, 2009). Dem Expressionsprofil von Oberflächenmolekülen könnte hierbei eine wesentliche Bedeutung hinsichtlich der Interaktion klonaler Plasmazellen mit Knochenmark-Stromazellen sowie der Regulation des Homings verschiedener Zell-Kompartimente in räumlich definierten Knochenmark-Mikromilieus (sogenannten

Nischen) zukommen.

2.2. Muster und Sequenzen zytogenetischer Aberrationen

Zytogenetische Veränderungen sind bei Plasmazell-Dyskrasien noch immer unzureichend charakterisiert und haben bisher keinen Eingang in risikostratifizierte Therapieprotokolle in der klinischen Routinebehandlung des Multiplen Myeloms gefunden (Kumar, 2010). Die Ursache hierfür liegt unter anderem darin begründet, dass klonale Plasmazellen häufig nur in vergleichsweise geringer Anzahl in Knochenmark-Proben vorhanden sind. Zusätzlich teilen sich klonale Plasmazellen - im Gegensatz zu Blasten bei akuten Leukämien - in Kulturansätzen sehr langsam, wodurch der Einsatz von einigen zytogenetischen Methoden wie z.B. der Metaphasen-Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) weiter limitiert wird (Avet-Loiseau, 2007). Anfängliche zytogenetische Untersuchungen ließen deshalb vermuten, dass chromosomale Veränderungen bei Plasmazell-Dyskrasien selten sind. Beispielsweise beschrieben, auf konventionellen zytogenetischen Verfahren basierende Untersuchungen das Vorliegen einer del(13q14) bei etwa 10-20% aller Patienten mit Multiplem Myelom, wobei initial angenommen wurde, dass diese Veränderung nicht bei Patienten mit MGUS vorkommt (Sawyer *et al*, 1995; Fonseca *et al*, 2004). Erst mit der breiteren Verfügbarkeit neuerer Methoden wie z.B. der Interphase-FISH-Technik konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass die meisten Patienten mit Multiplem Myelom zytogenetische Veränderungen aufweisen und eine del(13q14) in etwa der Hälfte der Fälle vorliegt (Avet-Loiseau *et al*, 2002; Fonseca *et al*, 2004; Mateo *et al*, 2005). Erwähnenswert ist jedoch, dass auch neuere Untersuchungen zu chromosomalen Veränderungen bei Plasmazell-Dyskrasien häufig anhand von unselektionierten Knochenmark-Proben oder an mit

CD138⁺ Mikrobeads aufgereinigten Plasmazellen durchgeführt wurden. Obwohl die Verwendung CD138-aufgereinigter Plasmazellen hinsichtlich der Frequenz der Erkennung von zytogenetischen Veränderungen im Vergleich zu unselektioniertem Knochenmark deutlich überlegen ist wie eine kürzlich publizierte vergleichende Studie zeigte, besitzt auch diese Technik wesentliche Einschränkungen (Put *et al*, 2010). CD138 wird auf der Oberfläche sowohl von normalen als auch von reaktiven und klonalen Plasmazellen exprimiert (Bataille *et al*, 2006). Weiterhin weisen nahezu alle Patienten mit Multiplem Myelom neben einer CD138⁺ eine CD138⁻ Population klonaler Plasmazellen im Knochenmark auf und die Induktion von Apoptose führt zusätzlich zu einem raschen CD138-Verlust (Jourdan *et al*, 1998; Reid *et al*, 2010). Plasmazellen, die mit CD138⁺ Mikrobeads aufgereinigt wurden, besitzen zudem meist nur eine unzureichende Reinheit von etwa 85-95% (Cumova *et al*, 2010). Hierdurch wird insbesondere die Erfassung von möglichen Sequenzen verschiedener zytogenetischer Veränderungen im Krankheitsverlauf limitiert. Ebenso erlaubt die von einigen Arbeitsgruppen beschriebene Kombination der FISH-Technik mit der May-Grünwald-Giemsa-Färbung oder der Immunphänotypisierung (z.B. Färbung von CD138 oder Leichtketten) meist keine eindeutige Unterscheidung von klonalen und nicht-klonalen Plasmazellen (Nickenig *et al*, 2001; Cook *et al*, 2006). Ein weiterer Nachteil dieser sogenannten FICTION-Technik ist die Tatsache, dass in der Regel nur wenige Plasmazellen an Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Präparatschnitten hinsichtlich zytogenetischer Veränderungen untersucht werden können.

Im Gegensatz zu diesen Verfahren erlaubt die Selektion von Plasmazellen anhand des Expressionsprofils von verschiedenen Oberflächenantigenen in der Durchflusszytometrie eine zweifelsfreie Unterscheidung von klonalen und normalen Plasmazellen in nahezu allen Fällen (Rawstron *et al*, 2008).

Wir haben bei 208 Patienten mit Plasmazell-Dyskrasien (148 Patienten mit Multiplem Myelom und 60 Patienten mit MGUS) Muster und mögliche Sequenzen zytogenetischer Veränderungen zum Diagnosezeitpunkt untersucht (bisher unveröffentlichte Daten). Chromosomale Veränderung wie z.B. del(13q14), del(17p13) oder *IGH*-Translokationen - t(14q32) - wurden mithilfe der Mehrfarben-Interphase-FISH-Technik an aberranten Plasmazellen erfasst, die mit einem Zellsorter hinsichtlich ihres Immunphänotyps mit hoher Reinheit (Median $\geq 98\%$) aufgetrennt wurden. Die Bestimmung der Reihenfolge des Auftretens verschiedener zytogenetischer Veränderungen im Krankheitsverlauf beruhte hierbei im Wesentlichen auf dem prozentualen Anteil aberranter Plasmazellen mit einer bestimmten chromosomalen Veränderung im Vergleich zur Anzahl analysierter Zellkerne. Zytogenetische Veränderungen, die in den meisten aberranten Plasmazellen zu finden waren, wie z.B. t(14q32), wurden als onkogenetisch frühe Ereignisse betrachtet, während diejenigen, die nur in einem Teil der aberranten Plasmazellen zu finden waren als onkogenetisch spätere Ereignisse (z.B. del(17p13)) definiert wurden. Hierbei wurde angenommen, dass 2 oder mehr verschiedene zytogenetische Aberrationen onkogenetisch zu verschiedenen Zeitpunkten auftraten, wenn sich ihr prozentualer Anteil um mindestens 15% unterschied. Zusätzlich erfolgte eine simultane Färbung mit verschiedenen FISH-Sonden in der Mehrfarbentechnik um chromosomale Veränderungen auf Einzelzellniveau erfassen zu können.

Del(13q14), del(17p13) und t(14q32) traten bei Patienten mit Multiplem Myelom deutlich häufiger auf als bei Patienten mit MGUS (55%, 11% und 42% gegenüber 22%, 0% und 22%), wobei sich die Frequenzen von del(14q32) und +14q32 - in der Abwesenheit von *IGH*-Translokationen - sowie +17p13 in beiden Patientengruppen nicht signifikant unterschieden. Im Gegensatz zu unseren

Beobachtungen beschrieben andere Arbeiten eine vergleichbare Häufigkeit der genannten chromosomalen Veränderungen bei Patienten mit Multiplem Myelom und MGUS (Fonseca *et al*, 2004). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist, dass in vorliegender Untersuchung nur Patienten mit MGUS, die mindestens 5% immunphänotypisch normaler Knochenmark-Plasmazellen (im Vergleich zum Gesamt-Plasmazellanteil im Knochenmark) bzw. Patienten mit Multiplem Myelom, die 5% oder weniger normale Plasmazellen aufwiesen, Berücksichtigung fanden. Grundlage für dieses Vorgehen war die Tatsache, dass Patienten, die nicht diesen Kriterien entsprechen, eher einen klinischen Krankheitsverlauf der anderen Entität zeigen. Das heißt, Patienten mit MGUS und einem geringen Anteil normaler Plasmazellen gehen üblicherweise rasch in ein manifestes Multiples Myelom über, während Patienten mit Multiplem Myelom und einem hohen Anteil normaler Plasmazellen im Knochenmark häufig einen schleichenden Krankheitsverlauf ohne Therapiebedürftigkeit aufweisen (asymptomatisches Multiples Myelom) (Pérez-Persona *et al*, 2007; Paiva *et al*, 2009; Pérez-Persona *et al*, 2010). Das simultane Vorliegen einer del(13q14) und einer *IGH*-Translokation wurde signifikant häufiger bei Patienten mit Multiplem Myelom als bei Patienten mit MGUS beobachtet (26% bzw. 3%, $p < 0,001$). In Übereinstimmung mit publizierten Beobachtungen fanden sich *IGH*-Translokationen sowohl bei Patienten mit Multiplem Myelom als auch mit MGUS häufiger in Verbindung mit einem hypodiploiden oder diploiden Karyotyp als einem hyperdiploiden Karyotyp (Avet-Loiseau *et al*, 2002). Diesbezüglich wiesen 57% aller Patienten mit Multiplem Myelom und einem nicht-hyperdiploiden Karyotyp eine *IGH*-Translokation auf, wobei diese Veränderung nur bei 25% der Patienten mit hyperdiploidem Karyotyp nachgewiesen wurde ($p < 0,001$). Entsprechend zeigten 30% der Patienten mit MGUS und nicht-hyperdiploidem Karyotyp eine *IGH*-Translokation und 11% derer, die einen hyperdiploiden Karyotyp hatten (nicht signifikant). Der

prozentuale Anteil aberranter Plasmazellen mit verschiedenen zytogenetischen Veränderungen - z.B. del(13q14) oder t(14q32) - im Verhältnis zur Anzahl analysierter Zellkerne unterschied sich nicht signifikant zwischen Patienten mit Multiplem Myelom und MGUS. Diese Beobachtung erlaubt die Schlussfolgerung, dass vergleichbare Sequenzen zytogenetischer Veränderungen prinzipiell bei beiden Entitäten auftreten können. Hierin unterscheiden sich unsere Ergebnisse von denen anderer Arbeitsgruppen, die bei Patienten mit MGUS einen geringeren Anteil von Plasmazellen mit del(13q14) fanden als bei Patienten mit Multiplem Myelom und hieraus die Schlussfolgerung zogen, dass diese genetische Veränderung bei der malignen Transformation eine entscheidende Rolle spielen könnte (Avet-Loiseau *et al*, 2002; Chiecchio *et al*, 2009). Eine unzureichende Reinheit klonaler Plasmazellen, das heißt Beimischung normaler Plasmazellen bedingt durch das Selektionsverfahren (z.B. mit CD138⁺ Mikrobeads) in einigen dieser publizierten Untersuchungen könnte zu diesen unterschiedlichen Ergebnissen beigetragen haben.

Interessanterweise fanden wir weiterhin, dass bei 24% der Patienten mit Multiplem Myelom und 62% der Patienten mit MGUS ($p=0,02$) sowohl *IGH*-translozierte als auch -nicht-translozierte aberrante Plasmazellen (>15%) nachgewiesen werden konnten. Ebenso waren bei 43% der Patienten mit Multiplem Myelom und 38% der Patienten mit MGUS (nicht signifikant) sowohl aberrante Plasmazellen mit als auch ohne del(13q14) vorhanden. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass sowohl *IGH*-Translokationen als auch die del(13q14) bei einem signifikanten Anteil der Patienten mit Multiplem Myelom oder MGUS im Tumorstammklon noch abwesend sind und erst im weiteren Krankheitsverlauf erworben werden. Beide chromosomalen Veränderungen galten bisher überwiegend als sehr frühe onkogenetische Ereignisse in der Pathogenese von Plasmazell-

Dyskrasien (Chng *et al*, 2007). In Übereinstimmung mit bereits beschriebenen Beobachtungen ko-existierten auch in vorliegender Untersuchung insbesondere andere, möglicherweise zufällig verteilte, *IGH*-Translokationen als t(4;14), t(11;14) und t(14;16) mit aberranten Plasmazellen ohne die entsprechenden chromosomalen Aberrationen. Bei einigen Patienten war der Anteil aberranter Plasmazellen mit anderen *IGH*-Translokationen als t(4;14), t(11;14) und t(14;16) sogar geringer als der mit del(13q14) oder +17p13 was vermuten lässt, dass insbesondere diese *IGH*-Translokationen onkogenetisch späte Ereignisse darstellen und möglicherweise bei der Krankheitsprogression eine Rolle spielen könnten. Jedoch entspricht unsere Beobachtung, dass auch rekurrende und prognostisch bedeutende *IGH*-Translokationen, wie beispielsweise t(4;14) oder t(11;14), häufig im Tumorstammklon noch abwesend sind nicht den bisherigen Vorstellungen zur Pathogenese von Plasmazell-Dyskrasien.

Ein weiteres wesentliches Ziel vorliegender Arbeit war Muster zytogenetischer Abnormalitäten beim Multiplen Myelom und MGUS zu vergleichen, entweder auf Grundlage der An- oder Abwesenheit chromosomaler Veränderungen oder unter Mitberücksichtigung der vermutlichen Sequenz ihres Auftretens. Bei Verwendung einer Unterteilung in 5 Patientengruppen hinsichtlich An- oder Abwesenheit einer *IGH*-Translokation, entweder mit oder ohne das simultane Vorliegen einer del(13q14) und/oder del(17p13), zeigten 89% der Patienten mit Multiplem Myelom und 100% der Patienten mit MGUS chromosomale Aberrationsmuster, die prinzipiell auch bei der entsprechend anderen Entität zu finden waren (nicht signifikant). Unter Mitberücksichtigung des sequenziellen Auftretens dieser Veränderungen (und +17p13) wiesen noch 73% der Patienten mit Multiplem Myelom zytogenetische Muster auf, die auch bei Patienten mit MGUS vorkamen, aber weiterhin 100% der Patienten mit MGUS Muster, die prinzipiell auch bei Patienten mit Multiplem Myelom

zu finden waren ($p < 0,001$). Wurden zusätzlich der durchflußzytometrisch bestimmte DNA-Ploidie-Status, der Translokationspartner von $t(14q32)$ sowie Deletionen oder Zugewinne von *FGFR3*, *CCND1* oder *MAF* - in der Abwesenheit von *IGH*-Translokationen - einschließlich der vermutlichen Reihenfolge ihres Auftretens in die Analyse mit einbezogen, zeigten noch 26% der Patienten mit Multiplem Myelom und 55% der Patienten mit MGUS sich überlappende, zytogenetische Evolutionsprofile ($p = 0,003$).

