

Aus dem Comprehensive Cancer Center Mainfranken,
Lehrstuhl für Translationale Onkologie
Univ. Prof. Dr. Ralf C. Bargou

**Der Einfluss des JNK-Signaltransduktionsweges
auf Carfilzomib-induzierten fatalen ER-Stress
beim Multiplen Myelom**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Carina Schneider

aus

Würzburg

Würzburg, März 2022

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Ralf C. Bargou

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Andreas Rosenwald

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Oktober 2022

Die Promovendin ist Ärztin

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Das Multiple Myelom	1
1.1.1. Definition und Historie	1
1.1.2. Epidemiologie und Ätiologie	2
1.1.3. Klinische Manifestation	3
1.1.4. Diagnostik und Stadieneinteilung	5
1.1.5. Therapie und Prognose	9
1.2. Die Pathogenese des Multiplen Myeloms	15
1.2.1. Die physiologische Plasmazellentwicklung	15
1.2.2. Die Pathogenese des Multiplen Myeloms als Mehrstufenmodell	17
1.2.4. Epigenetische Veränderungen beim Multiplen Myelom	20
1.2.5. Klonale Heterogenität beim Multiplen Myelom	20
1.3. Molekularbiologische Grundlagen	21
1.3.1. Das Endoplasmatische Retikulum, die <i>Unfolded Protein Response</i> und der JNK-Signaltransduktionsweg	21
1.3.2. Proteasominhibitoren	26
2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	29
3. MATERIAL UND GERÄTE	30
3.1. Geräte und Gebrauchsgegenstände	30
3.2. Verbrauchsmaterialien	31
3.3. Chemikalien	31
3.4. Puffer und Lösungen	33
3.5. Medium und Antibiotika	34
3.6. Primärantikörper	35
3.7. Sekundärantikörper	37
3.8. Pharmakologisch aktive Substanzen	37
3.9. Zelllinien	37
3.10. Software und Datenbanken	38
4. METHODEN	39
4.1. Zellkultur	39
4.2. Zellzahlbestimmung mit Neubauer-Zählkammer	40
4.3. Western Blot-Analyse	40

4.3.1. Ansatz und Proteinlyse	40
4.3.2. Proteinbestimmung mittels modifizierten Lowry-Assay.....	41
4.3.3. SDS-Gelelektrophorese	42
4.3.4. Semidry-Blot	44
4.3.5. Strippen der Membranen	46
4.4. Viabilitätsanalyse mittels Durchflusszytometrie	46
5. ERGEBNISSE	49
5.1. JNK-Aktivierung durch Anisomycin induziert Apoptose in AMO-1- und AMO-1-R65Car-Zellen	49
5.2. JNK-Inhibition führt in Abwesenheit weiterer Stressfaktoren zu keiner Beeinträchtigung der Viabilität von AMO-1- und AMO-1-R65Car-Zellen	50
5.3. CC-930 unterdrückt den durch fatalen ER-Stress induzierten JNK-Signaltransduktionsweg und schützt AMO-1-Zellen vor Apoptose.....	51
5.4. JNK-Inhibition verstärkt die apoptotische Wirkung des Proteasominhibitors Carfilzomib auf AMO-1-Zellen.....	55
5.5. Anisomycin und Carfilzomib haben synergistische Wirkung auf AMO-1R65Car-Zellen	59
6. DISKUSSION	63
7. ZUSAMMENFASSUNG	72
SUMMARY	74
8. LITERATURVERZEICHNIS	76
APPENDIX	
I ABBILDUNGSVERZEICHNIS	
II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	
III TABELLENVERZEICHNIS	
IV DANKSAGUNG	
V LEBENS LAUF	

1. EINLEITUNG

1.1. Das Multiple Myelom

1.1.1. Definition und Historie

Das Multiple Myelom (MM) ist eine maligne hämatologische Erkrankung, welche nach aktueller WHO-Klassifikation den indolenten B-Zell-Lymphomen zugeordnet wird (1). Die Erkrankung wird durch die Proliferation eines maligne transformierten Plasmazellklons im Knochenmark verursacht, der komplette oder inkomplette Immunglobuline produziert. Am häufigsten finden sich monoklonale Antikörper des IgG- (53%) und des IgA-Typs (25 %), gefolgt von ausschließlich Leichtkettenproduzierenden MM (20 %). Dagegen sind das IgD- und das asekretorische MM mit jeweils 1 % aller Myelome relativ selten. Das klinische Bild der Erkrankung wird durch die Verdrängung der Hämatopoese, die Entwicklung einer Immundefizienz, die osteolytische Knochendestruktion und die hohen Immunglobulin-Konzentrationen verursacht (2-4).

Der erste gut dokumentierte Fall stammt aus dem Jahr 1844 von Dr. Solly, der die Symptomatik der 39-jährigen Sarah Newbury beschrieb, welche sich mit Fatigue und Knochenschmerzen bei multiplen pathologischen Frakturen vorgestellt hatte. Er ging zunächst von einem entzündlichen Prozess aus. Bei der Urinuntersuchung fiel eine „veränderte Konsistenz“ auf, die vier Jahre später vorgenommene Autopsie zeigte „eine rötliche, das Knochenmark verdrängende Substanz“. Die Krankheit bezeichnete er als *Mollities ossium* (Knochenerweichung) (5, 6).

Dr. Sollys Befunde deckten sich mit einem anderen, 1850 von Dr. Macintyre beschriebenen Fall (7). Dr. Macintyre schenkte besonders dem veränderten Urin seines 46-jährigen Patienten Thomas McBean Aufmerksamkeit und schickte eine Probe davon an den renommierten Pathologen Henry Bence Jones. Dieser fand im Urin ein Protein, das er als *Mollities ossium*-spezifisches Protein bezeichnete. Später wurde dieses als freie, monoklonale Ig-Leichtkette identifiziert und als Bence-Jones-Protein nach ihm

benannt. Es besitzt bis heute eine wichtige diagnostische Bedeutung für das Multiple Myelom (5, 7).

Die früher verwendete Bezeichnung „Morbus Kahler“ ging auf den Wiener Arzt Otto Kahler zurück, der 1889 ebenfalls einen der frühesten bekannten Myelomfälle beschrieb (5, 8). Der Terminus ist heute allerdings nicht mehr geläufig.

1.1.2. Epidemiologie und Ätiologie

Mit einer Inzidenz von 5 von 100 000 Einwohnern pro Jahr in der westlichen Welt macht das Multiple Myelom etwa 1 % aller Krebsneuerkrankungen und 13 % der hämatologischen Krebsneuerkrankungen pro Jahr aus (9).

Das mediane Erkrankungsalter liegt zwischen 66 und 70 Jahren, Männer sind anteilig etwas häufiger betroffen als Frauen (10).

Die genaue Ätiopathogenese des MM ist bis heute nicht hinreichend geklärt. Neben Risikofaktoren wie einem hohen Lebensalter oder männliches Geschlecht wird der Einfluss von ionisierender Strahlung, Adipositas, Infektionskrankheiten und rheumatischen Erkrankungen auf die Myelomentstehung diskutiert (11, 12). Auch eine genetische Komponente wird vermutet, da in einigen Fällen eine familiäre Häufung beobachtet werden kann. Hinweisend hierfür ist auch die signifikant erhöhte Inzidenz in der afroamerikanischen Bevölkerung. So zeigen US-Amerikanische Studien ein doppelt so häufiges Vorkommen bei Afroamerikanern im Vergleich zu Kaukasiern bei gleichzeitig jüngerem mittlerem Erkrankungsalter (13). Die Ursache für die ethnische Variabilität der Erkrankungsinzidenz konnte bisher allerdings noch nicht gefunden werden.

Vom Krankheitsbild des Multiplen Myeloms abzugrenzen ist die Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS), die als prämalignes Stadium angesehen wird. Sie ist durch das Vorkommen monoklonaler Antikörper im Serum in Konzentrationen unter 3 g/dl sowie weniger als 10 % Plasmazellen im Knochenmark definiert. Im Gegensatz zum MM ist die MGUS zumeist symptomfrei und geht nicht mit Endorganschäden einher; die Patienten bedürfen keiner Therapie. Jedoch liegt die jährliche Progressionsrate zum Multiplen Myelom bei 1 %. Des Weiteren steigt bei

vorliegender MGUS auch das Risiko für andere Plasmazellneoplasien wie Morbus Waldenström (Immunozytom), B-Zell-Lymphome und AL-Amyloidose (14, 15).

Eine Zwischenstufe bei der Progression von der MGUS zum MM stellt das *Smouldering Myeloma* (schwelendes MM) dar. Wie die MGUS ist auch dieses zumeist asymptomatisch und ohne Endorganschäden, es liegen jedoch höhere monoklonale Antikörperkonzentrationen im Serum und ein höherer Plasmazellanteil im Knochenmarksausstrich vor. Die jährliche Progressionsrate vom *Smouldering Myeloma* in ein symptomatisches Multiples Myelom liegt bei etwa 10 % (16).

1.1.3. Klinische Manifestation

Zu den häufigsten Symptomen im Frühstadium der Erkrankung zählen unspezifische Allgemeinsymptome wie Abgeschlagenheit, Müdigkeit und B-Symptomatik (17).

Die zunehmende Proliferation maligner Plasmazellen im Knochenmark führt zu einer Verdrängung der physiologischen Hämatopoese. Daraus resultieren im Krankheitsverlauf Anämie, Leukozytopenie mit einhergehend gesteigerter Infektanfälligkeit und Blutungsneigung durch Thrombozytopenie (18).

Eine Anämie liegt bei 70 % der Patienten mit neu diagnostiziertem Multiplem Myelom vor. Bei symptomatischer Anämie klagen die Patienten insbesondere über Abgeschlagenheit und Belastungsdyspnoe, es fällt ein blasses Hautkolorit auf. Häufig bleibt die Anämie jedoch auch asymptomatisch und wird lediglich als Zufallsbefund im Rahmen von Blutuntersuchungen diagnostiziert. Es handelt sich meist um eine normochrome und normozytäre Anämie, seltener kommen makrozytäre Formen vor (19).

90 % aller Myelompatienten weisen eine erhöhte Infektanfälligkeit auf. Eine 2015 in der Fachzeitschrift *Haematologica* veröffentlichte schwedische Studie wies ein 7-fach gesteigertes Risiko für bakterielle Infektionen nach, virale Infektionen kämen 10-fach häufiger vor als bei Patienten ohne Multiples Myelom. Zudem zählen Infektionen zu den führenden Todesursachen bei Myelompatienten (20). Ursächlich für die gesteigerte Infektanfälligkeit ist zum einen die durch Knochenmarkinsuffizienz bedingte Leukopenie, zum anderen ein sekundäres Antikörpermangelsyndrom. Die Verdrängung von physiologischen Plasmazellen führt zu einer Reduktion der Produktion von

funktionsfähigen polyklonalen Antikörpern, das von Myelomzellen sezernierte Paraprotein erfüllt keine Funktion in der Abwehr von Infektionen. Somit ist neben dem zellulären auch das humorale Immunsystem kompromittiert.

Ab einer Serumkonzentration von etwa 10-12 g/dl können Paraproteine oder Leichtketten (Bence-Jones-Protein) zu einem Hyperviskositätssyndrom mit Mikrozirkulationsstörung führen. Dies wird bei 1-3 % der Myelompatienten beobachtet und manifestiert sich unter anderem in Form von neurologischen Symptomen wie Hörstörungen, Schwindel und Paresen. Auch hämorrhagische Diathesen und Nierenfunktionsstörungen durch Verstopfung von Glomeruli kommen vor. Die Paraprotein-bedingte Erhöhung des Plasmavolumens hat häufig eine Herzinsuffizienzsymptomatik zur Folge (18).

Bei bis zu 10 % der Patienten mit einem Multiplen Myelom kommt es im Krankheitsverlauf durch Ablagerung von Paraproteinen zu einer AL-Amyloidose, welche vor allem das Herz, die Nieren und den Gastrointestinaltrakt betrifft (4).

Myelom-typisch sind zudem Knochenschmerzen durch Osteolysen und Osteoporose, welche auf die Überproduktion von Osteoklasten-stimulierendem RANKL-Faktor und Osteoblasten-inhibierendem DKK1-Faktor durch Myelomzellen zurückgeführt werden. Die Patienten klagen häufig schon weit vor der Diagnosestellung des Multiplen Myeloms über Rückenschmerzen, welche allerdings meist lange fehlinterpretiert und mit Analgetika behandelt werden (18). Einer Studie zufolge liegen bei Diagnosestellung bei etwa 50 % der Patienten bereits Sinterungsfrakturen der Wirbelkörper vor, 30 % weisen pathologische Frakturen anderer Knochen auf (21). Wirbelkörperfrakturen bedingen durch Sinterung eine Abnahme der Körpergröße, können jedoch auch gravierende Komplikationen wie Querschnittslähmungen nach sich ziehen. In späten Stadien hat der gesteigerte Knochenabbau eine Hyperkalzämie zur Folge, welche sich klinisch mit Bewusstseinsstörungen, Vigilanzminderung bis hin zum Koma und Übelkeit und Emesis äußern kann. An der Niere führt die erhöhte Kalziumkonzentration zu Polyurie mit einhergehender Dehydratation. Infolge dessen kommt es zu einer Einschränkung der Nierenfunktion, welche bis zum akuten Nierenversagen führen kann. Selten tritt eine Nephrokalzinose auf (4).

Auch andere Pathomechanismen führen beim Multiplen Myelom zu einer Nierenbeteiligung und machen die Nieren somit zu einem der

Hauptmanifestationsorgane der Erkrankung. Bereits bei Diagnosestellung weisen 20-40 % der Patienten ein akutes Nierenversagen auf (22). Dieser Umstand lässt sich auf verschiedene Mechanismen zurückführen. Wie oben angeführt, spielt zum einen die Osteolyse-bedingte Hyperkalzämie eine Rolle bei der Entstehung und Progression einer Niereninsuffizienz. Wichtiger ist der Beitrag, den die Akkumulation von Leichtketten insbesondere im distalen Tubulus und im Sammelrohr zum Nierenfunktionsverlust leistet (Cast-Nephropathie). Dieser Effekt ist insbesondere beim Bence-Jones-MM zu beobachten. Weitere Faktoren, die die Entstehung einer Niereninsuffizienz begünstigen, sind die Einnahme von Analgetika zur Therapie von Knochenschmerzen, Harnwegsinfekte aufgrund der eingeschränkten Immunabwehr sowie die antibiotische Therapie bakterieller Infekte und Dehydratation (23). Auch eine AL-Amyloidose kann die Niere betreffen und ihre Funktion beeinträchtigen. Die klinische Manifestation der Nierenbeteiligung reicht abhängig von der Schwere des Defekts von einem nephrotischen Syndrom über die akute und chronische Niereninsuffizienz bis hin zum dialysepflichtigen Nierenversagen, welches in etwa 10 % der Fälle eintritt (4). Eine fortgeschrittene renale Insuffizienz kann durch die Entstehung einer renalen Anämie die beim Multiplen Myelom ohnehin häufig auftretende Anämiesymptomatik verstärken.

1.1.4. Diagnostik und Stadieneinteilung

Während es sich bei der Diagnose der MGUS meist um einen Zufallsbefund handelt, sollten Anämie und Hyperkalzämie, eine eingeschränkte Nierenfunktion sowie Knochenschmerzen und B-Symptomatik in der Anamnese Anlass zur diagnostischen Abklärung eines Multiplen Myeloms geben.

Laborchemisch kann häufig bereits in frühen Stadien eine durch Knochenmarkinsuffizienz bedingte normochrome und normozytäre Anämie nachgewiesen werden. Die Ausprägung selbiger lässt Rückschlüsse auf den Krankheitsfortschritt zu: Je größer die Tumormasse und damit die Verdrängung der physiologischen Hämatopoese im Knochenmark, desto niedriger der Hämoglobinwert. Zudem sollten Serumkalzium, Nierenretentionsparameter, LDH, Gesamteiweiß und β_2 -Mikroglobulin im Serum bestimmt werden. Letzteres wird von Plasmazellen

synthetisiert und korreliert mit der Tumorzellmasse, die Ausscheidung erfolgt renal und ist bei Niereninsuffizienz eingeschränkt. Eine stark beschleunigte Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) von häufig über 100 mm innerhalb der ersten Stunde kann hinweisend auf ein Myelom sein, jedoch schließt eine normale BSG ein Multiples Myelom nicht aus und kommt vor allem beim Bence-Jones-Myelom vor. Zudem sollte der 24-h-Sammelurin mittels Immunfixation auf Leichtketten untersucht werden, da eine Bence-Jones-Proteinurie durch routinemäßig verwendete Urinteststreifen nicht nachgewiesen werden kann (4, 16).

Die Serumeiweißelektrophorese zeigt in den meisten Fällen einen sogenannten „M-Gradienten“ im γ -Globulin-Bereich, welcher durch die erhöhte Sekretion von Paraprotein verursacht ist. Der M-Gradient ist typisch für monoklonale Gammopathien, kann beim Bence-Jones-Myelom oder dem asekretorischen Myelom jedoch auch fehlen. Der Nachweis der Monoklonalität der Paraproteine und die Spezifizierung des jeweiligen Subtypus gelingen mittels Immunfixation, die Quantifizierung des Immunglobulins kann mittels Immunnephelometrie erfolgen. Zusätzlich können mittels hochsensitiver Assays freie κ - und λ -Leichtketten im Serum nachgewiesen sowie deren Quotient errechnet werden. Hiermit ist eine sensitivere Diagnostik auch in frühen Erkrankungsstadien möglich und der Übergang einer MGUS oder eines *Smouldering Myeloma* in ein Multiples Myelom kann beurteilt werden (4, 16, 17).

Zur Diagnosesicherung ist eine Knochenmarkpunktion mit Aspiration und Entnahme eines Knochenmarkstanzzyllinders unerlässlich. Das entnommene Material sollte anschließend zytopathologisch, zytogenetisch mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH), immunhistochemisch und durchflusszytometrisch untersucht werden. Nach den 2014 aktualisierten Kriterien der *International Myeloma Working Group* gilt die Diagnose Multiples Myelom bei Vorliegen von mindestens 10 % Plasmazellen im Knochenmarkausstrich oder histologischem Nachweis von mindestens einem extramedullären Plasmazytomherd und gleichzeitigem Vorhandensein von Myelom-definierenden Kriterien als gesichert. Zu den Myelom-definierenden Kriterien zählen Plasmazell-assoziierte Endorganschäden, bei Fehlen selbiger kann ein Myelom aber auch anhand von Biomarkern diagnostiziert werden, welche mit einem mindestens 80 %-igen Risiko einhergehen, innerhalb von 24 Monaten Endorganschäden zu entwickeln (2). Die Plasmazell-assoziierten Endorganschäden werden unter dem

Akronym „CRAB-Kriterien“ zusammengefasst und beinhalten Hyperkalzämie (engl. *hypercalcemia*), Niereninsuffizienz (engl. *renal disease*), Anämie (engl. *anemia*) und Knochenläsionen (engl. *bone disease*). Während die drei erstgenannten Erscheinungen laborchemisch abgeklärt werden können, wird zur Diagnostik von Osteolysen und Osteopenie heute die Durchführung eines *low-dose* Ganzkörper-CT des Skeletts empfohlen, alternativ können MRT oder PET-CT zum Einsatz kommen (24). Knochenmanifestationen finden sich vor allem in Wirbelkörpern, Rippen, Becken, Sternum und Schädel. Durch Osteolysen der Schädelkalotte kommt es zum typischen Bild des „Schrotschussschädels“. Extramedulläre Herde und Rückenmarkbeteiligung bei Befall der Wirbelsäule können mittels MRT identifiziert werden.

Zu den Myelom-definierenden Biomarkern zählen der magnetresonanztomographische Nachweis von mehr als einem fokalen Knochen- oder Knochenmarkherd, ein pathologischer κ/λ -Leichtketten-Quotient und das Vorhandensein mindestens 60 % monoklonaler Plasmazellen im Knochenmarkausstrich (16, 17).

Zum *Staging* des Multiplen Myeloms und Abschätzen der Tumorlast und der damit einhergehenden Prognose wurden verschiedene Klassifikationssysteme entwickelt. Die Stadieneinteilung nach Durie und Salmon aus dem Jahr 1975 hat heute aufgrund mangelhafter prognostischer Aussagekraft eher historische Relevanz. Anhand laborchemischer und klinischer Parameter werden die Myelompatienten hier in drei Stadien eingeteilt (siehe Tabelle 1); die Einteilung lässt Rückschlüsse auf die Tumorlast zu. Zusätzlich erfolgt zur Verbesserung der prognostischen Aussagekraft eine Subklassifikation anhand des Kreatinin-Wertes im Serum: Patienten mit einer normalen Nierenfunktion und einem Kreatinin-Wert von unter 2 mg/dl (A) werden von solchen mit eingeschränkter Nierenfunktion und einem Kreatinin-Wert ab 2 mg/dl (B) unterschieden (25).

Als gängigeres Klassifikationssystem wird heute die ISS (*International Staging System*)-Stadieneinteilung verwendet. Diese wurde im Jahr 2005 von der *International Myeloma Working Group* etabliert und 2015 überarbeitet (*Revised-International Staging System*, R-ISS). In die ursprüngliche Klassifikation von 2005 gingen lediglich β_2 -Mikroglobulin und Albumin als prognostisch relevante Parameter ein, 2015 erfolgte die Erweiterung um zytogenetische Parameter und LDH (siehe Tabelle 2). Als Hochrisiko-Zytogenetik werden insbesondere drei Mutationen zusammengefasst:

t(4;14), t(14;16) und del(17p) (26). Im Vergleich zur Stadieneinteilung nach Durie und Salmon bietet die R-ISS-Klassifikation eine deutlich bessere prognostische Aussagekraft. Auch diese teilt Patienten in drei Stadien ein, wobei Stadium III mit der schlechtesten Prognose einhergeht.

Tabelle 1: Die Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms nach Durie und Salmon (25).

Stadium	Kriterien
I	Alle folgenden Kriterien müssen erfüllt sein: <ul style="list-style-type: none"> - Hämoglobinwert > 10 g/dl - Normwertiges Serumkalzium - Maximal eine solitäre Osteolyse - IgG < 5 g/dl - IgA < 3 g/dl - Bence-Jones-Protein im Urin < 4 g/24 h
II	Weder zu Stadium I noch Stadium III passend
III	Mindestens eines der folgenden Kriterien muss erfüllt sein: <ul style="list-style-type: none"> - Hämoglobinwert < 8,5 g/dl - Hyperkalzämie - Multiple osteolytische Herde - IgG > 7 g/dl - IgA > 5 g/dl - Bence-Jones-Protein im Urin > 12 g/24 h

Tabelle 2: Die Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms nach Revised International Staging System R-ISS (26).

Stadium	Kriterien
I	Alle folgenden Kriterien müssen erfüllt sein: <ul style="list-style-type: none"> - β_2-Mikroglobulin im Serum < 3,5 mg/l - Serumalbumin \leq 3,5 g/dl - Normwertige LDH - Keine Hochrisiko-Zytogenetik
II	Weder zu Stadium I noch Stadium III passend
III	<ul style="list-style-type: none"> - β_2-Mikroglobulin im Serum > 5,5 mg/l Zusätzlich muss mindestens eines der folgenden Kriterien erfüllt sein: <ul style="list-style-type: none"> - Hochrisiko-Zytogenetik - Erhöhte LDH

1.1.5. Therapie und Prognose

Grundsätzlich ergibt sich eine Therapieindikation bei jedem Patienten mit der Diagnose eines Multiplen Myeloms, das heißt bei Erfüllung der Diagnosekriterien der *International Myeloma working group* (2). Die monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz sowie das *Smouldering Myeloma* werden nach aktuellen Leitlinien nicht behandelt (27). Eine klinische Studie aus dem Jahr 2013 zeigte für das *Smouldering Myeloma* jedoch eine deutlich verlängerte Zeitdauer bis zur Progression in ein Multiples Myelom bei Patienten, welche mit Lenalidomid und Dexamethason therapiert wurden, sodass die frühe Therapie im Stadium des *Smouldering Myeloma* aktuell Gegenstand weiterer Forschung und Diskussion darstellt (28).

Neue Medikamente und Therapieansätze konnten die Überlebensrate von Patienten mit einem Multiplen Myelom innerhalb der vergangenen Jahre deutlich verbessern. Dennoch handelt es sich bis heute in den meisten Fällen um eine unheilbare Erkrankung, systemische und adjuvante Therapien sind lediglich in der Lage, eine Progression hinauszuzögern. Vorrangige Therapieziele sind die Kontrolle der Krankheitsaktivität durch Reduktion der Proliferation des malignen Plasmazellklons und die Verbesserung myelomassoziierter Symptome wie Knochenschmerzen, Niereninsuffizienz und Anämie (29). Unbehandelt liegt die mediane Überlebenszeit von Patienten mit einem Multiplen Myelom bei etwa 4 bis 11 Monaten (30), moderne Therapieoptionen ermöglichen eine mittlere Überlebensdauer von bis zu 7,7 Jahren (31).

Für die Chemo- und Immuntherapie stehen verschiedene Substanzgruppen zur Verfügung. Alkylanzien wie Melphalan oder Cyclophosphamid sowie Glukokortikoide (Prednison, Dexamethason) kommen bereits seit vielen Jahren in der Myelomtherapie zum Einsatz und stellten lange Zeit die einzige verfügbare Therapieoption dar. Die verbesserte Überlebensdauer ist insbesondere auf die Entwicklung und Zulassung neuer zielgerichteter Substanzen zurückzuführen, welche eine spezifische Therapie und damit einhergehend eine Reduktion der therapiebedingten Nebenwirkungen ermöglichen. Hierzu gehören unter anderem die Substanzklassen der Proteasominhibitoren, auf deren Wirkweise im Kapitel 1.3.2. eingegangen wird, und der Cereblon-bindenden

Immunmodulatoren. Der erste seiner Klasse und aktuell noch gängigste Vertreter der Proteasominhibitoren ist Bortezomib, die beiden neueren Substanzen Carfilzomib und Ixazomib sind bisher nur bei therapierefraktärem Verlauf oder der Behandlung von Rezidiven zugelassen. Der pan-Histon-Deacetylase-Inhibitor Panobinostat wurde vor einigen Jahren als Kombinationspartner von Bortezomib zugelassen. Die Cereblon-bindenden immunmodulatorischen Wirkstoffe, zu denen Thalidomid, Lenalidomid und Pomalidomid zählen, bilden eine wichtige Säule der modernen MM-Therapie und finden sich in zahlreichen Therapieprotokollen aller Therapielinien. Die monoklonalen Antikörper gegen CD138 (Daratumumab) und gegen CD319 (Elotuzumab) spielen sowohl bei Therapierefraktärität und Rezidiven als auch bei neuen Erstlinientherapieansätzen mittlerweile eine sehr wichtige Rolle (17, 27, 29). Neu zugelassen bei refraktären und rezidivierten MM wurde das Antikörper-Drug-Konjugat Belantamab-Mafodotin, sowie der erste CAR-T-Zellansatz mit Idecabtagene vicleucel.

