



**Analyse von BMP2 und BMP2-Derivaten der TGF- $\beta$ -Familie als  
potentielles Therapeutikum im Multiplen Myelom**

Analysis of BMP2 and BMP2 derivatives of the TGF- $\beta$ -family as a  
potential therapeutic agent in multiple myeloma

Dissertation zur Erlangung des zahnmedizinischen Doktorgrades  
der Graduate School of Life Sciences,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,  
Klasse Biomedizin

Vorgelegt von  
**Charlotte Lagler**

aus  
**Heilbronn**

Würzburg 2017

**Eingereicht am:** 18.05.2017

**Mitglieder des Promotionskomitees:**

- Vorsitzender:** Prof. Dr. Bargou
- 1. Betreuer:** Prof. Dr. Th. Müller
- 2. Betreuer:** Prof. Dr. H. Wajant
- 3. Betreuer:** Prof. Dr. Dr. U. Müller-Richter

**Tag des Promotionskolloquiums:** 18.10.2017

**Doktorurkunden ausgehändigt am:**.....

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „**Analyse von BMP2 und BMP2-Derivaten der TGF- $\beta$ -Familie als potentiell Therapeutikum im Multiplen Myelom**“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

*Ort, Datum*

*Unterschrift*

## Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “**Analysis of BMP2 and BMP2 derivatives of the TGF- $\beta$ -family as a potential therapeutic agent in multiple myeloma**” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

*place, date*

*Signature*

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Kübler und Herrn Prof. Dr. Dr. Müller-Richter dafür bedanken, dass ich die Möglichkeit hatte, in ihrer Arbeitsgruppe meine Doktorarbeit anzufertigen. An dieser Stelle geht mein Dank vor allem an Dr. Axel Seher, unter dessen wissenschaftlicher Leitung und Betreuung diese Arbeit zum Erfolg wurde. Danke für solch ein interessantes Thema, für die tollen Ideen und für die wertvollen Ratschläge und Hilfestellungen bei Problemlösungen.

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinen Supervisoren Herrn Prof. Dr. Thomas Müller und Herrn Prof. Dr. Harald Wajant für die Zeit bedanken, die sie sich für diese Arbeit genommen haben, um mich während meiner Promotion zu betreuen. Herrn Prof. Wajant danke ich ebenfalls für die Bereitstellung von einigen Geräten und Substanzen, sowie für die Beratung zum md-Programm der Graduate School of Life Sciences.

Frau Sabine Willhelm danke ich für die Hilfe bei den FACS-Experimenten und Dr. Joachim Nickel für die gute Zusammenarbeit bei der Publikation „Utilizing BMP-2 Muteins for Treatment of Multiple Myeloma“.

Zudem bedanke ich mich für eine sehr gute professionelle Zusammenarbeit während der gesamten Arbeitszeit bei allen Mitarbeitern und Kollegen des wissenschaftlichen Labors der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie und der Abteilung für Molekulare Innere Medizin des Universitätsklinikums Würzburg.

Besonders danken möchte ich meinen Eltern, Geschwistern und Freunden, die mich unterstützt und motiviert haben. Danke an alle für den Rückhalt, die Geduld und die Unterstützung während der Promotion.

Für meine Familie

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Das Multiple Myelom .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Ätiologie und Epidemiologie .....	1
1.1.2	Pathogenese und klinisches Bild .....	2
1.2	<b>Die TGF-<math>\beta</math>-Superfamilie und die Rolle ihrer Mitglieder Aktivin-A, BMP2 und GDF5 im Multiplen Myelom.....</b>	<b>3</b>
1.2.1	Die Signaltransduktion der TGF- $\beta$ -Superfamilie .....	4
1.2.2	Aktivin-A und seine Rolle im Multiplen Myelom.....	7
1.2.3	BMPs und ihre Rolle im Multiplen Myelom .....	9
1.3	<b>Therapieformen des Multiplen Myeloms .....</b>	<b>10</b>
1.3.1	Die Therapie der Primärerkrankung und die Supportivtherapie .....	10
1.3.2	Aktivin-A Antagonisten als mögliche Therapieform .....	11
1.3.3	Der Einsatz von BMP-Derivaten als Aktivin-A-Antagonist und therapeutisches Agens im Multiplen Myelom.....	12
1.4	<b>Ziel der Arbeit .....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>15</b>
2.1	<b>Material .....</b>	<b>15</b>
2.1.1	Eukaryotische Zellen .....	15
2.1.2	Zellkulturmedien und Zusätze .....	15
2.1.3	Reagenzien, Chemikalien .....	15
2.1.4	Antikörper.....	16
2.1.5	Kommerzielle Kits .....	16
2.1.6	Primer .....	17
2.1.7	Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	17
2.1.8	Lösungen und Puffer .....	18
2.2	<b>Methoden .....</b>	<b>19</b>
2.2.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	19
2.2.2	Liganden-Präparation.....	19
2.2.3	WST1-Vitalitäts-assay .....	20
2.2.4	Zytotoxizitäts-assay.....	20
2.2.5	Casy®-Zellzählung – <i>Coulter Counter</i> .....	20

2.2.6	ALP-assay.....	21
2.2.7	Quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction.....	21
2.2.8	Herstellung der Zell-Lysate.....	22
2.2.9	Westernblot.....	22
2.2.10	Fluorescence-activated cell sorting (FACS).....	23
2.2.11	Statistik .....	23
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Anti-proliferative Wirkung von BMP2 .....</b>	<b>24</b>
3.1.1	Humane MM-Zelllinien reagieren unterschiedlich auf BMP2.....	24
3.1.2	Analyse der biologischen Aktivität von BMP2 und GDF5.....	25
3.1.3	Lichtmikroskopische Darstellung von MM-Zellen nach BMP2- und FasL-Fc-Stimulation .....	29
3.1.4	Analyse des programmierten Zelltodes mit spezifischen Inhibitoren der Nekroptose und Apoptose .....	31
3.1.5	BMP2 stimulierte MM-Zellen zeigen keine Caspase-Aktivierung .....	37
3.1.6	Durch BMP2-Stimulation sinkt die Zellteilungsrate und die Quantität der apoptotischen Zellen bleibt relativ konstant.....	39
<b>3.2</b>	<b>Analyse der durch BMP2 vermittelten Smad-Signaltransduktion in Zelllinien des Multiplen Myeloms .....</b>	<b>41</b>
3.2.1	BMP2-Rezeptorexpression der humanen MM-Zelllinien.....	41
3.2.2	KMS11, AMO1, U266 und MM.1S exprimieren z.T. Phospho-Smad nach BMP2-Stimulation und besitzen ein hohes Level an Smad-7 .....	43
<b>3.3</b>	<b>Analyse der biologischen Aktivität von BMP2- und GDF5-Derivaten als potentielles Agens im Multiplen Myelom.....</b>	<b>46</b>
3.3.1	Der BMP2/Aktivin-A-Antagonismus .....	46
3.3.2	<i>Molecular Design</i> von BMP2 und GDF5.....	47
3.3.3	Analyse der biologische Aktivitäten der BMP2- und GDF5-Derivate .....	49
3.3.4	Analyse der Wirkung der Derivate von GDF5 und BMP2 in MM-Zellen .....	51
3.3.5	Aktivin-A-Wirkung auf MM-Zellen .....	56
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>59</b>
4.1	<b>BMP2 wirkt nicht apoptotisch, sondern anti-proliferativ in MM-Zellen .....</b>	<b>59</b>
4.2	<b>Responsiv vs. Non-Responsiv .....</b>	<b>64</b>
4.3	<b>Antagonismus von Aktivin-A.....</b>	<b>66</b>

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>Literatur- , Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>75</b>
6.1	Abkürzungen .....	75
6.2	Literatur .....	77



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Multiple Myelom

Das Multiple Myelom (MM) ist eine maligne neoplastische Erkrankung des Knochenmarks, welche durch eine Plasmazellvermehrung (Plasmozytose) mit erhöhter Produktion von funktionslosen und meist fragmentierten Immunglobulinen charakterisiert ist (Kyle and Rajkumar, 2004). Treten diese in großen Mengen als monoklonale Antikörperfragmente auf, spricht man vom M-Protein, welches im Blut oder Urin nachweisbar ist (Palumbo and Anderson, 2011). Andere Bezeichnungen für das Multiple Myelom sind „Plasmozytom“, „Kahler Krankheit“, „Huppert-Krankheit“ oder „monoklonale Gammopathie mit pathologischer Produktion von Immunglobulinen“.

### 1.1.1 Ätiologie und Epidemiologie

Das zu den B-Zell-Lymphomen zählende Multiple Myelom ist mit 10-15 % aller malignen hämatologischen Erkrankungen die zweithäufigste Krebserkrankung des blutbildenden Systems und repräsentiert 1 % aller Krebserkrankungen (Derlin and Bannas, 2014). In den Industrieländern lag die altersabgeglichene Inzidenz der Neuerkrankung zwischen den Jahren 2005 und 2009 bei 5,6 Fällen pro 100.000 Einwohner (Palumbo and Cerrato, 2013). Das mediane Lebensalter bei Erstdiagnose lag in diesem Zeitraum bei 69 Jahren, während Erkrankungen vor dem 35. Lebensjahr äußerst selten und keine Fälle von unter 20-jährigen Patienten dokumentiert sind (Palumbo and Cerrato, 2013). In der US-amerikanischen schwarzen Bevölkerung tritt das MM ca. doppelt so häufig auf als bei Kaukasiern, wohingegen in China die geringste Inzidenzrate vorliegt (Landgren et al., 2006). Dabei haben Männer ein höheres Erkrankungsrisiko als Frauen (Chou, 2012). Die Ätiologie des Multiplen Myeloms ist unklar. In Diskussion stehen jedoch verschiedene Risikofaktoren, wie die ökologische und medizinische Exposition ionisierender Strahlung (Lewis, 1963) oder mutagene Substanzen, wie Pestizide und Produkte der Petrochemie (Divine et al., 1999, Kogevinas et al., 1998, Wong and Raabe, 1997). Zudem können chronische Infektionen, wie Hepatitis C und HIV als Ursache für eine MM-Erkrankung in Frage kommen (RKI, Zentrum für Krebsregisterdaten C90, 2013). Einer weiteren Studie zufolge steigert ein erhöhter Body-Mass-Index (BMI) bzw. Adipositas das Risiko für die Entwicklung eines Multiplen Myeloms (Wallin and Larsson, 2011). Landgren *et al.* konnte in einer Studie zwar familiäre Häufungen feststellen, jedoch eine Vererbung der Erkrankung nicht ausreichend belegen (Landgren et al., 2006). Das vermehrte Auftreten bei Afroamerikanern, die familiäre Abundanz der Erkrankung, sowie die Assoziation der Erkrankung mit Chromosomenaberrationen und Genmutationen (z.B. 17p13-Deletion (Chang et al., 2004), t(4;14)(p16;q32)-Translokation (Keats et al., 2006), Monosomie 13 / Deletion 13q (Kobayashi and Miura, 2000)) lassen

einen hereditären Zusammenhang möglich erscheinen (Faiman and Richards, 2014). Einem MM gehen vermutlich chromosomale Translokationen (Bergsagel and Kuehl, 2001), sowie eine Vielzahl an Mutationen (Leich et al., 2013), die zu einer verstärkten bzw. veränderten Expression verschiedener Gene führen, voraus. In starker Diskussion stehen unter anderem die Gene Zyklin D1, D2 und D3 und die *fibroblast growth factor* Rezeptoren FGFR2 und FGFR3 (Jang and Chung, 2002, Tomlinson et al., 2007). Obwohl eine Vielzahl an Risikofaktoren bereits belegt ist, sind die ausschlaggebenden Ursachen für die Entstehung eines MMs letztendlich noch nicht geklärt. Es wird von einer multikausalen Pathologie ausgegangen, wobei die Summe und das Zusammenspiel verschiedener Faktoren das klinische Gesamtbild bestimmen (Anguiano et al., 2009).

### 1.1.2 Pathogenese und klinisches Bild

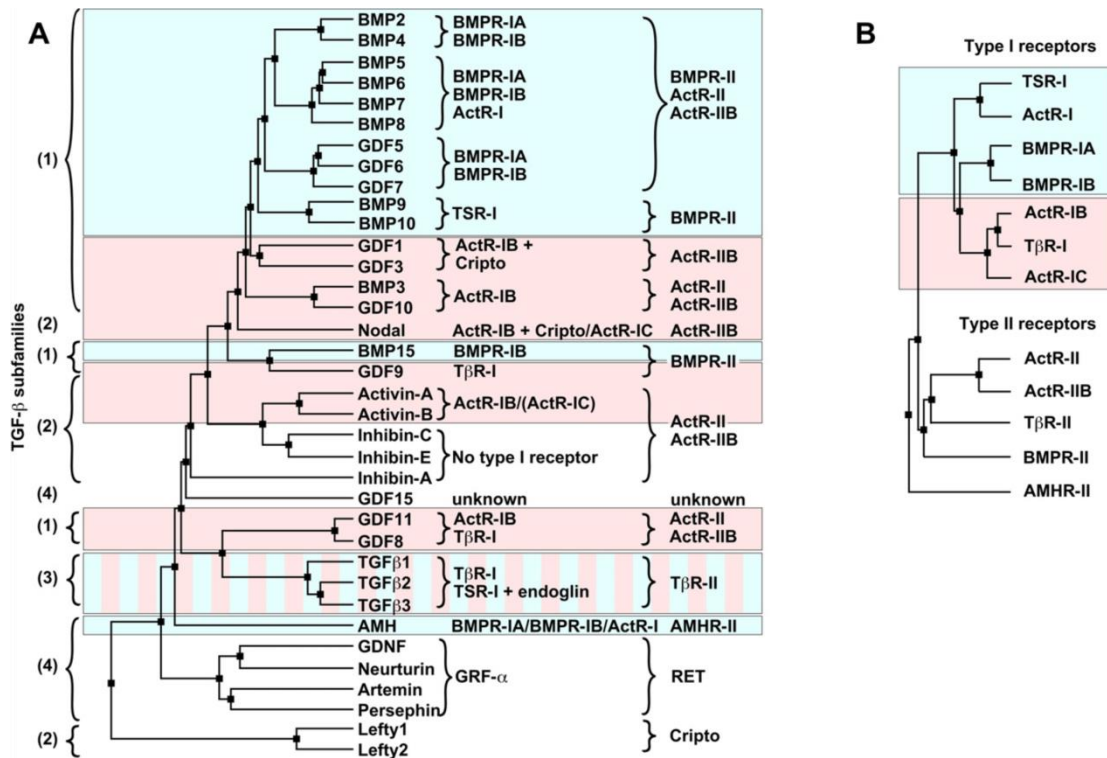
Die wesentlichen Charakteristika aller Plasmazelltumore sind die raumfordernde, lokal destruktive klonale Vermehrung der Plasmazellen und die Sezernierung des Paraproteins (monoklonale Immunglobuline, M-Proteine). Unterschieden werden Myelome, die komplette Immunglobuline bilden, von den Leichtkettenmyelomen mit fragmentierten Immunglobulinen (Bence-Jones-Proteine). Komplette Immunglobuline können mit schweren Ketten (H-Ketten) vom IsoTyp-IgG (~65%) oder IgA (~20%) sein. Seltener sind Fälle mit IsoTyp-IgD oder IsoTyp-IgE bekannt, sowie die Bildung kompletter Immunglobuline mit der leichten Kette  $\kappa$  (vorwiegend) oder  $\lambda$  (Hans-Harald Sedlacek, Onkologie - die Tumor-Erkrankungen des Menschen, De Gruyter-Verlag 2013, ISBN 3110255111).

Die Pathogenese des Multiplen Myeloms zieht sich vom solitären (medulläres/extramedulläres) Plasmozytom, über monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS), dem asymptomatischen Smouldering Myelom bis hin zum symptomatischen Multiplen Myelom (Kumar et al., 2008). Die typischen Symptome des MMs sind Fatigue durch Anämie, Knochenschmerzen und -brüche, Hyperkalzämie und Osteolysen (Hideshima et al., 2004, Bommert et al., 2006), erhöhte Infektanfälligkeit aufgrund von sekundärem Antikörpermangel und Leukopenie (Kyle and Rajkumar, 2004), sowie Gewichtsverlust und schäumender Urin aufgrund einer Bence-Jones-Proteinurie oder Albuminurie. Außerdem können Seh- und Gedächtnisstörungen, Schwindel, Angina Pectoris, Angina abdominalis und Blutungsneigung durch Thrombozytopenie im Rahmen eines Hyperviskositätssyndroms vorkommen. Auch das Auftreten einer AL-Amyloidose und mit ihr vergesellschafteter Symptome ist möglich (Suzuki, 2012). Aufgrund der überschüssigen Expression von Immunglobulinen und vermehrter Ausscheidung von Leichtketten im Urin, sowie deren Ablagerung im Nierengewebe kommt es zur Nephropathie bis hin zu akutem Nierenversagen (Singhal and Mehta, 2006, Seymour et al., 1980, Kastritis et al., 2009).

## 1.2 Die TGF- $\beta$ -Superfamilie und die Rolle ihrer Mitglieder Aktivin-A, BMP2 und GDF5 im Multiplen Myelom

Nach der *International Myeloma Working Group* (IMWG) sind die Hauptsymptome des Multiplen Myeloms in den sogenannten CRAB-Kriterien zusammengefasst. Zu ihnen gehören Hyperkalzämie („*hyper calcemia*“ (C)), Niereninsuffizienz („*renal insufficiency*“ (R)), Anämie („*anemia* (A)) und Knochenbeteiligung („*bone lesions*“ (B)). Dabei konnte man in den letzten Jahren feststellen, dass Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie eine wesentliche Rolle bei der Ausprägung des Phänotyps des Multiplen Myelom haben. Zum Beispiel ist der Level an Aktivin-A im Blutserum von Multiplen-Myelom-Patienten erhöht und geht mit dem Grad der Osteolysen einher (Vallet et al., 2010, Chantry et al., 2010, Terpos et al., 2012, You and Kruse, 2002). Außerdem wirken *Bone Morphogenetic Proteins*, die maßgeblich bei der Knochenentwicklung und -homöostase sind, bei Multiplen Myelom Zellen apoptotisch (Kawamura et al., 2002, Holien et al., 2012, Hjertner et al., 2001, Olsen et al., 2014).

Die *Transforming-Growth-Factor*(TGF)- $\beta$  Superfamilie setzt sich bei Säugetieren aus 30 Liganden zusammen, welchen 7 Typ-I (TSR-I, ActR-I, BR-IA, BR-IB, ActR-IB, T $\beta$ R-I, ActR-IC) und 5 Typ-II Rezeptoren (ActR-II, ActR-IIB, TR $\beta$ -II, BR-II, AMHR-II) zur Verfügung stehen (Mueller and Nickel, 2012). Aufgrund ihrer biologischen Funktion und dem Grad der Homologie lassen sich die 30 Liganden der TGF- $\beta$ -Superfamilie in vier unterschiedliche Subgruppen untergliedern: (1) BMPs/GDFs, (2) Aktivine/Inhibine/Nodale, (3) TGF- $\beta$ s und (4) Sonstige (u.a. Anti-Müller-Hormon) (Mueller and Nickel, 2012), wobei die Gruppe der BMPs die größte darstellt (Miyazono et al., 2010) (Abb. 1).



(Mueller and Nickel, 2012)

**Abb. 1:** (A) Phylogenetische Analyse der TGF- $\beta$ -Superfamilie (nur die gespleißte Region wurde benutzt), welche die Existenz vierer Subgruppen aufzeigt: (1) BMPs/GDFs, (2) Aktivine/Inhibine/Nodale, (3) TGF- $\beta$ s und (4) Sonstige. Die Typ-I und Typ-II-Rezeptor-Nutzung ist neben jedem Liganden angegeben. Blau gekennzeichnet ist der Smad-1/5/8- und rot der Smad-2/3-Signalweg. (B) Phylogenetischer Baum (Kinase-Domänen wurden für die Analyse benutzt) der TGF- $\beta$ -Rezeptoren, welcher die Typ-I- / Typ-II- Untergruppenklassifikation hervorhebt. Die Farbkennzeichnung von Typ-I Rezeptor zeigt den Smad-pathway an, der eingeleitet wurde (wie in A) (Mueller and Nickel, 2012).

### 1.2.1 Die Signaltransduktion der TGF- $\beta$ -Superfamilie

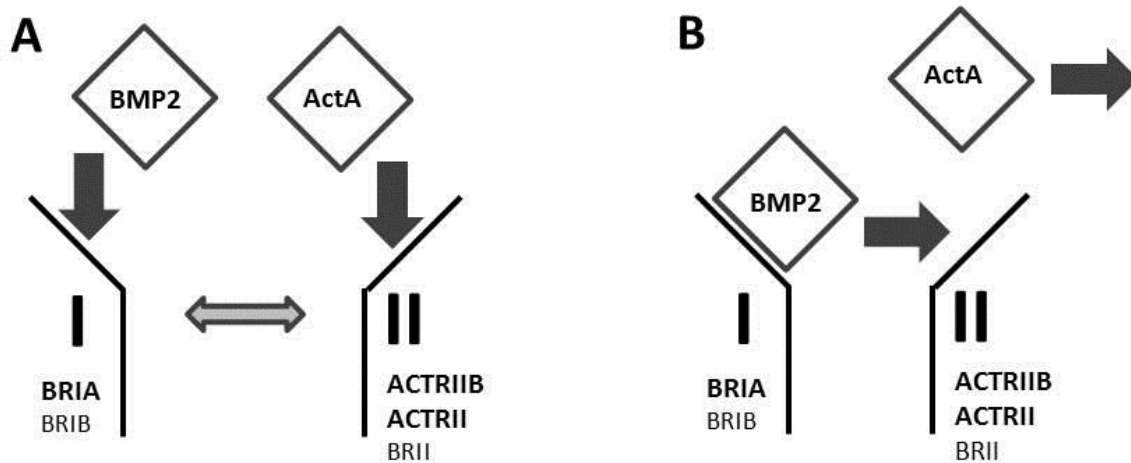
Charakteristisch für die TGF- $\beta$ -Superfamilie ist ihr Mechanismus der Ligand-Rezeptor-Aktivierung. Die Liganden agieren als Dimere, die zur Aktivierung der Signaltransduktion einen heterohexameren Ligand-Rezeptor-Komplex bilden (Nickel et al., 2009). Dazu werden neben dem dimeren Liganden jeweils zwei Typ-I und zwei Typ-II Rezeptoren rekrutiert, worauf sich ein Serin/Threonin(Ser/Thr)-Kinase-Rezeptorkomplex bildet, der zur Aktivierung von zytosolischen Transkriptionsfaktoren, den Smad-Proteinen führt (Abb. 2).

Alle Liganden der TGF- $\beta$ -Familie besitzen grundlegend unterschiedliche Affinitäten zu den Typ-I und Typ-II Rezeptoren (Müller, Sebald 2007, Biospektrum). BMP2 z.B. bindet an die Typ-I Rezeptoren (BR-IA und -IB) hochaffin und an die Typ-II Rezeptoren (BR-II, ActR-II und -IIB) niederaffin (bis zu 100fach schwächer als an die Typ-I Rezeptoren) (Kirsch et al., 2000), (Müller, Sebald 2007, Biospektrum). Die Rezeptorkomplexbildung ist deshalb eine 2-Schritt-Reaktion. Im ersten Schritt bindet BMP2 an den hochaffinen Typ-I Rezeptor. Der gebildete BMP2/Typ-I-Rezeptorkomplex rekrutiert dann im nächsten Schritt den Typ-II Rezeptor zur

Bildung des hexameren Komplexes (Sebald et al., 2004). Genau anders verhält es sich z.B. mit Aktivin-A. Aktivin-A bindet hochaffin an die Typ-II Rezeptoren ActR-II und ActR-IIB und mit wesentlich geringerer Affinität an die Typ-I Rezeptoren ActR-IB und ActR-IC (Weber et al., 2007). Hier bindet ebenfalls in einer 2-Schritt-Reaktion der Ligand zuerst den Typ-II Rezeptor und dann den Typ-I Rezeptor. Aufgrund der geringeren Anzahl an Rezeptoren gegenüber der großen Anzahl an Liganden muss die Liganden-Rezeptor-Interaktion promiskuitiv sein. Das bedeutet, dass ein und derselbe Ligand unterschiedliche Typ-I und Typ-II Rezeptoren binden kann. Genauso kann ein und derselbe Rezeptor verschiedene Liganden binden. Während alle Liganden der TGF- $\beta$ -Familie (ausgenommen die TGF- $\beta$ s selbst) mehr oder minder auf den gleichen Satz an Typ-II Rezeptoren zugreifen, liegt der funktionell und biologisch relevante Unterschied der Signaltransduktion in der Nutzung unterschiedlicher Typ-I Rezeptoren (Mueller and Nickel, 2012).

Nach der Bildung des Ligand/Rezeptorkomplexes erfolgt dessen Aktivierung durch Transphosphorylierung spezifischer Bereiche der intrazellulären Rezeptordomäne. Die nachgeschalteten Smad(*Small Mothers against Decapentaplegic*)-Proteine, die sogenannten *Receptor-regulated-Smads(R-Smad)*, werden durch die Ser/Thr-Kinase-Domäne des Typ-I Rezeptors phosphoryliert und aktiviert (Massague et al., 2005). Die Liganden können je nach Signalweg - R-Smad-1/5/8 oder R-Smad-2/3 - in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Die Rezeptoren TSR-I (=Alk1) (Macias-Silva et al., 1998), ActR-I (Chen et al., 1997, Macias-Silva et al., 1998), BR-IA und BR-IB (Chen et al., 1997, Hoodless et al., 1996) aktivieren den Smad-1/5/8-*pathway*, während ActR-IB, T $\beta$ R-I und ActR-IC den Smad-2/3-*pathway* aktivieren (Kretschmar and Massague, 1998, Itoh et al., 2000, Mueller and Nickel, 2012). Demnach induziert die Bindung von BMP2/4, BMP-5/6/7 und GDF5/6/7 an deren Typ-I Rezeptoren BR-IA, BR-IB oder ActR-I den Smad-1/5/8-Signalweg (Feng and Derynck, 2005, ten Dijke and Hill, 2004, Miyazawa et al., 2002, Miyazono, 2001). Folglich entscheidet die Bindung der verschiedenen Typ-I Rezeptoren letztendlich über die genregulatorische und damit biologische Aktivität des Liganden/Rezeptor-Komplexes.

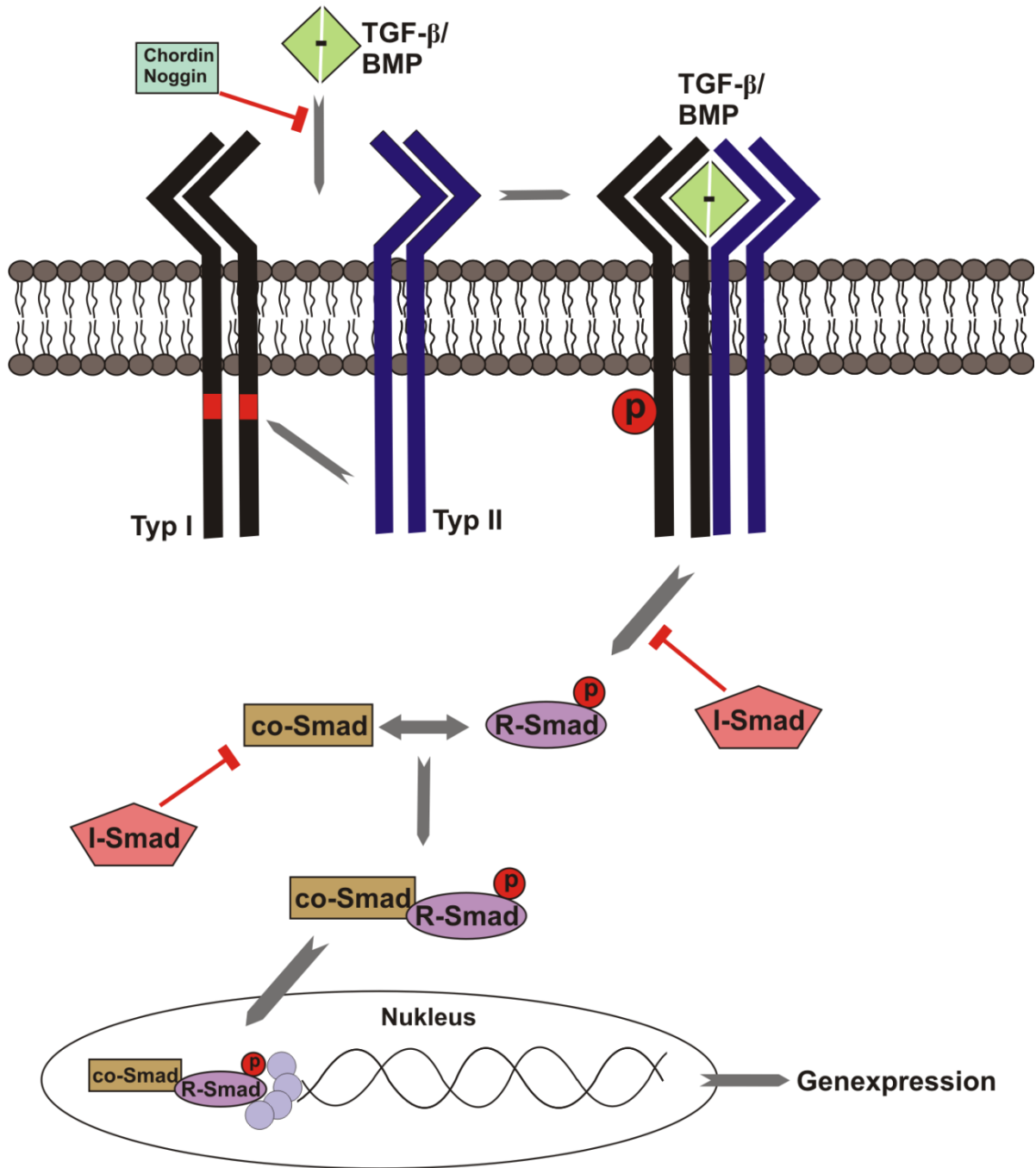
Dieser Umstand ist biologisch bedeutend, da Liganden der TGF- $\beta$ -Familie, die um die gemeinsam genutzten Typ-II Rezeptoren konkurrieren, deren Signaltransduktion aber durch die unterschiedliche Nutzung von Typ-I Rezeptoren divergiert, als Antagonisten am Rezeptor funktionieren können. Dies wird in Abbildung 2 an den Liganden BMP2 und Aktivin-A schematisch verdeutlicht.



**Abb. 2:** [A] Affinität von BMP2 und Aktin-A zu den Rezeptoren BR-IA, BR-IB, ActR-IIB, ActR-II und BR-II; [B] Verdrängung von Aktin-A vom Rezeptor Typ-II (ActR-II, ActR-IIB) durch BMP2.

Nach der Aktivierung des Rezeptors bilden die R-Smads mit dem *common-mediator-Smad* (co-Smad; Smad-4) einen Komplex, welcher in den Zellkern transloziert und dort zur Expression verschiedener *Target*-Genen führt (Heldin et al., 1997, Massague et al., 2005). Unter anderem kann der Transkriptionsfaktor RUNX exprimiert werden, der mitunter Hämatopoese und Osteogenese reguliert (Ito and Miyazono, 2003).

Die inhibitorischen Smads (*I-Smad*) Smad-6 und Smad-7 können auf zwei Wegen in die Signalkaskade eingreifen. Entweder blockieren sie den co-Smad-Komplex oder sie verhindern die Phosphorylierung der R-Smads am Typ-I Rezeptor (Massague et al., 2005). Dabei gilt Smad-7 als ein genereller Inhibitor der TGF- $\beta$ -Superfamilie, während Smad-6 spezifisch BMP-induzierte Signaltransduktion blockiert (Itoh et al., 1998, Ishisaki et al., 1999, Miyazawa et al., 2002). Des Weiteren kann die Signaltransduktion durch BAMBI (*BMP and activin membrane bound inhibitor*), welches als Pseudorezeptor zu Ser/Thr-Kinase Rezeptoren gehört, blockiert werden. Seine Expression wird durch BMPs und TGF- $\beta$  induziert (Miyazono et al., 2010, Massague et al., 2005). Außerdem können neben der Smad-Kaskade auch andere Signalwege, wie der MAPK(*mitogene-activated protein kinase*)- oder ERK(*extracellular signal-regulated kinases*)-Signalweg, durch Mitglieder der TGF- $\beta$ -Superfamilie ausgelöst werden (Zhang, 2009, Moustakas and Heldin, 2005).



**Abb. 3:** TGF- $\beta$  induzierte Smad-Signaltransduktion. Die Bindung von TGF- $\beta$ -Ligand als Dimer an je zwei Typ-I und zwei Typ-II Rezeptoren führt zur Bildung eines aktiven Ser/Thr-Kinase-Rezeptorkomplexes. Dieser phosphoryliert R-Smads, welche mit co-Smad einen Komplex bilden. Nach Translokation in den Nukleus werden verschiedene *Target*-Gene exprimiert. I-Smads können an co-Smad oder am Typ-I Rezeptor die Signalkaskade blockieren.

### 1.2.2 Aktivin-A und seine Rolle im Multiplen Myelom

Aktivin-A weist ein breites Spektrum an Funktionen auf. Unter anderem reguliert Aktivin-A die Funktion der Gonaden, hormonale Homöostase, Muskelwachstum, Entzündungsreaktionen, das Immunsystem, sowie Knochenumbauvorgänge (Luisi et al., 2001, Hedger and Winnall,

2012, Hedger et al., 2011). Durch seine Bindung an die Typ-I Rezeptoren ActR-IB und ActR-IC und die Typ-II Rezeptoren ActR-II und ActR-IIB wird der Smad-2/3 Signalweg ausgelöst (Chen et al., 2014).

In Bezug auf das Multiple Myelom wurde festgestellt, dass maligne Plasmazellen die Sekretion von Aktivin-A durch Knochenmarkstromazellen induzieren und dadurch der Blutserum-Level an Aktivin-A bei Patienten mit MM erhöht ist (Vallet et al., 2010). Dabei korreliert der Grad an Osteolysen bei MM-Patienten mit dem erhöhten Level an Aktivin-A im Blutplasma (Vallet et al., 2010, You and Kruse, 2002). Hingegen ist der Serum-Level von Aktivin-A bei Patienten mit MGUS (*Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz*) und asymptomatischen Smouldering Myelomen mit denen gesunder Patienten vergleichbar (Vallet et al., 2010). Daneben beschrieb auch Terpos *et al.*, dass bei der Erstdiagnose von symptomatischen MMs bzw. Rezidiven ein erhöhter Level an Aktivin-A vorliegt. Außerdem korrelieren niedrige Blutserum-Level an Aktivin-A mit einer erhöhten Lebenserwartung bei MM-Patienten (Terpos et al., 2012).

Aktivin-A kommt eine bedeutende Rolle im Multiplen Myelom zu, weil es aufgrund seiner biologischen Funktion unter anderem für die gestörte Knochenhomöostase verantwortlich sein kann (Vallet et al., 2010). Aktivin-A beeinflusst die Knochenhomöostase über zwei verschiedene katabole Wege. Zum einen aktiviert Aktivin-A knochenabbauende Osteoklasten, während zum anderen die Differenzierung von knochenaufbauenden Osteoblasten durch Aktivin-A inhibiert wird (You and Kruse, 2002). Osteoblasten entstehen aus multipotenten mesenchymalen Stammzellen (MSC), wohingegen Osteoklasten von hämatopoetischen Stammzellen abstammen. Bei der Osteoklastogenese kommt es durch Fusion von mononuklearen Vorläuferzellen der Monozyt/Makrophagen-Familie zur Entstehung multinuklearer Osteoklasten (Teitelbaum, 2000). Diese Differenzierung wird durch die Senkung des Osteoprotegerins (OPG), sowie die Erhöhung von *Receptor Activator of Nuclear factor- $\kappa$ B ligand* (RANKL) und den *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF) ausgelöst (Ma et al., 2001). Nach Stimulation mit Aktivin-A weisen die hämatopoetischen Stammzellen eine erhöhte RANK-Expression auf, wodurch ein parakrin-autokriner *Feedback Loop* entsteht, welcher zu verstärkter Osteoklastendifferenzierung und somit zum Knochenabbau führt (Sugatani et al., 2003). Dagegen wird von MM-Zellen die Freisetzung des knochenprotektiven OPGs, welches als *decoy*-Rezeptor antagonistisch zu RANKL wirkt, aus Knochenmarkstromazellen und Osteoblasten unterbunden (Pearse et al., 2001). Das verschobene Verhältnis von RANKL zu OPG zugunsten des RANKL löst eine positive Rückkopplung zwischen Osteoklasten und Multiplen Myelom-Zellen aus. Die Aktivierung von Osteoklasten durch RANKL führt durch Sekretion von Salzsäure und verschiedenen lytischen Enzymen (z.B. Cathepsin K, MMP-3) zur Knochenresorption (Teitelbaum, 2000). Dabei werden wiederum verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren,



wie z.B. IL-6, aus der extrazellulären Knochenmatrix freigesetzt, welche einen stimulierenden Effekt auf die Proliferation und das Überleben der Myelomzellen haben (Heider et al., 2006). Darüber hinaus reduziert Aktivin-A durch die Bindung an gemeinsamen Rezeptoren die biologische Aktivität von endogenem BMP2, einem starken Induktor der Knochenformation und -regeneration. BMP2 induziert den Transkriptionsfaktor Runx2/Cbfa-1, welcher die Osteoblastogenese fördert (Giuliani et al., 2007). Außerdem wirkt Aktivin-A der antiproliferativen Wirkung von BMP2 auf neoplastische B-Zellen (s. Kap. 1.2.3) entgegen. Damit kann Aktivin A eine Beteiligung an den zwei prominentesten Symptomen des Multiplen Myeloms zugesprochen werden: der malignen Plasmazell-Hyperproliferation und den Osteolysen.

### 1.2.3 BMPs und ihre Rolle im Multiplen Myelom

Anfänglich wurden BMPs als knochenbildende Proteine entdeckt, wodurch der Namen *Bone Morphogenetic Protein* entstand (Reddi and Reddi, 2009). Im Laufe der Zeit ergaben sich jedoch weit umfassendere Aufgaben der BMPs als ursprünglich angenommen. Neben der Knochenbildung tragen sie u.a. zur Differenzierung von Organen und Geweben, wie Knorpel, Zähnen, Niere, Haut, Haar, Muskeln, sowie der Entwicklung des blutbildenden und neuronalen Systems bei und halten außerdem den Eisenstoffwechsel und die Gefäßhomöostase aufrecht (Miyazono et al., 2010). Die BMPs können in die Subgruppen BMP2/4, BMP5/6/7/8 (OP1[*osteogenic-protein-1*]-Gruppe), GDF[*growth and differentiation factor*]5/6/7 und BMP9/10 eingeteilt werden. Myostatin (GDF8) und BMP3 wurden ebenfalls den BMPs zugeordnet, obwohl sie weder denselben Signalweg (Smad-2/3 anstatt Smad-1/5/8) haben, noch zur Knochen oder Knorpelbildung beitragen (Miyazono et al., 2010). Für die Großfamilie der BMPs ist die doppelte Linke-Hand-Struktur typisch (Scheufler et al., 1999), welche durch intermolekulare Disulfidbrücken stabilisiert wird (Müller, Sebald 2007, Biospektrum S.236). Wie bereits erwähnt interagieren die Liganden der BMP-Gruppe mit den Typ-I Rezeptoren BR-IA, BR-IB und ActR-I und den Typ-II Rezeptoren BR-II, ActR-II und ActR-IIB. Die Bindung mündet dann in den Smad-1/5/8 Signalweg (Miyazono et al., 2010).

Im Kontext des Multiplen Myeloms konnte für verschiedene BMPs eine apoptotische Wirkung auf B-Lymphozyten und unterschiedliche B-Zelllinien des Multiplen Myeloms aufgezeigt werden (Fukuda et al., 2006, Hjertner et al., 2001, Holien et al., 2012, Kawamura et al., 2002, Kawamura et al., 2000, Norgaard et al., 2010, Ro et al., 2004, Olsen et al., 2014). Im Jahr 2000 publizierten erstmals Kawamura et al. den apoptotischen Effekt von BMP2 auf die humanen Myelom-Zelllinien U266 und HS-Sultan, sowie auf primäre Multiple Myelom Zellen (Kawamura et al., 2000). In den folgenden Jahren konnte diese Erkenntnis durch mehrere Arbeiten an unterschiedlichen Zelllinien und primären Zellen des Multiplen Myeloms untermauert werden (Kawamura et al., 2002, Holien et al., 2012, Norgaard et al., 2010). Das

Spektrum der im MM Apoptose-induzierenden Liganden aus der TGF- $\beta$ -Familie erweiterte sich um die Faktoren BMP-4 (Fukuda et al., 2006, Hjertner et al., 2001), BMP-5/6/7 (Ro et al., 2004) und BMP-9 (Olsen et al., 2014). Die gegenwärtigen Studien beziehen sich auf Analysen der Zellmorphologie, *DNA ladder formation* (Kawamura et al., 2002), Analysen des Protoonkogens MYC (Holiien et al., 2012, Olsen et al., 2014) oder dem Nachweis aktivierter Caspasen, sowie einem p53 vermittelten anti-proliferativen Effekt (Fukuda et al., 2006). Hjertner *et al.* zeigten, dass BMP-4 die DNA-Synthese in drei Interleukin-6-abhängigen MM-Zelllinien inhibierte und bei einem Teil der Zellen den Zellzyklusarrest einleitete. Außerdem konnte BMP-4 in verschiedenen primären MM-Zellen Apoptose einleiten (Hjertner et al., 2001).

