

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Medizinische Klinik A

-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Georg Lenz-

der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Prognostische Bedeutung von Kollagen Typ VI beim Multiplen Myelom

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des

doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Roseland, Jan

aus

Thedinghausen

Münster 2019

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Dr. h. c. Sven Meuth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christoph Schliemann

2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfgang Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2020

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Medizinische Klinik A

-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Georg Lenz-

Referent: Prof. Dr. med. Christoph Schliemann

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfgang Hartmann

Zusammenfassung

Prognostische Bedeutung von Kollagen Typ VI beim Multiplen Myelom

Roseland, Jan

Die prognostische Bedeutung von Kollagen Typ VI (COLVI) ist aktuell Gegenstand vieler Studien. Aufgrund des großen Einflusses auf Tumorzellen könnte COLVI dabei Ziel von neuen therapeutischen Medikamenten sein und Auskunft über die Prognose eines Patienten geben, denn die Grundlagenforschung der vergangenen Jahre hat gezeigt, dass dem Mikroumfeld einer Neoplasie eine große Bedeutung bei der Progression der Erkrankung zukommt. Mit dieser Arbeit sollte eine prognostische Bedeutung von COLVI hinsichtlich des Gesamt- (OS) und progressionsfreien Überlebens (PFS) sowie hinsichtlich des Ansprechens auf die medikamentöse Therapie beim Multiplen Myelom (MM) untersucht werden. Hierfür wurden die Knochenmarkstanzen von Patienten mit bekanntem MM neu aufgearbeitet und als Gewebe-Microarray (TMA) mittels APAAP-Färbung mit einem Anti-COLVI-Antikörper gefärbt. Die Proteinexpressionsdaten wurden mit öffentlich zugänglichen mRNA-Expressionsdaten aus dem GEO verglichen. Die Studie wurde von der lokalen Ethik-Kommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der Westfälischen-Wilhelms Universität Münster (2016-654-f-S) am 16.12.2016 genehmigt und erfolgte in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki. Die statistische Auswertung der verwendeten 99 Knochenmarkstanzen ergab jedoch keinen signifikanten Vorteil bezüglich des OS (5-Jahres-OS, 81,2 % vs. 69,0 % für hohe COLVI-Expression vs. niedrige COLVI-Expression, $p = 0,052$), keinen signifikanten Vorteil bezüglich des PFS (5-Jahres-PFS, 39,9 % vs. 20,7 % für hohe COLVI-Expression vs. niedrige COLVI-Expression, $p = 0,301$) und kein signifikant verbessertes Ansprechen auf die Therapie (Induktionstherapie, 90,0 % vs. 88,2 % für hohe COLVI-Expression vs. niedrige COLVI-Expression, $p = 0,392$ / Hochdosistherapie, 90,0 % vs. 93,4 % für hohe COLVI-Expression vs. niedrige COLVI-Expression, $p = 0,686$) für Patienten mit niedriger COLVI-Expression. Patienten mit niedriger COLVI-Expression hatten dabei allerdings signifikant seltener monoklonales IgA (16,7 % vs. 33,3 %), häufiger monoklonales IgG (53,8 % vs. 42,9 %) und häufiger ein Leichtkettenmyelom (29,5 % vs. 9,5 %) als solche mit hoher COLVI-Expression. Außerdem hatten sie im Durchschnitt eine signifikant erhöhte LDH-Konzentration bei Diagnosestellung (196,00 U/l vs. 162,00 U/l). Die Vermutung einer Korrelation zwischen COLVI-Expression und Überleben konnte somit nicht bestätigt werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2020

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Prognostische Bedeutung von Kollagen Typ VI beim Multiplen Myelom

in der Medizinischen Klinik A des Universitätsklinikum Münster unter Anleitung von Prof. Dr. med. Christoph Schliemann und Dr. med. Linus Angenendt

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Etelsen, d. 23.06.2020

Ort, Datum



Name/Unterschrift

MEINER FAMILIE

INHALTSVERZEICHNIS

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	<i>I</i>
<i>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</i>	<i>III</i>
1. EINLEITUNG	1
1.1. Multiples Myelom	1
1.1.1. Pathophysiologie des Multiplen Myeloms	1
1.1.2. Klinik, Staging und Prognose.....	3
1.1.3. Therapie	5
1.2. Stroma, Extrazellularraum, extrazelluläre Matrix und hämatopoetische Stammzellnische	8
1.2.1. Hämatopoetische Stammzellnische	9
1.2.2. Hämatopoetische Stammzellnische beim Multiplen Myelom	10
1.2.3. Kollagen Typ VI.....	11
1.2.4. Kollagen Typ VI bei Neoplasien.....	12
1.3. Prognostische Bedeutung von Kollagen Typ VI	15
1.4. Ziele dieser Arbeit	16
2. PATIENTEN, MATERIAL & METHODEN	17
2.1. Studienaufbau	17
2.2. Patientenauswahl	17
2.3. Nachweis von Kollagen Typ VI im Knochenmark	19
2.3.1. Vorbereitung	19
2.3.2. Färbung.....	20
2.3.2.1. Deparaffinierung.....	20
2.3.2.2. Antigendemaskierung.....	20
2.3.2.3. Proteinblockierung.....	21
2.3.2.4. Primärantikörperreaktion	21
2.3.2.5. Sekundär-, Tertiär- und Quartärantikörperreaktion	21
2.3.2.6. Farbreaktion	22
2.3.2.7. Gegenfärbung	22
2.3.3. Auswertung der Färbungen.....	22
2.4. Kollagen Typ VI Alpha 1-mRNA-Expressionsdaten aus Gene Expression Omnibus	23
2.4.1. Kohorte 1.....	23
2.4.2. Kohorte 2.....	23
2.4.3. Kohorte 3.....	23

2.5.	Statistische Auswertung	24
3.	<i>ERGEBNISSE</i>	25
3.1.	Tatsächlicher Patientenumfang (drop outs).....	25
3.2.	Auswertung der Färbungen.....	26
3.3.	Vergleich Multiples Myelom vs. Kontrollen	27
3.4.	Deskriptive Statistik	28
3.5.	Ansprechen.....	32
3.6.	Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben	33
3.7.	Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben bei Kollagen Typ VI Alpha 1-mRNA-Expression	34
4.	<i>DISKUSSION</i>	38
	<i>LITERATURVERZEICHNIS</i>	40
	<i>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</i>	57
	<i>TABELLENVERZEICHNIS</i>	59
	<i>FLUSSDIAGRAMMVERZEICHNIS</i>	60
	<i>DANKSAGUNG</i>	61
	<i>LEBENS LAUF</i>	62
	<i>ANHANG</i>	I
1.	Forschungsgenehmigung des „Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz“, Nordrhein-Westfalen (Aktenz.: 2016-654-f-S)	II
2.	Laborprotokoll APAAP-Immunhistochemie Anti-Collagen VI – 05. + 06.12.2017	V

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Allo-SCT	Allogene Stammzelltransplantation (engl. <i>allogeneic stem cell transplantation</i>)
ANTXR1	Anthrax Toxin Rezeptor 1
Auto-SCT	Autologe Stammzelltransplantation (engl. <i>autologous stem cell transplantation</i>)
AZ	Allgemeinzustand
B	Bortezomib (Handelsname Velcade®), auch abgekürzt als V
BMM	Knochenmarkmikroumfeld (engl. <i>bone marrow microenvironment</i>)
BMSC	Knochenmarkstromazelle (engl. <i>bone marrow stromal cell</i>)
C	Cyclophosphamid
CAF	Krebs-assoziiertes Fibroblast (engl. <i>cancer-associated fibroblast</i>)
ccRCC	Klarzelliges Nierenzellkarzinom (engl. <i>clear cell renal cell carcinoma</i>)
COL6A1	Kollagen Typ VI Alpha 1 (engl. <i>collagen VI alpha 1</i>)
COLVI	Kollagen Typ VI (engl. <i>collagen VI</i>)
CR	Komplette Remission (engl. <i>complete remission</i>)
CRC	Kolorektales Karzinom (engl. <i>colorectal cancer</i>)
D	Dexamethason
d	Low-dose Dexamethason
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
EFS	Ereignisfreies Überleben (engl. <i>event free survival</i>)
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ETP	Endotrophin
EZM	Extrazelluläre Matrix (synonym Interzellulärsubstanz)

EZR	Extrazellularraum (synonym Interzellularraum, Zellzwischenraum)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor (engl. <i>granulocyte-colony stimulating factor</i>)
GEO	Gene Expression Omnibus
HC	Schwerkette (engl. <i>heavy chain</i>)
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 Alpha
HSCN	Hämatopoetische Stammzellnische (engl. <i>haematopoietic stem cell niche</i>)
HSPC	Hämatopoetische Stamm- und Progenitorzelle (engl. <i>haematopoietic stem and progenitor cell</i>)
IL-2	Interleukin-2
IL-6	Interleukin-6
IMWG	International Myeloma Working Group
ISS	International Staging System
KM	Knochenmark
LC	Leichtkette (engl. <i>light chain</i>)
M	Melphalan (Handelsname Alkeran®)
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MM	Multiples Myelom
MMC	Multiple Myelom Zelle (engl. <i>multiple myeloma cell</i>)
mOS	Medianes Gesamtüberleben (engl. <i>median overall survival</i>)
MRD	Minimale Resterkrankung (engl. <i>minimal residual disease</i>)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MSC	Mesenchymale Stammzelle (engl. <i>mesenchymal stem cell</i>)
NG2	Neural/Glial Antigen 2
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
OPG	Osteoprotegerin

OS	Gesamtüberleben (engl. <i>overall survival</i>)
P	Prednison
PD	Progression (engl. <i>progressive disease</i>)
PFS	Progressionsfreies Überleben (engl. <i>progression-free survival</i>)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PR	Teilremission (engl. <i>partial remission</i>)
R	Lenalidomid (Handelsname Revlimid®)
R-ISS	Revised International Staging System
RT	Raumtemperatur
SC	Stammzelle (engl. <i>stem cell</i>)
sCR	Stringente komplette Remission (engl. <i>stringent complete remission</i>)
SD	Stabile Krankheit (engl. <i>stable disease</i>)
SHM	Somatische Hypermutation
SMM	Schwelendes Myelom (engl. <i>smouldering multiple myeloma</i>)
SR	Somatische Rekombination
T	Thalidomid
TAM	Tumor-assoziierte Makrophage (engl. <i>tumor-associated macrophage</i>)
TBS	engl. <i>Tris-buffered saline</i>
TMA	Gewebe-Microarray (engl. <i>tissue microarray</i>)
TME	Tumormikroumfeld (engl. <i>tumor microenvironment</i>)
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRAIL/Apo2L	TNF-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand
UKM	Universitätsklinikum Münster
V	Bortezomib (Handelsname Velcade®), auch abgekürzt als B
VEGF / VEGFA	Endothelwachstumsfaktor A (engl. <i>vascular endothelial growth factor A</i>)

VGPR Sehr gute Teilremission (engl. *very good partial remission*)

1. EINLEITUNG

1.1. Multiples Myelom

Das Multiple Myelom (MM) ist ein niedrig malignes Lymphom der Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) B-Zell-Reihe und der zweithäufigste hämatopoetische Tumor.(83, 96) Es ist vor allem eine Erkrankung des älteren Menschen (60. bis 70. Lebensjahr) und trifft dabei in etwa doppelt so viele Männer wie Frauen.(123) Aufgrund der Entwicklung neuer Medikamente konnte die Fünfjahresüberlebensrate sukzessive von 37 % (1971-1996) auf 66 % (2006-2010) gesteigert werden.(123) Trotz all dieser Errungenschaften ist das MM jedoch eine für die meisten Patienten nach wie vor unheilbare Krankheit, da lediglich 10 % eine langjährige Remission erreichen.(96, 123) Neue Überlegungen gehen daher seit einigen Jahren vermehrt auf die Interaktion von Tumoren und Stroma (im Knochenmark (KM)) ein um möglicherweise neue oder verbesserte Angriffsmöglichkeiten für Medikamente zu finden und um prognostische Aussagen genauer zu gestalten, so geschehen zum Beispiel bei der AML,(3) einer ebenfalls im KM ansässigen hämatopoetischen Neoplasie.

1.1.1. Pathophysiologie des Multiplen Myeloms

Die monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS), eine Art Vorläufer verschiedener hämatopoetischer Krankheiten, kommt bei ca. 4 % der Kaukasier ab dem 50. Lebensjahr vor.(87) Ca. 1 % dieser MGUS gehen pro Jahr in ein MM über.(84) Das MM stellt das neoplastische Gegenstück zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen dar, die das terminal differenzierte Ende der B-Zell-Reihe darstellen.(123) Eine erste Veränderung hin zu einer maligne transformierten Zelle findet bereits während der somatischen Rekombination (SR) und somatischen Hypermutation (SHM) im Keimzentrum von Lymphknoten statt.(14, 17, 129) Mutationen der Schwer- und Leichtketten führen dazu, dass funktionslose Antikörper der Klassen IgG (ca. 50 %), IgA (ca. 25 %), IgD (ca. 1 %) oder inkomplette Antikörper (ca. 20 %, vor allem Leichtketten) entstehen.(80, 96) Darüber hinaus kommt es bei ca. 60 % zu einer mutationsbedingten Hyperdiploidie, welche sich vor allem in Trisomien der Chromosomen 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 und 21 äußert.(12, 14) Bei den anderen ca. 40 % finden sich dagegen häufig Translokationen, die den Immunglobulin-Schwerkettengen-Locus (IgH) auf Chromosom 14q32 betreffen. Zu den häufigsten gehören t(11;14), t(4;14), t(14;16), t(6;14) und t(14;20).(12, 117)

Da sich die funktionslosen Antikörper nicht gegen körpereigene Antigene richten, werden die sie produzierenden Zellen nicht zerstört, sondern überleben den Ausmusterungsprozess. Spätere Mutationen können nun zu einer Überaktivierung von Onkogenen und Deaktivierung von Suppressorgenen führen. Häufig auftretende Mutationen sind del(1p), del(13), del(17p), *RAS*-Mutationen und Translokationen des *MYC*-Gens.(12) Infolge dieses Ungleichgewichts anti-apoptotischer und pro-apoptotischer Faktoren vermehrt sich diese Plasmazelle nun klonal ohne großen Widerstand und produziert hohe Mengen an funktionslosen Antikörpern.(14, 100) Die transformierenden Vorgänge finden dabei im KM statt, sodass schlussendlich Myelomzellen (MMCs) entstehen.

Maligne Zellklone, die singular im KM (medullär) oder außerhalb des KMs (extramedullär) vorkommen, nennt man Plasmozytom. Treten auch im peripheren Blut maligne Zellklone auf, so spricht man von einer Plasmazelleukämie, welche das Endstadium des MM darstellt.(96, 100)

Grundsätzlich spricht man beim MM von einer klonalen Proliferation. Mit der Zeit entstehen jedoch durch weitere Mutationen Subtypen des ursprünglichen Klones, die mitunter sogar die älteren Ursprungszellen verdrängen.(100)

Die Forschung der letzten Jahre zeigte, dass die Mutationen allein aber nicht immer genügen, um ein langes Überleben der mutierten Zelle zu ermöglichen.(14) Um sich dauerhaft im KM anzusiedeln, gehen die Tumorzellen eine enge Beziehung mit dem Knochenmarkmikroumfeld (BMM) ein.(80) Sie konkurrieren mit den normalen Plasmazellen um diese Nische und verdrängen diese häufig durch eine bessere Bindung an das Stroma des KM. Drei bis sechs Subtypen des Ursprungsklones, man spricht hier von intraklonaler Heterogenität, setzen sich gegen die anderen Subtypen durch (*survival of the fittest*) und haben häufig eine verbesserte Adhäsion an das Stroma. Auf diese Weise verdrängen sie die Ursprungszellen und normalen Plasmazellen.(20, 100) Die Bildung von Netzwerken mit Stromazellen, Osteoklasten und -blasten sowie Endothelzellen hilft den Tumorzellen lange zu überleben und eine Resistenz gegenüber antineoplastischen Medikamenten zu entwickeln (CAMDR – *cell-adhesion-mediated drug resistance*). (41, 80, 83, 100)

1.1.2. Klinik, Staging und Prognose

Das MM ist eine Zwischenstufe von der MGUS zur Plasmazelleukämie. Nach der International Myeloma Working Group (IMWG) gibt es drei Arten der MGUS, Non-IgM-MGUS, IgM-MGUS und Leichtketten-MGUS.(118, 119) Weiterhin gibt es das schwelende Myelom (SMM) eine Zwischenstufe zwischen MGUS und MM, das solitäre Plasmozytom, das solitäre Plasmozytom mit minimaler KM-Beteiligung, das POEMS-Syndrom, die systemische AL Amyloidose bei der sich die klonalen Leichtketten im Interstitium abgelagern, das symptomatische MM und schlussendlich die Plasmazelleukämie als Endstadium.(118, 151)

Die Symptome des MM sind verschiedenartig und vor allem unspezifisch zu Beginn. Vier besonders markante und häufig auftretende Symptome werden auch als CRAB-Kriterien (entsprechen Endorganschäden) bezeichnet und deshalb zur Diagnostik verwendet. Dabei handelt es sich um Hyperkalzämie (C für engl. *calcium*) mit einer Serumkalziumkonzentration $> 2,75$ mmol/l oder $> 0,25$ mmol/l oberhalb des oberen Normwertes, Niereninsuffizienz (R für engl. *renal insufficiency*) mit einer Serumkreatininkonzentration $\geq 2,0$ mg/dl oder einer Kreatinin-Clearance von < 40 ml/min, Anämie (A für engl. *anaemia*) mit einer Hämoglobinkonzentration $< 10,0$ g/l oder $\geq 2,0$ g/l unterhalb des unteren Normwertes sowie Knochenbeteiligung (B für engl. *bone*) mit mindestens einer nachgewiesenen Knochenläsion in der Bildgebung.(118) Weitere Symptome sind eine erhöhte Infektneigung aufgrund des sekundär bedingten Antikörpermangels, Gewichtsverlust und Müdigkeit die meist durch die Anämie bedingt wird.(118) 2014 aktualisierte und erweiterte die IMWG die Diagnostik um die drei SLiM-Kriterien (entsprechen Biomarkern). Diese beinhalten eine Plasmazellinfiltration des KM > 60 % (S für engl. *sixty*), die Ratio aus der erhöhten Leichtkette zur nicht betroffenen Leichtkette von ≥ 100 , wobei die betroffene Leichtkette mindestens in einer Konzentration von 100 mg/l vorliegen muss (Li für engl. *light chain*) und mindestens zwei fokale Läsionen im Ganzkörper-MRT, deren Größe mindestens 5mm betragen muss (M für engl. *magnetic resonance imaging* (MRI)).(118) Fallen massenhaft Leichtketten an, so kann die Niere diese nicht mehr vollständig resorbieren und es kommt zu einem Ausfall im distalen Tubulus, indem die Leichtketten an das Tamm-Horsfall-Protein binden (auch Cast-Nephropathie genannt).(44) Außerdem werden die Leichtketten auch mit dem Urin ausgeschieden, die sogenannte Bence-Jones-Proteinurie. Diese zeigt sich klinisch durch einen aufschäumenden Urin.(151) Nur noch selten zeigt sich heute dagegen ein Hyperviskositätssyndrom infolge der hohen Antikörperproduktion.(86) Osteolytische Läsionen entstehen aufgrund der

komplexen Interaktion der MMCs mit dem BMM. Sie aktivieren über Mediatoren die Osteoklasten und hemmen die Osteoblasten.(83) Der Nachweis erfolgt heute per low-dose CT als sensitivster Methode.(67) Die Skelettszintigraphie dagegen hat keine Bedeutung in der Diagnostik der osteolytischen Läsionen, da sie vor allem von der Aktivität der Osteoblasten abhängig ist.(67)

Die Diagnose des symptomatischen MM gilt als gesichert, wenn folgende Kriterien erfüllt sind:

- Entweder
 - o ≥ 10 % KM-Infiltration durch klonale Plasmazellen und
 - o Nachweis von monoklonalem Protein im Serum oder Urin und
 - o Vorliegen mindestens eines CRAB-Kriteriums dessen Ursprung in kausalem Zusammenhang mit den Plasmazellen steht
- oder
 - o ≥ 60 % KM-Infiltration durch klonale Plasmazellen
- oder
 - o Ratio aus der erhöhten Leichtkette zur nicht betroffenen Leichtkette von ≥ 100 wobei die betroffene Leichtkette mindestens in einer Konzentration von 100 mg/l vorliegen muss
- oder
 - o > 1 Herdbefund im MRT.(67, 151)

Im Vergleich dazu sind beim SMM noch keine Endorganschäden oder Biomarker nachweisbar, jedoch liegt die KM-Infiltration auch hier schon bei > 10 %. Die MGUS ist definiert als eine KM-Infiltration < 10 % sowie ebenfalls durch nicht nachweisbare Endorganschäden oder Biomarker. Sowohl die MGUS als auch das SMM benötigen in der Regel keine Therapie.(67, 151)

Das Staging des MM erfolgt seit 2005 nach dem International Staging System in ISS-Stadien. Bis dahin galt seit 1975 die Stadieneinteilung nach Durie und Salmon als wegweisend. 2015 erfolgte eine Erweiterung der ISS-Stadien zu Revised-ISS-Stadien (R-ISS). Diese beinhalten:

- R-ISS I:
 - o beta-2-Mikroglobulin $\leq 3,5$ mg/l und
 - o Albumin $\geq 3,5$ g/dl und
 - o zytogenetisches Standardrisiko und

- LDH \leq oberer Normalwert
- R-ISS II:
 - Alle anderen Werte die nicht durch Stadium I oder III abgedeckt werden
- R-ISS III:
 - beta-2-Mikroglobulin \geq 5,5 mg/l und
 - zytogenetisches Hochrisiko oder LDH $>$ oberer Normalwert(108)

Als zytogenetisches Hochrisiko gelten dabei del(17p), t(4;14)(p16;q32) und t(14;16)(q32;q23), während ein Fehlen dieser Marker als Standardrisiko gilt.(108, 151)

Das mediane Gesamtüberleben (mOS) liegt nach neuesten Forschungsergebnissen und Bewertungskriterien bei 56 Monaten für ISS III und 87 Monaten für ISS II während es für die ISS I in den Studien noch nicht erreicht war.(108, 151) Die 5-Jahres-Überlebensrate entsprach dabei 82 % für ISS I, 62 % für ISS II und 40 % für ISS III.(108, 151) Die progressionsfreie 5-Jahres-Überlebensrate lag bei 55 % für ISS I, 36 % für ISS II und 24 % für ISS III.(108, 151)

Trotz des Erreichens einer kompletten Remission (CR) ist bei vielen Patienten noch eine minimale Resterkrankung (MRD) nachweisbar.(42) Kann keine MRD nachgewiesen werden, ist dies prognostisch günstig, da dies mit einer längeren progressionsfreien und Gesamtüberlebenszeit einhergeht.(104)

1.1.3. Therapie

Das Einleiten einer Therapie ist indiziert, wenn mindestens ein CRAB-Kriterium erfüllt ist.(151) Studien zeigten, dass die Transformationsrate der Plasmazellen zu MMCs bei Vorliegen eines der neuen Biomarker nach zwei Jahren zwischen 55-94 % liegt.(108, 151) Deshalb gilt die Diagnose des MM auch als gesichert wenn bereits einer der Biomarker erfüllt wird, selbst wenn noch keine klonalen Zellen vorhanden oder nachweisbar sind. Die IMWG empfiehlt daher nun mittlerweile das Einleiten einer Therapie auch bei Vorliegen dieser Parameter. Dies könnte zukünftig viele Patienten davor bewahren, eine Therapie erst dann zu erhalten, wenn sie bereits einen manifesten Endorganschaden haben.(118) Allerdings fehlen bislang noch Studienergebnisse über den Langzeiterfolg bzw. Langzeiteffekt einer früheren Therapie. Ebenfalls behandelt werden müssen MM-assoziierte Komplikationen wie beispielsweise Hyperviskositätssyndrom, Infektionen oder Schmerzen.(118)

Primäres Ziel einer Therapie ist eine möglichst gute, idealerweise komplette Remission sowie Symptomkontrolle. Zu berücksichtigen sind dabei immer auch die gegebenen Lebensumstände des Patienten, belastende und damit die Therapie einschränkende Nebenwirkungen der Medikamente und die subjektiv empfundene Lebensqualität. Sekundär sollte die Therapie darauf abzielen, eine möglichst lange progressionsfreie und Gesamtüberlebenszeit zu schaffen.(151) Dabei ist das Therapieschema des MM relativ vielschichtig.