Zusammenfassend konnten wir in vorliegender Arbeit aufzeigen, dass sich chromosomale Veränderungen schrittweise im Krankheitsverlauf von Plasmazell-Dyskrasien ereignen. Im Gegensatz zum bisherigen Verständnis sind die $del(13q14)$ und *IGH*-Translokationen hierbei im Tumorstammklon klonaler Plasmazellen häufig noch abwesend und treten erst im Krankheitsverlauf auf. Multiples Myelom und MGUS weisen häufig charakteristische Muster zytogenetischer Veränderungen auf, wenn die DNA-Ploidie sowie die mögliche Sequenz des Auftretens chromosomaler Aberrationen mit berücksichtigt wird.

Schmidt-Hieber M, Gutiérrez ML, Pérez-Andrés M, Paiva B, Rasillo AR, Taberero MD, Sayagués JM, Lopez A, Bárcena P, Sanchez ML, Gutierrez N, San Miguel JF, Orfao A. Cytogenetic evolution profiles in multiple myeloma and MGUS: a study in highly purified aberrant plasma cells (eingereicht).

2.3. Die Bedeutung der Expression von CD117 (c-Kit) durch klonale Plasmazellen (Publikation I)

CD117 (c-Kit), eine Rezeptor-Thyrosinkinase der Klasse III, wird normalerweise im Knochenmark von Mastzellen und einem Subset der

Progenitorzellen exprimiert (Escribano *et al*, 1998). Im Gegensatz zu Nagetieren, bei denen ein Teil der B-Vorläuferzellen im Knochenmark möglicherweise CD117 exprimiert, sind beim Menschen vermutlich alle CD19⁺ B-Zellen von den frühesten Vorläuferzellen bis zu den Plasmazellen CD117⁻ (Nagasawa, 2006; Bataille *et al*, 2008; Matarraz *et al*, 2010). Eine Expression von CD117 ist jedoch gelegentlich bei Non-Hodgkin-Lymphomen zu finden, und CD117⁺ klonale Plasmazellen werden bei etwa 30% aller Patienten mit Multiplem Myelom nachgewiesen (Vakiani *et al*, 2005; Mateo *et al*, 2008). Interessanterweise ist die Expression von CD117 durch klonale Plasmazellen bei Patienten mit Multiplem Myelom mit einer günstigen Prognose assoziiert, obwohl c-Kit bei anderen Erkrankungen, wie z.B. gastrointestinalen Stromatumoren oder der Mastozytose, regulatorische Moleküle aktiviert, die bei der malignen Transformation vermutlich eine wesentliche Rolle spielen (z.B. „signal transducer and activator of transcription 5, STAT-5“) (Hirota *et al*, 1998; Orfao *et al*, 2007; Mateo *et al*, 2008; Baumgartner *et al*, 2009). Auf Grundlage dieser Überlegungen kann vermutet werden, dass die Expression von c-Kit durch klonale Plasmazellen bei Plasmazell-Dyskrasien eher die Funktion eines Ankermoleküls besitzen könnte. Ein solches Ankermolekül könnte für die Regulation des Homings klonaler Plasmazellen im Knochenmark-Mikromilieu eine wesentliche Bedeutung haben.

Wir haben bei 106 neudiagnostizierten Patienten mit Plasmazell-Dyskrasien (50 Patienten mit manifestem Multiplem Myelom, 38 Patienten mit asymptomatischem Multiplem Myelom sowie 18 Patienten mit MGUS) myeloische und lymphatische Zell-Kompartimente im peripheren Blut und Knochenmark in Abhängigkeit der Expression von CD117 durch klonale Plasmazellen mithilfe der Mehrfarben-Durchflusszytometrie untersucht. Zusätzlich wurden prognostisch informative chromosomale Aberrationen - z.B. del(13q14), del(17p13), *IGH*-

Translokationen - unter Verwendung der Interphase-FISH-Technik bei Patienten mit CD117⁺ im Vergleich zu CD117⁻ klonalen Plasmazellen erfasst.

CD117⁺ klonale Plasmazellen wurden in vorliegender Untersuchung bei 30% der Patienten mit manifestem Multiplem Myelom, 45% der Patienten mit asymptomatischem Multiplem Myelom und 72% der Patienten mit MGUS gefunden. Diese Ergebnisse unterstützen die eingangs erwähnte Annahme, dass die Expression von CD117 durch klonale Plasmazellen mit der Aggressivität und/oder Prognose der zugrundeliegenden Plasmazell-Dyskrasie vergesellschaftet ist (Mateo *et al*, 2008). Patienten mit CD117⁺ im Vergleich zu CD117⁻ klonalen Plasmazellen wiesen im Knochenmark höhere prozentuale Anteile immunphänotypisch normaler Plasmazellen, CD117⁺ myeloischer Vorläuferzellen sowie CD38⁺ B-Vorläuferzellen auf, wobei dies für alle 3 untersuchten Formen von Plasmazell-Dyskrasien zutraf. Im Gegensatz hierzu war der prozentuale Anteil von knochenmarkständigen CD34⁺ myeloischen Progenitorzellen und die Anzahl neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut bei Patienten mit CD117⁺ gegenüber CD117⁻ Multiplem Myelom - jedoch nicht MGUS - vermindert. Diese alterierte Distribution verschiedener Zell-Kompartimente führte zu einem signifikant verminderten Verhältnis von CD34⁺CD19⁻ myeloischen und CD34⁺CD19⁺ lymphatischen Vorläuferzellen (4,3 bzw. 7,9; p=0,04), jedoch einem signifikant erhöhten Verhältnis von CD117⁺ und CD34⁺CD19⁻ myeloischen Knochenmark-Vorläuferzellen (8,8 bzw. 3,8; p=0,001) bei Patienten mit CD117⁺ gegenüber CD117⁻ Multiplem Myelom. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte sich weiterhin eine signifikant negative Korrelation (r=-0,39; p=0,003) zwischen der Anzahl von neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut und dem prozentualen Anteil von CD117⁺ Plasmazellen (im Verhältnis zum Gesamtanteil klonaler Plasmazellen) im Knochenmark bei Patienten mit Multiplem Myelom. Bei Patienten mit manifestem Multiplem Myelom war die Expression von CD117 durch

klonale Plasmazellen nicht nur mit einer signifikant verminderten Anzahl zirkulierender neutrophiler Granulozyten assoziiert, sondern auch mit einem signifikant verminderten prozentualen Anteil neutrophiler Granulozyten im Knochenmark. Die reduzierte Freisetzung reifer neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmarkraum in die Blutzirkulation bei progredienter Akkumulation CD117⁺ myeloischer Knochenmark-Progenitorzellen könnte auf einen zunehmenden Stammzellfaktor-Verbrauch im Knochenmark-Mikromilieu durch CD117⁺ klonale Plasmazellen hindeuten. Denkbar wäre allerdings auch ein Einfluss der CD117 Expression durch klonale Plasmazellen auf die Regulation des Homings verschiedener Zell-Kompartimente innerhalb des Knochenmark-Mikromilieus.

Die Verteilung anderer zirkulierender oder knochenmarkständiger Zell-Kompartimente (z.B. Mastzellen oder B-Zellen verschiedener Reifungsstufen) unterschied sich nicht signifikant bei Patienten mit CD117⁺ und CD117⁻ klonalen Plasmazellen. Die prognostisch ungünstige Koexpression von CD28 durch klonale Plasmazellen hatte in vorliegender Untersuchung keinen signifikanten Einfluss auf die Distribution myeloischer oder lymphatischer Zell-Kompartimente innerhalb der Gruppe der Patienten mit Multiplem Myelom und CD117⁺ klonalen Plasmazellen (Mateo *et al*, 2008).

Patienten mit Multiplem Myelom und CD117⁺ klonalen Plasmazellen zeigten weiterhin signifikant seltener *IGH*-Translokationen (10% gegenüber 48%; p=0,008) sowie seltener die prognostisch ungünstigen chromosomalen Veränderungen t(4;14), t(14;16) und del(17p13) (5% gegenüber 26%; p=0,08) als Patienten mit CD117⁻ klonalen Plasmazellen. Interessanterweise lag zudem ein IgG-Isotyp signifikant häufiger bei Patienten mit Multiplem Myelom und CD117⁺ klonalen Plasmazellen vor, wobei in der Patientengruppe mit CD117⁻ Multiplem Myelom IgA- und Leichtketten-Isotypen vorherrschten. Diese Beobachtung könnte erklären, dass ein IgA- oder

Leichtketten-Isotyp gegenüber dem IgG-Isotyp bekanntermaßen bei Patienten mit Multiplem Myelom mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist (Zhang *et al*, 2010).

Zusammenfassend zeigen unsere Untersuchungsergebnisse, dass die Expression von CD117 durch klonale Plasmazellen bei verschiedenen Plasmazell-Dyskrasien mit einer wesentlich veränderten Distribution myeloischer und lymphatischer Zell-Kompartimente sowie prognostisch günstigen Krankheitseigenschaften einhergeht. Die Expression von CD117 hat hierbei möglicherweise die Funktion eines Ankermoleküls, welches bewirken könnte, dass CD117⁺ im Vergleich zu CD117⁻ klonalen Plasmazellen im Organismus weniger streuen.

Publikation I

Schmidt-Hieber M, Perez-Andres M, Paiva B, Flores-Montero J, Perez JJ, Gutierrez NC, Vidriales MB, Matarraz S, San Miguel JF, Orfao A. CD117 expression in gammopathies is associated with an altered maturation of the myeloid and lymphoid hematopoietic cell compartments and favorable disease features. *Haematologica* 2011; 96: 328-332.

2.4. Distribution und Homing CXCL12-CXCR4-regulierter Zell-Kompartimente (Publikation I)

Die sogenannte CXCL12-CXCR4-Achse ist für die Regulation der Knochenmark-Homöostase und des Homings verschiedener Zell-Kompartimente in räumlich differentiell angeordneten Knochenmark-Mikromilieus (Nischen) von wesentlicher Bedeutung (Ma *et al*, 1999; Nie *et al*, 2004). Aus den sekundären lymphatischen Organen, wie z.B. den Tonsillen, werden neu gebildete Plasmazellen mit einer sehr kurzer Überlebensdauer (wenige Tage) abgegeben und erreichen über den Blutweg das Knochenmark, in dem sie als langlebige Plasmazellen möglicherweise über Jahre residieren können (Shapiro-Shelef *et al*, 2005). Das Homing von Plasmazellen im Knochenmark wird wesentlich von CXCL12-exprimierenden Knochenmark-Stromazellen bestimmt, wobei die Expressionsdichte des zugehörigen Rezeptors, das heißt CXCR4, auf der Plasmazelloberfläche kontinuierlich von den Tonsillen über das periphere Blut bis zum Knochenmark abnimmt. Allerdings wird im Knochenmark (und möglicherweise auch in der Milz) nicht nur das Homing von Plasmazellen über die CXCL12-CXCR4-Achse reguliert, sondern auch das anderer B-Vorläuferzell-Kompartimente und CD34⁺ hämatopoietischer Stammzellen (Tokoyoda *et al*, 2004; Sugiyama *et al*, 2006). Neuere Vorstellungen gehen deshalb davon aus, dass verschiedene CXCL12-CXCR4-regulierte Zell-Kompartimente im Knochenmark in sich potentiell überlappenden und in ihrer Anzahl begrenzten Nischen mit einander konkurrieren (Tokoyoda *et al*, 2004; Radbruch *et al*, 2006).

In vorliegender Publikation haben wir bei insgesamt 206 Patienten mit verschiedenen Plasmazell-Dyskrasien die Verteilung verschiedener Zell-Kompartimente, die über die CXCL12-CXCR4- Achse reguliert werden, im peripheren Blut und im Knochenmark untersucht und mit einer Gruppe gesunder

Kontrollpersonen verglichen. Zusätzlich wurde in einem innovativen *ex-vivo* Migrations-Assay die Auswanderung verschiedener CXCL12-CXCR4-regulierter Zell-Kompartimente, einschließlich klonaler und immunphänotypisch normaler Plasmazellen, in Richtung ansteigender CXCL12 („stromal cell derived factor-1, SDF-1“)-Konzentrationen bei verschiedenen Plasmazell-Dyskrasien untersucht.

Der prozentuale Anteil klonaler Plasmazellen nahm in vorliegender Untersuchung sowohl im Knochenmark als auch im peripheren Blut kontinuierlich vom MGUS über das asymptomatische Multiple Myelom bis hin zum manifesten Multiplen Myelom zu. Hierbei wiesen klonale Plasmazellen im peripheren Blut einen etwas unreiferen Immunphänotyp auf als klonale Plasmazellen im Knochenmark mit geringerer innerer Zellkomplexität (SSC-Parameter) sowie geringerer Expressionsdichte unter anderem von CD38, CD138 und CD40. Diese Veränderungen im Verteilungsmuster klonaler Plasmazellen vom MGUS zum manifesten Multiplen Myelom gingen mit einer zunehmenden Depletion immunphänotypisch normaler Plasmazellen, verschiedener B-Progenitorzell-Kompartimente sowie CD34⁺ hämatopoietischer Stammzellen im Knochenmark einher. Interessanterweise zeigte sich gegenüber gesunden Spendern bei allen 3 untersuchten Patientengruppen ein erhöhter prozentualer Anteil zirkulierender CD34⁺ hämatopoietischer Stammzellen, welcher kontinuierlich vom MGUS bis hin zum manifesten Multiplen Myelom zunahm. Normale Plasmazellen, B-Vorläuferzellen und CD34⁺ hämatopoietische Stammzellen konnten die Migration klonaler Plasmazellen von Patienten mit MGUS oder asymptomatischem Multiplen Myelom in Richtung ansteigender SDF-1-Konzentrationen abschwächen, während dies bei klonalen Plasmazellen von Patienten mit manifestem Multiplen Myelom nicht möglich war. Erwähnenswert ist weiterhin, dass normale zirkulierende Plasmazellen beim manifesten Multiplen Myelom im Gegensatz zum asymptomatischen Multiplen

Myelom und MGUS eine erhöhte CXCR4-Expressionsdichte im Vergleich zu gesunden Spendern aufwiesen und dabei nicht in ihrer Anzahl vermindert waren. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Depletion normaler Knochenmark-Plasmazellen insbesondere bei Patienten mit manifestem Multiplem Myelom nicht primär durch eine verminderte Bildung in den sogenannten induktiven Organsystemen wie z.B. den Tonsillen bedingt ist, sondern durch ein vermindertes Homing im Knochenmark-Mikromilieu.

