

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

Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele

Lehrstuhl für Translationale Onkologie

Professor Dr. med. Ralf C. Bargou

**Molekulare Analyse des IKK-Komplexes als Zielstruktur für potentielle
Therapieoptionen im Multiplen Myelom**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Eduard Maier

aus Nagold

Würzburg, August 2015



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

Korreferent: Prof. Dr. Albrecht Müller

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 19.01.2016

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 Monoklonale Gammopathien	1
1.1.1 Klassifikation, Symptome und Diagnose monoklonaler Gammopathien	3
1.1.2 Therapie und Prognose	7
1.2 Die Entwicklung von der naiven B-Zelle bis zur Plasmazelle.....	9
1.3 Genetische Alterationen und molekulare Klassifikation.....	12
1.4 Onkogene Netzwerke.....	15
1.5 Der Signalweg.....	16
1.5.1 NF- κ B Transkriptionsfaktoren	16
1.5.2 Struktur des NF- κ B Signalwegs.....	17
1.6 NF- κ B im Multiplen Myelom	18
1.7 Zielsetzung der Arbeit	22
2. MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 Zellbiologische Methoden.....	24
2.1.1 Zellkulturen	24
2.1.2 Transiente Transfektion von Myelomzelllinien mittels Elektroporation	27
2.1.3 Behandlung mit dem IKK β -Inhibitor TPCA	28
2.1.4 Zelltodmessungen mittels FACS.....	29
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	30
2.2.1 shRNA-Expressionsvektor	30
2.2.2 Design der Oligonukleotide.....	32
2.2.3 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung von pSUPER.....	35
2.2.4 Phenol/Chloroform Extraktion und Fällung des dephosphorylierten Vektors	36
2.2.5 Annealing von DNA-Oligonukleotiden	37

1. EINLEITUNG

2.2.6 Phosphorylierung der dsOligonukleotidkassetten (Kinase Reaktion).....	37
2.2.7 Ligation des Oligonukleotid-Inserts in den pSUPER Vektor	38
2.2.8 Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien und Selektion der Klone	38
2.2.9 Isolation von Plasmiden mittels QIAprep-Miniprep.....	39
2.2.10 Diagnostischer Verdau	40
2.2.11 Sequenzanalyse von shRNA Expressionsvektoren	42
2.2.12 Plasmidgewinnung mittels QIAprep-Maxiprep.....	44
2.3 Proteinbiochemische Methoden: Western-Blot Analyse	44
2.3.1 Ernten und Lysieren von Myelomzellen.....	44
2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	45
2.3.3 Gießen des SDS-Polyacrylamid Gels, SDS-Gelelektrophorese	46
2.3.4 Blotting, Immun-Detektion und Analyse von Proteinbanden.....	47
3. ERGEBNISSE.....	53
3.1 Identifikation von funktionellen IKK- γ und IKK- β shRNA Expressionskonstrukten	53
3.2 Analyse des Einflusses von IKK Knockdown auf das Überleben von Myelomzellen.....	57
3.3 Effekt des IKK- β Knockdowns mittels Stealth-siRNA auf I κ B- α nach TNF- α Stimulation ..	69
3.4 Effekt von TPCA-1 auf I κ B- α nach TNF- α Stimulation	71
3.5 Geringer Effekt von TPCA-1 auf die Überlebensrate von MM.1S.....	72
4. DISKUSSION	75
5. ZUSAMMENFASSUNG	84
6. ANHANG	86
7. LITERATUR	89
8. ABBILDUNGEN.....	95
9. DANKSAGUNG	1
10. LEBENS LAUF	2

1. EINLEITUNG

1.1 Monoklonale Gammopathien

Das Multiple Myelom ist eine bislang unheilbare, von malignen Plasmazellen ausgehende Erkrankung und gehört zu den B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen.¹

Die ersten Fälle der bislang unbekannt, tödlichen Erkrankung der Knochen, damals verallgemeinert als „Mollities Ossium“ (Weichlichkeit des Knochens) bezeichnet, wurden Mitte des 19ten Jahrhunderts dokumentiert.² Symptome wie Müdigkeit, Knochenschmerzen und -brüche sowie „wundersame“ Eigenschaften des Urins (Veränderungen der Konsistenz) der Patienten entsprachen auffälligen Knochenmarksbefunden („eine rötliche, Knochenmarks-verdrängende Substanz“) in der Autopsie.² Durch die genauere Charakterisierung von Plasmazellen und detaillierte chemische und biochemische Analysen von Patientenblut und -urin, konnten diese verschiedenen Symptome einer einzigen Erkrankung, dem Multiplen Myelom, zugeordnet werden. Einen guten historischen Überblick liefern Kyle und Rajkumar (2008).²

Heute ist bekannt, dass die Knochenmarks-infiltrierenden beziehungsweise -verdrängenden malignen Zellen monoklonale Immunglobuline (Ig) produzieren, die in der Serumelektrophorese durch Veränderung der γ -Globulinfraktion („ γ -peak“) dargestellt werden können und in den Urin abgesondert als „Bence-Jones Leichtketten“ bezeichnet werden. Daher wird das Multiple Myelom neben der monoklonalen Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS), dem Morbus Waldenström und anderen Formen maligner Plasmazellerkrankungen zu den monoklonalen Gammopathien gezählt.³ Auf Grund des verdrängenden Wachstums können Symptome wie Blutarmut, Blutungsneigung oder Infektneigung auftreten.

Die Krebserkrankung kann jedoch noch zu vielen weiteren Symptomen führen (siehe unten) und auch atypische Primärsymptome aufzeigen, so dass die Diagnose oft nicht einfach zu stellen ist. Eine sinnvolle Klassifikation, die sowohl klinische, als auch

1. EINLEITUNG

Laborparameter benutzt um eine grobe prognostische und therapeutische Richtung aufzuzeigen, wurde 2003 durch die „International Myeloma Working Group“ (I.M.W.G.)³ erstellt.

Für das bessere Verständnis der Erkrankung soll im Folgenden zunächst diese Klassifikation erläutert werden um dann die aktuellen therapeutischen Optionen daraus abzuleiten. Diese versprechen, obwohl sich die Überlebensprognose in den letzten Jahrzehnten deutlich verbessert hat, immer noch keine Heilung. Aus diesem Grund ist die Suche nach neuen therapeutischen Angriffspunkten unumgänglich. Mit zunehmendem Verständnis der Pathogenese, die auf einen mehrstufigen Entartungsprozess hindeutet, wird klar, dass neben der bestehenden klinisch-laborchemischen Klassifikation eine molekulare, beziehungsweise genetische Klassifikation notwendig ist. Erwähnenswert ist die extreme genetische Heterogenität der Krankheit, die - insbesondere auch unter Therapie - die Selektion und das präferenzielle Wachstum von molekularen Subklonen begünstigt.⁴ Die Erfassung der individuellen genetischen Parameter erfolgt heute zunehmend mittels moderner Sequenzierungstechniken. Die daraus abzuleitenden Möglichkeiten der punktuellen und longitudinalen genetischen Analyse versprechen für die Zukunft genauere Voraussagen zur Prognose und zur Wahl gezielter wirkender Therapieoptionen.

Die Möglichkeit der Identifikation potentieller molekularer Angriffspunkte bildet die Grundlage für die Entwicklung klinisch relevanter pharmakologischer Substanzen. In dieser Arbeit wurde die potentielle Bedeutung des IKK-Komplexes als molekularer Angriffspunkt im Multiplen Myelom untersucht. Obwohl die Blockade des IKK-Komplexes als Therapieoption für diverse Krebsarten diskutiert wird, bleibt dessen klinische Relevanz unklar.⁵ Pharmakologische Analysen mit Myelomzellen lieferten keine einheitlichen Aussagen und führten bislang auch nicht zu klinischen Anwendungen.⁵⁻¹⁰ Dabei ist nicht auszuschließen, dass insbesondere bei Verwendung hoher Konzentrationen der getesteten Wirkstoffe die beobachteten anti-tumoralen Effekte auf unspezifischen Nebenwirkungen beruhen. Aus diesem Grund erfolgte in dieser Arbeit ein alternativer Ansatz, bei dem eine siRNA vermittelte, spezifische

1. EINLEITUNG

Depletion von Untereinheiten des IKK-Komplexes (IKK- α , IKK- β und IKK- γ) die tatsächliche Relevanz dieser Proteine als molekulare Angriffspunkte ergründen sollte.

1.1.1 Klassifikation, Symptome und Diagnose monoklonaler Gammopathien

Die MGUS ist klinisch asymptomatisch und durch eine Paraproteinämie (M-Gradient) bis 30 g/l in der Serumelektrophorese gekennzeichnet.³ Eine Erhöhung der Plasmazellzahl auf bis zu 10% im Knochenmarksausstrich ist ebenfalls häufig vorhanden.³ Als Paraproteinämie wird hierbei die Erhöhung der monoklonalen γ -Globulin Fraktion einer bestimmten Antikörperklasse im Patientenserum bezeichnet.¹¹ Die Identifizierung der γ -Fraktion gelingt mit der Serum-Elektrophorese im Agarosegel. Die Klasse der Immunglobuline (IgM, IgG, IgA, IgD, IgE) wird durch die schwere Kette definiert. Die leichten Ketten, die auch im Urin als Bence-Jones Proteine nachweisbar sind, kann man in die beiden Klassen λ und κ einteilen.³ Die Ermittlung der Leichtketten-Klasse gelingt mittels Immunfixation, wodurch ein aus der Serumelektrophorese ermittelter Verdacht bestätigt wird.³

Die MGUS kann bei 3,2% der Bevölkerung über 50 Jahren nachgewiesen werden (Daten von über 20 000 Bewohnern aus Olmsted County in Minnesota).¹² Damit macht die Erkrankung laut Kyle et al. (2006) mit über 50% den Großteil der monoklonalen Gammopathien aus.¹² Bei etwa 1% der MGUS Patienten kam es innerhalb eines Jahres nach Erstdiagnose zu einem Fortschreiten zum Multiplen Myelom (Synonym: „Symptomatisches Myelom“).¹³ Ein wichtiger prognostischer Risikofaktor für das Fortschreiten zum Multiplen Myelom ist die Erhöhung der M-Protein Konzentration im Serum.^{3,13} Wichtig für das Verständnis der Pathogenese ist die Frage, ob sich ein symptomatisches Myelom immer aus einer MGUS entwickelt. Weiss und Landgren et al. (2009) konnten in zwei prospektiven Studien zeigen, dass in den meisten Fällen symptomatischer Myelom-Patienten eine MGUS vor Ausbruch der Krankheit vorhanden ist.^{14,15}

1. EINLEITUNG

Das Multiple Myelom ist eine bis heute unheilbare Erkrankung, die weltweit mit jährlich 86 000 Neuerkrankungen 0,8% aller neu diagnostizierten neoplastischen Erkrankungen ausmacht.¹⁶ Die jährliche Inzidenz in Europa wurde im Jahr 2011 auf etwa 2,5 - 4 pro 100 000 Einwohner geschätzt.¹⁶ Die 5-jahres Überlebensrate betrug im Jahr 2009 durchschnittlich 35%, wobei sie aber durchaus noch zwischen einzelnen Ländern variierte (beispielsweise betrug die 5-jahres Überlebensrate in Polen 23%, in Belgien dagegen 47%).¹⁷

Die Diagnose des Multiplen Myeloms bedarf neben dem M-Gradienten oder den Leichtketten im Urin (97%) sowie Myelom-spezifischer Tumorzellen im Knochenmark (selten auch unter 5%, manchmal bis 100%) zusätzlicher Befunde, die auf einen Endorganschaden (englisch „Related Organ or Tissue Impairment = ROTI) hinweisen. Typische Befunde im Knochenmarkspirat oder in der Stanzbiopsie sind doppelkernige Plasmazellen.¹⁸ Zu den Endorganschäden werden Knochenläsionen (80%), renale Dysfunktion (20%), Anämie (66%) und Hyperkalziämie (20%) (CRAB Kriterien = Increased Calcium, Renal Insufficiency, Anaemia, Bone Lesions) aber auch Hyperviskosität, Amyloidose und Infektneigung gezählt.³

Die Knochenläsionen gehen mit einer erhöhten Kalziumkonzentration im Serum einher und entstehen durch die Aktivierung von Osteoklasten und Inhibition von Osteoblasten.¹ Direkter Zellkontakt und die Produktion von Zytokinen durch die Myelomzellen scheinen hierbei von Bedeutung zu sein.^{19,20} Die Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark durch die Krebszellen führt zu Anämie, Müdigkeit und Infektneigung. Renale Dysfunktion, Hyperviskosität und Amyloidose sind auf die übermäßige Produktion von Immunglobulinen zurückzuführen.¹

Eine erste sinnvolle Einteilung der Krankheit in verschiedene Stadien lieferten Durie und Salmon unter Einbezug klinischer und laborchemischer Parameter vor etwa 40 Jahren.²¹ Sie fanden eine Korrelation zwischen durchschnittlichem Überleben und dem Hämoglobin-Wert, der Konzentration des Paraproteins im Serum, der Konzentration des Kalziums im Serum, der Anzahl von Knochenläsionen und der Serumkonzentration des Kreatinins.²¹ Die Einführung des Internationalen Staging Systems (ISS, siehe Tabelle 1) im Jahr 2005 ermöglichte anhand zweier Serumparameter (Serum-Albumin

1. EINLEITUNG

Konzentration und Serum-beta₂-Mikroglobulin Konzentration) eine genauere prognostische Einschätzung.²² Beide Laborwerte können im Gegensatz zu aufwendigeren zytogenetischen oder molekularbiologischen Analysen mit geringem Kosten- und Geräteaufwand ermittelt und somit in vielen Kliniken angewendet werden. Die genauen zugrundeliegenden biologischen Mechanismen der strengen Korrelation dieser Parameter und der Prognose müssen noch erschlossen werden.

Tabelle 1

Stadium	Parameter	Mediane Überlebenszeit
I	Serum-beta ₂ -Mikroglobulin <3,5 mg/L Serum-Albumin >3,5 g/dL	62 Monate
II	Weder zu Stadium I oder III passend	44 Monate
III	Serum-beta ₂ -Mikroglobulin >5,5 mg/L	29 Monate

Das neue International Staging System nach Greipp et al. (2005)²²

Obwohl durch die Stadienverteilung eine Einschätzung der Überlebenswahrscheinlichkeit vorgenommen werden kann, gehört die Testung von molekularen Prognoseparametern heute zum klinischen Standard. Durch die Identifikation entsprechender genetischer Veränderungen in Myelom-Patienten konnten Ansätze zu einer molekularen Klassifikation etabliert werden (siehe Kapitel „1.3 Genetische Alterationen und molekulare Klassifikation“ oder den Übersichtsartikel von Chesi und Bergsagel (2013)).²³

Neben den oben genannten Manifestationen existieren Sonderformen monoklonaler Gammopathien auf die (bis auf das im Folgenden erwähnte asymptomatische Myelom) hier nicht weiter eingegangen werden soll. Eine umfassende diagnostische Differenzierung, die sich an den Vorgaben der „International Myeloma Working Group“ orientiert, zeigen Sirohi und Powles et al. (2004).

1. EINLEITUNG

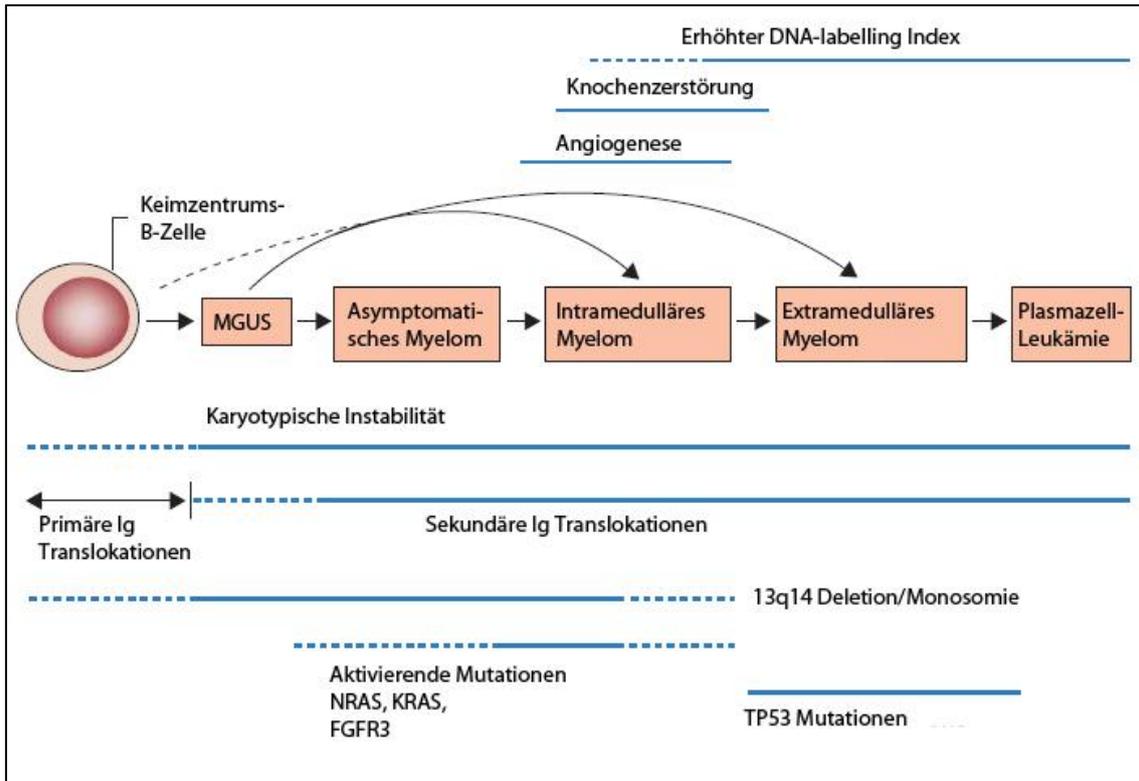


Abbildung 1

Klinische Erscheinungsbilder und die molekulare Pathogenese verschiedener Stufen monoklonaler Gammopathien (aus Sirohi et al. (2004))²⁴

Bekannt ist, dass einem symptomatischen Myelom (Intramedulläres und Extramedulläres Myelom) meist eine MGUS vorausgeht.^{14,15} Mit Fortschreiten der Erkrankung treten klinisch relevante Symptome auf und es häufen sich genetische Läsionen (Translokationen, Mutationen, Deletionen, Aneuploidien).

Eine Art Übergangsform zwischen dem MGUS und dem Multiplen Myelom stellt das sogenannte asymptotische Myelom (englisch: „smouldering Myeloma“) dar, das im Vergleich zur MGUS eine höhere M-Protein Konzentration im Blut oder im Urin und eine größere Plasmazellzahl im Knochenmark aufweist.³ Bei dieser Krankheitsstufe fehlen im Gegensatz zum symptomatischen Myelom Knochenläsionen oder Endorganschäden.³ Da das Risiko eines Fortschreitens zum Multiplen Myelom durchschnittlich 10% pro Jahr in den ersten 5 Jahren beträgt,²⁵ ergibt sich die Frage nach der Therapiebedürftigkeit der Patienten. Ob eine fulminante Behandlung des asymptotischen Myeloms langfristig günstig beziehungsweise potentiell kurativ ist, oder ob eine aggressive Behandlung durch die daraus resultierende Selektion resistenter Klone ungünstige Folgen für den Patienten hat, ist nicht abschließend

1. EINLEITUNG

geklärt, und hängt gegebenenfalls auch von den zur Verfügung stehenden Therapieoptionen ab.

1.1.2 Therapie und Prognose

Geschichtliche Entwicklung

Die heute klassischerweise in Kombination eingesetzten Chemotherapeutika Prednisolon und Melphalan (Synonym: Sarkolysin) wurden Mitte des 20ten Jahrhunderts zum ersten Mal beim Multiplen Myelom mit Erfolg eingesetzt. Versuche, beide Substanzen mit anderen konventionellen Chemotherapeutika zu kombinieren ergaben keine signifikanten Unterschiede in der Ansprechrate oder dem Gesamtüberleben.² Trotz einer guten Ansprechrate gab es Patienten, deren Tumor resistent gegen Alkylanzien war. Aus diesem Grund konnte sich die Kombination aus dem Alkaloid Vincristin, dem Anthrazyclin Doxorubicin und dem Corticosteroid Dexamethason (VAD) in der Therapie Melphalan-resistenter Patienten durchsetzen.²⁶ Auch die alleinige Gabe von Dexamethason in hoher Konzentration stellt eine komplikationsarme Therapieoption dar.²⁷

In den folgenden Jahrzehnten konnte erfolgreich die autologe beziehungsweise allogene Stammzelltransplantation, mit zuvor durchgeführter Myeloablation mittels Bestrahlung und Applikation von Melphalan, etabliert werden.^{2,28,29} Dabei war die Induktion mit VAD über Jahre hinweg die Therapie der ersten Wahl.^{26,30} Einen ausführlichen historischen Überblick liefert wieder das Review von Kyle und Rajkumar (2008).²

Neue Ansätze

Um die Jahrtausendwende wurde die klinische Wirksamkeit der neuen Substanzen Thalidomid³¹, Bortezomib³² und Lenalidomid^{33,34} in Studien belegt. Diese werden heute

1. EINLEITUNG

üblicherweise in Kombination mit Dexamethason für die Induktions-Chemotherapie verwendet.