Die Erstlinientherapie wird unterteilt in eine Gruppe für Patienten denen eine autologe Stammzelltransplantation (Auto-SCT) zugemutet, und in eine Gruppe für Patienten, denen diese nicht zugemutet werden kann. Limitierend hierfür sind die Nebenwirkungen der Hochdosistherapie, die vor der Auto-SCT erfolgt.(92) Eine Altersbegrenzung ist jedoch schwer festzulegen, da neuere Studien durchaus zeigten, dass auch Patienten > 70 Jahre noch von einer Auto-SCT profitieren können.(102) Die obere Altersgrenze ist daher unterschiedlich definiert. Grundsätzlich kann als Richtlinie angenommen werden, dass Patienten bis zu einem Alter von 65 Jahren hierfür geeignet sind. Bei einem guten Allgemeinzustand (AZ) und ohne Komorbiditäten können auch Patienten bis zu einem Alter von 75 Jahren für eine Auto-SCT geeignet sein. Patienten mit Komorbiditäten sollten eher keine Hochdosistherapie erhalten.(95, 102) Allerdings zeigte sich für diese Patienten auch in einer Studie, dass anstelle der Induktionstherapie und direkt eingeleiteter Hochdosistherapie mit Auto-SCT gerademal ein 4 % schlechteres Ergebnis bestand.(140) Grundsätzlich kann festgehalten werden, dass eine Therapie mit Auto-SCT bessere Ergebnisse zeigt als eine Behandlung ohne Auto-SCT.(10, 109) Dies bestätigte sich auch für die Konsolidierungstherapie.(52) Im New England Journal of Medicine (NEJM) wurde allerdings 2017 auch eine Studie veröffentlicht, die zeigte, dass die Auto-SCT zwar mit einer längeren progressionsfreien Überlebenszeit einhergeht, die Gesamtüberlebenszeit aber in beiden Gruppen (mit und ohne Auto-SCT) nahezu gleich blieb, gleichzeitig aber dafür die erhöhten Nebenwirkungen der Hochdosistherapie bei der Auto-SCT in Kauf genommen werden müssen.(7) Ebenfalls 2017 konnte aber auch gezeigt werden, dass eine doppelte Auto-SCT im Vergleich zu einfacher Auto-SCT oder Therapie ohne Auto-SCT sowohl das progressionsfreie (PFS) als auch das Gesamtüberleben (OS) deutlich verbessern kann.(26) So erwähnt auch die Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und medizinische Onkologie (DGHO) die doppelte Auto-SCT in ihrem Therapieschema.(151)

Sind die Patienten also für eine Hochdosistherapie geeignet, so erfolgt nach Erstlinientherapie zunächst eine Triple-Induktionstherapie aus

- Bortezomib (V), Lenalidomid (R) und Dexamethason (D) (VRD-Schema) oder
- V, Cyclophosphamid (C) und D (VCD-Schema) oder
- V, Thalidomid (T) und D (VTD-Schema) oder
- nur als Double-Therapie aus V und D, wobei die Ansprechrate hier niedriger ausfällt, dafür aber auch weniger Nebenwirkungen auftreten.(151)

Aus bisherigen Studien ist jedoch noch keine Erkenntnis abzuleiten, die klar eine der Kombinationstherapien bevorzugen würde.(98) Daher wird sich die Forschung sicherlich in den nächsten Jahren darum bemühen, Biomarker zu finden, die eine Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Therapieschemata ermöglichen und die idealerweise auch eine Differenzierung der Ansprechbarkeit der jeweiligen genetischen Subtypen auf die einzelnen Substanzen oder Therapieschemata zulassen.(98)

Der Induktionstherapie anschließend folgt die erste Auto-SCT mit Hochdosistherapie. Dafür werden zunächst mittels Gabe von Granulozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (G-CSF) und gegebenenfalls vorangehender Chemotherapie (meist Cyclophosphamid) Stammzellen (SC) ins periphere Blut mobilisiert und mittels Stammzellapherese gesammelt.(55) Sollten nicht ausreichend Stammzellen gesammelt werden können, kann ein erneuter Versuch gegebenenfalls mit Hinzunahme des CXCR4-Antagonisten Plerixafor unternommen werden. Spätestens 6 Wochen nach Abschluss der Induktionstherapie sollte die Stammzellsammlung abgeschlossen sein.(151) Es folgt die Hochdosistherapie mit Melphalan (M)(54) und die Auto-SCT. Vor allem für Patienten mit R-ISS III und/oder Hochrisiko-Zytogenetik ist eine zweite Auto-SCT mit Hochdosistherapie zu empfehlen.(151)

Nach Abschluss der Auto-SCT kann eine Erhaltungstherapie erfolgen.(134, 138) Die Erhaltungstherapie kann beispielsweise mit V(57, 135) oder R erfolgen.(77, 93)

Sind die Patienten hingegen nicht für eine Hochdosistherapie geeignet, erfolgt die Induktionstherapie nach einem der folgenden Schemata:

- V, C und D (VCD-Schema) oder
- V, M und Prednison (P) (VMP-Schema) oder
- R und low-dose Dexamethason (d) (Rd-Schema) oder
- V, R und D (VRD-Schema)(151)

In der Regel wird die Therapie dabei so lange fortgesetzt, bis es zum Progress oder inakzeptabler Toxizität aufgrund der verwendeten Medikamente kommt.(151)

Unabhängig davon, ob der Patient einer Hochdosistherapie zugeführt werden kann oder nicht, sollte eine unterstützende Therapie zur Knochenprotektion mit Bisphosphonaten durchgeführt werden, wenn das B-Kriterium erfüllt ist oder eine Glukokortikoid-haltige Therapie angewendet wird.(8, 99)

Die Zweitlinientherapie ist aufgrund der bereits recht inhomogenen Erstlinientherapie sehr komplex. Je nach Ansprechen der Patienten auf die Erstlinientherapie besteht sowohl die Möglichkeit einer Wiederholung mit denselben Medikamenten als auch ein Wechsel auf andere Medikamente,(45) ebenso wie eine Wiederholung der Auto-SCT.(45, 78) Grundsätzlich besteht zusätzlich ebenfalls die Option einer allogenen Stammzelltransplantation (Allo-SCT), welche im Rezidiv aufgrund des Graft-versus-Myeloma-Effekts durchaus ein positives Resultat erzielen und gegebenenfalls durch die spätere Gabe von Donorlymphozyten noch intensiviert werden kann.(66, 91)

1.2. Stroma, Extrazellularraum, extrazelluläre Matrix und hämatopoetische Stammzellnische

Das Stroma und der Extrazellularraum (EZR) umgeben die organspezifischen Zellen, die Parenchymzellen von Organen.(113) Für ein besseres Verständnis der folgenden Subkapitel werden die einzelnen Begriffe hier kurz erläutert:

- Stroma (synonym Interstitium): meint das Zwischengewebe das parenchymatöse Organe durchzieht und umgibt. Gemeint sind damit die Zellen, die keine organspezifische Aufgabe haben, sondern der Ernährung und Vernetzung des Organs dienen.(113)
- EZR: enthält Gewebsflüssigkeit und die extrazelluläre Matrix.(113)
- Extrazelluläre Matrix (EZM): die EZM wird von den Zellen des Stromas gebildet und in den EZR abgegeben. Sie besteht aus vielen verschiedenen Komponenten, unter anderem Kollagenen und hat vielfältige Aufgaben wie Stabilität, Elastizität, Formgebung oder Signaltransduktion.(113)

1.2.1. Hämatopoetische Stammzellnische

Stammzellnischen bestehen für viele Arten von SCs. Diese Nischen ermöglichen ein besonderes Mikroumfeld, so zum Beispiel das BMM für die Hämatopoese, die hämatopoetische Stammzellnische (HSCN).(79)

Die HSCN besteht aus mehreren heterogenen Nischen. Während die vaskuläre Nische hämatopoetische Stamm- und Progenitorzellen (HSPC) zur Mobilisierung, Proliferation und Differenzierung befähigt, ist die osteoblastisch-endostische Nische der Ort, an dem sich die HSPCs über längere Zeit in einem Ruhezustand aufhalten können und Selbsterneuerung betreiben.(53, 88) In ihrer Nische werden die Zellen unter anderem von Osteoblasten und Endothelzellen beeinflusst und reguliert.(6, 25, 139) Dabei interagieren die Zellen miteinander über Oberflächenrezeptoren, gap junctions und eine Vielzahl an löslichen Faktoren wie Zytokinen.(79) Ebenfalls die HSPCs beeinflussen können Ionen wie zum Beispiel Ca^{2+} , das in erhöhter Konzentration die Anreicherung von HSPCs in der Nähe von Osteoblasten am Endost vereinfacht.(79) Darüber hinaus findet man ein hypoxisches Milieu in den Knochenmarknischen vor, welches die Anzahl der Sauerstoffradikale niedrig hält und somit die HSPCs vor oxidativem Stress schützt.(74, 79) Außerdem führt dies zu einer erhöhten Konzentration an Hypoxie-induziertem Faktor 1 Alpha (HIF-1 α) und *vascular endothelial growth factor A* (VEGFA), welche ebenfalls zum Tumorwachstum und Angiogenese beitragen.(19, 39) Auch die EZM beeinflusst das Verhalten der HSPCs. Stromazellen und die EZM schaffen ein Umfeld, in dem sich die HSPCs gut ansiedeln und halten können, sodass sie innerhalb der Nische haften bleiben können, wo sie besonders viele Signale von Nachbarzellen erhalten, die ihr Verhalten regulieren.(79) In der HSCN scheinen besonders die Adhäsionsrezeptoren ScF, CXCR4 und Rac1 und 2 auf Zelloberflächen hochreguliert zu werden.(48, 61, 142) HSCN schaffen also eine optimale Umgebung, um die Entwicklung der HSPCs zu fördern und zu überwachen.

Diese HSCN bieten aber nicht nur für HSPCs eine gute Wachstumsumgebung, sondern können auch von Tumorzellen als Ausgangsort ihres Wachstums akquiriert werden.(23, 38, 116) Die Tumorzellen schaffen sich dabei über verschiedene Wege nach und nach ein eigenes Tumormikroumfeld (TME) und remodellieren auch das vorhandene Gewebe zu ihren Gunsten.(9)

1.2.2. Hämatopoetische Stammzellnische beim Multiplen Myelom

Das Zusammenspiel von MMCs und EZM ist für die Pathogenese des MM von großer Bedeutung.(41, 70, 97) Mitunter wird beim MM sogar von einer Krankheit gesprochen, die als das Modell schlechthin für eine Interaktion zwischen EZM und Stromazellen sowie Tumorzellen gelten kann.(97) Studien konnten zeigen, dass sich das BMM und die löslichen Faktoren von Patienten mit MM im Vergleich zu Gesunden unterscheiden.(15) Mesenchymale Stammzellen (MSCs) sind die Vorläufer von Knochenmarkstromazellen (BMSCs). Über Botenstoffe können MMCs die MSCs dazu bringen zu MM-MSCs zu differenzieren, die das Tumorwachstum begünstigen.(70) Sie hemmen die Funktion und das Wachstum der Osteoblasten in der osteoblastisch-endostischen Nische sowie ihre Differenzierung (s. dazu auch B-Kriterium) und ermöglichen den MMCs eine Nische, in der sie vor apoptotischen Reizen größtenteils geschützt sind.(53, 88, 145) Osteoblasten produzieren Osteoprotegerin (OPG), einen Faktor der andere knochenabbauende Substanzen und Faktoren der MMCs inhibieren kann. Er besitzt jedoch auch eine Bindungsstelle für TNF-related apoptosis-inducing ligand/Apo2 ligand (TRAIL/Apo2L). TRAIL/Apo2L löst bei Bindung an MMCs Apoptose aus, wird jedoch durch Bindung an OPG daran gehindert.(56, 131) Gleichzeitig erhöhen Osteoblasten in der Nähe von MMCs ihre Interleukin-6 (IL-6) Sekretion und stimulieren so die Proliferation der MMCs.(94) Ein weiterer wichtiger Aspekt besteht darin, dass MM-MSCs über Exosomen das Tumorwachstum fördern. Sie geben mittels dieser Exosomen die Möglichkeit der Produktion onkogener Faktoren an MMCs weiter. Diese sind nun in der Lage, diese onkogenen Faktoren selber zu produzieren, so zum Beispiel Fibronectin, das ihnen eine gute Anhaftung in der HSCN ermöglicht. Gleichzeitig konnte in Studien gezeigt werden, dass Exosomen gesunder MSCs das Wachstum der MMCs hemmen.(122) Die Exosomen der MM-MSCs enthalten außerdem weniger vom Tumorsuppressor miR-15a, was das Wachstum der MMCs ebenfalls fördert.(122) MMCs mit der Translokation t(14;16)(q32;q23) und t(14;20)(q32;q11) haben eine erhöhte Aktivität von zwei Transkriptionsfaktoren (c-Maf und MafB), die für eine vermehrte Transkription von NOTCH2 sorgen.(141) Bereits bei vielen MGUS-Patienten tritt eine Hypomethylierung und Acetylierung der Promoterregion von Jagged2 auf, sodass auch diese Transkription vermehrt stattfindet.(71) Eine vermehrte Expression von NOTCH1 und Jagged1 tritt ebenfalls beim Übertritt von MGUS zu MM auf.(132) Notch und Jagged führen zu erhöhter Proliferation, verstärkter Apoptoseresistenz sowie Osteoklastenaktivität.(145)

Auch zwischen den Fibroblasten und den MMCs besteht ein wechselseitiger Austausch von Informationen und Induktionen. Fibroblasten, die das TME durchdringen, können ähnlich wie die MSCs von denen Gesunder abweichen beziehungsweise anders ausgestattet sein. Sie heißen dann Krebs-assoziierte Fibroblasten (CAFs). MMCs induzieren CAF Proliferation und im Gegenzug verstärken diese das Voranschreiten des MM und die Angiogenese durch Produktion verschiedener Faktoren wie *transforming growth factor beta* (TGF- β), IL-6, *stromal cell-derived factor 1* (SDF-1 oder auch CXCL12), *insulin like growth factor 1* (IGF-1), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und *fibroblast growth factor 2* (FGF-2).(49) CXCL12 auf BMSCs bindet an CXCR4 auf MMCs, wodurch diese eine gute Anbindung finden.(2, 69) Außerdem synthetisieren sie EZM Komponenten, die von denen gesunder Fibroblasten abweichen.(133) Während der Progression der MGUS zum MM wird die Produktion einiger EZM Bestandteile hochreguliert.(133) Diese können, wie zum Beispiel Fibronectin, dazu beitragen, dass die Resistenz gegenüber Medikamenten zunimmt.(148)

1.2.3. Kollagen Typ VI

Kollagen Typ VI (COLVI) gehört zur Gruppe der Kollagene, von denen bis heute mindestens 27 verschiedene im menschlichen Körper entdeckt wurden.(105) Jedes Kollagen wird von einem eigenen Gen codiert und besteht zum Teil aus mehreren Subtypen. COLVI selbst wird von bisher 5 bekannten Genen codiert, *COL6A1* – *COL6A3* sowie *COL6A5* – *COL6A6*, die die Subtypen $\alpha 1(VI)$ – $\alpha 3(VI)$ sowie $\alpha 5(VI)$ – $\alpha 6(VI)$ repräsentieren (*COL6A4* welches den Subtyp $\alpha 4(VI)$ repräsentiert ist beim Menschen ein Pseudogen).(47) Dabei lagern sich drei dieser (Subtypen-)Ketten zusammen und bilden eine Tripelhelix, die sich vor allem nach folgendem Schema zusammensetzt: $\alpha 1-\alpha 2-\alpha X$. αX steht dabei für $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\alpha 6$, die eine sehr ähnliche Struktur aufweisen und von denen $\alpha 3$ am häufigsten Verwendung für αX findet.(27, 51) Interessanterweise wird $\alpha 3$, welche deutlich größer ist als $\alpha 1$ und $\alpha 2$, nach der Sekretion noch weiter prozessiert, indem Teile abgespalten werden.(1) Eines dieser abgespaltenen Teile ist Endotrophin (ETP) und spielt besonders bei Neoplasien eine größere Rolle.(111) Die typische Reihenfolge der Aminosäuren der einzelnen Ketten besteht aus Triplets und lautet Glycin-X-Y, wobei X meist für Prolin und Y meist für Hydroxyprolin, Lysin oder Hydroxylysin steht.(121) Im Gegensatz zu den anderen Kollagenen, die als einzelne Tripelhelices sezerniert werden, wird COLVI noch intrazellulär zu einem größeren Molekül zusammengesetzt. Über Disulfidbrücken werden dabei vier Tripelhelices

miteinander zu einem Tetramer verbunden und erst dann sezerniert.(50, 82) Im EZR interagiert COLVI mit Kollagen IV,(85) Kollagen I,(18) Kollagen II,(16) Kollagen XIV,(21) Decorin,(16) Lumican,(143) Heparin,(136) Hyaluronan,(136) und Fibulin-2.(126) COLVI kommt weit verbreitet im Körper vor, unter anderem in Haut, Knochen, Knorpel, Sehnen, Skelettmuskel, Fettgewebe, Blutgefäßen, peripherem und zentralem Nervensystem, aber auch in Herz, Lunge, Gelenken, Bandscheiben, und anderen.(13, 27)

Seine Hauptaufgabe besteht in der Bildung von Netzwerken, welche anderen Molekülen des EZR Möglichkeiten der Anhaftung bieten. Es sorgt somit für Stabilität und Einbindung von Strukturen in das umgebende Gewebe, auch unter den Zellen, die somit ein festes Gewebe überhaupt erst ausbilden können.(32, 81) Zudem kann es intrazelluläre Signalwege in Gang setzen und somit unter anderem Apoptose,(35) Autophagie,(59) Proliferation, Angiogenese,(111) Fibrose und Inflammation regulieren.(111, 137)

1.2.4. Kollagen Typ VI bei Neoplasien

COLVI kommt bei einer Vielzahl von Neoplasien vor, unter anderem in Glioblastomen,(112) Eierstockkrebs,(73, 130) Lungenkrebs,(107) Ösophaguskarzinomen,(107) Pankreaskarzinomen,(5) Brustkrebs,(76, 101, 111) Kolonkrebs,(107, 111, 115) Speicheldrüsenkrebs(4) und weiteren.(32) Dabei liegt seine Expression deutlich höher als im Vergleich zum jeweiligen normalen Gewebe.(5, 58, 76, 101, 107) Dies ist auch an einer deutlich erhöhten Konzentration an ETP erkennbar.(111) Weitere Studien zeigten, dass vor allem *COL6A3* hochreguliert wird und $\alpha 3(\text{VI})$ auf mehr verschiedene Arten prozessiert wird als in gesundem Gewebe, wodurch tumorspezifische $\alpha 3(\text{VI})$ -Isoformen entstehen.(5) Die Ergebnisse belegten ebenfalls, dass COLVI ein anti-apoptotischer Faktor für verschiedene Zelltypen ist(35, 36, 72, 125, 153) und dass das von $\alpha 3(\text{VI})$ abgespaltene Peptid ETP die Proliferation von Tumorzellen erhöht, während eine Reduktion von COLVI zu verringerter Proliferation und erhöhter Tumorzellapoptose führt.(75, 111, 153) Gleichzeitig ist COLVI an der Metastasierung beteiligt. Es begünstigt die Adhäsion und Ausbreitung von Tumorzellen und ermöglicht so eine Verbreitung und Invasion von Tumorzellen.(65) Vor allem *COL6A1*, respektive $\alpha 1(\text{VI})$ wird damit in Verbindung gebracht.(37) Allerdings unterstützt auch ETP die Metastasierung, indem es die TGF- β -abhängige epithelial-mesenchymale Transition (EMT) stimuliert.(111) Tumorzellen verändern oder verlieren dadurch ihre zellspezifischen Eigenschaften

und bekommen damit die Fähigkeit zur Migration.(60, 154) Dadurch hat COLVI in Form von ETP eine sehr direkte Auswirkung auf die Metastasierung von Tumorzellen.(32)

Die Adhäsion der Tumorzellen an EZM-Strukturen, in diesem Fall COLVI, erfolgt über Oberflächenproteine, unter anderem das Proteoglykan Neural/Glial Antigen 2 (NG2) und das Integrin β_1 .(24, 144) Die Bindung der Zellen über diese beiden Oberflächenproteine an COLVI ermöglicht ihnen die Ausbreitung und Ausbildung von Lamellipodien,(144) weshalb die Expression von zum Beispiel NG2 bei einigen Neoplasien heraufreguliert ist.(144) COLVI aktiviert über die Bindung an NG2 und Integrin β_1 Signalkaskaden in den Tumorzellen, die diese zur Ausbreitung und Migration befähigt.(4, 144) Eine erhöhte Expression von NG2 korreliert außerdem mit Therapieresistenz gegenüber antineoplastischen Medikamenten.(150) Das Überleben der Zelle wird dabei über den $\alpha_3\beta_1$ Integrin/Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) Signalweg ermöglicht. NG2 interagiert dabei mit $\alpha_3\beta_1$ Integrin und aktiviert diesen Rezeptor. Wird dabei der PI3K/AKT-Signalweg aktiviert, so verhindert dieser eine durch Tumornekrosefaktor α (TNF α) induzierte Apoptose und verbessert so das Tumorstadium.(76, 150)