Zusammenfassend zeigen die in dieser Publikation geschilderten Untersuchungsergebnisse, dass CXCL12-CXCR4-regulierte Zell-Kompartimente bei Patienten mit MGUS, asymptomatischem Multiplem Myelom und manifestem Multiplem Myelom progressiv alteriert sind. Diese Veränderungen gehen mit einer zunehmenden Verdrängung von normalen Plasmazellen, B-Vorläuferzellen und CD34⁺ hämatopoietischen Stammzellen durch klonale Plasmazellen in sich potentiell überlappenden Nischen im Knochenmark-Mikromilieu einher.

Publikation II

Paiva B, Pérez-Andrés M, Vídriales MB, Almeida J, de Las Heras N, Mateos MV, López-Corral L, Gutiérrez NC, Blanco J, Oriol A, Hernández MT, de Arriba F, de Coca AG, Terol MJ, de la Rubia J, González Y, Martín A, Sureda A, Schmidt-Hieber M, Schmitz A, Johnsen HE, Lahuerta JJ, Bladé J, San-Miguel JF, Orfao A. Competition between clonal plasma cells and normal cells for potentially overlapping bone marrow niches is associated with a progressively altered cellular distribution in MGUS vs myeloma. Leukemia 2011; 25: 697-706.

3. Neue Therapiemöglichkeiten beim Multiplen Myelom

3.1. Hintergrund

Durch den Einsatz mehrerer neuer Substanzen, insbesondere dem Proteasomen-Inhibitor Bortezomib sowie den immunmodulatorischen Substanzen Thalidomid und Lenalidomid konnte in den letzten Jahren eine deutliche Verbesserung des medianen Gesamtüberlebens (zur Zeit etwa 3-7 Jahre nach Diagnosestellung) bei Patienten mit Multiplem Myelom erzielt werden (Raab *et al*, 2009; Harousseau *et al*, 2010; Mateos *et al*, 2010a). Gegenwärtig wird die Wirksamkeit dieser Substanzen in klinischen Studien in verschiedenen Abschnitten des Algorithmus der Multiplen Myelom-Therapie evaluiert (z.B. Erhaltungstherapie). Trotz dieser bedeutenden Fortschritte ist nach gegenwärtigem Kenntnisstand die Hochdosistherapie mit Melphalan und autologem Stammzellersatz weiterhin unverzichtbarer Bestandteil der Multiplen Myelom-Therapie. Eine Heilung dieser Erkrankung kann auch heutzutage nur in Einzelfällen erreicht werden, z.B. durch eine allogene Stammzelltransplantation (Bensinger, 2004; Raab *et al*, 2009; Mateos *et al*, 2010a und b; Van de Donk *et al*, 2011).

Die Untersuchung von neuen gegen das Multiple Myelom gerichteten Substanzen, wie beispielsweise Perifosin, ist deshalb, ebenso wie die Weiterentwicklung von Transplantationsprotokollen (z.B. die Konditionierung oder virale Infektionen betreffend) von wesentlicher Bedeutung um die Prognose dieser Patienten zu verbessern.

3.2. *In vitro* Zytotoxizität von Perifosin, Bortezomib und Lenalidomid gegenüber Zelllinien und hämatopoietischen Progenitorzellen (Publikationen III und IV)

Perifosin, ein neues synthetisches Alkylphospholipid, wird gegenwärtig in

klinischen Phase-II- und -III-Studien als Behandlungsoption von onkologischen und hämatologischen Malignomen, insbesondere dem Multiplen Myelom, geprüft (Richardson *et al*, 2008; Pal SK *et al*, 2010). Präklinische Untersuchungen dieser Substanz an Zelllinien, selektionierten Plasmazellen von Patienten mit Multiplem Myelom sowie Tiermodellen lassen eine vielversprechende gegen das Multiple Myelom gerichtete Wirksamkeit vermuten (Hideshima, *et al*, 2006; Gajate *et al*, 2007). Im Gegensatz zu klassischen Chemotherapeutika, die vorwiegend gegen die DNA gerichtet sind, interagieren Alkylphospholipide mit der zellulären Plasmamembran, in welcher sie akkumulieren und schließlich über Membran-Mikrodomänen („Lipid rafts“) ins Zellinnere geschleust werden (Gajate *et al*, 2007). In klonalen Plasmazellen bewirkt Perifosin eine Hemmung des Phosphoinositid 3-Kinase (PI3-K)/AKT-Signalübertragungswegs, wodurch über die Regulierung weiterer zellulärer Proteine (z.B. Survivin, Caspase-3) der Zelluntergang induziert wird (Hideshima *et al*, 2007).

Wir haben *in vitro* die Zytotoxizität von Perifosin, Bortezomib und Lenalidomid gegenüber 6 verschiedenen Zelllinien, welche unter anderem von Patienten mit Multiplem Myelom abstammten (z.B. U266, RPMI-8226) untersucht (*Publikation III*). Weiterhin haben wir untersucht, inwiefern diese Substanzen das klonogene Potential hämatopoietischer Progenitorzellen gesunder Spender hemmen und Zytotoxizität induzieren (*Publikation IV*). Methoden, die hierbei eingesetzt wurden, waren vor allem die Trypanblau-Färbung, durchflusszytometrische Caspase- und Annexin-V-Assays, immunhistochemische Färbungen (z.B. Ki-67) sowie klonogene „colony forming units (CFU)“-Assays in zweitgenannter Arbeit. Daneben haben wir überprüft, ob die „Immature Myeloid Information (IMI)“-Technik unter Verwendung eines vollautomatisierten Analysesystems (XE-5000) geeignet ist, zytotoxische Vorgänge an Zellkulturen zu erfassen. Diese Technik, die ursprünglich unter anderem

entwickelt wurde, um frühe myeloische Zellen im peripheren Blut zu detektieren, beruht darauf, dass Leukozyten in Abhängigkeit ihres Reifungsgrads eine unterschiedliche Lipidzusammensetzung der Plasmamembran aufweisen (Linssen *et al*, 2008). Das bei diesem Verfahren verwendete Reagenz lysiert die leukozytären Zellmembranen in Abhängigkeit ihrer Lipidzusammensetzung in unterschiedlichem Masse bzw. fixiert das intrazelluläre Zytoskelett. Die Gleichstrom-Hochfrequenz-Methode erlaubt anschließend, diese Zellen gemäß ihrer Größe und inneren Zellkomplexität genau zu charakterisieren.

Perifosin und Bortezomib führten bei allen untersuchten Zelllinien zeit- (24 oder 48 Stunden Inkubation) und konzentrationsabhängig zu einer prozentualen Abnahme vitaler Zellen im Trypanblau-Assay sowie Zunahme apoptotischer (Caspase⁺) oder nekrotischer Zellen (Caspase⁻PI⁺) im Caspase-Assay. Hierbei betragen die mit der Reed-Muench-Methode ermittelten IC₅₀ Konzentrationen 13,3 - >80 µM für Perifosin und 2,1 - >40 nM für Bortezomib. Im Gegensatz hierzu induzierte Lenalidomid in klinisch wirksamen Konzentrationen (bis ca. 2,2 µM) nur geringgradige oder keine Zytotoxizität in allen eingesetzten Untersuchungsassays (<10% in Bezug auf die Negativkontrolle). Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass Perifosin und Bortezomib in klinisch wirksamen Konzentrationen Zytotoxizität über die Induktion von Apoptose und/oder Nekrose vermitteln. Die in klinischen Studien beschriebene Wirksamkeit von Lenalidomid ist jedoch eher, wie bereits vermutet, auf indirekte Effekte, wie z.B. Immunmodulation zurückzuführen (Görgün *et al*, 2010). Isobologramm-Analysen und Berechnungen von Kombinationsindizes zeigten weiterhin, dass Perifosin zusammen mit Bortezomib überwiegend additive oder synergistische Effekte induziert. Diese Beobachtung stellt die Grundlage für die Evaluation dieser Kombination in klinischen Therapiestudien bei Patienten mit Multiplem Myelom dar.

Perifosin - im Gegensatz zu Bortezomib und Lenalidomid - führte zu einem signifikanten Anstieg von IMI⁺ Kulturzellen im XE-5000 System. Interessanterweise beschrieben kürzlich publizierte mikroskopische Untersuchungen, dass die eingangs erwähnte Interaktion von Perifosin mit Plasmamembranen mit einer wesentlichen zellulären Formänderungen einhergeht und den intrazellulären Lipidstoffwechsel beeinflusst (Carrasco *et al*, 2010). Ebenso hängt auch die Erfassung von IMI⁺ Zellen im XE-5000 System wesentlich von der Struktur und Form der Zellmembran sowie, wie oben geschildert, von dem zellulären Lipidstoffwechsel ab (Linssen *et al*, 2008). Dies könnte erklären, dass Perifosin im Gegensatz zu den beiden anderen neuen Substanzen Bortezomib und Lenalidomid zu einem signifikanten Anstieg IMI⁺ Zellen führte. Weitere Forschungsarbeiten sind notwendig, um den Stellenwert dieser Technik hinsichtlich Erfassung zytotoxischer Vorgänge genauer zu eruieren.

Publikation III

Schmidt-Hieber M, Dabrowski R, Weimann A, Aicher B, Lohneis P, Busse A, Thiel E, Blau IW. In vitro cytotoxicity of the novel antimyeloma agents perifosine, bortezomib and lenalidomide against different cell lines. Invest New Drugs 2010 Nov 16 [Epub ahead of print].

Des Weiteren untersuchten wir mithilfe von verschiedenen nicht-klonogenen (z.B. durchflusszytometrische Caspase-Messungen) und klonogenen CFU-Assays den Einfluss von Perifosin, Bortezomib, Lenalidomid und Adriamycin gegenüber hämatopoietischen Progenitorzellen gesunder Spender (*Publikation IV*). Diese *in vitro* Untersuchungen stellen eine wesentliche Voraussetzung dar um das hämatologische Toxizitätsprofil dieser Substanzen *in vivo* abschätzen zu können. Interessanterweise induziert Perifosin bei Nagetieren eine Knochenmark-Hyperplasie mit Leukozytose, Thrombozytose und erhöhter klonogener Aktivität von Vorläuferzellen im Knochenmark („CFU-granulocyte-macrophage, CFU-GM“) (Catley *et al*, 2007). Bekanntermaßen bewirken im Gegensatz hierzu die meisten klassischen Chemotherapeutika eine, oft dosislimitierende, Myelosuppression.

Alle untersuchten Substanzen hemmten konzentrationsabhängig die Formation von CFU, wobei diese Hemmung in klinisch erreichbaren Plasma-Konzentrationen am ausgeprägtesten für Bortezomib und am schwächsten für Perifosin war. Perifosin hemmte vorwiegend die Formation von granulozytären Vorläuferzellen (CFU-GM), während durch die anderen Substanzen vor allem die Bildung von erythrozytären Vorläuferzellen („burst-forming unit-erythroid, BFU-E“) inhibiert wurde. Interessanterweise hemmte auch Lenalidomid in klinisch erreichbaren Konzentrationen die CFU-Bildung, insbesondere von BFU-E. Diese Beobachtung korreliert sehr gut mit der klinischen Erfahrung, dass Lenalidomid häufig als Nebenwirkung zu einer Zytopenie führt, wenn das Medikament bei Patienten mit Multiplem Myelom oder chronisch lymphatischer Leukämie (CLL) eingesetzt wird (Zonder *et al*, 2010). Lenalidomid stellt aber auch eine sehr wirksame Substanz in der Therapie des myelodysplastischen Syndroms (MDS) dar. Insbesondere bei Vorliegen eines MDS mit del(5q) wird Lenalidomid in der klinischen Routinetherapie eingesetzt und führt zur Unabhängigkeit von Erythrozyten-

Transfusionen bei etwa 50% der Patienten, obwohl auch hier anfängliche Zytopenien häufig sind (Sekeres *et al*, 2008; Ximeri *et al*, 2010). Im Gegensatz zu unseren Untersuchungsergebnissen steigerte Lenalidomid das klonogene Potential von Vorläuferzellen, wenn diese vor bzw. nach Therapieeinleitung mit Lenalidomid MDS-Patienten aus dem Knochenmark entnommen wurden (Ximeri *et al*, 2010). Wie bereits von einigen Arbeitsgruppen postuliert, könnte eine konzentrationsabhängige Beeinflussung der klonogenen Aktivität hämatopoietischer Vorläuferzellen durch Lenalidomid, das heißt Inhibition bei höheren und Aktivierung bei niedrigeren Substanzkonzentrationen für diese Beobachtung in Betracht kommen (Ebert *et al*, 2008; Pal R *et al*, 2010). Vorstellbar ist jedoch auch eine prinzipiell unterschiedliche Wirkung der Substanz gegenüber Progenitorzellen von MDS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen, die für unsere Experimente herangezogen wurden.

Der Ursprung hämatopoietischer Progenitorzellen, das heißt entweder Knochenmark oder peripheres Blut nach Stimulation mit „granulocyte-colony-stimulating factor“ (G-CSF) (mit oder ohne *in vitro* CD34⁺ Zellselektion) hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Hemmung der CFU-Formation durch Perifosin, wenn die Substanz in klinisch wirksamen Konzentrationen eingesetzt wurde. Perifosin in der Kombination mit Lenalidomid oder Adriamycin hemmte tendenziell antagonistisch die CFU-Formation. Trypanblau-Versuche, Caspase- und Annexin-V-Assays sowie immunhistochemische Färbungen (z.B. Ki-67) zeigten für keine der untersuchten Substanzen eine höhergradige Zytotoxizität gegenüber Progenitorzellen nach CD34⁺ Zellselektion. Diese Beobachtung könnte daraufhin hindeuten, dass die Möglichkeit der Stammzellapherese mit nachfolgender Hochdosistherapie durch den klinischen Einsatz dieser Substanzen nicht wesentlich beeinträchtigt wird.

