

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II  
der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele**

**"Die Bedeutung von Osteoklasten für das Wachstum des Multiplen Myeloms"**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Christoph Jank**

**aus Bobingen**

**Würzburg, September 2011**

**Referent:** Prof. Dr. med. Ralf Bargou

**Koreferent:** Prof. Dr. rer. Nat. Norbert Schütze

**Dekan:** Prof. Dr. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung :** 06.12.2012

**Der Promovend ist Arzt**

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>MULTIPLES MYELOM .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.1.</b>	<b>ERSTBESCHREIBUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.2.</b>	<b>NOMENKLATUR .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.3.</b>	<b>DEFINITION .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.4.</b>	<b>EPIDEMIOLOGIE.....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.5.</b>	<b>SYMPTOME UND DEREN GENESE .....</b>	<b>2</b>
<b>1.1.6.</b>	<b>DIAGNOSE .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.7.</b>	<b>STADIENEINTEILUNG UND RISIKOFAKTOREN .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1.8.</b>	<b>THERAPIE.....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.8.1.</b>	<b>INTENSIVE THERAPIEKONZEPTE .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1.8.2.</b>	<b>KONVENTIONELLE CHEMOTHERAPIE.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.8.3.</b>	<b>SUPPORTIVE THERAPIE .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.9.</b>	<b>PROGNOSE .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1.10.</b>	<b>NEUE SUBSTANZEN.....</b>	<b>5</b>
<b>1.2.</b>	<b>KNOCHENMARKMIKROMILIEU.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.1.</b>	<b>AUFBAU .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2.2.</b>	<b>KNOCHENMARKSTROMA.....</b>	<b>7</b>
<b>1.2.3.</b>	<b>OSTEOKLASTEN.....</b>	<b>8</b>
<b>1.2.4.</b>	<b>OSTEOBLASTEN .....</b>	<b>9</b>
<b>1.2.5.</b>	<b>MYELOMZELLEN .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.</b>	<b>SIGNALWEGE.....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.1</b>	<b>MAPK/ERK-SIGNALWEG .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.1.1.</b>	<b>ALLGEMEINER AUFBAU .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.1.2.</b>	<b>MAPK/ERK-SIGNALWEG IM MULTIPLN MYELOM.....</b>	<b>13</b>
<b>1.3.2.</b>	<b>JAK/STAT-SIGNALWEG.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.2.1.</b>	<b>ALLGEMEINER AUFBAU .....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.2.2.</b>	<b>STAT-3-SIGNALWEG IM MULTIPLN MYELOM.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3.3.</b>	<b>DER AKT-SIGNALWEG .....</b>	<b>15</b>
<b>1.3.3.1</b>	<b>ALLGEMEINER AUFBAU .....</b>	<b>15</b>
<b>1.3.3.2.</b>	<b>AKT IM MULTIPLN MYELOM .....</b>	<b>16</b>
<b>1.3.4.</b>	<b>NFKB – SIGNALWEG .....</b>	<b>17</b>

1.3.4.1.	ALLGEMEINER AUFBAU .....	18
1.3.4.1.1.	DER KANONISCHE SIGNALWEG.....	18
1.3.4.1.2.	DER ALTERNATIVE NFKB-SIGNALWEG .....	19
1.3.4.3	NFKB IM MULTIPLN MYELOM.....	20
1.3.5.	APOPTOSE .....	21
1.3.5.1.	ALLGEMEINER ABLAUF .....	21
1.3.5.1.1.	EXTRINSISCHE APOPTOSEEINLEITUNG .....	21
1.3.5.1.2.	INTRINSISCHE APOPTOSEEINLEITUNG .....	22
1.3.5.2.	APOPTOSE IM MULTIPLN MYELOM.....	22
1.4.	FRAGESTELLUNG.....	24
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	25
2.1	MATERIAL.....	25
2.1.1.	REAGENZIEN.....	25
2.1.2.	ZY TOKINE .....	25
2.1.3.	ANTIKÖRPER .....	25
2.1.4.	PLASMIDE .....	26
2.1.5.	FÄRBUNGEN .....	26
2.1.6.	ZELLKULTUR.....	26
2.1.7.	KITS .....	26
2.1.8.	POLYACRYLAMIDGELE .....	27
2.1.9.	ELEKTROPHORESEZUBEHÖR.....	27
2.1.10.	PUFFER UND LÖSUNGEN.....	27
2.1.11.	SONSTIGE MATERIALIEN.....	29
2.1.12.	GERÄTE.....	30
2.2	METHODEN.....	31
2.2.1.	ZELLKULTUR.....	31
2.2.2.	ZELLSEPERATION.....	33
2.2.2.1.	DICHTEGRADIENTENZENTRIFUGATION.....	33
2.2.2.2.	CD-14-AUFREINIGUNG .....	33
2.2.3.	FÄRBUNGEN .....	34
2.2.3.1.	TRAP-FÄRBUNG.....	34
2.2.3.2.	HOECHSTFÄRBUNG .....	34
2.2.4.	MTT-ASSAY .....	34
2.2.5.	FACS-ANALYSE.....	35

2.2.6.	<b>TRANSFORMATION UND HOCHZÜCHTEN DER BAKTERIEN.....</b>	<b>37</b>
2.2.7.	<b>MAXI-PRÄP .....</b>	<b>37</b>
2.2.8.	<b>ELEKTROPORATION .....</b>	<b>38</b>
2.2.9.	<b>LUCIFERASEASSAY.....</b>	<b>38</b>
2.2.10.	<b>WESTERN BLOT .....</b>	<b>39</b>
2.2.10.1.	<b>RIPA-LYSE .....</b>	<b>39</b>
2.2.10.2.	<b>SODIUMDODECYLSULFAT-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE).....</b>	<b>39</b>
2.2.10.2.1.	<b>BRADFORD PROTEINBESTIMMUNG .....</b>	<b>40</b>
2.2.10.2.2.	<b>AUFTRAGUNG UND ELEKTROPHORESE .....</b>	<b>40</b>
2.2.10.2.3.	<b>SEMI-DRY BLOT .....</b>	<b>41</b>
2.2.10.2.4.	<b>FÄRBUNGEN .....</b>	<b>41</b>
2.2.10.2.5.	<b>BLOCKEN.....</b>	<b>41</b>
2.2.10.2.6.	<b>ANTIKÖRPERINKUBATION UND DETEKTION .....</b>	<b>42</b>
2.2.11.	<b>2-D-GEL.....</b>	<b>42</b>
2.2.11.1.	<b>ERSTELLUNG DER LYSATE.....</b>	<b>43</b>
2.2.11.2.	<b>REHYDRATISIERUNG.....</b>	<b>43</b>
2.2.11.3	<b>ISOELEKTRISCHE FOKUSSIERUNG UND ÄQUILIBRIERUNG .....</b>	<b>44</b>
2.2.11.4.	<b>PAGE .....</b>	<b>45</b>
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISTEIL .....</b>	<b>46</b>
3.1.	<b>GENERIERUNG DER OSTEOKLASTEN.....</b>	<b>46</b>
3.1.1.	<b>GENERIERUNGSVERFAHREN.....</b>	<b>46</b>
3.1.2.	<b>NACHWEIS DER OSTEOKLASTEN.....</b>	<b>47</b>
3.1.2.1.	<b>MORPHOLOGIE .....</b>	<b>47</b>
3.1.2.2.	<b>FUNKTION.....</b>	<b>478</b>
3.2.	<b>ABHÄNGIGKEIT VON IL-6.....</b>	<b>48</b>
3.3.	<b>ÜBERLEBENSASSAY DER MYELOMZELLEN .....</b>	<b>50</b>
3.3.1	<b>DURCHFÜHRUNG.....</b>	<b>50</b>
3.3.2.	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>50</b>
3.4.	<b>WESTERN BLOT-ANALYSE DER MYELOMZELLEN DES ÜBERLEBENSASSAYS .....</b>	<b>52</b>
3.5.	<b>UNTERSUCHUNG DES NFKB-SIGNALWEGES .....</b>	<b>54</b>
3.5.1.	<b>VORAUSSETZUNG FÜR DEN LUCIFERASEASSAY.....</b>	<b>54</b>

3.5.2.	ERGEBNISSE.....	57
3.5.3.	WESTERN BLOT-ANALYSE VON IKBA.....	58
3.6.	WESTERN-BLOT-ANALYSE DES MAPK/ERK-, STAT-3- UND AKT-SIGNALWEGS .....	59
3.6.1.	P-ERK .....	59
3.6.2.	P-STAT-3 .....	60
3.6.3.	P-AKT .....	60
3.7.	WESTERN-BLOT-ANALYSE DER BCL-2 – PROTEINE.....	61
3.8.	HS-5 VERSUS PRIMÄREM STROMA.....	62
3.9.	SUCHE NACH WEITEREN ZIELMOLEKÜLEN.....	63
3.9.1.	WESTERN-BLOT-ANALYSE MIT P-TYR-ANTIKÖRPERN IM 1-D-GEL .....	64
3.9.2.	WESTERN BLOT-ANALYSE MIT P-TYR-100 IM 2-D-GEL .....	65
3.9.2.1.	DURCHFÜHRUNG.....	65
3.9.2.2.	ERGEBNISSE.....	68
4.	DISKUSSION.....	71
4.1.	METHODEN.....	71
4.2.	ÜBERLEBENSASSAY.....	71
4.3.	NFκB – SIGNALWEG .....	72
4.4.	ANALYSE DES MAPK/ERK-, STAT-3-, UND AKT – SIGNALWEG.....	74
4.4.1.	ERK-SIGNALWEG .....	74
4.4.2.	STAT-3.....	75
4.4.3.	AKT.....	75
4.4.4.	APOPTOSEREGULATION.....	77
4.4.5.	SUCHE NACH WEITEREN SIGNALWEGEN .....	77
5.	LITERATURVERZEICHNIS: .....	79

# 1. Einleitung

## 1.1. Multiples Myelom

### 1.1.1. Erstbeschreibung

Solly beschrieb 1844 das erste Mal eine Patientin mit einem multiplen Myelom. Die 39-jährige Sarah Newbury entwickelte Fatigue und Knochenschmerzen bei multiplen pathologischen Frakturen (Solly, 1844).

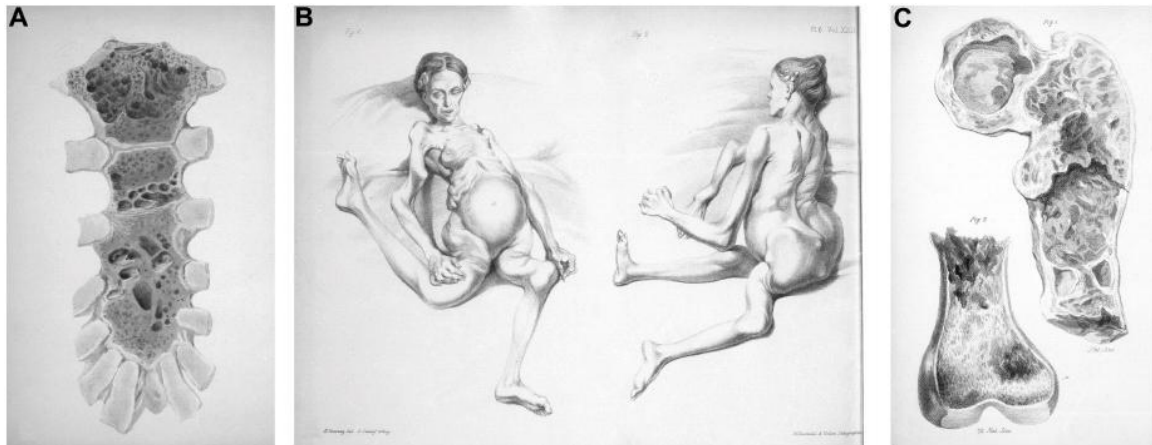


Abb. 1: Befunde von Sarah Newbury nach Solly (Solly, 1844); A: Osteolysen des Sternum, B: pathologische Fraktur Femur und Humerus rechts, C: Osteolysen Femur.

Ein weiterer Fall wurde von Dr. Macintyre 1850 beschrieben (Macintyre, 1850). In diesem Fall wurde auch den Veränderungen des Urins Aufmerksamkeit geschenkt, welche unter anderem von Dr. Bence Jones untersucht wurde und zur späteren Benennung der vom Myelom sezernierten Immunglobulinleichtketten als Bence-Jones-Proteine führte.

### 1.1.2. Nomenklatur

In der Vergangenheit wurden die Begriffe “Multiples Myelom“ und “Plasmozytom“ im deutschen Sprachraum synonym verwendet, während der Ausdruck “Plasmozytom“ im angloamerikanischen Sprachraum ausschließlich die seltene lokal begrenzte Manifestationsform bezeichnet. Der Begriff “multiples Myelom“ wird der überwiegend generalisierten Manifestationsform der Erkrankung besser gerecht als der Ausdruck “Plasmozytom“ (deutschsprachige Nomenklatur). Deshalb hat sich die angloamerikanische Nomenklatur mit den Begriffen “solitäres“ (für die lokal begrenzte Manifestationsform) und “multiples Myelom“ (für die generalisierte Manifestationsform) durchgesetzt (Prietz et al., 2008).

### **1.1.3. Definition**

Das multiple Myelom ist eine B-Zell-Neoplasie mit diffuser oder multilokulärer Infiltration des Knochenmarks durch klonale Plasmazellen, Insuffizienz der Hämatopoese und Osteolysen. Die meisten Plasmazellen produzieren im Serum und / oder Urin nachweisbare monoklonale Immunglobuline (komplette Immunglobulinmoleküle, meist vom Typ IgG oder IgA, und / oder Immunglobulinleichtketten); Ausnahme: asekretorisches multiples Myelom (2-3 % der Fälle). Das multiple Myelom gehört nach der WHO-Klassifikation zu den malignen Lymphomen, obwohl eine Lymphadenopathie nur selten vorkommt (Liebisch and Pest, 2008).

### **1.1.4. Epidemiologie**

Das multiple Myelom gehört mit einer Inzidenz von vier Neuerkrankungen / 100 000 Einwohnern pro Jahr (Böhrer and Pönisch, 2001) zu den seltenen Erkrankungen, ist jedoch das häufigste primär am Knochen lokalisierte Tumorleiden (Dhalin, 1978) und macht 10% aller hämatologischen Neoplasien aus (Rajkumar and Kyle, 2007). Das multiple Myelom ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters. 75 % der Patienten sind bei Erstdiagnose über 60 Jahre alt. 3 % der über 70-jährigen haben eine monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS), welche mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 % pro Jahr in eine maligne B-Zellerkrankung (meist ein multiples Myelom) übergeht (Liebisch and Pest, 2008). Die schwarzen US-Bevölkerung (9,9/100 000) ist doppelt so häufig vom multiplen Myelom betroffen wie die weiße Bevölkerung (4,3/100 000) (Rajkumar and Kyle, 2007; Young et al., 1978).

### **1.1.5. Symptome und deren Genese**

Knochenschmerzen (70 %), pathologische Frakturen und eine Hyperkalzämie entstehen durch die Markinfiltration und damit einhergehenden Osteolysen. Es kann eine B-Symptomatik mit Nachtschweiß, Gewichtsverlust und Fieber auftreten. Es besteht eine erhöhte Infektanfälligkeit, da die vom Myelom gebildeten Immunglobuline nicht funktionstüchtig sind und das kompetente Immunglobulin vermindern. In 25 % der Fälle besteht eine Niereninsuffizienz hervorgerufen durch tubuläre oder glomeruläre Schädigung durch Immunglobulinleichtketten. Eine in 80% nachweisbare Anämie entsteht durch Verdrängung der Hämatopoese im Knochenmark. Ein Hyperviskositätssyndrom kann durch Erhöhung des Serumproteingehaltes eintreten (Renz-Polster et al., 2004).



### 1.1.6. Diagnose

Die Diagnose gilt als gesichert, wenn alle drei folgenden Kriterien vorliegen

(International Myeloma Working Group, 2003):

- Mehr als 10 % Plasmazellen im Knochenmark (Knochenmarkaspirationszytologie) und / oder Nachweis eines Plasmozytoms (Histobiopsie). Bei asekretorischer Erkrankung sind mehr als 30 % Plasmazellen gefordert.
- Im Serum und / oder im Urin nachweisbares monoklonales Protein (Immunfixationselektrophorese)
- Vorliegen einer / von:
  - Hyperkalzämie und / oder
  - Niereninsuffizienz (Kreatininwert > 173 mmol/l oder > 2mg/dl) und / oder
  - Anämie (Hb-Wert < 10 g/dl oder 2 g/dl unter der Norm und / oder
  - Knochenläsionen (Bei solitärer Osteolyse sind mehr als 30 % Plasmazellen im Knochenmark gefordert, bei Osteoporose ist der Nachweis von Wirbelkörperfrakturen gefordert.)

Wichtigste Differentialdiagnosen sind die MGUS, andere Lymphome mit monoklonalen Proteinen (z.B. Morbus Waldenström), andere Tumoren mit Osteolysen bei monoklonaler Gammopathie (Liebisch and Pest, 2008).

### 1.1.7. Stadieneinteilung und Risikofaktoren

Durie und Salmon entwickelten 1975 eine Stadieneinteilung die eine Abschätzung der Tumorzellmasse bei Diagnosestellung zulässt und eine gewisse prognostische und therapeutische Bedeutung hat (Durie and Salmon, 1975).

	Stadium I	Stadium II	Stadium III
Hb	> 10 g/dl	Weder Stadium I noch III	< 8,5 g/dl
Serumcalcium	normal		erhöht
Konzentration monoklonaler Immunglobuline	Gering, IgG < 50 g/l, IgA < 30 g/l		Hohe Konzentration, IgG > 70 g/l, IgA > 50 g/l,
Leichtketten im Urin	< 4g täglich		> 12 g täglich
Osteolysen	Maximal eine		Mehrere

Zusätzliche Unterteilung in A (Kreatinin < 177 µmol/l = 2g/dl)

und B (Kreatinin > 177 µmol/l = 2g/dl).

Unabhängige Risikofaktoren sind die Erhöhung des Serum- $\beta$ 2-Mikroglobulins und der Nachweis bestimmter Veränderungen des Tumorzellgenoms (Monosomie 13/13q-Deletion, Deletion 17q13, hypodiploider Chromosomensatz) (Liebisch and Pest, 2008).

### **1.1.8. Therapie**

Da eine Heilung in der Regel nicht zu erreichen ist, folgt die Therapie einer palliativen Zielsetzung (Renz-Polster et al., 2004).

Eine Behandlung wird bei symptomatischer Erkrankung gemäß Definition der International Myeloma Working Group, d.h. bei Auftreten mindestens eines der sogenannten CRAB-Kriterien (Hyperkalzämie, Niereninsuffizienz mit Kreatinin  $> 179 \mu\text{mol/l}$  [ $2 \text{ mg/dl}$ ], Anämie mit Hb-Wert  $> 2 \text{ g/dl}$  unter dem unteren Referenzwert oder bei Knochendestruktion bzw. myelombedingter Osteoporose mit Wirbelkörperfrakturen) oder bei asymptomatischer, jedoch rasch progredienter Erkrankung mit drohenden Komplikationen begonnen. Patienten mit indolentem Myelom (Stadium I nach Salmon & Durie) sind zum Zeitpunkt der Diagnose nicht behandlungsbedürftig (Ausnahmen: Niereninsuffizienz, AL-Amyloidose, Neuropathie) müssen jedoch im weiteren Verlauf beobachtet werden (Renz-Polster et al., 2004).

#### **1.1.8.1. Intensive Therapiekonzepte**

Hierunter wird vor allem eine Hochdosischemotherapie mit autologer oder allogener Blutstammzelltransplantation verstanden. Zur Induktionstherapie vor autologer Stammzelltransplantation werden zunehmend Chemotherapeutikakombinationen mit neuen Substanzen wie Thalidomid - Dexamethason, Bortezomib basierte Behandlungsregime oder Lenalidomide - Dexamethason eingesetzt. Das Ziel der autologen Stammzelltransplantation ist eine Langzeitremission. Zur Konditionierung wird meist Mephalan  $200 \text{ mg/m}^2$  eingesetzt. Die Indikation muss angesichts der behandlungsassoziierten Mortalität von 1-2 % nach dem biologischen Alter und den Komorbiditäten gestellt werden. Für Patienten im Alter von 70-75 Jahren kann eine altersadaptierte dosisreduzierte Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation durchgeführt werden. Das mediane Überleben wird durch eine Hochdosischemotherapie mit Stammzelltransplantation um etwa 12 Monate verlängert (Attal et al., 1996; Child et al., 2003; Kyle and Rajkumar, 2008).

Voraussetzung für eine allogene Stammzelltransplantation ist ein Alter unter 65 Jahren und ein passender Spender. Die therapiebedingte Mortalität ist mit 10-20 % erheblich. Ob und für welche Subgruppe eine allogene Stammzelltransplantation einen Vorteil erbringt ist noch nicht geklärt (Liebisch and Pest, 2008).

#### **1.1.8.2. Konventionelle Chemotherapie**

Patienten, die für eine Hochdosischemotherapie nicht in Frage kommen, profitieren von einer Chemotherapie nach dem MP - Schema mit Mephalan und Prednisolon in Kombination mit einer neuen Substanz (Thalidomid, Bortezomib, Lenalidomide) (Liebisch and Pest, 2008).

#### **1.1.8.3. Supportive Therapie**

Bei Knochenbeteiligung ist eine Langzeittherapie mit Bisphosphonaten indiziert. Bei Anämie und gleichzeitiger Niereninsuffizienz ist die Gabe von Erythropoetin möglich. Knochenschmerzen und frakturgefährdete Knochen können bestrahlt werden. Bei Frakturgefährdung langer Röhrenknochen, pathologischen Frakturen und drohendem Querschnitt ist häufig ein operatives Vorgehen nötig (Liebisch and Pest, 2008).

#### **1.1.9. Prognose**

Unbehandelt liegt die mediane Überlebenszeit beim multiplen Myelom bei unter einem Jahr. Mittels einer stadienangepassten konventionellen Therapie können im Stadium I 60 Monate, im Stadium II 25-50 Monate und im Stadium III 6-33 Monate medianes Überleben erreicht werden. Eine weitere Verbesserung kann insbesondere bei jüngeren Patienten durch autologe und allogene Stammzelltransplantation erreicht werden (Prietz et al., 2008).

#### **1.1.10. Neue Substanzen**

In den letzten 10 Jahren konnten mit den Medikamenten Thalidomid, Bortezomib und Lenalidomide große Fortschritte in der Behandlung des multiplen Myeloms gemacht werden. Diese neuen Medikamente greifen in Signaltransduktionswege ein. Die Erforschung der Signaltransduktion im Multiplen Myelom führt möglicherweise zu weiteren an der Karzinogenese beteiligten Signalwegen. Diese Signalwege bzw. deren Zwischenstufen können Zielstrukturen zur Entwicklung neuer Medikamente darstellen.

## 1.2. Knochenmarkmikromilieu

### 1.2.1. Aufbau

Das Knochenmark ist der Ort der Hämatopoese. Man unterscheidet das rote Knochenmark, in dem die Blutbildung stattfindet, und das gelbe Knochenmark, in dem die blutbildenden Zellen durch Fett ersetzt wurden. Die hämatopoetischen Vorläuferzellen sind auf Unterstützung durch ein komplexes Umfeld angewiesen, um sich zu differenzieren. Dieses Umfeld bilden hauptsächlich Knochenmarkstromazellen, Osteoklasten und Osteoblasten. Die Unterstützung erfolgt durch Zell - Zell - Kontakt vermittelte Wachstumssignale und sezernierte Wachstumsfaktoren.

Das multiple Myelom profitiert als hämatologische Neoplasie von diesen Wachstumssignalen in Form von

Proliferation und Resistenz gegen Chemotherapeutika (Mitsiades et al., 2007). Außerdem stört das multiple Myelom die normalen Interaktionen im Knochenmark. Dies zeigt sich an den Osteolysen im Bereich der Myelomzellen. Diese sind auf ein Ungleichgewicht zwischen Knochenabbau durch Osteoklasten und osteoblastenvermitteltem Knochenaufbau zurückzuführen (Bataille et al., 1991). Auf molekularer Ebene besteht ein Ungleichgewicht zwischen dem osteoklastogenen Faktor *receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand* (RANKL) und dessen Gegenspieler *osteoprotegerin* (OPG) (Giuliani et al., 2001). RANKL stellt hierbei einen Ligand für Osteoprotegerin dar, welches als *decoy*-Rezeptor die Interaktion zwischen RANKL und seinem eigentlichen Rezeptor *receptor activator of NF- $\kappa$ B* (RANK) blockiert (Suda et al., 1999; Yasuda et al., 1998).

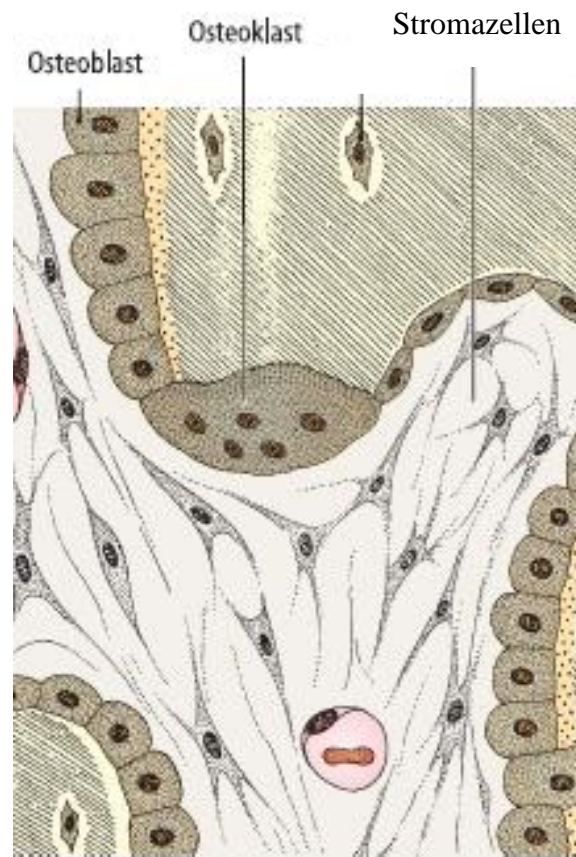


Abb. 2: Das Knochenmarkmikromilieu; modifiziert nach Junqueira (Junqueira and Carneiro, 2005)

### 1.2.2. Knochenmarkstroma

Morphologisch werden die Stromazellen als heterogene Gruppe von Bindegewebszellen mit Ähnlichkeiten zu Fibroblasten beschrieben (Mitsiades et al., 2004a). Sie durchziehen das gesamte Knochenmark wie ein Netz, in welches die Zellen der Hämatopoese eingebettet sind (Junqueira and Carneiro, 2005). Werts et al. bewiesen 1980 in vitro, dass Stromazellen die Erythropoese unterstützen (Werts et al., 1980).

Ebenso wie Stromazellen das Überleben und die Differenzierung von Blutvorläuferzellen unterstützen fördern sie das Überleben der Myelomzellen auf mehreren Wegen. Interaktionen mit Myelomzellen bilden die Stromazellen in Form von Adhensionsmolekülen wie *very late antigen - 4* (VLA - 4) und *intercellular adhesion molecules* (ICAM) (Uchiyama et al., 1992). Als Reaktion auf Zellkontakt mit Myelomzellen schütten die Stromazellen vermehrt das Interleukin 6 (IL - 6) aus, welches ein wichtiger Wachstumsfaktor für Myelomzellen ist (Uchiyama et al., 1993). Auch eine vermehrte Expression von RANKL wird durch Myelom-Zellkontakt vermittelt (Pearse et al., 2001). Außerdem wird weniger Osteoprotegerin von Stromazellen in Anwesenheit von Myelomzellen ausgeschüttet (Giuliani et al., 2001). Wie Chatterjee et al. zeigen konnte sind Myelomzellen in Anwesenheit von Stromazellen resistent gegen eine Blockade des Interleukin - 6/signal transducer and activator of transcription (STAT) – 3 Signalwegs (Chatterjee et al., 2002). Es ist die Blockade eines weiteren Signalweges zur Apoptoseinduktion nötig.

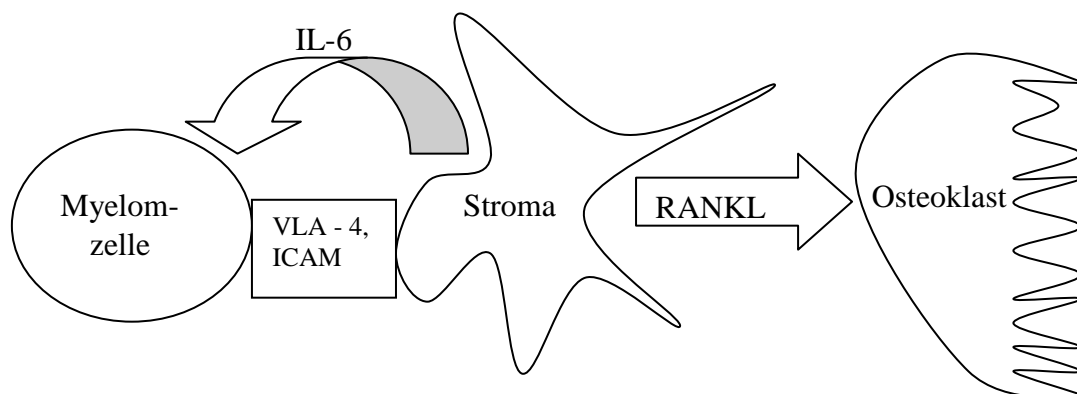


Abb. 3: Schema der Interaktionen der Knochenmarkstromazelle (Stroma) mit Myelomzellen und Osteoklasten.

### 1.2.3. Osteoklasten

Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, die durch Fusion mononukleärer Zellen entstehen. Sie sind für die Resorption im Prozess des ständigen Knochenumbaus zuständig. Sie sind an der Oberfläche von Knochen in Resorptionslakunen zu finden. Durch pH - Erniedrigung und Sekretion von proteolytischen Enzymen werden im Bereich unter den Osteoklasten sowohl die Mineralien als auch die Kollagenmatrix der Knochen abgebaut. Die Regulation des Knochenabbaus hängt von der Bildung neuer Osteoklasten aus Vorläuferzellen und deren Aktivierung zur Knochenresorption ab. Die Regulation dieses Vorganges wurde Ende der 90er Jahre auf molekularer Ebene erhellt. Das Zytokin RANKL wurde als Faktor zur Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten entdeckt (Lacey et al., 1998). Es kommt sowohl als membranständiges als auch als sezerniertes Protein vor. Es bindet an den *tumor necrosis factor* (TNF) - Rezeptor RANK, welcher auf Osteoklasten und Osteoklastenvorläuferzellen exprimiert wird (Li et al., 2000). Osteoprotegerin blockiert diesen Vorgang durch Bindung an RANKL und wirkt dem Knochenabbau entgegen (Suda et al., 1999; Yasuda et al., 1998).

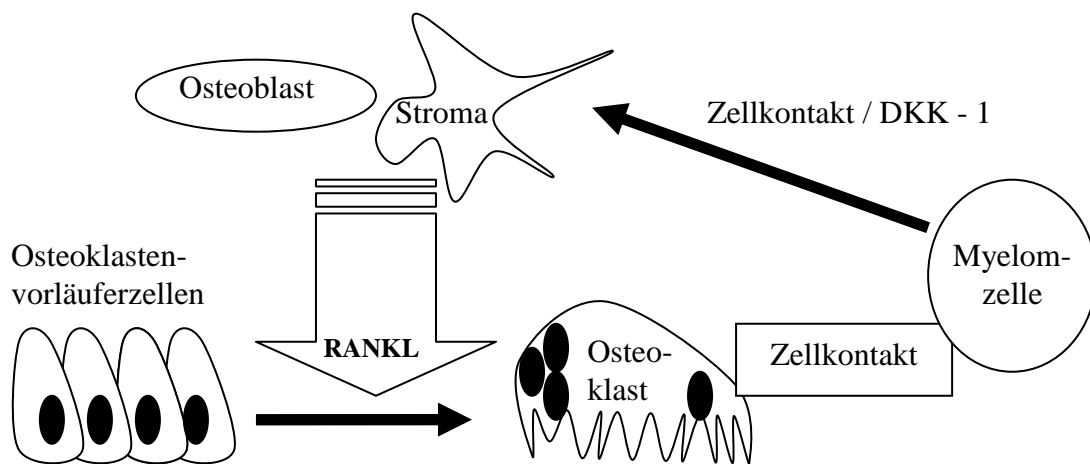


Abb. 4: Schema des Teufelskreises aus myelomzellvermittelter Osteoklastogenese und anti-apoptischer und proliferationsfördernder Wirkung von Osteoklasten auf Myelomzellen.