In der Tumormasse wird COLVI vor allem in der Nähe von oder in Blutgefäßen gefunden.(58, 107, 112) Dass COLVI die Angiogenese positiv beeinflusst, konnte in einer weiteren Studie gezeigt werden.(153) Die Ergebnisse zeigten, dass die Unterdrückung von COLVI zu verminderter Reifung von Perizyten und einer Störung der Ausbreitung und des Überlebens von Endothelzellen führt. Dies mündete in Gefäßlecks und einer Hemmung der Angiogenese.(153) Die Auswirkung von COLVI wird dem Peptid ETP zugeschrieben, da es nicht nur chemotaktisch auf Endothelzellen wirkt, die daraufhin in die Tumorzellmasse und dessen Umgebung einwandern, sondern auch die Gefäßformation und Migration von Endothelzellen positiv beeinflusst.(111) Eine Bindung von COLVI an $\alpha_3\beta_1$ Integrin auf Endothelzellen kann den FAK-Signalweg aktivieren, welcher ebenfalls zu erhöhter Angiogenese führt.(89)

Für das Wachstum von Tumoren spielt auch die Entzündung eine große Rolle. Sie begünstigt die Entwicklung und Ausbreitung von Tumorzellen. Vor allem Tumor-assoziierte Makrophagen (TAMs) haben dabei eine wichtige Position.(152) Sie unterdrücken die gegen den Tumor gerichtete Immunabwehr, fördern Angiogenese sowie Wachstum und Metastasierung des Tumors.(30, 114, 124) TAMs tendieren vor allem zum M2 Makrophagen-Phänotyp, der eine tumorunterstützende Auswirkung hat.(31, 33, 34, 114, 124) Interessanterweise aber

sind TAMs vor allem je nach Aktivierungs- und Entwicklungsstatus einer der größten Produzenten von COLVI in Neoplasien, was wiederum zu einer verbesserten Adhäsion von TAMs führt.(33, 62, 128) Angelockt werden sie ebenfalls durch ETP.(111)

Darüber hinaus kann COLVI über verschiedene Rezeptoren auf den Tumorzellen Transkriptions- und Wachstumsfaktoren direkt aktivieren und so ebenfalls zu Tumorwachstum und Angiogenese beitragen.(76)

Zahlreiche Studien konnten zudem belegen, dass bei therapieresistenten Tumorzellen im Vergleich zu sensiblen Tumorzellen, die Transkription von *COL6A3* und seinem Spaltprodukt ETP um ein vielfaches erhöht ist, was den Schluss nahelegt, dass COLVI auch zur Therapieresistenz gegenüber Medikamenten beiträgt.(32, 110, 130) Ebenso können wiederum TAMs die Reaktion von Tumorzellen auf Medikamente regulieren.(43, 124) Dies geschieht größtenteils über die Hochregulierung von Metallothioneinen.(46, 76)

ETP kann über Bindung an den Rezeptor Anthrax Toxin Rezeptor 1 (ANTXR1) außerdem zu einer Erhöhung der Selbsterneuerung von Krebsstammzellen führen.(29)

Kurz seien hier noch einmal die Auswirkungen von COLVI auf einige Neoplasien zusammengefasst:

- Anti-apoptotischer Faktor(35, 36, 72, 125, 153)
- Proliferation von Tumorzellen(75, 111, 153)
- Begünstigung von Tumorzelladhäsion, -ausbreitung und Invasion(37, 65)
- Induktion von EMT und damit einhergehender Metastasierung(32, 60, 111, 154)
- Förderung der Angiogenese(111, 153)
- Begünstigung von Tumorentzündung über Makrophagen(4, 30, 34, 114, 124, 128)
- Aktivierung von Transkriptionsfaktoren(76)
- Steigerung von Therapieresistenz(32, 43, 46, 76, 124, 150)

An dieser Stelle sollte allerdings auch erwähnt werden, dass es ebenfalls Studien gibt, die ein gegenteiliges Ergebnis bei anderen Neoplasien erzielten und deren Ergebnisse dafürsprechen, dass COLVI je nach Neoplasie unterschiedliche Funktionen ausübt.(32, 63, 146) So konnte eine Studie zeigen, dass bei Fibrosarkomen die Fähigkeit zur Synthese aller drei notwendigen Polypeptidketten zur Bildung von COLVI komplett fehlt und dort nicht nachweisbar ist,(32, 146) während COLVI bei der familiären adenomatösen Polyposis unter

Behandlung mit Sulindac, welches die Tumormasse reduzierte, gleichzeitig hochreguliert war.(63)

1.3. Prognostische Bedeutung von Kollagen Typ VI

Die prognostische Bedeutung von COLVI ist aktuell Gegenstand vieler Studien. Aufgrund seines großen Einflusses auf Tumorzellen könnte COLVI dabei Ziel von neuen therapeutischen Medikamenten sein und Auskunft über die Prognose eines Patienten geben, denn die Grundlagenforschung der vergangenen Jahre hat gezeigt, dass dem Mikroumfeld einer Neoplasie eine große Bedeutung bei Krankheitsentstehung und -progression zukommt.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine hohe COLVI-Expression beim Speicheldrüsenkarzinom assoziiert ist mit Tumormalignität in Form von hohem Grading, fortgeschrittenen und invasiven T-Stadien, Lymphknotenmetastasen (wobei hier sogar die Anzahl der betroffenen Lymphknoten proportional assoziiert war mit der COLVI-Expression), Proliferation (Ki-67) sowie mutiertem Tumorsuppressorprotein p53 (und damit einhergehend seinem Funktionalitätsverlust).(4) Die gleiche Studie konnte aufzeigen, dass es für Patienten mit wenig COLVI-Expression einen signifikanten 5-Jahres-Überlebensvorteil gab gegenüber solchen mit hoher COLVI-Expression (93,8 % mit geringer COLVI-Expression, 55,1 % für solche mit mittlerer COLVI-Expression und 38,3 % für solche mit hoher COLVI-Expression, $p = 0,002$). Dies blieb in einer multivariablen Analyse signifikant, die die Variablen Geschlecht, Alter, T-Stage, N-Stage, Histologie, Grading und Ki-67 mit einbezog.(4) Insgesamt erwies sich COLVI als Prognoseindikator für das Speicheldrüsenkarzinom, unabhängig von bisher etablierten Risikofaktoren.(4)

Auch für das kolorektale Karzinom (CRC) konnte ein prognostischer Zusammenhang zwischen COLVI und dem Überleben bereits belegt werden. So konnte in zwei Kohorten ein signifikanter Überlebensnachteil für Patienten mit hoher COLVI-Expression nachgewiesen werden ($p = 0,0054$ und $p = 0,0178$). Ebenfalls signifikant korreliert mit hoher COLVI-Expression waren die Progression der Dukes-Stadien, T-Stadien, rauchende Patienten und ein Rezidiv der Erkrankung.(115)

Darüber hinaus konnte auch für das klarzellige Nierenzellkarzinom (ccRCC) eine Korrelation belegt werden. Dabei zeigte sich in zwei Kohorten jeweils ein signifikant schlechteres PFS ($p = 0,007$ und $p < 0,001$) und OS ($p = 0,023$ und $p < 0,001$) für Patienten mit hoher

COLVI-Expression. Auch hier erwies sich COLVI als unabhängiger Prognoseindikator für das ccRCC. Darüber hinaus gab es eine signifikante Korrelation von hoher COLVI-Expression mit dem Alter, T-Stadien, positivem Lymphknotenbefall, Metastasierung und Tumor-Stadium.(149)

Auch beim Glioblastom stellte sich eine signifikante Korrelation zwischen hoher COLVI-Expression und schlechterem Überleben in zwei Kohorten dar ($p < 0,001$ und $p = 0,0002$). (147)

All dies wiederum deutet daraufhin, dass in Zukunft eine zielgerichtete Therapie mit Fokus auf COLVI bei Patienten mit hoher COLVI-Expression immer mehr in den Vordergrund rücken könnte.(32, 63, 146) Dies könnte in Form von Antikörpern oder kleinen Molekülen die inhibierend wirken auf Rezeptoren für COLVI, ETP oder in der Signalkaskade weiter vorangelegene Rezeptoren geschehen.(4) So werden zur Zeit in klinischen Studien bei Patienten mit soliden Tumoren Inhibitoren für AKT und FAK untersucht.(22, 90) Auch eine auf Antikörpern basierte und gegen ANTXR1 gerichtete Therapie konnte bereits Wirksamkeit in experimentellen Mäusemodellen zeigen.(28, 110) Darüber hinaus wäre COLVI auch ein mögliches Ziel für beladene Antikörper (sogenannte *armed-antibodies*). Diese könnten zum Beispiel mit Chemotherapeutika, Zytokinen wie Interleukin-2 (IL-2) oder Radionukliden bestückt sein, um diese Effektormoleküle gezielt in das Tumorgewebe zu lenken.(4, 64, 127)

Gleichzeitig müssen die Substanzen so ausgerichtet werden, dass sie zwar Aktivität gegen den Tumor und das TME entfalten, nicht jedoch dem gesunden Gewebe schaden. COLVI wäre hierfür möglicherweise eine geeignete Zielstruktur, da es wie oben beschrieben im gesunden Gewebe oft sehr viel weniger exprimiert wird als im Tumorgewebe.

1.4. Ziele dieser Arbeit

Die Rolle von COLVI beim MM ist bislang unklar. Mit dieser Arbeit soll eine prognostische Bedeutung von COLVI beim MM untersucht und auf ihren klinischen Nutzen hin bewertet werden. Dabei ist die Hypothese, dass eine hohe COLVI-Expression mit einer ungünstigen Prognose assoziiert ist. Zur Validierung der Ergebnisse werden diese mit öffentlich zugänglichen Genexpressionsdatasets verglichen. In Verbindung mit weiteren klinischen Daten können eventuell darüber hinaus noch zusätzliche Schlüsse beziehungsweise Hypothesen über COLVI beim MM gezogen werden.

2. PATIENTEN, MATERIAL & METHODEN

2.1. Studienaufbau

Für eine Aussage bezüglich der prognostischen Bedeutung von COLVI beim MM wurden die klinischen Daten in Frage kommender Patienten gesammelt. Dies geschah mittels Microsoft Excel V.16.16.1 (für Mac) und Numbers V.5.1. Mittels Orbis und dem Archiv der Pathologie wurde ermittelt, zu welchem Zeitpunkt die zur Verfügung stehenden Knochenmarkstanzen entnommen wurden und ob die Patienten daraufhin in die Studie aufgenommen werden konnten oder ausgeschlossen werden mussten. Die herausgesuchten Knochenmarkstanzen wurden zu Gewebe-Microarrays (TMA) verarbeitet und mittels Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP)-Färbung gefärbt. Anschließend erfolgte die Auswertung der gefärbten TMAs und die statistische Aufarbeitung der gewonnenen Daten. Zur Validierung der Ergebnisse wurden öffentlich zugängliche Genexpressionsdatasets aus dem Gene Expression Omnibus (GEO) verwendet und mit den Ergebnissen dieser Arbeit verglichen. Die Studie wurde von der lokalen Ethik-Kommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der Westfälischen-Wilhelms Universität Münster (2016-654-f-S) am 16.12.2016 genehmigt und erfolgte in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki.

2.2. Patientenauswahl

Für die Studie wurden Patienten ausgewählt, deren Knochenmarkstanze vor der Induktionstherapie entnommen wurde. Die Stanzen stammten dabei aus einem Zeitraum vom 01.11.1996 bis zum 30.09.2016 und wurden allesamt am Universitätsklinikum Münster (UKM) gewonnen. Insgesamt wurden 99 Patienten in die Studie aufgenommen.

Folgende Einschlusskriterien galten für die Patienten:

- Symptomatisches MM
- Alter ≥ 18 Lebensjahre
- Entnahmedatum der verfügbaren Knochenmarkstanze vor Induktionstherapie

Folgende Ausschlusskriterien galten für die Patienten:

- Keine Probe vorhanden
- Entnahmedatum der frühesten verfügbaren Knochenmarkstanze nach der Induktionstherapie

- Keine Plasmazellinfiltration in der Probe
- Unklares Entnahmedatum der Knochenmarkstanze

Mit Hilfe der elektronischen Patientenakten wurden klinische Daten der Patienten gesammelt um einen Vergleich zu ermöglichen (**Tabelle 1**).

Variablen	Einheit
Alter	Jahre
Geschlecht	männlich/weiblich
Gesamtüberleben	Tage
Befund der FISH	Freitext
del(1)(p32)	nein/ja
amp(1)(q21)	nein/ja
del(13)(q14)	nein/ja
Rearrangement 14q32	nein/ja
t(4;14)	nein/ja
t(6;14)	nein/ja
t(11;14)	nein/ja
t(14;16)	nein/ja
t(14;20)	nein/ja
del(17)(p13)	nein/ja
Vorausgegangene Plasmazellerkrankung	nein/aus MGUS/aus asymptomatischem Myelom/aus Plasmozytom
ISS-Stadium	1/2/3
R-ISS-Stadium	1/2/3
Initiallaborwerte	
Serum-Calcium	mmol/l
Serum-Kreatinin	mg/dl
Serum-Lactatdehydrogenase	U/l
Hämoglobin	g/l
beta-2-Mikroglobulin	mg/l
Albumin	g/dl
Osteolysen bei Diagnosestellung	nein/ja
Extramedulläre Krankheit ohne Knochenmarkassoziation bei Diagnosestellung	nein/ja
Hyperviskositätssyndrom bei Diagnosestellung	nein/ja
Leichtkettenspeicherkrankheit bei Diagnosestellung	nein/ja

AL Amyloidose bei Diagnosestellung	nein/ja
Schwerkette	keine/IgG/IgA/IgD
Leichtkette	kappa/lambda
Konzentration der Schwerkette vor Induktionstherapie	mg/dl
Konzentration der Leichtkette vor Induktionstherapie	mg/dl
Art der Induktionstherapie	Freitext
Zweite Hochdosistherapie = Tandemhochdosistherapie	nein/ja
Erhaltungstherapie	nein/ja
progressionsfreies Überleben	Tage
Allo-SCT	nein/ja
Anzahl der Tage von Auto-SCT bis Leukozyten-Engraftment	Tage
Anzahl der Tage von Auto-SCT bis Thrombozyten-Engraftment	Tage

Tabelle 1 | Klinische und erkrankungsassoziierte Variablen. Aufgelistet in dieser Tabelle finden sich alle Variablen, die mittels Orbis gesammelt wurden. Abkürzungen: FISH, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung; MM, Multiples Myelom; ISS, International Staging System; R-ISS, Revised International Staging System; Allo-SCT, allogene Stammzelltransplantation; Auto-SCT, autologe Stammzelltransplantation.

2.3. Nachweis von Kollagen Typ VI im Knochenmark

Der Nachweis von COLVI im KM erfolgte immunhistochemisch mittels APAAP-Methode(40) von TMAs.

2.3.1. Vorbereitung

Anhand der Journalnummern wurden die einzelnen, bereits eingebetteten Knochenmarkstanzen sowie die schon aus früheren Anfragen erstellten und gefärbten Schnittpräparate der jeweiligen Knochenmarkstanze in der Pathologie herausgesucht.

Unter dem Mikroskop (BX53, Olympus) wurde die Infiltration des MM im KM auf den Schnittpräparaten markiert. Mittels dieser Markierung konnte dann auf den eingebetteten Knochenmarkstanzen das Areal der Infiltration ermittelt und aus diesem mit dem Paraffinblockstanzer (Paraffinblockstanze Tissue Arrayer, Seriennummer 109143/169447, Beecher CO) eine Stanze mit dem Durchmesser 2 mm entnommen werden. Diese Stanzen wurden zu TMAs der Form 7x6 (sieben Spalten á sechs Stanzen) zusammengesetzt, von welchen

dann neue Schnittpräparate der Dicke 2 μm mit dem Mikrotom (Rotationsmikrotom HM 360, Seriennummer 11170, Microm Walldorf) erstellt und auf Objektträgern fixiert wurden. Dabei entstanden 9 TMA-Schnittpräparate.

2.3.2. Färbung

Die 9 TMA-Schnittpräparate wurden nun zusammen mit 7 Vergleichspräparaten im Labor der Angiogenese am UKM mit einem Anti-COLVI-Antikörper gefärbt. Hierfür wurde die APAAP-Methode nach Laborprotokoll benutzt. Die Kontrollen stammten von Patienten, bei denen eine Knochenmarkprobe zum Ausschluss einer systemischen Mastozytose im Rahmen einer allergischen Reaktion entnommen wurde. Eine systemische Mastozytose konnte bei allen Kontrollen ausgeschlossen werden.

2.3.2.1. Deparaffinierung

Dem Protokoll entsprechend wurden als erstes die Objektträger zur Deparaffinierung dreimal für je 5 min bei Raumtemperatur (RT) in Küvetten mit Xylol behandelt. Es folgte eine absteigende Alkoholreihe mit Ethanol von 100-95-70-50 %, in der die Schnitte für je 2 min verblieben und eine 15-minütige Waschung in Tris-buffered saline (TBS) als Puffer.

2.3.2.2. Antigendemaskierung

Der Waschung folgte die Antigendemaskierung mittels Zitratpuffer (Target Retrieval Solution, Citrate pH 6 (DAKO, S2031)), welcher im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser (dH_2O) hergestellt wurde.

Für die Antigendemaskierung wurde der Zitratpuffer in eine Küvette gefüllt und für 1 min bei 450 W in der Labormikrowelle vorgewärmt. Anschließend wurden die Objektträger in den vorgewärmten Zitratpuffer verbracht und der Zitratpuffer mit den Objektträgern bei 450 W für 15 min zum Kochen gebracht. Jeweils nach 5 min wurde die Lösung bis zum vorher markierten Spiegel wieder mit dH_2O aufgefüllt, um zu verhindern, dass die Objektträger austrocknen und dadurch Schaden nehmen. Nach Ablauf der 15 min wurde die Küvette erneut mit dH_2O aufgefüllt und das Ganze für 20 min bei RT zum Abkühlen gebracht.

Final wurden die Objektträger erst für 5 min mit dH₂O und anschließend für weitere 5 min mit TBS gewaschen.

2.3.2.3. Proteinblockierung

Das auf den Objektträgern verbliebene Gewebe wurde nun mit einem Silikonstift (DAKO, S2002) umrandet. Um eine unspezifische indifferente Hintergrundfärbung zu verhindern beziehungsweise zu verringern, wurde ein Proteinblock (Protein Block Serum-Free (DAKO, X0909)) aufgetragen und für 30 min bei RT in einer Feuchtkammer damit inkubiert.

2.3.2.4. Primärantikörperreaktion

Der Primärantikörper (NB120-6588, pAb anti-CollagenVI, Lot 21632, 0,1 mg immunogen affinity purified Rabbit Sera 2,0 mg/ml) wurde zuerst mit einem Antikörperverdünnungsmittel (Antibody Diluent, Background Reducing (DAKO, S3022)) im Verhältnis 1:800 verdünnt und dann aufgetragen. Insgesamt wurden dafür 3196 µl Diluent und 4 µl Primärantikörper benötigt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte dabei über Nacht in einer Feuchtkammer bei 4°C.

2.3.2.5. Sekundär-, Tertiär- und Quartärantikörperreaktion

Die APAAP-Methode sieht einen Brückenantikörper, sogenannter Sekundärantikörper, als Bindeglied zwischen APAAP-Komplex (besteht aus einem Antikörper und dem Enzym alkalische Phosphatase (AP)) und Primärantikörper vor. Da es sich bei dem Primärantikörper um einen Kaninchenantikörper handelt, wird noch ein weiterer Antikörper als Brücke benötigt. Dafür wurden die Objektträger nach der Inkubationsnacht zunächst jeweils dreimal für 3 min in TBS gewaschen. Der Sekundärantikörper (monoclonal mouse anti-rabbit immunoglobulins (DAKO, M0737)) wurde in einem Verhältnis von 1:100 verdünnt aufgetragen und die Objektträger dann für 45 min in einer Feuchtkammer bei RT inkubiert. Es folgte eine weitere Waschung mit dreimal 3 min TBS, bevor der Tertiärantikörper (polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins (DAKO, Z0259)) aufgetragen wurde. Dieser wurde davor in einem Verhältnis von 1:25 verdünnt. Die Inkubationszeit betrug auch hier 45 min bei RT in einer Feuchtkammer. Nach erneuter Waschung von 3x3 min mit TBS wurde der APAAP-Komplex (APAAP mouse monoclonal (DAKO, D0651)) hinzugefügt. Dieser wurde vorher

in einem Verhältnis von 1:50 verdünnt. Die letzte Inkubation erfolgte nun nur noch für 30 min bei RT in einer Feuchtkammer, bevor die Objektträger final für dreimal 3 min mit TBS gewaschen wurden.

2.3.2.6. Farbreaktion

Für die Farbreaktion wurde eine Fuchsinsubstanz (Fuchsin+Substrate-Chromogen (DAKO, K0625)) eingesetzt. Nach Herstelleranleitung wurden dafür zur Aktivierung 60 µl Fuchsin+Chromogen mit 60 µl Fuchsin+ActivatingAgent gemischt und für 1 min bei RT stehen gelassen. Danach wurden 880 µl Fuchsin+SubstrateBuffer hinzugefügt und das Ganze ordentlich miteinander vermischt. Die nun fertige Mischung wurde sofort aufgetragen, da sie nur begrenzte Zeit verwendbar ist. Unter mikroskopischer Kontrolle wurden die Objektträger damit bei RT für ca. 30 min inkubiert und die Reaktion bei gut erkennbarer Anfärbung mittels dH₂O gestoppt.

2.3.2.7. Gegenfärbung

Als letzter Schritt erfolgte nun für jeweils 8 s die Gegenfärbung der Objektträger mittels Mayer's Hämaunlösung (Mayer's Hämaunlösung, Merck 109249). Diese wurde dafür in einem Verhältnis von 1:2 mit dH₂O verdünnt. Nach der Färbung wurden die Objektträger in einer Küvette unter Laufendem Leitungswasser für 10 min gebläut.

Über Nacht wurden die Objektträger dann bei RT getrocknet. Am Folgetag wurden sie dann mit einer Glycergel-Eindecklösung (GVA mounting solution, ZYMED) fertiggestellt.