Auch bei immunbasierten Therapieansätzen konnten Erfolge verzeichnet werden: Neuere Phase I und Phase II Studien belegen die Wirksamkeit von monoklonalen Antikörpern (z.B. Elotuzumab).³⁵ Desweiteren ist es wünschenswert mit Hilfe von genetischen Subgruppenanalysen die Entwicklung zielgerichteter molekularer Therapien zu ermöglichen. Dabei ist das Ziel individualisierte, auf den Patienten abgestimmte Therapieoptionen zu entwickeln. Patienten deren genetisches Tumorprofil eine schlechte Prognose erwarten lässt („Hochrisiko Patienten“, z.B. mit del(13) oder del(17p13)), wären auf Grund ihres schlechten Ansprechens auf konventionelle Therapieverfahren besonders auf die erfolgreiche Entwicklung solcher neuartigen Behandlungskonzepte angewiesen.³⁶

Die Analyse des IKK Komplexes in der vorliegenden Arbeit soll in diesem Zusammenhang von einem molekularbiologischen Ansatz her beleuchten, ob die beiden Hauptachsen des NF- κ B Systems im Multiplen Myelom als potentiell Therapieziel in Betracht gezogen werden können.

Therapieindikation

Die Indikation für therapeutische Maßnahmen wird erst durch das Vorhandensein von Symptomen (siehe CRAB Kriterien) oder Endorganschäden (ROTI) gestellt. Frühe chemotherapeutische Interventionen bei MGUS oder asymptomatischen Myelompatienten zeigten bis vor Einführung der neuen Substanzen keine Vorteile.^{37,38} Bei asymptomatischen Myelompatienten mit einem hohen Risikoprofil konnte jedoch durch Monotherapie mit Thalidomid beziehungsweise in Kombination mit Dexamethason eine Verlängerung der Überlebenserwartung erzielt werden.^{39,40} Durch die Applikation von Lenalidomid kombiniert mit Dexamethason konnte das Risiko für das Fortschreiten der Erkrankung und die Mortalität bei gleichem Patientenkontext gesenkt werden.⁴¹

1. EINLEITUNG

Prognose

Für viele Patienten die am Multiplen Myelom leiden ist die Entwicklung neuer Therapiemaßnahmen von großer Wichtigkeit. Die Erkrankung ist immer noch nicht heilbar und führt bei Patienten mit ungünstiger genetischer Prognose schon nach relativ kurzer Zeit zum Tod. Junge Patienten leben häufig länger als 10 Jahre nach Diagnosestellung.⁴² Das mediane Überleben liegt je nach ISS Stadium zwischen 3 und 5 Jahren (siehe Tabelle 1).^{22,43} Die große Variabilität der Überlebenswahrscheinlichkeit bei Gleichaltrigen spiegelt die Vielfältigkeit der Tumorentwicklungen wider, die auf genetischer Basis begründet ist.

Durch Verwendung der neuen Substanzen konnte eine signifikante Verbesserung des Überlebens in den letzten beiden Jahrzehnten erzielt werden. So liegt die 5-Jahres Überlebens-Wahrscheinlichkeit bei transplantablen Patienten heute bei über 70% und bei nicht-transplantablen Patienten bei etwa 50%.⁴⁴

Auch ergänzende (supportive) Therapiemaßnahmen, wie die Gabe von Bisphosphonaten, die Gabe von Erythropoetin und die Verbesserung der Behandlung komorbider Niereninsuffizienzen sind wichtige Bestandteile der Therapie und scheinen auf Grund der Verringerung indirekter Todesfälle (z.B. durch Frakturen, oder Infektionen) die Überlebenszeit zu verlängern.⁴⁵

Die Abschätzung der Prognose erfolgt heutzutage mittels genetischer Testung. Molekulare Marker für Hochrisikopatienten sind die IgH-Translokationen t(4; 14), t(14; 16) oder t(14; 20), sowie bestimmte Deletionen auf den Chromosomen 17 und 13. Auch ein erhöhter Plasmazell-Labeling-Index bedingt eine schlechtere Prognose.³⁶

1.2 Die Entwicklung von der naiven B-Zelle bis zur Plasmazelle

Im Laufe der Differenzierung von hämatopoetischen Progenitorzellen über unreife und reife B-Lymphozyten bis hin zu Plasmazellen wirken immer wieder Wachstums- und Differenzierungssignale auf die sich entwickelnden Zellen ein.⁴⁶ Dabei nehmen B-Lymphozyten (ähnlich den T-Lymphozyten) gegenüber allen anderen Zellen eine

1. EINLEITUNG

Sonderrolle bezüglich ihrer genetischen Ausstattung ein: Um ein breites immunologisches Spektrum zu generieren, werden Rezeptoren und Antikörper in 3 Schritten in ihrer antigenerkennenden Struktur verändert. Zunächst erfolgt dies während der Reifung im Knochenmark (1. somatische Rekombination, VDJ-Rearrangement), dann in sekundären lymphatischen Organen (2. somatische Hypermutation). Schließlich verlassen antikörperproduzierende B-Zellen das Keimzentrum und kehren als langlebige, ausdifferenzierte, nicht proliferierende Plasmazellen in das Knochenmark zurück. Dort verbleiben sie über 30 Tage bis zu mehreren Jahren und produzieren Antikörper verschiedener Klassen (3. Isotyp-Klassenwechsel, IgH-Switch).⁴⁷ Die im Knochenmark stattfindende somatische Rekombination führt während der B-Zell Reifung im Zuge des VDJ-Rearrangements zu Genumlagerungen, die mit Strangbrüchen und Deletionen einhergehen. Auch bei der somatischen Hypermutation und beim Isotyp-Klassenwechsel sind genetische Veränderungen essentiell für die Strukturvarianz der Antikörper.⁴⁸

1. EINLEITUNG

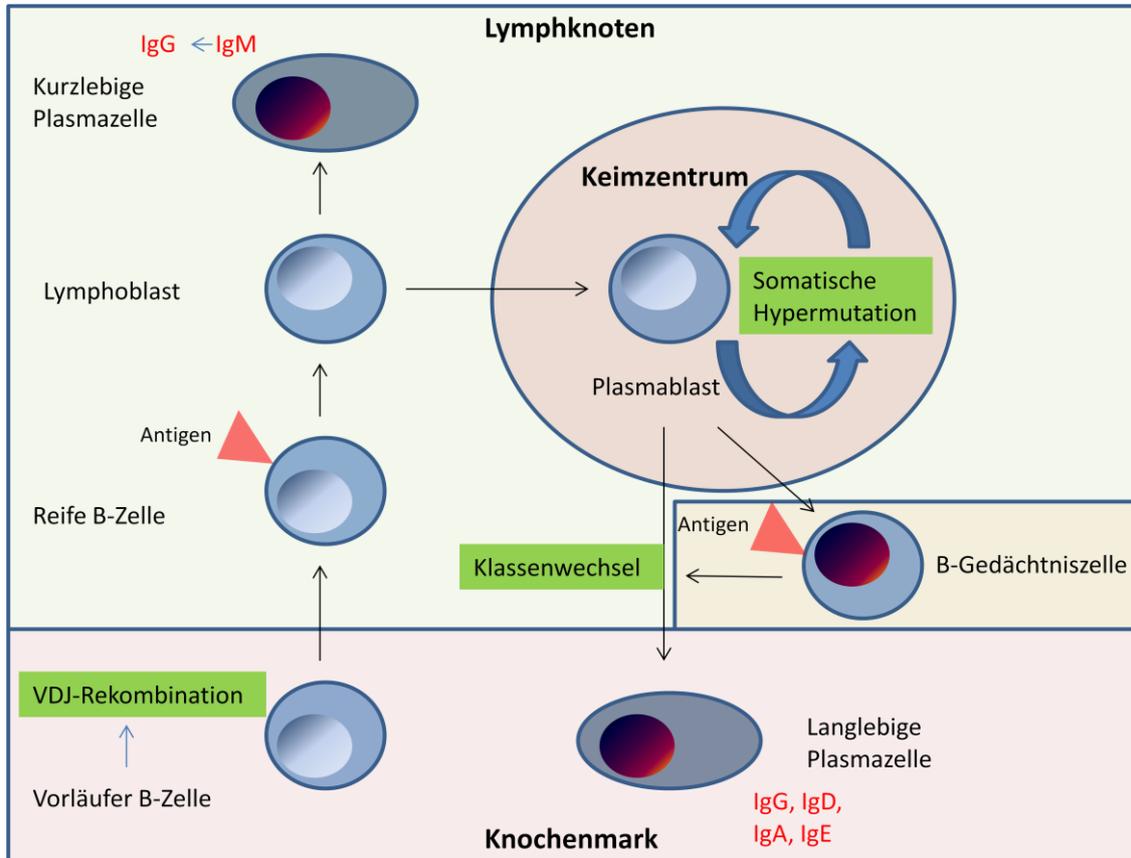


Abbildung 2

Normale B-Zell Entwicklung nach Kühl und Bergsagel (2002)⁴⁷

Die Vorläufer B-Zelle re-arrangiert ihre IgH V-, D- und J-Gene, so dass eine individuelle VDJ Gen-Kombination für die schwere Antikörperkette entsteht. Die Rekombination der IgL V- und J-Gene führt zur Bildung einer individuellen Kombination für die leichte Antikörperkette.⁴⁷

Die so gereifte B-Zelle verlässt das Knochenmark und verbleibt in sekundären lymphatischen Organen (z.B. Lymphknoten). Bei Antigenkontakt proliferieren B-Zellen und differenzieren zum Lymphoblast. Dieser differenziert zu einer kurzlebigen Plasmazelle oder wandert in das Keimzentrum. Kurzlebige Plasmazellen sezernieren zunächst IgM, können nach einigen Tagen jedoch auch einen Klassenwechsel erfahren.^{47,49} Im Keimzentrum durchlaufen die aktivierten Lymphoblasten mehrere Zyklen somatischer Hypermutation, bei der diejenigen B-Zellen mit hoher Affinität überleben. Post-Keimzentrums Plasmablasten führen Isotyp-Klassenwechsel durch und kehren als langlebige Antikörper-sezernierende Plasmazellen in das Knochenmark zurück. Diese können Antikörper der Klassen IgG, IgD, IgA und IgE sezernieren.⁴⁷

Laut einem Übersichtsartikel von Kuehl und Bergsagel (2002) entspringen 80% aller B-Zell Tumore Keimzentrums- oder Post-Keimzentrums-B-Zellen.⁴⁷ Ob die genannten Mutationsereignisse auch andere Protoonkogene betreffen, als die an den primären Ig-

1. EINLEITUNG

Translokationen beteiligten (siehe unten), ist noch unbekannt.⁴⁷ Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass auch nicht-Immunglobulin-Gene durch die somatische Hypermutation verändert werden.⁵⁰

1.3 Genetische Alterationen und molekulare Klassifikation

In nahezu allen Myelomzellen und meist auch in MGUS-Zellen sind strukturelle und numerische Chromosomenaberrationen bekannt.⁴⁷ Es wird unterschieden zwischen primären (frühen) und sekundären (späten) Mutationen. Darüber hinaus können die Malignome grob in hyperdiploide und nicht-hyperdiploide Tumore eingeteilt werden.

Frühe genetische Veränderungen – Primäre Translokationen

Im Zusammenhang mit den genannten Hypermutations- und Rekombinationsereignissen während der B-Zell Entwicklung, die mit Doppelstrangbrüchen einhergehen,⁵¹ werden häufige genetische Alterationen am Immunglobulin schwere Ketten (IgH) Lokus 14q32 beschrieben.⁴⁷ Diese Mutationen sind meist einfache reziproke Translokationen, die sich schon in frühen Phasen der Pathogenese ereignen und deshalb „Primäre Translokationen“ genannt werden. Dabei wird ein Protoonkogen (*FGFR3*, *CCDN1*, *MMSET* oder *c-MAF*) unter den Einfluss des IgH Promotors gebracht.^{47,52}

IgH Translokationen während VDJ-Rekombination, Klassenwechsel und somatischer Hypermutation sind bei verschiedenen B-Zell Lymphomen bekannt.^{47,53}

In malignen Plasmazellen findet man sie bei etwa 50% der MGUS Tumoren, 73% aller primären Myelomzellen und in über 90% aller Myelom Zelllinien (abgeleitet aus Plasmazell-Leukämien).^{47,52}

1. EINLEITUNG

Späte genetische Veränderungen – Sekundäre Translokationen und Mutationen

Wie schon erwähnt scheinen primäre genetische Ereignisse früh, noch während der B-Zell Entwicklung, sekundäre genetische Ereignisse später im Laufe der Pathogenese aufzutreten.⁵² Zu Letzteren zählen Dysregulationen von Myc, Ras und NF-κB aber auch viele andere Mutationen von Onkogenen oder Tumorsuppressor-Genen.²³

So geht beispielsweise die artifizielle Dysregulation von Myc im Mausmodell (eine Linie, die mit dem Alter eine hohe Erkrankungsrate an einer MGUS aufzeigt)⁵⁴ mit der Progression einer MGUS zum symptomatischen Myelom einher.⁵⁵

Des Weiteren scheinen Mutationen im Onkogen Ras eine wichtige Rolle im Multiplen Myelom einzunehmen. Mutiertes Ras ist im symptomatischen Myelom häufiger zu identifizieren (18 aus 58 Patienten) als in der MGUS (1 aus 20 Patienten).⁵⁶

Schließlich zeigen Daten aus den Arbeiten von Keats et al. (2007) und Annunziata et al. (2007), dass auch Mutationen des NF-κB Signalwegs in primären Myelomzellen sowie in einer Vielzahl von Myelomzelllinien gehäuft existieren.⁵⁷⁻⁵⁹

Hyperdiploide vs. nicht-hyperdiploide Tumoren, Verlust von genetischem Material auf Chromosom 13

Die molekulare Klassifikation des Multiplen Myeloms unterscheidet hyperdiploide zu nicht-hyperdiploiden Tumoren (siehe Abbildung 3): Eine Hälfte sind hyperdiploide Tumoren (48-75 Chromosomen) und sind mit einer besseren Prognose verbunden als die andere Hälfte (nicht-hyperdiploide: weniger als 48 oder mehr als 75 Chromosomen).⁶⁰ Zellen hyperdiploider Tumoren besitzen drei oder mehr Kopien bestimmter Chromosomen (3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 und 21).⁶¹

Primäre IgH Translokationen können häufiger in nicht-hyperdiploiden Tumoren detektiert werden, als in hyperdiploiden Tumoren.^{23,62,63} Sie sind mit einer schlechteren Prognose verbunden.⁶⁰

1. EINLEITUNG

Auch Verluste von genetischem Material auf Chromosom-13q, die ebenfalls häufiger in nicht-hyperdiploiden Tumoren vorkommen, sind mit einer schlechten Prognose assoziiert.^{47,52,60}

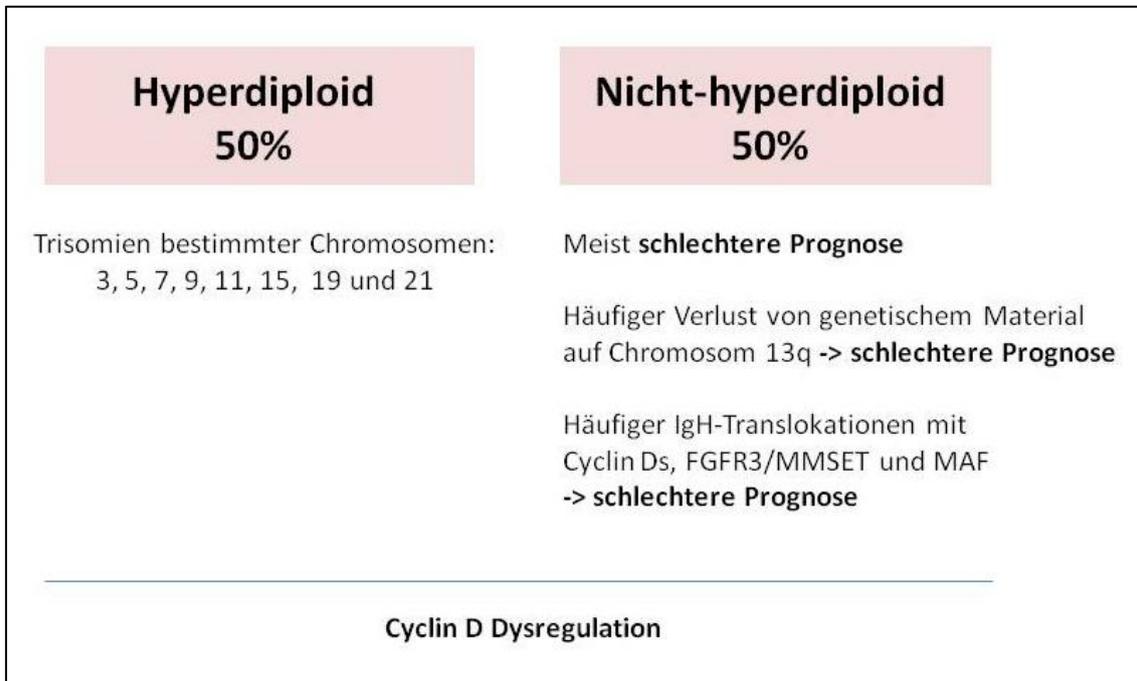


Abbildung 3

Genetische Konfiguration von MGUS und Myelom-Tumoren nach Chesi und Bergsagel (2013)²³

Beinahe alle Fälle von MGUS oder Tumoren von symptomatischen Myelompatienten weisen eine Dysregulation von Cyclin D auf.²³ Hyperdiploidie korreliert mit einer besseren Prognose. Nicht-hyperdiploide Tumore weisen häufig Deletionen auf Chromosom 13q, sowie bestimmte IgH-Translokationen auf. Diese und auch andere genetische Veränderungen (z.B. *TP53* Inaktivierung durch *Del(17p)*) sind mit einer schlechten Prognose assoziiert.⁶⁰ Angemerkt werden sollte aber auch, dass manche der prognostischen Korrelationen mit genetischen Läsionen für neue Therapieverfahren nur eingeschränkt gelten beziehungsweise aktuell neu kalkuliert und teilweise auch neu definiert werden.

Bei der MGUS und dem symptomatischen Myelom weisen beide Gruppen eine höhere mRNA Expression von Cyclin D1, Cyclin D2 oder Cyclin D3 auf als normale Plasmazellen.²³ Da nur ein geringer Prozentsatz von Tumoren eine geringe oder keine Cyclin D Expression aufweist, wird die Dysregulation von Cyclin D in der Pathogenese des Multiplen Myeloms als „frühes gemeinsames onkogenes Ereignis“ angesehen.²³ Dies ist sowohl auf reziproke Translokationen eines Cyclin D-Gens mit dem IgH Lokus

1. EINLEITUNG

(cis-Dysregulation), als auch auf indirekte Cyclin D Überexpression durch MAF (das Gen für Cyclin D2 ist Target von MAF; trans-Dysregulation) zurückzuführen.²³

Leider ist bislang noch nicht bekannt in welcher zeitlichen Sequenz diese Veränderungen (Aneuploidie, Chromosom 13 Verlust und Cyclin D Dysregulation) auftreten.⁵²

1.4 Onkogene Netzwerke

Die Analyse von genetischen Veränderungen mit Hilfe von Hochdurchsatz-Sequenzierungstechniken ist ein entscheidender Schritt zum besseren Verständnis der Pathogenese verschiedener Krebsarten. Für das Multiple Myelom untermauerten Sequenzierungen der Genome von Patientenzellen das Bild einer extremen genetischen Heterogenität, sowie das Vorhandensein und die Therapie-bedingte Selektion von Tumor-Subklonen.^{64,65} Neben der Bestätigung bereits bekannter Mutationen in diversen Signalwegen (z.B. Ras/MAPK, NF-κB) konnten bislang unbekannte genetische Veränderungen identifiziert werden (z.B. BRAF Mutationen), die jedoch grundsätzlich nur einen geringen Prozentsatz der Myelomfälle betreffen.⁶⁴

Die Vielzahl der Mutationen verschiedener Proteine bei gleichzeitig nur geringer individueller Häufigkeit könnte ein großes Problem für klinisch relevante Therapieansätze darstellen. Die onkogene Wirkung wird jedoch vermutlich von einer überschaubaren Anzahl von deregulierten Signalwegen vermittelt. Eine kombinierte Beeinflussung verschiedener Signalwege eines solchen onkogenen Netzwerks könnte daher das „genetische Chaos“ dieser Erkrankung in ein deutlich einfacheres und daher therapeutisch beherrschbares und nutzbares molekulares Behandlungskonzept übersetzen. Dabei beleuchtet die vorliegende Arbeit die Relevanz bestimmter Teile des NF-κB Systems als potentiellen Angriffspunkt. Zu erwähnen ist hierbei, dass beim Multiplen Myelom neben den genannten intrinsischen Einflüssen (aktivitätsfördernde Läsionen) auch extrinsische Einflüsse (Einflüsse des Mikromilieus) existieren. Da sich diese Arbeit auf die intrinsischen Aktivierungsmechanismen konzentriert, wird im Folgenden zunächst die Struktur des NF-κB Signalwegs dargestellt. Anschließend

1. EINLEITUNG

erfolgen die Beschreibung der Mutationen im NF- κ B System und die Hinführung zur konkreten Fragestellung.

