



Pan-Raf-Inhibition als neue therapeutische Strategie im Multiplen Myelom

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Elisabeth Müller
geboren in Aschaffenburg

Würzburg 2015



Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. R. Bargou

Gutachter: Prof. Dr. T. Müller

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde von März 2010 bis Dezember 2014 am Lehrstuhl für Translationale Onkologie des Universitätsklinikums Würzburg unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Bargou angefertigt.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig, ohne Hilfe einer kommerziellen Promotionsberatung und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Ich versichere an Eides statt, dass mir die Möglichkeit zur Promotion und deren Betreuer nicht durch kommerzielle Stellen vermittelt wurde. Weiterhin erkläre ich, dass die Richtlinien der Universität Würzburg über gute wissenschaftliche Praxis eingehalten wurden.

Die Dissertation hat bisher weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Es wurden neben dem Grad des Diplom-Biologen bisher keine weiteren akademischen Grade erworben.

Würzburg, April 2015

Elisabeth Müller

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Das Multiple Myelom	6
1.1.1	Definition	6
1.1.2	Geschichte	6
1.1.3	Epidemiologie	6
1.1.4	Sonderformen	7
1.1.5	Symptome	7
1.1.6	Diagnostik	8
1.1.7	Therapie.....	9
1.1.8	Pathogenese.....	12
1.1.8.1	Normale B-Zell-Entwicklung	12
1.1.8.2	Entwicklung der malignen Plasmazelle	13
1.1.9	Aberrante Signaltransduktion im Multiplen Myelom	15
1.2	Die Raf-Kinasen	17
1.2.1	Struktur der Raf-Kinasen.....	17
1.2.2	Funktion	18
1.2.3	Regulation.....	20
1.2.4	Rolle von Raf in Tumoren	22
1.2.5	Rolle der Raf-Kinasen im MM	23
2	Zielsetzung der Arbeit	25
3	Material und Methoden	27
3.1	Kultivierung von Zelllinien.....	27
3.2	Isolierung primärer Myelomzellen und BMSCs.....	27
3.3	Herstellung von pSU-basierten shRNA-Expressionsvektoren.....	28
3.4	Transiente Transfektion von Myelomzelllinien durch Elektroporation.....	30
3.5	Aufreinigung transfizierter Zellen mittels MicroBeads.....	31
3.6	Durchflusszytometrie	31
3.7	Western-Blot-Analyse.....	32
3.8	Behandlung von Zellen mit Inhibitoren	35
3.9	Microarray-Analyse	36

4	Ergebnisse	38
4.1	Raf-Isoformen sind im MM häufig konstitutiv aktiviert	38
4.2	Pan-Raf-Inhibition unterbindet die Aktivierung des MAPK-Signalwegs	39
4.2.1	Pan-Raf-Inhibition mittels Knockdown inhibiert den MAPK-Signalweg .	40
4.2.2	Pan-Raf-Blockade mittels Inhibitoren blockiert den MAPK-Signalweg..	42
4.3	Pan-Raf-Inhibition induziert Apoptose in MM Zellen.....	44
4.3.1	Pan-Raf-Knockdown verstärkt die apoptotischen Effekte gegenüber der Depletion einer einzelnen Isoform.....	44
4.3.2	Pan-Raf-Blockade mittels Inhibitoren induziert Apoptose in HMZL und primären Myelomzellen	45
4.4	Pan-Raf-Inhibition und MEK-Blockade zeigen deutliche Unterschiede	47
4.4.1	Pan-Raf-Inhibition beeinflusst die Expression Tumor-relevanter Gene.	48
4.4.2	Raf-Kinasen regulieren PI3K-abhängige, mTOR-assoziierte Signalwege auf Proteinebene.....	50
4.5	Simultane Blockade des PI3K- und des Raf-Signalweges verstärkt die Regulation PI3K-abhängiger, mTOR-assoziiertes Signalwege	54
4.6	Simultane Blockade des PI3K/mTOR- und des Raf-Signalweges verstärkt die Apoptose in MM Zellen.....	57
5	Diskussion	59
6	Zusammenfassung	74
	Summary	76
7	Anhang	78
7.1	Literaturverzeichnis	78
7.2	Abkürzungsverzeichnis	100
7.3	Abbildungsverzeichnis.....	105
7.4	Tabellenverzeichnis.....	107
7.5	Lebenslauf.....	108
7.6	Veröffentlichungen	110
7.7	Danksagungen	111

1 Einleitung

1.1 Das Multiple Myelom

1.1.1 Definition

Das Multiple Myelom (MM) ist eine maligne hämatologische Erkrankung, die nach WHO-Kriterien den B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen zugeordnet wird. Charakteristisch für diese Krankheit ist die klonale Expansion von Plasmazellen im Knochenmark und die vermehrte Produktion vollständiger oder unvollständiger monoklonaler Immunglobuline, die als so genanntes Paraprotein bzw. M-Gradient im Serum und/oder Urin nachweisbar sind [1],[2].

1.1.2 Geschichte

Die ersten bekannten wissenschaftlichen Berichte über eine Erkrankung am MM stammen aus dem Jahr 1844. Dr. Samuel Solly schilderte die Krankengeschichte einer Patientin und fertigte nach deren Autopsie Zeichnungen von gefundenen Knochenveränderungen an [3]. Im Jahre 1845 wurde ein weiterer Fall von Dr. Macintyre und Dr. Watson überliefert. Diese schickten von einem Patienten eine Urinprobe mit hoher spezifischer Dichte an Dr. Henri Bence Jones. Nachdem J.F. Heller im Jahr 1846 über eine Substanz im pathologischen Urin berichtete, erkannte Dr. Jones 1847 die diagnostische Bedeutung dieses Nachweises für das MM. Aus diesem Grund werden die bei der Krankheit im Urin ausgeschiedenen Leichtketten-Immunglobuline auch Bence-Jones-Proteine genannt [4]. Der Begriff „Multiples Myelom“ wurde allerdings erst 1873 von Dr. von Rustizky eingeführt. Auf Otto Kahler, der 1889 einen Artikel zur Symptomatik des MM veröffentlichte, geht die heute nicht mehr gebräuchliche synonyme Bezeichnung „Morbus Kahler“ zurück. „Plasmozytom“ wird ebenfalls als Synonym für das MM verwendet [5].

1.1.3 Epidemiologie

In Deutschland erkranken jährlich etwa 3.000 Männer und 2.700 Frauen neu an der Krankheit. Damit ist in Deutschland das MM die dritthäufigste hämatologische

Neoplasie und für ca. 1 % aller Krebserkrankungen verantwortlich. Die Häufigkeit der Erkrankung steigt ab einem Alter von 50 Jahren signifikant an; das mediane Erkrankungsalter beträgt 71 Jahre bei Männern und bei Frauen 73 Jahre [7]. Die derzeitige nach Europastandard altersstandardisierte Inzidenz liegt bei Männern durchschnittlich bei 5,4 Erkrankungen/100.000 Einwohnern, und für Frauen bei 3,7 Erkrankungen/100.000 Einwohnern [8]. Neben der alters- und geschlechtsspezifischen besteht auch eine ethnische Variabilität. So verzeichnet innerhalb Europas Norwegen die höchste Inzidenzrate; Albanien dagegen die niedrigste [8-10].

1.1.4 Sonderformen

Man unterscheidet vier Sonderformen des MM:

- Beim **asekretorischen Myelom** werden keine Immunglobuline in das Blut abgegeben oder im Urin ausgeschieden.
- Insbesondere im späteren Krankheitsverlauf kann der Tumor die Fähigkeit erlangen, auch an extramedullären Stellen (wie Blut, pleurale Flüssigkeiten und Haut) zu erscheinen (**extramedulläres Myelom**).
- Beim **solitären Myelom** lässt sich nur ein einzelner Knochenherd nachweisen.
- Lassen sich die malignen Plasmazellen ebenfalls im Blut nachweisen spricht man von einer **Plasmazell-Leukämie** [11].

1.1.5 Symptome

Die Symptome des MM sind vielgestaltig und oftmals unspezifisch. Bei über der Hälfte aller Patienten lässt sich eine Veränderung des Blutbildes nachweisen, da die normale Hämatopoese durch die Expansion der malignen Plasmazellen im Knochenmark gestört wird. Eine tumorbedingte Anämie führt zu einer Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit und Erschöpfungserscheinungen (Fatigue), während eine Verminderung der Leukozytenzahl die Infektanfälligkeit steigert und eine Abnahme der Thrombozyten die Blutungsneigung erhöht. Als weiteres Leitsymptom treten Knochendestruktionen auf, die oftmals mit einem gesteigertem Anteil Kalzium im Blut (Hyperkalzemie), Knochenschmerzen und pathologischen

Frakturen assoziiert sind [12],[13]. Der den Knochendestruktionen zu Grunde liegende Pathomechanismus beruht auf einer Störung des Gleichgewichts zwischen Knochenabbau und –aufbau. Die malignen Plasmazellen produzieren einerseits direkt Faktoren wie z.B. DcR3 (decoy receptor 3), IL-3 (Interleukin-3) und TNF- α (Tumornekrosefaktor- α), die Osteoklasten aktivieren und somit den Knochenabbau antreiben. Andererseits geben sie Moleküle wie sFRP-2 und -3 (soluble frizzled-related protein-2 and -3) und DKK-1 (Dickkopf-1) ab, die Osteoblasten und den Knochenaufbau inhibieren [14]. Weiterhin könnten die MM Zellen selbst in funktionale Osteoklasten-ähnliche Zellen transdifferenzieren und direkt an der Knochenresorption teilnehmen [15],[16]. Eher selten wird als Folge der gesteigerten Proteinkonzentration im Serum die Viskosität des Blutes erhöht (Hyperviskositätssyndrom), was u.a. Seh- und Gedächtnisstörungen, Schwindel und Krämpfe verursachen kann [17]. Des Weiteren kann eine Beeinträchtigung der Nierenfunktion festgestellt werden, da eine Ausfällung der übermäßig produzierten Immunglobuline zu einer Obstruktion des distalen Tubulus und der aufsteigenden Henleschleife führt [13],[18].

1.1.6 Diagnostik

Die Diagnostik des MM beruht auf Laboruntersuchungen von Blut- und Urinproben zum Nachweis der monoklonalen Immunglobuline, Knochenmarksuntersuchungen zur Feststellung einer erhöhten Anzahl von Plasmazellen und bildgebenden Verfahren zur Darstellung des Skelettsystems, wodurch Knochenläsionen nachgewiesen werden können [13]. Die International Myeloma Working Group spricht von den sog. „CRAB“-Kriterien (hyper **c**alcemia, renal insufficiency, **a**nemia, **b**one lesions), wobei die Erfüllung schon eines der Kriterien als Indikation für eine Behandlung ausreichend ist [19]. Salmon und Durie teilten das MM in Stadien ein, wobei ihr System klinische Parameter in Korrelation zur gemessenen Gesamtzahl von Plasmazytomzellen im Körper berücksichtigt [20]. Ein weiteres Klassifikationssystem stellt das Internationale Staging System (ISS) der International Myeloma Working Group (IMWG) dar. Basierend auf den prognostisch relevanten Faktoren Serumalbumin und Serum- β 2-Mikroglobulin erlaubt es die Einteilung der Patienten in drei prognostische Subgruppen (siehe Tabelle 1). Sowohl die Salmon und Durie-Klassifikation als auch das ISS stellen ein Hilfsmittel zur ungefähren

Abschätzung der Prognose dar [21]. Bei der hauptsächlich verwendeten Einteilung der IMWG werden die behandlungsbedürftigen MM Fälle von den nicht-behandlungsbedürftigen Fällen der Monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) und des „smoldering“ MM (SMM) abgetrennt. Hierbei handelt es sich um asymptomatische, prämaligne Vorstufen der Krankheit, die zwar durch monoklonale Plasmazellproliferation im Knochenmark jedoch auch durch Abwesenheit von Endorganschäden charakterisiert sind [22].

Stadien	Kriterien	Medianes Überleben [Monate]
I	Serum- β 2-Mikroglobulin < 3,5 mg/l und Serumalbumin \geq 3,5 g/dl	62
II	Weder I noch III	44
III	Serum- β 2-Mikroglobulin > 5,5 mg/l	29

Tabelle 1: Internationales Staging System (ISS) für das MM. Die Einteilung in Stadien erfolgt in Abhängigkeit der Parameter Serum- β 2-Mikroglobulin und Serumalbumin.

1.1.7 Therapie

Bei dem MM handelt es sich bis heute um eine weitgehend unheilbare Krankheit, deren Behandlung auf das Erreichen einer bestmöglichen Remission mit rascher Symptomkontrolle und Normalisierung myelombedingter Komplikationen abzielt. Hierdurch soll eine Verbesserung der Lebensqualität und eine Verlängerung des Überlebens erreicht werden [23-26]. Neben der Erfüllung eines „CRAB“-Kriteriums sind das Vorliegen MM-bedingter Schmerzen, Nierenfunktionseinschränkungen oder eines Hyperviskositätssyndroms als Behandlungsindikation zu werten [20],[27].

Die durchschnittliche Überlebenszeit hat sich in der letzten Dekade durch das Aufkommen von Thalidomid [28], Bortezomib [29] und Lenalidomid [30],[31] als Medikament signifikant erhöht [32]. Kürzlich wurden auch Carfilzomib und Pomalidomid für die Behandlung des MM zugelassen [26]. Weiterhin werden zurzeit ein Histon-Deacetylase-Inhibitor, anti-CD38 monoklonale Antikörper, ein anti-CS-1-monoklonaler Antikörper, ein Kinesin-Spindelprotein-Inhibitor und ein Cyclin-abhängige Kinasen-Inhibitor als potentiell wirksame Verbindungen untersucht [26].

Proteasom-Inhibitoren wie Bortezomib und Carfilzomib binden mit hoher Affinität und Spezifität an die katalytische Seite des 26S Proteasoms [33-36]. Dieser Proteinkomplex findet sich im Nukleus und Zytoplasma aller eukaryotischen Zellen [37] und ist für die Degradation missgefalteter Proteine zuständig [38],[39]. Plasmazellen zeichnen sich durch ein hochentwickeltes raues Endoplasmatisches Reticulum (ER) aus, das auf die Produktion und Sekretion großer Mengen von Antikörpern spezialisiert ist [40]. Bedingungen, die die Proteinfaltung im ER stören, aktivieren einen Stress-Signalweg, der „unfolded protein response“ (UPR) genannt wird [41]. Die Induktion der UPR führt zu einem generellen Abfall der Proteinsynthese, um den Influx von Proteinen in das ER zu verringern. Ebenfalls kommt es zu einer gesteigerten Transkription von Chaperonen und Komponenten Protein-abbauender Wege, um eine Aggregation der akkumulierenden, missgefalteten Proteine zu verhindern. Die UPR kann den Zellen helfen, reversiblen Umweltstress zu überleben; wird der Stress jedoch zu groß, löst die UPR Zellzyklusarrest und Induktion von Apoptose aus [42],[43]. Behandlung von Zellen mit einem PI führt zur Akkumulation missgefalteter Proteine im ER und zur Aktivierung der UPR. Da MM Zellen eine große Menge an Immunglobulinen, die im ER prozessiert werden produzieren, zeigen sie sich sensitiver als andere Zellen für PI-induzierte UPR-Aktivierung und ER-Stress-induzierte Apoptose [44]. Dieses therapeutische Fenster kann für die Therapie ausgenutzt werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass die Proteasom-Inhibition durch Bortezomib die Degradation von I κ B (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor) verhindert, was zur Inhibition des Transkriptionsfaktors NF κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) führt, der das Überleben von MM Zellen fördern kann [45],[46]. Darüber hinaus gelten die Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitoren p21 und p27, apoptotische Signalwege, Signalwege von Wachstumsfaktoren und die Wechselwirkung der Myelomzellen mit den Knochenmarkstromazellen als weitere Ziele, die durch Blockade des Proteasoms gestört werden können [47-51]. Der Wirkmechanismus von Thalidomid und seinen Derivaten Lenalidomid und Pomalidomid ist unklar, sie besitzen jedoch pleiotrope Eigenschaften gegen das MM, darunter die Fähigkeit die Immunantwort zu modellieren (immunmodulatorische Substanzen), Zytokinsekretion und Angiogenese zu verringern und T-Zellen und natürliche Killerzellen zu stimulieren. Durch die Induktion von Apoptose zeigt sich auch ein direkter Effekt auf die MM Zellen [52-57].

Präklinische Studien identifizierten das E3 Ligaseprotein Cereblon (CRBN) als direktes molekulares Ziel von Thalidomid, das mit den teratogenen Effekten dieses Moleküls in Zusammenhang gebracht wird. CRBN bindet u.a. im Gehirn an Kaliumkanäle in der Zellmembran und bildet während der Embryonalentwicklung die substratbindende Untereinheit einer Ubiquitin-Ligase, die das Wachstum von Gliedmaßen beeinflusst. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass CRBN die antiproliferative Aktivität von Lenalidomid und Pomalidomid in Myelomzellen vermittelt [58-60].

Hilfe bei der Auswahl, Dosierung und Dauer der Therapie entsprechend der genetischen Risikokonstellation können veröffentlichte Therapiealgorithmen geben. Patienten mit einem guten Allgemeinzustand, die für eine autologe Stammzelltransplantation in Frage kommen, werden üblicherweise mit zwei bis vier Zyklen Induktionstherapie vor der Stammzellentnahme behandelt. In der hierbei verwendeten sog. Hochdosis-Chemotherapie (HDCT) werden Kombinationen von Dexamethason mit Bortezomib, Thalidomid und Lenalidomid eingesetzt, was die Ansprechraten vor und nach der Stammzelltransplantation verbessert. Lenalidomid wird in den USA häufig in der Erstlinientherapie eingesetzt, ist in Deutschland, Österreich und der Schweiz aber hierfür nicht zugelassen. Bei Patienten, die sich nicht für eine autologe Stammzelltransplantation qualifizieren, wird die Chemotherapie in Standarddosierung durchgeführt; in Europa sind dabei Melphalan-haltige Therapien in Kombination mit den neuen beschriebenen Substanzen der Standard. Als ergänzende Therapiemaßnahmen können Strahlentherapie, Operationen (z.B. zur Sicherung der Stabilität von Wirbelkörpern) und Biphosphonate, die die Rate der Skelettereignisse reduzieren sollen, zum Einsatz kommen [61],[26]. Untherapiert liegt die mittlere Überlebenszeit bei 4-11 Monaten [62]; nach einer konventionellen Chemotherapie kann sich das Überleben auf ca. drei Jahre erhöhen [61]. Die Behandlung mit HDCT und autologer Stammzelltransplantation führt zu einem medianen Überleben von fünf bis sechs Jahren [63],[64].

1.1.8 Pathogenese

1.1.8.1 Normale B-Zell-Entwicklung

Bei der physiologischen B-Zell-Entwicklung (s. Abb. 1) entstehen aus lymphoiden Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems sog. Pro-B-Zellen. In diesem Stadium der Entwicklung startet die Umlagerung von Gensegmenten auf einem Allel des Locus für die Immunglobulin-Schwerketten (IgH), bei der zuerst die Verknüpfung eines D- mit einem J-Segment und dann eine Verknüpfung eines V-Segments mit dem DJ-Segment stattfinden. Bei Bildung eines durchgehenden Leserasters für die Schwere Kette erreicht die Zelle das prä-B-Zell-Stadium, in dem nach einem Kontrollschritt der Immunglobulin-Gen-Umlagerung mit dem Rearrangement des Ig-Leichtketten- (IgL) Locus begonnen wird. Die gebildete Ig-Leichtkette paart mit der Ig-Schwerkette und es entstehen unreife B-Zellen, die einen funktionellen B-Zell-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren [65]. Diese Zellen verlassen nun das Knochenmark und wandern in die Lymphknoten ein. Bei der folgenden Reifung führt der Kontakt mit einem Antigen zur Proliferation und Differenzierung in Lymphoblasten. Es entstehen entweder kurzlebige Plasmazellen oder die Zellen wandern nach erneutem Kontakt mit dem Antigen in die Keimzentren der Lymphknoten ein. Durch somatische Hypermutationen und Affinitätsreifung erhalten B-Zellen, die eine Keimzentrums-Reaktion durchlaufen haben, eine erhöhte Affinität ihrer B-Zell-Rezeptoren gegen das Antigen. Es werden hierbei vorzugsweise Punktmutationen in die DNA-Bereiche eingeführt, die für die Antigen-Bindestellen der Immunglobuline kodieren [66]. Nach positiver Selektion Antigen-erkennender B-Zellklone differenzieren sich die sog. Keimzentrums-B-Zellen entweder zu B-Gedächtniszellen oder Post-Keimzentrums-B-Zellen. Über chromosomale Umlagerungen kommt es zu einem Wechsel („switch“) der Ig-Isotypen und damit zur Umstellung der Ig-Synthese von IgM auf IgG, IgD, IgA oder IgE. Anschließend wandern die Zellen zurück ins Knochenmark und entwickeln sich durch Einfluss von Zytokinen zu langlebigen Antikörper-produzierenden Plasmazellen [67], [68].

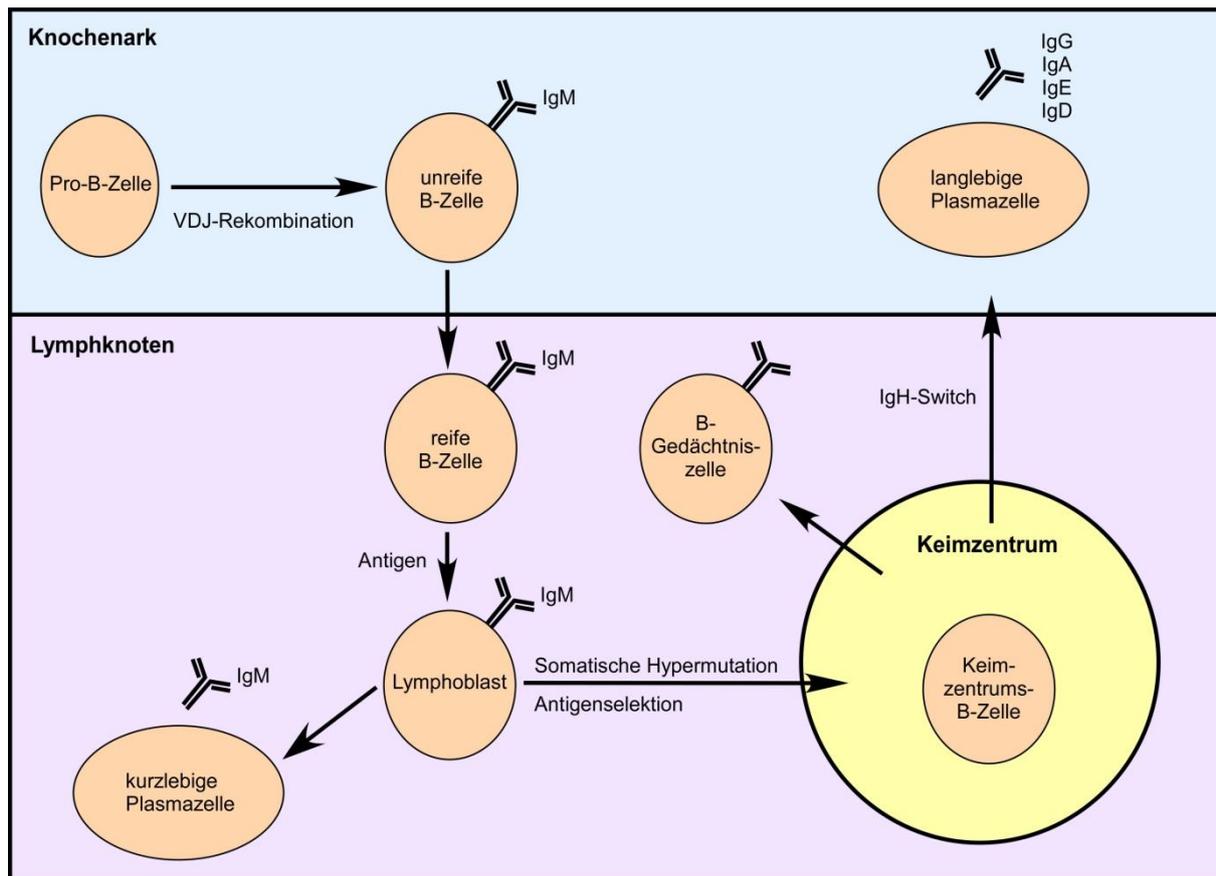


Abbildung 1: Physiologische B-Zell-Entwicklung. Im Knochenmark entstehen durch genetische Umstrukturierung (VDJ-Rekombination) aus Prä-B-Zellen die unreifen B-Zellen, die in die Lymphknoten einwandern. Antigen-Kontakt führt dort zur Entwicklung von Lymphoblasten, die entweder zu kurzlebigen Plasmazellen differenzieren oder die somatische Hypermutation der Ig-Gene durchlaufen und positiv auf die Erkennung von Antigenen selektiert werden. Die dabei entstehenden Keimzentrum-B-Zellen entwickeln sich zu B-Gedächtniszellen oder Post-Keimzentrum-B-Zellen, die einen Ig-Klassenwechsel vollziehen, ins Knochenmark zurück wandern und sich zu langlebigen, Antikörper-sezernierenden Plasmazellen differenzieren (Abb. modifiziert nach [68]).

1.1.8.2 Entwicklung der malignen Plasmazelle

Die MM Zellen leiten sich von Post-Keimzentrum-B-Zellen ab und entwickeln sich als Ergebnis eines mehrstufigen Prozesses, der bei ungefähr einem Drittel aller MM Fälle mit einer monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) beginnt (s. Abb. 2). Die Endstufe stellt eine extramedulläre Invasion oder eine sekundäre Plasmazell-Leukämie dar [69]. Die schrittweise Akkumulation genetischer Läsionen spielt bei der Entwicklung der MGUS zum MM eine wichtige Rolle [70]. Man differenziert in diesem Prozess zwischen primären (frühen) und sekundären (späten) Ereignissen [71]. Als frühes Ereignis der Pathogenese treten primäre chromosomale Translokationen auf, die sich häufig in der Isotyp-„switch“-Region des Immunglobulin-Schwerketten-Genlokus von Chromosom 14 (14q32) zeigen [72-74]; der Ig-Leichtkettenlokus ist dagegen seltener involviert [68]. Typischerweise bringen diese

balancierten Translokationen ein oder mehrere Onkogene unter die Kontrolle eines Enhancers der Ig-Gene, wodurch die Onkogene verstärkt aktiviert werden [75]. Häufige Translokationspartner hierbei sind die Chromosomen 4 (4p16; FGFR3/MMSET), 6 (6p21; CyclinD3), 11 (11q13; CyclinD1), 16 (16q23; c-MAF) und 20 (20p11; MAFB) [68],[72],[76],[77]. Diese Ereignisse führen vermutlich zur Entstehung der immortalisierten MGUS-Zelle [78]. Das MM weist durch eine starke genomische Instabilität komplexe Karyotypen auf, die neben strukturellen auch durch numerische chromosomale Veränderungen gekennzeichnet sind [79]. So findet sich beispielsweise schon im MGUS-Stadium die Monosomie von Chromosom 13 oder die Deletion von 13q14 [80],[81]. Der Verlust des Chromosoms führt zu einer Überexpression verschiedener Zellzyklusgene, was einen Überlebensvorteil für die malignen Zellen darstellt [82]. Mit zunehmender Progression der Krankheit kommen sekundäre Veränderungen hinzu, z.B. Mutationen, die das Ras- (rat sarcoma viral oncogene homolog) Onkogen aktivieren, den Transkriptionsfaktor NF- κ B anschalten, den Transkriptionsfaktor Myc (myelocytomatosis viral oncogene homolog) dysregulieren oder das Tumorsuppressorprotein p53 inaktivieren [83-85]. Die beschriebenen Veränderungen können dem postulierten Mehrstufenprozess zufolge die Transformation der MGUS-Zelle zur MM Zelle verursachen [67],[86].

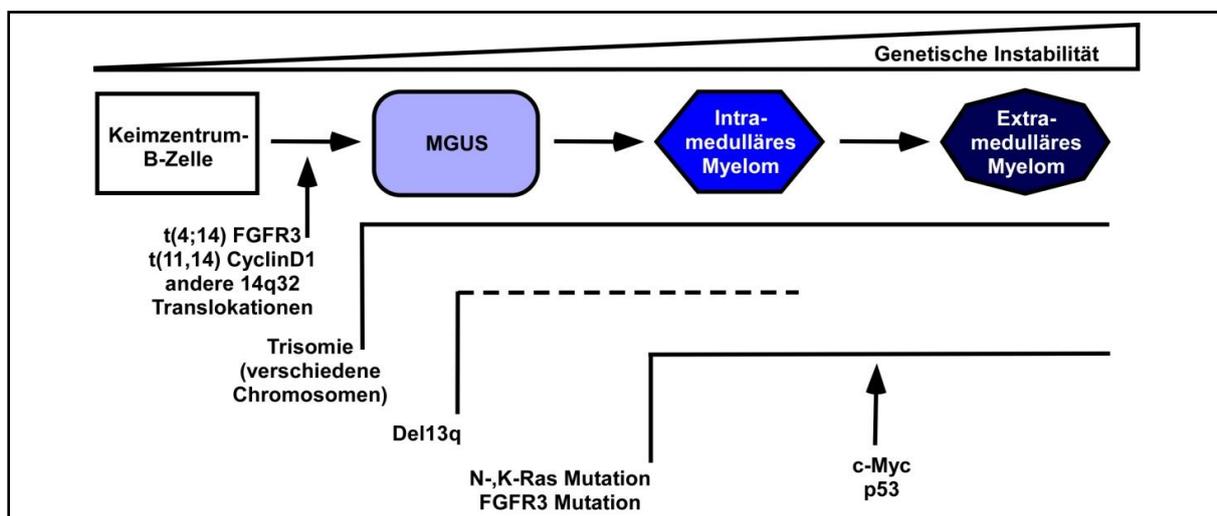


Abbildung 2: Modell der molekularen Pathogenese des MM. Das dargestellte Modell fasst die mögliche zeitliche Abfolge genetischer Ereignisse in Relation zum klinischen Voranschreiten des MM zusammen. Frühe genetische Veränderungen, die zur MGUS führen sind 14q32 Translokationen und del13q. Ab dem Stadium des Intra-medullären Myeloms finden sich aktivierende N- und K-Ras- bzw. FGFR3-Mutationen, deren Inzidenz mit Voranschreiten der Krankheit steigt. Mutationen von c-MYC und p53 sind späte Ereignisse, die mit dem aggressiven Extramedullären Myelom assoziiert sind. Zeichenerklärung: Pfeil: Ereignis erfolgt zu einem bestimmten Zeitpunkt; Linie: Ereignis ist klar mit einem definierten klinischen Stadium verbunden; gestrichelte Linie: Zeitpunkt des Auftretens eines Ereignisses ist unklar (Abb. Modifiziert nach [67] und [86]).

1.1.9 Aberrante Signaltransduktion im Multiplen Myelom

Mit dem Voranschreiten der Erkrankung akquirieren die transformierten Plasmazellen diverse genetische Läsionen, die zusammen mit wachstumsstimulierenden Faktoren des Knochenmark-Mikromilieus zum Überleben und Wachstum der Tumorzellen beitragen. Die Vielzahl genetischer Veränderungen führt zur Aktivierung verschiedener Signalwege, die ein sog. onkogenes Signalnetzwerk bilden, das zur Ausprägung des malignen Phänotyps führt (s. Abb. 3).

In ca. 50 % der Myelomfälle zeigt sich eine Aktivierung von STAT3, die jedoch nicht essentiell für das Überleben der Zellen ist [87]. Die Inhibition des NF κ B-Signalwegs, der sich in MM Zellen konstitutiv aktiviert findet, führt hingegen zur Apoptose [46],[87-89]. Neben abberanter CyclinD-Expression und verändertem c-MYC- und FGFR3-Signaling [67],[86],[90] sind im MM Stress-Response-Signalwege, wie der Heat-Shock-Protein- (HSP) Signalweg ebenfalls regelmäßig dereguliert und tragen zur Vermittlung des malignen Wachstums bei [91-93].

Die Proteinkinase AKT (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog) ist in ungefähr der Hälfte der primären MM Tumorproben phosphoryliert und die Zellen sind für ihr Wachstum und Überleben abhängig vom AKT-Signalweg. Die andere Subgruppe vermag im Gegensatz dazu AKT-unabhängig zu wachsen [94-96]. Die Aktivierung von PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) ist zwar eine notwendige Voraussetzung für die AKT-Aktivität, jedoch konnten im MM weder aktivierende Mutationen in PI3K gefunden werden noch ein Zusammenhang zwischen dem Aktivierungsstatus von AKT und dem Mutationsstatus von Ras nachgewiesen werden. Es konnten jedoch Mutationen in verschiedenen Adhäsions- und Rezeptortyrosinkinasegenen identifiziert werden, die vermutlich das der PI3K/AKT-Deregulation zu Grunde liegende genetische Ereignis darstellen [97],[98].

Relativ häufig finden sich im MM Ras-Mutationen (25-50 %) [94],[99],[100], die mit einer verkürzten Lebenszeit der Patienten in Verbindung gebracht werden [101]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass onkogenes Ras in MM Zellen wichtige Überlebenssignale vermittelt [94]. Diese werden allerdings nicht durch AKT übertragen, weshalb angenommen wird, dass andere Ras-abhängige Signalwege hierbei eine wichtige Bedeutung haben. Trotz intensiver Bemühungen konnten sich bis jetzt Strategien, bei denen mutiertes Ras direkt inhibiert wird, nicht in der klinischen Behandlung durchsetzen, wodurch downstream gelegene Effektoren wie der Raf/MEK/ERK-Signalweg in den Fokus rückten [114]. Dieser Signalweg spielt

eine wichtige Rolle im MM [102-108] und kann u.a. durch die onkogene Aktivierung von Ras hochreguliert werden [100],[101],[109-111]. Die Blockade des Signalweges löst sogar in Anwesenheit von Stroma, das die Zellen normalerweise vor herkömmlichen Medikamenten wie Dexamethason schützt, in MM Zellen Apoptose aus [112],[113]. Erste Daten unserer Arbeitsgruppe deuteten bereits an, dass Isoformen der Kinase Raf (rapidly accelerated fibrosarcoma) im primären MM überexprimiert sind und dass der apoptotische Effekt einer Raf-Inhibition unabhängig vom AKT-Aktivierungsstatus und vom Ras-Mutationsstatus ist. Somit könnte die Raf-Überexprimierung ein eigenständiges onkogenes Ereignis darstellen, dessen Bedeutung für das maligne Wachstum und Überleben der Tumorzelle näher untersucht werden muss. Da die Blockade des downstream der Raf-Kinasen gelegenen MEK/ERK-Moduls kaum zytotoxisch auf MM Zellen wirkt [94],[95],[113], stellt sich die Frage, welche MEK/ERK-unabhängigen Mechanismen im MM den apoptotischen Effekt der Raf-Inhibition vermitteln können.

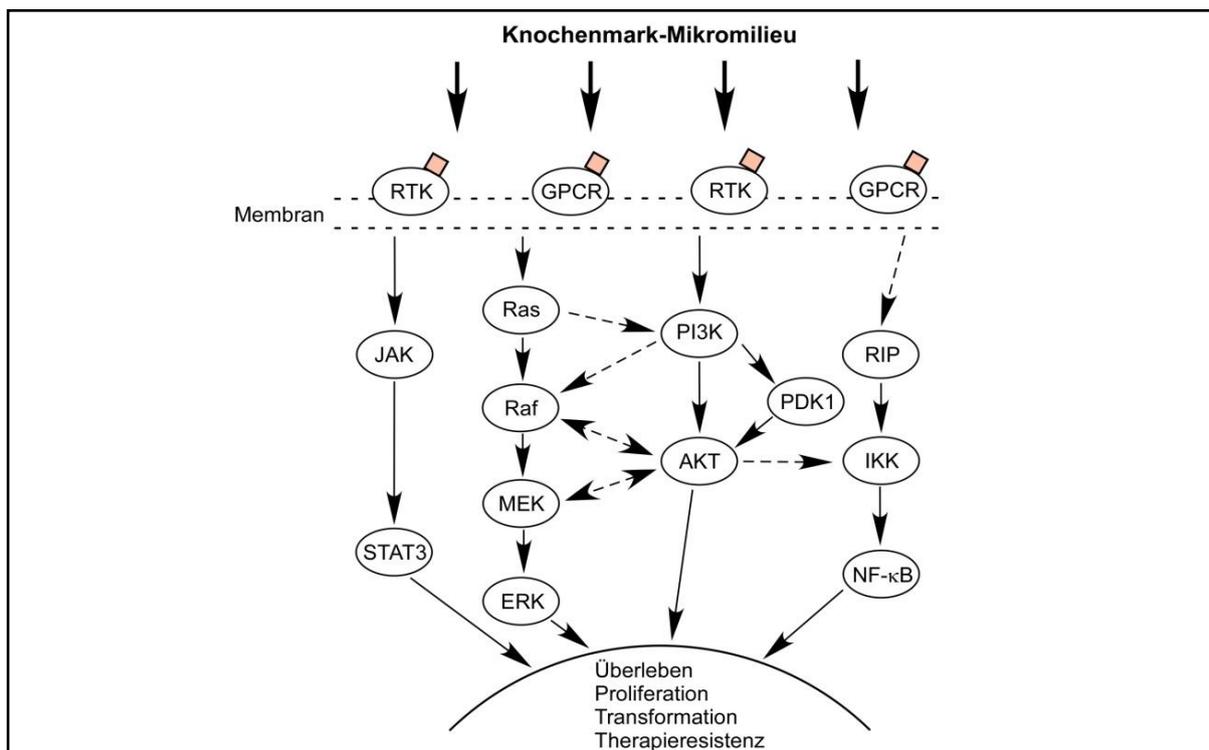


Abbildung 3: Das onkogene Signalnetzwerk im Multiplen Myelom. Vereinfachte Darstellung der komplexen Interaktionen verschiedener Signalwege in MM Zellen. Zeichenerklärung: Gestrichelte Pfeile: hypothetische Wechselwirkungen. RTK: Rezeptortyrosinkinase, GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor.

1.2 Die Raf-Kinasen

1983 wurde erstmals das virale Onkogen *v-raf* beschrieben, transduziert durch das „murine sarcoma virus isolate 3611“ [115],[116]. Bald wurden verwandte Gene auch im Menschen identifiziert: *a-raf* (auf X-Chromosom), *b-raf* (auf Chromosom 7) und *c-raf* (auf Chromosom 3) codieren hier die Serin/Threonin-Protein-Kinasen A-Raf, B-Raf und C-Raf (auch Raf-1 genannt) [117]. Die drei Isoformen teilen sich strukturelle Homologien, zeigen aber auch signifikante Unterschiede in Struktur und Funktion. In der Gruppe der Invertebraten findet man eine Raf-Isoform, die der B-Raf-Isoform der Säugetiere ähnelt: D-Raf in *Drosophila* und Lin-45 in *Caenorhabditis elegans* [118].

1.2.1 Struktur der Raf-Kinasen

Das C-Raf Protein besitzt ein kalkuliertes molekulares Gewicht von 74 kDa und B-Raf von 95 kDa. Zusätzliche B-Raf-Isoformen, die in den Geweben differentiell exprimiert werden, entstehen durch alternatives Splicen; C-Raf weist ebenfalls eine bekannte Splice-Variante auf. Mit 68 kDa ist A-Raf die kleinste Isoform [119]. Alle drei Mitglieder der Raf-Kinasen-Familie weisen eine ähnliche Struktur auf: sie besitzen drei konservierte Regionen CR1, CR2 und CR3 (s. Abb. 4) mit unterschiedlichen Funktionen, die in variable Regionen eingebettet sind [119].

CR1 enthält die „Ras binding domaine“ (RBD), die an aktives, GTP-gebundenes Ras bindet und eine Zinkfingerstruktur, auch „cysteine-rich domaine“ (CRD) genannt, die zwei Zinkionen binden kann. Diese stellt eine zweite Ras-Bindestelle dar, die die Assoziation mit Ras stabilisiert [117],[120-122]. Weiterhin ist sie notwendig für die Interaktion von CR1 mit der Kinasedomäne zur Raf-Autoinhibition [115],[123]. Neben Ras interagiert CR1 auch mit Membranphospholipiden [124], wodurch es nach der erfolgten Bindung von Ras zur weiteren Aktivierung von Raf kommt [125-127].

Im Bereich der CR2 finden sich wichtige inhibitorische Phosphorylierungsstellen, die an der negativen Regulation der Bindung von Ras und der Raf-Aktivierung teilnehmen [115],[128]. Eine konservierte Phosphorylierungsstelle bei S259 (C-Raf) dient als regulatorische Bindestelle für 14-3-3 Proteine; in B-Raf entspricht diese Stelle S365, in A-Raf S214 [118],[129-133].

Die Kinasedomäne einschließlich des Aktivierungssegments, dessen Phosphorylierung essentiell für die Kinaseaktivierung ist, liegt in CR3 [115],[134]. Ein

konserviertes Serin bei S621 (C-Raf) dient als zweite Bindestelle für 14-3-3 Proteine (B-Raf: S729, A-Raf: S572) [129].