2.3.3. Auswertung der Färbungen

Nach Abschluss des Färbeprotokolls wurden die Objektträger in der Anatomie des UKM mit dem Gerät Zeiss MIRAX MIDI BF eingescannt und am Computer mit dem Programm Panoramic Viewer (V.1.15.4) ausgewertet. Die Expression wurde anhand der Färbeintensität mit einem Immunreaktivitäts-Score (IRS) in vier Grade (0 = negativ, 1 = niedrig, 2 = mittel, 3 = stark) eingeteilt. Negativkontrollen blieben dabei negativ.

2.4. Kollagen Typ VI Alpha 1-mRNA-Expressionsdaten aus Gene Expression Omnibus

Um einen Vergleich der gewonnenen COLVI-Expressionsdaten zu ermöglichen wurde auf öffentlich zugängliche Genexpressionsdatasets aus dem GEO zurückgegriffen. Es wurden die COLVI Alpha 1 (*COL6A1*)-messenger Ribonukleinsäure (mRNA)-Expressionsdaten von drei verschiedenen Kohorten genutzt, mit den GEO-Nummern:

- Kohorte 1: GSE2658
- Kohorte 2: GSE9782
- Kohorte 3: GSE57317

2.4.1. Kohorte 1

Das Genexpressionsdataset aus dem GEO mit der Nummer GSE2658 enthielt die Daten von 559 Patienten. Die Daten der Kohorte 1 wurden von Patienten mit einem neu diagnostizierten MM gewonnen. Die Patienten waren Teilnehmer einer Studie in der es um die Fragestellung prädiktiver Marker für das Ansprechen und Überleben auf eine bestimmte Therapie bei MM-Patienten ging.(156) Die Patienten erhielten eine Total-Therapie II oder III nach Barlogie, unter anderem mit Tandemhochdosistherapie.(11, 106) Den Patienten wurde vor Therapie mittels Knochenmarkpunktion ein Aspirat entnommen welches dann aufgereinigt wurde um lediglich CD138+-Zellen (Plasmazellen) zu erhalten. Es folgte eine Genexpressionsanalyse der Zellen durch highdensity oligonucleotide DNA-Microarray.(155, 156)

2.4.2. Kohorte 2

Das Genexpressionsdataset aus dem GEO mit der Nummer GSE9782 enthielt die Daten von 264 Patienten. Die Daten der Kohorte 2 wurden von Patienten mit einem MM-Rezidiv in den Ländern USA, Kanada, Europa und Israel gesammelt. Die Patienten waren dabei mit ein bis drei Therapielinien vorbehandelt. Die Patienten waren Teilnehmer einer Studie in der herausgefunden werden sollte ob es prädiktive Marker gibt für ein Ansprechen und Überleben bei Rezidiv bei Therapie mittels B im Vergleich zu Kontrollpatienten die mit D behandelt wurden. Den Patienten wurde vor Beginn der Therapie mittels Knochenmarkpunktion ein Aspirat entnommen welches dann aufgereinigt wurde um lediglich MMCs zu erhalten. Es folgte eine Genexpressionsanalyse der Tumorzellen durch DNA-Microarray.(103)

2.4.3. Kohorte 3

Das Genexpressionsdataset aus dem GEO mit der Nummer GSE57317 enthielt die Daten von 55 Patienten. Die Daten der Kohorte 3 stammen von Patienten die bereits zuvor

therapiert worden waren, nicht jedoch mit einer Auto-SCT. Die Patienten waren Teilnehmer einer Studie, in der ein bereits zuvor gewonnenes 70-Gen-Erkennungsmuster für Hochrisikopatienten mit einem kurzen PFS und niedrigem OS überprüft werden sollte um dieses auf einige wenige Gene reduzieren zu können. Dafür erhielten die Patienten eine Induktionstherapie aus einer Kombination von M, B, T, D, Cisplatin, Doxorubicin, C und Etoposid (M-VTD-PACE-Schema) gefolgt von einer M-VTD-PACE-Hochdosistherapie mit doppelter Auto-SCT und einer Erhaltungstherapie im monatlichen Wechsel aus B, Lenalidomid, D und B, M, D über drei Jahre. Den Patienten wurde mittels Knochenmarkpunktion ein Aspirat entnommen welches dann aufgereinigt wurde um lediglich CD138+-Zellen (Plasmazellen) zu erhalten. Es folgte eine Genexpressionsanalyse der Zellen durch highdensity oligonucleotide DNA-Microarray.(68, 155, 156)

2.5. Statistische Auswertung

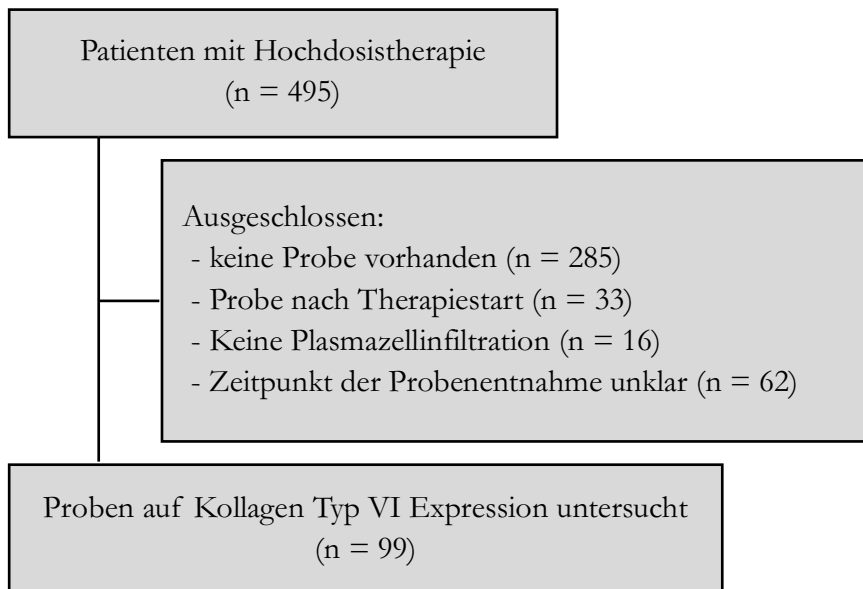
Patienten mit keiner oder wenig COLVI-Expression (IRS 0-1) sowie Patienten mit mittlerer und hoher COLVI-Expression (IRS 2-3) wurden statistisch miteinander verglichen. Für den Vergleich mit den *COL6A1*-mRNA-Expressionsdaten wurden die Kohorten in jeweils zwei Gruppen eingeteilt, solche mit niedriger Expression (50 % der Patienten unterhalb des Medians) und solche mit hoher Expression (50 % der Patienten oberhalb des Medians). Klinische und molekulare Variablen wurden unter der Verwendung des χ^2 -Tests oder dem exakten Test nach Fisher für die kategorialen und dem Mann-Whitney-U-Test für die kontinuierlichen Variablen verglichen. Überlebenswahrscheinlichkeiten wurden mit Kaplan-Meier-Kurven berechnet und mit Hilfe von Logrank-Tests verglichen; alle Überlebenswahrscheinlichkeiten für die COLVI-Expression wurden dabei als Fünfjahresüberlebensrate angegeben. Das OS wurde dabei als Zeit von Beginn der Induktion bis zum Tod (Ereignis) oder bis zum letzten Kontakt (zensiert) gemessen. Für das PFS wurde von Beginn der Induktion bis zum Rezidiv, Progress oder Tod (Ereignis) beziehungsweise - falls keines der Ereignisse eingetreten war - bis zum letzten Kontakt (zensiert) gemessen. Die statistische Ausarbeitung erfolgte mit der Software SPSS Statistics Version 25 von IBM.

3. ERGEBNISSE

3.1. Tatsächlicher Patientenumfang (drop outs)

Von anfangs 495 Patienten konnten 285 nicht in die Untersuchung eingeschlossen werden, weil von ihnen keine Knochenmarksprobe vorhanden war. Von weiteren 33 Patienten lag die Probe zwar vor, sie war jedoch nach Therapiestart entnommen. 16 Patienten mussten ausgeschlossen werden, weil sie histologisch keine Plasmazellinfiltration aufwiesen. Einige Patientendaten konnten aufgrund des Alters nur auf die Jahreszahl genau bestimmt, beziehungsweise nachverfolgt werden. Leider war aufgrund dieser Tatsache ein genauer Vergleich der Daten nur bedingt möglich, da für die Studie nur Patienten eingeschlossen werden konnten, deren Entnahmedatum der Knochenmarkstanze definitiv vor der Induktionstherapie lag. Vor allem Patienten, deren Entnahmedatum überwiegend vor Mitte 2003 lag, konnten daher nicht in die Studie aufgenommen werden. Dies hatte zur Folge, dass der Patientenumfang aufgrund des unklaren Zeitpunkts der Probenentnahme um weitere 62 Patienten reduziert werden musste, sodass schlussendlich 99 Patienten in die Studie aufgenommen werden konnten (**Flussdiagramm 1**).

Es ergab sich kein Ausschluss aufgrund von qualitativ nicht ausreichender Färbung. Lediglich ein Kontrollschnitt konnte aufgrund technischer Probleme nicht ausgewertet werden.



Flussdiagramm 1 | Auswahl und Ausschluss der Patienten beziehungsweise Patientenproben. Von 495 Patienten wurden 285 ausgeschlossen, weil keine Probe vorhanden war, 33 weil ihre Probe nach Therapiestart entnommen wurde, 16 weil die Probe keine Plasmazellinfiltration aufwies und 62 weil der Entnahmezeitpunkt der Probe unklar war. Die Kollagen Typ VI Expression wurde bei 99 Patienten untersucht.

3.2. Auswertung der Färbungen

Die Auswertung der Färbungen erfolgte in vier Gruppen im Vergleich zu den Kontrollschnitten (**Abbildung 1**):

- IRS 0 = keine Färbung → keine Expression von COLVI
- IRS 1 = wenig Färbung → niedrige Expression von COLVI
- IRS 2 = mittlere Färbung → mittlere Expression von COLVI
- IRS 3 = viel Färbung → starke Expression von COLVI

Von den sieben Kontrollschnitten aus dem KM anderer Patienten waren sechs auswertbar und zeigten einen IRS von 1. Bei den Patienten zeigten 12 (= 12,12 %) einen IRS von 0, 66 (= 66,67 %) einen IRS von 1, 16 (= 16,16 %) einen IRS von 2 und 5 (= 5,05 %) einen IRS von 3.

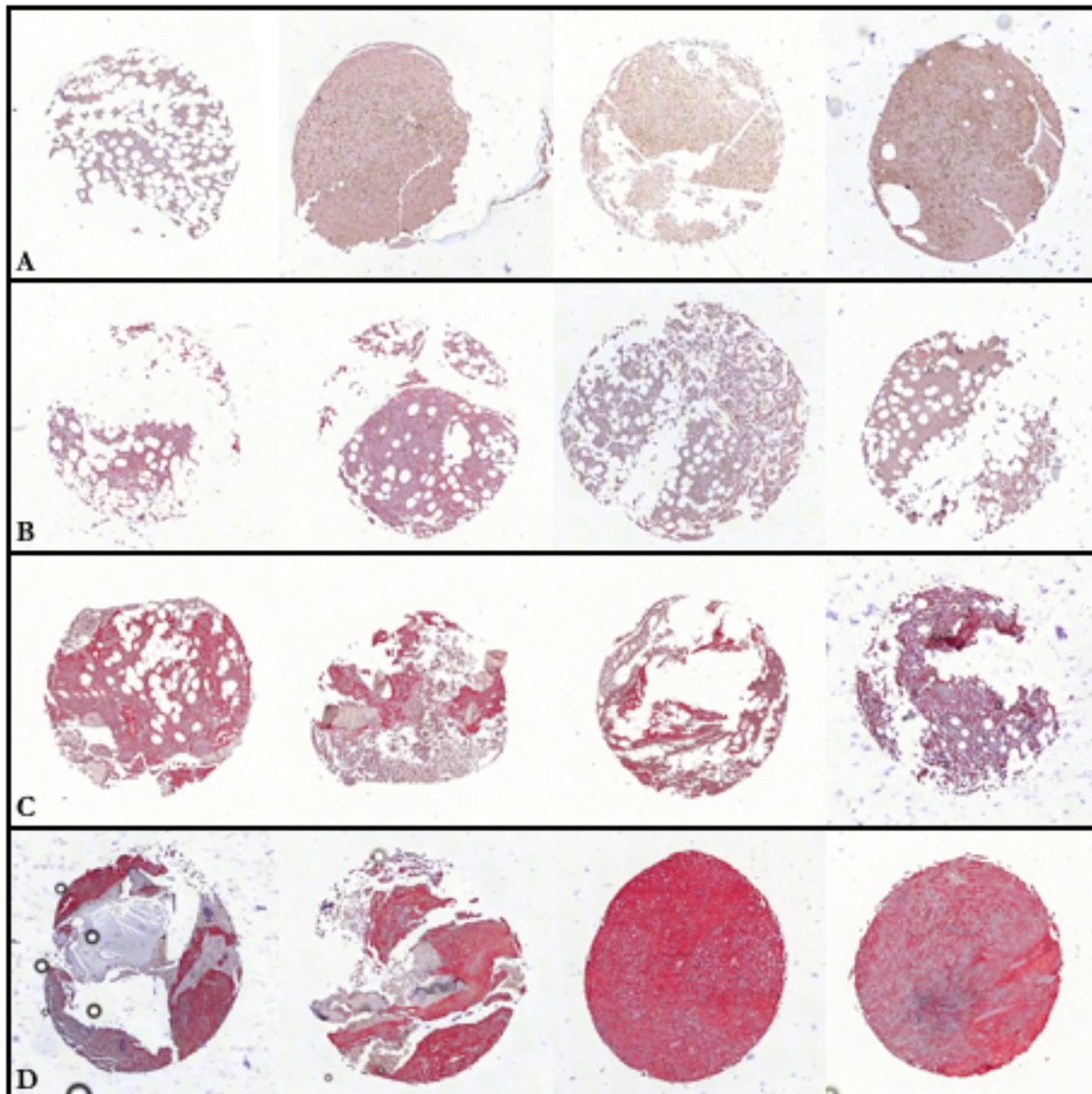


Abbildung 1 | Darstellung der Expressionsmuster von Kollagen Typ VI (COLVI) mittels APAAP-Färbung. Reihe A zeigt Schnittbilder von Patienten mit keiner Expression von COLVI (IRS 0), Reihe B solche von Patienten mit wenig Expression (IRS 1). Reihe C und Reihe D zeigen mittlere Expression (IRS 2), respektive viel Expression (IRS 3).

3.3. Vergleich Multiples Myelom vs. Kontrollen

Die Auswertung der COLVI-Expression in den MM-Schnittpräparaten im Vergleich zu den Kontrollen erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Dabei zeigte sich keine statistisch signifikant erhöhte COLVI-Expression in den MM-Schnittpräparaten gegenüber den Kontrollen ($p = 0,334$).

3.4. Deskriptive Statistik

Für die Auswertung der deskriptiven Daten mittels SPSS wurden die vier Expressionsmuster in zwei Gruppen eingeteilt, solche mit niedriger Expression (IRS 0-1, n = 78 (78,78 %) und solche mit hoher Expression (IRS 2-3, n = 21 (21,21 %)).

Bei den erhobenen klinischen Daten zeigte sich eine Signifikanz für Patienten mit niedriger COLVI-Expression gegenüber solchen mit hoher COLVI-Expression lediglich für LDH (p = 0,027) und die Schwerkettenexpression (HC) (p = 0,004) (**Tabelle 2**).

Patienten mit niedriger COLVI-Expression hatten dabei signifikant seltener monoklonales IgA (16,7 % vs. 33,3 %), häufiger monoklonales IgG (53,8 % vs. 42,9 %) und häufiger ein Leichtkettenmyelom (29,5 % vs. 9,5 %) als solche mit hoher COLVI-Expression. Außerdem hatten sie im Durchschnitt eine signifikant erhöhte LDH-Konzentration bei Diagnosestellung (196 U/l vs. 162 U/l).

Für die Calcium-, Kreatinin-, Hämoglobin-, beta-2-Mikroglobulin- und Albuminkonzentration sowie die Konzentration der Leicht- und Schwerkette bei Induktion, die Anzahl der Tage von Allo-SCT bis Leukozyten- und Thrombozyten-Engraftment sowie für das Alter zeigte sich im Mann-Whitney-U-Test keine Signifikanz bzgl. eines Unterschiedes zwischen solchen Patienten mit niedriger COLVI-Expression und solchen mit hoher COLVI-Expression (**Tabelle 2**).

Ebenfalls zeigte sich für Geschlecht, sekundäres MM, R-ISS, Osteolysen, Extramedulläre Manifestationen, Hyperviskosität, Leichtkettenspeicherkrankheit, AL Amyloidose, Leichtkette (LC), Art der Induktionstherapie, Erhaltungstherapie, Tandemhochdosistherapie, Allo-SCT, del(1)(p32), amp(1)(q21), del(13)(q14), Rearrangement 14q32, t(4;14), t(6;14) t(11;14), t(14;16), t(14;20) und del(17)(p13) im exakten Test nach Fisher, respektive χ^2 -Test, kein signifikanter Unterschied (**Tabelle 2**).

Variablen	Kollagen Typ VI niedrig	Kollagen Typ VI hoch	Test	p-Wert
N	78	21		
Calcium, mmol/l			Mann-Whitney-U-Test	0,638
Median (range)	2,33 (1,87-3,96)	2,35 (2,03-3,06)		
Kreatinin, mg/dl			Mann-Whitney-U-Test	0,521
Median (range)	1,1 (0,5-10,2)	0,9 (0,5-9,8)		
LDH, U/l			Mann-Whitney-U-Test	0,027

Median (range)	196 (103-630)	162 (110-245)		
Hb, g/dl			Mann-Whitney-U-Test	0,593
Median (range)	11,0 (4,5-17,1)	11,05 (8,1-15,0)		
b2M, mg/l			Mann-Whitney-U-Test	0,652
Median (range)	3,21 (1,29-67,40)	2,52 (1,89-16,77)		
Albumin, g/dl			Mann-Whitney-U-Test	0,239
Median (range)	4,195 (1,83-5,61)	4,32 (2,70-5,48)		
Heavy Chain, mg/dl			Mann-Whitney-U-Test	0,929
Median (range)	3452 (606-11517)	4264 (67-7140)		
Light Chain, mg/dl			Mann-Whitney-U-Test	0,235
Median (range)	452 (0-61100)	149 (0-47800)		
WBC engraftment, Tage			Mann-Whitney-U-Test	0,060
Median (range)	11 (10-27)	12 (9-17)		
PLT engraftment, Tage			Mann-Whitney-U-Test	0,155
Median (range)	12 (8-44)	13 (10-28)		
Alter, Jahre			Mann-Whitney-U-Test	0,628
Median (range)	57 (35-75)	56 (40-68)		
Geschlecht, Anzahl (%)			χ^2 -Test	0,143
männlich	50 (64,1)	17 (81,0)		
weiblich	28 (35,9)	4 (19,0)		
Vorausgegangene Plasma- zellerkrankung, Anzahl (%)			Fisher's-Exakt-Test	0,077
Asymptomatisches Myelom	4 (5,1)	1 (4,8)		
MGUS	6 (7,7)	5 (23,8)		
Plasmozytom	3 (3,8)	0 (0)		
nein	65 (83,3)	14 (66,7)		
unbekannt	0 (0)	1 (4,8)		
R-ISS, Anzahl (%)			Fisher's-Exakt-Test	0,426
1	19 (30,2)	8 (47,1)		
2	36 (57,1)	7 (41,2)		
3	8 (12,7)	2 (11,8)		
Osteolysen, Anzahl (%)			Fisher's-Exakt-Test	0,438
nein	7 (9,0)	3 (14,3)		
ja	71 (91,0)	18 (85,7)		

EM Manifestationen, Anzahl (%)			Fisher's-Exakt-Test	0,519
nein	75 (97,4)	20 (95,2)		
ja	2 (2,6)	1 (4,8)		
Hyperviskosität, Anzahl (%)			Fisher's-Exakt-Test	0,384
nein	76 (98,7)	20 (95,2)		
ja	1 (1,3)	1 (4,8)		
LCDD, Anzahl (%)			Fisher's-Exakt-Test	1,000
nein	75 (97,4)	21 (100,0)		
ja	2 (2,6)	0		
AL Amyloidose, Anzahl (%)			Fisher's-Exakt-Test	1,000
nein	73 (94,8)	20 (95,2)		
ja	4 (5,2)	1 (4,8)		
Monoklonale Leichtkette, Anzahl (%)			χ^2 -Test	0,587
kappa	46 (59,0)	11 (52,4)		
lambda	32 (41,0)	10 (47,6)		
Monoklonale Schwerekette, Anzahl (%)			Fisher's-Exakt-Test	0,004
IgA	13 (16,7)	7 (33,3)		
IgG	42 (53,8)	9 (42,9)		
IgD	0 (0)	2 (9,5)		
keine	23 (29,5)	2 (9,5)		
unbekannt	0 (0)	1 (4,8)		
Art der Induktion			Fisher's-Exakt-Test	0,420
Erhaltung, Anzahl (%)			Fisher's-Exakt-Test	1,000
nein	63 (80,8)	17 (81,0)		
ja	15 (19,2)	4 (19,0)		
Tandem HD, Anzahl (%)			Fisher's-Exakt-Test	0,732
nein	67 (85,9)	17 (81,0)		
ja	11 (14,1)	4 (19,0)		
Allo-SCT, Anzahl (%)			Fisher's-Exakt-Test	0,732
nein	66 (85,7)	17 (81,0)		
ja	11 (14,3)	4 (19,0)		
del(1)(p32), Anzahl (%)			Fisher's-Exakt-Test	1,000
nein	68 (95,8)	17 (94,4)		

ja	3 (4,2)	1 (5,6)		
amp(1)(q21), Anzahl (%)			Fisher's-Exakt-Test	0,347
nein	55 (77,5)	16 (88,9)		
ja	16 (22,5)	2 (11,1)		
del(13)(q14), Anzahl (%)			χ^2 -Test	0,913
nein	45 (62,5)	11 (61,1)		
ja	27 (37,5)	7 (38,9)		
t(v;14q32), Anzahl (%)			χ^2 -Test	0,966
nein	43 (60,6)	11 (61,1)		
ja	28 (39,4)	7 (38,9)		
t(4;14), Anzahl (%)			Fisher's-Exakt-Test	1,000
nein	64 (91,4)	17 (94,4)		
ja	6 (8,6)	1 (5,6)		
t(6;14), Anzahl (%)			Fisher's-Exakt-Test	1,000
nein	68 (98,6)	17 (100,0)		
ja	1 (1,4)	0 (0)		
t(11;14), Anzahl (%)			Fisher's-Exakt-Test	0,599
nein	65 (94,2)	16 (88,9)		
ja	4 (5,8)	2 (11,1)		
t(14;16), Anzahl (%)			Fisher's-Exakt-Test	1,000
nein	68 (98,6)	17 (100,0)		
ja	1 (1,4)	0 (0)		
t(14;20), Anzahl (%)				konstant
nein	69 (100,0)	17 (100,0)		
ja	0 (0)	0 (0)		
del(17)(p13), Anzahl (%)			Fisher's-Exakt-Test	1,000
nein	64 (88,9)	16 (88,9)		
ja	8 (11,1)	2 (11,1)		

Tabelle 2 | Deskriptive Statistik klinisch erhobener Daten. Die Auswertung der klinischen Daten mittels Mann-Whitney-U-Test für die stetigen und χ^2 -Test oder dem exakten Test nach Fisher für die nominalen Variablen ergab signifikante Unterschiede für Patienten mit niedriger COLVI-Expression (IRS 0-1) gegenüber solchen mit hoher COLVI-Expression (IRS 2-3) für die Variablen LDH und die Art der Schwerkette (HC). Patienten mit niedriger COLVI-Expression hatten dabei signifikant seltener monoklonales IgA (16,7 % vs. 33,3 %), häufiger monoklonales IgG (53,8 % vs. 42,9 %) und häufiger ein Leichtkettenmyelom (29,5 % vs. 9,5 %) als solche mit hoher COLVI-Expression. Außerdem hatten sie im Durchschnitt eine signifikant erhöhte LDH-Konzentration bei Diagnosestellung (196 U/l vs. 162

U/l). Abkürzungen: LDH, Lactatdehydrogenase; Hb, Hämoglobin; b2M, beta-2-Mikroglobulin; Heavy chain, Konzentration der Schwerekette bei Induktion; Light chain, Konzentration der Leichtkette bei Induktion; WBC engraftment, Anzahl der Tage von Auto-SCT bis Leukozyten-Engraftment; PLT engraftment, Anzahl der Tage von Auto-SCT bis Thrombozyten-Engraftment; R-ISS, Revised International Staging System; EM Manifestation, Extramedulläre Manifestation; LCDD, Leichtkettenspeicherkrankheit; Tandem HD, Tandemhochdosistherapie; Allo-SCT, allogene Stammzelltransplantation.