### 1.3 Therapieformen des Multiplen Myeloms

#### 1.3.1 Die Therapie der Primärerkrankung und die Supportivtherapie

Das Multiple Myelom ist nicht heilbar, jedoch interdisziplinär und multimodal therapierbar. Durch Remission und Eindämmung von Komplikationen kann die progressionsfreie Überlebenszeit verlängert werden. Bei einem symptomatischen Multiplen Myelom beginnt man mit einer alters- und zustandsabhängigen Primärtherapie (Kumar et al., 2008, Moreau, 2012, Gentile et al., 2012).

Hierbei kann eine klassische Kombinationstherapie bestehend aus dem Zytostatikum Melphalan und dem Kortikosteroid Prednison (*MP-Schema*) bei Patienten über 65 indiziert sein (Alexanian et al., 1969). Außerdem kann das Chemotherapeutikum Bendamustin plus Prednison (*BP-Schema*) eingesetzt werden (Ponisch et al., 2006). Eine Erhaltungstherapie auf Basis von Interferon- $\alpha$  wird kontrovers diskutiert (Fritz and Ludwig, 2000).

Weiteren Studien zufolge wirken sich immunmodulierende Substanzen (*Immunomodulatory Drugs - IMiDs*) wie Lenalidomid und Thalidomid positiv auf die Therapie aus, indem sie neben der Aktivierung von Immunzellen auch antiinflammatorisch, antitumorös und angiogenesehemmend wirken (Kastritis and Dimopoulos, 2007, Dimopoulos et al., 2007, Roziakova et al., 2014).

Neben den IMiDen können Proteasominhibitoren wie z.B. Bortezomib die Therapie in Kombination mit einer autologen Stammzelltransplantation erweitern, da sie anti-proliferativ und proapoptotisch auf Tumorzellen wirken (Neben et al., 2012, Sonneveld et al., 2013, van de Donk et al., 2006). Diese neuen Therapieansätze zeigen im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie eine verbessertes Ansprechen auf die Therapie und eine höhere Gesamtüberlebensrate (Rajkumar and Durie, 2008).

Neben der medikamentösen Therapie kann bei Patienten unter 65 Jahren eine autologe Stammzelltransplantation erfolgen, welche an eine myeloablative Hochdosis-Chemotherapie geknüpft ist (Krome, 2012). Seltener wird die allogene Stammzelltransplantation

vorgenommen, da sie eine höhere Rezidivquote hat und zunächst eine Frühmortalität von 50 % aufwies, welche jedoch in den letzten Jahren deutlich reduziert werden konnten (Gahrton et al., 2001). Hierbei ist in 50 % der Fälle eine Langzeitremission zu erkennen. Bei der allogenen Stammzelltransplantation besteht die Gefahr der „*Graft-versus-Host-disease*“, aber auch die Chance eines „*Graft-versus-Malignom-effects*“ (Lokhorst et al., 1997).

Zusätzlich zur Primärtherapie gibt es die Supportivtherapie, welche auf die Regredienz der Krankheitssymptome abzielt. Zur Eindämmung der Osteolysen werden MM-Patienten frühzeitig Bisphosphonate, wie z.B. Pamidronat oder Zoledronat verabreicht. Auch in der palliativen Therapie des MMs werden Bisphosphonate zum Schutz der Knochenmatrix eingesetzt (Terpos et al., 2011). Bisphosphonate inhibieren Osteoklasten, während sie keinerlei Einfluss auf Osteoblasten haben. Dies führt zu einer Verdichtung des Knochens, was Komplikationen wie Osteonekrosen hervorrufen kann. Die Osteonekrosen treten gehäuft im mandibulären Bereich auf, weshalb eine prätherapeutische Totalsanierung des stomatognathen Systems empfohlen ist (Dickinson et al., 2009). Außerdem sind in der Supportivtherapie die Behandlung der Hyperkalzämie und der Hyperurikämie besonders wichtig, sowie die Behandlung und die Vorbeugung von Infektionen.

Die mittlere Überlebensrate ist in den letzten 10 Jahren von 2,5 auf 4 Jahre gestiegen (Kumar et al., 2008), was auf immunmodulierende Medikamente IMiDs (Lenalidomid, Thalidomid, Pomalidomid) und Proteasominhibitoren (Bortezomib, Carfilzomib, MLN9708) zurückzuführen ist (Faiman and Richards, 2014). Jedoch gibt es immer noch eine hohe Rezidivrate und eine schlechte Langzeitprognose (Kumar et al., 2012, Berenson, 2013). In Studien bis zur klinischen Phase III werden weitere innovative Medikamente geprüft, welche auf Basis von monoklonalen Antikörpern wie z.B. Dacetuzumab (CD40 AK) und Bevacizumab (VEGF-AK), Histon-Deacetylase-Inhibition (Vorinostat, Panobinostat), mTOR[*mammalian target of rapamycin*]-Inhibition (Temsilimus, Everolimus) und Akt Protein Kinase B-Inhibition (Afuressertib, Perifosine) wirken (Faiman and Richards, 2014).

### 1.3.2 Aktivin-A Antagonisten als mögliche Therapieform

Das Level an Aktivin-A ist im Blutserum von Multiplen Myelom Patienten deutlich erhöht (Vallet et al., 2010). In Tierexperimenten wurde belegt, dass die Reduzierung von Aktivin-A im Blutplasma durch einen löslichen Aktivin-A bindenden *decoy*-Rezeptor (= RAP-011) das klinische Bild deutlich verbessert (Vallet et al., 2010). Neben einer verstärkten Osteoblastenaktivität, verminderte sich das Wachstum der tumorösen B-Zellen und es zeigte sich eine Verbesserung der Knochenintegrität (Vallet et al., 2010). Auch Chantry *et al.* untersuchten die Wirkung eines Aktivin-A bindenden *decoy*-Rezeptors in einem Maus-Myelommodell. Dieser Aktivin-A-Antagonist ist ein lösliches Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne des *activin receptors type II A* und dem Fc-Teil eines murinen IgGs

(= ActRIIA.muFc). Die Versuchstiere zeigten eine stimulierte Osteoblastogenese. Die Suppression der Knochenbildung wurde einerseits durch das ActRIIA.muFc Fusionsprotein inhibiert und andererseits die Entstehung von osteolytischen Knochenläsionen blockiert. Letztendlich zeigten die Studien eine erhöhte Überlebensrate der Versuchstiere (Chantry et al., 2010).

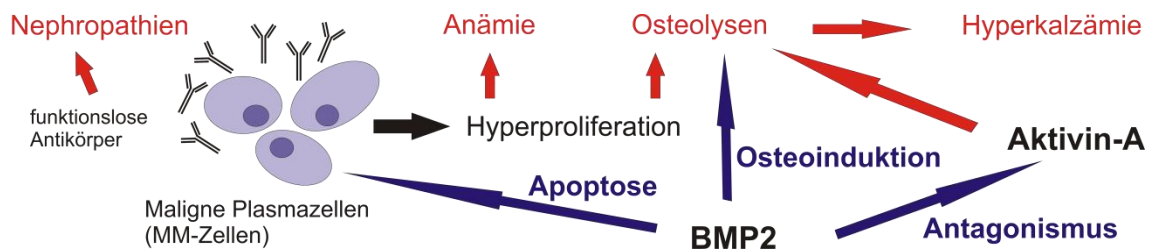
Sotatercept, das humane Äquivalent zu ActRIIA.muFc, befindet sich bereits erfolgreich in der klinischen Phase II (Raje and Vallet, 2010). Dieses lösliche Fusionsprotein besteht aus der extrazellulären Domäne des Rezeptors ActR-IIA und der Fc-Domäne des humanen IgG1 (IIA-IgG-Fc). Im Vergleich zur Kontrollgruppe traten hier ebenfalls eine Verbesserung der osteolytischen Läsionen und eine erhöhte antitumorale Aktivität (Raje and Vallet, 2010) auf.

### **1.3.3 Der Einsatz von BMP-Derivaten als Aktivin-A-Antagonist und therapeutisches Agens im Multiplen Myelom**

Der Einsatz von Aktivin-A-Antagonisten in Form von *decoy*-Rezeptoren beruht im Wesentlichen auf dem medizinischen Ansatz, die Knochenhomöostase bei MM-Patienten wiederherzustellen. Durch die Inhibition des endogenen Aktivin-As im bereits beschriebenen RANKL/OPG-System (Kap. 1.2.2) kommt es zu einer Reduzierung der Osteoklasten- und Verstärkung der Osteoblastenaktivität. Dieser grundlegende Ansatz könnte die Möglichkeit zu einer neuartigen und erweiterten Therapie eröffnen, indem man sich die molekularen und biologischen Eigenschaften der BMPs zu Nutze macht. BMP2 ist auf molekularer Ebene ein Aktivin-A-Antagonist, da die Typ-II Rezeptoren ActR-II und ActR-IIB sowohl von BMP2 als auch von Aktivin-A genutzt werden und damit die zwei Liganden um die Bindung an diesen kompetitieren (Abb. 2). Durch die unterschiedliche Typ-I-Rezeptor-Nutzung aktiviert jeder Ligand jedoch einen unterschiedlichen Smad-*pathway*. Ob Smad-2/3- oder Smad-1/5/8-*pathway* ausgelöst wird entscheidet, neben den Affinitäten der Liganden zu ihren gemeinsamen Rezeptoren, zum einen die Präsenz der jeweiligen Typ-II Rezeptoren auf der Membran und zum anderen die Konzentration der jeweiligen Liganden im Plasma.

Neben der antagonistischen Eigenschaft auf molekularer Ebene bringt BMP2 zusätzlich noch zwei biologische Eigenschaften mit, die es für das Multiple Myelom als therapeutisches Agens geradezu prädestinieren (Abb. 4). BMP2 hat einen zusätzlichen starken osteoanabolen Effekt (Miyazono et al., 2010) und eine apoptotische oder anti-proliferative Wirkung auf neoplastische B-Zellen des Multiplen Myeloms (Kawamura et al., 2002, Holien et al., 2012, Norgaard et al., 2010, Hjertner et al., 2001, Fukuda et al., 2006, Olsen et al., 2014, Ro et al., 2004, Kawamura et al., 2000). Somit könnten durch BMP2 sowohl die Aktivität des Aktivin-As auf molekularer Ebene inhibiert, als auch zwei wesentliche Phänotypen des klinischen Gesamtbildes - die Knochenhomöostase und die Hyperproliferation der neoplastischen B-Zellen - positiv beeinflusst werden.

Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass BMPs Aktivin-A auf molekularer Ebene antagonisieren können (Aykul and Martinez-Hackert, 2016, Olsen et al., 2015). Aus der Eliminierung von Aktivin-A und der Reduzierung von BMP-Antagonisten (z.B. Noggin) resultiert außerdem eine verbesserte Bioaktivität des endogenen BMP2 (Sebald et al., 2012, Albers et al., 2012, Dudaric et al., 2013) (Abb. 4)



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Hauptsymptome des Multiplen Myeloms, sowie Wirkungen der TGF- $\beta$ -Mitglieder BMP2 und Aktivin-A auf das Krankheitsgeschehen. Die maligne Hyperproliferation von Plasmazellen mit vermehrter Produktion fragmentierter und meist funktionsloser Antikörper führt zu den Hauptsymptomen Nephropathie, Anämie, Osteolysen und Hyperkalzämie. Das erhöhte Level an Aktivin-A begünstigen die Osteolysen. BMP2 hingegen kann diesem Krankheitsgeschehen entgegenwirken indem es apoptotisch oder anti-proliferativ auf MM-Zellen wirkt, sowie osteoanabol ist und Aktivin-A antagonisieren kann.

## 1.4 Ziel der Arbeit

Trotz innovativer Therapien ist das Multiple Myelom bis heute nicht heilbar und die durchschnittliche Überlebenszeit liegt bei etwa 5-10 Jahren je nach Alter und Allgemeinzustand des Patienten bei Erstdiagnose (Brenner et al., 2009).

BMP2 verspricht aufgrund zweier synergistischer Eigenschaften (Bifunktionalität) ein vielversprechender Therapieansatz für die Behandlung des Multiplen Myeloms zu sein. Einerseits vermag sein osteoinduktiver Charakter das Symptom der Osteolysen bzw. Osteonekrosen zu verbessern. Auf der anderen Seite wurde mehrfach publiziert, dass BMP2 eine apoptotische Wirkung auf Multiple Myelomzellen besitzt (Holien et al., 2012, Kawamura et al., 2002). Zu seinen bekannten Funktionen kommt die Eigenschaft des BMP2 als Aktivin-A-Antagonist auf molekularer Ebene hinzu, was sich ebenfalls in einer verbesserten Knochenhomöostase äußern könnte.

Der Apoptose-induzierende Effekt von BMP2 in MM-Zellen wurde bisher nicht ausreichend untersucht. Zwar wurde aufgezeigt, dass in unterschiedlichen Zelllinien und primären Zellen des Multiplen Myeloms einzelne Apoptosemechanismen, wie die Aktivierung von Caspasen (Fukuda et al., 2006), ausgelöst werden, aber nicht, wie BMPs auf molekularer Ebene genau die Apoptose induzieren. Aus diesem Hintergrund sollte in dieser Arbeit die BMP2 induzierte Apoptose in ausgewählten Zelllinien des Multiplen Myeloms genauer analysiert werden.

Auffällig war ebenfalls in der Literatur, sowie in eigenen Experimenten, dass nicht grundsätzlich alle Zelllinien und primäre Zellen des Multiplen Myeloms auf BMPs reagieren. Aus diesem Grund sollte auf Ebene der Signaltransduktion durch Analyse der mRNA-Expression der BMP-Rezeptoren, sowie des *Smad-pathways* genauer untersucht werden, was der entscheidende Unterschied zwischen einer BMP2-responsiven und einer BMP2-nicht-responsiven Zelle ist.

Im letzten Teil dieser Arbeit sollten verschiedene Derivate des BMP2 (sog. Muteine) auf ihre biologische Aktivität hin und auf ihren potentiellen Einsatz als Aktivin-A-Antagonisten untersucht werden. Durch gezielte Mutationen wurden BMP2-Muteine synthetisiert, die veränderte biologische Eigenschaften aufweisen, wie z.B. eine erhöhte Typ-II Rezeptor-Affinität. Durch Analyse in verschiedenen assays sollten die Eigenschaften dieser BMP2-Mutanten genauer charakterisiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Eukaryotische Zellen

Die humanen Multiple-Myelom Zelllinien KMS12-BM, AMO1, OPM2, L363, KMS11 und JJN3, sowie die murine Myoblastzelllinie C2C12 wurden vom Leibniz-Institut DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) erworben. Die humanen Multiple-Myelom Zelllinien MM.1S, RPMI8226 und U266, sowie die humanen T-Lymphozyten Jurkat A3 kamen aus der American Type Culture Collection (ATCC). Die chondrogene Mauszelllinie ATDC5 wurde von Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany erworben. Die humane MM-Zelllinie INA-6 wurde freundlicherweise von Dr. Martin Gramatzki, Erlangen, zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.2 Zellkulturmedien und Zusätze

RPMI-Medium 1640 (1x)	gibco® (life technologie™), Darmstadt
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	gibco® (life technologie™), Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle Medium (1x)	gibco® (life technologie™), Darmstadt
DMEM / F-12 Nutrient Mixture Ham (1:1)(1x)	gibco® (life technologie™), Darmstadt
PenStrep (Penicillin 10 units/ml; Streptomycin 10 µg/ml)	PAN Biotech, Aidenbac
Fetal calf serum (FCS)	Biochrom, Berlin
Glutamin (2mmol/l)	PAA, Pasching, Österreich
Na-Pyruvat (1mmol/l)	PAN Biotech, Aidenbach
Dimethylsulphoxide (DMSO)	Sigma, Deisenhofen

#### 2.1.3 Reagenzien, Chemikalien

Acrylamid (Rotiphorese® Gel 30)	ROTH, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat	ROTH, Karlsruhe
Bromphenolblau	ROTH, Karlsruhe
Color Plus Prestained Protein Ladder	NewEngland BioLabs® Inc., FfM
Dithiotreit	ROTH, Karlsruhe
Dodecylsulfat sel de Sodium ultrapure	ROTH, Karlsruhe
Glycerin	ROTH, Karlsruhe
Glycin	ROTH, Karlsruhe
Kristallviolett (CV-Pulver)	ROTH, Karlsruhe

Methanol (99,8 %)	Sigma, Deisenhofen
MgCl <sub>2</sub> 1mM	Merck, Darmstadt
Milchpulver	ROTH, Karlsruhe
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
NaCl	ROTH, Karlsruhe
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Necrostatin-1	Enzo Life Sciences, Lörrach
Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat (NPP)	ROTH, Karlsruhe
NP-40 (1%)	Merck, Darmstadt
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 und 3	Sigma, Deisenhofen
Roti®-Free Stripping-Puffer 2.2 plus	ROTH, Karlsruhe
Salzsäure (rauchend 37%)	Merck, Darmstadt
Tetramethylethylenediamine	ROTH, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Merck, Darmstadt
Trypsin/EDTA-Solution (10x)	Biochrom AG, Berlin
Tween®20	ROTH, Karlsruhe
WST1	Roche, Mannheim
ZnCl <sub>2</sub> (1mM)	Sigma, Deisenhofen
zVAD-fmk	Bachem AG, Weil am Rhein

#### 2.1.4 Antikörper

Anti-Smad-1, <i>Kaninchen polyklonal</i>	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-Phospho-Smad-1, 5, 8 <i>Kaninchen polyklonal</i>	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-Caspase-3, <i>Kaninchen polyklonal</i>	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Anti-Caspase-8 p18 (C-20), <i>Ziege polyklonal</i>	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Smad-6 (H-150), <i>Kaninchen polyklonal</i>	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-Smad-7, <i>Kaninchen polyklonal</i>	Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA
Anti-Tubulina Ab-2 (Clone DM1A), <i>Maus monoklonal</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

#### 2.1.5 Kommerzielle Kits

QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande
QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit	Qiagen, Venlo, Niederlande



### 2.1.6 Primer

Folgende Primer wurden für die qRT-PCR verwendet:

ActR-I (forward) TACGATGTGGTTCCCAATGA

(reverse) AGTCTTGCGGATGGATTTTG

ActR-IB (forward) CGACTTAGTGCCCTCTGACC

(reverse) TGTGGAGAGAGGGAGCAGTT

ActR-II (forward) GTTGCCATTTGAGGAGGAAA

(reverse) CCAGCTGATAACCTGGCTTC

ActR-IIB (forward) CTGACTTTGGCTTGGCTGTT

(reverse) AGGGCAGCATGTACTIONCATCC

BR-II (forward) AGGGGAATCCGTACCAGAGT

(reverse) CATCCTGGTCCCAACAGTCT

HPRT (forward) GACCAGTCAACAGGGGACAT

(reverse) ACACTTCGTGGGGTCCTTTT.

HS\_BMP1A\_1\_SG

Qiagen, Venlo, Niederlande

HS\_BMP1B\_1\_SG

Qiagen, Venlo, Niederlande

HS\_SMAD6\_1\_SG

Qiagen, Venlo, Niederlande

HS\_SMAD7\_1\_SG

Qiagen, Venlo, Niederlande

### 2.1.7 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Accujet®pro

Brand GmbH+CO KG, Wertheim

Agfa Curix 60 Entwicklmaschine

Agfa, Düsseldorf

Binokular CK40

Olympus, Southend-on-Sea, UK

Casy® Cell Counter

Schärfe System GmbH, Reutlingen

Centrifuge 5415R

Eppendorf, Hamburg

Centrifuge Universal 320R

Hettich Lab Technology, Tuttlingen

BD FACSCalibur Flow Cytometer

BD Biosciences, San Jose, USA

Gel-Blotting-Papier

ROTH, Karlsruhe

Heatblock, TS-100 Thermo Shaker

Biosan, Riga, Lettland

Inkubator, Hera Cell

Heraeus Holding GmbH, Hanau

Microplate-Reader (Spectra Rainbow)

TECAN, Männedorf, Switzerland

Mikro-Titerplatten

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

MiniRocker MR-1

Biosan, Riga, Lettland

Multiplate®PCR-Plates

Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA

NanoDrop 2000c

Peqlab, Erlangen

PeqPower

Peqlab, Erlangen

Pipettierspitzen	Eppendorf, Hamburg
Plastik-Falcons, Cellstar	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster
Plastikpipetten, Cellstar	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster
Pumpe, HLC	Ditabis, Pforzheim
Amersham Hyperfilm™ECL	GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK
Sterilbank, Hera safe	Heraeus Holding GmbH, Hanau
VortexGenie®2	Scientific Industries Inc., NY
Wärmebad GFL1083	GFL GmbH, Burgwedel
Wasserbad, Julabo5	Julabo, Seelbach
Whatman™-Membran	GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK
Zellschaber, Cell Scraper	SPL life science, Gyeonggi-do, Korea

### 2.1.8 Lösungen und Puffer

ALP1 (Alkalische Phosphatase1) –Lysispuffer	0,1 M Glycin (pH=9,6) 1% NP-40 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM ZnCl <sub>2</sub>
ALP2-Lysispuffer	0,1 M Glycin (pH=9,6) 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1 mM ZnCl <sub>2</sub>
Probenpuffer (4x)	20 % Glycerin 125 mM Tris (pH=8,0) 4 % SDS 3% DTT Bromphenolblau
Blotpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % Methanol pH 8,3
Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 2 mM SDS (20%) pH 8,3
PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> )	20 mM Natriumphosphat 0,7 % Natriumchlorid pH 7,2
PBST	PBS 0,05 % Tween-20

PBST-Milk	PBST 5 % Magermilch
Sammelgelpuffer (4x)	0,5 M Tris 0,015 M SDS pH 6,8 (mit HCL eingestellt)
TBS( <i>Tris buffered saline</i> )	0,02 M Tris 8 % NaCl pH 7,6 (mit HCL eingestellt)
Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris 0,015 M SDS pH 8,8 (mit HCL eingestellt)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die 10 Myelomzelllinien (KMS11, KMS12-BM, OPM2, INA6, L363, U266, JJN3, MM.1S, RPMI8226, AMO1) sind Suspensionszellen, welche in RPMI-Medium 1640 (1x) der Firma gibco® (life technologie™) unter physiologischen Bedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) kultiviert wurden. Dem Medium wurde 10 % fötales Kälberserum (FCS), 1 % Penicillin-Streptomycin und 1mmol/l Na-Pyruvat sowie 2 mmol/l Glutamin hinzugesetzt. Alle 2-3 Tage wurden die löslichen Suspensionszellen je nach Dichte zwischen 1:3 und 1:7 mit RPMI-Medium 1640 (1x) umgesetzt. Die Interleukin-6 (IL-6) abhängige Zelllinie INA6 wurde zuzüglich mit 2 ng/ml IL-6 versetzt. Die adhärente Zelllinie ATDC5 wurde mit PBS gewaschen und mit 0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA ca. 5 Minuten lang im Inkubator unter Standardbedingungen gelöst. Daraufhin wurde die Zellsuspension mit dem Medium DMEM / F-12 Nutrient Mixture Ham (1:1)(1x) mit 5 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin versetzt und entsprechend gesplittet (z.B. 1:10).

### 2.2.2 Liganden-Präparation

Rekombinante humane BMP2/GDF5, einschließlich der Varianten BMP2-L51P (BMP2-P), BMP2-L100KN102D (BMP2-KD) und BMP2-L51PL100KN102D (BMP2-PKD), sowie der Varianten GDF5-R57A und GDF5-R57A-KD wurden in Vor- und Zusammenarbeit mit Prof. T. D. Müller in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt, wie bereits beschrieben (Kirsch et al., 2000). Rekombinantes humanes Aktivin-A wurde in *Baculovirus*-transfizierten SF9-Insektenzellen, wie beschrieben, hergestellt (Heinecke et al., 2009). Freundlicherweise wurde von Prof. Wajant lösliches rekombinantes humanes Fc-Flag-FasL und Flag-TNF- $\alpha$  zu Verfügung gestellt, welche in HEK293-Zellen exprimiert und die Überstände mittels Affinitätschromatographie (Anti-FLAG-M2-Agarosebeads) aufgereinigt worden waren.

### 2.2.3 WST1-Vitalitäts-assay

WST1 (*water soluble tetrazolium*) ist ein Stoff, der die Zellvitalität aufzeigt. In Zellen mit intakter Atmungskette und damit intaktem mitochondrialem Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase-System wird das schwach rot gefärbte Tetrazoliumsalz WST1 zu dunkelrotem Formazan umgesetzt. Die Stoffwechselaktivität und damit auch die relative Zellzahl korreliert mit der Intensität der Färbung.

Die Anzahl der vitalen MM-Suspensionszellen wurde im Casy® Zellzähler ermittelt, woraufhin sie mit  $2 \times 10^4$ /well in 96-well-Mikrotiterplatten ausgesät wurden. Daraufhin wurden sie mit den multifunktionellen Zytokinen (BMP2, BMP2-KD, BMP2-PKD, BMP2-L51P, GDF5, GDF5-R57A, GDF5-R57A-KD) über verschiedene Zeiträume (24-96 h) und Konzentrationen (konstant mit je 125 nM oder exponentiell verdünnt ausgehend von 125 nM) inkubiert. Anschließend wurde das *cell proliferation reagent* WST1 mit dem Medium RPMI 1640 (add. 10% FCS, 1% P/S) im Verhältnis 1:1 gemischt und den stimulierten Zellen hinzugegeben. Nach einer Inkubation von ca. 2,5 Stunden wurde die Intensität (optische Dichte - OD) der WST1-Färbung im Spektralphotometer Elisa-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

### 2.2.4 Zytotoxizitäts-assay

Die humanen T-Lymphozyten Jurkat A3 wurden in einer 96-well-Mikrotiterplatte mit  $2 \times 10^4$  Zellen/well und 100 µl Medium über Nacht im Inkubator kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen, mit 10 µM MLN4924(NF-κB-pathway-Inhibitor), 50 µM zVAD-fmk(Pan-Caspase-Inhibitor *benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone*) und 90 µM Necrostatin-1 (Nekroptose-Inhibitor) für eine Stunde präinkubiert. Daraufhin wurden sie über Nacht mit 100 ng/ml Todesliganden Flag-TNFα im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) stimuliert. Die Analyse der Zellvitalität erfolgte mittels Kristallviolett-Färbung (20% MetOH, 1% Kristallviolett, 50 µl/well, 15 min). Die 96-well-Mikrotiterplatten wurden fünfmal in dH<sub>2</sub>O gewaschen und an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Proben in 100 µl MetOH pro well gelöst und durch Messen der Absorption mit einem ELISA-Reader (TECAN RAINBOW) bei 590 nm quantifiziert.

### 2.2.5 Casy®-Zellzählung – Coulter Counter

Der Casy®-Zellzählungs-assay gibt genauen Aufschluss über die absolute Anzahl der lebenden Zellen. Darüber hinaus werden Durchmesser, Zellvolumen, Impedanz und Zellvitalität durch Integrität und Membranpotential, sowie Zellaggregationen und Zelldebris gemessen. Hierzu wurden die Zelllinien KMS12-BM und L363 in 96-well-Mikrotiterplatten mit  $2 \times 10^4$ /well ausgesät. Ähnlich des Zytotoxizitäts-assays wurden sie ca. eine Stunde mit 50 µM zVAD-fmk und 90 µM Necrostatin einzeln und in Kombination stimuliert und anschließend die Zellen mit 125 nM BMP2 inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von je 24, 48, 72 und 96

Stunden wurde der Inhalt jedes *well*s in 10 ml Casy®Ton überführt und die Zellzahl im Casy®-Zellzähler ermittelt. Zellen, welche kleiner als 8 µm waren, wurden zu den toten Zellen gezählt.

### 2.2.6 ALP-assay

Für den Alkalische-Phosphatase-assay wurde u.a. die adhärente murine chondrogene Zelllinie ATDC5 in DMEM/F-12-Medium mit 5 % FCS und 1 % Penicillin-Streptomycin verwendet. Hierfür wurden die Zellen in 96-*well*-Mikrotiterplatten mit  $12 \times 10^3$ /*well* ausgesät und über Nacht im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) kultiviert. Dann wurde eine Verdünnungsreihe, ausgehend von 125 nM, der multifunktionellen Zytokine BMP2, BMP2-KD, BMP2-PKD, BMP2-L51P, GDF5, GDF5-R57A, sowie GDF5-R57A-KD durchgeführt. Nach einer Inkubation von 72 Stunden wurden die Zellen mit PBS (1%) gewaschen. Zur ALP-Auswertung wurden die Zellen mit 100 µl ALP1-Puffer versetzt und 2 Stunden inkubiert. Daraufhin wurde Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz Hexahydrat (NPP) mit einer Konzentration von 2,4 µg/ml in ALP2-Puffer gelöst und davon je 100 µl je *well* pipettiert. Die Umsetzung des NPPs durch die alkalische Phosphatase erfolgte innerhalb von 30 Minuten bei Raumtemperatur, woraufhin der Farbumschlag im Elisa-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen wurde. Die Ergebnisse wurden mit dem Programm *GraphPad Prism 5* ausgewertet und die EC50 der Wirkstoffe ermittelt.

### 2.2.7 Quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction

Je 5 Millionen Zellen der zehn humanen Myelomzelllinien (KMS12-BM, KMS11, OPM2, INA6, L363, U266, JLN3, MM.1S, RPMI8226, AMO1) wurden für die RNA-Isolation verwendet. Diese wurde mithilfe des *RNeasy® Mini Kits* der Firma Qiagen nach Herstellerprotokoll durchgeführt und die Nukleinsäurekonzentration im Gerät NanoDrop 2000 gemessen. Für die cDNA-Herstellung wurden je Zelllinie 1 µg RNA in 12 µl H<sub>2</sub>O gelöst und das *QuantiTect® Reverse Transcription Kit* der Firma Qiagen benutzt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellerprotokolls. Die *Quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction* (qRT-PCR) wurde mit dem *QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit* der Firma Qiagen durchgeführt. Zunächst wurde die cDNA 1:10 mit TE Wasser (pH 8) verdünnt und mit *QuantiTect-SYBR-Green-PCR-master-mix* versetzt. Eine qRT-PCR-96-*well*-Mikrotiterplatte wurde mit dem *cDNA-master-mix* und 0,3 µM/*well* der Primer (BR-IA, BR-IB, BR-II, ActR-IA, ActR-IB, ActR-IIB, Smad-6, Smad-7, HPRT) bestückt. Die qRT-PCR wurden im Real Time Cycler unter folgenden Einstellungen durchgeführt.

Einmalige Hitzeaktivierung:	95 °C (15 min.)
<b>40 Zyklen</b>	
Denaturierung:	94 °C (15 sec.)
Annealing:	55 °C (30 sec.)
Extension:	72 °C (30 sec.)

Die ermittelten Ct-Werte konnten mithilfe von Microsoft Excel ausgewertet werden. Das *housekeeping* Gen HPRT diente als Standard. Die Signale wurden im Verhältnis zum Standard dargestellt und als Prozentwert dessen durch unten stehende Formel angegeben:

$$x = (2^{(\text{Standard} - \text{Ct-Wert})}) * 100$$

### 2.2.8 Herstellung der Zell-Lysate

Zur Herstellung der Lysate für den Nachweis von Smad-1 und Phospho-Smad-1/5/8 wurden die humanen Myelomzelllinien (KMS12-BM, KMS11, OPM2, INA6, L363, U266, JJN3, MM.1S, RPMI8226 und AMO1) in 6-*well*-Mikrotiterplatten mit  $1 \times 10^6$ /well ausgesät, je 30 und 60 Minuten mit 100 nM BMP2 inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), sowie eine Negativkontrolle ohne BMP2 mitgeführt und anschließend auf Eis gelagert. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 10.000 rpm, wurde 100 µl Proteinprobenpuffer hinzugefügt, welcher die Phosphataseinhibitoren Phosphatase Inhibitor Cocktail 2 und 3 (Sigma, Deisenhofen) enthielt. Daraufhin wurden die Proteine durch 20-sekündige Sonifikation extrahiert und für 5 Minuten im Wasserbad denaturiert. Zur Herstellung der Lysate für den Nachweis von Smad-6 und -7 wurden 2 Millionen Zellen je Zelllinie ohne BMP2-Stimulation verwendet und lysiert. Zum Nachweis von Caspase-3 und Caspase-8 wurden auf einer 6-*well*-Platte die Zellen 0 (Negativ-Kontrolle), 24, 48 und 72 Stunden mit 125 nM BMP2 stimuliert. Die Positiv-Kontrollgruppe wurde 6 h lang mit 100 ng/ml FasL-Fc stimuliert. Nach Zentrifugation und Absaugen wurde die Zellpellets auch hier in 100 µl Proteinprobenpuffer aufgenommen, 20 Sekunden sonifiziert und 5 Minuten denaturiert.

### 2.2.9 Westernblot

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem SDS-Polyacrylamidgel (SDS-Page). Für die Elektrophorese wurden in der Gellaufkammer ein 12%iges Trenngel und ein 6%iges Sammelgel gegossen.

Die im Sammelgel geformten Taschen wurden mit je 20 µl Lysat und eine Tasche als Proteingrößenmarker mit 10 µl *Color Plus Prestained Protein Ladder* beladen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA pro Gel über 45 Minuten.

Für den Elektrotransfer der Proteine auf eine Whatman-Membran (Nitrozellulosepapier) wurde die PeqLab SemiDry Kammer verwendet und bei einer konstanten Stromstärke von  $1,5 \text{ mA/cm}^2$  Gel angelegt und 1,5 Stunden geblottet.

Für die Immundetektion wurde nach dem Elektrotransfer der Proteine die unspezifischen Bindungen auf der Membran für mindestens eine Stunde in TBS mit 0,1% Tween 20 und 5 % Magermilchpulver geblockt. Daraufhin wurde die Membran mit dem Erstantikörper in TBS-T oder TBS über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  auf einem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3-mal je 5 Minuten in TBS-T bei Raumtemperatur gewaschen. Daraufhin wurde die Membran mit dem Zweitantikörper (Konzentration nach Angaben des Herstellers) in 10 ml TBS-T oder TBST-*milk* für eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Membran 3-mal je 10 Minuten in TBS-T gewaschen. Die Detektion erfolgte durch das Amersham Hyperfilm™ECL - System der Firma GE Healthcare Life Sciences (Little Chalfont, UK) nach Angaben des Herstellers. Die Filme wurden je nach Signalstärke mehrere Sekunden bis über Nacht belichtet.

### 2.2.10 Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens der humanen MM-Zellen wurden die primären Amine der Zelllinien L363 und KMS12-BM mit dem Farbstoff CFSE nach Anleitung des Herstellers gefärbt und mit 125 nM BMP2 für 48 Stunden inkubiert. Je Zelllinie wurden  $2 \times 10^6$  Zellen verwendet, welche vor der Messung 3-mal in PBS gewaschen wurden. Zuletzt wurden sie in 1 ml PBS resuspendiert und mit dem Farbstoff 7AAD gefärbt. Die Auswertung der Zellproliferation, sowie der apoptotischen und vitalen Zellen wurde mittels FACSCalibur (Flow Cytometer) erhoben.

### 2.2.11 Statistik

Für alle Experimente gilt, dass mindestens drei erfolgreiche Wiederholungen durchgeführt wurden, von denen je eine repräsentativ dargestellt ist. Mittelwerte aus den Wiederholungen wurden nie gebildet. Pro Experiment gab es jedoch mindestens Doppelwerte, deren

Standardabweichung mittels der Formel  $s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$  berechnet wurde.

Die Ermittlung der IC50- und EC50-Werte in Verdünnungsreihen wurden mit Hilfe der GraphPad Prism 5.0 Analyse-Software durchgeführt. Anschließend wurden die Abbildungen mit der CoreIDRAW Graphics Suite X4 Software für die Enddarstellung bearbeitet.

Bei qRT-PCR wurden Ct-Werte mittels folgender Formel prozentual zum Standard dargestellt:  $x = (2^{(\text{Standard} - \text{Ct-Wert})}) * 100$ .

### 3 Ergebnisse

BMP2 verspricht aufgrund seiner Bifunktionalität (Osteoinduktivität & apoptotische Wirkung auf MM-Zellen) ein interessantes *Target* für die Therapie des MM zu sein. Da der genaue Apoptose induzierende Effekt nicht hinreichend untersucht wurde, soll in dieser Arbeit dieser in zehn ausgewählten Zelllinien des Multiplen Myeloms genauer analysiert werden. Sowohl die Literatur, als auch eigene Experimente zeigten eine unterschiedliche Responsivität der MM-Zellen auf BMP2. Deshalb soll ebenfalls die Signaltransduktion des BMP2 in MM-Zellen untersucht werden. Darüber hinaus beleuchtet die Arbeit die biologischen Aktivitäten von Derivaten des BMP2 (sog. Muteine), sowie deren Einsatz als Aktivin-A-Antagonisten. Einige Experimente wurden neben BMP2 zusätzlich mit GDF5 bzw. GDF5-Derivaten durchgeführt. Somit gliedert sich die Arbeit insgesamt in drei Teilbereiche:

1. Analyse der BMP2 induzierten Apoptose in Zelllinien des MM
2. Analyse der BMP2 induzierten Signaltransduktion in Zelllinien des MM
3. Analyse der biologischen Aktivität von BMP2- und GDF5-Derivaten in MM-Zelllinien

#### 3.1 Anti-proliferative Wirkung von BMP2

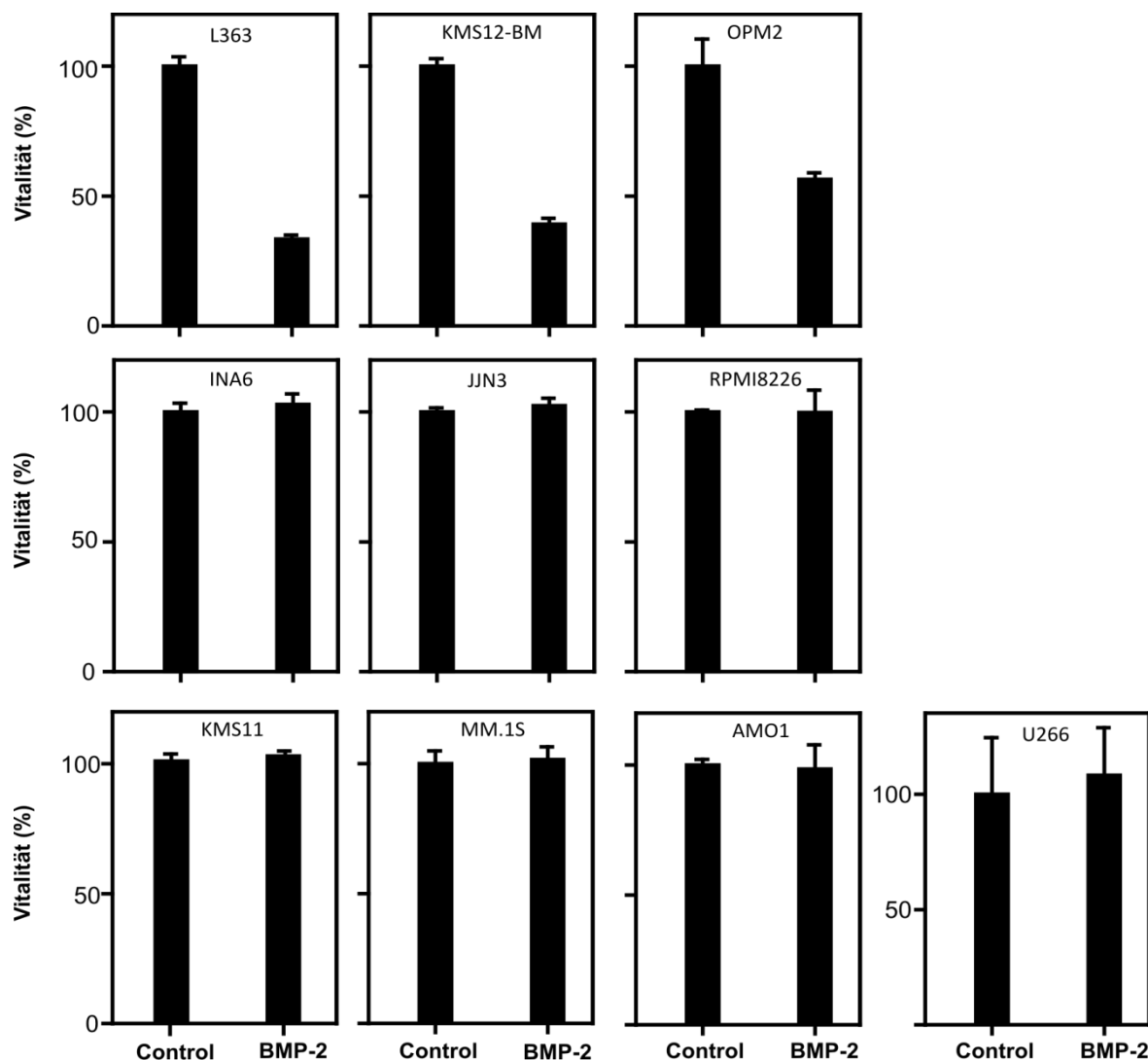
Der genaue molekulare Mechanismus, welchem die tumorsuppressive Wirkung von *Bone Morphogenetic Proteins* unterliegt, ist bis dato nicht aufgeklärt (Holien et al., 2012). Ebenso ist der genaue Prozess der Apoptose nur unwesentlich analysiert worden (s. Einleitung 1.2.3). Im ersten Teil der Arbeit, sollte die BMP2 induzierte Apoptose in Zelllinien des MM deshalb genauer untersucht werden.