Das multiple Myelom geht mit einer massiven Erhöhung von RANKL im Knochenmark einher (Pearse et al., 2001) und führt zu einer vermehrten Osteoklastogenese (Bataille et al., 1991). Abe et al publizierte 2004 Hinweise darauf, dass Osteoklasten einen Zellkontakt abhängigen Überlebensvorteil für Myelomzellen bieten (Abe et al., 2004). Dies zeigten auch unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Bargou der Med. Klinik II der Universität Würzburg. Es wurden Myelomzellen 5 Tage unter den

Bedingungen ohne Kokultur, in Kokultur mit Stroma und in Kokultur mit Osteoklasten kultiviert. Anschließend wurde eine *fluorescence activated cell sorting* (FACS) - Analyse nach Annexin-V-FITC/PI - Färbung durchgeführt. In der Abbildung 5 ist das Ergebnis zu sehen. Der Anteil der lebenden, Annexin – V – FITC/PI negativen Zellen (Quadrant links unten) ist bei Myelomzellen in Kokultur mit Osteoklasten mit 85 % lebenden Zellen am höchsten. Myelomzellen in Kokultur mit Stromazellen sind zu 53 %, Myelomzellen ohne Kokultur zu 20 % nicht apoptotisch. Es besteht möglicherweise ein Teufelskreis aus Osteoklastogenese und verbessertem Tumorüberleben durch Osteoklasten. Dies könnte ein entscheidender Faktor der Unterstützung des Tumors durch das Knochenmarkmikromilieu sein.

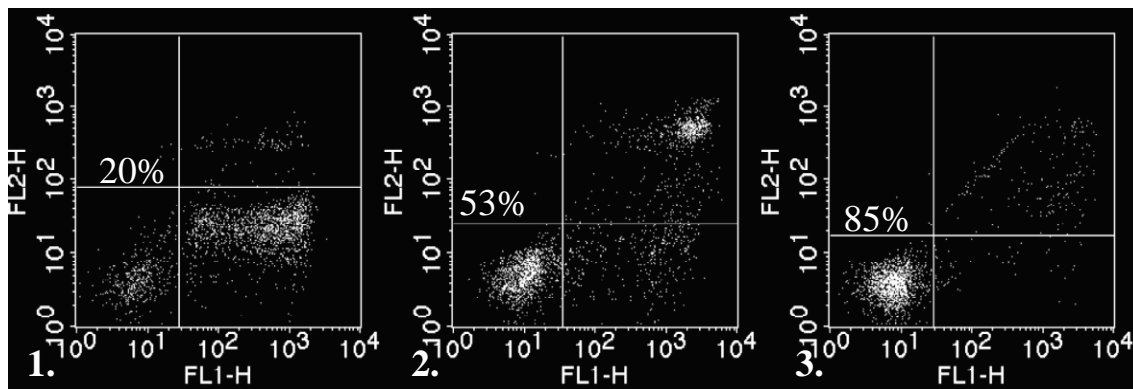


Abb. 5: FACS-Analyse von Myelomzellen auf Annexin – V - FITC (FL1 - H) / PI (FL2 - H); Kulturbedingungen der Myelomzellen während 5 Tagen: 1. Myelomzellen ohne Cokultur, 2. Myelomzellen in Cokultur mit Stromazellen, 3. Myelomzellen in Cokultur mit Osteoklasten.

#### 1.2.4. Osteoblasten

Osteoblasten sind Zellen, die für die Knochenbildung verantwortlich sind. Sie entwickeln sich aus undifferenzierten Mesenchymzellen, embryonalen Bindegewebszellen. Sie lagern sich an Knochen hautschichtartig an und bilden indirekt die Grundlage für neue Knochensubstanz, indem sie vor allem Typ I Collagen, Calciumphosphate und Carbonate in den interstitiellen Raum ausscheiden (wikipedia, 2008). Osteoblasten sind nicht nur am Knochenaufbau beteiligt sondern beeinflussen auch den Knochenabbau durch Regulation der Osteoklastenaktivität und Genese. Dies erfolgt über die Sekretion von RANKL und dessen Antagonisten Osteoprotegerin.

Die Sekretion von OPG wird durch eine Aktivierung des kanonischen Wnt - Signalweges hervorgerufen (Glass et al., 2005), während die RANKL - Expression durch Wnt - Aktivierung herunter reguliert wird (Spencer et al., 2006). Die Myelomzellen sezernieren nach Ergebnissen von Quiang et al. den Inhibitor des Wnt -

Signalweges Dickkopf - 1 (DKK - 1) (Qiang et al., 2008), was zu einem Ungleichgewicht der OPG / RANKL - Sekretion zu Gunsten von RANKL führt. Dies führt zur Osteoklastogenese und Knochenresorbtion.

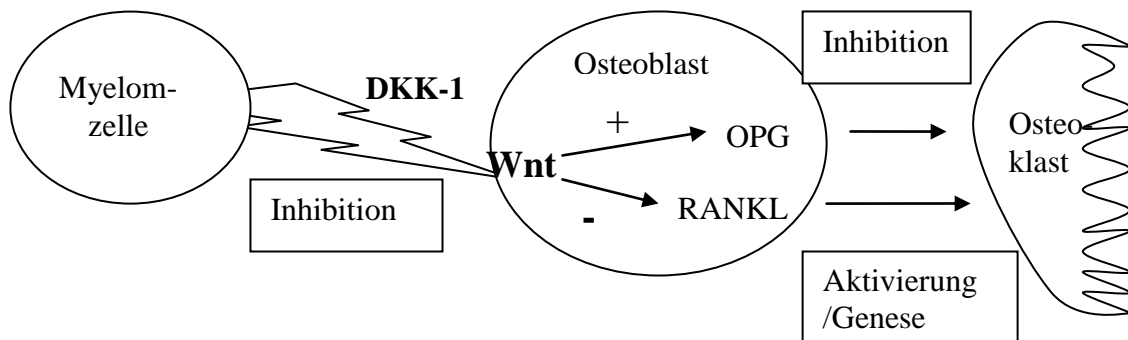


Abb. 6: Schema der durch Myelomzellen verursachten Osteoklastenaktivierung

### 1.2.5. Myelomzellen

Myelomzellen sind Tochterzellen eines maligne entarteten Plasmazellklons. Mit Ausnahme von Spätstadien proliferieren die Tumorzellen ausschließlich im Knochenmark, wo sie Unterstützung durch das Mikromilieu bekommen. Sowohl Zellkontakt zu Knochenmarkstromazellen (Damiano et al., 1999) und Osteoklasten (Abe et al., 2004) als auch Zytokine wie z.B. Il-6 (Uchiyama et al., 1993) spielen hierbei eine wichtige Rolle. Letztlich führen all diese Stimuli zu einer Aktivierung von antiapoptotischen Signalkaskaden wie dem AKT - Signalweg (Hideshima et al., 2001), *nuklear factor kappa B* (NFκB) - Signalweg (Hideshima et al., 2002), *mitogen activated protein kinase* (MAPK)/*extracellular signal-regulated kinases* (ERK) - Signalweg (Mitsiades et al., 2004b) und STAT - 3 - Signalwegs (Berger et al., 1994) in den Myelomzellen. Eine Expression von RANKL in Myelomzellen wurde von Farrugia nachgewiesen (Farrugia et al., 2003), bleibt aber kontrovers.



### **1.3. Signalwege**

Im Jahr 2000 fassten Hanahan und Weinberg in dem Artikel “The Hallmarks of Cancer“ die zentralen zellbiologischen Voraussetzungen der Krebsentstehung zusammen. Diese sind Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, Apoptoseresistenz, Resistenz gegen wachstumshemmende Faktoren, Fähigkeit zur Gewebeinvasion und Metastasierung und Induktion und Erhalt der Angiogenese (Hanahan and Weinberg, 2000). Nach Dhillon et al. lässt sich auch noch der Erwerb von Chemotherapeutikaresistenz hinzufügen, welche beim Multiplen Myelom eine große Rolle spielt. All diese Veränderungen lassen sich möglicherweise durch Veränderungen in der Signaltransduktion hervorrufen (Dhillon et al., 2007). Eine ganze Reihe externer Stimuli in Form von Wachstumsfaktoren und Zelladhäsionsmolekülen aktivieren zum Teil mehrere Signalwege, welche unter sich wiederum in Wechselwirkungen stehen (Crosstalk). Zusätzlich entscheidet der Zustand der Zelle über die Art der Reaktion einer Signalwegsaktivierung. Reaktionen sind unter anderem Proliferation, Migration, Apoptose und Differentierung. Es ist sehr wahrscheinlich, dass in allen malignen Tumoren Wachstumssignal abhängige Signalwege dereguliert sind (Hanahan and Weinberg, 2000).

#### **1.3.1 MAPK/ERK-Signalweg**

Ende der 80er wurde die Phosphorylierung des ribosomalen Protein S6 als Reaktion auf Wachstumsfaktoren genauer untersucht. Es zeigte sich, dass die Proteinkinasen p70s6 - Kinase und p90rsk diese Reaktion katalysierten, welche selber wiederum von einer Serin - Threoninkinase phosphoryliert wurden. Diese in 2 Isoformen vorliegende Serin - Threoninkinase wurde letztlich als *mitogen - activated protein kinase 1/2* (MAPK 1/2) bezeichnet und das entsprechende Gen nach Klonierung *extracellular signal-regulated kinase 1/2* (ERK 1/2) benannt (Pearson et al., 2001; Seger and Krebs, 1995).

Der Signalweg, in den ERK 1/2 eingebunden ist, wird nach ihm MAPK/ERK – Signalweg genannt.

##### **1.3.1.1. Allgemeiner Aufbau**

Wachstumsfaktoren und extrazelluläre Matrix sind Ausgangspunkte des MAPK/ERK – Signalweges. Extrazelluläre Matrix bindet an Integrine, Proteine, welche einen extra- und intrazellulären Anteil haben. Nach der Bindung extrazellulärer Matrix ans Integrin aktiviert der intrazelluläre Anteil über Zwischenstufen das *Ras*-Protein (Guo and Giancotti, 2004). Wachstumsfaktoren wie z.B. *platelet-derived growth factor* (PDGF),

*epidermal growth factor* (EGF), *fibroblast growth factor* (FGF) oder Insulin binden an Rezeptortyrosinkinasen wie z.B. den EGF-Rezeptor (Kohno and Pouyssegur, 2006). Im Falle des EGF-Rezeptors erfolgt nach Bindung des Liganden durch Konformationsänderung eine Dimerisierung des Rezeptors. Die sich nun in räumlicher Nähe befindlichen intrazellulären Tyrosinkinasedomänen der Monomere phosphorylieren Tyrosinreste des jeweils anderen Rezeptormonomers nahe der katalytischen Domäne. Über SH-2-Domänen bindet das Adapterprotein *growth factor receptor-bound protein 2* (Grb-2) an eine Phosphotyrosingruppe des aktivierten Rezeptors. Über zwei SH-3-Domänen von Grb-2 wird der Guaninnukleotidaustauschfaktor *son of sevenles* (Sos) gebunden und somit vom Zytoplasma zur Zellmembran rekrutiert. Hierdurch gelangt es in räumliche Nähe des membrangebundenen GTPase-Schalterproteins Ras. In gebundener Form verhält sich Sos wie ein Guaninnukleotidaustauschfaktor (GEF) und fördert die aktive Ablösung des Guanosindiphosphat (GDP) und passive Bindung von Guanosintriphosphat (GTP) ans Ras-Protein. Hierdurch wird das Ras-Protein aktiviert und bindet in dieser Konformation mehrere Proteine darunter die *rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma* (Raf) -Kinasefamilie. Die Inaktivierung des Ras-Proteins durch Hydrolyse von GTP geschieht durch Interaktion mit dem GTPase aktivierende Enzym (GAP). Die Serin-Threoninkinase Raf-1 wird durch Bindung an Ras zur Zellmembran rekrutiert und ändert seine Konformation. Ein weiterer unbekannter Mechanismus ist jedoch noch zur vollen Aktivierung nötig. Raf-1 aktiviert MAP/ERK-Kinase (MEK) 1/2 durch zweifache Serinphosphorylierung. Aktivierte Serin-Threoninkinase MEK 1/2 phosphorylieren einen Tyrosin und einen Threoninrest in der Aktivierungsdomäne von ERK 1/2. Hierdurch wird ERK 1/2 aktiviert und phosphoryliert eine Reihe von Proteinen im Zytoskelett, Zytosol und Zellkern. Im Zytosol handelt es sich um regulatorische Proteine, zum Teil desselben Signalweges wie z.B. EGF-Rezeptor, Sos, Raf-1 und MEK. Phosphorylierung von regulatorischen Zytoskelettproteinen wie *microtubule-associated protein* (MAP) -1, -2, -4 und Tau führen zu Veränderung im Zytoskelett und der Zellgestalt. Am wichtigsten für das Verständnis der proliferativen Wirkung des ERK-Signalweges sind die nukleären Zielmoleküle. ERK 1/2 phosphoryliert Transkriptionsfaktoren wie c-Fos, c-Jun, *activating transcription factor-2* (ATF-2). Hierdurch können sie sich an die DNA anlagern und die Transkription ihrer Zielgene initiieren. Die Zielgene sind an der

Zellzykluskontrolle beteiligt. Zusätzlich aktiviert ERK 1/2 die Proteinkinasen *ribosomal S6 kinase* (Rsk) und *mitogen-and stress-activated protein kinases* (Msk), welche die Histone H-3 phosphorylieren und so die DNA für Transkriptionsfaktoren besser erreichbar machen kann. Insgesamt führt die Phosphorylierung der verschiedenen Substrate durch ERK 1/2 zu einer Stimulation der Zellproliferation (Dhillon et al., 2007; Kohno and Pouyssegur, 2006; Lodish, 2001a; Pearson et al., 2001; Seger and Krebs, 1995).

### **1.3.1.2. MAPK/ERK-Signalweg im multiplen Myelom**

Interleukin-6 als das wichtigste Zytokin zur Wachstumsstimulation von Myelomzellen kann über den IL-6-Rezeptor und eine Reihe zwischengeschalteter Proteine neben der STAT-3 Aktivierung auch zu einer Aktivierung des MAPK/ERK-Signalweges führen. IL-6 vermittelt über den MAPK/ERK-Signalweg eine gesteigerte Zellproliferation (Ogata et al., 1997a), während es über den STAT-3-Signalweg im Multiplen Myelom einen Beitrag zur Apoptoseinhibition leistet (Fukada et al., 1996). In der Zellkultur wurde nachgewiesen, dass eine IL-6 Inhibition z.B. mit IL-6-Rezeptorantagonisten in Myelomzellen Apoptose induziert (Demartis et al., 1996). ERK1/2 Inhibition blockierte teilweise das Zellwachstum der Myelomzelllinie INA-6 in vitro, jedoch kaum in vivo (Burger et al., 2001). In Kokultur mit Knochenmarkstromazellen reicht eine IL-6-Blockade nicht zur Apoptoseinduktion von Myelomzellen aus. Erst eine zusätzliche ERK 1/2 –Blockade führt zur Apoptoseinduktion (Chatterjee et al., 2004).

N-Ras und K-Ras Mutationen treten beim Multiplen Myelom vor allem in späten Krankheitsstadien auf und sind zumindest im Falle von K-Ras mit einer höheren Tumorlast und einem kürzeren medianen Überleben assoziiert (Liu et al., 1996).

Farnesyltransferaseinhibitoren verhindern die Farnesylierung des Ras-Protein und damit seine Anheftung an die Zellmembran. Der MAPK/ERK-Signalweg ist hierdurch unterbrochen. Farnesyltransferaseinhibitoren induzieren Apoptose von Myelomzellen in vitro (Bolick et al., 2003).

Der MAPK/ERK-Signalweg vermittelt auch wichtige Signale im Knochenmarkmikromilieu. Osteoklastogenese und Aktivierung sind von einer ERK-Aktivierung abhängig und mittels MEK-Inhibitoren zu blocken (Breitkreutz et al., 2007).

### 1.3.2. JAK/STAT-Signalweg

#### 1.3.2.1. Allgemeiner Aufbau

Der JAK-STAT-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung, Organogenese und Organfunktion, angeborenen und erworbenen Immunabwehr, der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Die extrazellulären Stimuli sind 38 verschiedene Zytokine (u.a. Interferon  $\gamma$ , Erythropoetin, Thrombopoetin, Interleukin -2, -3, -4, -5,...). Beim Myelom spielt vor allem IL-6 eine Rolle. Zytokinrezeptormonomere binden das entsprechende Zytokin und dimerisieren. Im Falle des IL-6 Rezeptors rekrutiert die IL-6-Bindungseinheit 2 Glykoprotein 130 (gp-130)-Proteine, welche als Rezeptoruntereinheiten die Funktion der beiden Rezeptormonomere übernehmen. An die Zytokinrezeptormonomere/gp130 ist jeweils eine nicht kovalent gebundene Tyrosinkinase des Januskinasentyps ( Bei IL-6: Januskinase (Jak) 1,2 Tyrosinkinase (Tyk) 2 ) assoziiert. Durch die Zytokinbindung und Rezeptor/gp130 - Dimerisierung und damit einhergehende Konformationsänderung werden die Januskinasen aktiviert und phosphorylieren sich und die Rezeptormonomere/gp 130 gegenseitig. Die phosphorylierten Tyrosinreste jedes Rezeptors/gp130 binden ein *signaltransducer and activator of transkription* (STAT)-Protein an einer SH-2-Gruppe. Im Falle von gp130 bindet vor allem STAT 1 und 3. Die STAT-Proteine werden durch den Rezeptor oder assoziierte Kinasen (häufig Jaks) an einem Tyrosinrest phosphoryliert. Die STAT-Moleküle dissoziieren vom Rezeptor und bilden Homo- oder Heterodimere über Bindungen zwischen den SH-2 und Phosphotyrosingruppen. Die STAT-Dimere werden durch vereinfachten Transport in den Zellkern transloziert. Dort binden sie als Transkriptionsfaktoren an bestimmte Promotersequenzen und initiieren die Genexpression. Die Dephosphorylierung durch nukleären Tyrosinphosphatasen oder Proteolyse beenden die Aktivität als Transkriptionsfaktoren. Die Zielgene sind Apoptoseinhibitoren und Zellzyklusregulatoren wie *basal cell lymphoma-extra large* (BCL-XL), *myeloid cell leukemia sequence-1* (Mcl-1), Cyclin D1/D2 und c-myc. STAT-3 führt zur Expression von Akute-Phase-Proteingenen wie junB und ICAM-1, dem Inhibitor Cyclin abhängiger Kinasen p19INK4D und weiterer Proteine wie c-myc, pim-1 und pim-2. Aktiviertes gp 130 bindet außerdem das Protein SHP-2, welches hierauf phosphoryliert wird und Grb-2 und Sos an die Plasmamembran rekrutiert. Hierdurch kommt es zu einer Aktivierung des ERK-Signalweges über Ras-Aktivierung (Buettner

et al., 2002; Hirano et al., 1997; Levy and Darnell, 2002; Murray, 2007; Weinberg, 2007).

### **1.3.2. STAT-3-Signalweg im multiplen Myelom**

Im multiplen Myelom spielt vor allem die Aktivierung von STAT-3 eine Rolle, weswegen hierauf besonders eingegangen wird. Konstitutive Aktivierung von STAT-3 wurde in Myelomzellen aus Knochenmarkpunktionen von Patienten und in der Zelllinie U266 nachgewiesen (Catlett-Falcone et al., 1999). 1988 wurde nachgewiesen, dass IL-6 einen starken proliferativen Effekt auf primäre Myelomzellen hat (Kawano et al., 1988). Das antiapoptotische Zielgen BCL-XL ist bei konstitutiver STAT-3 Aktivierung hochreguliert und die Apoptose mittels Fas-Liganden inhibiert. Blockade des Signalwegs mittels IL-6-Rezeptorantagonisten (Demartis et al., 1996), Jak-Inhibitoren (De Vos et al., 2000) und dominant negative STAT-3 Genexpression (Catlett-Falcone et al., 1999) führte zur Herunterregulation von BCL-XL und Apoptoseinduktion. Inhibition des STAT-Signalweges wird deswegen immer wieder als Ziel für neue Medikamente diskutiert. So zeigten etwa Hönemann et al., dass der IL-6 Rezeptorantagonist SANT-7 Chemotherapeutikaresistenzen von Myelomzellen in vitro aufhebt (Hönemann et al., 2001). Dass jedoch ein IL-6-Rezeptorantagonist im Knochenmarkmikromilieu zur Apoptoseinduktion von Myelomzellen nicht ausreicht wurde klinisch bewiesen. In einer Studie mit einem monoklonalen Anti-IL-6-Antikörper konnte keine Remission des multiplen Myeloms erzielt werden (Bataille et al., 1995).

### **1.3.3. Der AKT-Signalweg**

Im Jahr 1991 wurde von drei Forschergruppen unabhängig von einander die Serin-Threonin-Proteinkinase AKT gefunden, welche ebenfalls mit den Proteinkinasen A und C verwandt ist und deshalb auch als Proteinkinase B bezeichnet wird. AKT ist zentrales Molekül des nach ihm benannten Signalwegs. Dieser ist sowohl in metabolische Funktionen und Zellwachstum, als auch in die Apoptoseregulation eingebunden.

#### **1.3.3.1 Allgemeiner Aufbau**

Ausgangspunkt für die AKT-Aktivierung ist die Assoziation von AKT an die Plasmamembran. Dies geschieht durch Anlagerung mit der *pleckstrin-homology* (PH)-Domäne an das Membranlipid Phosphatidylinositoltrisphosphat (PIP3). Dieses Membranlipid wird in seiner Menge streng reguliert. Es wird aus Phosphatidylinositoldiphosphat (PIP2) durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) synthetisiert

und durch die *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) wieder abgebaut. Die PI3K muss ihrerseits ebenfalls an die Zellmembran nichtkovalent binden, um durch die Nähe ihres Substrats enzymatisch aktiv werden zu können. Die Assoziation an die Zellmembran entsteht durch Bindung an ein aktiviertes Ras-Protein oder die  $\beta\gamma$ -Untereinheit eines trimeren G-Proteins. Die Bindung ist also letztlich von der Aktivierung einer Rezeptortyrosinkinase (z.B. Wachstumshormon-, PDGF-, Insulin-Rezeptor) oder eines G-Protein gekoppelten Rezeptors abhängig. Auch die Proteinkinase *phosphoinositide-dependent-kinase-1* (PDK-1) assoziiert über eine PH-Domäne an PIP3 und wird aktiviert. PDK-1 phosphoryliert schließlich AKT an zwei Aminosäurereste und aktiviert seine Kinaseaktivität. AKT dissoziiert von der Plasmamembran und phosphoryliert seine Zielproteine. Hierzu gehört eine Reihe von metabolischen Enzymen wie z.B. Glykogen-Synthase-Kinase-3 und 6-Phosphofruktokinase. Desweiteren erfolgt Zellzyklusregulation durch Phosphorylierung von Cyclin D1 und Apoptoseinhibition durch Inaktivierung des proapoptotischen *Bcl-2-antagonist of cell death* (BAD) durch Phosphorylierung. Mittels Aktivierung der Kinase *mammalian target of rapamycin* (mTOR) nimmt AKT weiteren Einfluß auf Proteinsynthese, Zellwachstum und Zellzyklusprogression (Duronio, 2008; Franke et al., 2003; Lodish, 2001a; Weinberg, 2007).

Aktiviertes mTOR vermittelt eine p70S6K-Phosphorylierung. Aktiviertes p70S6K vermittelt eine vermehrte Synthese ribosomaler Proteine und Translationsfaktoren und unterstützt hierdurch die Proteinbiosynthese unter Anderem des Transkriptionsfaktors c-myc (Jefferies et al., 1997; Terada et al., 1994). Auch das Bindeprotein 4e-BP des Initiationsfaktors der Translation eIF4E wird durch mTOR phosphoryliert. Hierdurch wird der Translationsfaktor eIF4E freigesetzt und die Translation einiger Proteine unter Anderem des Cyclins D1 erhöht (Rosenwald et al., 1995).

#### **1.3.3.2. AKT im Multiplen Myelom**

Es ist bekannt, dass die für das Multiple Myelom wichtigen Wachstumsfaktoren IL-6 und *insulin-like growth factor-1* (IGF-1) ihre antiapoptotischen und proliferativen Wirkung sowohl über den ERK-Signalweg als auch über den AKT-Signalweg vermitteln (Ge and Rudikoff, 2000b; Hideshima et al., 2001). Außerdem sind in Wachstumsfaktor unabhängigen Zelllinien und Proben von Patienten im fortgeschrittenen Stadium des Myeloms Komponenten des AKT-Signalweges mutiert. So

ist AKT z.T. konstitutiv aktiviert (Pene et al., 2002) und der Inhibitor des AKT-Signalweges PTEN wird z.T. nicht exprimiert (Ge and Rudikoff, 2000a). Inhibition der AKT-Aktivierung mittels LY294002 oder Restitution von PTEN mittels Transfektion mit einem Expressionsvektor führte zu geringerer Proliferation und Apoptose-Induktion (Ge and Rudikoff, 2000a; Pene et al., 2002).

Neuere Ergebnisse von Zöllinger et al. zeigen, dass der AKT-Signalweg nur in etwa der Hälfte der primären Myelomzellen und Myelomzelllinien von Bedeutung ist. Eine Gruppe starker konstitutiver AKT-Phosphorylierung ist von einer Gruppe geringer AKT-Phosphorylierung zu unterscheiden. Die starke AKT-Phosphorylierung ist vor allem auf noch z.T. unbekannte genetische Veränderungen wie z.B. eine PTEN-Deletion (20%) zurückzuführen. In der Gruppe der konstitutiven AKT-Aktivierung führt eine AKT-Inhibition zur Apoptoseinduktion. Die Gruppe geringer AKT-Phosphorylierung ist resistent gegen AKT-Inhibition und selbst bei der zusätzlichen Blockade des MAPK/ERK- und STAT-3-Signalweges zeigt sie keine gesteigerte Apoptoseinduktion. Es ist anzunehmen, dass in dieser Subgruppe der AKT-Signalweg keine Bedeutung für das Überleben der Zellen hat (Zollinger et al., 2008).

Interessanterweise führte die Inhibition von mTOR, welches eine denkbare pharmakologische Zielstruktur darstellt, nur zu einer geringen Apoptoseinduktion. Grund hierfür ist die mTOR abhängige Phosphorylierung vom Insulin-Rezeptor Substrat-1 (IRS-1), welches hierdurch abgebaut wird. IRS-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Signalübermittlung am Insulin und IGF-Rezeptor. Im Sinne einer negativen Rückkoppelung wird IRS von dem durch ihn aktivierten mTOR abgebaut. Diese Rückkoppelung wird durch mTOR-Blockade verhindert und eine vermehrte IGF-Signalaktivierung ist die Folge (Shi et al., 2005).

#### **1.3.4. NFκB-Signalweg**

Vor 20 Jahren wurde ein nukleärer Faktor entdeckt, der in B-Zellen die Expression der κ-Leichtketten von Immunglobulinen hochreguliert (Sen and Baltimore, 1986). Dieser wurde deshalb Nukleärer Faktor κ B (NFκB) genannt. Zunächst wurden die wichtigen Funktionen von NFκB als Transkriptionsfaktor in der Entwicklung und Aktivierung des Immunsystems entdeckt. In der letzten Zeit wurde erkannt, dass NFκB sowohl in immunologischen als auch in nicht-immunologischen Zellen weitere zentrale zelluläre

Prozesse wie Apoptose, Differenzierung und Proliferation steuert. Fehlregulationen von NFκB wurden in einer Reihe von Erkrankungen und unter anderem auch Krebs entdeckt.

#### **1.3.4.1. Allgemeiner Aufbau**

Die Familie der NFκB-Transkriptionsfaktoren besteht aus den Proteinen p50, p52, p65 (RelA), RelB und c-Rel. Aus diesen bilden sich Homo- oder Heterodimere. Allen Proteinen ist eine *Rel homology domain* (RHD) gemeinsam, welche für die DNA-Bindung an κB-Motive im Promotorbereich der NFκB-Zielgene verantwortlich ist. Die *transcriptional activation domain* (TAD) ist für die Rekrutierung von Coaktivatoren an die DNA und Transkriptionsförderung verantwortlich und nur in den Proteinen p65, RelB und c-Rel vorhanden. Dimere ohne p65, RelB und c-Rel-Beteiligung binden an die κB-Motive im Promotor ohne eine Transkription einleiten zu können. Die Transkription des Gens ist blockiert.

NFκB-Dimere kommen in einem aktiven und einem inaktiven Zustand vor. Im inaktiven Zustand ist das NFκB-Dimer an ein inhibitorisches Protein der IκB-Familie (IκBα, IκBβ, IκBε) assoziiert. Die IκB-Proteine maskieren die DNA-Bindungsdomäne und halten die NFκB-Dimere im Zytoplasma zurück. Aktive NFκB-Dimere sind von IκB-Proteinen dissoziiert, im Kern lokalisiert und als Transkriptionsfaktoren aktiv.

Viele Stimuli wie z.B. Bakterien, Viren, Zellkontakt, Zytokine (z.B. TNF-α, RANKL) und Wachstumshormone aktivieren über unterschiedliche Rezeptoren NFκB. Auf eine spezielle NFκB-Aktivierung durch einen Stimulus folgt jedoch immer eine Transkriptionsänderung einer bestimmten Auswahl der NFκB-Zielgene und eine passende Reaktion der Zelle. Gründe hierfür sind der Crosstalk mit anderen aktivierten Signalwegen, die kovalente Modifikation von NFκB nach Aktivierung und die unterschiedliche Aktivierung von NFκB über den kanonischen und nicht-kanonischen Signalweg.

##### **1.3.4.1.1. Der kanonische Signalweg**

Ausgangspunkt sind Rezeptoren der TNF-Familie, toll-like-Rezeptor, Interleukin-1-Rezeptor und B- und T-Zellrezeptor. Bei Bindung von TNF-α an den TNF-Rezeptor-1 trimerisiert dieser Rezeptor und rekrutiert mit seiner zytoplasmatischen Todesdomänen einen Komplex aus den Proteinen *TNF-receptor associated death domain* (TRADD), TNF-Rezeptor assoziierter Faktor (TRAF) 2 und 5, *receptor interacting proteins* (RIP)



und der Kinase RIP-1. Auf noch nicht im Detail geklärte Weise führt dieser Komplex zur Phosphorylierung des I $\kappa$ B-Kinase (IKK)-Komplexes. Der IKK-Komplex besteht aus den beiden durch Phosphorylierung aktivierbaren Kinaseuntereinheiten IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  und der regulatorischen Untereinheit *NF $\kappa$ B essential modulator* (NEMO)/ IKK $\gamma$ . Der aktivierte IKK-Komplex kann die meisten I $\kappa$ B-Proteine phosphorylieren. Phosphorylierung von I $\kappa$ B-Proteinen führt zu einer Ubiquitinierung durch die SCF $\beta^{\text{TrCP}}$  E3-Ubiquitin-Ligase. Hiermit ist das I $\kappa$ B-Protein zum Abbau markiert und wird im Proteasom degradiert. Das freie NF $\kappa$ B-Dimer kann nun weiter posttranslational modifiziert werden und schließlich in den Zellkern wandern und seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausüben (Hayden and Ghosh, 2008; Jost and Ruland, 2007; Tergaonkar, 2006).

#### **1.3.4.1.2. Der alternative NF $\kappa$ B-Signalweg**

Bisher sind wenige Liganden und Rezeptoren [*lymphotoxin beta receptor* (LT $\beta$ R), CD40, *B-cell activating factor receptor* (BAFFR), RANK] für den alternativen NF $\kappa$ B-Signalweg bekannt. Diese spielen jedoch eine wichtige Rolle in der Entwicklung von sekundären lymphatischen Organen, der B-Zellhomöostase und der Osteoklastogenese. Die Aktivierung des alternativen NF $\kappa$ B-Signalweg erfolgt langsamer als die des kanonischen.