Neben den bisher beschriebenen Phosphorylierungsstellen sind mittlerweile zahlreiche weitere bekannt, die mit Aktivierung oder Feedback-Inhibition der Kinasen in Verbindung gebracht werden [134-140]. In der Zelle liegt Raf als Teil eines großen Proteinkomplexes vor, der u.a. aus Homo- und Heterodimeren von Raf, 14-3-3 Proteinen und Hitzeschockproteinen besteht, [118],[141-145].

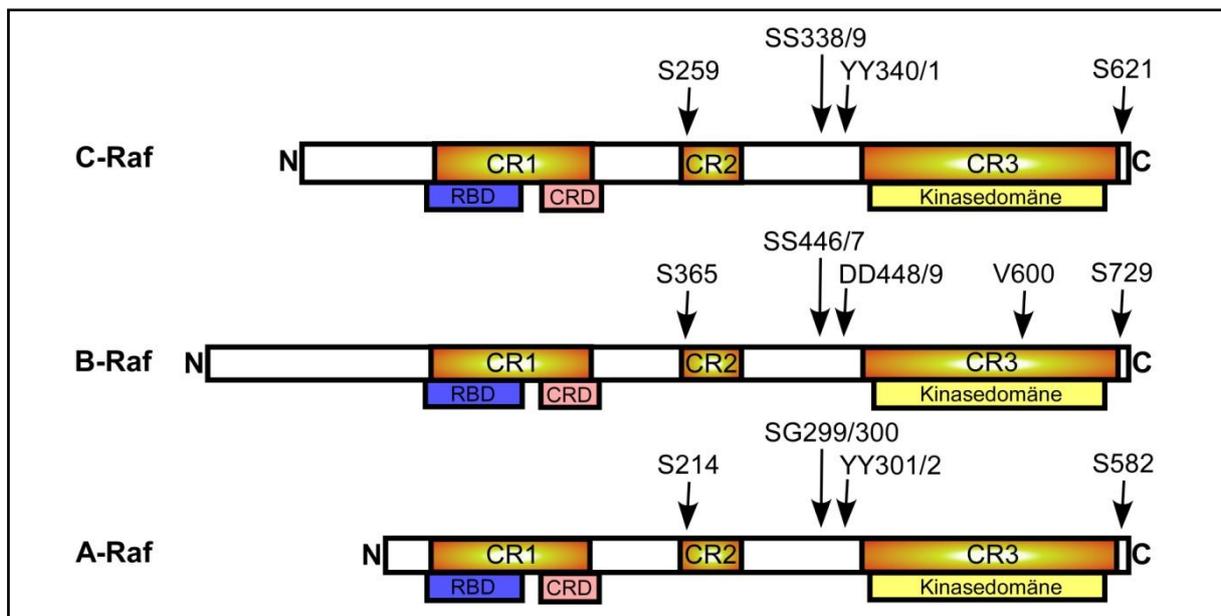


Abbildung 4: Schematische Struktur und regulatorische Phosphorylierungsstellen der menschlichen Raf-Kinasen. Die Raf-Isoformen C-Raf, B-Raf und A-Raf weisen drei konservierte Regionen (CR1, CR2 und CR3) auf. CR1 enthält die Ras-Binde-Domäne RBD und die Zinkfinger/Cystein-reiche Domäne CRD, die beide für die Bindung von aktiviertem Ras notwendig sind. CR2 enthält ein Serin, das im phosphoryliertem Zustand an regulatorische 14-3-3 Proteine bindet. Eine zweite regulatorische Bindestelle für 14-3-3 Proteine befindet sich am C-Terminus der Kinasen. CR3 enthält die Proteinkinasedomäne mit ATP-Bindestelle und Aktivierungselement. Ausgewählte aktivierende Phosphorylierungsstellen von C-Raf und die entsprechenden Stellen der anderen Isoformen sowie die bekannte Mutationsstelle V600 in B-Raf sind ebenfalls in der Abbildung verzeichnet (Abb. modifiziert nach [118]).

1.2.2 Funktion

Die Raf-Kinasen stellen wichtige Komponenten des Ras/Raf/MAPK- (mitogen-activated protein kinase) Signalweges dar, der eine entscheidende Rolle bei verschiedenen physiologischen Prozessen wie Metabolismus, Zellzyklusprogression, Differenzierung, Apoptose und neurologischen Funktionen spielt. In diesem Weg phosphoryliert aktiviertes Raf MEK1 (MAP/ERK Kinase) und MEK2, die Kinasen, die

ihrerseits ERK1 (extracellular-signal regulated kinase) und ERK2 phosphorylieren [118]. ERKs sind Serin-Threonin-Proteinkinasen, die in kleiner Menge in vielen Zelltypen vorkommen und mit einer Vielzahl von Substraten, wie p90^{RSK}, c-myc, c-jun, c-fos, Hif-1 und Ets interagieren [146].

Abgesehen von der Rolle der Raf-Kinasen im MAPK-Signalweg, wurden mittlerweile auch MEK-unabhängige Raf-Funktionen entdeckt. Es wird angenommen, dass einige der Funktionen sogar unabhängig von der Kinaseaktivität sein könnten, was auf strukturelle Modulationsfunktionen hinweist. Unter diesen neuen C-Raf-Zielen finden sich u.a. Proteine, die bei der Kontrolle des programmierten Zelltods eine Rolle spielen, z.B. ASK-1 (apoptosis signal-regulating kinase 1). Die genaue Bedeutung von Raf bei der Regulation dieser Zielstrukturen und der damit assoziierte Mechanismus müssen jedoch noch aufgedeckt werden. Somit bleibt MEK bis jetzt das einzige sehr gut etablierte physiologische Ziel von Raf [118],[147-156].

Knockout (KO)-Studien der Raf-Isoformen in Mäusen brachten weitere interessante Einblicke in die Funktion und zeigten, dass die Isoformen sowohl überlappende als auch einzigartige Funktionen in der Embryogenese und Organogenese besitzen. *c-raf* KO Mäuse sterben während der Embryonalentwicklung (zwischen E10.5 und E12.5) und zeigen eine schlechte Entwicklung der Leber, der Plazenta und der hämatopoetischen Organe. Diese Studien deuteten auch an, dass C-Raf während der Embryogenese notwendig ist, um apoptotische Vorgänge einzudämmen. Die Aktivierung des MAPK-Signalweges im Embryo ist jedoch regulär, da B-Raf in diesem Fall die Aktivierung von MEK übernehmen kann. Andere C-Raf-Ziele neben dem MAPK-Signalweg sollten demnach für den lethalen Phänotyp verantwortlich sein. *b-raf* KO Mäuse sterben *in utero* bis zum embryonischen Tag E12.5 durch massive Einblutungen in Körperhöhlen auf Grund von Apoptose differenzierter endothelialer Zellen. Zusätzlich zeigen sich schwere vaskuläre und neuronale Defekte. *a-raf*-defiziente Mäuse werden zwar lebend geboren, zeigen aber schwere intestinale und neurologische Abnormalitäten. Bei Verwendung von „Black 6“ Mäusen für die KO-Studie sterben diese innerhalb von 7-21 Tagen nach der Geburt. Diese KO-Studien deuten an, dass alle Raf-Isoformen notwendig für die normale Embryogenese, die Organogenese und das Überleben sind, aber auch dass sie unterschiedliche Funktionen besitzen. Der KO der einzelnen Isoformen zeigt relativ milde Effekte auf die Entwicklung des Embryos bis zum Tag E10.5, was darauf hindeutet, dass sich die Isoformen zu einem gewissen Grad bis zu dieser

Entwicklungsphase gegenseitig in ihrer Funktion kompensieren können. Studien mit zweifachem KO von *b*- und *c-raf* gleichzeitig zeigen schwerere Phänotypen als die Einzel-KO; hierbei kommt es zu stark unterentwickelten Embryos [117-119],[157-163].

Neben den funktionellen existieren auch biochemische Unterschiede zwischen den Isoformen. A-Raf wird nur schwach durch mutiertes Ras aktiviert, da der Austausch eines Arginins durch ein Lysin an der Position 22 in der RBD die Bindung von Ras an A-Raf abschwächt [115],[164]. Weiterhin zeigt A-Raf auf Grund einzigartiger, nicht-konservierter Aminosäuren im N-Terminus lediglich eine geringe Kinaseaktivität für MEK [115],[139],[165] und aktiviert im Gegensatz zu C- und B-Raf vor allem MEK1, aber nicht MEK2. Möglicherweise haben MEK1 und MEK2 der Säugetiere unterschiedliche Funktionen; durch spezifische Aktivierung von MEK1 durch A-Raf könnten somit andere zelluläre Signalwege als durch Aktivierung über C-Raf hervorgerufen werden [166-168]. Obwohl die Isoformen in ihren primären Sequenzen hoch konserviert sind, haben sie somit neben den ähnlichen auch unterschiedliche biochemische und funktionelle Eigenschaften [117],[139],[166],[169].

1.2.3 Regulation

Die Regulation der Raf-Kinasen umfasst verschiedene posttranslationale Modifizierungen, Protein-Protein-Wechselwirkungen, Feedback-Mechanismen und Modulation der Aktivität durch Scaffold-Proteine [117],[118]. Die Aktivierung von Raf beginnt mit der Interaktion von GTP-gebundenem, aktivem Ras mit der RBD und CRD von CR1, anschließend wird Raf zur weiteren Aktivierung an die Membran rekrutiert. Im Normalzustand ist die katalytische Domäne von Raf gefaltet und an die N-terminale regulatorische Domäne gebunden. Diese Interaktion wird durch die Bindung eines 14-3-3 Dimers an zwei C-Raf Phosphorylierungsstellen im N- und C-Terminus, S259 und S621 (bzw. pS365 und pS729 in B-Raf, pS214 und pS576 in A-Raf), die im basalen Zustand phosphoryliert sind, vermittelt [129-133]. Als Folge der Zellaktivierung stört das Binden von Ras-GTP die Bindung von 14-3-3 an S259 (Dephosphorylierung über die Serine/Threonin Phosphatasen PP1 und PP2 [170]) und führt somit zu Konformationsänderungen von C-Raf, die notwendig für die stabile Aktivierung sind [129],[171]. Zur vollständigen Aktivierung von C-Raf sind noch weitere Modifikationen notwendig wie beispielsweise die Phosphorylierung eines

N-terminal zur Kinasedomäne gelegenen Serins (S338), die als Surrogatmarker der Aktivierung gilt [135-138]. Es wurde bisher angenommen, dass PAK (p21 activated kinase) diese Stelle phosphoryliert [136],[172]; neuere Arbeiten schlagen jedoch vor, dass S338 eine Autophosphorylierungsstelle oder ein Target für CK2 (casein kinase 2) sein könnte [173],[174]. Die zu S338 homologe Stelle in B-Raf (Ser446) ist konstitutiv phosphoryliert und könnte die höhere basale Aktivität von B-Raf im Vergleich zu C-Raf bedingen [138]. Eine weitere C-Raf Phosphorylierungsstelle ist Y341, welches ebenfalls N-terminal zur Kinasedomäne liegt [139],[138] und durch Src (sarcoma) und JAK (janus kinase) phosphoryliert wird [175],[176]. In B-Raf finden sich an entsprechender Stelle zwei Asparaginsäurereste (Asp448 und 449), die negative Ladungen tragen. Zusammen mit der konstitutiven Phosphorylierung von S446 trägt die N-Region von B-Raf drei negative Ladungen und braucht keine zusätzlichen Enzym-katalysierten Modifikationen, um während der Aktivierung negativ geladen zu werden. Dies erklärt, warum B-Raf durch Ras alleine vollständig aktiviert werden kann, während A- und C-Raf Src für die vollständige Aktivierung benötigen [123],[139]. Weitere für die Aktivität wichtige Phosphorylierungsstellen konnten im Aktivierungsloop identifiziert werden [117],[134],[177]. Wurde Raf über die beschriebenen Phosphorylierungen aktiviert, dissoziiert Raf von Ras und gibt das Signal an MEK im Zytoplasma weiter. Dabei sorgen gebundene 14-3-3 Dimere für Stabilität der aktiven Raf-Konformation [119]. Die Deaktivierung wird durch die spezifische Bindung von PP5 an aktiviertes C-Raf initiiert, was zur Dephosphorylierung von pS338, Rephosphorylierung von S259 und Rückkehr in den inaktiven Zustand führt [178].

Zur weiteren Modulation der Regulation dienen Proteine wie KSR (kinase suppressor of Ras) [179],[180], Sur8 [181], CNK (connector enhancer of KSR) [182], IQGAPs (IQ motif containing GTPase-activating proteins) [183] und PHB (Prohibitin) [184], die das MAPK/ERK-Signaling verstärken. RKIP (Raf kinase inhibitor protein) [185] und Spred (Sprouty-related protein) [186] dienen als Inhibitoren des MAPK-Weges. Auch die Raf Homo- [143] und Heterodimerisierung [141] und die Assoziation mit Chaperonen wie HSP-90/p50(cdc37) [144] und HSP/HSC-70 [145] spielen bei der Regulation der Kinasen eine wichtige Rolle.

1.2.4 Rolle von Raf in Tumoren

B-Raf konnte bereits als *de facto* Onkogen etabliert werden und aktivierende Mutationen des Gens sind in 70 % der Melanomfälle, in 30 % der Patienten mit Schilddrüsenkrebs, in 15 % der Darmkrebsfälle und mit niedrigerer Häufigkeit in mehreren anderen Tumorentitäten nachgewiesen worden [118],[187],[188]; insgesamt ist B-Raf in ca. 7 % aller Krebsarten mutiert [189]. Die meisten der B-Raf Mutationen wurden in der Kinasedomäne gefunden, wobei die Mutation Val600Glu (V600E) 90 % aller Mutationen ausmacht. Diese Mutation führt zu einer negativen Ladung in der Nähe der T589 Phosphorylierungsstelle im Aktivierungsloop und ist ausreichend, um B-Raf-Aktivität zu stimulieren, wodurch es zu konstitutiver MEK- und ERK-Aktivierung kommt [118],[187],[188],[190]. Andere B-Raf Mutationen können zwar zu Proteinen mit beeinträchtigter B-Raf-Aktivität führen, diese könnten jedoch durch Heterodimerisierung mit C-Raf trotzdem ERK konstitutiv aktivieren [189],[191]. Eine der B-Raf V600E entsprechende Mutation wurde bei A- oder C-Raf in menschlichen Tumoren nicht gefunden. Dies liegt wahrscheinlich an der Tatsache, dass diese Isoformen eine striktere Regulation ihrer Kinasedomäne besitzen, wodurch eine einzelne Mutation ungenügend für eine bedeutende Kinaseaktivierung ist. Durch die konstitutive Phosphorylierung von S445 und die phosphomimetischen Asparaginsäurereste bei 448/449 ist B-Raf bereits für die Aktivierung vorbereitet [123],[192-194]. Nur selten werden B-Raf- und Ras-aktivierende Mutationen in menschlichen Tumoren zusammen gefunden, was darauf hinweist, dass sie in ihrem Potential zur Transformation gleichwertig sein könnten und somit ein Treffer des MAPK-Weges für die Onkogenese ausreichen könnte [195-197]. Während einige Daten eine starke onkogene Aktivität der B-Raf-Mutationen andeuten, legt jedoch das Vorhandensein von B-Raf-Mutationen in prä-malignen Läsionen nahe, dass B-Raf Mutationen alleine nicht ausreichen könnten, um die Transformation anzutreiben [118],[188-190],[198-200]. Für das Melanom wurde gezeigt, dass die konstitutive Aktivierung des Ras-Raf-Signalwegs durch B-Raf-Mutationen mit schlechter Prognose assoziiert ist [201] und dass die onkogenen B-Raf-Mutationen eher mit der Progression als mit der Initiierung des Melanoms korrelieren [202]. C-Raf wird in einigen Krebsarten (z.B. Lungen- oder Prostatakrebs) überexprimiert, die Rolle für die Onkogenese ist jedoch noch unklar [118],[203]. Verstärkte Expression von A-Raf wurde beispielsweise beim Dickdarmkrebs nachgewiesen [204]. Im Gegensatz zu B-Raf wurden nur wenige Fälle von aktiviertem C-Raf und

bisher keine Mutationen in A-Raf gefunden [205]. Krebs-assoziierte Mutationen von C-Raf wurden zunächst im Mausmodell für chemisch-induzierten Lungenkrebs [206], in menschlichen Krebszelllinien [192] und schließlich in Patienten mit Therapie-assoziiierter Akuter Myeloischer Leukämie (t-AML) [207] beschrieben. Die in der t-AML gefundenen C-Raf Mutationen riefen keine morphologischen Transformationen von NIH3T3 Zellen hervor; es wurde deshalb diskutiert, dass diese Mutationen einen für Tumore prädisponierenden Faktor darstellen [207],[208]. Obwohl noch Unklarheit über die Rolle von C-Raf als primäres Onkogen besteht, ist die Bedeutung von C-Raf bei der Vermittlung Ras-induzierter Transformation und von transformierenden Effekten aktivierter Wachstumsfaktorenrezeptoren gut etabliert [118],[209-212].

Nachdem Versuche, Ras direkt zu inhibieren, in präklinischen und klinischen Studien scheiterten, wurden die Bemühungen verstärkt, die Raf-Kinasen zu blockieren [146],[208],[219-221]. Die verschiedenen Ansätze hierzu beinhalten die Inhibition der Kinasen durch kleine Inhibitormoleküle, die Reduktion der Proteinlevel durch Antisense-Oligonukleotide und das Unterbrechen von Protein-Protein-Interaktionen. Die zunächst entwickelten Substanzen richteten sich gegen C-Raf, jedoch verlagerten sich die Bemühungen auf die Inhibition der B-Raf-Isoform durch die Entdeckung von aktivierenden B-Raf-Mutationen in Tumoren [115],[187].

1.2.5 Rolle der Raf-Kinasen im MM

Durch die bisherige Forschungsarbeit unserer Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Bargou am Lehrstuhl für Translationale Onkologie am Universitätsklinikum Würzburg konnten zwei Subgruppen beim MM definiert werden: eine Gruppe zeigt eine Aktivierung des AKT-Signalweges und ist von diesem Weg in Bezug auf Überleben und Wachstum abhängig, die andere Gruppe wächst AKT-unabhängig. Auf der Basis dieser Vorkenntnisse wurde dann mit der Suche nach AKT-unabhängigen Überlebensmechanismen im MM begonnen. Erste Vorversuche unserer Arbeitsgruppe haben bereits gezeigt, dass die drei Raf-Isoformen in verschiedenen MM Zelllinien exprimiert sind. Weiterhin wurde durch immunhistochemische Analysen von Knochenmarksbiopsien nachgewiesen, dass B- und C-Raf in den Zellen überexprimiert sind. Die pharmakologische Inhibition dieser Isoformen induzierte Apoptose in MM Zelllinien und in primären Myelomzellen aus Knochenmarksaspiraten von Patienten. Da die Sensitivität für die Raf-Inhibition

weder vom AKT-Aktivierungsstatus noch vom Ras-Mutationsstatus abhing, könnte die Raf-Überexpression unabhängig von Ras oder AKT zum malignen Phänotyp beitragen. Da weiterhin gezeigt werden konnte, dass die alleinige Blockade des downstream von Raf gelegenen MEK/ERK-Moduls die Viabilität und das Wachstum von MM Zellen nicht signifikant beeinflusst [95],[112],[113], muss angenommen werden, dass Raf Überlebenswirkungen im MM MEK/ERK-unabhängig vermitteln kann. 2011 wurde das Ergebnis der Genomsequenzierung von 38 MM Patienten veröffentlicht. Hierbei wurde bei einem Patienten eine B-Raf-Mutation entdeckt (G468A), woraufhin weitere 161 Patienten auf die 12 häufigsten B-Raf-Mutationen untersucht wurden. In sieben weiteren Patienten (4 %) [97],[222] konnten B-Raf-Mutationen identifiziert werden. Auch wenn nur wenig über das onkogene Potential bekannt war, präsentierte diese Studie zum ersten Mal im MM eine Mutation, die ein mögliches Ziel für Medikamente darstellt [223]. Eine weiterführende Studie identifizierte auch im MM die B-Raf V600E Mutation als die am meisten auftretende Mutation und zeigte, dass Mutationsträger häufiger ein extramedulläres Myelom entwickeln und die Patienten verglichen mit Kontrollen eine kürzere Überlebenszeit aufweisen. Für einen Patienten konnte ein schnelles und dauerhaftes Ansprechen auf den mutationsspezifischen B-Raf-Inhibitor Vemurafenib nachgewiesen werden. Somit konnte die klinische und therapeutische Relevanz der B-Raf V600E Mutation im MM nachgewiesen werden [224]. Eine weitere Arbeitsgruppe konnte *in vitro* eine Inhibition von Wachstum und Induktion von Apoptose in MM Zelllinien durch Vemurafenib unabhängig von der B-Raf V600E Mutation nachweisen [225], was auf eine potenzielle therapeutische Rolle für Raf-Inhibitoren im MM hinweist.

2 Zielsetzung der Arbeit

Für das Multiple Myelom konnte unsere Arbeitsgruppe direkte Beweise finden, dass onkogenes Ras das Überleben von Tumorzellen vermitteln kann. Da dies jedoch nicht über den AKT-Signalweg geschieht, wurde die Hypothese aufgestellt, dass mutiertes Ras Überlebenssignale über andere Ras-abhängige Signalwege vermittelt. Um diese Vermutung zu bestätigen, führten wir biochemische und funktionelle Analysen des Raf/MAPK-Signalwegs durch und fanden dabei heraus, dass B- und C-Raf in MM Zellen konstitutiv überexprimiert und wichtig für das Zellwachstum und -überleben sind. Somit könnten die Raf-Kinasen wichtige Effektoren für den durch Inhibition von onkogenem Ras vermittelten apoptotischen Effekt darstellen. Die Untersuchungen der Arbeitsgruppe zeigten weiterhin, dass die Behandlung der Zellen mit B- und C-Raf-Inhibitoren Apoptose induziert. Jedoch führten erste Knockdown-Experimente der einzelnen Isoformen nicht zu einem signifikanten Maß an Zelltod. Auch die Blockade der Phosphorylierung von ERK1/2 durch einen MEK-Inhibitor beeinflusst das Wachstum der MM Zellen kaum. Somit stellte sich die Frage nach der Bedeutung der einzelnen Raf-Isoformen für das Überleben und Wachstum der MM Zellen und nach MEK/ERK-unabhängigen Effektormechanismen. Die Verwendung eines B-Raf-Inhibitors führte zu einer Verminderung des Phosphorylierungsgrades von ERK1/2, während die Verwendung eines C-Raf-Inhibitors die Phosphorylierung sogar noch steigerte. Die Aufklärung der genauen Bedeutung der einzelnen Raf-Isoformen für das downstream von Raf gelegene MEK/ERK-Modul steht somit noch aus. Die vorliegende Arbeit soll nun möglichst genau die funktionelle Bedeutung der drei Raf-Isoformen für Wachstum und Überleben der MM Zellen untersuchen und dabei auch die Pan-Raf-Inhibition als neue therapeutische Strategie im MM evaluieren. Weiterhin soll der Mechanismus, der die onkogenen Effekte der Raf-Kinasen im MM vermittelt, aufgeklärt werden und eine mögliche Kooperation des Raf-Signalweges mit dem PI3K/AKT-Signalweg beschrieben werden. Dazu sollen die folgenden Fragestellungen näher analysiert werden:

1. Die Untersuchungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe deuteten an, dass die drei Raf-Isoformen im primären MM überexprimiert sind. Zunächst soll die Expression

und der Aktivierungsstatus von A-, B- und C-Raf in humanen Myelomzelllinien (HMZL) und in primären Proben untersucht werden.

2. Die Bedeutung jeder einzelnen Isoform bzw. das Zusammenspiel aller drei Isoformen für das Überleben der MM Zellen und die Aktivierung des MEK/ERK-Moduls soll mit Hilfe spezifischer shRNAs geklärt werden. Für primäre Zellen wird ein Raf-Inhibitor für die Untersuchung verwendet.
3. Die Unterscheidung der molekularen Effekte einer Raf-Blockade von den Auswirkungen einer MEK-Inhibition sollen mit Hilfe der Microarray-Anwendungen geklärt werden. Die Evaluation der gefundenen Ergebnisse soll auf Proteinebene mittels ausgewählter Targets stattfinden. Um aufzuklären, wie Raf seine onkogene Funktion ausübt, werden zur weiteren Charakterisierung downstream von Raf gelegene Effektoren auf Proteinebene untersucht.
4. Zur Untersuchung einer möglichen Kooperation des PI3K/AKT-Signalweges mit dem Raf-abhängigem Signalmodul wird die Regulation ausgewählter Proteine und das Überleben der Zellen nach einzelner und gleichzeitiger Blockade der Signalwege analysiert.

3 Material und Methoden

3.1 Kultivierung von Zelllinien

Die humanen Myelomzelllinien (HMZL) U266, L363, KMS-12-BM, AMO-1 und KMS11 wurden vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Deutschland) und die Zelllinie MM.1S wurde von LGC Standards GmbH (Wesel, Deutschland) erworben. Die Zelllinie INA-6 stellte freundlicherweise Prof. Dr. M. Gramatzki, Leiter der Sektion für Stammzell- und Immuntherapie am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (Kiel, Deutschland) zur Verfügung.

Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium, das mit 10 % (vol/vol) fötalem Rinderserum (fetal bovine serum, FBS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 1 mM Natriumpyruvat versetzt wurde, gehalten. Sämtliche Reagenzien wurden von der Firma PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich) bezogen. INA-6 Kulturen benötigten zusätzlich 2 ng/ml rekombinantes menschliches Interleukin-6 (IL-6). Alle Zellen wuchsen bei 37 °C und 5 % CO₂ und wurden regelmäßig auf Mykoplasmen getestet.

3.2 Isolierung primärer Myelomzellen und BMSCs

Knochenmarksproben von MM Patienten wurden aus der Routinediagnostik nach Zustimmung der Patienten erhalten. Die Erlaubnis dazu wurde durch das Ethikkomitee der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg (Referenznummer 18/09) erteilt. Zur Aufreinigung der primären Zellen wurde das Knochenmarkspunktat zwecks Homogenisierung zunächst über ein Zellsieb (70 µm, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) gegeben und im Verhältnis 1:1 mit PBS (phosphate buffered saline, PAA) gemischt. Für die anschließende Ficoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation (15 Minuten, 3400 rpm, keine Bremse) wurden ca. 20 ml Lymphocyte Separation Medium (LSM 1077, PAA) mit dem Gemisch überschichtet. Die mononukleäre Zellfraktion bildete einen Ring, der abgenommen und mit PBS und kaltem MACS- (magnetic activated cell sorting) Puffer gewaschen wurde. Nach Pelletierung der Zellen wurden diese in ca. 200 µl MACS-Puffer aufgenommen, mit 20 µl CD138- (Plasmazellmarker) Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach,

Deutschland) vermischt und für eine Viertelstunde bei 4 °C auf einem Rotationsschüttler (MACSmix, Miltenyi Biotec) inkubiert. Die Lösung wurde danach zur Selektion der CD138-positiven Zellen auf eine MACS Large Cell Column (Miltenyi Biotec), die sich in einem starken Magneten (MACS Multistand, Miltenyi Biotec) befand, gegeben. Nach gründlichem Waschen der Säule mit MACS Puffer wurde diese aus dem Magneten entfernt und die gewünschten Zellen konnten mittels eines Stempels herausgedrückt und in 1 ml RPMI 1640 zur weiteren Verwendung aufgenommen werden.

Primäre Stromazellen des Knochenmarks (bone marrow stromal cells; BMSCs) wurden aus dem Säulendurchlauf gewonnen und in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, PAA), dem 20 % (vol/vol) FBS und die üblichen Konzentrationen Penicillin/Streptomycin, Glutamin und Natriumpyruvat zugesetzt wurden, für zwei bis vier Monate kultiviert. Vor Gebrauch wurden die BMSCs trypsiniert und mit einer Dichte von 1500 Zellen pro Well in 96-Well-Platten ausgesät.

Lösungen für die Aufreinigung

MACS-Puffer	1 x	PBS
	2,5 mM	EDTA (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
	0,5 % (v/v)	FBS

3.3 Herstellung von pSU-basierten shRNA-Expressionsvektoren

Die pSUPER-basierten shRNA-Expressionskonstrukte gegen die einzelnen Raf-Isoformen beruhen auf dem pSUPER RNAi System (Oligoengine, Washington, USA). Die Effektivität der Konstrukte wurde durch Elektroporation und Western-Blot-Analyse überprüft. Folgende DNA Sequenzen der sense Oligonukleotide, die den effektivsten Knockdown erzielten, wurden verwendet (bestellt von BioTeZ, Berlin, Deutschland):

A-Raf:

5'-dGATCCCC**GACGCGACATGTCAACATCTTCAAGAGAGATGTTGACATGTCG**
CGTCTTTTTGGAAA-3'

B-Raf:

5'-dGATCCCC**GTGGCATGGTGATGTGGC**ATTCAAGAGAT**TGCCACATCACCATG**
CCACTTTTTGGAAA-3' (pSU/B-Raf-1)

und

5'-dGATCCCC**GCAGATGAAGATCATCGAA**ATTCAAGAGAA**TTTCGATGATC**
TTCATCTGCTTTTTGGAAA-3' (pSU/B-Raf-2)

C-Raf:

5'-dGATCCCC**CAGTGGTCAATGTGCGAA**ATTCAAGAGAA**TTTCGCACATTGAC**
CACTGTTTTTTGGAAA-3'

In kursiv sind Sequenzen dargestellt, die vom jeweiligen Gen stammen. Zum Knockdown von B-Raf wurden zwei Plasmide in Kombination verwendet.

Die gelieferten Oligonukleotide wurden zunächst in destilliertem Wasser gelöst (3 µg/µl) und anschließend in Oligo Annealing Buffer (OAB) annealt. Weiterführend wurden die annealten Oligonukleotide durch die Polynukleotidkinase PNK (Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland) phosphoryliert und in den mit BglII und HindIII (Fermentas) geschnittenen pSUPER Vektor (freundlicherweise von Dr. Agami, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande, zur Verfügung gestellt) mittels T4 Ligase (Fermentas) ligiert. Der Ligationsansatz wurde in XL-1 kompetente *E. coli* Bakterien transformiert. Von den gewachsenen, Ampicillin-resistenten Kolonien wurden einige ausgewählt, um damit Kulturen anzupflanzen, aus denen mit Hilfe des Zyppy Plasmid Miniprep Kits (Zymo Research, Freiburg, Deutschland) die Plasmide präpariert werden konnten. Hierbei wurde nach Herstellerprotokoll gearbeitet. Um zu überprüfen, ob die Oligonukleotide in den pSUPER Vektor eingebaut wurden, konnten die Plasmide mit EcoRI (Fermentas) und HindIII verdaut und mittels Gelelektrophorese überprüft werden: positive Klone hatten Inserts von ca. 300 bp; leere Vektoren ein Insert von ca. 240 bp. Positive Klone wurden ausgewählt und zum Sequenzieren an LGC Genomics GmbH (Berlin, Deutschland) geschickt. Nach Überprüfen der Sequenz wurden aus einem Klon mehrere Mikrogramm des Plasmids über eine Plasmid-Maxi Extraktion (Plasmid Maxi Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert und für die Transfektion verwendet.

Lösungen für die Herstellung der shRNA-Expressionsvektoren

Oligo Annealing Buffer	100 mM	CH ₃ COOK (Merck, Darmstadt, Deutschland)
	30 mM	Hepes (Sigma, Taufkirchen, Deutschland), pH 7,4
	2 mM	Mg(CH ₃ COO) ₂ (Merck)

3.4 Transiente Transfektion von Myelomzelllinien durch Elektroporation

Für die Transfektion wurden pro Ansatz 2×10^7 (MM.1S) bzw. $1,2 \times 10^7$ (INA-6, KMS11) Zellen mit RPMI 1640 Medium ohne Zusätze gewaschen (Zentrifugation für 5 Minuten bei 1200 rpm) und anschließend in 500 μ l RPMI 1640 Medium ohne Zusätze aufgenommen. Für den Knockdown der Raf-Isoformen wurden folgende Konzentrationen der shRNA-Expressionsvektoren verwendet:

20 μ g/ml pSU/A-Raf

15 μ g/ml pSU/B-Raf-1 und 15 μ g/ml pSU/B-Raf-2

20 μ g/ml pSU/C-Raf

Diese Konzentrationen wurden auch verwendet, wenn alle drei Isoformen gleichzeitig ausgeschaltet wurden. Als Kontrolle dienten entsprechende Konzentrationen des leeren pSUPER Vektors. Da die Transfektionsrate durch Elektroporation bei MM Zellen höchstens ca. 25 % entspricht, erfolgte auch immer eine Ko-Transfektion mit einem Expressionsplasmid für humanes trunkiertes CD4 (pCD4 Δ , 10 μ g/ml). Dieses Plasmid wurde konstruiert, indem die CD4 Δ cDNA von pMACS (Miltenyi Biotec) in die EcoRI/HindIII Schnittstellen von pcDNA3.1+ (Invitrogen, Carlsbad, USA) subkloniert wurde.

Über an der Zelloberfläche exprimiertes CD4 konnten transfizierte von nicht-transfizierten Zellen mit Hilfe von paramagnetischen MicroBeads getrennt werden. Zur Überprüfung der Transfektionsrate mittels Durchflusszytometrie wurde weiterhin ein Expressionsplasmid für enhanced green fluorescent protein (p-EGFP-N3, Clontech, Heidelberg, Deutschland) ko-transfiziert (10 μ g/ml).

Die Elektroporation der Zellen erfolgte in 4 mm Küvetten (BioRad, München, Deutschland) mit dem BioRad Gene Pulser bei einer Kapazität von 950 μ F und 280 V (INA-6 und KMS11) bzw. 310 V (MM.1S). Nach der Elektroporation wurden die Zellen für ca. 10-15 Minuten in 2 ml vorgewärmtes RPMI 1640 Medium ohne Zusätze gegeben, bevor sie in 25 ml vorgewärmtes RPMI 1640 Medium überführt und für

24 Stunden im Brutschrank inkubiert wurden. Die anschließende Aufreinigung wird unter Kapitel 3.5 beschrieben. Für die Anfertigung von Western Blots wurden die Zellen 72 h nach der Elektroporation geerntet. Dazu wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Die Zellviabilität nach Raf-Knockdown wurde 96 h post-Transfektion gemessen.

3.5 Aufreinigung transfizierter Zellen mittels MicroBeads

Nach der Inkubation wurden die Zellen pelletiert, mit kaltem MACS-Puffer (4 °C) gewaschen, in ca. 200 µl MACS-Puffer aufgenommen und mit 25 µl MACSelect 4 MicroBeads (Miltenyi Biotec) versetzt. Nach 15 Minuten Inkubation bei 4 °C auf einem Rotationsschüttler wurde 1 ml kalter MACS-Puffer hinzugefügt und die Suspension auf eine Large Cell Column (Miltenyi Biotec) gegeben. Die Säule wurde nach vollständigem Durchlaufen der Suspension mit MACS-Puffer gewaschen und zurückgehaltene Zellen wurden mit 2 ml Zellkulturmedium von der Säule gespült. Um die toten Zellen von den lebenden Zellen abzutrennen wurde diese Suspension mit 600 µl Optiprep (Axis-Shield, Oslo, Norwegen) versetzt, vorsichtig mit PBS überschichtet und für 7 Minuten bei 1400 rpm zentrifugiert. Bei dieser Dichte-Gradienten-Zentrifugation sammelten sich tote Zellen am Boden des Zentrifugationsgefäßes, lebende an der Phasengrenze zwischen PBS und Medium. Die lebenden Zellen wurden mit Zellkulturmedium gewaschen und zur weiteren Inkubation in Medium aufgenommen.

3.6 Durchflusszytometrie

Um den Anteil toter Zellen in einer Zellpopulation zu bestimmen, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in 100 µl Binding Buffer, der 1 µl Annexin-V-Allophycocyanin (APC, verwendet bei EGFP⁺ Zellen) bzw. Annexin V-Fluorescein-Isothiocyanat (FITC, Bender MedSystems, Frankfurt am Main, Deutschland) und 2 µg/ml Propidiumiodid (PI, Sigma) enthielt, resuspendiert. Annexin-V bindet mit hoher Affinität an das Phospholipid Phosphatidylserin, das bereits im frühen Stadium der Apoptose an die Außenseite der intakten Zellmembran transloziert. Da FITC ein ähnliches Fluoreszenzspektrum wie GFP besitzt, wurde für GFP-positive Zellen APC

verwendet. PI ist ein nicht-membrangängiger Farbstoff, der erst, wenn die Zellmembran mit Fortschreiten der Apoptose durchlässig wurde, in die Zelle eindringen und mit der DNA interkalieren kann.

Nach 15 Minuten Inkubation der Zellen bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss wurden erneut 100 µl Binding Buffer hinzugefügt. Die Analyse erfolgte über Durchflusszytometrie an einem FACSCalibur (Cellquest Software; Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Bei der Messung werden Zellen in eine Trägerflüssigkeit aufgenommen und es entsteht durch das Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung ein Strom aus Einzelzellen, die mit einem Laser abgetastet werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe können mit spezifischer Wellenlänge angeregt und das emittierte Fluoreszenzspektrum gemessen werden. Eingesetzt wurde die Durchflusszytometrie in dieser Arbeit zur Differenzierung zwischen lebenden, nekrotischen und apoptotischen Zellen sowie zu der Ermittlung der Transfektionseffizienz.

Für die weitere Analyse der Daten wurde die Software FlowJo (BD, Version 8.8) verwendet. Die Überlebensraten wurden jeweils in Relation zu den entsprechenden Kontrolldaten (Viabilität DMSO-behandelter bzw. pSUPER-transfizierter Zellen) berechnet.

Lösungen für die Durchflusszytometrie

Binding Buffer	10 mM	Hepes (Sigma), pH 7,4
	140 mM	NaCl (Roth)
	2,5 mM	CaCl ₂ (Merck)

3.7 Western-Blot-Analyse

Gefrorene Zellpellets (ca. 1×10^6 Zellen) wurden in 35 µl frisch angesetztem 1xLysepuffer aufgenommen, für 15 Minuten auf Eis inkubiert und für 15 Minuten zentrifugiert (13.000 rpm, 4 °C). Der Proteingehalt der Überstände wurde mittels des BioRad DC Protein Assay Kits an einem Microplate Reader (Model 680, BioRad) bestimmt. Danach wurden 30 µg Protein 1:1 mit Laemmli-Puffer gemischt und für 5 Minuten bei 95 °C erhitzt. Durch eine SDS-Gelelektrophorese mit 10 %igen Polyacrylamidgelen (Laufpuffer: Tris-Glyzin-SDS- (TGS) Puffer) wurden die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran (Protran; 0,45 µm;

Whatman, Dassel, Deutschland) transferiert. Nach Blockieren unspezifischer Bindungsstellen durch Inkubation der Membran in TBST (Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20) mit 5 % Sucofin Milchpulver (TSI GmbH & Co. KG, Zeven, Deutschland) für ca. 1 h, wurde diese mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert.

Folgende Antikörper wurden verwendet:

p-A-Raf Ser299 (# 4431), A-Raf (# 4432), p-B-Raf Ser445 (# 2696), p-C-Raf Ser338 (# 9427), p-MEK1/2 Ser217/221 (# 9154), MEK1/2 (# 9122), p-ERK1/2 Thr202/Tyr204 (# 9101), ERK1/2 (# 9102), p-p70 S6 Kinase Thr421/Ser424 (# 9204), p-p70S6 Kinase Thr389 (#9206), p70S6 Kinase (# 9202), p-Rb Ser 807/811 (# 9308), Rb (# 9309), Cyclin D1 (# 2926), Cyclin D2 (# 2924), p-MTOR Ser2448 (# 2971), MTOR (# 2972), PDK1 (#3062), p-PDK1 Ser241 (#3438) von Cell Signaling Technology, Frankfurt am Main, Deutschland, B-Raf (sc-5284), C-Raf (sc-133) von Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland, β -Aktin (A5316) von Sigma und α -Tubulin (BZL03568) von Biozol, Eching, Deutschland.

Antikörper gegen die phosphorylierten Raf-Isoformen wurden 1:200, β -Aktin und α -Tubulin Antikörper 1:5.000, alle anderen Antikörper 1:1.000 in TBST/ 5 % Milchpulver verdünnt.

Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST erfolgte die Inkubation mit dem HRP- (horseradish peroxidase) gekoppeltem Sekundärantikörper (1:20.000 in TBST/ 5 % Milchpulver verdünnt, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Newmarket, GB) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen wurde die Membran für eine Minute mit frisch angesetzter ECL- (enhanced chemiluminescence) Lösung behandelt und Röntgenfilme (Typon Röntgenfilm GmbH, Frankenthal, Deutschland) wurden entsprechend der Signalstärke des Antikörpers belichtet und entwickelt.