Die Auswahl eines geeigneten Therapieschemas hängt von verschiedenen Faktoren ab. Generell werden Patienten in zwei Gruppen unterteilt: Diejenigen, welche für eine Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation infrage kommen und diejenigen, für die eine Stammzelltransplantation keine Alternative darstellt. Die Unterscheidung zwischen den beiden Gruppen wurde lange altersabhängig getroffen; Patienten über 65 Jahre erhielten demnach keine Stammzelltransplantation (32, 33). Neuere Studien zeigten allerdings eine zweitrangige Bedeutung des biographischen Alters, eine weitaus größere Rolle spielt das biologische Alter, welches durch Gebrechlichkeit und das Vorliegen von Komorbiditäten wie Herz- und Lungenerkrankungen bestimmt wird (34). Ein von der *International Myeloma Working Group* etablierter Score erleichtert die Entscheidungsfindung anhand dieser neu definierten Kriterien (35).

Bei jüngeren Patienten ohne relevante Vorerkrankungen besteht die Erstlinientherapie aus einem mehrschrittigen Schema. Nach einer initialen Induktionstherapie mit Bortezomib, Lenalidomid und Dexamethason (27) zur Reduktion der Tumormasse werden Stammzellen mittels Apherese aus dem peripheren Blut entnommen. Anschließend erfolgen eine myeloablative Hochdosis-Chemotherapie mit 200 mg/m^2

Melphalan und die autologe Retransplantation der Stammzellen. Daran schließt sich eine mehrjährige Erhaltungphase an (27).

Insbesondere jüngere Patienten profitieren aktuellen Studien zufolge nach Stammzelltransplantation von einer Erhaltungstherapie. Für Lenalidomid konnte in dieser Patientengruppe sowohl eine Verlängerung der progressionsfreien Überlebenszeit als auch des Gesamtüberlebens gezeigt werden. Bei älteren Patienten und solchen mit Hochrisiko-Genetik ist der Nutzen der Erhaltungstherapie für das Gesamtüberleben noch umstritten (36).

Patienten mit neu diagnostiziertem Multiplem Myelom, welche aufgrund ihres Gesamtzustandes und ihrer Komorbiditäten nicht für eine Stammzelltransplantation infrage kommen, sollten aktuellen Leitlinien zufolge eine Chemo- und Immuntherapie mit Bortezomib, Melphalan und Prednison oder Lenalidomid und Dexamethason erhalten. Das Kombinationsschema aus Bortezomib, Lenalidomid und Dexamethason ist im klinischen Setting verbreitet, jedoch für die genannte Patientengruppe nicht offiziell zugelassen (27). Auch der monoklonale Antikörper Daratumumab kommt *off-label* in der Erstlinientherapie zum Einsatz und führt ersten Studien zufolge zu einer signifikanten Verbesserung des progressionsfreien Überlebens (37). Bei gebrechlichen Patienten oder ausgeprägten Vorerkrankungen muss eine Dosisanpassung der verschiedenen Therapeutika stattfinden. Die Erhaltungstherapie erfolgt mit Lenalidomid oder Bortezomib und sollte, sofern durch den Patienten toleriert, bis zum Eintreten eines Rezidivs durchgeführt werden (29).

Auch für Patienten mit gegenüber Bortezomib und Lenalidomid refraktärem Krankheitsverlauf oder mit einem Rezidiv stehen verschiedene Therapieoptionen zur Verfügung. Rezidive sind beim Multiplen Myelom generell häufig, viele Patienten durchleben im Krankheitsverlauf mehrere Phasen einer Remission mit anschließendem Rezidiv, sodass von einer chronischen Erkrankung gesprochen werden kann (29).

Die Auswahl des Therapieschemas richtet sich auch hier nach Alter und Gesamtzustand, außerdem beeinflusst die vorangegangene Therapie und das Ansprechen auf selbige die Entscheidungsfindung. Geeigneten Patienten, welche im Rahmen der Initialtherapie eine Stammzelltransplantation erhalten und diese gut toleriert haben, kann beim ersten Rezidiv eine erneute Hochdosis-Chemotherapie mit

anschließender autologer Stammzelltransplantation angeboten werden. In seltenen Fällen kann auch eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt werden.

Stellt eine Hochdosis-Chemotherapie mit Stammzelltransplantation keine Alternative dar, kommen zielgerichtete Immun- und Chemotherapeutika zum Einsatz. Die Auswahl entsprechender Substanzen hat sich innerhalb der letzten Jahre deutlich vergrößert und ermöglicht nun auch nach dem ersten Rezidiv eine Verbesserung der Überlebenszeit. So sind für die Zweitlinientherapie auch die beiden neueren Proteasominhibitoren Carfilzomib und Ixazomib zugelassen, welche als Triple-Kombination mit Dexamethason und Lenalidomid verabreicht werden sollten. Alternative Kombinationen sind Panobinostat mit Dexamethason und Bortezomib sowie Elotuzumab mit Dexamethason und Lenalidomid. Bei Refraktärität gegenüber Proteasominhibitoren und immunmodulierenden Substanzen kann Daratumumab als Monotherapie eingesetzt werden (27, 29).

Weitere Substanzen wie der Kinesin-Spindel-Protein-Inhibitor Filanesib und der Exportin-1-Inhibitor Selinexor werden aktuell im Rahmen klinischer Studien erprobt und zeigen vielversprechende Ergebnisse bei Patienten mit refraktärer Myelomerkrankung und mit Rezidiven (38, 39). Große Hoffnungen werden insbesondere bei Patienten, welche bereits mit multiplen Substanzgruppen vortherapiert sind, in die zelluläre Therapie mit *chimeric antigen receptor* (CAR)-T-Zellen gesetzt. Derzeit laufende Studien untersuchen die Wirksamkeit von CD19-spezifischen und *B-cell-maturation-antigen* (BCMA)-spezifischen CAR-T-Zellen (40). Für die Zukunft wird die Zulassung weiterer zielgerichteter Substanzen erwartet, welche die Überlebensdauer weiter verbessern sollen.

Neben der kausalen Therapie spielt beim Multiplen Myelom auch die supportive Therapie von Symptomen und Komplikationen eine wichtige Rolle. Das Ziel letzterer besteht nicht in der Verlängerung der Überlebenszeit, sondern vielmehr in der Verbesserung der Lebensqualität der Patienten. Knochenmanifestationen in Form von Osteolysen, Osteoporose und Knochenschmerzen betreffen 80-90 % der Patienten mit einem Multiplen Myelom (17). Unabhängig davon, ob magnetresonanztomographisch Osteolyseherde nachgewiesen werden können, empfiehlt die *International Myeloma Working Group*, jeden Myelom-Patienten einer Bisphosphonat-Therapie mit

Zoledronsäure oder Pamidronsäure i.v. zuzuführen. Mehreren Studien zufolge verringern Bisphosphonate nicht nur die Häufigkeit von pathologischen Frakturen, sondern eignen sich auch zur Schmerzkontrolle bei Knochenschmerzen und wirken einer Hyperkalzämie entgegen (41, 42). Alternativ steht bei Intoleranz von Bisphosphonaten seit einiger Zeit der monoklonale anti-RANKL-Antikörper Denosumab zur Verfügung, welcher in Studien eine vergleichbare Wirksamkeit gezeigt hat (43). Bei Sinterungsfrakturen der Wirbelsäule können chirurgischen Interventionen wie die Kyphoplastie oder Vertebroplastie angeboten werden. Schmerzen sollten nach WHO-Stufenschema mit Nicht-Opioid-Analgetika und bei stärkeren Schmerzen auch mit Opioiden sowie Adjuvantien wie Neuroleptika oder Antidepressiva therapiert werden. NSAIDs sollten dabei aufgrund des ungünstigen renalen Nebenwirkungsprofils vermieden werden. Bei therapierefraktären Knochenschmerzen insbesondere in palliativen Behandlungssituationen kann eine niedrigdosierte Radiatio der betroffenen Regionen lindernd wirken (42).

Die häufig mit der Erkrankung einhergehende Anämie wird mit Erythropoetin-Gabe und bei schweren Formen mit Transfusionen behandelt. Eisen und Vitamine sollten bei Bedarf intravenös substituiert werden (44).

Aufgrund der hohen Infektionsrate bei Myelompatienten und der damit einhergehenden Mortalität kommt der Infektionsprophylaxe eine übergeordnete Rolle zu. Generell sollten alle Patienten gegen Influenza, Pneumokokken und Haemophilus influenzae geimpft werden. Bei Infektionsanzeichen wie Fieber unter Chemo- oder Immuntherapie ist unverzüglich eine antibiotische Therapie einzuleiten. Insbesondere Proteasominhibitoren und Cereblon-bindende immunmodulatorische Substanzen gehen mit einem hohen Infektionsrisiko einher, weshalb innerhalb der ersten drei Monate einer Therapie mit genannten Wirkstoffen eine Infektionsprophylaxe empfohlen ist. Bei Gabe von Proteasominhibitoren ist zusätzlich eine antivirale Prophylaxe mit Aciclovir durchzuführen (27).

Die effektivste Prophylaxe von Eintreten und Progression einer Niereninsuffizienz besteht in der Vermeidung nephrotoxischer Substanzen. Zudem sollte der Serumkalziumspiegel im Normbereich gehalten und auf ausreichend Flüssigkeitsaufnahme geachtet werden. Bortezomib ist Mittel der ersten Wahl bei bestehender Niereninsuffizienz zu Beginn der Myelomtherapie (44).

Um den Erfolg einer Myelomtherapie zu evaluieren, sollten regelmäßige *Follow-up*-Untersuchungen stattfinden. Die aktuelle Leitlinie empfiehlt Blutuntersuchungen im Abstand von zwei bis drei Monaten, wobei das Blutbild, Kreatinin und Kalzium bewertet werden sollten. Zusätzlich werden Serum- und Urinelektrophorese zum Nachweis von freien Leichtketten empfohlen (27). Je nach Ansprechen auf die Therapie werden unterschiedliche Remissionsstadien unterschieden, welche durch die *International Myeloma Working Group* 2006 definiert und 2016 aktualisiert wurden. Wünschenswert ist eine *stringent Complete Response* (sCR) oder *Complete Response* (CR) mit weniger als 5 % Plasmazellen im Knochenmark, fehlender Weichteilmanifestation und nicht nachweisbarer M-Protein-Immundefixation in Serum und Urin. Bei der sCR, welche mit einer noch etwas besseren Prognose einhergeht, liegt zusätzlich ein normaler FLC-Quotient vor (45). Mit modernen Therapien lässt sich bei etwa 75 % der Patienten ein gutes Ansprechen erreichen (46). Jedoch ist bei etwa der Hälfte der Patienten, welche nach genannten Kriterien eine CR zeigen, mittels PET-CT, Durchflusszytometrie oder *Next Generation Sequencing* (NGS) eine minimale Resterkrankung (*Minimal Residual Disease*, MRD) nachweisbar (47). Mehrere Studien zeigen bei Vorhandensein einer MRD eine deutlich eingeschränkte progressionsfreie Überlebenszeit und auch Gesamtüberlebenszeit im Vergleich zu Patienten mit nicht nachweisbarer MRD (48). Dennoch ist der Nachweis einer MRD aktuell nicht therapeutisch relevant und die Diagnostik in den Leitlinien nicht vorgesehen (27). Ursächlich hierfür sind unter anderem das Fehlen von standardisierten Testverfahren sowie die eingeschränkte bzw. untersucherabhängige Aussagekraft einiger Tests (47). Die Entwicklung standardisierter, zuverlässiger und einfach zugänglicher Tests zum Nachweis von MRD ist Gegenstand aktueller Forschung und wird mit großer Wahrscheinlichkeit in der Zukunft zu einer gesteigerten therapeutischen Relevanz der MRD führen. MRD-Negativität ist nach IMWG-Kriterien definiert als Abwesenheit monoklonaler Plasmazellen im Knochenmark und fehlender Nachweisbarkeit von Tracer-aufnehmenden Plasmazytom-Herden im PET-CT (45).

Lange Zeit galt das Multiple Myelom als unheilbare Erkrankung mit schlechter Prognose. Vor dem Jahr 2000 lag die mittlere Überlebensdauer bei neu diagnostiziertem Myelom bei etwa 2,5 Jahren (34). Seit Einführung der Hochdosischemotherapie und Stammzelltransplantation sowie neuer zielgerichteter therapeutischer Substanzen hat

sich die Prognose insbesondere für jüngere und fitte Patienten deutlich verbessert (49). Patienten unter 60 Jahre, welche mit Hochdosischemotherapie, Stammzelltransplantation und anschließender Erhaltungstherapie behandelt werden, haben demnach aktuell eine mediane Gesamtüberlebenszeit von sieben bis acht Jahren. Prognostisch günstig sind ein niedriges R-ISS-Stadium bei Diagnose sowie gutes Ansprechen auf die Erstlinientherapie mit *Complete Response* oder *stringent Complete Response* und MRD-Negativität (31). Neueren Studien zufolge kann bei etwa 15 % der Patienten unter maximaler Therapie sogar eine Heilung erzielt werden (50). Die Prognose für ältere und gebrechliche Patienten, welche nicht für eine Stammzelltransplantation infrage kommen, ist allerdings weiterhin deutlich schlechter (34).

1.2. Die Pathogenese des Multiplen Myeloms

1.2.1. Die physiologische Plasmazellentwicklung

Plasmazellen entwickeln sich in mehreren Schritten aus lymphoiden hämatopoetischen Stammzellen (siehe Abbildung 1). Die frühen Reifungsstadien finden im Knochenmark statt. Im ersten Schritt entsteht aus der lymphoiden Stammzelle eine Pro-B-Zelle. In diesem Stadium kommt es zur sogenannten VDJ-Rekombination, bei der Gensegmente, welche für variable Regionen der schweren Immunglobulinketten kodieren, nach einem festen Schema neu arrangiert werden. Zunächst wird ein D-Segment mit einem J-Segment verknüpft, anschließend wird ein V-Segment an das entstandene DJ-Segment angeknüpft (51). Die VDJ-Rekombination gewährleistet die Antikörperdiversität. Nach der Rekombination der schweren Immunglobulinketten folgt im Prä-B-Zell-Stadium das Rearrangement der Leichtketten. Schwer- und Leichtketten werden anschließend zusammengefügt und es entsteht eine unreife B-Zelle, welche einen B-Zell-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimiert. Diese Zelle migriert aus dem Knochenmark in die Lymphknoten, wo der erste Antigenkontakt stattfindet und die B-Zelle sich zu einem Lymphoblasten differenziert. Aus einigen dieser Lymphoblasten entstehen kurzlebige Plasmazellen, andere wandern nach erneutem Antigenkontakt in die Keimzentren der

Lymphknoten ein. Verschiedene Prozesse wie die Affinitätsreifung und die somatische Hypermutation, bei welcher Punktmutationen in Gensegmente eingefügt werden, die für antigenbindende Bereiche der Immunglobuline kodieren, tragen zu einer erhöhten Affinität der B-Zell-Rezeptoren gegen ihr spezifisches Antigen bei (52).

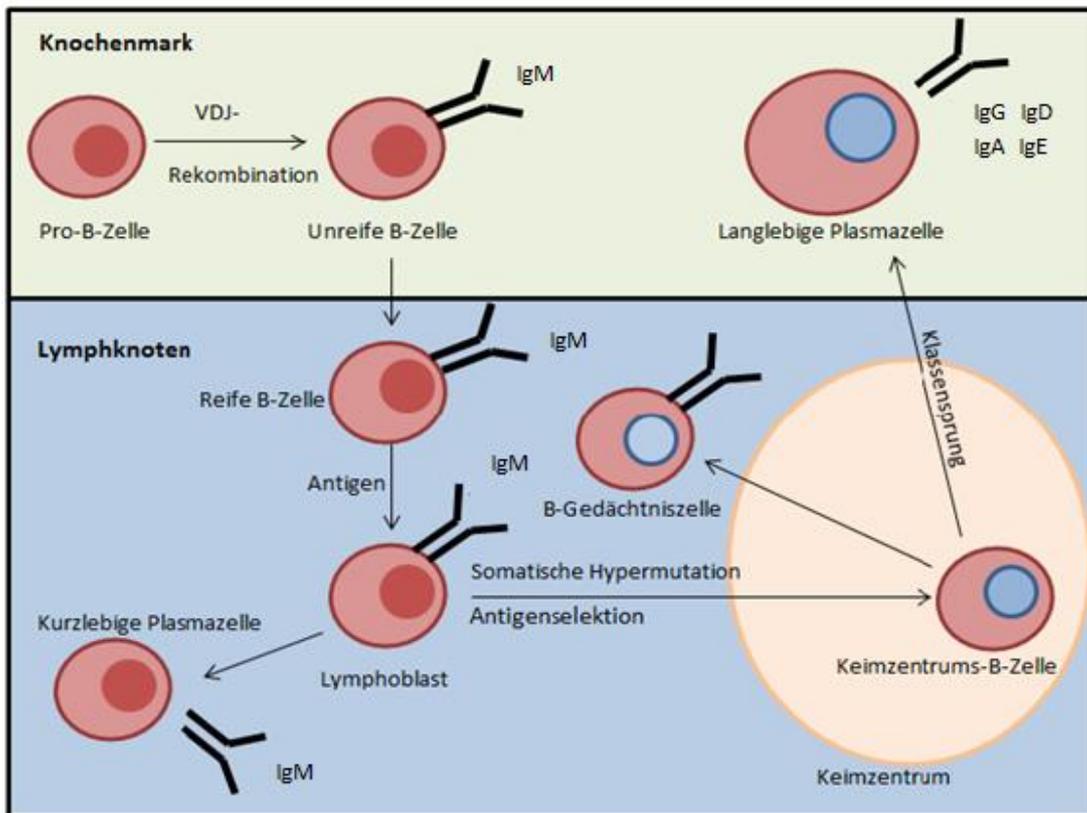


Abbildung 1: Die physiologische Plasmazellentwicklung. Im Knochenmark entwickeln sich aus lymphoiden hämatopoetischen Stammzellen Pro-B-Zellen, welche sich durch die VDJ-Rekombination weiter zu unreifen B-Zellen differenzieren. Diese migrieren in den Lymphknoten, wo Antigen-Kontakt die Weiterentwicklung zu Lymphoblasten ermöglicht. Aus einem Teil der Lymphoblasten entstehen kurzlebige Plasmazellen, ein anderer Teil durchläuft bestimmte Prozesse, zu denen unter anderem die somatische Hypermutation zählt, und wird im Keimzentrum auf die Affinität zu Antigenen positiv selektiert. Die sogenannten Keimzentrums-B-Zellen können sich nun entweder zu B-Gedächtniszellen entwickeln, oder sie durchlaufen den Klassensprung und wandern zurück ins Knochenmark, wo sie als langlebige Plasmazellen IgA, IgE, IgG und IgD sezernieren können. (Abbildung modifiziert nach Kuehl und Bergsagel, 2002 (53)).

Hochaffine B-Zellklone werden selektiert und differenzieren sich entweder zu B-Gedächtniszellen oder zu Post-Keimzentrums-B-Zellen. Letztere durchlaufen durch chromosomale Umlagerungen den Klassensprung, wonach anstelle der initialen IgM-Antikörper auch IgG-, IgE-, IgA- und IgD-Immunglobuline sezerniert werden. Im Anschluss an den Klassensprung wandern die Post-Keimzentrums-B-Zellen zurück ins Knochenmark, wo sie sich in Abhängigkeit von Knochenmarkstromazellen und Interleukin-6 zu langlebigen Plasmazellen differenzieren (53-56).

1.2.2. Die Pathogenese des Multiplen Myeloms als Mehrstufenmodell

Myelomzellen leiten sich von Post-Keimzentrums-B-Zellen ab, das heißt von langlebigen Plasmazellen, welche bis zum Zeitpunkt der malignen Transformation eine physiologische Entwicklung durchlaufen haben. Durch Akkumulation verschiedener genetischer Läsionen erfolgt stufenweise die Entwicklung über die monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz und das *Smouldering Myeloma* bis hin zum manifesten Multiplen Myelom. Als weit fortgeschrittene Krankheitsstadien können eine Plasmazellleukämie oder extramedulläre Organmanifestationen angesehen werden (zusammengefasst dargestellt in Abbildung 2) (53).

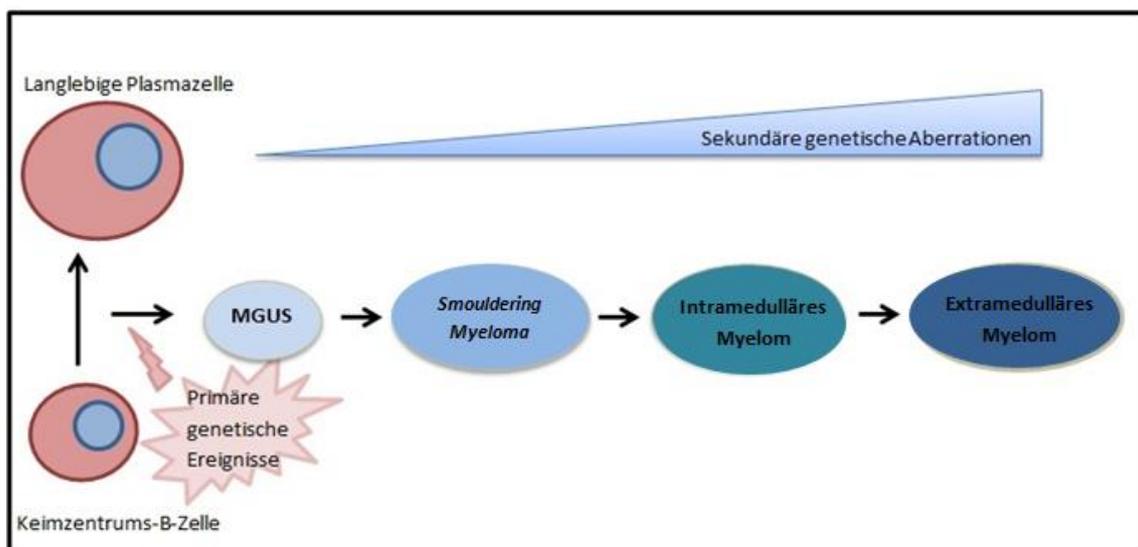


Abbildung 2: Mehrschrittige Pathogenese des Multiplen Myeloms. Aus einer Keimzentrums-B-Zelle entwickelt sich entweder eine physiologische langlebige Plasmazelle oder durch primäre genetische Läsionen wie IgH-Translokationen und Hyperdiploidie eine immortalisierte Plasmazelle. Dadurch kommt es zu einer monoklonalen Gammopathie unbestimmter Signifikanz. Sekundäre genetische Läsionen wie eine Monosomie 13 oder Aktivierung der *ras*- und *myc*-Onkogene führen zur Progression der Erkrankung in ein intramedulläres Multiples Myelom. Durch weitere genetische Aberrationen entkoppelt sich die Plasmazellproliferation vom Einfluss von Knochenmarkstromazellen und Interleukin-6, es kommt zum Endstadium der Erkrankung mit extramedullären Manifestationen des Myeloms oder einer Plasmazellleukämie (modifiziert nach (57) und (53)).

Eine gewisse genetische Instabilität der B-Zellen ist Grundvoraussetzung für die Funktionsfähigkeit des Immunsystems. Die dadurch entstehende Antikörpervielfalt ermöglicht erst die effektive Reaktion auf immer neue Antigene, welche für die Infektionsabwehr unerlässlich ist. Gleichzeitig macht diese genetische Instabilität das

B-Zell-System insbesondere in höherem Alter anfällig für maligne Transformationen (57).

Mutationen, welche die Entwicklung von physiologischen Plasmazellen in eine MGUS begünstigen, werden als primäre genetische Läsionen bezeichnet.

Um die Entstehung eines malignen Zellklons zu begünstigen, muss aus einer genetischen Mutation ein Proliferationsvorteil für die betroffene Zelle hervorgehen.

Auf Stufe der primären genetischen Läsionen wird dieser Vorteil in vielen Fällen durch erhöhte Expression von Proteinen der Zyklin-D-Familie erzielt (15, 58). Zyklin-D-Proteine nehmen im Zellzyklus eine Schlüsselrolle beim Übergang der Zelle von der G1- in die S-Phase ein und beeinflussen somit maßgeblich die Proliferation des Zellklons. Dieser Überexpression können verschiedene Mechanismen zugrunde liegen. Häufig handelt es sich um balancierte Translokationen zwischen dem IgH-Genlocus 14q32 und dem Genlocus eines Zyklin-D-Gens, der IgH-Enhancer stimuliert dann die Expression des jeweiligen Zyklin-D-Gens. Die häufigste Translokation ist $t(11;14)(q13;q32)$, hier wird das Zyklin-D1-Gen durch den Einfluss des IgH-Enhancers überexprimiert. Weitere Translokationen können MMSET, FGFR3 und die Transkriptionsfaktoren c-Maf und MafB betreffen, welche jeweils einen Einfluss auf die Expression von Zyklin-D2 ausüben. Translokationen entstehen meist in der Phase des Klassensprungs oder der somatischen Hypermutation, können aber auch bereits im früheren Entwicklungsstadium der Plasmazelle bei der VDJ-Rekombination auftreten (55, 58).

Die zweithäufigste primäre genetische Läsion, welche zu einer malignen Entartung von Plasmazellen führt, ist die Hyperdiploidie. Etwa 55 % der Myelompatienten weisen diese Auffälligkeit auf, zusätzlich lassen sich bei 10 % gleichzeitig Translokationen nachweisen. Hyperdiploidie entsteht durch das gleichzeitige Vorkommen verschiedener Trisomien. Aus bisher ungeklärten Gründen sind beim Multiplen Myelom meist die ungeraden Chromosomen 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 und 21 in dreifacher Ausführung vorhanden (58). Trisomie der Chromosomen 3 und 5 ist dabei mit einer guten Prognose verbunden, während das *Outcome* bei Trisomie 21 eher schlecht ist (59). Auf welchem Weg Hyperdiploidie die maligne Entartung von Plasmazellen begünstigt, ist bislang noch unklar und Gegenstand weiterer Forschung.

Die oben beschriebenen Auffälligkeiten lassen sich im Stadium der MGUS nachweisen, verursachen jedoch allein keine Progression in ein Multiples Myelom. Hierfür ist der Zugewinn weiterer Mutationen und damit verbundener Proliferationsvorteile notwendig: Die sogenannten sekundären genetischen Läsionen, zu denen die Monosomie 13, die Aktivierung der Onkogene *ras* und *myc* und in späterem Stadium der Verlust des p53-Tumorsuppressorgens zählen (15). Monosomie 13 lässt sich in einigen Fällen bereits im Stadium der MGUS nachweisen, allerdings ist die Inzidenz beim manifesten Multiplen Myelom deutlich höher, sodass die Mutation von den meisten Autoren den sekundären genetischen Läsionen zugeschrieben wird. Auf dem langen Arm von Chromosom 13 (13q14) befindet sich das Retinoblastom-Tumorsuppressorgen. Durch Deletion eines Chromosoms 13 kommt es zu einer Haploinsuffizienz dieses Tumorsuppressorgens, was die Krankheitsprogression möglicherweise begünstigt (60). Allerdings ist für gewöhnlich die Inaktivierung beider Allele des Retinoblastom-Tumorsuppressorgens zur Tumorentstehung notwendig, im Falle der Monosomie 13 ist nur eine Kopie inaktiviert, sodass nicht geklärt ist, ob dies der einzige Mechanismus ist, der zur Progression einer MGUS in ein Multiples Myelom führt. Alternativ wird das Vorhandensein eines weiteren, myelomspezifischen Tumorsuppressorgens auf dem langen Arm von Chromosom 13 diskutiert. Ein solches Gen konnte bislang allerdings nicht detektiert werden (53).