Die Rezeptoren des alternativen NF $\kappa$ B-Signalweg gehören ebenfalls der TNF-Familie an und ändern bei Aktivierung die Zusammensetzung ihrer assoziierten TRAF-Proteine. Vor allem wird TRAF 3 degradiert, welches seinerseits die Ubiquitinierung und Degradation der *NF $\kappa$ B inducing kinase* (NIK) vermittelt. Somit steigt die Menge an NIK. NIK phosphoryliert sowohl das Protein p100 als auch IKK $\alpha$ . IKK $\alpha$  phosphoryliert hierauf weitere Aminosäurereste des p100-Proteins, welches an RelB assoziiert ist. Dies führt zur Ubiquitinierung des p100-Proteins. Dieses wird im Proteasom jedoch nur teilweise degradiert und aus dem Protein p100 der NF $\kappa$ B-Transkriptionsfaktor p52 prozessiert. Das entstandene p52-RelB-Dimer wird nicht von einem I $\kappa$ B-Protein inhibiert und kann in den Kern translozieren und als Transkriptionsfaktor wirken.

Zielgene des NF $\kappa$ B-Signalweges sind Chemokine, Immunrezeptoren, Adhäsionsmoleküle, Apoptoseregulatoren, Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren, Zellzyklusregulatoren und seine eigenen Inhibitoren, die I $\kappa$ B-Proteine. Durch die

Expression der I $\kappa$ B-Proteine wird das NF $\kappa$ B-Signal im Sinne einer negativen Rückkoppelung beendet (Dejardin, 2006; Hayden and Ghosh, 2008; Jost and Ruland, 2007; Tergaonkar, 2006).

### **1.3.4.3 NF $\kappa$ B im multiplen Myelom**

Annunziata et al. wies in 82% primärer Knochenmarkstanzen von Patienten mit multiplen Myelom eine NF $\kappa$ B-Aktivierung durch erhöhte Expression von 11 NF $\kappa$ B Zielgenen nach (Annunziata et al., 2007).

Außerdem fanden sich zum Teil eine massiv erhöhte Expression vom Aktivator des kanonischen und alternativen NF $\kappa$ B-Signalweg NIK. Der negative Regulator von NIK TRAF-3 war zum Teil massiv vermindert exprimiert. Dies ist auf genetische Ereignisse (Translokation, Deletion...) zurückzuführen (Annunziata et al., 2007). Auch bestimmte Polymorphismen von I $\kappa$ B $\alpha$  kommen in Myelomzellen gehäuft vor (Parker et al., 2002).

Die Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweg durch genetische Abnormalitäten ist in etwa 16% aller primären Multiplen Myelome zu erwarten (Annunziata et al., 2007). Die Ursache der Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweg in vielen Myelomproben ist jedoch das veränderte Knochenmarkmikromilieu. Kontakt zu Knochenmarkstromazellen aktiviert den NF $\kappa$ B-Signalweg in Myelomzellen (Chauhan et al., 1996). Auch die im Knochenmarkmikromilieu gebildete Komponente der Extrazellulären Matrix Fibronectin aktiviert den NF $\kappa$ B-Signalweg in Myelomzellen (Landowski et al., 2003). NF $\kappa$ B-Aktivierung führt in Myelomzellen zur Hochregulation von Zell-Zell und Zell-Matrix-Adhäsionsproteinen wie VLA-4 und ICAM (Tatsumi et al., 1996).

Wichtige Veränderungen im Knochenmarkmikromilieu werden durch NF $\kappa$ B-Aktivierung in anderen Zellen z.B. den Osteoklasten durch Mediatoren z.B. *macrophage - colony stimulating factor* (M-CSF) und RANKL hervorgerufen (Lee and Kim, 2003). Auch die Sekretion von Wachstumsfaktoren für die Myelomzellen, wie IL-6, GM-CSF, BAFF und MIP-1 $\alpha$  wird durch den NF $\kappa$ B-Signalweg reguliert (Li et al., 2008).

NF $\kappa$ B-Aktivierung unterstützt in Myelomzellen auf verschiedenen Wegen das Überleben und die Proliferation. NF $\kappa$ B reguliert die Expression von antiapoptotischen Proteinen wie *B-cell lymphoma 2* (BCL-2), BCL-XL. Das Enzym Telomerase führt zur Immortalisierung der Plasmazellen, einem frühen Schritt der Krebsentstehung. Die

Expression der katalytischen Untereinheit *telomerase reverse transcriptase* wird von NFκB reguliert (Yin et al., 2000). Die Angiogenese unterstützt NFκB durch die Expression der 2 *vascular endothelial growth factors* VEGF-C und PLGF (Chilov et al., 1997; Cramer et al., 2005).

Neue Medikamente des Multiplen Myeloms wie der Proteasomeninhibitor Bortezomib oder Thalidomid blocken den NFκB-Signalweg. Dies ist zumindest für einen Teil ihrer proapoptotischen Wirkung verantwortlich. Vor allem kann eine Blockade des NFκB-Signalweg durch Reduktion antiapoptotischer Signale die Toxizität konventioneller Chemotherapeutika erhöhen (Li et al., 2008).

### **1.3.5. Apoptose**

Die Zellzahl einer Zellpopulation wird durch den Zuwachs an Zellen durch Zellteilung und den Verlust von Zellen durch den programmierten Zelltod Apoptose bestimmt. Normalerweise ist das Verhältnis von Zellteilung zu Apoptose in einer nicht mehr wachsenden Zellpopulation ausgeglichen. Das multiple Myelom ist eine Neoplasie, die sehr langsam proliferiert. Allerdings ist der Anteil an Zellen, die sich in der Apoptose befinden sehr gering. Somit akkumulieren die Myelomzellen (Oancea et al., 2004).

#### **1.3.5.1. Allgemeiner Ablauf**

Die Apoptose ist im Gegensatz zur Nekrose ein gut regulierter Vorgang. Zentrale Ereignisse sind Kern- und Zellschrumpfung, Chromatinkondensation, DNA-Fragmentation und Bildung apoptotischer Blasen. Zwei Signalwege führen letztlich zur Aktivierung von im Plasma inaktiv vorliegenden Cysteinproteasen (Caspasen). Diese aktivieren sich gegenseitig im Sinne einer Signalkaskade und letztlich eine ganze Reihe von zellulären Protease und Endonukleasen. Dies führen zur Degradation von Nukleinsäuren und Stützproteinen.

##### **1.3.5.1.1. EXTRINSISCHE APOPTOSEEINLEITUNG**

Der extrinsische Signalweg spielt vor allem im Immunsystem eine Rolle. Ausgangspunkt sind membranständige Todesrezeptoren wie Fas, TNF-Rezeptor 1, *death receptor* 4 und 5. Nach Bindung ihrer Liganden FasL, TNF-α, *TNF related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) oder *TNF ligand superfamily member 10* (TNFSF10) kommt es zu einer Neuorganisation der Rezeptoren z.B. in Form von Trimerisierung. Adapterproteine wie z.B. *Fas associated via death domain* (FADD) lagern sich an und

rekrutieren Procaspase 8 und 10 zu einem *death inducing signalling complex* (DISC). In diesem Komplex werden die Caspasen 8 und 10 autoproteolytisch aktiviert.

#### **1.3.5.1.2. Intrinsische Apoptoseeinleitung**

Der intrinsische Signalweg geht vom Mitochondrium aus und wird durch DNA-Schädigung, Chemotherapeutika, Hypoxie, oxidativem Stress und Entzug von Wachstumsfaktoren aktiviert. Das kritische Ereignis des intrinsischen Signalweges ist die Bildung von Poren in der äußeren Mitochondrienmembran und Freisetzung von Cytochrom c aus dem Raum zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran. Verantwortlich hierfür sind die proapoptotischen Proteine Bax und *Bcl-2 homologous antagonist/killer* Bak der Bcl-2 Familie, welche nach Aktivierung Oligomerisieren und Poren bilden. Aktiviert werden sie unter anderem von den Proteinen Bid und Bim. Bid wird durch den extrinsischen Weg aktiviert. Die antiapoptotischen Proteine der Bcl-2 Familie Bcl-2, Bcl<sub>XL</sub> und Mcl-1 trennen sowohl Bid und Bim von Bax und Bak als auch Bax und Bak voneinander. Somit wirken sie einer Aktivierung und Porenbildung entgegen. Die Proteine *p53 upregulated modulator of apoptosis* (Puma), Noxa und BAD antagonisieren wiederum die antiapoptotischen Mitglieder der bcl-2-Familie Bcl-2, Bcl<sub>XL</sub> und Mcl-1 und wirken somit proapoptotisch. Zytosolisches Cytochrom c bindet an den *apoptotic protease activating factor 1* (APAF 1). APAF 1 ändert hierdurch seine Konformation und oligomerisiert zum Apoptosom. Caspase 9 wird rekrutiert und aktiviert.

Das Verhältnis von pro- zu antiapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie bestimmt die Apoptoseneigung einer Zelle. Wachstumsfaktor abhängige Signalwege wie der MAPK/ERK-, JAK/STAT-, AKT- und NFκB-Signalweg nehmen über ihre Zielgene wie z.B. Bcl-2 antiapoptotischen Einfluß (Lodish, 2001b; Movassagh and Foo, 2008; Oancea et al., 2004).

#### **1.3.5.2. Apoptose im multiplen Myelom**

In Myelomzellen werden im Vergleich zu normalen Plasmazellen vermehrt Bcl-2, Mcl-1, gleich viel Bcl<sub>XL</sub> und weniger Bax exprimiert (Spets et al., 2002). In Spätstadien des Multiplen Myeloms konnte häufiger eine erhöhte Bcl<sub>XL</sub>-Expression nachgewiesen werden und in vitro - Versuche zeigten eine erhöhte Chemotherapeutikaresistenz bei Bcl<sub>XL</sub>-Überexpression (Gauthier et al., 1996). Die herausragende Rolle von Mcl-1 in der Apoptoseresistenz von Myelomzellen konnte mittels einer Expressionshemmung durch

Antisense-Oligonukleotide nachgewiesen werden. Antisense-Oligonukleotide von Mcl-1 konnten im Gegensatz zu Antisense-Oligonukleotide von Bcl-2 oder Bcl<sub>XL</sub> alleine Apoptose in Myelomzelllinien auslösen. Expressionshemmung von Bcl-2 führte zu einer Sensibilisierung von Myelomzellen gegenüber Dexamethason (Derenne et al., 2002). Erste klinische Einsätze von Bcl-2 Antisense Oligonukleotiden in Kombination mit konventionellen Chemotherapeutika wie Vincristine, Adriamycin, und Dexamethason zeigen gute Ansprechraten (van de Donk et al., 2004). Ein weiterer Ansatz der Apoptoseinduktion in Myelomzellen besteht in der Verwendung von Histonedacetylase (HDAC) Inhibitoren. Diese führen im Multiplen Myelom zu einer verminderten Expression von Bcl-2, Bcl<sub>XL</sub> und Mcl-1 und zu einer vermehrten Expression von Bax (Khan et al., 2004).

#### **1.4. Fragestellung**

Nicht nur Knochenmarkstromazellen sondern auch Osteoklasten scheinen auf Myelomzellen eine antiapoptotische und proliferationssteigernde Wirkung zu haben. Abe et al. wies an Myelomzelllinien ein besseres Überleben der Myelomzellen durch Kokultur mit Osteoklasten als durch Kokultur mit Knochenmarkstromazellen nach (Abe et al., 2004). Unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Bargou am Universitätsklinikum Würzburg belegen denselben Effekt an primären Myelomzellen. Die bisherige Erforschung des Knochenmarkmikromilieus beim multiplen Myelom konzentrierte sich jedoch hauptsächlich auf die Unterstützung der Myelomzellen durch Knochenmarkstromazellen. Diese ist mehrfach belegt. Zunächst bestand das Ziel der Arbeit darin zu untersuchen ob Osteoklasten oder Knochenmark-Stromazellen, für den entscheidenden Überlebensvorteil im Knochenmarkmikromilieu verantwortlich sind.

Weiter war es Ziel der Arbeit herauszufinden, welche Signalwege den Überlebensvorteil der Myelomzellen durch Osteoklasten vermitteln. Als Ausgangspunkt wurde die Analyse von Signalwegen gewählt, deren Beitrag zum besseren Überleben von Myelomzellen in Kokultur mit Knochenmarkstromazellen bereits bekannt ist. Dies ermöglicht außerdem einen Vergleich zwischen der Signalwegsaktivierung in Myelomzellen durch Knochenmarkstromazellen und Osteoklasten. Die Abhängigkeit des osteoklastenvermittelten Überlebensvorteils von Zellkontakten (Abe et al., 2004) führte zu einer Untersuchung vor allem von Zellkontakt abhängigen Signalwegen.

Letztlich war es auch Ziel in Myelomzellen die Aktivierung von Signalwegen durch Kokultur mit Osteoklasten nachzuweisen, deren Bedeutung für den Überlebensvorteil durch Knochenmarkstromazellen nicht oder noch nicht nachgewiesen ist.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1. Reagenzien

Die Standardreagenzien wurden von der Firma Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Dtl. bezogen und sind nicht einzeln aufgeführt.

Beetle Luciferin	Biosynth AG, St. Gallen, Schweiz
CoA	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Iodoacetamid - Alkylating Reagent	
Ampholyte - ZOOM <sup>®</sup> Carrier Ampholytes pH 3-10	Invitrogen, Carlsbad, USA

#### 2.1.2. Zytokine

RANKL	Rekombinanter humaner Solubler RANK Ligand (rh sRANKL)	Immunotools, Friesoythe, Dtl.
M-CSF	Rekombinanter humaner Macrophagen Stimulierender Faktor (rh M-CSF)	
IL-6	Rekombinantes humanes Interleukin-6	
TNF- $\alpha$	Rekombinantes Humanes TNF- $\alpha$	PreproTech, Rocky Hill, USA

#### 2.1.3. Antikörper

Primärantikörper			
Phospho – Stat3	#9134	Kanninchen	Cell Signalling Technology, Beverly, USA
Phospho-p44/42 MAP Kinase ( Phospho-ERK)	#9101		
Phosphotyrosin p-Tyr 100 (PY 100)	#9411	Maus	
I $\kappa$ B- $\alpha$	sc 847	Kanninchen	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
BCL-2	sc 509	Maus	
MCL-1	sc 12756		
BAX	sc 20067		
Hsp 70	sc 24		
Phosphotyrosin p-Tyr (PY 99)	sc 7020		
IKK- $\alpha$	556532	Maus	BD, Franklin Lakes, USA
$\beta$ -Aktin	A 5316	Maus	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Sekundärantikörper			
Anti Rabbit IgG Horseradish Peroxidase linked	NA 934V	Esel	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK
Anti-mouse IgG Horseradish Peroxidase linked F(ab) <sub>2</sub>	NA9310V	Schaf	

#### 2.1.4. Plasmide

GFP-Plasmid	pEGFP-N3	Clontech Laboratories, Mountain View, USA
6xNFκB-Plasmid	6xNFκB luc	Claus Schneidereit, MDC, Berlin, Dtl.

#### 2.1.5. Färbungen

PI	Propidiumiodid 50 µg/ml
Annexin V-FITC	EuroBioScience, Friesoythe, Dtl.

#### 2.1.6. Zellkultur

RPMI	RPMI 1640	PAA, Pasching, Österreich
FCS	Foetal Bovine Serum Standard Quality	
DMEM	DMEM low Glucose(1g/l) + L-Glut	
α-MEM	MEM Alpha Modification + L-Glut	
L-Glutamin	L-Glutamin 200mM	
Natrium Pyruvat	Natrium Pyruvat Lösung	
Gentamicin	Gentamicin ( 50 mg/ml)	
Trypsin	Trypsin EDTA (1x) - Lösung	
PBS	Dulbecco's PBS (1x) ohne Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	
PBS mit Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	Dulbecco's PBS (1x) mit Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	
Ficoll	Pancoll human	PAN-Biotech, Aidenbach, Dtl.

#### 2.1.7. Kits

MTT	Cell Proliferation Kit (MTT)	Roche, Basel, Schweiz
CD-14	Human CD-14 Selection Kit 18058	StemCellTechnologies, Vancouver, Kanada
Luciferase	Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Madison, USA



TRAP	Acid Phosphatase, Leucocyte 3861A-KIT	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
MaxiPräp	Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Venlo, NL.
2-D-Gel	ZOOM IPGRunner ComboKit	Invitrogen, Carlsbad, USA

### 2.1.8. Polyacrylamidgele

Gradientengele	4-12%	TRIS-Glycin	Anamed, Groß-Bieberau, Dtl.
2-D- ZOOM® Gele	4-20%	TRIS-Glycin	Invitrogen, Carlsbad, USA
Selbstgegossen	12%	TRIS-Glycin	Acrylamid Roth, Karlsruhe, Dtl

	Trenngel 12% 10 ml	Sammelgel 5% 5 ml
Rothiphorese 30%	4 ml	0,83 ml
TRIS pH 8,8 1M	3,8 ml	-
TRIS pH 6,8 1M	-	0,58 ml
Aqua dest.	2,2 ml	3,5 ml
SDS 10 %	100 µl	50 µl
APS 10 %	100 µl	50 µl
TEMED 100%	5 µl	2,5 µl

Nach Mischen der Reagenzien wird das Trenngel gegossen und mit voll entsalztem (VE)-Wasser überschichtet. Ist das Gel auspolymerisiert wird das Wasser abgeschüttet und das frisch angesetzte Sammelgel aufgetragen. Der Kamm wird eingesetzt und die Polymerisation abgewartet.

### 2.1.9. Elektrophoresezubehör

Marker	Seebule Prestained Standart	Invitrogen, Carlsbad, USA
Membran	PVDF Western Blotting Membran	Roche, Basel, Schweiz
Blotting Papier		Hartenstein, Würzburg, Dtl.
Röntgenfilme		CEA, Strängnäs, Schweden

### 2.1.10. Puffer und Lösungen

Bradford-Proteinstandarts:

Standart:	0	1	2	3	4	5
mg BSA / ml RIPA-Lysepuffer:	0	0,625	1,25	2,5	5	10

Bradford - Reagenzien:

Reagent AS	1ml Reagent A + 20 µl Reagent S	DC Protein Assay, BioRad, Hercules, USA
Reagent B		

2-D-Lysepuffer	ZOOM® 2D Protein Solubilizer 2	Invitrogen, Carlsbad, USA
RIPA – Lysepuffer :	Reagenz	Finale Konzentration
	TBS	1x
	NP 40 = IgePal	1%
	Na-Desoxycholate	10%
	SDS	0,1%
	NaN <sub>3</sub>	0,004%
	Proteaseinhibitorcocktail (Roche)	1 Tabl./10 ml
	Phosphataseinhibitor	1 Tabl./10 ml
Laemmli 4x/2x/1x:	TRIS pH 6,8 1M	2ml
	Glycerol 86%	4 ml
	β-Mercaptoethanol	2 ml
	Bromphenolblau 2%	100 µl
	SDS	3,2 g
4x Laemmli:	Ad 10 ml Aqua dest. + Lösung im Wasserbad (50°C)	
2x Laemmli:	5ml 4x Laemmli	+ 5 ml Aqua dest.
1x Laemmli :	5ml 4x Laemmli	+15 ml Aqua dest.
TGS 10x, pH 8,3 :	TRIS	30 g
	Glycin	144g
	SDS	5 g
	Ad 1000 ml Aqua dest.	
Coomassie - Staining Solution	Comassie Blue	0,25g
	Ethanol	100 ml
	Aqua dest.	100 ml
	1 Stunde komplett lösen lassen	
	Essigsäure	25 ml
	Ad 1000 ml Aqua dest., dunkel lagern	
Coomassie- Destaining Solution	Ethanol	400 ml
	Essigsäure	100 ml
	Aqua dest.	500 ml
TBS 10x:	TRIS-Base	24,2 g
	NaCl	80 g
	Ad 1000ml Aqua dest.	
	pH 7,6 mit konz. HCl einstellen	
TBS-Tween:	TBS 1x	+ 0,1% Tween
BSA-Lösung 5%:	TBS-Tween	+ 5% BSA

Transferpuffer: TGS 1x + 20% Methanol

Ponceau- Staining Solution Ponceau 0,2 g  
Essigsäure 10 ml  
Ad 200 ml Aqua dest

ECL-Lösung:

1ml Lösung A A(200ml 0,1 M TRIS (pH 8,6) + 50 mg Luminol)

+ 0,3 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%

+ 100 µl Lösung B B(1,1 mg para-Hydroxycoumarinsäure /1 ml DMSO)

PPBT 1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 90,8 ml

1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 9,2 ml

Ad 1l Aqua dest.

Zugabe von Triton X 100 : 0,2%

Beetle luciferase assay Reagent (BLA) nach Hampf et al. (Hampf and Gossen, 2006)

2x BLA 150 mM Hepes

nicht komplett 8 mM MgSO<sub>4</sub>

40 mM DTT

200 µM EDTA

1.06 mM ATP

Lagern bei -20°C

1x BLA komplett 2xBLA nicht komplett 1:1 mit Aqua dest. verdünnen

+ Beetle Luciferin, Konzentration 270 µM

+ CoA, Konzentration 470 µM

### 2.1.11. Sonstige Materialien

Elektroporationsküvette: 25 x 4 mm

Peqlab, Erlangen, Dtl.

### 2.1.12. Geräte

Beschallung:	Sonoplus UW 2070	Bandelin, Berlin, Dtl.
Zentrifugen:	5415C 1-14 Multifuge 3 S-R Avanti J-25	Eppendorf, Hamburg, Dtl. Sigma-Aldrich, St. Louis, USA Heraeus, Hanau, Dtl. Beckmann-Coulter, Fullerton, USA
Netzgeräte:		
Hochspannung	EPS 3500	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Niedrigspannung	E802	Consort, Turnhout, Belgien
Schüttler:	Mini Rocker MR-1	Peqlab, Erlangen, Dtl.
Brutschrank:	BB 16	Heraeus, Hanau, Dtl.
Sterilarbeitsplatz:	HeraSafe HS 12/2	Heraeus, Hanau, Dtl.
FACS-Gerät:	CyFlow	Partec, Münster, Dtl.
ELISA-Reader	Sunrise-Basic	Tecan, Männedorf, Schweiz
Elektrophorese:		
Kammer + Gelträger:	Mini Protean System	BioRad, Hercules, USA
Gelkammer : (auch 2-D-Gel)	ZOOM IPG Runner - Mini-Cell	Invitrogen, Carlsbad, USA
Blotting Kammer:		Peqlab, Erlangen, Dtl.
Röntgenentwickler:	Kompakt RTX	Blach-Röntgen, Assamstadt, Dtl.
Photometer:		
DNA-Messung	Biophotometer	Eppendorf, Hamburg, Dtl.
Luciferaseassay	MicroLumat	Berthold Technologie, Bad Wildbad, Dtl.
Fluoreszenzmikroskop:	Eclipse TE 2000-U	Nikon, Tokyo, Japan
Elektroporator:	Cellject Duo	Thermo Electron, Waltham, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Die üblichen Einmalprodukte folgender Firmen wurden benutzt:

NUNC, Roskilde, Dänemark.	Greiner Bio – One, Frickenhausen, Dtl.
Corning, Corning, USA.	BD, Franklin Lakes, USA.
Sarsted, Nümbrecht, Dtl.	Starlab, Ahrensburg, Dtl.

Folgende Zellen wurden benutzt:

Name:	Zellart:	Herkunft:
INA-6	Myelomzelllinie	Dr. Manik Chatterjee, Med. Klinik II, Uni Würzburg
MM.1S	Myelomzelllinie	
HS-5	Stromazelllinie	Dr. Martina Seiffert, DKFZ Heidelberg
Primäres Stroma	Primäre Knochenmarkstromazellen	Kultiviert aus diagnostischen Knochenmarkpunktionen, Med. Klinik II, Uni Würzburg
Osteoklasten	Fusionszellen differenziert aus PBMC's	Generiert aus PBMC's der Transfusionsmedizin, Uni Würzburg

Komplette Nährmedien der verschiedenen Zellen:

	INA-6	MM.1S	HS-5	Primäres Stroma	Osteoklasten
Medium	RPMI	RPMI	DMEM	DMEM	$\alpha$ -MEM
FCS	10%	10%	10%	20%	10%
Na-Pyruvat 1mM L-Glutamin 2mM	+	+	+	+	+
Zytokine	IL-6 2ng/ml	-	-	-	RANKL 50ng/ml M-CSF 25ng/ml

Zellkultur:

#### INA-6

Hierbei handelt es sich um eine nicht adhärenente Myelomzelllinie. Ihr Wachstum ist abhängig vom Zytokin IL-6 (Burger et al., 2001). Jeden zweiten Tag wurden die Zellen resuspendiert und nach Zelldichte im Verhältnis 1:2 bis 1:6 gesplittet.

#### MM.1S

Hierbei handelt es sich um eine teiladhärenente Myelomzelllinie. Die Zellen wurden jeden 2.Tag mit einem Zellschaber vom Boden gelöst, resuspendiert und nach Zelldichte im Verhältnis 1:2 bis 1:6 gesplittet.

## HS-5

Hierbei handelt es sich um eine Stromazelllinie, die stark an der Zellkulturflasche adhärert und einen Monolayer ausbildet. Sie wurden jeden zweiten Tag gesplittet. Nach Abnahme des Mediums werden die Zellen 2x mit PBS gewaschen um Mediumsreste zu entfernen. Anschließend werden die Zellen 15 min. mit Trypsin/EDTA (1x)-Lösung inkubiert. Die Zellen lösen sich hierdurch ab. Das zelltoxische Trypsin wird mit Medium neutralisiert. Nach Resuspension werden die Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:6 gesplittet.

## Primäres Stroma

Hierbei handelt es sich um primäre Knochenmarkstromazellen aus diagnostischen Knochenmarkspunktionen. Zur Aufreinigung laufen die Knochenmarkspunktate durch ein Zellsieb. Anschließend wird das Punktat ficollisiert. Die Interphase wird abgenommen und mit PBS gewaschen. Hierauf werden die Zellen je nach Menge in ein oder zwei 6-Wellen mit dem entsprechenden Medium ausgesät. Nach einem variablen Zeitraum von drei bis zehn Tagen setzen sich Zellen ab und zeigen die stromazelltypischen Zellausläufer. Ab jetzt wird das Medium alle zwei Tage gewechselt. Da es sich bei primärem Stroma um primäre Zellen handelt lassen sich die Zellen nur ein bis zwei Monate kultivieren.

## Osteoklasten

Die Generierung der Osteoklasten ist im Ergebnisteil genau erläutert. Ausdifferenzierte Osteoklasten benötigen jeden dritten Tag ein neues Medium. Es handelt sich um primäre Zellen, die sich nur ein bis zwei Monate kultivieren lassen und dann absterben.

## 2.2.2. Zellseparation

### 2.2.2.1. Dichtegradientenzentrifugation

Die zu separierende Probe ( 7,5ml PBMC/Knochenmarkspunktat) wird in einem 50 ml Röhrchen 1:1 mit PBS gemischt. In einem zweiten Röhrchen werden 15 ml Ficoll vorgelegt. Vorsichtig wird das PBS-Probengemisch mit einer 5 ml Pipette auf den vorgelegten Ficoll aufgeschichtet. Das Röhrchen wird nun mit minimaler Beschleunigung und Bremse für 15 min bei 3400 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation zeigen sich mehrere Schichten im Röhrchen (siehe Abb.7). Ganz unten sammeln sich rot die Erythrozyten, hierauf folgt eine durchsichtig visköse Phase. Auf dieser liegt eine schmale zellreiche, sogenannte Interphase. Diese wird nach oben durch eine gelbliche, nicht visköse Phase begrenzt. Mit einer 5 ml Pipette wird der Zellteppich der Interphase vorsichtig eingesaugt. Die Zellen werden in 40 ml PBS resuspendiert und bei 2000 rpm 5 min abzentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes können die Zellen in einem beliebigen Medium aufgenommen werden.



Mit

Abb. 7: Röhrchen nach Dichtegradientenzentrifugation; typische Schichtung, weiße Schicht = Interphase.

### 2.2.2.2. CD-14-Aufreinigung

Die CD-14-Aufreinigung erfolgte mit dem “Human CD-14 Selection Kit“ von StemCell-Technologies nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip basiert auf einer positiven Markierung des CD-14-Antigens mittels eines bispezifischen Antikörpers. Der bispezifische Antikörper bindet außerdem magnetische Nanopartikel. Wird eine Zellsuspension mit markierten CD-14-positiven Zellen in einem 1,5 ml Reaktionsröhrchen der Firma Eppendorf [Hamburg/Dtl] (Eppi) in einem Magneten positioniert können die restlichen Zellen abgeschüttet werden. Die CD-14-positiven Zellen adhäreren an der Wand des Reaktionsgefäßes. Nach Entfernen des Eppis aus dem Magneten können sie von der Wand ab gespült werden.

### 2.2.3. Färbungen

#### 2.2.3.1. TRAP-Färbung

Die TRAP-Färbung wurde mit dem "Acid Phosphatase, Leucocyte-Kit" der Firma Sigma-Aldrich nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Ergebnis der Färbung wurde am Mikroskop im Phasenkontrast begutachtet.

#### 2.2.3.2. Hoechstfärbung

Der Farbstoff Hoechst 33342 wurde in der Konzentration 5 µg/ml in das Medium eines 6-wells gegeben. Nach einer halben Stunde wurden die Zellen am Fluoreszenzmikroskop auf Fluoreszenz im Blaulicht untersucht.

#### 2.2.4. MTT-Assay

Lebende Zellen nehmen das gelbe Tetrazoliumsalz MTT auf und setzen es mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen zu einem stark blauen, wasserunlöslichen Formazanfarbstoff um (siehe Abb.8). Für die photometrische Messung (570-590 nm) werden die Zellen lysiert, um den Farbstoff freizusetzen. Die Intensität der Blaufärbung korreliert mit der metabolischen Aktivität der Zellen, bei einer Zellart (nach Erstellung einer Zellstandardkurve) auch mit der Zellzahl (Mosmann, 1983).

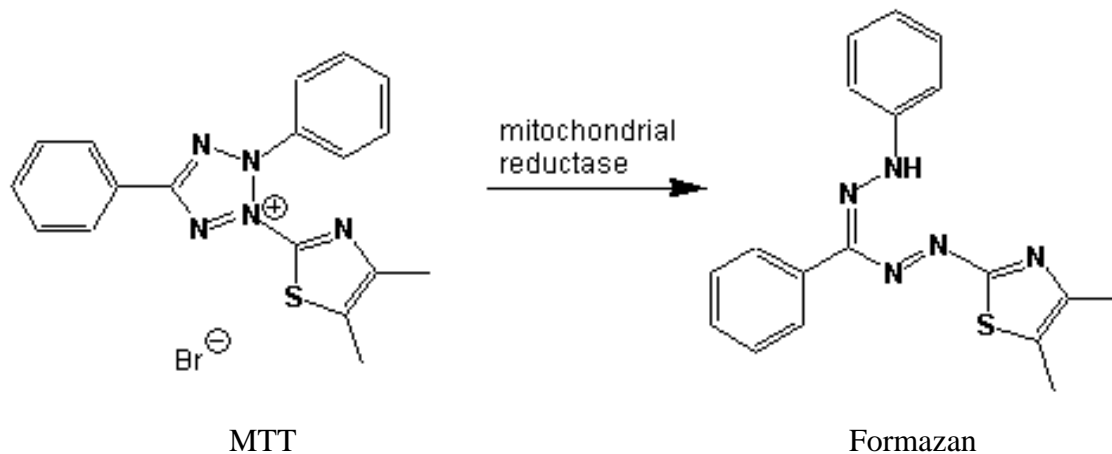


Abb. 8: Schematische Darstellung der Reaktion von MTT zu Formazan (wikipedia).

Es wurde das MTT-Kit der Firma Roche verwendet. Zellen werden in 100 µl Medium im 96-Well Format ausgesät und unter verschiedenen Bedingungen drei Tage kultiviert. Es werden 10 µl MTT-labeling Reagent dazu gegeben. Nach vier bis acht Stunden Inkubation im Brutschrank werden 100µl *solubilisation solution* hinzugegeben. Nach weiteren zwölf Stunden kann der Gehalt an Formazan im Elisa-Photometer bei 550-600 nm bestimmt werden.



### 2.2.5. FACS-Analyse

Das Prinzip der Durchflußzytometrie wurde 1968 an der Universität Münster von Ghöde (wikipedia.org, 2008) entdeckt und schon bald mit der Möglichkeit der Zellseparation kombiniert. Anfang der 70er Jahre wurde das erste Durchflußzytometer mit der Möglichkeit der Zellseparation von Becton-Dickson in America entwickelt (Herzenberg et al., 2002). Der Begriff des *fluorescence activated cell sorting* (FACS) setzte sich als Begriff für Durchflußzytometer mit und ohne Zellseparator durch.