Lösungen für den Western Blot

2 x Lysepuffer	40 mM	Hepes pH 7,9
	700 mM	NaCl
	2 mM	MgCl ₂ (Merck)
	1 mM	EDTA pH 8
	0,2 mM	EGTA (Sigma)

1 x Lysepuffer	500 µl 10 µl 10 µl 1 µl 10 µl 5 µl 100 µl 500 µl	2 x Lysepuffer PMSF 100 mM (Roth) Pefablock 1 mg/ml (Roth) Aprotinin 1 mg/ml (Roth) Natrium-ortho-Vanadat 100 mM (Roth) DTT 100 mM (Sigma) Tergitol NP40 10 % (Sigma) Aqua dest.
2 x Laemmli-Puffer	1 ml 2 ml 4 ml 1 ml 50 µl	Tris 1 M (Roth), pH 6,8 Glycerin 100 % (Merck) SDS 20 % (Roth) β-Mercaptoethanol 100 % (Roth) Bromphenolblau 2 % (Sigma)
10 % Trenngel	3,3 ml 3,8 ml 2,9 ml 100 µl 100 µl 5 µl	Rotiphorese Gel 30 (Roth) Tris pH 8,8 Aqua dest. SDS 10 % APS 10 % (Roth) TEMED (Roth)
5 % Sammelgel	830 µl 580 µl 3,5 ml 50 µl 50 µl 2,5 µl	Rotiphorese Gel 30 Tris pH 6,8 Aqua dest. SDS 10 % APS 10 % TEMED
TGS-Puffer	25 mM 192 mM 0,1 %	Tris pH 8,6 Glycin SDS
Transferpuffer	25 mM 192 mM 20 vol% 0,037 %	Tris Glycin Methanol (Sigma) SDS
TBST-Puffer	20 mM 130 mM 0,1 %	Tris NaCl Tween 20 (Roth)
ECL-Lösung	100 mM 2,5 mM 2 mM 3 mM	Tris pH 8,6 Luminol (Sigma) p-Hydroxycoumarinsäure (Sigma) H ₂ O ₂ (Merck)

3.8 Behandlung von Zellen mit Inhibitoren

Diese Arbeit hat die in Tabelle 2 dargestellten Inhibitoren verwendet. Die Raf-Inhibitoren wurden titriert und im Western Blot getestet, um die effektive Konzentration zu ermitteln, die die Phosphorylierung von MEK1/2 bzw. ERK1/2 verhinderte.

Name	Hauptziel	Hersteller	Konz. Stocklösung [mmol/l]	Lösungsmittel
PD-325901	MEK1/2	Selleck Chemicals (Houston, USA)	25	DMSO
SB-590885	B-Raf	Tocris Bioscience (Bristol, GB)	10	DMSO
MLN-2480	A-, B-, C-Raf	Hözel Diagnostica (Köln, Dtl.)	100	DMSO
BYL-719	PI3K	Novartis (Basel, CH)	20	DMSO
BEZ235	PI3K/mTOR	Selleck Chemicals	10	DMSO

Tabelle 2: Verwendete Inhibitoren. Die Inhibitoren wurden in der angegebenen Konzentration der Stocklösung angesetzt und für die Versuche weiter verdünnt.

Zur Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven wurden die MM Zellen (INA-6, KMS11 7.500 Zellen pro Well, MM.1S 10.000 Zellen pro Well) in 96-Well-Platten mit 100 µl Zellkulturmedium ausgesät. Zur Aussaat primärer Zellen wurde das Medium von adhärenen BMSC Kulturen entfernt und durch ca. 10.000 primäre Zellen in 100 µl Medium pro Well ersetzt. Die ausgesäten Zellen wurden mit 100 µl frisch angesetzter Verdünnungen der Inhibitoren vermischt, wobei die Konzentration dieser Verdünnungen dabei das Doppelte (Einzel-Drug Versuche) bzw. das Vierfache (2-Drugs Kombinationsexperimente) der gewünschten Endkonzentration betrug. Mit der höchsten entsprechenden DMSO-Konzentration behandelte Zellen dienten als Kontrolle. Bei Zelllinien wurde die Überlebensrate nach 3 Tagen bestimmt, bei primären Zellen nach 5 Tagen. Zur Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. Für die graphische Auswertung der gefundenen Messwerte wurde die Software GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA) verwendet (nicht-lineare Regressionsanalyse mit variabler Steigung).

Für die Western Blot Analyse wurden die Zellen in 6-Well-Platten (ca. 1×10^6 Zellen) ausgesät. MM.1S Zellen wurden 1-2 Tage vor Versuchsbeginn ausgesät, damit sie sich absetzen konnten. Anschließend wurden die Zellen mit der benötigten Inhibitor-Konzentration für einen bestimmten Zeitraum (s. auch Ergebnisse) behandelt, bevor sie geerntet wurden. Bei allen Experimenten mit MLN-2480, SB-590885, BYL-719 und BEZ235, die für die Western-Blot-Analyse vorgesehen waren, wurde die Zugabe des Pan-Caspasen-Inhibitors Z-VAD-fmk (50 mM final; PeptaNova, Sandhausen, Deutschland) zur Verhinderung des vorzeitigen Zelltodes notwendig.

3.9 Microarray-Analyse

Zur Durchführung der Microarray-RNA Analyse wurden zunächst INA-6 Zellen ausgesät (300.000 Zellen in 6 ml Medium) und für einen Zeitraum von 8 h mit 3 μ M (Versuch 1) bzw. 9 μ M (Wiederholung von Versuch 1) SB-590885 oder mit 1 μ M PD-325901 bzw. DMSO als Kontrolle behandelt. Die beiden verwendeten Konzentrationen von SB-590885 der Versuche entsprachen jeweils der empirisch ermittelten, wirkungsvollen Konzentration der jeweiligen Inhibitor-Charge. Die RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) aus den Zellen gemäß Herstellerprotokoll isoliert. Die Qualität der Proben wurde an Hand der Ergebnisse des Agilent 2100 Bioanalyzers- (Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland) Laufs beurteilt (durchgeführt von M. Göbel, Institut für Immunologie, Würzburg). Die cDNA Synthese, das Labelling und die Microarray-Analyse wurden von Dr. C. Scholz (Interdisciplinary Centre for Clinical Research der Universität Würzburg) durchgeführt. Die Herstellung doppelsträngiger cDNA, die Vorbereitung und das Labeln der cRNA, die Hybridisierung auf einen GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, USA) und das Waschen wurden gemäß dem Affymetrix Protokoll durchgeführt. Die Arrays wurden mittels eines GeneChip Scanners 3000 (Affymetrix) gescannt. Signalintensitäten wurden durch das statistische Fehlermodell VSN (Variance Stabilization and Normalization) normalisiert und die Qualität und Vergleichbarkeit aller Daten wurde durch Density Plots, RNA Degradation und Correspondence Analysis überprüft.

Zur weiteren Untersuchung wurden die in der Microarray-Analyse als differentiell reguliert gefundenen Gene mit Hilfe der bioinformatischen Plattform DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) untersucht. DAVID

kann unter <http://david.niaid.nih.gov> oder <http://david.abcc.ncifcrf.gov> gefunden werden. Die Tools dieser Plattform dienen der funktionellen Interpretation großer Listen von Genen aus z.B. Microarray-Analysen und sollen somit helfen, die biologische Bedeutung hinter großen Listen von Genen zu verstehen. Für jede gegebene Liste können die Tools der Datenbank DAVID angereicherte biologische Motive, insbesondere sog. GO (Gene Ontology) terms identifizieren. Gene Ontology ist eine bioinformatische Initiative, die die Darstellung von Gen- und Genprodukteigenschaften in allen Spezies vereinheitlichen möchte und drei Bereiche abdeckt: Zelluläre Komponenten, Biologische Prozesse und Molekulare Funktionen. Die GO kann genutzt werden, um mit Hilfe eines statistischen Algorithmus zu testen, ob ein GO Term für eine gegebene Liste von Genen statistisch angereichert ist (term enrichment analysis). Die Analyse von GO Annotationen erlaubt es, in Genexpressionsprofilen Familien von Genen zu identifizieren, die eine signifikante Rolle in einem spezifischen biologischen Prozess spielen könnten.

4 Ergebnisse

4.1 Raf-Isoformen sind im MM häufig konstitutiv aktiviert

Zu Beginn der Arbeit wurde die Expression und Aktivierung der Raf-Isoformen in verschiedenen humanen Myelomzelllinien (HMZL) und in primären Myelomproben, die im Rahmen einer diagnostischen Knochenmarkspunktion mittels CD138 MACS-Isolation gewonnen wurden, ermittelt (s. Abb. 5). Für die Untersuchung wurden Western Blots von Gesamtzellextrakten angefertigt und immunchemische Proteinfärbungen mit spezifischen Antikörpern gegen die Raf-Isoformen bzw. deren phosphorylierte Form durchgeführt. Frühe Daten unserer Arbeitsgruppe zeigten bereits, dass alle drei Raf-Isoformen in MM Zellen exprimiert werden. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Weiterhin konnte mit Hilfe spezifischer phospho-Antikörper nachgewiesen werden, dass die Raf-Isoformen sowohl in den HMZL, als auch in den primären Myelomproben in aktivierter Form vorlagen. Die phospho-Antikörper richteten sich gegen Phosphorylierungsstellen, die mit der Aktivierung der jeweiligen Isoform korrelieren (A-Raf: Ser299 [165], B-Raf: Ser445 [138], C-Raf: Ser338 [135]). Die Aktivierung der Isoformen konnte sowohl in Zelllinien mit N- oder K-Ras-Mutation als auch mit wildtypischem Ras nachgewiesen werden.

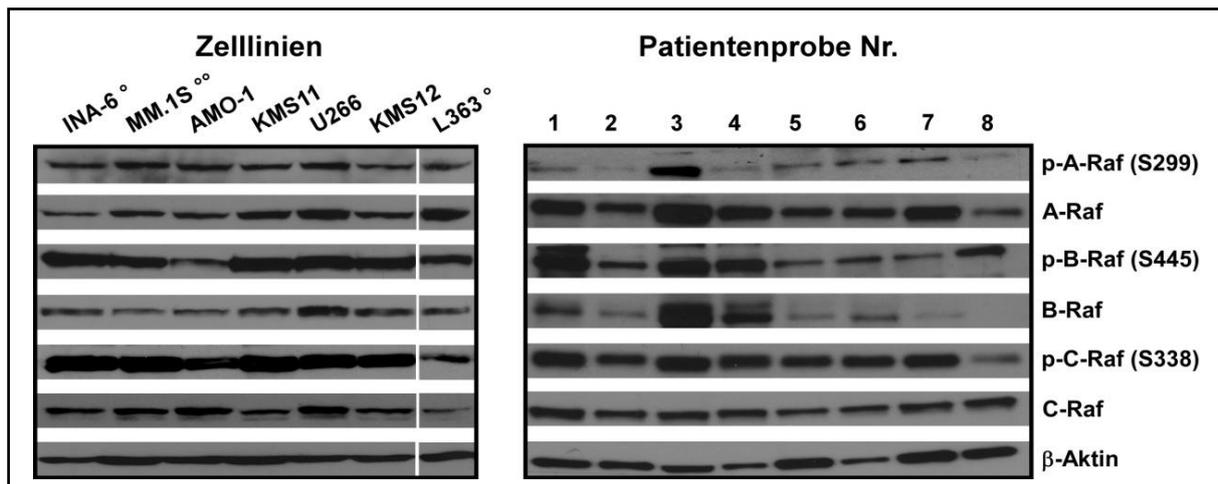


Abbildung 5: Expression und Aktivierungsstatus der Raf-Isoformen in humanen MM Zelllinien und primären Myelomzellen. Für die Western-Blot-Analyse wurden je 50 µg Protein im SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Spezifische Antikörper gegen A-, B- oder C-Raf bzw. gegen bestimmte Phosphorylierungsstellen der einzelnen Isoformen dienten zum Nachweis der Expression, respektive der Aktivierung der Isoformen. Die Aktivierung der Raf-Isoformen ließ sich sowohl in den Zelllinien (links) mit mutiertem N-Ras (°), mutiertem K-Ras (°°) und wildtypischem Ras als auch in den primären Myelomzellen (rechts) nachweisen. Als Vergleichskontrolle diente β-Aktin, welches in den verschiedenen Proben unterschiedlich stark vorhanden war.

4.2 Pan-Raf-Inhibition unterbindet die Aktivierung des MAPK-Signalwegs

Der MAPK-Signalweg spielt eine wichtige Rolle beim Wachstum und der Proliferation von MM Zellen [228]. Um die Bedeutung von Raf für die Funktionalität des Signalweges zu untersuchen, standen spezifische shRNAs, die sich gegen jeweils eine der Raf-Isoformen richteten, und Raf-Inhibitoren zur Verfügung. Der signifikanteste Unterschied zwischen den beiden Ansätzen besteht darin, dass RNA-Interferenz-vermitteltes Silencing die Ziel-mRNA (und damit das Protein) aus der Zelle entfernt, während pharmakologische Inhibition nur die Funktion blockiert; das Protein bleibt noch in der Zelle vorhanden. Weiterhin braucht es mitunter Tage bis der Effekt der shRNAs eintritt, während die pharmakologische Inhibition sofort Auswirkungen zeigen kann. In der Zellkultur lassen sich die shRNAs leicht anwenden, in anderen Systemen (wie Organismen) kann die Expression schwieriger werden und die pharmakologische Inhibition wäre dann die bessere Option. Da beide Methoden zu "off-target"-Effekten führen könnten, sollten zur Erlangung aussagekräftiger Daten bei der Inhibition einer Zielstruktur beide der methodisch unabhängigen Ansätze angewandt werden.

4.2.1 Pan-Raf-Inhibition mittels Knockdown inhibiert den MAPK-Signalweg

Die shRNAs gegen A- und C-Raf standen in unserer Arbeitsgruppe bereits zur Verfügung; für den Knockdown der B-Raf-Isoform war es notwendig, im Gegensatz zu den in der Literatur veröffentlichten Daten [229-231] zwei shRNAs zu kombinieren. Die Wirkung und Spezifität der shRNAs ließ sich über Western-Blot-Analysen nachweisen; die shRNAs waren nur gegen jeweils eine Isoform wirksam (s. Abb. 6).

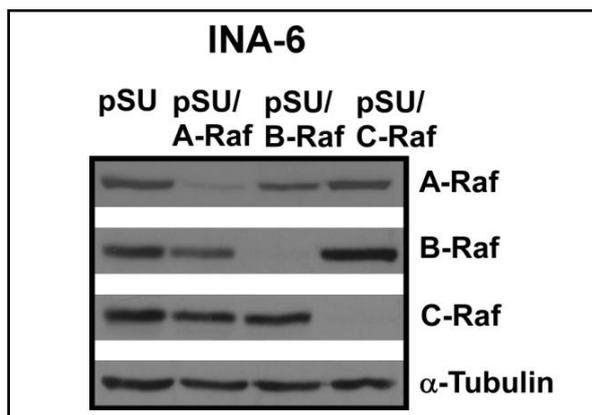


Abbildung 6: Spezifität der verwendeten shRNAs. INA-6 Zellen wurden mit den shRNAs der drei Isoformen behandelt, lysiert, und eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Diese zeigte, dass die shRNAs jeweils spezifisch für eine Isoform waren; andere Isoformen wurden nicht getroffen. Die Zellen wurden jeweils 72 h nach Transfektion geerntet. Mit α -Tubulin wurde die gleichmäßige Probenbeladung überprüft. Als Kontrolle wurden mit pSU-transfizierte Zellen (pSU) genutzt.

Mit Hilfe des Isoform-spezifischen Raf-Knockdowns konnte die Aktivierung des downstream von Raf gelegenen MEK/ERK-Moduls nach Depletion einer einzelnen Isoform in den Zelllinien INA-6 (mutiertes N-Ras), MM.1S (mutiertes K-Ras) und KMS11 (wildtypisches Ras) untersucht werden. Als gleichbedeutend mit einer Aktivität wird bei MEK1/2 die Phosphorylierung an der Stelle Ser217/221 [232] und bei ERK1/2 an der Stelle Thr202/204 [233] gesetzt. Nach Knockdown einer einzelnen Isoform konnte keine Abnahme der Aktivität des MEK/ERK-Moduls nachgewiesen werden (s. Abb. 7).

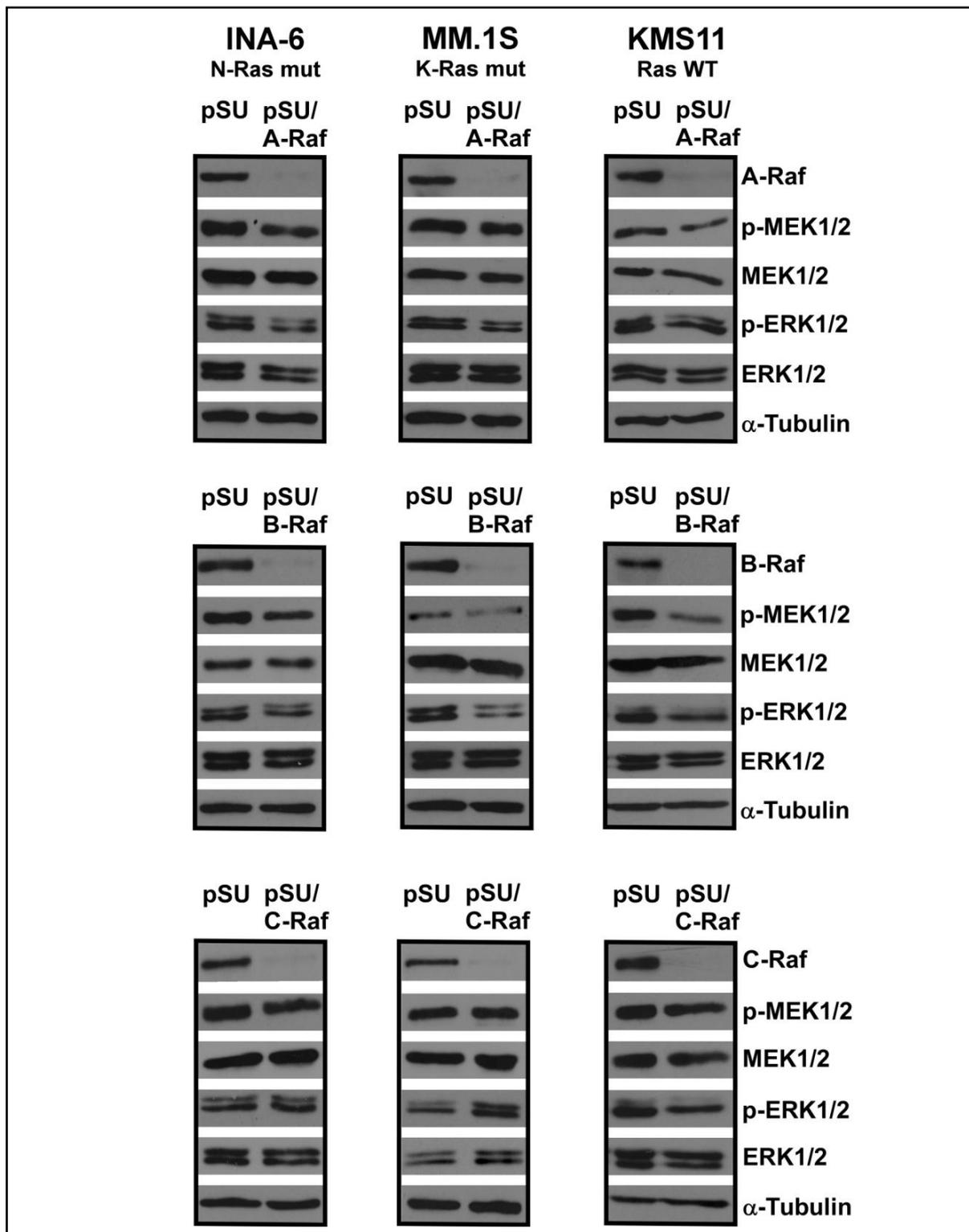


Abbildung 7: MAPK-Signaling nach Isoform-spezifischem Raf-Knockdown. Durch Western-Blot-Analysen wurde die Aktivierung des MEK/ERK-Moduls nach Knockdown von A-, B- oder C-Raf untersucht. Spezifische Antikörper gegen Phosphorylierungsstellen wiesen dabei auf die Aktivität von MEK1/2 bzw. ERK1/2 hin. Der Knockdown einer einzelnen Raf-Isoform führte in keiner der verwendeten Zelllinien zu einer deutlichen Abnahme der Phosphorylierung im Vergleich mit pSU-transfizierten Kontrollzellen. α -Tubulin diente als Ladungskontrolle; Antikörper gegen MEK1/2 bzw. ERK1/2 wurden als Indikator für die Gesamtproteinmenge an MEK/ERK genutzt. Die Zellen wurden nach ca. 72 h geerntet.

Da der Knockdown einer einzelnen Isoform keinen Einfluss auf die downstream gelegenen Kinasen hatte, wurden in einem weiteren Experiment alle drei Raf-Isoformen in den Zellen mit Hilfe der shRNAs gleichzeitig ausgeschaltet (s. Abb. 8). Durch diesen Pan-Raf-Knockdown kam es zu einer vollständigen Deaktivierung des MEK/ERK-Moduls.

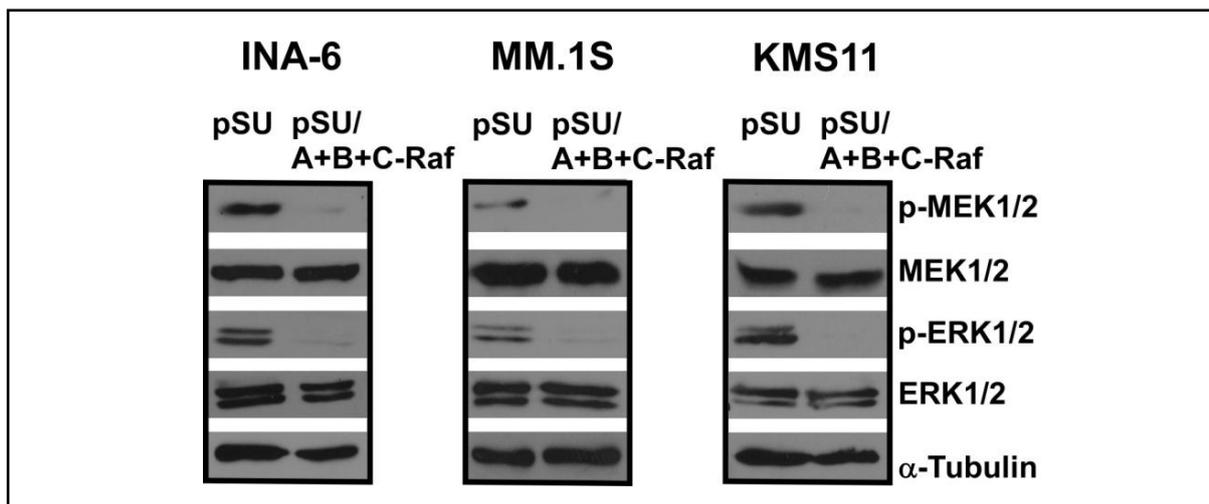


Abbildung 8: MAPK-Signaling nach Pan-Raf-Knockdown. Simultaner Knockdown der drei Raf-Isoformen führte im Western Blot zu einer De-Phosphorylierung von MEK1/2 und ERK1/2 und somit zu einer Inhibition des MAPK-Signalwegs. Mit der entsprechenden Konzentration von pSU behandelte Zellen dienten als Kontrolle; α -Tubulin zeigte die gleichmäßige Proteinbeladung an. Die Menge an unphosphoryliertem MEK/ERK blieb nach Raf-Knockdown konstant (Ernten der Zellen nach 72 h).

4.2.2 Pan-Raf-Blockade mittels Inhibitoren blockiert den MAPK-Signalweg

Für die vorliegende Arbeit standen zwei pharmakologische Inhibitoren zur Verfügung. Bei MLN-2480 handelt es sich um einen selektiven Pan-Raf-Kinase-Inhibitor; SB-590885 wird in der Literatur als potenter B-Raf-Inhibitor beschrieben und wurde in dieser Arbeit auf Grund besserer Verfügbarkeit für den Großteil der Experimente verwendet. Versuche mit MLN-2480 dienten jedoch als Referenz und zeigten, dass dieser Inhibitor, ebenso wie der simultane Knockdown aller drei Raf-Isoformen, die Aktivierung von MEK1/2 und somit auch ERK1/2, vollständig unterdrücken konnte (s. Abb. 9).

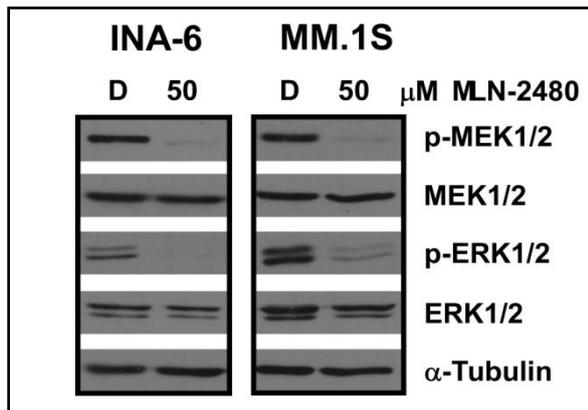


Abbildung 9: Pan-Raf-Blockade mittels Pan-Raf-Inhibitor MLN-2480. Das Ergebnis der Western-Blot-Analyse zeigte, dass der Pan-Raf-Inhibitor MLN-2480 ebenso wie die Pan-Raf-Blockade durch shRNAs das MEK/ERK-Modul in den Zelllinien INA-6 und MM.1S komplett abschalten konnte (Verlust der Phosphorylierung von MEK1/2 und ERK1/2). DMSO-behandelte Zellen (D) dienen als Kontrolle; die Inkubation betrug 24 h. Die Färbung auf α -Tubulin kontrollierte die gleichmäßige Beladung; die Gesamtmenge an MEK1/2 und ERK1/2 ist ebenfalls dargestellt.

Bei entsprechend hoher Dosierung ließ sich auch bei Verwendung des zweiten Inhibitors, SB-590885, keine MAPK-Aktivität mehr feststellen (s. Abb. 10). Daher konnte angenommen werden, dass dieser Inhibitor bei genügend hoher Konzentration (INA-6: 9 μ M, MM.1S 10 μ M) nicht mehr nur B-Raf hemmte, sondern auch als Pan-Raf-Inhibitor wirkte.

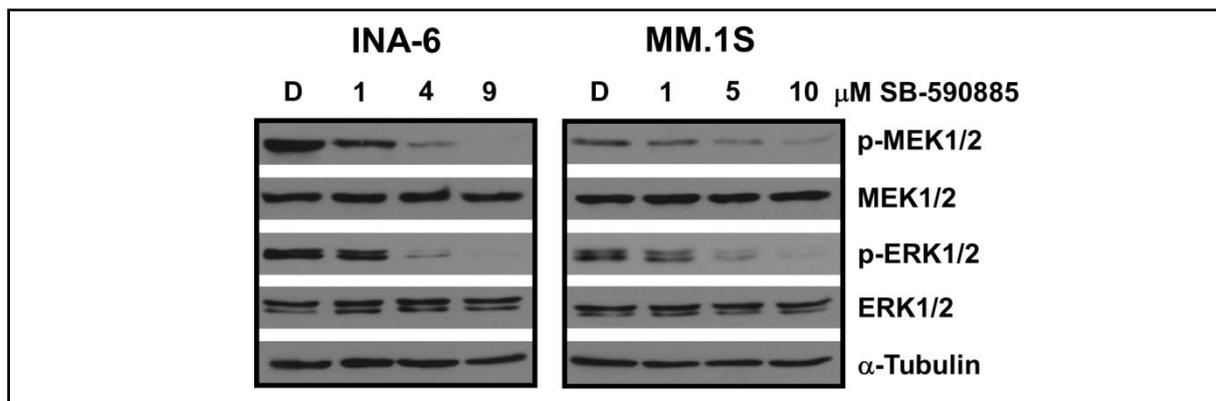


Abbildung 10: Pan-Raf-Inhibition durch SB-590885. INA-6 und MM.1S Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen des Inhibitors SB-590885 behandelt und eine Western-Blot-Analyse mit den Zellextrakten durchgeführt. Die in der Literatur als B-Raf-Inhibitor beschriebene Verbindung vermochte bei genügend hoher Konzentration das MEK/ERK-Modul komplett auszuschalten und somit wie ein Pan-Raf-Inhibitor zu wirken. Angezeigt wurde dies durch den Verlust der Phosphorylierung von MEK1/2 und ERK1/2 bei gleichbleibender Menge an Gesamt-MEK/ERK. α -Tubulin diente als Ladungskontrolle (Inkubationszeit 8 h), DMSO- (D) behandelte Zellen als Kontrolle.

4.3 Pan-Raf-Inhibition induziert Apoptose in MM Zellen

4.3.1 Pan-Raf-Knockdown verstärkt die apoptotischen Effekte gegenüber der Depletion einer einzelnen Isoform

Durch einen Isoform-spezifischen Raf-Knockdown konnte weiterhin die Bedeutung der Isoformen für das Überleben der MM Zellen untersucht werden (s. Abb. 11). Knockdown von C-Raf rief keine (INA-6) bzw. nur sehr geringfügige (MM.1S, KMS11) apoptotische Effekte in den Zellen hervor. Der Knockdown von A-Raf führte in allen drei Zelllinien zu einer Reduzierung der Viabilität um ca. 25 % gegenüber den Kontrollzellen. Ein durchaus ähnliches Bild ergab sich für den Knockdown von B-Raf; lediglich in KMS11 Zellen führte die Depletion dieser Isoform zu einem Viabilitätsverlust von ca. 50 % im Vergleich zu den Kontrollzellen.

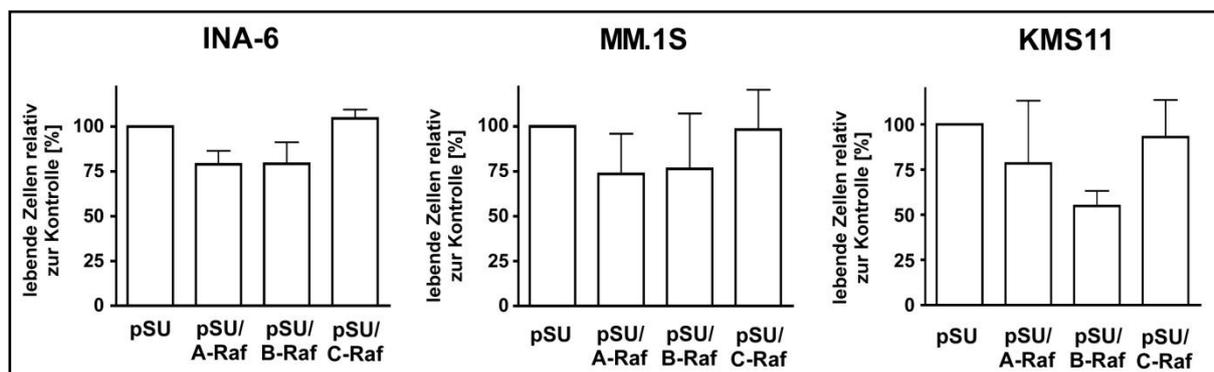


Abbildung 11: Auswirkung des Isoform-spezifischen Raf-Knockdowns auf das Überleben von HMZL. Mittels Durchflusszytometrie wurde der Anteil lebender Zellen ca. 96 h nach Knockdown der Raf-Isoformen ermittelt und auf die jeweilige Kontrolle (pSU-behandelte Zellen) bezogen. Knockdown von C-Raf zeigte die geringsten Effekte auf die Überlebensrate der Zellen; Verlust von A- oder B-Raf rief in den Zellen teilweise Apoptose hervor. Der größte Effekt zeigte sich in KMS11 Zellen; Knockdown von B-Raf führte hier zu einem Viabilitätsverlust von ca. 50 %. Dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Da die Depletion einer einzelnen Raf-Isoform nur partielle apoptotische Effekte in den Zelllinien hervorrief, wurde in einem weiterführenden Experiment durch simultanen Knockdown aller drei Isoformen eine Pan-Raf-Inhibition hervorgerufen (s. Abb. 12). Die apoptotischen Effekte fielen hierbei deutlich stärker als noch beim Einzel-Knockdown aus. Die Viabilität von INA-6 bzw. MM.1S Zellen konnte auf unter 50 % reduziert werden; bei KMS11 sogar auf ca. 30 % bezogen auf die Viabilität der Kontrollzellen.

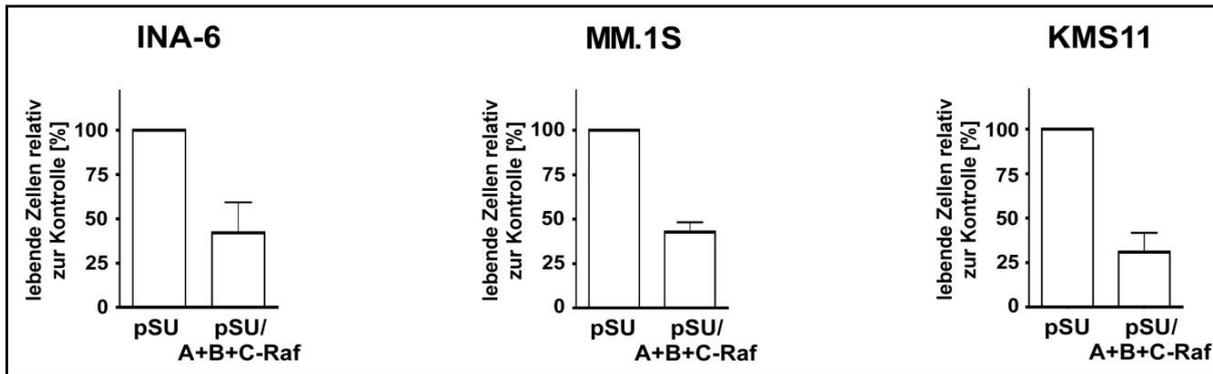


Abbildung 12: Auswirkung einer Pan-Raf-Inhibition durch gleichzeitigen Knockdown aller Isoformen auf das Überleben von MM Zelllinien. Simultaner Knockdown aller drei Isoformen führte in den Zelllinien zu einer starken Abnahme der Viabilität auf ca. 50 % (INA-6, MM.1S) bzw. 30 % (KMS11) im Vergleich zu pSU-behandelten Kontrollzellen. Der Viabilitätsverlust wurde per Durchflusszytometrie 96 h post-Transfektion gemessen; in den Diagrammen dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.

4.3.2 Pan-Raf-Blockade mittels Inhibitoren induziert Apoptose in HMZL und primären Myelomzellen

Da SB-590885 in geeigneter Konzentration offenbar alle drei Raf-Isoformen inhibierte, konnte die Auswirkung einer Pan-Raf-Blockade mittels eines Inhibitors auf das Überleben von MM Zellen untersucht werden. Hierzu wurden die Zellen mit steigenden Konzentrationen von SB-590885 behandelt und die Viabilität nach 72 h durch Annexin-FITC/PI-Färbung und mittels Durchflusszytometrie gemessen. Aus den gemessenen Viabilitäten wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt, aus denen der sog. EC50-Wert ermittelt wurde (s. Abb. 13 und Tab. 3). Dieser Wert gibt die mittlere effektive Konzentration von SB-590885 an, die notwendig ist, um eine Verringerung der Zellviabilität um 50 % hervorzurufen.

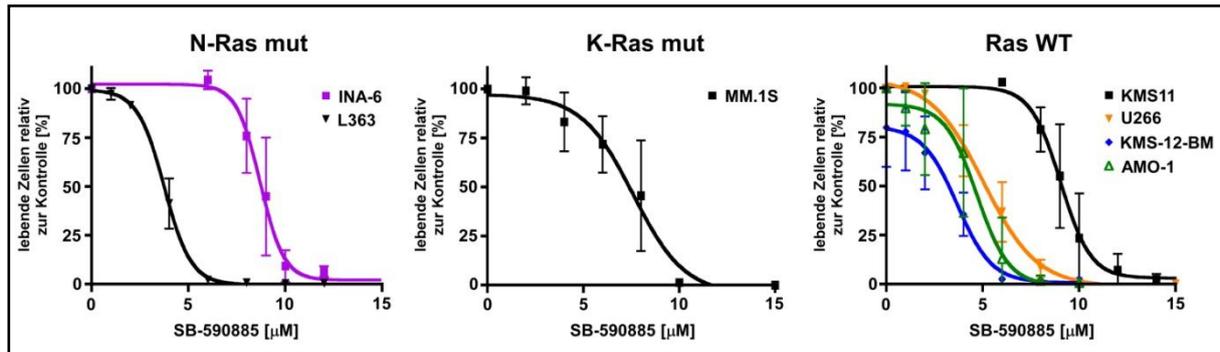


Abbildung 13: Dosis-Wirkungs-Kurven des Inhibitors SB-590885. Verschiedene Zelllinien wurden mit steigenden Konzentrationen von SB-590885 behandelt und die Viabilität mittels Durchflusszytometrie nach 72 h gemessen. In den Diagrammen sind die Konzentration von SB-590885 und der Prozentsatz lebender Zellen relativ zur Viabilität DMSO-behandelter Kontrollzellen aufgetragen. Aus den erhaltenen Dosis-Wirkungs-Kurven konnte der EC₅₀-Wert bestimmt werden (Kurven aus mindestens drei unabhängigen Messungen ermittelt; Standardabweichung durch senkrechte Linien gekennzeichnet). Das Ansprechen der Zelllinien auf den Raf-Inhibitor zeigte keinen Zusammenhang mit dem Ras-Mutationsstatus.

Der Inhibitor löste bei allen getesteten Zelllinien, unabhängig vom Ras-Mutationsstatus, Zelltod aus, wobei der EC₅₀-Wert im Bereich zwischen 4 und 11 μM lag. Eine Übersicht über die EC₅₀-Werte zeigt Tabelle 3.

MM Zelllinie	SB-590885 EC ₅₀ [μM]	Ras-Mutation
INA-6	8,8	N-Ras
MM.1S	7,4	K-Ras
AMO-1	4,6	Ras WT
KMS11	9,1	Ras WT
U266	5,1	Ras WT
KMS-12-BM	3,3	Ras WT
L363	3,8	N-Ras

Tabelle 3: EC₅₀-Werte der Behandlung mit dem Inhibitor SB-590885 bei verschiedenen HMZL.

Die Pan-Raf-Inhibition ergab auch eine konzentrationsabhängige Wirkung auf primäre Myelomzellen (pMM). Diese wurden mit drei verschiedenen Konzentrationen SB-590885 behandelt, wobei die Konzentrationen ausgehend von 2,5 μM jeweils verdoppelt wurden. Eine Konzentration von 2,5 μM reichte in den meisten Fällen nicht aus, um einen nennenswerten Effekt auf das Überleben der Zellen auszuüben; 10 μM führten dahingegen meist zum kompletten Zelltod der Proben. Bei der Verwendung von 5 μM zeigte sich eine heterogene Verteilung: der Effekt reichte von

totaler Insensibilität gegen die Behandlung bis zum vollständigen Zelltod. Bei dieser Konzentration wurden die Viabilitäten einiger Proben, deren Ras-Mutationsstatus freundlicherweise von Dr. Dr. T. Steinbrunn (Lehrstuhl für Translationale Onkologie, Universitätsklinikum Würzburg) bestimmt wurde, verglichen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Proben mit mutiertem Ras und Proben mit wildtypischem Ras (s. Abb. 14).

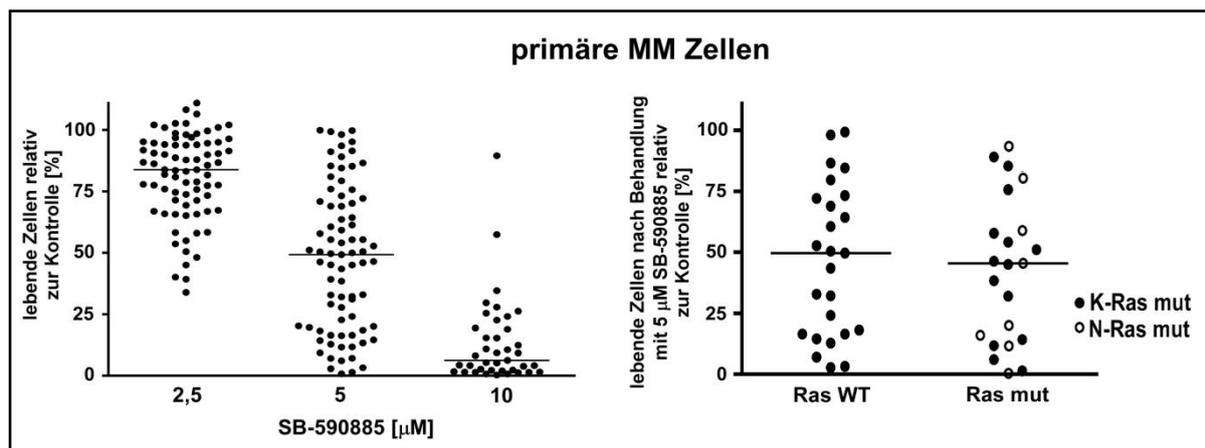


Abbildung 14: Behandlung von primären Myelomzellen mit SB-590885. Primäre Zellen von MM Patienten wurden mit drei verschiedenen Konzentrationen SB-590885 behandelt und die Viabilität nach fünf Tagen per Durchflusszytometrie bestimmt (links). Die Titration des Inhibitors zeigte, dass bei Verwendung von 5 µM eine durchschnittliche Reduzierung der Zellviabilität um ca. 50 % auftrat, die Anzahl n der gemessenen Proben betrug 79. 2,5 µM zeigten im Schnitt nur einen geringen Effekt auf die Viabilität (n=77); 10 µM führten meist zum vollständigen Zelltod (n=39). Für 47 Proben lag der Ras-Mutationsstatus vor und die Viabilitäten nach Behandlung mit 5 µM SB-590885 wurden hier verglichen (rechts). Es konnte kein bedeutender Unterschied zwischen Proben, bei denen Ras in der mutierten Form vorlag und Proben mit wildtypischem Ras festgestellt werden. Als horizontale Linie ist der Median der Viabilitäten dargestellt.