Hierfür wurde das apoptotische Potential von BMP2 auf zehn humane Zelllinien des Multiplen Myeloms (KMS12-BM, KMS11, OPM2, INA6, L363, U266, JJN3, MM.1S, RPMI8226, AMO1) analysiert.

##### 3.1.1 Humane MM-Zelllinien reagieren unterschiedlich auf BMP2

Mittels WST1-assays wurde die Vitalität der zehn humanen Myelomzelllinien mit und ohne BMP2-Stimulation (125 nM) nach 96 h gemessen. Dabei stellte sich heraus, dass die Zellen unterschiedlich auf BMP2 reagieren. Wie in Abb. 5 dargestellt, konnten die zehn Zelllinien in zwei Gruppen, nämlich Responsiv (obere 3) und Nicht-Responsiv (untere 7), aufgeteilt werden. Während BMP2 auf die Zelllinien KMS12-BM, L363, sowie OPM2 einen vitalitätssenkenden Effekt hatte, zeigten die Zelllinien KMS11, AMO1, MM.1S, U266, RPMI8226, INA6 und JJN3 keine Responsivität auf BMP2. Da KMS12-BM und L363 am stärksten auf BMP2 reagierten, wurde die Apoptose eingehender an diesen beiden Zelllinien untersucht.





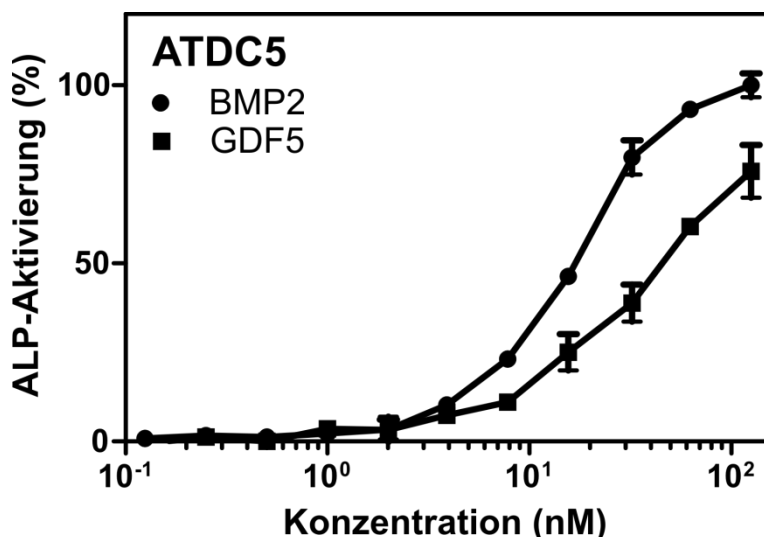
**Abb. 5:** Darstellung der BMP2-Responsivität von 10 humanen MM-Zelllinien. 20.000 Zellen/well wurden über 96 h mit 125 nM BMP2 stimuliert und mittels WST1-Vitalitäts-assay ausgewertet.

### 3.1.2 Analyse der biologischen Aktivität von BMP2 und GDF5

In ersten Untersuchungen sollte auf der einen Seite die Reproduzierbarkeit der bisher publizierten Ergebnisse überprüft und auf der anderen Seite zusätzlich die biologische Aktivität der im eigenen Labor produzierten Liganden der TGF- $\beta$ -Familie BMP2 und GDF5 getestet werden. BMP2 induziert unter anderem die Differenzierung mesenchymaler Zellen zu Osteoblasten und somit die Expression von ALP (Chatakun et al., 2014, Kamiya, 2012). Daher ist der Grad der durch BMP2-/GDF5-induzierten ALP-Aktivität ein Maßstab für die biologische Aktivität der Liganden. Die murine chondrogene Zelllinie ATDC5 wurde mit unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen für 72 Stunden inkubiert und anschließend die BMP2-/GDF5-induzierte Expression der Alkalischen Phosphatase (ALP) durch die Umsetzung eines spezifischen Substrates photometrisch bestimmt. Um die EC50-Werte

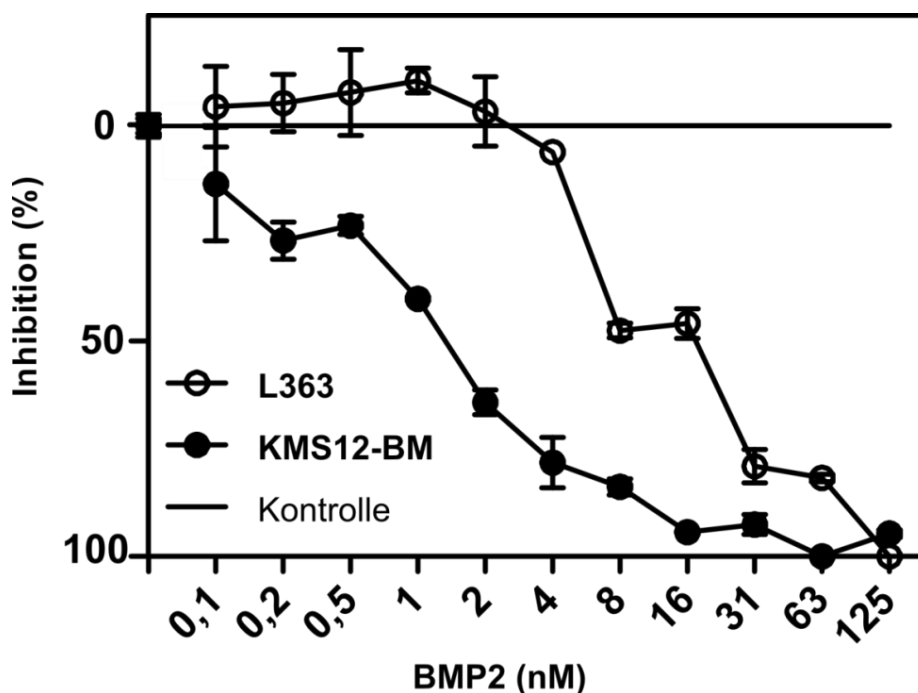
vergleichen zu können wurden die Dosis-Wirkungs-Kurven auf einen 100 % Wert bei einer Konzentration von 125 nM BMP2 genormt.

Wie in Abb. 6 zu sehen ist, steigt die ALP-Aktivität mit steigender Liganden Konzentration. Hierbei zeigt BMP2 mit einer EC50 von ~ 18 nM eine leicht höhere biologische Aktivität als GDF5 mit einer EC50 von ~ 31 nM.



**Abb. 6:** Analyse der biologischen Aktivitäten von BMP2 und GDF5 mittels Messung der Alkalischen Phosphatase Aktivität. Die chondrogene Maus-Zelllinie ATDC5 wurde mit einer Verdünnungsreihe ausgehend von 125 nM der jeweiligen Liganden stimuliert und die Aktivität der Alkalischen Phosphatase gemessen. Die ALP-Aktivierung wurde bei einer Konzentration von 125 nM BMP2 auf 100 % gesetzt.

In den folgenden Experimenten sollte das apoptotische Potential von BMP2 in den genannten humanen Zelllinien (KMS12-BM, L362) des Multiplen Myeloms charakterisiert werden. Dafür wurde der WST1-assay genutzt. Die Stoffwechselaktivität von Zellen kann mittels WST1 gemessen werden, welches je nach Vitalität der Zellen durch Reduktion der zelleigenen Reduktionsäquivalente (NADH, FADH<sub>2</sub>) zu Formazan umgesetzt wird, das photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und dadurch quantifiziert werden kann. In diesem Experiment korreliert die Bildung des Formazans entgegengesetzt mit dem inhibitorischen Effekt, den BMP2 auf die Proliferation der Zellen hat. Für eine detaillierte dosisabhängige Analyse wurden die Zellen KMS12-BM und L363 mit einer Verdünnungsreihe beginnend ab 125 nM BMP2 für 72 h inkubiert. Um die IC50-Werte vergleichen zu können, wurden die Kurven genormt, indem der Wert ohne BMP2-Stimulation auf 0% gesetzt wurde. Hierbei stellte sich bei höheren BMP2-Konzentrationen eine deutliche Zunahme der Proliferations-Inhibition heraus (Abb. 7).



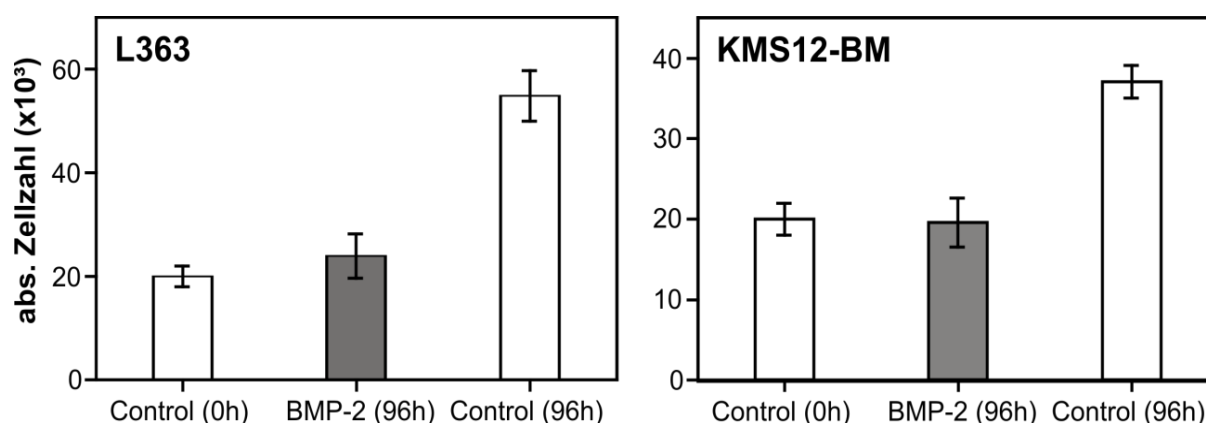
**Abb. 7:** Für eine detaillierte Dosis-Analyse wurde eine Verdünnungsreihe ausgehend von 125 nM BMP2 an L363 (weiße Punkte) und KMS12-BM (Schwarze Punkte) für 72 Stunden durchgeführt und über WST1-assay ausgewertet. Um einen Vergleich der IC50-Werte zu ermöglichen, wurde der Wert ohne BMP2-Stimulation auf Null gesetzt (Wert auf der Ordinate).

Ob die reduzierte Stoffwechselaktivität auf einen Rückgang der Zellzahl durch Apoptose oder auf ein vermindertes Wachstum zurückzuführen ist, kann durch diese Methode nicht beurteilt werden. Gleichmaßen muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass BMP2 nicht die Zellzahl, sondern lediglich die Vitalfunktion der Zellen und somit das durch die geringe Anzahl an Reduktionsäquivalente induzierte Signal verringert.

Um die absolute Zellzahl zu ermitteln, wurde dieses Experiment durch eine direkte Zählung der vitalen Zellen mittels eines *Coulter Counters* (Casy® Model TT) ergänzt. Diese Technologie basiert auf der elektrischen Analyse von Partikeln. Beim Durchfluss durch eine Messkammer kann sowohl der Durchmesser als auch die Impedanz, ein Maßstab für den elektrischen Widerstand, eines Partikels gemessen werden. Neben Partikeln kann man auch Zellen analysieren, deren Vitalität auf der einen Seite durch die Integrität der Zelle in Form des Durchmesser (Größe) als auch durch das Vorhandensein eines Membranpotentials sehr genau nominell bestimmt werden kann. Neben Zellzahl, Zellvitalität und Zellvolumen, können im Casy® Model TT auch Zellgrößenverteilung, Zellaggregation und Zelldebris gemessen werden. Der wesentliche Vorteil gegenüber dem WST1-assay liegt bei der Casy® Zellzählung darin, dass sowohl vitale als auch tote Zellen absolut gemessen und gezählt werden.

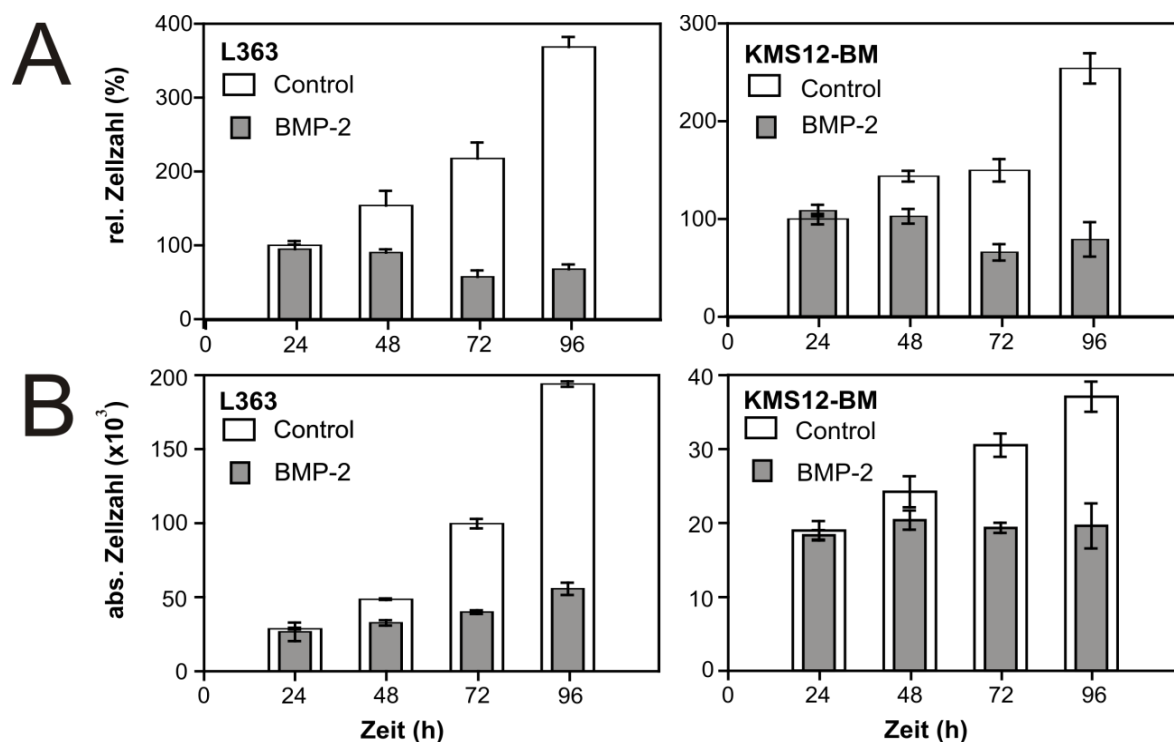
Die Myelomzelllinien L363 und KMS12-BM wurden mit 20.000 Zellen/well ausgesät, mit und ohne 125 nM BMP2 stimuliert und nach 96 Stunden die absolute Zellzahl bestimmt (Abb. 8). Hier hatte die Anzahl der BMP2-stimulierten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche

96 h proliferierte, über den untersuchten Zeitraum einen wesentlich geringeren Wert. Bei der Zelllinie L363 war die absolute Zellzahl der Kontrollgruppe von 20.000 Zellen nach 96 h auf ~55.000 Zellen proliferiert, während die BMP2-stimulierte Gruppe lediglich auf ~24.000 Zellen angewachsen war. Bei der Zelllinie KMS12-BM ergab sich nach 96 h ohne BMP2 eine Zellzahl von ~37.000 Zellen, während die absolute Zellzahl der BMP2 stimulierten Gruppe mit 19.600 Zellen relativ gleich blieb. Auffällig ist, dass die absolute Zellzahl nach BMP2 Stimulation über 96 h nicht sinkt. Während in früheren Publikationen von einer apoptotischen Wirkung des BMP2 berichtet wurde, zeigt sich hier keine Abnahme der Gesamtzellzahl, sondern nur ein anti-proliferativer Effekt.



**Abb. 8:** Analyse der Zellzahl mittels Zählung der absoluten Zellzahl im Coulter-Counter. Die Kontrollgruppen (weiße Balken) von L363 und KMS12-BM proliferierten mit einer anfänglichen Zellzahl von 20.000 Zellen/well über 96 h; bei der BMP2-stimulierten-Gruppe (graue Balken) wurde jeweils dieselbe Zellzahl mit 125 nM BMP2 stimuliert und über 96 h inkubiert. Zum Vergleich der Ergebnisse wurde der Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 ebenfalls dargestellt.

In einem weiteren Experiment wurde das Proliferationsverhalten in einer Zeitkinetik (24, 48, 72 und 96 h 125 nM BMP2-Stimulation) an den beiden bereits erwähnten Zelllinien KMS12-BM und L363 ausgehend von 20.000 Zellen genauer analysiert. In diesem Fall wurden die Zellzahlen sowohl relativ mittels WST1 als auch absolut mittels Casy® bestimmt (Abb. 9).



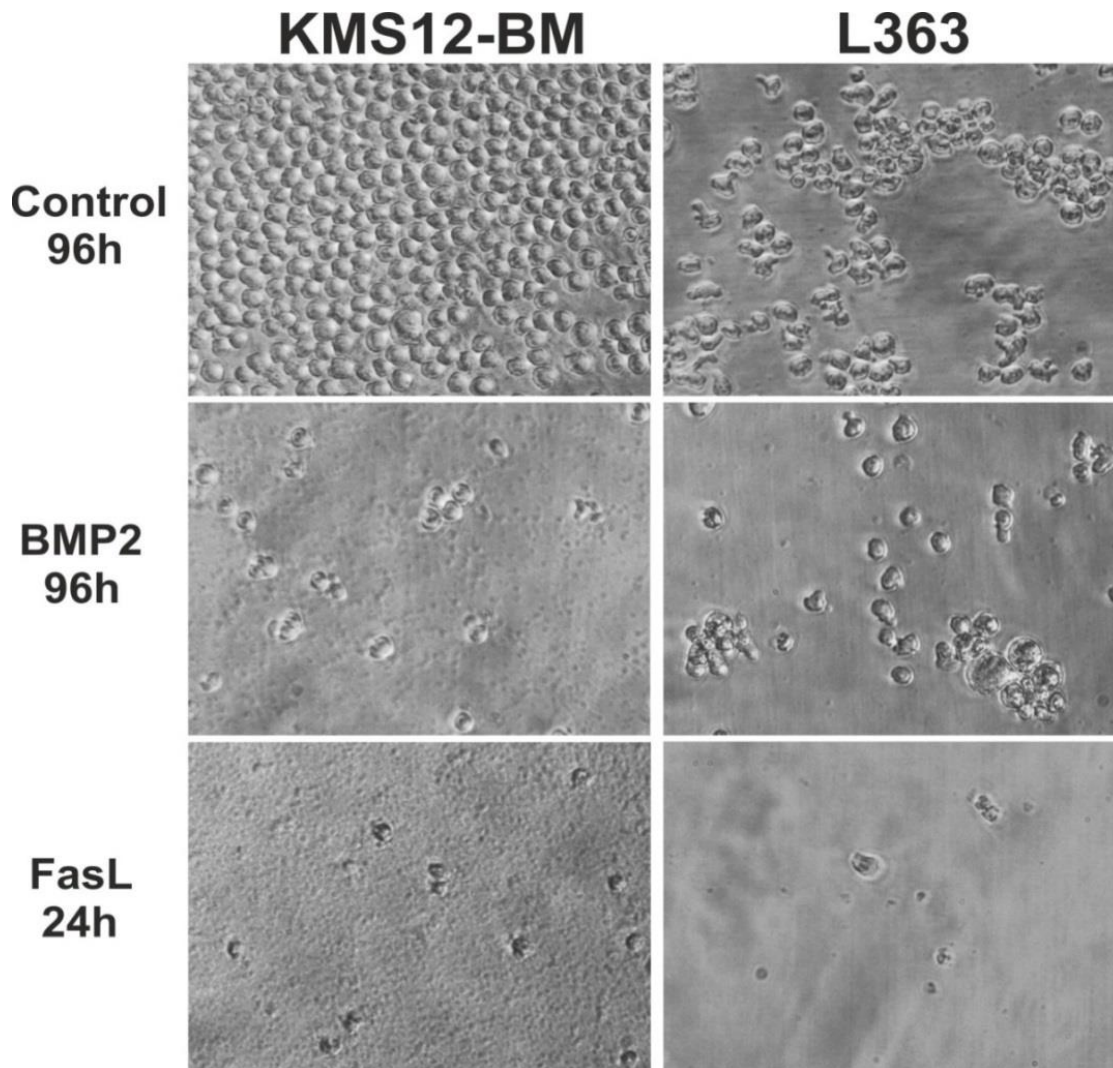
**Abb. 9:** Anti-proliferative Wirkung von BMP2 auf L363 und KMS12-BM in Abhängigkeit von der Zeit. Es wurden 96-well-Mikrotiterplatten mit je 20.000 Zellen/well pro Zelllinie ausplattiert. Die BMP2-Gruppe wurde mit 125 nM BMP2 stimuliert (graue Balken). Nach 24, 48, 72 und 96 h wurde A) ihre Stoffwechselaktivität (rel. Zellzahl [%]) mittels WST1 und B) ihre absolute Zellzahl mittels Casy® Coulter Counter detektiert.

In beiden Fällen lässt sich deutlich zeigen, dass die Zellzahl in der unbehandelten Kontrolle im Vergleich zu den BMP2-stimulierten Gruppen sowohl relativ als absolut zunimmt. Abb. 9 A zeigt den Rückgang der relativen Zellzahl nach 96 h BMP2-Stimulation in L363 auf 67 % und in KMS12-BM auf 79 %. Allerdings zeigt Abb. 9 B deutlich, dass die absolute Zellzahl der BMP2 stimulierten Proben zum Ausgangswert sich nicht wesentlich ändert, also keine deutlichen Anzeichen einer induzierten Apoptose aufzeigen, da die Gesamtzellzahl in den BMP2 stimulierten Proben nicht sinkt. Die absolute Zahl der vitalen Zellen bleibt in den Casy-Analysen bei der Zelllinie KMS12-BM gleich bzw. steigt in der Zelllinie L363 sogar noch leicht an. Dies steht in Kontrast zu den WST1-Ergebnissen. Die unter den Ausgangswert sinkende relative Zellzahl in den WST1-Analysen lässt sich evtl. auf eine reduzierte Stoffwechselaktivität und nicht auf eine durch Apoptose reduzierte Zellzahl zurückführen.

### 3.1.3 Lichtmikroskopische Darstellung von MM-Zellen nach BMP2- und FasL-Fc-Stimulation

Um in weiterführenden Experimenten einen Eindruck zu gewinnen, ob in den untersuchten MM-Zelllinien Apoptose induziert wird, wurden beide Zelllinien sowohl mit BMP2 als auch mit dem Apoptose-induzierenden Mitglied der TNF-Familie FasL-Fc inkubiert. Sowohl KMS12-BM als auch L363 sind FasL-Fc-sensitiv und gehen bereits nach wenigen Stunden in den Zelltod (eigene Daten, nicht gezeigt).

Lichtmikroskopische Aufnahmen (Olympus; Binokular CK40) der Zellkulturen L363 und KMS12-BM mit und ohne BMP2(125 nM)-Stimulation nach 96 h, sowie mit 100 ng/ml FasL-Fc-Stimulation nach 24 h geben optisch Aufschluss über die Zellmorphologie und können im direkten Vergleich mit dem Apoptosefaktor FasL-Fc erste Rückschlüsse zulassen, ob BMP2 Apoptose induziert oder nicht.



**Abb. 10:** Lichtmikroskopische Aufnahme von KMS12-BM und L363 nach 96-stündiger Kultivierung mit und ohne (Kontrolle) BMP2(125 nM)-Stimulation, sowie nach 24 Stunden FasL-Fc(100 ng/ml)-Stimulation; Vergrößerung 40x.

In der Kontrollgruppe sind die Zellen gut als runde und homogene Strukturen zu erkennen. In der mit 125 nM BMP2 stimulierten Gruppe ist die Zahl der Zellen deutlich geringer als in der Kontrollgruppe. Im Wesentlichen entspricht ihre Morphologie jedoch jener der Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu ist in der Gruppe, welche 24 h Stunden lang 100 ng/ml FasL-Fc ausgesetzt wurde, eine stark zerstörte Zellmorphologie zu erkennen. Man sieht hauptsächlich noch kleine inhomogene Zelltrümmer. Ganze und vital wirkende Zellen sind nicht mehr zu erkennen (Abb. 10).

### 3.1.4 Analyse des programmierten Zelltodes mit spezifischen Inhibitoren der Nekroptose und Apoptose

Zum besseren Verständnis der nachfolgenden Experimente werden die beiden häufigsten Formen des programmierten Zelltodes - die Nekroptose und die Apoptose –in einem Exkurs genauer beschrieben.

#### **Exkurs: Zelltod – Apoptose oder Nekroptose**

Es gibt den extrinsischen (Apoptose Typ-I) und den intrinsischen (Apoptose Typ-II) Weg der Apoptose. Beim extrinsischen Weg kommt es durch Ligandenbindung an z.B. membranständigen Todesrezeptoren der Tumor Nekrose Faktor(TNF)-Familie zur Initiierung der Apoptose. Im Gegensatz dazu führen beim intrinsischen Weg intrazelluläre Faktoren, unter anderem Tumor-Suppressoren wie p53 über Mitglieder der Bcl-2-Familie (z.B. Bax) zur Freisetzung von Cytochrom-C und anderen pro-apoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien ins Zytosol und zur Aktivierung der Apoptose. Sowohl der extrinsische, als auch der intrinsische Weg führen zur Auslösung der Caspasen-Kaskade (Lavrik and Krammer, 2012, Fan et al., 2005, Haupt et al., 2003). Caspasen sind proteolytische Enzyme, die aktiv am Abbau von Zellkernmembran- und Zytoskelettbestandteilen beteiligt sind, sowie als Aktivatoren sekundärer Zielproteine wie z.B. DNAsen (Desoxyribonuklease) oder anderer Caspasen fungieren (Chaabane et al., 2013). Die Zelle wird also enzymatisch in ihre Einzelteile zerlegt und anschließend in sog. Apoptosekörperchen (*apoptotic bodies*) verpackt, welche von Makrophagen beseitigt werden. Da das komplette Apoptose-Setup in der Zelle direkt abrufbar ist, d.h. keine *de-novo*-Synthese von apoptotischen Proteinen nötig ist, kann der Zelltod sehr schnell eingeleitet werden (Fischer-Posovszky et al., 2011, Galea-Lauri et al., 1996, Ishii et al., 1995, Quirk et al., 1998).

Am Beispiel von TNF- $\alpha$  und seines Rezeptors TNFR1 soll die extrinsisch initiierte Signaltransduktion der Apoptose beschrieben werden, welche auch in MM-Zellen aufgezeigt wurde (Rauert et al., 2011). Bemerkenswert ist, dass TNF- $\alpha$  kontextabhängig mittels dem TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) Apoptose, Nekroptose, sowie anti-apoptotische und pro-inflammatorische Prozesse (IKK/NF- $\kappa$ B, MAPK/AP1) auslösen kann (Wajant, 2011).

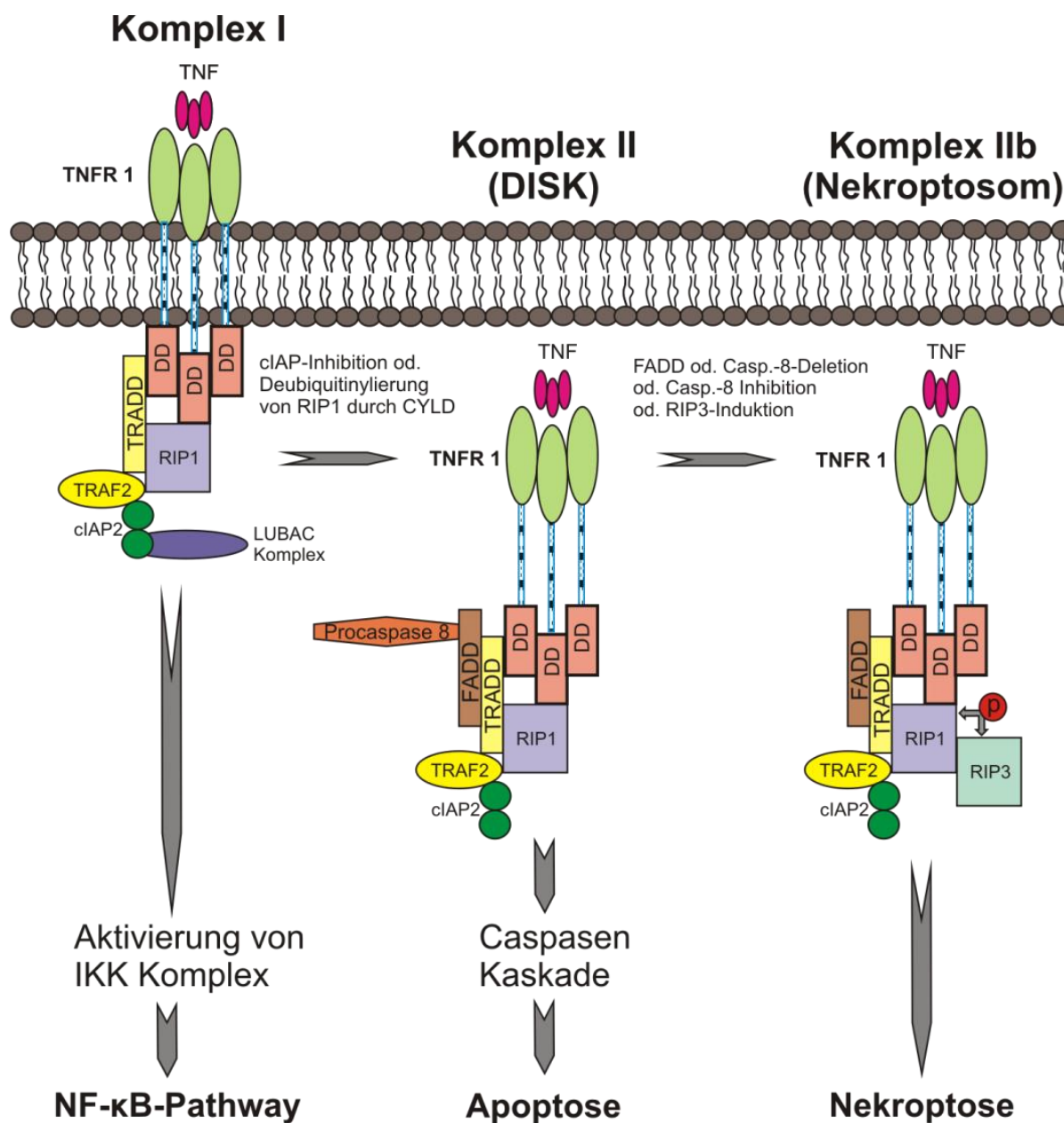
Die Aktivierung des TNFR1 kann abhängig von der Zusammensetzung intrazellulärer Adaptermoleküle zur Entstehung verschiedener Signal-Komplexe mit unterschiedlichen Wirkungen führen (Cabal-Hierro and Lazo, 2012). Im Folgenden werden die drei Komplexe I, II und IIb beschrieben. Der Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  bindet als Trimer an TNFR1. Dadurch ändert sich dessen Konformation hinsichtlich der Demaskierung der intrazellulären nahe der C-Terminalen gelegenen Todesdomäne (Tartaglia et al., 1993), welche anschließend von TRADD(*TNFR-associated factor containing death domains*) gebunden werden kann. Dieses dient als *scaffold* für die Anlagerung der Proteinkomplexe TRAF2/5(*TNFR-associated*

factors), sowie c-IAP1/2(*cellular inhibitor of apoptosis proteins*) und RIP1(*receptor interacting protein*), wodurch der sog. Komplex I (*TNF receptor signaling complex*, TNF-RSC) entsteht (Aggarwal et al., 1996, Hsu et al., 1996, Chen et al., 2008) (Abb. 11 Komplex I). Dieser ist in der Lage den LUBAC(*linear ubiquitination chain assembly*)-Komplex zu binden und durch Ubiquitinylierungen über den IKK $\gamma$ (NEMO)-Komplex die Aktivierung des NF- $\kappa$ B-*pathways* einzuleiten (Haas et al., 2009, Gerlach et al., 2011, Ikeda et al., 2011). NF- $\kappa$ B transloziert in den Nukleus und kann dort die Transkription von mehr als 200 NF- $\kappa$ B abhängigen Genen auslösen. Dieser Prozess ist in der Regel pro-inflammatorisch und anti-apoptotisch (Wang et al., 1998). Unter anderem werden beim klassischen NF- $\kappa$ B Signalweg die anti-apoptotischen Gene cFLIP und cIAP transkribiert (Luo et al., 2005, Krueger et al., 2001).

TNFR1 induziert in Abwesenheit von anti-apoptotischen Proteinen, wie cIAP und cFLIP, Apoptose z.B. wenn deren Neusynthese blockiert ist (Hehlhans and Pfeffer, 2005). Das Wesentliche hierbei ist jedoch, dass sich in diesem Falle FADD(*Fas-associated protein containing death domain*) an TRADD anlagert, wodurch deubiquitinyliertes RIP1 andockt. FADD und RIP1 interagieren mit der Pro-Caspase-8, was zur Spaltung und Aktivierung der Caspase-8 (Initiatorcaspase) führt (Bertrand et al., 2008). Dieser sogenannte Todeskomplex Komplex II, auch DISC(*death-inducing signaling complex*) genannt, führt letztendlich über Effektorcaspase Caspase-3 (Caspasen-Kaskade) zur Apoptose (für eine Übersicht s. „*Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death*“ (Elmore, 2007)) (Abb. 11 Komplex II).

In Abwesenheit oder bei Inhibition der Caspase-8, kann die Deubiquitinylierung von RIP1 die Rekrutierung von RIP3 auslösen, wodurch ein neuer Komplex, das RIP1-RIP3-Nekrosom (Nekroptosom) entsteht, welches zum Caspase-unabhängigen Zelltod, der Nekroptose, führt (Holler et al., 2000, Vercammen et al., 1998) (Abb. 11 Komplex IIb). Diese fungiert als Notfallprogramm für den Fall, dass Apoptose nicht eingeleitet werden kann (Gunther et al., 2011, O'Donnell et al., 2011, Oberst et al., 2011, Degterev et al., 2005). Die Nekroptose verläuft über diverse Phosphorylierungen von verschiedenen Proteinen wie z.B. RIP3 über MLKL (*mixed lineage kinase domain-like protein*), PGAM5 (*phospho-glycerate mutase family member 5*) und Drp1 (*dynamain related protein*) (Vandenabeele et al., 2010). Schlussendlich kann TNF $\alpha$  unterschiedliche biologische Antworten induzieren, die abhängig von der intrazellulären Situation ineinander übergehen können. Das bedeutet u.a., dass eine sich in einem apoptotischen Prozess befindliche Zelle auf Nekroptose umschalten kann und umgekehrt (Abb. 11).





**Abb. 11:** Eigene Abbildung modifiziert nach Cabal-Hierro and Lazo 2012. TNF $\alpha$  Signaltransduktion an TNFR1 mit Aktivierung verschiedener Signalkomplexe sowie Umschaltung der Komplexe ineinander. Komplex I führt u.a. zum NF- $\kappa$ B-Pathway, DISK zur Einleitung der Apoptose und das Nekroptosom zur Einleitung der Nekroptose.

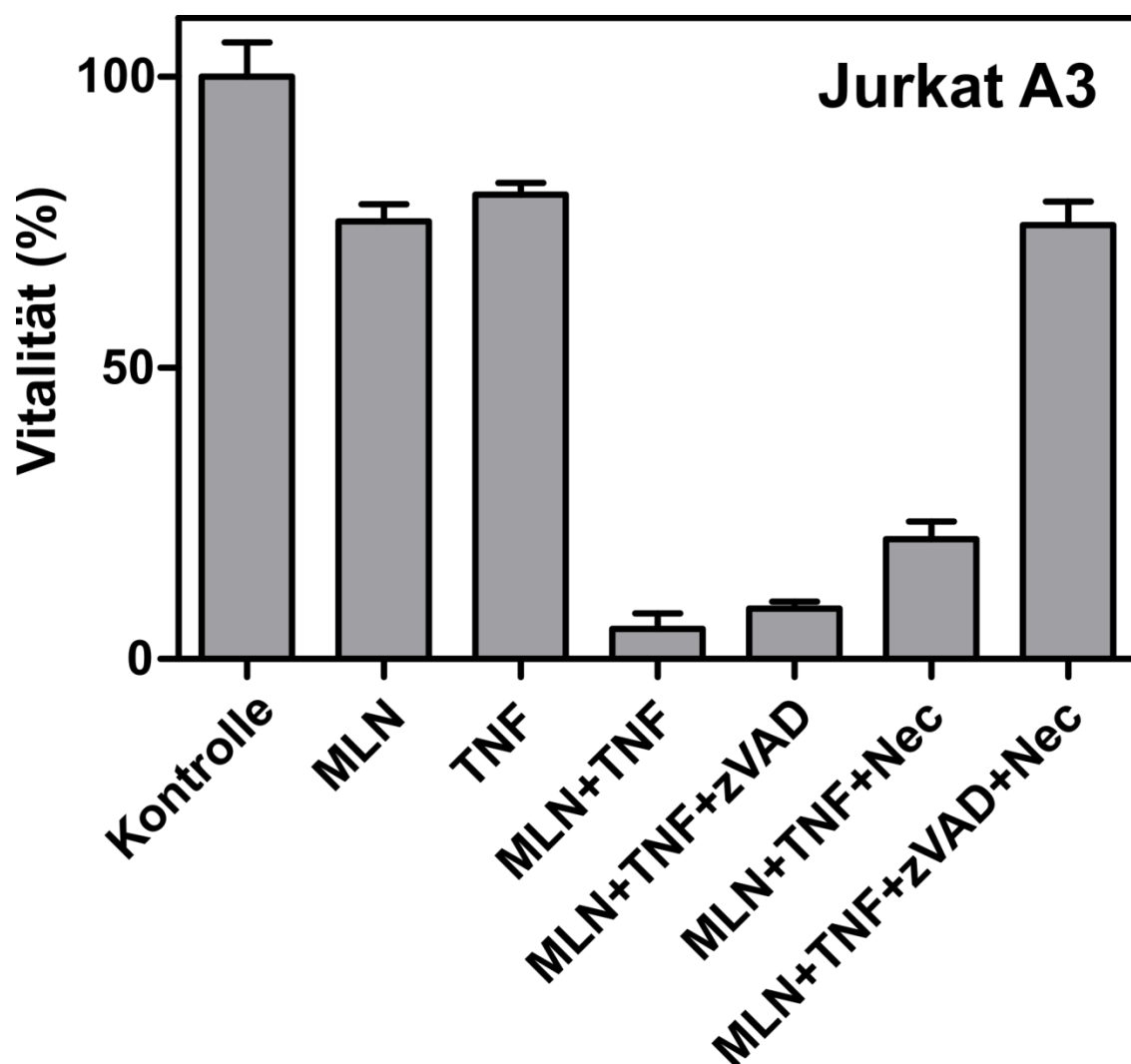
In ersten Versuchen sollte der Mechanismus des BMP2 induzierten Zelltodes in MM-Zelllinien genauer analysiert werden. Dazu sollte durch die Verwendung spezifischer Inhibitoren die genaue Form des BMP2 induzierten Zelltodes bestimmt werden.

Die Apoptose ist ein Caspasen-abhängiger Prozess der zum Zelltod führt. Der Pan-Caspase-Inhibitor zVAD-fmk, welcher irreversibel an die katalytische Domäne der Caspase-Proteasen bindet, kann dadurch die Apoptose grundsätzlich inhibieren (Craighead et al., 1999). Necrostatin-1 wird hingegen zum Nachweis der Caspasen-unabhängigen Nekroptose

eingesetzt. Es ist ein allosterischer Inhibitor der RIP1-Kinase, dem essentiellen Aktivator der Nekroptose (Vandenabeele et al., 2013).