Das Prinzip der Durchflußzytometrie beruht auf der Lichtstreuung, Absorption und Fluoreszenz. Die Zellen werden hierzu mit einer Düse so vereinzelt, dass Sie einzeln in einem Flüssigkeitsstrom einen Laserstrahl passieren. Ein Photosensor ist in Verlängerung des Laserstrahls angebracht und misst die ankommende Lichtmenge (forward scatter). Die Absorption lässt Rückschlüsse auf die Zellgröße zu. Ein weiterer Sensor steht in einem bestimmten Winkel zum Laserstrahl und misst die Streustrahlung. Diese ist von der Granularität der Zellen abhängig. Granula brechen das Licht und lenken es z.B. zu dem seitlichen Photosensor ab.

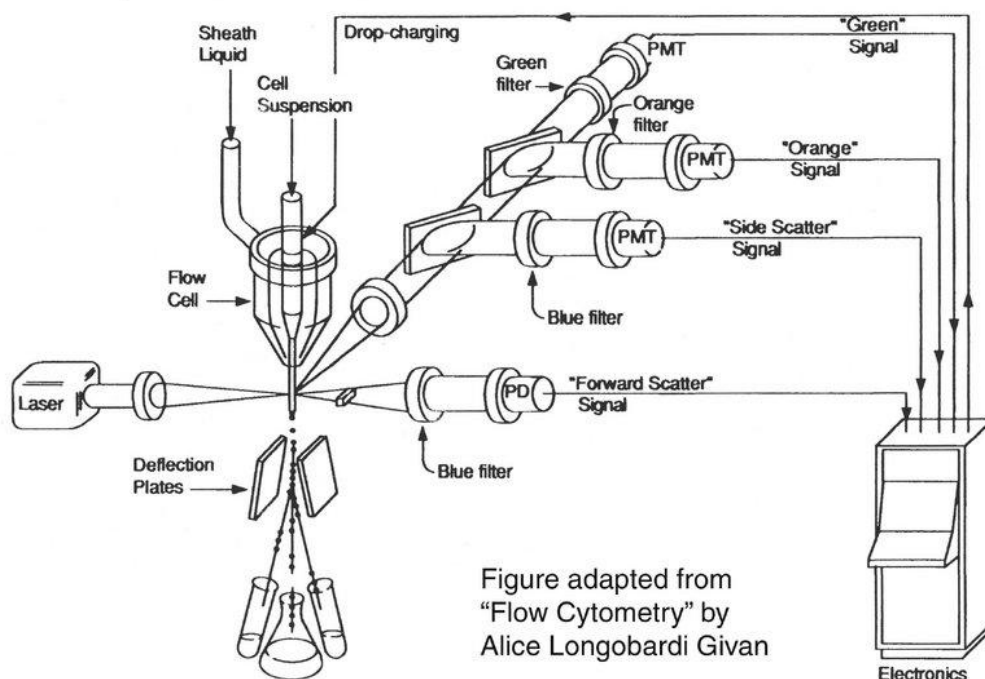


Abb. 9: Schematische Darstellung eines *fluorescence activated cell sorters* (Shetty, 2005).

Außerdem werden mittels Linsen mehrere Farbspektren separat auf verschiedene Photosensoren abgelenkt (in Abb.9 Orange und Green). Hiermit lässt sich die

Fluoreszenz in definierten Farbbereichen messen. Zellen müssen für solche Messungen mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Antikörper-Farbstoffkonjugaten angefärbt werden.

- Zellzählung

Das FACS-Gerät wurde zur Ermittlung der Zellzahl, z.B. vor dem Aussäen von Zellen, benutzt. Hierzu wurden je 10µl und 50µl Zellsuspension mit PBS auf 1 ml verdünnt und im FACS-Gerät gemessen. Die ermittelten Zellzahlen sind entsprechend der Verdünnung mit dem Faktor 20 oder 100 zu multiplizieren. Es wurde der Mittelwert aus beiden Werten als ungefähre Zellzahl angenommen.

- GFP-Färbung

Zur Feststellung der Transfektionseffizienz, z.B. einer Elektroporation, bietet sich eine GFP-Kontrolle an. Es wird in diesem Falle an Stelle des Zielplasmides ein Plasmid welches das Grün fluoreszierende Protein (GFP) kodiert in die Zellen transfiziert. In der FACS-Analyse leuchten die Zellen, welche das Plasmid aufgenommen haben, grün auf. So lässt sich der Anteil der transfizierten Zellen bestimmen.

- Annexin V- Fluoresceinisothiocyanate (FITC) / Propidiumiodid (PI)-Färbung

Mit dieser Färbung kann der Anteil der lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen dargestellt werden.

Die Apoptose geht mit einem Verlust der Asymmetrie der Zellmembran einher. Hierdurch können Makrophagen die apoptotischen Zelle erkennen. Phosphatidylserin ist normalerweise nur in der Innenschicht der Zellmembran vorhanden. Während der Apoptose ist es auch in der Außenschicht vorhanden und für Färbungen von außen zugänglich. Das Protein Annexin V bindet spezifisch an Phosphatidylserin. Bei einer Annexinfärbung ist das Protein an den Fluoreszenzfarbstoff Fluoresceinisothiocyanate (FITC) gekoppelt (Brumatti et al., 2008).

Zellmembranen sind für den Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid undurchlässig. Nekrotische Zellen oder Zellen in der späten Phase der Apoptose weisen Löcher in der Zellmembran auf. Der Farbstoff PI dringt in diese Zellen ein und färbt sie.

Eingesetzt werden 50-100µl mit etwa 20000 Zellen Inhalt. Diese werden im FACS-Röhrchen mit 3 ml PBS pelletiert. Nach Abkippen des Überstandes wird eine Färbelösung, die 5µl PI, 2,5µl Annexin V-FITC und 92,5 µl PBS mit  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  enthält,

zugegeben. Das FACS-Röhrchen wird gevortext und 15 min im Kühlschrank inkubiert. Vor der FACS-Analyse wird das Volumen im Röhrchen mit PBS auf 1 ml aufgefüllt. Die Fluoreszenzen der Zellen werden mittels des FACS-Gerätes gemessen und in einem Scatterplot die Fluoreszenzen Annexin V-FITC und PI gegeneinander aufgetragen. Es entstehen mehrere Wolken, denen ein Quadranten zugeordnet werden kann. Die lebenden Zellen befinden sich im Annexin V-FITC/PI negativen Bereich Quadrant Q3. Im Überlebensassay beobachtet man den Anteil der lebenden Annexin V-FITC/PI-negativen Zellen.

### **2.2.6. Transformation und Hochzüchten der Bakterien**

Ziel der Transformation ist es ein Plasmid in ein Bakterium einzubringen, um es von diesen vervielfältigen zu lassen.

8 µl kompetente E.coli der Firma New England Biolabs wurden auf Eis mit 0,5µl des Zielplasmides 1000 µg/ml 30 min inkubiert. Es folgten 30 Sekunden Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad. Anschließend wurden 100 µl *super optimal broth* (SOB)-Medium zugegeben und die Lösung auf Eis gekühlt. Es folgt eine einstündige Inkubation bei 37°C im Schüttler. Die Zellen werden auf einer vorgewärmten Agarplatte mit Ampicillin 100 µg/ml ausplattiert. Ampicillinresistenz ist ein Selektionsgen des Plasmides. Es wird ein Klon gepickt und in einem Reagenzglas 2 ml *lysogeny broth* (LB) + Ampicillin (amp.) Medium angeimpft. Nach 8 h Schütteln bei 37°C sind die Bakterien hochgewachsen und dienen als Starterkultur. Hiermit werden 100 ml LB Ampicillin-Medium in einem Erlenmeyerkolben angeimpft. Diese werden im Schüttler bei 37°C über Nacht inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation im Röhrchen bei 5000g für 15 min, der Überstand wird abgegossen.

### **2.2.7. Maxi-Präp**

Zur Aufreinigung eines Plasmides aus einer E.coli-Kultur wurde das "Plasmid Maxi Kit" der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Konzentration des Plasmides wurde am Photometer bestimmt. Aus 100 ml E.coli-Kultur konnten im Durchschnitt ~ 600 µg Plasmid-DNA gewonnen werden.

### **2.2.8. Elektroporation**

Die Elektroporation ist eine Methode, mit der DNA in Zellen eingebracht wird. Ein starkes elektrisches Feld führt zur Bildung von Poren in der Zellmembran und ermöglicht die Aufnahme von DNA aus dem Medium.

Die Zellen müssen sich zum Zeitpunkt der Elektroporation im exponentiellen Wachstum befinden. Die Zellen werden in PBS gewaschen und in RPMI-Medium ohne Zusätze aufgenommen.  $2 \times 10^6$  Zellen in 0,7 ml Medium werden mit 10  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA gemischt. Bei 280 Volt/1425  $\mu\text{F}$  werden die Zellen in einer 0,7 ml-Elektroporationsküvette elektroporiert. Anschließend werden die Zellen in vorgewärmtes RPMI-Medium mit IL-6, Natriumpyruvat und l-Glutamin, aber ohne Gentamycin, überführt. Die Zellen konnten sich 12 h lang vom Stress der Elektroporation erholen.

Für den Luciferaseassay wurden 10 Elektroporationen in einer 50 ml Kulturflasche gepoolt.

### **2.2.9. Luciferaseassay**

Der Luciferaseassay wurde auf zwei verschiedenen Arten durchgeführt. Zum einen wurde er mit dem Dual-Luciferase Reporter Assay System von Promega nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden nur die Komponenten die zur Firefly-Lumineszenz nötig sind eingesetzt.

Zum anderen wurde der Luciferaseassay nach einem nicht kommerziellen Protokoll von Hampf et al. durchgeführt (Hampf and Gossen, 2006).

Die zu untersuchenden Zellen wurden geerntet, in PBS gewaschen und in ein 1,5 ml Eppi überführt. Zur Lyse wurden 50  $\mu\text{l}$  PPBT-Lysepuffer für Zellen eines 6-Wells verwendet. Die Lyse erfolgte 30 min auf Eis unter gelegentlichem Durchmischen. Anschließend wurde die Probe bei 12000 g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppi überführt. In einer weißen Mikrotiterplatte wurden in 2-Wells 20 $\mu\text{l}$  eines Lysats hineinpipettiert. Die Lumineszenzreaktion wurde durch Zugabe von 50  $\mu\text{l}$  einer kompletten BLA-Lösung eingeleitet. Die Zugabe erfolgte mittels eines Mikroplattenluminometers mit Injektionssystem. Die Lumineszenz wurde anschließend über 10 sec. gemessen.

### **2.2.10. Western Blot**

Ziel des Western Blots ist es ein Protein eindeutig zu erkennen und seine Menge festzustellen. Durch eine Auftrennung nach Proteingröße mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und eine spezifische Markierung mittels eines Primärantikörpers lässt sich ein Protein spezifisch identifizieren. Ein Sekundärantikörper dient der Sichtbarmachung des Primärantikörpers durch eine von ihm vermittelte Lichtreaktion.

#### **2.2.10.1. RIPA-Lyse**

Um das Proteom einer Zelle in einem bestimmten Zustand zu untersuchen ist es nötig die Zelle zu lysieren.

Die Zellen werden geerntet (Trypsinieren/Abschaben/..) und in einem Röhrchen bei 2000 g abzentrifugiert. Die Zellen werden in eiskaltem PBS resuspendiert und wiederum abzentrifugiert. Hierauf werden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen, in ein 1,5 ml Eppi überführt und wiederum abzentrifugiert. Das Pellet wird trocken gesaugt und mit 100-150 µl RIPA-Puffer gemischt. Anschließend inkubieren die Zellen 30 min. unter gelegentlichem Durchmischen. Nach Zentrifugation bei 4°C und 12000 g wird der Überstand in ein neues Eppi überführt. Anschließend wird das Lysat bei weniger als 4°C gelagert.

#### **2.2.10.2. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Zur Auftrennung von Proteingemischen wird standartmäßig die Natriumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) verwendet. Ziel ist eine Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe und damit nach ihrem Molekulargewicht. Die Trennung erfolgt in einer Gelmatrix, die aus quervernetzten Polymeren besteht. Der Vernetzungsgrad bestimmt die Größe der Poren und damit den Widerstand, der großen Proteinen entgegengesetzt wird. Dies bestimmt auch welches Proteinspektrum am Besten aufgetrennt wird. Bereits seit den 60er Jahren wird Polyacrylamid hierfür verwendet, welches in verschiedenen Konzentrationen unterschiedliche Vernetzungsgrade ausbildet (Davis and L., 1959).

Während der Elektrophorese fließt mittels des ionischen Laufpuffers Tris/Glycin ein elektrischer Strom zwischen zwei Elektroden. Die Spannung bewegt die Proteine gemäß ihrer Ladung. Da die Ladung der Proteine unterschiedlich und nicht von der Größe

abhängig ist muss sie für ein einheitliches Wanderungsverhalten der Proteine maskiert werden. Dies geschieht mittels des Zwitterions SDS, welches sich an die hydrophoben Bereiche des Proteins anlagert. Außerdem wird die Sekundärstruktur des Proteins aufgebrochen und das Protein entfaltet. Dies ist für die korrekte Laufgeschwindigkeit durch die Poren des Gels nötig (Laemmli, 1970).

Um später scharfe Banden im SDS-PAGE zu erhalten müssen die Proteine möglichst zur selben Zeit das Trenngel erreichen. Hierfür wird dem Trenngel mit pH 8,8 ein 5% Sammelgel mit pH 6,8 vorgeschaltet. Hier sammeln sich die Proteine am Übergang zum Trenngel.

Es wurden sowohl 4-12% - Gradientengele von Anamed als auch selbst gegossene 12% - Gele verwendet.

Um eine Auftragung gleicher Proteinmengen auf das Elektrophoresegel zu gewährleisten ist eine Proteinbestimmung nötig.

#### **2.2.10.2.1. Bradford Proteinbestimmung**

Es werden immer Doppelbestimmungen in klaren Mikrotiterplatten durchgeführt. 5 µl/well der Standards (0-5 ansteigend) werden in der ersten Reihe aufgetragen. Es folgen jeweils 5 µl/well der zu untersuchenden Proben. Es werden 25 µl/well Reagent AS zugegeben. Es folgen 200 µl Reagent B. Nach 15 min. Inkubation wird am ELISA-Reader die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wird anhand einer Eichkurve ermittelt.

Anschließend wird, die Menge jeder Probe die 40 µg Protein enthält mit derselben Menge Laemmli bei 95°C 5 min erhitzt. Hierauf wird die Probe herunter zentrifugiert.

#### **2.2.10.2.2. Auftragung und Elektrophorese**

Als Laufpuffer wurde TGS 1x verwendet. Als Marker wurde Seeblye prestained Standard verwendet. Die Proben wurden in die Taschen des Gels aufgetragen. Leere Taschen wurden mit 1x Laemmli zur Verhinderung eines Smile-Effektes aufgefüllt. Die Einstellungen des Netzgerätes waren 120 Volt, Milliampere (mA) maximal. Wenn die Bromphenolblau - Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte wurde die Elektrophorese beendet.

#### **2.2.10.2.3. Semi-Dry Blot**

Beim Blotten werden die Proteine mittels eines senkrecht zum Gel angelegten elektrischen Stromes auf eine darunter liegende Membran transferiert. Diese bindet die Proteine.

Als Membran wurde eine PVDF-Membran verwendet. Diese wird mit Methanol getränkt, um sie für die Proteinaufnahme bereit zu machen. Die Membran wird in der Blotkammer blasenfrei auf drei in Transferpuffer getränkten Blotting Paper aufgelegt. Das Gel wird blasenfrei auf die Membran transferiert. Es werden drei weitere, in Transferpuffer getränkte, Blotting Paper aufgelegt. Die Blotkammer wird komplett zusammengebaut und ein Strom von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  Membran für 2 h angelegt.

Es folgt eine Kontrolle, ob die Proteine korrekt auf die Membran transferiert wurden. Hierzu wird das Gel Coomassie gefärbt. Ist noch viel Protein im Gel vorhanden, so ist die Effizienz des Blottens gering gewesen. Die PVDF-Membran wird Ponceau gefärbt. Dies weist die Proteine auf der Membran nach.

#### **2.2.10.2.4. Färbungen**

- Coomassiefärbung:

Das Gel wird in Coomassie Staining Solution für 5 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Nachdem diese abgegossen wurde wird das Gel mit Destaining Solution 5 min entfärbt. Die Proteinbanden erscheinen blau.

- Ponceaufärbung

Die Membran wird in Ponceau Staining Solution 5 min auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend folgt eine Entfärbung mit VE-Wasser auf dem Schüttler.

Die Proteinbanden erscheinen rot.

#### **2.2.10.2.5. Blocken**

Damit Antikörper nicht unspezifisch an die Membran gebunden werden müssen alle Stellen die noch kein Protein gebunden haben mit unspezifischen Proteinen abgesättigt werden.

Die Membran wird 3x 10 min. in TBS-Tween auf dem Schüttler gewaschen (Standard - Waschprotokoll). Es folgt eine einstündige Inkubation der Membran mit einer 5% BSA-Lösung auf dem Schüttler. Anschließend wird die Membran wiederum gewaschen.

#### **2.2.10.2.6. Antikörperinkubation und Detektion**

Die Antikörper wurden in der Verdünnung 1:1000 in 5% BSA-Lösung angesetzt. Die Membran wurde bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler mit dem Primärantikörper inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wird die Membran mit dem passenden Sekundärantikörper für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Ist der Primärantikörper aus der Maus so wird die Membran in einer 1:10000 Anti-Maus - Lösung inkubiert. Bei Kaninchenantikörpern folgt eine Inkubation mit Anti-Kaninchenantikörpern in der Verdünnung 1:5000. Hierauf werden die nicht gebundenen Antikörper mit TBS-Tween weggewaschen.

Die Antikörperdetektion beruht auf einer lichtemittierenden Reaktion am Sekundärantikörper. Dieser ist mit dem Enzym Horseradish Peroxidase verbunden. Dieses Enzym katalysiert bei Zugabe von ECL-Lösung die Lichtreaktion.

Die Membran wird mit ECL-Lösung benetzt und in eine Photo-Kassette gelegt. In der Dunkelkammer werden Röntgenfilme verschieden lange belichtet und im Röntgenentwickler entwickelt. Es erscheint eine oder mehrere schwarze Banden, wenn der Antikörper ein Protein spezifisch gebunden hat. Ziel ist es die Belichtungszeit zu finden in der möglichst deutlich Unterschiede in der Bandenintensität verschiedener Proben zu erkennen sind.

#### **2.2.11. 2-D-Gel**

Es wurde das Zoom IPGRunner System von Invitrogen, Carlsbad, USA benutzt. Die Erstellung eines 2-D-Gels mittels Zoom IPGRunner System lässt sich in fünf Abschnitte unterteilen.

1. Voraussetzung ist die Erstellung eines geeigneten Lysats
2. Dann wird ein Gelstreifen (ZOOM Strip) mit immobilisierten pH-Gradienten rehydriert. Dies geschieht durch eine Rehydratisierungslösung, die das Lysat enthält.
3. Anschließend werden die Proteine im rehydrierten Streifen isoelektrisch fokussiert. Sie verteilen sich nach ihrem Isoelektrischen Punkt (IEF).
4. Die Streifen werden mit Lämmli äquilibriert, um die Proteine für eine SDS-PAGE vorzubereiten
5. Der Gelstreifen wird auf ein Polyacrylamidgel geladen
6. Die Polyacrylamidgelelektrophorese wird durchgeführt



### 2.2.11.1. Erstellung der Lysate

Herstellung von 950 µl Lysepuffer:

1X Zoom 2D Protein Solubilizer 2	909 µl
1 M Tris Base	3 µl
100X Protease Inhibitor Cocktail (Protease Inhibitor Cocktail Tablet Roche 1836170 in 500µl 1.1X Zoom 2D Protein Solubilizer 2)	10 µl
2 M DTT	10 µl
<u>Dejonisiertes Wasser</u>	<u>18 µl</u>
Lysepuffer	950 µl

Der Lysepuffer wurde stets frisch angesetzt, gemischt und auf Eis gekühlt.

Herstellung der Lysate:

		Trockengewicht	+ Lysepuffer
Erste Lysate:	INA-6 ohne Co.	67 mg	848 µl
	INA-6 auf HS-5	79 mg	1 ml
	INA-6 auf OC's	92 mg	1,164 ml
Zweite Lysate:	INA-6 ohne Co.	30 mg	579 µl
	INA-6 auf primärem Stroma	30 mg	579 µl
	INA-6 auf OC's	30 mg	579 µl

Die Proben wurden gemischt und anschließend abwechselnd 10x 5 sek. beschallt.

Zwischen den Beschallungen wurden die Proben auf Eis gekühlt.

- Anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur 15 min im Drehschüttler inkubiert.
- Hierauf wurden die Proben mit 5 µl Alkylating Reagent ( Iodoacetamid)/950µl Lysat alkalisiert und 30 min. bei RT auf dem Drehschüttler inkubiert.
- 10 µl 2M DTT/ 950µl Lysat wurden zur Neutralisation überschüssigen Alkylating Reagents zugegeben. Die Proben wurden hierauf bei 4°C 20 min bei 16000 g zentrifugiert.
- Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Eppi überführt. Die Proteinkonzentration des Lysats sollte nach Protokoll nun 8-10 mg/ml betragen.

### 2.2.11.2. Rehydratisierung

Es wurden Rehydratisierungslösungen mit verschiedenen Mengen Lysat ausprobiert.

Die ersten 2-D-Gele wurden mit 12 µl Lysat/Streifen angefertigt. Hierauf wurde die

Menge an geladenem Protein bei allen weiteren Gelen auf 24 µl Lysat/Streifen erhöht.

Eine weitere Steigerung der Proteinladung auf 40 µl Lysat/Streifen war aufgrund der höheren Ladungseinbringung nicht möglich.

Folgende Reagenzien sind für die Rehydratisierungslösung eines Streifens erforderlich:

1.1X ZOOM 2D Protein Solubilizer 2	115 µl
Lysat	24 µl (12µl)
2 M DTT	0,7 µl
ZOOM Carrier Ampholyte	0,8 µl
Bromphenol Blau	Spur

Die Rehydratisierungslösung wurde blasenfrei in die Ladevertiefung der "IPGRunner" Kassette pipettiert.

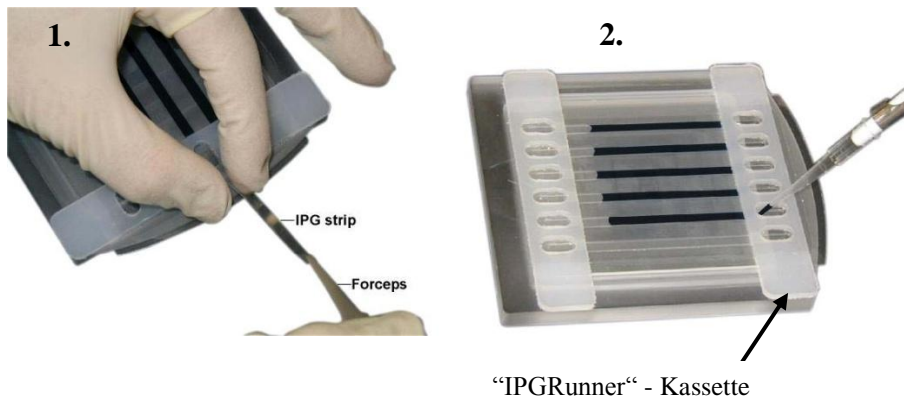


Abb. 10 : Photographie 1. Pipettieren des Lysats in die "IPGRunner"-Kassette; 2. Einführen der Streifen zur Rehydratisierung und anschließenden isoelektrischen Fokussierung in die Kassette (Invitrogen, 2004).

Die ZOOM Streifen pH 7-10 nicht linear wurden nach Anleitung (Invitrogen, 2004) in der richtigen Orientierung in die "ZOOM IPGRunner"-Kassette eingeführt. Anschließend wurden die Öffnungen zu beiden Seiten der Kassette mit Klebeband der Firma Invitrogen abgeklebt um Verdunstung zu vermeiden. Die Streifen wurden 1 h rehydriert.

### 2.2.11.3 Isoelektrische Fokussierung und Äquilibration

Diese wird in der "ZOOM IPGRunner Mini-Cell"-Kammer durchgeführt. Im Gegensatz zur normalen Elektrophorese wird hier jedoch das "ZOOM IPGRunner Core" verwendet.

Nach der Rehydratation wurden die beidseitigen Ladevorrichtungen mitsamt den Klebebändern von der Kassette entfernt. Auf der Kassette wurden zwei Klebestreifen frei auf die jeweils ein Elektrodenpapier der Firma Invitrogen geklebt wurde. Mit 600 µl

deionisierten Wasser werden die Elektrodenpapiere getränkt. Hierdurch wird eine leitende Verbindung zwischen dem Streifen und der Papieroberfläche geschaffen. Von jeder Seite wird nun eine Kassette auf ebener Unterlage gegen das "IPGRunner Core" gedrückt. Die Elektrodenpapiere müssen auf Höhe der Elektroden liegen. In dieser Position wird der "IPGRunner Core" mit den beiden Kassetten in die „Mini Cell“-Kammer überführt. In die äußere Kammer wurde deionisiertes Wasser als Kühlflüssigkeit eingefüllt und die Kammer vollständig zusammengebaut. Die Isoelektrische Fokussierung erfolgte nach folgendem Protokoll:

200 Volt	20 min
450 Volt	15 min
750 Volt	15 min
2000 Volt	30 min

Als Zeichen der funktionierenden Fokussierung wird das Bromphenolblau zunehmend aus dem Streifen in das untere Elektrodenpapier gezogen.

Zur Äquilibrierung wurden die Streifen nach Abschluss der Fokussierung aus den Kassetten entfernt und in Inkubationsgefäße überführt. Hierin wurden sie mit 1 x Lämmli bedeckt und eine Stunde geschüttelt.

#### **2.2.11.4. PAGE**

Bei den ersten 2-D-Gelen wurden die Streifen auf selbstgegossene 12% Polyacrylamidgele aufgesetzt. Alle Weiteren wurden auf 4-20% TRIS-Glycin ZOOM Gele der Firma Invitrogen aufgesetzt. Die Proteine sollen entlang der X-Achse während der Elektrophorese weiterhin sauber nach IEF getrennt bleiben. Deshalb ist es nötig eine direkte Verbindung zwischen dem Gelstreifen und dem Polyacrylamidgel zu schaffen. Hierzu wurde 0,5% Agaroselösung mit 5% Lämmli in der Mikrowelle erhitzt und auf das Gel aufgeschichtet. Der Streifen wurde daraufhin unverzüglich mittels einer Pinzette in die noch flüssige Lösung eingebracht.

Die Elektrophorese in der zweiten Dimension erfolgte genauso wie bei eindimensionalen Gelen. 2-D-Gele lassen sich genauso wie 1-D-Gele in Comassie färben. Zur weiteren Analyse wurden die Proteine auf PVDF-Membranen geblottet. Dies erfolgte ebenfalls nach bekanntem Verfahren.

### **3. Ergebnisteil**

#### **3.1. Generierung der Osteoklasten**

Nach der Entdeckung von RANKL als Aktivator der Differenzierung von mononukleären Zellen zu Osteoklasten (Yasuda et al., 1998) 1998 wurden neue In-vitro-Systeme der Osteoklastogenese entwickelt. Die Kombination aus RANKL und M-CSF reicht zur Differenzierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes zu Osteoklasten. Verantwortlich hierfür sind die CD-14-positiven Monozyten (Quinn et al., 1998).

##### **3.1.1. Generierungsverfahren**

Eine Aufreinigung der CD-14-positiven Monozyten ist also der erste Schritt. Als Grundlage zur Generierung der Osteoklasten wurde ein 7,5 ml fassender PBMC-Zapfen (BuffyCoat) der Transfusionsmedizin der Universität Würzburg verwendet. Mittels Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll) wurden die mononukleären Zellen separiert. Anfangs wurden die Zellen mit Hilfe des "Human CD14 Selection Kit EasySep" von StemCell Technologies auf CD-14-positive Zellen aufgereinigt, um die Vorläuferzellen der Osteoklasten zu konzentrieren. Dies führte jedoch zu einer geringeren Ausbeute an Osteoklasten, so dass dieser Schritt später wieder verlassen wurde. Möglicherweise gleicht die höhere Aufreinigung CD-14-positiver Zellen die hohen Zellverluste während der Aufreinigung nicht aus.

Die Interphase der Dichtegradientenzentrifugation wurde also direkt in 50 ml  $\alpha$ -MEM Medium in einer 50 ml - Kulturflasche ausgesät. Monozytäre Zellen haben die Eigenschaft an die Zellkulturflasche zu adhären, während die übrigen Zellen, vor allem Lymphozyten, in Lösung bleiben. Nach sieben bis zehn Tagen war ein großer Teil der Zellen adhärent. Die nicht adhären Zellen wurden verworfen und die adhären Zellen abtrypsinisiert. Hierdurch wurden monozytäre Zellen aufgereinigt. Nach der Zellzahlbestimmung im FACS wurden  $4e^5$ - $8e^5$  Zellen pro 6-well in 2 ml  $\alpha$ -MEM mit 25 ng/ml MCSF und 50 ng/ml RANKL ausgesät. Das Medium wurde jeden dritten Tag gewechselt.

### 3.1.2. Nachweis der Osteoklasten

#### 3.1.2.1. Morphologie

Nach drei bis sechs Tagen zeigten sich im Phasenkontrastmikroskop neben den kleinen einkernigen Zellen, Zellen mit großem Plasmasaum. Zentral zeigten sie mehrere eng gepackte Kerne. Dies entspricht der Morphologie der Osteoklasten als durch Fusion von Monozyten entstandenen polynukleären Riesenzellen.

Mittels Färbung mit dem Nucleinsäurefarbstoff Hoechst 33342 ließen sich die Kerne selektiv darstellen. Der gebundene Farbstoff hat ein Fluoreszenzmaximum bei 461 nm und ließ sich gut im blauen Fluoreszenzbereich anregen. Es bestätigte sich der Befund aus der Phasenkontrastmikroskopie im Hellfeld, dass die Riesenzellen zentral mehrere Zellkerne enthalten. Die Intensität der Fluoreszenz im UV-Licht ist im mittleren Bild dargestellt. Im Fusionsbild wird die Fluoreszenz im UV-Licht in roter Farbe dargestellt.

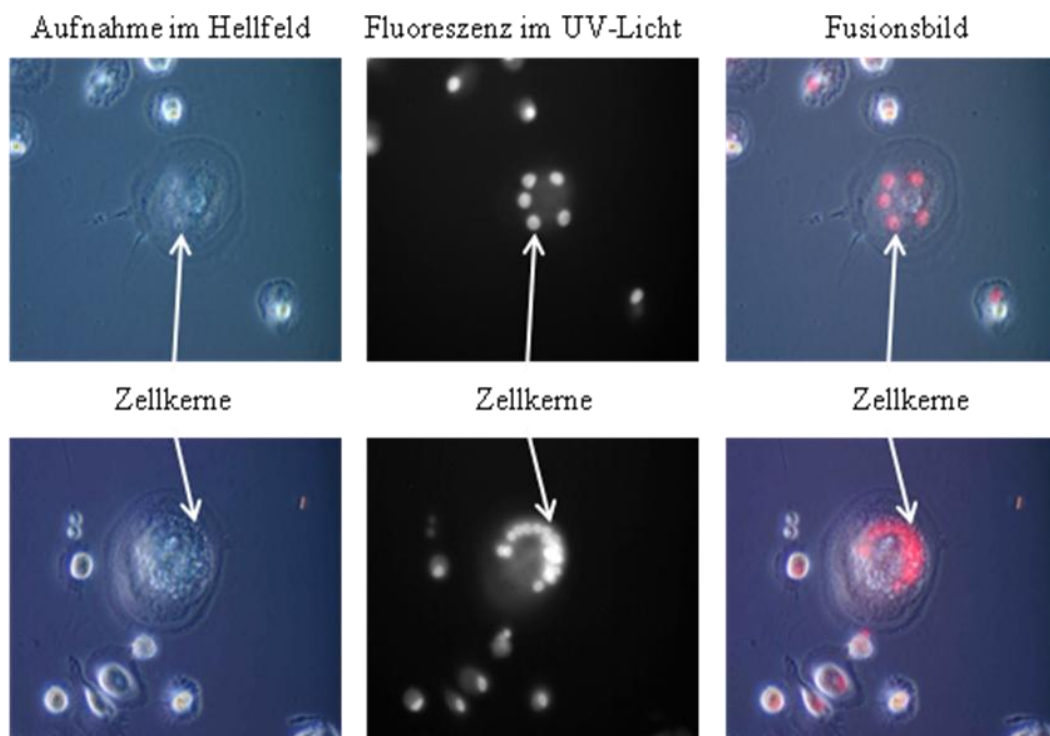


Abb. 11: Mikroskopische Aufnahme von Osteoklasten im Hellfeld und UV-Licht; Fusionsbild

### 3.1.2.2. Funktion

Aktiviert Osteoklasten exprimieren die Tartrat resistente alkalische Phosphatase (Minkin, 1982) und sezernieren sie in die Resorptionslücke (Reinholt et al., 1990). Obwohl die exakte Funktion der Tartrat resistenten alkalischen Phosphatase unklar ist, dient sie als Marker für funktionelle Osteoklasten.