4.4 Pan-Raf-Inhibition und MEK-Blockade zeigen deutliche Unterschiede

Wie die bisherigen Ergebnisse zeigten, spielen die Raf-Isoformen eine wichtige Rolle für das Überleben von MM Zellen, da eine Inhibition aller Raf-Isoformen durch Inhibitoren oder eine Depletion durch shRNAs zum Tod der Zellen führte. MEK-Inhibitoren rufen im Gegensatz dazu jedoch meist kaum bzw. keine Apoptose in den MM Zellen hervor [94],[95],[113],[234]. Dadurch wird die Vermutung verstärkt, dass das Raf-Signaling nicht ausschließlich über das MEK/ERK-Modul ablaufen kann. Folglich sollten sich funktionelle Unterschiede zwischen MEK- und Raf-Blockade erarbeiten lassen.

4.4.1 Pan-Raf-Inhibition beeinflusst die Expression Tumor-relevanter Gene

Zur Identifizierung unterschiedlich regulierter mRNAs nach Pan-Raf- und MEK-Inhibition wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt. INA-6 Zellen wurden 8 h mit DMSO, SB-590885 und PD-325901, einem gut etablierten MEK1/2-Inhibitor, der in MM Zellen effektiv die Phosphorylierung von ERK1/2 verhindert [235] behandelt und die RNA anschließend isoliert. Die Qualität der RNA wurde an Hand des RIN- (RNA integrity number) Wertes der Proben ermittelt. Dieser Wert, der mit einem spezifischen Algorithmus berechnet wird, bewertet intakte RNA (maximaler Wert: 10). Der RIN-Wert aller Proben betrug über 9, was auf eine sehr gute RNA-Integrität hinwies. Anschließend wurden die RNA-Proben auf genomweiten Microarrays analysiert. Das Experiment wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Um beide Experimente vergleichen zu können, wurden die Veränderungen der Genexpressionslevel (log fold changes, logFCs) zwischen den beiden Experimenten korreliert (Pearson-Korrelation). Dabei ergab sich für Raf und MEK jeweils eine Korrelation von ca. 0,68, was einen für dieses System ausreichend guten Wert darstellte.

Es zeigte sich, dass die Pan-Raf-Blockade zu einer deutlich größeren Anzahl an signifikant differentiell exprimierten Genen im Vergleich zur MEK-Blockade führte (Raf: 7333; MEK:2037; mit einer Überschneidung von 1004 Genen, $p < 0,05$, s. Abb. 15). Somit übte die Pan-Raf-Inhibition einen deutlich größeren Effekt auf die Genexpression aus.

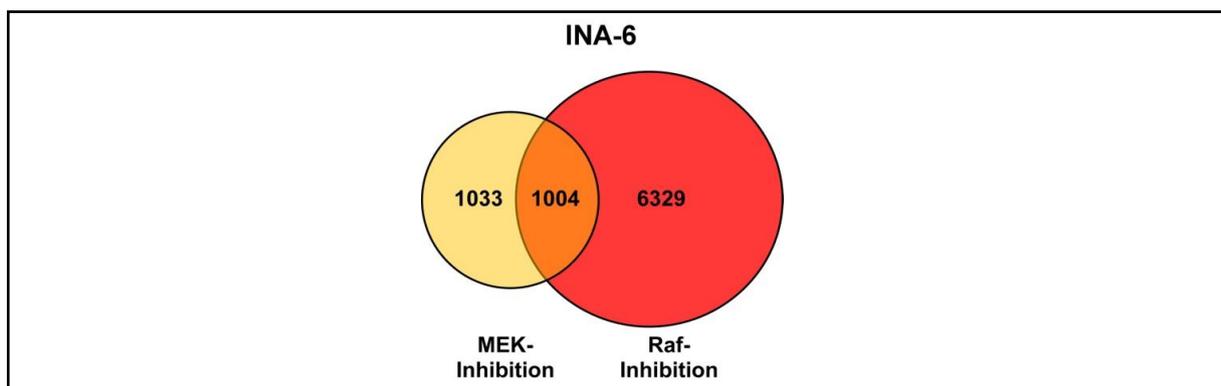


Abbildung 15: Anzahl der regulierten mRNAs nach MEK- und Pan-Raf-Blockade. Mit Hilfe eines Venn-Diagramms wurden die in der Genexpressionsanalyse als signifikant verändert gefundenen mRNAs nach MEK- bzw. Pan-Raf-Inhibition graphisch dargestellt. Der überlappende Bereich stellt die mRNAs dar, die von MEK und Raf reguliert wurden. Der größere Anteil regulierter Gene fand sich nach Pan-Raf-Inhibition.

Die aus den differentiell exprimierten Genen erstellte Heatmap (s. Abb. 16) ließ erkennen, dass die Kongruenz zwischen Kontrolle und MEK-Inhibition größer ist als beim Vergleich von Kontrolle und Pan-Raf-Inhibition.

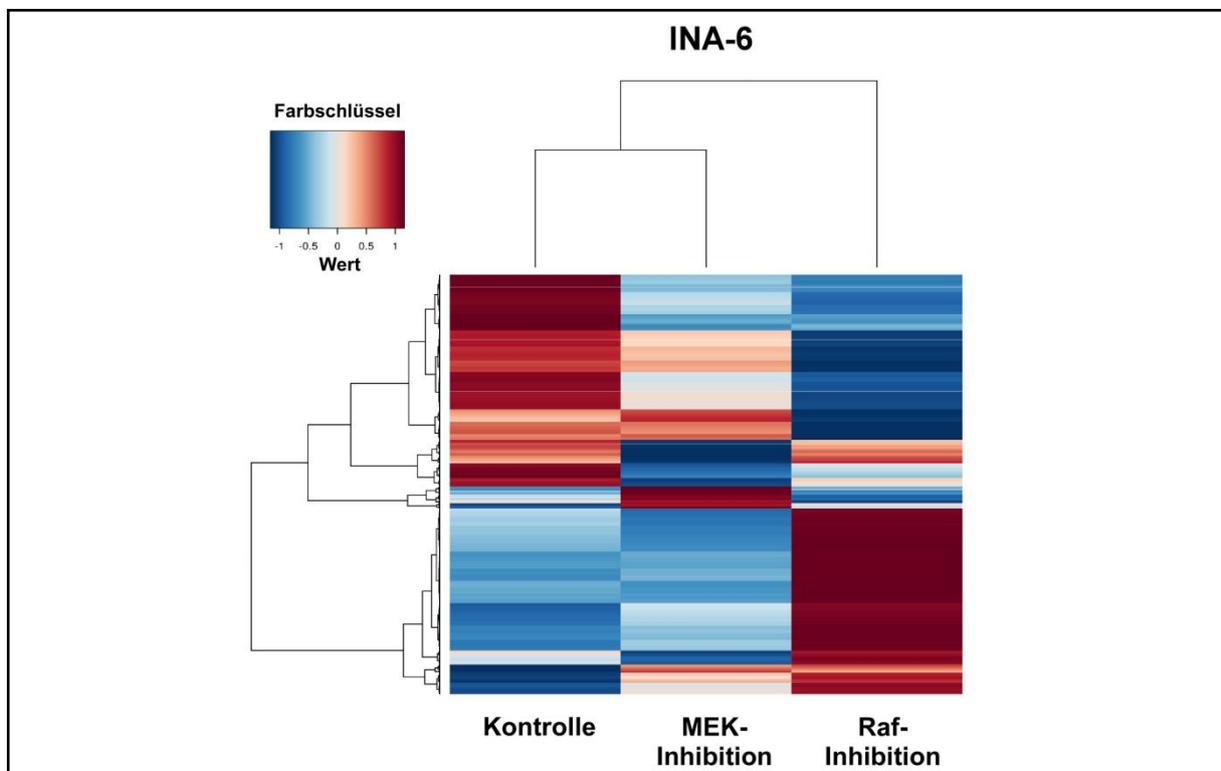


Abbildung 16: Heat Map-Darstellung der nach MEK- und Pan-Raf-Inhibition differentiell exprimierten Gene. Dargestellt wurden die regulierten Gene nach MEK- oder Pan-Raf-Inhibition im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Die Farbe Rot repräsentiert eine vermehrte Genexpression; die Farbe Blau steht für eine verminderte Genexpression. Man erkennt deutlich, dass das Muster regulierter Gene nach MEK-Inhibition der Kontrolle ähnlicher war als das nach Pan-Raf-Inhibition.

Zur Identifizierung signifikant überexprimierter GO terms innerhalb der differentiell exprimierten Gene wurde die Datenbank DAVID genutzt. Basierend auf den GO Analysen wurden unter den differentiell exprimierten Genen nach Pan-Raf- und MEK-Inhibition zahlreiche Gene gefunden, die mit Tumor-relevanten Kategorien wie Transkription, Apoptose, Translation, Zellzyklus, posttranslationale Proteinmodifikation, Stressantwort, B-Zell-Proliferation und Metabolismus assoziiert sind (s. Abb. 17). Es konnte gezeigt werden, dass die Pan-Raf-Inhibition in diesen Bereichen weitaus mehr dem jeweiligen GO Term zugehörige Gene regulierte als die MEK-Blockade. Die Genexpressionsanalysen lieferten einen guten Überblick über die Zugehörigkeit der regulierten Gene zu biologischen Prozessen und waren Grundlage für weiterführende Experimente.

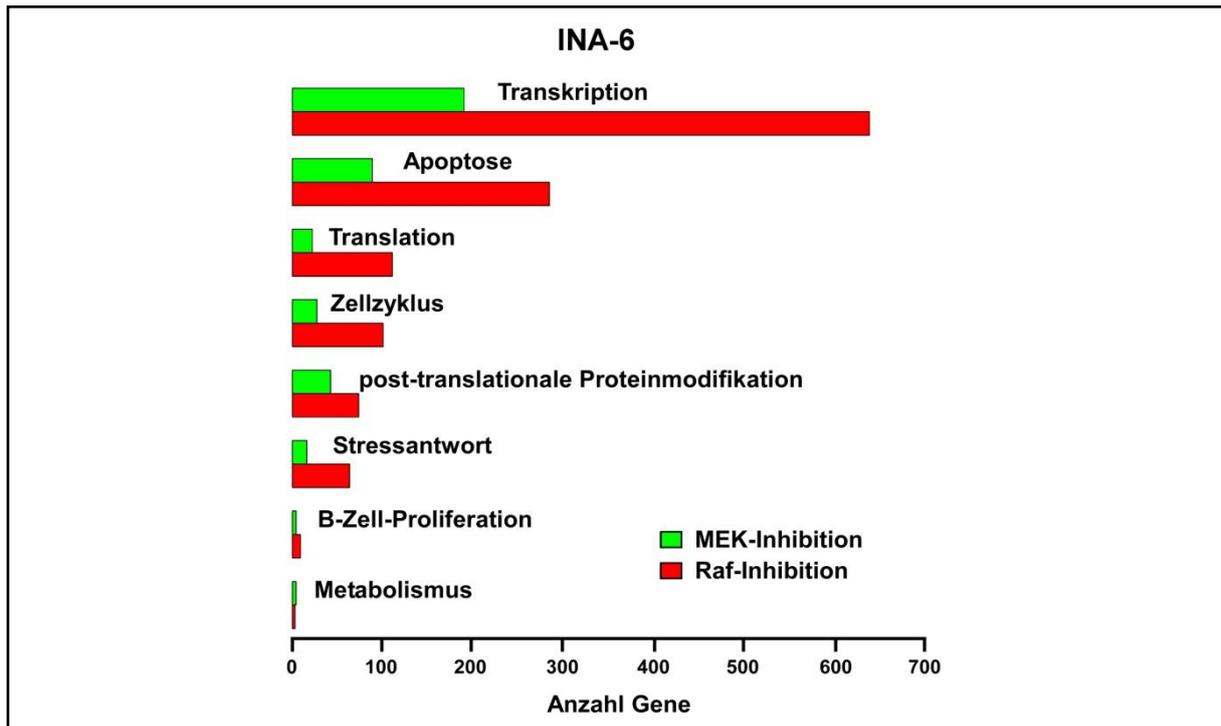


Abbildung 17: GO Term Klassifikation der differentiell regulierten Gene nach MEK- und Pan-Raf-Inhibition. Der Graph zeigt die Anzahl der differentiell regulierten Gene nach Pan-Raf- oder MEK-Inhibition, die zu einem spezifischen GO Term der Klasse Biologische Prozesse annotiert sind. Die nach Pan-Raf-Inhibition größere Anzahl differentiell regulierter Gene in Tumor-relevanten GO Terms wie Apoptose, Zellzyklus und B-Zell-Proliferation lieferte weitere Hinweise auf die Relevanz von Raf im MM.

4.4.2 Raf-Kinasen regulieren PI3K-abhängige, mTOR-assozierte Signalwege auf Proteinebene

Die starke Regulation von Proliferation, Zellzyklus und Apoptose durch Pan-Raf-Inhibition, nicht jedoch durch MEK-Blockade, warf die Frage nach möglichen MEK/ERK-unabhängigen Effektormechanismen auf. Der PI3K/PTEN/AKT/mTOR-Signalweg ist im MM oftmals aktiviert und seine Blockade induziert ebenfalls die Apoptose der Tumorzellen [94-96],[236]. Wir stellten deshalb in Verbindung mit den Ergebnissen der Genexpressionsanalysen die Arbeitshypothese auf, dass die Pan-Raf-Inhibition einen Einfluß auf Komponenten dieses Signalwegs ausüben könnte. Um eine mögliche Regulation von PI3K-abhängigen, mTOR-assozierten Genen auf Proteinebene nach Pan-Raf- oder MEK-Inhibition zu untersuchen, wurden INA-6 und MM.1S Zellen mit MLN-2480 und SB-590885 oder mit PD-325901 behandelt, Zellpellets geerntet, lysiert und Western-Blot-Analysen durchgeführt (s. Abb. 18). Durch die Behandlung mit MLN-2480 und SB-590885 nahm die Phosphorylierung von mTOR (mammalian target of rapamycin) an der Stelle Ser2448, die die Aktivität

der Kinase regelt, ab. Ein downstream target von mTOR (p70S6K) zeigte ebenfalls eine De-Phosphorylierung an regulatorischen Phosphorylierungsstellen. Weiterhin wurde mit diesen Experimenten gezeigt, dass durch eine Pan-Raf-Inhibition die Gesamtproteinmenge an PDK1 (3-phosphoinositide dependentprotein kinase-1) vermindert werden konnte, die Aktivität von Rb (retinoblastoma tumor suppressor protein) abnahm (angezeigt durch den Verlust der Phosphorylierung bei Ser807/811) und die Proteinlevel von CyclinD1 (INA-6) bzw. CyclinD2 (MM.1S) gesenkt werden konnten.

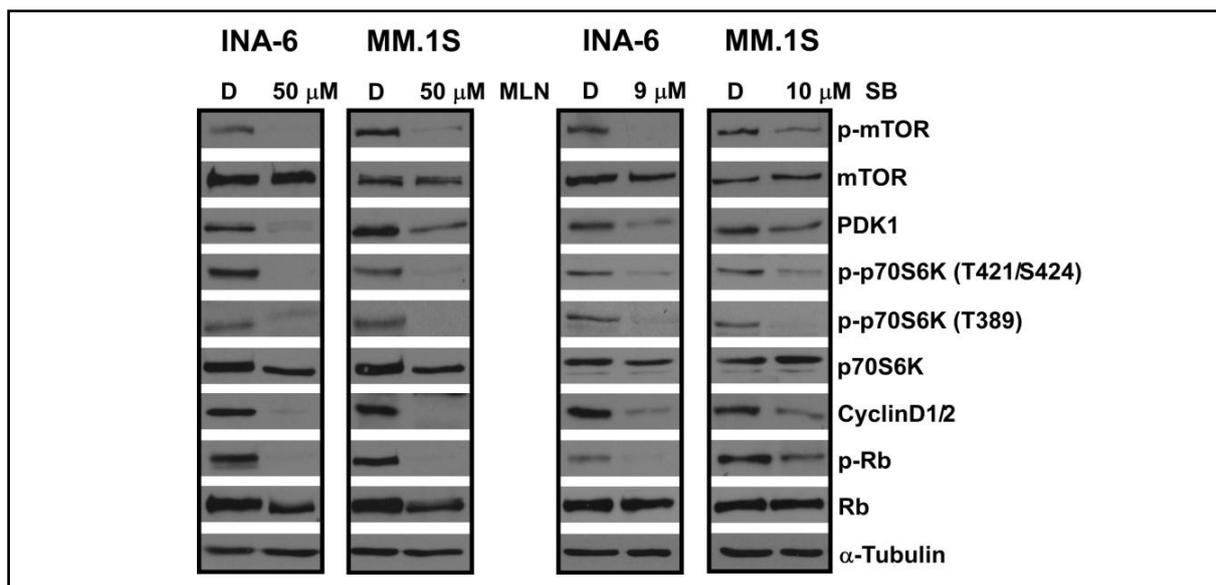


Abbildung 18: Western-Blot-Analyse PI3K-abhängiger, mTOR-assoziierter Proteine nach Pan-Raf-Inhibition durch Inhibitoren. INA-6 und MM.1S Zellen wurden mit zwei verschiedenen Raf-Inhibitoren mit den angegebenen Konzentrationen behandelt. Für MLN-2480 (MLN) betrug die Inkubationszeit 24 h; für SB-590885 (SB) 8 h. Western Blots ergaben die Level der untersuchten Proteine der behandelten Zellen. Die Pan-Raf-Inhibition führte zu einer Abnahme an phosphoryliertem mTOR, Rb und p70S6K und zu verringerten Proteinleveln von PDK1 und CyclinD1 (INA-6) oder CyclinD2 (MM.1S) im Vergleich zu DMSO-behandelten Kontrollzellen. α -Tubulin diente als Ladungskontrolle.

An Hand von Versuchen mit MM.1S Zellen (s. Abb. 19) konnten die Auswirkungen einer Pan-Raf-Blockade auf AKT ermittelt werden: in der Western-Blot-Analyse wurde nachgewiesen, dass der Phosphorylierungsgrad der Phosphorylierungsstellen Ser473 und Thr308 von AKT nach pharmakologischer Pan-Raf-Inhibition abnahm (INA-6 Zellen besitzen kein im Western Blot nachweisbares p-AKT Signal).

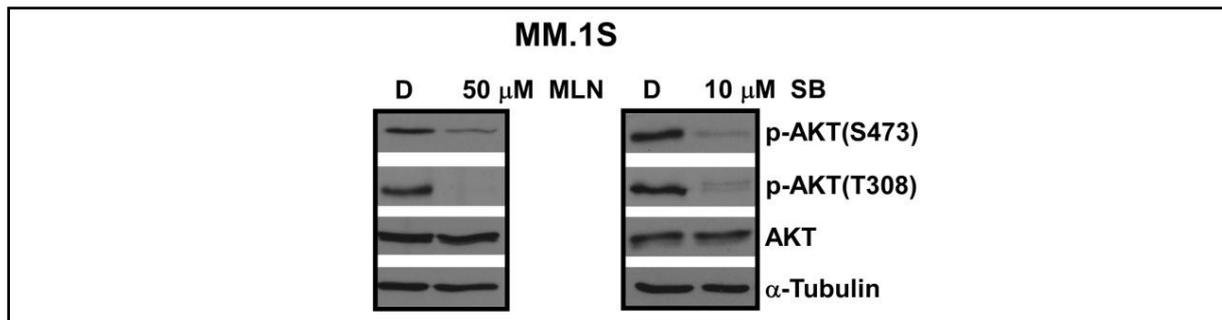


Abbildung 19: Western-Blot-Analyse des Phosphorylierungsgrades von AKT nach Pan-Raf-Blockade mittels Inhibitoren. Western Blots nach Pan-Raf-Inhibition durch MLN-2480 (MLN, Inkubation 24 h) und SB-590885 (SB, Inkubation 16 h) zeigten eine Reduktion des Phosphorylierungsgrades von p-AKT an den Stellen S473 und T308 bei gleichbleibendem AKT-Level. α -Tubulin wies auf eine gleichmäßige Proteinbeladung hin, mit DMSO (D) behandelte Zellen dienten als Kontrolle.

Zur Bestätigung der aus der Verwendung von Inhibitoren gewonnenen Erkenntnisse wurden die obigen Experimente mit Zellen wiederholt, bei denen alle drei Raf-Isoformen durch shRNAs ausgeschaltet wurden. Beim shRNA-vermittelten Pan-Raf-Knockdown konnte eine Verminderung der Proteinlevel von PDK1, CyclinD1 bzw. D2, p-p70S6K und p-Rb (s. Abb. 20) nachgewiesen werden.

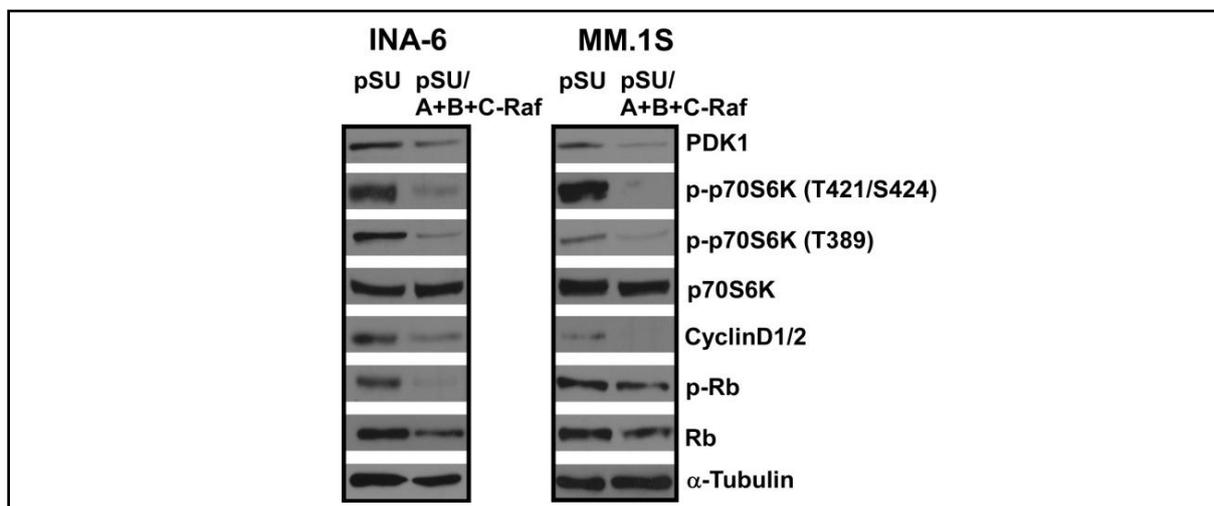


Abbildung 20: Western-Blot-Analyse PI3K-abhängiger, mTOR-assoziiierter Proteine nach Pan-Raf-Inhibition durch shRNAs. Die Pan-Raf-Inhibition durch Knockdown aller drei Isoformen führte zu vergleichbaren Effekten wie bei den Pan-Raf-Inhibitoren. Es kam zu einer Abnahme der Proteinlevel von PDK1 und CyclinD1 bzw. D2 und zu einer Senkung des Phosphorylierungsgrades von p70S6K und Rb im Vergleich zu den Kontrollzellen (pSU). α -Tubulin zeigte die gleichmäßige Beladung an (Ernten der Zellen nach 52 h).

Die Pan-Raf-Inhibition durch simultanen Knockdown aller drei Isoformen führte ebenso wie die pharmakologische Pan-Raf-Inhibition zu einer De-Phosphorylierung von AKT an Ser473 und Thr308 (s. Abb. 21).

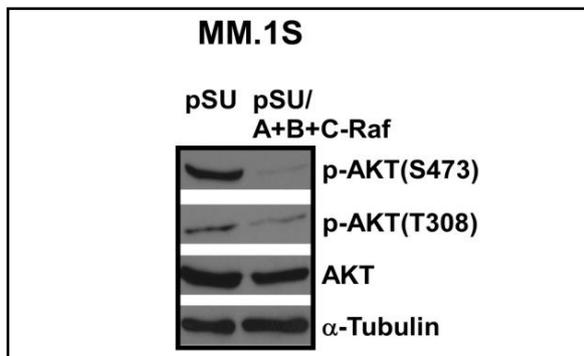


Abbildung 21: Western-Blot-Analyse des Phosphorylierungsgrades von AKT nach Pan-Raf-Inhibition mittels simultanen Knockdowns der drei Isoformen. Der Western Blot nach Pan-Raf-Inhibition durch gleichzeitigen Knockdown der drei Raf-Isoformen zeigte eine De-Phosphorylierung von AKT an S473 und T308 im Vergleich zu pSU-behandelten Kontrollzellen. Das Proteinlevel von AKT selber wurde nicht beeinflusst. α -Tubulin diente als Ladungskontrolle; die Zellen wurden nach ca. 52 h geerntet.

Im Gegensatz zu der Pan-Raf-Inhibition konnte bei Verwendung des MEK-Inhibitors PD-325901 kein Einfluss auf die untersuchten Signalwege festgestellt werden. Der Phosphorylierungsstatus von Rb, mTOR und p70S6K blieb unverändert und auch eine Abnahme an PDK1 oder CyclinD1/2 konnte nicht nachgewiesen werden (s. Abb. 22).

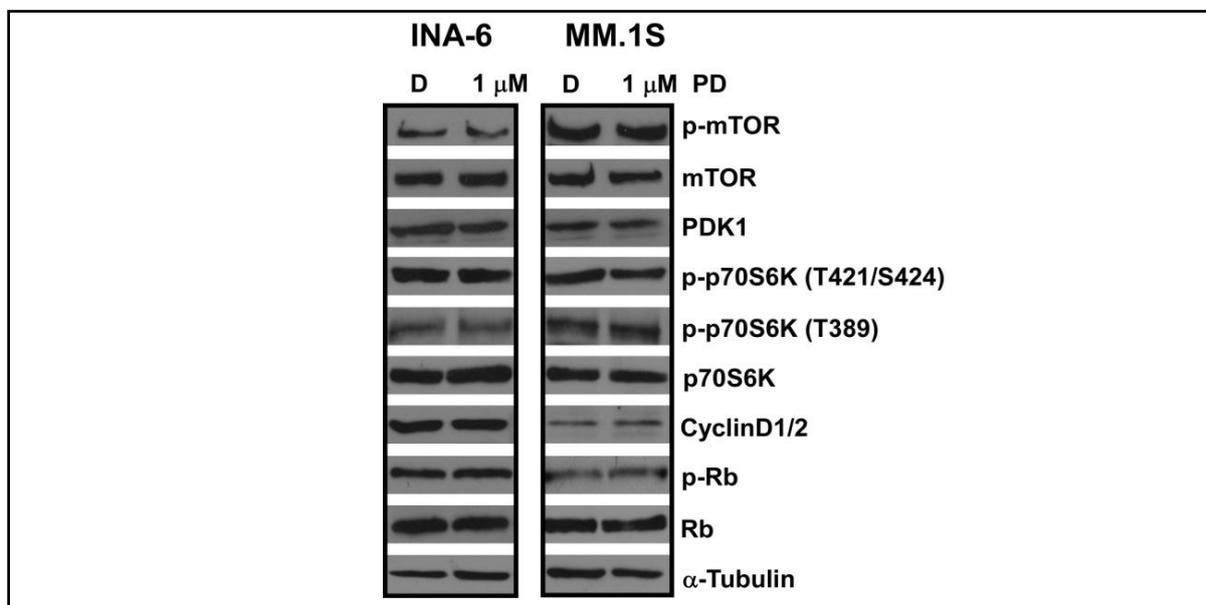


Abbildung 22: Western-Blot-Analyse PI3K-abhängiger, mTOR-assoziiierter Proteine nach MEK-Blockade durch Inhibitor. Die Zellen wurden 16 h lang mit dem MEK-Inhibitor PD-325921 (PD) behandelt und anschließend wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt (α -Tubulin als Ladungskontrolle). Es konnte keine Veränderung der untersuchten Proteinlevel festgestellt werden. DMSO-behandelte Zellen (D) dienten als Kontrolle.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich der Phosphorylierungsstatus von AKT durch die pharmakologische MEK-Inhibition nicht veränderte (s. Abb. 23).

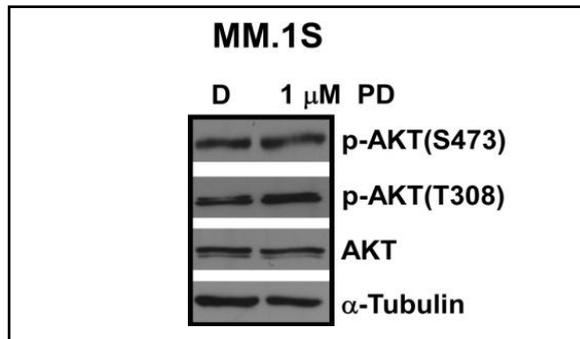


Abbildung 23: Western-Blot-Analyse des Phosphorylierungsgrades von AKT nach MEK-Blockade. MM.1S Zellen wurden 16 h mit dem MEK-Inhibitor PD-325921 (PD) behandelt, die Zellen geerntet, lysiert und eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Die MEK-Inhibition führte nicht zu einer Veränderung der Phosphorylierung von AKT im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen (D). Eine gleichmäßige Beladung wurde mit α -Tubulin nachgewiesen.

Somit zeigte sich insgesamt nach Pan-Raf-Blockade eine deutliche Regulation der ausgewählten PI3K-abhängigen Gene auf Proteinebene, während nach MEK-Inhibition keine Veränderungen festgestellt werden konnten.

4.5 Simultane Blockade des PI3K- und Raf-Signalweges verstärkt die Regulation PI3K-abhängiger, mTOR-assoziierter Signalwege

Neben dem Ras/Raf/MEK-Signaling spielt der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg eine wichtige Rolle im MM. Verschiedene Studien lieferten bereits Beweise, dass diese beiden Signalwege eng bei der Transduktion von Überlebenssignalen kooperieren [237]. Da die bisher beschriebenen Ergebnisse dieser Arbeit auf eine Ko-Regulation der PI3K-abhängigen Signaltransduktion durch die Raf-Kinasen hindeuteten, lag eine rationale Begründung für die simultane Inhibition der Signalwege vor. Die PI3K-Inhibition wurde mit Hilfe der Inhibitoren BYL-719 oder BEZ235 (inhibiert neben PI3K auch mTOR) ausgelöst. Die mit diesen Inhibitoren behandelten Zellen zeigten erwartungsgemäß eine De-Phosphorylierung von mTOR und p70S6K; des Weiteren wurden auch die Level an p-RB, CyclinD1 bzw. D2 und p-PDK1 gesenkt (s. Abb. 24).

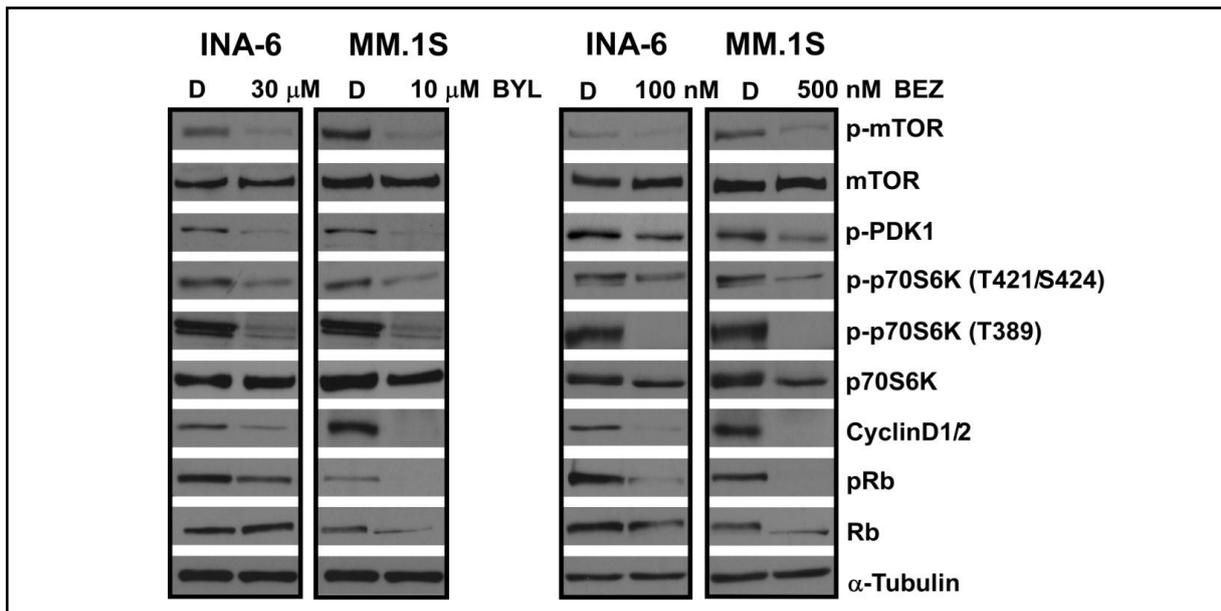


Abbildung 24: PI3K/mTOR-Inhibition in INA-6 und MM.1S Zellen. Nach Behandlung der Zellen mit BYL-719 (BYL) bzw. BEZ235 (BEZ) für 16 h wurden Western-Blot-Analysen der Zelllysate mit den angegebenen Antikörpern durchgeführt. Eine Abnahme des Phosphorylierungsgrades von mTOR, PDK1, p70S6K und Rb, sowie eine Verringerung des Proteinlevels von CyclinD1 oder D2 (und von Rb bei MM.1S) gegenüber Kontrollzellen (D) konnte nachgewiesen werden. α -Tubulin zeigte eine gleichmäßige Beladung des Gels mit Protein an.

An Hand von MM.1S Zellen wurde gezeigt, dass die verwendeten Inhibitoren ebenfalls zuverlässig die Phosphorylierung von AKT verhinderten (s. Abb. 25).

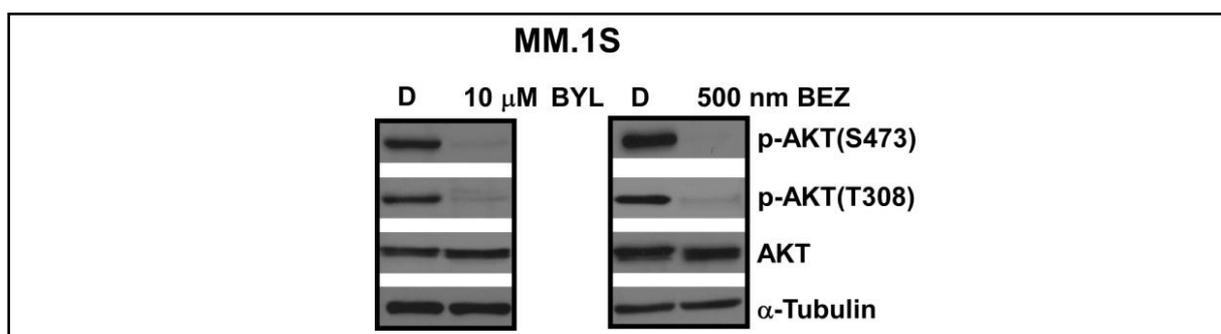


Abbildung 25: Phosphorylierung von AKT nach PI3K/mTOR-Inhibition in MM.1S Zellen. Western-Blot-Analysen zeigten, dass die Behandlung der Zellen mit BYL-719 (BYL) bzw. BEZ235 (BEZ) zu einer De-Phosphorylierung von AKT an Ser473 und Thr308 führte (Inkubationszeit 16 h). α -Tubulin diente als Ladungskontrolle, DMSO-behandelte Zellen (D) als Vergleichskontrollen.

Um die Effekte einer Kombination aus Pan-Raf- und PI3K-Blockade zu untersuchen, wurde die Wirkung von Einzelkonzentrationen der PI3K- und Raf-Inhibitoren mit der Wirkung der gleichzeitigen Anwendung der Inhibitoren im Western Blot verglichen. Die Einzelkonzentrationen wurden dabei so gewählt, dass sich nur ein geringer Effekt

auf die Regulation der zu untersuchenden Proteine zeigte. Bei p-ERK1/2, p-mTOR und p-PDK1 konnte herausgearbeitet werden, dass die Kombination der Einzelkonzentrationen die Proteinlevel stärker verringerte als die Einzelkonzentrationen (s. Abb. 26). Dieser Effekt fiel für die weiteren untersuchten Proteinlevel nicht so deutlich aus, allgemein ließ sich jedoch eine Tendenz in Richtung der Wirkungsverstärkung der gemeinsamen Blockade verzeichnen.

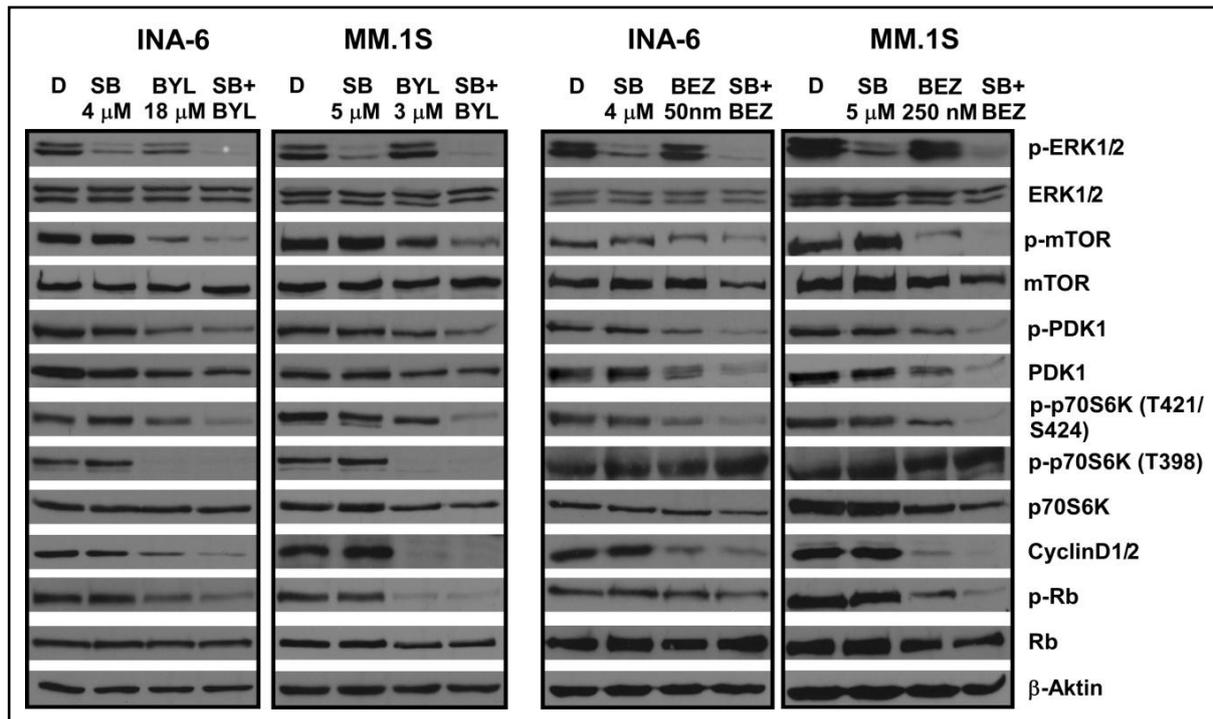


Abbildung 26: Western-Blot-Analyse nach dualer Blockade von PI3K und Pan-Raf mittels Inhibitoren. Es wurden Konzentrationen der Inhibitoren SB-590885 (SB), BYL-719 (BYL) bzw. BEZ235 (BEZ) gewählt, die alleine nur einen geringen Effekt auf die zu untersuchenden Proteine haben sollten. Bei gleichzeitiger Verwendung der Inhibitoren (SB+BYL bzw. SB+BEZ) kam es zumeist zu einer deutlicheren Reduktion des Phosphorylierungsgrades oder der Proteinlevel gegenüber den Einzelkonzentrationen. Die Zellen wurden für 16 h inkubiert; β -Aktin diente als Ladungskontrolle und mit entsprechender Konzentration DMSO behandelte Zellen (D) als Vergleichskontrolle.

Der Effekt der Wirkungsverstärkung einer dualen Blockade von PI3K und Raf ließ sich auch für den Phosphorylierungsgrad von AKT in MM.1S Zellen nachweisen. Einzelne Konzentrationen der Inhibitoren, die nur eine leichte Verringerung der Phosphorylierung hervorriefen, verhinderten die Phosphorylierung von AKT gemeinsam fast vollständig (s. Abb. 27).