1.5 Der Signalweg

Die Transduktion von externen Signalen zur Aktivierung des NF- κ B Systems geschieht über geeignete Rezeptoren. Dazu gehört die TNF-Rezeptor (TNF-R)-Superfamilie, die Toll-like-Rezeptor (TL-R)-Superfamilie sowie die Interleukin-1 Rezeptor (IL-1-R)-Superfamilie.⁶⁶ Aber auch B-Zell-Rezeptoren (BCR) und T-Zell-Rezeptoren (TCR) vermitteln Signale zur NF- κ B Aktivierung.⁶⁶ Das intrazelluläre Signal kann über den klassischen NF- κ B Signalweg oder über den erst später entdeckten alternativen NF- κ B Signalweg zur Transkriptionsaktivierung verschiedener Zielgene führen. Zu den vielfältigen Effekten von NF- κ B in Lymphozyten gehört die vermehrte Expression und Freisetzung von inflammatorischen Proteinen. Dabei vermittelt NF- κ B unter anderem das Überleben von Zellen durch seine anti-apoptotische Funktion.^{67,68} Der Signalweg ist notwendig für die Lymphozytendifferenzierung und bleibt auch in normalen Plasmazellen aktiviert.⁵⁹

1.5.1 NF- κ B Transkriptionsfaktoren

Die fünf NF- κ B Transkriptionsfaktoren NF- κ B1 (p105/50), NF- κ B2 (p100/52), RelA (p65), RelB und c-Rel gehören zur Familie der Rel-Proteine. Ihnen ist die Rel-Homology-Domäne (RHD) gemeinsam. Mit ihr ist es ihnen möglich, sequenzspezifische DNA Bindungen einzugehen und Homo- oder Heterodimere zu bilden. Im Zellkern erfolgt die Bindung an Zielsequenzen innerhalb von Promotoren oder Enhancern der NF- κ B Zielgene.^{67,69}

RelA, RelB und c-Rel sind die einzigen der fünf NF- κ B Proteine, die eine Transkriptions-Aktivierungs-Domäne (TAD) besitzen. Diese ist essentiell für die Transkriptions-Initiation. NF- κ B1 (p50) und NF- κ B2 (p52) (die Vorläufermoleküle sind p105 und p100) können auch als Transkriptionsrepressoren wirken, da sie keine TAD besitzen aber als Homodimer trotzdem sequenzspezifisch an DNA binden. Zu einer Initiierung der

1. EINLEITUNG

Transkription kommt es, wenn sie ein Heterodimer mit einem der drei Proteine bilden, die eine TAD besitzen.⁶⁹

Ist keine Signalwegsaktivierung vorhanden, binden heterodimere NF- κ B Transkriptionsfaktoren über repetitive Ankyrin-Sequenzen eines der drei zytosolständigen NF- κ B inhibierenden Proteine (I κ B- α , I κ B- β oder I κ B- γ) beziehungsweise im alternativen Signalweg wirkt p100 (als Vorläufer von p52) als auto-inhibitorisches Protein und lokalisiert RelB im Zytosol (siehe Abbildung 4).⁶⁶

1.5.2 Struktur des NF- κ B Signalwegs

Im nicht stimulierten Zustand bindet I κ B- α im Zellkern an p65, wonach der Komplex durch einen aktiven Transportmechanismus in das Zytoplasma gelangt, so dass in der Summe das Gleichgewicht der p65 Verteilung stark auf der Seite des Zytoplasmas liegt.⁷⁰ Der Transport erfolgt auf Grund einer auf I κ B- α lokalisierten Sequenz („Nuclear Export Sequence“ = NES).⁷⁰ Die Bindung von I κ B- α an der „Nuclear Localization Sequence“ (NLS) von p50 beziehungsweise p65 maskiert darüber hinaus das Signal zum Kerntransfer.⁷¹

Im Falle einer Aktivierung des klassischen NF- κ B Signalwegs kommt es nach einer phosphorylierungsabhängigen Ubiquitylierung durch die E3 Ligase „ β -Transducin-Repeat-Containing-Protein (β -TRCP) zur proteasomalen Degradation von I κ B- α , so dass eine Gleichgewichtsverschiebung von p65 zugunsten der nukleären Lokalisierung möglich wird.⁷²

Das Gen von I κ B- α ist wiederum ein Zielgen von p65 wodurch eine Rückkopplungs-Regulation des Signalwegs erfolgt.^{73,74}

Die Phosphorylierung von I κ B- α wird durch den I κ B- α Kinase (IKK)-Komplex katalysiert. Dieser besteht aus drei verschiedenen Proteinen: IKK- α , IKK- β und IKK- γ (Synonym: NF- κ B essential modulator, NEMO).⁷⁵⁻⁷⁹

Die Bedeutung und exakte Funktion der jeweiligen Komponenten des IKK-Komplexes ist noch nicht abschließend geklärt. So gibt es Hinweise, dass IKK- β essentiell für die I κ B- α -Kinase Aktivität ist.⁸⁰ IKK- γ nimmt offensichtlich ebenfalls eine wichtige (nicht

1. EINLEITUNG

katalytische) Rolle in der Übermittlung des klassischen Signalwegs ein, indem es eine Interaktion zwischen IKK- β und I κ B- α ermöglicht.⁸¹ IKK- α wurde in der Vergangenheit eine eher geringere Notwendigkeit für die katalytische Aktivität des IKK-Komplexes zugeschrieben, da die Aktivierung des IKK-Komplexes in Experimenten mit IKK- α Knockout-Mäusen nicht beeinträchtigt war.^{82,83} Neuere Arbeiten belegen jedoch, dass sowohl IKK- α , als auch IKK- β und IKK- γ für die Aktivierung von NF- κ B Zielgenen eine definierte Funktion einnehmen: In Experimenten mit Fibroblasten aus Mäuseembryonen wurden einige der I κ B- α regulierten Gene bei der Suppression einer der drei Proteine (z.B. IKK- α) stärker exprimiert als bei der Suppression eines anderen Mitwirkenden (z.B. IKK- β oder IKK- γ) und umgekehrt.⁸⁴

Der alternative Signalweg ist charakterisiert durch die IKK- α abhängige Phosphorylierung von p100 mit anschließender Prozessierung (partielle Proteolyse; entfernt die auto-inhibitorische Komponente) zu p52 (siehe Abbildung 4).^{85,86} RelB bildet mit p52 einen Komplex und gelangt so als transkriptionsaktiver Faktor in den Zellkern.⁸⁷ IKK- β und IKK- γ sind für die Prozessierung von p100 entbehrlich.⁸⁷

Die Regulation der beiden Signalwege oberhalb der IKKs ist vielschichtig und komplex. Beteiligt sind im Falle des klassischen Signalwegs unter anderem Deubiquitinasen (CYLD) und TNF-Rezeptor-assoziierte Proteine (TRAFs). Beim alternativen Signalweg sind neben den TRAFs auch Ubiquitin-Ligasen (cIAPs = cellular Inhibitor of Apoptosis) und die NF- κ B Inducing Kinase (NIK) essentiell. Die Aktivierung des klassischen Signalwegs auf Rezeptorebene erfolgt durch eine Vielzahl von extrazellulären Stimuli, wohingegen der alternative Signalweg nur durch wenige Liganden aktiviert wird. Zur weiterführenden Literatur siehe Hinz und Scheiderei (2014).⁸⁸

1.6 NF- κ B im Multiplen Myelom

Die Rolle von NF- κ B im Multiplen Myelom ist noch nicht endgültig geklärt. Der NF- κ B Signalweg hat vielschichtige Funktionen, wobei dessen Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung verschiedener Krebsarten kontrovers diskutiert wird.⁸⁹

1. EINLEITUNG

Wie schon in Kapitel 1.4 Onkogene Netzwerke erwähnt, bestätigten genomweite Analysen das in ihrer Gesamtheit relativ häufige Vorkommen von Mutationen des NF- κ B Systems im Multiplen Myelom, wobei diese Mutationen auf eine intrinsische Aktivierung dieses Systems hinauslaufen. Sie entkoppeln also potentiell das NF- κ B System der Myelomzellen von der Notwendigkeit einer externen Stimulierung durch das Mikromilieu, was möglicherweise zu einer tumorfördernden Situation beiträgt.

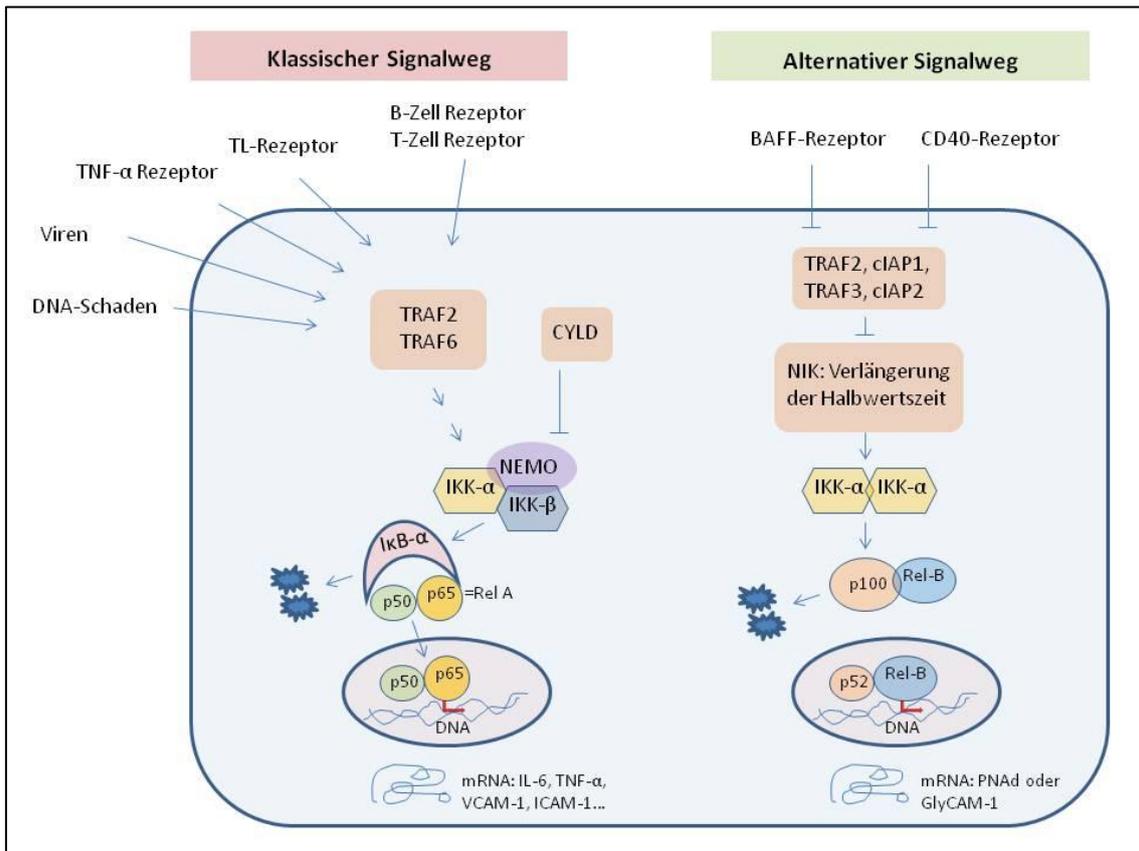


Abbildung 4

Der NF- κ B Signalweg nach Bonizzi et al. (2004) und Annunziata et al. (2007)^{57,67}

Die Aktivierung des alternativen Signalwegs wird nur durch wenige Rezeptoren der TNF-R Superfamilie ermöglicht, wohingegen eine Aktivierung des klassischen Signalwegs durch eine Vielzahl von Rezeptoren vermittelt wird.⁶⁹

Gemeinsam ist allen Stimuli des klassischen Signalwegs die Aktivierung des IKK-Komplexes, der seinerseits das NF- κ B Inhibitorprotein I κ B- α phosphoryliert und damit dessen Degradation initiiert. NF- κ B Transkriptionsfaktoren werden folglich freigesetzt und können nach Translokation in den Zellkern die Expression ihrer Zielgene vorantreiben. Ebenfalls dargestellt sind regulatorische Proteine oberhalb von IKK: TRAF2 und TRAF6 führen zu einer Aktivierung von IKK, wohingegen CYLD der Phosphorylierung von IKK entgegenwirkt.

1. EINLEITUNG

Im Falle des alternativen Signalwegs führen die Stimuli zur Aktivierung eines IKK- α Homodimers, das die partielle Degradation des NF- κ B Inhibitorproteins p100 zum Transkriptionsfaktor p52 initiiert, der dann als p52/RelB-Komplex in den Zellkern transloziert. Auch hier sind die Regulatoren oberhalb von IKK- α dargestellt: Die Akkumulation von NIK in Abwesenheit der negativ-Regulatoren TRAF2, TRAF3, cIAP1 und cIAP2 führt zu einer Phosphorylierung von IKK- α .

Hinweise für die Relevanz des NF- κ B Systems im Multiplen Myelom ergaben sich aus Studien, in denen Mutationen im NF- κ B System identifiziert werden konnten (17% aller primären Myelomzellen und 42% aller Myelomzelllinien waren betroffen).^{57,59} In Form von aktivitätsfördernden Läsionen finden sie sich vor allem in Genen von positiven NF- κ B Regulatoren wie NIK, NF κ B1, NF κ B2, CD40, LT β R und TACI, während Defektmutationen eher in Genen von negativen NF- κ B Regulatoren wie TRAF3, cIAP1, cIAP2, CYLD und TRAF2 auftreten.^{57,59} Einigen dieser Läsionen ist die Stabilisierung von NIK gemeinsam, wodurch es zu einer konstitutiven Aktivierung beider Signalwege zu kommen scheint.^{57,59} Ob die Mutationen jedoch tatsächlich zu einer Dysregulation des klassischen, beziehungsweise des alternativen Signalwegs führen oder ob ihre potenziell onkogene Wirkung auch auf NF- κ B unabhängigen Effekten von z.B. NIK oder IKK- α beruhen könnte, ist unklar.

Eine pharmakologische Blockade des NF- κ B Systems, das heißt im Wesentlichen des klassischen Signalwegs mit IKK- β Inhibitoren, führte in Tierexperimenten zu einer mehr oder weniger ausgeprägten Verringerung des Tumorwachstums.^{6,10}

Zellkulturexperimente mit dem bislang spezifischsten IKK- β Inhibitor MLN120b zeigten eine Suppression von NF- κ B Zielgenen nach Applikation und eine gewisse Wachstumsverringerng bei Zelllinien, deren NF- κ B Zielgene herunter reguliert waren.⁵⁷ Allerdings treffen IKK- β Inhibitoren meist zu einem gewissen Grad auch IKK- α und vermitteln wie nahezu alle pharmakologischen Wirkstoffe konzentrationsabhängig unterschiedliche Effekte auf die behandelten Zellen.⁹⁰ Interessanterweise ist die anti-Myelom Wirkung des relativ spezifischen IKK- β Inhibitors MLN120b in vielen Zelllinien nur gering und variabel ausgeprägt.⁷ Ob die mit verschiedenen IKK Inhibitoren beobachteten Effekte also tatsächlich auf die Blockade des klassischen und/oder alternativen Signalwegs zurückzuführen sind bleibt weitgehend unklar.

1. EINLEITUNG

Daher war es das Ziel dieser Arbeit mittels Einsatz von RNAi (RNA Interferenz) eine spezifischere molekulare Suppression von IKK- β in Myelomzelllinien herbeizuführen und die Effekte der Proteindepletion auf das Überleben und die Viabilität der Zellen zu untersuchen. Dieser zu pharmakologischen Untersuchungen komplementäre Ansatz sollte Aufschlüsse über die tatsächliche Relevanz der IKK-Proteine als Angriffspunkte für potentielle Therapieoptionen im Multiplen Myelom liefern.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Analyse des Genoms von Myelomzellen bewies eine immense genetische Heterogenität: Sowohl in hyperdiploiden, als auch in nicht-hyperdiploiden Tumoren konnten diverse Chromosomenaberrationen, Translokationen, Deletionen und Punktmutationen identifiziert werden. Eine Vielzahl von Myelomzelllinien weisen Mutationen im NF- κ B Signalweg auf, zeigen eine konstitutive NF- κ B Signatur und sind sensitiv für pharmakologische IKK- β Inhibitoren. Dies spricht dafür, dass die entsprechenden Zellen hinsichtlich ihrer Viabilität abhängig vom klassischen NF- κ B Signalweg sein könnten. Das publizierte Wirkspektrum und die Spezifität pharmakologischer NF- κ B Inhibitoren sind allerdings sehr uneinheitlich, mit einer Tendenz zu geringeren anti-Myelom Wirkungen bei spezifischeren Inhibitoren. Daher ist die wirkliche potentielle Bedeutung des klassischen beziehungsweise alternativen NF- κ B Signalwegs für eine Myelomtherapie nach wie vor ungeklärt.

Ziel der hier vorliegenden Doktorarbeit ist es, mittels spezifischer RNAi-vermittelter Suppression von IKK- α , IKK- β oder IKK- γ , eine Blockade des klassischen und/oder alternativen NF- κ B Signalwegs herbeizuführen. Dazu wurden durch Elektroporation shRNA-Expressionsvektoren oder kommerziell erhältliche Stealth-siRNAs in Myelomzellen transfiziert, wobei 3 verschiedene Myelomzelllinien (AMO-1, MM1.S und L363) verwendet wurden. ShRNA-Expressionsvektoren mussten zunächst konstruiert und hinsichtlich ihrer Eignung für einen effizienten Knockdown getestet werden. Die Stealth-siRNA kam später als alternativer RNAi Suppressionsansatz zum Einsatz.

Transfizierte Zellen wurden selektiv angereichert und im Zeitraum von 2-5 Tagen nach der Transfektion mittels durchflusszytometrischer Methoden auf ihr Überleben und ihr Proliferationsverhalten hin untersucht. Western-Blot-Analysen gaben Aufschluss über die Stärke und das Zeitfenster der effektiven IKK Proteindepletion. Um zu überprüfen ob die Depletion von IKK- α , IKK- β oder IKK- γ mittels shRNA-Expressionsvektor oder Stealth-siRNA für eine nachhaltige Unterbrechung des NF- κ B Signalwegs ausreichte,

1. EINLEITUNG

wurde der Effekt der Suppression der I κ B- α Phosphorylierung und Degradation nach Stimulation mit TNF- α untersucht.

Darüber hinaus wurde die Wirkung des IKK- β Inhibitors TPCA auf die Viabilität der Myelomzellen untersucht. Auch hier wurde die Effektivität der IKK- β Blockade nach TNF- α Stimulation anhand der Phosphorylierung und Degradation von I κ B- α analysiert.

Zusammengefasst wurden folgende Fragestellungen untersucht:

1. Führt die Transfektion der shRNA-Expressionsvektoren oder der Stealth-siRNA zu einer substanziellen Depletion von IKK- α , IKK- β oder IKK- γ ?
2. Wie wirkt sich die spezifische Depletion von IKK- α , IKK- β oder IKK- γ mittels shRNA-Expressionsvektor oder mittels Stealth-siRNA im Vergleich zu TPCA auf die Viabilität von AMO-1, MM1.S und L363 Zellen aus?
3. Führt die spezifische Depletion von IKK- β mittels shRNA-Expressionsvektor oder mittels Stealth-siRNA im Vergleich zu TPCA zu einer verminderten Phosphorylierung und Degradation von I κ B- α nach TNF- α Stimulation?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Zellkulturen

Die Verwendung von Myelom Zelllinien bietet, im Gegensatz zu primär gewonnenen Myelomzellen, auf Grund ihres unbeschränkten Wachstums die Möglichkeit, viele Experimente in geringer Zeit durchzuführen. Außerdem können an Zelllinien bestimmte Manipulationen (z.B. Transfektion mittels Elektroporation) durchgeführt werden, die mit primären Zellen auf Grund der beschränkten Zellzahl nicht möglich wären. Schließlich sind Myelom Zelllinien kommerziell erhältlich, während die Organisation von primären Myelomzellen mit einem erheblichen logistischen und bürokratischen Aufwand verbunden ist.

Für die Experimente dieser Arbeit wurden die Myelomzelllinien AMO-1, L363 und MM.1S (alle EBV negativ) verwendet. Generell lassen sich Plasmide schlecht in Myelomzellen transfizieren, weshalb auf die weiter hinten beschriebene Transfektions- und Anreicherungsmethode zurückgegriffen wurde (siehe Abbildung 5 und Abbildung 6). Diese konnte mit den hier gewählten Linien zufriedenstellend durchgeführt werden. AMO-1 stammt von einer 64 Jahre alten Frau mit einem Plasmazytom, wobei die etablierte Zelllinie bei ihrer Gewinnung 1984 licht- und elektronenmikroskopische Eigenschaften von Plasmazellen zeigte.⁹¹

L363 stammt von einer 36 Jahre alten Frau mit einer Plasmazell-Leukämie (57% Plasmazellen im peripheren Blut). Die humane Myelomzelllinie L363 darf nicht mit der aus der selben Blutprobe durch Inokulation von EBV entstandenen L363 + EBV (LCL) - Zelllinie verwechselt werden.⁹²

AMO-1 und L363 wurden aus der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen.