Zu ihrem Nachweis wurde eine TRAP-Färbung durchgeführt. Die TRAP-Färbung zeigt bei Anwesenheit der Tartrat resistenten alkalischen Phosphatase eine dunkelviolett bis dunkelrote Färbung. Es zeigte sich eine deutliche Rotfärbung der polynukleären Riesenzellen im Vergleich zu den mit Hämatoxylin-Eosin gelb gegengefärbten mononukleären Zellen.

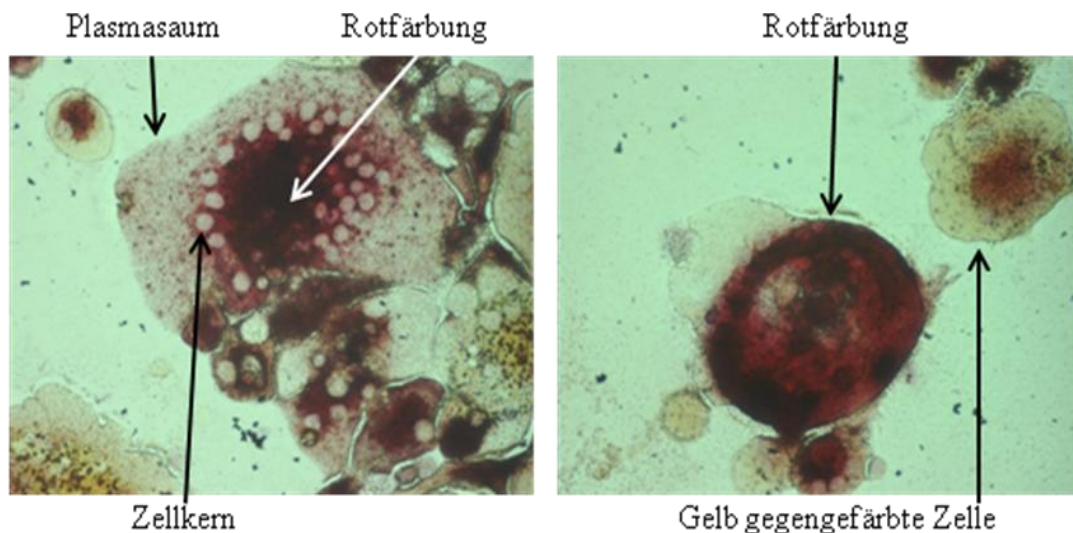


Abb. 12: Mikroskopische Aufnahmen von TRAP-gefärbten Osteoklasten; li. Abb.: Zelle mit einer starken zentralen Rotfärbung durch das Produkt der Tartrat resistenten alkalischen Phosphatase, Aufhellungen durch multiple ungefärbte Zellkerne und einem peripheren schwach gefärbten Plasmaaum; re Abb.: zentral: stark rot gefärbte, TRAP positive Zelle; Rechts oben: kleine, gelb gegengefärbte, TRAP negative, Zelle

### 3.2. Abhängigkeit von IL-6

IL-6 ist einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren für Myelomzellen und im Besonderen für INA-6-Zellen (Burger et al., 2001). Als Ausgangspunkt für meine Untersuchungen war es wichtig zu überprüfen, ob die benutzten INA-6-Zellen noch IL-6-abhängig sind oder durch Mutation unabhängig geworden sind. Eine Blockade des IL-6 Rezeptors mittels des Rezeptorantagonisten SANT-7 führt zu einer Aufhebung der IL-6 vermittelten STAT-3 Phosphorylierung. Es bestehen noch weitere Wege der STAT-3 Phosphorylierung. Ein Einfluß der Hemmung des IL-6-Rezeptors auf das Zellüberleben gilt deshalb nur bei IL-6 abhängigen Ziellinien als wahrscheinlich. Zum Nachweis der

Abhängigkeit der Zelllinie INA-6 von IL-6 wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Es wurden 10000 Zellen in 100µl Medium mit ansteigenden IL-6 Konzentrationen ausgesät. Am dritten Tag wurde das Überleben gemessen.

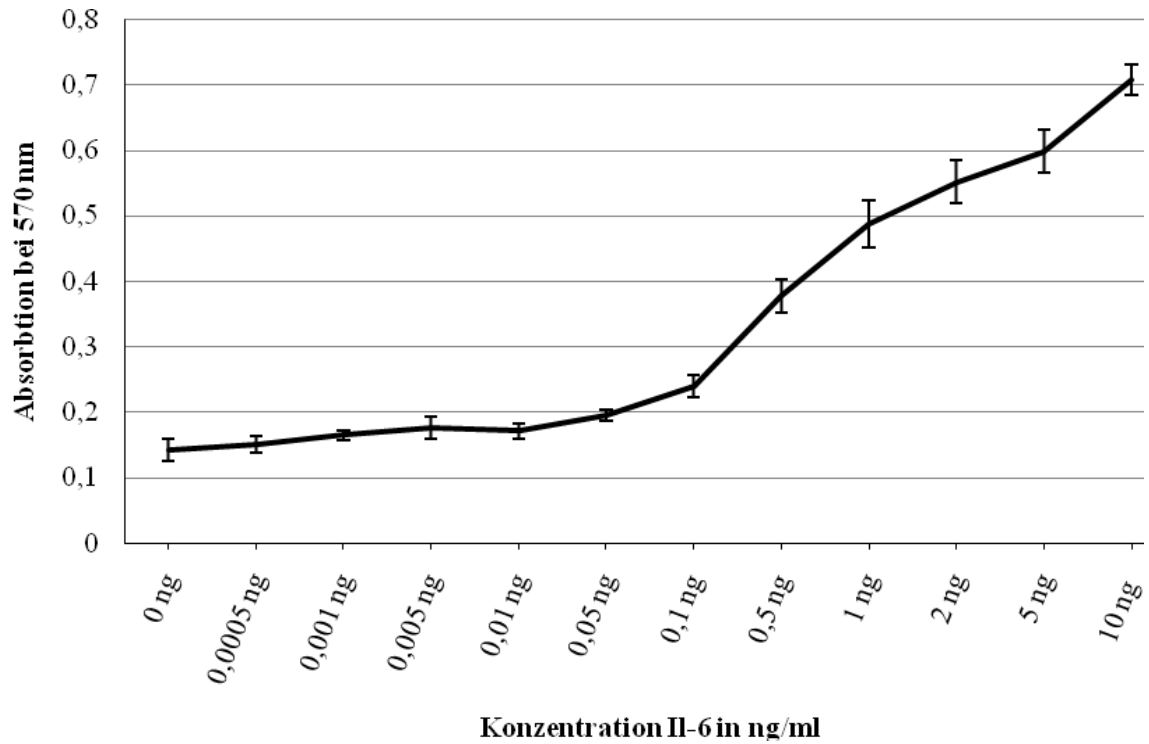


Abb. 13 : MTT-Proliferationsassay mit ~10 000 INA-6-Zellen in Abhängigkeit der IL-6-Konzentration; Y-Achse: Absorption bei 570 nm, X-Achse: IL-6 Konzentration in ng/ml; 4-fache Bestimmung, Mittelwerte mit Standardabweichung (Fehlerbalken).

### **3.3. Überlebensassay der Myelomzellen**

#### **3.3.1 Durchführung**

Verschiedene Arbeiten haben sich bereits mit dem Einfluß von Knochenmarkstromazellen oder Osteoklasten auf das Überleben von Myelomzellen beschäftigt. Sowohl in Kokultur mit Osteoklasten (Abe et al., 2004) als auch mit Stromazellen (Caligaris-Cappio et al., 1992) wurden Überlebensvorteile für Myelomzellen festgestellt. In meiner Arbeit steht der direkte Vergleich der Auswirkungen von Osteoklasten und Stromazellen auf das Überleben und die Aktivierung von Signalwegen in Myelomzellen im Mittelpunkt. Deshalb habe ich zuerst einen Überlebensassay durchgeführt. Hierzu wurden  $14 \times 10^4$  Zellen INA-6 im 96-well Format ohne Support, auf Stromazellen und auf Osteoklasten ausgesät. Die Fraktion der lebenden Zellen wurde am dritten Tag mittels Annexin-V-FITC/PI-Färbung im FACS festgestellt.

2002 konnten Chatterjee et al. nachweisen, dass Myelomzellen in Kokultur mit Stroma unabhängig von einer Blockade des Il-6/STAT-3-Signalweges wurden. Hierzu wurden der Il-6-Rezeptorantagonist SANT-7 benutzt. Erst eine zusätzliche Blockade des MAP-Kinase-Signalweges durch den MEK-Inhibitor PD 98059 führte zur Apoptose. Für mich war es interessant diese Befunde auf Stroma zu reproduzieren und die Wirkung der Osteoklasten im Vergleich zu betrachten. Es wurde der Überlebensassay also zusätzlich unter den Bedingungen + SANT-7 30 µg/ml, + PD 98059 50 µmolar und der Kombination von PD 98059 und SANT-7 durchgeführt (Chatterjee et al., 2004).

#### **3.3.2. Ergebnisse**

Bei Betrachtung der Anteile lebender Zellen in der FACS-Analyse ohne Normierung (hier nicht gezeigt) fiel Folgendes auf. Der Anteil lebender Zellen war ohne Inhibitoren auf Osteoklasten mit 84% am Höchsten, gefolgt von INA-6 auf primärem Stroma mit 82%. Das Überleben der INA-6-Zellen ohne Support war mit 64% etwa 20% geringer als auf Stroma oder Osteoklasten. Osteoklasten und primäres Stroma scheinen also beide den Myelomzellen einen Überlebensvorteil zu bieten.



Desweiteren zeigte sich besonders deutlich bei Normierung der verschiedenen Bedingungen, dass eine Il-6-Rezeptor-Inhibition mittels SANT-7 die Zahl der überlebenden Zellen in den verschiedenen Kulturbedingungen um etwa 10% reduziert. Unter MEK-Inhibition sank der Anteil der lebenden Zellen sowohl ohne Kokultur als auch auf Osteoklasten auf etwa 75%. Auf primärem Stroma lebten noch 85%.

Die größten Unterschiede im Abfall der lebenden Zellen lassen sich unter der Kombination von SANT-7 und PD 98059 beobachten. Bei einer Blockade sowohl des STAT-3-Signalweges durch SANT-7 als auch des MAP-Kinase-Signalweges durch PD 98059 fällt der prozentuale Anteil lebender Zellen ohne Kokultur auf 40% ab. Unter Kokulturbedingungen mit primärem Stroma sind bei Blockade beider Signalwege noch 60% der Zellen vital, in Kokultur mit Osteoklasten 90%.

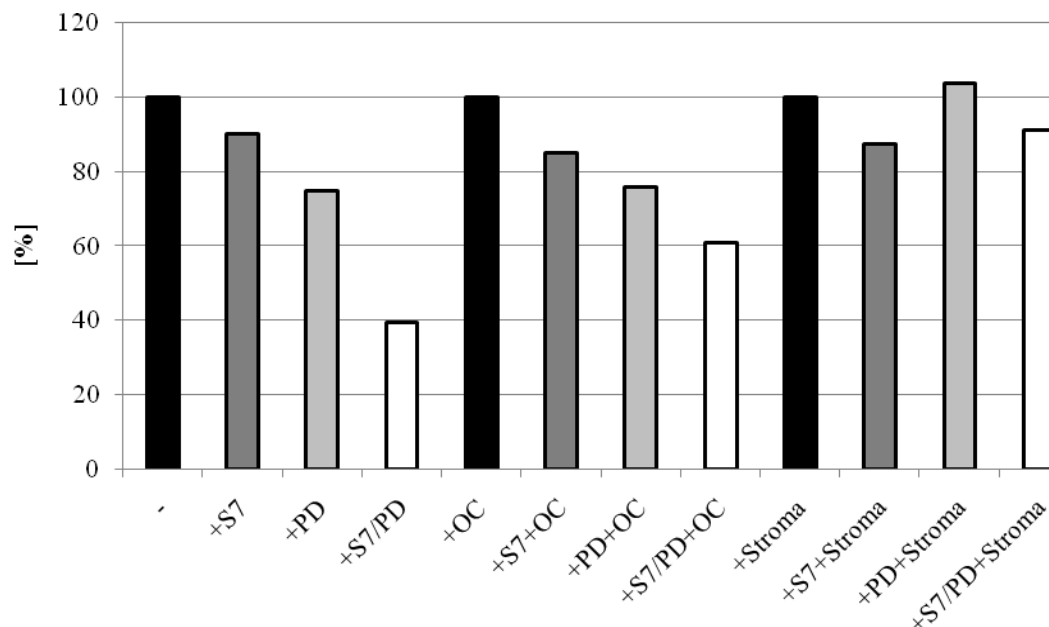


Abb. 14: Repräsentatives Beispiel des Drei-Tages-Überleben von INA-6-Zellen in verschiedenen Kokulturbedingungen, FACS-Analyse nach Annexin-V-FITC/PI-Färbung, Prozentuale Darstellung; Kontrolle = INA-6-Zellen ohne Kokultur, +OC = INA-6-Zellen in Kokultur mit Osteoklasten, + Stroma = INA-6-Zellen in Kokultur mit primärem Stroma, +S7 = mit SANT-7, +PD = mit PD98059, +S7/PD = mit SANT-7 und PD 98059; Normierung der Bedingungen -, +OC, und + Stroma jeweils ohne Inhibitoren als 100%.

Die gleichen Versuche wurden ebenfalls mit HS-5 durchgeführt. Hierbei zeigte sich ein ähnlicher Abfall des Überlebens unter den verschiedenen Bedingungen (siehe Abschnitt 3.8.).

### 3.4. Western Blot-Analyse der Myelomzellen des Überlebensassays

Unter denselben Bedingungen des Überlebensassays wurden 5000000 Zellen INA-6 in 7 ml Medium im 6-well 12 Stunden inkubiert. Hierauf wurden die Zellen geerntet und eine RIPA-Lyse durchgeführt. Im Western Blot wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 und STAT-3 untersucht. Während die Phosphorylierung von ERK 1/2 über MEK-Blockade durch PD 89059 gehemmt werden sollte, stellt STAT-3 ein späteres Zielmolekül im STAT-3 – Signalweg dar.

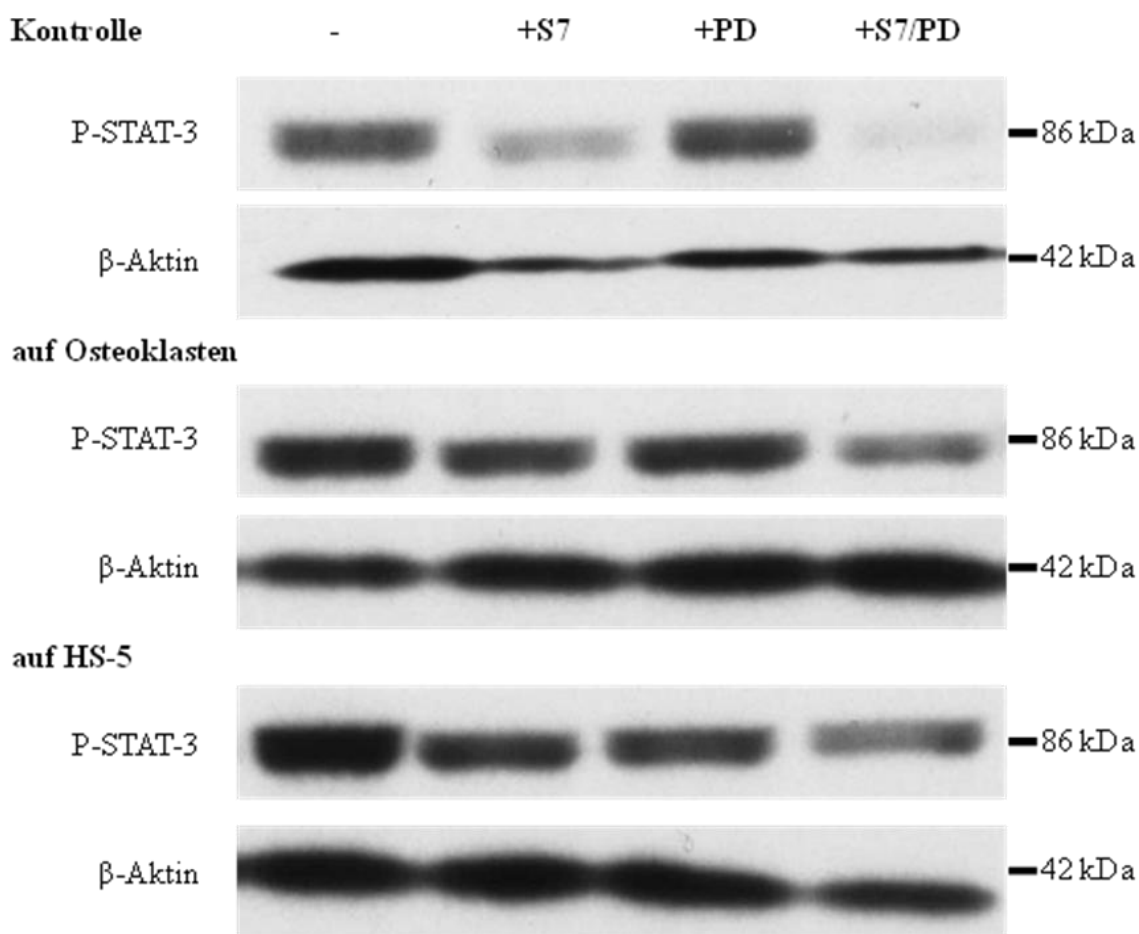


Abb. 15: Western-Blot-Analyse von INA-6-Zelllysaten auf STAT-3-Phosphorylierung, INA-6-Zellen unter den Kokulturbedingungen: Kontrolle = ohne Kokultur, auf Osteoklasten = in Kokultur mit Osteoklasten, auf HS-5 = in Kokultur mit HS-5-Zellen; jeweils mit den Inhibitoren +S7 = mit SANT-7, +PD = mit PD98059, +S7/PD = mit den Inhibitoren SANT-7 und PD98059, - = ohne Inhibitoren; Antikörperinkubation mit P-STAT-3-Antikörper (=P-STAT-3) und β-Aktin-Antikörper (=β-Aktin) zur Ladekontrolle.

Zunächst betrachten wir das Phospho-STAT-3 Signal ohne Inhibitoren (Kontrolle). Sowohl in Kokultur mit Stroma als auch mit Osteoklasten ist in diesem Blot das Phospho-STAT-3 Signal hochreguliert im Vergleich zu INA-6 ohne Kokultur. HS-5 scheint zu einer noch höheren Phosphorylierung von INA-6 zu führen.

Auf INA-6 Zellen ohne Support führt SANT-7 über Il-6-Rezeptor-Blockade sowohl alleine als auch zusammen mit PD 98059 zu einer geringeren Phosphorylierung von STAT-3. Mit SANT-7 ist noch eine schwache Phosphorylierung, mit SANT-7 und PD 98509 fast keine Phosphorylierung mehr im Western Blot nachzuweisen.

Im Gegensatz hierzu ist auf HS-5 und Osteoklasten ein starkes Phospho-STAT-3 Signal mit SANT-7 und auch noch mit SANT-7 und PD 98509 zu detektieren. PD 98059 alleine hat sowohl mit als auch ohne Kokultur keinen Einfluß auf die Phosphorylierung von STAT-3.

### 3.5. Untersuchung des NFκB-Signalweges

Zur Klärung des Überlebensvorteils der INA-6 auf Stroma und Osteoklasten untersuchte ich weitere Signalwege. Der NFκB – Signalweg ist hierbei von besonderem Interesse. Er ist vor allem in der Entwicklung der B-Zellen und Entzündungsreaktionen beteiligt (Bendall et al., 1999). Außerdem ist eine konstitutive Aktivierung in vielen Krebsarten und unter anderem auch im Multiplen Myelom nachgewiesen worden (Annunziata et al., 2007).

Als Nachweis der NFκB-Aktivität wurde der sehr sensitive Luciferaseassay gewählt. Über ein Plasmid mit einem sechsfachen NFκB Promotor und einem nachgeschalteten Reportergen kann die Menge an aktivem NFκB-Transkriptionsfaktor nachgewiesen werden. Der NFκB-Transkriptionsfaktor bindet an den Promotor und setzt die Transkription des Reportergens in Gang.

Der Vorgang ist quantitativ vom NFκB-Transkriptionsfaktor, nicht vom im Überschuss vorliegenden Plasmid abhängig. Als Reportergen wurde das Fireflyluciferasegen (*luc*) benutzt. Es kodiert für das Enzym Fireflyluciferase welches unter Zugabe von Luciferin, Sauerstoff und ATP in einer Biolumineszenzreaktion Licht emittiert (siehe Abb. 18) (Wood et al., 1989). Zusätzlich ist Magnesium nötig. Der pH-Wert der Lösung beeinflusst das emittierte Lichtspektrum und muss mittels eines geeigneten Puffers eingestellt werden (Seliger and Mc, 1960). Die Lichtmessung erfolgte in einem Photometer. Eine erhöhte Aktivität des NFκB-Signalweges führt zu einer häufigeren Transkription des Luciferasegens. Dies führt zu einer erhöhten Expression der Luciferase. Nach Lyse der Zelle und Zugabe des Luciferins, ATP's,  $Mg^{2+}$  und  $O_2$  führt dies zu einer erhöhten Lichtemission.

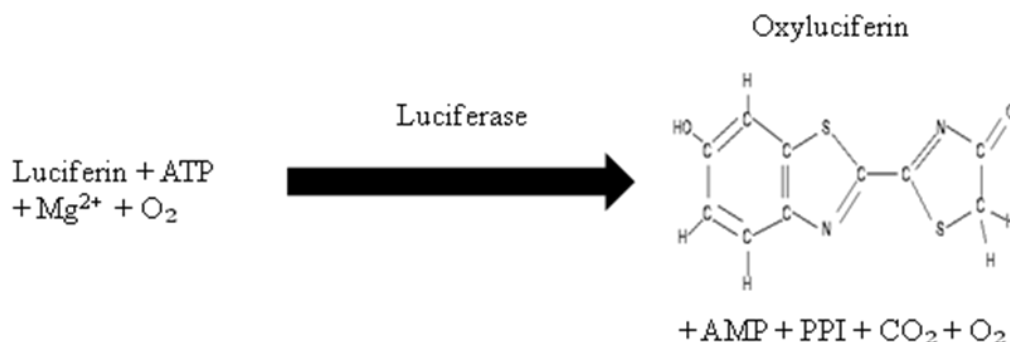


Abb. 16 : Schematische Darstellung der durch die Luciferase katalysierten Lichtreaktion (Wood, 1998)

#### 3.5.1. Voraussetzung für den Luciferaseassay

Eine Transfektion der Zellen mit dem 6xNFκB-luc – Plasmid ist Voraussetzung für den Versuch. Als Transfektionsmethode wurde die vorübergehende Transfektion mittels Elektroporation gewählt. In einem Vorversuch wurde die Transfektionseffizienz der Zellen INA-6 und MM.1S mit einem GFP-Plasmid bei unterschiedlichen Elektroporationsbedingungen mittels FACS-Analyse untersucht. Es wurden  $2 \times 10^6$  Zellen mit  $10 \mu\text{g}$  GFP-Plasmid in  $700 \mu\text{l}$  RPMI ohne Alles elektroporiert. Es zeigte sich, dass die Zelllinie INA-6 mit maximal 12% besser als die Zelllinie MM.1S mit maximal 8% transfizieren ließ. Als optimale Elektroporationsbedingungen stellte sich die Kombination von 280 Volt und  $1425 \mu\text{Farrad}$  heraus. Besonders wichtig für eine gute Transfektionsrate ist, dass die Zellen sich zum Zeitpunkt der Elektroporation im exponentiellen Wachstum befinden.

Es wurden  $2 \times 10^6$  elektroporierte Zellen pro 6-well in je 4 ml Medium ausgesät.

Zur Durchführung des Luciferaseassays bestand die Möglichkeit der Nutzung eines kommerziell erhältlichen Kits der Firma Promega oder der eigenen Zusammenstellung der Reagenzien nach publizierten Vorgehensweisen. Zunächst wurde die Effizienz der beiden Vorgehensweisen verglichen. Als kommerziell erhältliche Variante wurden die Reagenzien des Dual Luciferase Reporterassay System der Firma Promega verwendet, die für die Firefly-Lumineszenz nötig sind. Dies sind als Lysepuffer Passiv Lysis Buffer (PLB) und als Reaktionslösung Luciferase Assay Reagent II (LAR II). Die Zellen eines 6-wells wurden in  $500 \mu\text{l}$  PLB lysiert.  $20 \mu\text{l}$  Lysat wurden eingesetzt und unter Zugabe von  $50 \mu\text{l}$  LAR II die Reaktion in Gang gesetzt. Hierauf wurde die Lumineszenz gemessen.

Als alternative Reaktionslösung wurde nach dem Paper von Hampf et al. die "Beetle Luciferase Assay"-Lösung (BLA) hergestellt (siehe Abschnitt 2.2.9.). Außerdem wurde eine Alternative zum PLB in Form von  $0,1$  molarem Phosphatpuffer mit PH 7,8 und Zugabe von  $0,2\%$  Triton X-100 (PPBT) gefunden. Matthias Hampf et al. waren bei der Suche nach einer Lyse die den Luciferaseassay und Proteinbestimmungen ermöglicht auf diesen Puffer gestoßen (Hampf and Gossen, 2006). Im Gegensatz zum PLB reichen  $100 \mu\text{l}$  PPBT zur Lyse eines 6-wells. Es werden ebenfalls  $20 \mu\text{l}$  des Lysates eingesetzt und  $50 \mu\text{l}$  BLA zugegeben. Die Lumineszenz sollte etwa dieselbe sein. Es wurden alle Kombinationen zwischen den beiden Lysepuffern und den beiden Reaktionslösungen an

4x10<sup>5</sup> INA-6 Zellen/6-well getestet. Als Induktor der NFκB-Aktivität diente eine einfache Schicht HS-5 Zellen am Boden des 6-Wells.

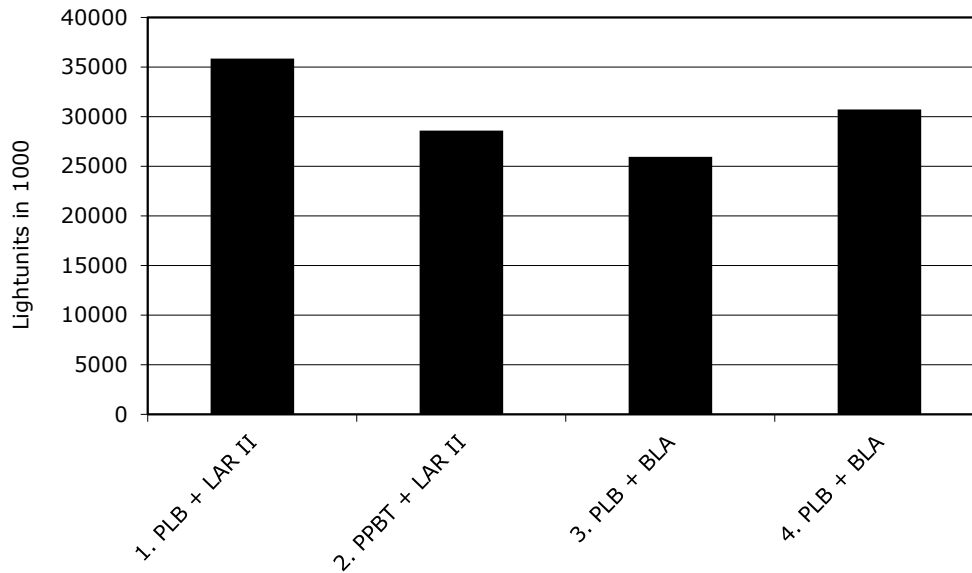


Abb.17 :Repräsentatives Beispiel eines Luciferaseassay von INA-6-Zellen transfiziert mit 6 x NFκB-luc-Plasmid unter den Bedingungen 1. Zelllyse mit 500 µl PLB, Luciferaseassay mit LAR II; 2. Zelllyse mit 100 µl PPBT, Luciferaseassay mit LAR II; 3. Zelllyse mit 100 µl PLB, Luciferaseassay mit BLA; 4. Zelllyse mit 100 µl PPBT, Luciferaseassay mit BLA. Y-Achse: Lightunits angegeben in 1000;

Es zeigte sich, dass alle Kombinationen in derselben Größenordnung von 2-4 Millionen Lightunits liegen. Die Kombination aus PPBT und BLA ist damit dem Produkt der Firma Promega ebenbürtig. Aus Kostengründen wurde mit dieser Kombination weitergearbeitet.

### 3.5.2. Ergebnisse

INA-6-Zellen ohne Kokultur führten im Luciferaseassay nur zu geringen Leuchtstärken, was auf eine geringe NFκB-Aktivität hinweist. TNF wurde als starker Induktor des NFκB-Signalweges als Positivkontrolle benutzt. INA-6-Zellen unter TNF-Stimulation führten zu einer etwa drei mal so starken Lumineszenz. In Kokultur mit Osteoklasten oder primärem Stroma wurden die höchsten Leuchtwerte erzielt. Mit einer fünf mal höheren Lumineszenz als die Kontrolle wurde bei INA-6-Zellen in Kokultur mit Osteoklasten die höchste NFκB-Aktivierung festgestellt.

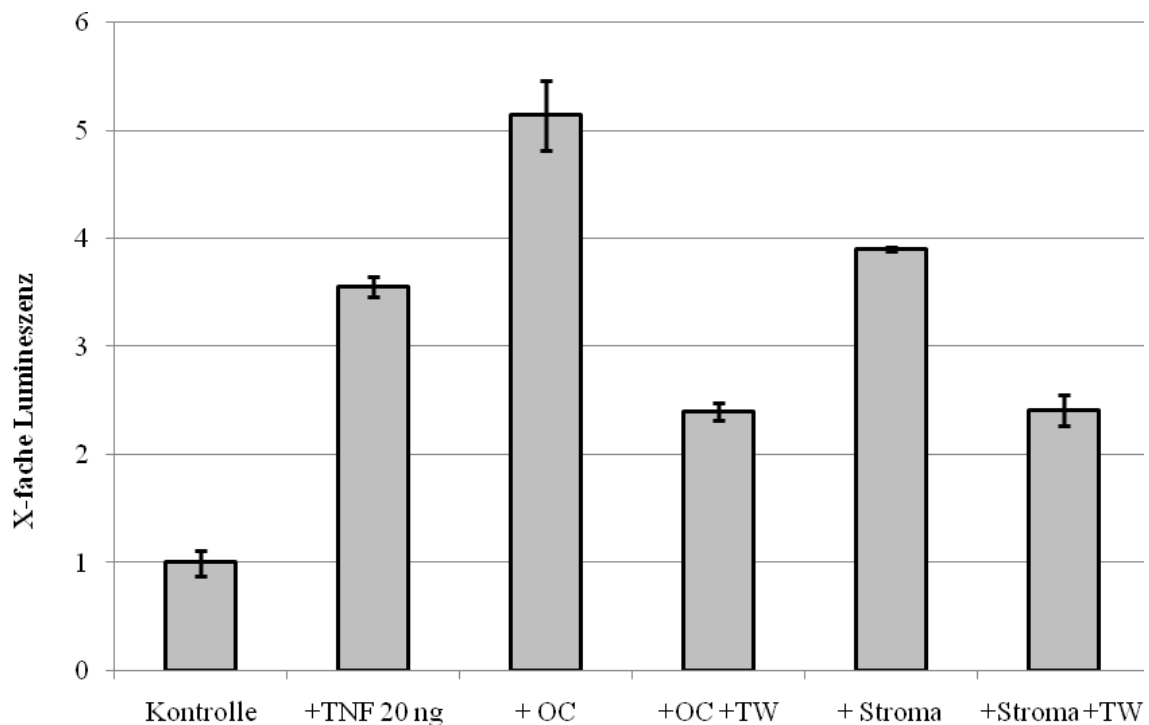


Abb. 18: Luciferaseassay von INA-6-Zellen transfiziert mit 6 x NFκB-luc-Plasmid; Die Bedingung Kontrolle = INA-6-Zellen ohne Kokultur / Zusätze wurde als 1 normiert. Weitere Bedingungen: TNF = INA-6-Zellen in Medium mit TNF- $\alpha$  20 ng/ml, OC = INA-6-Zellen in Kokultur mit Osteoklasten, OC + TW = INA-6-Zellen in Kokultur mit Osteoklasten - Zellkulturen durch Transwell getrennt, Stroma = INA-6-Zellen in Kokultur mit primärem Stroma, Stroma + TW = INA-6-Zellen in Kokultur mit primärem Stroma - Zellkulturen durch Transwell getrennt; Y-Achse: Lightunits; Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichungen (Fehlerbalken).