Nach dem Erwerb der beschriebenen sekundären genetischen Läsionen verursachen die transformierten Plasmazellen nun die typische Symptomatik des Multiplen Myeloms: Zum einen wird durch exzessives Wachstum die physiologische Hämatopoese verdrängt, zum anderen führen Interaktionen der Myelomzellen mit Knochenzellen zu schmerzhaften osteolytischen Läsionen. Jedoch sind die malignen Zellen in diesem Stadium noch von Knochenmarkstromazellen und Interleukin-6 abhängig.

Als terminales Erkrankungsstadium gilt das extramedulläre Multiple Myelom, welches sich durch Knochenmarkstroma-unabhängige Proliferation von Plasmazellen auszeichnet und als Plasmazelleukämie oder extramedulläre Plasmozytommanifestation symptomatisch wird.

1.2.4. Epigenetische Veränderungen beim Multiplen Myelom

Während die Rolle genetischer Mutationen in der Karzinogenese bereits seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung ist, stellt die Epigenetik ein recht junges Forschungsgebiet dar. Entsprechend ist derzeit noch wenig über den Einfluss epigenetischer Veränderungen auf die Krankheitsprogression beim Multiplen Myelom bekannt. In früheren Stadien der Erkrankung findet sich eine globale Hypomethylierung mit gleichzeitiger Hypermethylierung bestimmter Tumorsuppressorgene. Durch Methylierung von Cytosin in Cytosin-Phosphat Guanin (CpG)-Inseln der Enhancer-Regionen von Tumorsuppressorgenen wird die Expression der Gene herabgesetzt. Der Grad der Methylierung nimmt mit fortgeschrittenem Erkrankungsstadium zu (61).

Auch bezüglich der epigenetischen Modifikationen von Histonen in Form von Methylierung, Acetylierung, Ubiquitylierung und Phosphorylierung unterscheiden sich Myelomzellen von physiologischen Plasmazellen. Insbesondere in späten Stadien findet sich Hypomethylierung und Hypoacetylierung der Histone, was zu einer generell gesteigerten Transkriptionsrate führt, die sich auch auf die Expression von Onkogenen ausweitet (62).

Grundsätzlich wird angenommen, dass epigenetische Modifikationen sowohl die Progression der Erkrankung als auch das Proliferations- und Apoptoseverhalten sowie Therapieresistenzen beeinflussen können (15, 63).

1.2.5. Klonale Heterogenität beim Multiplen Myelom

Lange wurde davon ausgegangen, dass die Progression von der physiologischen Plasmazelle über die MGUS zum Multiplen Myelom durch Akkumulation verschiedener genetischen Läsionen auf linearem Weg verläuft. Mittels neuerer Testverfahren wie Exomsequenzierung und komparativer genomischer Hybridisierung konnte nun bereits in frühen Myelomstadien eine ausgeprägte intraklonale Heterogenität nachgewiesen werden (64). Ein Plasmazellklon, welcher durch ein initiales genetisches Ereignis immortalisiert wurde, entwickelt sich somit nicht linear zum Multiplen Myelom weiter, sondern es entstehen in jeder Phase der Erkrankung neue Subklone, die im Vergleich zur Ausgangspopulation Überlebensvorteile aufweisen können. Durch

diverse spontane genetische Mutationen verbessern die Subklone ihre Anpassung an das umgebende Milieu und konkurrieren dabei untereinander: Der fitteste, am besten an die gegebenen Bedingungen angepasste Klon weist die höchste Proliferationsrate auf. Durch Neumutation im Genom anderer Subklone oder Veränderungen des umgebenden Milieus kann innerhalb kurzer Zeit ein neuer Subklon als fittester Klon selektioniert werden und proliferieren (65). So entsteht die große genetische Heterogenität in verschiedenen Myelomzellen desselben Patienten, was die Therapie deutlich erschwert. Ein zum Zeitpunkt der Diagnose dominanter Klon kann auf ein gewähltes Therapieschema ansprechen. Gewinnt dann durch die Veränderung der Wachstumsbedingungen ein neuer Subklon mit anderen genetischen Aberrationen einen Überlebensvorteil und entwickelt sich zum dominanten Subklon, so lässt die Wirksamkeit der Therapie nach, da die nun dominante Population ein reduziertes Ansprechen auf das gewählte Schema zeigt. Die Therapie übt also einen entscheidenden Selektionsdruck auf die Klone aus und bedingt damit selbst die Reduktion ihrer Wirksamkeit. Die so induzierte Resistenzentwicklung führt zu immer weiter eingeschränkten Therapiemöglichkeiten insbesondere bei Rezidiven und letztlich zu einem endgültigen Therapieversagen und zum Tod des Patienten (66).

1.3. Molekularbiologische Grundlagen

1.3.1. Das Endoplasmatische Retikulum, die *Unfolded Protein Response* und der JNK-Signaltransduktionsweg

Die Funktion des Endoplasmatischen Retikulums (ER) besteht in der Translation, Faltung und Modifikation von Transmembranproteinen und Proteinen, die für die Exozytose bestimmt sind. Man unterscheidet morphologisch und funktionell das raue ER mit Ribosomenanlagerung an der zytoplasmatischen Seite des Organells vom ribosomfreien, sogenannten glatten ER. Im glatten ER erfolgt unter anderem die Phospholipid- und Prostaglandinbiosynthese, zudem fungiert das Organell als Calciumspeicherort. Das raue ER dient der Proteinbiosynthese. Sekretorische Proteine werden durch das translatierende Ribosom ins Lumen des Endoplasmatischen

Retikulums geschleust, wo die Aminosäureketten unter der Kontrolle von *Chaperonen* in ihre funktionsfähige Tertiärstruktur gefaltet werden. Außerdem findet eine Modifikation mittels Glykosylierung statt (67, 68).

Kommt es trotz strenger Kontrollmechanismen zur Fehlfaltung oder zu Funktionsstörungen eines Proteins, so wird dieses aus dem ER ins Zytosol transportiert und dort ubiquitiniert. Durch die Ubiquitin-Markierung kann das fehlerhafte Protein von einem 26-S-Proteasom erkannt und proteolytisch abgebaut werden (67).

Der Mechanismus der Erkennung und des Abbaus fehlgefalteter Proteine aus dem ER durch Proteasomen wird als ER-assoziierte Degradation (ERAD) bezeichnet und trägt maßgeblich zur Zellhomöostase bei (69). Überschreitet die Menge anfallender fehlgefalteter Proteine die Degradationskapazität der Proteasomen, so akkumulieren diese Proteine im Endoplasmatischen Retikulum und lösen dort den sogenannten ER-Stress aus. Durch die kontinuierliche exzessive Produktion von Paraproteinen kommt es in Myelomzellen zu einer großen Anzahl fehlgefalteter Proteine, welche aus dem ER beseitigt und abgebaut werden müssen. Die Zellen sind für ihr Überleben somit auf eine funktionierende ERAD angewiesen, außerdem stehen sie kontinuierlich unter einem gewissen Grad von ER-Stress (68).

ER-Stress setzt einen Mechanismus in Gang, der als *Unfolded Protein Response* (UPR) bezeichnet wird. Primärziel der UPR ist die Wiederherstellung der Zellhomöostase. Hierfür vergrößert sich das Volumen des ER, die Expression von zur Proteinfaltung benötigten Genprodukten wird gesteigert und die Translation von neuen mRNAs inhibiert. Außerdem nimmt die ERAD zu und es werden Autophagieprozesse eingeleitet (68, 70). Kann jedoch der ER-Stress durch diese Adaptationen über längere Zeit nicht gebessert werden, so handelt es sich um fatalen ER-Stress und die Apoptose wird eingeleitet (71).

Die Signaltransduktion der UPR wird auf drei verschiedenen Wegen vermittelt, die in Abbildung 3 dargestellt sind. Am Beginn jedes Signaltransduktionsweges steht ein membranständiges Protein im ER, welches ER-Stress wahrnimmt und nachgeschaltete Reaktionen in Gang setzt. Bei den transmembranären Stresssensoren handelt es sich um IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*), PERK (*PKR-like ER-kinase*) und ATF6 (*activating transcription factor 6*). Im ungestressten Zustand binden diese Proteine das Hitzeschockprotein HSPA5 (synonym GRP78, BIP, HSP70-5), das als Chaperon

funktioniert, an ihre luminale Domäne, wodurch die Aggregation bzw. Freisetzung der Transmembranproteine verhindert wird.

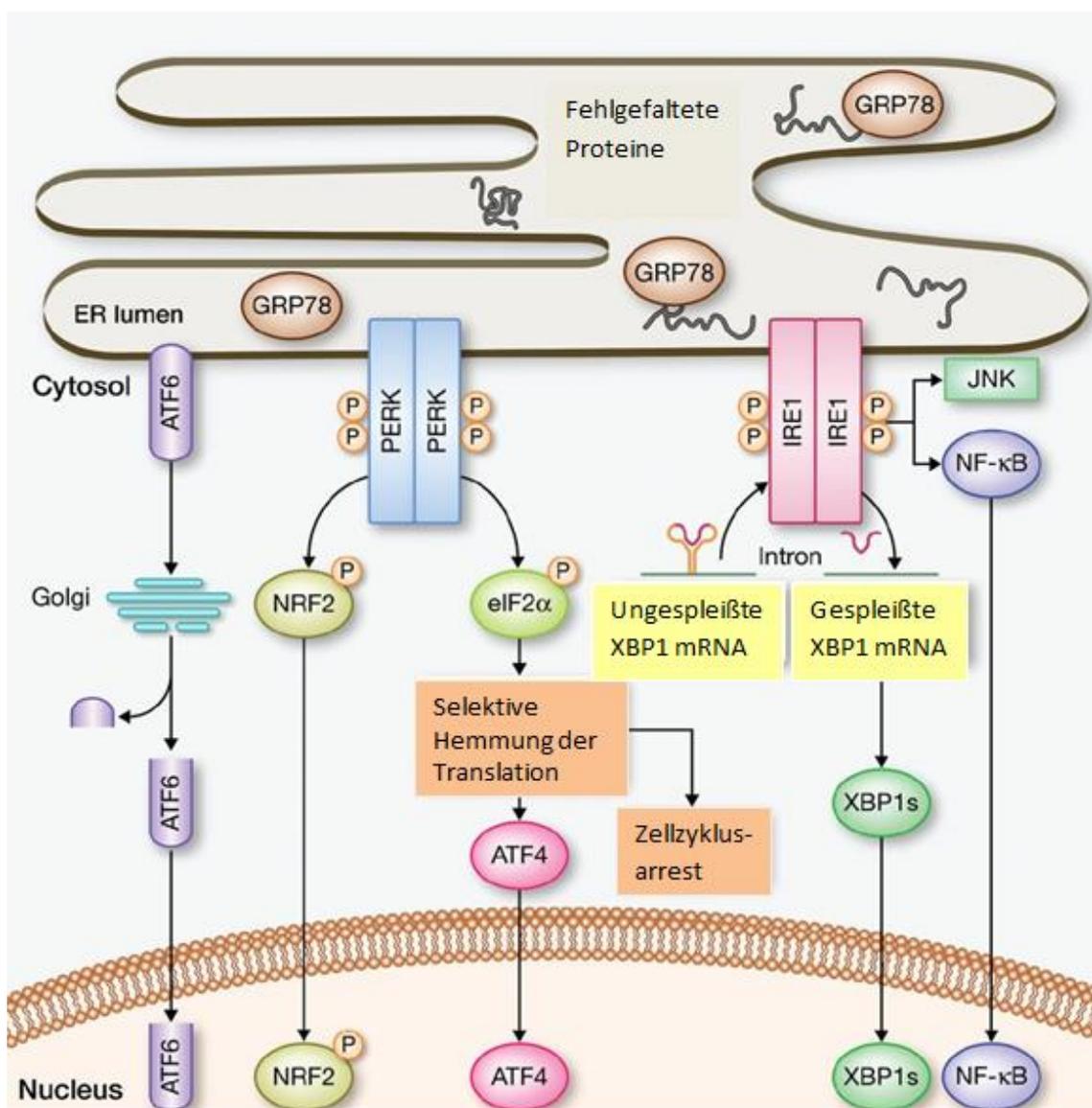


Abbildung 3: Die drei Signaltransduktionswege der *Unfolded Protein Response*. Kommt es zur Akkumulation fehlgefalteter Proteine im Endoplasmatischen Retikulum, so konkurrieren diese mit ATF6, PERK und IRE1 in der Membran des ER um die Bindung an das Chaperone-Protein GRP78. GRP78 gibt die Bindestellen an den Transmembranproteinen frei und ermöglicht somit deren Aktivierung. IRE1 und PERK bilden daraufhin in der ER-Membran Homodimere aus und aktivieren sich durch Autophosphorylierung. PERK phosphoryliert eIF2a (*eukaryotic initiation factor 2a*), wodurch die mRNA-Translation der meisten Proteine gehemmt wird. Eine Ausnahme bildet ATF4 (*activation transcription factor 4*), dieser wird verstärkt translatiert. ATF4 induziert die verstärkte Expression von Genen, welche für die Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der Homöostase im ER nötig sind. Zusätzlich phosphoryliert PERK den Transkriptionsfaktor NRF2, welcher ebenfalls die Expression von pro-homöostatischen Genen reguliert. ATF6 wird nach der Freisetzung durch GRP78 zum Golgi-Apparat transportiert, wo die Transmembran-Domäne abgespalten wird. Anschließend erfolgt die Translokation als Transkriptionsfaktor in den Zellkern. Dort induziert ATF6 die Expression von Genen, deren Produkte für die ERAD benötigt werden sowie vom XBP1-Gen. IRE1 besitzt gleichzeitig Kinase- und Endoribonuklease-Aktivität. Durch die Kinase werden die JNK- und NF-κB-Signalwege aktiviert, was sowohl proapoptische, aber auch zellprotektive Effekte vermitteln kann. Die Endoribonuklease spaltet ein Intron aus der mRNA von XBP1, es entsteht der Transkriptionsfaktor XBP1s, welcher im Zellkern die Expression von Genen für die Wiederherstellung der ER-Homöostase induziert (70). (Abbildung modifiziert nach (70))

Kommt es nun innerhalb des ERs zu einer Akkumulation fehlgefalteter Proteine, so konkurrieren diese um die Bindestelle an GRP78 und durch Dissoziation von GRP78 weg von den ER-Stresssensoren erfolgt deren Aktivierung (70).

Die Serin/Threonin-Kinase PERK oligomerisiert innerhalb der Membran des ER und aktiviert sich durch Autophosphorylierung. Durch Phosphorylierung des *eukaryotic initiation factor 2 α* (eIF2 α) wird dieser inaktiviert und damit die Translation der meisten mRNAs inhibiert. So soll die Menge an anfallendem Protein, welches durch das ER verarbeitet werden muss, reduziert werden. Gesteigert wird hingegen die Translation von *Activating transcription factor 4* (ATF4), einem Transkriptionsfaktor, der die Expression von Genen reguliert, deren Produkte eine bedeutende Rolle für die Wiederherstellung der Homöostase bei ER-Stress spielen. Eine ähnliche Wirkung vermittelt der Transkriptionsfaktor *Nuclear factor erythroid-2-related factor 2* (NRF2), der durch PERK-abhängige Phosphorylierung aktiviert wird (70, 72).

ATF6 ist selbst ein Transkriptionsfaktor, der nach Freisetzung durch GRP78 aus der ER-Membran im Golgi-Apparat von seiner Transmembran-Domäne abgespalten wird. Nach dieser Modifikation kann ATF6 in den Nucleus translozieren, wo es die Expression von Genen für die ERAD und *X-box-binding protein 1* (XBP1) stimuliert. So trägt auch dieser Signaltransduktionsweg der UPR zur Aufrechterhaltung und Wiederherstellung der ER-Homöostase bei (68, 70, 72).

Der dritte ER-Stresssensor IRE1 wird ähnlich wie PERK durch Oligomerisierung und Autophosphorylierung aktiviert. Es existieren zwei bekannte Isoformen von IRE1, wobei IRE1 α ubiquitär vorkommt, während IRE1 β bislang ausschließlich in Zellen des Gastrointestinaltraktes und der Lunge nachgewiesen werden konnte (70). IRE1 besitzt sowohl Kinase- als auch Endoribonukleaseaktivität. Die Endoribonuklease spleißt bei mildem bis moderatem ER-Stress ein Intron aus der mRNA von XBP1, nach Translation der so modifizierten mRNA entsteht der aktive Transkriptionsfaktor XBP1s, der im Zellkern wiederum die Expression von für ERAD und ER-Homöostase notwendigen Genen fördert (70). Auf diese Weise wirkt die Endoribonuklease zellprotektiv.

Zudem existiert eine weitere Funktion der Endoribonuklease, welche als RIDD (*Regulated IRE1-dependent Decay*) bezeichnet wird. Hierunter versteht man den

zielgerichteten Abbau von mRNAs, insbesondere solchen, deren Produkte im ER modifiziert werden. Diese sogenannte basale RIDD-Aktivität, wie sie in Zellen ohne ER-Stress vorliegt, ist notwendig für die Zellhomöostase. Bei zunehmendem ER-Stress scheint die RIDD-Aktivität jedoch das Gegenteil zur Folge zu haben: über verschiedene Mechanismen, zu denen unter anderem die Degradation von prä-miRNA und mRNAs, deren Produkte eine Rolle für das Zellwachstum spielen, gehören, führt RIDD hier zur Einleitung von Apoptose. Die genauen Hintergründe dieser Mechanismen sind bislang unklar, es wird jedoch angenommen, dass RIDD eine bedeutende Rolle bei der Induktion von Apoptose unter ER-Stress spielt (73).

Durch die Kinaseaktivität von IRE1 wird eine MAP (*Mitogen Activated Protein*)-Kinase-Kaskade in Gang gesetzt, die in der Phosphorylierung und damit Aktivierung von JNK (*C-Jun NH₂-terminal Kinase*) resultiert. Initial wird das Adapterprotein TRAF2 (*TNF-Receptor-Associated Factor 2*) auf der zytosolischen Seite von IRE1 rekrutiert (74), welches die Oligomerisierung und Aktivierung von ASK1 (*Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1*) steuert. ASK1 ist eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKKK), die 2 verschiedene MAP-Kinase-Kinasen (MAPKK) phosphoryliert und aktiviert: MKK4/MKK7 (MAP-Kinase-Kinase 4/7) und MKK6. Letztere aktiviert den p38-MAPK-Signaltransduktionsweg, wobei die genauen Effekte dieses Signalweges noch nicht geklärt werden konnten (75). MKK4/7 phosphoryliert JNK 1, 2 und 3, auch bekannt als SAPK (*Stress-Activated MAP-Kinase*) und setzt somit die assoziierten Signaltransduktionswege in Gang. Die Aktivierung von JNK kann aber auch unabhängig von ER-Stress über diverse Mechanismen vermittelt werden, beispielsweise mittels Zytokinen wie IL-1 oder TNF (76, 77). JNK 1 und 2 kommen ubiquitär vor, während JNK 3 nur in Hirn, Hoden und Herz nachgewiesen werden konnte. Durch alternatives Spleißen entstehen verschiedene Isoformen des Proteins mit einem Molekulargewicht von entweder 46 oder 54 kDa (76). Die Funktionen von JNK sind vielfältig, mittels unterschiedlicher Mechanismen kann die Kinase zellprotektiv und proapoptotisch wirken, auch Autophagie kann JNK-abhängig induziert werden. Welche zellulären Gegebenheiten zum Beschreiten der unterschiedlichen Wege führen, ist noch nicht abschließend geklärt.

Aktiviert JNK-Proteine phosphorylieren c-jun N-terminal an Serin 63 und 73. C-jun ist eine Untereinheit des dimeren Transkriptionsfaktors AP-1 (*Activator Protein 1*) und

beeinflusst als solche die Transkription sowohl zellprotektiver als auch proapoptotisch wirksamer Genprodukte (TNF- α , Fas-L, Bak) (78, 79).

JNK 1 vermittelt durch Phosphorylierung des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 (*B-cell-lymphoma 2*) Autophagie. Im inaktiven Zustand bildet Bcl-2 einen Komplex mit Beclin 1 und inhibiert so die autophagische Wirkung von Beclin 1. Durch JNK-abhängige Phosphorylierung kommt es zur Dissoziation von Bcl-2 und Beclin 1, Beclin 1 wird aktiviert und die Autophagie eingeleitet (80). Im Rahmen der Ausbildung eines Autophagosoms wird LC3 (*Light-chain 3*)-I an ein Membranlipid konjugiert; es entsteht LC3-II, welches Bestandteil der Membran des Autophagosoms ist (81). LC3-I/II ist ein sensitiver Marker für Autophagie, welcher in der vorliegenden Arbeit zum Nachweis autophagischer Prozesse mittels Western-Blot-Analyse herangezogen wurde.

Proapoptotische JNK-Effekte werden neben der beschriebenen Phosphorylierung von c-jun unter anderem auch durch Aktivierung des Proteins BAX (*Bcl-2-associated Protein X*) vermittelt. BAX beeinflusst die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran und führt zur Freisetzung von Cytochrom C aus dem Intermembranraum, welches über die Caspase-9-Kaskade Apoptose auslöst. Zudem phosphoryliert JNK weitere proapoptotische Proteine, zu denen BAD, Bim, Bmf und Bcl-2 zählen (79).

1.3.2. Proteasominhibitoren

Myelomzellen sind aufgrund ihrer Paraproteinproduktion einem hohen chronischen ER-Stress-Niveau ausgesetzt. Kompensationsmechanismen, die die Proteinhomöostase aufrechterhalten, sind deshalb überlebensnotwendig. Zu ihnen gehören unter anderem die erhöhte Proteasomaktivität und erhöhte HSP-Siegel, und damit einhergehend eine verstärkte Aktivität von ERAD und UPR. Diese chronisch notwendigen Kompensationsmechanismen verringern aber auch den Spielraum von MM-Zellen, auf akuten proteotoxischen Stress zu reagieren. Diese Abhängigkeit der pathogenen Zellen von Mechanismen zur Reduktion von ER-Stress wird sich in der modernen Myelomtherapie zu Nutzen gemacht, indem proteotoxischer Stress (einschließlich des ER-Stress) erzeugt wird, der möglichst fatale Auswirkungen für die Zelle haben soll.

Dies gelingt mittels Inhibition von Proteasomen durch aktuell drei zugelassene Proteasominhibitoren (PI): Bortezomib, Carfilzomib und Ixazomib (68).

Alle drei inhibieren das 26S-Proteasom, ein aus mehreren Untereinheiten bestehendes Zellorganell, dessen Aufgabe in der Degradation fehlerhafter und nicht mehr benötigter zellulärer Proteine besteht (82). Ein 26S-Proteasom ist aus einer zentralen 20S-Untereinheit und zwei 19S-Untereinheiten zusammengesetzt, die wie Deckel an beiden Seiten der 20S-Untereinheit angelagert sind. Die 19S-Untereinheiten erkennen ubiquitinierte Proteine, die für den Abbau im Proteasom bestimmt sind, deubiquitinieren und entfalten diese und leiten sie in die proteolytisch aktive 20S-Einheit weiter. Die 20S-Einheit ist zylindrisch aufgebaut und besteht aus 4 Ringen, welche wiederum mehrere α und β -Untereinheiten besitzen. Katalytisch aktiv sind drei dieser Untereinheiten: $\beta 1$ zeigte Caspase-ähnliche Aktivität, $\beta 2$ Trypsin-ähnliche und $\beta 5$ Chymotrypsin-ähnliche Aktivität (83, 84).

Bortezomib, der 2003 zugelassene Proteasominhibitor der ersten Generation, inhibiert reversibel die $\beta 5$ -Untereinheit und kann intravenös oder subkutan appliziert werden. Proteasominhibitoren der nächsten Generation wurden entwickelt, um Resistenzen gegen Bortezomib zu überwinden und die Effektivität der Therapie weiter zu steigern. Der zweite zugelassene PI, Carfilzomib, inhibiert die $\beta 5$ -Untereinheit irreversibel, wird intravenös verabreicht und erwies sich in Studien als wirksam bei Bortezomib-resistentem Multiplem Myelom. Mit Ixazomib kam 2015 der erste oral applizierbare PI auf den Markt, auch dieser kann bei Bortezomib-resistentem Myelom erfolgreich eingesetzt werden (68, 83). Aktuell laufen klinische Studien mit weiteren Vertretern der Substanzklasse, darunter der oral verfügbare PI Oprozomib und Marizomib, eine Substanz, die anders als die anderen PI nicht nur die $\beta 5$ -, sondern auch die $\beta 2$ -Untereinheit inhibiert (83).

Trotz unterschiedlicher Strukturen und Angriffspunkte der verschiedenen PI sind die vermittelten Effekte auf die nachgeschalteten Signaltransduktionswege sehr ähnlich (85). So blockieren PI NF- κ B-Signaltransduktionswege, welche sowohl für die Proliferation, das Überleben und die Resistenzentwicklung von Myelomzellen als auch für die Interaktion mit dem Knochenmarkmikromilieu bedeutend sind. Zudem wird die PI-induzierte Apoptose durch JNK-vermittelte Aktivierung des extrinsischen Caspase-8- und des intrinsischen Caspase-9-Signaltransduktionswegs ausgelöst. Die Inhibition

des 26S-Proteasoms führt zur Akkumulation von fehlgefaltetem oder nicht mehr benötigtem Protein, welches für den proteolytischen Abbau vorgesehen war und löst somit ER-Stress und die UPR aus, die, wie oben beschrieben, proapoptische Effekte vermittelt (83). Weitere Wirkmechanismen von PI sind bekannt, sollen an dieser Stelle jedoch nicht näher erörtert werden.

2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Seit der Einführung von Proteasominhibitoren (PI) in der Therapie des Multiplen Myeloms (MM) hat sich die Lebenserwartung der Patienten deutlich verbessert. Bei vergleichsweise mildem Nebenwirkungsprofil zeichnet sich diese Substanzklasse durch sehr gute Wirksamkeit und Effektivität aus und lässt sich gut mit anderen Substanzen kombinieren. Während der direkte Wirkmechanismus am Proteasom schon gut erforscht ist, gibt es eine Vielzahl indirekter Mechanismen, deren Beitrag zur Signalverarbeitung und der proapoptotischen Wirkung noch weitgehend ungeklärt ist.

Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe hatten die Aktivierung des JNK-c-jun-Signaltransduktionsweges durch die Behandlung von MM-Zellen mit dem PI Carfilzomib gezeigt. Wir hypothesierten deshalb, dass der JNK-c-jun-Signaltransduktionsweg durch die Vermittlung von fatalem ER-Stress im Rahmen der UPR eine kritische Rolle für die Carfilzomib-induzierte Apoptose spielen könnte.