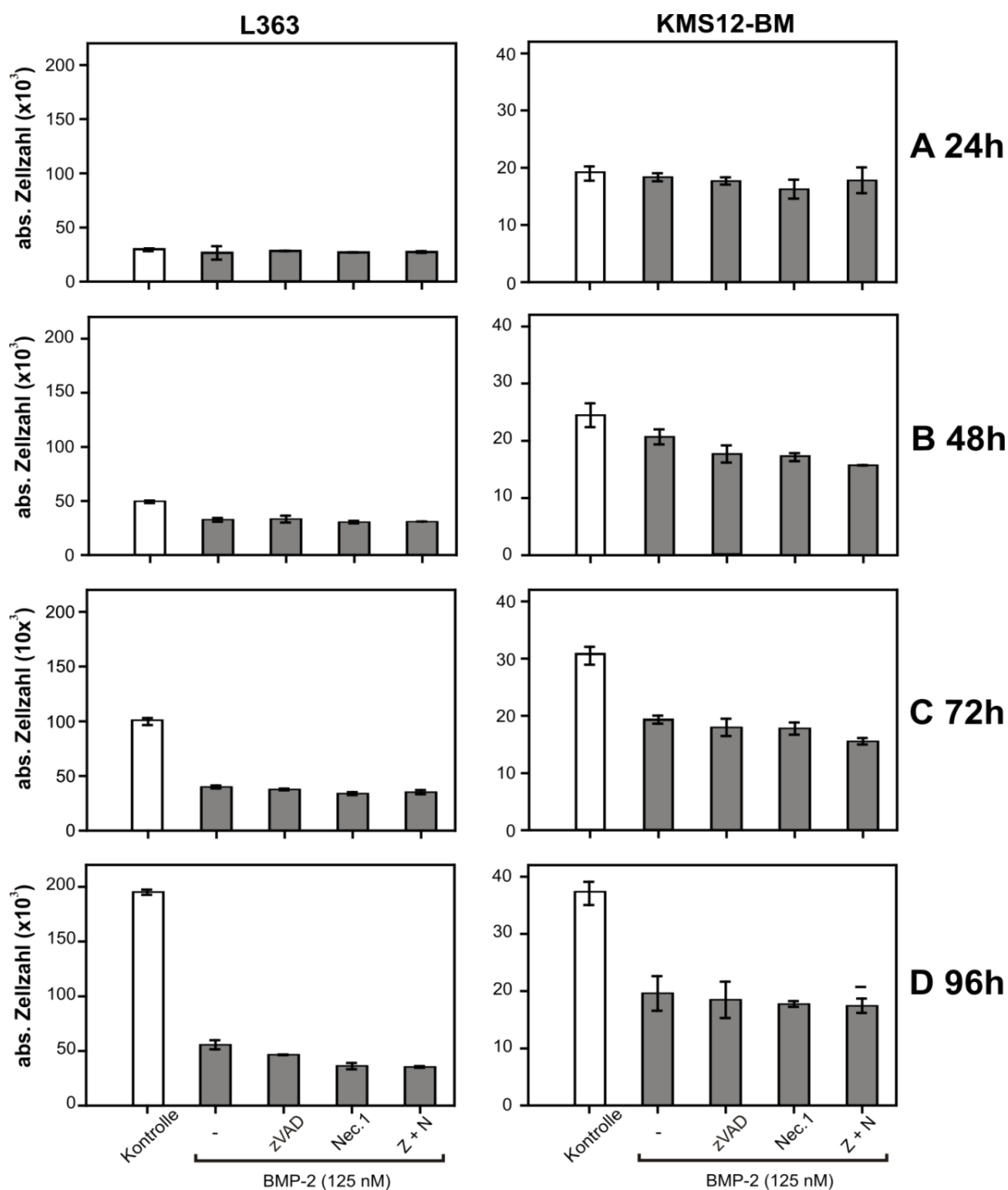
Experimentell werden die Inhibitoren grundsätzlich sowohl einzeln als auch in Kombination eingesetzt, da, wie bereits beschrieben, die einzelnen Formen des programmierten Zelltodes ineinander wechseln können (Lalaoui et al., 2015, Long and Ryan, 2012, Nikolettou et al., 2013). Allgemein wird die Nekroptose nach der Aktivierung der Apoptose durch die Inhibition von RIPK1 durch die aktivierte Caspase-8 geblockt (Gunther et al., 2011, Oberst et al., 2011, O'Donnell et al., 2011). Allerdings zeigen Krebszellen, die stark anti-apoptotische Gene (z.B. cFLIP) exprimieren oder Zellen, die mit einem Virus infiziert sind, oft eine nicht aktivierte oder sogar gezielt inhibierte Form der Caspase-8 (Mocarski et al., 2011). In diesem Fall ist die Apoptose zwar geblockt, allerdings akkumuliert dann RIPK1 und kann somit als Backup Programm die Nekroptose aktivieren (Degterev et al., 2005, Gunther et al., 2011, Oberst et al., 2011, O'Donnell et al., 2011). Dies kann auch bei der Inhibition der Caspase-8 durch zVAD-fmk geschehen. So kann nur der jeweils einzelne Einsatz und der kombinierte Einsatz der beiden Inhibitoren zVAD-fmk und Necrostatin-1 Aufschluss über die Form des programmierten Zelltod geben.

Um die Funktionsfähigkeit und Integrität der Inhibitoren zVAD-fmk und Necrostatin-1 zu überprüfen, wurde ein Kontrollexperiment, wie bereits beschrieben (El-Mesery et al., 2015), mit den humanen T-Lymphozyten Jurkat A3 und dem Todesliganden TNF $\alpha$ -wt-Flag (100 ng/ml) mittels eines Zytotoxizitäts-assay durchgeführt. Damit TNF $\alpha$ -wt-Flag nicht den NF- $\kappa$ B-*pathway* in Jurkat A3 einleitet, wurde allen Gruppen der NF- $\kappa$ B-*pathway*-Inhibitor MLN4942 (20  $\mu$ M) zugesetzt, welcher das Enzym NEDD8-*activating-enzyme* (NAE) inhibiert. Durch Inhibition des NF- $\kappa$ B-*pathways* leitete TNF $\alpha$ -wt-Flag direkt den Zelltod ein (Abb. 12 M+T). Sowohl zVAD-fmk [50  $\mu$ M] (Abb. 12 M+T+Z), als auch Necrostatin-1 [90 $\mu$ M] (Abb. 12 M+T+N) zeigten einen Rettungseffekt. Jedoch erst die Kombination aus zVAD-fmk und Necrostatin-1 konnte Jurkat A3 fast vollständig vor TNF $\alpha$ -wt-Flag-induziertem Zelltod schützen, da beide möglichen Zelltod-*pathways* simultan inhibiert wurden (Abb. 12 M+T+Z+N). Der geringere Rettungseffekt, der bei einzelner Gabe der inhibitorischen Stoffe zu sehen ist, zeigt deutlich, dass ein Teil der Zellen zwar von z.B. zVAD-fmk geschützt wurde, dann aber auf Nekroptose umgeschaltet hat. Genauso verhielt es sich bei der einzelnen Gabe von Necrostatin-1, bei der ein Teil der Zellen dann in Apoptose ging (El-Mesery et al., 2015). Mit diesem Ergebnis waren die funktionellen Aktivitäten von zVAD-fmk und Necrostatin-1 bestätigt.



**Abb. 12:** Die Inhibitoren zVAD-fmk und Necrostatin-1 wurden auf ihre biologische Aktivität getestet. Die humanen T-Lymphozyten Jurkat A3 Zellen wurden über Nacht in 96well-Platten kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen der Inhibitoren MLN4924 (20  $\mu$ M), zVAD-fmk (50  $\mu$ M) und Necrostatin-1 (90  $\mu$ M) inkubiert. Nach 1 h wurde TNF $\alpha$  (100 ng / ml) hinzugegeben und über Nacht inkubiert. Die Zellvitalität wurde durch einen Zytotoxizitäts-assay bestimmt.

Demnach waren die Stoffe zVAD-fmk und Necrostatin-1 auch in folgendem BMP2-Experiment aktiv. Diese Inhibitoren wurden zur Analyse des BMP2-induzierten Zelltodes in den humanen MM-Zelllinien L363 und KMS12-BM genutzt (Abb. 13). In folgendem Experiment wurde, nach zweistündiger Präinkubation mit je 90  $\mu$ M Necrostatin-1 oder 50  $\mu$ M zVAD-fmk und beidem in Kombination, 125 nM BMP2 auf die humanen Myelomzelllinien L363 und KMS12-BM hinzugegeben. Die absolute Zellzahl wurde nach 24, 48, 72 und 96 Stunden im *Coulter Counter* detektiert.



**Abb. 13:** Analyse des programmierten Zelltodes nach BMP2-Stimulation durch Verwendung der spezifischen Inhibitoren zVAD-fmk und Necrostatin-1. Die Analyse erfolgte durch Zählung der absoluten Zellzahl von L363 und KMS-12-BM mit und ohne 125 nM BMP2-Stimulation, sowie unter Einfluss von zVAD-fmk (Z) und Necrostatin-1 (N). Eine 96-well-Mikrotiterplatte wurde mit je 20.000 Zellen/well ausplattiert und mit 50  $\mu$ M zVAD-fmk oder 90  $\mu$ M Necrostatin-1 einzeln und in Kombination (Z/N) stimuliert. Nach dreistündiger Inkubation wurde BMP2 hinzugegeben und die absolute Zellzahl nach 24 (A), 48 (B), 72 (C) und 96 Stunden (D) im Casy® Coulter Counter gemessen.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe, deren Zellzahl über den gemessenen Zeitraum stetig zunimmt, bleibt die Zellzahl der BMP2-stimulierten Gruppen wie bereits beobachtet (Abb. 9) bei beiden Zelllinien nahezu konstant. Darüber hinaus zeigten weder zVAD-fmk, noch

Necrostatin-1 oder beides in Kombination einen Rettungseffekt vor TNF $\alpha$ -wt-Flag-vermitteltem Zelltod. Das bedeutet, dass sich die absolute Zellzahl ausgehend von der Anzahl der Zellen bei Start des Experimentes nicht wesentlich ändert und keiner der verwendeten Inhibitoren des programmierten Zelltodes einen signifikanten Effekt zeigt. Die Ergebnisse deuten entgegen der bisher publizierten Ergebnisse darauf hin, dass BMP2 keine apoptotische oder nekroptotische Wirkung hat.

### **3.1.5 BMP2 stimulierte MM-Zellen zeigen keine Caspase-Aktivierung**

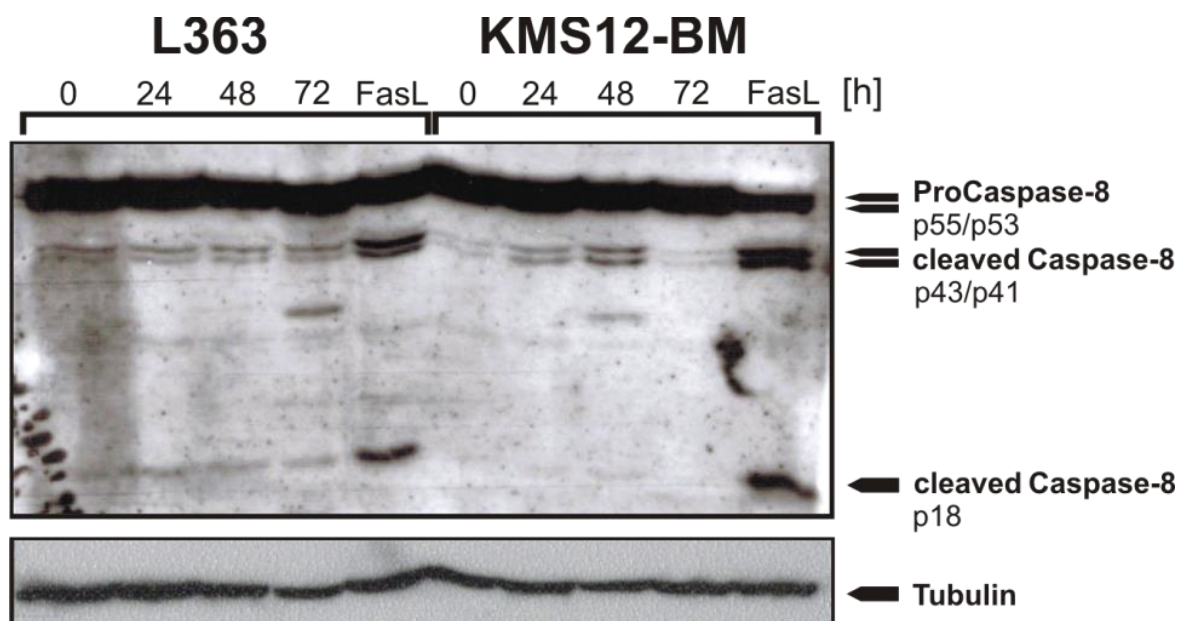
Da die in vorherigen Experimenten erhaltenen Ergebnisse eher auf einen anti-proliferativen Effekt hindeuten, sollte dies im Detail untersucht werden.

Bei der Apoptose spielen die Caspasen eine zentrale Rolle. Sowohl der extrinsische als auch der intrinsische Signalweg führen zur Aktivierung der Caspasen-Kaskade (Lavrik and Krammer, 2012). Dabei werden zuerst die Initiatorcaspasen-8 und -9 autoproteolytisch aktiviert. Die aktivierten Initiatorcaspasen spalten daraufhin die Effektorcaspasen-3, -6 und -7 zu ihrer aktiven Form. Anschließend folgen die Fragmentierung der DNA und die Spaltung von essentiellen regulatorischen Proteinen. Die Caspase-Aktivität lässt sich anhand ihrer entstandenen Spaltprodukte, sowie der aktiven Caspase nachweisen (Kurokawa and Kornbluth, 2009, Lamkanfi et al., 2007).

Um vorangegangene Ergebnisse zu verifizieren, wurden nach BMP2-Stimulation der humanen MM-Zelllinien L363 und KMS12-BM die Aktivierung der Caspase-8 und -3 mittels Westernblot detektiert. Nach der Aktivierung können für die Caspasen folgende Spaltprodukte nachgewiesen werden: Caspase-8 (43/41 kDa) und ihr Spaltprodukt p18 (18 kDa), sowie ProCaspase-3 (35 kDa) und die Spaltprodukte p17 (17 kDa) und p19 (19 kDa).

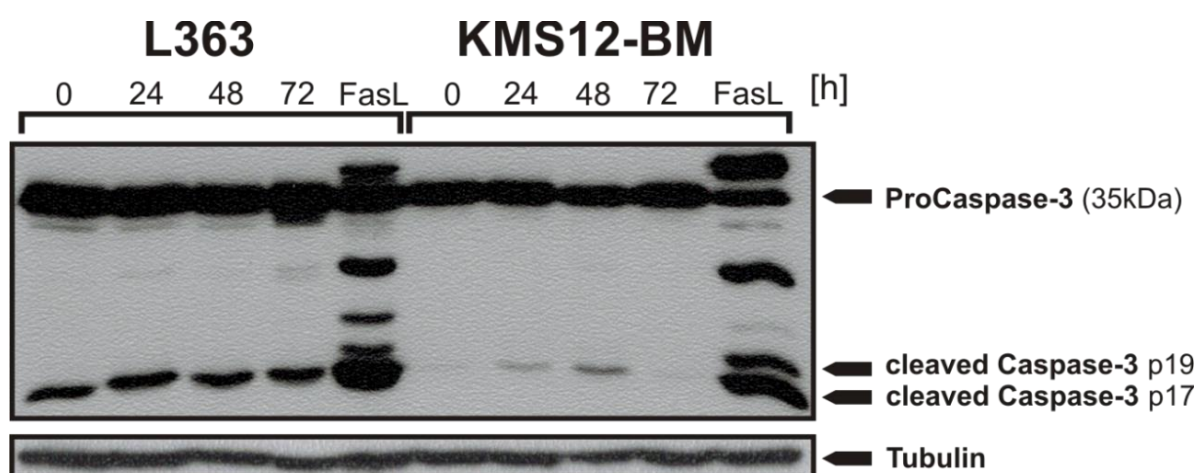
L363- und KMS12-BM-Zellen wurden 24, 48 und 72 h mit 125 nM BMP2 stimuliert und eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle diente eine für 6 h mit dem Todesliganden FasL-Fc (100 ng/ml) stimulierte Probe der jeweiligen Zelllinie. Anschließend wurden die Proteinlysate über SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot auf die Caspasenaktivität analysiert (Abb.14 + 15).

Die oberste Bande zeigt die zwei Isoformen der unprozessierten Procaspase-8 (p55/p53), während darunter die aktive Caspase-8 (p43/p41) läuft und zuunterst ihr Spaltprodukt p18 zu sehen ist (Abb. 14). Nach 6-stündiger FasL-Fc-Inkubation ist anhand des Spaltproduktes p18 deutlich zu sehen, dass die Caspase aktiviert worden ist. Hingegen zeigte sich nach der BMP2-Stimulation in beiden Zelllinien selbst nach 72 Stunden keine signifikante Aktivierung der Caspase-8 im Vergleich zur Kontrolle.



**Abb. 14:** Analyse der Caspase-8-Aktivierung nach BMP2-Stimulation. L363 und KMS12-BM wurden 0, 24, 48 und 72 Stunden mit 125 nM BMP2 und 6 Stunden mit 100 ng/ml FasL stimuliert. Caspase-8 sowie das Spaltprodukte p18 wurden mittels Westernblot detektiert.

In weiteren Versuchen wurde die Caspase-3-Aktivierung in L363- und KMS12-BM-Zellen ebenfalls mit Hilfe von Western-Blot-Analysen untersucht (Abb.15). Die Spaltprodukte p17 und p19 der Procaspase-3 waren nach 6 h FasL-Fc(100 ng/ml)-Stimulation (Positivkontrolle) in beiden Zelllinien sehr gut zu erkennen. In der Zelllinie L363 war das Spaltprodukt p17 (unterste Bande) jedoch nach BMP2 (125nM)-Stimulation nur marginal vorhanden und in der Zelllinie KMS12-BM kaum nachweisbar. Das Spaltprodukt p19 war in beiden Zelllinien nach BMP2-Stimulation nicht zu detektieren (Abb. 15).



**Abb. 15:** Analyse der Caspase-3-Aktivierung nach BMP2-Stimulation (125 nM). L363 und KMS12-BM wurden 0, 24, 48 und 72 Stunden mit BMP2(125 nM) und 6 Stunden mit FasL-Fc (100 ng/ml) stimuliert. Die Caspase-3 Aktivierung wurde durch die Spaltprodukte p17 und p19 mittels Westernblot analysiert.

### 3.1.6 Durch BMP2-Stimulation sinkt die Zellteilungsrate und die Quantität der apoptotischen Zellen bleibt relativ konstant

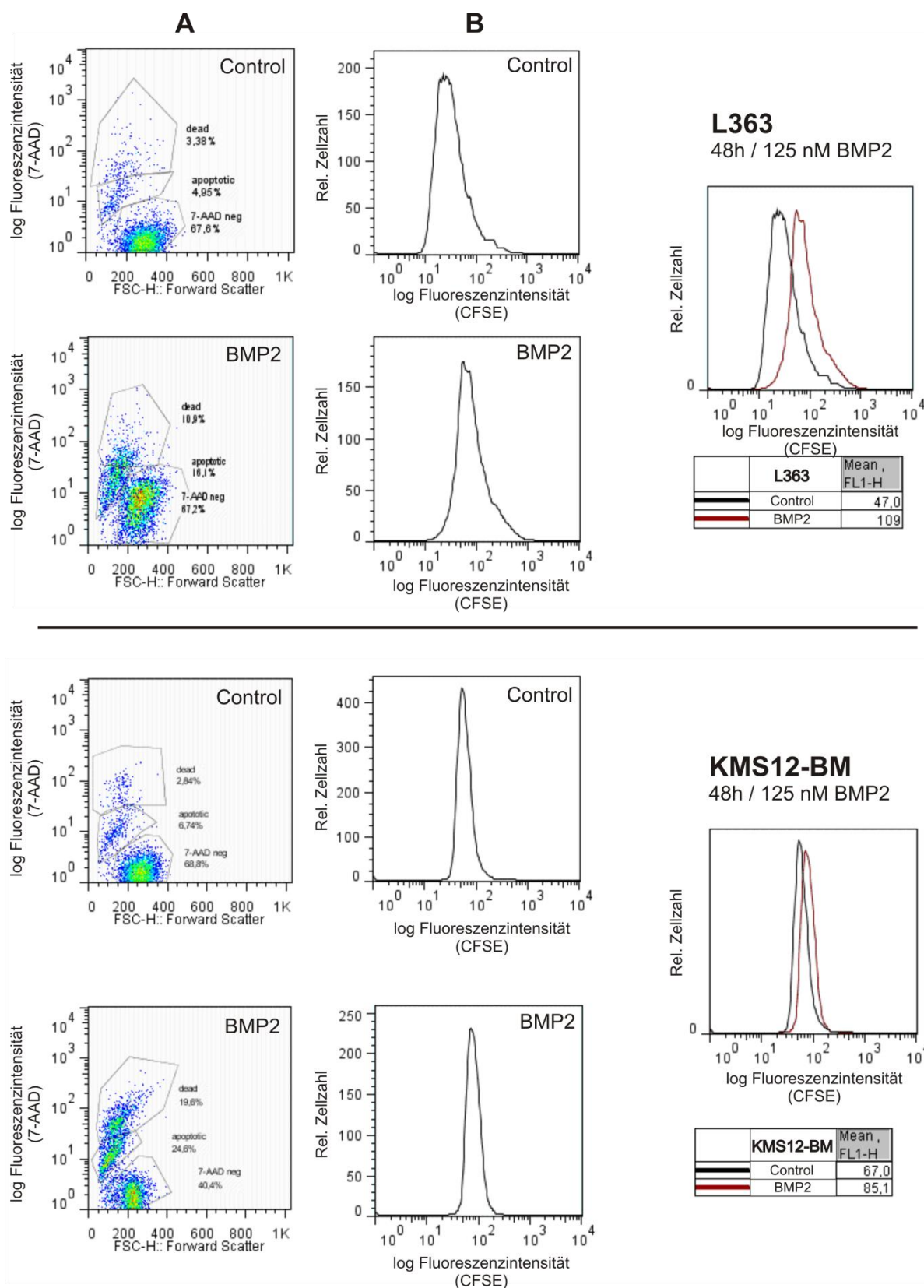
CFSE ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, welcher primäre Amine und damit im Wesentlichen Proteine in den Zellen anfärbt. Teilt sich eine CFSE-gefärbte Zelle, halbiert sich folglich die Intensität des Farbstoffs. Somit ist die Farbintensität ein Maßstab für die Teilungsrate der Zelle. Diese Eigenschaft kann genutzt werden, um die Zellproliferation mittels Durchflusszytometrie zu analysieren (Abb. 16 B).

Außerdem kann die Durchflusszytometrie Aufschluss über die Menge der in einem apoptotischen Prozess befindlichen Zellen und der toten Zellen geben. Hierfür wurde der Farbstoff 7-AAD (*7-Aminoactinomycin*) verwendet, der sich in die DNA nicht lebender Zellen spezifisch zwischen Cytosin und Guanin einlagert, was dadurch seine Fluoreszenzeigenschaften verändert (Abb. 16 A).

Um die anti-proliferative Wirkung von BMP2 zu verdeutlichen wurde folgendes Experiment durchgeführt. Die Zelllinien L363 und KMS12-BM wurde mit dem Farbstoff CFSE intrazellulär gefärbt und mit 125 nM BMP2 für 48 Stunden stimuliert. Die Kontrollgruppe, welche nicht mit BMP2 stimuliert wurde, gab ein deutlich schwächeres Signal (grauer Graph) als die mit BMP2 stimulierte Gruppe (roter Graph) ab. Diese reduzierte ebenfalls ihre Signalstärke, jedoch deutlich weniger. Demnach ergab sich nach 48 Stunden eine Diskrepanz der Intensität zur Kontrollgruppe bei L363 um den Faktor von ca. 2,7 und bei KMS12-BM um den Faktor von ca. 1,45 (Abb. 16 B)

Darüber hinaus zeigten die FACS-Analysen, dass die Anzahl der apoptotischen Zellen über das Zeitintervall von 48 h zwar angestiegen war, aber nicht um den Faktor, welcher für einem Todesliganden typisch ist. Der Prozentsatz der apoptotischen Zellen lag für L363 nach 48 h bei der Kontrollgruppe bei 4,95 % und bei der BMP2 stimulierten Gruppe bei 16,1 %. Für KMS12-BM lag der Prozentsatz der apoptotischen nach 48 h bei der Kontrollgruppe bei 6,74 % und bei der BMP2 stimulierten Gruppe bei 24,6 % (Abb. 16 A).





**Abb. 16:** A) Darstellung der lebenden, apoptotischen und toten Zellen von L363 und KMS12-BM mittels Durchflusszytometrie. Der Prozentsatz derer wurde sowohl bei der Kontrollgruppe, als auch bei der mit 125 nM BMP2 stimulierten Gruppe nach 48 Stunden gemessen. Beide Gruppen mit 7AAD gefärbt. B) Analyse der Zellteilungsrate mittels Durchflusszytometrie. L363 und KMS12-BM wurden mit CFSE gefärbt und 48 Stunden mit 125 nM BMP2 stimuliert (rote Kurve); die Kontrollgruppe wurde ebenfalls mit CFSE gefärbt (graue Kurve). Die Intensität des Farbstoffes wurde nach 48 Stunden gemessen.



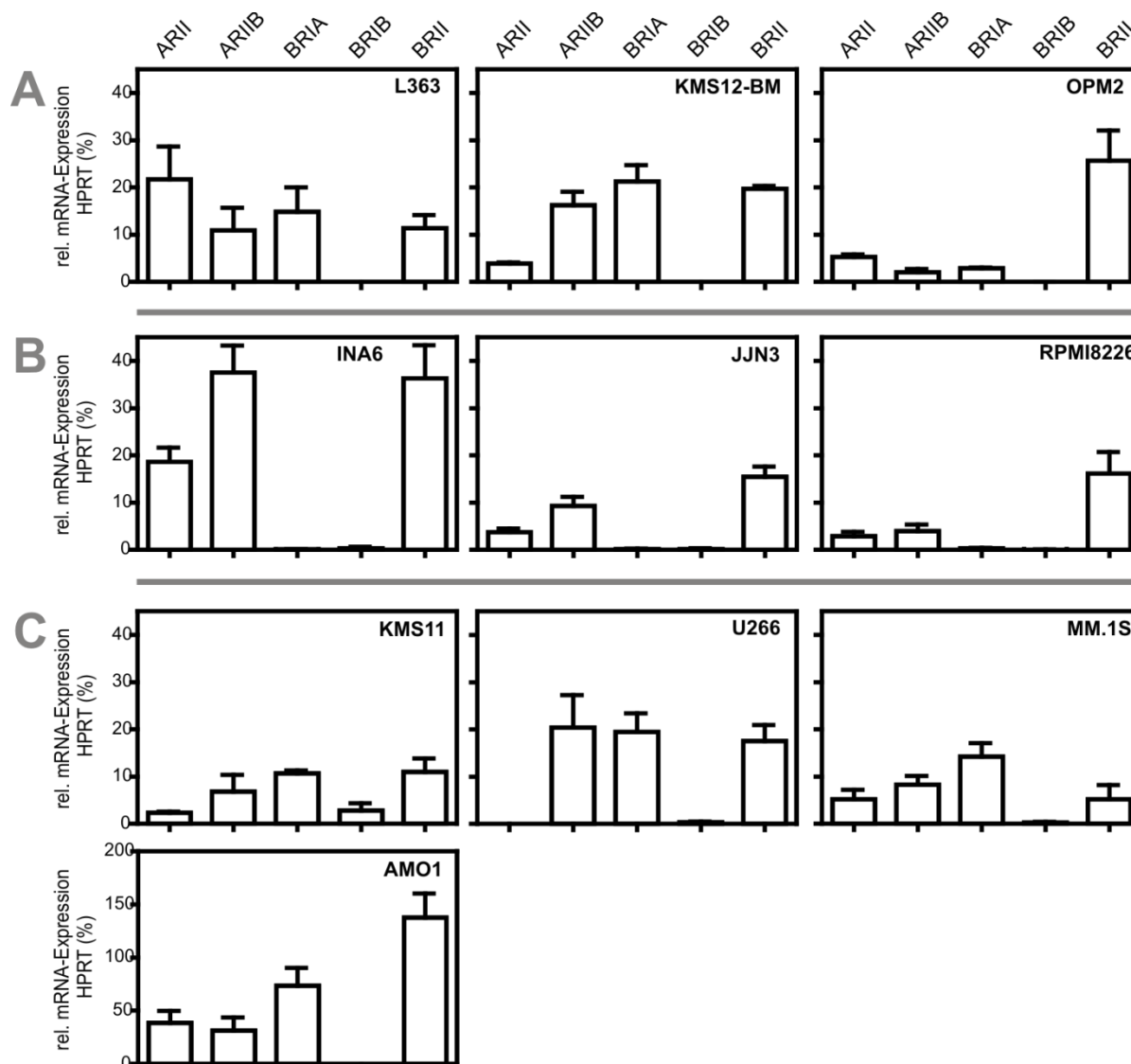
### **3.2 Analyse der durch BMP2 vermittelten Smad-Signaltransduktion in Zelllinien des Multiplen Myeloms**

Wie bereits erwähnt, wurde in Vorversuchen die BMP2 induzierten Apoptose im Multiplen Myelom in insgesamt 10 humane Zelllinien (KMS12-BM, KMS11, OPM2, INA6, L363, U266, JJN3, MM.1S, RPMI8226, AMO1) auf ihr anti-proliferatives Verhalten nach BMP2-Stimulation analysiert. Hierbei wurde festgestellt, dass insgesamt nur die drei Zelllinien KMS12-BM, L363 und OPM2 BMP2-responsiv waren (Abb. 5).

Da mit 7 Zelllinien ein Großteil der Zellen nicht auf BMP2 reagieren, sollten die Ursachen für diese Nichtresponsivität genauer analysiert werden. In einer ersten Analyse wurden die Zelllinien daher auf ihre relative mRNA-Rezeptorexpression in Bezug zum *housekeeping*-Gen HPRT hin mittels qRT-PCR untersucht.

#### **3.2.1 BMP2-Rezeptorexpression (mRNA) der humanen MM-Zelllinien**

BMP2 bindet an Ser/Thr-Kinase Rezeptoren, indem es als Dimer je zwei Typ-I und zwei Typ-II Rezeptoren in einen Ligand-Rezeptor-Komplex rekrutiert. Dabei interagiert BMP2 mit den Typ-I Rezeptoren BR-IA oder BR-IB und den Typ-II Rezeptoren BR-II, ActR-II oder ActR-IIB. Damit eine BMP2-Signaltransduktion stattfinden kann, muss eine Zelle jeweils mindestens einen der Typ-I Rezeptoren und mindestens einen der Typ-II Rezeptoren exprimieren. Der Rezeptorexpressionslevel wurde daher mittels qRT-PCR auf mRNA-Ebene analysiert.



**Abb. 17:** Analyse der mRNA-Expression der BMP2-Rezeptoren der humanen MM-Zelllinien KMS12-BM, L363, OPM2, KMS11, AMO1, MM.1S, U266, INA6, JJN3 und RPMI8226 mittels qRT-PCR. Eingesetzt wurden 500 ng/well cDNA der jeweiligen Zelllinie, welche mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix versetzt war, und 0,3  $\mu$ M der Primer, welche für ActR-II, ActR-IIB, BR-IA, BR-IB und BR-II kodieren. [A] Responsive; [B] Nicht-responsive ohne Typ-I Rezeptoren; [C] Nicht-responsive mit Typ-I und Typ-II Rezeptoren. Das Standardgen war HPRT.

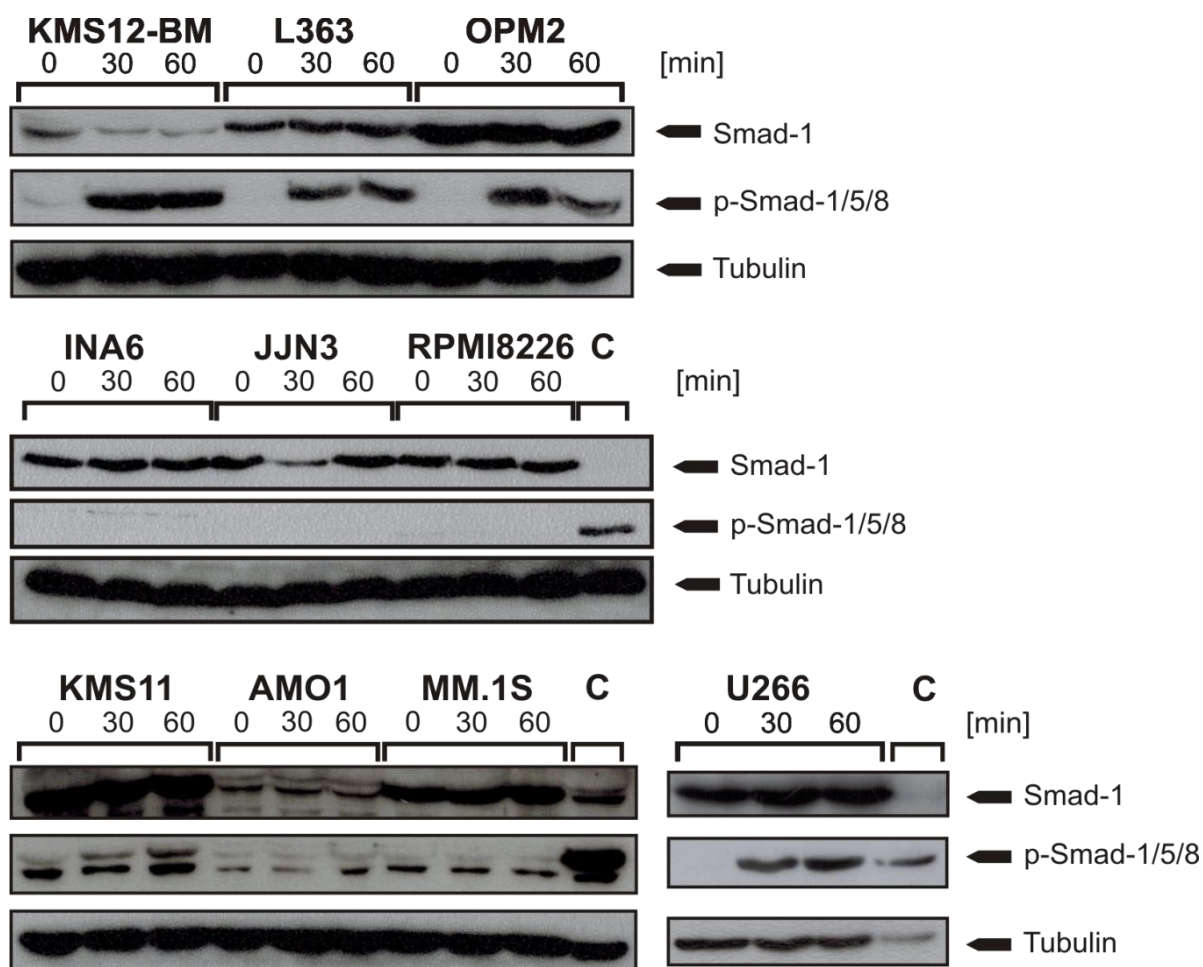
Die Ergebnisse ermöglichten die Einteilung aufgrund der mRNA-Rezeptorexpression in drei Gruppen (Abb.17). Zur ersten Gruppe gehören Zellen, die responsiv waren und bei denen eine ausreichende Rezeptorzusammensetzung auf mRNA-Ebene nachweisbar war (KMS12-BM, L363, OPM2) (Abb.17 [A]). Die zweite Gruppe umfasste Zellen, die nicht-responsiv waren (INA6, JJN3, RPMI8226). Hier fehlten auf mRNA-Ebene beide notwendigen Typ-I-Rezeptoren (Abb.17 [B]). Die letzte Gruppe war ebenfalls nicht-responsiv, auf mRNA-Ebene waren jedoch die notwendigen Typ-I und Typ-II Rezeptoren nachweisbar (KMS11, AMO1, MM.1S, U266) (Abb.17 [C]).

### **3.2.2 KMS11, AMO1, U266 und MM.1S exprimieren z.T. Phospho-Smad nach BMP2-Stimulation und besitzen ein hohes Level an Smad-7**

Da bei einigen der nicht-responsiven Zellen die notwendigen BMP2-Rezeptoren auf RNA-Ebene nachgewiesen werden konnten, sollte in weiteren Versuchen die möglichen Ursachen für die BMP2-Resistenz analysiert werden. Dem nicht-responsiven BMP2 Verhalten der vier Zelllinien KMS11, AMO1, U266 und MM.1S können mehrere Ursachen zugrunde liegen. Zum einen könnte einer der BMP-spezifischen Rezeptoren nicht exprimiert sein, was jedoch mittels qRT-PCR widerlegt wurde (Kapitel 3.2.1). Allerdings sind Mutationen der BMP-Rezeptoren möglich, welche z.B. eine falsche Faltung auslösen können und somit eine Bindung von BMP2 am Rezeptor verhindern oder eine fehlende Übersetzung der exprimierte RNA verursachen. Ein bereits durchgeführtes Genomscreening der AG Rosenwald (Leich et al., 2013) (Ergebnisse nicht gezeigt) wurde dazu genutzt, um bei den von uns ebenfalls verwendeten Zelllinien (JUN3, AMO1, U266, OPM2, L363) den Mutationsstatus der einzelnen BMP-Rezeptoren zu analysieren. Die Ergebnisse zeigten, dass keine bzw. wenn dann nur stille Mutationen in den BMP2-Rezeptoren dieser MM-Zellen vorkommen (Leich et al., 2013). Eine „loss of function“ Mutation am Rezeptor ist bei den analysierten Zelllinien demnach unwahrscheinlich. Eine weitere mögliche Erklärung für die fehlende BMP2-Responsivität einiger MM-Zelllinien liegt in einer gestörten Signaltransduktion durch den aktivierten Ligand-Rezeptor-Komplex. Hier wären Störungen der Phosphorylierung von Rezeptor I durch Rezeptor II oder der Phosphorylierung der R-Smads möglich. Ebenfalls ist denkbar, dass inhibitorische Smads die Responsivität und damit die Signaltransduktion negativ beeinflussen (Miyazono et al., 2010).

Aus diesem Grund wurde die BMP2-induzierten Smad-1/5/8-Signalkaskade, auf Proteinebene mittels Westernblot genauer analysiert (Abb. 18). Ermittelt wurde der Proteingehalt an Smad-1 und phosphoryliertem Smad-1/5/8 in allen 10 Zelllinien. Hierzu wurden diese Zelllinien 0, 30 und 60 Minuten lang mit 125 nM BMP2 inkubiert. Bei den BMP2-responsiven Zelllinien KMS12-BM, L363 und OPM2 konnte nach 30- und 60-minütiger BMP2 Stimulation eindeutig Phospho-Smad-1/5/8 nachgewiesen werden. Die auf Grund der fehlenden BMP-Rezeptoren nicht BMP2-responsiven Zelllinien INA6, JUN3 und RPMI8226 zeigten keine nachweisbare Phospho-Smad-1/5/8 Aktivierung. Als Positivkontrolle wurde hier die responsive Zelllinie KMS12-BM verwendet, welche 60 min lang mit BMP2 inkubiert war. Ein differenziertes Bild zeigte sich hingegen bei der dritten Gruppe, den nicht BMP2-responsiven Zelllinien, bei denen auf RNA-Ebene die Expression der notwendigen Rezeptoren nachweisbar war. Bei den Zelllinien AMO1 und MM.1S zeigte sich im Vergleich zur Positiv-Kontrolle kaum Phospho-Smad-Signal (Abb. 18 untere Gruppe). KMS11 wies eine schwache Induktion auf, welche jedoch wesentlich schwächere im Vergleich zur Positiv-Kontrolle war. U266 zeigt unter Berücksichtigung der Positiv-Kontrolle im Tubulinblot

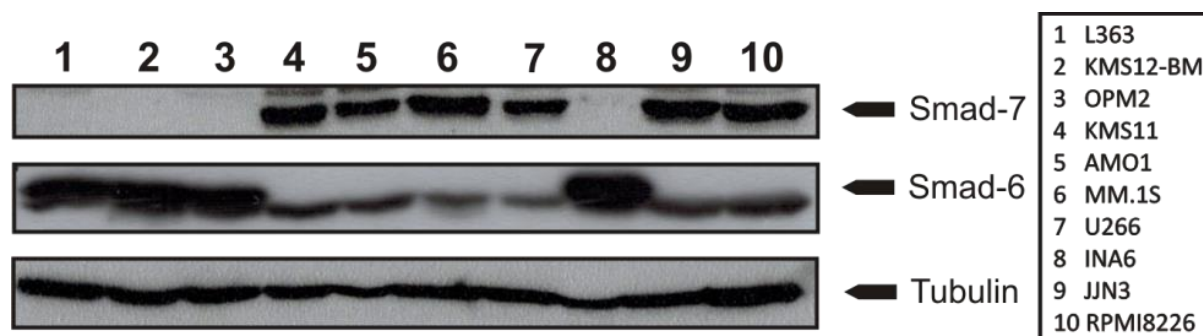
ebenfalls eine schwächere Induktion der R-Smad-Phosphorylierung. Somit haben alle Zelllinien dieser Gruppe keine oder nur eine schwache Smad-Phosphorylierung.



**Abb. 18:** Darstellung der Smad-1 und Phospho-Smad-1/5/8 Proteinexpression der responsiven Gruppe KMS12-BM, L363, OPM2, der nicht-responsiven Gruppe INA6, JJN3, RPMI8226 und der nicht-responsiven Gruppe KMS11, AMO1, MM.1S, U266 nach 30 und 60 minütiger BMP2-Stimulation. Jede Zelllinie wurde sowohl ohne (0) als auch mit 125 nM BMP2 jeweils 30 und 60 Minuten stimuliert. Bei den nicht-responsiven Zelllinien wurde als Positiv-Kontrolle (C) die responsive Zelllinie KMS12-BM verwendet. Die einzelnen Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Westernblot untersucht. Dabei wurden die Antikörper Anti-Smad-1 und Anti-Phospho-Smad-1, 5, 8 benutzt.

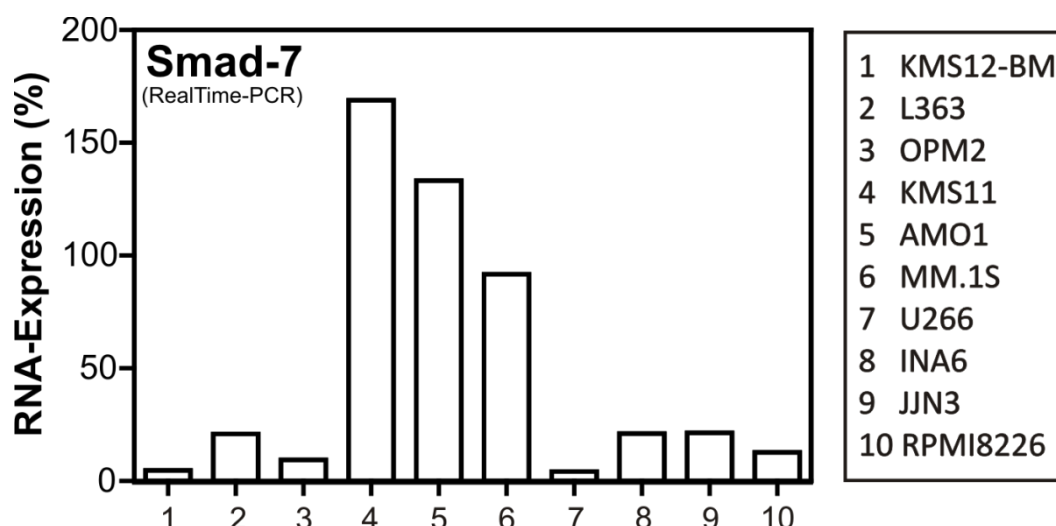
Mittels Westernblotting wurde daraufhin die Expression an Smad-6 und Smad-7 in den zehn humanen Zelllinien des Multiplen Myeloms (KMS12-BM, KMS11, OPM2, INA6, L363, U266, JJN3, MM.1S, RPMI8226, AMO1) ohne vorherige BMP2-Stimulation untersucht (Abb. 19). Auffällig war, dass die responsiven Zelllinien keinerlei Smad-7 Expression zeigten. Die nicht-responsiven Zelllinien zeigten mit einer Ausnahme (INA6) einen erhöhten Smad-7-Level. Die Ursache für die nicht-Responsivität der Zelllinien KMS11, AMO1, U266 und MM.1S gegenüber BMP2 könnte demnach in der hohen Expression von inhibitorischem Smad-7 liegen.