3.5. Ansprechen

Für die Auswertung mittels SPSS wurden die vier Expressionsmuster ebenfalls in zwei Gruppen eingeteilt, solche mit niedriger Expression (IRS 0-1) und solche mit hoher Expression (IRS 2-3). Das Ansprechen wurde in drei Kategorien eingeteilt, solche mit Ansprechen (1 = sCR, CR, VGPR, PR), solche mit stabiler Erkrankung (2 = SD) und solche mit fortschreitender Erkrankung (3 = PD). Ob ein Ansprechen vorlag oder nicht, wurde mittels der relativen Reduktion des monoklonalen Proteins im Vergleich zum Ausgangswert und der Immunfixation nach Induktions- beziehungsweise Hochdosistherapie bestimmt.

Sowohl für das Ansprechen auf die Induktionstherapie (90,0 % vs. 88,2 % für hohe COLVI-Expression vs. niedrige COLVI-Expression, $p = 0,392$) als auch auf die Hochdosistherapie (90,0 % vs. 93,4 % für hohe COLVI-Expression vs. niedrige COLVI-Expression, $p = 0,686$) ergab sich kein signifikanter Unterschied für Patienten mit niedriger COLVI-Expression gegenüber solchen mit hoher COLVI-Expression im exakten Test nach Fisher (**Tabelle 3**).

Variablen	Kollagen Typ VI niedrig	Kollagen Typ VI hoch	Test	p-Wert
N	76	20		
Ind, Anzahl (%)			Fisher's-Exakt-Test	0,638
1	67 (88,2)	18 (90,0)		
2	8 (10,5)	1 (5,0)		
3	1 (1,3)	1 (5,0)		
HD, Anzahl (%)			Fisher's-Exakt-Test	0,521
1	71 (93,4)	18 (90,0)		
2	1 (1,3)	0 (0)		
3	4 (5,3)	2 (10,0)		

Tabelle 3 | Ansprechen auf Induktions- und Hochdosistherapie. Die Auswertung des Ansprechens auf die Induktions- und Hochdosistherapie mittels dem exakten Test nach Fisher ergab keine Signifikanz für Patienten mit niedriger COLVI-Expression (IRS 0-1) gegenüber solchen mit hoher COLVI-Expression (IRS 2-3). Hierfür wurde das Ansprechen in drei Kategorien eingeteilt, solche mit Ansprechen (1 = sCR, CR, VGPR, PR), solche mit stabiler

Erkrankung (2 = SD) und solche mit fortschreitender Erkrankung (3 = PD). Abkürzungen: Ind, Induktionstherapie; HD, Hochdosistherapie.

3.6. Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben

Auch hier wurden für die Auswertung mittels SPSS die vier Expressionsmuster in zwei Gruppen eingeteilt, solche mit niedriger Expression (IRS 0-1) und solche mit hoher Expression (IRS 2-3).

Die Auswertung der Patientendaten hinsichtlich einer Prognose von COLVI auf das OS erfolgte mittels Kaplan-Meyer-Analyse und Logrank-Test. Dabei zeigte sich zwar kein statistisch signifikanter Überlebensvorteil für Patienten mit niedriger COLVI-Expression gegenüber solchen mit hoher COLVI-Expression (5-Jahres-OS, 81,2 % vs. 69,0 % für hohe COLVI-Expression vs. niedrige COLVI-Expression, $p = 0,052$) (**Abbildung 2**), ein Trend war jedoch dahingehend erkennbar, dass im Gegenteil diejenigen mit hoher COLVI-Expression einen Überlebensvorteil haben.

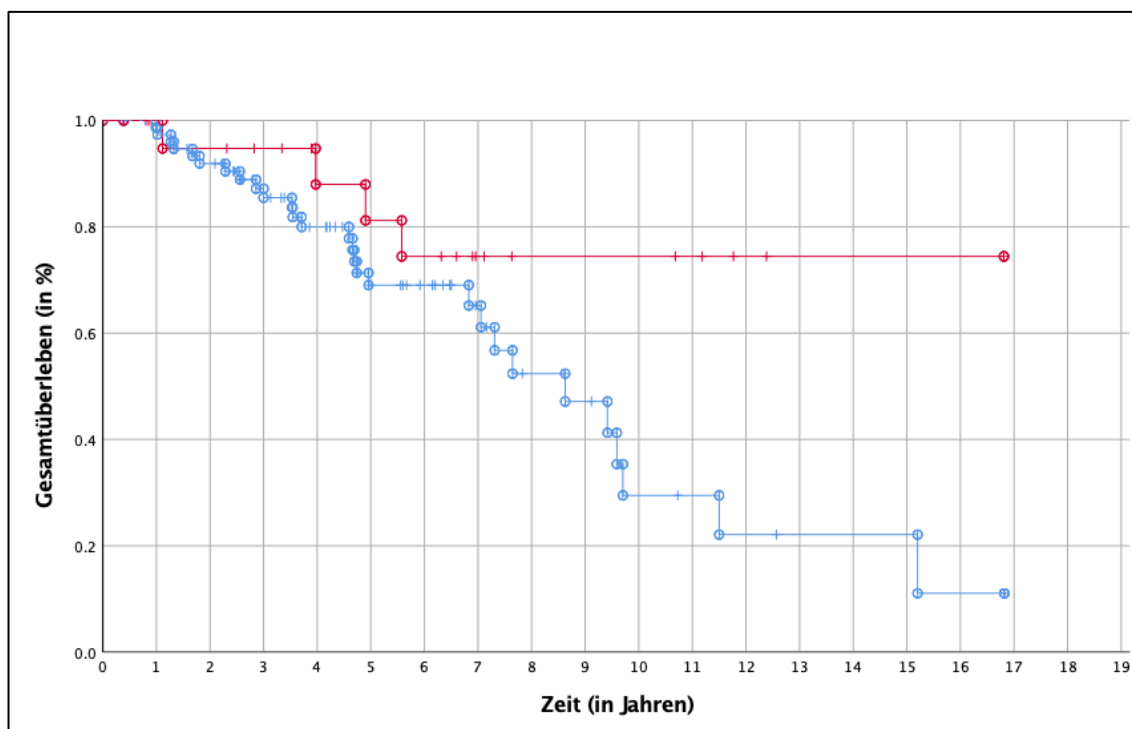


Abbildung 2 | Prognostische Relevanz von Kollagen Typ VI (COLVI) in Bezug auf das Gesamtüberleben (OS). Es zeigte sich in der Kaplan-Meyer-Analyse und dem Logrank-Test kein signifikanter Überlebensvorteil für Patienten mit niedriger COLVI-Expression (IRS 0-1; blau) gegenüber solchen mit hoher COLVI-Expression (IRS 2-3; rot) (5-Jahres-OS, 81,2 % vs. 69,0 % für hohe COLVI-Expression vs. niedrige COLVI-Expression, $p = 0,052$). Es zeigte sich im Gegenteil ein Trend hin zu einem höheren Überlebensvorteil für

Patienten mit hoher COLVI-Expression gegenüber solchen mit niedriger COLVI-Expression.

Auch hinsichtlich des PFS erfolgte eine Auswertung mittels Kaplan-Meier-Analyse und Logrank-Test. Ein signifikanter progressionsfreier Überlebensvorteil für Patienten mit niedriger COLVI-Expression gegenüber solchen mit hoher COLVI-Expression konnte auch hier nicht nachgewiesen werden (5-Jahres-PFS, 39,9 % vs. 20,7 % für hohe COLVI-Expression vs. niedrige COLVI-Expression, $p = 0,301$) (**Abbildung 3**).

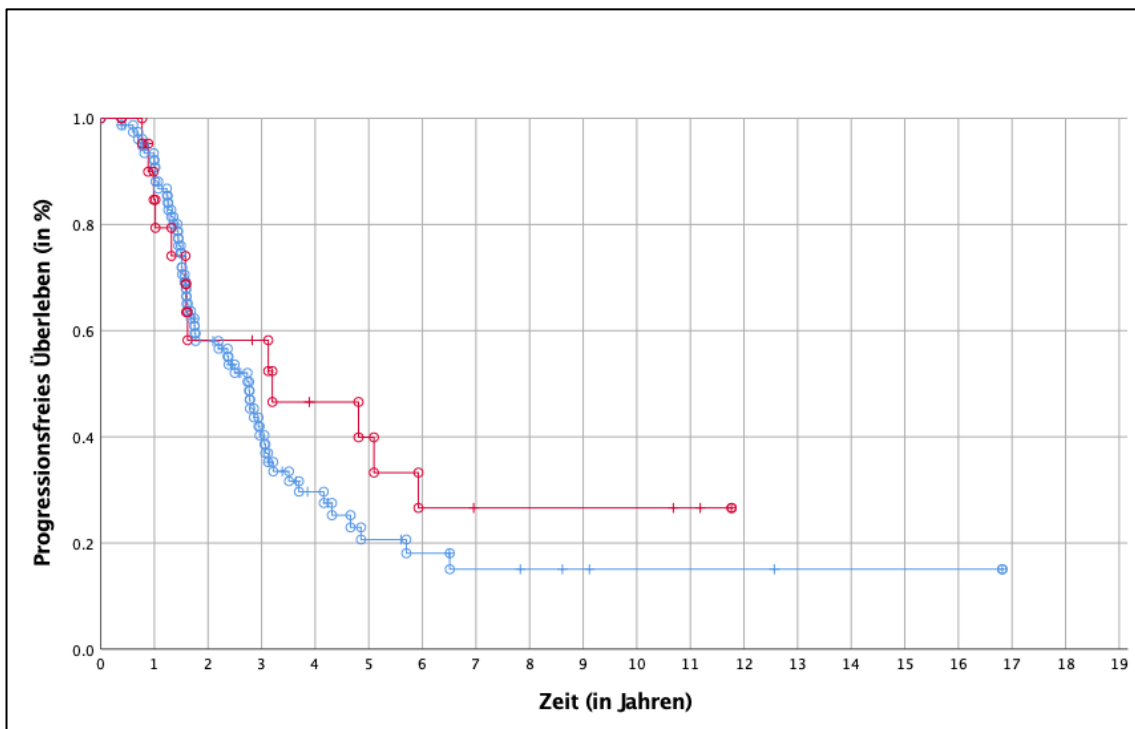


Abbildung 3 | Prognostische Relevanz von Kollagen Typ VI (COLVI) in Bezug auf das progressionsfreie Überleben (PFS). Es zeigte sich in der Kaplan-Meier-Analyse und dem Logrank-Test kein signifikanter progressionsfreier Überlebensvorteil für Patienten mit niedriger COLVI-Expression (IRS 0-1; blau) gegenüber solchen mit hoher COLVI-Expression (IRS 2-3; rot) (5-Jahres-PFS, 39,9 % vs. 20,7 % für hohe COLVI-Expression vs. niedrige COLVI-Expression, $p = 0,301$).

3.7. Gesamtüberleben und progressionsfreies Überleben bei Kollagen Typ VI Alpha 1-mRNA-Expression

Für die Auswertung der Kohorten aus dem GEO mittels SPSS wurden die *COL6A1*-mRNA-Expressionswerte in zwei Gruppen eingeteilt, solche mit niedriger Expression (50 % der Patienten unterhalb des Medians) und solche mit hoher Expression (50 % der Patienten oberhalb des Medians).

Die Auswertung der Daten hinsichtlich einer Prognose von *COL6A1*-mRNA auf das OS erfolgte mittels Kaplan-Meyer-Analyse und Logrank-Test. Dabei zeigte sich in zwei Kohorten (Kohorten 2 und 3) ein statistisch signifikanter Überlebensvorteil für Patienten mit hoher *COL6A1*-mRNA-Expression gegenüber solchen mit niedriger *COL6A1*-mRNA-Expression (Kohorte 2: 2,5-Jahres-OS, 38,7 % vs. 31,2 % für hohe *COL6A1*-mRNA-Expression vs. niedrige *COL6A1*-mRNA-Expression, $p = 0,020$ / Kohorte 3: 2,5-Jahres-OS, 84,2 % vs. 61,5 % für hohe *COL6A1*-mRNA-Expression vs. niedrige *COL6A1*-mRNA-Expression, $p = 0,037$) (**Abbildung 5 und 6**). In einer dritten Kohorte (Kohorte 1) zeigte sich dieser signifikante Überlebensvorteil jedoch nicht (Kohorte 1: 5-Jahres-OS, 63,2 % vs. 61,8 % für hohe *COL6A1*-mRNA-Expression vs. niedrige *COL6A1*-mRNA-Expression, $p = 0,791$) (**Abbildung 4**).

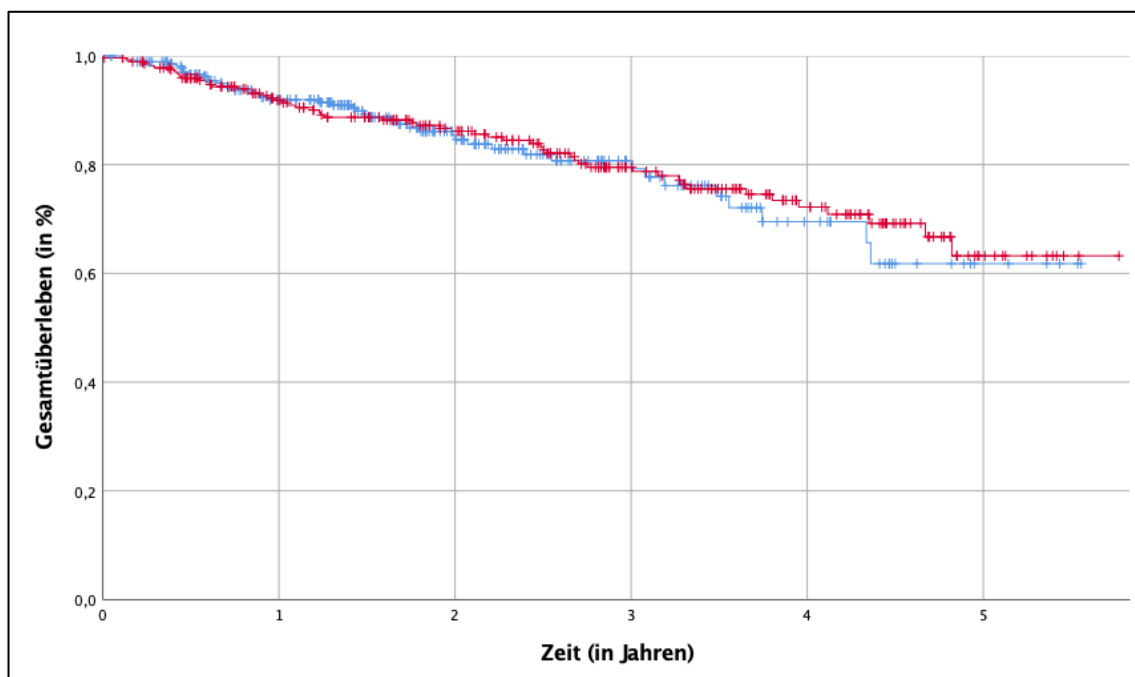


Abbildung 4 | Prognostische Relevanz von Kollagen Typ VI Alpha 1 (*COL6A1*)-mRNA-Expression in Bezug auf das Gesamtüberleben (OS) der Kohorte 1. Es zeigte sich in der Kaplan-Meyer-Analyse und dem Logrank-Test kein signifikanter Überlebensvorteil für Patienten mit niedriger *COL6A1*-mRNA-Expression (blau) gegenüber solchen mit hoher *COL6A1*-mRNA-Expression (rot) (5-Jahres-OS, 63,2 % vs. 61,8 % für hohe *COL6A1*-mRNA-Expression vs. niedrige *COL6A1*-mRNA-Expression, $p = 0,791$).

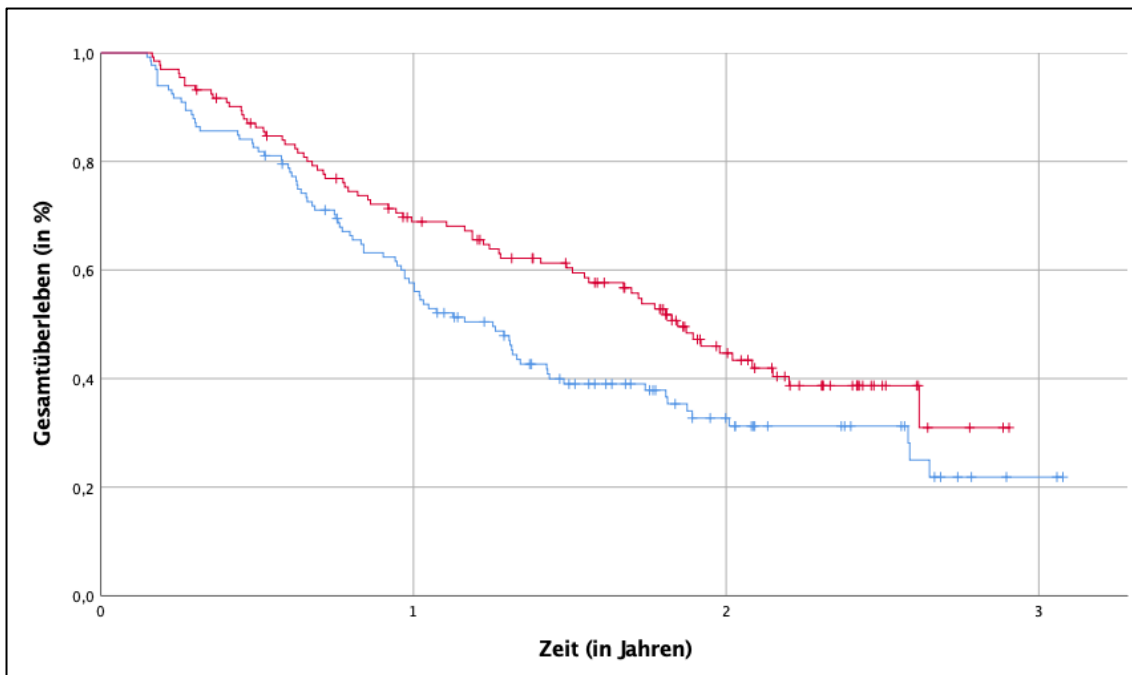


Abbildung 5 | Prognostische Relevanz von Kollagen Typ VI Alpha 1 (*COL6A1*)-mRNA-Expression in Bezug auf das Gesamtüberleben (OS) der Kohorte 2. Es zeigte sich in der Kaplan-Meyer-Analyse und dem Logrank-Test ein signifikanter Überlebensvorteil für Patienten mit hoher *COL6A1*-mRNA-Expression (rot) gegenüber solchen mit niedriger *COL6A1*-mRNA-Expression (blau) (2,5-Jahres-OS, 38,7 % vs. 31,2 % für hohe *COL6A1*-mRNA-Expression vs. niedrige *COL6A1*-mRNA-Expression, $p = 0,020$).

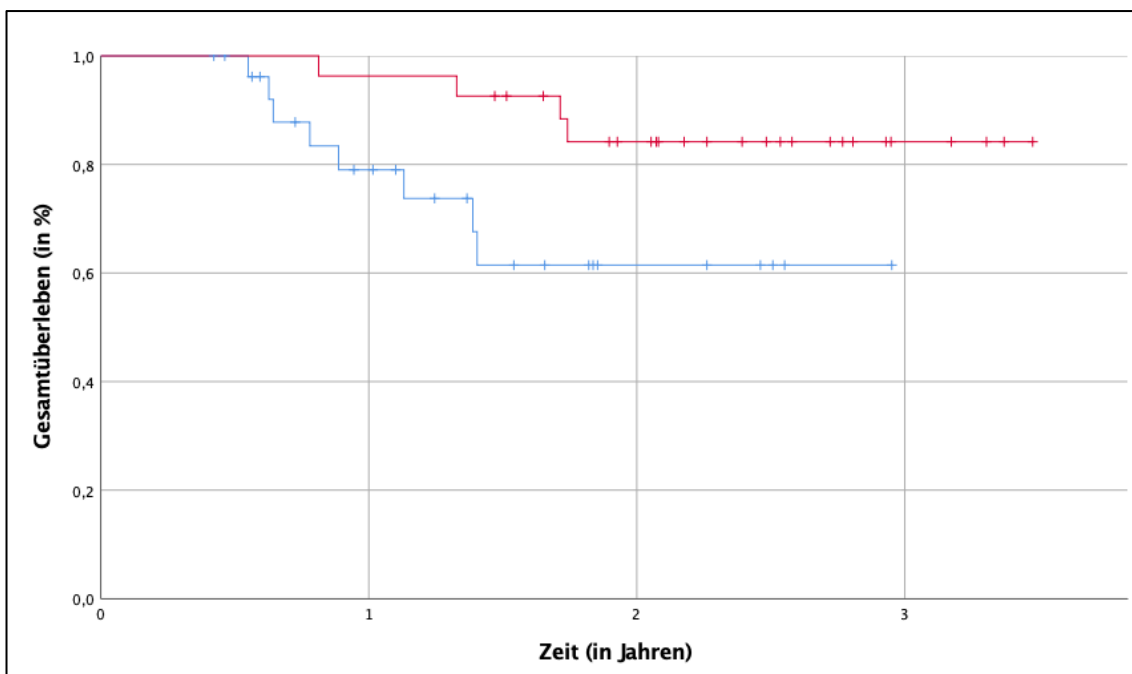


Abbildung 6 | Prognostische Relevanz von Kollagen Typ VI Alpha 1 (*COL6A1*)-mRNA-Expression in Bezug auf das Gesamtüberleben (OS) der Kohorte 3. Es zeigte sich in der Kaplan-Meyer-Analyse und dem Logrank-Test ein signifikanter Überlebensvorteil für Patienten mit hoher *COL6A1*-mRNA-Expression (rot) gegenüber solchen mit niedriger

COL6A1-mRNA-Expression (blau) (2,5-Jahres-OS, 84,2 % vs. 61,5 % für hohe *COL6A1*-mRNA-Expression vs. niedrige *COL6A1*-mRNA-Expression, $p = 0,037$).