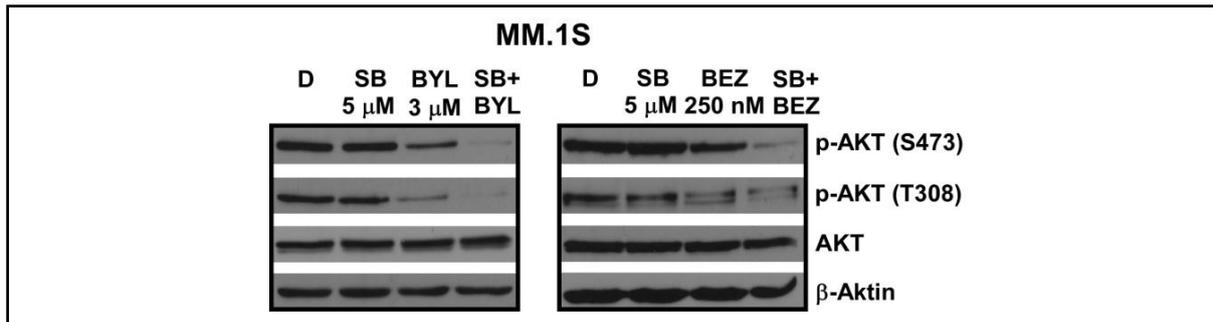


Abbildung 27: Phosphorylierung von AKT nach einzelner und gemeinsamer Blockade von Pan-Raf und PI3K. MM.1S Zellen wurden mit geringen Konzentrationen an SB-590885 (SB) und BYL-719 (BYL) oder BEZ235 (BEZ) für 16 h behandelt. Erst die Kombination dieser Konzentrationen (SB+BYL bzw. SB+BEZ) führte zu einem deutlichen Verlust des p-AKT-Signals im Vergleich zu Kontrollzellen (D). β -Aktin diente in der Western-Blot-Analyse als Ladungskontrolle.

4.6 Simultane Blockade des PI3K/mTOR- und des Raf-Signalweges verstärkt die Apoptose in MM Zellen

Der Effekt einer Kombination von Pan-Raf- und PI3K/mTOR-Inhibition in Bezug auf das Überleben der Zellen wurde sowohl an der Zelllinie MM.1S als auch an primären Zellen untersucht. Dazu wurden die Zellen mit Konzentrationen von BYL-719 bzw. BEZ235 und SB-590885 behandelt, die die Viabilität der Zellen nicht übermäßig beeinflussen sollten (Viabilitätsverluste zwischen ca. 20-30 % bei MM.1S und zwischen ca. 25-55 % bei primären Zellen). Im gleichen Ansatz wurden die Zellen auch mit einer Kombination dieser Inhibitoren-Konzentrationen inkubiert. Hierdurch kam es sowohl bei MM.1S Zellen (Viabilitätsverluste von über 90 %) als auch bei den primären Zellen (Viabilitätsverluste zwischen 50-65 %) zu einer deutlichen Steigerung der Apoptose gegenüber der Einzelbehandlung (s. Abb. 28).

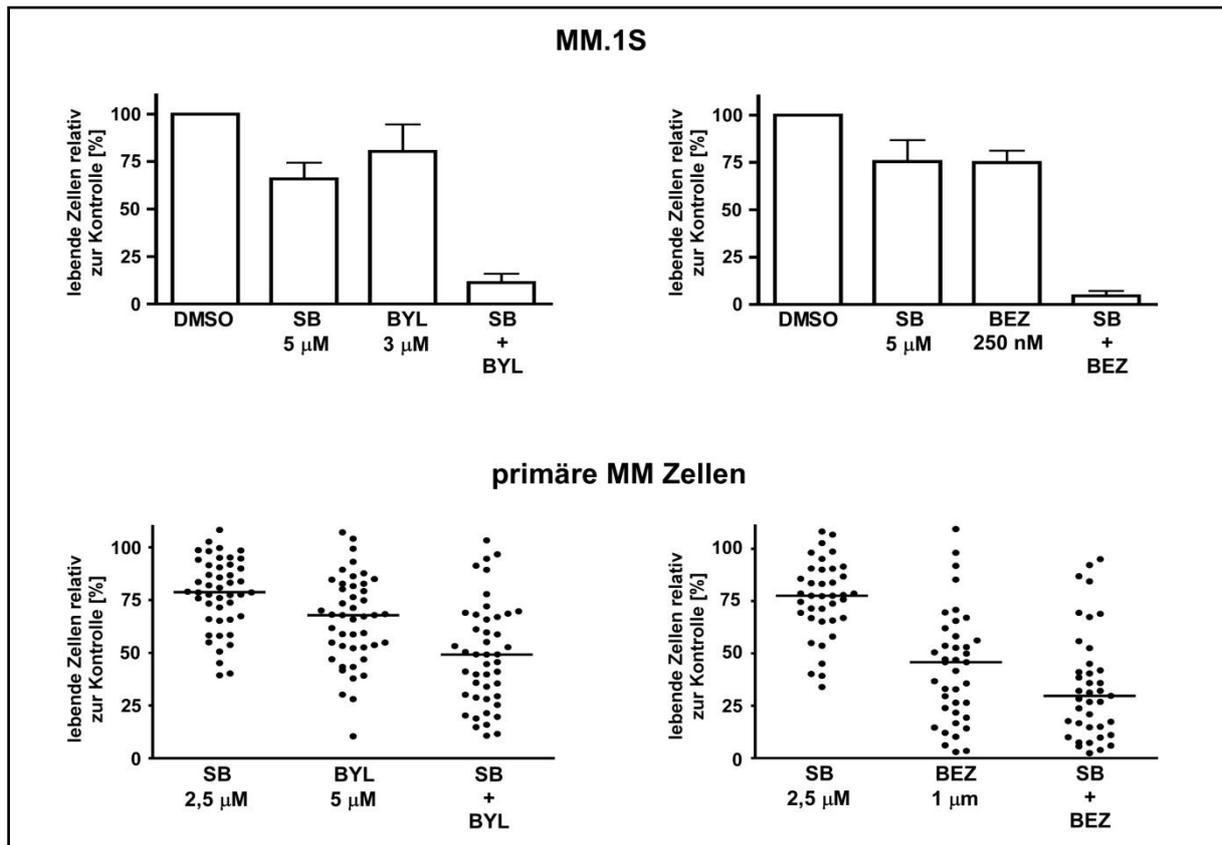


Abbildung 28: Gesteigerte Apoptose bei Kombination von Pan-Raf- und PI3K-Blockade. Die Apoptoserate von MM.1S und pMM Zellen wurde nach drei- (Zelllinie) bzw. fünftägiger (primäre Zellen) Behandlung mit SB-590885 (SB) und BYL-719 (BYL) bzw. BEZ235 (BEZ) als Einzelbehandlung und als Kombination mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Einzelkonzentrationen der Pan-Raf- bzw. PI3K-Inhibitoren wurden so gewählt, dass nur ein geringer Effekt auf das Überleben der Zellen sichtbar war. Die Kombination dieser Konzentrationen (SB+BYL bzw. SB+BEZ) führte hingegen zu einer deutlich verstärkten Apoptoserate gegenüber den Einzelkonzentrationen. Mit MM.1S Zellen wurden drei unabhängige Versuche durchgeführt, dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung. Eine Anzahl von 46 (BYL) bzw. 39 (BEZ) primären Proben wurden getestet, der Median der Viabilitäten ist ebenfalls dargestellt. Mit DMSO-behandelte Zellen dienten als Kontrolle.

5 Diskussion

Bei dem Multiplen Myelom handelt es sich um eine maligne Krankheit, die durch die klonale Proliferation neoplastischer Plasmazellen im Knochenmark charakterisiert ist. Durch die Entwicklung und den Einsatz neuer pharmakologischer Verbindungen wie immunomodulatorische Substanzen (Thalidomid, Lenalidomid, Pomalidomid) und Proteasom-Inhibitoren (Bortezomib, Carfilzomib, u.a.) verlängerte sich die Überlebenszeit der Patienten in der letzten Dekade bedeutend [238],[239]. Trotzdem gilt die Krankheit bis zum heutigen Tage als unheilbar. Daher sind ein tiefgreifendes Verständnis der Pathogenese und die Erforschung neuer potenzieller therapeutischer Angriffspunkte unbedingt notwendig. Für das MM kennzeichnend ist die große genetische Komplexität und Heterogenität, die sich in einer Vielzahl von Subgruppen äußert. Die funktionellen Konsequenzen der meisten genetischen Läsionen für das maligne Wachstum sind jedoch unklar, ebenso wie die onkogenen Signalwege, die durch diese Mutationen dereguliert werden. Die Analyse funktioneller Signalwege kann deshalb helfen, die Pathogenese des MM besser zu verstehen. Im Zusammenhang mit diesem Konzept wurde entdeckt, dass in MM Zellen wachstumsregulierende Signalwege aktiviert oder dereguliert sind und so zum Überleben und der Proliferation beitragen [68],[88],[97],[100],[240],[241]. Vorläufige Daten deuteten an, dass B- und C-Raf in primären MM Zellen überexprimiert sind und ihre pharmakologische Inhibition zur Apoptose führt. Bevor jedoch die Raf-Isoformen für einen therapeutischen Ansatz als tauglich angesehen werden können, müssen die Mechanismen, die die onkogenen Effekte von Raf vermitteln, sowie die Kooperation mit anderen onkogenen Signalwegen noch genauer untersucht werden.

Als wichtige Voraussetzung zur Charakterisierung der Raf-Isoformen wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die Expression und Aktivierung der Raf-Isoformen in humanen Myelomzelllinien (HMZL) und primären Myelomzellen untersucht. Mit diesen ersten Experimenten konnte gezeigt werden, dass alle drei Raf-Isoformen in sieben Zelllinien (INA-6, MM.1S, AMO-1, KMS11, U266, KMS-12-BM und L363) und in acht untersuchten primären Myelomproben etwa gleich stark exprimiert wurden, was in Übereinstimmung mit bisherigen Ergebnissen der Arbeitsgruppe steht. Da die Raf-Isoformen ihre Aktivität hauptsächlich über die Kinasefunktion vermitteln

[118],[147],[148],[150],[151],[154-156], spielt der Aktivierungsstatus eine überaus wichtige Rolle für die Funktionsbeschreibung der Isoformen. Zur Untersuchung der Aktivierung wurden in der vorliegenden Arbeit spezifische phospho-Antikörper genutzt, die die Phosphorylierung von Stellen, die für die Aktivität der Isoformen wichtig sind, detektieren können. Ser338, das sich in einer konservierten regulatorischen Region von C-Raf befindet, spielt eine der wichtigsten Rollen bei der Aktivierung dieser Isoform [242] und ist essentiell für die biologische und enzymatische Aktivität von C-Raf [135]. Ser338 von C-Raf entspricht ähnlichen Stellen in A-Raf (Ser229) und B-Raf (Ser445), obwohl diese Stelle in B-Raf konstitutiv aktiviert ist [138]. Die Aktivierung aller drei Isoformen konnte mit Hilfe dieser Antikörper sowohl in HMZL als auch zum großen Teil in Patientenproben nachgewiesen werden (s. Abb. 5). HMZL stellen zwar u.a. durch die genetische Übereinstimmung der Genexpressionsprofile mit neu-diagnostizierten Plasmozytomen ein gutes Modell für das MM dar [226], sie repräsentieren jedoch späte Stadien der progressiv verlaufenden Krankheit, da sie hauptsächlich von extramedullären MM etabliert wurden [227]. Somit weisen sie bereits zahlreiche genetische Abberationen und Mutationen auf, die aktivierend auf Signalwege wirken können. Die in den HMZL nachgewiesene starke Aktivierung der Raf-Isoformen könnte sich demnach von der Aktivierung in früheren Stadien der Krankheit unterscheiden. Die pMM-Proben können sofort nach der Entnahme zur Kultivierung für Experimente genutzt werden und bilden damit ein anderes Stadium als die HMZL ab. Allerdings muss beachtet werden, dass die Zellen für die Experimente aus ihrem eigentlichen Milieu entfernt wurden, was sich ebenfalls auf die Aktivierung von Signalwegen auswirken kann und den Rückgang der Phospho-Färbung in einigen Proben erklären könnte.

Auch in anderen Tumorentitäten konnten konstitutiv aktivierte Raf-Isoformen nachgewiesen werden. Die Aktivierung geschieht meist entweder direkt, durch Mutationen in der N-terminalen regulatorischen Region, oder indirekt auf Grund von Überstimulation durch autokrine Wachstumsfaktoren oder aktivierte proximale Onkogene [243]. So zeigen einige solide Tumore wie Nierenzell-, hepatozelluläres und nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom eine Hochregulation der C-Raf-Aktivität, vermutlich auf Grund einer Überexpression von Wachstumsfaktoren [244-246]. Weiterhin konnte eine erhöhte Expression von phosphoryliertem C-Raf in Proben einer Therapie-induzierten akuten myeloischen Leukämie nachgewiesen werden

[207] und auch Brusttumorgewebe wurde positiv auf p-S338 C-Raf untersucht; die Aktivierung wird hier im Zusammenhang mit MEK-unabhängiger Zellproliferation gesehen [247]. Abberante B-Raf-Aktivierung durch Mutationen findet sich ebenfalls mit großer Häufigkeit in bestimmten menschlichen Tumoren [187]. Die häufigste onkogene Variante, B-Raf V600E, wurde beispielsweise in 63 % der Melanomfälle nachgewiesen [248]. Es wird davon ausgegangen, dass die Aktivierung von B-Raf zwar nicht in die Initiation des Tumors involviert ist, aber eine wichtige Rolle bei Wachstum und Überleben der Zellen spielt [244],[249-251]. Beim kolorektalem Karzinom wird die aktivierte B-Raf V600E Mutation in Zusammenhang mit Resistenz gegen Apoptose, Unabhängigkeit von extrazellulären Wachstumssignalen und einer schlechten Prognose der Patienten gebracht [252],[253]. Von den untersuchten HMZL wies lediglich die Zelllinie U266 eine B-Raf Mutation auf. Die Aktivierung der Raf-Isoformen schien somit unabhängig von bisher beschriebenen aktivierenden Mutationen in den Raf-Genen zu sein. Interessanterweise konnte in den HMZL auch keine Korrelation der Aktivierung mit dem Ras-Mutationsstatus gefunden werden. Sowohl in Zelllinien mit mutiertem Ras (INA-6, MM.1S, L363) als auch in Zelllinien mit wildtypischem Ras (KMS11, U266, KMS-12-BM, AMO-1) lagen die Raf-Isoformen in aktiviertem Zustand vor. Das der Raf-Aktivierung zu Grunde liegende genetische Ereignis blieb damit unklar.

Da die vorliegenden Ergebnisse auf eine Expression und Aktivierung aller drei Isoformen sowohl in Zelllinien als auch in primären Myelomzellen hindeuteten, sollte die Bedeutung jeder einzelnen Isoform für das Überleben und die Aktivierung von downstream-Signalwegen geklärt werden, um sie als möglichen Angriffspunkt bei der Entwicklung von Antitumor-Strategien zu validieren. Hierzu wurden Isoform-spezifische shRNAs entwickelt, deren Funktionalität im Western Blot nachgewiesen wurde. Die verwendeten shRNAs zeigten eine nahezu vollständige Reduktion der entsprechenden Isoform im Vergleich zu den Kontrollzellen; die anderen Isoformen wurden jedoch nicht beeinflusst (s. Abb. 6). Für einen effektiven Knockdown von B-Raf musste in unserem Labor, im Gegensatz zu in der Literatur beschriebenen shRNAs [229-231], allerdings eine Kombination aus zwei verschiedenen shRNAs verwendet werden. Die Transfektion der Zellen mit bis zu 40 µg/ml einer einzelnen shRNA zeigte im Western Blot keinen zufriedenstellenden Knockdown. Bei Kombination zweier Sequenzen konnte die Konzentration der einzelnen shRNAs

allerdings auf 15 µg/ml gesenkt werden und somit das Risiko für mögliche, unerwünschte off-target Effekte und toxische Nebenwirkungen vermindert werden.

Nach erfolgreichem Knockdown einer Isoform wurden in den transfizierten Zellen die Auswirkungen auf die downstream von Raf gelegenen MEK- und ERK-Kinasen untersucht. Auch hierzu konnten Antikörper genutzt werden, die mit der Aktivität der jeweiligen Kinase assoziiert sind. Die Aktivierung von MEK1 und MEK2 verläuft über die Phosphorylierung der zwei Serine an den Positionen 217 und 221, die sich im Aktivierungsloop der Subdomäne VIII befinden [232]. MEK1 und MEK2 aktivieren ERK1 und ERK2 durch Phosphorylierung von den im Aktivierungsloop gelegenen Aminosäuren Thr202 und Tyr204 [233].

Der Isoform-spezifische Knockdown zeigte in den drei untersuchten Zelllinien INA-6 (N-Ras mutiert), MM.1S (K-Ras mutiert) und KMS11 (wildtypisches Ras) keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivierung von MEK1/2 und ERK1/2 (s. Abb. 7). In HMZL schien somit die Depletion einer einzelnen Raf-Isoform unzureichend zur Beeinflussung des MEK/ERK-Moduls, da die Funktion der zwei verbliebenen Raf-Isoformen offensichtlich für ein normales Signaling ausreichte. Dies wurde ebenfalls bei Versuchen mit KO-Mäusen gesehen; so ist beispielsweise die Aktivierung des MAPK-Signalweges im Embryo von *c-raf* KO-Mäusen normal [163],[254]. Weiterhin zeigten die Tierversuche auch, dass durch den KO mehrerer Isoformen schwerere Phänotypen im Vergleich zum Einzel-KO hervorgerufen werden können [160],[255]. Um zu testen, ob dies auch für MM Zellen zutrifft, wurden die drei Raf-Isoformen gleichzeitig in den Zelllinien depletiert. Hierbei zeigte sich, dass die Phosphorylierung von MEK1/2 bzw. ERK1/2 durch diese Pan-Raf-Inhibition komplett verhindert werden konnte (s. Abb 8). Die Expression von MEK1/2 und ERK1/2 blieb unverändert und die Abnahme der Signale der Phosphoformen war somit auf eine Abnahme des Phosphorylierungsgrades und nicht auf eine verminderte Expression der Proteine zurückführbar. Dabei schien der Mutationsstatus des upstream von Raf gelegenen Ras keine Rolle zu spielen, da sich die Effekte in den drei untersuchten Zelllinien ähnelten. Im Gegensatz zum Isoform-spezifischen Raf-Knockdown führte die Pan-Raf-Inhibition durch simultanen Knockdown der drei Isoformen zu einer vollständigen Deaktivierung des MEK/ERK-Moduls.

Zur Überprüfung dieses Ergebnisses wurde als weiterer, unabhängiger Ansatz die pharmakologische Inhibition der Raf-Isoformen gewählt. Dazu standen zwei

Inhibitoren zur Verfügung. Im Versuch mit MLN-2480, einem selektiven Pan-Raf-Inhibitor, der sich im Stadium von klinischen Tests befindet [256], zeigte sich, wie schon bei der Pan-Raf-Inhibition durch shRNAs, ein Verlust der Phosphorylierung von MEK1/2 und ERK1/2 (s. Abb. 9). Die pharmakologische Inhibition bestätigte somit, dass in HMZL nur eine Pan-Raf-Blockade zu einer Herunterregulation von phosphoryliertem MEK1/2 bzw. ERK1/2 führte. Neben MLN-2480 wurde in dieser Arbeit auf Grund der besseren Verfügbarkeit der Inhibitor SB-590885 für weitere Experimente verwendet. Dieser inhibiert selektiv die Raf-Kinasen, B-Raf jedoch weitaus effektiver als C-Raf [257]. Für diesen Inhibitor wurden Experimente, bei denen INA-6 und MM.1S Zellen mit steigenden Inhibitorkonzentrationen behandelt wurden, durchgeführt (s. Abb. 10). Hierbei konnte gezeigt werden, dass es für jede Zelllinie eine individuelle Konzentration gab, bei der es zu einer De-Phosphorylierung von MEK1/2 bzw. ERK1/2 kam (INA-6: 9 μ M; MM.1S: 10 μ M). Aus dieser Tatsache ließ sich ableiten, dass bei genügend hoher Konzentration SB-590885 nicht nur B-Raf, sondern auch die anderen beiden Isoformen effektiv inhibierte. Ab einer entsprechend hohen Konzentration konnte dieser Inhibitor folglich als Pan-Raf-Inhibitor angesehen werden.

Neben den Auswirkungen des Raf-Knockdowns auf den MEK/ERK-Signalweg wurde auch das Überleben der Zellen nach Depletion von Raf untersucht. Hierfür wurden INA-6, MM.1S und KMS11 Zellen verwendet, deren Überlebensrate 96 h nach Knockdown mittels APC-Annexin-V/PI-Färbung ermittelt wurde. Der Knockdown von C-Raf hatte in den drei Zelllinien keinen Einfluß auf die Viabilität der Zellen. Transfektion mit A-Raf spezifischer shRNA führte zu einer Viabilitätsabnahme der Zellen um ca. 25 %, wobei KMS11 Zellen hierbei größere Schwankungsbreiten aufwiesen. In INA-6 und MM.1S Zellen führte die Depletion von B-Raf ebenfalls zu einer Abnahme der Überlebensrate um ca. ein Viertel, in KMS11 Zellen sogar um ca. die Hälfte (s. Abb. 11). Nach gleichzeitigem Knockdown aller drei Isoformen verloren INA-6 und MM.1S Zellen dahingegen rund 50 % ihrer Viabilität, bei KMS11 Zellen waren es sogar fast 70 % (s. Abb. 12). Beim Vergleich der unterschiedlichen Zellviabilitäten muss berücksichtigt werden, dass es bei der mittels Elektroporation durchgeführten Transfektion von MM Zelllinien nicht möglich ist, alle Zellen in einem Ansatz zu transfizieren. Selbst nach Aufreinigung über ko-transfiziertes CD4 verbleiben im Experiment untransfizierte Zellen, die normal weiterwachsen können.

Da diese die Messung der Viabilität verfälschen können, ist davon auszugehen, dass die wahre Viabilitätsrate der transfizierten Zellen sogar noch etwas niedriger als die tatsächlich gemessene gelegen haben könnte. Diese Experimente zeigten jedoch eindeutig, dass die Zelltod-Rate von MM Zellen durch eine Pan-Raf-Blockade durch gleichzeitigen Knockdown der Isoformen maximiert werden konnte.

Eine Bestätigung dieses Ergebnisses konnte auch durch die pharmakologische Pan-Raf-Inhibition erzielt werden. SB-590885, der, wie zuvor gezeigt, als Pan-Raf-Inhibitor wirken konnte, induzierte in den untersuchten Zelllinien (INA-6, MM.1S, AMO-1, KMS11, U266, KMS-12-BM und L363) starke apoptotische Effekte (s. Abb. 13). Primäre MM Zellen konnten zwar nicht mittels Elektroporation transfiziert werden, zeigten aber bei der Behandlung mit dem Inhibitor ebenfalls ein starkes Ansprechen (s. Abb. 14). Während bei 5 μM der Effekt auf die primären Zellen noch eine große Schwankungsbreite aufwies, konnte mit 10 μM in den Proben mehrheitlich Apoptose ausgelöst werden. Die vorliegenden Experimente wiesen darauf hin, dass die einzelnen Isoformen sich in ihrer Funktion teilweise kompensieren könnten und dass eine Pan-Raf-Inhibition der Inhibition einer einzelnen Isoform deutlich überlegen ist. Dies sollte bei der Entwicklung eines erfolgreichen Therapieansatzes unbedingt beachtet werden. Da sich auch bei den Reaktionen auf die Pan-Raf-Blockade weder in den Zelllinien noch in den primären Zellen eine Korrelation mit dem Ras-Mutationsstatus zeigte, könnte Raf unabhängig von onkogenem Ras als eigenständige therapeutische Zielstruktur dienen. Ein weiterer Vorteil einer Pan-Raf-Blockade liegt in der Vermeidung der paradoxen Aktivierung des MAPK-Signalweges in Ras-mutierten Zellen nach Anwendung B-Raf-spezifischer Inhibitoren, wie sie in z.B. Melanomzellen nachgewiesen wurde. Dabei kommt es, durch mutiertes Ras angetrieben und durch die Inhibitoren begünstigt, zur C-Raf-Homo- und -Heterodimerisierung mit B-Raf. Diese wurden als wichtiger regulatorischer Mechanismus der Raf-Kinasen entdeckt, der ihre Aktivität dramatisch steigern kann. Die durch Dimerisierung vermittelte Aktivierung wird nicht beeinträchtigt, wenn die Kinaseaktivität einer der Dimerisierungspartner durch einen Inhibitor geblockt wird. Somit sind Heterodimere aus wildtypischem B-Raf und C-Raf trotz der Blockade der B-Raf Isoform durch einen spezifischen Inhibitor aktiv und führen zur Aktivierung des MAPK-Signalweges [258-261].

Zwar erwies sich durch die vorliegenden Experimente das downstream der Raf-Kinasen gelegene MEK/ERK-Modul als exzellenter Biomarker für eine Pan-Raf-Inhibition, jedoch wirken sich MEK-Inhibitoren trotz Blockade der ERK1/2-Phosphorylierung nicht entscheidend auf das Überleben der MM Zellen aus [94],[95],[113],[235]. Folglich kann die Inhibition von MEK nicht mit einer Pan-Raf-Inhibition gleichgesetzt werden und es sollten sich MEK/ERK-unabhängige Mechanismen der Pan-Raf-Inhibition in den MM Zellen nachweisen lassen. Um diese Mechanismen aufzuklären, wurden in der vorliegenden Arbeit mRNA-basierte Genexpressionsprofile nach pharmakologischer Pan-Raf- bzw. MEK-Inhibition angefertigt und miteinander verglichen. Primäre Zellen standen für diese Art von Versuch nicht in ausreichender Menge zur Verfügung, weshalb auf die Zelllinie INA-6 zurückgegriffen wurde. Die Zellen wurden mit DMSO, PD-325901 (MEK-Inhibitor) oder SB-590885 behandelt, die RNA isoliert und anschließend genomweite cDNA-Microarray-Analysen mit GeneChips von Affymetrix durchgeführt. Die Konzentration des Raf-Inhibitors wurde so gewählt, dass die MEK/ERK-Phosphorylierung herunterreguliert, ein vollständiger Zelltod während der Inkubationszeit jedoch vermieden wurde. Die gewählte Konzentration des MEK-Inhibitors verhindert in den Zellen effektiv die Phosphorylierung von ERK1/2 [235]. Die Genexpressionsprofile gaben einen ersten Überblick über mögliche Unterschiede zwischen MEK- und Pan-Raf-Inhibition. Deutlich mehr Gene wurden nach der Pan-Raf-Blockade differentiell reguliert (s. Abb. 15). So konnten nach Raf-Behandlung 7333, nach MEK-Inhibition nur 2037 differentiell exprimierte Gene gefunden werden ($p < 0,05$). Die Heatmap der differentiell regulierten Gene zeigte, dass die Genexpressionsmuster der mit MEK-Inhibitor behandelten Zellen den Kontrollzellen ähnlicher waren als die mit Pan-Raf-Inhibitor behandelten und damit wirkte die Pan-Raf-Inhibition sich weitaus mehr auf die Genexpression der Zellen aus (s. Abb. 16). Da aber die Pan-Raf-Inhibition, wie bereits beschrieben, in den Zellen Apoptose induziert, könnten dadurch viele Gene indirekt reguliert werden und es zu falsch-positiven Genexpressions-Veränderungen kommen. Die Inkubationszeit des Experiments betrug jedoch nur acht Stunden, so dass die Mehrheit der gefundenen Effekte eine direkte Auswirkung der Raf-Blockade sein sollte. Die nähere Klassifizierung der als differentiell reguliert gefundenen Gene mit Hilfe von GO-Analysen zeigte, dass sich die Raf-Inhibition in den MM Zellen deutlich auf die Regulation Tumor-relevanter Funktionen wie Proliferation, Zellzyklus und Apoptose auswirkte (s. Abb. 17), was mit bisherigen Erkenntnissen aus der

Literatur übereinstimmt [262]. Der Einfluss der Raf-Blockade auf grundlegende Charakteristika maligner Tumore lieferte einen weiteren Hinweis auf die bedeutende Rolle von Raf im MM und auf die Abgrenzung zu MEK.

Zur weiteren Evaluierung der Genexpressions-Analysen sollte eine Regulation durch die Raf-Kinasen auch auf Proteinebene durch Western-Blot-Analysen untersucht werden. Die vorliegende Arbeit beschränkte sich dabei auf die Untersuchung einer möglichen Regulation der Gruppe der PI3K-abhängigen, mTOR-assozierten Gene. Der PI3K/AKT-Signalweg, der im MM oftmals aktiviert vorliegt, vermittelt wichtige Überlebenssignale und seine Blockade induziert in den Tumorzellen Apoptose [94-96],[236]. PI3K setzt sich aus Heterodimeren einer katalytischen (p110) und einer regulatorischen (p85) Untereinheit zusammen [263],[264]. Rezeptortyrosinkinasen interagieren mit der SH2 (Src homology 2) Domäne von p85, wodurch sich Heterodimere mit der katalytischen Untereinheit bilden, die an die Plasmamembran rekrutiert werden. Ras kann direkt mit der katalytischen Untereinheit in Wechselwirkung treten und so ebenfalls aktivierend wirken. Aktive PI3K generiert an der Plasmamembran durch Phosphorylierung von PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat) das Membranlipid PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat). AKT wird durch Binden von PIP3 an die PH- (pleckstrin homology) Domäne aktiviert, wodurch die Kinase zur Plasmamembran lokalisiert, wo eine Phosphorylierung an Thr308 durch PDK1 stattfindet [265-267]. Weiterhin kann zur vollen Aktivierung Ser347 durch mTOR phosphoryliert werden [268],[269]. Vollständig aktiviertes AKT transloziert zum Nukleus und phosphoryliert und inhibiert TSC1/2, wodurch mTOR und downstream Ziele aktiviert werden [270].

mTOR, eine Serin/Threonin-Proteinkinase, spielt eine wichtige Rolle bei der Modulation von Proteinsynthese, Proliferation, Wachstum, Überleben, Invasion und Chemoresistenz von MM Zellen [271]. Da die Aktivität dieser Kinase durch PI3K- und AKT-Aktivierung reguliert wird, stellt sie eine attraktive pharmakologische Zielstruktur für breitgefächerte downstream Effekte dar. Konstitutive Aktivierung mTOR-bezogener downstream Effektoren wie p70S6K und 4EBP1 wurde bereits bei verschiedenen Krebsarten nachgewiesen. Eine Studie zeigte, dass p-mTOR in fast 60 % der untersuchten MM Patienten exprimiert wird und zur Zellproliferation und zum Überleben der MM Zellen beitragen könnte [272]. mTOR existiert in zwei verschiedenen multimolekularen Komplexen: Komplex 1 (mTORC1) und Komplex 2

(mTORC2) [273]. mTORC1 ist sensitiv für Rapamycin und besteht aus mTOR, Raptor, mLST8 und PRAS40 [274-276]. Aktivität von mTORC1 führt zu erhöhter mRNA Translation, Proteinsynthese und Zellproliferation, zum Teil vermittelt durch Phosphorylierung von S6 Kinase (S6K) und dem eIF-4E Bindeprotein [277]. mTORC2 besteht aus mTOR, Rictor, mSin1, mLST8 und Protor und findet sich upstream von AKT, das direkt von mTORC2 an Ser473 phosphoryliert wird [267],[278-282]. Zur Aktivierung von mTOR finden Phosphorylierungen an verschiedenen Aminosäuren, unter anderem an Thr2446, S2448 und S2481, statt. Der Phosphorylierungsstatus von Ser2448 stellt dabei einen gut etablierten Biomarker für den Aktivierungsstatus von mTOR dar [283],[284]. Durch die Behandlung der Zellen mit den Raf-Inhibitoren nahm die Phosphorylierung von Ser2448 (bei gleichbleibendem mTOR Level) in INA-6 und MM.1S Zellen ab, wodurch auf eine eingeschränkte Aktivität von mTOR nach Pan-Raf-Blockade geschlossen werden konnte (s. Abb. 18).

Auch die Phosphorylierung der p70S6 Kinase (p70S6K) veränderte sich durch diese Behandlung. Bei p70S6K handelt es sich um eine Ser-/Thr-Proteinkinase downstream von mTOR, deren Aktivierung zu erhöhter Phosphorylierung des S6 Proteins, das einen Teil der 40S Untereinheit des eukaryotischen Ribosoms bildet, führt. Durch Phosphorylierung von S6 wird die Translation eines Subsets von mRNAs moduliert, das ribosomale Proteine und Elongationsfaktoren der Translation kodiert. Hierdurch wird zusammen mit der Phosphorylierung des Translationsrepressors 4E-BP1 durch mTOR, was die Dissoziation des Translations-Initiationsfaktors eIF4E von 4E-BP1 auslöst, die Translation von mRNAs, mit regulatorischen Elementen in der 5'-untranslatierten Region wie z.B. CyclinD1 eingeleitet. Somit kann die Progression durch die G1-Phase des Zellzyklus und Zellwachstum gefördert werden [285-287],[270]. Die Aktivität von p70S6K wird durch Phosphorylierungen von Aminosäuren in der katalytischen, der Linker- und der Pseudosubstrat-Domäne reguliert. Die Phosphorylierung von Thr229 durch PDK1 in der katalytischen Domäne und Thr389 in der Linker-Domäne durch mTOR ist kritisch für die Funktion der Kinase. Weitere Phosphorylierungsstellen wie Ser411, Thr421 und Ser424 finden sich in der Pseudosubstrat-Domäne und spielen ebenfalls eine wichtige Rolle für die Aktivierung [288-293]. Da die Phosphorylierung von p70S6K an Thr398 einen Marker für die Aktivität von mTORC1 darstellt [294], lieferte die De-Phosphorylierung dieser Phosphostelle nach Pan-Raf-Inhibition einen weiteren

Hinweis auf einen Aktivitätsverlust von mTOR. Der spezifische Antikörper gegen Thr421/Ser424 p70S6K zeigte weiterhin an, dass auch an diesen Stellen die Phosphorylierung durch die Pan-Raf-Inhibition abnahm. Dies stimmt mit bisherigen Hypothesen, dass die Phosphorylierung von p70S6K an Thr421/Ser424 vom Ras/Raf-Signalweg abhängt, überein [295]. Die De-Phosphorylierung von Thr389 und Thr421/424 ließ auf eine stark verminderte Aktivität der p70S6K nach Pan-Raf-Inhibition schließen.

Da der PI3K/mTOR-Signalweg weiterhin sowohl die Expression als auch die Proteolyse (GSK-3 β -abhängig) von CyclinD kontrolliert [296-300], wurde das Proteinlevel nach Pan-Raf-Inhibition von CyclinD1 (INA-6) bzw. CyclinD2 (MM.1S) untersucht und eine Reduzierung des Levels festgestellt. CyclinD ist in die normale Regulation des Zellzyklus involviert und spielt bei Neoplasien oft eine bedeutende Rolle. In der G1-Phase des Zellzyklus ist CyclinD zusammen mit seiner Cyclin-abhängigen Kinase verantwortlich für den Übergang zur S-Phase durch Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins, Rb, welches anschließend Transkriptionsfaktoren (E2F) freisetzt, die entscheidend für die Initiation der DNA-Replikation sind [301],[302]. Die Abnahme des CyclinD Levels steht in guter Übereinstimmung mit Ergebnissen aus Melanomzellen mit mutiertem B-Raf, bei denen die Herunterregulation aller drei Raf-Isoformen mit einer gesenkten CyclinD1 Expression verbunden war [303],[304].

Mit dem Verlust von CyclinD durch Pan-Raf-Inhibition ging auch eine Abnahme der Phosphorylierung von Rb an der Phosphorylierungsstelle Ser807/811 einher (bei ungefähr gleichbleibendem Niveau an Rb). Dieses Protein steuert den G1-S-Kontrollpunkt des Zellzyklus und wird während des Zyklus wechselweise phosphoryliert und dephosphoryliert [305]. Während der G1-Phase stellt die CyclinD-abhängige Phosphorylierung von Rb an Ser795 den Übergang vom hypophosphorylierten Zustand zu einem inaktivem, phosphorylierten Zustand, der durch Phosphorylierung von u.a. Ser807/811 aufrecht erhalten wird, dar. Hypophosphoryliertes Rb unterdrückt die Transkription von Genen, die den Zellzyklus regulieren durch direkte Protein-Protein-Wechselwirkung und durch die Rekrutierung von Histon-Deacetylasen [306],[307]. Neben der Cyclin-vermittelten Inaktivierung von Rb kann auch zumindest C-Raf als Antwort auf proliferative Signale Rb effektiv phosphorylieren. Dies setzt eine direkte Bindung von C-Raf an Rb voraus und ist von der Kinasefunktion von C-Raf abhängig [152],[308-310], jedoch

unabhängig vom MEK/ERK Signalweg [309]. Für Melanomzellen wurde bereits gezeigt, dass Inhibitoren, die die Interaktion von C-Raf mit Rb hemmen, die Phosphorylierung von Rb verhindern, wodurch die Zellzyklus-Progression gestört wird [310],[311].

Interessanterweise führten die Raf-Inhibitoren in den untersuchten Zelllinien auch zu einer Abnahme des PDK1-Proteinlevels. Über eine Wechselwirkung von Raf und PDK1 ist bisher nichts bekannt geworden und der Mechanismus muss erst noch aufgeklärt werden. Möglicherweise könnte dieser über den Transkriptionsfaktor c-Jun laufen, der die Transkription von PDK1 reguliert und dessen Inhibition die PDK1-Expression in Melanomzellen reduziert [314]. Die Aktivität von c-Jun kann andererseits über Raf-Signaling reguliert werden [315], wobei Studien zeigen, dass diese Aktivierung keine direkte Konsequenz einer ERK1/2-Aktivierung ist [316]. Zum weiteren Nachweis der Beteiligung im Multiplen Myelom müssten c-Jun spezifische Antikörper nach Pan-Raf- und MEK-Inhibition im Western Blot verwendet werden.

AKT selbst zeigte nach Pan-Raf-Inhibition durch die Inhibitoren eine De-Phosphorylierung an Serin473 und Threonin308 (bei gleichbleibendem AKT-Proteinlevel), zwei für die Aktivierung von AKT kritische Phosphorylierungsstellen (s. Abb. 19). Dieser Versuch wurde nur an MM.1S-Zellen durchgeführt, da INA-6 Zellen kein im Western Blot nachweisbares p-AKT-Signal aufweisen. PDK1 wurde als die Kinase, die Thr308 phosphoryliert beschrieben [313],[317], während Ser473 von mTOR phosphoryliert wird [298],[318] und einen Marker für die Aktivität von mTORC2 darstellt [294]. Die Abnahme der Phosphorylierung an Ser473 und Thr308 nach Pan-Raf-Inhibition durch die Raf-Inhibitoren könnte direkt auf die verringerte mTOR-Aktivität bzw. Abnahme der PDK1 Expression zurückzuführen sein. In Experimenten mit Sorafenib (Multi-Kinase-Inhibitor, der u.a. Raf inhibiert) wurde eine De-Phosphorylierung von AKT in der Literatur bereits aufgezeigt [319].

Zur Überprüfung der durch die Raf-Inhibitoren gewonnenen Ergebnisse, wurden die zuvor genannten Proteine auch nach gleichzeitigem Knockdown der drei Raf-Isoformen untersucht, und es wurde gezeigt, dass die Level von PDK1, p-p70S6K, CyclinD1 bzw. D2, p-Rb und p-AKT abnahmen (s. Abb. 20 und 21). Allerdings konnte keine eindeutige Aussage zur Veränderung des Phosphorylierungsgrades von mTOR gemacht werden. Dies könnte daran gelegen haben, dass sich der Wirkmechanismus von shRNAs von dem der Inhibitoren unterscheidet und der

Knockdown technische Probleme mit sich brachte (längere Inkubationszeiten und somit mögliche gegenregulatorische Vorgänge, Verbleiben von nicht-transfizierten Zellen in der Kultur, etc.). Grundsätzlich wurden die Ergebnisse aus den Versuchen mit den Inhibitoren jedoch durch die shRNA-Experimente bestätigt.

Die gefundenen Regulationen der mTOR-assoziierten Proteine nach Pan-Raf-Blockade schienen im Multiplen Myelom jedoch nicht von dem MEK/ERK-Modul abhängig zu sein, da die Verwendung eines MEK-Inhibitors keinen Einfluß auf die untersuchten Proteinlevel zeigte (s. Abb. 22). Die Phosphorylierungsgrade von mTOR, p70S6K und Rb bzw. die Proteinlevel von PDK1 und CyclinD1/2 veränderten sich gegenüber den Kontrollzellen nicht. Auch die von Niba und Kollegen [320] gesehene De-Phosphorylierung von AKT an Ser473 und Thr308 nach Inkubation mit einem MEK-Inhibitor konnte für die MM Zellen nicht gezeigt werden (s. Abb. 23).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass durch die Pan-Raf-Inhibition im Gegensatz zur MEK-Inhibition mTOR und mTOR-assoziierte, PI3K-abhängige Gene reguliert werden und somit eine potentielle Ko-Regulation der PI3K-abhängigen Signaltransduktion durch die Raf-Kinasen bestehen könnte. Somit würde sich die Pan-Raf-Inhibition auf einen zentralen Signalweg, der im MM wichtig für das Überleben der Zellen ist und dessen Blockade Apoptose der Tumorzellen hervorruft, auswirken [95],[96],[235]. Dies könnte die Induktion der Apoptose nach Pan-Raf-Inhibition, nicht aber nach MEK-Inhibition in MM Zellen erklären.