Interessanterweise zeigt die Proteinexpression von Smad-6 ein exakt gegenläufiges Muster zur Smad-7-Expression. Während die Smad-7-Expression bei der responsive Gruppe fehlt, ist bei dieser der Smad-6-Protein-Level deutlich erhöht. Die nicht-responsiven Zelllinien zeigen dagegen nun ein niedrigeres Protein-Level an inhibitorischen Smad-6. Auch hier stellt die Zelllinie INA6 mit erhöhtem Smad-6-Level wieder eine Ausnahme dar (Abb. 19).



**Abb. 19:** Darstellung der Smad-6 und Smad-7 Proteinexpression aller Zelllinien L363, KMS12-BM, OPM2, KMS11, AMO1, MM.1S, U266, INA6, JN3 und RPMI8226 ohne BMP2-Stimulation. Die einzelnen Proben wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Westernblot untersucht. Dabei wurden der Antikörper Anti-Smad-6 benutzt.

Das Expressionsprofil an Smad-7 wurde auf RNA-Ebene mittels qRT-PCR für Gruppe C weitestgehend bestätigt (Abb. 20). KMS11, AMO1 und MM.1S besitzen einen erhöhten Level an Smad-7, während die responsive Gruppe kaum Smad-7 exprimiert. U266 stellt mit einer geringeren Expression an Smad-7 auf RNA-Ebene im Vergleich zum Proteinnachweis eine Ausnahme dar.



**Abb. 20:** Analyse der Smad-7 Expression auf RNA-Ebene der humanen MM-Zelllinien KMS12-BM, L363, OPM2, KMS11, AMO1, MM.1S, U266, INA6, JN3 und RPMI8226 mittels qRT-PCR. Eingesetzt wurden 500 ng/well cDNA der jeweiligen Zelllinie, welche mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix und 0,3  $\mu$ M des Primers HS\_SMAD7\_1\_SG versetzt wurde. Das Standardgen war HPRT.

### 3.3 Analyse der biologischen Aktivität von BMP2- und GDF5-Derivaten als potentielles Agens im Multiplen Myelom

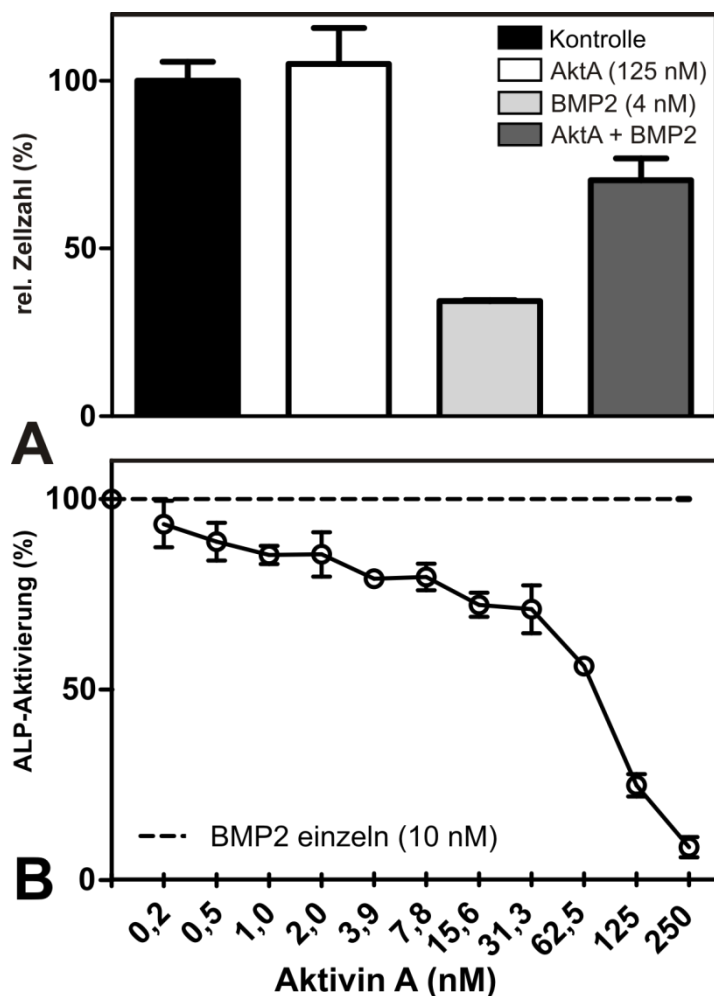
Kennzeichnend für das Multiple Myelom ist die vermehrte Proliferation maligner Plasmazellen und erhöhte Level an Aktivin A, welche mit schweren Knochenlysen verbunden sind. In den letzten Jahren wurden Aktivin-A-Antagonisten bereits erfolgreich bei MM-Patienten eingesetzt (Raje and Vallet, 2010, Chantry et al., 2010, Vallet et al., 2010).

Aus diesem Grund könnte BMP2 für einen klinischen Einsatz als therapeutisches Agens sehr gut geeignet sein. Es bringt als Molekül selbst alle notwendigen Anforderungen mit für den Einsatz im Multiplen Myelom. Erstens ist es auf molekularer Ebene ein Aktivin-A-Antagonist und zweitens wirkt es den zwei maßgeblichen Phänotypen des MM entgegen. BMP2 hat eine extrem starke osteoanabole Aktivität und zusätzlich eine apoptotische oder anti-proliferative Wirkung auf neoplastische B-Zellen des Multiplen Myeloms.

#### 3.3.1 Der BMP2/Aktivin-A-Antagonismus

Grundsätzlich ist BMP2 auf molekularer Ebene ein Aktivin-A-Antagonist, da die Typ-II Rezeptoren ActR-II und ActR-IIB sowohl von BMP2 als auch vom Aktivin-A genutzt werden. Allerdings aktiviert durch eine unterschiedliche Typ-I-Rezeptor-Nutzung jeder Ligand einen anderen Smad-*pathway* und mündet somit in einer unterschiedlichen biologischen Aktivität. Beide Liganden können sich *vice versa* inhibieren, da sie um die gleichen Typ-II Rezeptor konkurrieren (Abb. 3)

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass Aktivin-A durch BMPs in Zellen des MM antagonisiert wird (Olsen et al., 2015). Auch in eigenen Experimenten konnte der beschriebene Antagonismus bereits in KMS12-BM Zellen durch WST1-assay und durch die Inhibition der BMP2 induzierten alkalischen Phosphatase in C2C12-Zellen belegt werden (Daten aus Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe, freundlicherweise zu Verfügung gestellt von Dr. A. Seher). Wie in Abb. 21 A zu sehen ist, hat die alleinige Stimulation von KMS12-BM-Zellen für 72 h mit 125 nM Aktivin-A keinen anti-proliferativen Effekt, während 4 nM BMP2 die Stoffwechselaktivität der Zellen um mehr als die Hälfte verringert. Gibt man nun beide Wachstumsfaktoren in Kombination, hemmt Aktivin-A den anti-proliferativen Effekt von BMP2, was zu einer Verringerung der Stoffwechselaktivität auf nur ca. 75 % führt. Ebenso wurde in Abb. 21 B der Antagonismus zwischen Aktivin-A und BMP2 gezeigt. Hier wurden murine Myoblastzellen C2C12 mit einer konstanten Konzentration an BMP2 (10 nM) stimuliert und ihre Alkalische Phosphatase Induktion nach 72 h gemessen, sowie diese als 100 % definiert. Steigende Konzentrationen an Aktivin-A, welche hinzugegeben wurden, senkten eindeutig den ALP-induzierenden Effekt von BMP2. Ein ähnlicher inhibitorischer Effekt von Aktivin-A auf die ALP-Expression wurde bereits für BMP7 gezeigt (Piek et al., 1999).



**Abb. 21:** Aktin-A hemmt BMP2-vermittelte zelluläre Reaktionen.

(A) KMS12-BM-Zellen wurden jeweils mit 125 nM Aktin-A oder 4 nM BMP2 je einzeln und in Kombination für 72 h stimuliert. Das Zellwachstum wurde mittels WST1-assay bestimmt.

(B) C2C12-Zellen wurden als Kontrolle ohne BMP2 (Daten nicht gezeigt) und zum einen mit 10 nM BMP2 und zum anderen mit 10 nM BMP2 + steigender Konzentration an Aktin-A inkubiert. Nach 72 h wurde die ALP-Aktivität gemessen. In Abwesenheit von BMP2 zeigten die Zellen keine ALP-Aktivität und das Hintergrundsignal wurde auf 0% gesetzt. Die ALP-Aktivität, die aus der Stimulation mit 10 nM BMP2 und ohne Aktin-A abgeleitet wurde, wurde als 100% definiert (Wert auf der Ordinate).

Anhand von weiteren Vorarbeiten sollte nun überprüft werden, inwiefern sich BMP2 und verschiedene Muteine von BMP2, deren Affinitäten zu den BMP-Rezeptoren verändert wurden, als Aktin-A-Antagonisten eignen. Durch gezieltes *Molecular Design* wurden von der Arbeitsgruppe Prof. T. D. Müller gezielt durch den Austausch einzelner Aminosäuren die Bindungseigenschaften des BMP2 und des GDF5 verändert.

### 3.3.2 *Molecular Design* von BMP2 und GDF5

Die Vielfalt der Interaktionsmöglichkeiten zwischen Rezeptoren und Liganden der BMP-Großfamilie (Promiskuität), bringt eine große Bandbreite biologischer Aktivitäten hervor. Aufschluss über die Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor auf molekularer Ebene ergaben die Kristallisations- und anschließenden Röntgenstrukturanalyse von verschiedenen Ligand/Rezeptor-Komplexen der TGF- $\beta$ -Superfamilie (Keller et al., 2004). Für BMP2 ergaben diese Analysen eine Bindungsdomäne für die Typ-II Rezeptoren (BR-II, BR-IIB, ActR-II), welche nur aus wenigen Aminosäuren besteht. Ebenso konnte für die Typ-I-Rezeptorerkennung ein *Hotspot* in Form einer einzelnen Aminosäure aufgezeigt werden, der über Bindung oder nicht-Bindung des Typ-I Rezeptors BR-IA entscheidet.

Durch *Molecular Design* wurden mithilfe dieser Erkenntnisse Varianten von Liganden (Muteine) entwickelt, welche neue Rezeptor-Bindungseigenschaften aufzeigen (Weber et al., 2007). Aus BMP2 entstanden die Derivate BMP2-KD, BMP2-L51P (Weber et al., 2007, Kirsch et al., 2000, Sebald et al., 2012, Mueller and Nickel, 2012) und BMP2-PKD, sowie aus GDF5 die Derivate GDF5-R57A und GDF5-R57A-KD.

Bei BMP2-KD ergab sich aus der Substitution der Aminosäuren L100K und N102D innerhalb der Bindungsdomäne eine signifikante Erhöhung der Bindungsaffinität an BR-II (3,5fach) und ActR-IIB (20fach) (Weber et al., 2007). Im Gegensatz dazu steht die Mutante BMP2-L51P. Wenn die Aminosäure L51P (Abb. 22 BMP2-P) substituiert wird, kann BMP2 nicht mehr an den Typ-I Rezeptor BR-IA binden (Keller et al., 2004). Die Kombination der beiden beschriebenen molekularen Modellierungen (BMP2-L51P, BMP2-KD) ergab die Trippelmutante BMP2-PKD, welche keine Bindungseigenschaft zu Typ-I Rezeptoren aufwies, jedoch eine erhöhte Affinität zu Typ-II Rezeptor.

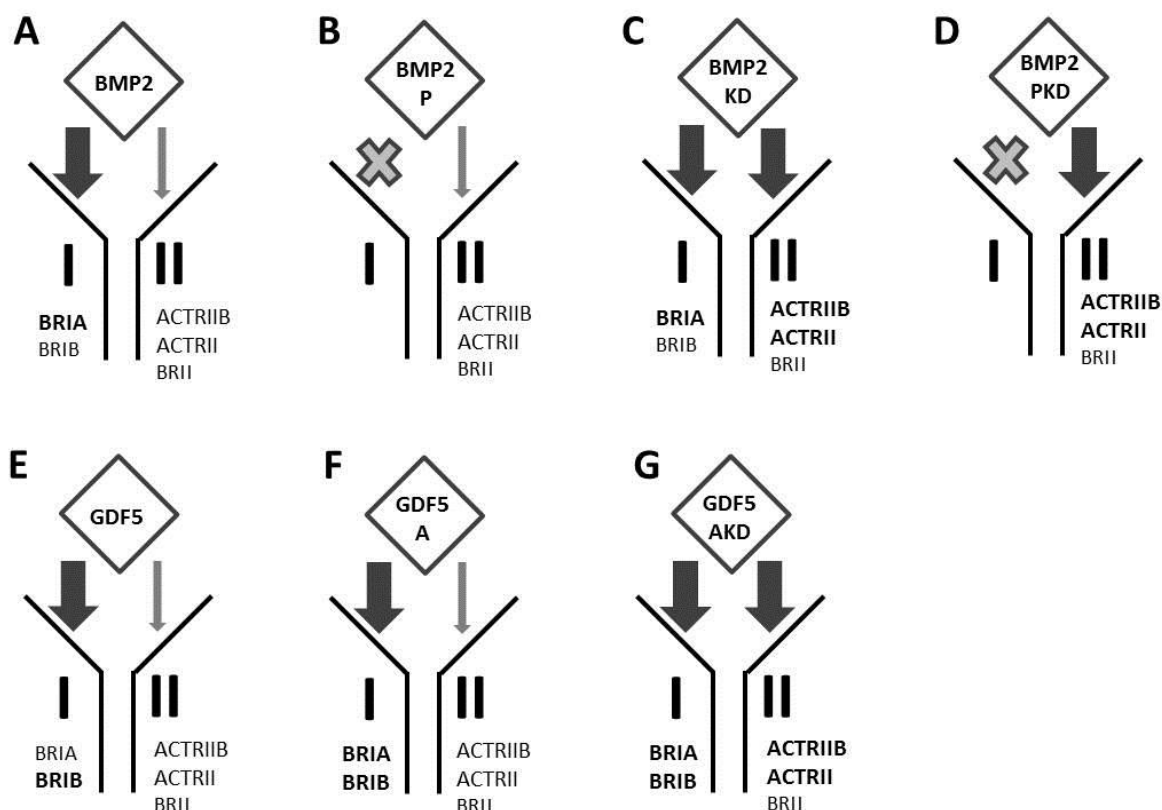
Da nicht alle Plasmazellen im Multiplen Myelom auf dieselben Liganden ansprechen (Ro et al., 2004, Holien et al., 2012), wurde das Spektrum an Varianten um GDF5 erweitert. Es bindet wie BMP2 an die Typ-I Rezeptoren BR-IA und BR-IB. Jedoch besitzt GDF5 zu BR-IB eine höhere Affinität als BMP2 (Kotzsch et al., 2009). Bei GDF5-R57A (GDF5-A) wurde die Aminosäure R57A in der Typ-I-Rezeptor-Ligand-Bindedomäne ausgetauscht, was zu keiner veränderten Affinität zu BR-IB, aber zu einer 15fach erhöhten Affinität zu BR-IA führte. Diese Bindungsintensität von GDF5-R57A entsprach etwa der von BMP2 zu BR-IA (Nickel et al., 2011). Die Affinität zu den Typ-II Rezeptoren konnte bei GDF5 analog zum BMP2 ebenfalls durch Austausch von L100K und N102D wesentlich erhöht werden. Die Kombination der genannten Mutation ergibt dann die Mutante GDF5-R57A-KD (GDF5-AKD).

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Bindungseigenschaften können diese verschiedenen Mutanten nun potentiell als therapeutisches Agens im Multiplen Myelom eingesetzt werden. BMP2-KD ist sowohl ein Superagonist als auch ein Superantagonist. Durch die erhöhte Bindungsaffinität an die Typ-II Rezeptoren BR-II und ActR-IIB ist sowohl das Potential Aktivin-A zu antagonisieren verstärkt, als auch evtl. die biologischen Funktion in Form der Induktion der Knochenbildung und der anti-proliferativen Wirkung auf neoplastische B-Zellen des Multiplen Myeloms. Im Gegensatz dazu steht die Mutante BMP2-L51P. Diese Proteinvariante ist durch die Bindung an die Typ-II Rezeptoren ActR-II und ActR-IIB ein reiner Antagonist zu Aktivin-A. Bei BMP2-PKD werden die beiden Eigenschaften aus den beiden vorher genannten Mutanten in einem Protein kombiniert. Damit ist BMP2-PKD ein reiner Superantagonist, da die Affinität zu Rezeptor Typ-I ausgeschaltet und die zu Rezeptor Typ-II dagegen stark erhöht ist. Ein ähnliches Bild ergibt sich für die GDF5-Muteine. GDF5-R57A könnte mit ähnlicher biologischer Aktivität wie GDF5 und BMP2 mit Aktivin-A um die Typ-II Rezeptoren ActR-II, ActR-IIB und BR-II konkurrieren und wäre damit ein Antagonist und



Agonist. GDF5-R57A-KD kann mit seiner erhöhten Bindungsaffinität zu den Typ-II-Rezeptoren sowohl als Superagonist als auch Superantagonist agieren und könnte in seinem klinischer Einsatz ähnlich der BMP2-KD-Mutante sein.

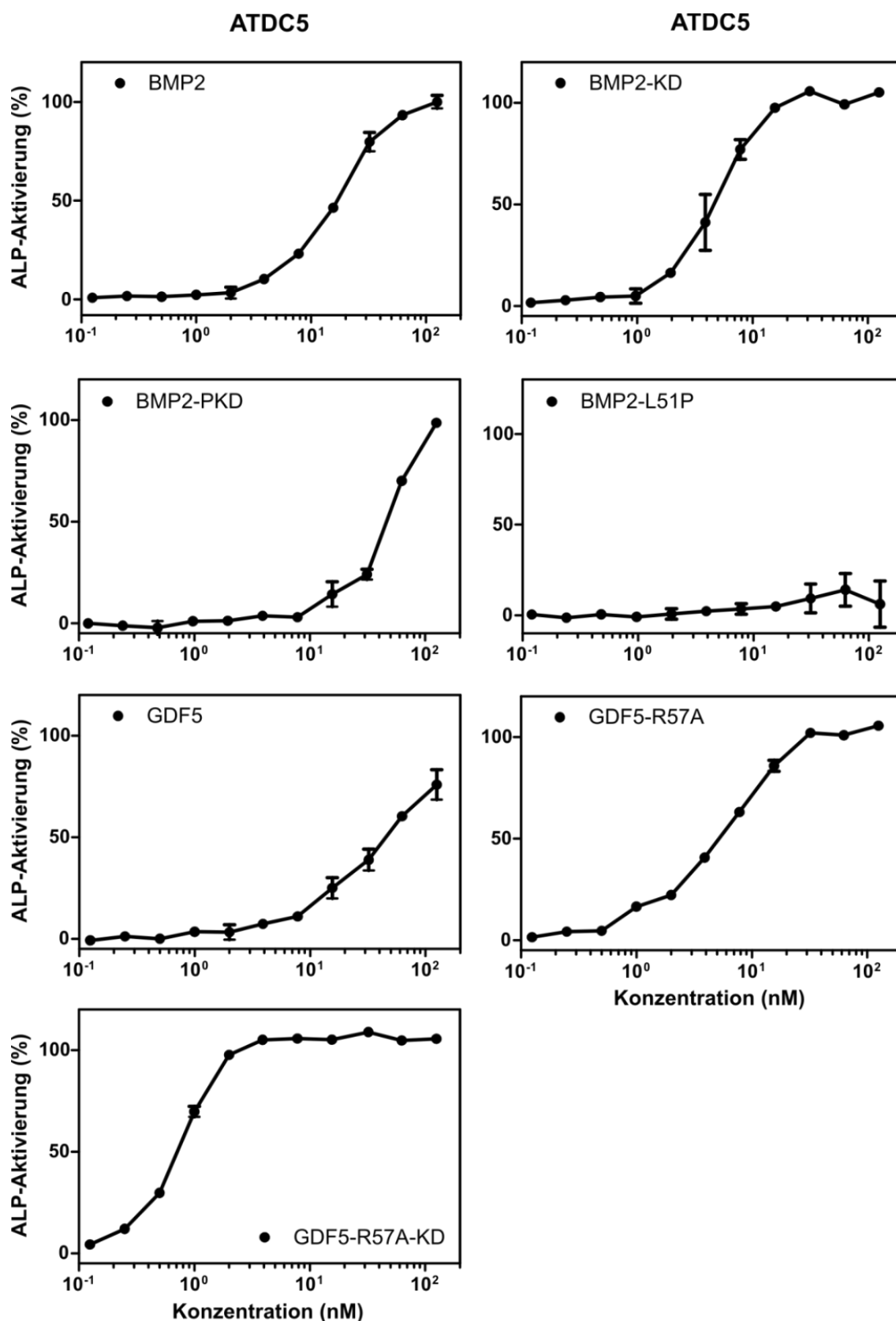
Die einzelnen Proteinvarianten und Affinitäten sind in Abb. 22 zum besseren Verständnis schematisch dargestellt.



**Abb. 22:** Funktionsschema der einzelnen Derivate von BMP2 [A-D] und GDF5 [E-G]. Bindungsaffinitäten von BMP2 [A], BMP2-L51P [B], BMP2-KD [C] und BMP2-PKD [D], sowie von GDF5 [E], GDF5-R57A [F] und GDF5-R57A-KD [G] zu ihren Rezeptoren BR-IA, BR-IB, ActR-IIB, ActR-II und BR-II werden durch die Breite der Pfeile abgestuft; x bedeutet, dass die Bindungsaffinität ausgeschaltet wurde.

### 3.3.3 Analyse der biologische Aktivitäten der BMP2- und GDF5-Derivate

Die beschriebenen Muteine wurden in verschiedenen assays zur Analyse der biologischen Aktivität untersucht. Durch den Alkalischen-Phosphatase(ALP)-assay konnten das unterschiedliche osteoinduktive Potential der Liganden getestet werden. Hierfür wurde die murine chondrogene Zelllinie ATDC5 verwendet. Die Zellen wurden mit einer Verdünnungsreihe eines jeden Derivats mit einer Ausgangskonzentration von 125 nM 72 h inkubiert. Abhängig von ihrer Konzentration und Aktivität induzieren die einzelnen Liganden die alkalische Phosphatase unterschiedlich stark und ermöglichen durch die Ermittlung des EC50-Werts eine Aktivitätsbestimmung. Um die EC50-Werte vergleichen zu können wurden die Dosis-Wirkungs-Kurven auf einen 100 % Wert bei einer Konzentration von 125 nM BMP2 genormt (Abb. 23).



**Abb. 23:** Analyse der biologischen Aktivitäten von BMP2 und den BMP2-Derivaten BMP2-KD, BMP2-PKD und BMP2-L51P, sowie von GDF5 und den GDF5-Derivaten GDF5-R57A und GDF5-R57A-KD durch die Messung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität. Die murine chondrogene Zelllinie ATDC5 wurde mit einer Verdünnungsreihe ausgehend von 125 nM der jeweiligen Derivate für 72 h stimuliert und dann die Aktivität der Alkalischen Phosphatase detektiert. Die EC<sub>50</sub> wurde mittels des Grafik-Programms *Prism* ermittelt. Die ALP-Aktivierung wurde bei einer Konzentration von 125 nM BMP2 auf 100 % gesetzt.

Die EC50-Werte der einzelnen Derivate sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

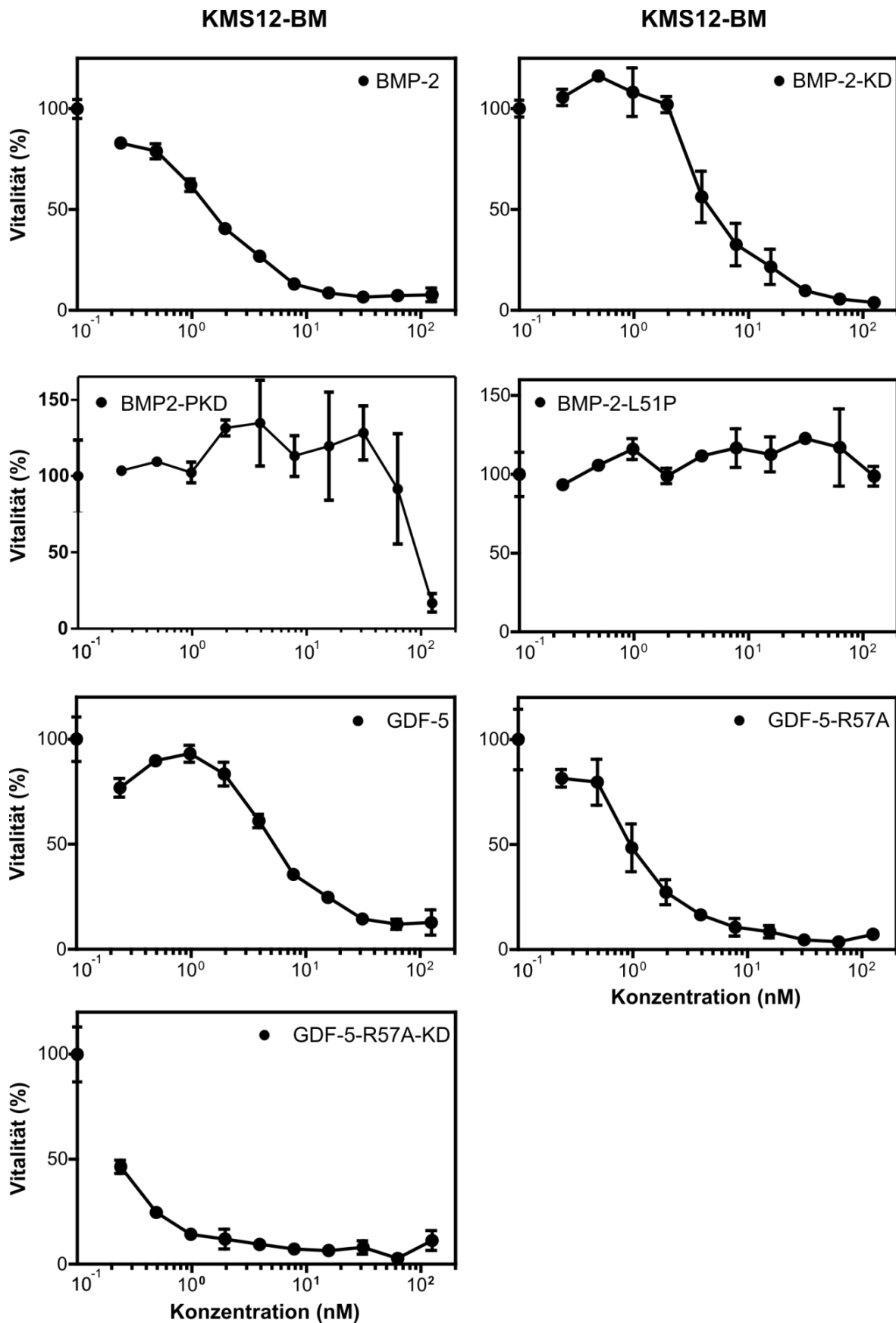
BMP2 besitzt in ATDC5 eine EC50 von ~18 nM; BMP2-KD dagegen hat mit einer EC50 von ~5 nM eine höhere biologische Aktivität, während BMP2-PKD (EC50 ~48 nM) wesentlich niedrigere biologische Aktivität aufweist, aber immer noch Restaktivität besitzt. Die Variante BMP2-L51P ist eine Totmutante ohne biologische Aktivität. GDF5 hat eine EC50 von ~31 nM, während die Derivate GDF5-R57A (EC50 ~6 nM) und GDF5-R57A-KD (EC50 ~1 nM) biologisch aktiver sind.

**Tab. 1:** Biologische Aktivität (EC50-Werte) von BMP2 und seinen Derivaten BMP2-KD, BMP2-PKD, BMP2-L51P, sowie von GDF5 und seinen Derivaten GDF5-R57A und GDF5-R57A-KD bei der murinen chondrogenen Zelllinie ATDC5. Die EC50 wurde mittels des Grafik-Programms *Prism* ermittelt.

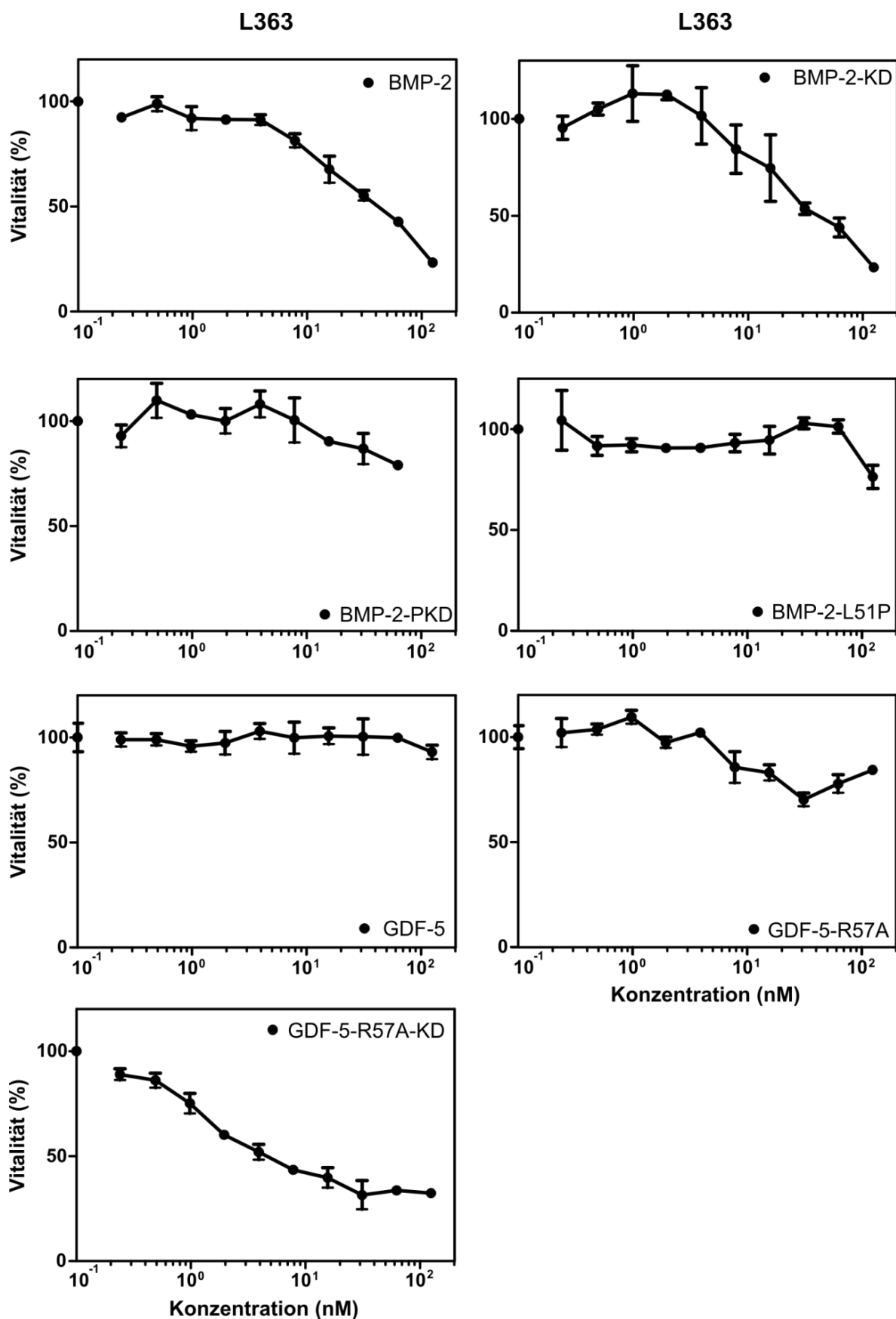
<b><u>BMP2- / GDF5 - Derivat</u></b>	<b><u>EC50 (ATDC5) [nM]</u></b>
BMP2	~ 18
BMP2-KD	~ 5
BMP2-PKD	~ 48
BMP2-L51P	-
GDF5	~ 31
GDF5-R57-A	~ 6
GDF5-R57-A-KD	~ 1

### 3.3.4 Analyse der Wirkung der Derivate von GDF5 und BMP2 in MM-Zellen

Das anti-proliferative Potential der Derivate von BMP2 und GDF5 in MM-Zellen wurde an den BMP responsiven Zelllinien KMS12-BM und L363 untersucht. Wie bei ATDC5 wurden hier analog Konzentrationsreihen mit BMP2, BMP2-KD, BMP2-PKD und BMP2-L51P, sowie GDF5, GDF5-R57A bzw. GDF5-R57A-KD ausgehend von 125 nM durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 96 h wurde das Experiment mit der WST1-Methode ausgewertet. Die einzelnen IC50-Werte sind in Tabelle 2 zusammengefasst.



**Abb. 24 A:** Vitalitätsmessung der Zelllinie KMS12-BM nach Stimulation mit verschiedenen Derivaten von BMP2 und GDF5 mittels der WST1-Methode. An KMS12-BM wurden Verdünnungsreihen von BMP2, BMP2-KD, BMP2-PKD und BMP2-L51P, sowie von GDF5, GDF5-R57A und GDF5-R57A-KD ausgehend von 125 nM über 96 h durchgeführt. Alle Kurven wurden auf einen 100 %-Wert bei je 0 nM Derivat genormt.



**Abb. 24 B:** Vitalitätsmessung der Zelllinie L363 nach Stimulation verschiedener Derivate von BMP2 und GDF5 mittels der WST1-Methode. An L363 wurden Verdünnungsreihen von BMP2, BMP2-KD, BMP2-PKD und BMP2-L51P, sowie von GDF5, GDF5-R57A und GDF5-R57A-KD ausgehend von 125 nM über 96 h durchgeführt. Alle Kurven wurden auf einen 100 %-Wert bei je 0 nM Derivat genormt.

Die humane MM-Zelllinie KMS12-BM reagierte auf BMP2 (IC<sub>50</sub> ~1 nM) vitalitätssenkend (Abb. 24 A). Der Superagonist BMP2-KD besitzt aufgrund der höheren Affinität zu den Typ-II Rezeptoren zwar eine erhöhte biologische Aktivität, wirkt jedoch in KMS12-BM mit IC<sub>50</sub> ~4 nM leicht schlechter. Die Mutante BMP2-PKD zeigt Restaktivität, wobei allerdings erst bei höheren Konzentrationen (ca. >70nM) anti-proliferatives Verhalten zu erkennen ist. BMP2-L51P ist eine Totmutante, die keine Rezeptor Typ-I-Bindung und damit keine anti-proliferative Wirkung zeigt. GDF5 zeigte ebenfalls anti-proliferative Wirkung auf die Zelllinie KMS12-BM mit einer IC<sub>50</sub> von ~5 nM. Ihre Derivate GDF5-R57A (IC<sub>50</sub> ~1 nM) und GDF5-R57A-KD (IC<sub>50</sub> ~0,2 nM) wiesen vielfach erhöhte biologische Aktivitäten in KMS12-BM auf (Tab. 2).

Die humane MM-Zelllinie L363 brachte bei Stimulation mit BMP2 und dessen Derivaten ähnliche Resultate wie die Zelllinie KMS12-BM hervor (Abb. 24 B). Allerdings war hier BMP2-KD als Superagonist etwas wirksamer. Somit wirkte BMP2-KD (IC<sub>50</sub> ~20 nM) bereits bei geringeren Konzentrationen als BMP2 (IC<sub>50</sub> ~23), während BMP2-L51P kein anti-proliferatives Verhalten auslöste. Bei BMP2-PKD waren höhere Konzentrationen (ca. >70 nM) nötig, um ein die Restaktivität zu sehen. Die Stimulation mit GDF5 erbrachte jedoch bei L363 im Gegensatz zu KMS12-BM keine vitalitätssenkende Wirkung. Das Derivat GDF5-R57A löste nur eine geringe Reduktion des Wachstums aus. GDF5-R57A-KD dagegen war bei L363 mit einer IC<sub>50</sub> von ~2 nM das Derivat mit der größten biologischen Aktivität (Tab. 2).

**Tab. 2:** Antiproliferatives Potential (IC<sub>50</sub>-Werte) von BMP2 und seinen Derivaten BMP2-KD, BMP2-PKD, BMP2-L51P, sowie von GDF5 und seinen Derivaten GDF5-R57A und GDF5-R57A-KD der humanen MM-Zelllinie KMS12-BM und der der humanen MM-Zelllinie L363. Die IC<sub>50</sub> wurde mittels des Grafik-Programms *Prism* ermittelt.

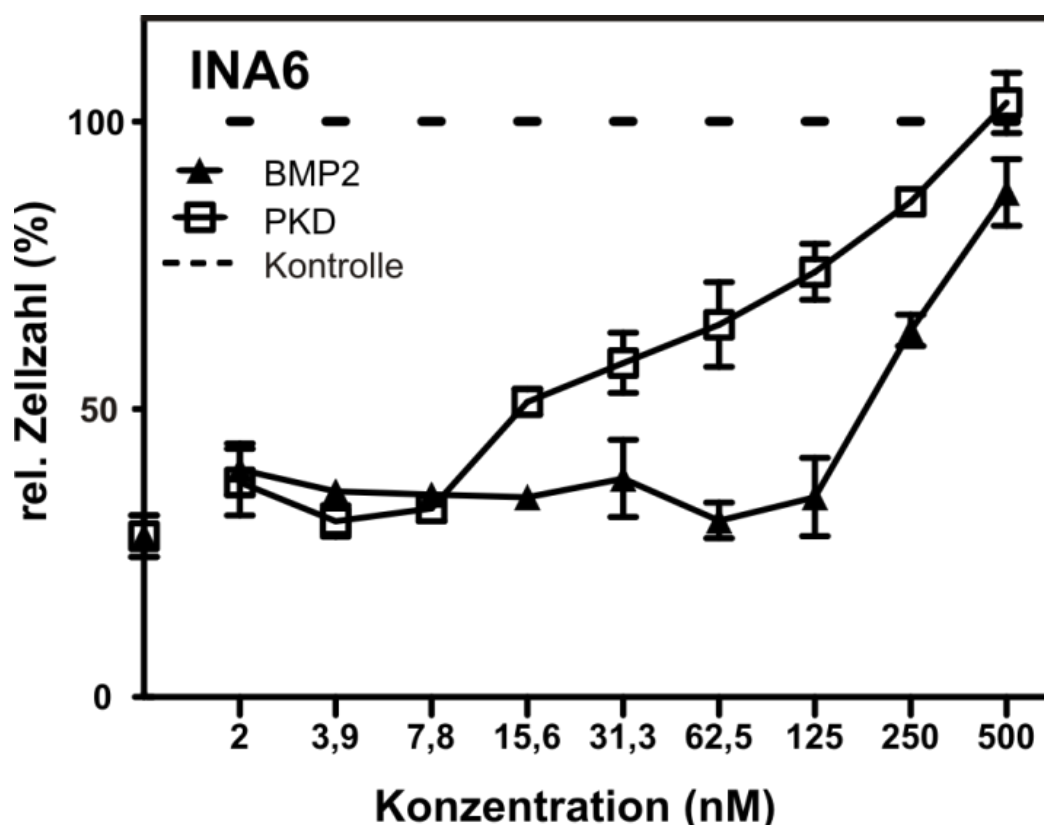
<b>BMP2-/GDF5 - Derivat</b>	<b>IC<sub>50</sub> (KMS12-BM) [nM]</b>	<b>IC<sub>50</sub> (L363) [nM]</b>
BMP2	~ 1	~ 23
BMP2-KD	~ 4	~ 20
BMP2-PKD	-	-
BMP2-L51P	-	-
GDF5	~ 5	-
GDF5-R57-A	~ 1	-
GDF5-R57-A-KD	~ 0,2	~ 2

Abschließend wurde der Einsatz der BMP2 Muteine als Aktivin-A-Antagonisten an der humanen MM-Zelllinie INA6 getestet. Aktivin-A weist einen zytotoxischen Effekt auf Interleukin-6(IL6)-wachstumsabhängige Myelom-Zelllinien auf (Nishihara et al., 1993), wie auch INA6 eine ist. Es wurde bereits gezeigt, dass INA6-Zellen BMP4-insensitiv sind (Ro et al., 2004), was auch hier in dieser Arbeit für BMP2 bestätigt werden konnte. Von Vorteil für

den Nachweis des Antagonismus auf molekularer Ebene ist, dass bei INA6 die für ein BMP2-*signaling* nötigen Typ-I Rezeptoren fehlen, jedoch die Typ-II Rezeptoren ActR-II und ActRII-B, an welche auch Aktivin-A bindet, exprimiert sind.