In Zusammenschau zeigen die in dieser Publikation dargelegten Untersuchungsergebnisse, dass Perifosin - ebenso wie Bortezomib, Lenalidomid und

Adriamycin - *in vitro* die Formation von CFU hemmt und sich damit von den tierexperimentellen *in vivo* Beobachtungen unterscheidet. Perifosin besitzt deshalb wahrscheinlich keine klinische Wirksamkeit als eine die Myelopoese stimulierende Substanz zur Verhinderung oder Verkürzung von Neutropeniephasen nach intensiver Chemotherapie wie die Untersuchungsergebnisse im Mausmodell vermuten ließen.

Publikation IV

Schmidt-Hieber M, Dabrowski R, Aicher B, Lohneis P, Busse A, Tietze-Buerger C, Reufi B, Thiel E, Blau IW. In vitro effects of perifosine, bortezomib and lenalidomide against hematopoietic progenitor cells from healthy donors. Invest New Drugs 2011 Jul 13 [Epub ahead of print].

3.3. Konditionierung mit Fludarabin und Treosulfan vor allogener Stammzelltransplantation (Publikationen V und VI)

Die allogene Stammzelltransplantation stellt nach heutigem Kenntnisstand vermutlich das einzige Therapieverfahren dar, mit welchem eine Heilung des Multiplen Myeloms prinzipiell erreicht werden kann (Bensinger, 2004; Raab *et al*, 2009; Van de Donk *et al*, 2011). Diesen vielversprechenden Therapieaussichten steht jedoch ein vergleichsweise hohes Risiko gegenüber, bereits in der Frühphase nach Transplantation an Komplikationen zu versterben. Die transplantationsassoziierte Mortalität („Treatment-related Mortality“) beträgt in Abhängigkeit der Art der Konditionierung und verschiedener Risikofaktoren (z.B. Alter des Patienten) 10-60% und setzt sich im Wesentlichen aus Toxizität durch die Konditionierung (z.B. Chemotherapeutika, Radiotherapie), infektiösen Komplikationen sowie der Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung („Graft-versus-host disease, GvHD“) mit ihren

Folgekomplikationen (z.B. Organversagen, Infektionen) zusammen. In den letzten Jahren wurden vermehrt intensitäts- und/oder toxizitätsreduzierte Konditionierungsprotokolle entwickelt („reduced-intensity conditioning, RIC“), welche insbesondere bei älteren Patienten oder bei Vorliegen von Komorbiditäten zum Einsatz kommen. Diese intensitätsreduzierten Konditionierungsprotokolle sind gegenüber konventionellen Konditionierungen (z.B. hochdosiertes Cyclophosphamid in Kombination mit Ganzkörperbestrahlung oder Busulfan) mit einer verminderten Akuttoxizität vergesellschaftet, weisen jedoch als möglichen Nachteil einen verzögerten Übergang in einen kompletten hämatopoietischen Spender-Empfänger-Chimärismus sowie ein erhöhtes Rezidivrisiko der malignen Grunderkrankung auf (Kröger *et al*, 2002; Baron *et al*, 2006; Lokhorst *et al*, 2010). Die Therapiewirksamkeit der allogenen Stammzelltransplantation nach intensitätsreduzierter Konditionierung beruht im Wesentlichen auf dem Transplantat-gegen-Tumor („graft-versus-tumor“)-Effekt, das heißt der immunologischen Wirkung vor allem von zytotoxischen T-Spenderzellen gegenüber malignen Zellen des Empfängers (Tricot *et al*, 1996). Im Gegensatz zu konventionellen Konditionierungsprotokollen trägt damit die Zytotoxizität der Konditionierung in geringerem Maße zur Wirksamkeit dieses Verfahrens bei. Das Risiko von Infektionen und GvHD ist nach intensitätsreduzierter Konditionierung vor allogener Stammzelltransplantation eher im Auftreten verzögert als in der Inzidenz vermindert (Junghanss *et al*, 2002).

Fludarabin ist ein Nukleosidanalogen und wird bereits seit vielen Jahren in der klinischen Routinetherapie von hämatologischen Neoplasien wie beispielsweise der CLL eingesetzt. In den letzten Jahren wird die Substanz auch zunehmend in intensitätsreduzierten Konditionierungsprotokollen verwendet, z.B. in Kombination mit Busulfan oder Cyclophosphamid. Treosulfan ist eine Vorstufe („Prodrug“) eines bifunktionellen Alkylans und ist bei soliden Neoplasien wie z.B. dem Ovarialkarzinom

wirksam. Präklinische Untersuchungen an Multiplen Myelom-Zelllinien und selektionierten Plasmazellen von Patienten mit Multiplem Myelom zeigten eine vielversprechende antimaligne Wirksamkeit gegenüber dieser Neoplasie (Meinhardt *et al*, 2003).

Wir haben eine retrospektive, multizentrische Analyse zur Durchführbarkeit („Feasibility“) und Wirksamkeit einer intensitätsreduzierten Konditionierung mit Fludarabin und Treosulfan vor allogener Stammzelltransplantation bei 34 Patienten mit Multiplem Myelom durchgeführt (*Publikation V*). In einer zweiten Arbeit (*Publikation VI*) wurde die Kinetik des hämatopoietischen Spender-Empfänger-Chimärismus nach diesem neuen Konditionierungsprotokoll im Detail untersucht, wobei der überwiegende Anteil der insgesamt 27 Patienten ebenfalls ein Multiples Myelom als Grunderkrankung aufwies.

Alle 34 Patienten in erstgenannter Arbeit waren intensiv chemotherapeutisch vorbehandelt und 82% hatten bereits eine Hochdosistherapie mit Melphalan und autologem Stammzellsupport erhalten. Die Konditionierung mit Fludarabin und Treosulfan war bei allen Patienten von einer Neutropeniephase gefolgt und führte bei 33 der 34 Patienten (97%) zu einer Thrombozytopenie (<20/nL). Der mediane Neutrophilen- bzw. Thrombozytennadir wurde an Tag +7 bzw. Tag +8 erreicht. Alle Patienten zeigten ein zeitgerechtes und andauerndes Neutrophilenengraftment (median 13,5 Tage nach Transplantation) und alle bis auf einen Patienten ein Thrombozytenengraftment (Median Tag +13). Einer der Patienten (3%) zeigte ein primäres Versagen des Thrombozytenengraftments, während bei keinem der Patienten ein sekundäres Transplantatversagen beobachtet wurde. Einen kompletten hämatopoietischen Spender-Empfänger-Chimärismus, definiert auf der Basis von mindestens 95% hämatopoietischen Spenderzellen, erreichten an Tag +28, Tag +100 sowie einem Jahr nach Transplantation 94%, 83% und 100% der Patienten. Im

Gegensatz hierzu zeigten andere intensitätsreduzierte oder nicht-myeloablative Fludarabin-haltige Konditionierungsprotokolle (z.B. in der Kombination mit niedrigdosierter Ganzkörperbestrahlung oder Busulfan) eine höhere Rate von Patienten mit verzögertem Engraftment, sekundärem Transplantatversagen und inkomplettem (gemischtem) hämatopoietischem Spender-Empfänger-Chimärismus (Michallet *et al*, 2001; Banna *et al*, 2004; Baron *et al*, 2006). Unsere Beobachtungen lassen die Annahme zu, dass Fludarabin und Treosulfan eine adäquate Stammzelltoxizität und Immunsuppressivität aufweisen. Hierin bestätigen unsere Ergebnisse bereits publizierte präklinische Untersuchung, die diese Eigenschaften Treosulfan zuschrieben (Sjöo *et al*, 2006).

Eine akute Grad II-IV GvHD wurde bei 33% der Patienten beobachtet, 39% wiesen eine chronische GvHD auf. Schwere nicht-hämatologische Toxizitäten waren insgesamt selten und bestanden meist aus Fieber in der Neutropeniephase („Common Toxicity Criteria, CTC“ Grad 3 in 46%, CTC Grad 4 in 3%) und Infektionen (CTC Grad 3 36%, CTC Grad 4 12%). Ein wesentlicher Vorteil einer Konditionierung mit Fludarabin und Treosulfan gegenüber einer Konditionierung auf der Basis von Busulfan (z.B. in der Kombination mit Cyclophosphamid oder Fludarabin) ist sicherlich die niedrigere Häufigkeit von schwerer Lebertoxizität. In vorliegender Analyse wurde bei 24% der Patienten eine CTC Grad 3 Lebertoxizität verzeichnet, während eine Grad 4 Lebertoxizität bei keinem der Patienten auftrat. Im Gegensatz hierzu sind Konditionierungsprotokolle, die Busulfan beinhalten - auch mit reduzierter Dosis in RIC-Protokollen - mit einer wesentlich höheren Rate von schweren Lebertoxizitäten vergesellschaftet. Insbesondere das sinusoidale Obstruktionssyndrom (SOS oder früher auch als „veno-occlusive disease, VOD“ bezeichnet) ist nach einer Konditionierung, die Busulfan beinhaltet eine häufige Komplikation, wobei ein SOS nur bei einem Patienten in unserer Untersuchung

auftrat (Schetelig *et al*, 2002).

Das durch die allogene Stammzelltransplantation maximal erreichte Therapieansprechen gemäß den Kriterien der Europäischen Gesellschaft für Knochenmark- und Stammzelltransplantation („European Blood & Marrow Transplantation, EBMT Group“) war eine komplette Remission bei 44%, eine partielle Remission bei 47%, ein minimales Ansprechen bei 3% und eine stabile Erkrankung bei 6% der Patienten. Mit einer medianen Nachbeobachtungszeit von 708 Tagen nach Transplantation betrug das mediane progressionsfreie Überleben 180 Tage. Die transplantations-assoziierte Mortalität, definiert auf der Grundlage aller nicht Rezidiv-bedingter Todesfälle, wurde mit 10% an Tag +100 und 25% nach einem Jahr nach Transplantation ermittelt. Das mithilfe der Kaplan-Meier-Methode geschätzte Gesamtüberleben betrug 72% nach einem und 58% nach 2 Jahren nach allogener Stammzelltransplantation, wobei das mediane Gesamtüberleben zum letzten Beobachtungszeitpunkt noch nicht erreicht wurde.

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass bei vielfach vorbehandelten Patienten mit Multiplem Myelom eine allogene Stammzelltransplantation nach Konditionierung mit Fludarabin und Treosulfan durchführbar ist und meist zu einem stabilen Engraftment und komplettem hämatopoietischem Spender-Empfänger-Chimärismus führt. Aufgrund des recht vielversprechenden Gesamtüberlebens von 58% nach 2 Jahren sollte dieses Therapieverfahren in klinischen Studien weiter evaluiert werden.

Publikation V

Schmidt-Hieber M, Blau IW, Trensche R, Andreesen R, Stuhler G, Einsele H, Kanz L, Keilholz U, Marinets O, Beelen DW, Fauser AA, Volin L, Ruutu T, Uharek L, Fietz T, Knauf W, Hopfenmüller W, Thiel E, Freund M, Casper J. Reduced-toxicity

conditioning with fludarabine and treosulfan prior to allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39: 389-396.

Der Schwerpunkt der in *Publikation VI* dargelegten Untersuchungsergebnisse war die Analyse der Kinetik des hämatopoietischen Spender-Empfänger-Chimärismus nach Konditionierung mit Fludarabin und Treosulfan vor allogener Stammzelltransplantation. Die Bestimmung des Chimärismus-Status erfolgte hierbei durch die Unterscheidung von Spender- und Empfänger-Allelen von kurzen, sich wiederholenden DNA-Sequenzen (sogenannten „short tandem repeats, STR“) mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction, PCR“). Insgesamt wurden 27 Patienten in die Analyse einbezogen, hiervon 9 (33%) mit Multiplem Myelom, 8 (30%) mit akuter myeloischer Leukämie und 10 (37%) mit anderen hämatologischen Erkrankungen (z.B. CLL). Wie bereits in vorangestellter Arbeit, war auch in diesem, bezüglich der zugrundeliegenden malignen Erkrankung heterogenerem Patientenkollektiv, die Rate von primärem Neutrophilen- und Thrombozytenengraftment mit 100% bzw. 97% ausgesprochen hoch.

An Tag +28, Tag +56 sowie zum letzten Beobachtungszeitpunkt wiesen 46%, 57% und 72% der Patienten einen kompletten hämatopoietischen Spender-Empfänger-Chimärismus, definiert auf der Basis von 100% Spenderzellen, auf. Die meisten Patienten wiesen entweder einen andauernden kompletten Chimärismus (6 Patienten, 26%), einen kompletten nach anfänglich inkomplettem Chimärismus (8 Patienten, 35%) oder einen andauernden gemischten Chimärismus auf (4 Patienten, 17%). Andere Verlaufsformen wie z.B. ein transienter inkompletter Chimärismus waren demgegenüber seltener.

Das mediane Gesamtüberleben betrug 875 Tage nach Transplantation und das mit der Kaplan-Meier-Methode geschätzte Überleben ein bzw. 2 Jahre nach

allogener Stammzelltransplantation 74% bzw. 55%. In einigen publizierten Analysen zeigte sich, dass ein inkompletter hämatopoietischer Spender-Empfänger-Chimärismus nach allogener Stammzelltransplantation mit einem erhöhten Rezidivrisiko der Grunderkrankung assoziiert ist, während andere Untersuchungen ein vergleichbares Rezidivrisiko für beide Gruppen oder sogar einen Prognosevorteil für Patienten mit gemischtem hämatopoietischem Chimärismus beschrieben haben (Huss *et al*, 1996; Baron *et al*, 2006). In vorliegender Untersuchung fanden wir keinen signifikanten Unterschied bezüglich dem Auftreten von Rezidiven der Grunderkrankung oder dem Gesamtüberleben in Abhängigkeit des Chimärismus-Status an Tag +28.