In der vorliegenden Arbeit sollte dieser Hypothese experimentell nachgegangen werden. Im Falle der Verifikation dieser Hypothese wäre eine eingeschränkte Wirksamkeit von Carfilzomib bei JNK-Inhibition sowie eine Verstärkung der proapoptotischen Wirkung durch JNK-Aktivierung zu erwarten. Um dies zu untersuchen, wurde JNK in einer MM-Zelllinie pharmakologisch entweder inhibiert oder aktiviert, und die so modifizierten Zellen mit Carfilzomib inkubiert. Anschließend wurde der Einfluss der JNK-Modifikation sowohl auf das Zellüberleben unter Carfilzomib-Behandlung als auch auf die Expression von Proteinen der UPR und insbesondere des JNK-Signaltransduktionswegs eruiert.

3. MATERIAL UND GERÄTE

3.1. Geräte und Gebrauchsgegenstände

Tabelle 3: Geräte und Gebrauchsgegenstände. Übersicht über die verwendeten Geräte und Gebrauchsgegenstände mit Angabe des Herstellers und der Artikelnummer, falls vorhanden.

Produkt und Artikelnummer	Hersteller
Vortexmischer L46, 46000	LABINCO BV, Breda, Niederlande
pH-Messgerät HI991001	HANNA Instruments Inc, Woonsocket, USA
Magnetrührgerät	Heidolph Instruments, Schwabach
Minizentrifuge C130 1B-230V	NeoLab, Heidelberg
Zentrifuge Multifuge 3 R-S	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Zentrifuge 5180	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe accujet-pro pipette controller, BR26320	BRAND GmbH&Co.KG, Wertheim
Pipette 1-10µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette 10-100µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette 100-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg
Feinwaage Sartorius H51, 272805422181	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Waage ScoutPro SPU402, 7125191435	OHAUS Corporation, Pine Brook, USA
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik
Brutschrank Hera Cell 150	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Mikroskop Nikon Eclipse TS100	Nikon Instruments Europe BV, Amsterdam, Niederlande
Neubauer-Zählkammer, 54441	Marienfeld GmbH&Co.KG, Lauda-Königshofen
Gelplatte „Spacer Plate“, 165 3310	Bio-Rad Laboratories, California, US
Gelplatte „Short Plate“, 165 3308	Bio-Rad Laboratories, California, US
Amersham Hypercassette, RPN11642	GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK
Mini-PROTEAN Tetra Handcast Systems, #552BR	Bio-Rad Laboratories, California, US
Semidry-Blottingkammer, #221BR	Bio-Rad Laboratories, California, US
Power Supply, #043BR	Bio-Rad Laboratories, California, US
AGFA Curix 60 (Entwicklermaschine)	AGFA Healthcare, Mortsel, Belgien
BD FACSCalibur™ Flow Cytometer	BD Biosciences, San Jose, California, USA
BioRad Gene Pulser	BioRad, Hercules, California, USA
BioRad Power Pac Basic	BioRad Hercules, California, USA
Sterilbank Hera Safe	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Heizblock	neoLab, Heidelberg

Microplate Reader Model 680	BioRad, California, US
-----------------------------	------------------------

3.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien. Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Hersteller und ggf. Artikelnummer.

Produkt und Artikelnummer	Hersteller
Pipettenspitzen 0,5-20µl, 732 024	BRAND GmbH&Co.KG, Wertheim
Pipettenspitzen 2-200µl, 732 028	BRAND GmbH&Co.KG, Wertheim
Pipettenspitzen 50-1000µl, 732 032	BRAND GmbH&Co.KG, Wertheim
Serologische Pipetten 5ml, 606 180	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Serologische Pipetten 10ml, 607 180	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Serologische Pipetten 25ml, 760 180	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
FACS Tubes, 5ml, 551579	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäß 15ml, 188271	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäß 50ml, 227261	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Reagiergefäß 1,5ml, 72 690 001	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
Reagiergefäß Safe Seal 2,0ml, 72 695 500	Sarstedt AG&Co., Nümbrecht
6-Well-Platten, 92406	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
96-Well-Platten, 92696	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflaschen, 150ml, 90151	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Chromatografiepapier, 195g/m ²	GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK
Nitrocellulose-Blottingmembran, 106 00002	GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK
Röntgenfilme, 47410	Fujifilm GmbH, Düsseldorf

3.3. Chemikalien

Tabelle 5: Chemikalien. Übersicht über die verwendeten Chemikalien mit Angabe von Hersteller und ggf. Artikelnummer.

Produkt und Artikelnummer	Hersteller
Annexin-V PF 647	Rekombinantes Protein. Hergestellt nach Logue et al.2009 <i>Expression, purification and use of recombinant annexin V for the detection of apoptotic cells</i> doi:10.1038/nprot.2009.143
Propidiumiodid, CN74.1; Lot:166240634	Carl ROTH GmbH Karlsruhe
FACS Clean, 340345	BD, Biosciences; San Jose, USA
FACS Rinse, 340346	BD, Biosciences; San Jose, USA
FACS Flow, 342003	BD, Biosciences; San Jose, USA
HEPES Potassium Salt, H0527-100G	Sigma Aldrich GmbH, Missouri, USA

Natriumchlorid (NaCl), 92652	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe
EDTA, 5134-250G	Sigma Aldrich GmbH, Missouri, USA
EGTA, E4378-100G	Sigma Aldrich GmbH, Missouri, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid, P-7626	Sigma Aldrich GmbH, Steinheim
Pefablock, A154.1	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe
Aprotinin, A162.1	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe
DTT (1,4-Dithiothreit), 6908.1	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe
Natriumorthovanadat	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe
NP-40	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe
BSA (Bovines Serum Antigen), T844.2	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe
DC TM Protein Assay Reagent A, 500-0113	Bio-Rad Laboratories, California, USA
DC TM Protein Assay Reagent B, 500-0114	Bio-Rad Laboratories, California, USA
DC TM Protein Assay Reagent S, 500-0115	Bio-Rad Laboratories, California, USA
β-Mercaptoethanol, 4227.1	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe
Rotiphorese-Gel-30 Monoacrylamid-Lösung, 3029.1	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS), 9592.2	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe
TEMED, 2367.1	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe
SDS ultra pure, 2326.2	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe
TRIS Base, AE15.3	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe
Glycin, 3908.3	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe
Konzentrierte Salzsäure (HCl), 4326.1	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe
Essigsäure (100%), 3738.1	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe
Milchpulver, ST00227	TSI GmbH, Zeven
Methanol, 32213-2.5L-M	Sigma Aldrich, Steinheim
Tween 20, 1389.0500	AppliChem GmbH, Darmstadt
Page Ruler Unstained Protein Ladder, 26614	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA
Ponceau-S, 1405.0100	AppliChem GmbH, Darmstadt
Luminol, 4203.1	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe
p-Coumarsäure, C9008-10G	Sigma Aldrich, Steinheim
30% H ₂ O ₂ , 1.07209.0250	Merck KGaA Darmstadt
AGFA Developer G153A	AGFA, Köln, Deutschland
AGFA Developer G153B	AGFA, Köln, Deutschland
AGFA Rapid Fixer G354	AGFA, Köln, Deutschland
Bromphenolblau, B-5525	Sigma Aldrich, Steinheim

3.4. Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Puffer und Lösungen. Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Bestandteile	Menge/Volumen	Molarität
Propidiumiodid-Lösung (50 µg/ml)	Propidiumiodid PBS IX	0,00125 g 25 ml	1,87 µM
Annexin V/Propidiumiodid Bindepuffer	HEPES NaCl CaCl ₂ NaOH HCl (20 %) H ₂ O	1,38 g 4,097 g 0,184 g <i>ad</i> pH = 7,4 <i>ad</i> pH = 7,4 <i>ad</i> 500ml	10,6 mM 140 mM 2,5 mM - - -
Annexin/Propidiumiodid Färbelösung	Annexin/Propidiumiodid Bindepuffer AnnexinV PF 647 Propidiumiodid	200 µl 1 µl 4 µl	
2x Lysis-Puffer (20 ml-Ansatz)	HEPES (1 M) NaCl (5 M) MgCl ₂ (1 M) EDTA (0,5 M) EGTA (0,5 M) H ₂ O	800 µl 2800 µl 40 µl 40 µl 8 µl 16,31 ml	40 mM 700 mM 2 mM 1 mM 0,2 mM
1xLysis-Puffer	2x Lysispuffer PMSF (100 mM) Pefablock SC Natriumorthovanadat (100 mM) DTT (100 mM) Aprotinin (1mg/ml) NP-40 (10%) H ₂ O	500 µl 10 µl 10 µl 10 µl 5 µl 1 µl 100 µl 364 µl	1 mM 0,42 mM 1 mM 0,5 mM 154 nM
Mixed Reagent	DC Protein Assay Reagent A DC Protein Assay Reagent S	1 ml 20 µl	
10x TGS-Puffer (Gelelektrophoresepuffer)	TRIS Base Glycin SDS H ₂ O	30 g 142 g 10 g <i>ad</i> 1000 ml	240 mM 1,89 M 35 mM
1x TGS-Puffer	10x TGS-Puffer H ₂ O	100 ml <i>ad</i> 1000 ml	
TRIS pH 8,8	TRIS Base H ₂ O HCl (20%)	12,114 g <i>ad</i> 100,0 ml <i>ad</i> pH = 8,8	1 M

TRIS pH 6,8	TRIS Base H ₂ O HCl (20%)	12,114 g ad 100,0 ml ad pH = 8,8	1 M
10x TBS-Puffer	TRIS Base NaCl H ₂ O HCl (20%)	24,2 g 80 g ad 1000 ml ad pH = 7,6	220 mM 1,52 M
1x TBST-Puffer	10x TBS H ₂ O Tween 20	100 ml 900 ml 1 ml	
Transfer-Puffer	TRIS Base Glycin SDS (10 %) Methanol H ₂ O	5,82 g 2,93 g 3,75 ml 200 ml ad 1000 ml	48 mM 39 mM 1,3 mM 20 %
ECL-Reagenz	TRIS pH = 8,8 Luminol p-Coumarsäure 30% H ₂ O ₂	10 ml 100 µl 20 µl 3 µl	100 mM 2,5 mM 0,2 mM
Ponceau-Rot-Lösung	Ponceau S 100% Essigsäure H ₂ O	0,5 g 25 ml 475 ml	
2x Laemmli-Puffer	TRIS pH = 6,8 Glycerol SDS 10 % Bromphenolblau H ₂ O β-Mercaptoethanol	5 ml 10 ml 20 ml 250 µg ad 50 ml frisch zugeben	100 mM 20 % 4 % 0,01 % 1 %
Stripping-Puffer	Glycin SDS 10 % H ₂ O HCl (20 %) Tween 20	7,5 g 5 ml ad 500 ml ad pH = 2,2 frisch zugeben	200 mM 3,5 mM 1 %

3.5. Medium und Antibiotika

Tabelle 7: Medium und Antibiotika für Zellkultur. Übersicht über verwendete Chemikalien für Zellkultur mit Angabe von Hersteller und Artikelnummer.

Produkt und Artikelnummer	Hersteller
RPMI-1640 W/O L-Glutamine, R0883-500ML	Sigma Aldrich GmbH, Missouri, US
FCS (Fetales Kälberserum), F7524	Sigma Aldrich GmbH, Missouri, US
Penicillin/Streptomycin, P4333-100ML	Sigma Aldrich GmbH, Missouri, US
L-Glutaminlösung, G7513-100ML	Sigma Aldrich GmbH, Missouri, US

Natrium-Pyruvat, S8636-100ML	Sigma Aldrich GmbH, Missouri, US
Thermo Clean DC blau, CAC1	Hartenstein, Würzburg
Incidin Plus, UN3267	ECOLAB, Minnesota USA

3.6. Primärantikörper

Tabelle 8: Primärantikörper: Übersicht über verwendete Primärantikörper mit Angabe von Verdünnung, zu verwendetem Sekundärantikörper, Hersteller, Artikelnummer und Lotnummer. Zudem ist das Molekulargewicht der Zielproteine aufgeführt.

Protein	Verdünnung	Sekundärantikörper	Detektion	Hersteller/ Artikelnummer
ATF6	1:1000 3 % BSA	Rabbit	100 kDa 70 kDa	Abcam, Cambridge, UK ab85304 Lot: GR17858-1
Beclin	1:1000 3 % BSA	Mouse	60 kDa	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA #48381
p-Beclin (Ser 93)	1:1000 3% BSA	Rabbit	60 kDa	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK 14717
β -Aktin	1:10.000 3%Milch	Mouse	45 kDa	Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland A5316
peIF2 α (Ser51)	1:1000 3%BSA	Rabbit	38 kDa	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK 3398 Lot: 6
eIF2 α	1:10.000 3%BSA	Rabbit	40 kDa	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK 5324 Lot: 3
IRE1 α	1:1000 3%BSA	Rabbit	130 kDa	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK 3294 Lot: 9
pIRE1 α (Ser742)	1:1000 3%BSA	Rabbit	110 kDa	Abcam plc, Cambridge, UK ab124945
PERK	1:1000 3%BSA	Rabbit	140 kDa	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK 5683 Lot: 5

GRP78 (BiP)	1:1000 3%Milch	Rabbit	78 kDa	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK 3183 Lot:4
LC3AB	1:1000 3%BSA	Rabbit	14-16 kDa	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK 12741 Lot: 3
Bcl-2	1:1000 3%BSA	Rabbit	26 kDa	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK 2870 Lot: 5
pSAPK/ pJNK (T183/ Y185)	1:1000 3%BSA	Mouse	46-54 kDa	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK 9255 Lot: 32
SAPK/ JNK	1:1000 3%BSA	Rabbit	46-54 kDa	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK 9252 Lot:12
ATF4	1:1000 3%BSA	Rabbit	49 kDa	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK 1181 Lot:
c-jun	1:1000 3%BSA	Rabbit	43 kDa 48 kDa	Cell Signaling Technology Cambridge, UK 9165 Lot: 11
p-c-jun (Ser 73)	1:1000 3%BSA	Rabbit	48 kDa	Cell Signaling Technology Cambridge, UK 3270 Lot: 5
p-c-jun (Ser 63)	1:1000 3%BSA	Rabbit	48 kDa	Cell Signaling Technology Cambridge, UK 2361 Lot: 6
HSF-1	1:1000 3% Milch	Rat	85 kDa	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland ADI-SPA-950
p-HSF-1 (S326)	1:1000 3%Milch	Rabbit	85 kDa	Abcam plc, Cambridge, UK 76076
XBP-1s	1:1000 3% Milch	Rabbit	60 kDa	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK 12782 Lot: 3

3.7. Sekundärantikörper

Tabelle 9: Sekundärantikörper. Übersicht über verwendete Sekundärantikörper mit Angabe von Hersteller und Artikelnummer.

Produkt und Artikelnummer	Hersteller
Anti-Rabbit IgG 011-000-003	Jackson Immunoresearch, Newmarket, UK
Anti-Mouse IgG 015-000-003	Jackson Immunoresearch, Newmarket, UK
Anti-Rat IgG 011-000-003	Jackson Immunoresearch, Newmarket, UK

3.8. Pharmakologisch aktive Substanzen

Tabelle 10: Pharmakologisch aktive Substanzen. Übersicht über verwendete pharmakologisch wirksame Substanzen mit Angabe von Hersteller und Artikelnummer.

Produkt und Artikelnummer	Hersteller
Carfilzomib	Selleck Chemicals LLC, Houston, TX, USA
Anisomycin, S7409	Selleck Chemicals LLC, Houston, TX, USA
CC-930, S8490	Selleck Chemicals LLC, Houston, TX, USA
SP 60 125	Sigma Aldrich, Steinheim
Thapsigargin	Sigma Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfonoxid (DMSO), A994.2	Carl ROTH GmbH, Karlsruhe

3.9. Zelllinien

AMO-1:

Die AMO-1- Zelllinie wurde aus Aszites einer 64-jährigen Patientin mit Plasmozytom (IgA-kappa) des Zwölffingerdarms zwei Monate nach Resektion der Tumormasse im Jahr 1984 isoliert (86). Es handelt sich um Suspensionszellen, welche leicht in RPMI-Medium kultiviert werden können.

AMO-1R65Car:

Hierbei handelt es sich um Carfilzomib-resistente AMO-1-Zellen, welche innerhalb der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Daniela Brännert generiert und zur Verfügung gestellt

wurden. Die Resistenz gegen den Proteasominhibitor Carfilzomib wurde durch beständige Inkubation mit steigenden Dosen Carfilzomib in Konzentrationen bis 65 nM erreicht. Als Resistenzmechanismus wurden nach Angaben von Frau Dr. Brännert die 800-fache Hochregulation des ABCB1- sowie die 200-fache Hochregulation des ABCB4-Transporters auf RNA-Ebene nachgewiesen. Die ABCB1-Überexpression konnte auch auf Proteinebene gezeigt werden (87).

3.10. Software und Datenbanken

Tabelle 11: Software und Datenbanken. Übersicht über verwendete Software und Datenbanken mit Angabe der Herstellerfirma.

Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmond, USA
GraphPad Prism v4.0b	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
FlowJo v8.8.7	FlowJo LLC, San Jose, USA
Pubmed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
Canvas X 2017	Canvas X Software, Inc.
Adobe Photoshop Elements Version 6.0	Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA
Endnote	Adept Software, Deutschland
Cell Quest™ Pro Research	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

4. METHODEN

4.1. Zellkultur

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden an der kommerziell erwerblichen Myelomzelllinie AMO-1 sowie an innerhalb der Arbeitsgruppe generierten Carfilzomib-resistenten AMO-1R65Car Zellen durchgeführt, die von Frau Dr. Daniela Brännert freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden.

Um optimales Zellwachstum zu gewährleisten, wurden die Zellen bei 37 °C und einer Atmosphäre von 5 % CO₂ im Brutschrank in Vollmedium kultiviert, welches aus mit 10 % FBS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin angereichertem RPMI 1640 Medium bestand. Dreimal wöchentlich fand ein Mediumwechsel statt, bei dem frisches, zuvor auf Zimmertemperatur aufgewärmtes Vollmedium zugegeben und die Zellen gegebenenfalls gesplittet und entsprechend verdünnt wurden.

Um einen kontinuierlichen Zellvorrat zu gewährleisten und Experimente über eine lange Zeitspanne an Zellen mit identischer genetischer Signatur vornehmen zu können, wurde eine Zelllinienbank in Kryolagerung erstellt. Dafür wurden $2-3 \times 10^6$ Zellen der entsprechenden Zelllinien sedimentiert, der Überstand verworfen und die Zellen in Einfriermedium bestehend aus 90 % FBS und 10 % DMSO aufgenommen. Nach 24-stündiger Lagerung bei -80 °C wurden die Aliquots in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Wiederauftauen und Kultivieren erwärmte man 10 ml Vollmedium auf 37 °C und überführte 500 µl dieses warmen Mediums in das Kryogefäß, um das Einfriermedium aufzutauen. Die angetauten Zellen im Einfriermedium wurden in die übrigen 9,5 ml Vollmedium aufgenommen, wodurch das im Einfriermedium hoch konzentrierte zelltoxische DMSO verdünnt wurde. Durch eine 5-minütige Zentrifugation konnte es schließlich entfernt werden. Das Zellpellet wurde in 20 ml Vollmedium aufgenommen und in eine 75 ml-Zellkulturflasche überführt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte für einen Zeitraum von etwa drei Monaten, anschließend wurden neue Zellen aufgetaut, um zu verhindern, dass altersabhängige Veränderungen der verwendeten Zellen die Versuchsergebnisse beeinflussen.

4.2. Zellzahlbestimmung mit Neubauer-Zählkammer

Um die Anzahl an Zellen in einem Milliliter Zellsuspension zu bestimmen, wurden sie mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Dafür färbte man 15 µl der Zellsuspension zunächst mit 15 µl Trypanblau in einem Well einer 96-Well-Platte an. Trypanblau ist ein Vitalfarbstoff, der von lebenden Zellen über in der Zellmembran exprimierte Pumpen kontinuierlich nach außen gepumpt wird. Somit werden nur nekrotische und apoptotische Zellen blau angefärbt, was eine Differenzierung zwischen vitalen und toten Zellen unter dem Lichtmikroskop ermöglicht. Von der gefärbten Zellsuspension wurden nun 15 µl in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und unter dem Lichtmikroskop die vitalen Zellen in allen vier Quadranten der Zählkammer ausgezählt. Die Zellzahl in einem Milliliter errechnete sich dann aus dem Mittelwert der Zellzahl in den vier Quadranten, welcher mit dem Kammerfaktor 10 000 und dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert wurde.

4.3. Western Blot-Analyse

Die Western Blot-Analyse diente dazu, die Expression spezifischer Proteine in einer Zelle zu identifizieren und quantitativ zu beurteilen.

Dafür wurden die Proteine zunächst mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt, mit dem Semidry-Blotting-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran mit einer Porengröße von 45 µm übertragen und mit einem proteinspezifischen Primärantikörper markiert. Ein mit dem Enzym Meerrettichperoxidase beladener Sekundärantikörper diente schließlich zur Sichtbarmachung der zu untersuchenden Proteinbande, indem er eine Lichtreaktion katalysierte, die auf einem Röntgenfilm detektiert werden konnte.

4.3.1. Ansatz und Proteinlyse

Für die Western Blot Ansätze wurden zunächst 1,5 Millionen Zellen pro Ansatz ausgezählt und jeweils in 4,5 ml Vollmedium suspendiert. In einer 6-Well-Platte wurden nun 4,5 ml Zellsuspension pro Well vorgelegt und mit dem jeweiligen Drug für

eine zuvor festgelegte Zeit bei 37 °C inkubiert. Zusätzlich wurde immer eine Negativkontrolle mit DMSO angesetzt, der keine pharmakologisch wirksame Substanz zugegeben wurde, um vergleichen zu können, wie sich die Proteinexpression unter der jeweiligen Substanz im Verhältnis zur Inkubation unter vergleichbaren Bedingungen ohne die Wirkung der pharmakologischen Substanz veränderte.

Nach der Inkubationszeit wurden die Ansätze aus ihren Kavitäten in 15 ml Falcon-Tubes geerntet und für 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, die Zellpellets wurden in 1 ml 4 °C kaltem PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach erneutem Zentrifugieren für 5 Minuten bei 300 g wurde das PBS abgesaugt und die Zellpellets bei -80 °C für mindestens 15 Minuten schockgefroren.

Um Aussagen über den Proteingehalt einer Zelle treffen zu können, mussten die Zellen zunächst lysiert werden. Dafür wurden 75 µl 1xLysepuffer pro Zellpellet verwendet, welche auf das gefrorene Pellet aufgetragen wurde. Unter gelegentlichem Vortexen musste der Ansatz für 20 Minuten auf Eis inkubieren und anschließend für 15 Minuten bei 4 °C und 16 100 g abzentrifugiert werden. Der proteinhaltige Überstand wurde nach dem Zentrifugieren in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C eingefroren.

Für aussagekräftige Ergebnisse der Western Blot Analyse ist es wichtig, in alle Taschen des SDS-Gels die gleiche Proteinmenge aufzutragen. Deshalb wurde der Proteingehalt jeder verwendeten Probe mithilfe des DC Protein Assays, einer von Biorad etablierten Weiterentwicklung des Lowry-Assays (88), bestimmt.

4.3.2. Proteinbestimmung mittels modifizierten Lowry-Assay

Die einzelnen Proben wurden gegen festgelegte BSA-Standards auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. In die ersten beiden Reihen wurden als Duplikat je 5 µl der sechs Standard Lösungen in absteigender Konzentration pipettiert, außerdem wurden einmalig 5 µl des verwendeten 1x Lysepuffers als Blank-Kontrolle aufgetragen. Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit H₂O ad inject verdünnt und in der folgenden Reihe der Wellplatte aufgetragen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 25 µl eines Reaktionsgemisches aus

1000 μl Reagent A und 20 μl *Reagent S*. Nach Einzelzugabe von 200 μl *Reagent B* zu jedem der Ansätze wurden sie für 15 Minuten bei Dunkelheit inkubiert und anschließend mittels *Microplate-Reader* ausgewertet.

Der verwendete DC Proteinassay beruht auf zwei Farbreaktionen. Im ersten Schritt, der Biuret-Reaktion, bildet sich durch Zugabe von im *Reagent A* enthaltenen Kupfer(II)ionen in alkalischer Lösung ein blauvioletter Farbstoff. Durch die Peptidbindungen der Proteine wird Kupfer(II) zu Kupfer(I) reduziert. Diese Kupfer(I)ionen sind nun in der Lage, das im zweiten Schritt zugegebene gelbe Folin-Coicalteu-Reagenz (*Reagent B*) zu Molybdänblau zu reduzieren (88). Der so katalysierte Farbumschlag kann photometrisch gemessen und der Proteingehalt in den Proben im Vergleich zu den Standards anhand einer Eichgerade berechnet werden.

Anschließend berechnete man die Menge jeder Probe, in der 20 μg Protein enthalten waren und füllte diese in einem frischen 1,5 ml Reaktionsgefäß mit H_2O auf, um ein Volumen von 10 μl zu erreichen. Zusammen mit 2,87 μl 5x SDS-Puffer und 0,1- 3 μl β -Mercaptoethanol wurden die Proben bei 98 °C unter Schütteln für 5 Minuten aufgeköcht, was eine Denaturierung der Proteine hervorrief. Nach dem Erhitzen wurden die Proben kurz anzenrifugiert und entweder direkt auf das SDS-Gel aufgetragen oder bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C eingefroren.

4.3.3. SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) diente dazu, die in den Proben enthaltenen Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. SDS maskierte die elektrische Eigenladung der Proteine, damit diese die Wanderung durch das Gel nach Anlegen eines elektrischen Felds nicht beeinflussen konnte und sorgte außerdem für die Linearisierung der Proteine. Das Verhältnis aus Rotiphorese und H_2O bestimmte die Porengröße des Gels.

Das für die beschriebenen Experimente verwendete Gel bestand aus einem 15%igem Trenngel, dem oben eine etwa 1,5 cm breite Schicht 5%igen Sammelgels aufgelagert war. Bis zur Verwendung wurde es feucht gehalten und bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

Die Gele wurden nach folgendem Rezept gegossen:

Tabelle 12: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die Gelelektrophorese

15% Trenngel	5% Sammelgel
2,5 ml Rotiphorese 30 (Fa. Roth)	0,83 ml Rotiphorese 30 (Fa. Roth)
1,9 ml Tris-HCl pH 8,8 1 M	0,58 ml Tris-HCl pH 6,8 1 M
0,6 ml Aqua dest.	3,5 ml Aqua dest.
50 µl SDS 10 %	50 µl SDS 10 %
50 µl APS 10 %	50 µl APS 10 %
2,5 µl TEMED	2,5 µl TEMED

In mindestens eine Tasche des Gels wurden 5 µl einer Proteinleiter aufgetragen, anhand derer man nach dem Blotten erkennen konnte, welche molekulare Masse sich an welcher Stelle der Membran befand. Neben der Leiter trug man je 12 µl der zu beurteilenden Samples auf; leere Taschen wurden mit 10 µl Laemmli-Puffer befüllt, um zu gewährleisten, dass alle Taschen gleich groß blieben.