2. MATERIAL UND METHODEN

MM.1 (bezogen von LGC Standards, Wesel) ist eine Zelllinie, die im Jahr 1989 aus einem Patienten mit einem IgA Myelom etabliert wurde.⁹³ Dieser entwickelte nach Behandlung mit Dexamethason eine Resistenz gegenüber dem Glukokortikoid, wodurch nun 2 Zelllinien eines Ursprungs entstanden sind: Die Glukokortikoid-sensible Variante MM.1S und die resistente Zelllinie MM.1R.⁹⁴

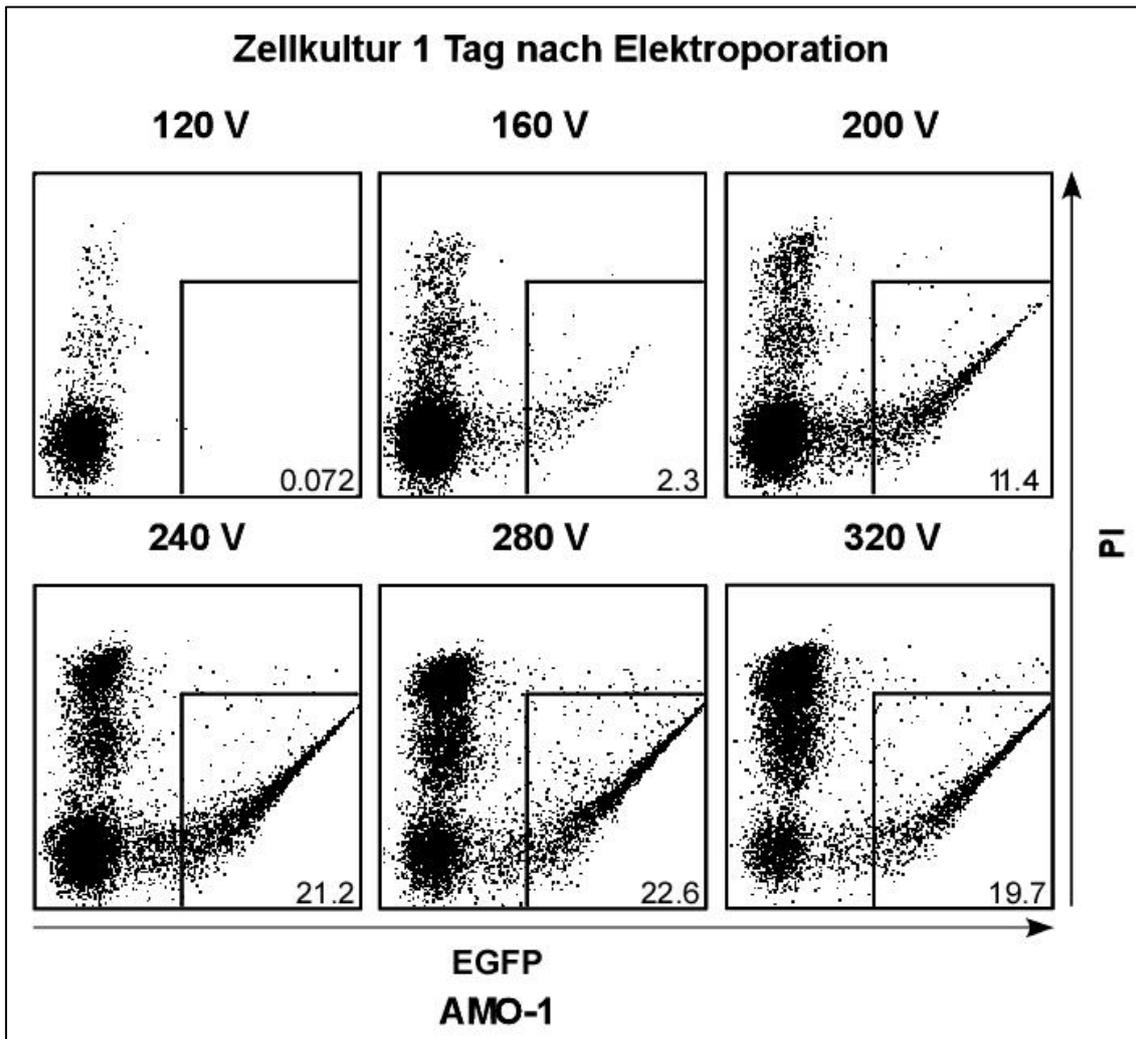


Abbildung 5

Beispiel einer Voltreihe für AMO-1 Zellen 1 Tag nach Elektroporation (FACS-Analyse). Die Abszisse markiert die EGFP-Intensität als Maß für die erfolgreiche Transfektion, die Ordinate markiert die Propidiumjodid-Fluoreszenz als Maß für den Vitalitätszustand der Zellen (Daten entnommen aus Steinbrunn et al. (2014))⁹⁵

Es erfolgte die Transfektion des EGFP-Expressionsplasmids in AMO-1 Zellen durch Elektroporation der Zellen bei verschiedenen Voltzahlen. Es ist ersichtlich, dass sich die Transfektionseffizienz mit steigenden

2. MATERIAL UND METHODEN

Voltzahlen bis zu einem gewissen Grad verbessert (beachte EGFP positive, PI negative Fraktion im jeweiligen Kasten rechts unten), dann aber auf Grund eines vermehrten Zelltods stagniert oder sogar abfällt (vergleiche 240V, 280V und 320V und beachte die Zunahme der EGFP negativen, PI positiven Fraktion jeweils links oben). Da der hier erreichte Anteil transfizierter Zellen unzureichend zur Beurteilung der erwünschten shRNA Suppressionsexperimente war, erfolgte das weiter unten beschriebene Aufreinigungsverfahren.

Kulturbedingungen

Myelomzellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ in einem chemisch definierten (siehe Tabelle 2) Medium gehalten. RPMI 1640-Medium diente als Basismedium und wurde durch proliferationsfördernde, nährstoffreiche und antibakterielle Reagenzien ergänzt.

Tabelle 2

Mengenangaben der Zusätze	Zusätze in 500ml RPMI 1640-Medium
50ml	Fötales Rinderserum (FBS)
5ml	L-Glutamin (200mM)
5ml	Natriumpyruvat (100mM)
5ml	Penicillin (10000U/ml)
100µg/ml	Streptomycin (10mg/ml)

Auf Grund der unterschiedlichen Eigenschaften hinsichtlich Proliferation und Adhärenz, war es wichtig, schnell wachsende Zelllinien wie AMO-1 und L363 öfter zu splitten als die eher langsam wachsenden MM.1S-Zellen. Letztere hafteten am Boden der Zellkulturflasche (semi-adhärenz) und mussten mit einem Zellschaber gelöst werden, bevor die Kultur gesplittet werden konnte. Da bei den mit den Zellen durchgeführten Elektroporations- und Aufreinigungsverfahren stets mit Zellverlusten zu rechnen war, mussten angemessen große Zellzahlen vor Durchführung dieser Anwendungen in Kultur gehalten werden. Dabei war grundsätzlich besonders direkt vor Elektroporation darauf zu achten, dass die Zellen nicht zu dicht wuchsen (<500 000 Zellen/ml). Eine zu hohe Zelldichte in der Kultur kann tendenziell zu geringerer Elektroporations-Effizienz führen.

2.1.2 Transiente Transfektion von Myelomzelllinien mittels Elektroporation

Die Elektroporation wurde in einem Gemisch aus RPMI 1640-Medium (ohne Zusätze), MM-Zellen und der zu transfizierenden DNA durchgeführt. Dafür wurden $1,5 \times 10^7$ Zellen in 500µl Medium aufgenommen und in eine Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand = 4mm) überführt, in der die Elektroporation bei 280V (für AMO-1 und L363 Zellen) beziehungsweise 310V (für MM.1S Zellen) vonstattenging (Kondensatoreinstellung: jeweils 950µF; exponentiell abnehmende Entladung). Nach Elektroporation war darauf zu achten, dass die Zellen zur Regeneration schnell aus der Küvette in ein Gefäß mit 500µl frischem Medium ohne Zusätze überführt wurden, wo sie für 15 Minuten bei 37°C lagerten um anschließend in die reguläre Zellkultur überführt zu werden (RPMI 1640-Medium mit Zusätzen).

Zu den transfizierten Nukleinsäuren gehörten das für die Suppression essentielle shRNA Expressionsplasmid, beziehungsweise die gekaufte siRNA. Diese Reagenzien wurden mit einem Proteinexpressionsplasmid für EGFP co-transfiziert. Zellen, die nach der Elektroporation EGFP positiv sind, haben auch sämtliche anderen im Elektroporationsmix vorhandenen Nukleinsäuren aufgenommen. Die Transfektionseffizienz der Elektroporation betrug meist deutlich unter 50%. Aus diesem Grund war es erforderlich die lebenden sowie gleichzeitig EGFP-positiven Zellen selektiv anzureichern.

Für beide Parameter sind Propidiumiodid (PI) und EGFP die geeigneten Marker, weshalb deren Messung mittels FACS (Fluorescence-Activated-Cell-Sorting)-Analyse durchgeführt wurde. Zuvor wurden mittels OptiPrep die stark geschädigten Zellen (PI-positiv) von den strukturell integren Zellen (PI-negativ) abgetrennt. Dazu wurden die elektroporierten Zellen in einem Gemisch aus 750µl OptiPrep Lösung und 2,5ml Medium pro Ansatz suspendiert und nach der Überschichtung mit 200µl PBS 5 Minuten bei 3000U/min zentrifugiert. Tote Zellen, deren Membranen durchlässig sind, werden im Gegensatz zu gesunden Zellen vom Medium durchflutet und wandern im Zentrifugationsröhrchen der Zentrifugalkraft entsprechend nach unten. Unversehrte

2. MATERIAL UND METHODEN

Zellen wandern auf Grund der geringeren Dichte des Zytosols nach oben bis sie an die Grenzfläche zum PBS gelangen, wo sie sich sammeln. Diese Zellen wurden entnommen und anschließend mittels Zell-Sorter (FACS) nach EGFP-positiven Zellen aufgereinigt. Dadurch konnte der Anteil EGFP-positiver Zellen maximiert werden (siehe Abbildung 6).

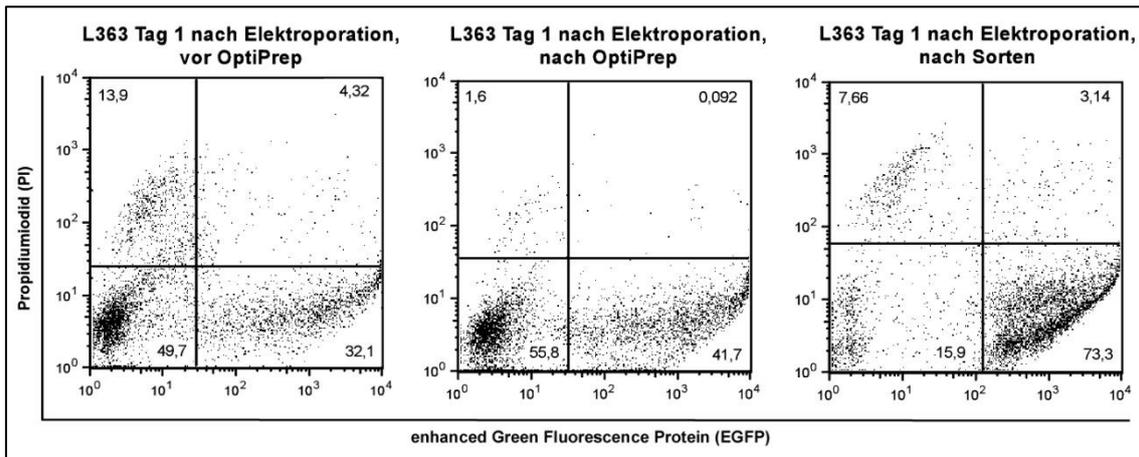


Abbildung 6

FACS Graphiken von L363-Zellen an Tag 1 nach Elektroporation

Links: Die elektroporierten Zellen (siehe linker unterer Quadrant: 49,7% der Zellen) sind zwar lebendig (PI-negativ), haben als EGFP-negative Zellen aber keine oder nur wenig Plasmid-DNA aufgenommen.

Mitte: Nach OptiPrep vermindert sich der PI-positive Anteil (siehe die beiden oberen Quadranten).

Rechts: Durch die Aufreinigung nach EGFP-positiven Zellen mittels FACS wird der Anteil lebendiger und stark transfizierter Zellen stark verbessert (rechter unterer Quadrant: 73,3%).

2.1.3 Behandlung mit dem IKK β -Inhibitor TPCA

MM.1S Zellen wurden 2 Stunden mit 10 μ M TPCA beziehungsweise zur Kontrolle mit einer äquivalenten Menge des Lösungsmittels DMSO inkubiert, und es wurde anschließend eine TNF- α Stimulation (100ng/ml, je nach Experiment sofort und nach 3 beziehungsweise 10 Minuten) durchgeführt. Eine Blockade des Signalwegs kann im Western-Blot, z.B. durch Färbung auf (phospho-)I κ B- α , nachgewiesen werden.

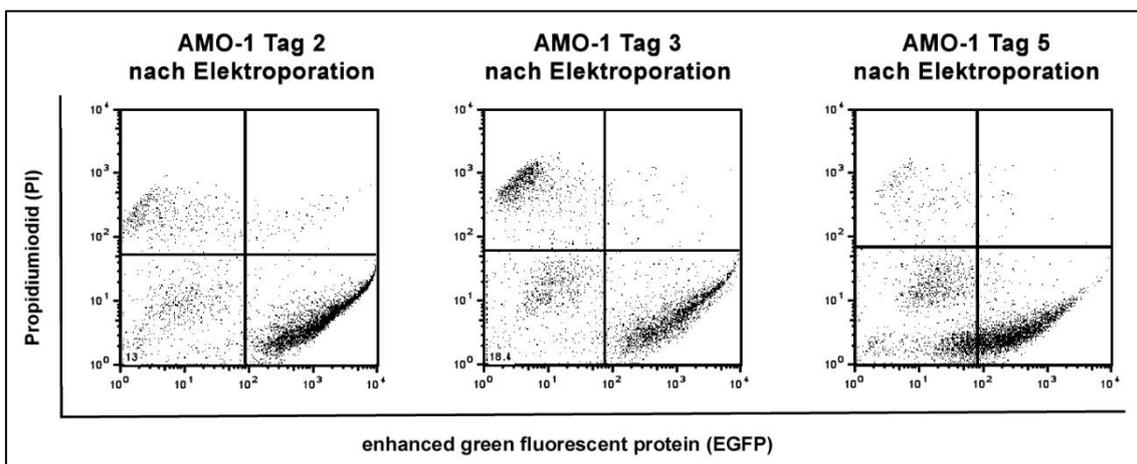
Zwecks Messung der Apoptoserate und Abschätzung der Proliferationsrate (Abnahme der EGFP Intensität) der Myelomzelllinien, wurden in einer 96-Well Platte pro Well 10⁴

2. MATERIAL UND METHODEN

Zellen ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen (20, 10, 5, 2,5, 1,25 und 0,625 μM ; jeweils Doppelwerte) des Inhibitors behandelt. Am zweiten und dritten Tag nach TPCA-Zugabe wurden die Ansätze mittels Durchflusszytometrie (FACS) analysiert.

2.1.4 Zelltodmessungen mittels FACS

Zelltodmessungen wurden mittels FACS Analyse vorgenommen. Hierbei werden die Zellen zuvor mit PI behandelt. Nur die Zellmembranen spät-apoptotischer/nekrotischer Zellen sind durchlässig für PI, welches in die DNA interkaliert und Fluoreszenzlicht mit einem Emissionsgipfel bei 617nm emittiert. Mit Hilfe von EGFP, das andere Absorptions- und Emissionsmaxima besitzt, kann durch die FACS Analyse eine Aussage sowohl zur Integrität von Zellen (PI) als auch über deren Transfektionserfolg (EGFP) getroffen werden. Zusätzlich kann die EGFP-Intensität der Zellen einen Hinweis auf eine erfolgte Proliferation geben, weil das EGFP Expressionsplasmid durch Zellteilungen verdünnt wird und somit letztlich auch die EGFP Intensität abnimmt. Auch die Konzentration des co-transfizierten pSUPER Vektors nimmt vermutlich im Zeitverlauf ab.



2. MATERIAL UND METHODEN

Abbildung 7

FACS Ergebnisse von AMO-1 Zellen an Tag 2, 3 und 5 nach Elektroporation

Die Verschiebung der EGFP-positiven Zellen nach links entspricht der Proliferations-bedingten Verdünnung des EGFP-Plasmids (vergleiche insbesondere Tag 3 mit Tag 5).

Spezifischere Aussagen zur Apoptose lassen sich mit Fluoreszenzfarbstoff (FITC) - markiertem Annexin V erhalten. Annexin V ist ein Protein, das spezifisch an Phosphatidylserin bindet, welches sich bei gesunden Zellen auf der Innenseite der Zellmembran befindet. Leiten Zellen Apoptose ein, tritt es vermehrt auch an der Außenseite der Membran auf, wo es durch Annexin V gebunden werden kann. Die Annexin V Färbung markiert somit zusätzlich zu spät apoptotischen Zellen (zerstörte Membranen, freier Zugang ins Zellinnere) auch früh apoptotische Zellen (noch intakte Membranen, kein freier Zugang ins Zellinnere).

Annexin V-FITC wurde zusätzlich zu PI bei nicht-transfizierten, TPCA behandelten Zellen angewandt, um frühe Anzeichen der Apoptose detektieren zu können.

Zur Durchführung der Annexin V-FITC-Markierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde zum Zellpellet 200µl Annexin V Bindepuffer mit 5µl PI (Konzentration der Stammlösung: 20µg/ml) und 2µl Annexin V-FITC (Konzentration der Stammlösung wird vom Hersteller nicht angegeben, Bestell-Nummer: BMS306FI; Bender MedSystems) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten erfolgte die FACS Messung.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 shRNA-Expressionsvektor

Für die Klonierung einer Nukleotidsequenz, die für die Bildung einer shRNA als DNA-Vorlage dienen soll, wurde das Vektorsystem pSUPER (= Suppression-of-Endogenous-RNA) verwendet.⁹⁶ Dieses Plasmid besitzt, neben einer Expressionskassette für Ampicillin einen H1-RNA Polymerase III Promotor. Die spezifischen Sequenzen zum Bau

2. MATERIAL UND METHODEN

einer kompletten shRNA Expressionskassette werden direkt downstream des H1-Promotors in die *Bgl* II/*Hin* dIII Restriktionsschnittstellen einkloniert und enthalten am 3' Ende eine (T)₅-Sequenz, die für die RNA Polymerase III als Stop-Signal fungiert. T7 oder T3 Primer eignen sich zur Verifizierung der Sequenz der einklonierten DNA.

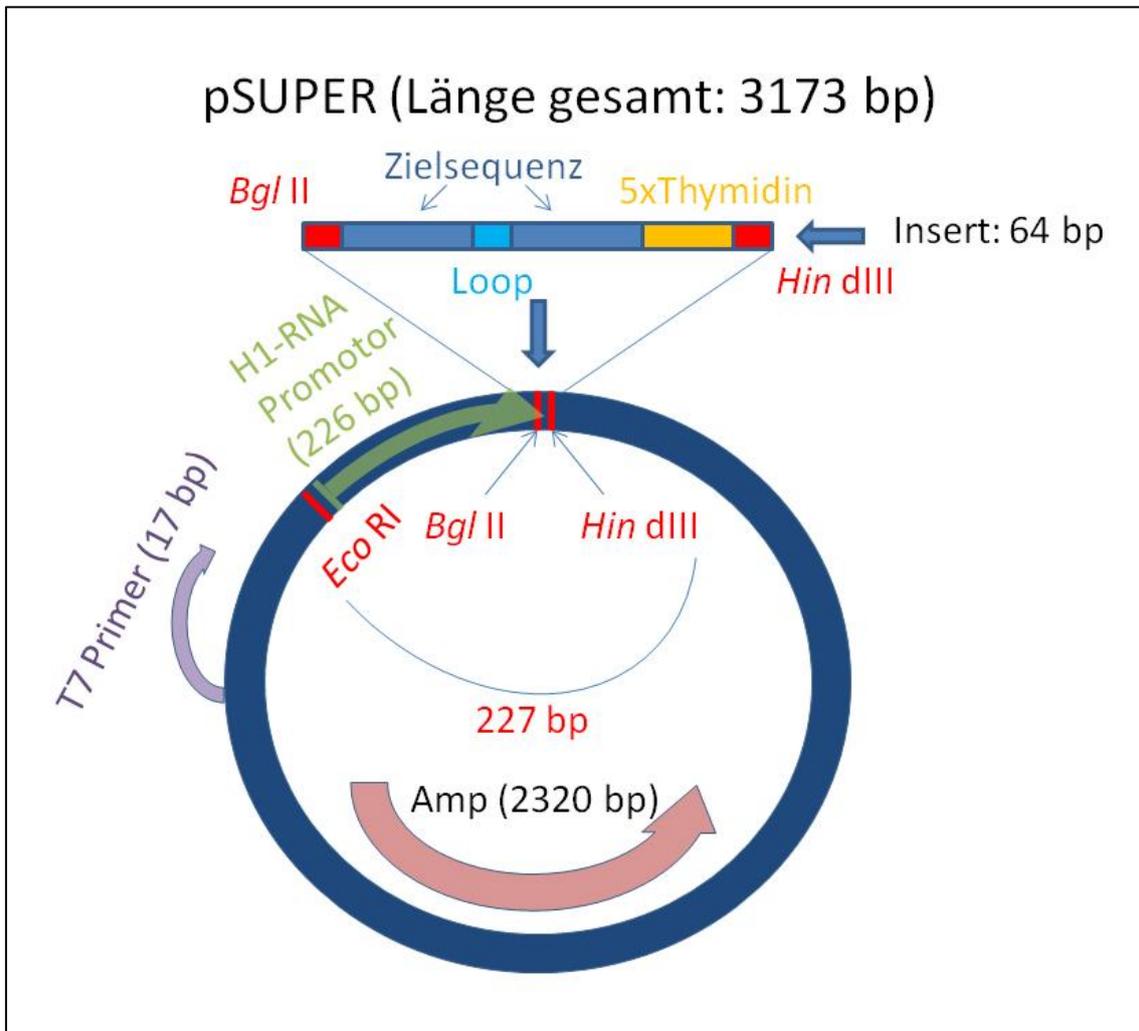


Abbildung 8

Schematische Darstellung des pSUPER Vektors nach dem pSUPER Manual von Oligo Engine⁹⁷

Zur Klonierung von dsOligonukleotidkassetten (Insert) werden die Restriktionsenzyme *Bgl* II und *Hin* dIII verwendet. Zur Überprüfung ob das Insert in den Vektor integriert wurde, erfolgte nach Ligation, Transformation und DNA-Minipräparation ein diagnostischer Verdau mit *Eco* RI und *Hin* dIII (siehe 2.2.10 Diagnostischer Verdau).