Die in dieser Publikation dargelegten Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen der vorangestellten Untersuchung, dass eine Konditionierung mit Fludarabin und Treosulfan vor allogener Stammzelltransplantation bei nahezu allen Patienten zu einem frühen und stabilen Engraftment führt. Prinzipiell können verschiedene Verlaufsformen des hämatopoietischen Spender-Empfänger-Chimärismus nach dieser Konditionierung beobachtet werden, wobei ein andauernder kompletter oder kompletter nach initial inkomplettem Chimärismus die häufigsten sind. An Tag +28 weist ungefähr die Hälfte der Patienten noch hämatopoietische Empfängerzellen auf, ohne dass dies einen negativen prognostischen Einfluss hätte.

Publikation VI

Blau IW, Schmidt-Hieber M, Leschinger N, Göldner H, Knauf W, Hopfenmüller W, Thiel E, Blau O. Engraftment kinetics and hematopoietic chimerism after reduced-intensity conditioning with fludarabine and treosulfan before allogeneic stem cell transplantation. *Ann Hematol* 2007; 86: 583-589.

3.4. Virale Infektionen als wesentliche Komplikation nach allogener Stammzelltransplantation (Publikationen VII-IX)

Trotz antiviraler Prophylaxe (z.B. mit Aciclovir) und präemptiver Therapie von Cytomegalievirus (CMV)-Infektionen (z.B. mit Ganciclovir) als Standardverfahren nach allogener Stammzelltransplantation tragen virale Infektionen und Erkrankungen bei diesen Patienten weiter wesentlich zu Morbidität und Mortalität bei (Schmidt-Hieber *et al*, 2009). Wir haben in den 3 folgenden Arbeiten bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation Charakteristika viraler Erkrankungen des Zentralen Nervensystems (ZNS) (*Publikation VII*), Immunrekonstitution und Kinetik von CMV-Infektionen (*Publikation VIII*) sowie den prophylaktischen Einsatz von intravenösen Immunglobulinen bei Patienten mit hohem CMV-Risiko (*Publikation IX*) untersucht. Da bei diesen Arbeiten nur ein Teil der Patienten ein Multiples Myelom als Grunderkrankung hatte, sollten diese Beobachtungen an einem homogeneren Kollektiv von Patienten mit Plasmazell-Dyskrasien erneut evaluiert werden.

Virale ZNS-Erkrankungen nach allogener Stammzelltransplantation (Publikation VII)

In vorliegender Arbeit haben wir 2628 Patienten, bei denen zwischen 1999 und 2009 an insgesamt 11 deutschen Einrichtungen eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt wurde, mit dem Ziel analysiert Charakteristika viraler ZNS-Erkrankungen und Risikofaktoren für deren Auftreten zu bestimmen. Um eine Unterschätzung der Inzidenz weitestgehend zu minimieren, wurden Patienten mit viraler ZNS-Erkrankung (n=32, 1,2%) hierbei immer (wenn möglich) auf Grundlage elektronischer Datenbanken des an die jeweilige Transplantationseinheit angeschlossenen virologischen Institutes identifiziert. Die Diagnose einer viralen ZNS-Erkrankung (das heißt in der Regel Enzephalitis) erforderte eine positive Virus-PCR entweder aus dem Liquor oder ZNS-Biopsiematerial und nicht anderweitig

erklärbare neurologische Symptome. Wichtige klinische Daten von Patienten ohne virale ZNS-Erkrankung, die als Kontrollgruppe dienten, wurden freundlicherweise durch das Deutsche Register für Stammzelltransplantationen (DRST, Ulm) zur Verfügung gestellt. Hierbei wurde die Kontrollgruppe so ausgewählt, dass sie zentrenspezifisch mit der Patientengruppe, die auf das Vorliegen einer viralen ZNS-Erkrankung untersucht wurde, übereinstimmte. Humanes Herpesvirus-6 (HHV-6) war das Virus, das am häufigsten eine virale ZNS-Erkrankung verursachte (28%), gefolgt von: Epstein-Barr-Virus (EBV, 19%), Herpes-simplex-Virus (HSV, 13%), JC-Virus (9%), Varizella-Zoster-Virus (VZV, 6%), CMV (6%) und Adenovirus (3%). Bei 16% der Patienten wurde mehr als ein Virus im Liquor identifiziert (z.B. CMV, HHV-6 und JC-Virus). Patienten, die eine virale ZNS-Erkrankung nach allogener Stammzelltransplantation entwickelten, hatten im Rahmen der Transplantation signifikant häufiger eine T-Zell-depletierende Therapie mit dem Anti-CD52-Antikörper Alemtuzumab (4/31 Patienten, 13% gegenüber 10/1533 Patienten der Kontrollgruppe, 0,7%; $p < 0,001$) oder OKT-3 (5/31 Patienten, 16% gegenüber 10/1533 Patienten der Kontrollgruppe, 0,7%; $p < 0,001$) erhalten. Demgegenüber hatten andere Parameter, wie z.B. Alter, Geschlecht, Spendertyp (HLA-identer Familienspender gegenüber anderen Spendertypen), Konditionierungsprotokoll, Stammzellquelle (Knochenmark oder peripheres Blut), Typ der GvHD-Prophylaxe oder Einsatz einer T-Zell-unterdrückenden Therapie mit Anti-Thymozyten- oder Anti-Lymphozyten-Globulin (ATG bzw. ALG) keinen signifikanten Einfluss auf die Inzidenz viraler ZNS-Erkrankungen nach allogener Stammzelltransplantation.

Virale ZNS-Erkrankungen traten im Median 106 Tage nach allogener Stammzelltransplantation auf und wurden am frühesten bei Patienten mit HHV-6-Erkrankungen (Median Tag +62) und am spätesten bei Patienten mit JC-Virus-assoziiertes Progressiver Multifokaler Leukenzephalopathie (PML) beobachtet. Die

klinischen Symptome waren häufig unspezifisch, wobei eine Änderungen des Bewusstseinsstatus das häufigstes Symptom war (81%), gefolgt von Fieber (59%), Krampfanfällen (34%), psychiatrischen Symptomen wie z.B. Psychosen (28%), Paresen (25%) und Hypo- oder Dysästhesien (19%). Schnittbildverfahren wie die Magnetresonanztomographie (MRT) oder die Computertomographie (CT) zeigten zum Diagnosezeitpunkt bei 53% der Patienten Auffälligkeiten, die am ehesten einer viralen ZNS-Erkrankung zuzuschreiben waren und bei 10% Abnormalitäten vermutlich anderer Genese; 37% der Patienten wiesen einen unauffälligen MRT- oder CT-Befund auf. Die etwas überraschend geringe Häufigkeit von virustypischen Veränderungen in der ZNS-Bildgebung ist möglicherweise dadurch erklärbar, dass nur bei einem Teil der Patienten ein MRT des ZNS durchgeführt wurde. Erst kürzlich wurde beschrieben, dass Patienten mit HHV-6-Enzephalitis häufig einen unauffälligen Befund in der kraniellen CT zeigen, die MRT aber virustypische Veränderungen meist erkennen lässt (Noguchi *et al*, 2010). Interessanterweise wiesen 52% der Patienten eine normale Zellzahl und 54% eine normale Proteinkonzentration im Liquor auf. Für bakterielle ZNS-Infektionen konnten andere Arbeitsgruppen bereits zeigen, dass Patienten mit malignen Erkrankungen häufig deutlich niedrigere Liquorzellzahlen aufweisen als Patienten ohne maligne Grunderkrankung (Van de Beek *et al*, 2004; Safdieh *et al*, 2008). Unsere Ergebnisse verdeutlichen, dass bei Patienten mit Verdacht auf eine virale ZNS-Erkrankung nach allogener Stammzelltransplantation auch dann eine Virus-PCR-Analyse des Liquors durchgeführt werden sollte, wenn die Liquorzellzahl normal ist. Die PCR-Technik weist für die meisten Virustypen eine ausgesprochen hohe Sensitivität und Spezifität auf (Schmidt-Hieber *et al*, 2009).

Eine Therapie mit antiviral wirksamen Substanzen (z.B. Aciclovir, Ganciclovir oder Foscarnet) oder dem Anti-CD20-Antikörper Rituximab (bei EBV-Erkrankungen)

fürte bei 63% der Patienten zu einem signifikanten und andauernden Therapieansprechen. Das mithilfe der Kaplan-Meier-Methode ermittelte mediane Gesamtüberleben nach Beginn der viralen ZNS-Erkrankungen betrug in vorliegender Analyse nur 94 Tage, und die Gesamtmortalität war bei Patienten, die eine virale ZNS-Erkrankung nach allogener Stammzelltransplantation entwickelten gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht (66% gegenüber 42%; $p=0,011$). Hierbei zeigten sich allerdings erwähnenswerte virustypische Besonderheiten: Bei keinem der Patienten mit HSV-Enzephalitis, jedoch bei 80% der Patienten mit Nachweis von mehr als einem Virus im Liquor führte die virale ZNS-Erkrankung zum Tod. Eine weitere interessante Beobachtung vorliegender Arbeit war, dass bei einem Patienten mit JC-Virus-assoziiertes PML durch eine antivirale Therapie mit Cidofovir eine Symptombesserung mit mehr als 3 Jahre andauerndem Überleben erzielt werden konnte. Die PML ist üblicherweise eine rasch progrediente virale ZNS-Erkrankung, die meist innerhalb weniger Monate nach Diagnosestellung zum Tod führt (Kharfan-Dabaja *et al*, 2007).

Die in dieser Publikation zusammengefassten Untersuchungsergebnisse zeigen, dass virale ZNS-Erkrankungen mit einer Inzidenz von etwa 1,2% eine seltene Komplikation nach allogener Stammzelltransplantation sind. Die Prognose dieser Patienten ist insgesamt ungünstig, jedoch sollte stets eine zeitnahe und adäquate Diagnostik und gegebenenfalls Therapie angestrebt werden, da in einzelnen Subgruppen ein günstiger Verlauf erzielt werden kann.

Publikation VII

Schmidt-Hieber M, Schwender J, Heinz WJ, Zabelina T, Kühl JS, Mousset S, Schüttrumpf S, Junghanss C, Silling G, Basara N, Neuburger S, Thiel E, Blau IW. Viral encephalitis after allogeneic stem cell transplantation: a rare complication with

distinct characteristics of different causative agents. *Haematologica* 2011; 96: 142-149.

Immunrekonstitution und CMV-Infektionen nach allogener Stammzelltransplantation (Publikation VIII)

Das Risiko für CMV-Erkrankungen (das heißt Infizierung von Organsystemen wie z.B. der Lunge oder dem Darm) konnte in den letzten Jahren wesentlich durch den Einsatz von CMV-negativen Blutprodukten und der präemptiven Therapie von CMV-Infektionen (das heißt CMV-Antigenämien ohne Organbefall) deutlich reduziert werden. Die Implementierung dieser Maßnahmen in klinische Routinealgorithmen nach allogener Stammzelltransplantation führte dazu, dass die Inzidenz von CMV-Erkrankungen, die mit einer hohen Letalität einhergehen, von ca. 20-30% in den frühen 90er-Jahren auf weniger als 5% reduziert werden konnte (Boeckh *et al*, 2003). Trotz dieser Fortschritte lassen neuere Untersuchungen eine relative Zunahme von späten CMV-Erkrankungen vermuten (Boeckh *et al*, 2003; Bjorklund *et al*, 2007; Ozdemir *et al*, 2007). Eigene, bisher nicht publizierte, Beobachtungen lassen zusätzlich annehmen, dass die CMV-Seropositivität des Empfängers, als einem wesentlichen Risikofaktor für CMV-Infektionen und -Erkrankungen, weiter einen prognostisch ungünstigen Einfluss auf das Gesamtüberleben nach allogener Stammzelltransplantation hat.

In vorliegender Arbeit haben wir bei 89 Patienten die Kinetik von CMV-Infektionen und der Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation untersucht. Die meisten Patienten (67%) erhielten eine intensitätsreduzierte Konditionierung auf Fludarabin-Basis, 19% eine konventionelle Konditionierung mit Cyclophosphamid in Kombination mit Busulfan oder Ganzkörperbestrahlung und 14% andere Konditionierungsprotokolle. Bei 42% der Patienten wurde mindestens

eine CMV-Infektions-Episode diagnostiziert, wobei bestätigte oder wahrscheinliche CMV-Erkrankungen mit 6% erwartungsgemäß selten waren. Die kumulative Inzidenz von CMV-Infektionen unter Berücksichtigung von Todesfällen als konkurrierendem Risikofaktor wurde mit der Fine-Gray-Methode berechnet und betrug 40% ein Jahr nach allogener Stammzelltransplantation. Der Einsatz einer *in vivo* T-Zell-Depletion mit dem Anti-CD52-Antikörper Alemtuzumab sowie die Konstellation des CMV-Serostatus von Spender und Empfänger waren signifikante Risikofaktoren für das Auftreten einer CMV-Infektion in einer univariaten Coxregressionsanalyse. Hierbei war das Risiko für CMV-Infektionen bei CMV-seropositiven Empfängern mit CMV-seronegativen Spendern am ausgeprägtesten erhöht (Hazard-Rate 7,5 gegenüber CMV-seronegativen Empfängern mit CMV-seronegativen Spendern), nachgefolgt von CMV-seronegativen Empfängern mit CMV-seropositiven Spendern (Hazard-Rate 5,1) und CMV-seropositiven Empfänger mit CMV-seropositiven Spendern (Hazard-Rate 4,3). Patienten nach *in vivo* T-Zell-Depletion mit Alemtuzumab wiesen gegenüber Patienten, die eine solche Therapie nicht erhielten, ebenfalls ein signifikant erhöhtes CMV-Infektionsrisiko auf (Hazard-Rate 4,8). Demgegenüber erhöhte eine T-Zell-Depletion mit ATG das CMV-Infektionsrisiko nur geringgradig (Hazard-Rate 1,4). Andere Parameter, wie z.B. das Geschlecht des Empfängers, Alter, Spendertyp (HLA-identer Familienspender gegenüber anderen Spendertypen), Konditionierung oder der Einsatz von Mycophenolat Mofetil (MMF) im Rahmen der GvHD-Prophylaxe hatten keinen signifikanten Einfluss auf das CMV-Infektionsrisiko. In einer multivariaten Coxregressionsanalyse hatte der Einsatz einer *in vivo* T-Zell-Depletion mit Alemtuzumab den stärksten Einfluss auf das CMV-Infektionsrisiko (Hazard-Rate 4,8), gefolgt von der CMV-Seropositivität des Empfängers (Hazard-Rate 2,7).