Auch eine Auswertung der Daten hinsichtlich einer Prognose von *COL6A1*-mRNA auf das PFS bei einer Kohorte (Kohorte 2) konnte mittels Kaplan-Meyer-Analyse und Logrank-Test durchgeführt werden. Auch hier wurden für die Auswertung der Kohorte mittels SPSS die *COL6A1*-mRNA-Expressionswerte in zwei Gruppen eingeteilt, solche mit niedriger Expression (50 % der Patienten unterhalb des Medians) und solche mit hoher Expression (50 % der Patienten oberhalb des Medians). Ein signifikanter Unterschied im PFS für Patienten mit niedriger *COL6A1*-mRNA-Expression gegenüber solchen mit hoher *COL6A1*-mRNA-Expression konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (1,5-Jahres-PFS, 10,7 % vs. 2,0 % für hohe *COL6A1*-mRNA-Expression vs. niedrige *COL6A1*-mRNA-Expression, $p = 0,099$) (**Abbildung 7**).

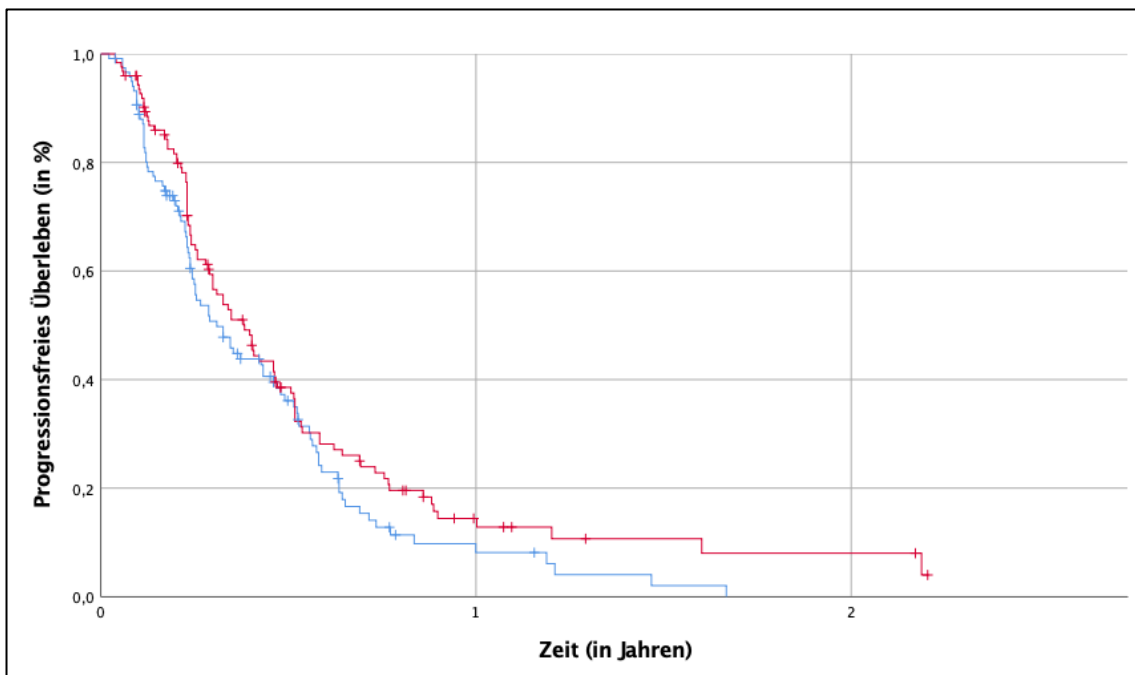


Abbildung 7 | Prognostische Relevanz von Kollagen Typ VI Alpha 1 (*COL6A1*)-mRNA-Expression in Bezug auf das progressionsfreie Überleben (PFS) der Kohorte 2. Es zeigte sich in der Kaplan-Meyer-Analyse und dem Logrank-Test kein signifikanter progressionsfreier Überlebensvorteil für Patienten mit niedriger *COL6A1*-mRNA-Expression (blau) gegenüber solchen mit hoher *COL6A1*-mRNA-Expression (rot) (1,5-Jahres-PFS, 10,7 % vs. 2,0 % für hohe *COL6A1*-mRNA-Expression vs. niedrige *COL6A1*-mRNA-Expression, $p = 0,099$).

4. DISKUSSION

Für viele Neoplasien konnte bereits gezeigt werden, dass COLVI vermehrt im Vergleich zu den jeweiligen Normalgeweben exprimiert wird, unter anderem bei Glioblastomen,(112) Eierstockkrebs,(73, 130) Lungenkrebs,(107) Ösophaguskarzinomen,(107) Pankreaskarzinomen,(5) Brustkrebs,(76, 101, 111) Kolonkrebs,(107, 111, 115) und Speicheldrüsenkrebs.(4) Damit einhergehend zeigte sich oftmals eine Korrelation zwischen COLVI-Expression und OS sowie PFS, so bei Speicheldrüsenkrebs,(4) CRC,(115) ccRCC(149) und beim Glioblastom.(147) In allen Fällen konnte dabei gezeigt werden, dass eine vermehrte COLVI-Expression zu einem signifikant verschlechterten PFS und/oder OS führt. Bisher konnte also festgestellt werden, dass COLVI ein prognostisch ungünstiger Faktor in vielen soliden Neoplasien ist. In einigen Studien konnte gezeigt werden, dass COLVI dabei auch einen unabhängigen prognostischen Faktor darstellt.(4, 149)

COLVI wirkt in vielfältiger Weise auf Tumorzellen und TME. Es wirkt als anti-apoptotischer Faktor(35, 36, 72, 125, 153) auf Tumorzellen und begünstigt deren Proliferation(75, 111, 153) sowie Adhäsion, Ausbreitung und Invasion.(37, 65) Es wirkt induzierend auf die EMT und fördert damit die Metastasierung.(32, 60, 111, 154) Darüber hinaus fördert es die Angiogenese(111, 153) und begünstigt Tumorentzündung über Makrophagen(4, 30, 34, 114, 124, 128) sowie die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren.(76) Ferner trägt es außerdem zur Steigerung der Therapieresistenz gegenüber Medikamenten bei.(32, 43, 46, 76, 124, 150)

Demzufolge ist COLVI ein vielversprechendes Ziel für medikamentöse Interventionen. COLVI könnte dabei einerseits genutzt werden, um mittels beladener Antikörper, die an COLVI binden, Chemotherapeutika, Zytokine wie IL-2 oder Radionuklide zielgerichtet in das neoplastische Gewebe zu lenken,(4, 64, 127) andererseits um mittels Antikörpern oder kleinen Molekülen inhibierend auf Rezeptoren für COLVI, ETP oder in der Signalkaskade weiter vorangelegene Rezeptoren einzuwirken.(4) Inhibitoren für Signalkaskaden, die auch von COLVI induziert werden, werden bereits in einigen klinischen Studien untersucht (AKT- und FAK-Inhibitoren).(22, 90, 110)

In der hier durchgeführten Studie konnte gezeigt werden, dass die Hypothese eines signifikanten Zusammenhanges zwischen niedriger COLVI-Proteinexpression und erhöhtem OS, beziehungsweise erhöhtem PFS beim MM nicht bestätigt werden konnte. Es zeigte sich im Gegenteil ein Trend hin zu einem Überlebensvorteil für die Patienten mit hoher COLVI-

Expression. Ein Vergleich zu den *COL6A1*-mRNA-Expressionsdaten konnte die statistischen Ergebnisse ebenfalls widerspiegeln. In der *COL6A1*-mRNA-Expression fand sich ein signifikanter Überlebensvorteil für diejenigen mit hoher *COL6A1*-mRNA-Expression, welches sich als Trend bereits in der COLVI-Proteinexpression fand. Für das PFS konnte ein solcher Effekt jedoch nur als Trend in der *COL6A1*-mRNA-Expression gezeigt werden, nicht jedoch in der COLVI-Proteinexpression. Eine Bestätigung der Ergebnisse dieser Arbeit durch eine zweite unabhängige Kohorte, idealerweise im Rahmen einer prospektiven Studie, wäre sinnvoll, um das Resultat dieser Arbeit zu verifizieren.

Patienten mit niedriger COLVI-Expression hatten dabei in dieser Studie allerdings signifikant seltener monoklonales IgA (16,7 % vs. 33,3 %), häufiger monoklonales IgG (53,8 % vs. 42,9 %) und häufiger ein Leichtkettenmyelom (29,5 % vs. 9,5 %) als solche mit hoher COLVI-Expression. Außerdem hatten sie im Durchschnitt eine signifikant erhöhte LDH-Konzentration bei Diagnosestellung (196 U/l vs. 162 U/l).

In dieser Studie zeigte sich bei 66 (= 66,67 %) Patienten eine leichte COLVI-Expression, vergleichbar mit der im gesunden KM. Bei 21 (= 21,21 %) Patienten fand sich eine höhere Expression als im gesunden KM, davon 16 (= 16,16 %) mit mittlerer und 5 (= 5,05 %) mit starker. Bei 12 (= 12,12 %) der 99 Patienten fand sich keine Expression von COLVI. Aufgrund des nicht vorhandenen Zusammenhangs zwischen COLVI-Expression und OS, PFS sowie Ansprechen auf die Therapie beim MM stellt sich die Frage, inwiefern COLVI auf einzelne Faktoren beim MM Einfluss hat. Insgesamt erscheint eine biologische Rolle von COLVI beim MM jedoch aufgrund der Ergebnisse eher unwahrscheinlich. Für eine genauere Abklärung sind aber weitere, vor allem molekularbiologische Untersuchungen nötig, wie zum Beispiel Studien zur Auswirkung von COLVI auf Tumorzellapoptose, Proliferation, Metastasierung und weitere Faktoren beim MM. Im Rahmen dieser Studien wäre eine simultane Untersuchung von zirkulierendem PRO-C6, einem bei der Synthese von COLVI entstehenden Produktes, als Tumor- oder prognostischem Marker sicherlich ebenfalls interessant.(4, 120)

Abschließend lässt sich festhalten, dass entgegen der Erwartung des doch insgesamt eher Stroma-abhängigen MM keine signifikante Korrelation zwischen einer niedrigen COLVI-Expression und gesteigertem OS, PFS oder verbessertem Ansprechen auf die Therapie festgestellt werden konnte. Inwieweit dies für weitere hämatologische Neoplasien, wie zum Beispiel maligne Lymphome oder Leukämien gilt, müssen zukünftige Studien zeigen.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Aigner T, Hambach L, Söder S, Schlötzer-Schrehardt U, Pöschl E (2002) The C5 domain of Col6a3 is cleaved off from the Col6 fibrils immediately after secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 290(2): 743–748
2. Alsayed Y, Ngo H, Runnels J, Leleu X, Singha UK, Pitsillides CM, Spencer J a, Kimlinger T, Ghobrial JM, Jia X, et al. (2006) Mechanisms of regulation of CXCR4/SDF-1 (CXCL12) dependent migration and homing in Multiple Myeloma. *Blood* 109(7): 2708–2718
3. Angenendt L (2017) Proteomische Charakterisierung blutstromexponierter Knochenmarkantigene für eine zielgerichtete Therapie der Akuten Myeloischen Leukämie. Dissertation (Westfälische Wilhelms-Universität Münster).
4. Angenendt L, Mikesch JH, Görlich D, Busch A, Arnhold I, Rudack C, Hartmann W, Wardelmann E, Berdel WE, Stenner M, et al. (2018) Stromal collagen type VI associates with features of malignancy and predicts poor prognosis in salivary gland cancer. *Cell Oncol*: 1–9
5. Arafat H, Lazar M, Salem K, Chipitsyna G, Gong Q, Pan TC, Zhang RZ, Yeo CJ, Chu ML (2011) Tumor-specific expression and alternative splicing of the COL6A3 gene in pancreatic cancer. *Surgery* 150(2): 306–315
6. Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T (2004) Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* 118(2): 149–161
7. Attal M, Lauwers-Cances V, Hulin C, Leleu X, Caillot D, Escoffre M, Arnulf B, Macro M, Belhadj K, Garderet L, et al. (2017) Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma. *N Engl J Med* 376(14): 1311–1320
8. AWMF, DKG/ASORS, DKH, DEGRO, DGHO (2017) S3 - Leitlinie Supportive Therapie bei onkologischen PatientInnen – interdisziplinäre Querschnittsleitlinie. (April): 1–527
9. Barcellos-Hoff MH, Lyden D, Wang TC (2013) The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 13(7): 511–518

10. Barlogie B, Jagannath S, Vesole DH, Naucke S, Cheson B, Mattox S, Bracy D, Salmon S, Jacobson J, Crowley J, et al. (1997) Superiority of tandem autologous transplantation over standard therapy for previously untreated multiple myeloma. *Blood* 89(3): 789–793
11. Barlogie B, Tricot G, Anaissie E, Shaughnessy J, Rasmussen E, van Rhee F, Fassas A, Zangari M, Hollmig K, Pineda-Roman M, et al. (2006) Thalidomide and Hematopoietic-Cell Transplantation for Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 354(10): 1021–1030
12. Bergsagel PL, Chesi M (2013) V. Molecular classification and risk stratification of myeloma. *Hematol Oncol* 31(SUPPL 2): 38–41
13. Bernardi P, Bonaldo P (2008) Dysfunction of mitochondria and sarcoplasmic reticulum in the pathogenesis of collagen VI muscular dystrophies. *Ann N Y Acad Sci* 1147: 303–311
14. Bianchi G, Munshi NC (2015) Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. *Blood* 125(20): 3049–3058
15. Bianchi G, Anderson KC (2014) Understanding Biology to Tackle the Disease: Multiple Myeloma From Bench to Bedside, and Back. *Ca Cancer J Clin* 64(6): 423–444
16. Bidanset DJ, Guidry C, Rosenberg LC, Choi HU, Timpl R, Hook M (1992) Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI. *J Biol Chem* 267(8): 5250–5256
17. Blombery PA, Wall M, Seymour JF (2015) The molecular pathogenesis of B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Eur J Haematol* 95(4): 280–293
18. Bonaldo P, Russo V, Bucciotti F, Doliana R, Colombatti A (1990) Structural and Functional Features of the $\alpha 3$ Chain Indicate a Bridging Role for Chicken Collagen VI in Connective Tissues. *Biochemistry* 29(5): 1245–1254
19. Borsi E, Perrone G, Terragna C, Martello M, Zamagni E, Tacchetti P, Pantani L, Brioli A, Dico AF, Zannetti BA, et al. (2014) HIF-1 α inhibition blocks the cross talk between multiple myeloma plasma cells and tumor microenvironment. *Exp Cell Res* 328(2): 444–455
20. Brioli A, Melchor L, Walker BA, Davies FE, Morgan GJ (2014) Biology and treatment

- of myeloma. *Clin Lymphoma, Myeloma Leuk* 14(September): S65–S70
21. Brown C (1993) Structure and Binding Properties of Collagen Type XIV Isolated from Human Placenta. *120(2)*: 557–567
 22. Brown JS, Banerji U (2017) Maximising the potential of AKT inhibitors as anti-cancer treatments. *Pharmacol Ther* 172: 101–115
 23. Bulycheva E, Rauner M, Medyouf H, Theurl I, Bornhäuser M, Hofbauer LC, Platzbecker U (2015) Myelodysplasia is in the niche: Novel concepts and emerging therapies. *Leukemia* 29(2): 259–268
 24. Burg MA, Tillet E, Timpl R, Stallcup WB (1996) Binding of the NG2 proteoglycan to type VI collagen and other extracellular matrix molecules. *J Biol Chem* 271(42): 26110–26116
 25. Calvi L, Adams G, Weibrecht K, Weber J, Olson D, Knight M, Martin R, Schipani E, Divieti P, Bringham F, et al. (2003) Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425(6960): 841–846
 26. Cavo M, Gay FM, Patriarca F, Zamagni E, Montefusco V, Dozza L, Al. E (2018) Double Autologous Stem Cell Transplantation Significantly Prolongs Progression-Free Survival and Overall Survival in Comparison with Single Autotransplantation in Newly Diagnosed Multiple Myeloma: An Analysis of Phase 3 EMN02/HO95 Study. *Blood* 130: 401
 27. Cescon M, Gattazzo F, Chen P, Bonaldo P (2015) Collagen VI at a glance. *J Cell Sci* 128(19): 3525–3531
 28. Chaudhary A, Hilton MB, Seaman S, Haines DC, Stevenson S, Lemotte PK, Tschantz WR, Zhang XM, Saha S, Fleming T, et al. (2012) TEM8/ANTXR1 Blockade Inhibits Pathological Angiogenesis and Potentiates Tumoricidal Responses against Multiple Cancer Types. *Cancer Cell* 21(2): 212–226
 29. Chen D, Bhat-Nakshatri P, Goswami C, Badve S, Nakshatri H (2013) ANTXR1, a stem cell enriched functional biomarker, connects collagen signaling to cancer stem-like cells and metastasis in breast cancer. *Cancer Res* 73(18): 5821–5833
 30. Chen J, Yao Y, Gong C, Yu F, Su S, Liu B, Deng H, Wang F, Lin L, Yao H, et al. (2011) CCL18 from Tumor-Associated Macrophages Promotes Breast Cancer

- Metastasis via PITPNM3. *Cancer Cell* 19(4): 541–555
31. Chen P, Bonaldo P (2013) Role of Macrophage Polarization in Tumor Angiogenesis and Vessel Normalization: Implications for New Anticancer Therapies. In: Jeon KWBT-IR of C and MB (Hrsg), *International Review of Cell and Molecular Biology*. Academic Press, Bd 301 S. 1–35
 32. Chen P, Cescon M, Bonaldo P (2013) Collagen VI in cancer and its biological mechanisms. *Trends Mol Med* 19(7): 410–417
 33. Chen P, Cescon M, Zuccolotto G, Nobbio L, Colombelli C, Filaferro M, Vitale G, Feltri ML, Bonaldo P (2015) Collagen VI regulates peripheral nerve regeneration by modulating macrophage recruitment and polarization. *Acta Neuropathol* 129(1): 97–113
 34. Chen P, Huang Y, Bong R, Ding Y, Song N, Wang X, Song X, Luo Y (2011) Tumor-associated macrophages promote angiogenesis and melanoma growth via adrenomedullin in a paracrine and autocrine manner. *Clin Cancer Res* 17(23): 7230–7239
 35. Cheng IH, Lin YC, Hwang E, Huang HT, Chang WH, Liu YL, Chao CY (2011) Collagen VI protects against neuronal apoptosis elicited by ultraviolet irradiation via an Akt/Phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Neuroscience* 183: 178–188
 36. Cheng JS, Dubal DB, Kim DH, Legleiter J, Cheng IH, Yu G, Tesseur I, Wyss-Coray T, Bonaldo P, Mucke L (2009) Collagen VI protects neurons against A β toxicity. *Nat Neurosci* 12(2): 119–121
 37. Chiu KH, Chang YH, Wu YS, Lee SH, Liao PC (2011) Quantitative secretome analysis reveals that COL6A1 is a metastasis-associated protein using stacking gel-aided purification combined with iTRAQ labeling. *J Proteome Res* 10(3): 1110–1125
 38. Cogle CR, Saki N, Khodadi E, Li J, Shahjahani M, Azizidoost S (2015) Bone marrow niche in the myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 39(10): 1020–1027
 39. Colla S, Storti P, Donofrio G, Todoerti K, Bolzoni M, Lazzaretti M, Abeltino M, Ippolito L, Neri A, Ribatti D, et al. (2010) Low bone marrow oxygen tension and hypoxia-inducible factor-1 α overexpression characterize patients with multiple myeloma: Role on the transcriptional and proangiogenic profiles of CD138+ cells.