Um die Masse und relative Menge des untersuchten Proteins hinreichend beurteilen zu können, war es wichtig, dass die Proteine in sauberen, schmalen Banden durch das Gel liefen. Dafür ließ man die Proteine zunächst bei einer Spannung von 100 V durch das grobporige Sammelgel laufen. Am Übergang zum 15%igen Trenngel sammelten sich die Proben und bildeten eine gemeinsame Laufmittelfront. Die Auftrennung im Trenngel erfolgte bei einer Spannung von 180 V für etwa 45 bis 60 Minuten, bis die Proteinbanden das untere Ende des Gels erreicht hatten.

4.3.4. Semidry-Blot

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteinbanden mit der Semidry-Blotting Technik durch eine senkrecht zum Gel verlaufende Spannung auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und darauf fixiert.

Die folgende Abbildung zeigt den schematischen Aufbau der Semidry-Blot-Vorrichtung.

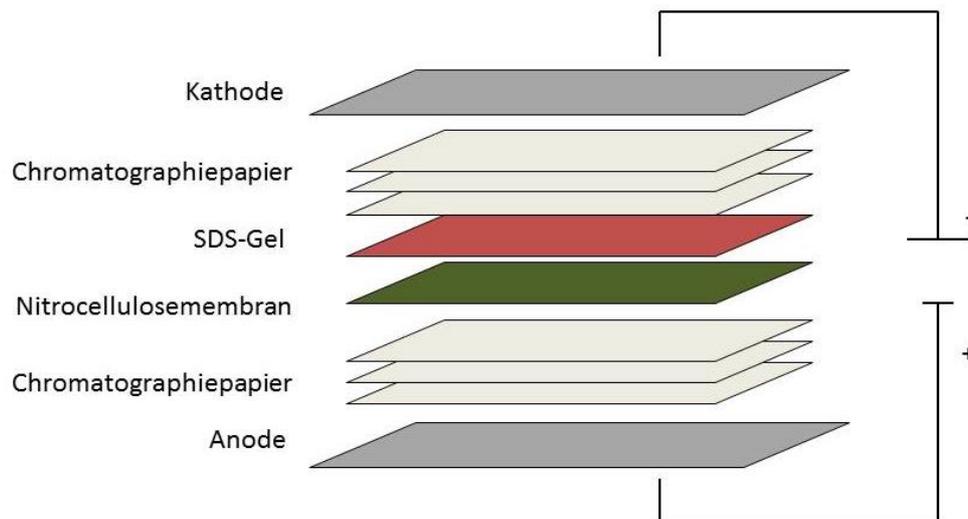


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Semidry-Blot-Vorrichtung. Durch eine elektrische Spannung zwischen Kathode und Anode wandern die Proteine aus dem Gel auf die darunter liegende Nitrocellulosemembran und werden auf dieser fixiert.

Nitrocellulosemembran und Chromatographiepapier tränkte man zuvor in Blotting-Transfer-Puffer. Vor Beginn des Blot-Vorgangs strich man die Flüssigkeit aus dem Papier-Membran-Gel Stapel und überprüfte, dass sich keine Blasen zwischen Gel und Membran gebildet hatten. Anschließend legte man für 35 Minuten eine Spannung von 15 V an.

Nach dem Blotten wurde zunächst mit Ponceau-S-Färbung kontrolliert, ob die Proteine korrekt auf die Membran transferiert worden waren. War dies der Fall, inkubierte man

die Membran für etwa 30 Minuten in 5%-iger in TBST gelöster Milch. Die Proteine aus der Milch banden an noch nicht mit Protein beladenen Stellen der Membran und blockten diese, wodurch unspezifische Antikörperbindung und somit eine Verfälschung der Ergebnisse verhindert wurde. Anschließend wusch man die Milch für 5 Minuten mit TBST ab und applizierte die entsprechenden Primär-Antikörper, die spezifisch an das zu untersuchende Protein auf der Membran banden. Diese inkubierte man über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler. Für die beschriebenen Experimente wurden Primärantikörper gegen Bcl-2, LC3A/B, Phospho-Beclin Ser93, Beclin, c-jun, Phospho-c-jun Ser73, Phospho-c-jun Ser63, SAPK und Phospho-SAPK verwendet. Gemäß Herstellerempfehlung wurden sie im Verhältnis 1:1000 in 5%-iger Milch-TBST oder in 5%-igem BSA-TBST verdünnt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit folgte ein dreimaliger Waschvorgang mit TBST für jeweils fünf Minuten und daraufhin die Applikation der Sekundär-Antikörper. Abhängig davon, ob der verwendete Primär-Antikörper aus Maus oder Kaninchen gewonnen worden war, musste nun 1:20 000 in Milch verdünnter Anti-Maus oder Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper aufgetragen werden, um eine Bindung an die mit Primär-Antikörper beladenen Stellen der Membran zu erreichen. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler wurde die Membran wiederum dreimal für je fünf Minuten mit TBST gewaschen und anschließend mit *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-Lösung behandelt. An den Sekundärantikörper war das Enzym Meerrettich-Peroxidase gebunden, welches das in der ECL-Lösung enthaltene Luminol in einen energiereichen Zustand versetzte und somit eine Lichtreaktion katalysierte.

Die ECL-Enzym-Reaktion ließ man für eine bis maximal fünf Minuten bei Licht ablaufen. Danach wurde mithilfe eines empfindlichen Röntgenfilms in einer Entwicklermaschine das Lichtsignal des Sekundärantikörpers detektiert. Trifft Licht auf den Röntgenfilm, so färbt er sich an der Stelle, die mit Licht in Berührung war, schwarz. Nach dem Entwickeln ließ sich also ein für das jeweilige Antigen des aufgetragenen Primärantikörpers spezifisches schwarzes Bandenmuster erkennen.

Zur Überprüfung der gleichmäßigen Beladung der Gele mit Protein wurde immer eine Kontrolle mit β -Aktin als Referenzprotein gefärbt, welches an DMSO-Kontrolle und

mit pharmakologisch aktiver Substanz behandelte Samples gleich stark binden sollte. Ungleich stark exprimierte Banden ließen so auf ungleichmäßige Beladung der Membranen mit Protein schließen, was die Aussagekraft des Blots einschränkte.

4.3.5. Strippen der Membranen

Sollten weitere Antikörper-Färbungen auf einer bereits verwendeten Membran durchgeführt werden, so musste diese zunächst für mindestens zwei Stunden, am besten aber über Nacht mit Stripping Puffer behandelt werden. Der saure pH-Wert von 2,2 des Puffers führte zur Lösung der Wasserstoffbrückenbindungen, die sich zwischen Protein und Antikörper gebildet hatten. Nach dreimaligem Waschen mit TBST konnten neue Primär-Antikörper auf die Membran aufgetragen werden, welche wiederum über Nacht inkubiert wurden.

4.4. Viabilitätsanalyse mittels Durchflusszytometrie

Das Apoptoseverhalten der Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Drugs wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Hierbei passieren die Zellen in einem Durchflusszytometer einzeln den Messbereich eines Lasers. Abhängig von der Zellgröße trifft unterschiedlich viel Licht auf einen in Verlängerung des Laserstrahls hinter der zu analysierenden Zelle angebrachten Photosensor, was Rückschlüsse auf die Größe der Zelle zulässt. Dies bezeichnet man als *Forward Scatter*. Ein weiterer Sensor, der in einem festgelegten Winkel zum Laserstrahl lokalisiert ist, misst die Streustrahlung des Lichts, welche durch die Granularität der Zelle beeinflusst wird. Stark granulierten Zellen wie beispielsweise Granulozyten brechen das Licht stärker und führen zu einer verstärkten Detektion dieses Rezeptors (*Side Scatter*).

Zudem sind in dem FACS-Gerät verschiedene Linsen installiert, welche Fluoreszenz in bestimmten Farbspektren auf definierte Photosensoren ablenken.

Zur Viabilitätsanalyse wurden zunächst in einer 96-Well-Platte je 8000 Zellen in 100 µl RPMI vorgelegt, welche für drei Tage bei 37 °C mit 100 µl des zu untersuchenden

Drugs inkubiert wurden. Zusätzlich wurden jeweils zwei Kontrollen angesetzt, welchen nur DMSO zugegeben wurde, um einen Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten Zellen anstellen und DMSO-toxische Wirkungen auf die Zellen einschätzen zu können.

Nach der Inkubationszeit wurden die Ansätze aus ihren Kavitäten in Reaktionsgefäße für Durchflusszytometrie geerntet, welche zuvor etwa zur Hälfte mit PBS gefüllt worden waren. Die Reaktionsgefäße wurden für fünf Minuten bei 300 g zentrifugiert, anschließend kippte man das überstehende PBS ab und gab in jedes Tube 200 µl Annexin-V-Bindepuffer, 1 µl Annexin-V-FITC und 4 µl Propidiumiodid dazu. Dieser Ansatz musste nun für mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubieren.

Annexin-V-FITC bindet an Phosphatidylserin, welches von apoptotischen Zellen Flippase-gesteuert auf der Außenseite der Zellmembran exprimiert wird. Das verwendete Annexin war zum Nachweis im Zytometer an einen Fluoreszenzfarbstoff gebunden.

Propidiumiodid bindet an doppelsträngige DNA. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran sind undurchlässig für Propidiumiodid. Geht jedoch die Integrität der Membran durch Nekrose oder späte Apoptosevorgänge verloren, so kann Propidiumiodid in die DNA interkalieren und dort in der FACS-Analyse nachgewiesen werden. Vitale Zellen werden weder durch Propidiumiodid, noch durch Annexin-V-FITC angefärbt, Annexin-V-FITC färbt apoptotische Zellen ab einem frühen Stadium der Apoptose und Propidiumiodid markiert nekrotische und spät-apoptotische Zellen.

Die Auswertung erfolgte mithilfe des Programms CellQuest Pro. Für jedes Proberöhrchen wurden zwei Punkt-Wolkendiagramme erstellt, in welchen *Forward*- gegen *Side-Scatter* sowie Annexin-V-FITC gegen Propidiumiodid aufgetragen wurden. Mit dem Programm FlowJo wurden die Diagramme schließlich in vier Quadranten eingeteilt, um vitale, apoptotische und nekrotische Anteile zu differenzieren und den prozentualen Anteil in jedem Quadranten zu bestimmen. Folgende Abbildung veranschaulicht dies am Beispiel der AMO-1-Zelllinie nach dreitägiger Inkubation in mit DMSO versetztem Medium bei 37 °C. Im linken unteren Quadranten sind lebende Zellen aufgetragen, welche weder für Propidiumiodid, noch für Annexin-V FITC positiv sind. 90 % der in der Probe vorhandenen Zellen sind demnach vital. Der Anteil

der spätapoptotischen Zellen, welche sowohl für Propidiumiodid als auch für Annexin-V-FITC positiv sind, beträgt hier 7,6 %. Diejenigen Zellen, welche negativ für Annexin-V FITC und positiv für Propidiumiodid sind, befinden sich in nekrotischen Zustand. Im angeführten Beispiel machen diese 1,15% aus.

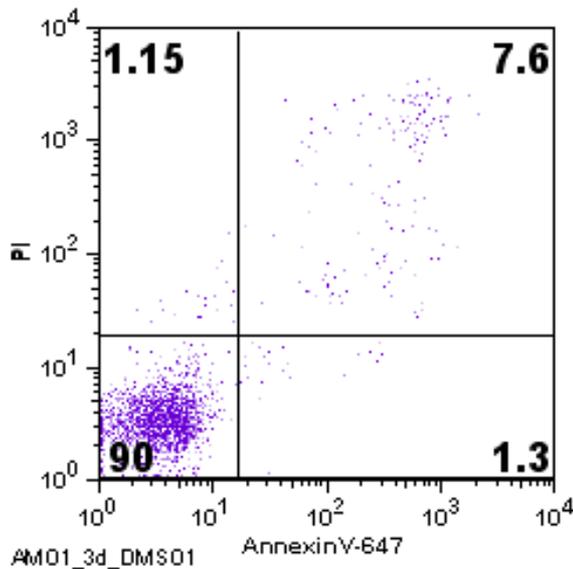


Abbildung 5: Darstellung der durchflusszytometrisch bestimmten Zellviabilität mit FlowJo. Das Programm FlowJo trägt in einem Diagramm Annexin-V-FITC gegen PI auf und ermöglicht so eine übersichtliche Darstellung des Anteils an vitalen sowie apoptotischen und nekrotischen Zellen in einer zuvor mittels FACS untersuchten Probe. Vitale Zellen sind weder für Annexin-V-FITC, noch für PI positiv und werden im linken unteren Quadranten dargestellt, während spätapoptotische Zellen positiv für beide Marker sind und im rechten oberen Quadranten abgebildet werden. Beispielhaft wurden hier AMO-1-Zellen untersucht, welche zuvor für drei Tage in mit DMSO versetztem Medium bei 37 °C inkubiert worden waren. Mit 90 % machen die vitalen Zellen hier den größten Anteil aus, während 7,6 % der Zellen in Apoptose gegangen sind. 1,3 % der Zellen befinden sich in einer frühen Apoptosephase, 1,15 % der Zellen sind nekrotisch.

5. ERGEBNISSE

5.1. JNK-Aktivierung durch Anisomycin induziert Apoptose in AMO-1- und AMO-1-R65Car-Zellen

Um Effekte des potenten JNK-Aktivators Anisomycin auf Zellen der Carfilzomib-sensitiven AMO-1- beziehungsweise der Carfilzomib-resistenten AMO-1R65Car-Zelllinien zu untersuchen, wurden Zellen beider Zelllinien mit ansteigenden Anisomycin-Konzentrationen zwischen 50 und 125 nM für drei Tage inkubiert. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen mittels Annexin V-FITC/PI-Färbung im Durchflusszytometer beurteilt. Mit steigender Anisomycin-Konzentration ließ sich für beide Zelllinien eine deutlich reduzierte Viabilität durch eine gesteigerte Apoptoserate im Verhältnis zur DMSO-Kontrolle beobachten. Die sich aus dem Vergleich der viablen Zellpopulationen unter Anisomycin-Behandlung ergebenden Dosis-Wirkungskurven (Abb. 6) zeigen den Abfall der Viabilität. Der EC₅₀-Wert lag für beide Zelllinien bei einer Konzentration von 80 nM, ab etwa 100 nM war die Viabilität auf unter 5% abgesunken.

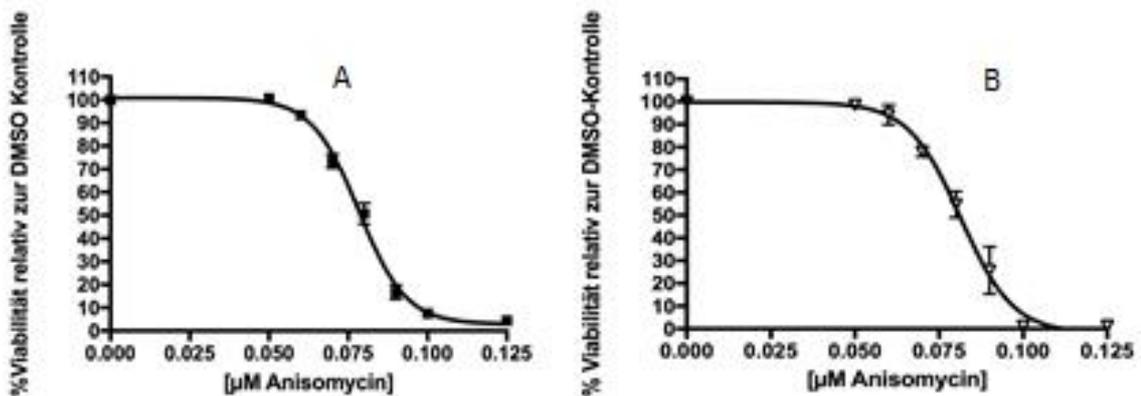


Abbildung 6: Anisomycin induziert Apoptose in der AMO-1- und der AMO-1-R65Car-Zelllinie.

Die Zelllinien AMO-1 (Abbildung A) und AMO-1-R65Car (Abbildung B) wurden jeweils für drei Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen des JNK-Aktivators Anisomycin inkubiert. Anschließend wurden die Viabilität und Apoptoserate mittels Annexin-V-FITC/PI-Färbung im Durchflusszytometer analysiert. Die Abbildungen zeigen den Anteil der viablen Zellen in Prozent der DMSO-Kontrolle mit der Standardabweichung aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten. Ab einer Anisomycin-Konzentration von 50 nM ließ sich für beide Zelllinien eine Viabilitätsreduktion beobachten, welche mit steigenden Konzentrationen weiter zunahm, bis die Zellen bei Konzentrationen ab 100 nM zu weniger als 5% viabel waren.

5.2. JNK-Inhibition führt in Abwesenheit weiterer Stressfaktoren zu keiner Beeinträchtigung der Viabilität von AMO-1- und AMO-1-R65Car-Zellen

Mit der gleichen Methodik wurde auch die Wirkung der beiden JNK-Inhibitoren CC-930 (Tanzisertib) und SP600125 auf AMO-1- und AMO-1-R65Car-Zellen untersucht. In Konzentrationen zwischen 5 nM und 10 μ M zeigte sich nach 72-stündiger Inkubationszeit bei keiner der beiden untersuchten Zelllinien eine signifikante Änderung der Viabilität im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abb. 7).

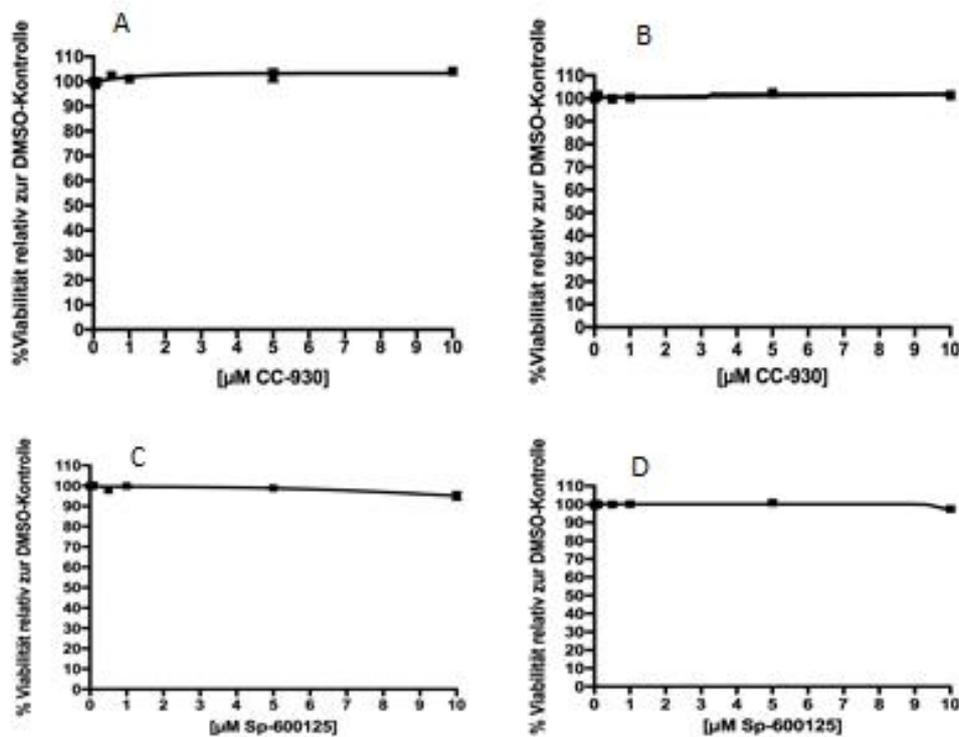


Abbildung 7: JNK-Inhibition führt zu keiner Beeinträchtigung der Viabilität von AMO-1- und AMO-1-R65Car-Zellen. Zellen der Zelllinien AMO-1 (Abbildungen A und C) und AMO-1-R65Car (Abbildungen B und D) wurden jeweils für drei Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen CC-930 beziehungsweise SP 600125 zwischen 5 nM und 10 μ M inkubiert. In der anschließenden Viabilitätsbestimmung mittels Annexin-V-FITC/PI im Durchflusszytometer zeigte sich für alle untersuchten CC-930- und SP 600125-Konzentrationen eine mit der DMSO-Kontrolle vergleichbare Viabilität. Die Standardabweichung in A, B, C und D wurde für drei voneinander unabhängige Experimente berechnet.

JNK-Inhibition hat somit in Abwesenheit weiterer Stressfaktoren keine proapoptotische Wirkung auf die Zellen.

5.3. CC-930 unterdrückt den durch fatalen ER-Stress induzierten JNK-Signaltransduktionsweg und schützt AMO-1-Zellen vor Apoptose

Zur Überprüfung der Wirksamkeit und Etablierung der optimalen Inkubationsdauer des JNK-Inhibitors CC-930 wurden AMO-1-Zellen zunächst über verschiedene Zeiträume zwischen 0,5 h und 24 h mit CC-930 in 2 μ M Konzentration behandelt. Da unbehandelte AMO-1-Zellen geringe bis keine Expression der Proteine des JNK-Signaltransduktionswegs aufweisen, wurden die Zellen zur Kontrolle für 4 Stunden mit 100 nM Thapsigargin inkubiert. Thapsigargin hemmt die Kalziumpumpe im endoplasmatischen Retikulum und induziert dadurch einen fatalen ER-Stress mit starker Aktivierung des des JNK-Signaltransduktionsweges. In der anschließenden Viabilitätsuntersuchung mittels Annexin V-FITC/PI-Färbung und Durchflusszytometrie ließ sich erkennen, dass die vierstündige Inkubation der Zellen mit Thapsigargin den Anteil der vitalen Zellen auf etwa 50% relativ zur DMSO-Kontrolle reduzierte (Abb. 8). Während die alleinige JNK-Inhibition mit CC-930 die Viabilität der Zellen nicht beeinflusste, wiesen die mit Thapsigargin und CC-930 ko-inkubierten Zellen signifikant erhöhte Viabilitätsraten (von bis zu 80%) auf. Diese Beobachtung deutet auf einen protektiven Effekt der JNK-Inhibition bei fatalem ER-Stress hin. Dieser protektive Effekt auf die Viabilität war abhängig von der Wirkdauer der Ko-Inkubation: Er stieg im Zeitraum bis zu 12 h an und begann nach 24 h wieder leicht abzunehmen (Abb. 8).

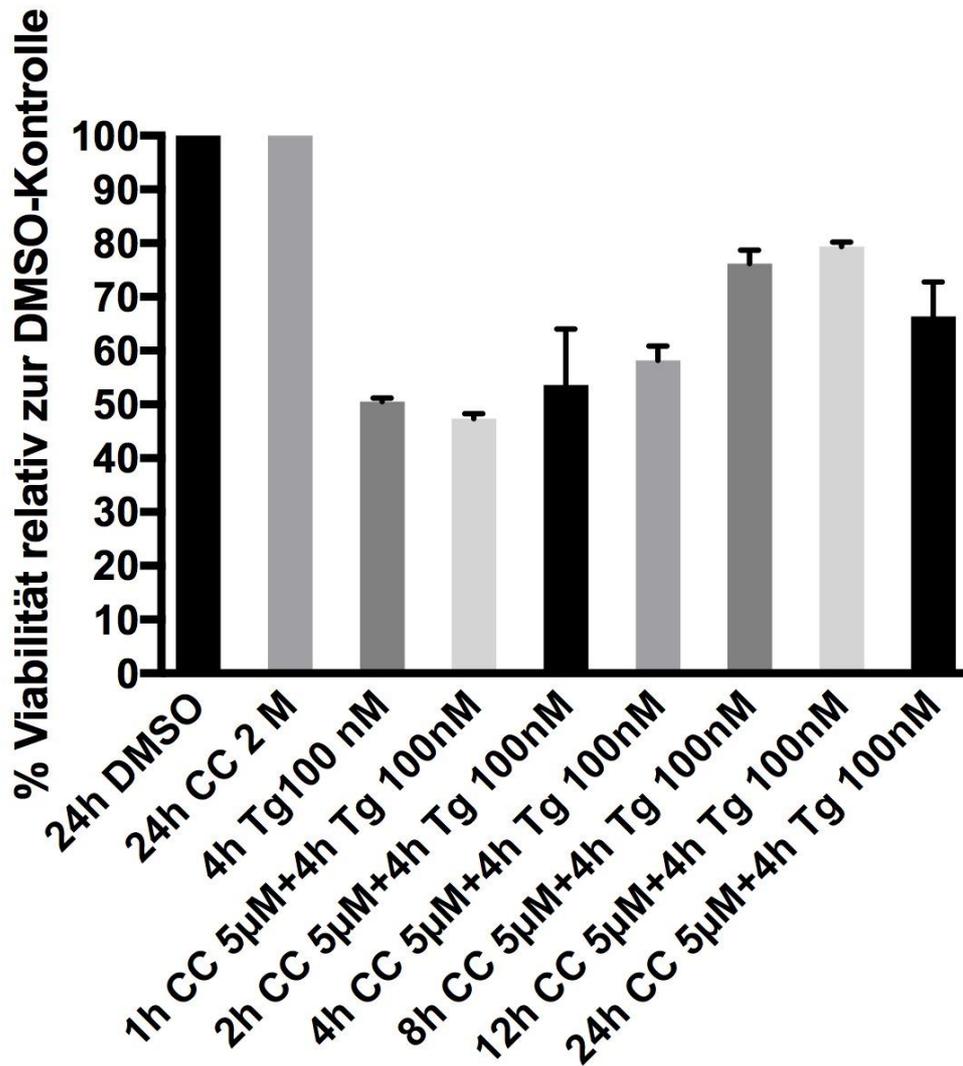


Abbildung 8: JNK-Inhibition mit CC-930 verbessert die Viabilität von AMO-1-Zellen nach Inkubation mit Thapsigargin. AMO-1-Zellen wurden für 4 h mit Thapsigargin 100 nM sowie für unterschiedlich lange Zeitspannen zwischen 1 h und 24 h mit dem JNK-Inhibitor CC-930 in 2 µM Konzentration inkubiert. Zusätzlich wurden Kontrollen mit DMSO, 24 h CC 2 µM und 4 h Thapsigargin 100 nM angefertigt. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurde der Anteil vitaler Zellen mittels Durchflusszytometrie und Annexin-V-FITC/PI-Färbung ermittelt. Vierstündige Behandlung mit CC-930 führte zu keiner signifikanten Änderung der Viabilität, die vierstündige Inkubation mit Thapsigargin bewirkte einen Rückgang der vitalen Zellen auf etwa 50%. Wurde der JNK-Signaltransduktionsweg mit dem Inhibitor CC-930 inhibiert, so reduzierte dies die proapoptotische Wirkung des Thapsigargin. Der Zell-protective Effekt nahm mit steigender Inkubationszeit des Inhibitors zu und erreichte sein Wirkmaximum nach 8-12 h Inkubationsdauer mit einem Anteil vitaler Zellen von etwa 80%. Die hier gezeigten Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

AMO1

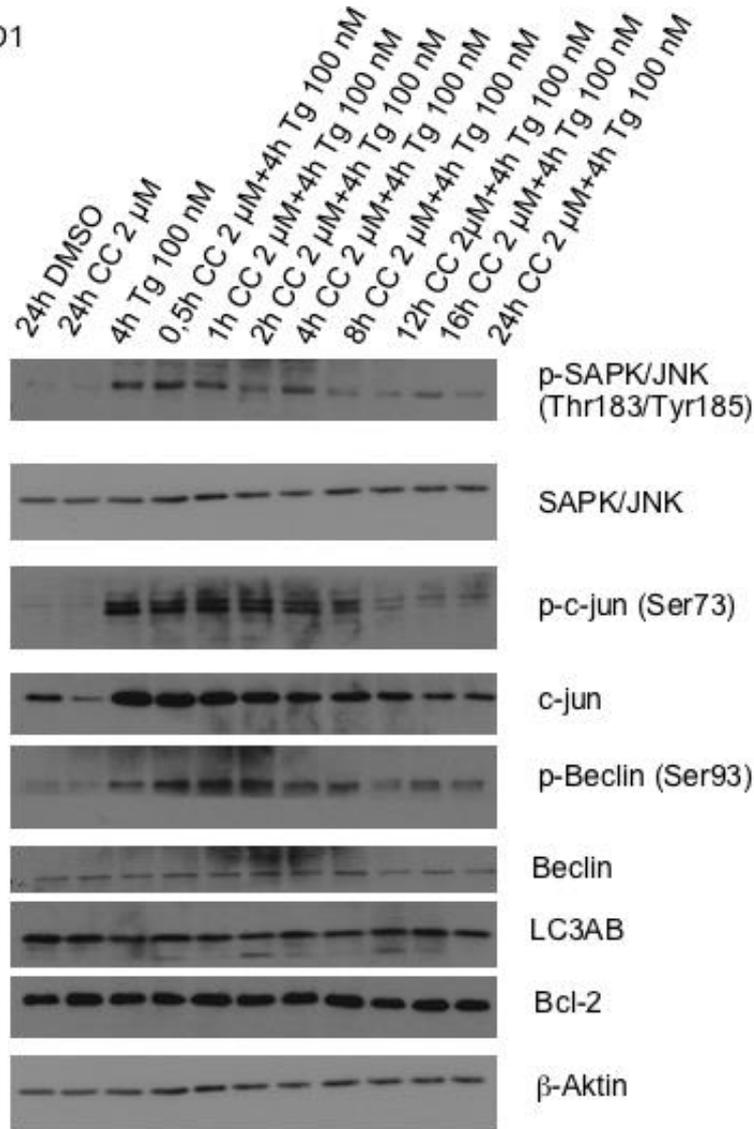


Abbildung 9: Die durch Thapsigargin induzierte verstärkte Expression von Proteinen des JNK-Signaltransduktionsweges wird durch CC-930 gehemmt. AMO-1-Zellen wurden für 4 h mit dem potenten JNK-Induktor Thapsigargin 100 nM sowie für unterschiedlich lange Zeitspannen zwischen 1 h und 24 h mit dem JNK-Inhibitor CC-930 in 2 μ M Konzentration inkubiert. Zusätzlich wurden Kontrollen mit DMSO, 24 h CC 2 μ M und 4 h Thapsigargin 100 nM angefertigt. Die Expression der Proteine des JNK-Signaltransduktionsweges wurde mittels Western Blot bestimmt. Thapsigargin führt zu einer deutlichen Induktion von p-SAPK (Thr183/Tyr185), c-jun und p-c-jun (Ser73), welche durch JNK-Inhibition mittels CC-930 effektiv abgeschwächt werden kann. Hierbei zeigt sich eine Augmentation der CC-930-Wirkung mit steigender Inkubationszeit, wobei die stärkste Suppression der Thapsigargin-induzierten JNK-Aktivierung nach einer CC-930-Inkubationsdauer von 8-12 h beobachtet werden kann.