Des Weiteren untersuchten wir in vorliegender Publikation die Rekonstitution

von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen (einschließlich CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen), NK-Zellen und der Serum-IgG-Konzentration sowie deren Abhängigkeit von Transplantationsparametern (z.B. *in vivo* T-Zell-Depletion) und Einfluss auf das CMV-Infektionsrisiko. Die mediane Anzahl zirkulierender CD4⁺ T-Zellen stieg von 104/ μ L an Tag +30 im Verlauf nach Transplantation langsam an, lag jedoch an Tag +360 noch unterhalb dem Normalwert. Demgegenüber zeigte die mediane CD8⁺ T-Zellanzahl einen rascheren Anstieg und befand sich bereits ab Tag +120 im Normalbereich. Die mediane NK-Zellanzahl war an Tag +30 mit 203/ μ L bereits leicht über dem unteren Normalwert, fiel dann vorübergehend erneut ab und befand sich ab Tag +210 wieder im Normalbereich. Die mediane Serum-IgG-Konzentration war zu jedem untersuchten Zeitpunkt im Normbereich. Diese Rekonstitutionskinetiken verschiedener Immunparameter bestätigen weitestgehend bereits publizierte Beobachtungen nach allogener Transplantation peripherer Blutstammzellen (Storek *et al*, 2001). Interessanterweise beobachteten wir jedoch weiterhin, dass eine *in vivo* T-Zell-Depletion mit Alemtuzumab bzw. ATG nicht nur, wie oben dargelegt, einen differentiellen Einfluss auf das CMV-Infektionsrisiko hatte, sondern auch auf die Rekonstitutionskinetiken von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen: Eine T-Zell-Deletion mit ATG verzögerte signifikant die CD4⁺, aber nicht die CD8⁺ T-Zellrekonstitution, während eine T-Zell-Depletion mit Alemtuzumab sowohl die CD4⁺ als auch die CD8⁺ T-Zellrekonstitution protrahierte. In Zusammenschau lassen diese Ergebnisse vermuten, dass insbesondere eine verzögerte Rekonstitution von CD8⁺ T-Zellen zu einem erhöhten CMV-Infektionsrisiko führt. Andere Faktoren, wie z.B. Alter, Spendertyp oder der Einsatz von MMF im Rahmen der GvHD-Prophylaxe hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Rekonstitutionskinetiken der untersuchten Immunparameter.

Wir untersuchten weiterhin, ob die Anzahl von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, NK-

Zellen oder die Serum-IgG-Konzentration an Tag +30 oder Tag +60 mit einem erhöhten Risiko für CMV-Infektionen einherging. Hierzu erfolgte eine Dichotomisierung der Patientengruppe anhand der Medianwerte genannter Immunparameter. Die Assoziation mit dem CMV-Infektionsrisiko wurde sowohl deskriptiv mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests als auch anhand eines statistischen Modells mit Berücksichtigung des jeweiligen Immunparameters als zeitabhängiger Kovariable ermittelt. Beide statistischen Verfahren ergaben, dass ausschließlich eine erniedrigte NK-Zellanzahl an Tag +60 mit einem erhöhten CMV-Infektionsrisiko assoziiert war. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass neben T- auch NK-Zellen an der (möglicherweise insbesondere späten) CMV-Abwehr nach allogener Stammzelltransplantation beteiligt sind. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese konnten andere Arbeitsgruppen zeigen, dass NK-Zellen die CMV-Replikation inhibieren können und dass Patienten mit einem schweren Immundefizienzsyndrom („Severe Combined Immunodeficiency, SCID“) auch bei Vorliegen eines TB^+NK^+ -Phänotyps, das heißt ohne funktionierende T-Zell-Abwehr, CMV kontrollieren können (Iversen *et al*, 2005; Kuijpers *et al*, 2008). Bei vorliegender Analyse waren jedoch weder die $CD4^+$ noch $CD8^+$ T-Zellanzahl an Tag +30 oder Tag +60 signifikant mit dem CMV-Infektionsrisiko assoziiert, obwohl, wie oben ausführlich dargelegt, unsere Daten die Vermutung zulassen, dass eine verzögerte $CD8^+$ T-Zellrekonstitution nach Alemtuzumab-Applikation für das erhöhte CMV-Infektionsrisiko dieser Patientengruppe verantwortlich sein könnte. Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang jedoch die Tatsache, dass Alemtuzumab nicht nur mit einem erhöhten CMV-Infektionsrisiko einherging, sondern auch mit einem früheren Beginn von CMV-Infektionen nach Transplantation im Vergleich zu Patienten, die diese Therapie nicht erhielten. Somit ist es prinzipiell vorstellbar, dass vor allem die sehr frühe (das heißt vor Tag +30) $CD8^+$ T-Zell-Rekonstitution für die CMV-Abwehr wichtig

ist. Diese Hypothese sollte an einem größeren Patientenkollektiv überprüft werden.

Bei einigen Patienten wurden zusätzlich zirkulierende CMV-spezifische (pp65-Antigen) CD8⁺ T-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten mit einem antigenspezifischen, durchflusszytometrischen Versuchsansatz gemessen. An Tag +30 konnten CMV-spezifische CD8⁺ T-Zellen bei 57% der Patienten mit einem CMV-seropositivem Spender erfasst werden, jedoch bei keinem der Patienten mit CMV-seronegativem Spender (p=0,01). Diese Untersuchungsergebnisse könnten erklären, dass in unserer und anderen publizierten Analysen das CMV-Infektionsrisiko bei CMV-seropositiven Patienten niedriger ist, wenn der Spender ebenfalls CMV-seropositiv und nicht -seronegativ ist.

Die in dieser Publikation zusammengefassten Beobachtungen verdeutlichen, dass ATG und Alemtuzumab im Rahmen der *in vivo* T-Zell-Depletion sowohl das CMV-Infektionsrisiko als auch die Kinetik der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellrekonstitution differentiell beeinflussen. Da Patienten nach *in vivo* T-Zell-Depletion mit Alemtuzumab ein außergewöhnlich hohes CMV-Infektionsrisiko aufweisen, sollte insbesondere diese Patientengruppe bezüglich CMV engmaschig nach allogener Stammzelltransplantation überwacht werden.

Publikation VIII

Schmidt-Hieber M, Schwarck S, Stroux A, Ganepola S, Reinke P, Thiel E, Uharek L, Blau IW. Immune reconstitution and cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation: the important impact of *in vivo* T cell depletion. Int J Hematol 2010; 91: 877-885.

Prophylaktische Immunglobuline bei Patienten mit hohem CMV-Risiko nach allogener Stammzelltransplantation (Publikation IX)

Eine 2001 veröffentlichte Erhebung der EBMT-Gruppe beschrieb, dass 55% von 45 europäischen Transplantationszentren in der klinischen Routine prophylaktisch intravenöse Immunglobuline nach allogener Knochenmark- oder Stammzelltransplantation applizieren (Akhan *et al*, 2001). Diese Vorgehensweise beruht am ehesten darauf, dass einige, jedoch meist ältere Arbeiten, zeigten, dass prophylaktische intravenöse Immunglobuline das Infektions- und das GvHD-Risiko nach allogener Stammzelltransplantation reduzieren und ein vergleichsweise günstiges Toxizitätsprofil aufweisen (Sullivan *et al*, 1990). Auf dieser Grundlage wurden intravenöse Immunglobuline zur Prophylaxe von Infektionen und GvHD innerhalb der ersten 90 Tage nach allogener Stammzelltransplantation zugelassen. Jedoch haben sich viele Standards nach allogener Stammzelltransplantation in den letzten Jahren wesentlich geändert, so dass es nahelag die Wertigkeit einer prophylaktischen Immunglobulingabe bei diesen Patienten erneut zu hinterfragen. Entscheidend ist in diesem Zusammenhang, dass das Risiko von CMV-Erkrankung, einer im Vordergrund stehenden, häufig letalen, Komplikation in den Anfängen der allogenen Stammzelltransplantation, unter anderem durch die präemptive Therapie von CMV-Infektionen deutlich reduziert werden konnte (Boeckh *et al*, 2003). Intravenöse Immunglobuline sind außerdem mit außergewöhnlich hohen Kosten behaftet und können als schwere Nebenwirkung ein SOS und eine verzögerte Immunrekonstitution induzieren (Sullivan *et al*, 1996; Cordonnier *et al*, 2003). Eine 2003 publizierte randomisierte, doppelblinde, plazebokontrollierte Studie zeigte eine vergleichbare Inzidenz von Infektionen, GvHD und transplantations-assoziiierter Mortalität, jedoch ein erhöhtes SOS-Risiko bei Patienten, die nach allogener Stammzelltransplantation prophylaktisch intravenöse Immunglobuline erhielten im

Vergleich zu Patienten, denen Plazebo verabreicht wurde (Cordonnier *et al*, 2003).

Wir haben in vorliegender Publikation untersucht, ob prophylaktische intravenöse Immunglobuline in hoher Dosierung, selektiv in Phasen ausgeprägter Immunsuppression appliziert, das CMV-Infektions- und -Erkrankungsrisiko im Vergleich zu einer sequentiell evaluierten Kontrollkohorte senken können. Weitere wichtige Untersuchungsziele waren die Erfassung von akuter und chronischer GvHD, transplantations-assoziiertes Mortalität, Gesamtüberleben und Toxizität. Patienten der Interventionsgruppe erhielten intravenöse Immunglobuline (500 mg/kg Körpergewicht alle 2 Wochen), wenn mindestens eines der folgenden, monatlich evaluierten, Kriterien erfüllt war: 1. Serum-IgG-Konzentration <4 g/L. 2. NK-Zellanzahl <100/μL. 3. CD4⁺ T-Zellanzahl <100/μL. 4. Akute (Grad II-IV) oder chronische (extensive) GvHD. Der Algorithmus wurde an Tag +30 nach allogener Stammzelltransplantation begonnen und spätestens 1 Jahr nach Transplantation beendet. Insgesamt wurden 44 Patienten in die Interventionsgruppe und 35 Patienten in die Kontrollgruppe aufgenommen.

Die kumulative Inzidenz von CMV-Infektionen unterschied sich nicht signifikant zwischen Interventions- und Kontrollgruppe (43% und 31%). Weiterhin waren die mit der Kaplan-Meier-Methode bestimmte „Zeit bis zur ersten CMV-Infektion“ (44% und 36% nach einem Jahr) sowie die durchschnittliche kumulative Inzidenz von CMV-Infektionsepisoden (1,7 und 1,5) in beiden Kohorten vergleichbar. Nachgewiesene oder wahrscheinliche CMV-Erkrankungen traten in beiden Gruppen mit 5% und 9% selten auf. Es bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich der kumulativen Inzidenz von akuter oder chronischer GvHD, transplantations-assoziiertes Mortalität und Gesamtüberleben. Immunglobulin-assoziierte Nebenwirkungen, wie z.B. Exanthem, Fieber oder Schüttelfrost traten bei 4 Patienten (9%) der Interventionsgruppe auf (CTC Grad 1-2) und führten zu einer vorzeitigen Beendigung

des Algorithmus. Ein Patient (2%) der Interventionsgruppe entwickelte ein SOS (CTC Grad 0-1), jedoch trat dieses vor der ersten Immunglobulingabe auf und war nach Therapie mit Defibrotide rasch rückläufig.

Die vorliegende Analyse zeigt, dass Immunglobuline, auch wenn sie in hoher Dosierung selektiv in Phasen ausgeprägter Immunsuppression oder GvHD verabreicht werden, das CMV-Infektionsrisiko und die transplantations-assoziierte Mortalität bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation nicht signifikant senken. Diese Beobachtung stützt die in den letzten Jahren zunehmend verbreitete Annahme, dass intravenöse Immunglobuline nicht prophylaktisch in der klinischen Routine nach allogener Stammzelltransplantation appliziert werden sollten.

Publikation IX

Schmidt-Hieber M, Schwarck S, Stroux A, Thiel E, Ganepola S, Uharek L, Blau IW. Prophylactic i.v. Igs in patients with a high risk for CMV after allo-SCT. Bone Marrow Transplant 2009; 44: 185-192.

4. Diskussion und Zusammenfassung

Die zur Pathogenese von Plasmazell-Dyskrasien dargestellten Untersuchungsergebnisse (bisher unveröffentlichte Daten sowie Publikationen I und II) beschreiben zytogenetische Veränderungen in hochaufgereinigten aberranten Plasmazellen sowie Distribution und Homing verschiedener Zell-Kompartimente im Knochenmark und peripheren Blut.

Publizierte Untersuchungen zum sequentiellen Auftreten verschiedener chromosomaler Aberration im Krankheitsverlauf von Plasmazell-Dyskrasien sind vorwiegend an unselektionierten Knochenmark-Proben oder CD138⁺ Mikrobead-gesorteten Plasmazellen durchgeführt worden (Fonseca *et al*, 2004). Trotz der Tatsache, dass an CD138⁺ Mikrobead-gesorteten Plasmazellen im Vergleich zu unselektioniertem Knochenmark signifikant mehr chromosomale Aberration erfasst werden können, besitzt auch diese Technik als wesentliche Limitation die unzureichende Unterscheidung von klonalen und nicht-klonalen Plasmazellen und erlaubt deshalb keine verlässlichen Rückschlüsse bezüglich sequentiellm Auftreten verschiedener zytogenetischer Veränderungen bei Plasmazell-Dyskrasien.