Durch das Zwischenschalten eines Transwells der Porengröße 0,4  $\mu$ m wurde untersucht in wieweit ein löslicher Faktor oder eine Zell-Zellinteraktion an der NFκB-Aktivierung beteiligt ist. Eine Abnahme der NFκB-Aktivierung und damit der Lumineszenz in unserem Versuch deutet auf eine NFκB-Aktivierung der INA-6-Zellen durch einen gebundenen Faktor/Zell-Zellinteraktionen hin. Das Zwischen-schalten eines Transwells

der Porengröße 0,4  $\mu\text{m}$  zwischen INA-6-Zellen und Osteoklasten bzw. Stroma reduzierte die Lumineszenz und damit die NF $\kappa$ B-Aktivierung erheblich.

Die Lumineszenz der INA-6 Zellen auf Osteoklasten nimmt nach Zwischenschalten eines Transwells mit dem 2,7 fachen der Ausgangslumineszenz stark ab. Die Lumineszenz der INA-6-Zellen auf Stroma nimmt nach Zwischenschalten eines Transwells um das 1,5 fache der Ausgangslumineszenz ab.

### 3.5.3. Western Blot-Analyse von I $\kappa$ B $\alpha$

Um einen weiteren Nachweis der unterschiedlichen Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges zu erhalten wurden auch Western-Blot-Analysen der Zwischenstufen des Signalweges durchgeführt. Hierbei interessierte vor allem der Inhibitor der Freisetzung von NF $\kappa$ B-Transkriptionsfaktoren I $\kappa$ B $\alpha$ . Dieser stellt nämlich ein NF $\kappa$ B-Zielgen dar. Ist der NF $\kappa$ B-Signalweg aktiviert wird in der Zelle viel I $\kappa$ B $\alpha$  im Proteasom abgebaut. Im Sinne einer negativen Rückkopplung wird I $\kappa$ B $\alpha$  bei NF $\kappa$ B-Aktivierung vermehrt neu synthetisiert (Hayden and Ghosh, 2008; Pasparakis et al., 2006). Dies ist zur Beendigung des NF $\kappa$ B-Signals nötig.

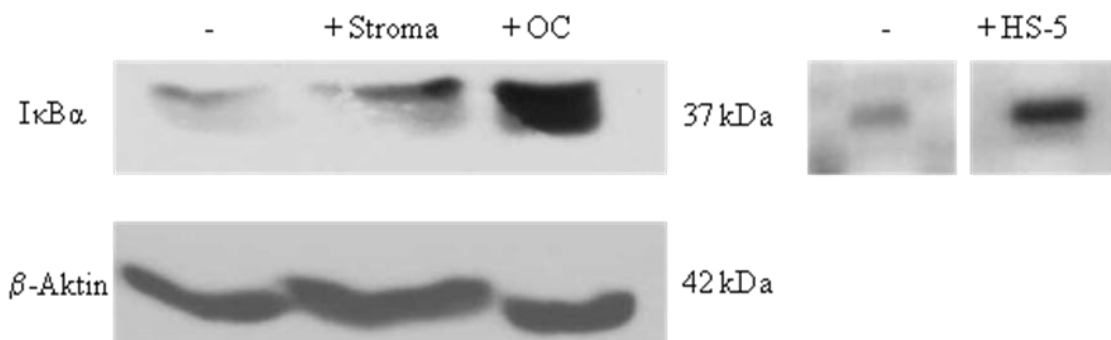


Abb. 19 : Western-Blot-Analyse von INA-6-Zelllysaten auf I $\kappa$ B $\alpha$  unter den Bedingungen - = INA-6-Zellen ohne Kokultur, + HS-5 = INA-6-Zellen in Kokultur mit HS-5, +Stroma = INA-6-Zellen in Kokultur mit primärem Stroma, +OC = INA-6-Zellen in Kokultur mit Osteoklasten; Antikörperinkubation mit I $\kappa$ B $\alpha$ -Antikörper (=I $\kappa$ B $\alpha$ ) und  $\beta$ -Aktin-Antikörper (=  $\beta$ -Aktin) als Ladekontrolle.

Auf dem rechten Blot der Abb. 19 erkennt man ein deutlich höheres I $\kappa$ B $\alpha$ -Signal bei INA-6-Zellen in Kokultur mit HS-5. Der linke Blot zeigt, daß INA-6 Zellen auf Stroma zu einem minimal stärkeren Signal im Western Blot führen als INA-6 Zellen ohne Kokultur. INA-6 Zellen auf Osteoklasten führen zu einem deutlich stärkeren I $\kappa$ B $\alpha$  - Signal.



**3.6. Western-Blot-Analyse des MAPK/ERK-, STAT-3-, AKT-Signalwegs**  
 Neben dem NFκB-Signalweg tragen noch weitere Signalwege zum besseren Überleben der Myelomzellen auf Stroma und Osteoklasten bei. Naheliegender ist die Untersuchung von Signalwegen, von denen bereits gezeigt wurde, dass sie durchs Knochenmark-mikromilieu beeinflusst werden. Zu diesen gehören der AKT-, STAT-3-, MAPK/ERK-Signalweg (Podar et al., 2009). Auf die Bedeutung des STAT-3- und MAPK/ERK-Signalwegs wurde auch schon beim Überlebensassay eingegangen.

**3.6.1. P-ERK**

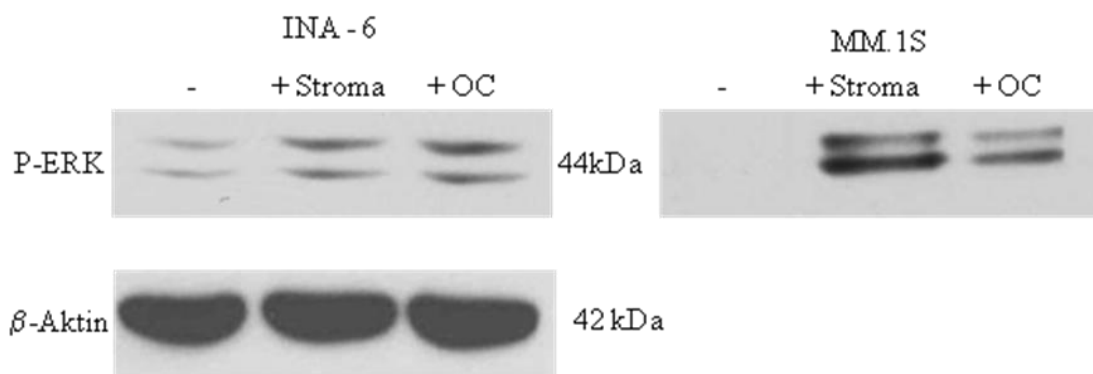


Abb. 20 : Western-Blot-Analyse von Lysaten von INA-6- und MM.1S-Zellen auf P-ERK unter den Bedingungen - = Zellen ohne Kokultur, +Stroma = Zellen in Kokultur mit primärem Stroma, +OC = Zellen in Kokultur mit Osteoklasten; Antikörperinkubation mit P-ERK-Antikörper (=P-ERK) und β-Aktin-Antikörper (=β-Aktin) zur Ladekontrolle.

Bei INA-6-Zellen in Kokultur mit Stroma und Osteoklasten ist ein stärkeres Phospho-ERK-Signal zu detektieren als bei INA-6-Zellen ohne Kokultur. Bei der Zelllinie MM.1S ist jedoch nur in Kokultur mit Stroma ein deutliches Phospho-ERK-Signal sichtbar.

### 3.6.2. P-STAT-3

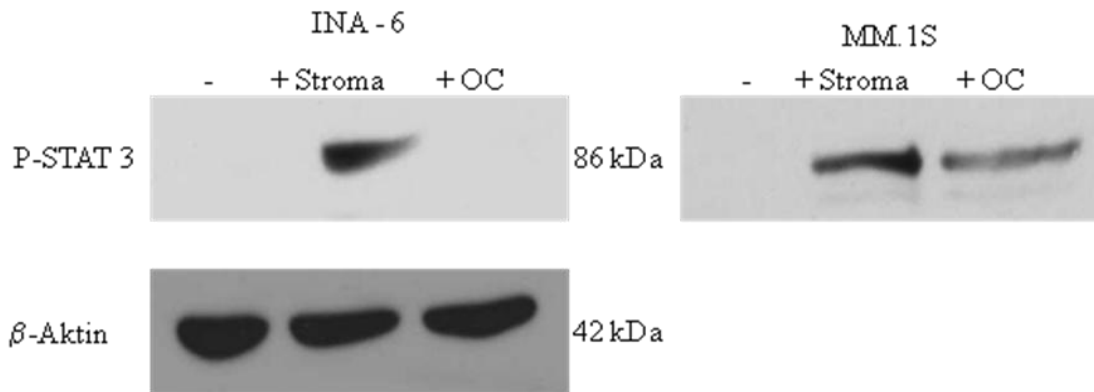


Abb. 21 : Western-Blot-Analyse von Lysaten von INA-6- und MM.1S-Zellen auf P-STAT-3 unter den Bedingungen - = Zellen ohne Kokultur, +Stroma = Zellen in Kokultur mit primärem Stroma, +OC = Zellen in Kokultur mit Osteoklasten; Antikörperinkubation mit P-STAT-3-Antikörper (=P-STAT-3) und  $\beta$ -Aktin-Antikörper (=  $\beta$ -Aktin) zur Ladekontrolle.

INA-6 Zellen haben in Kokultur mit Stroma ein deutliches Phosphorylierungssignal. In Kokultur mit Osteoklasten oder Ohne Kokultur ist im Blot Abb.24 kein Phospho-STAT-3-Signal zu erkennen.

In der Zelllinie MM.1S führt sowohl Kokultur mit Osteoklasten als auch mit Stroma zu einem Phospho-STAT-3-Signal. Das Signal ist jedoch in Kokultur mit Stroma deutlich am Stärksten.

### 3.6.3. P-AKT

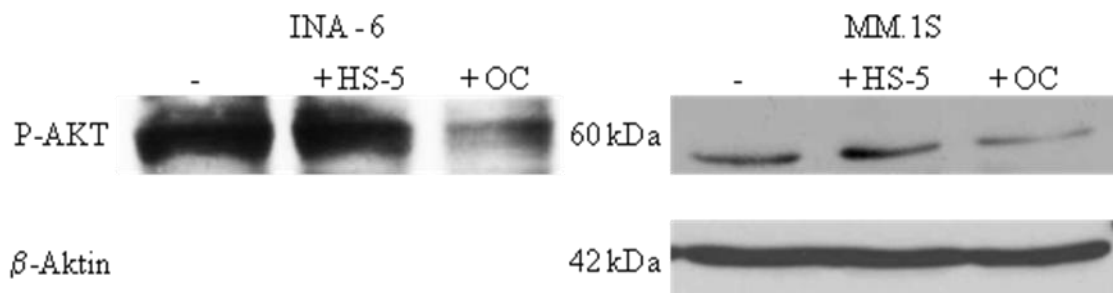


Abb. 22 : Western-Blot-Analyse von Lysaten von INA-6- und MM.1S-Zellen auf P-AKT unter den Bedingungen - = Zellen ohne Kokultur, +HS-5 = Zellen in Kokultur mit HS-5-Zellen, +OC = Zellen in Kokultur mit Osteoklasten; Antikörperinkubation mit P-AKT-Antikörper (=P-AKT) und  $\beta$ -Aktin-Antikörper (=  $\beta$ -Aktin) zur Ladekontrolle.

Es war schwierig ein gutes P-Akt-Signal im Western Blot nachzuweisen. Das Phospho-Akt-Signal auf HS-5 und ohne Kokultur ist gleich stark. Das Phospho-AKT-Signal auf Osteoklasten nimmt leicht ab. Ein signifikanter Anstieg der AKT-Phosphorylierung in Kokultur der INA-6 Zellen ist auf alle Fälle auszuschließen.

### 3.7. Western-Blot-Analyse der Bcl-2 – Proteine

Letztlich wurden noch die Bcl-2-Proteine der Endstrecke der Überlebensregulation untersucht. Hierbei handelt es sich um Proteine, die an das Mitochondrium assoziiert sind. Sie regulieren die Freisetzung von Cytochrom c und weiteren Stoffen aus dem Mitochondrium. Diese leiten durch Caspasenaktivierung direkt die Apoptose ein. Die Familie der BCL-2 Proteine lässt sich hierbei in antiapoptotische Proteine, die die Mitochondrienmembran abdichten und proapoptotische, die an einer Porenbildung der Mitochondrienmembran beteiligt sind unterscheiden (Barille-Nion et al., 2003). Als antiapoptotische Proteine wurden BCL-2 und MCL-1, als proapoptotisches Protein BAX untersucht. MCL-1 kommt bei der Apoptoseregulation in Myelomzellen eine besondere Rolle zu (siehe Einleitung) und wurde deswegen untersucht.

Es zeigt sich, dass Bcl-2 und Mcl-1 in Myelomzellen unter den Bedingungen ohne Kokultur, mit Stroma und mit Osteoklasten gleich stark exprimiert werden. Das proapoptotische Gen Bax wurde in Myelomzellen ohne Kokultur und in Kokultur mit Osteoklasten gleich stark exprimiert. In Myelomzellen in Kokultur mit Stromazellen wurde Bax weniger stark exprimiert als in Myelomzellen ohne Kokultur oder in Kokultur mit Osteoklasten.

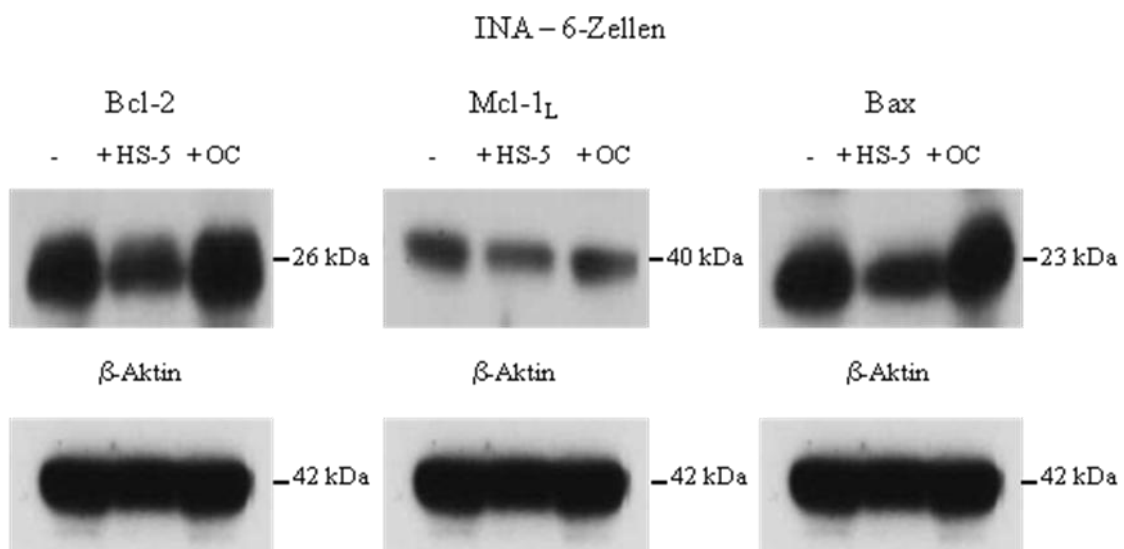


Abb. 23 : Western-Blot-Analyse von Lysaten von INA-6-Zellen auf Bcl-2, Mcl-1 und Bax unter den Bedingungen - = Zellen ohne Kokultur, +Stroma = Zellen in Kokultur mit primärem Stroma, +OC = Zellen in Kokultur mit Osteoklasten; Antikörperinkubation mit Bcl-2-Antikörper (=Bcl-2), Mcl-1-Antikörper (=Mcl-1<sub>L</sub>), Bax-Antikörper (= Bax) und β-Aktin-Antikörper (=β-Aktin) zur Ladekontrolle.

### 3.8. HS-5 versus Primärem Stroma

Anfangs wurden die meisten Versuche mit der Stromazelllinie HS-5 durchgeführt, da diese einfach zu kultivieren ist. Im Vergleich mit primärem Stroma zeigten sich dann jedoch Unterschiede im Überlebensassay (siehe 3.3.2.). In Abb. 24 sind die Ergebnisse der FACS-Analyse von INA-6-Zellen in Kokultur mit HS-5 und primärem Stroma unter den Bedingungen des Überlebensassays gegenübergestellt. Die Daten sind aus verschiedenen Überlebensassays gewonnen (Versuch1/2). Die Anzahl der lebenden Zellen in der FACS-Analyse unter den Bedingungen +HS-5/+Stroma wurden als 100% normiert. Die Zahl der lebendigen INA-6-Zellen in Kokultur mit HS-5-Zellen unter der Zugabe von SANT-7, PD 98059 und PD 98059 und SANT-7 fällt kontinuierlich ab bis zu ~80% ab. Die Zahl der lebenden Zellen in Kokultur mit primärem Stroma schwankt unter diesen Bedingungen um die 94%

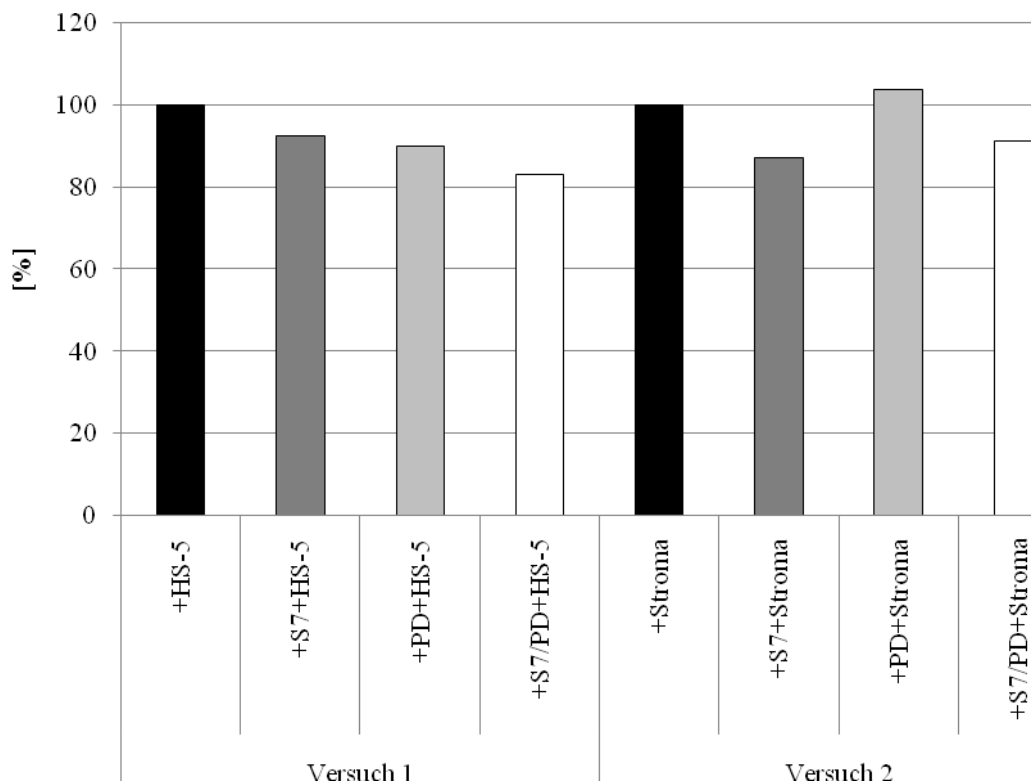


Abb. 24: Vergleich des Drei-Tages-Überleben von INA-6-Zellen in verschiedenen Kokulturbedingungen aus 2 verschiedenen Versuchen (Versuch 1/2), FACS-Analyse nach Annexin-V-FITC / PI - Färbung, Prozentuale Darstellung, Normierung auf 100% von +HS-5/+Stroma; + Stroma = INA-6-Zellen in Kokultur mit primärem Stroma, +HS-5=INA-6-Zellen in Kokultur mit HS-5-Zellen, +S7 = mit SANT-7, +PD = mit PD98059, +S7/PD = mit SANT-7 und PD 98059.

Primäres Stroma scheint Myelomzellen resistenter gegenüber einer Inhibition des STAT-3 und MAP-Kinase-Signalweges zu machen und somit protektiver auf diese zu wirken als HS-5. Es ist bekannt, dass Zelllinien immer nur einen Stromazelltyp mit dessen spezifischen Eigenschaften darstellen. Das Knochenmark besteht jedoch aus mehreren Stromazelltypen mit unterschiedlichen Eigenschaften (Torok-Storb et al., 1999). Die tatsächliche Situation in vivo lässt sich somit besser durch primäres Stroma abbilden. Es stellte sich die Frage, ob die untersuchten Signalwege unterschiedlich stark durch HS-5 oder primäre Stromazellen aktiviert wurden.

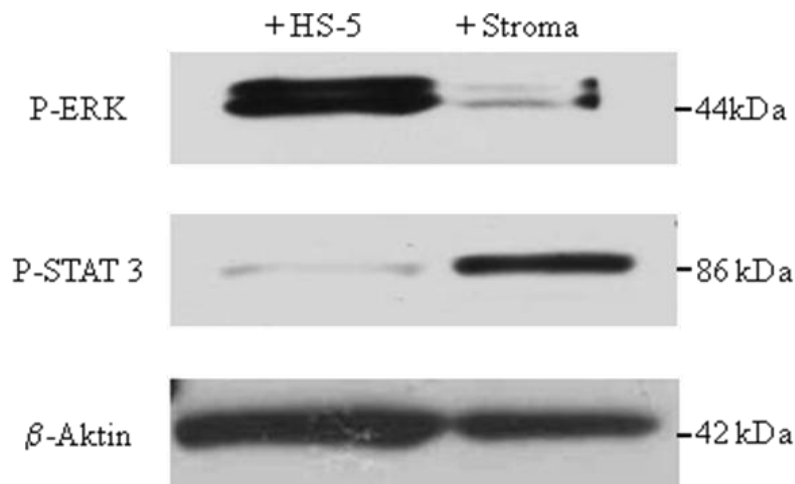


Abb. 25 : Western- Blot-Analyse von Lysaten von MM.1S-Zellen auf P-ERK und P-STAT-3 unter den Bedingungen HS-5 = MM.1S-Zellen in Kokultur mit HS-5-Zellen, Stroma = MM.1S-Zellen in Kokultur mit primärem Stroma; Antikörperinkubation mit P-ERK-Antikörper (=P-ERK), P-STAT-3-Antikörper (=P-STAT-3) und  $\beta$ -Aktin-Antikörper (=  $\beta$ -Aktin) zur Ladekontrolle.

Das P-ERK-Signal ist in Kokultur der INA-6 mit HS-5 stärker als in Kokultur mit primärem Stroma. Das P-STAT-3 Signal ist bei INA-6 Zellen in Kokultur mit primärem Stroma wesentlich stärker als bei INA-6-Zellen in Kokultur mit HS-5. Dies deckt sich auch mit weiteren Blots.

### 3.9. Suche nach weiteren Zielmolekülen

Mit den bisherigen Versuchen konnten bereits Unterschiede in der Signalweg-aktivierung der INA-6-Zellen auf Stroma oder Osteoklasten nachgewiesen werden. Es ist jedoch fraglich ob diese Unterschiede ausreichen einen so deutlichen Überlebensunterschied, wie ihn z.B. Abe et al. postulieren, zu erzeugen (Abe et al., 2004).

### 3.9.1. Western-Blot-Analyse mit P-Tyr-Antikörpern im 1-D-Gel

Möglicherweise sind noch weitere Signalwege in Anwesenheit von Stroma oder Osteoklasten aktiviert. Hierzu wurden die phosphorylierten Zwischenstufen der Signalwege untersucht. Eine ganze Reihe von Aminosäuren kann phosphoryliert werden. Tatsächlich werden hauptsächlich Serin und Threonin durch Serin/Threoninkinasen und Tyrosin durch Tyrosinkinasen phosphoryliert

Um einen möglichst großen Anteil der phosphorylierten Zwischenstufen von Signalwegen zu untersuchen wurden Phosphotyrosinantikörper im Western Blot verwendet. Phosphotyrosinantikörper binden an eine Vielzahl von Proteinen, die einen phosphorylierten Tyrosinrest aufweisen.

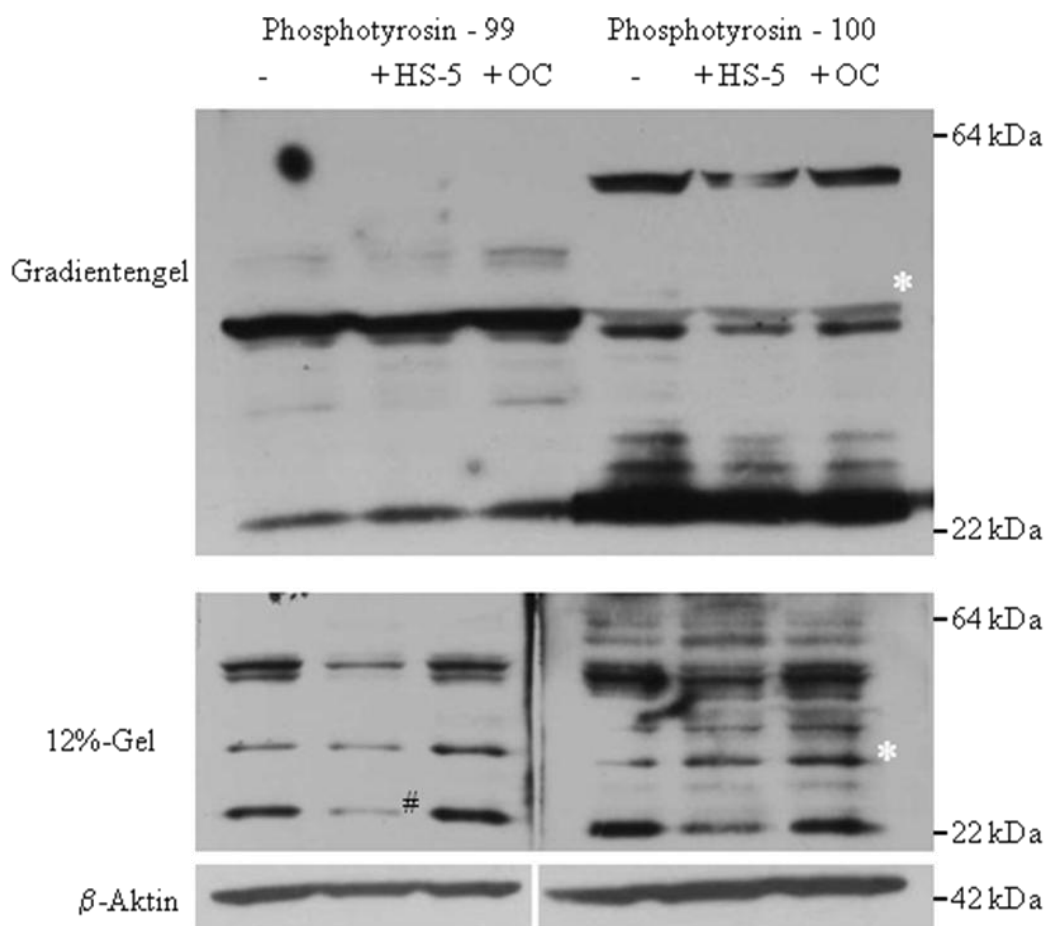


Abb. 26 : Western-Blot-Analyse von INA-6-Zelllysaten auf tyrosinphosphorylierte Proteine unter den Bedingungen - = INA-6-Zellen ohne Kokultur, HS-5 = INA-6-Zellen in Kokultur mit HS-5-Zellen, OC = INA-6-Zellen in Kokultur mit Osteoklasten; Antikörperinkubation mit dem Phosphotyrosin-99-Antikörper (=Phosphotyrosin-99), Phosphotyrosin-100-Antikörper (=Phosphotyrosin 100) und  $\beta$ -Aktin-Antikörper (=  $\beta$ -Aktin) zur Ladekontrolle; Der obere Blot stammt von der Gelelektrophorese eines Gradientengels, der untere Blot von der gelelektrophorese eines 12%-Gels.\*bezeichnet eine starke Proteinbande unter allen drei Bedingungen, # bezeichnet eine Bande mit niedrigerem Signal unter der Bedingung +HS-5 im Vergleich zu - und +OC.

In Abb. 26 sind mehrere deutliche Banden sichtbar. Mit dem Antikörper Phosphotyrosin 100 (P-Tyr-100) erscheinen mehr Banden als mit dem Antikörper Phosphotyrosin 99. Es sind wenig Unterschiede in der Intensität der Banden unter den Bedingungen ohne Kokultur, HS-5 und Osteoklasten zu erkennen. Die unterste Bande im 12% Gel zeigt eine geringere Intensität unter der Bedingung + HS-5 (Abb. 26, #). Eine starke Phosphorylierung ist zwischen 40 und 50 kDa in beidem Gelen nachweisbar (Abb.26,\*). Diese wird noch von weiterem Interesse sein.

### **3.9.2. Western Blot-Analyse mit P-Tyr-100 im 2-D-Gel**

#### **3.9.2.1. Durchführung**

Um genauere Aussagen über das Phosphorylierungsmuster unter den verschiedenen Bedingungen zu erhalten entschied man sich für eine Analyse im 2-D-Gel. Hierbei werden die Proteine nicht nur nach ihrer Größe wie im SDS-PAGE sondern auch noch nach ihrer Ladung aufgetrennt.

Im ersten Schritt werden die Proteine in einem Gelstreifen mit immobilisierten pH-Gradienten nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Proteine tragen eine unterschiedliche Anzahl von sauren bzw. basischen Gruppen. Je nach umgebendem pH-Wert nehmen diese Gruppen H<sup>+</sup> bzw. OH<sup>-</sup> Gruppen auf oder geben sie ab. Dies verändert ihre Eigenladung. An einem bestimmten pH-Wert gleichen sich die Ladungen der saueren und basischen Gruppen eines Proteins aus. Die Nettoladung ist null. Wird nun eine Spannung angelegt wandern die Proteine solange der entgegengesetzt geladenen Elektrode entgegen bis sie keine Nettoladung mehr besitzen. Dies ist der isoelektrische Punkt dieses Proteins. In einem zweiten Schritt wird der Gelstreifen mit Lämmli äquilibriert und einem normalen Polyacrylamidgel aufgesetzt. Es schließt sich eine normale Größenauftrennung im SDS-PAGE an.

Das Transkriptom einer Zelle wird so auf eine Fläche verteilt. Bei der eindimensionalen Auftrennung liegt in jeder Bande ein Gemisch verschiedener Proteine vor. Bei einer zweidimensionalen Auftrennung konzentriert sich das Protein definiert durch seinen pH-Wert und seiner Größe in einem Punkt (Spot). Hat man einen interessanten Spot identifiziert kann man diesen aus dem Gel ausschneiden und mittels Massenspektroskopie analysieren. Hierdurch lässt sich oft das gesuchte Protein identifizieren. Die 2-D-Gelelektrophorese wurde mit dem IPGRunner System der Firma Invitrogen durchgeführt (siehe Methoden). Die Proteine wurden im Bereich pH 3-10 nicht linear

isoelektrisch fokussiert. Anschließend wurden Sie in einem 4-20% Gradientengel nach Größe aufgetrennt. Es wurden 20 µl des nach Protokoll erstellten Lysates eingesetzt. Das Gel wurde 1h in Coomassie gefärbt und 12 h entfärbt.