Der H1-RNA Promotor wird für die Transkription der shRNA (short-hairpin RNA) mittels RNA Polymerase III benötigt.

Das Ampicillin Resistenzgen (Amp) dient zur Selektion von transformierten Bakterien.

2. MATERIAL UND METHODEN

pSUPER wurden die Komponenten so designt, dass am 5' Ende ein „*Bgl* II“- und am 3' Ende ein „*Hin* dIII“ kompatibler Überhang entsteht (die *Bgl* II Schnittstelle wird dabei durch die Klonierung nicht wieder regeneriert). Die 5 Thymin-Nukleotide am 3' Ende führen zum Abbruch der Transkription. nt = Nukleotid.

Das durch Transkription und Umfaltung entstandene shRNA Molekül mit Schleife wird endogen mittels des Enzyms DICER prozessiert, wobei eine Schleifen-freie doppelsträngige Short- Interfering-RNA (siRNA) entsteht. Nach Anlagerung der siRNA an eine komplementäre mRNA, wird diese durch den RNA-Induced-Silencing-Complex (RISC) zerstört (für weiterführende Literatur siehe das Review von Tijsterman (2004)).⁹⁹ Der gekaufte, aus jeweils 25 Basen bestehende, chemisch modifizierte RNA Doppelstrang („Stealth-siRNA“, Invitrogen) funktioniert nach dem gleichen Prinzip, wobei keine Prozessierung durch DICER erforderlich ist.

Invitrogen wirbt für die Stealth-siRNA mit Vorteilen gegenüber herkömmlicher siRNA:

- Effektivere Suppression
- Höhere Spezifität
- Bessere Stabilität
- Geringere zelluläre Toxizität

Die Stealth-siRNA wurde bestellt, als schon Experimente zur Testung der designten IKK- β (2-5) shRNA Vektor-Expressionskonstrukten gemacht wurden. Letztendlich zeigte sich, dass die Stealth-siRNA ähnlich stabil war und insgesamt sogar eine bessere Suppression von IKK- β bewirkte.

Nach dem Design der folgenden vier Zielsequenzen (fett hervorgehoben) wurden die 64 nt langen Oligonukleotide bei BioTeZ (Berlin) bestellt:

IKK β 2 (Vorwärtsstrang):

GATCCCC**CCAATAATCTTAACAGTG**TTCAAGAG**CACTGTTAAGATTATTGGG**TTTTTGGAAA

(Sequenz entnommen aus Hu et al. (2008))⁹⁸

IKK β 2 (Rückwärtsstrang):

AGCTTTTCCAAAA**CCAATAATCTTAACAGTG**TCTCTTGAA**CACTGTTAAGATTATTGGG**GGG

IKK β 3 (Vorwärtsstrang):

2. MATERIAL UND METHODEN

GATCCCC**GAGGAATCTCGCCTTCTTC**TTCAAGAGA**GAAGAAGGCGAGATTCCTC**TTTTTGAAA

IKK β 3 (Rückwärtsstrang):

AGCTTTTCCAAAA**GAGGAATCTCGCCTTCTTC**TCTCTTGAA**GAAGAAGGCGAGATTCCTC**GGG

IKK β 4 (Vorwärtsstrang):

GATCCCC**CGCTGGACGACCTAGAGGA**TTCAAGAGAT**TCCTCTAGGTCGTCCAGCG**TTTTTGAAA

IKK β 4 (Rückwärtsstrang):

AGCTTTTCCAAAA**CGCTGGACGACCTAGAGGA**TCTCTTGAA**TCCTCTAGGTCGTCCAGCG**GGG

IKK β 5 (Vorwärtsstrang):

GATCCCC**GCAGAAGGCGCTGGA**ACTGTTCAAGAGAT**CAGTTCCAGCGCCTTCTGC**TTTTTGAAA

IKK β 5 (Rückwärtsstrang):

AGCTTTTCCAAAA**GCAGAAGGCGCTGGA**ACTGTTCTCTTGAA**CAGTTCCAGCGCCTTCTGC**GGG

Die synthetisierten (und HPLC-gereinigten) Oligonukleotide wurden in *Aqua dest.* gelöst, so dass die Konzentration der Stammlösung 100pmol/ μ l betrug.

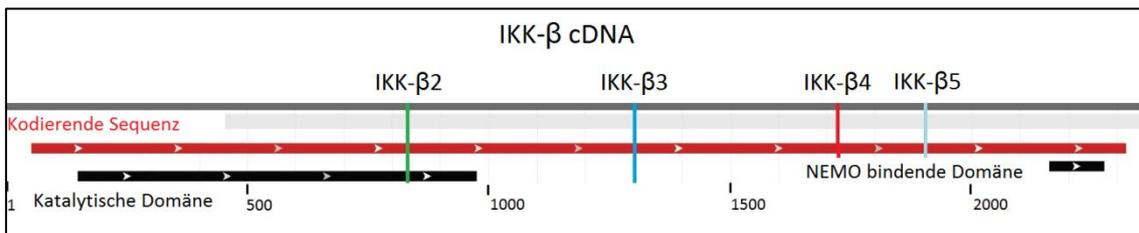


Abbildung 10

Positionen der shRNA-Zielsequenzen in einer humanen IKK- β cDNA (NCBI: FLJ79317, Gesamtlänge: 2360 Basenpaare)

IKK- β 2 (grün): bp 831 - bp 849

IKK- β 3 (blau): bp 1301 - bp 1319

IKK- β 4 (rot): bp 1723 - bp 1741

IKK- β 5 (türkis): bp 1904 - bp 1922

Kodierende Sequenz (rot): bp 54 - bp 2318.

Katalytische Domäne (schwarz, links): bp 150 - bp 974.

NEMO bindende Domäne (schwarz, rechts): bp 2160 - bp 2273.

bp = Basenpaar

Quelle: NCBI: *Homo sapiens* cDNA, FLJ79317 complete cds, highly similar to Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta (EC 2.7.11.10).

2. MATERIAL UND METHODEN

Die doppelsträngigen Stealth-siRNAs gegen IKK- β und IKK- α wurden bei Invitrogen/Life-Technologies bestellt und in RNase-freiem Wasser gelöst. Die Konzentration der Stammlösung betrug 300 μ M.

Ikkb-2 (IKK- β Stealth, Vorwärtsstrang):

-CGA ACU GAG GGU GAC AGU CAG GAA A-

Ikkb-2 (IKK- β Stealth, Rückwärtsstrang):

-UUU CCU GAC UGU CAC CCU CAG UUC G-

Stealth IKK- α (Vorwärtsstrang):

-GCA UUC AGC UUG ACU UGG AGA GAU A-

Stealth IKK- α (Rückwärtsstrang):

-UAU CUC UCC AAG UCA AGC UGA AUG C-

Die bei den siRNA Experimenten durchgeführten Kontrolltransfektionen wurden mit einem nicht spezifischen RNA Doppelstrang Molekül (scr = scrambled) durchgeführt:

Scrambled (Vorwärtsstrang):

-AUU CUC CGA ACG UGU CAC GUA GCU A-

Scrambled (Rückwärtsstrang):

-UAG CUA CGU GAC ACG UUC GGA GAA U-

2.2.3 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung von pSUPER

Der Vektor wurde mit den beiden Restriktionsendonukleasen *Bgl* II und *Hin* dIII geschnitten um später das Insert einfügen zu können.

0,5 μ l *Hin* dIII

0,5 μ l *Bgl* II

1 μ l pSUPER (Stammkonzentration: 3,3 μ g/ μ l)

5 μ l Puffer Rot

43µl *Aqua dest.*

Das Gemisch wurde 2 Stunden bei 37°C inkubiert (Restriktions-Verdau).

Anschließend erfolgte die Dephosphorylierung von pSUPER, ebenfalls bei 37°C für eine Stunde, mittels Applikation von 1µl Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP). Dieser Schritt dient zur Verringerung des Transformationshintergrunds durch re-ligierte Plasmide.

2.2.4 Phenol/Chloroform Extraktion und Fällung des dephosphorylierten Vektors

Zur Inaktivierung der Enzyme und zur Aufreinigung und Entsalzung wurde der Vektor mittels Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließender Ethanol-fällung aus dem DNA-Enzym-Salz-Gemisch isoliert.

Dafür wurde 50µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 zum Gemisch hinzugegeben, gevortext und 5 Minuten bei höchster Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge (13000 U/min) zentrifugiert.

Phenol denaturiert Proteine und dient als organisches Lösungsmittel, wodurch ein 2 Phasen-Gemisch entsteht. Da Phenol eine nur geringfügig höhere Dichte als Wasser besitzt, sind beide Phasen nicht einfach voneinander zu trennen. Deshalb wird Chloroform als zusätzliches organisches Lösungsmittel benutzt. Es besitzt eine höhere Dichte und ermöglicht eine gute Phasentrennung.

Die wässrige Phase, die nur noch gelöste Nukleinsäuren, Salze und etwas Phenol beinhaltet (die denaturierten Proteine sammeln sich als Interphase) wurde abgenommen und mit 50µl Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch versetzt. Isoamylalkohol verändert die Eigenschaften der Phasengrenzflächen derart, dass die DNA-enthaltende wässrige Phase mit etwas Geschick bis auf eine kleine Blase fast vollständig abgenommen werden kann. Die erhaltene Lösung wurde mit 125µl Ethanol (96%) und 5µl 3M Natriumacetat-Lösung versetzt, kurz bei -80°C durchgefroren und anschließend in der Benchtop-Zentrifuge für 20min bei 13000 U/min zentrifugiert. Der

Überstand wurde verworfen, das Pellet 10 Minuten luftgetrocknet (dabei verdampft das Ethanol) und in Wasser zu einer Endkonzentration von etwa 20ng/μl gelöst.

2.2.5 Annealing von DNA-Oligonukleotiden

Um die Zusammenlagerung komplementärer Oligonukleotide zu bewerkstelligen, wurden beide Komponenten in Oligonukleotid-Annealing-Puffer im folgenden Verhältnis gemischt:

1,5μl Vorwärtsstrang-Oligonukleotid (100pmol/μl)

1,5μl Rückwärtsstrang-Oligonukleotid (100pmol/μl)

47μl Oligonukleotid-Annealing-Puffer (Zusammensetzung: siehe in der Liste der Materialien)

Das Gemisch wurde bei 95°C im Wasserbad erhitzt und anschließend langsam abgekühlt, um eine korrekte komplementäre Zusammenlagerung der Vorwärts- und Gegenstränge zu ermöglichen, bevor es bei zu niedrigen Temperaturen zum intramolekularen Annealing kommt.

2.2.6 Phosphorylierung der dsOligonukleotidkassetten (Kinase Reaktion)

Vor der Klonierung der dsOligonukleotidkassetten in den pSUPER Vektor erfolgte deren Phosphorylierung mittels einer ATP abhängigen T4-Polynukleotidkinase. Erst dann ist eine kovalente Verknüpfung der Oligonukleotidkassette mit dem dephosphorylierten Vektor im nächsten Schritt möglich.

Das Reaktionsgemisch enthält:

2μl Oligonukleotid-Lösung aus der Annealing-Reaktion

1μl 10x T4-Polynukleotidkinase-Puffer

1μl 10mM ATP

2. MATERIAL UND METHODEN

1µl T4-Polynukleotidkinase
5µl *Aqua dest.*

Das Gemisch wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach folgte für 10min eine Erhöhung der Temperatur auf 70°C. Diese ist nötig ist um das Enzym zu inaktivieren. Eine Rephosphorylierung des dephosphorylierten pSUPER-Vektors (s.o.) ist somit nicht mehr möglich.

2.2.7 Ligation des Oligonukleotid-Inserts in den pSUPER Vektor

Für die Ligase-Reaktion wurde folgendes Gemisch erstellt:

2µl phosphorylierte Oligonukleotide
1µl Ligase Puffer (10x)
1µl T4 DNA-Ligase
1µl geschnittener und dephosphorylierter pSUPER-Vektor
5µl *Aqua dest.*

Das Gemisch wurde mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Das Enzym T4 DNA-Ligase katalysiert hierbei in einer ATP-abhängigen Reaktion (ATP ist im Ligase Puffer enthalten) die kovalente Bindung zwischen dephosphoryliertem Vektor und phosphoryliertem ds-Oligonukleotid-Insert.

2.2.8 Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien und Selektion der Klone

Zur Identifizierung korrekter Klonierungsprodukte mittels eines diagnostischen Verdaus und der anschließenden Sequenzierung werden hinreichende Mengen der klonierten Plasmid DNA benötigt. Dazu wird das Plasmid in kompetente *E. coli* Bakterien transformiert. Die erfolgreich transformierten und sich im Selektionsmedium

2. MATERIAL UND METHODEN

vermehrenden Bakterien replizieren zusätzlich zu ihrem eigenen Genom auch das aufgenommene Plasmid.

Die gefrorene Bakteriensuspension wurde auf Eis aufgetaut, 2 µl des Ligationsansatzes dazugegeben und vorsichtig durchmischt. Nach 30 Minuten Inkubationszeit auf Eis erfolgte eine Erhitzung der Bakteriensuspension auf 42°C im Wasserbad für 2 Minuten und anschließend die Zugabe von 1 ml LB-Medium. Nach der Inkubation von 30 Minuten im Schüttler bei 37°C wurden die Zellen auf einer Agarplatte mit Ampicillin (100 µg/ml) ausplattiert und bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Durch das Ampicillin in der Agarplatte konnten pSUPER Plasmid-positive Zellen selektioniert werden, weil der Vektor eine entsprechende Antibiotika-Resistenz vermittelt (siehe Abbildung 8).

Pro Transformationsansatz (für jedes transformierte Konstrukt) wurden am nächsten Tag 2-3 Kolonien mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in 2 ml LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin-Zusatz über Nacht im Schüttler (180 Umdrehungen/min) kultiviert.

2.2.9 Isolation von Plasmiden mittels QIAprep-Miniprep

Da durch die Transformation zwar davon ausgegangen werden kann, dass jeder Klon den pSUPER Vektor aufgenommen hat, aber noch nicht sicher gestellt ist ob auch jedes Konstrukt ein korrektes Insert beinhaltet, wurden zunächst Plasmid-Minipräparationen mit anschließendem diagnostischen Verdau sowie DNA-Sequenzierung durchgeführt. Das Prinzip der Aufreinigung mit alkalischer Lyse wird in folgende Schritte gegliedert:

1. Lyse der Bakterienzellen
2. Neutralisation des basischen Lysats
3. Adsorption an einer Silica-Membran mittels QIAprep Säulen
4. Elution der adsorbierten DNA

Die Aufreinigung wurde mit dem QIAprep Miniprep-Kit durchgeführt.

2. MATERIAL UND METHODEN

Zunächst wurden die gepickten und über Nacht kultivierten Bakterienzellen in RNase haltigem Puffer resuspendiert. Die alkalische Lyse erfolgte durch Natriumhydroxid gemischt mit Natriumdodecylsulfat (SDS). SDS ist hierbei das Reagenz, das die Zellmembran zerstört, wobei Natriumhydroxid die durch SDS gelösten Membranproteine und die chromosomale DNA sowie die Plasmid-DNA denaturiert. Die alkalische Lyse sollte nicht länger als 5 Minuten andauern, da in diesem Lysefenster die gewünschte Plasmid-DNA im Gegensatz zu chromosomaler DNA bereits aus den geschädigten Zellen entweichen kann, sie aber gleichzeitig noch nicht irreversibel denaturiert wird. Der alkalischen Lyse folgte eine Neutralisation mit einem Guanidin-Hydrochlorid/Essigsäure-Puffer. Die hohen Salzkonzentrationen im Puffer führen dazu, dass denaturierte Proteine, chromosomale DNA und SDS präzipitieren, dagegen die Plasmide jedoch in Lösung bleiben. Darüber hinaus bieten die hohen Salz-Bedingungen optimale Adsorptionsbedingungen an die Silica-Membran (die Silica-Membran ist Bestandteil der verwendeten QIAprep Säule). Nach Zentrifugation und Abtrennung der Plasmid Lösung vom präzipitierten Rest, der im Eppendorf Röhrchen als Pellet erscheint, wurden die gelösten Plasmide auf die QIAprep Säule gegeben und kurz bei 13000 U/min zentrifugiert. Um die Plasmide bei Salzbedingungen niedriger Konzentration eluieren zu können erfolgte eine Waschung mit einem Ethanol-haltigen Puffer. Dieser entfernt die Salze aus der Silica-Membran ohne die DNA von der Säule zu lösen. Die folgende DNA-Elution kann mit Wasser oder einem Puffer mit Salzbedingungen niedriger Konzentration erfolgen.

2.2.10 Diagnostischer Verdau

Um zu überprüfen ob die durch den Miniprep gewonnenen Plasmide das Oligonukleotid-Insert eingebaut haben wurde ein diagnostischer Verdau mit den Restriktionsenzymen *Hin* dIII und *Eco* RI durchgeführt.

Pro Ansatz wurde das folgende Gemisch erstellt:

2. MATERIAL UND METHODEN

5 μ l durch Miniprep aufgereinigter Vektor
2 μ l Puffer Rot
0,5 μ l *Hin* dIII
0,5 μ l *Eco* RI
12 μ l *Aqua dest.*

Durch den Verdau entsteht ein Fragment, das entweder 221 bp oder 285 bp (221 bp + 64 bp) lang ist (siehe Abbildung 11). Das größere Fragment entsteht beim Verdau eines Vektors mit erfolgreicher Insert-Ligation. Die Auftrennung erfolgte durch Auftragen des Verdaus (5 μ l) zusammen mit etwas Ladepuffer in die Taschen eines 1%igen, Ethidiumbromidhaltigen Agarosegels mit anschließender Elektrophorese bei 100V. Da DNA negativ geladen ist, wandert sie in Richtung der Anode. Hierbei sind kleinere DNA Fragmente schneller als größere, da letztere auf Grund der Größe im Gel stärker retardiert werden. Lineare doppelsträngige DNA-Fragmente können somit streng nach der Größe aufgetrennt werden und durch Vergleich mit einem parallel laufenden Größenstandard kategorisiert werden. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Gel mit UV-Licht bestrahlt. Das in die DNA interkalierende Ethidiumbromid besitzt fluoreszierende Eigenschaften und führt dazu, dass Stellen mit hohen DNA-Konzentrationen im UV-Licht als Banden sichtbar werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

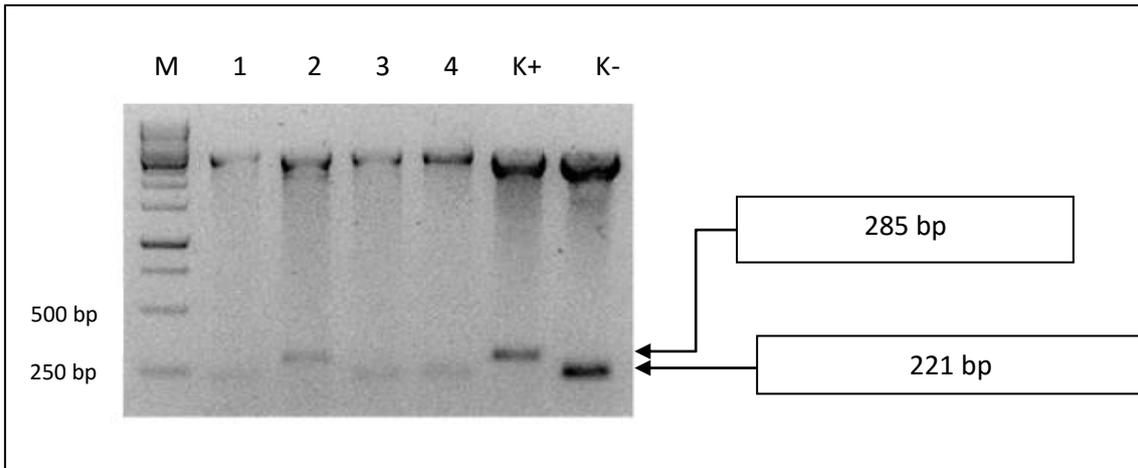


Abbildung 11

Diagnostischer Verdau

Beim diagnostischen Verdau mit *Eco* RI und *Hin* dIII erscheint ein großes Fragment (obere schwarze Bande) und ein kleineres (untere schwarze Bande). Bei fehlendem Insert (K- und Bahn 1,3 und 4) ist das kleinere Fragment 221 bp lang. Bei eingebautem Insert ist es 285 bp lang.