In der Literatur finden sich bereits zahlreiche Hinweise auf einen Crosstalk zwischen dem Ras/Raf/MEK/ERK- und dem PI3K/PTEN/AKT/mTOR-Signalweg auf verschiedenen Ebenen. So vermag AKT beispielsweise C-Raf direkt am Serin259 zu phosphorylieren [321-323]. Der Crosstalk zwischen Raf- und PI3K/mTOR-Signalweg könnte eine potentielle Rolle bei der Modulation von Resistenzen der MM Zellen gegen die Blockade eines einzelnen Signalweges spielen und legt eine simultane Inhibition beider Signalwege nahe [324],[235]. Die Abschaltung nur eines dieser Wege kann abhängig von upstream Mutationen sogar zur Aktivierung führen. So können beispielsweise Raf-Inhibitoren in Zellen mit wildtypischem Raf in Anwesenheit von mutiertem Ras zur Raf-Aktivierung führen und Rapamycin, ein mTOR-Inhibitor, kann die Aktivierung von AKT auslösen. Die gleichzeitige Blockade

beider Signalwege könnte sich somit in Hinblick auf Therapiemaßnahmen als wesentlich effektiver erweisen [324].

Um diese These weiter zu stützen, wurden in dieser Arbeit die Inhibitoren BYL-719 und BEZ235 verwendet. Während BYL-719 nur PI3K inhibiert [325] handelt es sich bei BEZ235 um einen neuen Inhibitor, der gleichzeitig PI3K und mTOR inhibiert. Er hemmt das Wachstum von MM Zelllinien und primären Zellen im nanomolaren Bereich und induziert darüber hinaus Apoptose [326]. Diese Inhibitoren führten erwartungsgemäß zu einer Abnahme des p-AKT-Signals in MM.1S Zellen (s. Abb. 25). Weiterhin zeigte sich eine Abnahme der Level von p-mTOR, p-p70S6K, CyclinD und p-Rb (s. Abb. 24), wie es bereits in der Literatur beschrieben wurde [270],[294],[326-334]. Auch nahm der Phosphorylierungsgrad von PDK1 an Serin241 ab, was auf eine verminderte Aktivität von PDK1 nach PI3K-Inhibition hinwies. Die Phosphorylierung dieser Phospho-Site im Aktivierungsloop durch Autophosphorylierung ist notwendig für die Aktivität von PDK1 [335].

Um die Auswirkungen einer dualen Blockade von PI3K/mTOR und Pan-Raf zu untersuchen, wurden zunächst Western Blots angefertigt, bei denen die Wirkung einzelner Inhibitor-Konzentrationen mit der Wirkung der kombinierten Konzentrationen verglichen wurde. Die einzelnen Konzentrationen von SB-590885 und BYL-719 bzw. BEZ235 wurden so eingestellt, dass sie weitgehend keinen Einfluss auf die untersuchten Proteine hatten. Anschließend wurde die ermittelte Grenzkonzentration von SB-590885 mit der Konzentration von BYL-719 bzw. BEZ235 kombiniert (s. Abb. 26 und 27). Für p-ERK1/2, p-mTOR, p-PDK1, p-p70S6K (T421/S424), CyclinD, p-Rb und p-AKT konnte nachgewiesen werden, dass die Kombination der Inhibitoren einen deutlich größeren Effekt gegenüber den Einzelkonzentrationen erzielte. Somit führten niedrige Konzentrationen der Inhibitoren, die alleine kaum einen Effekt zeigten, in Kombination zu einer Veränderung in der Expression wichtiger Signalmoleküle und Zellzyklus-Proteine. Am Beispiel von PDK1 ließ sich ein weiterer vorteilhafter Effekt der gemeinsamen Inhibition der Signalwege erkennen. Während PI3K-Inhibition die Aktivität von PDK1 minderte, wurde durch die Pan-Raf-Inhibition die Expression von PDK1 gesenkt, so dass die Kombination aus beiden Inhibitoren zu einer umfassenden Blockade führte.

Der Effekt der gesteigerten Wirksamkeit bei Kombination der Inhibitoren ließ sich auch für die Zellviabilität von MM.1S und primären Zellen nachweisen. Die Einzelkonzentrationen führten bei MM.1S lediglich zu einer Reduktion der Zellviabilität um ca. 25 %, während die Kombinationen zu einer Zelltod-Rate von über 75 % führten. Für die primären Zellen fiel der Effekt weniger deutlich aus, doch auch hier konnte das Überleben der Zellen durch Kombination der Inhibitoren weiter gesenkt werden (s. Abb. 28).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen deutlich, dass die Raf-Kinasen und Raf-abhängiges Signaling im MM eine wichtige Rolle spielen und dass zahlreiche Raf-Funktionen nicht über das MEK/EKR-Modul vermittelt werden. Die Inhibition von Pan-Raf könnte eine neue, von Ras unabhängige, Therapiestrategie für das MM darstellen. Weiterhin besteht eine enge Kommunikation mit dem PI3K/AKT-Signalweg, sodass keine linearen Signalwege, sondern vielmehr ein weitverzweigtes Signalnetzwerk vorliegt, das zur Entstehung und Entwicklung des MM beiträgt und wichtig für das Überleben der Myelomzellen ist. Die gezeigte Effektivität der gemeinsamen Blockade des PI3K- und Raf-Signalweges legt nahe, dass es downstream Zielstrukturen gibt, die durch beide aktivierte Signalwege reguliert werden, so dass die Inhibierung nur eines Weges weniger effektiv ist. Diese Strukturen könnten Komponenten der Regulation der Apoptose, wie z.B. Bad [336] und der Translation wie S6, 4E-BP1 [337] und p70S6K (wie in dieser Arbeit gezeigt) sein. Die duale Inhibition von Komponenten des PI3K- und des Raf-Signaling-Moduls könnte eine vielversprechende therapeutische Option darstellen, insbesondere für Ras-mutierte Tumore mit einer bekanntermaßen schlechteren Prognose, da mutiertes Ras einen gemeinsamen upstream Effektor für diese Signalwege bildet. Kompensatorische Gegenregulationen, die durch Crosstalk bei Einzelinhibition zu Komplikationen führen, könnten so effektiv vermieden werden [235]. Weiterhin kann es bei der Inhibition nur einer Zielstruktur leicht zur Resistenzbildung durch z.B. Gate-keeper Mutationen kommen [338],[339]. Da bei der wirksameren Kombination der Medikamente im Vergleich zur Einzelbehandlung die aktiven Konzentrationen gesenkt werden können, lassen sich möglicherweise Nebeneffekte der Behandlung abmildern und somit die Lebensqualität der Patienten steigern. Die Zahl der präklinischen und klinischen Studien, die die duale Ras/Raf/MAPK und PI3K/Akt

Inhibition untersuchen, zeigt einen zunehmenden Trend, diese Kombination anzuwenden, um wirkungsvollere und nachhaltigere Effekte zu erzielen [340],[341].

6 Zusammenfassung

Das Multiple Myelom (MM) ist eine durch monoklonale Vermehrung terminal differenzierter Antikörper-produzierender B-Lymphozyten (Plasmazellen) im Knochenmark charakterisierte maligne Krankheit, die sich v.a. in osteolytischen Knochendestruktionen, hämatopoetischer und Niereninsuffizienz äußert. Verbesserte Therapieansätze wie die Hochdosis-Chemotherapie mit Melphalan und anschließender autologer Stammzelltransplantation sowie die Einführung neuer pharmakologischer Substanzklassen (Proteasom-Inhibitoren, Cereblon-bindende Thalidomidderivate) führten zu einer Verlängerung der durchschnittlichen Überlebenszeit, für die meisten der Patienten ist die Erkrankung jedoch derzeit unheilbar. Die Erforschung neuer potenzieller therapeutischer Angriffspunkte auf Grund pathobiologischer Erkenntnisse bleibt daher unabdingbar. Ein Ansatz zur Verbesserung des Verständnisses der Pathogenese ist die funktionelle, molekulare und genetische Analyse des Signalnetzwerkes im MM. Im Zusammenhang mit diesem Konzept wurde entdeckt, dass wachstums-regulierende Signalwege in MM Zellen aktiviert oder dereguliert sind und zum Überleben und der Proliferation des Tumors beitragen. So konnte beispielsweise von unserer Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden, dass onkogenes Ras essentiell zum Überleben der MM Zellen beiträgt. Da Ras derzeit mangels spezifischer Inhibitoren pharmakologisch nicht angreifbar ist, stellen weitere funktionelle Bestandteile des Signalweges eine potenzielle therapeutische Zielstruktur dar. Während die Blockade von MEK1/2 in MM Zellen keinen Einfluss auf das Überleben hatte, konnte durch die Blockade von Raf in ersten Tests unserer Arbeitsgruppe Apoptose hervorgerufen werden. Aus diesem Grund habe ich in der vorliegenden Arbeit zur Evaluation eines neuen Therapieansatzes die Rolle der Raf-abhängigen Signaltransduktion eingehend untersucht. Als Grundlage diente dabei die Hypothese, dass die Raf-Kinasen entscheidende Effektoren der durch onkogenes Ras vermittelten apoptotischen Effekte darstellen. In einem ersten Schritt konnte ich nachweisen, dass alle drei Raf-Isoformen (A-, B- und C-Raf) in humanen MM Zelllinien und in primären MM Zellen aktiviert sind. Mittels shRNA-vermittelter, Isoform-spezifischer Raf-Knockdown-Experimente konnte ich zeigen, dass nur ein simultaner Knockdown aller Isoformen, d.h. ein Pan-Raf-Knockdown, zu einer De-Phosphorylierung von MEK1/2 und

ERK1/2 führte. Dieser Versuch ließ sich mittels pharmakologischer Raf-Inhibition, bei der ebenfalls nur eine Pan-Raf-Blockade zu einer Herunterregulation von MEK1/2 und ERK1/2 in MM Zellen führte, bestätigen. Das MEK/ERK-Modul stellte somit einen hervorragenden Surrogat- und Biomarker für die Pan-Raf-Aktivität dar. Im Gegensatz zur Blockade des MEK/ERK-Moduls führte eine Hemmung der Pan-Raf-Aktivität mittels shRNA oder pharmakologischer Inhibitoren in allen untersuchten Zelllinien und in der Mehrheit der primären MM Zellen zu einer starken Induktion von Apoptose. Da das Ansprechen auf eine Pan-Raf-Blockade nicht mit dem Ras-Mutationsstatus korrelierte, könnten die Raf-Kinasen eine von onkogenem Ras unabhängige Qualität als therapeutische Zielstruktur aufweisen. Zur Untersuchung möglicher MEK/ERK-unabhängiger Effektormechanismen der Pan-Raf-Inhibition habe ich die mRNA-basierten Genexpressionsprofile von INA-6 Zellen nach pharmakologischer Pan-Raf- oder MEK-Inhibition verglichen. Dabei führte die Pan-Raf-Inhibition zu einer Regulation von wesentlich mehr Genen, wobei sich auch die Art der regulierten Gene unterschied, darunter Gene mit tumorrelevanten Funktionen wie Regulation von Proliferation, Zellzyklus und Apoptose. Für eine dieser Gengruppen, die Gruppe der PI3K-abhängigen, mTOR-assoziierten Gene, konnte ich eine Regulation auch auf der Proteinebene nachweisen: die Phosphorylierungen von mTOR, p70S6K, Rb und AKT und die Expression von CyclinD1 und PDK1 waren nach Pan-Raf-Inhibition, nicht jedoch nach MEK-Blockade herunterreguliert. Dieses Ergebnis deutet auf eine Ko-Regulation der PI3K-abhängigen Signaltransduktion durch die Raf-kinasen hin. Mittels spezifischer PI3K-Inhibitoren ließ sich sowohl bei der Regulation der untersuchten Proteine als auch bei der Induktion von Apoptose eine deutliche Verstärkung der Pan-Raf-Inhibition in HMZL und in primären Zellen erzielen. Zusammengefasst zeigt diese Arbeit, dass die Pan-Raf-Blockade eine neue Therapiemöglichkeit darstellt, die durch Kombination mit einer PI3K/AKT-Inhibition noch verstärkt werden kann.

Summary

Multiple Myeloma (MM) is a malignant disease which is characterized by monoclonal expansion of terminally differentiated, antibody-producing B-lymphocytes (plasma cells) and results mostly in bone lesions, haematopoietic and renal insufficiency. Improved therapeutic approaches like high-dose melphalan chemotherapy followed by autologous stem-cell transplantation and the introduction of new pharmacological compounds (proteasome inhibitors, cereblon-binding Thalidomide derivatives) increased the mean survival time. Nevertheless, the disease remains incurable for most of the patients. Therefore, the exploration of new potential therapeutical targets based on pathobiologic insights becomes vital. One approach to improve the understanding of the pathogenesis is to analyze functionally, molecularly and genetically the signaling network in MM. In the context of this concept, it was discovered, that growth-regulating pathways are activated or deregulated in MM cells and contribute to tumor survival and proliferation. Our working group could already prove that oncogenic Ras is crucial for cell survival. Since Ras itself does not yet represent a druggable target, therapeutical approaches should aim at other functional parts of the pathway. While blocking of MEK1/2 has no influence on MM cell survival, early reports of our working group showed that inhibiting Raf induced apoptosis. For this reason I investigated the role of Raf-dependent signaling in order to evaluate a new therapeutic approach. This was based on the hypothesis that Raf kinases act as important effectors for the apoptotic effects of oncogenic Ras. As a first step, I could prove, that all three Raf isoforms (A-, B- and C-Raf) are activated in human MM cell lines and in primary MM cells. By using of shRNA-mediated, isoform-specific Raf knockdown experiments I could reveal that only the simultaneous knockdown of all three isoforms, i.e. a Pan-Raf knockdown, led to de-phosphorylation of MEK1/2 and ERK1/2. Also pharmacological Raf inhibition showed that only Pan-Raf blockage decreases the phosphorylation of MEK1/2 and ERK1/2 and thereby confirmed the knockdown experiment. These experiments also proved that the MEK/ERK module is a strong surrogate and biomarker for Pan-Raf activity. Contrary to inhibiting the MEK/ERK module the inhibition of Pan-Raf activity by shRNAs or pharmacological inhibitors led on to a strong induction of apoptosis in the tested cell lines and in the majority of primary cells. Since the response to Pan-Raf inhibition did not correlate

with Ras mutational status, the Raf kinases could probably represent a Ras-independent therapeutical target of high quality. In order to decode possible MEK/ERK-independent effector mechanisms I compared the mRNA-based gene expression profiles of INA-6 cells after pharmacological inhibition of Pan-Raf or MEK. Pan-Raf inhibition led to the regulation of a greater number of genes, taking into account that the character of the regulated genes also varied. This included genes with functions relevant for tumors like regulation of proliferation, cell cycle and apoptosis. For one of these groups, the PI3K-dependent, mTOR-associated genes, I could show the regulation on the level of the proteins: phosphorylation of mTOR, p70S6K, Rb and AKT as well as the expression of cyclinD1 and PDK1 decreased after Pan-Raf inhibition, but not after MEK inhibition. This result suggests a co-regulation of the PI3K-dependent signal transduction by Raf kinases. In summary, this thesis presents a rationale for Pan-Raf inhibition as a new therapeutical option, which can be enhanced by combination with PI3K/AKT-inhibition.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

- [1] H. Stein, "Die neue WHO-Klassifikation der malignen Lymphome," *Der Onkologe*, vol. 17 (9), pp. 769–788, 2000.
- [2] R. A. Kyle, "Multiple myeloma: review of 869 cases," *Mayo Clinic proceedings*, vol. 50 (1), pp. 29–40, 1975.
- [3] R. A. Kyle, "Multiple myeloma: an odyssey of discovery," *British Journal of Haematology*, vol. 111 (4), pp. 1035–1044, 2000.
- [4] R.A. Kyle, "Henry Bence Jones – physician, chemist, scientist and biographer: A man for all seasons," *British Journal of Haematology*, vol. 115 (1), pp. 13–18, 2001.
- [5] R. A. Kyle and S. V. Rajkumar, "Multiple myeloma," *Blood*, vol. 111 (6), p. 2962–2972, 2008.
- [6] R. A. Kyle, T. M. Therneau, V. S. Rajkumar, D. R. Larson, M. F. Plevak, J. R. Offord, A. Dispenzieri, J. A. Katzmann, and L. J. Melton, "Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance," *The New England Journal of Medicine*, vol. 354 (13), pp. 1362–1369, 2006.
- [7] L. M. Brown, G. Gridley, D. Check, and O. Landgre, "Risk of multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance among white and black male united states veterans with prior autoimmune, infectious, inflammatory, and allergic disorders," *Blood*, vol. 111 (7), pp. 3388–3394, 2008.
- [8] A. Katalinic and R. Pritzkeleit, "Hochrechnung des Institut für Krebs epidemiologie E.V., Lübeck für icd10: C90 auf Basis der Daten der Krebsregister BY, BR, HB, HH, MV NI, NW (Reg.Bez. Münster) SL, SN, SH (2005-2009)," <http://www.gekid.de>, 2013.
- [9] J. Ferlay, E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J. Coebergh, H. Comber, D. Forman, and F. Bray, "Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012," *European Journal of Cancer*, vol. 49 (6), pp. 1374–1403, 2013.
- [10] F. Bray, J.-S. Ren, E. Masuyer, and J. Ferlay, "Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008," *Int. J. Cancer*, vol. 132 (5), pp. 1133–1145, 2012.
- [11] K. C. Anderson and R. D. Carrasco, "Pathogenesis of myeloma," *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, vol. 6 (1), pp. 249–274, 2011.
- [12] G. D. Roodman, "Pathogenesis of myeloma bone disease," *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, vol. 32 (109), pp. 290–292, 2004.
- [13] M. S. Raab, K. Podar, I. Breitkreutz, P. G. Richardson, and K. C. Anderson, "Multiple myeloma," *The Lancet*, vol. 374 (9686), pp. 324–339, 2009.
- [14] A. Oranger, C. Carbone, M. Izzo, and M. Grano, "Cellular mechanisms of multiple myeloma bone disease," *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2013, 2013.
- [15] T. L. Andersen, P. Boissy, T. E. Sondergaard, K. Kupisiewicz, T. Plesner, T. Rasmussen, J. Haaber, S. Kølvråa, and J.-M. Delaissé, "Osteoclast nuclei of myeloma patients show chromosome translocations specific for the myeloma cell clone: A new type of cancer-host partnership?" *The Journal of Pathology*, vol. 211 (1), pp. 10–17, 2007.
- [16] N. Calvani, P. Cafforio, F. Silvestris, and F. Dammacco, "Functional osteoclast-like transformation of cultured human myeloma cell lines," *British Journal of Haematology*, vol. 130 (6), p. 926–938, 2005.
- [17] J. A. Russell and R. L. Powles, "The relationship between serum viscosity, hypervolaemia and clinical manifestations associated with circulating paraprotein," *British Journal of Haematology*, vol. 39 (2), pp. 163–175, 1978.

- [18] M. A. Dimopoulos, E. Kastritis, L. Rosinol, J. Bladé, and H. Ludwig, "Pathogenesis and treatment of renal failure in multiple myeloma," *Leukemia*, vol. 22 (8), pp. 1485–1493, 2008.
- [19] The International Myeloma Working Group, "Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the international myeloma working group," *British Journal of Haematology*, vol. 121 (5), pp. 749–757, 2003.
- [20] B. G. Durie and S. E. Salmon, "A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival," *Cancer*, vol. 36 (3), pp. 842–854, 1975.
- [21] P. R. Greipp, J. S. Miguel, B. G. Durie, J. J. Crowley, B. Barlogie, J. Bladé, M. Boccadoro, J. A. Child, H. Avet-Loiseau, R. A. Kyle, J. J. Lahuerta, H. Ludwig, G. Morgan, R. Powles, K. Shimizu, C. Shustik, P. Sonneveld, P. Tosi, I. Turesson, and J. Westin, "International staging system for multiple myeloma," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 23 (15), pp. 3412–3420, 2005.
- [22] S. V. Rajkumar, "MGUS and smoldering multiple myeloma: Update on pathogenesis, natural history, and management," *American Society of Hematology Education Program*, pp. 340–345, 2005.
- [23] M. A. Dimopoulos, P. G. Richardson, P. Moreau, and K. C. Anderson, "Current treatment landscape for relapsed and/or refractory multiple myeloma," *Nature Reviews Clinical Oncology*, vol. 12 (1), pp. 42–54, 2015.
- [24] A. J. King, S. Gooding, and K. Ramasamy, "Managing multiple myeloma in the over 70s: A review," *Maturitas*, vol. 80 (2), pp. 148–154, 2015.
- [25] N. Grzasko, M. Morawska, and M. Hus, "Optimizing the treatment of patients with multiple myeloma and renal impairment," *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 2014.
- [26] S. V. Rajkumar, "Multiple myeloma: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management," *American Journal of Hematology*, vol. 89 (10), pp. 999–1009, 2014.
- [27] S. Giralt, E. A. Stadtmauer, J. L. Harousseau, A. Palumbo, W. Bensinger, R. L. Comenzo, S. Kumar, N. C. Munshi, A. Dispenzieri, R. Kyle, and et al., "International myeloma working group (IMWG) consensus statement and guidelines regarding the current status of stem cell collection and high-dose therapy for multiple myeloma and the role of plerixafor (AMd 3100)," *Leukemia*, vol. 23 (10), pp. 1904–1912, 2009.
- [28] S. Singhal, J. Mehta, R. Desikan, D. Ayers, P. Roberson, P. Eddlemon, N. Munshi, E. Anaissie, C. Wilson, M. Dhodapkar, J. Zeldis, D. Siegel, J. Crowley, and B. Barlogie, "Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma," *New England Journal of Medicine*, vol. 341 (21), pp. 1565–1571, 1999.
- [29] P. G. Richardson, P. Sonneveld, M. W. Schuster, D. Irwin, E. A. Stadtmauer, T. Facon, J.-L. Harousseau, D. Ben-Yehuda, S. Lonial, H. Goldschmidt, D. Reece, J. F. San-Miguel, J. Bladé, M. Boccadoro, J. Cavenagh, W. S. Dalton, A. L. Boral, D. L. Esseltine, J. B. Porter, D. Schenkein, and K. C. Anderson, "Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma," *The new england journal of medicine*, vol. 352 (24), pp. 2487–2498, 2005.
- [30] S. V. Rajkumar, S. R. Hayman, M. Q. Lacy, A. Dispenzieri, S. M. Geyer, B. Kabat, S. R. Zeldenrust, S. Kumar, P. R. Greipp, R. Fonseca, J. A. Lust, S. J. Russell, R. A. Kyle, T. E. Witzig, and M. A. Gertz, "Combination therapy with lenalidomide plus dexamethasone (rev/dex) for newly diagnosed myeloma," *Blood*, vol. 106 (13), pp. 4050–4053, 2005.
- [31] P. G. Richardson, E. Blood, C. S. Mitsiades, S. Jagannath, S. R. Zeldenrust, M. Alsina, R. L. Schlossman, S. V. Rajkumar, K. R. Desikan, T. Hideshima, N. C. Munshi, K. Kelly-Colson, D. Doss, M. L. McKenney, S. Gorelik, D. Warren, A. Freeman, R. Rich, A. Wu, M. Olesnyckyj, K. Wride, W. S. Dalton, J. Zeldis, R. Knight, E. Weller, , and K. C. Anderson, "A randomized phase 2 study of lenalidomide therapy for patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma," *Blood*, vol. 108 (10), pp. 3458–3464, 2006.

- [32] S. K. Kumar, S. V. Rajkumar, A. Dispenzieri, M. Q. Lacy, S. R. Hayman, F. K. Buadi, S. R. Zeldenrust, D. Dingli, S. J. Russell, J. A. Lust, P. R. Greipp, R. A. Kyle, and M. A. Gertz, "Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies," *Blood*, vol. 111 (5), pp. 2516–2520, 2008.
- [33] R. C. Gardner, S. J. Assinder, G. Christie, G. G. F. Mason, R. Markwell, H. Wadsworth, M. McLaughlin, R. King, M. C. Chabot-Fletcher, J. J. Breton, D. Allsop, and A. J. Rivett, "Characterization of peptidyl boronic acid inhibitors of mammalian 20S and 26S proteasomes and their inhibition of proteasomes in cultured cells," *Biochemical Journal*, 2000.
- [34] S. V. Rajkumar, P. G. Richardson, T. Hideshima, and K. C. Anderson, "Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 23 (3), pp. 630–639, 2005.
- [35] S. Kumar and S. V. Rajkumar, "Many facets of bortezomib resistance/susceptibility," *Blood*, vol. 112 (6), pp. 2177–2178, 2008.
- [36] D. Gutman, A. A. Morales, and L. H. Boise, "Acquisition of a multidrug-resistant phenotype with a proteasome inhibitor in multiple myeloma," *Leukemia*, vol. 23 (11), pp. 2181–2183, 2009.
- [37] P. Brooks, G. Fuertes, R. Z. Murray, S. Bose, E. Knecht, M. C. Rechsteiner, K. B. Hendil, K. Tanaka, J. Dysons, and A. J. Rivett, "Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells," *Biochemical Journal*, vol. 346 (Pt 1), pp. 155–161, 2000.
- [38] A. Ciechanover, "The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway," *Cell*, vol. 79 (1), pp. 13–21, 1994.
- [39] B. Tsai, Y. Ye, and T. A. Rapoport, "Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol," *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, vol. 3 (4), pp. 246–255, 2002.
- [40] K. L. Calame, K.-I. Lin, and C. Tunyaplin, "Regulatory mechanisms that determine the development and function of plasma cells," *Annual Review of Immunology*, vol. 21, pp. 205–230, 2003.
- [41] C. Patil and P. Walter, "Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 13 (3), pp. 349–355, 2001.
- [42] J. W. Brewer and J. A. Diehl, "PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97 (23), pp. 12625–12630, 2000.
- [43] H. Zinszner, M. Kuroda, X. Wang, N. Batchvarova, R. T. Lightfoot, H. Remotti, J. L. Stevens, and D. Ron, "CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum," *Genes and Development*, vol. 12 (7), pp. 982–995, 1998.
- [44] E. A. Obeng, L. M. Carlson, D. M. Gutman, W. J. Harrington Jr., K. P. Lee, and L. H. Bois, "Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells," *Blood*, vol. 107 (12), pp. 4907–4916, 2006.
- [45] J. B. Sunwoo, Z. Chen, G. Dong, N. Yeh, C. C. Bancroft, E. Sausville, J. Adams, P. Elliott, and C. V. Waes, "Novel proteasome inhibitor ps-341 inhibits activation of nuclear factor- κ b, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma," *Clinical Cancer Research*, vol. 7, p. 1419–1428, 2001.
- [46] N. Mitsiades, C. S. Mitsiades, V. P. D. Chauhan, P. G. Richardson, T. Hideshima, N. Munshi, S. P. Treon, and K. C. Anderson, "Biologic sequelae of nuclear factor- κ b blockade in multiple myeloma: therapeutic applications," *Blood*, vol. 99 (11), pp. 4079–4086, 2002.
- [47] W. An, S.-G. Hwang, J. Trepel, and M. Blagosklon, "Protease inhibitor-induced apoptosis: accumulation of wt p53, p21waf1/cip1 and induction of apoptosis are independent markers of proteasome inhibition," *Leukemia*, vol. 14 (7), pp. 1276–1283, 2000.

- [48] T. Hideshima, D. Chauhan, P. Richardson, C. Mitsiades, N. Mitsiades, T. Hayashi, N. Munshi, L. Dang, A. Castro, V. Palombella, J. Adams, and K. C. Anderson, "NF- κ B as a therapeutic target in multiple myeloma," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277 (19), pp. 16639–16647, 2002.
- [49] T. Hideshima, C. Mitsiades, M. Akiyama, T. Hayashi, D. Chauhan, P. Richardson, R. Schlossman, K. Podar, N. C. Munshi, N. Mitsiades, and K. C. Anderson, "Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor ps-341," *Blood*, vol. 101 (4), pp. 1530–1534, 2003.
- [50] T. Hideshima, P. Richardson, D. Chauhan, V. J. Palombella, P. J. Elliott, J. Adams, and K. C. Anderson, "The proteasome inhibitor ps-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells," *Cancer Research*, vol. 61 (7), pp. 3071–3076, 2001.
- [51] N. Mitsiades, C. S. Mitsiades, V. Poulaki, D. Chauhan, G. Fanourakis, X. Gu, C. Bailey, M. Joseph, T. A. Libermann, S. P. Treon, N. C. Munshi, P. G. Richardson, T. Hideshima, and K. C. Anderson, "Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99 (22), pp. 14374–14379, 2002.
- [52] L. Sedlarikova, L. Kubickova, S. Sevcikova, and R. Hajek, "Mechanism of immunomodulatory drugs in multiple myeloma," *Leukemia Research*, vol. 36 (10), pp. 1218–1224, 2012.
- [53] N. Mitsiades, C. S. Mitsiades, V. Poulaki, D. Chauhan, P. G. Richardson, T. Hideshima, N. C. Munshi, S. P. Treon, and K. C. Anderson, "Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications," *Blood*, vol. 99 (12), pp. 4525–4530, 2002.
- [54] R. J. D'Amato, M. S. Loughnan, E. Flynn, and J. Folkman, "Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 91 (9), pp. 4082–4085, 1994.
- [55] W. Xu, M. Celeridad, S. Sankar, D. R. Webb, and B. L. Bennett, "Cc-4047 promotes TH1 cell differentiation and reprograms polarized human TH2 cells by enhancing transcription factor t-bet," *Clinical Immunology*, vol. 128 (3), pp. 392–399, 2008.
- [56] L. Wu, M. Adams, T. Carter, R. Chen, G. Muller, D. Stirling, P. Schafer, and J. B. Bartlett, "Lenalidomide enhances natural killer cell and monocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-treated CD20+ tumor cells," *Clinical Cancer Research*, vol. 14 (14), pp. 4650–4657, 2008.
- [57] H. Quach, D. Ritchie, A. K. Stewart, P. Neeson, S. Harrison, M. J. Smyth, and H. M. Prince, "Mechanism of action of immunomodulatory drugs (IMiDs) in multiple myeloma," *Leukemia*, vol. 24 (1), pp. 22–32, 2010.
- [58] T. Ito, H. Ando, T. Suzuki, T. Ogura, K. Hotta, Y. Imamura, Y. Yamaguchi, and H. Handa, "Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity," *Science*, vol. 327 (5971), pp. 1345–1350, 2010.
- [59] Y. X. Zhu, E. Braggio, C.-X. Shi, L. A. Bruins, J. E. Schmidt, S. V. Wier, X.-B. Chang, C. C. Bjorklun, R. Fonseca, P. L. Bergsagel, R. Z. Orlowski, and A. K. Stewart, "Cereblon expression is required for the antimyeloma activity of lenalidomide and pomalidomide," *Blood*, vol. 118 (18), pp. 4771–4779, 2011.
- [60] A. Lopez-Girona, D. Mendy, T. Ito, K. Miller, A. K. Gandhi, J. Kang, S. Karasawa, G. Carmel, P. Jackson, M. Abbasian, A. Mahmoudi, B. Cathers, E. Rychak, S. Gaidarova, R. Chen, P. H. Schafer, H. Handa, T. O. Daniel, J. F. Evans, and R. Chopra, "Cereblon is a direct protein target for immunomodulatory and antiproliferative activities of lenalidomide and pomalidomide," *Leukemia*, vol. 26(11), p. 2326–2335, 2012.
- [61] R. Alexanian and M. Dimopoulos, "The treatment of multiple myeloma," *New England Journal of Medicine*, vol. 330 (7), no. 484–489, 1994.
- [62] R. Bataille and J.-L. Harousseau, "Multiple myeloma," *The New England Journal of Medicine*, vol. 336 (23), pp. 1657–1664, 1997.

- [63] M. Attal, J.-L. Harousseau, A.-M. Stoppa, J.-J. Sotto, J.-G. Fuzibet, J.-F. Rossi, P. Casassus, H. Maisonneuve, thierry Facon, N. Ifrah, C. Payen, and R. Bataille, "A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma.intergroupe francais du myelome." *The New England Journal of Medicine*, vol. 335 (2), pp. 91–97, 1996.
- [64] A. Palumbo, O. Sezer, R. Kyle, J. S. Miguel, R. Z. Orlowski, P. Moreau, R. Niesvizky, G. Morgan, R. Comenzo, P. Sonneveld, and et al., "International myeloma working group guidelines for the management of multiple myeloma patients ineligible for standard high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation," *Leukemia*, vol. 23 (10), pp. 1716–1730, Jun 2009.
- [65] C. Brack, M. Hirama, R. Lenhard-Schuller, and S. Tonegawa, "A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination," *Cell*, vol. 15 (1), pp. 1–14, 1978.
- [66] S. D. Wagner and M. S. Neuberger, "Somatic hypermutation of immunoglobulin genes," *Annual Review of Immunology*, vol. 14, pp. 441–457, 1996.
- [67] M. Hallek, P. L. Bergsagel, and K. C. Anderson, "Multiple myeloma: Increasing evidence for a multistep transformation process," *Blood*, vol. 91 (1), pp. 3–21, 1998.
- [68] M. W. Kuehl and L. P. Bergsagel, "Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions," *Nature Reviews Cancer*, vol. 2, no. 3, pp. 175–187, 2002.
- [69] S. Iida and R. Ueda, "Multistep tumorigenesis of multiple myeloma: its molecular delineation," *International Journal of Hematology*, vol. 77 (3), pp. 207–212, 2003.
- [70] H. Avet-Loiseau, M. Attal, P. Moreau, C. Charbonnel, F. Garban, C. Hulin, S. Leyvraz, M. Michallet, I. Yakoub-Agha, L. Garderet, G. rald Marit, L. Michaux, L. Voillat, M. Renaud, B. Grosbois, G. Guillermin, L. Benboubker, M. Monconduit, C. Thieblemont, P. Casassus, D. Caillot, A.-M. Stoppa, J.-J. Sotto, M. Wetterwald, C. Dumontet, J.-G. Fuzibet, I. Azais, V. Dorvaux, M. Zandecki, R. Bataille, S. Minvielle, J.-L. Harousseau, T. Facon, and C. Mathiot, "Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the intergroupe francophone du myélome," *Blood*, vol. 109 (8), pp. 3489–3495, 2007.
- [71] R. Fonseca, B. Barlogie, R. Bataille, C. Bastard, P. L. Bergsagel, M. Chesi, F. E. Davies, J. Drach, P. R. Greipp, I. R. Kirsch, W. M. Kuehl, J. M. Hernandez, S. Minvielle, L. M. Pilarski, J. D. S. Jr., A. K. Stewart, and H. Avet-Loiseau, "Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: A workshop report," *Cancer research*, vol. 4 (4), pp. 1546–1558., 2004.
- [72] P. L. Bergsagel and W. M. Kuehl, "Chromosome translocations in multiple myeloma," *Oncogene*, vol. 20 (40), pp. 5611–22, 2001.
- [73] M. J. Calasanz, J. C. Cigudosa, M. D. Odero, C. Ferreira, M. T. Ardanaz, A. Fraile, J. L. Carrasco, F. Solé, B. Cuesta, and A. Gullón, "Cytogenetic analysis of 280 patients with multiple myeloma and related disorders: Primary breakpoints and clinical correlations," *Genes, Chromosomes and Cancer*, vol. 18 (2), pp. 84–93, 1997.
- [74] P. L. Bergsagel, M. Chesi, E. Nardini, L. A. Brents, S. L. Kirby, and W. M. Kuehl, "Promiscuous translocations into immunoglobulin heavy chain switch regions in multiple myeloma," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 93 (24), no. 13931-6, 1996.
- [75] M. Chesi and L. P. Bergsagel, "Many multiple myelomas: Making more of the molecular mayhem," *American Society of Hematology*, vol. 1, pp. 344–353, 2011.
- [76] H. Avet-Loiseau, T. Facon, B. Grosbois, F. Magrangeas, M.-J. Rapp, J.-L. Harousseau, S. Minvielle, R. Bataille, for the Intergroupe Francophone du Myélome, "Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation," *Blood*, vol. 99 (6), pp. 2185–2191., 2002.
- [77] M. Chesi, P. L. Bergsagel, L. A. Brents, C. M. Smith, D. S. Gerhard, and W. M. Kuehl, "Dysregulation of cyclin d1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines," *Blood*, vol. 88 (2), pp. 674–681, 1996.

- [78] T. Rasmussen, K. Theilgaard-Mönch, H. Hudlebusch, M. Lodahl, H. Johnsen, and I. Dahl, "Occurrence of dysregulated oncogenes in primary plasma cells representing consecutive stages of myeloma pathogenesis: indications for different disease entities," *British Journal of Haematology*, vol. 123 (2), pp. 253–262, 2003.
- [79] J. Drach, J. Schuster, H. Nowotny, J. Angerler, F. Rosenthal, M. Fiegl, C. Rothermundt, A. Gsur, U. Jäger, R. Heinz, K. Lechner, H. Ludwig, and H. Huber, "Multiple myeloma: high incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization," *Cancer Research*, vol. 55 (17), pp. 3854–3859, 1995.
- [80] R. Königsberg, J. Ackermann, H. Kaufmann, N. Zojer, E. Urbauer, E. Krömer, U. Jäger, H. Gisslinger, S. Schreiber, R. Heinz, H. Ludwig, H. Huber, and J. Drach, "Deletions of chromosome 13q in monoclonal gammopathy of undetermined significance," *Leukemia*, vol. 14 (11), pp. 1975–1979, 2000.
- [81] H. Avet-Loiseau, J.-Y. Li, N. Morineau, T. Facon, C. Brigaudeau, J.-L. Harousseau, B. Grosbois, and R. Bataille, "Monosomy 13 is associated with the transition of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. intergroupe francophone du myélome," *Blood*, vol. 94 (8), pp. 2583–2589, 1999.
- [82] J. Claudio, E. Masih-Khan, and A. Stewart, "Insights from the gene expression profiling of multiple myeloma," *Current Hematology Reports*, vol. 3 (1), pp. 67–73, 2004.
- [83] C. Humphries, "Profiling a shape-shifter. unlocking the genetic secrets of multiple myeloma could reveal new ways to attack this killer disease." *Nature*, vol. 480 (7377), pp. 50–51, 2011.
- [84] H. Avet-Loiseau, F. Gerson, F. Magrangeas, S. Minvielle, J.-L. Harousseau, and R. Bataille, "Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors," *Blood*, vol. 98 (10), pp. 3082–3086, 2001.
- [85] J. Drach, J. Ackermann, E. F. E. Krömer, R. Schuster, H. Gisslinger, M. DeSantis, N. Zojer, M. Fiegl, S. Roka, J. Schuster, R. Heinz, H. Ludwig, and H. Huber, "Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy," *Blood*, vol. 92 (3), pp. 802–809, 1998.
- [86] T. Hideshima, P. L. Bergsagel, W. M. Kuehl, and K. C. Anderson, "Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications," *Blood*, vol. 104 (3), no. 3, pp. 607–618, 2004.
- [87] A. C. Bharti, S. Shishodia, J. M. Reuben, D. Weber, R. Alexanian, S. Raj-Vadhan, Z. Estrov, M. Talpaz, and B. B. Aggarwal, "Nuclear factor- κ b and STAT3 are constitutively active in CD138+ cells derived from multiple myeloma patients, and suppression of these transcription factors leads to apoptosis," *Blood*, vol. 103 (8), pp. 3175–3184, 2004.
- [88] C. M. Annunziata, R. E. Davis, Y. Demchenko, W. Bellamy, A. Gabrea, F. Zhan, G. Lenz, I. Hanamura, G. Wright, W. Xiao, S. D. Elaine M. Hurt, B. Tan, H. Zhao, O. Stephens, M. Santra, D. R. Williams, L. Dang, B. Barlogie, J. D. S. Jr., W. M. Kuehl, and L. M. Staudt, "Frequent engagement of the classical and alternative nf-kappab pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma," *Cancer Cell*, vol. 12(2), pp. 115–130, 2007.
- [89] Y. N. Demchenko and W. M. Kuehl, "A critical role for the NF κ B pathway in multiple myeloma," *Oncotarget*, vol. 1 (1), pp. 59–68., 2010.
- [90] P. L. Bergsagel and W. M. Kuehl, "Critical roles for immunoglobulin translocations and Cyclin D dysregulation in multiple myeloma," *Immunological Reviews*, vol. 194, pp. 96–104, 2003.
- [91] C. S. Mitsiades, N. S. Mitsiades, C. J. McMullan, V. Poulaki, A. L. Kung, F. E. Davies, G. Morgan, M. Akiyama, R. Shringarpure, N. C. Munshi, P. G. Richardson, T. Hideshima, D. Chauhan, X. Gu, C. Bailey, M. Joseph, T. A. Libermann, N. S. Rosen, , and K. C. Anderson, "Antimyeloma activity of heat shock protein-90 inhibition," *Blood*, vol. 107 (3), pp. 1092–1100, 2006.