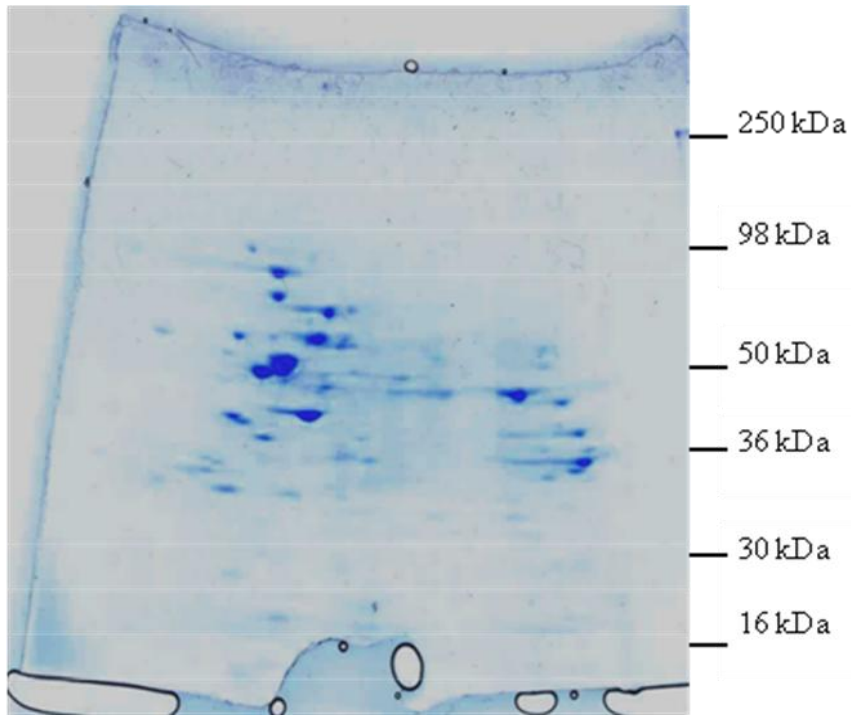


Abb. 27 : Coomassie gefärbtes 2-D-Gel mit Proteinspots (blaue Punkte); 1. Dimension: Isoelektrische Fokussierung pH 3-pH 10; 2. Dimension SDS-PAGE auf 4-20 % Gradientengel.

Wie in Abb. 27 zu sehen ist sind die Spots häufig vorkommender Proteine deutlich als blaue Punkte zu erkennen. Es ist also genug Protein für die Färbung vorhanden, andererseits jedoch nicht soviel, dass sich die Spots überlagern. Es wurde der Versuch ebenfalls mit der doppelten Menge Lysat durchgeführt. Die Einbringung von zusätzlichen Ladungen machte jedoch eine Isoelektrische Fokussierung bei hoher Spannung unmöglich.

Es wurden 2-D-Gele von den Lysaten INA-6 ohne Kokultur, in Kokultur mit HS-5 und in Kokultur mit Osteoklasten angefertigt. Diese wurden auf PVDF-Membranen gebロットet, um sie einer Western Blot-Analyse zugänglich zu machen. Der Vorteil einer Western Blot-Analyse liegt in der hohen Sensitivität im Vergleich zur Coomassie-Färbung. Außerdem sollten mittels des p-Tyr-100 Antikörpers nur Proteine mit einer Tyrosinphosphorylierung erkannt werden.

Es konnte ein Phosphorylierungsmuster mit dieser Methode abgebildet werden. Dies zeigen die z.T. schwachen Spots auf unterschiedlichen Höhen der Y-Achse (Molekular-



gewicht). Außerdem zeigte sich einer bzw. mehrere starke Spots auf einer Höhe. Dies entspricht möglicherweise einem Protein mit mehreren Phosphorylierungsstufen (siehe Abb. 28, Region A). Durch eine Phosphorylierung werden neue negative Ladungen in das Molekül eingebracht, sodass sich der isoelektrische Punkt verschiebt.

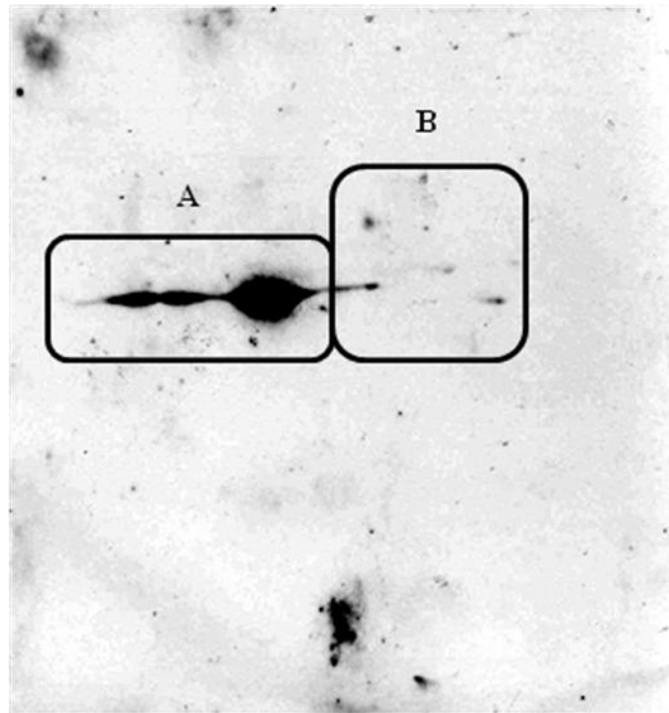


Abb. 28 : Western-Blot-Analyse eines 2-D-Gels auf tyrosinphosphorylierte Proteine, verwendetes Lysat von INA-6-Zellen in Kokultur mit Osteoklasten, Antikörperinkubation mit Phosphotyrosin-100-Antikörper; Detektierte Proteine: Region A zeigt mehrere Phosphorylierungsstufen desselben Proteins, Region B zeigt mehrere verschiedene tyrosinphosphorylierte Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten und isoelektrischen Punkten.

### 3.9.2.2. Ergebnisse

Mit dem Lysat von Myelomzellen ohne Kokultur konnte im 2-D-Gel keine starke Phosphorylierung abgebildet werden. Die schwachen Spots können schwache Phosphorylierungssignale oder Artefakte sein. Das Lysat von Myelomzellen in Kokultur mit HS-5 zeigt eine starke Phosphorylierung und eine schwächere auf gleicher Höhe. An derselben Stelle zeigt sich im 2-D-Gel von Lysaten von Myelomzellen in Kokultur mit Osteoklasten eine stärkere Phosphorylierung und zwei schwächere Phosphorylierungen auf gleicher Höhe (Abb. 29).

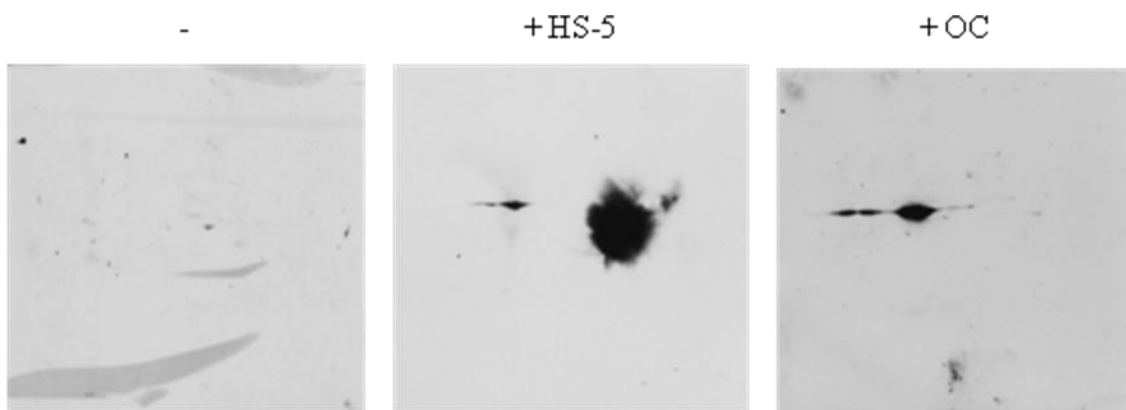


Abb. 29: Western-Blot-Analyse von 2-D-Gelen auf tyrosinphosphorylierte Proteine, eingesetzte Lysate: - = INA-6-Zellen ohne Kokultur, +HS-5 = INA-6-Zellen in Kokultur mit HS-5, +OC = INA-6-Zellen in Kokultur mit Osteoklasten; Antikörperinkubation mit Phosphotyrosin-100-Antikörper.

Im zweiten Blot ließ sich ein schwächeres Signal des Lysates ohne Kokultur nachweisen. Die Kokultur der INA-6 Zellen mit HS-5 und Osteoklasten führte zu einem etwa gleich starken Spot. Durch die Verwendung von Gradientengelen mit Marker ließ sich die Größe der Phosphorylierung auf 45-50 kDa festlegen (Abb. 30).

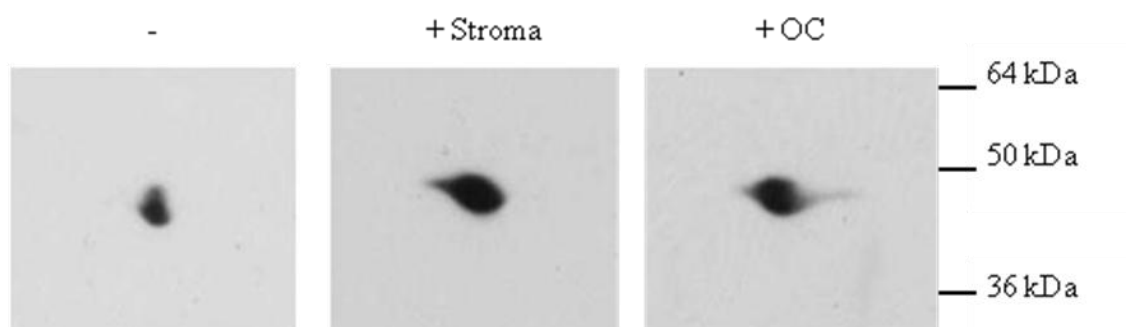


Abb. 30: Ausschnitte aus einer Western-Blot-Analyse von 2-D-Gelen mit INA-6-Zellysaten auf tyrosinphosphorylierte Proteine unter den Bedingungen - = INA-6-Zellen ohne Kokultur, +Stroma = INA-6-Zellen in Kokultur mit primärem Stroma, +OC = INA-6-Zellen in Kokultur mit Osteoklasten; Antikörperinkubation Phosphotyrosin-100.

Es ist anzunehmen, dass es sich hierbei um die Phosphorylierung bei 40-50 kDa im 1-D-Gel handelt (Abb.26,\*). Hierauf wurden neue Lysate hergestellt, wobei INA-6 Zellen in Kokultur mit primärem Stroma statt HS-5 benutzt wurden. Das Ergebnis der INA-6 Zellen auf primärem Stroma war in Bezug auf den starken Phosphorylierungspot dasselbe wie in Kokultur mit HS-5. Die Phosphorylierung ist bei INA-6 Zellen in Kokultur mit primärem Stroma und Osteoklasten gleich stark.

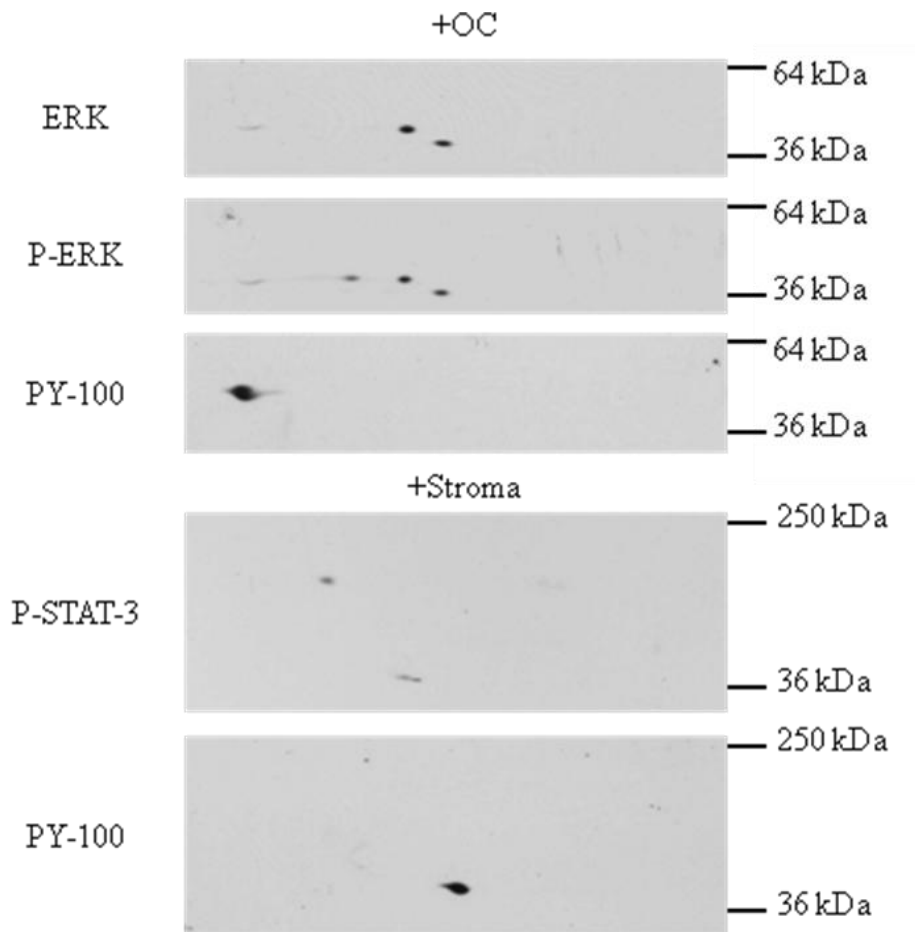


Abb. 31 : Ausschnitte aus Western-Blot-Analysen von 2-D-Gelen auf ERK, P-ERK, P-STAT-3 und Phosphotyrosin-100; Verwendete Lysate +OC = INA-6-Zellen in Kokultur mit Osteoklasten, +Stroma = INA-6-Zellen in Kokultur mit primärem Stroma; Antikörperinkubation mit ERK-Antikörper (=ERK), P-ERK-Antikörper (=P-ERK), P-Stat-3-Antikörper (=P-STAT-3) und Phosphotyrosin-100-Antikörper (=PY-100).

Es stellte sich die Frage um welches Protein es sich bei dem starken Spot in der Phosphotyrosin-100-Antikörper Inkubation handelt. Es stand die Vermutung, dass es sich hierbei um P-ERK handelt im Raum. P-ERK hat mit 44/42 kDa ein ähnliches

Molekulargewicht wie der Spot und ist tyrosinphosphoryliert. Außerdem ist der Phosphorylierungszustand in der Zelllinie INA-6 von der Kokultur mit Stroma und Osteoklasten abhängig (siehe Abschnitt 3.6.1.). Zur Überprüfung dieser These wurde der Blot "INA-6 + Osteoklasten" mit ERK und P-ERK inkubiert. Es zeigte sich, dass weder ERK noch Phospho-ERK an der Stelle des starken Phosphorylierungsspots liegen (siehe Abb. 31). Des Weiteren wurde die Lokalisation des Serinphosphorylierten P-STAT-3 Moleküls im Blot INA-6 + Stroma überprüft. Es zeigte sich ein Spot auf der zu erwartenden Höhe von 86 kDa. Der Isoelektrische Punkt lag stark im sauren pH-Bereich. Auch dieses Protein ist nicht mit dem starken Phosphorylierungssignal durch Phosphotyrosinantikörper identisch.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Methoden**

Als experimentelles Modell zur Untersuchung der Zusammenhänge im Knochenmarkmikromilieu wurden die Myelomzelllinien INA-6 und MM.1S, aus PBMC's generierte Osteoklasten, die Stromazelllinie HS-5 und später aus Knochenmarkstanzen kultiviertes primäres Stroma gewählt. Dieses Vorgehen garantierte eine gute Reproduzierbarkeit der Experimente. Außerdem bietet die Myelomzelllinie INA-6 die Möglichkeit der transienten Transfektion mittels Elektroporation (Chatterjee et al., 2004), welche für den Luciferaseassay mit dem 6xNF $\kappa$ B-luc-Plasmid nötig war. Viele Erkenntnisse zur Signaltransduktion im multiplen Myelom wurden durch Experimente mit Myelomzelllinien gewonnen und konnten später an primären Myelomzellen aus Knochenmarkstanzen verifiziert werden. In meiner Arbeit war es das Ziel Unterschiede in der Signalwegsaktivierung von Myelomzellen in Kokultur mit Osteoklasten gegenüber INA-6-Zellen in Kokultur mit Stromazellen oder INA-6-Zellen ohne Kokultur zu identifizieren. Diese Unterschiede müssen im nächsten Schritt durch die Pathologie an primären Myelomzellen im Knochenmarkmikromilieu validiert werden. Hierfür bieten sich Knochenmarksstanzen an.

Es wurde während der Experimente klar, dass primäres Stroma eine stärkere antiapoptotische und proliferationssteigernde Wirkung auf die Myelomzelllinien INA-6 und MM.1S hat als HS-5. In Western Blots zeigte sich, dass primäres Stroma zu einer stärkeren STAT-3-Phosphorylierung führt als HS-5, während HS-5 eine stärkere ERK-Phosphorylierung bewirkt als primäres Stroma. Es wurde also überwiegend primäres Stroma anstelle von HS-5 benutzt.

### **4.2. Überlebensassay**

Eindeutig ließ sich ein Überlebensvorteil von Myelomzellen in Kokultur mit Osteoklasten oder Knochenmarkstromazellen gegenüber Myelomzellen ohne Kokultur feststellen. Allerdings konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Überlebensvorteil in Kokultur mit Osteoklasten oder Knochenmarkstromazellen gefunden werden. Möglicherweise besteht kein signifikanter Unterschied zwischen dem Überlebensvorteil durch Osteoklasten oder Knochenmarkstromazellen. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass die Ergebnisse aufgrund des gewählten Modells (Myelomzelllinien) nicht den tatsächlichen Zustand im Knochenmark widerspiegeln.

Hemmung des IL-6-Rezeptor mit dem Il-6-Antagonist SANT-7 oder Inhibition von MEK 1/2 mittels PD 98059 oder Inhibition beider Strukturen des ERK/STAT-3-Signalweges reduziert das Überleben der Myelomzellen ohne Kokultur im Überlebensassay (normiert) bis auf 40% (siehe Abb. 14). Kokultur mit Osteoklasten bzw. Knochenmarkstromazellen wirkt auch hier in ähnlichem Maße antiapoptotisch mit 60 bzw. 90% (normiert) vitalen Zellen. Auch die Phosphorylierung von STAT-3 bzw. ERK1/2 war in Kokultur mit Knochenmarkstromazellen oder Osteoklasten unter Inhibition dieser Signalwege erhalten. Dies widerspricht Beobachtungen von Chatterjee et al. nach denen Myelomzellen in Kokultur mit Stromazellen durch Inhibition des ERK und STAT-3-Signalweges sowohl apoptotisch werden als auch keine STAT-3-Phosphorylierung mehr zeigen (Chatterjee et al., 2002). Dies deutet auf eine ungenügende gp130 Inhibition in meinen Versuchen hin.

Wenn es einen besseren Überlebensvorteil für Myelomzellen durch Kokultur mit Osteoklasten als durch Kokultur mit Knochenmarkstromazellen gibt, so wird dieser anscheinend nicht über den ERK oder STAT-3-Signalweg vermittelt.

#### **4.3. NFκB – Signalweg**

Der von Osteoklasten vermittelte Überlebensvorteil ist von Zellkontakten mit Myelomzellen abhängig (Abe et al., 2004). Deshalb ist der NFκB-Signalweg, welcher von vielen Rezeptoren für membrangebundene Liganden wie z.B. der TNF-Rezeptorenfamilie (Hehlhans and Pfeffer, 2005) aktiviert wird für die Fragestellung sehr interessant. Zudem wies Annunziata et al. eine NFκB-Aktivierung von Myelomzellen in 82% primärer Knochenmarkstanzen nach (Annunziata et al., 2007). Nur in 16% der Knochenmarkstanzen konnte die NFκB-Aktivierung auf genetische Abnormitäten zurückgeführt werden. Die restlichen Fälle der NFκB-Aktivierung sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf das Knochenmarkmikromilieu zurückzuführen (Landowski et al., 2003).

Es wurde der sehr sensitive Luciferaseassay zur Untersuchung der NFκB-Aktivierung herangezogen. Es zeigte sich ein starker Anstieg der NFκB-Aktivität in Myelomzellen in Kokultur mit Stroma oder Osteoklasten im Vergleich zu Myelomzellen ohne Unterstützung. Die im Photometer gemessene Lumineszenz entspricht in diesem Versuch der NFκB-Aktivierung. Die höchste Lumineszenz, und damit NFκB-Aktivität, mit dem fünffachen der Lumineszenz von Myelomzellen ohne Unterstützung erzielten

Myelomzellen in Kokultur mit Osteoklasten. Stromazellen führten nur zu einer vierfachen stärkeren Lumineszenz als Myelomzellen ohne Unterstützung (Abb. 18). Der NFκB-Signalweg ist also in Myelomzellen in Kokultur mit Osteoklasten stark aktiviert. Außerdem weist dieses Experiment und weitere, hier nicht gezeigte, Luciferaseassays auf eine stärkere Aktivierung des NFκB-Signalweg in Myelomzellen in Kokultur mit Osteoklasten als mit Stromazellen.

Weiter gestützt wird diese Ansicht durch eine Western Blotanalyse von IκBα, einem NFκB-Zielgen (siehe Abschnitt 1.3.4.2.). Dieses ist in Kokultur mit Osteoklasten deutlich mehr als in Kokultur mit Stroma exprimiert. Auch zeigen Myelomzellen in Kokultur mit HS-5/Stroma auch eine höhere IκBα-Expression als Myelomzellen ohne Unterstützung.

Die Aufhebung von Zellkontakten in der Kokultur mittels Transwells führte zu einer starken Abnahme der NFκB-Aktivität in der Kokultur sowohl mit Osteoklasten als auch mit Stromazellen auf das zweifache der Lumineszenz von Myelomzellen ohne Unterstützung. Die NFκB-Aktivierung von Myelomzellen in Kokultur mit Osteoklasten oder Stromazellen scheint großteils Zellkontakt abhängig zu sein. Dies stimmt wiederum mit den Daten von Abe et al. überein, dass der Wachstumsvorteil von Myelomzellen in Kokultur mit Osteoklasten Zellkontakt abhängig ist (Abe et al., 2004). Dieser wies jedoch eine Beteiligung von den NFκB-unabhängigen Integrinen VLA-4 und  $\alpha_v\beta_3$  nach. Eine NFκB-Aktivierung führt zu einer Aktivierung von antiapoptotischen Genen wie BCL-2 und BCL-XL, dem Enzym Telomerase (Yin et al., 2000) und angio-genetischen Faktoren wie VEGF-C und PLGF (Chilov et al., 1997; Cramer et al., 2005). In INA-6 Zellen ist nachgewiesen, dass eine Hemmung des NFκB-Signalweges durch den IKKβ-Inhibitor MLN120B zu einer Apoptoseinduktion führt (Hideshima et al., 2006). In wie weit eine höhere NFκB-Aktivierung als in Myelomzellen ohne Kokultur zu einem weiteren Überlebensvorteil führt müsste noch experimentell untersucht werden. Aus Gründen der hohen Transfektionseffizienz mittels Elektroporation von INA-6-Zellen gegenüber anderen Myelomzelllinien wurde der Luciferaseassay nur mit INA-6-Zellen durchgeführt. Eine Untersuchung anderer Myelomzelllinien wäre ebenfalls interessant. Es ist durchaus wahrscheinlich, dass der NFκB-Signalweg zum Zellkontakt abhängigen Überleben der Myelomzellen in Kokultur mit Osteoklasten beiträgt. Die NFκB-Aktivierung ist auch eindeutig höher in Myelomzellen in Kokultur mit Osteoklasten als

in Myelomzellen in Kokultur mit Stromazellen. Deshalb könnte die NFκB-Aktivierung für einen von der Arbeitsgruppe Bargou (Med. Klinik II, Universität Würzburg) und Abe et al. beobachteten signifikanten Überlebensvorteil von Myelomzellen in Kokultur mit Osteoklasten gegenüber Myelomzellen in Kokultur mit Stromazellen verantwortlich sein. Um die Wertigkeit dieser Ergebnisse für das multiple Myelom in vivo zu untersuchen wäre eine Anfärbung von NFκB-p65 in Knochenmarkstanzen interessant. Mittels eines NFκB-P65-Antikörper kann die Lokalisation des Transkriptionsfaktors NFκB bestimmt werden. Eine nukleäre Lokalisation weist auf eine NFκB-Aktivierung hin.

Eine weitere Analyse der NFκB-Aktivierung könnte Aufschluß über die Ursache der zellkontaktabhängigen Aktivierung geben. Eine Untersuchung ob der kanonische oder alternative NFκB-Signalweg aktiviert ist kann die in Frage kommenden Rezeptoren eingrenzen. Letztlich wäre es sinnvoll den für die NFκB-Aktivierung verantwortlichen Rezeptor zu finden. Dies könnte zum Beispiel durch das Durchmustern inhibitorischer Antikörper gegen TNF-Rezeptoren geschehen.

Kandidaten sind Rezeptoren des B-Zell aktivierende Faktor BAFF. BAFF aktiviert in Myelomzellen hauptsächlich über die Rezeptoren *transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor* (TACI) und *B-cell maturation antigen* (BCMA) NFκB und führt zu einem besseren Überleben der Myelomzellen (Moreaux et al., 2004). BAFF ist ein zunächst membrangebundener Faktor, der proteolytisch freigesetzt werden kann (Schneider et al., 1999).

#### **4.4. Analyse des MAPK/ERK-, STAT-3-, und AKT-Signalweg**

##### **4.4.1. ERK-Signalweg**

Die Aktivierung des ERK-Signalweges wurde mittels Western-Blot mit P-ERK-Antikörpern ermittelt. Es zeigte sich sowohl in der Zelllinie INA-6 als auch MM.1S eine fast identische ERK-Phosphorylierung. ERK ist in Myelomzellen in Kokultur mit Osteoklasten oder Stromazellen gleichermaßen stärker als in Myelomzellen ohne Kokultur aktiviert. Mittels MAPK antisense Oligodesoxynukleotiden konnte der ERK-Signalweg blockiert werden und ein antiproliferativer Effekt erzielt werden (Ogata et al., 1997b). Die erhöhte ERK-Aktivierung in Kokultur mit Osteoklasten/Stromazellen wird wahrscheinlich zum besseren Überleben der Zellen in Kokultur beitragen.



Lentzsch et al. untersuchten eine ganze Reihe von Zytokinen, welche von Myelomzellen oder den Zellen des Knochenmarkmikromilieus sezerniert werden und deren Rezeptoren in Myelomzellen exprimiert werden. IL-6, bFGF, IL-1 $\beta$ , MIP-1 $\alpha$ , LIF, VEGF, SDF-1 $\alpha$ , IL-3 und SCF aktivieren den ERK-Signalweg. Außerdem wirken sie proliferativ und bis auf IL-1 $\beta$  auch antiapoptotisch (Lentzsch et al., 2004). Es ist anzunehmen, dass in Kokultur sowohl mit Osteoklasten, als auch mit Stromazellen mehrere Zytokine den ERK-Signalweg aktivieren. Allerdings scheint aufgrund der ERK-Aktivierung durch mehrere Zytokine ein einzelner Rezeptor als Zielstruktur zur Entwicklung eines Inhibitors des ERK-Signalweges wenig aussichtsreich.

#### **4.4.2. STAT-3**

Ebenfalls die STAT-3-Aktivierung wurde mittels Western Blot untersucht. Stroma als bekanntermaßen starker Induktor der STAT-3-Phosphorylierung führte zu einer starken Aktivierung des STAT-3-Signalweges. Myelomzellen in Kokultur mit Osteoklasten zeigten jedoch keine (INA-6) oder nur eine schwache (MM.1S) STAT-3-Phosphorylierung. IL-6 wirkt auf Myelomzellen über den STAT-3-Signalweg stark proliferativ. Inhibition der STAT-3-Phosphorylierung durch JAK2-Inhibition führt zur Apoptoseinduktion (De Vos et al., 2000). Der STAT-3-Signalweg trägt also nicht zum besseren Überleben der Myelomzellen in Kokultur mit Osteoklasten bei. Dies zeigt, dass durch Osteoklasten eine andere Auswahl an Signalwegen aktiviert wird als durch Stromazellen. Die Wertigkeit des IL-6/STAT-3-Signalweges als unentbehrlicher Vermittler von antiapoptotischen und proliferationssteigernden Signalen beim multiplen Myelom wurde klinisch widerlegt. In einer Studie mit einem monoklonalen Anti-IL-6-Antikörper konnte keine Remission der Erkrankung erzielt werden (Bataille et al., 1995). Dies wird auch durch die Ergebnisse von Chatterjee et al. gestützt wonach im Knochenmarkmikromilieu sowohl der STAT-3 als auch der ERK-Signalweg gehemmt werden müssen, um Apoptose in Myelomzellen auszulösen.

#### **4.4.3. AKT**

Die Western Blot Analyse von P-AKT zeigte in Myelomzellen in Kokultur im Vergleich zu Myelomzellen ohne Unterstützung keinen Anstieg der Phosphorylierung. Weder die Kokultur mit Osteoklasten noch die Kokultur mit Stromazellen führen zu einer Überlebensverbesserung über den AKT-Signalweg.

Neue Ergebnisse zur Bedeutung von AKT unterstützen dieses Ergebnis. Zöllinger et al. konnte sowohl an primären Myelomzellen als auch an Myelomzelllinien zwei Subgruppen der AKT-Aktivierung identifizieren. Etwa die Hälfte der Proben wiesen eine konstitutive starke AKT-Phosphorylierung auf, während die andere Hälfte nur eine geringe AKT-Phosphorylierung aufwies. Eine konstitutive AKT-Aktivierung ist zu 20% durch eine PTEN-Deletion hervorgerufen. Ein großer Anteil muss jedoch durch bisher unbekannte genetische Veränderungen hervorgerufen sein. Nur in der Gruppe der konstitutiven AKT-Aktivierung konnte durch AKT-Blockade Apoptose induziert werden. In der Gruppe geringer AKT-Phosphorylierung konnte selbst eine zusätzliche Blockade des MAPK und STAT-3-Signalweges keinen Anstieg der Apoptose induzieren (Zöllinger et al., 2008).

Der AKT-Signalweg scheint also als Überlebensfaktor nur in der Hälfte der multiplen Myelome von Bedeutung zu sein und seine Aktivierung ist wesentlich mehr von genetischen Faktoren als vom Knochenmarkmikromilieu abhängig.

Alle drei Signalwege tragen sicherlich zum Überleben der Myelomzellen bei. Ein besseres Überleben der Myelomzellen in Kokultur mit Osteoklasten oder Stroma im Vergleich zu Myelomzellen ohne Unterstützung zeigte sich im Überlebensassay (siehe Abschnitt 3.3.) Ebenso zeigte die Westernblotanalyse eine stärkere Aktivierung des AKT-MAP-Kinase und STAT-3-Signalweges in Myelomzellen in Kokultur mit Osteoklasten oder Stroma als in Myelomzellen ohne Unterstützung (siehe Abschnitt 3.6.).

Diese drei Signalwege sind jedoch sicherlich nicht für ein besseres Überleben der Myelomzellen in Kokultur mit Osteoklasten als in Kokultur mit Stromazellen verantwortlich. Weder im Überlebensassay unter Zugabe von Inhibitoren des MAP-Kinase/ERK und STAT-3-Signalweges zeigten sich signifikante Unterschiede im Überleben der Myelomzellen in Kokultur mit Osteoklasten oder Stromazellen (siehe Abschnitte 4.2, 3.3-3.4), noch konnte ein klarer Unterschied in der Westernblotanalyse der phosphorylierten Zwischenstufen des AKT-MAP-Kinase und STAT-3-Signalweges dedektiert werden (siehe Abschnitt 3.6).