Zusätzlich sollten die Vorgänge, die diesen Beobachtungen auf Proteinebene zugrunde lagen, mittels Western Blot untersucht werden. Im Western Blot zeigte sich nach vierstündiger Inkubation mit dem ER-Stress-Induktor Thapsigargin eine im Vergleich

zur DMSO Kontrolle deutlich gesteigerte Expression der untersuchten Proteine des JNK-Signaltransduktionsweges, zu denen p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) als phosphorylierte und somit aktive Form von JNK und die wiederum dadurch aktivierten Proteine c-jun und p-c-jun (Ser73) sowie zählen (Abb. 9). Diese Beobachtung bestätigt die Annahme, dass ER-Stress zur Aktivierung des JNK-Signaltransduktionsweges in MM-Zellen führt. Die Hochregulation des phosphorylierten Beclin 1 nach Inkubation mit Thapsigargin für 4 Stunden weist auf eine induzierte Autophagie-Reaktion hin, auch wenn sich eine Änderung des LC3A/B-Signals noch nicht nachweisen lässt.

Inkubation mit CC-930 führte zu einer im Vergleich zur DMSO-Kontrolle dezent reduzierten Expression der JNK-Signalweg-Proteine, welche sich jedoch schwierig quantifizieren lässt, da die Proteine des JNK-Signaltransduktionsweges auch bei den unbehandelten Zellen der DMSO-Kontrolle nur schwach exprimiert waren.

Beim Kombinationsansatz von Thapsigargin und CC-930 zeigte sich, dass die durch Thapsigargin induzierte Phosphorylierung von c-jun an Serin73 als Hauptmarker für die Aktivierung des JNK-Signaltransduktionsweges durch den JNK-Inhibitor CC-930 wirksam unterdrückt werden konnte. Darüber hinaus weist auch die Reduktion der Phosphorylierung von JNK an Thr183/Tyr185 und der Expression von c-jun auf eine suffiziente JNK-Signaltransduktionswegshemmung durch CC-930 hin. Dabei war das Ausmaß der Suppression von der Inkubationsdauer des Inhibitors abhängig. Eine optimal inhibierende Wirkung auf die Expression der Proteine des JNK-Signaltransduktionsweges hatte CC-930 nach einer Einwirkdauer zwischen 8 h und 12 h.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob sich die beschriebenen Beobachtungen auf den in der Therapie des Multiplen Myeloms angewandten Proteasominhibitor Carfilzomib übertragen lassen, um Rückschlüsse auf die bisher noch nicht vollständig aufgeklärte Vermittlung der apoptotischen Wirkung von Carfilzomib zu ziehen.

5.4. JNK-Inhibition verstärkt die apoptotische Wirkung des Proteasominhibitors Carfilzomib auf AMO-1-Zellen

Der klinisch zugelassene Proteasominhibitor Carfilzomib induziert ER-Stress (UPR) und Apoptose in MM-Zellmodellen *in vitro* und *in vivo*, und hat auch einen starken anti-MM-Effekt bei Patienten. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente konnten die apoptotische Wirkung von Carfilzomib in MM-Zellmodellen *in vitro* gut reproduzieren. Um zu untersuchen, ob die durch Carfilzomib induzierte Apoptose von der Aktivierung des JNK-Signaltransduktionsweges abhängig ist, sollte dieser Signalweg vor der Carfilzomib-Zugabe mittels CC-930 inhibiert und die Viabilität bestimmt werden.

Dafür wurden in einer 96-Well Platte AMO-1-Zellen vorgelegt, die entweder mit DMSO als Kontrolle oder mit 2 μ M beziehungsweise 5 μ M CC-930 vorinkubiert wurden, bevor nach 4 Stunden wiederum DMSO oder 2 nM Carfilzomib zugegeben worden ist.

Nach 72 Stunden Inkubationszeit wurde die Viabilität der AMO-1-Zellen in den verschiedenen Ansätzen mittels Annexin-V-FITC/PI-Färbung im Durchflusszytometer analysiert. Beide untersuchten CC-930 Konzentrationen zeigten bei Mono-Behandlung keine Auswirkung auf die Apoptoserate, während 2 nM Carfilzomib bei einzelner Zugabe zu einer Apoptoserate von etwa 50 % führte. In der Kombination zeigte sich im Vergleich zur Carfilzomib-Kontrolle eine signifikant eingeschränkte Viabilität, wobei die Viabilität bei höherer CC-930-Konzentration weiter abnahm. So führte die Kombinationsbehandlung mit 2 nM Carfilzomib und 2 μ M CC-930 zu einer Viabilität von etwa 30 %. Bei 5 μ M CC-930-Konzentration lag die Viabilität nur noch bei unter 10 % (Abb. 10 A und B). Um auszuschließen, dass es sich hierbei lediglich um Substanz-spezifische aber Wirkmechanismus-unabhängige toxische Effekte durch CC-930 handelte, wurden die Experimente anschließend mit SP600125, einem anderen pharmakologischen JNK-Inhibitor, wiederholt. Auch mit der Kombination von Carfilzomib mit SP600125 ließen sich erhebliche Viabilitätsreduktionen der behandelten AMO-1-Zellen beobachten (Abb. 10 C und D).

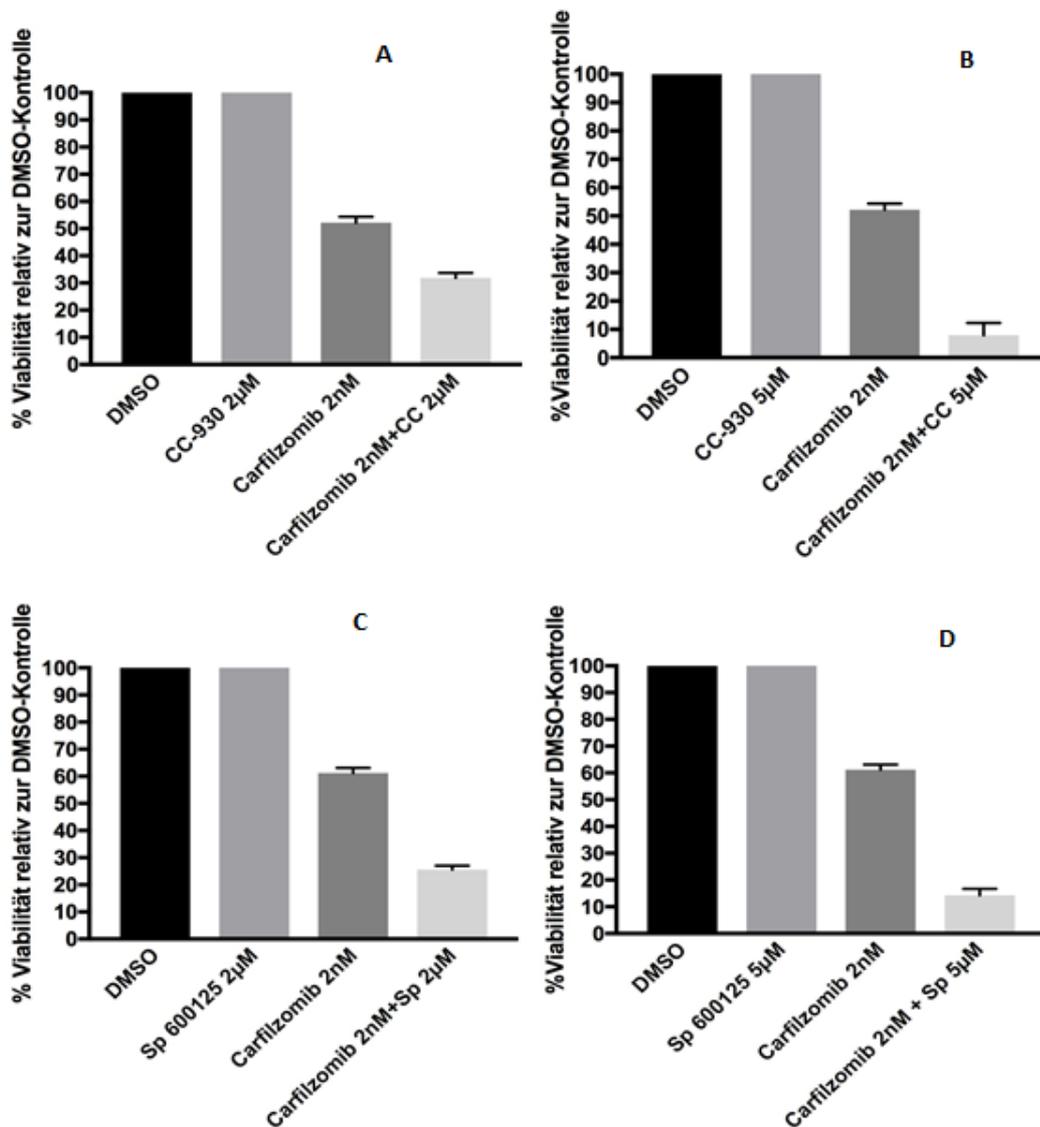


Abbildung 10: JNK-Inhibition verstärkt die apoptotische Wirkung des Proteasom-Inhibitors Carfilzomib auf AMO-1-Zellen. AMO-1-Zellen wurden für drei Tage entweder mit 2 nM Carfilzomib oder mit 2 μM (Abbildungen A und C) beziehungsweise 5 μM (Abbildungen B und D) CC-930/Sp-600125 oder einer Kombination aus Proteasom-Inhibitor und JNK-Inhibitor behandelt. Anschließend wurde die Viabilität mittels Annexin-V-FITC/PI-Färbung im Durchflusszytometer analysiert. 2 nM Carfilzomib führte zu einer Apoptoserate von etwa 50%. Selektive JNK-Inhibition durch CC-930 oder Sp-600125 beeinflusste die Viabilität der AMO1-Zellen nicht. Die Kombination aus Proteasom-Inhibition und JNK-Inhibition führte im Vergleich zur Carfilzomib-Kontrolle zu gesteigerter Induktion von Apoptose, deren Ausmaß mit steigender JNK-Inhibitor-Konzentration zunahm. Die gezeigten Abbildungen zeigen Mittelwerte aus je drei voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten mit den dazugehörigen Standardabweichungen.

Um den Einfluss des JNK-Signaltransduktionsweges auf den durch Carfilzomib induzierten ER-Stress via Unfolded Protein Response (UPR) auf molekularbiologischer Ebene besser verstehen zu können, wurde ein in unserer Arbeitsgruppe etabliertes UPR-spezifisches Protein-Panel mittels Western Blot analysiert.

Carfilzomib induziert ER-Stress (UPR), was durch die Induktion von pIRE1 α , ATF4 als *Downstream*-Protein des PERK-Signalweges und ATF6 erkennbar wird (Abb. 11). Die JNK-Inhibitoren CC-930 und SP600125 führten zu verstärkter Expression von p-IRE1 α . Die Expression der weiteren untersuchten Proteine des UPR-Panels blieb durch die alleinige Inkubation mit einem der beiden Inhibitoren unbeeinflusst. Die Aktivierung von IRE1 α führt einerseits über die Endoribonukleaseaktivität von IRE1 α zur vermehrten Expression von XBP1s, zudem wird über IRE1 α die SAPK/JNK aktiviert, welche im Nukleus c-jun an Serin73 phosphoryliert. Diese Phosphorylierung ließ sich durch Behandlung der Zellen mit den JNK-Inhibitoren CC-930 beziehungsweise SP600125 supprimieren. Die aktive Form des IRE1 α ist nach Behandlung mit der Kombination aus Carfilzomib und CC-930/SP600125 stärker exprimiert als nach Monoinkubation mit Carfilzomib. Dieser Befund deutet darauf hin, dass sich die die IRE1 α -aktivierenden Wirkungen der beiden Substanzen verstärken. Im Gegensatz zur alleinigen Hemmung des JNK-Signalweges durch CC-930, zeigte die alleinige Proteasominhibition mit Carfilzomib eine Induktion der GRP78-Expression im Sinne einer protektiven Aktivierung der UPR. Dies wird durch die UPR-vermittelte Initiierung von Autophagie durch Carfilzomib unterstrichen, die sich in dem Experiment durch die gesteigerte Expression von LC3A/B nachweisen lässt. JNK-Inhibition allein hat dagegen keine Auswirkung auf die Induktion von Autophagie.

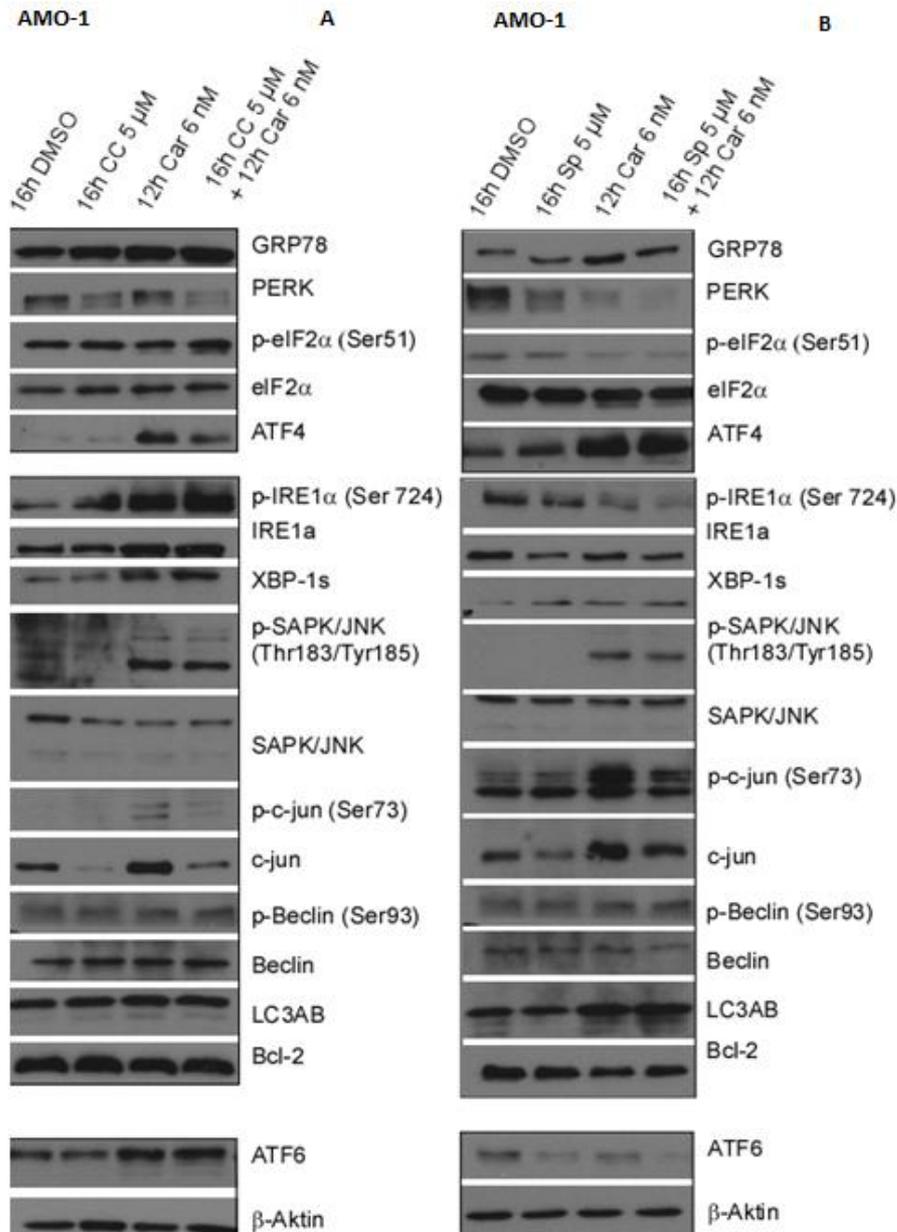


Abbildung 11: Carfilzomib-induzierte *Unfolded Protein Response* kann durch JNK-Inhibition beeinflusst werden. AMO-1-Zellen wurden für 16 h entweder mit DMSO, mit 5 μM CC-930 (Abbildung A) beziehungsweise SP600125 (Abbildung B) oder für 12 h mit 6 nM Carfilzomib oder einer Kombination aus Carfilzomib und einem JNK-Inhibitor kultiviert. Anschließend wurde die Proteinexpression mittels Western Blot untersucht. Es zeigte sich, dass der Proteasominhibitor Carfilzomib die verschiedenen Signalwege der *Unfolded Protein Response* im Vergleich zur DMSO-Kontrolle aktivierte. Alleinige Inkubation mit CC-930 beziehungsweise SP600125 führt zu verstärkter Expression von p-IRE1α, was auf eine leichte Induktion der *Unfolded Protein Response* über diesen Signalweg im Vergleich zur DMSO-Kontrolle schließen ließ. Zudem supprimierten die Inhibitoren die Expression von c-jun im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Die anderen untersuchten Proteine blieben von CC-930 und SP600125 unbeeinflusst. Nach Kokultivierung ließ sich eine Reduktion der Expression der Proteine des JNK-Signaltransduktionsweges (c-jun, p-c-jun Ser73) verglichen mit der Carfilzomib-Kontrolle erkennen. Gleichzeitig war die Expression von p-IRE1α nach der Kombinationsbehandlung stärker ausgeprägt als in der Kontrolle, die nur mit Carfilzomib behandelt worden war. β-Aktin wurde zur Ladekontrolle der Membranen angefärbt.

5.5. Anisomycin und Carfilzomib haben synergistische Wirkung auf AMO-1R65Car-Zellen

Die AMO-1R65Car-Zelllinie wurde in unserer Arbeitsgruppe als eine gegen Carfilzomib resistente MM-Zelllinie generiert. Sie ist durch eine Überexpression von ABCB1- und ABCB4-Pumpen in der Zellmembran gekennzeichnet. Hierbei handelt es sich um Effluxpumpen, deren Wirkmechanismus darin besteht, Carfilzomib aus der Zelle auszuschleusen, sodass das Pharmakon seine Wirkung am Proteasom nicht entfalten kann.

Im folgenden Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob eine Behandlung mit dem JNK-Aktivator Anisomycin die Resistenz der Zellen gegenüber Carfilzomib beeinflussen kann. Bei einer Überwindung der Resistenz wäre nach Kultivierung der Zellen mit einer Kombination aus Anisomycin und Carfilzomib eine höhere Apoptoserate zu erwarten als die addierten Raten in den Kontrollen, welche mit nur einer der beiden Substanzen inkubiert worden waren. Es wurde ein entsprechender Ansatz mit AMO-1R65Car Zellen durchgeführt, welche für 72 h mit DMSO, Anisomycin in 68 nM Konzentration, Carfilzomib in 200 nM Konzentration oder einer Kombination aus beiden Substanzen inkubiert wurden. Anschließend wurde die Viabilität der Zellen mittels Annexin-V-FITC/PI-Färbung im Durchflusszytometer kontrolliert. Nach Supplementierung mit 68 nM Anisomycin waren im Vergleich zur DMSO-Kontrolle 12 % der Zellen apoptotisch, 200 nM Carfilzomib führten zu einer Apoptoserate von 16 %. Kombinierte man die beiden Substanzen in identischer Konzentration, so wurde ein Viabilitätsverlust von 78 % relativ zur DMSO-Kontrolle beobachtet, was deutlich über der additiven Wirkung der Einzelsubstanzen lag.

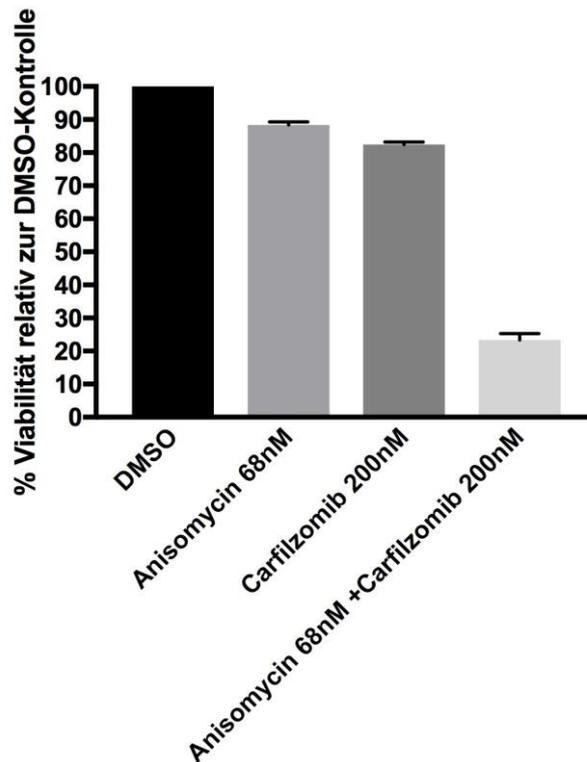


Abbildung 12: JNK-Aktivierung durch Anisomycin wirkt synergistisch mit Carfilzomib auf AMO-1R65Car-Zellen. AMO-1R65Car-Zellen wurden für drei Tage mit DMSO, 68 nM Anisomycin, 200 nM Carfilzomib oder einer Kombination aus beiden Drugs inkubiert. Anschließend erfolgte eine Analyse der Viabilität mittels Annexin-V-FITC/PI-Färbung im Durchflusszytometer. Für die Kombination ließ sich eine im Verhältnis zu den Kontrollen gesteigerte Apoptoserate beobachten, die über den summierten Effekt der beiden Einzelsubstanzen hinaus reichte. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Experimenten mit den jeweiligen Standardabweichungen.

Um die dieser Beobachtung zugrunde liegenden Mechanismen näher zu untersuchen, wurde ein Western Blot durchgeführt. AMO-1-R65Car-Zellen wurden für 16 h mit DMSO oder Carfilzomib 6 nM oder für 2 h mit Anisomycin 200 nM oder mit einer Kombination aus beiden pharmakologisch wirksamen Substanzen kultiviert. Es wurden Konzentrationen und Inkubationszeiten gewählt, welche in vorangegangenen Etablierungsexperimenten gut auswertbare Signale gezeigt hatten.

In der anschließenden Viabilitätskontrolle mittels FACS ließ sich zwar schon eine geringgradig aber noch nicht signifikant erhöhte Apoptoserate nach Behandlung der Zellen mit der Kombination aus Anisomycin und Carfilzomib im Vergleich zu der Kontrolle mit Anisomycin nachweisen. Die Kultivierung mit 6 nM Carfilzomib für 16 h führte zu keiner deutlich gesteigerten Viabilitätsreduktion relativ zur DMSO-Kontrolle.

Die molekulare Auswertung nach Färbung der Proteine des JNK-Signaltransduktionsweges ist in Abbildung 13 dargestellt. Sowohl Carfilzomib als auch Anisomycin induzieren in der verwendeten Konzentration den JNK-Signaltransduktionsweg, was sich an der verstärkten Expression von p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle erkennen lässt. Bei Anisomycin ist diese Induktion jedoch verglichen mit Carfilzomib deutlich stärker ausgeprägt. Anisomycin induziert zudem die Expression der im Signalweg JNK untergeordneten Proteine c-jun und p-c-jun (Ser73). Die verwendete Carfilzomib-Konzentration konnte über die gewählte Zeitdauer keine gesteigerte Expression dieser Proteine erreichen. In der Kombination der beiden Substanzen fällt, verglichen mit den Kontrollen nach Monobehandlung, eine deutliche Verstärkung der Phosphorylierung von JNK/SAPK sowie auch der Expression von c-jun auf. Die Phosphorylierung von c-jun hingegen war nach Carfilzomib-Behandlung fast maximal und ließ sich deshalb in der Kombination mit Anisomycin nicht mehr steigern. Autophagie wird durch keine der beiden untersuchten Substanzen ausgelöst, was sich an den im Vergleich zur DMSO-Kontrolle unveränderten Signalen von Beclin, p-Beclin (Ser93) und LC3A/B zeigt (Abb. 13).