Unsere Interphase-FISH-Untersuchungen an aberranten Plasmazellen, die mithilfe eines Zellsorters hinsichtlich ihres Immunphänotyps mit hoher Reinheit (Median $\geq 98\%$) aufgetrennt wurden, zeigen, dass bei einem wesentlichen Anteil der Patienten mit Multiplem Myelom oder MGUS sowohl aberrante Plasmazellen mit *IGH*-Translokationen oder del(13q14) als auch solche ohne diese chromosomalen Veränderungen nachweisbar sind. Diese Beobachtungen lassen annehmen, dass *IGH*-Translokationen und die del(13q14) häufig im Tumorstammklon noch abwesend sind. Insbesondere *IGH*-Translokationen galten bisher als initiale, krankheitsdeterminierende genetische Veränderungen, die in nahezu allen Plasmazellsubklonen vorhanden sind (Chng *et al*, 2007). Kürzlich publizierte

Beobachtung lassen vermuten, dass sich bei vielen - oder möglicherweise nahezu allen - gesunden Individuen zirkulierende, monoklonale, CLL-ähnliche B-Zellen finden, wobei chromosomale Veränderungen, wie z.B. die Trisomie 12 oder del(13q), typischerweise erst bei höheren prozentualen Anteilen dieser Zellen zu finden sind (Nieto *et al*, 2009; Almeida *et al*, 2011). Chronische Immunstimulation könnte dazu führen, dass es bei einigen Individuen zu einem Übergang in eine manifeste CLL kommt (Almeida *et al*, 2011). In Analogie hierzu lassen unsere Untersuchungen bei Plasmazell-Dyskrasien vermuten, dass möglicherweise sowohl Multiples Myelom als auch MGUS aus klonalen Plasmazellen ohne genetische Veränderungen entstehen können, wobei *IGH*-Translokationen und/oder eine del(13q14) erst im Krankheitsverlauf akquiriert werden. Vorstellbar ist, dass klonale Plasmazellen ohne genetische Veränderungen in niedriger Frequenz bei einem signifikanten Anteil gesunder Individuen zu finden sind und bisher undefinierte Faktoren den Übergang in ein Multiples Myelom oder MGUS triggern.

Neben zytogenetischen Veränderungen spielt auch das Expressionsmuster von Molekülen auf der Oberfläche klonaler Plasmazellen, wie z.B. CD117 (c-Kit) oder CXCR4, in der Pathogenese von Plasmazell-Dyskrasien eine entscheidende Rolle und beeinflusst sowohl die Distribution und Ausreifung als auch das Homing verschiedener knochenmarkständiger und zirkulierender Zell-Kompartimente. Interessanterweise ist die Expression von CD117 durch klonale Plasmazellen mit einem günstigen Krankheitsverlauf bei Patienten mit Multiplem Myelom assoziiert, obwohl bei anderen hämatologischen Erkrankungen, wie z.B. GIST oder der Mastozytose, c-Kit in die maligne Transformation involviert ist (Orfao *et al*, 2007; Mateo *et al*, 2008; Baumgartner *et al*, 2009). In vorliegender Untersuchung zeigten Patienten mit Multiplem Myelom und CD117⁺ gegenüber CD117⁻ klonalen Plasmazellen eine deutlich alterierte Distribution lymphatischer und myeloischer Zell-

Kompartimente im Knochenmark sowie eine signifikant erniedrigte Neutrophilenanzahl im peripheren Blut. Die hierbei beobachtete Akkumulation CD117⁺ myeloischer Progenitorzellen im Knochenmark bei verminderter Freisetzung reifer neutrophiler Granulozyten in die Blutzirkulation könnte sowohl auf einen erhöhten Verbrauch des Stammzellfaktors (CD117-Ligand) als auch auf ein verändertes Homing verschiedener Zell-Kompartimente bei Patienten mit Multiplem Myelom und CD117⁺ klonalen Plasmazellen hindeuten. Ebenso wie bei Patienten mit Multiplem Myelom war auch bei Patienten mit MGUS die Expression von CD117 durch klonale Plasmazellen mit signifikant erhöhten prozentualen Anteilen CD38⁺ B-Lymphozyten sowie CD117⁺ myeloischer Progenitorzellen im Knochenmark assoziiert, die Anzahl zirkulierender neutrophiler Granulozyten jedoch erhöht. Zusammengenommen lassen unsere Untersuchungsergebnisse annehmen, dass die Expression von CD117 durch klonale Plasmazellen bei verschiedenen Plasmazell-Dyskrasien eher die Funktion eines Ankermoleküls besitzt, welches bewirken könnte, dass CD117⁺ gegenüber CD117⁻ klonalen Plasmazellen im Organismus weniger streuen.

Die in Publikation II geschilderten Beobachtungen verdeutlichen, dass neben der Expression von CD117 auch der CXCL12-CXCR4-Achse eine entscheidende Rolle in der Regulation des Homings klonaler Plasmazellen zukommt. Hierbei kann angenommen werden, dass klonale Plasmazellen vom MGUS über das asymptotische Multiple Myelom bis zum manifesten Multiplen Myelom sich potentiell überlappende Nischen im Knochenmark-Mikromilieu okkupieren und andere CXCL12-CXCR4-regulierte Zell-Kompartimente, die wesentlich zur Knochenmark-Homöostase beitragen, verdrängen. Diese Hypothese wird unter anderem durch die Ergebnisse eines neuen *ex-vivo* Migrations-Assays unterstützt, der zeigte, dass bei Patienten mit asymptotischem Multiplem Myelom oder MGUS

andere CXCL12-CXCR4-regulierte Zell-Kompartimente (z.B. normale Plasmazellen oder hämatopoietische Stammzellen) die Migration klonaler Plasmazellen in Richtung ansteigender SDF-1 Konzentrationen aufheben konnten, während dies für Patienten mit manifestem Multiplem Myelom nicht zutrif.

Die Publikationen III-IX beschäftigen sich mit neuen Therapiemöglichkeiten des Multiplen Myeloms und therapiebedingten, insbesondere Virusinfektionen betreffenden, Komplikationen nach allogener Stammzelltransplantation.

Der neue AKT-Inhibitor Perifosin und der Proteasomen-Inhibitor Bortezomib induzierten - im Gegensatz zu der immunmodulatorischen Substanz Lenalidomid - *in vitro* Zytotoxizität bei Zelllinien verschiedener hämatologischer Neoplasien, wie z.B. dem Multiplen Myelom (Publikation III). Perifosin und Bortezomib zeigten hierbei vorwiegend additive oder synergistische Effekte und sollten deshalb als Kombination in der Multiplen Myelom-Therapie innerhalb klinischer Studien weiter evaluiert werden. Perifosin, das mit der zellulären Plasmamembran interagiert und den zellulären Lipidstoffwechsel beeinflusst, führte im Gegensatz zu Bortezomib und Lenalidomid konzentrationsabhängig zu einem signifikanten Anstieg von IMI⁺ Kulturzellen im XE-5000 System. Diese Beobachtung verdeutlicht, dass die IMI-Technik, die ursprünglich unter anderem zur Detektion zirkulierender Progenitorzellen entwickelt wurde, auch geeignet sein könnte, zytotoxische Vorgänge an Kulturzellen zu erfassen.

Tierexperimentelle Daten zeigten, dass Perifosin - im Gegensatz zu der häufig dosislimitierenden Myelosuppression klassischer Chemotherapeutika - die Myelopoiese stimuliert (Catley *et al*, 2007). Wir untersuchten den Einfluss sowohl von Perifosin als auch von Lenalidomid, Bortezomib und Adriamycin, die bereits einen festen Stellenwert in der klinischen Routinetherapie des Multiplen Myeloms besitzen, gegenüber hämatopoietischen Progenitorzellen gesunder Spender (Publikation IV).

Perifosin hemmte ebenso wie Bortezomib und Lenalidomid das klonogene Potential hämatopoietischer Progenitorzellen gesunder Spender und besitzt deshalb vermutlich keine Wirksamkeit zur Verhinderung oder Verkürzung von Neutropeniephasen nach intensiver Chemotherapie. Alle untersuchten Substanzen zeigten in verschiedenen Assays (z.B. Caspase-Assays, Ki-67-Färbungen) auch bei hohen Substanzkonzentrationen nur geringe oder moderate Zytotoxizität gegenüber CD34⁺ aufgereinigten Progenitorzellen, so dass angenommen werden kann, dass eine Apherese zur Gewinnung funktionell normaler Stammzellen und die nachfolgende Hochdosischemotherapie bei Patienten mit Multiplem Myelom auch nach Einsatz dieser neuen Substanzen durchgeführt werden kann.

Die Publikationen V und VI zeigen, dass eine intensitätsreduzierte Konditionierung mit Fludarabin und Treosulfan vor allogener Stammzelltransplantation bei Patienten mit Multiplem Myelom meist sowohl zu einem zeitgerechten und stabilen Neutrophilen- und Thrombozytenengraftment als auch einem kompletten hämatopoietischen Spender-Empfänger-Chimärismus führt. Die vergleichsweise niedrige transplantations-assoziierte Mortalität (10% an Tag +100) sowie das günstige Gesamtüberleben von 58% 2 Jahre nach Transplantation lassen vermuten, dass dieses Verfahren bei vielfach vorbehandelten Patienten mit Multiplem Myelom, die sich nicht für eine konventionelle Konditionierung eignen, eine sinnvolle Therapieoption darstellt und in klinischen Studien weiter geprüft werden sollte.

Virale Infektionen sind eine wesentliche Komplikation nach allogener Stammzelltransplantation und, insofern sie das ZNS betreffen, mit einer insgesamt schlechten Prognose assoziiert. Eine zeitnahe und adäquate Diagnostik und gegebenenfalls antivirale Therapie sollte jedoch bei Verdacht auf eine virale ZNS-Erkrankung nach allogener Stammzelltransplantation stets angestrebt werden, da in

einzelnen Subgruppen ein günstiger Verlauf erzielt werden kann. Eine *in vivo* T-Zell-Depletion mit Alemtuzumab supprimiert sowohl die CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zell-Rekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation und ist mit einem außergewöhnlich hohen CMV-Infektionsrisiko vergesellschaftet. Insbesondere Patienten nach Alemtuzumab-basierter T-Zell-Depletion sollten deshalb engmaschig hinsichtlich CMV-Infektionen und -Erkrankungen untersucht werden. Prophylaktische Immunglobuline führen nach allogener Stammzelltransplantation auch dann zu keiner Reduzierung von CMV-Infektionen oder transplantations-assoziiierter Mortalität, wenn sie in hoher Dosierung selektiv in Phasen ausgeprägter Immunsuppression appliziert werden.

5. Literaturverzeichnis

Akhan H, Cordonnier C. Antimicrobial prophylaxis in EBMT centers: a report from the EBMT Infectious Diseases Working Party. *Bone Marrow Transplant* 2001; 27 (Suppl 1): S202.

Almeida J, Nieto WG, Teodosio C *et al.* CLL-like B-lymphocytes are systematically present at very low numbers in peripheral blood of healthy adults. *Leukemia* 2011; 25: 718-722.

Avet-Loiseau H. Role of genetics in prognostication in myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20: 625-635.

Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B *et al.* Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood* 2002; 99: 2185-2191.

Banna GL, Aversa S, Sileni VC *et al.* Nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation (NST) after truly nonmyeloablative and reduced intensity conditioning regimens. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004; 51: 171-189.

Baron F, Sandmaier BM. Chimerism and outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Leukemia* 2006; 20: 1690-1700.

Bataille R, Jégo G, Robillard N *et al.* The phenotype of normal, reactive and

malignant plasma cells. Identification of "many and multiple myelomas" and of new targets for myeloma therapy. *Haematologica* 2006; 91: 1234-1240.

Bataille R, Pellat-Deceunynck C, Robillard N *et al.* CD117 (c-kit) is aberrantly expressed in a subset of MGUS and multiple myeloma with unexpectedly good prognosis. *Leuk Res* 2008; 32: 379-382.

Baumgartner C, Cerny-Reiterer S, Sonneck K *et al.* Expression of activated STAT5 in neoplastic mast cells in systemic mastocytosis: subcellular distribution and role of the transforming oncoprotein KIT D816V. *Am J Pathol* 2009; 175: 2416-2429.

Bensinger WI. The current status of hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Clin Adv Hematol Oncol* 2004; 2: 46-52.

Bjorklund A, Aschan J, Labopin M *et al.* Risk factors for fatal infectious complications developing late after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40: 1055-1062.

Boeckh M, Leisenring W, Riddell SR *et al.* Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood* 2003; 101: 407-414.

Carrasco MP, Jiménez-López JM, Ríos-Marco P *et al.* Disruption of cellular cholesterol transport and homeostasis as a novel mechanism of action of membrane-targeted alkylphospholipid analogues. *Br J Pharmacol* 2010; 160: 355-366.

Catley L, Hideshima T, Chauhan D *et al.* Alkyl phospholipid perfosine induces myeloid hyperplasia in a murine myeloma model. *Exp Hematol* 2007; 35: 1038-1046.

Chiecchio L, Dagrada GP, Ibrahim AH *et al.* Timing of acquisition of deletion 13 in plasma cell dyscrasias is dependent on genetic context. *Haematologica* 2009; 94: 1708-1713.

Chng WJ, Glebov O, Bergsagel PL *et al.* Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007; 20: 571-596.

Cook JR, Hartke M, Pettay J *et al.* Fluorescence in situ hybridization analysis of immunoglobulin heavy chain translocations in plasma cell myeloma using intact paraffin sections and simultaneous CD138 immunofluorescence. *J Mol Diagn* 2006; 8: 459-465.

Cordonnier C, Chevret S, Legrand M *et al.* Should immunoglobulin therapy be used in allogeneic stem-cell transplantation? A randomized, double-blind, dose effect, placebo-controlled, multicenter trial. *Ann Intern Med* 2003; 139: 8-18.

Cumova J, Kovarova L, Potacova A *et al.* Optimization of immunomagnetic selection of myeloma cells from bone marrow using magnetic activated cell sorting. *Int J Hematol* 2010; 92: 314-319.