- [92] M. Chatterjee, S. Jain, T. Stühmer, M. Andrulis, U. Ungethüm, R.-J. Kuban, H. Lorentz, K. Bommert, M. Topp, D. Krämer, H. K. Müller-Hermelink, H. Einsele, A. Greiner, and R. C. Bargou, "STAT3 and MAPK signaling maintain overexpression of heat shock proteins 90 alpha and beta in multiple myeloma cells, which critically contribute to tumor-cell survival," *Blood*, vol. 109 (2), pp. 720–728, 2007.
- [93] E. L. Davenport, A. Zeisig, L. I. Aronson, H. E. Moore, S. Hockley, D. Gonzalez, E. M. Smith, M. V. Powers, S. Y. Sharp, P. Workman, G. J. Morgan, and F. E. Davies, "Targeting heat shock protein 72 enhances HSP90 inhibitor-induced apoptosis in myeloma," *Leukemia*, vol. 24 (10), pp. 1804–1807, 2010.
- [94] T. Steinbrunn, T. Stuhmer, S. Gattenlohner, A. Rosenwald, A. Mottok, C. Unzicker, H. Einsele, M. Chatterjee, and R. C. Bargou, "Mutated Ras and constitutively activated Akt delineate distinct oncogenic pathways, which independently contribute to multiple myeloma cell survival," *Blood*, vol. 117 (6), pp. 1998–2004, 2011.
- [95] A. Zöllinger, T. Stühmer, M. Chatterjee, S. Gattenlöhner, E. Haralambieva, H.-K. Müller-Hermelink, M. Andrulis, A. Greiner, C. Wesemeier, J. C. Rath, H. Einsele, and R. C. Bargou., "Combined functional and molecular analysis of tumor cell signaling defines 2 distinct myeloma subgroups: Akt-dependent and Akt-independent multiple myeloma," *Blood*, vol. 112 (8), pp. 3403–3411, 2008.
- [96] J. Hsu, Y. Shi, S. K. S. Renner, M. Fisher, J. C. Reed, T. Franke, and A. Lichtenstein, "The Akt kinase is activated in multiple myeloma tumor cells," *Blood*, vol. 98 (9), pp. 2853–2855, 2001.
- [97] M. A. Chapman, M. S. Lawrence, J. J. Keats, K. Cibulskis, C. Sougnez, A. C. Schinzel, C. L. Harview, J.-P. Brunet, G. J. Ahmann, M. Adli, K. C. Anderson, K. G. Ardlie, D. Auclair, A. Baker, P. L. Bergsagel, B. E. Bernstein, Y. Drier, R. Fonseca, S. B. Gabriel, C. C. Hofmeister, S. Jagannath, A. J. Jakubowiak, A. Krishnan, J. Levy, T. Siefeld, S. Lonial, S. Mahan, B. Mfuko, S. Monti, L. M. Perkins, R. Onofrio, T. J. Pugh, S. V. Rajkumar, A. H. Ramos, D. S. Siegel, A. Sivachenko, A. K. Stewart, S. Trudel, R. Vij, D. Voet, W. Winckler, T. Zimmerman, J. Carpten, J. Trent, W. C. Hahn, L. A. Garraway, M. Meyerson, E. S. Lander, G. Getz, and T. R. Golub, "Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma," *Nature*, vol. 471 (7339), pp. 467–472, 2011.
- [98] E. Leich, S. Weißbach, H.-U. Klein, T. Grieb, J. Pischmarov, T. Stühmer, M. Chatterjee, T. Steinbrunn, C. Langer, M. Eilers, S. Knop, H. Einsele, R. Bargou, and A. Rosenwald, "Multiple myeloma is affected by multiple and heterogeneous somatic mutations in adhesion- and receptor tyrosine kinase signaling molecules," *Blood Cancer Journal*, vol. 3 (2), p. e102, 2013.
- [99] G. J. Morgan, B. A. Walker, and F. E. Davies, "The genetic architecture of multiple myeloma," *Nature Reviews Cancer*, vol. 12 (5), pp. 335–348, 2012.
- [100] S. Bezieau, M.-C. Devilder, H. Avet-Loiseau, M.-P. Mellerin, D. Puthier, E. Pennarun, M.-J. Rapp, J.-L. Harousseau, J.-P. Moisan, and R. Bataille, "High incidence of N- and K-Ras activating mutations in multiple myeloma and primary plasma cell leukemia at diagnosis," *Human Mutation*, vol. 18 (3), pp. 212–224, 2001.
- [101] P. Liu, T. Leong, L. Quam, D. Billadeau, N. E. Kay, P. Greipp, and R. A. Kyle, "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*, vol. 88 (7), pp. 2699–706, 1996.
- [102] H. Uchiyama, B. A. Barut, A. F. Mohrbacher, D. Chauhan, and K. C. Anderson, "Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion," *Blood*, vol. 82 (12), pp. 3712–3720, 1993.
- [103] A. Vacca, D. Ribatti, L. Roncali, G. Ranieri, G. Serio, F. Silvestris, and F. Dammacco, "Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma," *British Journal of Haematology*, vol. 87 (3), pp. 503–508, 1994.
- [104] M. Ferlin, N. Noraz, C. Hertogh, J. Brochier, N. Taylor, and B. Klein, "Insulin-like growth factor induces the survival and proliferation of myeloma cells through an

- interleukin-6-independent transduction pathway," *British Journal of Haematology*, vol. 111 (2), pp. 626–634, 2000.
- [105] K. Podar, Y.-T. Tai, F. E. Davies, S. Lentzsch, M. Sattler, T. Hideshima, B. K. Lin, D. Gupta, Y. Shima, D. Chauhan, C. Mitsiades, N. Raje, P. Richardson, and K. C. Anderson, "Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration," *Blood*, vol. 98 (2), pp. 428–435, 2001.
- [106] S. V. Rajkumar, R. A. Mesa, R. Fonseca, G. Schroeder, M. F. Plevak, A. Dispenzieri, M. Q. Lacy, J. A. Lust, T. E. Witzig, M. A. Gertz, R. A. Kyle, S. J. Russell, and P. R. Greipp, "Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma, and primary amyloidosis," *Clinical Cancer Research*, vol. 8 (7), pp. 2210–2216, 2002.
- [107] M. Rowley and B. V. Ness, "Activation of N-Ras and K-Ras induced by interleukin-6 in a myeloma cell line: implications for disease progression and therapeutic response," *Oncogene*, vol. 21 (57), pp. 8769–8775, 2002.
- [108] S. Kumar, M. A. Gertz, A. Dispenzieri, M. Q. Lacy, L. A. Wellik, R. Fonseca, J. A. Lust, T. E. Witzig, R. A. Kyle, P. R. Greipp, and et al., "Prognostic value of bone marrow angiogenesis in patients with multiple myeloma undergoing high-dose therapy," *Bone Marrow Transplant*, vol. 34 (3), pp. 235–239, 2004.
- [109] A. Neri, J. P. Murphy, L. Cro, D. Ferrero, C. Tarella, L. Baldini, and R. Dalla-Favera, "Ras oncogene mutation in multiple myeloma," *The Journal of experimental medicine*, vol. 170 (5), pp. 1715–1725, 1989.
- [110] R. Paquette, J. Berenson, A. Lichtenstein, F. McCormick, and H. Koeffler, "Oncogenes in multiple myeloma: point mutation of N-Ras," *Oncogene*, vol. 5 (11), pp. 1659–1663, 1990.
- [111] M. Portier, J. Molès, G. Mazars, P. Jeanteur, R. Bataille, B. Klein, and C. Theillet, "p53 and Ras gene mutations in multiple myeloma," *Oncogene*, vol. 7 (12), pp. 2539–2543, 1992.
- [112] M. Chatterjee, D. Hönemann, S. Lentzsch, K. Bommert, C. Sers, P. Herrmann, S. Mathas, B. Dörken, and R. C. Bargou, "In the presence of bone marrow stromal cells human multiple myeloma cells become independent of the il-6/gp130/STAT3 pathway," *Blood*, vol. 100 (9), pp. 3311–3318, 2002.
- [113] M. Chatterjee, T. Stühmer, P. Herrmann, K. Bommert, B. Dörken, and R. C. Bargou, "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*, vol. 104 (12), pp. 3712–3721, 2004.
- [114] A. T. Baines, D. Xu, and C. J. Der, "Inhibition of Ras for cancer treatment: the search continues," *Future Medicinal Chemistry*, vol. 3 (14), pp. 1787–1808, 2011.
- [115] D. Matallanas, M. Birtwistle, D. Romano, A. Zebisch, J. Rauch, A. von Kriegsheim, and W. Kolch, "Raf family kinases: Old dogs have learned new tricks," *Genes & Cancer*, vol. 2 (3), pp. 232–260, 2011.
- [116] U. R. Rapp, M. D. Goldsborough, G. E. Mark, T. I. Bonner, J. Groffen, F. H. Reynolds, and J. R. Stephenson, "Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus proc. natl acad. sci. usa vol. 80, pp. 4218-4222, july 1983 biochemistry," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 80 (14), pp. 4218–4222, 1983.
- [117] H. Chong, H. G. Vikis, and K.-L. Guan, "Mechanisms of regulating the raf kinase family," *Cellular Signalling*, vol. 15 (5), pp. 463–469, 2003.
- [118] D. T. Leicht, V. Balan, A. Kaplun, V. Singh-Gupta, L. Kaplun, M. Dobson, and G. Tzivion, "Raf kinases: Function, regulation and role in human cancer," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1773 (8), pp. 1196–1212, 2007.
- [119] C. Hagemann and U. R. Rapp, "Isotype-specific functions of Raf kinases," *Experimental Cell Research*, vol. 253 (1), p. 34–46, 1999.
- [120] D. K. Morrison and R. E. Cutler, "The complexity of Raf-1 regulation," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 9 (2), pp. 174–179, 1997.

- [121] N. Nassar, G. Horn, F. McCormick, and A. Wittinghofer, "The 2.2 Å crystal structure of the ras-binding domain of the serine/threonine kinase C-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue," *Nature*, vol. 375 (6532), pp. 554–560, 1995.
- [122] A. B. Vojtek, S. M. Hollenberg, and J. A. Cooper, "Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf," *Cell*, vol. 74 (1), pp. 205–214, 1993.
- [123] N. H. Tran, X. Wu, and J. A. Frost, "B-raf and Raf-1 are regulated by distinct autoregulatory mechanisms," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 280 (16), pp. 16244–16253, 2005.
- [124] R. Roskoski, "Raf protein-serine/threonine kinases: Structure and regulation," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 399 (3), pp. 313–317, 2010.
- [125] J. Yan, S. Roy, A. Apolloni, A. Lane, and J. F. Hancock, "Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273 (37), pp. 24052–24056, 1998.
- [126] J. K. Voice, R. L. Klemke, A. Le, and J. H. Jackson, "Four human Ras homologs differ in their abilities to activate Raf-1, induce transformation, and stimulate cell motility," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 274 (824), no. 24, pp. 17164–17170, 1999.
- [127] S. Kuroda, T. Ohtsuka, B. Yamamori, K. Fukui, K. Shimizu, and Y. Takai, "Different effects of various phospholipids on Ki-ras-, Ha-ras-, and rap1b-induced B-raf activation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271 (25), pp. 14680–14683, 1996.
- [128] A. S. Dhillon, S. Meikle, Z. Yazici, M. Eulitz, and W. Kolch, "Regulation of raf-1 activation and signalling by dephosphorylation," *EMBO Journal*, vol. 21 (1-2), pp. 64–71, 2002.
- [129] G. Tzivion, Z. Luo, and J. Avruch, "A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity," *Nature*, vol. 394 (6688), pp. 88–92, 1998.
- [130] W. Kolch, "Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interaction," *Biochemical Journal*, vol. 351(2), pp. 289–305, 2000.
- [131] M. T. Yip-Schneider, W. Miao, A. Lin, D. S. Barnard, G. Tzivion, and M. S. Marshall, "Regulation of the Raf-1 kinase domain by phosphorylation and 14-3-3 association," *Biochemical Journal*, vol. 351 (1), pp. 151–159, 2000.
- [132] J. A. Thorson, L. W. K. Yu, A. L. Hsu, N.-Y. Shih, P. R. Graves, J. W. Tanner, P. M. Allen, H. Piwnica-Worms, and A. S. Shaw, "14-3-3 proteins are required for maintenance of Raf-1 phosphorylation and kinase activity," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 18 (9), pp. 5229–5238, 1998.
- [133] D. K. Morrison, G. Heidecker, U. R. Rapp, and T. D. Copeland, "Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 268 (23), pp. 17309–17316, 1993.
- [134] H. Chong, J. Lee, and K.-L. Guan, "Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation," *EMBO Journal*, vol. 20 (14), pp. 3716–3727, 2001.
- [135] B. Diaz, D. S. Barnard, A. Filson, S. MacDonald, A. King, and M. Marshall, "Phosphorylation of Raf-1 serine 338-serine 339 is an essential regulatory event for ras-dependent activation and biological signaling," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 17 (8), p. 4509–4516, 1997.
- [136] A. J. King, H. Sun, B. Diaz, D. Barnard, W. Miao, S. Bagrodia, and M. S. Marshall, "The protein kinase PAK3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338," *Nature*, vol. 396 (6707), pp. 180–183, 1998.
- [137] A. Chaudhary, W. King, M. Mattaliano, J. Frost, B. Diaz, D. Morrison, M. Cobb, M. Marshall, and J. Brugge, "Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through PAK phosphorylation of serine 338," *Current Biology*, vol. 10 (9), pp. 551–554, 2000.
- [138] C. S. Mason, C. J. Springer, R. G. Cooper, G. Superti-Furga, C. J. Marshall, and R. Marai, "Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-raf activation," *EMBO Journal*, vol. 18 (8), pp. 2137–2148, 1999.

- [139] R. Marais, Y. Light, H. F. Paterson, C. S. Mason, and C. J. Marshall, "Differential regulation of Raf-1, A-raf, and B-raf by oncogenic Ras and tyrosine kinases," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272 (7), pp. 4378–4383, 1997.
- [140] M. K. Dougherty, J. Müller, D. A. Ritt, M. Zhou, X. Z. Zhou, T. D. Copeland, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, K. P. Lu, and D. K. Morrison, "Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation." *Molecular Cell*, vol. 17 (2), pp. 215–224, 2005.
- [141] L. K. Rushworth, A. D. Hindley, E. O'Neill, and W. Kolch, "Regulation and role of Raf-1/B-Raf and heterodimerization," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 26 (6), pp. 2262–2272, 2006.
- [142] A. S. Dhillon and W. Kolch, "Untying the regulation of the Raf-1 kinase," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 404 (1), pp. 3–9, 2002.
- [143] Z. Luo, G. Tzivion, P. J. Belshaw, D. Vavvas, M. Marshall, and J. Avruch, "Oligomerization activates C-Raf-1 through a Ras-dependent mechanism," *Nature*, vol. 383 (6596), pp. 181–185, 1996.
- [144] N. Grammatikakis, J.-H. Lin, A. Grammatikakis, P. N. Tsichlis, and B. H. Cochran, "p50cdc37 acting in concert with HSP90 is required for Raf-1 function," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 19 (3), pp. 1661–1672, 1999.
- [145] J. Zhu, V. Balan, A. Bronisz, K. Balan, H. Sun, D. T. Leicht, Z. Luo, J. Qin, J. Avruch, and G. Tzivion, "Identification of Raf-1 S471 as a novel phosphorylation site critical for Raf-1 and B-Raf kinase activities and for MEK binding," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 16 (10), pp. 4733–4744, 2005.
- [146] S. S. Sridhar, D. Hedley, and L. L. Siu, "Raf kinase as a target for anticancer therapeutics," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 4 (4), pp. 677–685, 2005.
- [147] J. Chen, K. Fujii, L. Zhang, T. Roberts, and H. Fu, "Raf-1 promotes cell survival by antagonizing apoptosis signal-regulating kinase 1 through a MEK/ERK independent mechanism," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 98 (14), pp. 7783–7788, 2001.
- [148] E. O'Neill and W. Kolch, "Raf-1 controls apoptosis by suppressing MST2/hippo," *Cell Cycle*, vol. 4 (3), pp. 365–367, 2005.
- [149] H. Wang, S. Takayama, U. R. Rapp, and J. C. Reed, "Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf-1," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 93 (14), pp. 7063–7068, 1996.
- [150] J. Troppmair and U. R. Rapp, "Raf and the road to cell survival," *Biochemical Pharmacology*, vol. 66 (8), pp. 1341–1345, 2003.
- [151] E. O'Neill, L. Rushworth, M. Baccharini, and W. Kolch, "Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1," *Science*, vol. 306 (5705), pp. 2267–2270, 2004.
- [152] S. Wang, R. N. Ghosh, and S. P. Chellappan, "Raf-1 physically interacts with RB and regulates its function: a link between mitogenic signaling and cell cycle regulation," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 18 (12), pp. 7487–7498, 1998.
- [153] K. Galaktionov, C. Jesus, and D. Beach, "Raf1 interaction with cdc25 phosphatase ties mitogenic signal transduction to cell cycle activation," *Genes and Development*, vol. 9 (9), pp. 1046–1058, 1995.
- [154] P. Janosch, A. Kieser, M. Eulitz, J. Lovric, and G. Sauer, "The Raf-1 kinase associates with vimentin kinases and regulates the structure of vimentin filaments," *FASEB Journal*, vol. 14 (13), pp. 2008–2012, 2000.
- [155] N.-O. Ku, H. Fu, and M. B. Omary, "Raf-1 activation disrupts its binding to keratins during cell stress," *The Journal of Cell Biology*, vol. 166 (4), pp. 479–485, 2004.
- [156] M. Baccharini, "Second nature: Biological functions of the Raf-1 "kinase"," *FEBS Letters*, vol. 4 (4), pp. 677–685, 2005.
- [157] G. Galabova-Kovacs, A. Kolbus, D. Matzen, K. Meissl, D. Piazzolla, C. Rubiolo, K. Steinitz, and M. Baccharini, "ERK and beyond insights from B-Raf and Raf-1 conditional knockouts," *Cell Cycle*, vol. 5 (14), pp. 1514–1518, 2006.

- [158] C. Pritchard, L. Bolin, R. Slattery, R. Murray, and M. McMahon, "Post-natal lethality and neurological and gastrointestinal defects in mice with targeted disruption of the A-Raf protein kinase gene," *Current Biology*, vol. 6 (5), pp. 614–617, 1996.
- [159] L. Wojnowski, A. M. Zimmer, T. W. Beck, H. Hahn, R. Bernal, U. R. Rapp, and A. Zimmer, "Endothelial apoptosis in B-Raf-deficient mice," *Nature Genetics*, 1997.
- [160] L. Wojnowski, L. F. Stancatoc, A. C. Larnerc, U. R. Rapp, and A. Zimmer, "Overlapping and specific functions of BRAF and CRAF-1 proto-oncogenes during mouse embryogenesis," *Mechanisms of Development*, vol. 91 (1-2), pp. 97–104, 2000.
- [161] H. Yamazaki, F. Katsuoka, H. Motohashi, J. D. Engel, and M. Yamamotoa, "Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking all three small maf proteins," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 32 (4), pp. 808–816, 2012.
- [162] S. Wiese, G. Pei, C. Karch, J. Troppmair, B. Holtmann, U. R. Rapp, and M. Sendtner, "Specific function of B-Raf in mediating survival of embryonic motoneurons and sensory neurons," *Nature Neuroscience*, vol. 4 (2), pp. 137–142, 2001.
- [163] M. Hüser, J. Lockett, A. Chiloeches, K. Mercer, M. Iwobi, S. Giblett, X.-M. Sun, J. Brown, R. Marais, and C. Pritchard, "MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function," *EMBO Journal*, vol. 20 (8), pp. 1940–1951, 2001.
- [164] C. K. Weber, J. R. Slupsky, C. Herrmann, M. Schuler, U. R. Rapp, and C. Block, "Mitogenic signaling of Ras is regulated by differential interaction with Raf isozymes space," *Oncogene*, vol. 19 (2), pp. 169–176, 2000.
- [165] A. Baljuls, T. Mueller, H. C. A. Drexler, M. Hekman, and U. R. Rapp, "Unique N-region determines low basal activity and limited inducibility of A-Raf kinase: the role of N-region in the evolutionary divergence of Raf kinase function in vertebrates," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282 (36), pp. 26575–26590, 2007.
- [166] X. Wu, S. J. Noh, G. Zhou, J. E. Dixon, and K.-L. Guan, "Selective activation of MEK1 but not MEK2 by A-Raf from epidermal growth factor-stimulated HeLa cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 271 (6), pp. 3265–3271, 1996.
- [167] Y. Wu, M. Han, and K.-L. Gua, "MEK-2, a caenorhabditis elegans map kinase kinase, functions in Ras-mediated vulval induction and other developmental events," *Genes and*, vol. 9 (6), pp. 742–755, 1995.
- [168] K. Kornfeld, K.-L. Guan, and H. R. Horvitz, "The caenorhabditis elegans gene mek-2 is required for vulval induction and encodes a protein similar to the protein kinase mek," *Genes*, vol. 9 (6), pp. 756–768, 1995.
- [169] C. A. Pritchard, M. L. Samuels, E. Bosch, and M. McMahon, "Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NiH3t3 cells," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 15 (11), p. 6430–6442, 1995.
- [170] M. Jaumot and J. F. Hancock, "Protein phosphatases 1 and 2a promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3 interactions," *Oncogene*, vol. 20 (30), pp. 3949–3958, 2001.
- [171] H. Chong and K.-L. Gua, "Regulation of Raf through phosphorylation and N terminus-C terminus interaction," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278 (38), pp. 36269–36276, 2003.
- [172] H. Sun, A. J. King, H. B. Diaz, and M. S. Marshall*, "Regulation of the protein kinase Raf-1 by oncogenic Ras through phosphatidylinositol 3-kinase, cdc42/rac and PAK," *Current Biology*, vol. 10 (5), pp. 281–284, 2000.
- [173] M. Zang, J. Gong, L. Luo, J. Zhou, X. Xiang, W. Huang, Q. Huang, X. Luo, M. Olbrot, Y. Peng, C. Chen, and Z. Luo, "Characterization of Ser338 phosphorylation for Raf-1 activation," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 46, pp. 31429–31437, Sep 2008.
- [174] D. A. Ritt, M. Zhou, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, T. D. Copeland, and D. K. Morrison, "Ck2 is a component of the KSR1 scaffold complex that contributes to Raf kinase activation," *Current Biology*, vol. 17 (2), pp. 179–184, 2007.

- [175] J. R. Fabian, I. . Daar, and D. K. Morrison, "Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 13 (11), pp. 7170–7179, 1993.
- [176] K. Xia, N. K. Mukhopadhyay, R. C. Inhorn, D. L. Barber, P. E. Rose, R. S. Lee, R. P. Narsimhan, A. D. D'Andrea, J. D. Griffin, and T. M. Roberts, "The cytokine-activated tyrosine kinase JAK2 activates Raf-1 in a p21Ras-dependent manner," vol. 93 (21), pp. 11681–11686, 1996.
- [177] B.-H. Zhang and K.-L. Guan, "Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601," *EMBO Journal*, vol. 19 (20), pp. 5429–5439, 2000.
- [178] A. von Kriegsheim, A. Pitt, G. J. Grindlay, W. Kolch, and A. S. Dhillon, "Regulation of the Raf-MEK-ERK pathway by protein phosphatase 5," *Nature Cell Biology*, vol. 8 (9), pp. 1011–1016, 2006.
- [179] S. Stewart, M. Sundaram, Y. Zhang, J. Lee, M. Han, and K.-L. Guan, "Kinase suppressor of Ras forms a multiprotein signaling complex and modulates MEK localization," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 19 (8), pp. 5523–5534, 1999.
- [180] F. Roy, G. Laberge, M. Douziech, D. Ferland-McCollough, and M. Therrien, "Ksr is a scaffold required for activation of the ERK/MAPK module," *Genes & Development*, vol. 16 (4), pp. 427–438, 2002.
- [181] W. Li, M. Han, and K.-L. Guan, "The leucine-rich repeat protein Sur-8 enhances MAP kinase activation and forms a complex with Ras and Raf," *Genes & Development*, vol. 14 (8), pp. 895–900, 2000.
- [182] M. Therrien, A. M. Wong, and G. M. Rubin, "CNK, a Raf-binding multidomain protein required for Ras signaling," *Cell*, vol. 95 (3), pp. 343–353, 1998.
- [183] M. Roy, Z. Li, and D. B. Sacks, "IQGAP1 is a scaffold for mitogen-activated protein kinase signaling," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 25 (18), pp. 7940–7952, 2005.
- [184] K. Rajalingam and T. Rudel, "Ras-Raf signaling needs prohibitin," *Cell Cycle*, vol. 4 (11), pp. 1503–1505, 2005.
- [185] K. Yeung, T. Seitz, S. Li, P. Janosch, B. McFerran, C. Kaiser, F. Fee, K. D. Katsanakis, D. W. Rose, H. Mischak, J. M. Sedivy, and W. Kolch, "Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP," *Nature*, vol. 401 (6749), pp. 173–177, 1999.
- [186] T. Wakioka, A. Sasaki, R. Kato, T. Shouda, A. Matsumoto, K. Miyoshi, M. Tsuneoka, S. Komiya, R. Baron, and A. Yoshimura, "Spred is a Sprouty-related suppressor of Ras signalling," *Nature*, vol. 412 (6847), pp. 647–651, 2001.
- [187] H. Davies, G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. C. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F. Seigler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton, and P. A. Futreal, "Mutations of the braf gene in human cancer," *Nature*, vol. 417 (6892), pp. 949–954, 2002.
- [188] C. Wellbrock, L. Ogilvie, D. Hedley, and et al, "V599EB-Raf is an oncogene in melanocytes," *Cancer Research*, vol. 64 (7), pp. 2338–2342, 2004.
- [189] M. J. Garnett and R. Marais, "Guilty as charged b-raf and is a human oncogene," *Cancer Cell*, vol. 6 (4), pp. 313–319, 2004.
- [190] N. Thomas, "Braf somatic mutations in malignant melanoma and melanocytic naevi," *Melanoma Research*, vol. 16 (2), pp. 97–103, 2006.
- [191] M. J. Garnett, S. Rana, H. Paterson, D. Barford, and R. Marais, "Wild-type and mutant B-Raf activate C-Raf through distinct mechanisms involving heterodimerization," *Molecular Cell*, vol. 20 (6), pp. 963–969, 2005.

- [192] V. Emuss, M. Garnett, C. Mason, T. C. G. Project, and R. Marais, "Mutations of C-Raf are rare in human cancer because C-Raf has a low basal kinase activity compared with B-Raf," *Cancer Research*, vol. 65 (21), pp. 9719–9726, 2005.
- [193] J. W. Lee, Y. H. Soung, S. Y. Kim, W. S. Park, S. W. Nam, W. S. Min, S. H. Kim, J. Y. Lee, N. J. Yoo, and S. H. Lee, "Mutational analysis of the araf gene in human cancers," *APMIS*, vol. 113 (1), pp. 54–57, 2005.
- [194] K. Fransén, M. Klintenäs, A. Österström, J. Dimberg, H.-J. Monstein, and P. Söderkvist, "Mutation analysis of the braf, araf and raf-1 genes in human colorectal adenocarcinomas," *Carcinogenesis*, vol. 25 (4), pp. 527–533, 2004.
- [195] T. L. Chan, W. Zhao, C. G. Project, S. Y. Leung, and S. T. Yuen, "Braf and Kras mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas," *Cancer Research*, vol. 63 (16), pp. 4878–4881, 2003.
- [196] A. A. Saetta, P. Papanastasiou, N. V. Michalopoulos, F. Gigelou, P. Korkolopoulou, T. Bei, and E. Patsouris, "Mutational analysis of BRaf in gallbladder carcinomas in association with K-Ras and p53 mutations and microsatellite instability," *Virchows Archiv*, vol. 445 (2), pp. 179–182, 2004.
- [197] H. Rajagopalan, A. Bardelli, C. Lengauer, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, and V. E. Velculescu, "Tumorigenesis: Raf/Ras oncogenes and mismatch-repair status," *Nature*, vol. 418 (6901), p. 934, 2002.
- [198] K. Mercer, S. Giblett, S. Green, D. Lloyd, S. D. Dias, M. Plumb, R. Marais, and C. Pritchard, "Expression of endogenous oncogenic V600E B-Raf induces proliferation and developmental defects in mice and transformation of primary fibroblasts," *Cancer Research*, vol. 65 (24), pp. 11493–11500, 2005.
- [199] P. M. Pollock, U. L. Harper, K. S. Hansen, L. M. Yudt, M. Stark, C. M. Robbins, T. Y. Moses, G. Hostetter, U. Wagner, J. Kakareka, and et al., "High frequency of Braf mutations in nevi," *Nature Genetics*, vol. 33 (1), pp. 19–20, 2002.
- [200] E. E. Patton, H. R. Widlund, J. L. Kutok, K. R. Kopani, J. F. Amatruda, R. D. Murphey, S. Berghmans, E. A. Mayhall, D. Traver, C. D. Fletcher, J. C. Aster, S. R. Granter, A. T. Look, C. Lee, D. E. Fisher, and L. I. Zon, "Braf mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma," *Current Biology*, vol. 15 (3), pp. 249–254, 2005.
- [201] R. Houben, J. C. Becker, A. Kappel, P. Terheyden, E.-B. Brocker, R. Goetz, and U. R. Rapp, "Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis," *Journal of Carcinogenesis*, vol. 3 (1), p. 6, 2004.
- [202] J. Dong, R. G. Phelps, R. Qiao, S. Yao, O. Benard, Z. Ronai, and S. A. Aaronson, "Braf oncogenic mutations correlate with progression rather than initiation of human melanoma," *Cancer Research*, vol. 63 (14), pp. 3883–3885, 2003.
- [203] U. R. Rapp, J. Fesnterle, S. Albert, and R. Götz, "Raf kinases in lung tumor development," *Advances in Enzyme Regulation*, vol. 43 (1), pp. 183–195, 2003.
- [204] J. Rauch, E. O'Neill, B. Mack, C. Matthias, M. Munz, W. Kolch, and O. Gires, "Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H blocks MST2-mediated apoptosis in cancer cells by regulating a-raf transcription," *Cancer Research*, vol. 70 (4), pp. 1679–1688, 2010.
- [205] V. Khazak, I. Astsaturov, I. G. Serebriiskii, and E. A. Golemis, "Selective Raf inhibition in cancer therapy," *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, vol. 11 (12), pp. 1587–1609, 2007.
- [206] S. M. Storm and U. R. Rapp, "Oncogene activation: c-raf-1 gene mutations in experimental and naturally occurring tumors," *Toxicology Letters*, vol. 67 (1-3), pp. 201–210, 1993.
- [207] A. Zebisch, P. B. Staber, A. Delavar, C. Bodner, K. Hiden, K. Fischereeder, M. Janakiraman, W. Linkesch, H. W. Auner, W. Emberger, C. Windpassinger, M. G. Schimek, G. Hoefler, J. Troppmair, and H. Sill, "Two transforming c-raf germ-line mutations identified in patients with therapy-related acute myeloid leukemia," *Cancer Research*, vol. 66 (7), pp. 3401–3408, 2006.

- [208] R. Schreck and U. R. Rapp, "Raf kinases: Oncogenesis and drug discovery," *International Journal of Cancer*, vol. 119 (10), pp. 2261–2271, 2006.
- [209] W. Kolch, G. Heidecker, P. Lloyd, and U. R. Rapp, "Raf-1 protein kinase is required for growth of induced NiH/3t3 cells," *Nature*, vol. 349 (6308), pp. 426–428, 1991.
- [210] F. McPhillips, P. Mullen, K. G. MacLeod, J. M. Sewell, B. P. Monia, D. A. Cameron, J. F. Smyth, and S. P. Langdon, "Raf-1 is the predominant Raf isoform that mediates growth factor-stimulated growth in ovarian cancer cells," *Carcinogenesis*, vol. 27 (4), pp. 729–739, 2006.
- [211] A. Cuadrado, J. Bruder, M. Heidarani, H. App, U. Rapp, and S. Aaronson, "H-ras and Raf-1 cooperate in transformation of NiH3t3 fibroblasts," *Oncogene*, vol. 8 (9), pp. 2443–2448, 1993.
- [212] A. C. Porter and R. R. Vaillancourt, "Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis," *Oncogene*, vol. 17 (11), pp. 1343–1352, 1998.
- [213] J. Yu, H. Deshmukh, R. J. Gutmann, R. J. Emnett, F. J. Rodriguez, M. A. Watson, R. Nagarajan, and D. H. Gutmann, "Alterations of Braf and Hipk2 loci predominate in sporadic pilocytic astrocytoma," *Neurology*, vol. 73 (19), pp. 1526–1531, 2009.
- [214] D. T. Jones, S. Kocialkowski, L. Liu, D. M. Pearson, L. M. Bäcklund, K. Ichimura, and V. P. Collins, "Tandem duplication producing a novel oncogenic braf fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas," *Cancer Research*, vol. 68 (21), pp. 8673–8677, 2008.
- [215] D. Jones, S. Kocialkowski, L. Liu, D. Pearson, K. Ichimura, and V. Collin, "Oncogenic raf1 rearrangement and a novel braf mutation as alternatives to kiaa1549:braf fusion in activating the MAPK pathway in pilocytic astrocytoma," *Oncogene*, vol. 28 (20), pp. 2119–2123, 2009.
- [216] R. Ciampi, J. A. Knauf, R. Kerler, M. Gandhi, Z. Zhu, M. N. Nikiforova, H. M. Rabes, J. A. Fagin, and Y. E. Nikiforov, "Oncogenic AKAP9-braf fusion is a novel mechanism of mapk pathway activation in thyroid cancer," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 115 (1), pp. 94–101, 2005.
- [217] N. Palanisamy, B. Ateeq, S. Kalyana-Sundaram, D. Pflueger, K. Ramnarayanan, S. Shankar, B. Han, Q. Cao, X. Cao, K. Suleman, C. Kumar-Sinha, S. M. Dhanasekaran, Y. bei Chen, R. Esgueva, S. Banerjee, C. J. LaFargue, J. Siddiqui, F. Demichelis, P. Moeller, T. A. Bismar, R. Kuefer, D. R. Fullen, T. M. Johnson, J. K. Greenson, T. J. Giordano, P. Tan, S. A. Tomlins, S. Varambally, M. A. Rubin, C. A. Maher, and A. M. Chinnaiyan, "Rearrangements of the Raf kinase pathway in prostate cancer, gastric cancer and melanoma," *Nature Medicine*, vol. 16 (7), pp. 793–798, 2010.
- [218] J. L. Maldonado, J. Fridlyand, H. Patel, A. N. Jain, K. Busam, T. Kageshita, T. Ono, D. G. Albertson, D. Pinkel, and B. C. Bastian, "Determinants of braf mutations in primary melanomas," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 95 (24), pp. 1878–1890, 2003.
- [219] G. S. Inamdara, S. V. Madhunapantula, and G. P. Robertson, "Targeting the MAPK pathway in melanoma: Why some approaches succeed and other fail," *Biochemical Pharmacology*, vol. 80 (5), pp. 624–637, 2010.
- [220] D. S. R. R. Seeber, "Raf kinase inhibitors in oncology," *Oncology Research and Treatment*, vol. 28 (2), pp. 101–107, 2005.
- [221] N. Thompson and J. Lyons, "Recent progress in targeting the RAF/MEK/ERK pathway with inhibitors in cancer drug discovery," *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 5 (4), pp. 350–356, 2005.
- [222] B. A. Walker, C. P. Wardell, L. Melchor, S. Hulkki, N. E. Potter, D. C. Johnson, K. Fenwick, I. Kozarewa, D. Gonzalez, C. J. Lord, A. Ashworth, F. E. Davies, and G. J. Morgan, "Intraclonal heterogeneity and distinct molecular mechanisms characterize the development of t(4;14) and t(11;14) myeloma," *Blood*, vol. 120 (5), pp. 1077–1086, 2012.