AMO1R65Car

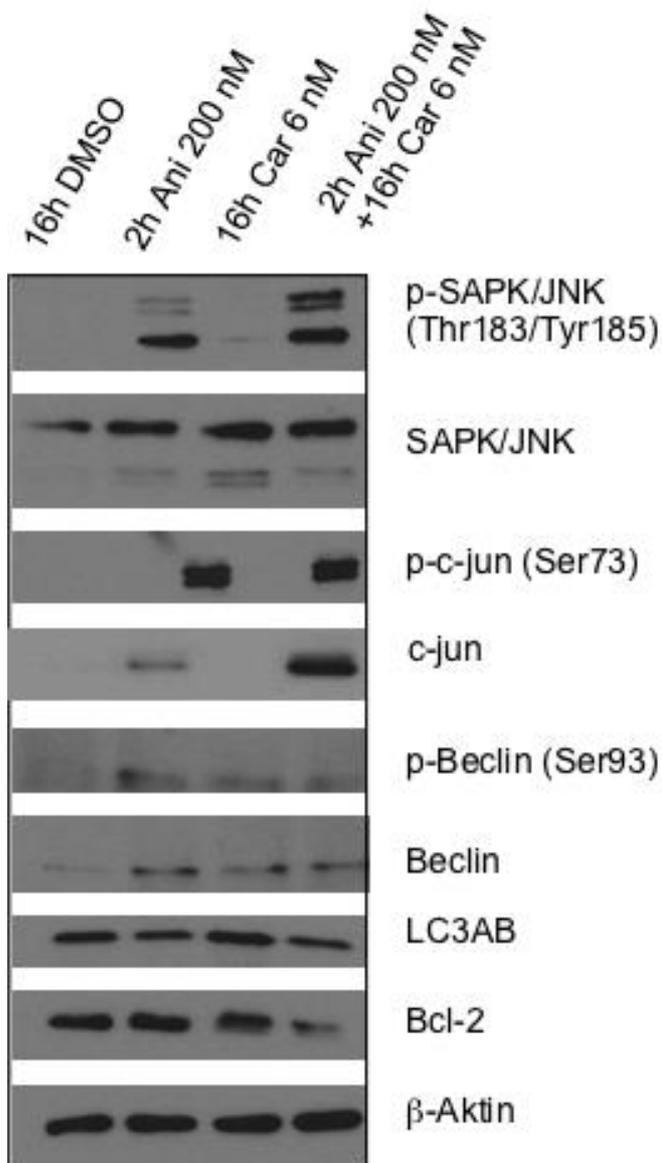


Abbildung 13: Carfilzomib und Anisomycin induzieren synergistisch die Expression der Proteine des JNK-Signaltransduktionsweges. AMO-1R65Car-Zellen wurden für 16 h entweder mit DMSO oder mit 6 nM Carfilzomib oder für 2 h mit 200 nM Anisomycin oder einer Kombination aus beiden Wirkstoffen kultiviert. Anschließend wurde die Proteinexpression mittels Western Blot untersucht. Sowohl Anisomycin als auch Carfilzomib induzieren die Phosphorylierung von JNK/SAPK im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, bei Anisomycin ist dieser Effekt jedoch deutlich stärker ausgeprägt. Anisomycinbehandlung verstärkt zudem die Expression von c-jun und p-c-jun (Ser73). In der Kombination lässt sich ein synergistischer Effekt der beiden Substanzen auf die Phosphorylierung von SAPK/JNK und die Expression von c-jun erkennen. Autophagie wird durch keine der beiden Substanzen ausgelöst. β-Aktin wurde zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Membranen angefärbt.

6. DISKUSSION

Mit einer Inzidenz von etwa 5 von 100 000 Einwohnern pro Jahr ist das Multiple Myelom (MM) die zweithäufigste hämatologische Neoplasie (10). Während die therapeutischen Optionen bis vor einigen Jahrzehnten noch auf symptomatische Therapien beschränkt und die Überlebenszeit der Patienten stark limitiert waren, wurden seither verschiedene, immer effektivere Therapieschemata etabliert, welche das Überleben der Patienten signifikant verbessern konnten. Intensive Forschung und Kenntnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen ermöglichen heute die Entwicklung immer neuer zielgerichteter therapeutischer Substanzen, die eine effektive Behandlung bei gleichzeitig möglichst geringen Nebenwirkungen gewährleisten (49).

Zu den Substanzklassen, die innerhalb der letzten Jahre zu bedeutenden Fortschritten in der Myelomtherapie geführt haben, zählen unter anderem die Proteasominhibitoren (PIs) mit den Vertretern Bortezomib, Carfilzomib und Ixazomib (83). Diese entfalten ihre proapoptotische Wirkung auf MM-Zellen durch Induktion von proteotoxischem Stress, indem sie den Abbau von Proteinen durch das Ubiquitin-Proteasom-System inhibieren. Dabei beeinflussen PIs diverse Signaltransduktionswege, zu denen unter anderem der IRE1-Signalweg aus der *Unfolded Protein Response* zählt (84). Bei der Betrachtung des IRE1-Signaltransduktionsweges unter dem Einfluss von Proteasominhibitoren fällt eine verstärkte Expression der JNK-Proteine und einhergehend eine verstärkte Phosphorylierung von c-jun an Serin 63 und Serin 73 auf. Als Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP-1 beeinflusst c-jun die verstärkte Expression von sowohl proapoptotischen (TNF- α , FAS-L, Bak) (89) als auch überlebensfördernden Faktoren wie Zyklin D1 (79, 90). Aufgrund der apoptotischen Wirkung von Proteasominhibitoren wurde innerhalb der Arbeitsgruppe die Hypothese aufgestellt, dass die Phosphorylierung von c-jun in diesem Kontext zur Vermittlung der Carfilzomib-induzierten Apoptose beitragen könnte. Unter der Voraussetzung, dass der JNK-Signaltransduktionsweg relevant für die durch PI induzierte Apoptose von MM-Zellen ist, wäre zu erwarten, dass die Behandlung von MM-Zellen mit JNK-Inhibition zu einer gesteigerten Überlebensrate der Zellen führen müsste, während im

Umkehrschluss eine Induktion des JNK-Signalweges die Apoptose fördern sollte. Diese Hypothese sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Die Aktivierung und Inhibition des JNK-Signalweges wurde pharmakologisch erreicht, wobei Anisomycin als starker JNK-Aktivator und CC-930 sowie SP600125 als JNK-Inhibitoren zum Einsatz kamen. Die Versuche wurden an AMO-1- sowie an Carfilzomib-resistenten AMO-1-R65Car-Zellen durchgeführt.

Zunächst wurde die Auswirkung des JNK-Aktivators Anisomycin auf die Viabilität beider Zelllinien mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hier zeigte sich eine apoptotische Wirkung, welche mit steigenden Anisomycin-Konzentrationen zunahm. Die Kurven ähneln sich für beide Zellreihen, der EC_{50} Wert war vergleichbar. Dieses experimentelle Ergebnis lässt zweierlei Rückschlüsse zu. Zum einen ist klar, dass Anisomycin in den AMO-1-Zellen Apoptose auslöst. Ob diese jedoch hauptsächlich durch die Aktivierung des JNK-Signaltransduktionsweges bedingt ist oder ob andere Mechanismen zugrunde liegen, kann dieses Experiment allein nicht klären. Des Weiteren zeigen die vergleichbaren EC_{50} Werte für beide Zelllinien, dass der Mechanismus, welcher in AMO-1R65Car-Zellen für die Resistenz gegen Carfilzomib verantwortlich ist, keine Resistenz gegenüber Anisomycin vermittelt. Bislang unpublizierte Daten von Frau Dr. Daniela Brännert et al. legen nahe, dass die Carfilzomib-Resistenz von AMO-1-R65Car-Zellen auf eine 800-fache Hochregulation von MDR1 (*Multi Drug Resistance-Protein 1*), auch als ABCB1 (*ATP-Binding Cassette sub-family B member 1*) bezeichnet, zurückzuführen ist. Zudem konnte eine 200-fache Hochregulation des ABCB4-Transporters auf RNA-Ebene nachgewiesen werden (87). Bei den ABCB-Transportern handelt es sich um ATP-abhängige Efflux-Pumpen, welche in der Lage sind, diverse Substanzen, zu denen insbesondere Medikamente zählen, aus der Zelle auszuschleusen. ABCB-Überexpression ist ein verbreiteter Mechanismus bei der Entstehung von Resistenzen gegenüber Therapeutika, an der Überwindung des Mechanismus wird derzeit intensiv geforscht (91, 92). Da AMO-1R65Car-Zellen auf Anisomycin vergleichbar sensitiv reagieren wie nicht-resistente AMO-1-Zellen kann gefolgert werden, dass Anisomycin kein Substrat der ABCB-Transporter ist und somit seine Wirkung innerhalb der Zelle auch bei Überexpression von ABCB1 und 4 ungehindert entfalten kann.

Auch die Auswirkung von JNK-Inhibition auf die Viabilität beider Zelllinien wurde durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei zeigte sich keine relevante Einschränkung der Viabilität durch die Behandlung mit den JNK-Inhibitoren CC-930 und SP600125, das heisst, dass die Inhibition des JNK-Signaltransduktionsweges in Abwesenheit weiterer Stressfaktoren nicht zu gesteigerter Apoptoserate führte.

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegende Hypothese postuliert eine zellprotektive Wirkung von JNK-Inhibition auf MM-Zellen bei Behandlung mit dem Proteasominhibitor Carfilzomib. Ein solcher Effekt konnte im Rahmen der durchgeführten Experimente für Thapsigargin nachgewiesen werden, eine Substanz, die nachweislich über die Aktivierung des JNK-Signaltransduktionsweges ER-Stress-induzierte Apoptose auslöst (93). Die Ergebnisse waren kongruent zu einer 2019 veröffentlichten Studie (93) und zeigten zum einen durchflusszytometrisch eine geringere Thapsigargin-induzierte Apoptoserate bei JNK-Inhibition im Vergleich zu Zellen, in denen der JNK-Signalweg nicht medikamentös inhibiert war. Zum anderen konnte auf Proteinebene eine gesteigerte Expression der *downstream*-Proteine des JNK-Signaltransduktionsweges durch Behandlung mit Thapsigargin nachgewiesen werden. Der Inhibitor CC-930 unterdrückte die JNK-abhängige Phosphorylierung von c-jun an Serin 73, zudem ließ sich aber bereits eine abgeschwächte Phosphorylierung von JNK an Thr183/Tyr185 und eine reduzierte Expression von nicht-phosphoryliertem c-jun erkennen.

Die Ergebnisse legen nahe, dass der JNK-Signaltransduktionsweg mit der Phosphorylierung von c-jun an Ser73 zur Thapsigargin-induzierten Apoptose beiträgt, da mit zunehmender Inhibierung JNK-Signalweges die Apoptoseraten abnehmen. Zudem konnte gezeigt werden, dass CC-930 in der Lage ist, JNK-vermittelte Apoptose zu verhindern. Nach dem aktuellen Stand der Wissenschaft resultiert die Wirkung von CC-930 aus der Inhibierung der ATP-abhängigen Phosphorylierung von c-jun durch JNK. CC-930 fungiert hierbei als kompetitiver Inhibitor von ATP (94). Einflüsse auf JNK selbst bzw. auf Proteine des IRE1- Signaltransduktionsweges wurden bisher nicht beschrieben. Allerdings lassen die mittels Western Blot gezeigten erniedrigten Phosphorylierungsraten von JNK und die erniedrigte Expression von c-jun nach Behandlung mit CC-930 darauf schließen, dass der Inhibitor seine Wirkung in diesem

Fall auch an dem JNK-Signalweg unmittelbar vorgeschalteten Zielstrukturen entfaltet. Um dies zu verifizieren und die zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären, sind weitere Versuche nötig. Allerdings sind ähnliche Effekte für andere JNK-Inhibitoren beschrieben, so beispielsweise für SP600125, einen der ersten etablierten JNK-Inhibitoren, welcher wie CC-930 durch kompetitive ATP-Inhibition wirkt. SP600125 inhibiert nachweislich neben der Phosphorylierung von c-jun durch die drei bekannten JNK-Isoformen auch weitere mit dem JNK-Signaltransduktionsweg in Verbindung stehende Kinasen, zu denen unter anderem MKK4 und MKK7 zählen (95). Ebensolche zusätzlichen Effekte von CC-930 könnten die beobachteten Einflüsse auf die Phosphorylierung von JNK erklären.

Unter Annahme der Richtigkeit der Arbeitshypothese – Carfilzomib wirkt über JNK-abhängige Phosphorylierung von c-jun an Serin 73 apoptotisch - wäre damit zu rechnen, dass sich die beschriebenen Ergebnisse für den Proteasominhibitor reproduzieren lassen. In Konzentrationen von 2 nM führte die Inkubation mit Carfilzomib bei nicht vorbehandelten AMO-1-Zellen zu einer Viabilitätsreduktion von etwa 50 %. AMO-1-Zellen, in denen der JNK-Signaltransduktionsweg vor Carfilzomib-Zugabe mit CC-930 inhibiert worden war, wiesen nach der gleichen Inkubationszeit eine deutlich geringere Viabilität auf. Mit steigender CC-930-Konzentration ließ sich dieser Effekt nicht verringern, sondern wurde sogar verstärkt (vgl. Abbildung 10). Zunächst wurden unspezifisch toxische Effekte durch CC-930 als ursächlich für dieses Phänomen angenommen, dagegen spricht jedoch die Tatsache, dass die alleinige Inkubation mit den verwendeten Dosen von CC-930 zu keinerlei Viabilitätseinschränkungen führte. Unter Verwendung eines alternativen JNK-Inhibitors, SP600125, waren die Ergebnisse reproduzierbar, was auf einen zumindest anteiligen Zusammenhang zwischen dem beobachteten Effekt und der Inhibierung des JNK-Signaltransduktionsweges hinweist.

Entgegen der aus der Arbeitshypothese abgeleiteten Erwartungen führte die Inhibierung von JNK mittels CC-930 bzw. SP600125 also nicht zu einer Reduktion der Carfilzomib-induzierten Apoptose; die Arbeitshypothese schien bereits an dieser Stelle widerlegt zu sein. Es blieb jedoch die Frage, ob die erhöhte Apoptoserate durch Carfilzomib bei Zellen, in denen der JNK-Signalweg pharmakologisch inhibiert worden

war, tatsächlich auf die verminderte Phosphorylierung von c-jun zurückzuführen war. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde zunächst diskutiert, ob die Inhibitoren möglicherweise nicht potent genug seien, um JNK trotz der starken aktivierenden Wirkung von Carfilzomib suffizient zu hemmen. Außerdem wurde in Erwägung gezogen, dass JNK-unabhängige Effekte der Inhibitoren für die Einschränkung der Viabilität verantwortlich sein könnten (95). Um dies besser beurteilen zu können, wurden die Vorgänge auf Proteinebene beleuchtet.

CC-930 und SP600125 supprimieren nach Monoinkubation die Expression von c-jun verglichen mit der DMSO-Kontrolle, außerdem führen sie zu verstärkter Expression von p-IRE1 α (Ser724). Auf welchem Weg die JNK-Inhibitoren letztere Wirkung erzielen ist unklar. Einflüsse auf IRE1 wurden in der Literatur bisher für keinen JNK-Inhibitor beschrieben (95). Die Suppression von c-jun ist möglicherweise auf eine Inhibition der Kinasen MKK4 und MKK7 zurückzuführen, ein Nebeneffekt, der zumindest für Sp-600125 bekannt ist (95). Ob dieser auch bei CC-930 auftritt bzw. ob die Kinase-Kinasen hier inhibiert wurden lässt sich aus den durchgeführten Versuchen nicht ableiten, dafür wäre eine Färbung von MKK4 und MKK7 notwendig.

Carfilzomib induziert ER-Stress via *Unfolded Protein Response* (UPR) (84, 96), was durch die Induktion von pIRE1 α , ATF4 als *Downstream*-Protein des PERK-Signalweges und ATF6 erkennbar wird.

Die Aktivierung von IRE1 α führt einerseits über die Endoribonukleaseaktivität von IRE1 α zur vermehrten Expression von XBP1s als einen Weg zur Wiederherstellung der zellulären Proteinhomöostase (70).

Zudem wird durch Carfilzomib die SAPK/JNK aktiviert, welche im Nukleus c-jun an Serin73 phosphoryliert, zusätzlich aber auch noch andere Signalwege steuert und sowohl Zellüberleben als auch Apoptose und Autophagie triggern kann. Diese Beobachtungen entsprechen auch dem aktuellen wissenschaftlichen Stand in der Literatur (83).

Nach Behandlung mit einer Kombination aus Carfilzomib und CC-930/SP600125 war die aktive, phosphorylierte Form des IRE1 α stärker exprimiert als nach Inkubation

allein mit Carfilzomib, was darauf hinweist, dass sich die IRE1 α -aktivierenden Wirkungen der beiden Substanzen verstärken. Eine stärkere Aktivierung von IRE1 führt nach Ko-Inkubation auch zu einer gesteigerten Expression von XBP1s im Sinne einer Zellprotektion (96). Die IRE1-Aktivierung scheint folglich nicht bzw. zumindest nicht ausschließlich für die gesteigerte Apoptoserate der Zellen nach Koinkubation verantwortlich zu sein. Allerdings erfüllt IRE1 diverse Funktionen (72), sodass eine proapoptotische Wirkung über andere Mechanismen denkbar wäre. Infrage käme hierfür die RIDD-Funktion (*Regulated IRE1-dependent Decay*), welche ohne ER-Stress zwar für Zellhomöostase sorgt, bei starkem ER-Stress jedoch gegenteilige Effekte vermittelt. Die Degradation von prä-miRNAs und mRNAs, deren Produkte eine Rolle für das Zellwachstum spielen, könnte dann zu einer Einleitung von Apoptose führen (73). Auf gesteigerten ER-Stress durch die Ko-Inkubation weisen die vermehrte Expression von p-eIF2 α als *Downstream*-Protein des PERK-Signalweges und p-IRE1 α im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit Carfilzomib hin. Es könnte gefolgert werden, dass der erhöhte ER-Stress nach Ko-Inkubation zu vermehrter RIDD-Aktivität führt und diese zumindest anteilig für die gesteigerte Apoptoserate mitverantwortlich ist.

Bei der Betrachtung des JNK-Signalweges fiel in der Kombination eine deutlich reduzierte Expression des phosphorylierten c-jun im Vergleich zur Carfilzomib-Kontrolle auf. Beide Inhibitoren sind also in der Lage, die durch Carfilzomib induzierte JNK-abhängige Phosphorylierung von c-jun an Serin 73 suffizient zu verhindern, die oben angeführte Annahme, es könne sich um zu wenig potente Inhibitoren handeln, wäre damit widerlegt. Ohnehin hätte diese Hypothese zwar eine ähnliche Apoptoserate bei nicht vorbehandelten und JNK-inhibierten AMO-1-Zellen erklärt, die signifikant höhere Viabilitätseinschränkung bei inhibiertem JNK-Signalweg vermag sie jedoch nicht zu begründen. Hier muss ein weiterer Mechanismus zugrunde liegen.

Die Phosphorylierung von c-jun führt über die Aktivierung des dimeren Transkriptionsfaktors AP-1 zur Transkription von sowohl proapoptotischen als auch zellprotektiven Genen (78, 79). Da Carfilzomib nachweislich den JNK-Signalweg aktiviert und so die Phosphorylierung von c-jun verstärkt und dabei proapoptotisch wirksam ist, lag die Vermutung nahe, dass p-c-jun in diesem Fall zu einer gesteigerten Expression proapoptotischer Gene führt. Wäre dies der Fall, so würde das Fehlen dieser

Genexpression durch JNK-Inhibition zu einer erniedrigten Apoptoserate führen, das Gegenteil war jedoch der Fall. Ein möglicher Grund hierfür wäre eine zellprotektive Wirkung von p-c-jun unter Carfilzomib-Behandlung, deren Antagonisierung durch JNK-Inhibition beobachtete erhöhte Apoptoserate erklären könnte. Die durchgeführten Versuche hatten allerdings nicht das Ziel, Aussagen über die genaue Wirkweise von AP-1 im Nukleus zu generieren; hierfür wären weiterführende Experimente, z.B. eine Färbung verschiedener durch AP-1 beeinflusster Proteine, notwendig.

Eine weitere Auffälligkeit auf Proteinebene ist die in der Kombination diskret reduzierte Expression von GRP78 im Vergleich zur Kontrolle mit Carfilzomib-Mono-Behandlung. GRP78 gehört zur HSP70-Familie, ist funktionell ein Chaperone-Protein und ist ein zentraler Regulator des ER-Stress. Deshalb kann es zum Zellüberleben unter proteotoxischem Stress beitragen (70). Geht man von einer zellprotektiven Wirkung des JNK-Signalweges aus, so führt die Ko-Inkubation der Zellen mit Carfilzomib und einem JNK-Inhibitor zum gleichzeitigen Wegfall mindestens dieser zwei zellprotektiven Mechanismen, welcher ausschlaggebend für die erhöhte Apoptoserate sein könnte. In entsprechenden (unpublizierten) Experimenten, bei denen Zellen mit einem GRP78-Inhibitor und einem JNK-Inhibitor kokultiviert wurden und anschließend die Viabilität mittels Durchflusszytometrie bestimmt wurde, konnte diese Hypothese allerdings nicht bestätigt werden.

Carfilzomib kann in AMO-1-Zellen autophagische Prozesse auslösen, was aus der gesteigerten Expression des Autophagiemarkers LC3A/B geschlossen werden kann. Autophagie ist allerdings ein komplexer Prozess, der durch diverse Signaltransduktionswege beeinflusst wird (97). So kann aus der unveränderten Expression der frühen Autophagiemarker Beclin1 und p-Beclin1 (Ser93) nach Carfilzomib-Behandlung nicht automatisch geschlossen werden, dass hier keine Autophagie induziert wird. Es ist beschrieben worden, dass JNK über die Phosphorylierung von Bcl-2 Autophagie induzieren kann (80).

Die beschriebenen Beobachtungen ließen keine eindeutigen Rückschlüsse darauf zu, weshalb die Kokultivierung mit Carfilzomib und einem JNK-Inhibitor zu gesteigerten

Apoptoseraten der Zellen führt. Möglicherweise ist die JNK-abhängige Phosphorylierung von c-jun an Serin73 kein für die Carfilzomib-induzierte Apoptose notwendiger Mechanismus. Ebenfalls bleibt zu klären, ob der Effekt sich *in vivo* auch so darstellen würde, und man sich die gewonnenen Informationen gegebenenfalls klinisch zu Nutzen machen könnte, beispielsweise um eine Wirkungsverstärkung von Carfilzomib durch adjuvante Behandlung mit einem JNK-Inhibitor zu erreichen.

Die Kombination aus Proteasominhibitor und JNK-Aktivator zeigte eine Steigerung der Apoptoserate im Vergleich zur Apoptoserate der Einzelsubstanzen. Dabei war insbesondere für die Carfilzomib-resistenten AMO-1-R65Car-Zellen die Auswirkung einer Kombination aus beiden Substanzen interessant. Ohne Anisomycin-Behandlung sorgen in den resistenten Zellen ABCB1- und ABCB4-Transporter (91, 92) für das Ausschleusen von Carfilzomib aus der Zelle. Es sollte geprüft werden, ob der zelluläre Stress ausgelöst durch den übermäßig aktivierten JNK-Signalweg mittels Anisomycin mit diesem Mechanismus interferieren könnte und so die Zellen für Carfilzomib resensibilisieren könnte. Im Falle einer solchen synergistischen Wirkung der beiden Inhibitoren wäre in der Kombination eine verstärkte Apoptoserate im Vergleich zur Einzel-Behandlung mit beiden Substanzen zu erwarten. Tatsächlich bestätigte sich diese Hypothese im Rahmen der Versuche, Carfilzomib und Anisomycin wirken synergistisch auf die Apoptoseinduktion von AMO-1-R65Car-Zellen. Ob dies auf den Zusammenbruch der Effluxpumpen oder auf andere Mechanismen zurückzuführen ist, ließ sich aus den durchgeführten Experimenten jedoch nicht ableiten.

Auf Proteinebene findet sich für beide Substanzen eine Induktion der Proteine des JNK-Signaltransduktionsweges, welche bei Anisomycin jedoch deutlich stärker ausgeprägt ist als bei Carfilzomib. In der Kombination zeigt sich eine mehr als additive Verstärkung der Expression von p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) und c-jun, jedoch nicht von p-c-jun (Ser73). Daraus lässt sich ableiten, dass die gesteigerte Apoptoserate bei Ko-Inkubation zwar durch JNK-Aktivierung verursacht sein kann, jedoch eher nicht über die Phosphorylierung von c-jun vermittelt wird. Auf welchem Weg JNK-Aktivierung stattdessen zur Apoptose führt, geht aus den Versuchen nicht hervor,

hierfür müssten weitere mit JNK in Verbindung stehende Proteine mittels Western-Blot dargestellt werden.

Auch in diesem Fall bleibt zu klären, ob sich die Ergebnisse *in vivo* reproduzieren lassen. Sollte dies der Fall sein, könnte eine adjuvante Therapie mit einem JNK-Aktivator zur Überwindung einer Carfilzomib-Resistenz beitragen. Hierfür müsste jedoch zunächst ein geeignetes, klinisch verträgliches Pharmakon zur JNK-Induktion gefunden werden. Aufgrund seines Nebenwirkungsprofils eignet sich Anisomycin nicht für die Anwendung *in vivo*. Außerdem wäre interessant zu wissen, ob ähnliche Effekte bei Resistenzen gegen andere Proteasominhibitoren zu beobachten sind, ob Anisomycin also beispielsweise auch mit Bortezomib oder Ixazomib synergistisch auf entsprechend resistente Zellen wirkt.

7. ZUSAMMENFASSUNG

Das Multiple Myelom (MM) ist trotz seiner vergleichsweise geringen Inzidenz die zweithäufigste maligne hämatologische Erkrankung in der westlichen Welt. Während die Krankheit bis vor einigen Jahrzehnten aufgrund mangelnder effizienter Therapieansätze meist innerhalb kurzer Zeit letal verlief, führte die Entwicklung mehr zielgerichteter Therapeutika in den letzten Jahren zu einer deutlich gebesserten Überlebensrate für die betroffenen Patienten. So greifen neuentwickelte Substanzklassen wie die Cereblon-bindenden Immunmodulatoren oder die Proteasominhibitoren gezielt Strukturen an, welche für das Überleben von MM-Zellen relevant sind. Trotzdem rezidivieren nahezu alle Patienten, weshalb das MM weitgehend unheilbar und deshalb eine medizinische Herausforderung bleibt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich Carfilzomib, einem Proteasominhibitor der zweiten Generation. Carfilzomib bindet irreversibel an das Proteasom, hemmt dadurch seine Funktion des Proteinabbaus und löst dadurch eine Reihe von bisher noch nicht vollständig verstandenen zellulären Reaktionen aus, die zu einer Induktion von Apoptose in MM-Zellen führen.