M = Marker (Gene Ruler 1kb DNA Leiter), K+ = positiv-Kontrolle, K- = negativ-Kontrolle.

2.2.11 Sequenzanalyse von shRNA Expressionsvektoren

Der diagnostische Verdau liefert zwar die Information, dass ein etwa 64 bp langes Insert in das Plasmid eingebaut wurde, jedoch können Synthesefehler bei der Herstellung der Oligonukleotide zu einer fehlerhaften Sequenz führen, so dass die positiven Minipräparationen obligatorisch durch Sequenzierung (durch die Firma AGOWA) auf Korrektheit der shRNA-Expressionskassette geprüft werden mussten. Hierfür wurde der T7-Primer beziehungsweise der T3-Primer verwendet. Mittels Extinktionsmessung (Nano Drop) wurde zunächst die DNA-Konzentration bestimmt. Nach der Verdünnung auf 100ng/ μ l konnte die DNA an AGOWA zur Sequenzierung versandt werden. Nur die durch Sequenzierung bestätigten Konstrukte wurden für die später beschriebenen Transfektionsexperimente verwendet.

2. MATERIAL UND METHODEN

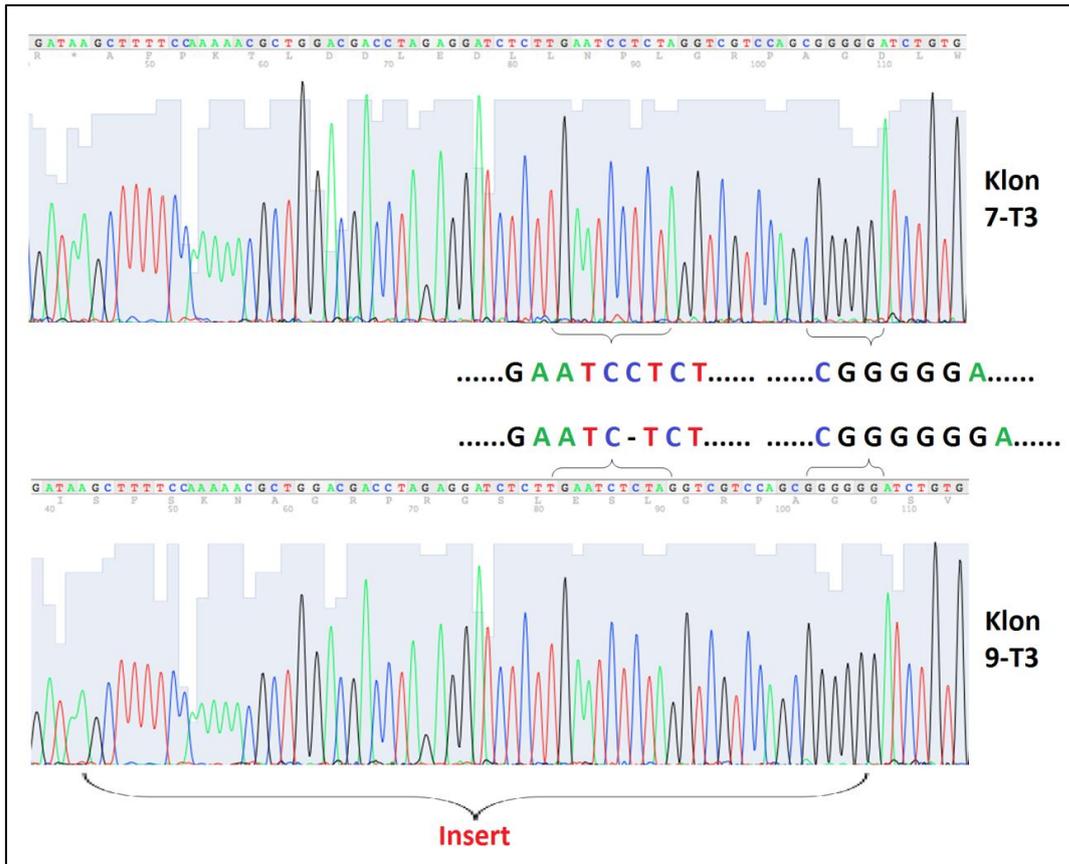


Abbildung 12

Exemplarische Darstellung zweier Sequenzierungen von DNA Proben, die durch Minipräparation gewonnen und im diagnostischen Verdau als potenziell geeignete IKK- β Vektorkonstrukte identifiziert wurden

Die Sequenzierung des Klons 7-T3 ergab eine identische Basenabfolge im Vergleich zu der bestellten Sequenz des IKK- β Oligonukleotids. Demgegenüber war bei der Sequenzanalyse des Klons 9-T3 eine Deletion (Cytosin) und eine Insertion (Guanin) zu verzeichnen gewesen (siehe vergrößerte Sequenzbereiche zwischen den originalen Sequenzierungsabbildungen). Dabei betraf zwar nur die Deletion den Zielbereich der shRNA doch schloss dies eine weitere Verwendung dieses Klons aus.

Vergleiche die Sequenz (a) des Klons 7-T3 (Rückwärtsstrang, diese Sequenz ist identisch mit der des bestellten IKK- β Oligonukleotids) mit der Sequenz (b) des nicht mit dem bestellten IKK- β Oligonukleotid identischen 9-T3 Klons (Deletion des Cytosins rot, Insertion des Guanins (zur Illustration willkürlich an Position 3 gesetzt) grün dargestellt).

(a) AGCTTTTCCAAAAACGCTGGACGACCTAGAGGATCTCTGAATCCTCTAGGTCGTCAGCGGGG

(b) AGCTTTTCCAAAAACGCTGGACGACCTAGAGGATCTCTGAATC**G**CTAGGTCGTCAGCGGGG

2.2.12 Plasmidgewinnung mittels QIAprep-Maxiprep

Um ein als korrekt identifiziertes shRNA-Expressionskonstrukt mittels Transfektion auf eine erfolgreiche Suppression des Zielproteins testen zu können, werden wesentlich größere Mengen an DNA benötigt, als es für den diagnostischen Verdau erforderlich ist. Aus diesem Grund wurden DNA Maxipräparationen durchgeführt.

Die Einstichstellen auf den Agarplatten der gepickten (und markierten) Bakterienkolonien enthalten immer noch Bakterien, auch wenn mit bloßem Auge keine Kolonie mehr sichtbar ist. Klone, die ein als korrekt identifiziertes Plasmid tragen, wurden erneut verwendet, um 100 ml LB-Medium mit Ampicillin (100µg/ml) zu beimpfen. Die Kultur wurde anschließend über Nacht bei 37°C und 180 U/min kultiviert.

Das QIAprep Maxi-Kit beruht auf denselben Prinzipien und gleichen Pufferkombinationen wie das QIAprep Mini-Kit, nur dass mit anderen Volumina und anderen zeitlichen Abfolgen gearbeitet wird (siehe QIAGEN Plasmid Purification Handbook).

2.3 Proteinbiochemische Methoden: Western-Blot Analyse

2.3.1 Ernten und Lysieren von Myelomzellen

Die mittels Elektroporation transfizierten und nach EGFP-Positivität aufgereinigten Myelomzellen wurden am zweiten, dritten und fünften Tag nach Transfektion geerntet. Dazu erfolgten eine 5-minütige Zentrifugation bei 1200 U/min mit anschließendem Waschen mit PBS und Einfrieren mit flüssigem Stickstoff. Bei diesem Vorgang wird die strukturelle Organisation der Zellen mehr oder weniger stark beschädigt, wobei vor allem lysosomale Enzyme die zu analysierenden Proteine gefährden. Deshalb muss vor dem Auftauen der Proben der für die vollständige Degradation der Zellmembranen verantwortliche Lysepuffer (500µl Ansatz) mit 20µl Complete und mit jeweils 10µl Proteinase Cocktail I und II versetzt werden. Beim

2. MATERIAL UND METHODEN

Auftauen der schockgefrorenen Proben ist darauf zu achten, dass der Lysepuffer (35µl/Pellet) zu den noch gefrorenen Proben auf Eis zugegeben wird. Nach 25 Minuten auf Eis wurden die Proben bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert um Zellmembrantrümmer vom Proteinlysate abzutrennen. Der Überstand wurde in neue Eppendorfgefäße überführt.

2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry

Für die Interpretation der Western-Blot Ergebnisse im Hinblick auf die Beurteilung der Depletion eines Proteins, wird eine Kontroll-Bahn mit der zu testenden Bahn verglichen. Für diesen Vergleich ist es essentiell, dass zuvor die Proteinkonzentrationen bestimmt und gleichwertige Mengen aufgetragen wurden.

Die Bestimmung der Konzentration wurde mittels des Lowry-Verfahrens durchgeführt, welches aus 2 Reaktionsschritten besteht:¹⁰⁰

1. Biuret-Reaktion: Peptidbindungen bilden planare Komplexe mit Kupfer(II)-Ionen in alkalischer Lösung.
2. Reduktion von Kupfer(II)- zu Kupfer(I)-Ionen, die wiederum das gelbe Folin-Ciocalteu-Reagenz reduzieren.

Es entsteht eine blaue Lösung mit einem Absorptionsmaximum bei 750nm. Die Proteinkonzentration korreliert mit der Extinktion. Diese konnte mit Hilfe des BioRad Analyzers bestimmt werden.

Nach der Empfehlung von BioRad wurden die Proben mit je 5µl Proteinlysate, 25µl Reagenz A und 200µl Reagenz B versetzt und in einer 96-well Platte verteilt. Nach 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur konnte die Extinktion gemessen werden und nach Abgleich mit einer Standardreihenmessung die Konzentration ermittelt werden. Eine Konzentration von 1µg/µl ist für die Detektion im Western-Blot im Allgemeinen angemessen.

2.3.3 Gießen des SDS-Polyacrylamid Gels, SDS-Gelelektrophorese

Bevor das Proteinlysate mittels Elektrophorese aufgetrennt wurde, erfolgte die Zugabe von 2,5µl Laemmli-Puffer (4x) mit nachfolgender Erhitzung der Probe auf 95°C über 5 Minuten um eine Denaturierung der Proteine hervorzurufen (Endvolumen: 15µl).

Die reduzierende Thioether-Verbindung Mercaptoethanol des Laemmli-Puffers führt zur Spaltung von Disulfidbrücken.⁴⁸

Die SDS-PAGE (Sodium-Dodecylsulphate-Polyacrylamide-Gel-Electrophoresis) ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer molekularen Masse. Da Proteine positive und negative Ladungsträger besitzen, wandern sie entsprechend ihrer Ladung in einer Trägersubstanz (Polyacrylamid) wenn ein elektrisches Feld angelegt wird. Durch Zugabe des stark negativ-geladenen SDS wird einerseits die Eigenladung der Proteine maskiert, andererseits eine Aufhebung höhergradiger Strukturen und eine Linearisierung der Proteine erreicht. Folglich ist im Maschenwerk des Polyacrylamids eine Auftrennung nach der molekularen Masse möglich.

Eine saubere, schmale Bande im Western-Blot ist entscheidend für die genaue Beurteilung der Masse und der relativen Menge des dargestellten Proteins. Dafür müssen die in die Taschen des Polyacrylamid-Gels aufgetragenen Proteingemische schnell durch das weite Maschenwerk des Sammelgels wandern, um an der Grenzschicht zum Trenngel gebündelt und somit in eine gemeinsame Startposition gebracht zu werden (es erfolgt eine initiale Gelelektrophorese bei 80V). Anschließend geschieht die eigentliche Auftrennung im Trenngel bei 120V.

2. MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 3

Reagenzien	Sammelgel	Trenngel
<i>Aqua dest.</i>	3,5ml	2,9ml
Tris pH 6,8 (1M)	0,58ml	3,8ml
10% SDS	50 μ l	100 μ l
Rotiphorese	0,83ml	3,3ml
TEMED	2,5 μ l	5 μ l
10% APS	50 μ l	100 μ l

Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel

Der deutlich geringere Anteil von Rotiphorese im Sammelgel bewirkt, dass sich größere Maschen bei der Verfestigung des Gels bilden. So sammeln sich zunächst alle Proteine an der Grenzschicht zum Trenngel und bilden eine scharfe Bande.

2.3.4 Blotting, Immun-Detektion und Analyse von Proteinbanden

Das Gel, in dem sich die Proteine aufgetrennt haben, wurde auf eine in Blottingpuffer getränkte Nitrocellulose Membran gelegt und es wurden von oben (direkt auf das Gel) und unten (unter die Nitrocellulose Membran) je 3 ebenfalls in Blottingpuffer getränkte Filterpapiere gepresst. Dabei sollte vermieden werden, dass sich Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten bilden.

Die aufgetrennten Proteine werden durch das Anlegen einer vertikalen Spannungsquelle (15V, 50 Minuten) aus dem Gel eluiert, anschließend auf die Nitrocellulose Membran transferiert und fixiert.

Die Membran sollte zunächst mit Ponceau-Rot gefärbt werden um den Proteintransfer und die Einheitlichkeit der Beladung zu verifizieren. Danach wurde die Membran nach kurzem Waschen mit Milchpulverlösung (3%) in TBS-T geblockt um unspezifische Antikörperbindungen zu verringern. Anschließend erfolgte die Applikation eines Erstantikörpers (1:2000 verdünnt in 3%iger Milchpulverlösung in TBS-T. Die verschiedenen Erstantikörper sind jeweils spezifisch für IKK- α , IKK- β oder IKK- γ und für die Kontrollantikörper β -Actin, Tubulin oder Lamin-A.

2. MATERIAL UND METHODEN

Nach drei 10-minütigen Waschschritten mit TBS-T wurde die Nitrocellulose Membran für mindestens 30 Minuten mit einer Zweitantikörper-Lösung (1:20 000 verdünnt in 3%iger Milchpulverlösung in TBS-T) behandelt. Der Zweitantikörper bindet an konstante Bereiche des Erstantikörpers. Dabei müssen Zweitantikörper verwendet werden, die Immunglobuline der Spezies erkennen, aus der der Erstantikörper gewonnen wurde (Kaninchen, Maus oder Ratte). Es folgten erneut drei 10-minütige Waschschrritte der Nitrocellulose Membran in TBS-T und die anschließende Behandlung mit einer Luminol-haltigen ECL (Enhanced Chemiluminescence)-Lösung. Das Luminol wird durch das an den Zweitantikörper gebundene Enzym „Meerrettich-Peroxidase“ in einen angeregten Zustand überführt. Das durch die Reaktion emittierte Licht führt zur Schwärzung des Röntgenfilms und markiert somit die Position des gebundenen Erstantikörpers.

2. MATERIAL UND METHODEN

Liste der Materialien

Produkt	Konzentration/Menge	Bezugsfirma
Zellbiologische Methoden	-	-
RPMI 1640-Medium	Zusätze: -BSA -L-Glutamin -Penicillin/ Streptomycin	- PAA Laboratories Sigma/Roth Sigma-Aldrich -
Fötales Rinderserum (FBS)	10% (Endkonzentration)	Biochrom -
L-Glutamin (1x GlutaMAX-I)	2mM	Invitrogen
Penicillin	100U/ml	Pan Biotech
Streptomycin	100µg/ml	Pan Biotech
Natrium-Pyruvat	1mM	Pan Biotech
Propidium-Iodid	20µg/ml	Sigma
Annexin V-FITC	Konzentration vom Hersteller nicht angegeben. Bestell-Nummer: BMS306FI	Bender Med- Systems - - -
Annexin V-Bindepuffer	10mM HEPES/NaOH pH 7,4 140mM NaCl 2,5mM CaCl ₂	Sigma-Aldrich - Roth Merck
AlamarBlue	20µl/Ansatz	Invitrogen
Elektroporator (Gene-Pulser)	-	BioRad
Optiprep	750µl	Axis-Shield
TPCA	10µM -	Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA)
TNF-α	100ng/ml	Miltenyi Biotech
EGFP (pcDNA3.1-EGFP)	10µg/ml	Invitrogen
PBS-Gebrauchsmischung	9,55g/l	PAA
Molekularbiologische Methoden	-	-
pSUPER Vektor	3,3µg/µl - - -	Siehe Brummel- kamp et al. (2002). ⁹⁶ Bezogen von Dr. Reuven Agami.
Stealth-siRNA-IKK-β	300µM Stock, 2µM/Transfektion	Invitrogen -
Stealth-siRNA-IKK-γ	300µM 2µM/Transfektion	Invitrogen -
Stealth-siRNA-p65	300µM	Invitrogen

2. MATERIAL UND METHODEN

	2µM/Transfektion	-
Oligonukleotid-Annealing-Puffer	100mM Kaliumacetat	Merck
	30mM HEPES; pH 7,4	Sigma
	2mM	Roth
	Magnesiumacetat	-
T4-Polynukleotidkinase	10000U/ml	New England Biolabs (NEB)
T4-Polynukleotidkinase-Puffer	10x	Fermentas
Adenosin-Triphosphat (ATP)	10mM	Fermentas
<i>Bgl</i> II Restriktionsenzym	10U/µl	Fermentas
<i>Hin</i> dIII Restriktionsenzym	10U/µl	Fermentas
<i>Eco</i> RI Restriktionsenzym	10 U/µl	Fermentas
Puffer Rot (1x)	10mM Tris-HCl (pH 5,8 bei 37°C)	Fermentas
	10mM MgCl ₂	-
	100mM KCl	Fermentas
	0,1mg/ml BSA	Fermentas
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	1U/µl	Fermentas
Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol Ethanol	25:25:1	Roth
	-	-
	96%	Universitäts-apotheke Würzburg
Natriumacetat	3M	Roth
Ligase Puffer	10x	Fermentas
T4-DNA-Ligase	5U/µl	Fermentas
LB (Lysogeny Broth) Medium	5g/l Hefe-Extrakt	Roth
	10g/l Bacto Tryptone	Roth
	10g/l Natriumchlorid	Roth
	50µg/ml Ampicillin	Sigma-Aldrich
Agar Platten (35ml)	250ml LB Medium	-
	7,5g Bacto-Agar	Sigma-Aldrich
	100µg/ml Ampicillin	Sigma-Aldrich
	250ml Aqua dest.	-
Qia Prep-Miniprep-Kit	-	Qia-Gen
TAE Puffer (50x)	242g TRIS Base	Roth
	57,1ml Eisessig	J.T. Baker
	37,2g EDTA	Sigma
Agarose-Gel	-	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	-	Sigma-Aldrich
DNA Leiter (Gene Ruler 1kb)	-	Fermentas
QIAprep Maxiprep-Kit	-	Qiagen
Proteinbiologische Methoden	-	-

2. MATERIAL UND METHODEN

Lysepuffer	50mM Tris HCl, pH 8,0	Roth -	
	10mM EDTA	Sigma/Roth	
	0,1mM PMSF	Sigma-Aldrich	
	Complete Protease Inhibitor Cocktail (1 Tablette für 50ml Zellextrakt)	Roche, Mannheim - -	
	Phosphatase Inhibitor-Cocktail	- Sigma -Aldrich	
	I und II (je 1ml pro 100 ml Lysepuffer)	- -	
	Laemmlie Puffer 4x	2ml 1M Tris-HCl pH 6,8	Roth Merck
		4ml Glyzerin 86%	Roth
		2ml β -Mercapto- ethanol	Sigma -
		100 μ l 2%iges Brom- phenolblau	- -
3,2g SDS		Fluka	
Trenngel (Mengenangaben siehe Tabelle 3)		Aqua dest.	-
	Tris-HCl pH 6,8	Roth	
	SDS 10%	Fluka	
	Rotiphorese	Roth	
	TEMED	Roth	
	APS (10%)	Roth	
Sammelgel (Mengenangaben siehe Tabelle 3)	Aqua dest.	-	
	Tris-HCl pH 6,8	Roth	
	SDS 10%	Fluka	
	Rotiphorese	Roth	
	TEMED	Roth	
	APS (10%)	Roth	
Laufpuffer (5x TGS)	15g Tris	Roth	
	72g Glycin	Roth	
	5g SDS	Fluka	
Blotting Puffer	0,3M Tris HCl	Roth	
	20% Methanol	Sigma	
Nitrocellulose Membran	-	Schleicher und Schüll, Dassel	
TBS-Waschpuffer (10x Stock)	20mM Tris	Roth	
	136mM NaCl	Roth/Sigma	
	pH 7,6	-	
TBS-T-Waschpuffer (1x)	1x TBS; 0,1% Tween	-	
Ponceau-Rot	Ponceau S (Pulver)	Applichem	
Blocking Puffer	1x TBS mit 3%	-	
	Milchpulver	-	

2. MATERIAL UND METHODEN

Antikörper

Anti β -Actin A-5316	Sigma Aldrich
Anti Tubulin	Biozol, Eching
Anti IKK- α	BD Biosciences
Anti IKK- β (#2684)	Cell Signaling
Anti IKK- γ	Cell Signaling

ECL

10ml	Tris-Puffer,	Sigma
100mM,		-
pH 8,8		Sigma
100 μ l	Luminol,	-
2,5mM		Sigma
20 μ l	p-Cumarsäure,	-
0,2mM		Roth
3 μ l H ₂ O ₂ ,	3mM	

3. ERGEBNISSE

3.1 Identifikation von funktionellen IKK- γ und IKK- β shRNA Expressionskonstrukten

Zur Detektion eines funktionierenden shRNA Expressionskonstruktes für IKK- γ wurden die vier verschiedenen zu Beginn der Arbeit bereits fertig klonierten pSUPER Vektoren gegen IKK- γ (IKK- γ 1, IKK- γ 2, IKK- γ 3 und IKK- γ 4) getestet. Dabei konnte für die Transfektion von **IKK- γ 3** in AMO-1 Zellen eine deutliche Suppression des Proteins erreicht werden, die von Tag 2 auf Tag 3 nach Elektroporation noch erheblich zunahm (siehe Abbildung 13 oben). Die hier exemplarisch dargestellten durchflusszytometrischen Daten (siehe Abbildung 13 unten) belegen, dass die durchgeführte Aufreinigung (nach EGFP positiven Zellen) relativ erfolgreich war. Allerdings verblieben niedrige zweistellige Raten von untransfizierten Zellen, die durchaus als Hauptquelle für die im Western Blot erkennbare Restmenge von IKK- γ bei Verwendung des IKK- γ 3 Konstrukts angesehen werden können. Auch für die Transfektion von IKK- γ 3 in L363 Zellen (61,8% transfizierte Zellen; Daten nicht gezeigt) zeigte sich innerhalb von drei Tagen nach Elektroporation eine starke Reduktion des Zielproteins (siehe Abbildung 14).