- Leukemia 24(11): 1967–1970
40. Cordell JL, Falini B, Erber WN, Ghosh AK, Abdulaziz Z, MacDonald S, Pulford KAF, Stein H, Mason DY (1984) Immunoenzymatic Labeling of Monoclonal Antibodies Using Immune Complexes of Alkaline Phosphatase and Monoclonal Anti-alkaline Phosphatase (APAAP Complexes). *J Histochem Cytochem* 32(2): 219–229
 41. Damiano JS, Cress AE, Hazlehurst LA, Shtil AA, Dalton WS (1999) Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* 93(5): 1658–67
 42. Davies FE (2017) Is molecular remission the goal of multiple myeloma therapy? *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr*: 205–211
 43. De PM, Lewis CE (2011) Cancer: macrophages limit chemotherapy. *Nature* 472: 303–304
 44. Dimopoulos MA, Kastritis E, Rosinol L, Bladé J, Ludwig H (2008) Pathogenesis and treatment of renal failure in multiple myeloma. *Leukemia* 22(8): 1485–1493
 45. van de Donk NWCJ, Lokhorst HM, Dimopoulos M, Cavo M, Morgan G, Einsele H, Kropff M, Schey S, Avet-Loiseau H, Ludwig H, et al. (2011) Treatment of relapsed and refractory multiple myeloma in the era of novel agents. *Cancer Treat Rev* 37(4): 266–283
 46. Faller WJ, Rafferty M, Hegarty S, Gremel G, Ryan D, Fraga MF, Esteller M, Dervan PA, Gallagher WM (2010) Metallothionein 1E is methylated in malignant melanoma and increases sensitivity to cisplatin-induced apoptosis. *Melanoma Res* 20(5): 392–400
 47. Fitzgerald J, Rich C, Zhou FH, Hansen U (2008) Three novel collagen VI chains, $\alpha 4(VI)$, $\alpha 5(VI)$, and $\alpha 6(VI)$. *J Biol Chem* 283(29): 20170–20180
 48. Fleming WH, Alpern EJ, Uchida N, Ikuta K, Weissman IL (1993) Steel factor influences the distribution and activity of murine hematopoietic stem cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(8): 3760–3764
 49. Frassanito MA, Rao L, Moschetta M, Ria R, Di Marzo L, De Luisi A, Racanelli V, Catacchio I, Berardi S, Basile A, et al. (2014) Bone marrow fibroblasts parallel multiple

- myeloma progression in patients and mice: In vitro and in vivo studies. *Leukemia* 28(4): 904–916
50. Furthmayr H, Wiedemann H, Timpl R, Odermatt E, Engel J (1983) Electron-microscopical approach to a structural model of intima collagen. *Biochem J* 211(2): 303 LP – 311
 51. Gara SK, Grumati P, Urciuolo A, Bonaldo P, Kobbe B, Koch M, Paulsson M, Wagener R (2008) Three novel collagen VI chains with high homology to the $\alpha 3$ chain. *J Biol Chem* 283(16): 10658–10670
 52. Gay F, Oliva S, Petrucci MT, Conticello C, Catalano L, Corradini P, Siniscalchi A, Magarotto V, Pour L, Carella A, et al. (2015) Chemotherapy plus lenalidomide versus autologous transplantation, followed by lenalidomide plus prednisone versus lenalidomide maintenance, in patients with multiple myeloma: A randomised, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 16(16): 1617–1629
 53. Ghobrial IM, Detappe A, Anderson KC, Steensma DP (2018) The bone-marrow niche in MDS and MGUS: Implications for AML and MM. *Nat Rev Clin Oncol* 15(4): 219–233
 54. Giralt S (2010) 200 mg/m² melphalan—the gold standard for multiple myeloma. *Nat Rev Clin Oncol* 7: 490
 55. Giralt S, Stadtmauer EA, Harousseau JL, Palumbo A, Bensinger W, Comenzo RL, Kumar S, Munshi NC, Dispenzieri A, Kyle R, et al. (2009) International myeloma working group (IMWG) consensus statement and guidelines regarding the current status of stem cell collection and high-dose therapy for multiple myeloma and the role of plerixafor (AMD 3100). *Leukemia* 23(10): 1904–1912
 56. Giuliani N, Rizzoli V (2007) Myeloma cells and bone marrow osteoblast interactions: role in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 48(12): 2323–9
 57. Goldschmidt H, Lokhorst HM, Mai EK, Van Der Holt B, Blau IW, Zweegman S, Weisel KC, Vellenga E, Pfreundschuh M, Kersten MJ, et al. (2018) Bortezomib before and after high-dose therapy in myeloma: Long-term results from the phase III HOVON-65/GMMG-HD4 trial. *Leukemia* 32(2): 383–390

58. Gramann M, Wendler O, Haeberle L, Schick B (2009) Prominent collagen type VI expression in juvenile angiofibromas. *Histochem Cell Biol* 131(1): 155–164
59. Grumati P, Coletto L, Sabatelli P, Cescon M, Angelin A, Bertaggia E, Blaauw B, Urciuolo A, Tiepolo T, Merlini L, et al. (2010) Autophagy is defective in collagen VI muscular dystrophies, and its reactivation rescues myofiber degeneration. *Nat Med* 16(11): 1313–1320
60. Gu X, Jiang R, Fowler MR (2012) Acantholytic Squamous Cell Carcinoma in Upper Aerodigestive Tract: Histopathology, Immunohistochemical Profile and Epithelial Mesenchymal Transition Phenotype Change. *Head Neck Pathol* 6(4): 438–444
61. Gu Y, Filippi M-D, Cancelas JA, Sieftring JE, Williams EP, Jasti AC, Harris CE, Lee AW, Prabhakar R, Atkinson SJ, et al. (2003) Hematopoietic Cell Regulation by Rac1 and Rac2 Guanosine Triphosphatases. *Science* (80-) 302(5644): 445 LP – 449
62. Gualandi F, Curci R, Sabatelli P, Martoni E, Bovolenta M, Maraldi MN, Merlini L, Ferlini AA (2011) Macrophages: A minimally invasive tool for monitoring collagen VI myopathies. *Muscle and Nerve* 44(1): 80–84
63. Guillen-Ahlers H, Buechler SA, Suckow MA, Castellino FJ, Ploplis VA (2008) Sulindac treatment alters collagen and matrilysin expression in adenomas of ApcMin/+mice. *Carcinogenesis* 29(7): 1421–1427
64. Gutbrodt KL, Schliemann C, Giovannoni L, Frey K, Pabst T, Klapper W, Berdel WE, Neri D (2013) Antibody-Based Delivery of Interleukin-2 to Neovasculature Has Potent Activity Against Acute Myeloid Leukemia. *Sci Transl Med* 5(201): 1–11
65. Han J, Daniel JC (1995) Biosynthesis of Type-VI Collagen By Glioblastoma Cells and Possible Function in Cell Invasion of 3-Dimensional Matrices. *Connect Tissue Res* 31(2): 161–170
66. Hebart H, Bader P, Meisner C, Einsele H, Plasswilm L, Liebisch P, Bamberg M, Faul C, Kanz L (2003) Follow-up of patients with progressive multiple myeloma undergoing allografts after reduced-intensity conditioning. 411–418
67. Herold G, Mitarbeiter U (2017) Innere Medizin: Eine vorlesungsorientierte Darstellung; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung; mit ICD 10-Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis, Herold, Köln

68. Heuck CJ, Qu P, van Rhee F, Waheed S, Usmani SZ, Epstein J, Zhang Q, Edmondson R, Hoering A, Crowley J, et al. (2014) Five gene probes carry most of the discriminatory power of the 70-gene risk model in multiple myeloma. *Leukemia* 28(12): 2410–2413
69. Hideshima T, Chauhan D, Hayashi T, Podar K, Akiyama M, Gupta D, Richardson P, Munshi N, Anderson KC (2002) The biological sequelae of stromal cell-derived factor-1alpha in multiple myeloma. *Mol Cancer Ther* 1(7): 539–544
70. Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC (2007) Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 7(8): 585–598
71. Houde C, Li Y, Song L, Barton K, Zhang Q, Godwin J, Nand S, Toor A, Alkan S, Smadja NV, et al. (2004) Overexpression of the NOTCH ligand JAG2 in malignant plasma cells from multiple myeloma patients and cell lines. *Neoplasia* 104(12): 3697–3705
72. Irwin WA, Bergamin N, Sabatelli P, Reggiani C, Megighian A, Merlini L, Braghetta P, Columbaro M, Volpin D, Bressan GM, et al. (2003) Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency. *Nat Genet* 35(4): 367–371
73. Ismail RS, Baldwin RL, Fang J, Browning D, Karlan BY, Gasson JC, Chang DD (2000) Differential Gene Expression between Normal and Tumor-derived Ovarian Epithelial Cells. *Cancer Res* 60(23): 6744–6749
74. Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I, Nomiyama K, Hosokawa K, Sakurada K, Nakagata N, et al. (2004) Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 431(7011): 997–1002
75. Iyengar P, Combs TP, Shah SJ, Gouon-Evans V, Pollard JW, Albanese C, Flanagan L, Tenniswood MP, Guha C, Lisanti MP, et al. (2003) Adipocyte-secreted factors synergistically promote mammary tumorigenesis through induction of anti-apoptotic transcriptional programs and proto-oncogene stabilization. *Oncogene* 22(41): 6408–6423
76. Iyengar P, Espina V, Williams TW, Lin Y, Berry D, Jelicks LA, Lee H, Temple K, Graves R, Pollard J, et al. (2005) Adipocyte-derived collagen VI affects early

- mammary tumor progression in vivo, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. *J Clin Invest* 115(5): 1163–1176
77. Jackson G, Davies FE, Pawlyn C, Cairns D, Striha A, Hockaday A, Sakauskienė I, Jones JR, Kishore B, Garg M, et al. (2017) Lenalidomide Maintenance Significantly Improves Outcomes Compared to Observation Irrespective of Cytogenetic Risk: Results of the Myeloma XI Trial. *Blood* 130(Suppl 1): 436 LP – 436
 78. Jimenez-Zepeda VH, Mikhael J, Winter A, Franke N, Masih-Khan E, Trudel S, Chen C, Kukreti V, Reece DE (2012) Second Autologous Stem Cell Transplantation as Salvage Therapy for Multiple Myeloma: Impact on Progression-Free and Overall Survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 18(5): 773–779
 79. Jones DL, Wagers AJ (2008) No place like home: Anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(1): 11–21
 80. Josefina U (2009) In vitro Analyse von Standard und innovativen anti-Multiplen Myelom(MM)-Therapien auf MM-Zelllinien und deren Interaktion mit dem Knochenmark(KM)-Milieu. Dissertation (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau).
 81. Keene DR, Engvall E, Glanville RW (1988) Ultrastructure of type VI collagen in human skin and cartilage suggests an anchoring function for this filamentous network. *J Cell Biol* 107(5): 1995–2006
 82. Knupp C, Pinali C, Munro PM, Gruber HE, Sherratt MJ, Baldock C, Squire JM (2006) Structural correlation between collagen VI microfibrils and collagen VI banded aggregates. *J Struct Biol* 154(3): 312–326
 83. Kuehl WM, Bergsagel PL (2012) Molecular pathogenesis of multiple myeloma and its premalignant precursor. *J Clin Invest* 122(10): 3456–3463
 84. Kuehl WM, Zingone A (2011) Pathogenesis of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance (MGUS) and Progression to Multiple Myeloma. 48(1): 4–12
 85. Kuo H, Maslen CL, Douglas R, Glanville RW, Keene DR (1997) Protein Chemistry and Structure: Type VI Collagen Anchors Endothelial Basement Membranes by Interacting with Type IV Collagen Type VI Collagen Anchors Endothelial Basement

- Membranes by Interacting with Type IV Collagen *. 272(42): 26522–26529
86. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, Fonseca R, Rajkumar S V., Offord JR, Larson DR, et al. (2003) Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 78(1): 21–33
 87. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Offord JR, Dispenzieri A, Katzmann JA, Melton LJ (2006) Prevalence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med* 354(13): 1362–1369
 88. Laita M, Laita M, Mcteir B, Mcteir B, Pettersson J, Pettersson J, Ko M, Ko M, Spot GO, Spot GO, et al. (2003) Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Methods Mol Biol* 425(October): 0–5
 89. Lechertier T, Hodivala-Dilke K (2012) Focal adhesion kinase and tumour angiogenesis. *J Pathol* 226(2005): 404–12
 90. Lee BY, Timpson P, Horvath LG, Daly RJ (2015) FAK signaling in human cancer as a target for therapeutics. *Pharmacol Ther* 146: 132–149
 91. Lokhorst HM, van der Holt B, Cornelissen JJ, Kersten MJ, van Oers M, Raymakers R, Minnema MC, Zweegman S, Bos G, Schaap N, et al. (2015) Reduced relapse rate in upfront tandem autologous/reduced-intensity allogeneic transplantation in multiple myeloma only results in borderline non-significant prolongation of progression-free but not overall survival. *Haematologica* 100(12l): e508 LP-e510
 92. Mateos M V, San Miguel JF (2017) Management of multiple myeloma in the newly diagnosed patient. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr*: 498–507
 93. McCarthy PL, Holstein SA, Petrucci MT, Richardson PG, Hulin C, Tosi P, Bringhen S, Musto P, Anderson KC, Caillot D, et al. (2017) Lenalidomide maintenance after autologous stem-cell transplantation in newly diagnosed multiple myeloma: A meta-analysis. *J Clin Oncol* 35(29): 3279–3289
 94. Medicine M and, Antonio S (2000) Human myeloma cells promote the production of interleukin 6 by primary human osteoblasts. *Br J Haematol* 108: 383–390
 95. Merz M, Jansen L, Castro FA, Hillengass J, Salwender H, Weisel K, Scheid C, Luttmann S, Emrich K, Holleczeck B, et al. (2016) Survival of elderly patients with multiple myeloma - Effect of upfront autologous stem cell transplantation. *Eur J*

- Cancer 62: 1–8
96. Michl M (2016) BASICS Hämatologie, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 4. Aufl
 97. Mitsiades CS, Mitsiades NS, Munshi NC, Richardson PG, Anderson KC (2006) The role of the bone microenvironment in the pathophysiology and therapeutic management of multiple myeloma: Interplay of growth factors, their receptors and stromal interactions. *Eur J Cancer* 42(11): 1564–1573
 98. Moreau P (2017) How I treat myeloma with new agents. *Blood* 130(13): 1507–1513
 99. Morgan GJ, Davies FE, Gregory WM, Bell SE, Szubert AJ, Cook G, Drayson MT, Owen RG, Ross FM, Jackson GH, et al. (2013) Long-term follow-up of MRC Myeloma IX trial: Survival outcomes with bisphosphonate and thalidomide treatment. *Clin Cancer Res* 19(21): 6030–6038
 100. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE (2012) The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer* 12(5): 335–348
 101. Motrescu ER, Blaise S, Etique N, Messaddeq N, Chenard MP, Stoll I, Tomasetto C, Rio MC (2008) Matrix metalloproteinase-11/stromelysin-3 exhibits collagenolytic function against collagen VI under normal and malignant conditions. *Oncogene* 27(49): 6347–6355
 102. Muchtar E, Dingli D, Kumar S, Buadi FK, Dispenzieri A, Hayman SR, Wolf RC, Gastineau DA, Chakraborty R, Hogan WJ, et al. (2016) Autologous stem cell transplant for multiple myeloma patients 70 years or older. *Bone Marrow Transplant* 51(11): 1449–1455
 103. Mulligan G, Mitsiades C, Bryant B, Zhan F, Chng WJ, Roels S, Koenig E, Fergus A, Huang Y, Richardson P, et al. (2007) Gene expression profiling and correlation with outcome in clinical trials of the proteasome inhibitor bortezomib. *Blood* 109(8): 3177 LP – 3188
 104. Munshi NC, Avet-Loiseau H, Rawstron AC, Owen RG, A CJ (2016) Minimal residual disease predicts superior survival in patients with multiple myeloma: a meta-analysis. *Blood* 127(12): 773–779
 105. Myllyharju J, Kivirikko KI (2004) Collagens, modifying enzymes and their mutations

- in humans, flies and worms. *Trends Genet* 20(1): 33–43
106. Nair B, van Rhee F, Shaughnessy JD, Anaissie E, Szymonifka J, Hoering A, Alsayed Y, Waheed S, Crowley J, Barlogie B (2010) Superior results of Total Therapy 3 (2003-33) in gene expression profiling–defined low-risk multiple myeloma confirmed in subsequent trial 2006-66 with VRD maintenance. *Blood* 115(21): 4168 LP – 4173
 107. Nanda A, Carson-Walter EB, Seaman S, Barber TD, Stampfl J, Singh S, Vogelstein B, Kinzler KW, St. Croix B (2004) TEM8 Interacts with the Cleaved C5 Domain of Collagen $\alpha 3(\text{VI})$. *Cancer Res* 64(3): 817–820
 108. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, Richardson P, Caltagirone S, Lahuerta JJ, Facon T, et al. (2015) Revised international staging system for multiple myeloma: A report from international myeloma working group. *J Clin Oncol* 33(26): 2863–2869
 109. Palumbo A, Cavallo F, Gay F, Di Raimondo F, Ben Yehuda D, Petrucci MT, Pezzatti S, Caravita T, Cerrato C, Ribakovsky E, et al. (2014) Autologous Transplantation and Maintenance Therapy in Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 371(10): 895–905
 110. Park J, Morley TS, Scherer PE (2013) Inhibition of endotrophin, a cleavage product of collagen VI, confers cisplatin sensitivity to tumours. *EMBO Mol Med* 5(6): 935–948
 111. Park J, Scherer PE (2012) Adipocyte-derived endotrophin promotes malignant tumor progression. *J Clin Invest* 122(11): 4243–4256
 112. Paulus W, Roggendorf W, Schuppan D (1988) Immunohistochemical investigation of collagen subtypes in human glioblastomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 413(4): 325–332
 113. Pschyrembel-Redaktion, Pschyrembel-Fachredaktion-Medizin, Leitung: Dr. med. Arne Schäffler (2018) *Pschyrembel online - Klinisches Wörterbuch*
 114. Qian BZ, Pollard JW (2010) Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. *Cell* 141(1): 39–51
 115. Qiao J, Fang C, Chen S, Wang X, Cui S (2015) Stroma derived COL6A3 is a potential prognosis marker of colorectal carcinoma revealed by quantitative proteomics. *Oncotarget*: 1–19

116. Quail D, Joyce J (2013) Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* 19(11): 1423–1437
117. Rajkumar SV (2016) Updated Diagnostic Criteria and Staging System for Multiple Myeloma. *Am Soc Clin Oncol Educ B* 36: e418–e423
118. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, Kumar S, Hillengass J, Kastritis E, Richardson P, et al. (2014) International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 15(12): e538–e548
119. Rajkumar SV, Kyle RA, Buadi FK (2010) Advances in the diagnosis, classification, risk stratification, and management of monoclonal gammopathy of undetermined significance: Implications for recategorizing disease entities in the presence of evolving scientific evidence. *Mayo Clin Proc* 85(10): 945–948
120. Rasmussen DGK, Hansen TW, von Scholten BJ, Nielsen SH, Reinhard H, Parving H-H, Tepel M, Karsdal MA, Jacobsen PK, Genovese F, et al. (2018) Higher Collagen VI Formation Is Associated With All-Cause Mortality in Patients With Type 2 Diabetes and Microalbuminuria. *Diabetes Care* 41(7): 1493 LP – 1500
121. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R (2008) *Duale Reihe - Biochemie*, Georg Thieme Verlag KG, 2.
122. Roccaro AM, Sacco A, Maiso P, Azab AK, Tai YT, Reagan M, Azab F, Flores LM, Campigotto F, Weller E, et al. (2013) BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *J Clin Invest* 123(4): 1542–1555
123. Röllig C, Knop S, Bornhäuser M (2015) Multiple myeloma. *Lancet* 385(9983): 2197–2208
124. Ruffell B, Affara NI, Coussens LM (2012) Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. *Trends Immunol* 33(3): 119–126
125. Rühl M, Sahin E, Johannsen M, Somasundaram R, Manski D, Riecken EO, Schuppan D (1999) Soluble collagen VI drives serum-starved fibroblasts through S phase and prevents apoptosis via down-regulation of Bax. *J Biol Chem* 274(48): 34361–34368
126. Sasaki T, Göhring W, Pan TC, Chu ML, Timpl R (1995) Binding of mouse and human fibulin-2 to extracellular matrix ligands. *J Mol Biol* 254(5): 892–899

127. Schliemann C, Gutbrodt KL, Kerkhoff A, Pohlen M, Wiebe S, Silling G, Angenendt L, Kessler T, Mesters RM, Giovannoni L, et al. (2015) Targeting Interleukin-2 to the Bone Marrow Stroma for Therapy of Acute Myeloid Leukemia Relapsing after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cancer Immunol Res* 3(5): 547–556
128. Schnoor M, Cullen P, Lorkowski J, Stolle K, Robenek H, Troyer D, Rauterberg J, Lorkowski S (2008) Production of Type VI Collagen by Human Macrophages: A New Dimension in Macrophage Functional Heterogeneity. *J Immunol* 180(8): 5707–5719
129. Seifert M, Scholtysik R, Küppers R (2013) Origin and Pathogenesis of B Cell Lymphomas. Küppers R *Lymphoma Methods Mol Biol (Methods Protoc* 971: 1–25
130. Sherman-Baust CA, Weeraratna AT, Rangel LBA, Pizer ES, Cho KR, Schwartz DR, Shock T, Morin PJ (2003) Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Cell* 3(4): 377–386
131. Shipman CM, Croucher PI (2003) Advances in Brief Osteoprotegerin Is a Soluble Decoy Receptor for Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand / Apo2 Ligand and Can Function as a Paracrine Survival Factor for Human Myeloma Cells 1. *Cultures*: 912–916
132. Škrtić A, Korać P, Krišto DR, Ajduković Stojisavljević R, Ivanković D, Dominis M (2010) Immunohistochemical analysis of NOTCH1 and JAGGED1 expression in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Hum Pathol* 41(12): 1702–1710
133. Slany A, Haudek-Prinz V, Meshcheryakova A, Bileck A, Lamm W, Zielinski C, Gerner C, Drach J (2014) Extracellular matrix remodeling by bone marrow fibroblast-like cells correlates with disease progression in multiple myeloma. *J Proteome Res* 13(2): 844–854
134. Sonneveld P, Beksac M, van der Holt B, Dimopoulos MA, Carella AM, Ludwig H, Driessen C, Wester R, Hajek R, Croockewit S, et al. (2016) Consolidation Followed By Maintenance Therapy Versus Maintenance Alone in Newly Diagnosed, Transplant Eligible Patients with Multiple Myeloma (MM): A Randomized Phase 3 Study of the European Myeloma Network (EMN02/HO95 MM Trial). *Blood* 128(22): 242 LP –

242

135. Sonneveld P, Schmidt-Wolf IGH, Van Der Holt B, El Jarari L, Bertsch U, Salwender H, Zweegman S, Vellenga E, Broyl A, Blau IW, et al. (2012) Bortezomib induction and maintenance treatment in patients with newly diagnosed multiple myeloma: Results of the randomized phase III HOVON-65/ GMMG-HD4 trial. *J Clin Oncol* 30(24): 2946–2955
136. Specks U, Mayer U, Nischt¹ R, Spissinger² T, Mann K, Timpl R, Engel² J, Chu³ M-L (1992) Structure of recombinant N-terminal globule of type VI collagen oc3 chain and its binding to heparin and hyaluronan. *EMBO J* 1(1): 4281–4290
137. Spencer M, Yao-Borengasser A, Unal R, Rasouli N, Gurley CM, Zhu B, Peterson CA, Kern PA (2010) Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *AJP Endocrinol Metab* 299(6): E1016–E1027
138. Stadtmauer EA, Pasquini MC, Blackwell B, Knust K, Bashey A, Devine SM, Al. E (2016) Comparison of Autologous Hematopoietic Cell Transplant (autoHCT), Bortezomib, Lenalidomide (Len) and Dexamethasone (RVD) Consolidation with Len Maintenance (ACM), Tandem Autohct with Len Maintenance (TAM) and Autohct with Len Maintenance (AM) for up-Front. *Blood* 128(22): LBA-1
139. Stier S, Ko Y, Forkert R, Lutz C, Neuhaus T, Grünewald E, Cheng T, Dombkowski D, Calvi LM, Rittling SR, et al. (2005) Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med* 201(11): 1781–1791
140. Straka C, Liebisch P, Salwender H, Hennemann B, Metzner B, Knop S, Reiche SA, Gerecke C, Wandt H, Bentz MT, et al. (2016) Autotransplant with and without induction chemotherapy in older multiple myeloma patients: Long-term outcome of a randomized trial. *Haematologica* 101(11): 1398–1406
141. van Stralen E, van de Wetering M, Agnelli L, Neri A, Clevers HC, Bast BJEG (2009) Identification of primary MAFB target genes in multiple myeloma. *Exp Hematol* 37(1): 78–86
142. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T (2006) Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone

- Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity* 25(6): 977–988
143. Takahashi T, Cho HI, Kublin CL, Cintron C (1993) Keratan sulfate and dermatan sulfate proteoglycans associate with type VI collagen in fetal rabbit cornea. *Histochem Cytochem* 41: 1447–1457
 144. Tillet E, Gential B, Garrone R, Stallcup WB (2002) NG2 proteoglycan mediates beta1 integrin-independent cell adhesion and spreading on collagen VI. *J Cell Biochem* 86(4): 726–736
 145. Toscani D, Bolzoni M, Accardi F, Aversa F, Giuliani N (2015) The osteoblastic niche in the context of multiple myeloma. *Ann N Y Acad Sci* 1335(1): 45–62
 146. Trueb B, Odermatt BF (2000) Loss of type VI collagen in experimental and most spontaneous human fibrosarcomas. *Int J Cancer* 86(3): 331–336
 147. Turtoi A, Blomme A, Bianchi E, Maris P, Vannozzi R, Naccarato AG, Delvenne P, De Pauw E, Bevilacqua G, Castronovo V (2014) Accessibilome of human glioblastoma: Collagen-VI-alpha-1 is a new target and a marker of poor outcome. *J Proteome Res* 13(12): 5660–5669
 148. Vincent T, Mechti N (2005) Extracellular matrix in bone marrow can mediate drug resistance in myeloma. *Leuk Lymphoma* 46(6): 803–811
 149. Wan F, Wang H, Shen Y, Zhang H, Shi G, Zhu Y, Dai B, Ye D (2015) Upregulation of COL6A1 is predictive of poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma patients. *Oncotarget* 6(29): 27378–87
 150. Wang J, Sakariassen PØ, Sandal T, Lønning PE, Flatmark T, Enger PØ, Bjerkvig R, Sioud M, Stallcup WB, Chekenya M (2008) The progenitor cell marker NG2/MPG promotes chemoresistance by activation of integrin-dependent PI3K/Akt signalling. *Oncogene* 27(39): 5182–5194
 151. Wörmann B, Driessen C, Einsele H, Goldschmidt H, Gunsilius E, Kortüm M, Kröger N, Ludwig H, Mügge L, Naumann R, et al. (2018) Leitlinie Multiples Myelom. 1–33
 152. Wu Y, Deng J, Rychahou PG, Qiu S, Evers BM, Zhou BP (2009) Stabilization of Snail by NF- κ B Is Required for Inflammation-Induced Cell Migration and Invasion. *Cancer Cell* 15(5): 416–428
 153. You WK, Bonaldo P, Stallcup WB (2012) Collagen VI ablation retards brain tumor

- progression due to deficits in assembly of the vascular basal lamina. *Am J Pathol* 180(3): 1145–1158
154. Yuan W, Yuan Y, Zhang T, Wu S (2015) Role of Bmi-1 in regulation of ionizing irradiation-induced epithelial-mesenchymal transition and migration of breast cancer cells. *PLoS One* 10(3): 1–10
155. Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B, Bumm K, Zheng M, Tian E, Sanderson R, Yang Y, Wilson C, Zangari M, et al. (2002) Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood* 99(5): 1745 LP – 1757
156. Zhan F, Huang Y, Colla S, Stewart JP, Hanamura I, Gupta S, Epstein J, Yaccoby S, Sawyer J, Burington B, et al. (2006) The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 108(6): 2020–2028

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 | Darstellung der Expressionsmuster von Kollagen Typ VI (COLVI) mittels APAAP-Färbung. Reihe A zeigt Schnittbilder von Patienten mit keiner Expression von COLVI (IRS 0), Reihe B solche von Patienten mit wenig Expression (IRS 1). Reihe C und Reihe D zeigen mittlere Expression (IRS 2), respektive viel Expression (IRS 3).....27

Abbildung 2 | Prognostische Relevanz von Kollagen Typ VI (COLVI) in Bezug auf das Gesamtüberleben (OS). Es zeigte sich in der Kaplan-Meyer-Analyse und dem Logrank-Test kein signifikanter Überlebensvorteil für Patienten mit niedriger COLVI-Expression (IRS 0-1; blau) gegenüber solchen mit hoher COLVI-Expression (IRS 2-3; rot) (5-Jahres-OS, 81,2 % vs. 69,0 % für hohe COLVI-Expression vs. niedrige COLVI-Expression, $p = 0,052$). Es zeigte sich im Gegenteil ein Trend hin zu einem höheren Überlebensvorteil für Patienten mit hoher COLVI-Expression gegenüber solchen mit niedriger COLVI-Expression.....33

Abbildung 3 | Prognostische Relevanz von Kollagen Typ VI (COLVI) in Bezug auf das progressionsfreie Überleben (PFS). Es zeigte sich in der Kaplan-Meyer-Analyse und dem Logrank-Test kein signifikanter progressionsfreier Überlebensvorteil für Patienten mit niedriger COLVI-Expression (IRS 0-1; blau) gegenüber solchen mit hoher COLVI-Expression (IRS 2-3; rot) (5-Jahres-PFS, 39,9 % vs. 20,7 % für hohe COLVI-Expression vs. niedrige COLVI-Expression, $p = 0,301$).....34

Abbildung 4 | Prognostische Relevanz von Kollagen Typ VI Alpha 1 (COL6A1)-mRNA-Expression in Bezug auf das Gesamtüberleben (OS) der Kohorte 1. Es zeigte sich in der Kaplan-Meyer-Analyse und dem Logrank-Test kein signifikanter Überlebensvorteil für Patienten mit niedriger COL6A1-mRNA-Expression (blau) gegenüber solchen mit hoher COL6A1-mRNA-Expression (rot) (5-Jahres-OS, 63,2 % vs. 61,8 % für hohe COL6A1-mRNA-Expression vs. niedrige COL6A1-mRNA-Expression, $p = 0,791$).
.....35

Abbildung 5 | Prognostische Relevanz von Kollagen Typ VI Alpha 1 (COL6A1)-mRNA-Expression in Bezug auf das Gesamtüberleben (OS) der Kohorte 2. Es zeigte sich in der Kaplan-Meyer-Analyse und dem Logrank-Test ein signifikanter Überlebensvorteil für Patienten mit hoher COL6A1-mRNA-Expression (rot) gegenüber solchen mit niedriger COL6A1-mRNA-Expression (blau) (2,5-Jahres-OS, 38,7 % vs. 31,2 % für hohe COL6A1-mRNA-Expression vs. niedrige COL6A1-mRNA-Expression, $p = 0,020$).....36

Abbildung 6 | Prognostische Relevanz von Kollagen Typ VI Alpha 1 (COL6A1)-mRNA-Expression in Bezug auf das Gesamtüberleben (OS) der Kohorte 3. Es zeigte sich in der Kaplan-Meyer-Analyse und dem Logrank-Test ein signifikanter Überlebensvorteil

für Patienten mit hoher COL6A1-mRNA-Expression (rot) gegenüber solchen mit niedriger COL6A1-mRNA-Expression (blau) (2,5-Jahres-OS, 84,2 % vs. 61,5 % für hohe COL6A1-mRNA-Expression vs. niedrige COL6A1-mRNA-Expression, $p = 0,037$).....36

Abbildung 7 | Prognostische Relevanz von Kollagen Typ VI Alpha 1 (COL6A1)-mRNA-Expression in Bezug auf das progressionsfreie Überleben (PFS) der Kohorte

2. Es zeigte sich in der Kaplan-Meyer-Analyse und dem Logrank-Test kein signifikanter progressionsfreier Überlebensvorteil für Patienten mit niedriger COL6A1-mRNA-Expression (blau) gegenüber solchen mit hoher COL6A1-mRNA-Expression (rot) (1,5-Jahres-PFS, 10,7 % vs. 2,0 % für hohe COL6A1-mRNA-Expression vs. niedrige COL6A1-mRNA-Expression, $p = 0,099$).....37

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 | Klinische und erkrankungsassoziierte Variablen. Aufgelistet in dieser Tabelle finden sich alle Variablen, die mittels Orbis gesammelt wurden. Abkürzungen: FISH, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung; MM, Multiples Myelom; ISS, International Staging System; R-ISS, Revised International Staging System; Allo-SCT, allogene Stammzelltransplantation; Auto-SCT, autologe Stammzelltransplantation..... 19

Tabelle 2 | Deskriptive Statistik klinisch erhobener Daten. Die Auswertung der klinischen Daten mittels Mann-Whitney-U-Test für die stetigen und χ^2 -Test oder dem exakten Test nach Fisher für die nominalen Variablen ergab signifikante Unterschiede für Patienten mit niedriger COLVI-Expression (IRS 0-1) gegenüber solchen mit hoher COLVI-Expression (IRS 2-3) für die Variablen LDH und die Art der Schwerkette (HC). Patienten mit niedriger COLVI-Expression hatten dabei signifikant seltener monoklonales IgA (16,7 % vs. 33,3 %), häufiger monoklonales IgG (53,8 % vs. 42,9 %) und häufiger ein Leichtkettenmyelom (29,5 % vs. 9,5 %) als solche mit hoher COLVI-Expression. Außerdem hatten sie im Durchschnitt eine signifikant erhöhte LDH-Konzentration bei Diagnosestellung (196 U/l vs. 162 U/l). Abkürzungen: LDH, Lactatdehydrogenase; Hb, Hämoglobin; b2M, beta-2-Mikroglobulin; Heavy chain, Konzentration der Schwerkette bei Induktion; Light chain, Konzentration der Leichtkette bei Induktion; WBC engraftment, Anzahl der Tage von Auto-SCT bis Leukozyten-Engraftment; PLT engraftment, Anzahl der Tage von Auto-SCT bis Thrombozyten-Engraftment; R-ISS, Revised International Staging System; EM Manifestation, Extramedulläre Manifestation; LCDD, Leichtkettenspeicherkrankheit; Tandem HD, Tandemhochdosistherapie; Allo-SCT, allogene Stammzelltransplantation..... 31

Tabelle 3 | Ansprechen auf Induktions- und Hochdosistherapie. Die Auswertung des Ansprechens auf die Induktions- und Hochdosistherapie mittels dem exakten Test nach Fisher ergab keine Signifikanz für Patienten mit niedriger COLVI-Expression (IRS 0-1) gegenüber solchen mit hoher COLVI-Expression (IRS 2-3). Hierfür wurde das Ansprechen in drei Kategorien eingeteilt, solche mit Ansprechen (1 = sCR, CR, VGPR, PR), solche mit stabiler Erkrankung (2 = SD) und solche mit fortschreitender Erkrankung (3 = PD). Abkürzungen: Ind, Induktionstherapie; HD, Hochdosistherapie..... 32

FLUSSDIAGRAMMVERZEICHNIS

Flussdiagramm 1 | Auswahl und Ausschluss der Patienten beziehungsweise Patientenproben. Von 495 Patienten wurden 285 ausgeschlossen, weil keine Probe vorhanden war, 33 weil ihre Probe nach Therapiestart entnommen wurde, 16 weil die Probe keine Plasmazellinfiltration aufwies und 62 weil der Entnahmezeitpunkt der Probe unklar war. Die Kollagen Typ VI Expression wurde bei 99 Patienten untersucht.....25



DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

ANHANG

1. **Forschungsgenehmigung des „Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz“, Nordrhein-Westfalen (Aktenz.: 2016-654-f-S)**
2. **Laborprotokoll APAAP-Immunhistochemie Anti-Collagen VI - 05. + 06.12.2017**

1. Forschungsgenehmigung des „Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz“, Nordrhein-Westfalen (Aktenz.: 2016-654-f-S)

<p>Patientenschutz Forschungsfreiheit</p>  <p>ÄRZTEKAMMER WESTFALEN-LIPPE</p>  <p>WESTFÄLISCHE WILHELMS-UNIVERSITÄT MÜNSTER</p>	<p>ETHIK KOMMISSION</p> <p>der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der Westfälischen Wilhelms-Universität</p> <p>Gartenstraße 210-214 48147 Münster, Germany Tel.: +49 (0)251 929 2460 Fax: +49 (0)251 929 2478 E-Mail: ethik-kommission@aeowl.de www.ethik-kommission.uni-muenster.de</p>
<p>Ethik-Kommission Münster - Gartenstraße 210 - 214 - 48147 Münster</p>	
<p>Herrn PD Dr. med. Christoph Schliemann Medizinische Klinik A Universitätsklinikum Münster Albert-Schweitzer-Campus 1, Gebäude A1 48149 Münster</p>	
<p>22. Dezember 2016</p>	
<p>Unser Aktenzeichen: 2016-654-f-S (bitte immer angeben!) Titel des Forschungsvorhabens: „Multiple Myeloma Tissue Microarray“</p>	
<p>Beratung und Bewertung</p>	
<p>Sehr geehrter Herr Dr. Schliemann,</p> <p>für das oben genannte Forschungsvorhaben haben Sie mit Schreiben vom 28.11.2016 die Beratung durch die Ethik-Kommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster („Ethik-Kommission“) beantragt. Die Ethik-Kommission hat in ihrer Sitzung am 16.12.2016 über Ihren Antrag beraten und beschlossen:</p> <p style="text-align: center;">Die Ethik-Kommission hat keine grundsätzlichen Bedenken ethischer oder rechtlicher Art gegen die Durchführung des Forschungsvorhabens.</p> <p><u>Die Kommission weist allerdings auf Folgendes hin:</u> Für Patienten, die darin nicht eingewilligt haben, können keine korrelierenden Untersuchungen durchgeführt werden. Daten oder Proben von auswärtigen Hausärzten, Onkologen und Pathologien können nur von Patienten eingeholt werden, die dafür eine Einwilligung erteilt haben. Für eine Ausnahme von diesem Grundsatz sind die Voraussetzungen nicht erfüllt.</p> <p>Die vorliegende Einschätzung gilt für das Forschungsvorhaben, wie es sich auf Grundlage der in Anhang 1 genannten Unterlagen darstellt.</p> <p>Für die Entscheidung der Ethik-Kommission erhebt die Ärztekammer Westfalen-Lippe Gebühren nach Maßgabe ihrer Verwaltungsgebührenordnung. Für Ihren Antrag gewährt die Ethik-Kommission eine Ermäßigung der Verwaltungsgebühr auf 20% des regulären Gebührensatzes. Über die auf 20% ermäßigten Gebühren erhalten Sie von der Ärztekammer einen gesonderten Bescheid.</p> <p><u>Allgemeine Hinweise:</u> Mit der vorliegenden Stellungnahme berät die Ethik-Kommission die der Ärztekammer Westfalen-Lippe angehörenden Ärztinnen und Ärzte zu den mit dem Forschungsvorhaben verbundenen berufsethischen und berufsrechtlichen Fragen gemäß § 15 Abs. 1 Berufsordnung ÄKWL.</p>	
<p>Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. med. H.-W. Bothe M.A., phil. Stellvertretende Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. med. W. E. Berdel, Prof. Dr. phil. C. Frenzt, Univ.-Prof. Dr. med. F. U. Möller</p>	

Ethik-Kommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
unser Az: 2016-0544-S
Schreiben vom: 22. Dezember 2016

Die Einschätzung der Kommission ist als ergebnisoffene Beratung für den Antragsteller nicht bindend. Die Ethik-Kommission weist darauf hin, dass unabhängig von der vorliegenden Stellungnahme die medizinische, ethische und rechtliche Verantwortung für die Durchführung des Forschungsvorhabens bei dessen Leiter und bei allen an dem Vorhaben teilnehmenden Ärzten bzw. Forschern verbleibt.

An der Beratung und Beschlussfassung haben die in Anhang 2 aufgeführten Mitglieder der Ethik-Kommission teilgenommen. Es haben keine Mitglieder teilgenommen, die selbst an dem Forschungsvorhaben mitwirken oder deren Interessen davon berührt werden.

Die Ethik-Kommission empfiehlt im Einklang mit der Deklaration von Helsinki nachdrücklich die Registrierung klinischer Studien vor Studienbeginn in einem öffentlich zugänglichen Register, das die von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) geforderten Voraussetzungen erfüllt, insbesondere deren Mindestangaben enthält. Ausführliche Informationen zur International Clinical Trials Registry Platform (ICTRP) stehen im Internetangebot der WHO zur Verfügung:

<http://www.who.int/ictcp/about/en/>

Zu den Kriterien des International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) sei beispielsweise verwiesen auf die Informationen unter:

<http://www.icmje.org/recommendations/browse/publishing-and-editorial-issues/clinical-trial-registration.html>

Das WHO Primär-Register für Deutschland ist das Deutsche Register für Klinische Studien (DRKS) in Freiburg. Es erfüllt die Forderungen der Fachzeitschriften:

<http://www.drks.de/index.html>

Die Ethik-Kommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster ist organisiert und arbeitet gemäß den nationalen gesetzlichen Bestimmungen und den GCP-Richtlinien der ICH.

Die Kommission wünscht Ihrem Forschungsvorhaben gutes Gelingen und geht davon aus, dass Sie nach Abschluss des Vorhabens über die Ergebnisse berichten werden.

Mit freundlichen Grüßen



Prof. Dr. phil. Christiane Frantz
Stellv. Vorsitzende der Ethik-Kommission

Ethik-Kommission der Ärztekammer Westfalen-Lippe und der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
unser Az.: 2016-6544-S
Schreiben vom: 22. Dezember 2016

Anhang 1

Folgende Unterlagen haben bei der Beschlussfassung vorgelegen:

Bei mehreren Versionen eines Dokumentes bezieht sich unsere Bewertung stets auf die letzte Version.

Eingang	Datierung	Anlage
02.12.2016	28.11.2016	Antrag inkl. CVs ohne CD

Anhang 2

Folgende Mitglieder der Ethik-Kommission haben an der Beratung und Beschlussfassung in der Sitzung am 16.12.2016 teilgenommen:

Dr. med.
Doris Dorsel, M.A., LL.M.
Ärztekammer Westfalen-Lippe

Hans-Theo Fortmeier
Universitätsklinikum Münster, Apotheke

Prof. Dr. phil.
Christiane Frantz
Westfälische Wilhelms-Universität Münster,
Institut für Politikwissenschaft

Prof. Dr. med.
Uwe Kirchhefer
Universitätsklinikum Münster, Institut für
Pharmakologie und Toxikologie

Dr. jur.
Anna Lauber, LL.M.
Kanzlei am Ärztehaus, Münster

Gisela Laumann
Patientenvertreterin

Heidi Oellers
Universitätsklinikum Münster, Kompetenznetz
Vorhofflimmern

Dr.
Raif Schupp
Alexianer-Hospital Münster, Referat Christliche
Ethik/Leitbild/Spiritualität

Prof. Dr. med.
Friedrich-Wilhelm Schütter
St. Elisabeth-Hospital Herten, Chirurgie

/

2. Laborprotokoll APAAP-Immunhistochemie Anti-Collagen VI – 05. + 06.12.2017

Laborprotokoll

Jan Roseland

Di. 05.12.2017 + Mi. 06.12.2017

Tag 1+2 APAAP Anti-Collagen VI Färbung von 9 Myelom Arrays und 7 Kontrollen

APAAP-Immunhistochemie Anti-CollagenVI

Tag 1

Schritt	Zeit
Deparaffinierung und Antigendemaskierung	
Xylol (2-3 x wiederverwendbar)	3 x 5 min
Abst. Ethanolreihe 100-95-70-50%	je 2 min
In TBS waschen	15 min
Zitratpuffer (DAKO S2031) 1:10 in Aqua dest. verdünnen	
Verdünnten Zitratpuffer in der Mikrowelle bei 450 W aufwärmen	1 min
Schnitte im aufgewärmten Zitratpuffer bei 450 W kochen	15 min
- dazwischen immer mit Aqua dest. auffüllen (z.B. alle 5 min)	
- Gewebe muss immer komplett im Puffer stehen	
Mit Aqua dest. auffüllen und bei Raumtemperatur abkühlen lassen	15-20 min
In Aqua dest. waschen	5 min
In TBS waschen	5 min
Immunreaktion	
Mit Silikonstift umranden	
Mit Proteinblock (DAKO X0909) in Feuchtkammer inkubieren	30 min
Proteinblock abgießen	
In TBS waschen	3 x 3 min
Primärantikörper (NB120-6588 / pAb anti-CollagenVI / Lot 21632 / 0,1mg immunogen affinity purified Rabbit Sera 2,0 mg/ml) 1:800 in Antikörperdiluent (DAKO S3022) verdünnen	
- insgesamt 3196µl Diluent und 4µl Antikörper	
Inkubation mit Primärantikörper in Feuchtkammer für 2 h bei 37 °C oder über Nacht bei 4 °C	

Tag 2

Schritt	Zeit
Sekundärantikörperreaktion (Sekundär-AK ggf. an Primär-AK anpassen)	
In TBS waschen	3 x 3 min
Mit mouse anti-rabbit (DAKO M0737) 1:100 in Feuchtkammer inkubieren	45 min
In TBS waschen	3 x 3 min
Mit rabbit anti-mouse (DAKO Z0259) 1:25 in Feuchtkammer inkubieren	45 min
In TBS waschen	3 x 3 min

Schritt	Zeit
Mit mouse monoclonal APAAP-Komplex (DAKO D0651) 1:50 in Feuchtkammer inkubieren	30 min
In TBS waschen	3 x 3 min
Farbreaktion	
Fuchsin+ Substrat-Chromogen (DAKO K0625) - 60 µl <i>Fuchsin+Chromogen</i> + 60 µl <i>Fuchsin+ActivatingAgent</i> mischen und 1 min bei RT stehen lassen - mit 880 µl <i>Fuchsin+SubstrateBuffer</i> hinzugeben, mischen und innerhalb von 30 min aufbrauchen	
Inkubation der Schnitte unter mikroskopischer Kontrolle	30 min
Reaktion mit Aqua dest. stoppen	
Gegenfärbung	
Mayer's Hämalaun (1:2 Verdünnung mit Aqua dest.)	ca. 8 s
unter Leitungswasser bläuen	10 min
Trocknen bei RT über Nacht	
Einbettung mit Glycergel	