Einer der Signaltransduktionswege, die durch Carfilzomib induziert werden, ist der JNK-Signaltransduktionsweg, der unter anderem bei zellulärem Stress in die Entscheidung zwischen Zellprotektion und Apoptose eingebunden ist. Welche Umstände welche Wege triggern, und wie genau dieser Prozess reguliert wird, ist bisher noch weitgehend unklar.

Da Carfilzomib zu einer Aktivierung des JNK-Signaltransduktionsweg führt und Apoptose induziert, lag die Frage nach einem möglichen Zusammenhang zwischen beiden Mechanismen nahe. Die vorliegende Arbeit überprüft die Hypothese, dass der JNK-Signaltransduktionsweg entscheidend zur Vermittlung der apoptotischen Effekte von Carfilzomib beiträgt.

Die Ergebnisse einer ersten Versuchsreihe schienen die Hypothese zu bestätigen, da wir bei einer artifiziellen, sehr starken Aktivierung des JNK-Signaltransduktionsweges durch Anisomycin eine Verstärkung des durch Carfilzomib-induzierten apoptotischen Effektes beobachten konnten.

Weitere Versuche, die sich auf die durch Carfilzomib induzierte Aktivierung des JNK-Signaltransduktionsweges fokussierten, konnten die Annahme in unserer Hypothese klar widerlegen, indem sie zeigten, dass die JNK-vermittelte Phosphorylierung von c-jun an Serin 63 und Serin 73 für die Carfilzomib-induzierte Apoptose nicht notwendig ist. Im Gegenteil, bei Inhibition des JNK-Signaltransduktionsweges waren die apoptotischen Effekte durch Carfilzomib sogar stärker ausgeprägt als durch Carfilzomib-Behandlung allein. Die diesem Effekt zugrundeliegenden molekularen Mechanismen ließen sich im Rahmen der Arbeit nicht aufklären. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die reaktive Aktivierung des JNK-Signaltransduktionsweges unter dem zellulären Stresszustand, den die Proteasominhibition auslöst, eher eine zellprotektive Wirkung zeigt. Der Wegfall dieser protektiven Wirkung vermag die erhöhte Apoptoserate bei JNK-Inhibition zu erklären. Meine Arbeit unterstreicht dabei den weiterzuverfolgenden Ansatz, die zellprotektiven Mechanismen unter Carfilzomib-Behandlung besser zu verstehen.

SUMMARY

Despite its relatively low incidence, multiple myeloma (MM) is the second most malignant hematologic disease in Western countries. Until a few decades ago, the disease progression was rapid and MM was usually fatal due to a lack of efficient therapeutic approaches; however, the development of more targeted therapeutics in recent years has led to significant improvements in the survival rate for affected patients. Newly-developed substance classes such as Cereblon-binding immunomodulators or proteasome inhibitors target structures that are relevant for the survival of MM cells. However, because almost all patients relapse, MM remains largely incurable and therefore medically challenging.

The present work analyzes the second generation proteasome inhibitor Carfilzomib, a substance that irreversibly binds to the proteasome, inhibiting its protein degradation function and thereby triggering a series of, as yet not fully understood, cellular responses leading to induction of apoptosis in MM cells.

One of the signal transduction pathways induced by Carfilzomib is the JNK signal transduction pathway, which has been implicated in the decision pathway between cell protection and apoptosis during cellular stress. The specific circumstances that trigger these pathways and the exact processes for regulation remain largely unclear.

As Carfilzomib leads to activation of the JNK signal transduction pathway and induces apoptosis, a correlation between these mechanisms has been postulated. Therefore, the present work tests the hypothesis of whether the JNK signal transduction pathway is crucial in mediating the apoptotic effects of carfilzomib.

The results of an initial series of experiments confirmed the hypothesis, as the apoptotic effect induced by carfilzomib was enhanced when the JNK signal transduction pathway was artificially activated to a very high degree by Anisomycin. However, further experiments that focused on Carfilzomib-induced activation of the JNK signal transduction pathway did not support the hypothesis and showed that JNK-mediated phosphorylation of c-jun at serine 63 and serine 73 was not required for carfilzomib-induced apoptosis. In contrast, when the JNK signal transduction pathway was inhibited, the apoptotic effects were even more pronounced by Carfilzomib than by Carfilzomib treatment alone. The molecular mechanisms underlying this effect could not be elucidated within the scope of this work. However, one possible explanation for

these results could be that reactive activation of the JNK signal transduction pathway tends to exhibit a cell-protective effect under the cellular stress state induced by proteasome inhibition. The removal of this protective effect may explain the increased rate of apoptosis on JNK inhibition. In this regard, this work underscores the ongoing efforts to understand the cell-protective mechanisms that are impacted by Carfilzomib treatment.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Weltgesundheitsorganisation. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Revised 4th edition ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017.
2. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014;15(12):e538-48.
3. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clinic proceedings.* 2003;78(1):21-33.
4. Herold G. *Innere Medizin* 2019. I HÄMATOLOGIE: De Gruyter; 2019. p. 84-8.
5. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood.* 2008;111(6):2962-72.
6. Solly S. Remarks on the pathology of mollities ossium; with cases. *Med Chir Trans.* 1844;27:435-98 8.
7. Macintyre W. Case of Mollities and Fragilitas Ossium, accompanied with urine strongly charged with animal matter. *Med Chir Trans.* 1850;33:211-32.
8. Kyle RA, Steensma DP. History of multiple myeloma. Recent results in cancer research *Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer.* 2011;183:3-23.
9. Palumbo A, Anderson K. Multiple Myeloma. *New England Journal of Medicine.* 2011;364(11):1046-60.
10. Kazandjian D. Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Seminars in oncology.* 2016;43(6):676-81.
11. Brown LM, Gridley G, Check D, Landgren O. Risk of multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance among white and black male United States veterans with prior autoimmune, infectious, inflammatory, and allergic disorders. *Blood.* 2008;111(7):3388-94.
12. Wallin A, Larsson SC. Body mass index and risk of multiple myeloma: a meta-analysis of prospective studies. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990).* 2011;47(11):1606-15.
13. Waxman AJ, Mink PJ, Devesa SS, Anderson WF, Weiss BM, Kristinsson SY, et al. Racial disparities in incidence and outcome in multiple myeloma: a population-based study. *Blood.* 2010;116(25):5501-6.
14. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, et al. A Long-Term Study of Prognosis in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *New England Journal of Medicine.* 2002;346(8):564-9.
15. Brigle K, Rogers B. Pathobiology and Diagnosis of Multiple Myeloma. *Seminars in oncology nursing.* 2017;33(3):225-36.
16. Gerecke C, Fuhrmann S, Striffler S, Schmidt-Hieber M, Einsele H, Knop S. The Diagnosis and Treatment of Multiple Myeloma. *Deutsches Arzteblatt international.* 2016;113(27-28):470-6.
17. Michels TC, Petersen KE. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *American family physician.* 2017;95(6):373-83.

18. Matzdorff A, Duckert M, Fritze D. Multiples Myelom (MM). In: Arastéh K, Baenkler H-W, Bieber C, Brandt R, Chatterjee TT, Dill T, et al., editors. *Duale Reihe Innere Medizin. 4., überarbeitete Auflage* ed: Georg Thieme Verlag; 2018.
19. Eslick R, Talaulikar D. Multiple myeloma: from diagnosis to treatment. *Australian Family Physician*. 2013;42:684-8.
20. Blimark C, Holmberg E, Mellqvist UH, Landgren O, Björkholm M, Hultcrantz M, et al. Multiple myeloma and infections: a population-based study on 9253 multiple myeloma patients. *Haematologica*. 2015;100(1):107-13.
21. Croucher PI, Apperley JF. BONE DISEASE IN MULTIPLE MYELOMA. *British Journal of Haematology*. 1998;103(4):902-10.
22. Eleutherakis-Papaiakovou V, Bamias A, Gika D, Simeonidis A, Pouli A, Anagnostopoulos A, et al. Renal failure in multiple myeloma: incidence, correlations, and prognostic significance. *Leukemia & lymphoma*. 2007;48(2):337-41.
23. Katagiri D, Noiri E, Hinoshita F. Multiple myeloma and kidney disease. *TheScientificWorldJournal*. 2013;2013:487285.
24. Mosebach J, Thierjung H, Schlemmer HP, Delorme S. Multiple Myeloma Guidelines and Their Recent Updates: Implications for Imaging. *RoFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Röntgenstrahlen und der Nuklearmedizin*. 2019;191(11):998-1009.
25. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer*. 1975;36(3):842-54.
26. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(26):2863-9.
27. Moreau P, San Miguel J, Sonneveld P, Mateos MV, Zamagni E, Avet-Loiseau H, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2017;28(suppl_4):iv52-iv61.
28. Mateos MV, Hernández MT, Giraldo P, de la Rubia J, de Arriba F, López Corral L, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma. *The New England journal of medicine*. 2013;369(5):438-47.
29. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, van Duin M, Sonneveld P, Mateos M-V, et al. Multiple myeloma. *Nature Reviews Disease Primers*. 2017;3(1):17046.
30. Bataille R, Harousseau JL. Multiple myeloma. *The New England journal of medicine*. 1997;336(23):1657-64.
31. Blimark CH, Turesson I, Genell A, Ahlberg L, Björkstrand B, Carlson K, et al. Outcome and survival of myeloma patients diagnosed 2008–2015. Real-world data on 4904 patients from the Swedish Myeloma Registry. *Haematologica*. 2018;103(3):506-13.
32. Attal M, Harousseau JL. Standard therapy versus autologous transplantation in multiple myeloma. *Hematology/oncology clinics of North America*. 1997;11(1):133-46.
33. Child JA, Morgan GJ, Davies FE, Owen RG, Bell SE, Hawkins K, et al. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *The New England journal of medicine*. 2003;348(19):1875-83.

34. Larocca A, Dold SM, Zweegman S, Terpos E, Wäsch R, D'Agostino M, et al. Patient-centered practice in elderly myeloma patients: an overview and consensus from the European Myeloma Network (EMN). *Leukemia*. 2018;32(8):1697-712.
35. Palumbo A, Bringhen S, Mateos MV, Larocca A, Facon T, Kumar SK, et al. Geriatric assessment predicts survival and toxicities in elderly myeloma patients: an International Myeloma Working Group report. *Blood*. 2015;125(13):2068-74.
36. Attal M, Palumbo A, Holstein SA, Lauwers-Cances V, Petrucci MT, Richardson PG, et al. Lenalidomide (LEN) maintenance (MNTC) after high-dose melphalan and autologous stem cell transplant (ASCT) in multiple myeloma (MM): A meta-analysis (MA) of overall survival (OS). *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(15_suppl):8001-.
37. Mateos M-V, Dimopoulos MA, Cavo M, Suzuki K, Jakubowiak AJ, Knop S, et al. Phase 3 Randomized Study of Daratumumab Plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone (D-VMP) Versus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone (VMP) in Newly Diagnosed Multiple Myeloma (NDMM) Patients (Pts) Ineligible for Transplant (ALCYONE). *Blood*. 2017;130(Supplement 1):LBA-4-LBA-.
38. Bahlis NJ, Sutherland H, White D, Sebag M, Lentzsch S, Kotb R, et al. Selinexor plus low-dose bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood*. 2018;132(24):2546-54.
39. Algarín EM, Hernández-García S, Garayoa M, Ocio EM. Filanesib for the treatment of multiple myeloma. *Expert opinion on investigational drugs*. 2020;29(1):5-14.
40. Terpos E. Multiple Myeloma: Clinical Updates From the American Society of Hematology Annual Meeting, 2017. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*. 2018;18(5):321-34.
41. Berenson JR, Rosen LS, Howell A, Porter L, Coleman RE, Morley W, et al. Zoledronic acid reduces skeletal-related events in patients with osteolytic metastases. *Cancer*. 2001;91(7):1191-200.
42. Terpos E, Morgan G, Dimopoulos MA, Drake MT, Lentzsch S, Raje N, et al. International Myeloma Working Group recommendations for the treatment of multiple myeloma-related bone disease. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(18):2347-57.
43. Terpos E, Ntanasis-Stathopoulos I, Dimopoulos MA. Myeloma bone disease: from biology findings to treatment approaches. *Blood*. 2019;133(14):1534-9.
44. Terpos E, Kleber M, Engelhardt M, Zweegman S, Gay F, Kastritis E, et al. European Myeloma Network guidelines for the management of multiple myeloma-related complications. *Haematologica*. 2015;100(10):1254-66.
45. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *The Lancet Oncology*. 2016;17(8):e328-e46.
46. Mailankody S, Korde N, Lesokhin AM, Lendvai N, Hassoun H, Stetler-Stevenson M, et al. Minimal residual disease in multiple myeloma: bringing the bench to the bedside. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2015;12(5):286-95.

47. Oliva S, D'Agostino M, Boccadoro M, Larocca A. Clinical Applications and Future Directions of Minimal Residual Disease Testing in Multiple Myeloma. *Frontiers in oncology*. 2020;10:1.
48. Munshi NC, Avet-Loiseau H, Rawstron AC, Owen RG, Child JA, Thakurta A, et al. Association of Minimal Residual Disease With Superior Survival Outcomes in Patients With Multiple Myeloma: A Meta-analysis. *JAMA oncology*. 2017;3(1):28-35.
49. Joshua DE, Bryant C, Dix C, Gibson J, Ho J. Biology and therapy of multiple myeloma. *Medical Journal of Australia*. 2019;210(8):375-80.
50. Usmani SZ, Crowley J, Hoering A, Mitchell A, Waheed S, Nair B, et al. Improvement in long-term outcomes with successive Total Therapy trials for multiple myeloma: are patients now being cured? *Leukemia*. 2013;27(1):226-32.
51. Alt FW, Yancopoulos GD, Blackwell TK, Wood C, Thomas E, Boss M, et al. Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. *The EMBO journal*. 1984;3(6):1209-19.
52. Wagner SD, Neuberger MS. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annual review of immunology*. 1996;14:441-57.
53. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nature Reviews Cancer*. 2002;2(3):175-87.
54. Hoth M, Wischmeyer E. Spezifisches Immunsystem. In: Behrends J, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H, Frings S, Grissmer S, et al., editors. *Duale Reihe Physiologie*. 3., vollständig überarbeitete Auflage ed: Georg Thieme Verlag; 2016.
55. González D, van der Burg M, García-Sanz R, Fenton JA, Langerak AW, González M, et al. Immunoglobulin gene rearrangements and the pathogenesis of multiple myeloma. *Blood*. 2007;110(9):3112-21.
56. Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;131(4):959-71.
57. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer*. 2012;12(5):335-48.
58. Furukawa Y, Kikuchi J. Molecular pathogenesis of multiple myeloma. *International Journal of Clinical Oncology*. 2015;20(3):413-22.
59. Chretien ML, Corre J, Lauwers-Cances V, Magrangeas F, Cleyne A, Yon E, et al. Understanding the role of hyperdiploidy in myeloma prognosis: which trisomies really matter? *Blood*. 2015;126(25):2713-9.
60. Chiecchio L, Dagrada GP, Ibrahim AH, Dachs Cabanas E, Protheroe RK, Stockley DM, et al. Timing of acquisition of deletion 13 in plasma cell dyscrasias is dependent on genetic context. *Haematologica*. 2009;94(12):1708-13.
61. Kaiser MF, Johnson DC, Wu P, Walker BA, Brioli A, Mirabella F, et al. Global methylation analysis identifies prognostically important epigenetically inactivated tumor suppressor genes in multiple myeloma. *Blood*. 2013;122(2):219-26.
62. Dimopoulos K, Gimsing P, Grønbaek K. The role of epigenetics in the biology of multiple myeloma. *Blood cancer journal*. 2014;4(5):e207.
63. Bianchi G, Munshi NC. Pathogenesis beyond the cancer clone(s) in multiple myeloma. *Blood*. 2015;125(20):3049-58.

64. Walker BA, Wardell CP, Melchor L, Brioli A, Johnson DC, Kaiser MF, et al. Intracloonal heterogeneity is a critical early event in the development of myeloma and precedes the development of clinical symptoms. *Leukemia*. 2014;28(2):384-90.
65. Keats JJ, Chesi M, Egan JB, Garbitt VM, Palmer SE, Braggio E, et al. Clonal competition with alternating dominance in multiple myeloma. *Blood*. 2012;120(5):1067-76.
66. Magrangeas F, Avet-Loiseau H, Gouraud W, Lodé L, Decaux O, Godmer P, et al. Minor clone provides a reservoir for relapse in multiple myeloma. *Leukemia*. 2013;27(2):473-81.
67. Hauser K. Zellorganellen. In: Rassow J, Hauser K, Deutzmann R, Netzker R, editors. *Duale Reihe Biochemie*. 4. Auflage ed: Georg Thieme Verlag; 2016.
68. Nikesitch N, Lee JM, Ling S, Roberts TL. Endoplasmic reticulum stress in the development of multiple myeloma and drug resistance. *Clinical & translational immunology*. 2018;7(1):e1007.
69. Ruggiano A, Foresti O, Carvalho P. Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond. *The Journal of cell biology*. 2014;204(6):869-79.
70. Vincenz L, Jäger R, O'Dwyer M, Samali A. Endoplasmic Reticulum Stress and the Unfolded Protein Response: Targeting the Achilles Heel of Multiple Myeloma. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2013;12(6):831-43.
71. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO reports*. 2006;7(9):880-5.
72. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *The Journal of clinical investigation*. 2005;115(10):2656-64.
73. Maurel M, Chevet E, Tavernier J, Gerlo S. Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends in Biochemical Sciences*. 2014;39(5):245-54.
74. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, et al. Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. *Science*. 2000;287(5453):664-6.
75. Ichijo H, Nishida E, Irie K, Dijke Pt, Saitoh M, Moriguchi T, et al. Induction of Apoptosis by ASK1, a Mammalian MAPKKK That Activates SAPK/JNK and p38 Signaling Pathways. *Science*. 1997;275(5296):90-4.
76. Davis RJ. Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases. *Cell*. 2000;103(2):239-52.
77. Ip YT, Davis RJ. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) — from inflammation to development. *Current Opinion in Cell Biology*. 1998;10(2):205-19.
78. Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes & development*. 1993;7(11):2135-48.
79. Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK-signaling: A multiplexing hub in programmed cell death. *Genes & cancer*. 2017;8(9-10):682-94.
80. Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Molecular cell*. 2008;30(6):678-88.
81. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ). 2008;445:77-88.

82. Budenholzer L, Cheng CL, Li Y, Hochstrasser M. Proteasome Structure and Assembly. *Journal of molecular biology*. 2017;429(22):3500-24.
83. Gandolfi S, Laubach JP, Hideshima T, Chauhan D, Anderson KC, Richardson PG. The proteasome and proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2017;36(4):561-84.
84. Okazuka K, Ishida T. Proteasome inhibitors for multiple myeloma. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 2018;48(9):785-93.
85. Hideshima T, Anderson KC. Biologic impact of proteasome inhibition in multiple myeloma cells--from the aspects of preclinical studies. *Seminars in hematology*. 2012;49(3):223-7.
86. Shimizu S, Takiguchi T, Fukutoku M, Yoshioka R, Hirose Y, Fukuhara S, et al. Establishment of a CD4-positive plasmacytoma cell line (AMO1). *Leukemia*. 1993;7(2):274-80.
87. Brännert D. Persönliche Kommunikation. Oktober 2018.
88. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951;193(1):265-75.
89. Fan M, Chambers TC. Role of mitogen-activated protein kinases in the response of tumor cells to chemotherapy. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2001;4(4):253-67.
90. Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature Cell Biology*. 2002;4(5):E131-E6.
91. Wu CP, Hung TH, Hsiao SH, Huang YH, Hung LC, Yu YJ, et al. Erdafitinib Resensitizes ABCB1-Overexpressing Multidrug-Resistant Cancer Cells to Cytotoxic Anticancer Drugs. *Cancers*. 2020;12(6).
92. Wu CP, Hsiao SH, Huang YH, Hung LC, Yu YJ, Chang YT, et al. Sitravatinib Sensitizes ABCB1- and ABCG2-Overexpressing Multidrug-Resistant Cancer Cells to Chemotherapeutic Drugs. *Cancers*. 2020;12(1).
93. Wu L, Huang X, Kuang Y, Xing Z, Deng X, Luo Z. Thapsigargin induces apoptosis in adrenocortical carcinoma by activating endoplasmic reticulum stress and the JNK signaling pathway: an in vitro and in vivo study. *Drug design, development and therapy*. 2019;13:2787-98.
94. Plantevin Krenitsky V, Nadolny L, Delgado M, Ayala L, Claren SS, Hilgraf R, et al. Discovery of CC-930, an orally active anti-fibrotic JNK inhibitor. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2012;22(3):1433-8.
95. Han SY. c-Jun N-Terminal Kinase Signaling Inhibitors Under Development. *Toxicological research*. 2008;24(2):93-100.
96. Walter P, Ron D. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science*. 2011;334(6059):1081-6.
97. Amaravadi R, Kimmelman AC, White E. Recent insights into the function of autophagy in cancer. *Genes & development*. 2016;30(17):1913-30.

APPENDIX

I ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Die physiologische Plasmazellentwicklung.	16
Abbildung 2: Mehrschrittige Pathogenese des Multiplen Myeloms.	17
Abbildung 3: Die drei Signaltransduktionswege der <i>Unfolded Protein Response</i>	23
Abbildung 4: Schematische Darstellung der <i>Semidry</i> -Blot-Vorrichtung.	44
Abbildung 5: Darstellung der durchflusszytometrisch bestimmten Zellviabilität mit FlowJo.	48
Abbildung 6: Anisomycin induziert Apoptose in der AMO-1- und der AMO-1-R65Car-Zelllinie. .	49
Abbildung 7: JNK-Inhibition führt zu keiner Beeinträchtigung der Viabilität von AMO-1- und AMO-1-R65Car-Zellen.	50
Abbildung 8: JNK-Inhibition mit CC-930 verbessert die Viabilität von AMO-1-Zellen nach Inkubation mit Thapsigargin.	52
Abbildung 9: Die durch Thapsigargin induzierte verstärkte Expression von Proteinen des JNK- Signaltransduktionsweges wird durch CC-930 gehemmt.	53
Abbildung 10: JNK-Inhibition verstärkt die apoptotische Wirkung des Proteasom-Inhibitors Carfilzomib auf AMO-1-Zellen.	56
Abbildung 11: Carfilzomib-induzierte <i>Unfolded Protein Response</i> kann durch JNK-Inhibition beeinflusst werden.	58
Abbildung 12: JNK-Aktivierung durch Anisomycin wirkt synergistisch mit Carfilzomib auf AMO- 1R65Car-Zellen.	60
Abbildung 13: Carfilzomib und Anisomycin induzieren synergistisch die Expression der Proteine des JNK-Signaltransduktionsweges.	62

II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
ASK1	<i>Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1</i>
ATF6	<i>Activating Transcription Factor 6</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BAX	<i>Bcl-2-associated Protein X</i>
Bcl-2	<i>B-Cell-Lymphoma 2</i>
BCMA	<i>B-Cell-Maturation-Antigen</i>
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CAR-T-Zellen	<i>Chimeric Antigen Receptor T-Zellen</i>
CpG	Cytosin-Phosphat Guanin
CR	<i>Complete Response</i>
DMSO	Dimethylsulfonoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
EC50	Mittlere effektive Konzentration
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
eIF2 α	<i>Eukaryotic Initiation Factor 2α</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Degradation
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FLC	<i>Free Light Chains</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
GRP78	<i>78 kDA Glucose-Regulated Protein</i>
IMWG	<i>International Myeloma Working Group</i>
IRE1	<i>Inositol-Requiring Enzyme 1</i>
ISS	<i>International Staging System</i>
JNK	<i>C-Jun NH₂-terminal Kinase</i>
LC3	<i>Light-chain 3</i>
LDH	L-Lactatdehydrogenase
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein-Kinase</i>
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
MRD	<i>Minimal Residual Disease</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
NRF2	<i>Nuclear Factor Erythroid-2-Related Factor 2</i>
NSAID	<i>Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug</i>
PERK	<i>PKR-like ER-kinase</i>
PI	Proteasominhibitor
RIDD	<i>Regulated IRE1-dependent Decay</i>
R-ISS	<i>Revised International Staging System</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
SAPK	<i>Stress-Activated MAP-Kinase</i>

sCR	<i>stringent Complete Response</i>
TRAF2	<i>TNF-Receptor-Associated Factor 2</i>
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>
XBP1	<i>X-Box-Binding Protein 1</i>

Aufgrund der besseren Lesbarkeit wird in der vorliegenden Arbeit das generische Maskulinum verwendet. Gemeint sind damit immer alle Geschlechter.

III TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Die Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms nach Durie und Salmon (22).	8
Tabelle 2: Die Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms nach Revised International Staging System R-ISS (23).	8
Tabelle 4: Geräte und Gebrauchsgegenstände. Übersicht über die verwendeten Geräte und Gebrauchsgegenstände mit Angabe des Herstellers und der Artikelnummer, falls vorhanden.	30
Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien. Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Hersteller und ggf. Artikelnummer.	31
Tabelle 6: Chemikalien. Übersicht über die verwendeten Chemikalien mit Angabe von Hersteller und ggf. Artikelnummer.....	31
Tabelle 7: Puffer und Lösungen. Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen.....	33
Tabelle 8: Medium und Antibiotika für Zellkultur. Übersicht über verwendete Chemikalien für Zellkultur mit Angabe von Hersteller und Artikelnummer.	34
Tabelle 9: Primärantikörper: Übersicht über verwendete Primärantikörper mit Angabe von Verdünnung, zu verwendetem Sekundärantikörper, Hersteller, Artikelnummer und Lotnummer. Zudem ist das Molekulargewicht der Zielproteine aufgeführt.	35
Tabelle 10: Sekundärantikörper. Übersicht über verwendete Sekundärantikörper mit Angabe von Hersteller und Artikelnummer.	37
Tabelle 11: Pharmakologisch aktive Substanzen. Übersicht über verwendete pharmakologisch wirksame Substanzen mit Angabe von Hersteller und Artikelnummer.....	37
Tabelle 12: Software und Datenbanken. Übersicht über verwendete Software und Datenbanken mit Angabe der Herstellerfirma.	38
Tabelle 13: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel für die Gelelektrophorese.....	43

IV DANKSAGUNG

Primär möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ralf C. Bargou für die Möglichkeit, meine Dissertation am Institut für Translationale Onkologie anzufertigen und die Übernahme des Erstgutachtens bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei Prof. Dr. Andreas Rosenwald für die Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt zum einen Dr. Manik Chatterjee für die umfangreiche Betreuung meiner Promotionsarbeit und die Korrektur meiner Dissertation, zum anderen Dr. Daniela Brännert für jegliche Unterstützung und Einarbeitung in Labormethoden und Computerprogramme, die prompte und ausführliche Beantwortung meiner Fragen und ebenfalls die Korrektur meiner Dissertation.

Bedanken möchte ich mich auch bei den technischen Assistentinnen Evelyn Brandt und Stefanie Kirner, an die ich mich mit Fragen jederzeit wenden konnte.

Abschließend danke ich der gesamten Arbeitsgruppe Chatterjee/Steinbrunn/Stühmer für das freundliche Arbeitsumfeld und jegliche Unterstützung.