Stellvertretend wurden die beiden Varianten BMP2 und BMP2-PKD in der Zelllinie INA6 getestet (Daten zu Verfügung gestellt von Dr. A. Seher). Dazu wurden die Zellen konstant mit 10 nM Aktivin-A und unterschiedlichen Konzentration der beiden Liganden BMP2 und BMP2-PKD bis zu 500 nM für 96 h inkubiert (Abb. 25).

Hierbei war deutlich zu erkennen, dass in Abwesenheit von BMP2/BMP2-PKD und einer konstanten Konzentration von 10 nM Aktivin-A die relative Zellzahl der INA6-Zellen um bis zu ca. 75 % sank. Bei steigenden BMP2/BMP2-PKD Konzentrationen wurde jedoch die zytotoxische Wirkung von Aktivin-A aufgehoben. Die IC<sub>50</sub> zeigte die halb-maximale Inhibitoraktivität und lag für Wildtyp-BMP2 bei 250 nM. BMP2-PKD war mit einer IC<sub>50</sub> von 62,5 nM sogar ein 4fach stärkerer Antagonist als Wildtyp-BMP2. Mit einer Konzentration von 500 nM ließ sie sich bei BMP2-PKD der vitalitätssenkende Effekt von Aktivin A sogar fast vollständig aufheben. Demnach können also BMP2 und seine Muteine auf molekularer Rezeptor-Ebene als Antagonisten zu Aktivin A wirken.



**Abb. 25:** Antagonismus von Aktivin-A und BMP2 bzw. BMP2-PKD. Die IL6-wachstumsabhängige MM-Zelllinie INA6 wurde über die gesamte Versuchsdauer von 96 h mit einer konstanten Konzentration von 10 nM Aktivin-A inkubiert. Von BMP2 bzw. BMP2-PKD wurden Verdünnungsreihen ausgehend von 500 nM angelegt. Aktivin-A führt zu einer Abnahme der Zellvitalität, während BMP2 und BMP2-PKD dies antagonisieren. Der Wert auf der Ordinate zeigt die rel. Zellzahl ohne BMP2 bzw. BMP2-PKD, aber mit 10nM Aktivin A.

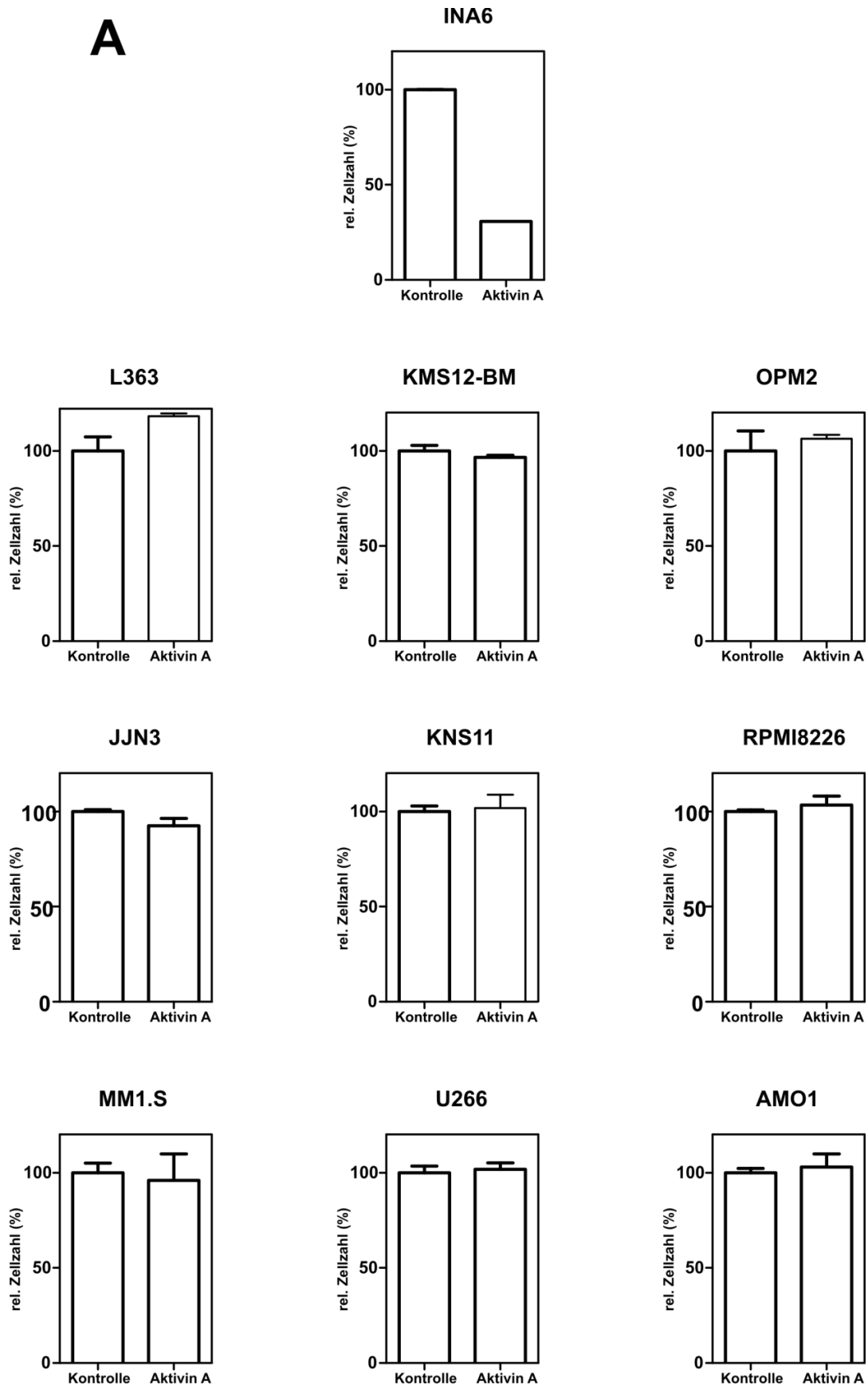
### 3.3.5 Aktivin-A-Wirkung auf MM-Zellen

BMP2 besitzt eine antagonistische Wirkung gegenüber Aktivin-A und könnte somit, wie zuvor beschrieben, potentiell als Medikament für das MM fungieren. Allerdings muss noch untersucht werden, inwieweit Aktivin-A selbst eine anti-proliferative Wirkung auf Zellen des Multiplen Myeloms besitzt. In der Literatur wurde beschrieben, dass Aktivin-A wie BMP2 eine zytotoxische Wirkung auf neoplastische Zellen des Multiplen Myeloms ausübt. Der Einsatz von BMP2 als Aktivin-A-Antagonist könnte also kontraproduktiv sein. Aus diesem Grund wurde in allen 10 genannten humanen Zelllinien des Multiplen Myeloms Aktivin A auf seine anti-proliferative Eigenschaft hin analysiert.

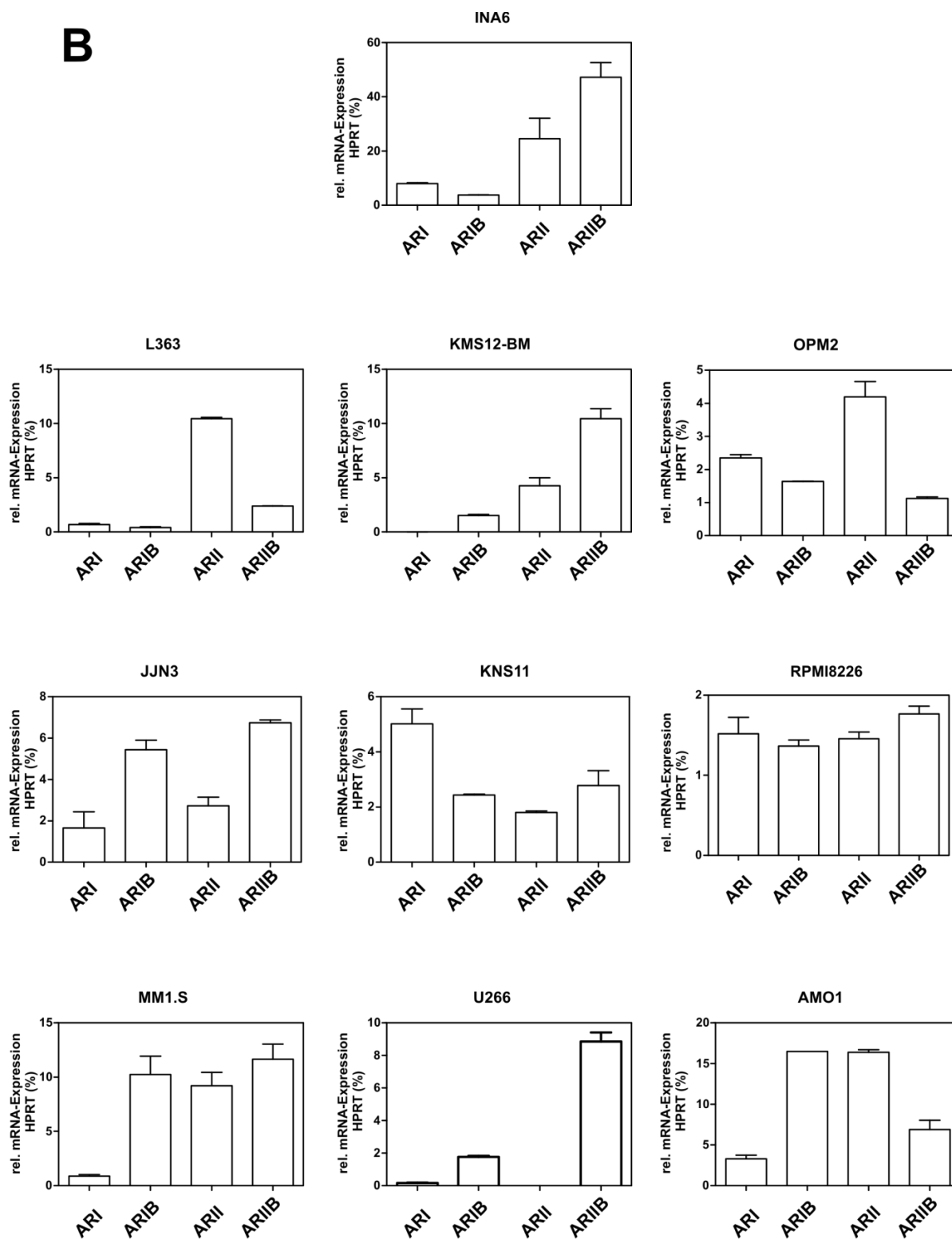
Die 10 humanen MM-Zelllinien wurden mit 125 nM Aktivin-A über 72 h inkubiert und anschließend mit der WST1-Methode analysiert. Hierbei wurde gezeigt, dass Aktivin-A im Gegensatz zu BMP2 bei 9/10 der humanen MM-Zelllinien keinen signifikanten Einfluss auf ihre Proliferation hat. Eine Ausnahme war die Interleukin 6-abhängige Zelllinie INA6, die durch Aktivin-A eine um ca. 70 % verringerte Vitalität zeigte (Abb. 26 A).

Eine Analyse des Rezeptorexpressionsprofils der genannten Zelllinien über qRT-PCR ergab keinen konkreten Hinweis für die Ursache der fehlenden Aktivin-A-Responsivität. Denn wie bei INA6 waren die zum Aktivin-A-*signaling* notwendigen Rezeptoren AR-I, AR-IB, AR-II und AR-IIB in allen Zelllinien ausreichend vorhanden (Abb. 26 B).





**Abb. 26 A:** Wirkung von Aktivin-A auf 10 humane multiple Myelomzelllinien; Die MM-Zelllinien wurden mit oder ohne 125 nM Aktivin-A inkubiert und nach 72 h die Zellproliferation durch WST1-Messungen beurteilt. Alle Zelllinien außer INA6 sind Aktivin-A-resistent.



**Abb. 26 B:** Expressionsprofil der Aktivin-A-Rezeptoren in MM-Zelllinien. RNA wurde aus den zehn angegebenen humanen MM-Zelllinien isoliert und das Expressionsniveau der Aktivin-A Rezeptoren AR-I, AR-IB, AR-II und AR-IIB durch qRT-PCR bestimmt. Die Expressionsniveaus wurden auf das Standard-Gen HPRT (= 100%) genormt.

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit brachte die Analyse von BMP2 im Kontext des Multiplen Myeloms insgesamt 3 grundlegende Ergebnisse hervor:

- 1) Entgegen den bisher publizierten Ergebnissen hat BMP2 in den untersuchten Zelllinien KMS12-BM und L363 keine apoptotische, sondern eine anti-proliferative Wirkung.
- 2) Die BMP2-Responsivität ist nicht nur von dem zur Verfügung stehenden Rezeptor-Setup abhängig, sondern auch die Expression der BMP-Inhibitoren Smad-6 und Smad-7 scheint eine entscheidende Relevanz zu haben.
- 3) Die generierten BMP2- und GDF5-Derivate unterscheiden sich maßgeblich in ihrer biologischen Aktivität und könnten potentiell als therapeutisches Agens sowohl als Aktivin-A-Antagonist, als auch auf Grund ihrer biologischen Eigenschaften in Form des osteoinduktiven Effekts und anti-proliferativen Potentials auf neoplastische B-Zellen im MM einsetzbar sein.

### 4.1 BMP2 wirkt nicht apoptotisch, sondern anti-proliferativ in MM-Zellen

Die Apoptose ist grundlegend ein wichtiger biologischer Prozess, der z.B. eine bedeutende Funktion in der Entwicklung von Gliedmaßen (Montero and Hurle, 2010) oder in der negative Selektion von Lymphozyten (Feig and Peter, 2007) hat. Darüber hinaus spielt die Apoptose eine wichtige Rolle bei der täglichen Beseitigung von potentiell malignen Vorstufen oder bereits malignen Zellen, um die Integrität des Organismus aufrechtzuerhalten. Es gibt zwei besondere Merkmale des programmierten Zelltodes: Er ist schnell und effizient. Todesliganden der TNF-Familie, wie FasL-Fc oder TRAIL, initiieren die Apoptose und töten die Zelle nach nur wenigen Stunden (Wajant, 2002, Trebing et al., 2014). Die genauen Apoptosemechanismen, welche BMP2 in MM-Zellen auslöst, sind in der Vergangenheit noch nicht genauer untersucht worden, weshalb in dieser Arbeit die BMP2-induzierte Apoptose in 2 unterschiedlichen humanen MM-Zelllinien (KMS12-BM, L363) analysiert wurde.

Dazu wurden Proliferationsanalysen mittels WST1-assays durchgeführt, wie sie in der Literatur bereits beschrieben waren. Insgesamt wurden die Zellen nach 24, 48, 72 und 96-stündiger BMP2-Stimulation untersucht. Die Proben wurden gleich lang mit WST1 inkubiert, um einen Vergleich der einzelnen Zeitmessungen zu ermöglichen. Hier fiel erstmals auf, dass nach 48 h die relative Zellzahl bei den BMP2 stimulierten Zellen zwar geringer im Vergleich zu der jeweiligen zeitgleichen Kontrolle war, aber im Vergleich zu dem Ausgangswert die Gesamtzellzahl nach 48, 72 und 96 h nicht abnahm, sondern eher konstant blieb (Abb. 9). Da die WST1 Methode nur eine relative Zellzählung erlaubt, die

aufgrund der Messung der Stoffwechselaktivität in Form von Reduktionäquivalenten beruht, muss diese nicht zwangsläufig die absolute Zellzahl widerspiegeln, sondern kann auch nur eine erhöhte oder gesenkte Stoffwechselaktivität reflektieren (Abb. 9 A). Aus diesem Grund wurde die Zellzählung mit Hilfe eines *Coulter Counters* durchgeführt, der sowohl die absolute Zellzahlbestimmung als auch eine Vitalitätsbestimmung durch Messung der Impedanz einer einzelnen Zelle ermöglicht. Der experimentelle Aufbau entsprach den WST1-Versuchsreihen. Auch hier konnte man sehen, dass die Proliferation durch BMP2 im Vergleich zum Ausgangswert (0 h) eingeschränkt wird, jedoch die absolute Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle nicht ab-, sondern sogar noch leicht zunahm (Abb. 9B). Da diese Ergebnisse im Widerspruch zu den bisher publizierten Ergebnissen stehen, wurden im nächsten Schritt die Zellen mikroskopisch betrachtet (Abb. 10). In unseren lichtmikroskopischen Aufnahmen waren deutliche Unterschiede zwischen der Inkubation der MM-Zellen mit BMP2 und dem Todesliganden FasL-Fc zu sehen. Während die Zellen bei FasL-Fc eine zerstörte Zellmorphologie aufwiesen, waren die BMP2-stimulierten Zellen von vitaler Morphologie. Diese Ergebnisse standen im Widerspruch mit denen von Kawamura et al. 2002, welche hingegen eine für Apoptose typische morphologische Erscheinung der Zellen mit kondensiertem Chromatin und fragmentierten Nuklei mit Apoptosekörperchen zeigten (Kawamura et al., 2002). Die vorliegenden Resultate zeigten jedoch auch bei den Apoptose- und Nekroptose-Inhibitoren zVAD-fmk und Necrostatin-1 keinen Hinweis auf Apoptose (Abb. 13). In der Literatur wird zwar von einem apoptotischen Effekt von BMPs gesprochen, dennoch schließt keiner der Autoren die Möglichkeit der Nekroptose oder einen anderen Signalweg bzw. eine reine Antiproliferation durch BMP2 aus. Deshalb wurden die Apoptose und Nekroptose durch den spezifischen Apoptoseinhibitor zVAD-fmk und den spezifischen Nekroptoseinhibitor Necrostatin-1 differenziert analysiert. Die Analysen der absoluten Zellzahl von MM-Zellen mittels des *Coulter Counters*, welche parallel mit zVAD-fmk, Necrostatin-1 und BMP2, sowie in Kombination behandelt worden waren, zeigten keinen Rettungseffekt durch die Faktoren zVAD-fmk und Necrostatin-1. Dies könnte ein weiterer Beleg dafür sein, dass BMP2 kein apoptotischer sondern ein rein anti-proliferativer Faktor für MM-Zellen darstellt. Des Weiteren konnte in Westernblots nach BMP2-Stimulation keine signifikante Aktivierung der Caspase-3 und -8 in den MM-Zellen detektiert werden (Abb. 14+15). Dies führt zu der Annahme, dass BMP2 Caspase-3/8 nur marginal im Vergleich zu FasL-Fc aktiviert und somit nahezu keine Apoptose auslöst. Darüber hinaus zeigten FACS-Analysen lediglich eine sinkende Zellteilungsrate der humanen MM-Zelllinien L363 und KMS12-BM durch BMP2, aber kaum einen Anstieg der apoptotischen Zellen (Abb. 16). Summa summarum lassen die Ergebnisse den Rückschluss zu, dass BMP2 in den verwendeten Zelllinien keine Apoptose induziert. Hier stellt sich die Frage, warum in mehreren Veröffentlichungen Mitglieder der Bone Morphogenetic Proteins als Apoptose

induzierende Liganden in MM-Zellen oder B-Zell-Hybridomzellen benannt werden (Fukuda et al., 2006, Kawamura et al., 2002, Kawamura et al., 2000, Ro et al., 2004, Olsen et al., 2014, Holien et al., 2012, Norgaard et al., 2010, Hjertner et al., 2001). Dazu gibt es zwei grundlegende Annahmen:

1. Die Kontrollen und die BMP stimulierten Proben wurden bis auf eine Ausnahme (Fukuda et al. 2006) in der Literatur nie *side by side* mit einem Apoptose induzierenden Faktor wie TRAIL oder FasL verglichen.
2. BMPs sind wahrscheinlich keine direkten apoptotischen Faktoren, sondern die gestiegene Zahl an apoptotischen Zellen ist ein Randprodukt der Zellarretierung. Das bedeutet, dass zwar ein Teil der Zellen in die Apoptose geht, allerdings während der Arretierung des Zellzyklus durch Kontrollmechanismen.

Einige Ergebnisse der genannten Studien zeigten, dass die Vitalität der MM-Zellen nach BMP-Stimulation in MTT-Vitalitäts-assays abnimmt (Kawamura et al., 2000, Fukuda et al., 2006). Jedoch wurde hier nicht die absolute Zellzahl bestimmt, weshalb daher nicht genau bestimmt werden kann, ob die Zellen hier in Apoptose gegangen waren und ihre absolute Zellzahl damit abgenommen hatte oder ob, wie in dargestellten Ergebnissen, lediglich die Stoffwechselaktivität und damit die relative Zellzahl abnahm. Andere Apoptose-Nachweise erfolgten über einen [3H]-Thymidin-Einbau (Hjertner et al., 2001, Ro et al., 2004), den spezifischen Abbau von DNA (Kawamura et al., 2000, Fukuda et al., 2006) und die Zelloberflächenexpression von Annexin-V (Hjertner et al., 2001, Fukuda et al., 2006, Holien et al., 2012, Olsen et al., 2014). Letztere in den Veröffentlichungen mehrmals durchgeführte Methode (Annexin-V-Färbung) ist besonders kritisch zu betrachten. Entscheidend sind in diesen Experimenten die Inkubationszeiten nach denen die Messungen durchgeführt wurden. Annexin-V ist ein Markerprotein der frühapoptotischen Phase. Zu späteren Zeitpunkten, wenn bei nekrotisch, nekroptotisch oder autophagisch vermitteltem Zelltod die Zellmembranen nicht mehr intakt sind, können auch hier positive Annexin-V Färbungen gezeigt werden (Sawai and Domae, 2011). Der Nachweis von Annexin-V erfolgte jedoch erst nach 36 h (Fukuda et al., 2006) oder 72 h (Hjertner et al., 2001, Holien et al., 2012, Olsen et al., 2014). Dies bedeutet, dass Annexin-V wahrscheinlich nicht in einer Phase der Apoptose, sondern erst später durch die fehlende Integrität der Zellmembran nachgewiesen wurde. Dies wäre auch mit der vorher genannten 2. Annahme kompatibel; nämlich, dass BMPs den Zellzyklus arretieren und erst später der Zelltod durch Kontrollmechanismen ausgelöst wird. Generell waren für einen sichtbaren „apoptotischen“ Effekt sehr lange Inkubationszeiten notwendig. Z.B. musste Hjertner et al. für den Apoptosetest FITC-Annexin-V u.a. die humanen MM-Zelllinien OH2 für 72 h mit BMP-4 inkubieren. Kawamura et al. inkubierten die Zellen in ihren Proliferationsassays für 48 h mit BMP2 und Holien et. al setzten die MM-Zellen bei ihren Studien zur Herunterregulierung von MYC ebenfalls 72 h den Zytokinen

BMP4 und BMP6 aus. Auch in den eigenen Studien war erst nach 96 h der größtmögliche anti-proliferative Effekt von BMP2 zu sehen (Abb. 9A). Diese langen Zeitintervalle zwischen Stimulation und Effekt sind eher untypisch für extrinsische apoptotische Faktoren. Wenn man z.B. Jurkat-Zellen mit dem Apoptose-induzierenden FasL-Fc inkubiert, wird der extrinsische Signalweg der Apoptose initiiert, wobei sich nach drei Stunden eindeutig eine Caspase-8- und nach sieben Stunden die Caspase-3- und -7-Aktivität nachweisen lässt (Aguirre et al., 2013). In dieser Arbeit zeigte der direkte Vergleich zwischen FasL-Fc und BMP2 eindeutig, dass Caspase-3 und Caspase-8 bei FasL-Fc bereits schon deutlich nach 6 h aktiviert waren, jedoch bei BMP2 selbst nach einer 72-stündigen Stimulation kaum Aktivität aufwies (Abb. 14 + 15). In der Literatur wurde jedoch, wie schon erwähnt, nie ein klassischer apoptotischer Faktor wie FasL-Fc oder TRAIL zum Vergleich herangezogen. Einzig Fukuda et al. setzte Todesliganden als Positivkontrolle ein. Diese waren jedoch TNF $\alpha$  + CHX (Fukuda et al., 2006), welche im Gegensatz zu FasL-Fc nicht nur Apoptose induzieren können (Sheikh and Fornace, 2000) (Einleitung Kap. 3.1.4.1).

Einen minimalen Anstieg an apoptotischen Zellen konnten wir in FACS-Analysen beobachten. Der Anteil der Zelldebris nach BMP2 Stimulation erhöhte sich in den FACS-Messung. Allerdings war diese nur gering und wahrscheinlich durch die Arretierung der Zellen und Kontrollmechanismen begründet. Die kleineren Anzeichen einer Apoptose, die in BMP-behandelten MM-Zellen nachgewiesen werden konnten, können sekundär aus dem gut dokumentierten BMP-induzierten Zellzyklus-Arrest resultieren (Olsen et al., 2014, Kawamura et al., 2000, Hjertner et al., 2001), da z.B. der klassische p53-abhängige Kontrollmechanismus zum Zelltod führt (Hollen et al., 2012, Haupt et al., 2003). P53 übt hierbei seine tumorsuppressive Wirkung v.a. über die Arretierung des Zellzyklus (z.B. über p21) und die Einleitung der Apoptose (über proapoptotische Proteine wie z.B. Bax) aus (Hager and Gu, 2014) und wurde bereits im Zusammenhang mit BMPs näher untersucht (Pardali et al., 2005, Ishisaki et al., 1999, Kawamura et al., 2002). Für BMP7 wurde u.a. in der humanen Keratinozyten-Zelllinie HaCaT gezeigt, dass es zu einer p21 Expression führt, jedoch die p21 nicht stark genug für eine Zellwachstumsinhibition ist (Pardali et al., 2005). In B-Zell-Hybridom Zellen HS-72C5 ergab die Stimulation mit BMP2 auch eine Zunahme der p21 Expression nach 6 Stunden (Ishisaki et al., 1999). Kawamura et al. konnten in U266-Zellen, welche mit BMP2 behandelt wurden eine Hochregulierung der Proteine p21 und p27, sowie eine Hypophosphorylierung des CDK-Inhibitors Rb erkennen. Darüber hinaus konnte zwar eine Herunterregulierung des anti-apoptotischen Bcl-X<sub>L</sub> durch BMP2 nachgewiesen werden, jedoch keine Hochregulierung der proapoptotischen Faktoren Bax und Bad (Kawamura et al., 2002). Diese Resultate sprechen eher für eine anti-proliferative Wirkung von BMPs auf MM-Zellen als für eine apoptotische. p53 ist einer der wichtigsten Tumorsuppressoren und wird auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, da dieser

Transkriptionsfaktor maßgeblich an DNA-Reparatur, Induktion der Apoptose und Regulation des Zellzyklus beteiligt ist (Lane, 1992). In ca. 50% aller Krebserkrankungen treten Mutationen von p53 auf (Vogelstein et al., 2000, Muller and Vousden, 2013). Obwohl in hämatologischen Malignitäten p53-Mutationen und –Deletionen seltener sind als in soliden Tumoren, wurden sie jedoch bereits beim Burkitt-Lymphom, bei der chronisch myeloischen Leukämie (CML), adulter T-Zell Leukämie (ATL), B-Zell prolymphozytischen Leukämie sowie der chronischen Lymphatischen Leukämie (CLL) festgestellt (Wattel et al., 1994, Newcomb, 1995, Lens et al., 1997, Stirewalt et al., 2001, Lionetti et al., 2016). TP53-Mutationen sind auch v.a. in fortgeschrittenen Stadien des Multiplen Myeloms zu finden (Xu-Monette et al., 2012, Chng et al., 2007). Die Deletion der chromosomalen 17p13-Region, welche den TP53-Genlocus enthält, kommt in 10 % der MM-Neuerkrankungen vor und geht mit einer schlechten Prognose, selbst nach extramedullärer Stammzelltransplantation (Chang et al., 2005) und Bortezomibgabe (Rosinol et al., 2012), einher (Drach et al., 1998, Gutierrez et al., 2007, Fonseca et al., 2003, Chen et al., 2012, Gertz et al., 2005, Jimenez-Zepeda et al., 2011). Ebenfalls wird diese Mutation mit Chemotherapie-Resistenz und frühem extramedullärem Auftreten beim MM assoziiert (Jimenez-Zepeda et al., 2011, Elnenaei et al., 2003, Deng et al., 2015, Lopez-Anglada et al., 2010, Merz et al., 2016, Mangiacavalli et al., 2013). Ein negativer Regulator von p53 ist MDM2 (*murine double minute 2*) (Jones et al., 1998). Dieser ist in zahlreichen Krebsarten, wie auch im MM hochreguliert (Oliner et al., 2016). Außerdem ist bekannt, dass die Inhibition von MDM2 im Multiplen Myelom die Apoptose der Krebszellen triggert (Teoh et al., 1997). Das lässt vermuten, dass auch BMP2 in MDM2-hochregulierten MM-Zellen die Apoptose schlechter initiieren könnte. Des Weiteren wurde über Deregulationen von p53 durch epigenetische Modifikationen z.B. über DNA-Methylierung (Teoh et al., 2014, Hurt et al., 2006) und funktionell deregulierten MicroRNAs (Ahmad et al., 2014, Amodio et al., 2013, Tagliaferri et al., 2012, Raimondi et al., 2016) im MM berichtet. All diese Dysfunktionen von p53 im MM könnten eng mit der Signaltransduktion von BMPs verknüpft sein. Für die TGF- $\beta$ -Superfamilie wurde gezeigt, dass mutiertes p53 den TGF- $\beta$ -*pathway* inhibieren kann, indem es die Expression des TGF- $\beta$ -Typ-II Rezeptor hemmt (Kalo et al., 2007). In Bezug auf diese Arbeit wäre es interessant weiter zu untersuchen, ob die fehlenden Typ-I Rezeptoren der nicht-responsiven MM-Zellen auch in Zusammenhang mit p53 stehen. Außerdem zeigten Adorno et al., dass die TGF- $\beta$ -abhängige Migration, Invasion und Metastasierung von Krebszellen durch einen Komplex aus mutiertem p53, phospho-Smad-2 und p63 forciert ist (Adorno et al., 2009). Die gezeigten Fehlfunktionen von p53 im MM, sowie ihr Zusammenhang mit BMPs bzw. der TGF- $\beta$ -Signaltransduktion erweisen sich als gute Ansätze für weitere Studien.

Unsere zwei Hauptargumente, die gegen eine apoptotische Wirkung von BMP2 sprechen sind zum einen das Ausbleiben der Aktivierung der Caspasen-3 und -8 im Vergleich zu FasL-

Fc, sowie das „Versagen“ von zVAD-fmk und Necrostatin-1 als Rettungsfaktoren vor programmiertem Zelltod bei nachgewiesener Funktionalität der Stoffe.

Die meisten Autoren haben eher eine Aktivierung der Anti-proliferation nachgewiesen. Was den Anstieg der apoptotischen Zellen betrifft, waren die Annexin-V Messungen, welche nur einen Anstieg von 7,2 auf 22,4 % der apoptotischen Zellen ergaben, mit den Ergebnissen dieser Arbeit im Einklang. Außerdem fand in der Literatur die Aktivierung der Caspasen erst nach 24 h statt (Fukuda et al., 2006). Dies führt zu der Annahme, dass hier die intrinsische Aktivierung der Apoptose stattfand und BMP4 die Zellen nur arretierte und ein Teil dieser dann in Apoptose ging. Auch dies würde sich mit den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit decken.

Unter all diesen Gesichtspunkten ist es kritisch zu überdenken, ob in der Vergangenheit tatsächlich Apoptose nachgewiesen wurde oder ob Anti-proliferation als Apoptose postuliert wurde. Die eigenen Ergebnisse legen letzteres zwar nahe, bleiben jedoch durch weitere Experimente, wie z.B. Zellzyklusanalysen, zu verifizieren.

## 4.2 Responsiv vs. Non-Responsiv

Zu Beginn der Studie wurde bereits festgestellt, dass nur drei der zehn getesteten humanen MM-Zelllinien, nämlich KMS12-BM, L363 und OPM2, auf BMP2 und GDF5 reagieren (Abb. 5). Durch eine qRT-PCR, die den BMP-Rezeptorbesatz der Zelllinien auf RNA-Ebene evaluierte, konnte gezeigt werden, dass die Zellen grundsätzlich in drei Gruppen gegliedert werden können (Abb. 17). Erstens in eine BMP2-responsive Gruppe, die die notwendigen Rezeptoren besitzt. Zweitens in eine BMP2 nicht responsive Gruppe (INA6, RPMI8226 und JJN3), denen zumindest einer der notwendigen Rezeptoren fehlte und drittens in eine Gruppe nicht responsiver Zellen (MM1.S, AMO1, U226 und KMS11), bei denen auf RNA-Ebene die notwendigen Rezeptoren für die Signaltransduktion vorhanden sind. Mutationen in den Rezeptoren konnten in Kooperation mit der AG Rosenwald durch ein früher durchgeführtes Genom-Screening zumindest für die Zelllinien (JJN3, AMO1, U266, OPM2, L363) ausgeschlossen werden (Leich et al., 2013). Um die Nicht-Responsivität der dritten Gruppe genauer zu analysieren, wurde die Signaltransduktion durch die intrazelluläre Phosphorylierung der R-Smads nach BMP2-Stimulation per Westernblot bei allen 10 MM-Zelllinien untersucht (Abb. 18). In der BMP2-responsiven Gruppe konnte eine eindeutige Phosphorylierung des R-Smad nachgewiesen werden. In der zweiten, der Rezeptor-defizienten Gruppe, war entsprechend kein Signal nachweisbar. Ein differenziertes Bild ergab sich für die dritte Gruppe, die nicht BMP2-responsiv war, aber die notwendigen Rezeptoren auf RNA-Ebene exprimiert. Während in den Zelllinien AMO1 und MM1.S keine BMP2-induzierbare Phosphorylierung von R-Smads nachweisbar war, war in den Zelllinien KMS11 und U266 ein BMP2-induziertes Signal detektierbar, welches aber schwächer ausfiel im Vergleich zur Positivkontrolle.



Da die An- bzw. Abwesenheit diverser BMP2-Rezeptoren nicht für alle Zellen eine ausreichende Erklärung für die Responsivität bzw. Nicht-Responsivität darstellte, wurde die Expression der inhibitorischen Smads (I-Smads) sowohl auf Protein-, als auch auf RNA-Ebene ohne BMP2-Stimulation evaluiert (Abb. 19). Es wurde bereits publiziert, dass die inhibitorischen Smads Einfluss auf die BMP-Responsivität haben können (Itoh et al., 1998, Ishisaki et al., 1999, Miyazawa et al., 2002). Hier wurde durch die ektopische Expression von Smad-6 und Smad-7 in einer murinen B-Zelllinie (HS-72) aufgezeigt, dass Smad-7 beide, Smad-6 allerdings nur den von z.B. BMP2-induzierten Smad-1/5/8-*pathway* inhibieren kann (Ishisaki et al., 1999). In vorliegender Arbeit wurde zum ersten Mal jedoch die Basisexpression der beiden inhibitorischen Smads in unterschiedlichen humanen Zelllinien des Multiplen Myeloms aufgezeigt (Abb. 19). Bei Smad-7 war deutlich zu sehen, dass alle BMP2-nicht-responsiven Zelllinien (RPMI8226, JLN3, AMO1, U266, MM.1S, KMS11) mit Ausnahme der INA6 eine Smad-7 Proteinbasisexpression haben. Eine gute Erklärung für die fehlende BMP2-Signaltransduktion nicht-responsiver Zelllinien (KMS11, AMO1, MM.1S und U266) trotz vorhandener Rezeptoren, sind die auffällig hohen Werte an inhibitorischem Smad-7. Bei der Überprüfung der Smad-6 Proteinexpression erkannte man ein zu Smad-7 exakt gegenläufiges Expressionsmuster. Bei den BMP2-nicht-responsiven Zelllinien war die Smad-6-Expression mit Ausnahme von INA6 nicht vorhanden, bei responsiven jedoch hoch. Mehrfach ist beschrieben, dass Smad-7 beide Smad-Signaltransduktionswege inhibieren kann, während Smad-6 sich auf die Blockierung des BMP-Signalwegs (Smad-1/5/8) „spezialisiert“ (Ishisaki et al., 1999, Itoh et al., 1998, Miyazawa et al., 2002). Neu ist in diesem Zusammenhang jedoch, dass die Basisexpression von Smad-7 in den Zelllinien des MMs bereits über eine grundsätzlich mögliche BMP-Responsivität entscheidet. Besonders auffällig ist, dass die Smad-6 Expression genau gegensätzlich zur Smad-7 Expression ist. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob die beiden inhibitorischen Smads sich evtl. gegenseitig regulieren oder auf einander Einfluss nehmen können. Diese Fragestellung sollte durch die Überexpression bzw. den *knock-out* der beiden Proteinen und einer darauffolgenden Analyse der BMP-Responsivität weiter analysiert werden. Etwas kontrovers erscheinen auf den ersten Blick die Ergebnisse für die Zelllinie INA6. Dass diese Zelllinie trotz der fehlenden Smad-7-Expression BMP2-nicht-responsiv ist, kann einfach durch das Fehlen der notwendigen Rezeptoren BR-IA und BR-IB erklärt werden. Smad-6 hat laut Literatur in B-Zelllinien keinen inhibitorischen Einfluss auf den Smad-2/3-*pathway* und unterbindet so nicht die Aktivin-A Responsivität (Ishisaki. 1998 Zitat). Warum nur diese Zelle Aktivin-A responsiv ist, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Kontrovers zu diskutieren ist, dass die Smad-6 Expression nicht die BMP2-Responsivität bei KMS12-BM, L363 und OPM2 inhibiert. Allerdings ist ein möglicher Erklärungsansatz, dass in den Versuchen nur die Basisexpression analysiert worden ist. Es ist bereits publiziert, dass beide

inhibitorischen Smads nach Stimulation mit Mitgliedern der TGF- $\beta$ -Familie reguliert werden (Ishisaki et al. 1998). So könnte die Stimulation mit BMP2 in den Zellen zur Inhibition und Degradation von Smad-6 und damit zu einer anschließenden induzierten BMP2-Responsivität führen. Auch dieser Umstand sollte in weiterführenden Experimenten genauer analysiert werden.

Sowohl Smad-6 als auch Smad-7 können nachweislich den Zellzyklus und die Apoptose beeinflussen (Pardali et al., 2005, Ishisaki et al., 1999). Beide Proteine stehen in direktem Zusammenhang mit der bereits beschriebenen und diskutierten Tatsache, dass die in dieser Arbeit untersuchten nicht-responsiven Zelllinien grundsätzlich keine Apoptose nach BMP2-Stimulation aufzeigen. In Bezug auf den Zellzyklus wurde gezeigt, dass Smad-7 die p21 Induktion über alle Typ-I Rezeptoren inhibieren kann (Pardali et al., 2005). Eine Überexpression an Smad-6 und -7 in HS72-Zellen führt bei BMP2-Stimulation zu einer Inhibition des Zellzyklusarrestes und der Apoptose, bei Aktivin-A-Stimulation jedoch tut dies nur die Überexpression von Smad-7 (Ishisaki et al., 1999). Für Smad-6 konnte eine Inhibition der p21 Aktivierung an allen BMP-Typ-I Rezeptoren, jedoch nicht an TGF- $\beta$ /Aktivin-Typ-I Rezeptoren festgestellt werden (Pardali et al., 2005). Auch hier sollten weiterführende Experimente aufzeigen, wie die inhibitorischen Smad-6 und Smad-7 eventuell auf die Apoptose bzw. Anti-proliferation in den von uns untersuchten Zelllinien Einfluss nehmen.