#### **4.4.4. Apoptoseregulation**

Viele Wirkungen von Signalwegen werden über die Apoptoseregulation vermittelt. Eine Reihe von Proteinen regulieren die Permeabilität der Mitochondrien für Cytochrom c. Der Ausstrom von Cytochrom c aus den Mitochondrien ist der zentrale Schritt der Einleitung der intrinsischen Apoptose. An antiapoptotischen Proteinen wurden Bcl-2 und Mcl-1 untersucht, an proapoptotischen Bax. Es ist bekannt, dass Apoptosegene im Multiplen Myelom und normalen Plasmazellen unterschiedlich stark exprimiert werden (Spets et al., 2002). Insbesondere die Expression von Mcl-1 wurde als essentieller Überlebensfaktor für Myelomzellen nachgewiesen (Derenne et al., 2002). Das proapoptotische Protein Bax ist in Myelomzellen ohne Kokultur und in Kokultur mit Osteoklasten gleich stark exprimiert. Myelomzellen in Kokultur mit Stromazellen exprimieren das proapoptotische Gen Bax weniger stark und sind so wahrscheinlich besser vor der Einleitung der Apoptose geschützt. Der Überlebensvorteil von Myelomzellen in Kokultur mit Osteoklasten wird hierdurch jedoch nicht erklärt. Die Expression von Bcl-2 und Mcl-1 in Myelomzellen in Kokultur mit Osteoklasten oder Stromazellen wich nicht von der Expression in Myelomzellen ohne Kokultur ab. Anscheinend wird der Überlebensvorteil für Myelomzellen in Kokultur mit Stromazellen oder Osteoklasten nicht über Bcl-2 oder Mcl-1 vermittelt. Möglicherweise wird der Überlebensvorteil nicht über eine Apoptosehemmung sondern eher über proliferationsfördernde Effekte vermittelt. Andererseits ist es auch möglich, dass andere nicht analysierte Proteine der Apoptoseregulation einen weiteren Beitrag zum besseren Zellüberleben von Myelomzellen in Kokulturen leisten.

#### **4.4.5. Suche nach weiteren Signalwegen**

Von den untersuchten Signalwegen gibt nur der NFκB-Signalweg eine Erklärung für den Überlebensvorteil von Myelomzellen in Kokultur mit Osteoklasten gegenüber Myelomzellen in Kokultur mit Knochenmarkstromazellen. Deshalb erschien es sinnvoll nach der unterschiedlichen Aktivierung weiterer Signalwege in Myelomzellen in Kokultur mit Osteoklasten oder Knochenmarkstromazellen zu suchen. In den meisten Signalwegen wird das Signal durch die konsekutive Phosphorylierung von Proteinen in einer Kaskade weitergegeben und amplifiziert. Dies geschieht durch Serin/Threonin oder Tyrosinkinase. Die durch die Kinasen phosphorylierten Proteine werden häufig aktiviert und entwickeln selber eine Kinaseaktivität oder rekrutieren Proteine zur

Signalweitergabe. Phosphorylierte Proteine lassen sich mit spezifischen Phosphoantikörpern im Western Blot detektieren. Besonders gute Antikörper stehen für die Detektion von Phosphotyrosinseitengruppen von Aminosäuren zur Verfügung. Eine Detektion von Phosphoserin- und Phosphothreoninseitengruppen ist mit diesen Antikörpern jedoch nicht möglich. Zunächst wurden im 1-dimensionalen Western Blot die Phosphotyrosinantikörper p-Tyr 100 und p-Tyr 99 getestet. Es zeigte sich mit beiden ein Bandenmuster mit Unterschieden in der Intensität der Banden unter den Bedingungen Myelomzellen ohne Unterstützung, in Kokultur mit Stromazellen und in Kokultur mit Osteoklasten. Da der p-Tyr 100-Antikörper im 1-D-Gel mehr Proteine detektierte entschied man sich mit diesem weiter zu arbeiten. Obwohl die Proteine im Polyacrylamidgel nach ihrer Größe aufgetrennt vorliegen, liegt in jeder Bande dennoch ein Gemisch verschiedener Proteine vor. Um dieses weiter zu differenzieren bietet sich die 2-D-Gelelektrophorese an. In dieser wird das Proteom einer Zelle sowohl nach Größe als auch nach Ladung aufgetrennt und jedes Protein wird an einem Punkt einer Fläche fokussiert. In der 2-D-Gelelektrophorese konnte nach Blotten auf eine PVDF-Membran mit dem p-Tyr-100 Antikörper ein tyrosinphosphoryliertes Protein detektiert werden. Dieses zeigte sich im ersten Blot nicht in Lysaten von Myelomzellen ohne Unterstützung, stark im Blot der Lysate von Myelomzellen in Kokultur mit Stromazellen und am stärksten in Lysaten von Myelomzellen in Kokultur mit Osteoklasten. Außerdem ließen sich bei Lysaten in Kokultur mit Stromazellen/Osteoklasten 1/2 kleinere Phosphorylierungen auf gleicher Höhe nachweisen. Möglicher Weise handelt es sich bei diesen um weitere Phosphorylierungsstufen desselben Proteins. Die Größe des Proteins wurde im Bereich 40-50 kDa festgestellt. Die Membran wurde außerdem mit ERK-, P-ERK- und P-STAT-3-Antikörpern inkubiert. Die Spots waren nicht an der Stelle der mittels p-Tyr-Antikörper ermittelten Phosphorylierung. AKT wird an einer Threoninseitenkette phosphoryliert (Duronio, 2008) und kann somit nicht durch Phosphotyrosinantikörper detektiert werden. Es handelt sich bei der mittels p-Tyr-100 detektierten Phosphorylierung also nicht um P-ERK, P-STAT-3 oder P-AKT. Es wäre weiterhin interessant das detektierte Protein zu identifizieren. Hierzu bietet sich die Untersuchung des Spots in der Massenspektrometrie an. In Protein-Datenbanken lassen sich die Ergebnisse abgleichen und das Protein kann identifiziert werden. Nach der

Identifikation des phosphorylierten Proteins ist auch in diesem Fall der Nachweis der Bedeutung für das multiple Myelom an primärem Material zu erbringen.

## 5. Literaturverzeichnis:

Abe, M., Hiura, K., Wilde, J., Shioyasono, A., Moriyama, K., Hashimoto, T., Kido, S., Oshima, T., Shibata, H., Ozaki, S., *et al.* (2004). Osteoclasts enhance myeloma cell growth and survival via cell-cell contact: a vicious cycle between bone destruction and myeloma expansion. *Blood* 104, 2484-2491.

Annunziata, C.M., Davis, R.E., Demchenko, Y., Bellamy, W., Gabrea, A., Zhan, F., Lenz, G., Hanamura, I., Wright, G., Xiao, W., *et al.* (2007). Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer cell* 12, 115-130.

Attal, M., Harousseau, J.L., Stoppa, A.M., Sotto, J.J., Fuzibet, J.G., Rossi, J.F., Casassus, P., Maisonneuve, H., Facon, T., Ifrah, N., *et al.* (1996). A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *The New England journal of medicine* 335, 91-97.

Barille-Nion, S., Barlogie, B., Bataille, R., Bergsagel, P.L., Epstein, J., Fenton, R.G., Jacobson, J., Kuehl, W.M., Shaughnessy, J., and Tricot, G. (2003). Advances in biology and therapy of multiple myeloma. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology*, 248-278.

Bataille, R., Barlogie, B., Lu, Z.Y., Rossi, J.F., Lavabre-Bertrand, T., Beck, T., Wijdenes, J., Brochier, J., and Klein, B. (1995). Biologic effects of anti-interleukin-6 murine monoclonal antibody in advanced multiple myeloma. *Blood* 86, 685-691.

Bataille, R., Chappard, D., Marcelli, C., Dessauw, P., Baldet, P., Sany, J., and Alexandre, C. (1991). Recruitment of new osteoblasts and osteoclasts is the earliest critical event in the pathogenesis of human multiple myeloma. *The Journal of clinical investigation* 88, 62-66.

Bendall, H.H., Sikes, M.L., Ballard, D.W., and Oltz, E.M. (1999). An intact NF-kappa B signaling pathway is required for maintenance of mature B cell subsets. *Molecular immunology* 36, 187-195.

Berger, L.C., Hawley, T.S., Lust, J.A., Goldman, S.J., and Hawley, R.G. (1994). Tyrosine phosphorylation of JAK-TYK kinases in malignant plasma cell lines growth-stimulated by interleukins 6 and 11. *Biochemical and biophysical research communications* 202, 596-605.

Böhrer, S., and Pönisch, W. (2001). Multiples Myelom. In *Non-Hodgkin-Lymphome*, P. Mitrou, ed., pp. 293-329.

Bolick, S.C., Landowski, T.H., Boulware, D., Oshiro, M.M., Ohkanda, J., Hamilton, A.D., Sebti, S.M., and Dalton, W.S. (2003). The farnesyl transferase inhibitor, FTI-277, inhibits growth and induces apoptosis in drug-resistant myeloma tumor cells. *Leukemia* 17, 451-457.

Breitkreutz, I., Raab, M.S., Vallet, S., Hideshima, T., Raju, N., Chauhan, D., Munshi, N.C., Richardson, P.G., and Anderson, K.C. (2007). Targeting MEK1/2 blocks osteoclast differentiation, function and cytokine secretion in multiple myeloma. *British journal of haematology* *139*, 55-63.

Brumatti, G., Sheridan, C., and Martin, S.J. (2008). Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. *Methods (San Diego, Calif)* *44*, 235-240.

Buettner, R., Mora, L.B., and Jove, R. (2002). Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* *8*, 945-954.

Burger, R., Guenther, A., Bakker, F., Schmalzing, M., Bernand, S., Baum, W., Duerr, B., Hocke, G.M., Steininger, H., Gebhart, E., *et al.* (2001). Gp130 and ras mediated signaling in human plasma cell line INA-6: a cytokine-regulated tumor model for plasmacytoma. *Hematol J* *2*, 42-53.

Caligaris-Cappio, F., Gregoret, M.G., Merico, F., Gottardi, D., Ghia, P., Parvis, G., and Bergui, L. (1992). Bone marrow microenvironment and the progression of multiple myeloma. *Leukemia & lymphoma* *8*, 15-22.

Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J.L., Nunez, G., *et al.* (1999). Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* *10*, 105-115.

Chatterjee, M., Honemann, D., Lentzsch, S., Bommert, K., Sers, C., Herrmann, P., Mathas, S., Dorken, B., and Bargou, R.C. (2002). In the presence of bone marrow stromal cells human multiple myeloma cells become independent of the IL-6/gp130/STAT3 pathway. *Blood* *100*, 3311-3318.

Chatterjee, M., Stuhmer, T., Herrmann, P., Bommert, K., Dorken, B., and Bargou, R.C. (2004). Combined disruption of both the MEK/ERK and the IL-6R/STAT3 pathways is required to induce apoptosis of multiple myeloma cells in the presence of bone marrow stromal cells. *Blood* *104*, 3712-3721.

Chauhan, D., Uchiyama, H., Akbarali, Y., Urashima, M., Yamamoto, K., Libermann, T.A., and Anderson, K.C. (1996). Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood* *87*, 1104-1112.

Child, J.A., Morgan, G.J., Davies, F.E., Owen, R.G., Bell, S.E., Hawkins, K., Brown, J., Drayson, M.T., and Selby, P.J. (2003). High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *The New England journal of medicine* *348*, 1875-1883.

- Chilov, D., Kukk, E., Taira, S., Jeltsch, M., Kaukonen, J., Palotie, A., Joukov, V., and Alitalo, K. (1997). Genomic organization of human and mouse genes for vascular endothelial growth factor C. *The Journal of biological chemistry* 272, 25176-25183.
- Cramer, M., Nagy, I., Murphy, B.J., Gassmann, M., Hottiger, M.O., Georgiev, O., and Schaffner, W. (2005). NF-kappaB contributes to transcription of placenta growth factor and interacts with metal responsive transcription factor-1 in hypoxic human cells. *Biological chemistry* 386, 865-872.
- Damiano, J.S., Cress, A.E., Hazlehurst, L.A., Shtil, A.A., and Dalton, W.S. (1999). Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood* 93, 1658-1667.
- Davis, B., and L., O. (1959). A new high resolution electrophoresis method (Society for the Study of Blood at the New York Academy of Medicine).
- De Vos, J., Jourdan, M., Tarte, K., Jasmin, C., and Klein, B. (2000). JAK2 tyrosine kinase inhibitor tyrphostin AG490 downregulates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) and signal transducer and activator of transcription (STAT) pathways and induces apoptosis in myeloma cells. *British journal of haematology* 109, 823-828.
- Dejardin, E. (2006). The alternative NF-kappaB pathway from biochemistry to biology: pitfalls and promises for future drug development. *Biochemical pharmacology* 72, 1161-1179.
- Demartis, A., Bernassola, F., Savino, R., Melino, G., and Ciliberto, G. (1996). Interleukin 6 receptor superantagonists are potent inducers of human multiple myeloma cell death. *Cancer research* 56, 4213-4218.
- Derenne, S., Monia, B., Dean, N.M., Taylor, J.K., Rapp, M.J., Harousseau, J.L., Bataille, R., and Amiot, M. (2002). Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood* 100, 194-199.
- Dhalin, D. (1978). Bone Tumors.
- Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., and Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 3279-3290.
- Durie, B.G., and Salmon, S.E. (1975). A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 36, 842-854.
- Duronio, V. (2008). The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *The Biochemical journal* 415, 333-344.
- Farrugia, A.N., Atkins, G.J., To, L.B., Pan, B., Horvath, N., Kostakis, P., Findlay, D.M., Bardy, P., and Zannettino, A.C. (2003). Receptor activator of nuclear factor-kappaB



ligand expression by human myeloma cells mediates osteoclast formation in vitro and correlates with bone destruction in vivo. *Cancer research* 63, 5438-5445.

Franke, T.F., Hornik, C.P., Segev, L., Shostak, G.A., and Sugimoto, C. (2003). PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene* 22, 8983-8998.

Fukada, T., Hibi, M., Yamanaka, Y., Takahashi-Tezuka, M., Fujitani, Y., Yamaguchi, T., Nakajima, K., and Hirano, T. (1996). Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity* 5, 449-460.

Gauthier, E.R., Piche, L., Lemieux, G., and Lemieux, R. (1996). Role of bcl-X(L) in the control of apoptosis in murine myeloma cells. *Cancer research* 56, 1451-1456.

Ge, N.L., and Rudikoff, S. (2000a). Expression of PTEN in PTEN-deficient multiple myeloma cells abolishes tumor growth in vivo. *Oncogene* 19, 4091-4095.

Ge, N.L., and Rudikoff, S. (2000b). Insulin-like growth factor I is a dual effector of multiple myeloma cell growth. *Blood* 96, 2856-2861.

Giuliani, N., Bataille, R., Mancini, C., Lazzaretti, M., and Barille, S. (2001). Myeloma cells induce imbalance in the osteoprotegerin/osteoprotegerin ligand system in the human bone marrow environment. *Blood* 98, 3527-3533.

Glass, D.A., 2nd, Bialek, P., Ahn, J.D., Starbuck, M., Patel, M.S., Clevers, H., Taketo, M.M., Long, F., McMahon, A.P., Lang, R.A., *et al.* (2005). Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Developmental cell* 8, 751-764.

Guo, W., and Giancotti, F.G. (2004). Integrin signalling during tumour progression. *Nature reviews* 5, 816-826.

Hampf, M., and Gossen, M. (2006). A protocol for combined Photinus and Renilla luciferase quantification compatible with protein assays. *Analytical biochemistry* 356, 94-99.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132, 344-362.

Hehlhans, T., and Pfeffer, K. (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115, 1-20.

Herzenberg, L.A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O., Roederer, M., and Herzenberg, L.A. (2002). The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clinical chemistry* 48, 1819-1827.

Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Hayashi, T., Munshi, N., Dang, L., Castro, A., Palombella, V., *et al.* (2002). NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *The Journal of biological chemistry* 277, 16639-16647.

Hideshima, T., Nakamura, N., Chauhan, D., and Anderson, K.C. (2001). Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene* 20, 5991-6000.

Hideshima, T., Neri, P., Tassone, P., Yasui, H., Ishitsuka, K., Raje, N., Chauhan, D., Podar, K., Mitsiades, C., Dang, L., *et al.* (2006). MLN120B, a novel IkappaB kinase beta inhibitor, blocks multiple myeloma cell growth in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 12, 5887-5894.

Hirano, T., Nakajima, K., and Hibi, M. (1997). Signaling mechanisms through gp130: a model of the cytokine system. *Cytokine & growth factor reviews* 8, 241-252.

Honemann, D., Chatterjee, M., Savino, R., Bommert, K., Burger, R., Gramatzki, M., Dorken, B., and Bargou, R.C. (2001). The IL-6 receptor antagonist SANT-7 overcomes bone marrow stromal cell-mediated drug resistance of multiple myeloma cells. *International journal of cancer* 93, 674-680.

Invitrogen (2004). ZOOM® IPGRunner™ System For isoelectric focusing of ZOOM® Strips

Jefferies, H.B., Fumagalli, S., Dennis, P.B., Reinhard, C., Pearson, R.B., and Thomas, G. (1997). Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *The EMBO journal* 16, 3693-3704.

Jost, P.J., and Ruland, J. (2007). Aberrant NF-kappaB signaling in lymphoma: mechanisms, consequences, and therapeutic implications. *Blood* 109, 2700-2707.

Junqueira, C., and Carneiro, J. (2005). *Histologie*.

Kawano, M., Hirano, T., Matsuda, T., Taga, T., Horii, Y., Iwato, K., Asaoku, H., Tang, B., Tanabe, O., Tanaka, H., *et al.* (1988). Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 332, 83-85.

Khan, S.B., Maududi, T., Barton, K., Ayers, J., and Alkan, S. (2004). Analysis of histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228), effect on multiple myeloma. *British journal of haematology* 125, 156-161.

Kohno, M., and Pouyssegur, J. (2006). Targeting the ERK signaling pathway in cancer therapy. *Annals of medicine* 38, 200-211.

Kyle, R.A., and Rajkumar, S.V. (2008). Multiple myeloma. *Blood* 111, 2962-2972.

Lacey, D.L., Timms, E., Tan, H.L., Kelley, M.J., Dunstan, C.R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., *et al.* (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93, 165-176.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Landowski, T.H., Olashaw, N.E., Agrawal, D., and Dalton, W.S. (2003). Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) is associated with activation of NF-kappa B (RelB/p50) in myeloma cells. *Oncogene* 22, 2417-2421.

Lee, Z.H., and Kim, H.H. (2003). Signal transduction by receptor activator of nuclear factor kappa B in osteoclasts. *Biochemical and biophysical research communications* 305, 211-214.

Lentzsch, S., Chatterjee, M., Gries, M., Bommert, K., Gollasch, H., Dorken, B., and Bargou, R.C. (2004). PI3-K/AKT/FKHR and MAPK signaling cascades are redundantly stimulated by a variety of cytokines and contribute independently to proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia* 18, 1883-1890.

Levy, D.E., and Darnell, J.E., Jr. (2002). Stats: transcriptional control and biological impact. *Nature reviews* 3, 651-662.

Li, J., Sarosi, I., Yan, X.Q., Morony, S., Capparelli, C., Tan, H.L., McCabe, S., Elliott, R., Scully, S., Van, G., *et al.* (2000). RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 1566-1571.

Li, Z.W., Chen, H., Campbell, R.A., Bonavida, B., and Berenson, J.R. (2008). NF-kappaB in the pathogenesis and treatment of multiple myeloma. *Current opinion in hematology* 15, 391-399.

Liebisch, P., and Pest, D. (2008). Multiples Myelom. *Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie*

Liu, P., Leong, T., Quam, L., Billadeau, D., Kay, N.E., Greipp, P., Kyle, R.A., Oken, M.M., and Van Ness, B. (1996). Activating mutations of N- and K-ras in multiple myeloma show different clinical associations: analysis of the Eastern Cooperative Oncology Group Phase III Trial. *Blood* 88, 2699-2706.

Lodish, H. (2001a). *Molekulare Zellbiologie*, 4 edn (Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag).

Lodish, H. (2001b). *Molekulare Zellbiologie*, 4 edn (Heidelberg - Berlin, Spektrum akademischer Verlag).

Macintyre, W. (1850). Case of mollities and fragilitas ossium, accompanied with urine strongly charged with animal matter

. Med Chir Trans Lond 33, 211-232.

Minkin, C. (1982). Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcified tissue international* 34, 285-290.

Mitsiades, C.S., Mitsiades, N., Munshi, N.C., and Anderson, K.C. (2004a). Focus on multiple myeloma. *Cancer cell* 6, 439-444.

Mitsiades, C.S., Mitsiades, N.S., McMullan, C.J., Poulaki, V., Shringarpure, R., Akiyama, M., Hideshima, T., Chauhan, D., Joseph, M., Libermann, T.A., *et al.* (2004b). Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer cell* 5, 221-230.

Mitsiades, C.S., Mitsiades, N.S., Richardson, P.G., Munshi, N.C., and Anderson, K.C. (2007). Multiple myeloma: a prototypic disease model for the characterization and therapeutic targeting of interactions between tumor cells and their local microenvironment. *Journal of cellular biochemistry* 101, 950-968.

Moreaux, J., Legouffe, E., Jourdan, E., Quittet, P., Reme, T., Lugagne, C., Moine, P., Rossi, J.F., Klein, B., and Tarte, K. (2004). BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone. *Blood* 103, 3148-3157.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65, 55-63.

Movassagh, M., and Foo, R.S. (2008). Simplified apoptotic cascades. *Heart failure reviews* 13, 111-119.

Murray, P.J. (2007). The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J Immunol* 178, 2623-2629.

Oancea, M., Mani, A., Hussein, M.A., and Almasan, A. (2004). Apoptosis of multiple myeloma. *International journal of hematology* 80, 224-231.

Ogata, A., Chauhan, D., Teoh, G., Treon, S.P., Urashima, M., Schlossman, R.L., and Anderson, K.C. (1997a). IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J Immunol* 159, 2212-2221.

Ogata, A., Chauhan, D., Urashima, M., Teoh, G., Treon, S.P., and Anderson, K.C. (1997b). Blockade of mitogen-activated protein kinase cascade signaling in interleukin 6-independent multiple myeloma cells. *Clin Cancer Res* 3, 1017-1022.

Parker, K.M., Ma, M.H., Manyak, S., Altamirano, C.V., Tang, Y.M., Frantzen, M., Mikail, A., Roussos, E., Sjak-Shie, N., Vescio, R.A., *et al.* (2002). Identification of

polymorphisms of the I kappa B alpha gene associated with an increased risk of multiple myeloma. *Cancer genetics and cytogenetics* 137, 43-48.

Pasparakis, M., Luedde, T., and Schmidt-Supprian, M. (2006). Dissection of the NF-kappaB signalling cascade in transgenic and knockout mice. *Cell death and differentiation* 13, 861-872.

Pearse, R.N., Sordillo, E.M., Yaccoby, S., Wong, B.R., Liao, D.F., Colman, N., Michaeli, J., Epstein, J., and Choi, Y. (2001). Multiple myeloma disrupts the TRANCE/osteoprotegerin cytokine axis to trigger bone destruction and promote tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 11581-11586.

Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews* 22, 153-183.

Pene, F., Claessens, Y.E., Muller, O., Viguie, F., Mayeux, P., Dreyfus, F., Lacombe, C., and Bouscary, D. (2002). Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Oncogene* 21, 6587-6597.

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

Prietzl, T., Pönisch, W., and von Salis-Soglio, G. (2008). Solitäres und Multiples Myelom Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und orthopädische Chirurgie und dem Bundesverband der Ärzte für Orthopädie

Qiang, Y.W., Chen, Y., Stephens, O., Brown, N., Chen, B., Epstein, J., Barlogie, B., and Shaughnessy, J.D., Jr. (2008). Myeloma-derived Dickkopf-1 disrupts Wnt-regulated osteoprotegerin and RANKL production by osteoblasts: a potential mechanism underlying osteolytic bone lesions in multiple myeloma. *Blood* 112, 196-207.

Quinn, J.M., Elliott, J., Gillespie, M.T., and Martin, T.J. (1998). A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulating factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro. *Endocrinology* 139, 4424-4427.

Rajkumar, S., and Kyle, R. (2007). Plasma cell disorders. *Textbook of Medicine* , 1426-1437.

Reinholt, F.P., Widholm, S.M., Ek-Rylander, B., and Andersson, G. (1990). Ultrastructural localization of a tartrate-resistant acid ATPase in bone. *J Bone Miner Res* 5, 1055-1061.

Renz-Polster, H., Krautzig, S., and Braun, J. (2004). *Basislehrbuch Innere Medizin*. 404 - 406.

- Rosenwald, I.B., Kaspar, R., Rousseau, D., Gehrke, L., Leboulch, P., Chen, J.J., Schmidt, E.V., Sonenberg, N., and London, I.M. (1995). Eukaryotic translation initiation factor 4E regulates expression of cyclin D1 at transcriptional and post-transcriptional levels. *The Journal of biological chemistry* 270, 21176-21180.
- Schneider, P., MacKay, F., Steiner, V., Hofmann, K., Bodmer, J.L., Holler, N., Ambrose, C., Lawton, P., Bixler, S., Acha-Orbea, H., *et al.* (1999). BAFF, a novel ligand of the tumor necrosis factor family, stimulates B cell growth. *The Journal of experimental medicine* 189, 1747-1756.
- Seger, R., and Krebs, E.G. (1995). The MAPK signaling cascade. *Faseb J* 9, 726-735.
- Seliger, H.H., and Mc, E.W. (1960). Spectral emission and quantum yield of firefly bioluminescence. *Archives of biochemistry and biophysics* 88, 136-141.
- Sen, R., and Baltimore, D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46, 705-716.
- Shetty, R.P. (2005). FACS analysis.
- Shi, Y., Yan, H., Frost, P., Gera, J., and Lichtenstein, A. (2005). Mammalian target of rapamycin inhibitors activate the AKT kinase in multiple myeloma cells by up-regulating the insulin-like growth factor receptor/insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase cascade. *Molecular cancer therapeutics* 4, 1533-1540.
- Solly, S. (1844). Remarks on the pathology of molities ossium with cases. *Med Chir Trans Lond* 27, 435-461.
- Spencer, G.J., Utting, J.C., Etheridge, S.L., Arnett, T.R., and Genever, P.G. (2006). Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NFκB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Journal of cell science* 119, 1283-1296.
- Spets, H., Stromberg, T., Georgii-Hemming, P., Siljason, J., Nilsson, K., and Jernberg-Wiklund, H. (2002). Expression of the bcl-2 family of pro- and anti-apoptotic genes in multiple myeloma and normal plasma cells: regulation during interleukin-6(IL-6)-induced growth and survival. *European journal of haematology* 69, 76-89.
- Suda, T., Takahashi, N., Udagawa, N., Jimi, E., Gillespie, M.T., and Martin, T.J. (1999). Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine reviews* 20, 345-357.
- Tatsumi, T., Shimazaki, C., Goto, H., Araki, S., Sudo, Y., Yamagata, N., Ashihara, E., Inaba, T., Fujita, N., and Nakagawa, M. (1996). Expression of adhesion molecules on myeloma cells. *Jpn J Cancer Res* 87, 837-842.
- Terada, N., Patel, H.R., Takase, K., Kohno, K., Nairn, A.C., and Gelfand, E.W. (1994). Rapamycin selectively inhibits translation of mRNAs encoding elongation factors and

ribosomal proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 11477-11481.

Tergaonkar, V. (2006). NF $\kappa$ B pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. *The international journal of biochemistry & cell biology* 38, 1647-1653.

Torok-Storb, B., Iwata, M., Graf, L., Gianotti, J., Horton, H., and Byrne, M.C. (1999). Dissecting the marrow microenvironment. *Annals of the New York Academy of Sciences* 872, 164-170.

Uchiyama, H., Barut, B.A., Chauhan, D., Cannistra, S.A., and Anderson, K.C. (1992). Characterization of adhesion molecules on human myeloma cell lines. *Blood* 80, 2306-2314.

Uchiyama, H., Barut, B.A., Mohrbacher, A.F., Chauhan, D., and Anderson, K.C. (1993). Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood* 82, 3712-3720.

van de Donk, N.W., de Weerd, O., Veth, G., Eurelings, M., van Stralen, E., Frankel, S.R., Hagenbeek, A., Bloem, A.C., and Lokhorst, H.M. (2004). G3139, a Bcl-2 antisense oligodeoxynucleotide, induces clinical responses in VAD refractory myeloma. *Leukemia* 18, 1078-1084.

Weinberg, R.A. (2007). *The biology of cancer* (New York - Abingdon, Garland sciences).

Werts, E.D., DeGowin, R.L., Knapp, S.K., and Gibson, D.P. (1980). Characterization of marrow stromal (fibroblastoid) cells and their association with erythropoiesis. *Experimental hematology* 8, 423-433.

wikipedia.org (2008) MTT assay.

wikipedia.org (2008). Osteoblast.

wikipedia.org (2008). Durchflusszytometrie.

Wood, K.V. (1998). *The Chemistry of Bioluminescent Reporter Assays*. Promega Notes, 14.

Wood, K.V., Lam, Y.A., and McElroy, W.D. (1989). Introduction to beetle luciferases and their applications. *Journal of bioluminescence and chemiluminescence* 4, 289-301.

Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., *et al.* (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 3597-3602.

Yin, L., Hubbard, A.K., and Giardina, C. (2000). NF-kappa B regulates transcription of the mouse telomerase catalytic subunit. *The Journal of biological chemistry* 275, 36671-36675.

Young, J., Asire, A., and Pollack, E. (1978). SEER program: Cancer incidence and mortality in the United States 1973-1976. *DHEW* 78, 1837.

Zollinger, A., Stuhmer, T., Chatterjee, M., Gattenlohner, S., Haralambieva, E., Muller-Hermelink, H.K., Andrusis, M., Greiner, A., Wesemeier, C., Rath, J.C., *et al.* (2008). Combined functional and molecular analysis of tumor cell signaling defines 2 distinct myeloma subgroups: Akt-dependent and Akt-independent multiple myeloma. *Blood* 112, 3403-3411.



## Danksagung:

Ich danke zunächst meinen Eltern Angela Köhler-Jank und Dr. Stephan Jank. Sie haben mich beim Studium der Medizin und dem Erstellen dieser Arbeit stets unterstützt. Ein lateinischer Sinnspruch, der mich seit meiner Schulzeit begleitet zeigt in Kürze was mir meine Eltern stets gegeben haben:

In necessariis unitas

in Notlagen Zusammenhalt

In dubiis libertas

in zweifelhaften Fällen Freiheit

In omnibus caritas

in allem Liebe

Peter Meiderlin, (\* 1582 in Oberacker bei Maulbronn, † 1. Juni 1651 in Augsburg)

Desweiteren danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. C. Bargou für die Übernahme meiner Doktorarbeit, Prof Dr. rer nat Norbert Schütze für die Übernahme als Koreferent, Dr. Kurt Bommert für die Anleitung und Betreuung und Frau König, medizinisch technische Assistentin, für die tatkräftige Unterstützung im Labor.

## Lebenslauf:

Name: Christoph Michael Jank

Geboren: 25.06.1982 in Bremen

Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Ausbildung:

Seit 10/2010 Assistenzarzt an der Kinderklinik der Universität Würzburg

06/2010 Approbation als Arzt

05/2010 Bestehen des 2. Abschnittes der ärztlichen Prüfung (1,5)

03-09/2008 Durchführung des experimentellen Teils der Dr.-Arbeit  
im Labor der Med. Klinik 2 der Universität Würzburg,  
Arbeitsgruppe Bargou

09/2006 – 08/2007 Studium an der Universität Limoges (Frankreich) im Rahmen des  
Studentenaustausches Erasmus

08/2006 Grundlagenpraktikum der Molekularbiologie

04/2003 - 05/2010 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-  
Universität Würzburg

09/2002-04/2003 Freiwilligen Arbeit im Aidshospiz und Kinderheim der  
Bruderschaft des seligen Gerhard“ in Mandeni, Südafrika

09/1993-06/2002 Gymnasium bei St. Anna, Augsburg; Abitur

08/2002 Sonderpreis des Bundesumweltwettbewerbs für die Facharbeit zur  
“Kletterkonzeption Hersbrucker Alb“

09/1989-08/1993 Grundschule Bobingen Siedlung

Würzburg, den 24.09.2011