3. ERGEBNISSE

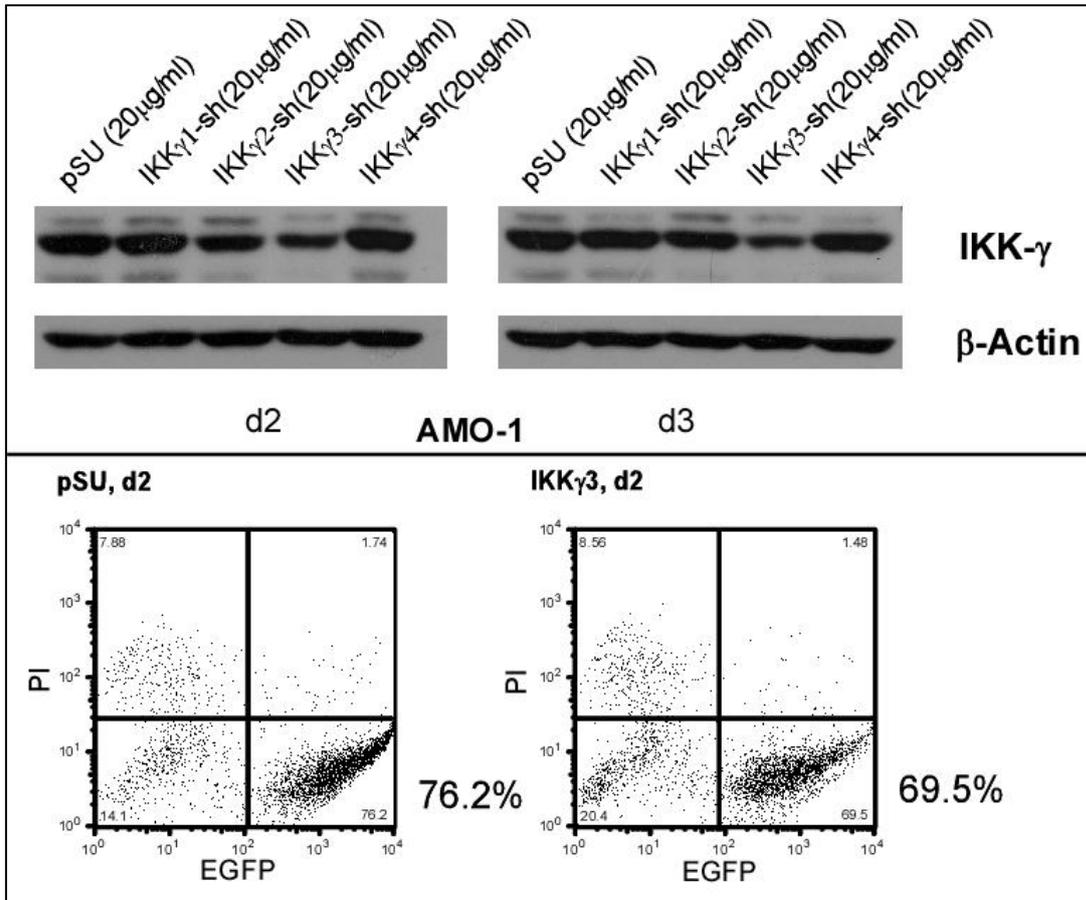


Abbildung 13

Identifikation von funktionellen IKK-γ shRNA Expressionskonstrukten in der Zelllinie AMO-1

Die Testung der fertig klonierten IKK-γ shRNA Expressionsvektoren in AMO-1 Zellen erfolgte mittels Western Blot an Tag 2 und 3 (siehe oben). Die Transfektion des Vektors mit der IKK-γ3 Zielsequenz bewirkte eine deutliche Depletion des Zielproteins, während die anderen gegen IKK-γ gerichteten shRNA Expressionskonstrukte keinen Effekt zeigten (oberes Bild).

Der Erfolg der Aufreinigung nach EGFP-positiven Zellen konnte mittels FACS Analyse bestätigt werden (unteres Bild). Die Prozentzahl rechts neben den FACS Bildern entspricht der Anzahl der Zellen im rechten unteren Quadranten und gibt den Anteil der stark transfizierten lebenden Zellen (EGFP-positiv, PI-negativ) an.

pSU = Kontrolltransfektion (pSUPER Vektor ohne Insert); PI = Propidiumiodid; EGFP = Enhanced Green Fluorescent Protein; d2 = Tag 2; d3 = Tag 3.

3. ERGEBNISSE

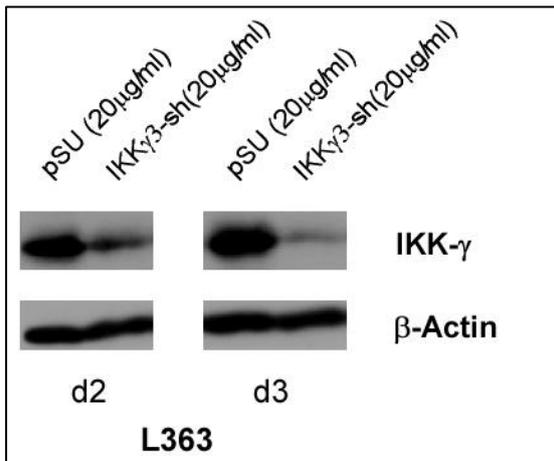


Abbildung 14

Verifikation von IKK-γ3 als funktionelles shRNA Expressionskonstrukt in der Myelomzelllinie L363

Die Analyse der Wirksamkeit des IKK-γ3 shRNA Expressionsvektors erfolgte mittels Western Blot an Tag 2 (d2) und Tag 3 (d3) nach Elektroporation. An beiden Tagen kam es zu einer signifikanten Depletion des Zielproteins. Dies bestätigt die Funktionalität des Konstrukts. pSU = Kontrolltransfektion (pSUPER Vektor ohne Insert).

Zur spezifischen Depletion von IKK-β wurden insgesamt vier verschiedene shRNA Expressionsvektoren konstruiert und anhand ihrer Elektroporation in verschiedenen Myelomzelllinien auf Funktionalität hin getestet. Als Zielsequenzen dienten die in den Methoden dargestellten cDNA Bereiche (IKK-β2 bis IKK-β5; siehe 2.2.2 Design der Oligonukleotide).

Dabei zeigte sich insbesondere nach Transfektion des **IKK-β5**-shRNA Expressionsvektors eine signifikante Suppression von IKK-β (siehe Abbildung 15 oben). Auch hier konnte der Erfolg der Anreicherung stark transfizierter Zellen durch FACS Analysen bestätigt werden (siehe Abbildung 15 unten).

Für die weiteren Experimente zur Prüfung eines Effekts auf die Viabilität von Myelomzellen wurden die als funktional verifizierten shRNA-Expressionsvektoren IKK-γ3 und IKK-β5 verwendet.

3. ERGEBNISSE

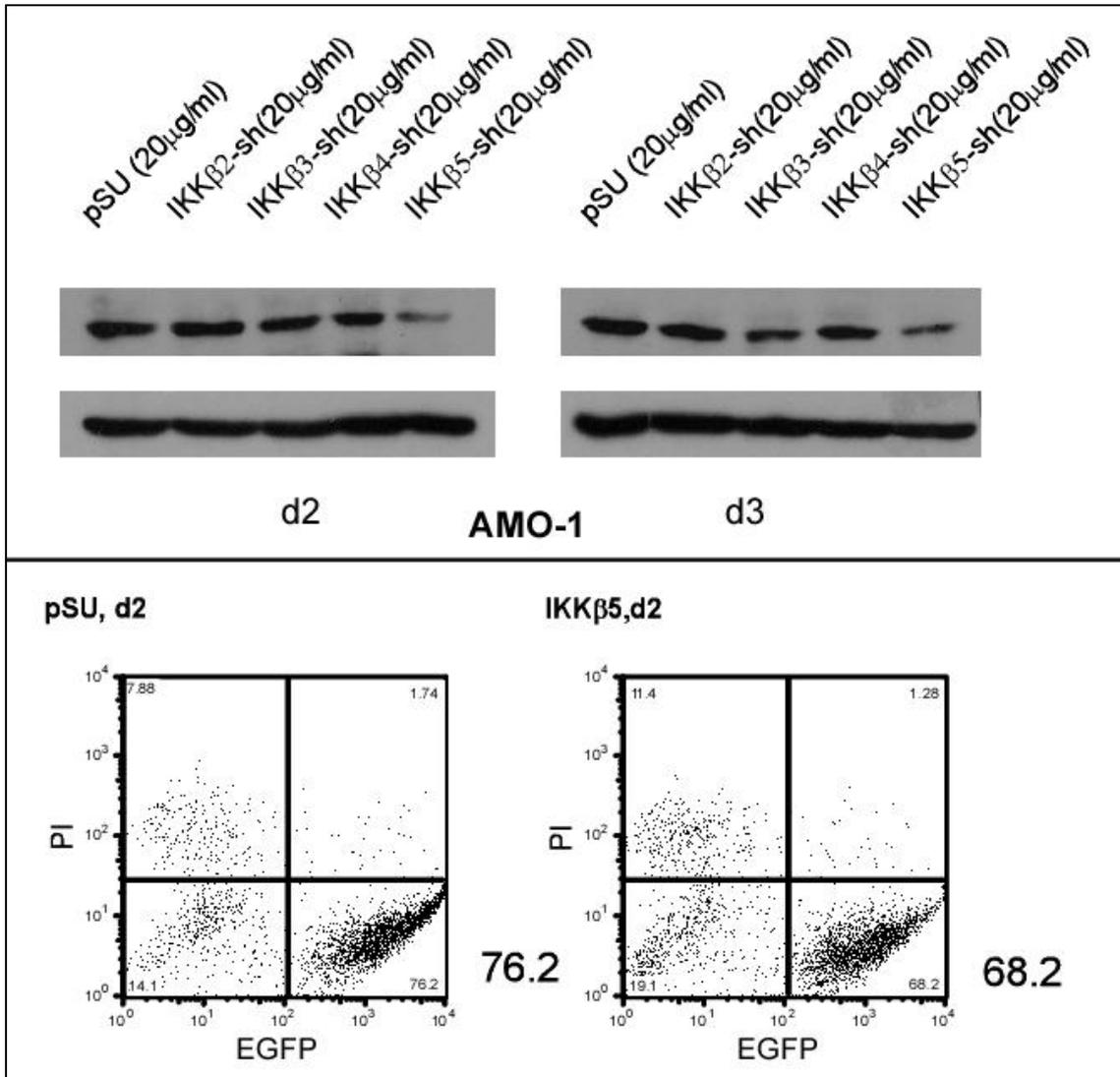


Abbildung 15

Identifikation von funktionellen IKK-β shRNA Expressionskonstrukten in AMO-1

Nach Transfektion von vier verschiedenen shRNA Expressionsvektoren gegen IKK-β (IKK-β2-5) in AMO-1 Zellen wurde die Funktionalität der Konstrukte mittels Western Blot analysiert. Dabei führte die Transfektion des shRNA Expressionsvektors IKK-β5 zu einer deutlich sichtbaren Suppression des IKK-β Proteins an Tag 2 (d2) und Tag 3 (d3) nach Elektroporation (oberes Bild).

Der Erfolg der Aufreinigung nach EGFP-positiven Zellen konnte mittels FACS Analyse bestätigt werden (unteres Bild). Die Prozentzahl rechts neben den FACS Bildern entspricht der Anzahl der Zellen im rechten unteren Quadranten und gibt den Anteil der stark transfizierten lebenden Zellen (EGFP-positiv, PI-negativ) an.

pSU = Kontrolltransfektion (pSUPER Vektor ohne Insert); PI = Propidiumiodid; EGFP = Enhanced Green Fluorescent Protein.

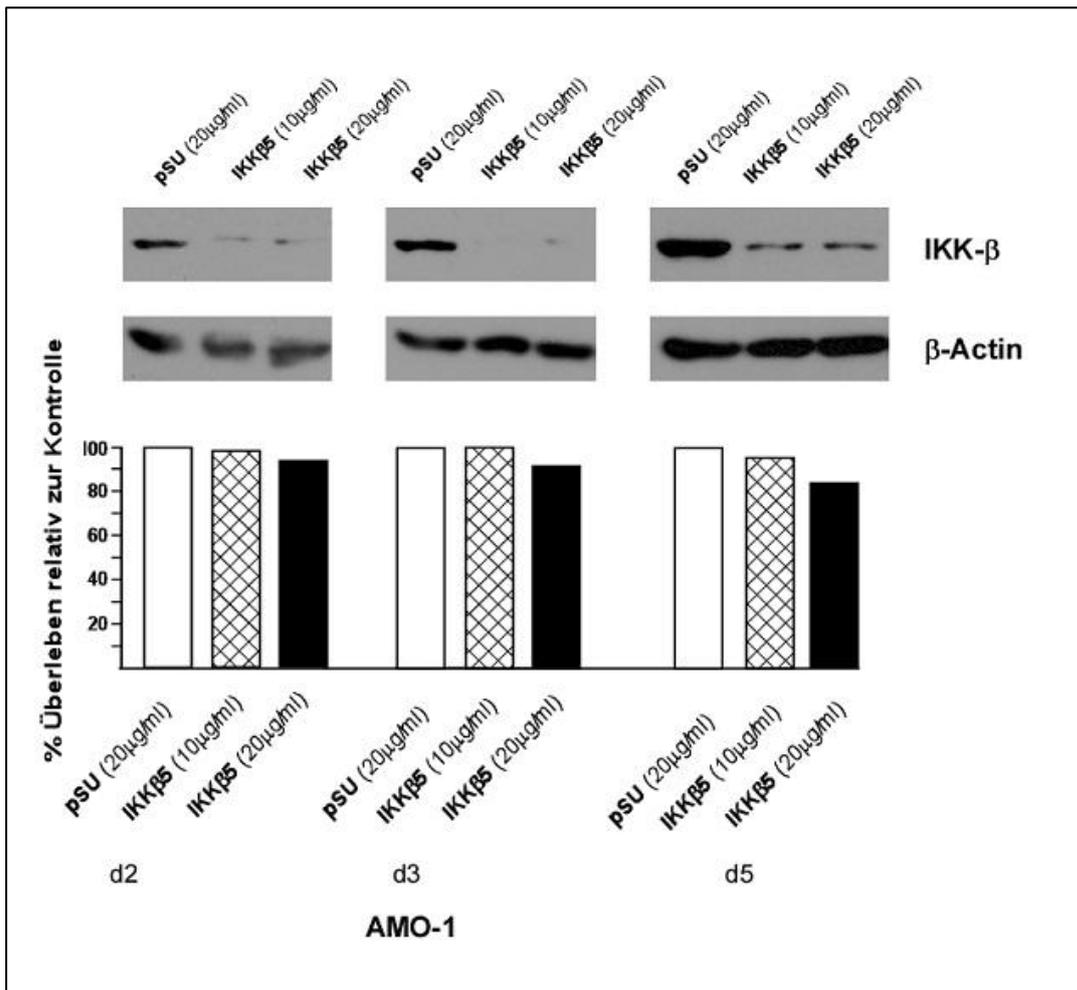
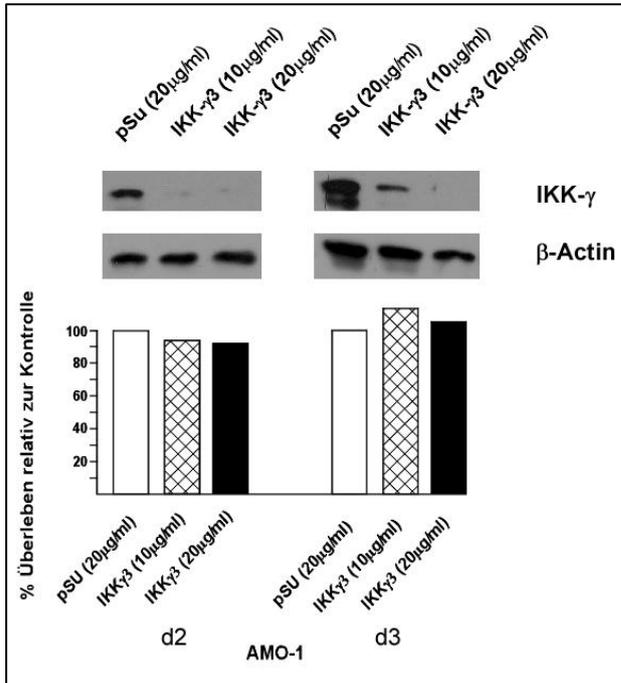
Diese Ergebnisse zeigen zusammengefasst, dass sowohl die Zelllinie AMO-1, als auch L363 Zellen geeignet sind, um nach Elektroporation und anschließender FACS Sortierung hinreichend reine Mengen stark transfizierter Zellen für funktionelle und molekulare Untersuchungen zu gewinnen. Es konnten für IKK- β (IKK- β 5) und für IKK- γ (IKK- γ 3) funktionelle shRNA Expressionsvektoren identifiziert werden, deren Transfektion innerhalb von drei Tagen zu einer signifikanten Depletion des jeweiligen Zielproteins führte. Somit waren hiermit für die beiden Hauptkomponenten des IKK-Komplexes im klassischen NF- κ B Signalweg geeignete Reagenzien zur molekularen Repression etabliert worden.

3.2 Analyse des Einflusses von IKK Knockdown auf das Überleben von Myelomzellen

Um den Einfluss einer Depletion der verschiedenen Inhibitor of κ B Kinasen auf das Überleben von MM Zellen näher zu untersuchen wurden shRNA Expressionsvektoren und/oder Stealth-siRNAs in die Myelomzelllinien AMO-1, L-363 und MM.1S elektroporiert. Die aufgereinigten, stark transfizierten Zellen wurden anschließend bis zu einer Woche lang weiter in Kultur gehalten, damit an verschiedenen Zeitpunkten Proben zur Verifizierung des Proteinknockdowns und zur FACS-Bestimmung der Überlebensrate entnommen werden konnten.

Die funktionellen shRNA Expressionsvektoren IKK- γ 3 und IKK- β 5 wurden verwendet, um zunächst den Einfluss des weitgehenden Verlusts von IKK- γ beziehungsweise IKK- β auf das Überleben von AMO-1 Zellen zu untersuchen. Trotz einer stark ausgeprägten Suppression der jeweiligen Zielproteine bereits bei shRNA Konzentrationen von 10 μ g/ml im Elektroporationsansatz war allerdings weder nach Transfektion des IKK- γ 3, noch nach Transfektion des IKK- β 5 shRNA Expressionsvektors eine Veränderung der Viabilität an Tag 2 oder Tag 3 zu verzeichnen (siehe Abbildung 16 und Abbildung 17).