- [223] E. O'Donnell and N. S. Raje, "Targeting BRAf in multiple myeloma," *Cancer Discovery*, vol. 3 (8), pp. 840–842, 2013.
- [224] M. Andrulis, N. Lehnert, D. Capper, R. Penzel, C. Heining, J. Huellein, T. Zenz, A. von Deimling, P. Schirmacher, A. D. Ho, H. Goldschmidt, K. Neben, and M. S. Raab, "Targeting the BRAF V600E mutation in multiple myeloma," *Cancer Discovery*, vol. 3 (8), pp. 862–869, 2013.
- [225] A. Bolomsky, H. Ludwig, and N. Zojer, "Vemurafenib inhibits myeloma cell growth independent of BRAF V600E mutations, potentiates the activity of established anti-myeloma drugs, but impairs osteogenesis via an HGF autocrine loop in bone marrow stromal cells," *Blood*, vol. 122 (21), p. 5363, 2013.
- [226] F. Zhan, J. Hardin, B. Kordsmeier, K. Bumm, M. Zheng, E. Tian, R. Sanderson, Y. Yang, C. Wilson, M. Zangari, E. Anaissie, C. Morris, F. Muwalla, F. van Rhee, A. Fassas, J. Crowley, G. Tricot, B. Barlogie, and J. John Shaughnessy, "Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells," *Blood*, vol. 99 (5), pp. 1745–1757, 2002.
- [227] H. Jernberg-Wiklund and K. Nilsson, "Multiple myeloma cell lines," *Human Cell Cultures Vol III*, vol. Kluwer Academic Publishers, pp. 81–155, 2000.
- [228] T. Hideshima, C. Mitsiades, G. Tonon, P. G. Richardson, and K. C. Anderson, "Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets," *Nature Reviews Cancer*, vol. 7 (8), pp. 585–598, 2007.
- [229] K. Bhatt, R. Hu, L. Spofford, and A. Aplin, "Mutant B-Raf signaling and Cyclin D1 regulate cks1/S-phase kinase-associated protein 2-mediated degradation of p27kip1 in human melanoma cells," *Oncogene*, vol. 26 (7), pp. 1056–1066, 2007.
- [230] S. M. Kumar, H. Yu, R. Edwards, L. Chen, S. Kazianis, P. Brafford, G. Acs, M. Herlyn, and X. Xu, "Mutant V600E BRAF increases hypoxia inducible factor-1 α expression in melanoma," *Cancer Research*, vol. 67 (7), pp. 3177–3184, 2007.
- [231] S. Yasuda, M. Kai, S. Ichi Imai, K. Takeishi, A. Taketomi, M. Toyota, H. Kanoh, and F. Sakane, "Diacylglycerol kinase ϵ augments C-Raf activity and B-Raf/C-Raf heterodimerization," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284 (43), pp. 29559–29570, 2009.
- [232] C. Crews, A. Alessandrini, and R. Erikson, "The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product," *Science*, vol. 258 (5081), pp. 478–480, 1992.
- [233] J. E. Ferrell and R. R. Bhat, "Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272 (30), pp. 19008–19016, 1997.
- [234] Y.-T. Tai, M. Fulciniti, T. Hideshima, W. Song, M. Leiba, X.-F. Li, M. Rumizen, P. Burger, A. Morrison, K. Podar, D. Chauhan, P. Tassone, P. Richardson, N. C. Munshi, I. M. Ghobrial, and K. C. Anderson, "Targeting MEK induces myeloma-cell cytotoxicity and inhibits osteoclastogenesis," *Blood*, vol. 110 (5), pp. 1656–1663, 2007.
- [235] T. Steinbrunn, T. Stühmer, C. Sayehli, M. Chatterjee, H. Einsele, and R. C. Bargou, "Combined targeting of MEK/MAPK and PI3K/Akt signalling in multiple myeloma," *British Journal of Haematology*, vol. 159 (4), pp. 430–440, 2012.
- [236] F. Pene, Y.-E. Claessens, O. Muller, F. Viguié, P. Mayeux, F. Dreyfus, C. Lacombe, and D. Boscary, "Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/p70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma," *Oncogene*, vol. 21 (43), pp. 6587–6597, 2002.
- [237] I. Sánchez-Hernández, P. Baquero, L. Calleros, and A. Chilocheches, "Dual inhibition of (V600E)BRAF and the PI3K/Akt/mTOR pathway cooperates to induce apoptosis in melanoma cells through a MEK-independent mechanism," *Cancer Letters*, vol. 314 (2), pp. 244–255, 2012.
- [238] E. Kastiris, A. D. Wechalekar, M. A. Dimopoulos, G. Merlini, P. N. Hawkins, V. Perfetti, J. D. Gillmore, and G. Palladini, "Bortezomib with or without

- dexamethasone in primary systemic (light chain) amyloidosis,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 28 (6), pp. 1031–1037, 2010.
- [239] D. E. Reece, V. Santhorawala, U. Hegenbart, G. Merlini, G. Palladini, J.-P. Fermand, R. A. Vescio, X. Liu, Y. A. Elsayed, A. Cakana, and R. L. Comenzo, “Weekly and twice-weekly bortezomib in patients with systemic al amyloidosis: results of a phase 1 dose-escalation study,” *Blood*, vol. 114 (8), pp. 1489–1497, 2009.
- [240] J. J. Keats, R. Fonseca, M. Chesi, R. Schop, A. Baker, W.-J. Chng, S. V. Wier, R. Tiedemann, C.-X. Shi, M. Sebag, E. Braggio, T. Henry, Y.-X. Zhu, H. Fogle, T. Price-Troska, G. Ahmann, C. Mancini, L. A. Brents, S. Kumar, P. Greipp, A. Dispenzieri, B. Bryant, G. Mulligan, L. Bruhn, M. Barrett, R. Valdez, J. Trent, K. Stewart, J. Carpten, and P. L. Bergsagel, “Promiscuous mutations activate the noncanonical NF- κ B pathway in multiple myeloma.” *Cancer Cell*, vol. 12 (2), pp. 131–144, 2007.
- [241] A. Neri, L. Baldini, Baldini, D. Trecca, L. Cro, E. Polli, and A. T. Maiolo, “p53 gene mutations in multiple myeloma are associated with advanced forms of malignancy,” *Blood*, vol. 81 (1), pp. 128–135, 1993.
- [242] D. T. Leicht, V. Balan, J. Zhu, A. Kaplun, A. Bronisz, A. Rana, and G. Tzivion, “Mek-1 activates C-Raf through a ras-independent mechanism,” *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1833 (5), pp. 976–986, 2013.
- [243] L. S. Callans, H. Naama, M. Khandelwal, R. Plotkin, and L. Jardines, “Raf-1 protein expression in human breast cancer cells,” *Annals of Surgical Oncology*, vol. 2 (1), pp. 38–42, 1995.
- [244] J. A. Gollob, S. Wilhelm, C. Carter, and S. L. Kelley, “Role of Raf kinase in cancer: Therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway,” *Seminars in Oncology*, vol. 33 (4), pp. 392–406, 2006.
- [245] H. Oka, Y. Chatani, R. Hoshino, O. Ogawa, Y. Takechi, T. Terachi, Y. Okada, M. Kawauchi, M. Kohno, and O. Yoshida, “Constitutive activation of mitogen-activated protein (MAP) kinases in human renal cell carcinoma,” *Cancer Research*, vol. 55 (18), pp. 4182–4187, 1995.
- [246] Y. H. Hwang, J. Y. Choi, S. Kim, E. S. Chung, T. Kim, S. S. Koh, B. Lee, S. H. Bae, J. Kim, and Y. M. Park, “Over-expression of c-raf-1 proto-oncogene in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma,” vol. 29 (2), pp. 113–121, 2004.
- [247] A. Mielgo, L. Seguin, M. Huang, M. F. Camargo, S. Anand, A. Franovic, S. M. Weis, S. J. Advani, E. A. Murphy, and D. A. Cheresch, “A MEK-independent role for CRaf in mitosis and tumor progression,” *Nature Medicine*, vol. 17 (12), pp. 1641–1645, 2011.
- [248] M. S. Brose, P. Volpe, M. Feldman, M. Kumar, I. Rishi, R. Gerrero, E. Einhorn, M. Herlyn, J. Minna, A. Nicholson, J. A. Roth, S. M. Albelda, H. Davies, C. Cox, G. Brignell, P. Stephens, P. A. Futreal, R. Wooster, M. R. Stratton, and B. L. Weber, “Raf and Ras mutations in human lung cancer and melanoma,” *Cancer Research*, vol. 62 (23), pp. 6997–7000, 2002.
- [249] S. R. Hingorani, M. A. Jacobetz, G. P. Robertson, M. Herlyn, and D. A. Tuveson, “Suppression of BRaf(V599E) in human melanoma abrogates transformation,” *Cancer Research*, vol. 63 (17), pp. 5198–5202, 2003.
- [250] A. Sharma, N. R. Trivedi, M. A. Zimmerman, D. A. Tuveson, C. D. Smith, and G. P. Robertson, “Mutant V599EB-Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors,” *Cancer Research*, vol. 65 (6), pp. 2412–2421, 2005.
- [251] K. P. Hoeflich, D. C. Gray, M. T. Eby, J. Y. Tien, L. Wong, J. Bower, A. Gogineni, J. Zha, M. J. Cole, H. M. Stern, L. J. Murray, D. P. Davis, and S. Seshagiri, “Oncogenic BRaf is required for tumor growth and maintenance in melanoma models,” *Cancer Research*, vol. 66 (2), pp. 999–1006, 2006.
- [252] G. Maurer, B. Tarkowski, and M. Baccharini, “Raf kinases in cancer—roles and therapeutic opportunities,” *Oncogene*, vol. 30 (32), pp. 3477–3488, 2011.
- [253] C. Bokemeyer, E. V. Cutsem, P. Rougier, F. Ciardiello, S. Heeger, M. Schlichting, I. Celik, and C.-H. Köhne, “Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for K-Ras wild-type metastatic colorectal cancer: Pooled analysis of the

- crystal and opus randomised clinical trials,” *European Journal of Cancer*, vol. 48(10), pp. 1466–1475, 2012.
- [254] M. Mikula, M. Schreiber, Z. Husak, L. Kucerova, J. R uth, R. Wieser, K. Zatloukal, H. Beug, E. F. Wagner, and M. Baccharini, “Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene,” *EMBO Journal*, vol. 20 (8), pp. 1952–1962, 2001.
- [255] K. Mercer, S. Giblett, A. Oakden, J. Brown, R. Marais, and C. Pritchard, “A-Raf and Raf-1 work together to influence transient ERK phosphorylation and G1/S cell cycle progression,” *Oncogene*, vol. 24 (33), pp. 5207–5217, 2005.
- [256] D. W. Rasco, A. J. Olszanski, A. Patnaik, G. Espino, R. Neuwirth, S. Faucette, M. Bargfrede, E. A. Gangolli, R. M. Walker, M. Kneissl, and V. Bozon, “MLN2480, an investigational oral pan-Raf kinase inhibitor, in patients (pts) with relapsed or refractory solid tumors: Phase 1 study,” *Journal of Clinical Oncology*, vol. 31 (15), p. suppl 2547, 2013.
- [257] A. J. King, D. R. Patrick, R. S. Batorsky, M. L. Ho, H. T. Do, S. Y. Zhang, R. Kumar, D. W. Rusnak, A. K. Takle, D. M. Wilson, E. Hugger, L. Wang, F. Karreth, J. C. Lougheed, J. Lee, D. Chau, T. J. Stout, E. W. May, C. M. Rominger, M. D. Schaber, L. Luo, A. S. Lakdawala, J. L. Adams, R. G. Contractor, K. S. Smalley, M. Herlyn, M. M. Morrissey, D. A. Tuveson, and P. S. Huang, “Demonstration of a genetic therapeutic index for tumors expressing oncogenic BRaf by the kinase inhibitor SB,” *Cancer Research*, vol. 66 (23), pp. 11100–11105, 2006.
- [258] S. J. Heidorn, C. Milagre, S. Whittaker, A. Nourry, I. Niculescu-Duvas, N. Dhomen, J. Hussain, J. S. Reis-Filho, C. J. Springer, C. Pritchard, and R. Marais, “Kinase-dead BRaf and oncogenic Ras cooperate to drive tumor progression through CRaf,” *Cell*, vol. 140 (2), pp. 209–221, 2010.
- [259] P. I. Poulikakos, C. Zhang, G. Bollag, K. M. Shokat, and N. Rosen, “Raf inhibitors transactivate Raf dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRaf,” *Nature*, vol. 464 (7287), pp. 427–430, 2010.
- [260] G. Hatzivassiliou, K. Song, I. Yen, B. J. Brandhuber, D. J. Anderson, R. Alvarado, M. J. C. Ludlam, D. Stokoe, S. L. Gloor, G. Vigers, T. Morales, I. Aliagas, B. Liu, S. Sideris, K. P. Hoeflich, B. S. Jaiswal, S. Seshagiri, H. Koeppen, M. Belvin, L. S. Friedman, and S. Malek, “Raf inhibitors prime wild-type Raf to activate the MAPK pathway and enhance growth,” *Nature*, vol. 464 (7287), pp. 431–435, 2010.
- [261] P. T. Wan, M. J. Garnett, S. Roe, S. Lee, D. Niculescu-Duvaz, V. M. Good, C. Jones, C. J. Marshall, C. J. Springer, and D. Barford, “Mechanism of activation of the Raf-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-Raf,” *Cell*, vol. 116 (6), pp. 855–867, 2004.
- [262] G. Thiel, M. Ekici, and O. G. R ossler, “Regulation of cellular proliferation, differentiation and cell death by activated Raf,” *Cell Communication and Signaling*, vol. 7 (8), 2009.
- [263] S. G. Ward and P. Finan, “Isoform-specific phosphoinositide 3-kinase inhibitors as therapeutic agents,” *Current Opinion in Pharmacology*, vol. 3 (4), pp. 426–434, 2003.
- [264] L. C. Cantley, “The phosphoinositide 3-kinase pathway,” *Science*, vol. 296 (5573), pp. 1655–1657, 2002.
- [265] S. R. Datta, A. Brunet, and M. E. Greenberg, “Cellular survival: a play in three akts,” *Genes and Development*, vol. 13 (22), pp. 2905–2927, 1999.
- [266] J. A. Engelman, J. Luo, and L. C. Cantley, “The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism,” *Nature Reviews. Genetics*, vol. 7 (8), pp. 606–619, 2006.
- [267] D. D. Sarbassov, D. A. Guertin, S. M. Ali, and D. M. Sabatini, “Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR complex,” *Science*, vol. 307 (5712), pp. 1098–1101, 2005.
- [268] P. Blume-Jensen and T. Hunter, “Oncogenic kinase signalling,” *Nature*, vol. 411 (6835), pp. 355–365, 2001.

- [269] B. T. Hennessy, D. L. Smith, P. T. Ram, Y. Lu, and G. B. Mills, "Exploiting the PI3K/Akt pathway for cancer drug discovery," *Nature Reviews. Drug Discovery*, vol. 4 (12), pp. 988–1004, 2005.
- [270] S. Faivre, G. Kroemer, and E. Raymond, "Current development of mTOR inhibitors as anticancer agents," *Nature Reviews. Drug Discovery*, vol. 5 (8), pp. 671–688, 2006.
- [271] J. Li, J. Zhu, B. Cao, and X. Mao, "The mTOR signaling pathway is an emerging therapeutic target in multiple myeloma," *Current Pharmaceutical Design*, vol. 20 (1), pp. 125–135, 2014.
- [272] T. Guglielmelli, S. Cappia, E. Giugliano, R. Merlini, S. Mussino, E. Bacillo, E. Bracco, M. Papotti, and G. Saglio, "Activation of the mtor signaling pathway in multiple myeloma patients and its prognostic significance," *ASH Annual Meeting Abstracts*, vol. 110 (11), p. 1493, 2007.
- [273] D. M. Sabatini, "mTOR and cancer: insights into a complex relationship," *Nature Reviews Cancer*, vol. 6 (9), pp. 729–734, 2006.
- [274] K. Hara, Y. Maruki, X. Long, K. ichi Yoshino, N. Oshiro, S. Hidayat, C. Tokunaga, J. Avruch, and K. Yonezawa, "Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action," *Cell*, vol. 110 (2), pp. 177–189, 2002.
- [275] D.-H. Kim, D. D. Sarbassov, S. M. Ali, J. E. King, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and D. M. Sabatini, "mTOR interacts with Raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery," *Cell*, vol. 110 (2), pp. 163–175, 2002.
- [276] E. V. Haar, S. il Lee, S. Bandhakavi, T. J. Griffin, and D.-H. Kim, "Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate Pras40," *Nature Cell Biology*, vol. 9 (3), pp. 316–323, 2007.
- [277] A. R. Tee and J. Blenis, "mTOR, translational control and human disease," *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 16 (1), pp. 29–37, 2005.
- [278] D. D. Sarbassov, S. M. Ali, D.-H. Kim, D. A. Guertin, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and D. M. Sabatini, "Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and Raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton," *Current Biology*, vol. 14 (14), pp. 1296–1302, 2004.
- [279] M. A. Frias, C. C. Thoreen, J. D. Jaffe, W. Schroder, T. Sculley, S. A. Carr, and D. M. Sabatini, "Msin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s," *Current Biology*, vol. 16 (18), pp. 1865–1870, 2006.
- [280] E. Jacinto, V. Facchinetti, D. Liu, N. Soto, S. Wei, S. Y. Jung, Q. Huang, J. Qin, and B. Su, "Sin1/mip1 maintains Rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity," *Cell*, vol. 127 (1), pp. 125–137, 2006.
- [281] Q. Yang, K. Inoki, T. Ikenoue, and K.-L. Guan, "Identification of Sin1 as an essential TORC2 component required for complex formation and kinase activity," *Genes & Development*, vol. 20 (20), pp. 2820–2832, 2006.
- [282] L. R. Pearce, X. Huang, J. Boudeau, R. Pawlowski, S. Wullschleger, M. Deak, A. F. M. Ibrahim, R. Gourlay, M. A. Magnuson, and D. R. Alessi, "Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2," *Biochemical Journal*, vol. 405 (3), pp. 513–522, 2007.
- [283] S. W. Y. Cheng, L. G. D. Fryer, D. Carling, and P. R. Shepherd, "Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279 (16), pp. 15719–15722, 2004.
- [284] J. Copp, G. Manning, and T. Hunter, "TORC-specific phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR): Phospho-Ser2481 is a marker for intact mTOR signaling complex 2," *Cancer Research*, vol. 69 (5), no. 5, pp. 1821–1827, 2009.
- [285] N. Sonnenberg and A.-C. Gingras, "The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 10 (2), pp. 268–275, 1998.
- [286] I. B. Rosenwald, R. Kaspar, D. Rousseau, L. Gehrke, P. Leboulch, J.-J. Chen, E. V. Schmidt, N. Sonnenberg, and I. M. London, "Eukaryotic translation initiation factor 4e regulates expression of Cyclin D1 at transcriptional and post-transcriptional levels," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 270 (36), pp. 21176–21180, 1995.

- [287] N. Hay and N. Sonenberg, "Upstream and downstream of mTOR," *Genes & Development*, vol. 18 (16), pp. 1926–1945, 2004.
- [288] P. E. Burnett, R. K. Barrow, N. A. Cohen, S. H. Snyder, and D. M. Sabatini, "Raft1 phosphorylation of the translational regulators p70 s6 kinase and 4E-Bp1," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 95 (4), p. 1432–1437, 1998.
- [289] M. Saitoh, N. Pullen, P. Brennan, D. Cantrell, P. B. Dennis, and G. Thomas, "Regulation of an activated S6 kinase 1 variant reveals a novel mammalian target of rapamycin phosphorylation site," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277 (22), pp. 20104–20112, 2002.
- [290] Q.-P. Weng, M. Kozlowski, C. Belham, A. Zhang, M. J. Comb, and J. Avruch, "Regulation of the p70 S6 kinase by phosphorylation in vivo. Analysis using site-specific anti-phosphopeptide antibodies," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273 (26), pp. 16621–16629, 1998.
- [291] N. Pullen and G. Thomas, "The modular phosphorylation and activation of p70S6K," *FEBS Letters*, vol. 410 (1), pp. 78–82, 1997.
- [292] N. Pullen, P. B. Dennis, M. Andjelkovic, A. Dufner, S. C. Kozma, B. A. Hemmings, and G. Thomas, "Phosphorylation and activation of p70S6K by PDK1," *Science*, vol. 279 (5351), pp. 707–710, 1998.
- [293] D. R. Alessi, M. T. Kozlowski, Q.-P. Weng, N. Morrice, and J. Avruch, "3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 Kinase in vivo and in vitro," vol. 8 (2), pp. 69–81, 1998.
- [294] K. Yu, C. Shi, L. Toral-Barza, J. Lucas, B. Shor, J. E. Kim, W.-G. Zhang, R. Mahoney, C. Gaydos, L. Tardio, and et al., "Beyond rapalog therapy: Preclinical pharmacology and antitumor activity of wye-125132, an ATP-competitive and specific inhibitor of mTORC1 and mTORC2," *Cancer Research*, vol. 70 (2), pp. 621–631, 2010.
- [295] Y. Shi, J. Hsin Hsu, L. Hu, J. Gera, and A. Lichtenstein, "Signal pathways involved in activation of p70S6K and phosphorylation of 4E-BP1 following exposure of multiple myeloma tumor cells to interleukin-6," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277 (18), pp. 15712–15720, 2002.
- [296] J. A. Diehl, M. Cheng, M. F. Roussel, and C. J. Sherr, "Glycogen synthase kinase-3beta regulates Cyclin D1 proteolysis and subcellular localization," *Genes and Development*, vol. 12 (22), pp. 3499–3511, 1998.
- [297] A. Parrales, E. López, and A. López-Colomé, "Thrombin activation of PI3K/PDK1/Akt signaling promotes Cyclin D1 upregulation and RPE cell proliferation," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1813 (10), p. 1758–1766, 2011.
- [298] D. A. Cross, D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovic, and B. A. Hemmings, "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B," *Nature*, vol. 378 (6559), pp. 785–789, 1995.
- [299] J. Liang and J. M. Slingerland, "Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression," *Cell Cycle*, vol. 2 (4), pp. 339–345, 2003.
- [300] A. Kida, K. Kakihana, S. Kotani, T. Kurosu, and O. Miura, "Glycogen synthase kinase-3beta and p38 phosphorylate Cyclin D2 on Thr280 to trigger its ubiquitin/proteasome-dependent degradation in hematopoietic cells," *Oncogene*, vol. 26 (46), pp. 6630–6640, 2007.
- [301] E. Athanasiou, V. Kaloutsis, V. Kotoula, P. Hytiroglou, I. Kostopoulos, C. Zervas, P. Kalogiannidis, M. Athanasios Fassas, J. I. Christakis, and C. S. Papadimitriou, "Cyclin D1 overexpression in multiple myeloma. A morphologic, immunohistochemical, and in situ hybridization study of 71 paraffin-embedded bone marrow biopsy specimens," *American Journal of Clinical Pathology*, vol. 116 (4), pp. 535–542, 2001.
- [302] R. Donnellan and R. Chetty, "Cyclin D1 and human neoplasia," *Molecular Pathology*, vol. 51 (1), pp. 1–7, 1998.
- [303] O. M. Grbovic, A. D. Basso, A. Sawai, Q. Ye, P. Friedlander, D. Solit, and N. Rosen, "V600E B-Raf requires the HSP90 chaperone for stability and is degraded in

- response to HSP90 inhibitors," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006.
- [304] E. W. Joseph, C. A. Pratilas, P. I. Poulidakos, M. Tadi, W. Wang, B. S. Taylor, E. Halilovic, Y. Persaud, F. Xing, A. Viale, J. Tsai, P. B. Chapman, G. Bollag, D. B. Solit, and N. Rosen, "The Raf inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRaf-selective manner," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107 (33), pp. 14903–14908, 2010.
- [305] J. C. Sherr, "Cancer cell cycles," *Science*, vol. 274 (5293), pp. 1672–1677, 1996.
- [306] E. S. Knudsen and J. Y. Wang, "Dual mechanisms for the inhibition of E2F binding to RB by cyclin-dependent kinase-mediated RB phosphorylation," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 17 (10), pp. 5771–5783, 1997.
- [307] A. S. Lundberg and R. A. Weinberg, "Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 18 (2), pp. 753–761, 1998.
- [308] J. Padmanabhan and S. P. Chellappa, "Regulation of Rb Function by Noncyclin Dependent Kinases", ser. Intelligence Unit, M. Fanciull, Ed. Springer Business and Science Media, 2006.
- [309] P. Dasgupta, J. Sun, S. Wang, G. Fusaro, V. Betts, J. Padmanabhan, S. M. Sebti, and S. P. Chellappan, "Disruption of the RB-Raf-1 interaction inhibits tumor growth and angiogenesis," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 24 (21), pp. 9527–9541, 2004.
- [310] R. Kinkade, P. Dasgupta, A. Carie, D. Pernazza, M. Carless, S. Pillai, N. Lawrence, S. M. Sebti, and S. Chellappan, "A small molecule disruptor of RB/Raf-1 interaction inhibits cell proliferation, angiogenesis, and growth of human tumor xenografts in nude mice," *Cancer Research*, vol. 68 (10), pp. 3810–3818, 2008.
- [311] S. Singh, R. Davis, V. Alamanda, R. Pireddu, D. Pernazza, S. Sebti, N. Lawrence, and S. Chellappan, "RB-Raf-1 interaction disruptor RRD-251 induces apoptosis in metastatic melanoma cells and synergizes with dacarbazine," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 9 (12), pp. 3330–3341, 2010.
- [312] B. A. Hemmings and D. F. Restuccia, "PI3K-PKB/Akt pathway," *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 4 (9), pp. a011189–a011189, 2012.
- [313] D. R. Alessi, S. R. James, C. P. Downes, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, C. B. Reese, and P. Cohen, "Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase b alpha," *Current Biology*, vol. 7 (4), pp. 261–269, 1997.
- [314] P. Lopez-Bergami, H. Kim, A. Dewing, J. Goydos, S. Aaronson, and Z. Ronai, "c-jun regulates phosphoinositide-dependent kinase 1 transcription implication for Akt and protein kinase C activities and melanoma tumorigenesis," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285 (2), pp. 903–913, 2009.
- [315] F. Chang, L. S. Steelman, J. T. Lee, J. G. Shelton, P. M. Navolanic, W. L. Blalock, R. A. Franklin, and J. A. McCubrey, "Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention," *Leukemia*, vol. 17 (7), pp. 1263–1293, 2003.
- [316] J. K. Westwick, A. D. Cox, C. J. Der, M. H. Cobbs, M. Hibi, M. Karin, and D. A. Brenner, "Oncogenic Ras activates c-Jun via a separate pathway from the activation of extracellular signal-regulated kinases," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994.
- [317] T. F. Franke, S.-I. Yang, T. O. Chan, K. Datta, A. Kazlauskas, D. K. Morrison, D. R. Kaplan, and P. N. Tsichlis, "The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase," *Cell*, vol. 81 (5), pp. 727–736, 1995.
- [318] D. R. Alessi, M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen, and B. A. Hemmings, "Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1," *EMBO Journal*, vol. 15 (23), pp. 6541–6551, 1996.

- [319] H. Chai, A. Z. Luo, P. Weerasinghe, and R. E. Brown, "Sorafenib downregulates ERK/Akt and STAT3 survival pathways and induces apoptosis in a human neuroblastoma cell line," *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, vol. 3 (4), pp. 408–415, 2010.
- [320] E. T. E. Niba, H. Nagaya, T. Kanno, A. Tsuchiya, A. Gotoh, C. Tabata, K. Kuribayashi, T. Nakano, and T. Nishizak, "Crosstalk between PI3K/PDK1/Akt/Rac1 and Ras/Raf/MEK/ERK pathways downstream PDGF receptor," *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 31 (6), pp. 905–913, 2013.
- [321] S. Zimmermann and K. Moelling, "Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B)," *Science*, vol. 286 (5445), pp. 1741–1744, 1999.
- [322] K. Moelling, K. Schad, M. Bosse, S. Zimmermann, and M. Schwenker, "Regulation of Raf-Akt cross-talk," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277 (34), pp. 31099–31106, 2002.
- [323] C. Rommel, B. A. Clarke, S. Zimmermann, L. Lorna Nunez, R. Rossman, K. Reid, K. Moelling, G. D. Yancopoulos, and D. J. Glass, "Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK/ERK pathway by Akt," *Science*, vol. 286 (5445), pp. 1738–1741, 1999.
- [324] J. A. McCubrey, L. S. Steelman, W. H. Chappell, S. L. Abrams, R. A. Franklin, G. Montalto, M. Cervello, M. Libra, S. Candido, G. Malaponte, M. C. Mazzarino, P. Fagone, F. Nicoletti, J. Bäsecke, S. Mijatovic, D. Maksimovic-Ivanic, M. Milella, A. Tafuri, F. Chiarini, C. Evangelisti, L. Cocco, and A. M. Martelli, "Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascade inhibitors: how mutations can result in therapy resistance and how to overcome resistance," *Oncotarget*, vol. 3 (10), pp. 1068–1111, 2012.
- [325] P. Furet, V. Guagnano, R. A. Fairhurst, P. Imbach-Weese, I. Bruce, M. Knapp, C. Fritsch, F. Blasco, J. Blanz, R. Aichholz, J. Hamon, D. Fabbro, and G. Caravatti, "Discovery of NVP-bBYL719 a potent and selective phosphatidylinositol-3 kinase alpha inhibitor selected for clinical evaluation," *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, vol. 23 (13), pp. 3741–3748, 2013.
- [326] S.-M. Maira, F. Stauffer, J. Brueggen, P. Furet, C. Schnell, C. Fritsch, S. Brachmann, P. Chène, A. D. Pover, K. Schoemaker, D. Fabbro, D. Gabriel, M. Simonen, L. Murphy, P. Finan, W. Sellers, and C. García-Echeverría, "Identification and characterization of NVP-Bez235, a new orally available dual phosphatidylinositol 3-kinase/mammalian target of rapamycin inhibitor with potent in vivo antitumor activity," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 7 (7), pp. 1851–1863, 2008.
- [327] G. L. Baker, M. W. Landis, and P. W. Hinds, "Multiple functions of d-type cyclins can antagonize pRB-mediated suppression of proliferation," *Cell Cycle*, vol. 4 (2), pp. 330–338, 2005.
- [328] G. P. Ilyin, D. Glaise, D. Gilot, G. Baffet, and C. Guguen-Guillouzo, "Regulation and role of p21 and p27 cyclin-dependent kinase inhibitors during hepatocyte differentiation and growth," *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 285 (1), pp. G115–127, 2003.
- [329] J. Dong, J. Peng, H. Zhang, W. H. Mondesire, W. Jian, G. B. Mills, M.-C. Hung, and F. Meric-Bernstam, "Role of glycogen synthase kinase 3 beta in rapamycin-mediated cell cycle regulation and chemosensitivity," *Cancer Research*, vol. 65 (5), pp. 1961–1972, 2005.
- [330] S. Hashemolhosseini, Y. Nagamine, S. J. Morley, S. Desrivieres, L. Mercep, and S. Ferrari, "Rapamycin inhibition of the G1 to S transition is mediated by effects on Cyclin D1 mRNA and protein stability," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273 (23), pp. 14424–14429, 1998.
- [331] W. H. Mondesire, W. Jian, H. Zhang, J. Ensor, M.-C. Hung, G. B. Mills, and F. Meric-Bernstam, "Targeting mammalian target of rapamycin synergistically enhances chemotherapy-induced cytotoxicity in breast cancer cells," *Clinical Cancer Research*, vol. 10 (20), pp. 7031–7042, 2004.

- [332] W.-C. Noh, W. H. Mondesire, J. Peng, W. Jian, H. Zhang, J. Dong, G. B. Mills, M.-C. Hung, and F. Meric-Bernstam, "Determinants of rapamycin sensitivity in breast cancer cells," *Clinical Cancer Research*, vol. 10 (3), pp. 1013–1023, 2004.
- [333] N. Takuwa, Y. Fukui, and Y. Takuwa, "Cyclin D1 expression mediated by phosphatidylinositol 3-kinase through mTOR-p70S6K-independent signaling in growth factor-stimulated NIH 3t3 fibroblasts," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 19 (2), pp. 1346–1358, 1999.
- [334] F. Casagrande, D. Bacqueville, M.-J. Pillaire, F. Malecaze, S. Manenti, M. Breton-Douillon, and J.-M. Darbon, "G1 phase arrest by the phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor LY 294002 is correlated to up-regulation of p27kip1 and inhibition of G1 cdk in choroidal melanoma cells," *FEBS Letters*, vol. 422 (3), pp. 385–390, 1998.
- [335] A. Casamayor, N. A. Morrice, and D. R. Alessi, "Phosphorylation of Ser-241 is essential for the activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1: identification of five sites of phosphorylation in vivo," *Biochemical Journal*, vol. 342 (2), pp. 287–292, 1999.
- [336] Q.-B. She, D. B. Solit, Q. Ye, K. E. O'Reilly, J. Lobo, and N. Rosen, "The bad protein integrates survival signaling by EGFR/MAPK and PI3K/Akt kinase pathways in PTEN-deficient tumor cells," *Cancer Cell*, vol. 8 (4), pp. 287–297, 2005.
- [337] Q.-B. She, E. Halilovic, Q. Ye, W. Zhen, S. Shirasawa, T. Sasazuki, D. B. Solit, and N. Rosen, "4E-BP1 is a key effector of the oncogenic activation of the Akt and ERK signaling pathways that integrates their function in tumors," *Cancer Cell*, vol. 18 (1), pp. 39–51, 2010.
- [338] J. G. Greger, S. D. Eastman, V. Zhang, M. R. Bleam, A. M. Hughes, K. N. Smitheman, S. H. Dickerson, S. G. Laquerre, L. Liu, and T. M. Gilmer, "Combinations of BRAf, MEK, and PI3K/mTOR inhibitors overcome acquired resistance to the BRAf inhibitor GSK2118436 dabrafenib, mediated by NRas or MEK mutations," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 11 (4), pp. 909–920, 2012.
- [339] S. Whittaker, R. Kirk, R. Hayward, A. Zambon, A. Viros, N. Cantarino, A. Affolter, D. Niculescu-Duvaz, C. Springer, and R. Marais, "Gatekeeper mutations mediate resistance to BRAf-targeted therapies," *Science Translational Medicine*, vol. 2 (35), p. 35ra41, 2010.
- [340] K. R. Molhoek, D. L. Brautigan, and C. L. Slingluff, "Synergistic inhibition of human melanoma proliferation by combination treatment with B-Raf inhibitor BAY43-9006 and mTOR inhibitor rapamycin," *Journal of Translational Medicine*, vol. 28 (3), p. 39, 2005.
- [341] N. Babchia, A. Calipel, F. Mouriaux, A.-M. Faussat, and F. Mascarelli, "The PI3K/Akt and mTOR/p70S6K signaling pathways in human uveal melanoma cells: interaction with b-raf/erk," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 51 (1), pp. 421–429, 2010.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
AMPK	AMP-activated protein kinase
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
ASK-1	apoptosis signal-regulating kinase 1
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	Bcl-2-associated death promoter
Bcl	B-cell lymphoma
bp	Basenpaare
BP	Bisphosphonate
BSA	bovine serum albumin
B-ZIP	basic leucine zipper
bzw.	beziehungsweise
° C	Grad Celsius
ca.	circa
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CD	cluster of differentiation
cDc25	Cell division cycle 25
CDK	Cyclin-dependent kinase
cDNA	Copy-DNA
CH ₃ COOK	Kaliumacetat
CK2	Casein kinase 2
CLL	chronische lymphatische Leukämie
C-MAF	musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog
c-Myc	human homologe of the MC29 avian myelocytomatosis virus oncogene
CNK	connector enhancer of KSR
CR	conserved region
CRBN	Cereblon
CRD	cysteine-rich domain
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DcR3	Decoy receptor 3
DKK	Dickkopf
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotid-Triphosphate
Dtl.	Deutschland
DTT	Dithiothreitol
EBP1	ErbB3-binding protein 1
EC	effective concentration
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EGFP	Enhanced GFP
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERK	extracellular-signal regulated kinase
Ets	E26 transformation-specific
F	Farad
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
FC	fold change
FGFR-3	fibroblast growth factor receptor-3
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward light scatter
g	Gramm
G	gap
GB	Großbritannien
GDP	Guanosindiphosphat
GEP	gene expression profiling
GFP	green fluorescent protein
Glycerin	propane-1,2,3-triol
GO	Gene Ontology
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GSK3-β	Glykogen Synthase Kinase 3-β
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDCT	Hochdosis-Chemotherapie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGF	human growth factor

Hif1	hypoxia-inducible factor 1
HMZL	humane Myelomzelllinien
HRP	Meerrettich-(horse radish) Peroxidase
HSP	Hitzeschockprotein
Ig	Immunglobulin
IgH	Immunoglobulin Heavy
IGF-1	Insulin-like growth factor- 1
IL-6	Interleukin-6
IMID	immunomodulatory drug
IMWG	International Myeloma Working Group
IQGAP	GTPase-activating-like protein
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo-Dalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KMSZ	Knochenmarkstromazellen
KO	knockout
KOH	Kaliumhydroxid
KSR	kinase suppressor of Ras
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LSM	lymphocyte separation medium
μ	mikro
m	milli
M	mol/l
MACS	magnetic activated cell sorting
MafB	V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MEK	MAP/ERK Kinase
Mg(CH ₃ COO) ₂	Magnesiumacetat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
min.	Minute
MM	Multiples Myelom
MMSET	multiple myeloma SET domain
mRNA	messenger-RNA
MST2	mammalian STE20-like protein kinase 2

mTOR	mechanistic target of rapamycin
mut	mutiert
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NF-κB	Nukleärer Faktor-κB
OAB	oloigonucleotide annealing buffer
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAK	p21 activated kinase
PBMC	peripheral blood mononucleated cell
PBS	phosphat buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction
PDK1	pyruvate dehydrogenase kinase 1
PHB	Prohibitin
PI	Propidiumiodid
PI	Proteasomen-Inhibitor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat
PKA	protein kinase A
pMM	primäre Multiple Myelom Zellen
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	polynucleotide kinase
PP5	protein phosphatase 5
PRAS40	proline-rich Akt substrate of 40 kDa
pSU	pSuper
pSUPER	pSUPER shRNA-Expressionsvektor (suppression of endogenous RNA)
PTEN	phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	rat sarcoma viral oncogene homolog
RB1	Retinoblastoma 1
RBD	Ras binding domain
RIN	RNA integrity number
RKIP	Raf kinase inhibitor protein
RNA	Ribonukleinsäure
Rok-α	Rho-dependent kinase

rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 Zellkulturmedium
RSK	ribosomal s6 kinase
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
s	Sekunde
S	Synthese
SAP	shrimp alkaline phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sFRP-2/3	soluble frizzled-related protein-2/3
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
Spread	Sprouty-related, EVH1 domain-containing
Src	sarcoma
STAT	signal transducer and activator of transcription
t-AML	Therapie-assoziierte Akute Myeloische Leukämie
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGS	Tris-Glyzin-SDS-Puffer
TNF- α	tumor necrosis factor alpha
Tris	a,a,a-Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitan-monolaurat
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
UPR	unfolded protein response
V	Volt
v.a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial growth factor
VSN	Variances Stabilization and Normalization
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZVAD	Z-Val-Ala-DL-Asp
ZZ	Zellzyklus

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Physiologische B-Zell-Entwicklung.....	13
Abbildung 2: Modell der molekularen Pathogenese des MM	14
Abbildung 3: Das onkogene Signalnetzwerk im Multiplen Myelom.....	16
Abbildung 4: Schematische Struktur und regulatorische Phosphorylierungsstellen der menschlichen Raf-Kinasen.....	18
Abbildung 5: Expression und Aktivierungsstatus der Raf-Isoformen in humanen MM Zelllinien und primären Myelomzellen.....	39
Abbildung 6:Spezifität der verwendeten shRNAs.....	40
Abbildung 7: MAPK-Signaling nach Isoform-spezifischem Raf-Knockdown.....	41
Abbildung 8: MAPK-Signaling nach Pan-Raf-Knockdown.....	42
Abbildung 9: Pan-Raf-Blockade mittels pan-Raf-Inhibitor MLN-2480.....	43
Abbildung 10: Pan-Raf-Inhibition durch SB-590885.....	43
Abbildung 11: Auswirkung des Isoform-spezifischen Raf-Knockdowns auf das Überleben von HMZL	44
Abbildung 12: Auswirkung einer Pan-Raf-Inhibition durch gleichzeitigen Knockdown aller Isoformen auf das Überleben von MM Zelllinien.	45
Abbildung 13: Dosis-Wirkungs-Kurven des Inhibitors SB-590885.....	46
Abbildung 14: Behandlung von primären Myelomzellen mit SB-590885.. ..	47
Abbildung 15: Anzahl der regulierten mRNAs nach MEK- und Pan-Raf-Blockade.....	48
Abbildung 16: Heat Map-Darstellung der nach MEK- und Pan-Raf-Inhibition differentiell exprimierten Gene.....	49
Abbildung 17: GO Term Klassifikation der differentiell regulierten Gene nach MEK- und Pan-Raf-Inhibition.	50
Abbildung 18: Western-Blot-Analyse PI3K-abhängiger, mTOR-assoziiierter Proteine nach Pan-Raf-Blockade durch Inhibitoren.....	51
Abbildung 19: Western-Blot-Analyse des Phosphorylierungsgrades von AKT nach Pan-Raf-Inhibition mittels Inhibitoren	52
Abbildung 20: Western-Blot-Analyse PI3K-abhängiger, mTOR-assoziiierter Proteine nach Pan-Raf-Inhibition durch shRNAs.....	52

Abbildung 21: Western-Blot-Analyse des Phosphorylierungsgrades von AKT nach Pan-Raf-Inhibition mittels simultanen Knockdowns der drei Isoformen.	53
Abbildung 22: Western-Blot-Analyse PI3K-abhängiger, mTOR-assoziiierter Proteine nach MEK-Blockade durch Inhibitor.	53
Abbildung 23: Western-Blot-Analyse des Phosphorylierungsgrades von AKT nach MEK-Blockade.	54
Abbildung 24: PI3K/mTOR-Inhibition in INA-6 und MM.1S Zellen.	55
Abbildung 25: Phosphorylierung von AKT nach PI3K/mTOR-Inhibition in MM.1S Zellen.	55
Abbildung 26: Western-Blot-Analyse nach dualer Blockade von PI3K und Pan-Raf mittels Inhibitoren.	56
Abbildung 27: Phosphorylierung von AKT nach einzelner und gemeinsamer Blockade von Pan-Raf und PI3K.	57
Abbildung 28: Gesteigerte Apoptose bei Kombination von Pan-Raf- und PI3K-Blockade.	58

7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Internationales Staging System (ISS) für das MM.....	9
Tabelle 2: Verwendete Inhibitoren	35
Tabelle 3: EC50-Werte der Behandlung mit SB-590885 bei verschiedenen HMZL.....	46

7.5 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

7.6 Veröffentlichungen

Manuskript in Vorbereitung: **E. Müller** *et al.*, 2015

M. Chatterjee, M. Andrulis, T. Stühmer, **E. Müller**, C. Hofmann, T. Steinbrunn, T. Heimberger, H. Schraud, S. Kressmann, H. Einsele, and R. C. Bargou, "The PI3K/Akt signaling pathway regulates the expression of Hsp70, which critically contributes to Hsp90-chaperone function and tumor cell survival in multiple myeloma," *Haematologica*, vol. 98 (7), pp. 1132–1141, 2013.

E. Müller, A. Keller, A. Fregin, C. R. Müller, and S. Rost, "Confirmation of warfarin resistance of naturally occurring VKORC1 variants by coexpression with coagulation factor IX and in silico protein modeling," *BMC Genetics*, 15:17, 2014.

H.-J. Pelz, S. Rost, **E. Müller**, A. Esther, R. G. Ulrich, and C. R. Müller, "Distribution and frequency of VKORC1 sequence variants conferring resistance to anticoagulants in *Mus musculus*," *Pest Management Science*, vol. 68 (2), pp. 254-259, 2012.

7.7 Danksagungen

Zunächst gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. Bargou für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die fachliche Unterstützung.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Chatterjee bedanken für die hervorragende fachliche Betreuung und für immer neue Anregungen zur Vertiefung des Themas.

Des Weiteren möchte ich Herrn Prof. Dr. Müller meinen Dank für die Übernahme des Zweitgutachtens entgegenbringen.

Auch einen herzlichen Dank an Stephanie Barthel für die gute Vorarbeit bei der Entwicklung und Etablierung der shRNAs und das Überlassen der Daten. Bei Dr. Dr. Torsten Steinbrunn und Nadine möchte ich mich für die Untersuchung des Ras-Mutationsstatus bedanken.

Herrn Dr. Scholz und Frau Göbel möchte ich meinen herzlichen Dank für die Durchführung, die Auswertung und viele investierte Stunden für die Interpretation der Microarray Experimente entgegenbringen. Erhard Kress danke ich für die Durchführung der Zellsortierung.

Nicht alle Themen, die ich während meiner Zeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin bearbeitet habe, haben es in die Doktorarbeit geschafft. Nichtsdestotrotz möchte ich meinen Dank an Herrn Dr. Beilhack und seine Arbeitsgruppe, insbesondere Dr. Sabrina Kraus, für die gemeinsame Planung und Durchführung der Mausexperimente, aussprechen. An dieser Stelle auch ein herzliches Dankeschön an Herrn Prof. Dr. Sottriffer und Frau Prof. Dr. Holzgrabe und ihren Arbeitsgruppen für die großartige und erfolgreiche Kooperation bei unserem HSP70-Projekt. Namentlich möchte ich hierbei insbesondere Andreas Hartung erwähnen, bei dem ich mich für die stets angenehme Zusammenarbeit bedanke.

Natürlich geht auch ein riesengroßes Dankeschön an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe Bargou für die gute Arbeitsatmosphäre und die fortwährende Unterstützung im Laboralltag von jedem Einzelnen. Es hat mir großen Spaß gemacht, ein Teil dieses starken Teams zu sein. Besonderer Dank gilt hierbei Steffi und Heike für ihr Durchhaltevermögen, ihre Motivation und die großartige Durchführung der Experimente, was mir eine unglaubliche Hilfe war.

Ich danke meinen Freunden Sonja, David, Teresa und Tommy für eine großartige Zeit, viele tolle Erinnerungen und jede Menge Unsinn. Meiner Freundin Melanie und ihrem Mann Christian danke ich für ihre großartige Hilfsbereitschaft, ihre Zuverlässigkeit und für die vielen schönen Abende. Meiner neuen Arbeitskollegin und Freundin Conny möchte ich für die vielen Tipps und die Motivationsarbeit während des Schreibens der Doktorarbeit danken.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und insbesondere meinen Eltern für die bedingungslose Unterstützung, den Rückhalt und allzeitige Hilfe in allen Lebenslagen.