### 4.3 Antagonismus von Aktivin-A

In den letzten Jahren hat sich Aktivin-A als höchst interessantes *Target* für die Behandlung des Multiplen Myeloms herausgestellt. Sowohl Tiermodelle als auch klinische Studien zeigten, dass die systemische Elimination von Aktivin-A, z.B. durch einen *decoy*-Rezeptor, eine vielversprechende Strategie sein könnte (Vallet et al., 2010, Raje and Vallet, 2010, Chantry et al., 2010). Aktivin-A übt seine inhibitorischen Eigenschaften sehr wahrscheinlich durch einen einfachen molekularen Mechanismus aus, indem es mit bestimmten Liganden der TGF- $\beta$ -Superfamilie, wie z.B. BMP2, um die Bindung an gemeinsamen Rezeptoren konkurriert. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass spezifisch designte BMP2-Varianten als potentiell therapeutisches Agens genutzt werden könnten, um Aktivin-A, dessen Level bei MM-Patienten erhöht ist (Terpos et al., 2012), entgegenzuwirken. Gezieltes *Molecular Design* brachte BMP2-Varianten hervor, welche entweder als superagonistische BMP2 und gleichzeitig als hocheffiziente Aktivin-A-Antagonisten agieren können (z.B. BMP2-KD) oder, wenn es gewünscht ist, nur eine superantagonistische Aktivität gegenüber Aktivin-A haben, aber inaktiv in Bezug auf ein BMP2-*signaling* sind (z.B. BMP2-PKD) (Abb. 22). Speziell die Variante BMP2-KD, welche im Vergleich zu Wildtyp-BMP2 ein erhöhtes osteoanaboles Potential und verbesserte inhibitorische Wirkung gegenüber Aktivin-A zeigt, scheint von Vorteil für die Behandlung der Hauptsymptome des MMs zu sein. BMP2, dessen endogene biologische Aktivität wahrscheinlich durch die Überexpression von Aktivin-A reduziert ist, ist

selbst ein sehr starker Induktor der Knochenformation und -regeneration. Außerdem übt BMP2 eine signifikante inhibitorische Wirkung auf die Proliferation neoplastischer B-Zellen aus. Daher lässt sich der Mechanismus, durch den die erhöhten Aktivin-A Level zu Osteolysen und starker B-Zell-Proliferation führen, sehr wahrscheinlich auf die Eliminierung oder wenigstens starke Reduzierung der biologischen Aktivität von endogenem BMP2 zurückführen. Da Wildtyp-BMP2 schon Aktivin-A entgegenwirkt bzw. seine Aktivität durch Bindung an gemeinsame Typ-II Rezeptoren abschwächt, kann die Entwicklung erhöhter Bindungsaffinitäten zu den gemeinsamen Typ-II Rezeptoren ActR-II und ActR-IIB signifikant das inhibitorische Potenzial der BMP2-Varianten (BMP2-KD und BMP2-PKD) erhöhen. Wenn die Bindungsaffinität dieser Varianten zu den BMP2 Typ-I Rezeptoren erhalten bleibt, führt die erhöhte Bindungsaffinität zu den Typ-II Rezeptoren ebenfalls zu einer verstärkten osteoanabolen Kapazität, was für BMP2-KD im Vergleich zu Wildtyp-BMP2 gezeigt wurde (Abb. 23). Aufgrund seiner verbesserten Funktion osteoanabole Effekte zu fördern, kombiniert mit einem erhöhten anti-proliferativen Effekt auf neoplastische B-Zellen *in vivo*, verspricht BMP2-KD die am vielversprechendste Variante für die Behandlung der MM-Symptome zu sein. Allerdings könnte die therapeutische Anwendung dieser Variante unvorhersehbare Risiken mit sich führen, da seine systemische Verabreichung zu unspezifischen Aktivitäten auf Zellen von mesenchyalem Ursprung führen könnte (Knight and Hankenson, 2013, Ryoo et al., 2006). Um eine potenzielle Induktion von ektopischem Knochenwachstums in mesenchyalem Gewebe zu vermeiden, könnte es von Vorteil sein, die osteogene Aktivität des systemisch applizierten BMP2 auszuschalten. Damit diese gedämpft werden kann, wird es nötig sein die Smad-1/5/8-*pathway*-aktivierenden Eigenschaften von BMP2 zu reduzieren oder gänzlich auszuschalten. Dieser Prozess wird am besten durch die BMP2-L51P-Variante erreicht, welche Smad-1/5/8-*pathway* nicht aktivieren kann, da sie keine Typ-I Rezeptorbindungsaffinität aufweist. Trotz der Abwesenheit osteogener Aktivität, kann diese Variante immer noch mit Aktivin-A um die Typ-II Rezeptorbindung an ActR-II und ActR-IIB konkurrieren und damit Aktivin-A antagonisieren. Zudem kann diese BMP-Mutante, obwohl sie nicht BMP Typ-I Rezeptoren binden kann, immer noch wie Wildtyp-BMP2 den BMP-Antagonisten Noggin binden (Albers et al., 2012, Sebald et al., 2012). Noggin wird oft mit BMPs koexprimiert, um die BMP-Aktivität über einen negativen *feedback loop* zu dämpfen. Da die BMP2-L51P-Variante Noggin neutralisieren und dabei endogene BMP aus dem Komplex mit Noggin befreit, wirkt sie somit indirekt osteogen an Stellen, wo endogen BMPs produziert werden (Sebald et al., 2012, Albers et al., 2012, Dudaric et al., 2013). Das antagonistische und ortsspezifische Potenzial dieser Variante wurde auch schon in Zellkultur, sowie in einem Rattenmodell gezeigt und kann der Verabreichung des wildtyp-BMP2 in vielen Aspekten überlegen sein (Sebald et al., 2012, Albers et al., 2012).

Dieselben Eigenschaften, jedoch mit stärkerer Aktivin-A Inhibition, zeigt die Variante BMP2-PKD. Diese Variante zeigt erhöhte Bindungsaffinität zu den Aktivin Typ-II Rezeptoren und kann daher Aktivin-A effizienter inhibieren. Diese Eigenschaft könnte von Vorteil in der klinischen Anwendung in Bezug auf die Sicherheit sein, da geringere Konzentrationen der systemisch applizierten BMP2-Variante verabreicht werden könnten. Die Risiken von systemisch applizierten BMP-Proteinen mit konservierter intrinsischer osteogener Aktivität, welche Wildtyp-BMP2 und BMP2-KD aufweisen, können derzeit noch nicht eingeschätzt werden, da es noch keine klinischen Studien und Tierexperimente gibt. Vermutlich jedoch bestehen Risiken, wie ektopische Knochenformation in mesenchymalem Gewebe oder gewisse tumoröse Aktivitäten, da bekannt ist, dass BMPs bei der mesenchymalen Stammzellendifferenzierung und in Krebs-assoziierte Prozesse, wie z.B. der Transition von epitheliale zu mesenchymalem Gewebe (EMT), involviert sind (McCormack and O'Dea, 2013). Allerdings sind die BMP-Konzentrationen im Blut gesunder wie an MM-erkrankter Patienten sehr niedrig, was keine Vorhersage in Bezug auf tolerierbare systemisch applizierte BMP2-Konzentrationen erlaubt (Park et al., 2010, Choi et al., 2012). Außerdem scheint der endogene Aktivin-A Level im Blut gesunder Menschen sehr niedrig zu sein (400-1500 pg/ml) (Terpos et al., 2012); allerdings werden nur subnanomolare Konzentrationen gebraucht, um die BMP2-Inhibition durch Aktivin-A zu initiieren (Olsen et al., 2015). Im Gegenzug dazu benötigen BMPs Konzentrationen von 10-50 nM, um ihr osteogenes Potential auszuüben (Urist et al., 1979). Damit exklusiv die Aktivin-A-spezifische Aktivitäten inhibiert werden ohne dass eine BMP-spezifische Antwort induziert wird, sollten eher niedrige Konzentrationen an BMP-Derivaten verabreicht werden. Diese Situation legt nahe, dass der Aktivin-A Superantagonist BMP2-PKD wahrscheinlich die beste Option für solch ein Behandlungssystem darstellen würde.

Wie in vorangegangenen Ergebnissen gezeigt wurde, reagieren nicht alle Zelllinien gleich auf BMP2, was die Vermutung nahelegt, dass auch mit unterschiedlichem Ansprechen auf die BMP2-Derivate bei therapeutischem Einsatz zu rechnen wäre. Um eine erfolgreiche agonistische Therapie (osteoanabole Eigenschaft von BMP2 / -Derivaten) zu gewährleisten, müsste der der Erkrankung zu Grunde liegende Zelltyp sowohl BMP Typ-I, als auch BMP Typ-II Rezeptoren für ein BMP2-Signaling aufweisen. Das bedeutet, dass BMP2 und das Derivat BMP2-KD theoretisch das Potenzial zur Knochenregeneration bei Patienten mit BMP2-responsiven Zelltypen hätten. Anders sieht es bei der antagonistischen Therapie (Inhibition der Aktivin-A-Wirkung) aus. Hierbei wäre es möglich BMP2-Derivate auch bei Zelltypen ohne Typ-I Rezeptorexpression einzusetzen, da Aktivin-A und BMP2 nur die Typ II Rezeptoren ActR-II und ActR-IIB teilen. In diesem Fall könnten für die Therapie als Antagonist das Derivat BMP2-L51P und als Superantagonisten die Derivate BMP2-KD und BMP2-PKD in Frage kommen.

Einige Zelltypen weisen auch eine Hochregulierung der inhibitorischen Smad 6 oder Smad 7 auf. Dies würde jedoch die antagonistische Therapie, anders als die agonistische, in Bezug auf das Konkurrieren der Liganden an den Rezeptoren ActR-II und ActR-IIB wahrscheinlich nicht beeinflussen.

Im Multiplen Myelom ist demnach für eine erfolgreiche personalisierte Therapie die genaue Stratifizierung des Zelltyps Grundvoraussetzung. In Bezug auf die BMP2-Derivate wäre eine Unterteilung der Zelltypen in verschiedene Gruppen möglich. 1) Zelltypen mit BMP Typ-II Rezeptorexpression könnten je nach Affinität unterschiedlich stark antagonistisch, auch bei fehlenden Typ-I Rezeptoren, mit allen BMP2-Derivaten behandelt werden. 2) Zelltypen mit BMP Typ-I und Typ-II Rezeptoren könnten, neben der antagonistischen Therapie, agonistisch mit BMP2 und BMP2-KD behandelt werden. 3) Zelltypen mit erhöhter Smad 6 oder Smad 7 Expression kommen für eine antagonistische Therapie in Frage. Um diese Theorie zu verifizieren, müssen jedoch noch weitere Studien durchgeführt werden.

Daneben muss bedacht werden, dass die neoplastischen Zellen nicht bei allen MM-Patienten Aktivin-A-insensitiv sind. In diesen Fällen hat Aktivin-A einen anti-proliferativen Effekt genau wie BMP2 und unsere generierten BMP2-Varianten. Dadurch kann die Verabreichung von BMP2 ungewollte Nebenwirkungen durch die Inhibition von endogenem Aktivin-A provozieren (Nishihara et al., 1993). Auf der anderen Seite reagierte nur eine (INA6) unserer 10 getesteten MM-Zelllinien auf Aktivin-A (Abb. 26 A). Darüber hinaus zeigten Analysen der CD 138+ Zellen von 8 MM-Patienten nur geringe apoptotische Effekte unter Aktivin-A Stimulation (Ergebnisse nicht gezeigt). Zu guter Letzt korrelieren die erhöhten Aktivin-A Level bei MM-Patienten mit umfassender Knochenbeteiligung und geringeren Überlebensraten (Terpos et al., 2012). Genauso haben diverse gezielte Antagonisten gegen das endogene Aktivin-A in Form von *decoy*-Rezeptoren einen positiven Effekt gegenüber dem MM gezeigt (Chantry et al., 2010, Fields et al., 2013, Raje and Vallet, 2010, Scullen et al., 2013, Vallet et al., 2010, Zipori and Barda-Saad, 2001). Aus diesen Gründen dominieren die Vorteile Aktivin-A durch BMPs auf Rezeptorebene zu blockieren.

Des Weiteren haben Olsen et al. bereits gezeigt, dass Aktivin-A BMP6 und BMP9 antagonisieren kann, indem es mit ihnen um die Bindung an den Typ-II Rezeptoren ActR-II und ActR-IIB in MM-Zellen konkurriert (Olsen et al., 2015). Interessanterweise scheint es wesentliche Unterschiede zu geben, wenn man deren Ergebnisse mit den Daten dieser Arbeit vergleicht. Zum einen benötigten sie sehr geringe Konzentrationen an Aktivin-A, um BMP6 und BMP9 zu antagonisieren. Auf der anderen Seite konnten Aktivitäten von BMP2 und BMP4 nicht durch diese Konzentrationen an Aktivin-A antagonisiert werden. Diese Ergebnisse scheinen den in dieser Arbeit gezeigten Resultaten jedoch nur auf den ersten Blick zu widersprechen. Es muss nämlich berücksichtigt werden, dass Unterschiede in der Bindungs-Kinetik und Formation des signalaktiven Liganden-Rezeptor-Komplexes zwischen

BMP2 und BMP6/9 ursächlich für die Diskrepanz sein könnten. Um diese gegensätzliche Beobachtung zu erklären, sollen in Folgendem die Bindungseigenschaften von BMP2 aus zwei verschiedenen Perspektiven betrachtet werden (Szenario A + B). In erster Linie kann Aktivin-A als BMP2-Inhibitor in den Zelllinien C2C12 und KMS12-BM agieren, wie in Abb. 21 gezeigt ist. Allerdings war in diesen Zellen eine wesentlich höhere Konzentration an Aktivin-A nötig, als die BMP2 Konzentration, welche zur Stimulation benutzt wurde (10fach und mehr), um die BMP2-vermittelten Effekte zu inhibieren. Um in diesem Szenario als ein effizienter Inhibitor zu agieren, muss Aktivin-A die Formation eines aktiven BMP-Signalkomplexes verhindern, welcher zwei Typ-I und zwei Typ-II Rezeptoren, sowie den BMP-Dimer umfasst. Die Formation eines solchen aktivierenden Liganden-Rezeptor-Komplexes bildet sich wahrscheinlich in einer Zwei-Schritt-Reaktion, weil die Bindungsaffinität des BMP2-Liganden für den Typ-I und Typ-II Rezeptor grundlegend verschieden ist. *In vitro* Messungen haben gezeigt, dass die Affinität von BMP2 für seine Typ-II Rezeptoren ungefähr 10-60-fach geringer ist als für seine Typ-I Rezeptoren (Heinecke et al., 2009). Deshalb bindet BMP2 zuerst an einen Typ-I Rezeptor (BR-IA oder -IB) mit einer hohen Affinität und anschließend rekrutiert dieser membranständige binäre Komplex den niederaffinen Typ-II Rezeptor in den Komplex, um das *downstream signaling* zu initiieren. Es kann jedoch irreführend sein die Typ-II Rezeptoren ActR-II, ActR-IIB und BR-II als niederaffine BMP2-Rezeptoren zu bezeichnen, da man von einer strikten Niederaffinität nur dann sprechen kann, wenn BMP2 direkt aus dem extrazellulären Raum an seine Typ-II Rezeptoren bindet. Wenn jedoch BMP2 bereits an die Membran durch den Typ-I Rezeptor rekrutiert wurde, findet die anschließende Interaktion mit dem Typ-II Rezeptor in einem zweidimensionalen Raum statt; z.B. wird der binäre Komplex aus BMP-Typ-I-Rezeptor den Typ-II-Rezeptor in die Membran rekrutieren und auf diese Weise die Interaktion lateral begrenzen. Verschiedene theoretische Analysen zeigten eindeutig, dass die Reduktion der Liganden in den Freiheitsgraden durch die Verschiebung von einer dreidimensionalen in eine zweidimensionalen Suche die Reaktionsgeschwindigkeiten des zweiten Interaktionsschrittes, der innerhalb der Membran auftritt, signifikant erhöhen kann (DeLisi and Chabay, 1979, DeLisi, 1981a, DeLisi, 1981b, Wiegel and DeLisi, 1982). Dies deutet darauf hin, dass eine scheinbar höhere Affinität der BMP-Liganden zu den Typ-II Rezeptoren beobachtet werden kann, wenn die Liganden-Rezeptor-Wechselwirkung innerhalb der Membran auftritt. Dies wird typischerweise bei *in-vitro*-Versuchen gezeigt, die 3D-Interaktionen, sowie Oberflächenplasmonresonanz oder Kalorimetrie messen (Nickel et al., 2009, Mueller and Nickel, 2012). Obwohl Aktivin-A die Typ-II Rezeptoren mit höheren Affinitäten als BMP2 bindet, kann die Typ-I-Rezeptor-gestützte Interaktion von BMP2 mit den Typ-II Rezeptoren innerhalb der Membran Aktivin-A zu einem eher schwachen Inhibitor für BMP2 machen, weshalb unerwartet hohe Konzentrationen an Aktivin-A erforderlich wären. Um BMP2 zu verdrängen, müssen fast alle

Typ-II Rezeptoren von Aktivin-A besetzt werden, da ansonsten der binäre Membran-BMP2-Typ-I-Rezeptorkomplex seinen Typ-II Rezeptor (Szenario A) effizient rekrutiert.

Das Szenario ändert sich, wenn die Blockierung von Aktivin-A durch BMP2 in INA6-Zellen analysiert wird (als Szenario B bezeichnet). Obwohl dies als umgekehrte Situation betrachtet werden könnte, wie oben beschrieben, ist hier eine viel höhere BMP2-Konzentration erforderlich, um die Effekte, die durch eine sehr niedrige nanomolare Konzentration an Aktivin-A induziert werden, zu antagonisieren (Abb. 25). Der Unterschied liegt in der Tatsache, dass INA6-Zellen die hochaffinen Typ-I Rezeptoren (BR-IA und -IB), welche BMP2 benötigt, nicht exprimieren. Die BMP2-vermittelte Blockade der Aktivin-A-Typ-II-Rezeptorbindung wird durch eine erste Rekrutierung von BMP2 zur Zellmembran nicht erleichtert. Somit werden Aktivin-A und BMP2 direkt an die gemeinsamen Typ-II Rezeptoren gebunden, wobei sie die Affinitäten besitzen, die durch *in-vitro*-Interaktionsanalysen bestimmt wurden. Da BMP2 Affinitäten zu seinen drei Typ-II Rezeptoren aufweist, die etwa 15- bis 35-fach niedriger sind, wie die von Aktivin-A (Heinecke et al., 2009), sind viel höhere BMP2-Konzentrationen erforderlich, um die Bindung und Aktivierung des Aktivin-A-Rezeptors zu behindern. Für diesen Mechanismus ist die BMP2-Variante PKD von Vorteil, welche die Aktivin-Typ-II-Rezeptoren mit nahezu Aktivin-A-ähnlichen Affinitäten bindet, aber eine sehr geringe Affinität für BMP-Typ-I-Rezeptoren aufweist und eine höhere antagonistische Kapazität gegenüber Aktivin-A hat (Abb. 25). Der Mechanismus, der dem gegenseitigen Antagonismus von Aktivin-A und BMP zugrunde liegt, beruht auf einer direkten Konkurrenz der Bindung an einen Satz von gemeinsamen Typ-II Rezeptoren. Trotzdem beeinflusst das spezielle Expressionsprofil von BMP Typ-I und Typ-II Rezeptoren in den adressierten Zellen, sowie das Rezeptor-Bindungsprofil des jeweiligen BMPs die hemmende Effizienz von Aktivin-A oder BMP stark.

Mit diesen Überlegungen kann erklärt werden, warum Olsen et al. nur geringe Konzentrationen von Aktivin-A benötigten, um die BMP9- und BMP6-vermittelte Hemmung der Zellproliferation in INA6- und IH-1-Myelomzelllinien zu inhibieren, aber trotzdem keine Wirkung mit denselben Konzentrationen an Aktivin-A auf BMP2 / 4 in IH-1-Zellen nachweisen konnte (Olsen et al., 2015). BMP6 bindet keine TGF- $\beta$ -Typ-I-Rezeptoren mit hoher Affinität, hat aber eine mittlere Affinität für Aktivin-Typ-II-Rezeptoren und kann daher von Aktivin-A antagonisiert werden, indem es effizient um die Bindung an Typ-II Rezeptoren direkt aus dem extrazellulären Raum konkurriert (wie Szenario B) . Im Gegensatz dazu bindet BMP9 mit hoher Affinität an den Typ-I Rezeptor TSR-1 (ALK1), der jedoch in MM-Zellen fehlt und zeigt somit ein ähnliches antagonistisches Profil gegenüber Aktivin-A, wie es für BMP6 beobachtet wurde, mit dem einzigen Unterschied, dass BMP9 auch Typ-II Rezeptoren mit höherer Affinität bindet als BMP6. Das Scheitern der Antagonisierung von BMP2 und BMP4 gegenüber Aktivin-A in der MM-Zelllinie IH-1, das bei der Untersuchung von Olson et al.

beobachtet wurde, ist darauf zurückzuführen, dass IH-1-Zellen alle drei Typ-I Rezeptoren (Ro et al., 2004), die durch BMP2 und BMP4 gebunden werden, exprimieren. Somit müssen beide TGF- $\beta$ -Liganden miteinander konkurrieren, wenn sie bereits von ihren hochaffinen Typ-I Rezeptoren an die Zelloberfläche rekrutiert werden (Szenario A), was jedoch viel höhere Konzentrationen von Aktivin-A erfordert (wie in dieser Arbeit gezeigt, Abb. 21 B), als sie in der Studie von Olson et al. verwendet wurden (Olsen et al., 2015).

Es bleibt noch zu diskutieren, warum in dieser Arbeit BMP2 und keine anderer BMP-Ligand verwendet wurde. BMP2 und die in dieser Studie verwendeten Varianten können BMP6, BMP9 und verschiedene andere BMPs aufgrund der gemeinsamen Nutzung der drei Typ-II Rezeptoren ActR-II, ActR-IIB und BR-II potenziell hemmen. Dies scheint kontraproduktiv zu sein, da BMP6 die Apoptose in primären Myelomzellen über den Typ-I Rezeptor ActR-I (ALK2) stärker induzieren kann als BMP2 und BMP4 über BR-IA oder -IB (Olsen et al., 2014, Holien et al., 2012). Darüber hinaus ist ActR-I im Gegensatz zu BR-IA und -IB in Myelomzellen ubiquitär exprimiert, was BMP6 zu einem potentiell vielseitigeren Aktivin-A-Antagonisten als BMP2 macht (Seckinger et al., 2009). BMP2 wurde in dieser Studie jedoch aus zwei Hauptgründen eingesetzt. Erstens konnte gezeigt werden, dass auch BMP2 als Aktivin-A-Antagonist in MM agieren kann. Zweitens wurden BMP2 und insbesondere seine Varianten als Modell verwendet, um zu zeigen, dass BMP-Moleküle mit maßgeschneiderten Funktionen durch *Molecular Design* für eine spezifische Anwendung in der MM-Therapie erzeugt werden können. Es könnte möglich sein, dass die Funktionalitäten dieser BMP2-Varianten auch auf BMP6 übertragen werden können, was BMP6 zu einem noch vielseitigeren Aktivin-A-Antagonisten machen würde.

Um jedoch weitere Einblicke in das therapeutische Potenzial dieses Feldes an BMP2 und möglichen BMP6-Varianten zu erhalten, ist die Prüfung in Tiermodellen erforderlich. Auch wenn die Anwendbarkeit solcher BMP-basierter Aktivin-A-Antagonisten bei Tierversuchen noch nicht gezeigt wurde, ist es sehr wahrscheinlich, dass diese BMP2-Varianten ein leistungsfähiges Werkzeug für die Behandlung des Multiplen Myeloms darstellen, indem sie die Aktivitäten von Aktivin-A beeinträchtigen und damit signifikante Verbesserungen der klinischen Symptome, die mit dieser Krankheit verbunden sind, vermitteln.



## 5 Zusammenfassung

Diese Dissertation analysiert BMP2 und BMP2-Derivate als neue therapeutische Strategien für die Behandlung des Multiplen Myeloms (MM). Das MM ist eine maligne neoplastische Erkrankung des Knochenmarks mit Plasmazellvermehrung und erhöhten Leveln an Aktivin A im Blutserum, wobei eines der Hauptsymptome das Auftreten von schmerzvollen Osteolysen ist. In den letzten Jahren rückte Aktivin-A als interessantes *Target* zur Behandlung des Multiplen Myeloms in den Vordergrund. Die Reduzierung der Aktivin-A Level durch *decoy*-Rezeptoren führte zu einer signifikanten Verbesserung der Osteolysen und einem reduzierten Proliferationsverhalten der neoplastischen B-Zellen, sowohl im Tierexperiment als auch in Studien der klinischen Phase II. Die Aktivin-A-Antagonisierung ist somit ein neuer und vielversprechender Ansatz in der Therapie des Multiplen Myeloms.

Das *Bone Morphogenetic Protein 2* ist aufgrund seiner molekularen und biologischen Eigenschaften ein interessantes *Target* für die Therapie des Multiplen Myeloms. Es ist auf molekularer Ebene ein Aktivin-A-Antagonist, besitzt aber auch osteoinduktives Potential und apoptotische bzw. anti-proliferative Eigenschaften auf neoplastische B-Zellen. Da die in der Literatur bereits beschriebenen, durch Mitglieder der TGF- $\beta$ -Familie induzierten Apoptosemechanismen, noch nicht genauer untersucht waren, wurde in dieser Arbeit die BMP2-induzierte Apoptose in 10 unterschiedlichen humanen MM-Zellen analysiert. Erstens konnte dabei nachgewiesen werden, dass 7 von 10 Zelllinien nicht BMP2-responsiv waren. Eine genauere Untersuchung ergab, dass neben der Expression spezifischer BMP-Rezeptoren auch die Expression von inhibitorischen Smad-Proteinen über die BMP2-Responsivität entscheidet. Zweitens zeigte die genauere Analyse der Apoptosemechanismen, dass entgegen der in der Literatur publizierten Ergebnisse, BMP2 keine apoptotische Wirkung auf die von uns untersuchten Zelllinien hat. Mehrere verschieden durchgeführte Experimente, u.a. die Verwendung von spezifischen Inhibitoren des programmierten Zelltodes, unterstützen dieses Ergebnis und klassifizieren BMP2 als einen rein anti-proliferativen Faktor.

Der letzte Teil der Arbeit befasst sich mit der Analyse von potentiellen Aktivin-A-Antagonisten in Form verschiedener BMP2- und GDF5-Derivate und inwiefern sie sich zum Einsatz in der Therapie des Multiplen Myeloms eignen. Die unterschiedlichen Eigenschaften der einzelnen Mutanten wurden in verschiedenen Zellsystemen getestet. So konnte aufgezeigt werden, dass neben einer erhöhten biologischen Aktivität in Form eines gesteigerten osteoinduktiven und anti-proliferativen Potentials auf neoplastische B-Zellen (Superagonisten), sich die verschiedenen Derivate als Super-Antagonisten zu Aktivin A eignen und damit unterschiedlichen Ansprüchen der adjuvanten Therapie im Multiplen Myelom gerecht werden.

## Summary

This dissertation analyses BMP2 and BMP2 derivatives as new therapeutic agents in multiple myeloma (MM). MM is a malignant neoplastic disease of bone marrow with plasmatic cell proliferation and increased Activin-A-level in blood serum. A particular symptom of this disease is the occurrence of painful osteolysis. In the last few years Activin A has become an important target for the treatment of multiple myeloma. Reducing Activin A levels by decoy receptors led to a significant improvement in osteolysis and reduced proliferation behavior of neoplastic B cells, both in animal experiments and clinical phase II trials. Activin A antagonization is thus a new and promising approach in the treatment of multiple myeloma.

Bone Morphogenetic Protein 2 is a promising prospect for the treatment of multiple myeloma due to its molecular and biological properties. It is an Activin-A-antagonist at the molecular level, but also has osteoinductive potential and apoptotic or anti-proliferative properties on neoplastic B cells as already described in literature. Since the apoptotic mechanisms, which members of the TGF- $\beta$  family induced in MM-cells, have not yet been investigated in detail, the BMP2-induced apoptosis was analyzed in 10 different human MM cells. Firstly it was shown that 7 out of 10 cell lines were not responsive to BMP2. A more detailed analysis revealed that, besides the expression of specific BMP receptors, the expression of inhibitory Smad proteins determines BMP responsiveness. Secondly the more precise analysis of the apoptotic mechanisms revealed that, contrary to the results published in the literature, BMP2 has no apoptotic effect on the cell lines we have examined. Several different experiments, e.g. the use of specific inhibitors of programmed cell death, support this result and classify BMP2 as a purely anti-proliferative factor.

The last part of this research deals with the analysis of potential Activin-A-antagonists in form of different BMP2 and GDF5 derivatives and how they are suitable for use in the therapy of multiple myeloma. The different properties of the individual mutants were tested in diverse cell systems. The results demonstrate that in addition to increased biological activity in form of increased osteoinductive and anti-proliferative potential on neoplastic B cells (superagonist), the various derivatives are suitable as super-antagonist to Activin A and cope with different requirements of adjuvant therapy in context of multiple myeloma.

## 6 Literatur- , Abkürzungsverzeichnis

### 6.1 Abkürzungen

A	Ampere
AK	Antikörper
ATL	Adulte T-Zell Leukämie
Bax	<i>Bcl2-associated X protein</i>
BAMBI	<i>BMP and activin membrane bound inhibitor</i>
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-X <sub>L</sub>	<i>Bcl2-like protein</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
Caspase	<i>cysteiny aspartat specific proteinase</i>
cFLIP	<i>cellular FLICE inhibitory protein</i>
CFSE	<i>carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CHX	Cycloheximid
clAP	<i>cellular inhibitor of apoptosis protein</i>
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
DD	<i>death domain</i> , Todesdomäne
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco`s PBS
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
IC50	Halbmaximale inhibitorische Konzentration
IMiDs	<i>Immunomodulatory Drugs</i>
IL6	Interleukin
EC50	Halbmaximale effektive Konzentration
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
Fas	<i>FS7-associated surface antigen</i>
Fc	<i>Fragment crystallisable</i> , konstanter Antikörperteil
FCS	fötales Kälberserum
FGFR	<i>fibroblast growth factor</i> Rezeptor

fl	<i>Full length</i>
Flag	Polypeptid Protein-tag (DYKDDDDK)
GDF	<i>Growth differentiation factor</i>
HCl	Chlorwasserstoff
HPRT	<i>hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase</i>
RP	<i>horse radish peroxidase</i>
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IKK	I $\kappa$ B ( <i>inhibitor of NF<math>\kappa</math>B</i> ) Kinasekomplex
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton = 10 <sup>3</sup> Dalton
M	Molarität (Mol/Liter)
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MDM2	<i>murine double minute 2</i>
MM	Multiple Myelom
mol	Stoffmenge
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
OD	optische Dichte
OPG	Osteoprotegerin
p53	<i>tumor suppressor p53</i>
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
RANK	<i>receptor activator of NF<math>\kappa</math>B</i>
RANKL	<i>receptor activator of NF<math>\kappa</math>B ligand</i>
RIP-1	<i>receptor interacting protein-1</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Smad	<i>Small Mothers against Decapentaplegic</i>
TBS	<i>Tris buffered Saline</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TRADD	<i>TNFR associated death domain</i>
TRAF	<i>TNFR associated factor</i>

TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TWEAK	<i>tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis</i>
Tween	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurate
WB	Westernblot
WST1	<i>water soluble tetrazolium2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium</i>
wt	Wildtyp
zVAD-fmk	<i>Carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone</i>
7AAD	<i>7-Aminoactinomycin D</i>

## 6.2 Literatur

RKI, Zentrum für Krebsregisterdaten C90, 2013

Hans-Harald Sedlacek, Onkologie - die Tumor-Erkrankungen des Menschen, De Gruyter-Verlag 2013, ISBN 3110255111

DGHO= Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie e. V.

Müller, Sebald 2007, Biospektrum 03.07 (S.236)

- ADORNO, M., CORDENONSI, M., MONTAGNER, M., DUPONT, S., WONG, C., HANN, B., SOLARI, A., BOBISSE, S., RONDINA, M. B., GUZZARDO, V., PARENTI, A. R., ROSATO, A., BICCIATO, S., BALMAIN, A. & PICCOLO, S. 2009. A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis. *Cell*, 137, 87-98.
- AGGARWAL, B. B., SCHWARZ, L., HOGAN, M. E. & RANDO, R. F. 1996. Triple helix-forming oligodeoxyribonucleotides targeted to the human tumor necrosis factor (TNF) gene inhibit TNF production and block the TNF-dependent growth of human glioblastoma tumor cells. *Cancer Res*, 56, 5156-64.
- AGUIRRE, A., SHOJI, K. F., SAEZ, J. C., HENRIQUEZ, M. & QUEST, A. F. 2013. FasL-triggered death of Jurkat cells requires caspase 8-induced, ATP-dependent cross-talk between Fas and the purinergic receptor P2X(7). *J Cell Physiol*, 228, 485-93.
- AHMAD, N., HAIDER, S., JAGANNATHAN, S., ANAISSIE, E. & DRISCOLL, J. J. 2014. MicroRNA theragnostics for the clinical management of multiple myeloma. *Leukemia*, 28, 732-8.
- ALBERS, C. E., HOFSTETTER, W., SEBALD, H. J., SEBALD, W., SIEBENROCK, K. A. & KLENKE, F. M. 2012. L51P - A BMP2 variant with osteoinductive activity via inhibition of Noggin. *Bone*, 51, 401-6.
- ALEXANIAN, R., HAUT, A., KHAN, A. U., LANE, M., MCKELVEY, E. M., MIGLIORE, P. J., STUCKEY, W. J., JR. & WILSON, H. E. 1969. Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *JAMA*, 208, 1680-5.
- AMODIO, N., DI MARTINO, M. T., NERI, A., TAGLIAFERRI, P. & TASSONE, P. 2013. Non-coding RNA: a novel opportunity for the personalized treatment of multiple myeloma. *Expert Opin Biol Ther*, 13 Suppl 1, S125-37.
- ANGUIANO, A., TUCHMAN, S. A., ACHARYA, C., SALTER, K., GASPARETTO, C., ZHAN, F., DHODAPKAR, M., NEVINS, J., BARLOGIE, B., SHAUGHNESSY, J.

- D., JR. & POTTI, A. 2009. Gene expression profiles of tumor biology provide a novel approach to prognosis and may guide the selection of therapeutic targets in multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 27, 4197-203.
- AYKUL, S. & MARTINEZ-HACKERT, E. 2016. Transforming Growth Factor-beta Family Ligands Can Function as Antagonists by Competing for Type II Receptor Binding. *J Biol Chem*, 291, 10792-804.
- BERENSON, J. R. 2013. Multiple myeloma: treatment updates. *Clin Adv Hematol Oncol*, 11, 744-5.
- BERGSAGEL, P. L. & KUEHL, W. M. 2001. Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene*, 20, 5611-22.
- BERTRAND, M. J., MILUTINOVIC, S., DICKSON, K. M., HO, W. C., BOUDREAULT, A., DURKIN, J., GILLARD, J. W., JAQUITH, J. B., MORRIS, S. J. & BARKER, P. A. 2008. cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol Cell*, 30, 689-700.
- BOMMERT, K., BARGOU, R. C. & STUHMER, T. 2006. Signalling and survival pathways in multiple myeloma. *Eur J Cancer*, 42, 1574-80.
- BRENNER, H., GONDOS, A. & PULTE, D. 2009. Expected long-term survival of patients diagnosed with multiple myeloma in 2006-2010. *Haematologica*, 94, 270-5.
- CABAL-HIERRO, L. & LAZO, P. S. 2012. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal*, 24, 1297-305.
- CHAABANE, W., USER, S. D., EL-GAZZAH, M., JAKSIK, R., SAJJADI, E., RZESZOWSKA-WOLNY, J. & LOS, M. J. 2013. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 61, 43-58.
- CHANG, H., QI, C., YI, Q. L., REECE, D. & STEWART, A. K. 2005. p53 gene deletion detected by fluorescence in situ hybridization is an adverse prognostic factor for patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation. *Blood*, 105, 358-60.
- CHANG, H., SLOAN, S., LI, D. & KEITH STEWART, A. 2004. Multiple myeloma involving central nervous system: high frequency of chromosome 17p13.1 (p53) deletions. *Br J Haematol*, 127, 280-4.
- CHANTRY, A. D., HEATH, D., MULIVOR, A. W., PEARSALL, S., BAUD'HUIN, M., COULTON, L., EVANS, H., ABDUL, N., WERNER, E. D., BOUXSEIN, M. L., KEY, M. L., SEEHRA, J., ARNETT, T. R., VANDERKERKEN, K. & CROUCHER, P. 2010. Inhibiting activin-A signaling stimulates bone formation and prevents cancer-induced bone destruction in vivo. *J Bone Miner Res*, 25, 2633-46.
- CHATAKUN, P., NUNEZ-TOLDRA, R., DIAZ LOPEZ, E. J., GIL-RECIO, C., MARTINEZ-SARRA, E., HERNANDEZ-ALFARO, F., FERRES-PADRO, E., GINER-TARRIDA, L. & ATARI, M. 2014. The effect of five proteins on stem cells used for osteoblast differentiation and proliferation: a current review of the literature. *Cell Mol Life Sci*, 71, 113-42.
- CHEN, L., ZHANG, W., LIANG, H. F., ZHOU, Q. F., DING, Z. Y., YANG, H. Q., LIU, W. B., WU, Y. H., MAN, Q., ZHANG, B. X. & CHEN, X. P. 2014. Activin A induces growth arrest through a SMAD- dependent pathway in hepatic progenitor cells. *Cell Commun Signal*, 12, 18.
- CHEN, M. H., QI, C. X., SAHA, M. N. & CHANG, H. 2012. p53 nuclear expression correlates with hemizygous TP53 deletion and predicts an adverse outcome for patients with relapsed/refractory multiple myeloma treated with lenalidomide. *Am J Clin Pathol*, 137, 208-12.
- CHEN, N. J., CHIO, II, LIN, W. J., DUNCAN, G., CHAU, H., KATZ, D., HUANG, H. L., PIKE, K. A., HAO, Z., SU, Y. W., YAMAMOTO, K., DE POOTER, R. F., ZUNIGA-

- PFLUCKER, J. C., WAKEHAM, A., YEH, W. C. & MAK, T. W. 2008. Beyond tumor necrosis factor receptor: TRADD signaling in toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 12429-34.
- CHEN, Y., BHUSHAN, A. & VALE, W. 1997. Smad8 mediates the signaling of the ALK-2 [corrected] receptor serine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 12938-43.
- CHNG, W. J., PRICE-TROSKA, T., GONZALEZ-PAZ, N., VAN WIER, S., JACOBUS, S., BLOOD, E., HENDERSON, K., OKEN, M., VAN NESS, B., GREIPP, P., RAJKUMAR, S. V. & FONSECA, R. 2007. Clinical significance of TP53 mutation in myeloma. *Leukemia*, 21, 582-4.
- CHOI, Y. J., KIM, S. T., PARK, K. H., OH, S. C., SEO, J. H., SHIN, S. W., KIM, J. S. & KIM, Y. H. 2012. The serum bone morphogenetic protein-2 level in non-small-cell lung cancer patients. *Med Oncol*, 29, 582-8.
- CHOU, T. 2012. Multiple myeloma : recent progress in diagnosis and treatment. *J Clin Exp Hematop*, 52, 149-59.
- CRAIGHEAD, M. W., TIWARI, P., KEYNES, R. G. & WATERS, C. M. 1999. Human oligodendroglial cell line, MO3.13, can be protected from apoptosis using the general caspase inhibitor zVAD-FMK. *J Neurosci Res*, 57, 236-43.
- DEGTEREV, A., HUANG, Z., BOYCE, M., LI, Y., JAGTAP, P., MIZUSHIMA, N., CUNY, G. D., MITCHISON, T. J., MOSKOWITZ, M. A. & YUAN, J. 2005. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol*, 1, 112-9.
- DELISI, C. 1981a. The effect of cell size and receptor density on ligand--receptor reaction rate constants. *Mol Immunol*, 18, 507-11.
- DELISI, C. 1981b. The magnitude of signal amplification by ligand-induced receptor clustering. *Nature*, 289, 322-3.
- DELISI, C. & CHABAY, R. 1979. The influence of cell surface receptor clustering on the thermodynamics of ligand binding and the kinetics of its dissociation. *Cell Biophys*, 1, 117-31.
- DENG, S., XU, Y., AN, G., SUI, W., ZOU, D., ZHAO, Y., QI, J., LI, F., HAO, M. & QIU, L. 2015. Features of extramedullary disease of multiple myeloma: high frequency of p53 deletion and poor survival: a retrospective single-center study of 834 cases. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 15, 286-91.
- DERLIN, T. & BANNAS, P. 2014. Imaging of multiple myeloma: Current concepts. *World J Orthop*, 5, 272-82.
- DICKINSON, M., PRINCE, H. M., KIRSA, S., ZANNETTINO, A., GIBBS, S. D., MILESHKIN, L., O'GRADY, J., SEYMOUR, J. F., SZER, J., HORVATH, N. & JOSHUA, D. E. 2009. Osteonecrosis of the jaw complicating bisphosphonate treatment for bone disease in multiple myeloma: an overview with recommendations for prevention and treatment. *Intern Med J*, 39, 304-16.
- DIMOPOULOS, M., SPENCER, A., ATTAL, M., PRINCE, H. M., HAROUSSEAU, J. L., DMOSZYNSKA, A., SAN MIGUEL, J., HELLMANN, A., FACON, T., FOA, R., CORSO, A., MASLIAK, Z., OLESNYCKYJ, M., YU, Z., PATIN, J., ZELDIS, J. B., KNIGHT, R. D. & MULTIPLE MYELOMA STUDY, I. 2007. Lenalidomide plus dexamethasone for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med*, 357, 2123-32.
- DIVINE, B. J., HARTMAN, C. M. & WENDT, J. K. 1999. Update of the Texaco mortality study 1947-93: Part II. Analyses of specific causes of death for white men employed in refining, research, and petrochemicals. *Occup Environ Med*, 56, 174-80.
- DRACH, J., ACKERMANN, J., FRITZ, E., KROMER, E., SCHUSTER, R., GISSLINGER, H., DESANTIS, M., ZOJER, N., FIEGL, M., ROKA, S., SCHUSTER, J., HEINZ, R., LUDWIG, H. & HUBER, H. 1998. Presence of a p53 gene deletion in patients with

- multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood*, 92, 802-9.
- DUDARIC, L., CVEK, S. Z., CVIJANOVIC, O., SANTIC, V., MARIC, I., CRNCEVIC-ORLIC, Z. & BOBINAC, D. 2013. Expression of the BMP-2, -4 and -7 and their antagonists gremlin, chordin, noggin and follistatin during ectopic osteogenesis. *Coll Antropol*, 37, 1291-8.
- EL-MESERY, M., SEHER, A., STUHMER, T., SIEGMUND, D. & WAJANT, H. 2015. MLN4924 sensitizes monocytes and maturing dendritic cells for TNF-dependent and -independent necroptosis. *Br J Pharmacol*, 172, 1222-36.
- ELMORE, S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35, 495-516.
- ELNENAEI, M. O., GRUSZKA-WESTWOOD, A. M., A'HERNT, R., MATUTES, E., SIROHI, B., POWLES, R. & CATOVSKY, D. 2003. Gene abnormalities in multiple myeloma; the relevance of TP53, MDM2, and CDKN2A. *Haematologica*, 88, 529-37.
- FAIMAN, B. & RICHARDS, T. 2014. Innovative agents in multiple myeloma. *J Adv Pract Oncol*, 5, 193-202.
- FAN, T. J., HAN, L. H., CONG, R. S. & LIANG, J. 2005. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 37, 719-27.
- FEIG, C. & PETER, M. E. 2007. How apoptosis got the immune system in shape. *Eur J Immunol*, 37 Suppl 1, S61-70.
- FENG, X. H. & DERYNCK, R. 2005. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21, 659-93.
- FIELDS, S. Z., PARSHAD, S., ANNE, M., RAFTOPOULOS, H., ALEXANDER, M. J., SHERMAN, M. L., LAADEM, A., SUNG, V. & TERPOS, E. 2013. Activin receptor antagonists for cancer-related anemia and bone disease. *Expert Opin Investig Drugs*, 22, 87-101.
- FISCHER-POSOVSZKY, P., KEUPER, M., NAGEL, S., HESSE, D., SCHURMANN, A., DEBATIN, K. M., STRAUSS, G. & WABITSCH, M. 2011. Downregulation of FLIP by cycloheximide sensitizes human fat cells to CD95-induced apoptosis. *Exp Cell Res*, 317, 2200-9.
- FONSECA, R., BLOOD, E., RUE, M., HARRINGTON, D., OKEN, M. M., KYLE, R. A., DEWALD, G. W., VAN NESS, B., VAN WIER, S. A., HENDERSON, K. J., BAILEY, R. J. & GREIPP, P. R. 2003. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. *Blood*, 101, 4569-75.
- FRITZ, E. & LUDWIG, H. 2000. Interferon-alpha treatment in multiple myeloma: meta-analysis of 30 randomised trials among 3948 patients. *Ann Oncol*, 11, 1427-36.
- FUKUDA, N., SAITOH, M., KOBAYASHI, N. & MIYAZONO, K. 2006. Execution of BMP-4-induced apoptosis by p53-dependent ER dysfunction in myeloma and B-cell hybridoma cells. *Oncogene*, 25, 3509-17.
- GAHRTON, G., SVENSSON, H., CAVO, M., APPERLY, J., BACIGALUPO, A., BJORKSTRAND, B., BLADE, J., CORNELISSEN, J., DE LAURENZI, A., FACON, T., LJUNGMAN, P., MICHALLET, M., NIEDERWIESER, D., POWLES, R., REIFFERS, J., RUSSELL, N. H., SAMSON, D., SCHAEFER, U. W., SCHATTENBERG, A., TURA, S., VERDONCK, L. F., VERNANT, J. P., WILLEMZE, R., VOLIN, L., EUROPEAN GROUP FOR, B. & MARROW, T. 2001. Progress in allogeneic bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma: a comparison between transplants performed 1983--93 and 1994--8 at European Group for Blood and Marrow Transplantation centres. *Br J Haematol*, 113, 209-16.
- GALEA-LAURI, J., RICHARDSON, A. J., LATCHMAN, D. S. & KATZ, D. R. 1996. Increased heat shock protein 90 (hsp90) expression leads to increased apoptosis in the



- monoblastoid cell line U937 following induction with TNF-alpha and cycloheximide: a possible role in immunopathology. *J Immunol*, 157, 4109-18.
- GENTILE, M., RECCHIA, A. G., MAZZONE, C. & MORABITO, F. 2012. Emerging biological insights and novel treatment strategies in multiple myeloma. *Expert Opin Emerg Drugs*, 17, 407-38.
- GERLACH, B., CORDIER, S. M., SCHMUKLE, A. C., EMMERICH, C. H., RIESER, E., HAAS, T. L., WEBB, A. I., RICKARD, J. A., ANDERTON, H., WONG, W. W., NACHBUR, U., GANGODA, L., WARNKEN, U., PURCELL, A. W., SILKE, J. & WALCZAK, H. 2011. Linear ubiquitination prevents inflammation and regulates immune signalling. *Nature*, 471, 591-6.
- GERTZ, M. A., LACY, M. Q., DISPENZIERI, A., GREIPP, P. R., LITZOW, M. R., HENDERSON, K. J., VAN WIER, S. A., AHMANN, G. J. & FONSECA, R. 2005. Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood*, 106, 2837-40.
- GIULIANI, N., MORANDI, F., TAGLIAFERRI, S., LAZZARETTI, M., BONOMINI, S., CRUGNOLA, M., MANCINI, C., MARTELLA, E., FERRARI, L., TABILIO, A. & RIZZOLI, V. 2007. The proteasome inhibitor bortezomib affects osteoblast differentiation in vitro and in vivo in multiple myeloma patients. *Blood*, 110, 334-8.
- GUNTHER, C., MARTINI, E., WITTKOPF, N., AMANN, K., WEIGMANN, B., NEUMANN, H., WALDNER, M. J., HEDRICK, S. M., TENZER, S., NEURATH, M. F. & BECKER, C. 2011. Caspase-8 regulates TNF-alpha-induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. *Nature*, 477, 335-9.
- GUTIERREZ, N. C., CASTELLANOS, M. V., MARTIN, M. L., MATEOS, M. V., HERNANDEZ, J. M., FERNANDEZ, M., CARRERA, D., ROSINOL, L., RIBERA, J. M., OJANGUREN, J. M., PALOMERA, L., GARDELLA, S., ESCODA, L., HERNANDEZ-BOLUDA, J. C., BELLO, J. L., DE LA RUBIA, J., LAHUERTA, J. J., SAN MIGUEL, J. F. & GROUP, G. P. S. 2007. Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor, whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia*, 21, 143-50.
- HAAS, T. L., EMMERICH, C. H., GERLACH, B., SCHMUKLE, A. C., CORDIER, S. M., RIESER, E., FELTHAM, R., VINCE, J., WARNKEN, U., WENGER, T., KOSCHNY, R., KOMANDER, D., SILKE, J. & WALCZAK, H. 2009. Recruitment of the linear ubiquitin chain assembly complex stabilizes the TNF-R1 signaling complex and is required for TNF-mediated gene induction. *Mol Cell*, 36, 831-44.
- HAGER, K. M. & GU, W. 2014. Understanding the non-canonical pathways involved in p53-mediated tumor suppression. *Carcinogenesis*, 35, 740-6.
- HAUPT, S., BERGER, M., GOLDBERG, Z. & HAUPT, Y. 2003. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci*, 116, 4077-85.
- HEDGER, M. P. & WINNALL, W. R. 2012. Regulation of activin and inhibin in the adult testis and the evidence for functional roles in spermatogenesis and immunoregulation. *Mol Cell Endocrinol*, 359, 30-42.
- HEDGER, M. P., WINNALL, W. R., PHILLIPS, D. J. & DE KRETZER, D. M. 2011. The regulation and functions of activin and follistatin in inflammation and immunity. *Vitam Horm*, 85, 255-97.
- HEHLGANS, T. & PFEFFER, K. 2005. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, 115, 1-20.
- HEIDER, U., FLEISSNER, C., ZAVRSKI, I., KAISER, M., HECHT, M., JAKOB, C. & SEZER, O. 2006. Bone markers in multiple myeloma. *Eur J Cancer*, 42, 1544-53.

- HEINECKE, K., SEHER, A., SCHMITZ, W., MUELLER, T. D., SEBALD, W. & NICKEL, J. 2009. Receptor oligomerization and beyond: a case study in bone morphogenetic proteins. *BMC Biol*, 7, 59.
- HELDIN, C. H., MIYAZONO, K. & TEN DIJKE, P. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390, 465-71.
- HIDESHIMA, T., BERGSAGEL, P. L., KUEHL, W. M. & ANDERSON, K. C. 2004. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood*, 104, 607-18.
- HJERTNER, O., HJORTH-HANSEN, H., BORSET, M., SEIDEL, C., WAAGE, A. & SUNDAN, A. 2001. Bone morphogenetic protein-4 inhibits proliferation and induces apoptosis of multiple myeloma cells. *Blood*, 97, 516-22.
- HOLIEN, T., VATSVEEN, T. K., HELLA, H., RAMP, C., BREDE, G., GROSETH, L. A., REKVIK, M., BORSET, M., STANDAL, T., WAAGE, A. & SUNDAN, A. 2012. Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in multiple myeloma cells by Smad-dependent repression of MYC. *Leukemia*, 26, 1073-80.
- HOLLER, N., ZARU, R., MICHEAU, O., THOME, M., ATTINGER, A., VALITUTTI, S., BODMER, J. L., SCHNEIDER, P., SEED, B. & TSCHOPP, J. 2000. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol*, 1, 489-95.
- HOODLESS, P. A., HAERRY, T., ABDOLLAH, S., STAPLETON, M., O'CONNOR, M. B., ATTISANO, L. & WRANA, J. L. 1996. MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell*, 85, 489-500.
- HSU, H., HUANG, J., SHU, H. B., BAICHWAL, V. & GOEDEL, D. V. 1996. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. *Immunity*, 4, 387-96.
- HURT, E. M., THOMAS, S. B., PENG, B. & FARRAR, W. L. 2006. Reversal of p53 epigenetic silencing in multiple myeloma permits apoptosis by a p53 activator. *Cancer Biol Ther*, 5, 1154-60.
- IKEDA, F., DERIBE, Y. L., SKANLAND, S. S., STIEGLITZ, B., GRABBE, C., FRANZ-WACHTEL, M., VAN WIJK, S. J., GOSWAMI, P., NAGY, V., TERZIC, J., TOKUNAGA, F., ANDROULIDAKI, A., NAKAGAWA, T., PASPARAKIS, M., IWAI, K., SUNDBERG, J. P., SCHAEFER, L., RITTINGER, K., MACEK, B. & DIKIC, I. 2011. SHARPIN forms a linear ubiquitin ligase complex regulating NF-kappaB activity and apoptosis. *Nature*, 471, 637-41.
- ISHII, H. H., ETHERIDGE, M. R. & GOBE, G. C. 1995. Cycloheximide-induced apoptosis in Burkitt lymphoma (BJA-B) cells with and without Epstein-Barr virus infection. *Immunol Cell Biol*, 73, 463-8.
- ISHISAKI, A., YAMATO, K., HASHIMOTO, S., NAKAO, A., TAMAKI, K., NONAKA, K., TEN DIJKE, P., SUGINO, H. & NISHIHARA, T. 1999. Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells. *J Biol Chem*, 274, 13637-42.
- ITO, Y. & MIYAZONO, K. 2003. RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling. *Curr Opin Genet Dev*, 13, 43-7.
- ITOH, S., ITOH, F., GOUMANS, M. J. & TEN DIJKE, P. 2000. Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins. *Eur J Biochem*, 267, 6954-67.
- ITOH, S., LANDSTROM, M., HERMANSSON, A., ITOH, F., HELDIN, C. H., HELDIN, N. E. & TEN DIJKE, P. 1998. Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7. *J Biol Chem*, 273, 29195-201.
- JANG, J. H. & CHUNG, C. P. 2002. A novel splice variant of fibroblast growth factor receptor 2 in human leukemia HL-60 cells. *Blood Cells Mol Dis*, 29, 133-7.

- JIMENEZ-ZEPEDA, V. H., NEME-YUNES, Y. & BRAGGIO, E. 2011. Chromosome abnormalities defined by conventional cytogenetics in plasma cell leukemia: what have we learned about its biology? *Eur J Haematol*, 87, 20-7.
- JONES, S. N., HANCOCK, A. R., VOGEL, H., DONEHOWER, L. A. & BRADLEY, A. 1998. Overexpression of Mdm2 in mice reveals a p53-independent role for Mdm2 in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 15608-12.
- KALO, E., BUGANIM, Y., SHAPIRA, K. E., BESSERGLICK, H., GOLDFINGER, N., WEISZ, L., STAMBOLSKY, P., HENIS, Y. I. & ROTTER, V. 2007. Mutant p53 attenuates the SMAD-dependent transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) signaling pathway by repressing the expression of TGF-beta receptor type II. *Mol Cell Biol*, 27, 8228-42.
- KAMIYA, N. 2012. The role of BMPs in bone anabolism and their potential targets SOST and DKK1. *Curr Mol Pharmacol*, 5, 153-63.
- KASTRITIS, E. & DIMOPOULOS, M. A. 2007. Thalidomide in the treatment of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol*, 20, 681-99.
- KASTRITIS, E., MIGKOU, M., GAVRIATOPOULOU, M., ZIROGIANNIS, P., HADJIKONSTANTINOOU, V. & DIMOPOULOS, M. A. 2009. Treatment of light chain deposition disease with bortezomib and dexamethasone. *Haematologica*, 94, 300-2.
- KAWAMURA, C., KIZAKI, M. & IKEDA, Y. 2002. Bone morphogenetic protein (BMP)-2 induces apoptosis in human myeloma cells. *Leuk Lymphoma*, 43, 635-9.
- KAWAMURA, C., KIZAKI, M., YAMATO, K., UCHIDA, H., FUKUCHI, Y., HATTORI, Y., KOSEKI, T., NISHIHARA, T. & IKEDA, Y. 2000. Bone morphogenetic protein-2 induces apoptosis in human myeloma cells with modulation of STAT3. *Blood*, 96, 2005-11.
- KEATS, J. J., REIMAN, T., BELCH, A. R. & PILARSKI, L. M. 2006. Ten years and counting: so what do we know about t(4;14)(p16;q32) multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*, 47, 2289-300.
- KELLER, S., NICKEL, J., ZHANG, J. L., SEBALD, W. & MUELLER, T. D. 2004. Molecular recognition of BMP-2 and BMP receptor IA. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 481-8.
- KIRSCH, T., NICKEL, J. & SEBALD, W. 2000. BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II. *EMBO J*, 19, 3314-24.
- KNIGHT, M. N. & HANKENSON, K. D. 2013. Mesenchymal Stem Cells in Bone Regeneration. *Adv Wound Care (New Rochelle)*, 2, 306-316.
- KOBAYASHI, Y. & MIURA, I. 2000. [Relationship between 13q (RB-1 gene) deletion and the prognosis of multiple myeloma]. *Rinsho Ketsueki*, 41, 418-20.
- KOGEVINAS, M., SALA, M., BOFFETTA, P., KAZEROUNI, N., KROMHOUT, H. & HOAR-ZAHM, S. 1998. Cancer risk in the rubber industry: a review of the recent epidemiological evidence. *Occup Environ Med*, 55, 1-12.
- KOTZSCH, A., NICKEL, J., SEHER, A., SEBALD, W. & MULLER, T. D. 2009. Crystal structure analysis reveals a spring-loaded latch as molecular mechanism for GDF-5-type I receptor specificity. *EMBO J*, 28, 937-47.
- KRETZSCHMAR, M. & MASSAGUE, J. 1998. SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling. *Curr Opin Genet Dev*, 8, 103-11.
- KROME, S. 2012. [Multiple myeloma]. *Dtsch Med Wochenschr*; 137 Suppl 1, S14-7.
- KRUEGER, A., BAUMANN, S., KRAMMER, P. H. & KIRCHHOFF, S. 2001. FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol*, 21, 8247-54.
- KUMAR, S. K., LEE, J. H., LAHUERTA, J. J., MORGAN, G., RICHARDSON, P. G., CROWLEY, J., HAESSLER, J., FEATHER, J., HOERING, A., MOREAU, P.,

- LELEU, X., HULIN, C., KLEIN, S. K., SONNEVELD, P., SIEGEL, D., BLADE, J., GOLDSCHMIDT, H., JAGANNATH, S., MIGUEL, J. S., ORLOWSKI, R., PALUMBO, A., SEZER, O., RAJKUMAR, S. V., DURIE, B. G. & INTERNATIONAL MYELOMA WORKING, G. 2012. Risk of progression and survival in multiple myeloma relapsing after therapy with IMiDs and bortezomib: a multicenter international myeloma working group study. *Leukemia*, 26, 149-57.
- KUMAR, S. K., RAJKUMAR, S. V., DISPENZIARI, A., LACY, M. Q., HAYMAN, S. R., BUADI, F. K., ZELDENRUST, S. R., DINGLI, D., RUSSELL, S. J., LUST, J. A., GREIPP, P. R., KYLE, R. A. & GERTZ, M. A. 2008. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood*, 111, 2516-20.
- KUROKAWA, M. & KORNBLUTH, S. 2009. Caspases and kinases in a death grip. *Cell*, 138, 838-54.
- KYLE, R. A. & RAJKUMAR, S. V. 2004. Multiple myeloma. *N Engl J Med*, 351, 1860-73.
- LALAOUI, N., LINDQVIST, L. M., SANDOW, J. J. & EKERT, P. G. 2015. The molecular relationships between apoptosis, autophagy and necroptosis. *Semin Cell Dev Biol*, 39, 63-9.
- LAMKANFI, M., FESTJENS, N., DECLERCQ, W., VANDEN BERGHE, T. & VANDENABEELE, P. 2007. Caspases in cell survival, proliferation and differentiation. *Cell Death Differ*, 14, 44-55.
- LANDGREN, O., LINET, M. S., MCMASTER, M. L., GRIDLEY, G., HEMMINKI, K. & GOLDIN, L. R. 2006. Familial characteristics of autoimmune and hematologic disorders in 8,406 multiple myeloma patients: a population-based case-control study. *Int J Cancer*, 118, 3095-8.
- LANE, D. P. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358, 15-6.
- LAVRIK, I. N. & KRAMMER, P. H. 2012. Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. *Cell Death Differ*, 19, 36-41.
- LEICH, E., WEISSBACH, S., KLEIN, H. U., GRIEB, T., PISCHIMAROV, J., STUHMER, T., CHATTERJEE, M., STEINBRUNN, T., LANGER, C., EILERS, M., KNOP, S., EINSELE, H., BARGOU, R. & ROSENWALD, A. 2013. Multiple myeloma is affected by multiple and heterogeneous somatic mutations in adhesion- and receptor tyrosine kinase signaling molecules. *Blood Cancer J*, 3, e102.
- LENS, D., DE SCHOUWER, P. J., HAMOUDI, R. A., ABDUL-RAUF, M., FARAHAT, N., MATUTES, E., CROOK, T., DYER, M. J. & CATOVSKY, D. 1997. p53 abnormalities in B-cell prolymphocytic leukemia. *Blood*, 89, 2015-23.
- LEWIS, E. B. 1963. Leukemia, Multiple Myeloma, and Aplastic Anemia in American Radiologists. *Science*, 142, 1492-4.
- LIONETTI, M., BARBIERI, M., MANZONI, M., FABRIS, S., BANDINI, C., TODOERTI, K., NOZZA, F., ROSSI, D., MUSTO, P., BALDINI, L. & NERI, A. 2016. Molecular spectrum of TP53 mutations in plasma cell dyscrasias by next generation sequencing: an Italian cohort study and overview of the literature. *Oncotarget*, 7, 21353-61.
- LOKHORST, H. M., SCHATTENBERG, A., CORNELISSEN, J. J., THOMAS, L. L. & VERDONCK, L. F. 1997. Donor leukocyte infusions are effective in relapsed multiple myeloma after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 90, 4206-11.
- LONG, J. S. & RYAN, K. M. 2012. New frontiers in promoting tumour cell death: targeting apoptosis, necroptosis and autophagy. *Oncogene*, 31, 5045-60.
- LOPEZ-ANGLADA, L., GUTIERREZ, N. C., GARCIA, J. L., MATEOS, M. V., FLORES, T. & SAN MIGUEL, J. F. 2010. P53 deletion may drive the clinical evolution and treatment response in multiple myeloma. *Eur J Haematol*, 84, 359-61.
- LUISSI, S., FLORIO, P., REIS, F. M. & PETRAGLIA, F. 2001. Expression and secretion of activin A: possible physiological and clinical implications. *Eur J Endocrinol*, 145, 225-36.

- LUO, J. L., KAMATA, H. & KARIN, M. 2005. The anti-death machinery in IKK/NF-kappaB signaling. *J Clin Immunol*, 25, 541-50.
- MA, Y. L., CAIN, R. L., HALLADAY, D. L., YANG, X., ZENG, Q., MILES, R. R., CHANDRASEKHAR, S., MARTIN, T. J. & ONYIA, J. E. 2001. Catabolic effects of continuous human PTH (1--38) in vivo is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology*, 142, 4047-54.
- MACIAS-SILVA, M., HOODLESS, P. A., TANG, S. J., BUCHWALD, M. & WRANA, J. L. 1998. Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *J Biol Chem*, 273, 25628-36.
- MANGIACAVALLI, S., POCHINTESTA, L., COCITO, F., POMPA, A., BERNASCONI, P., CAZZOLA, M. & CORSO, A. 2013. Correlation between burden of 17P13.1 alteration and rapid escape to plasma cell leukaemia in multiple myeloma. *Br J Haematol*, 162, 555-8.
- MASSAGUE, J., SEOANE, J. & WOTTON, D. 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev*, 19, 2783-810.
- MCCORMACK, N. & O'DEA, S. 2013. Regulation of epithelial to mesenchymal transition by bone morphogenetic proteins. *Cell Signal*, 25, 2856-62.
- MERZ, M., HIELSCHER, T., SECKINGER, A., HOSE, D., MAI, E. K., RAAB, M. S., GOLDSCHMIDT, H., JAUCH, A. & HILLEGASS, J. 2016. Baseline characteristics, chromosomal alterations, and treatment affecting prognosis of deletion 17p in newly diagnosed myeloma. *Am J Hematol*, 91, E473-E477.
- MIYAZAWA, K., SHINOZAKI, M., HARA, T., FURUYA, T. & MIYAZONO, K. 2002. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells*, 7, 1191-204.
- MIYAZONO, K. 2001. [Recent advances in the research on TGF-beta/Smad signaling pathways]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, 46, 105-10.
- MIYAZONO, K., KAMIYA, Y. & MORIKAWA, M. 2010. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem*, 147, 35-51.
- MOCARSKI, E. S., UPTON, J. W. & KAISER, W. J. 2011. Viral infection and the evolution of caspase 8-regulated apoptotic and necrotic death pathways. *Nat Rev Immunol*, 12, 79-88.
- MONTERO, J. A. & HURLE, J. M. 2010. Sculpturing digit shape by cell death. *Apoptosis*, 15, 365-75.
- MOREAU, P. 2012. The future of therapy for relapsed/refractory multiple myeloma: emerging agents and novel treatment strategies. *Semin Hematol*, 49 Suppl 1, S33-46.
- MOUSTAKAS, A. & HELDIN, C. H. 2005. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci*, 118, 3573-84.
- MUELLER, T. D. & NICKEL, J. 2012. Promiscuity and specificity in BMP receptor activation. *FEBS Lett*, 586, 1846-59.
- MULLER, P. A. & VOUSDEN, K. H. 2013. p53 mutations in cancer. *Nat Cell Biol*, 15, 2-8.
- NEBEN, K., LOKHORST, H. M., JAUCH, A., BERTSCH, U., HIELSCHER, T., VAN DER HOLT, B., SALWENDER, H., BLAU, I. W., WEISEL, K., PFREUNDSCHUH, M., SCHEID, C., DUHRSEN, U., LINDEMANN, W., SCHMIDT-WOLF, I. G., PETER, N., TESCHENDORF, C., MARTIN, H., HAENEL, M., DERIGS, H. G., RAAB, M. S., HO, A. D., VAN DE VELDE, H., HOSE, D., SONNEVELD, P. & GOLDSCHMIDT, H. 2012. Administration of bortezomib before and after autologous stem cell transplantation improves outcome in multiple myeloma patients with deletion 17p. *Blood*, 119, 940-8.
- NEWCOMB, E. W. 1995. P53 gene mutations in lymphoid diseases and their possible relevance to drug resistance. *Leuk Lymphoma*, 17, 211-21.

- NICKEL, J., KOTZSCH, A., SEBALD, W. & MUELLER, T. D. 2011. Purification, crystallization and preliminary data analysis of the ligand-receptor complex of the growth and differentiation factor 5 variant R57A (GDF5R57A) and BMP receptor IA (BRIA). *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 67, 551-5.
- NICKEL, J., SEBALD, W., GROPE, J. C. & MUELLER, T. D. 2009. Intricacies of BMP receptor assembly. *Cytokine Growth Factor Rev*, 20, 367-77.
- NIKOLETOPOULOU, V., MARKAKI, M., PALIKARAS, K. & TAVERNARAKIS, N. 2013. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 3448-59.
- NISHIHARA, T., OKAHASHI, N. & UEDA, N. 1993. Activin A induces apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 197, 985-91.
- NORGAARD, N. N., HOLIEN, T., JONSSON, S., HELLA, H., ESPEVIK, T., SUNDAN, A. & STANDAL, T. 2010. CpG-oligodeoxynucleotide inhibits Smad-dependent bone morphogenetic protein signaling: effects on myeloma cell apoptosis and in vitro osteoblastogenesis. *J Immunol*, 185, 3131-9.
- O'DONNELL, M. A., PEREZ-JIMENEZ, E., OBERST, A., NG, A., MASSOUMI, R., XAVIER, R., GREEN, D. R. & TING, A. T. 2011. Caspase 8 inhibits programmed necrosis by processing CYLD. *Nat Cell Biol*, 13, 1437-42.
- OBERST, A., DILLON, C. P., WEINLICH, R., MCCORMICK, L. L., FITZGERALD, P., POP, C., HAKEM, R., SALVESEN, G. S. & GREEN, D. R. 2011. Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature*, 471, 363-7.
- OLINER, J. D., SAIKI, A. Y. & CAENEPEEL, S. 2016. The Role of MDM2 Amplification and Overexpression in Tumorigenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6.
- OLSEN, O. E., WADER, K. F., HELLA, H., MYLIN, A. K., TURESSON, I., NESTHUS, I., WAAGE, A., SUNDAN, A. & HOLIEN, T. 2015. Activin A inhibits BMP-signaling by binding ACVR2A and ACVR2B. *Cell Commun Signal*, 13, 27.
- OLSEN, O. E., WADER, K. F., MISUND, K., VATSVEEN, T. K., RO, T. B., MYLIN, A. K., TURESSON, I., STORDAL, B. F., MOEN, S. H., STANDAL, T., WAAGE, A., SUNDAN, A. & HOLIEN, T. 2014. Bone morphogenetic protein-9 suppresses growth of myeloma cells by signaling through ALK2 but is inhibited by endoglin. *Blood Cancer J*, 4, e196.
- PALUMBO, A. & ANDERSON, K. 2011. Multiple myeloma. *N Engl J Med*, 364, 1046-60.
- PALUMBO, A. & CERRATO, C. 2013. Diagnosis and therapy of multiple myeloma. *Korean J Intern Med*, 28, 263-73.
- PARDALI, K., KOWANETZ, M., HELDIN, C. H. & MOUSTAKAS, A. 2005. Smad pathway-specific transcriptional regulation of the cell cycle inhibitor p21(WAF1/Cip1). *J Cell Physiol*, 204, 260-72.
- PARK, Y., KANG, M. H., SEO, H. Y., PARK, J. M., CHOI, C. W., KIM, Y. H., KIM, I. S., KIM, J. S. & OH, S. C. 2010. Bone morphogenetic protein-2 levels are elevated in the patients with gastric cancer and correlate with disease progression. *Med Oncol*, 27, 1192-9.
- PEARSE, R. N., SORDILLO, E. M., YACCOBY, S., WONG, B. R., LIAU, D. F., COLMAN, N., MICHAELI, J., EPSTEIN, J. & CHOI, Y. 2001. Multiple myeloma disrupts the TRANCE/ osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 11581-6.
- PIEK, E., AFRAKHTE, M., SAMPATH, K., VAN ZOELLEN, E. J., HELDIN, C. H. & TEN DIJKE, P. 1999. Functional antagonism between activin and osteogenic protein-1 in human embryonal carcinoma cells. *J Cell Physiol*, 180, 141-9.
- PONISCH, W., MITROU, P. S., MERKLE, K., HEROLD, M., ASSMANN, M., WILHELM, G., DACHSELT, K., RICHTER, P., SCHIRMER, V., SCHULZE, A., SUBERT, R.,

- HARKSEL, B., GROBE, N., STELZER, E., SCHULZE, M., BITTRICH, A., FREUND, M., PASOLD, R., FRIEDRICH, T., HELBIG, W., NIEDERWIESER, D., EAST GERMAN STUDY GROUP OF H. & ONCOLOGY 2006. Treatment of bendamustine and prednisone in patients with newly diagnosed multiple myeloma results in superior complete response rate, prolonged time to treatment failure and improved quality of life compared to treatment with melphalan and prednisone--a randomized phase III study of the East German Study Group of Hematology and Oncology (OSHO). *J Cancer Res Clin Oncol*, 132, 205-12.
- QUIRK, S. M., PORTER, D. A., HUBER, S. C. & COWAN, R. G. 1998. Potentiation of Fas-mediated apoptosis of murine granulosa cells by interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and cycloheximide. *Endocrinology*, 139, 4860-9.
- RAIMONDI, L., DE LUCA, A., MORELLI, E., GIAVARESI, G., TAGLIAFERRI, P., TASSONE, P. & AMODIO, N. 2016. MicroRNAs: Novel Crossroads between Myeloma Cells and the Bone Marrow Microenvironment. *Biomed Res Int*, 2016, 6504593.
- RAJE, N. & VALLET, S. 2010. Sotatercept, a soluble activin receptor type 2A IgG-Fc fusion protein for the treatment of anemia and bone loss. *Curr Opin Mol Ther*, 12, 586-97.
- RAJKUMAR, S. V. & DURIE, B. G. 2008. Eliminating the complete response penalty from myeloma response criteria. *Blood*, 111, 5759-60.
- RAUERT, H., STUHMER, T., BARGOU, R., WAJANT, H. & SIEGMUND, D. 2011. TNFR1 and TNFR2 regulate the extrinsic apoptotic pathway in myeloma cells by multiple mechanisms. *Cell Death Dis*, 2, e194.
- REDDI, A. H. & REDDI, A. 2009. Bone morphogenetic proteins (BMPs): from morphogens to metabologens. *Cytokine Growth Factor Rev*, 20, 341-2.
- RO, T. B., HOLT, R. U., BRENNE, A. T., HJORTH-HANSEN, H., WAAGE, A., HJERTNER, O., SUNDAN, A. & BORSET, M. 2004. Bone morphogenetic protein-5, -6 and -7 inhibit growth and induce apoptosis in human myeloma cells. *Oncogene*, 23, 3024-32.
- ROSINOL, L., ORIOL, A., TERUEL, A. I., HERNANDEZ, D., LOPEZ-JIMENEZ, J., DE LA RUBIA, J., GRANELL, M., BESALDUCH, J., PALOMERA, L., GONZALEZ, Y., ETXEBESTE, M. A., DIAZ-MEDIAVILLA, J., HERNANDEZ, M. T., DE ARRIBA, F., GUTIERREZ, N. C., MARTIN-RAMOS, M. L., CIBEIRA, M. T., MATEOS, M. V., MARTINEZ, J., ALEGRE, A., LAHUERTA, J. J., SAN MIGUEL, J., BLADE, J. & PROGRAMA PARA EL ESTUDIO Y LA TERAPEUTICA DE LAS HEMOPATIAS MALIGNAS/GRUPO ESPANOL DE MIELOMA, G. 2012. Superiority of bortezomib, thalidomide, and dexamethasone (VTD) as induction pretransplantation therapy in multiple myeloma: a randomized phase 3 PETHEMA/GEM study. *Blood*, 120, 1589-96.
- ROZIAKOVA, L., MISTRİK, M. & BATOROVA, A. 2014. [Pomalidomide in the treatment of relapsed and refractory multiple myeloma]. *Klin Onkol*, 27, 318-25.
- RYOO, H. M., LEE, M. H. & KIM, Y. J. 2006. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene*, 366, 51-7.
- SAWAI, H. & DOMAE, N. 2011. Discrimination between primary necrosis and apoptosis by necrostatin-1 in Annexin V-positive/propidium iodide-negative cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 411, 569-73.
- SCHEUFLER, C., SEBALD, W. & HULSMEYER, M. 1999. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7 Å resolution. *J Mol Biol*, 287, 103-15.
- SCULLEN, T., SANTO, L., VALLET, S., FULCINITI, M., EDA, H., CIRSTEANU, D., PATEL, K., NEMANI, N., YEE, A., MAHINDRA, A. & RAJE, N. 2013. Lenalidomide in combination with an activin A-neutralizing antibody: preclinical rationale for a novel anti-myeloma strategy. *Leukemia*, 27, 1715-21.

- SEBALD, H. J., KLENKE, F. M., SIEGRIST, M., ALBERS, C. E., SEBALD, W. & HOFSTETTER, W. 2012. Inhibition of endogenous antagonists with an engineered BMP-2 variant increases BMP-2 efficacy in rat femoral defect healing. *Acta Biomater*, 8, 3816-20.
- SEBALD, W., NICKEL, J., ZHANG, J. L. & MUELLER, T. D. 2004. Molecular recognition in bone morphogenetic protein (BMP)/receptor interaction. *Biol Chem*, 385, 697-710.
- SECKINGER, A., MEISSNER, T., MOREAUX, J., GOLDSCHMIDT, H., FUHLER, G. M., BENNER, A., HUNDEMER, M., REME, T., SHAUGHNESSY, J. D., JR., BARLOGIE, B., BERTSCH, U., HILLENGASS, J., HO, A. D., PANTESCO, V., JAUCH, A., DE VOS, J., ROSSI, J. F., MOHLER, T., KLEIN, B. & HOSE, D. 2009. Bone morphogenetic protein 6: a member of a novel class of prognostic factors expressed by normal and malignant plasma cells inhibiting proliferation and angiogenesis. *Oncogene*, 28, 3866-79.
- SEYMOUR, A. E., THOMPSON, A. J., SMITH, P. S., WOODROFFE, A. J. & CLARKSON, A. R. 1980. Kappa light chain glomerulosclerosis in multiple myeloma. *Am J Pathol*, 101, 557-80.
- SHEIKH, M. S. & FORNACE, A. J., JR. 2000. Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis. *Leukemia*, 14, 1509-13.
- SINGHAL, S. & MEHTA, J. 2006. Multiple myeloma. *Clin J Am Soc Nephrol*, 1, 1322-30.
- SONNEVELD, P., GOLDSCHMIDT, H., ROSINOL, L., BLADE, J., LAHUERTA, J. J., CAVO, M., TACCHETTI, P., ZAMAGNI, E., ATTAL, M., LOKHORST, H. M., DESAI, A., CAKANA, A., LIU, K., VAN DE VELDE, H., ESSELTINE, D. L. & MOREAU, P. 2013. Bortezomib-based versus nonbortezomib-based induction treatment before autologous stem-cell transplantation in patients with previously untreated multiple myeloma: a meta-analysis of phase III randomized, controlled trials. *J Clin Oncol*, 31, 3279-87.
- STIREWALT, D. L., KOPECKY, K. J., MESHINCHI, S., APPELBAUM, F. R., SLOVAK, M. L., WILLMAN, C. L. & RADICH, J. P. 2001. FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 97, 3589-95.
- SUGATANI, T., ALVAREZ, U. M. & HRUSKA, K. A. 2003. Activin A stimulates IkappaB-alpha/NFkappaB and RANK expression for osteoclast differentiation, but not AKT survival pathway in osteoclast precursors. *J Cell Biochem*, 90, 59-67.
- SUZUKI, K. 2012. Diagnosis and treatment of multiple myeloma and AL amyloidosis with focus on improvement of renal lesion. *Clin Exp Nephrol*, 16, 659-71.
- TAGLIAFERRI, P., ROSSI, M., DI MARTINO, M. T., AMODIO, N., LEONE, E., GULLA, A., NERI, A. & TASSONE, P. 2012. Promises and challenges of MicroRNA-based treatment of multiple myeloma. *Curr Cancer Drug Targets*, 12, 838-46.
- TARTAGLIA, L. A., AYRES, T. M., WONG, G. H. & GOEDEL, D. V. 1993. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*, 74, 845-53.
- TEITELBAUM, S. L. 2000. Bone resorption by osteoclasts. *Science*, 289, 1504-8.
- TEN DIJKE, P. & HILL, C. S. 2004. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci*, 29, 265-73.
- TEOH, G., URASHIMA, M., OGATA, A., CHAUHAN, D., DECAPRIO, J. A., TREON, S. P., SCHLOSSMAN, R. L. & ANDERSON, K. C. 1997. MDM2 protein overexpression promotes proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Blood*, 90, 1982-92.
- TEOH, P. J., CHUNG, T. H., SEBASTIAN, S., CHOO, S. N., YAN, J., NG, S. B., FONSECA, R. & CHNG, W. J. 2014. p53 haploinsufficiency and functional abnormalities in multiple myeloma. *Leukemia*, 28, 2066-74.
- TERPOS, E., KASTRITIS, E., CHRISTOULAS, D., GKOTZAMANIDOU, M., ELEUTHERAKIS-PAPAIKOVOU, E., KANELLIAS, N., PAPTAEODOROU, A.



- & DIMOPOULOS, M. A. 2012. Circulating activin-A is elevated in patients with advanced multiple myeloma and correlates with extensive bone involvement and inferior survival; no alterations post-lenalidomide and dexamethasone therapy. *Ann Oncol*, 23, 2681-6.
- TERPOS, E., MOULOPOULOS, L. A. & DIMOPOULOS, M. A. 2011. Advances in imaging and the management of myeloma bone disease. *J Clin Oncol*, 29, 1907-15.
- TOMLINSON, D. C., BALDO, O., HARNDEN, P. & KNOWLES, M. A. 2007. FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. *J Pathol*, 213, 91-8.
- TREBING, J., EL-MESERY, M., SCHAFER, V., WEISENBERGER, D., SIEGMUND, D., SILENCE, K. & WAJANT, H. 2014. CD70-restricted specific activation of TRAILR1 or TRAILR2 using scFv-targeted TRAIL mutants. *Cell Death Dis*, 5, e1035.
- URIST, M. R., MIKULSKI, A. & LIETZE, A. 1979. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 1828-32.
- VALLET, S., MUKHERJEE, S., VAGHELA, N., HIDESHIMA, T., FULCINITI, M., POZZI, S., SANTO, L., CIRSTEIA, D., PATEL, K., SOHANI, A. R., GUIMARAES, A., XIE, W., CHAUHAN, D., SCHOONMAKER, J. A., ATTAR, E., CHURCHILL, M., WELLER, E., MUNSHI, N., SEEHRA, J. S., WEISSLEDER, R., ANDERSON, K. C., SCADDEN, D. T. & RAJE, N. 2010. Activin A promotes multiple myeloma-induced osteolysis and is a promising target for myeloma bone disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 5124-9.
- VAN DE DONK, N. W., KROGER, N., HEGENBART, U., CORRADINI, P., SAN MIGUEL, J. F., GOLDSCHMIDT, H., PEREZ-SIMON, J. A., ZIJLMANS, M., RAYMAKERS, R. A., MONTEFUSCO, V., AYUK, F. A., VAN OERS, M. H., NAGLER, A., VERDONCK, L. F. & LOKHORST, H. M. 2006. Remarkable activity of novel agents bortezomib and thalidomide in patients not responding to donor lymphocyte infusions following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma. *Blood*, 107, 3415-6.
- VANDENABEELE, P., GALLUZZI, L., VANDEN BERGHE, T. & KROEMER, G. 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 700-14.
- VANDENABEELE, P., GROOTJANS, S., CALLEWAERT, N. & TAKAHASHI, N. 2013. Necrostatin-1 blocks both RIPK1 and IDO: consequences for the study of cell death in experimental disease models. *Cell Death Differ*, 20, 185-7.
- VERCAMMEN, D., BROUCKAERT, G., DENECKER, G., VAN DE CRAEN, M., DECLERCQ, W., FIERS, W. & VANDENABEELE, P. 1998. Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J Exp Med*, 188, 919-30.
- VOGELSTEIN, B., LANE, D. & LEVINE, A. J. 2000. Surfing the p53 network. *Nature*, 408, 307-10.
- WAJANT, H. 2002. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*, 296, 1635-6.
- WAJANT, H. 2011. Increasing complexity in TNFR1 signaling. *FEBS J*, 278, 861.
- WALLIN, A. & LARSSON, S. C. 2011. Body mass index and risk of multiple myeloma: a meta-analysis of prospective studies. *Eur J Cancer*, 47, 1606-15.
- WANG, C. Y., MAYO, M. W., KORNELUK, R. G., GOEDDEL, D. V. & BALDWIN, A. S., JR. 1998. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*, 281, 1680-3.
- WATTEL, E., PREUDHOMME, C., HECQUET, B., VANRUMBEKE, M., QUESNEL, B., DERVITE, I., MOREL, P. & FENAUX, P. 1994. p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies. *Blood*, 84, 3148-57.

- WEBER, D., KOTZSCH, A., NICKEL, J., HARTH, S., SEHER, A., MUELLER, U., SEBALD, W. & MUELLER, T. D. 2007. A silent H-bond can be mutationally activated for high-affinity interaction of BMP-2 and activin type IIB receptor. *BMC Struct Biol*, 7, 6.
- WIEGEL, F. W. & DELISI, C. 1982. Evaluation of reaction rate enhancement by reduction in dimensionality. *Am J Physiol*, 243, R475-9.
- WONG, O. & RAABE, G. K. 1997. Multiple myeloma and benzene exposure in a multinational cohort of more than 250,000 petroleum workers. *Regul Toxicol Pharmacol*, 26, 188-99.
- XU-MONETTE, Z. Y., MEDEIROS, L. J., LI, Y., ORLOWSKI, R. Z., ANDREEFF, M., BUESO-RAMOS, C. E., GREINER, T. C., MCDONNELL, T. J. & YOUNG, K. H. 2012. Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies. *Blood*, 119, 3668-83.
- YOU, L. & KRUSE, F. E. 2002. Differential effect of activin A and BMP-7 on myofibroblast differentiation and the role of the Smad signaling pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, 72-81.
- ZHANG, Y. E. 2009. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res*, 19, 128-39.
- ZIPORI, D. & BARDA-SAAD, M. 2001. Role of activin A in negative regulation of normal and tumor B lymphocytes. *J Leukoc Biol*, 69, 867-73.