Ebert BL, Galili N, Tamayo P *et al.* An erythroid differentiation signature predicts response to lenalidomide in myelodysplastic syndrome. *PLoS Med* 2008; 5: e35.

Escribano L, Ocqueteau M, Almeida J *et al.* Expression of the c-kit (CD117) molecule in normal and malignant hematopoiesis. *Leuk Lymphoma* 1998; 30: 459-466.

Fonseca R, Barlogie B, Bataille R *et al.* Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res* 2004; 64: 1546-1558.

Gajate C, Mollinedo F. Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. *Blood* 2007; 109: 711-719.

Görgün G, Calabrese E, Soydan E *et al.* Immunomodulatory effects of lenalidomide and pomalidomide on interaction of tumor and bone marrow accessory cells in multiple myeloma. *Blood* 2010; 116: 3227-3237.

Harousseau JL, Palumbo A, Richardson PG *et al.* Superior outcomes associated with complete response in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with nonintensive therapy: analysis of the phase 3 VISTA study of bortezomib plus melphalan-prednisone versus melphalan-prednisone. *Blood* 2010; 116: 3743-3750.

Hideshima T, Catley L, Raje N *et al.* Inhibition of Akt induces significant downregulation of survivin and cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Br J Haematol* 2007; 138: 783-791.

Hideshima T, Catley L, Yasui H *et al.* Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Blood* 2006; 107: 4053-4062.

Hirota S, Isozaki K, Moriyama Y *et al.* Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998; 279: 577-580.

Huss R, Deeg HJ, Gooley T *et al.* Effect of mixed chimerism on graft-versus-host disease, disease recurrence and survival after HLA-identical marrow transplantation for aplastic anemia or chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant* 1996; 18: 767-776.

Iversen AC, Norris PS, Ware CF *et al.* Human NK cells inhibit cytomegalovirus replication through a noncytolytic mechanism involving lymphotoxin-dependent induction of IFN-beta. *J Immunol* 2005; 175: 7568-7574.

Jagannath S, Barlogie B, Berenson JR *et al.* Updated survival analyses after prolonged follow-up of the phase 2, multicenter CREST study of bortezomib in relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood (ASH Annual Meeting)* 2007; 110: 2717.

Jemal A, Siegel R, Xu J *et al.* Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 277-300.

Jourdan M, Ferlin M, Legouffe E *et al.* The myeloma cell antigen syndecan-1 is lost by apoptotic myeloma cells. *Br J Haematol* 1998; 100: 637-646.

Junghanss C, Boeckh M, Carter RA *et al.* Incidence and outcome of cytomegalovirus infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic stem cell transplantation, a matched control study. *Blood* 2002; 99: 1978-1985.

Kharfan-Dabaja MA, Ayala E, Greene J *et al.* Two cases of progressive multifocal leukoencephalopathy after allogeneic hematopoietic cell transplantation and a review of the literature. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39: 101-107.

Kröger N, Sayer HG, Schwerdtfeger R *et al.* Unrelated stem cell transplantation in multiple myeloma after a reduced-intensity conditioning with pretransplantation antithymocyte globulin is highly effective with low transplantation-related mortality. *Blood* 2002; 100: 3919-3924.

Kuijpers TW, Baars PA, Dantin C *et al.* Human NK cells can control CMV infection in the absence of T cells. *Blood* 2008; 112: 914-915.

Kumar S. Multiple myeloma - current issues and controversies. *Cancer Treat Rev* 2010; 36: S3-11.

Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV *et al.* A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2002; 346: 564-569.

Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV *et al.* Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2006; 354: 1362-1369.

Linssen J, Aderhold S, Nierhaus A *et al.* Automation and validation of a rapid method to assess neutrophil and monocyte activation by routine fluorescence flow cytometry in vitro. *Cytometry B Clin Cytom* 2008; 74: 295-309.

Lokhorst H, Einsele H, Vesole D *et al.* International Myeloma Working Group consensus statement regarding the current status of allogeneic stem-cell transplantation for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4521-4530.

Ma Q, Jones D, Springer TA. The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity* 1999; 10: 463-471.

Matarraz S, López A, Barrena S *et al.* Bone marrow cells from myelodysplastic syndromes show altered immunophenotypic profiles that may contribute to the diagnosis and prognostic stratification of the disease: a pilot study on A series of 56 patients. *Cytometry B Clin Cytom* 2010; 78: 154-168.

Mateo G, Castellanos M, Rasillo A *et al.* Genetic abnormalities and patterns of antigenic expression in multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3661-3667.

Mateo G, Montalbán MA, Vidriales MB *et al.* Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2737-2744.

Mateos MV, Oriol A, Martínez-López J *et al.* Bortezomib, melphalan, and prednisone versus bortezomib, thalidomide, and prednisone as induction therapy followed by maintenance treatment with bortezomib and thalidomide versus bortezomib and prednisone in elderly patients with untreated multiple myeloma: a randomised trial. *Lancet Oncol* 2010a; 11: 934-941.

Mateos MV, Richardson PG, Schlag R *et al.* Bortezomib plus melphalan and prednisone compared with melphalan and prednisone in previously untreated multiple myeloma: updated follow-up and impact of subsequent therapy in the phase III VISTA trial. *J Clin Oncol* 2010b; 28: 2259-2266.

Meinhardt G, Dayyani F, Jahrsdörfer B *et al.* Treosulfan is an effective inducer of cell death in myeloma cell lines and primary myeloma cells from patients. *Br J Haematol* 2003; 122: 892-899.

Michallet M, Bilger K, Garban F *et al.* Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation after nonmyeloablative preparative regimens: impact of pretransplantation and posttransplantation factors on outcome. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3340-3349.

Nagasawa T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 107-116.

Nickenig C, Lang NK, Schoch C *et al.* New insights into the biology of multiple myeloma using a combination of May-Grünwald-Giemsa staining and fluorescence in situ hybridization techniques at the single cell level. *Ann Hematol* 2001; 80: 662-668.

Nie Y, Waite J, Brewer F *et al.* The role of CXCR4 in maintaining peripheral B cell compartments and humoral immunity. *J Exp Med* 2004; 200: 1145-1156.

Nieto WG, Almeida J, Romero A *et al.* Increased frequency (12%) of circulating chronic lymphocytic leukemia-like B-cell clones in healthy subjects using a highly

sensitive multicolor flow cytometry approach. *Blood* 2009; 114: 33-37.

Noguchi T, Yoshiura T, Hiwatashi A *et al.* CT and MRI findings of human herpesvirus 6-associated encephalopathy: comparison with findings of herpes simplex virus encephalitis. *AJR Am J Roentgenol* 2010; 194: 754-760.

Orfao A, Garcia-Montero AC, Sanchez L *et al.* Recent advances in the understanding of mastocytosis: the role of KIT mutations. *Br J Haematol* 2007; 138: 12-30.

Ozdemir E, Saliba RM, Champlin RE *et al.* Risk factors associated with late cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant* 2007; 40: 125-136.

Paiva B, Vidriales MB, Mateo G *et al.* The persistence of immunophenotypically normal residual bone marrow plasma cells at diagnosis identifies a good prognostic subgroup of symptomatic multiple myeloma patients. *Blood* 2009; 114: 4369-4372.

Pal SK, Reckamp K, Yu H *et al.* Akt inhibitors in clinical development for the treatment of cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2010; 19: 1355-1366.

Pal R, Monaghan SA, Hassett AC *et al.* Immunomodulatory derivatives induce PU.1 down-regulation, myeloid maturation arrest, and neutropenia. *Blood* 2010; 115: 605-614.

Pérez-Persona E, Mateo G, García-Sanz R *et al.* Risk of progression in smouldering myeloma and monoclonal gammopathies of unknown significance: comparative

analysis of the evolution of monoclonal component and multiparameter flow cytometry of bone marrow plasma cells. *Br J Haematol* 2010; 148: 110-114.

Pérez-Persona E, Vidriales MB, Mateo G *et al.* New criteria to identify risk of progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smoldering multiple myeloma based on multiparameter flow cytometry analysis of bone marrow plasma cells. *Blood* 2007; 110: 2586-2592.

Podar K, Chauhan D, Anderson KC. Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy. *Leukemia* 2009; 23: 10-24.

Put N, Lemmens H, Wlodarska I *et al.* Interphase fluorescence in situ hybridization on selected plasma cells is superior in the detection of cytogenetic aberrations in plasma cell dyscrasia. *Genes Chromosomes Cancer* 2010; 49: 991-997.

Raab MS, Podar K, Breitkreutz I *et al.* Multiple myeloma. *Lancet* 2009; 374: 324-339.

Radbruch A, Muehlinghaus G, Luger EO *et al.* Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 741-750.

Rawstron AC, Orfao A, Beksac M *et al.* Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008; 93: 431-438.

Reid S, Yang S, Brown R *et al.* Characterisation and relevance of CD138-negative plasma cells in plasma cell myeloma. *Int J Lab Hematol* 2010; 32: e190-196.

Richardson P, Wolf J, Jakubowiak A *et al.* Phase I/II results of a multicenter trial of perifosine (KRX-0401) + bortezomib in patients with relapsed or relapsed/refractory multiple myeloma who were previously relapsed from or refractory to bortezomib. *Blood* 2008; 112: 870.

Safdieh JE, Mead PA, Sepkowitz KA *et al.* Bacterial and fungal meningitis in patients with cancer. *Neurology* 2008; 70: 943-947.

Sawyer JR, Waldron JA, Jagannath S *et al.* Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 82: 41-49.

Schetelig J, Kröger N, Held TK *et al.* Allogeneic transplantation after reduced conditioning in high risk patients is complicated by a high incidence of acute and chronic graft-versus-host disease. *Haematologica* 2002; 87: 299-305.

Schmidt-Hieber M, Zweigner J, Uharek L *et al.* Central nervous system infections in immunocompromised patients: update on diagnostics and therapy. *Leuk Lymphoma* 2009; 50: 24-36.

Sekeres MA, Maciejewski JP, Giagounidis AA *et al.* Relationship of treatment-related cytopenias and response to lenalidomide in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2008; 26: 5943-5949.

Shapiro-Shelef M, Calame K. Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 230-242.

Sher T, Miller KC, Deeb G *et al.* Plasma cell leukaemia and other aggressive plasma cell malignancies. *Br J Haematol* 2010; 150: 418-427.

Sjöo F, Hassan Z, Abedi-Valugerdi M *et al.* Myeloablative and immunosuppressive properties of treosulfan in mice. *Exp Hematol* 2006; 34: 115-121.

Storek J, Dawson MA, Storer B *et al.* Immune reconstitution after allogeneic marrow transplantation compared with blood stem cell transplantation. *Blood* 2001; 97: 3380-3389.

Sugiyama T, Kohara H, Noda M *et al.* Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 2006; 25: 977-988.

Sullivan KM, Kopecky KJ, Jocom J *et al.* Immunomodulatory and antimicrobial efficacy of intravenous immunoglobulin in bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1990; 323: 705-712.

Sullivan KM, Storek J, Kopecky KJ *et al.* A controlled trial of long-term administration of intravenous immunoglobulin to prevent late infection and chronic graft-vs.-host disease after marrow transplantation: clinical outcome and effect on subsequent immune recovery. *Biol Blood Marrow Transplant* 1996; 2: 44-53.

Tokoyoda K, Egawa T, Sugiyama T *et al.* Cellular niches controlling B lymphocyte behavior within bone marrow during development. *Immunity* 2004; 20: 707-718.

Tricot G, Vesole DH, Jagannath S *et al.* Graft-versus-myeloma effect: proof of principle. *Blood* 1996; 87: 1196-1198.

Vakiani E, Cattoretti G, Colovai AI *et al.* CD117 expression in diffuse large B-cell lymphomas: fact or fiction? *Pathol Int* 2005; 55: 716-723.

Van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L *et al.* Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *N Engl J Med* 2004; 351: 1849-1859.

Van de Donk NW, Lokhorst HM, Dimopoulos M *et al.* Treatment of relapsed and refractory multiple myeloma in the era of novel agents. *Cancer Treat Rev* 2011; 37: 266-283.

Wadhera RK, Rajkumar SV. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance: a systematic review. *Mayo Clin Proc* 2010; 85: 933-942.

Ximeri M, Galanopoulos A, Klaus M *et al.* Effect of lenalidomide therapy on hematopoiesis of patients with myelodysplastic syndrome associated with chromosome 5q deletion. *Haematologica* 2010; 95: 406-414.

Zhang L, Qi JY, Qi PJ *et al.* Comparison among immunologically different subtypes of 595 untreated multiple myeloma patients in northern China. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2010; 10: 197-204.

Zonder JA, Crowley J, Hussein MA *et al.* Lenalidomide and high-dose dexamethasone compared with dexamethasone as initial therapy for multiple

myeloma: a randomized Southwest Oncology Group trial (S0232). *Blood* 2010; 116: 5838-5841.

6. Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Eckhard Thiel für die großzügige und stete Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit und die wertvollen klinischen Erfahrungen, die ich in den vielen Jahren meiner Tätigkeit am Universitätsklinikum Benjamin Franklin sowie an der Charité sammeln konnte, danken. Besonders danken möchte ich auch Herrn PD Dr. Igor Wolfgang Blau für die vielen freundschaftlichen und hilfreichen Diskussionen bei wissenschaftlichen und klinischen Fragestellungen. Wesentlich haben auch Herr Prof. Alberto Orfao und seine Arbeitsgruppe (Cancer Research Center, Salamanca, Spanien) zu diesem Projekt beigetragen, bei denen ich mich hier herzlich bedanken möchte. Insbesondere möchte ich mich auch bei Frau Birgit Reufi und den DoktorantInnen Herrn Robert Dabrowski und Frau Sandra Schwarck bedanken, deren Mitarbeit für die vorliegende Arbeit sehr hilfreich war. Auch herzlichen Dank an alle Kollegen der Medizinischen Klinik III, Campus Benjamin Franklin der Charité, die mich unterstützt haben und hier namentlich nicht genannt sind.

7. Erklärung

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

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde.

- Die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/ Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.

- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 16.10.2011

Dr. M. Schmidt-Hieber