3. ERGEBNISSE



3. ERGEBNISSE

Abbildung 17

Transfektion des IKK β -5 shRNA-Vektorkonstrukts in AMO-1 Zellen und Viabilität der transfizierten Zellen

Western Blot Analysen zeigten einen ausgeprägten Knockdown des IKK- β Proteins an den Tagen 2, 3 und 5 (d2, d3 und d5) nach Transfektion des IKK- β 5 shRNA Vektors (10 μ g/ml oder 20 μ g/ml) in AMO-1 Zellen. FACS Messungen ergaben jedoch keinen Hinweis auf eine nennenswerte Auswirkung der IKK- β Depletion auf das Überleben der Zellen (siehe Balkendiagramm). pSU = Kontrolltransfektion (pSUPER Vektor ohne Insert).

Der Schwerpunkt der folgenden Experimente wurde zunächst auf den Knockdown von IKK- β gelegt, da mit diesem Ziel direkt die relevante Kinase des IKK-Komplexes angesprochen werden konnte. Um zu überprüfen ob das Ausbleiben eines Überlebenseffektes durch den IKK- β Knockdown i) auch in einem längeren Zeitfenster und ii) auch in anderen Myelomzelllinien gilt, wurden IKK- β 5-shRNA Expressionsvektor-transfizierte AMO-1 Zellen zusätzlich an Tag 5 analysiert (siehe Abbildung 17) beziehungsweise L363 Zellen an den Tagen 2, 3 und 5 getestet (siehe Abbildung 18). Der Knockdown von IKK- β war in AMO-1 an Tag 5 noch deutlich ausgeprägt, jedoch konnte nach wie vor keine Veränderung der Überlebensrate festgestellt werden (siehe Abbildung 17). Die Depletion von IKK- β in L363 war an Tag 3 am stärksten, aber auch an Tag 5 (trotz der nicht optimalen Belichtung in Abbildung 18) noch eindeutig erkennbar. Auch hier ergaben FACS Messungen zu keinem Zeitpunkt Hinweise auf einen nennenswerten Unterschied zwischen dem Überleben von Kontrollzellen und IKK-depletierten Zellen (siehe Abbildung 18).

3. ERGEBNISSE

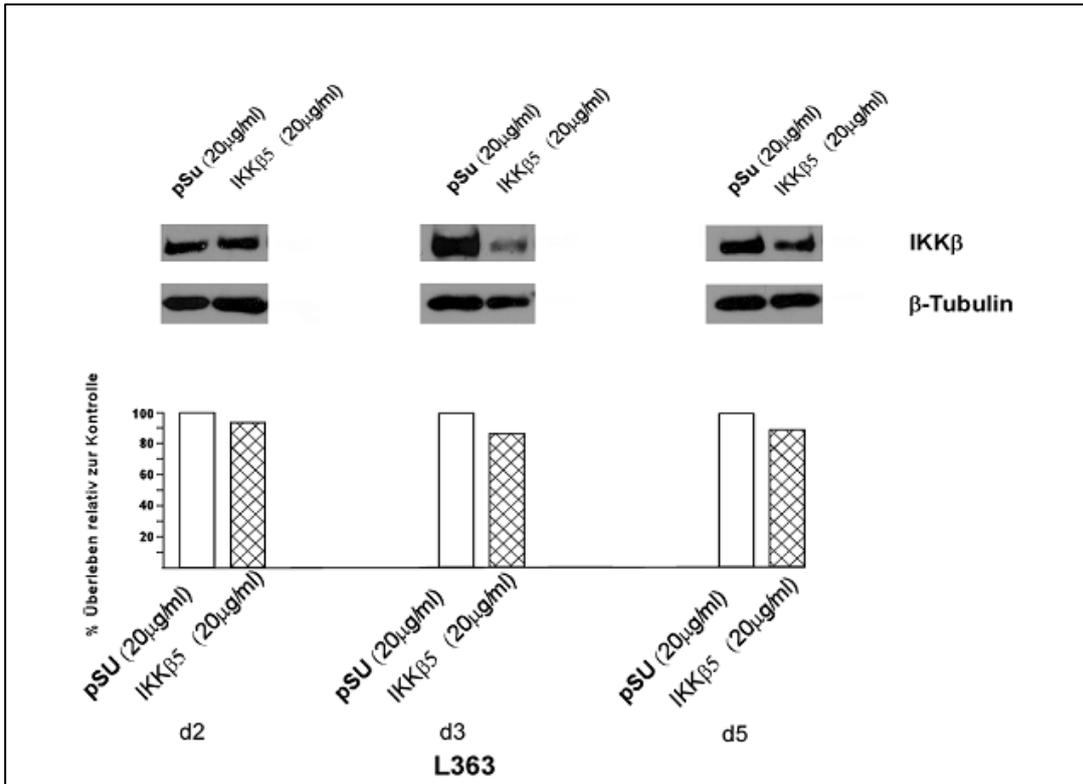


Abbildung 18

Transfektion des IKK-β5 shRNA Vektorkonstrukts in L363 und Effekt auf das Überleben der Zellen

Es erfolgte die Transfektion des IKK-β5 shRNA Vektors (20 μg/ml) in L363 Zellen und anschließend eine Western Blot Analyse der aufgereinigten Zellen an den Tagen 2, 3 und 5 (d2, d3 und d5) nach Elektroporation. Die Depletion des IKK-β Proteins war an Tag 3 am deutlichsten, aber auch an Tag 5 vorhanden. FACS Messungen ergaben, dass die Suppression von IKK-β zu keinem Zeitpunkt einen nennenswerten Effekt auf die Viabilität der Zellen hatte (siehe Balkendiagramm). pSU = Kontrolltransfektion (pSUPER Vektor ohne Insert).

Angesichts des Ausbleibens jeglicher Überlebenseffekte des shRNA-vermittelten IKK-β Knockdowns in den Zelllinien AMO-1 und L363 wurde alternativ die Wirkung einer Elektroporation mit einer synthetisierten Stealth-siRNA gegen IKK-β getestet (Sequenz siehe 2.2.2 Design der Oligonukleotide), da diese Methode potenziell einen etwas schnelleren Abbau der mRNA des Zielproteins ermöglicht und - zumindest initial - auch einen noch stärkeren Knockdown zeitigen kann.

Der Erfolg der Aufreinigung nach EGFP-positiven Zellen konnte durch FACS Analyse von Stealth-siRNA transfizierten Zellen belegt werden (exemplarisch in Abbildung 19 unten aufgeführt; Anmerkung: Mittlerweile wurde im Labor gezeigt, dass bei der

3. ERGEBNISSE

Elektroporation von Myelomzellen mit Stealth siRNAs sämtliche der überlebenden Zellen transfiziert sind, also auch diejenigen, die nicht das Expressionsplasmid für EGFP aufgenommen haben.⁹⁵⁾ Die Transfektion der IKK- β Stealth-siRNA führte in AMO-1 zu einer ausgezeichneten Depletion des IKK- β Proteins an Tag 2 und Tag 3 (siehe Abbildung 19), in einem weiteren Experiment wurde der Effekt zusätzlich auch noch für Tag 5 belegt (siehe Abbildung 20). Trotz des signifikanten Knockdowns zeigten durchflusszytometrische Daten jedoch wiederum an keinem Tag eine Verringerung der Viabilität von AMO-1 Zellen (siehe Balkendiagramm in Abbildung 19 und Abbildung 20).

Um die Spezifität des IKK- β Knockdowns bezüglich IKK- α zu überprüfen, erfolgte im Western Blot neben der Verwendung eines Antikörpers gegen IKK- β auch eine Färbung mit einem Antikörper gegen IKK- α . Es zeigte sich wie erwartet trotz einer deutlichen IKK- β Depletion keine Verminderung von IKK- α im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 20).

Da durch die Stealth-siRNA tendenziell sogar eine bessere Suppression des IKK- β Proteins erzielt werden konnte als mit den shRNA Expressionsvektoren (vergleiche z. B. Abbildung 18 mit Abbildung 20), wurden weitere Stealth-siRNA Transfektionsexperimente mit den Zelllinien L363 und MM.1S durchgeführt. An Tag 2, Tag 3 und Tag 5 nach Transfektion der IKK- β Stealth-siRNA in L363 Zellen zeigte sich erneut ein deutlicher Knockdown von IKK- β im Western Blot (siehe Abbildung 21). Die Messung der Viabilität mittels FACS ergab jedoch keine signifikanten Hinweise auf eine Veränderung der Überlebensrate (siehe Balkendiagramm in Abbildung 21). Western Blot Analysen an Tag 3 nach Transfektion der IKK- β Stealth-siRNA zeigten auch in MM.1S Zellen eine deutliche Depletion von IKK- β (siehe Abbildung 22; keine Western Blot Daten zu Tag 2 und Tag 5 vorhanden). Abermals konnte jedoch durch FACS Analysen weder an Tag 2, Tag 3, noch an Tag 5 eine Veränderung der Viabilität nachgewiesen werden (siehe Balkendiagramm in Abbildung 22).

3. ERGEBNISSE

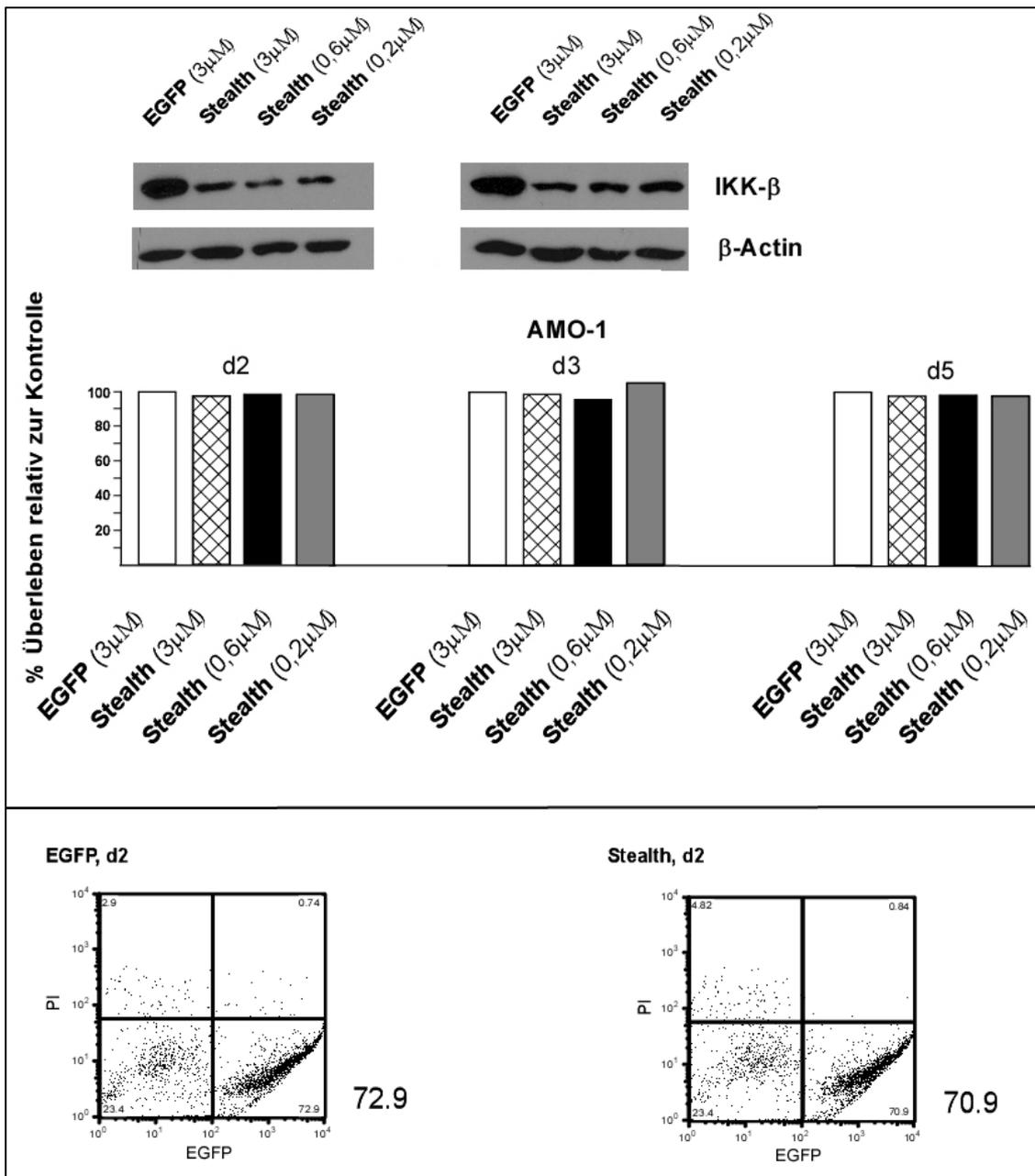


Abbildung 19

Transfektion von Stealth-siRNA in AMO-1 zur effektiven Depletion von IKK-β und Messung der Viabilität

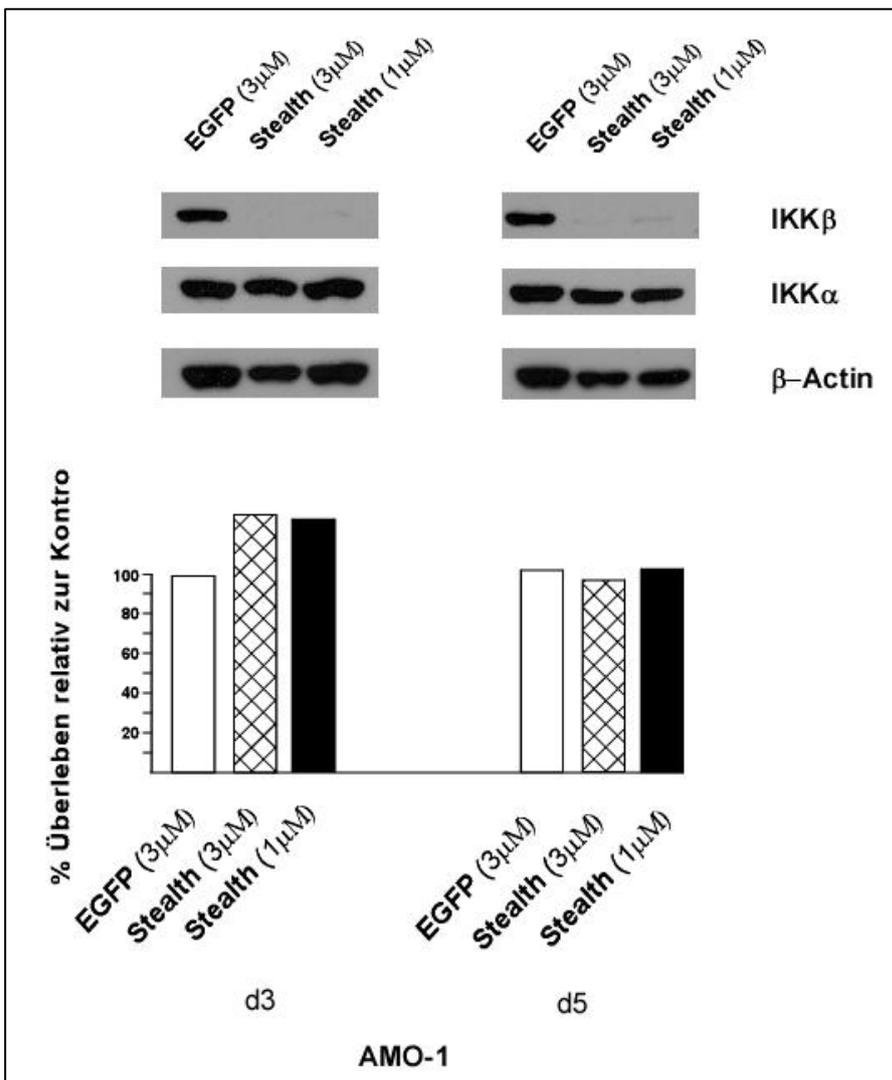
Um die Wirkung einer effektiven Depletion von IKK-β zu analysieren erfolgte die Transfektion von Stealth-siRNA in AMO-1 Zellen. Western Blot Analysen an Tag 2 und Tag 3 (d2 und d3) nach Elektroporation zeigten eine deutliche Verminderung von IKK-β und FACS Messungen ergaben keine Veränderung des Überlebens an beiden Tagen (siehe Balkendiagramm). Auch an Tag 5 (d5) konnte kein Effekt auf die Viabilität der Zellen gemessen werden (korrespondierende Western Analyse im gezeigten Experiment nicht durchgeführt).

3. ERGEBNISSE

Zu beachten ist, dass die Suppression zwar formal nicht vollständig ist, jedoch ein sehr deutlicher Unterschied der Proteinkonzentration zur (eingebrennten) Kontrolle besteht (das Restprotein ist in diesem Fall nur auf Grund der langen Belichtungsdauer zu sehen). Darüber hinaus ist die Suppression schon bei einer Konzentration von 0,2 μM der stealth siRNA im Elektroporationsansatz gleichwertig zu den höheren Konzentrationen.

Der Erfolg der Aufreinigung nach EGFP-positiven Zellen konnte mittels FACS Analyse bestätigt werden (unteres Bild). Die Prozentzahl rechts neben den FACS Bildern entspricht der Anzahl der Zellen im rechten unteren Quadranten und gibt den Anteil der stark transfizierten lebenden Zellen (EGFP-positiv, PI-negativ) an.

PI = Propidiumiodid; EGFP = Kontrolltransfektion (Expressionsplasmid für Enhanced Green Fluorescent Protein); Stealth = IKK- β Stealth-siRNA.



3. ERGEBNISSE

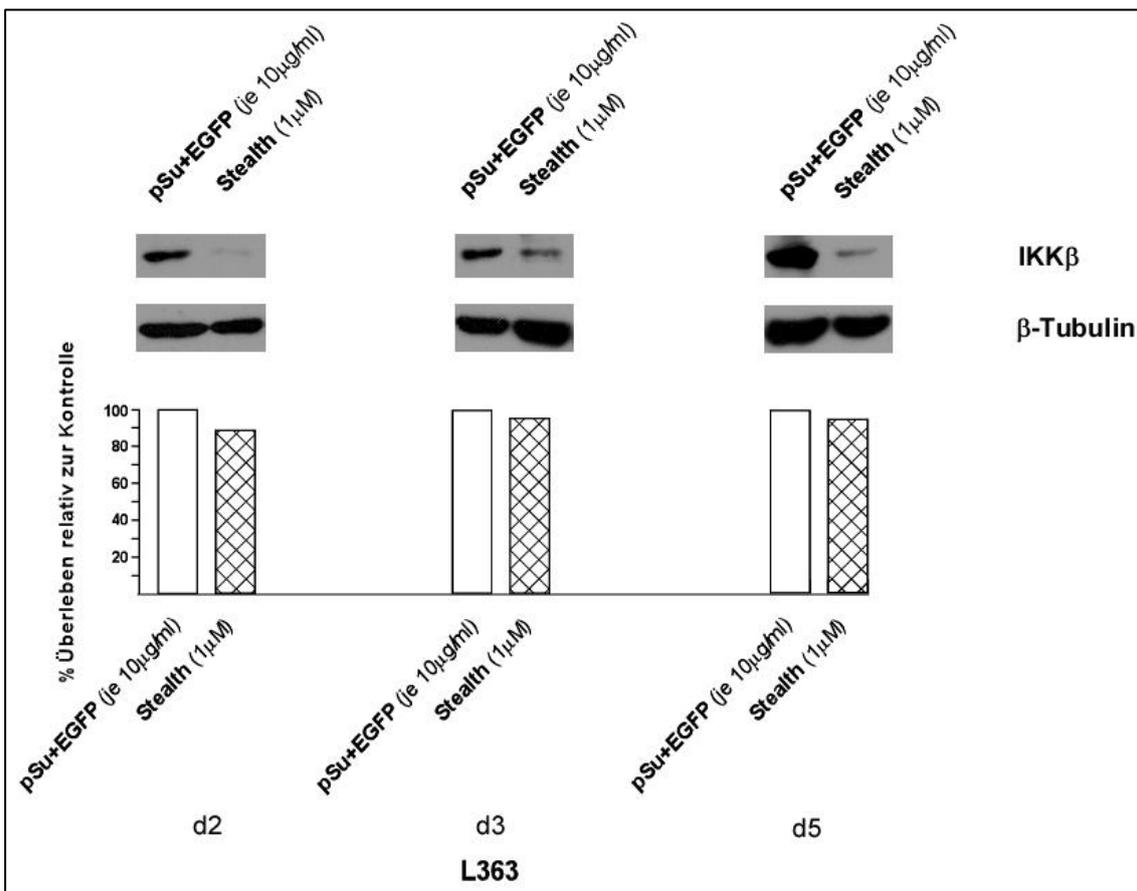
Abbildung 20

Transfektion von Stealth-siRNA in AMO-1 Zellen zur effektiven Suppression von IKK- β und Untersuchung eines möglichen Effekts auf IKK- α und die Viabilität der Zellen

Um die Wirkung einer Suppression von IKK- β zu analysieren erfolgte die Transfektion der IKK- β Stealth-siRNA gefolgt von Western Blot Analysen an den Tagen 2, 3 und 5 (d2, d3 und d5) nach Elektroporation. Es zeigte sich eine nahezu vollständige Depletion von IKK- β im Western Blot, die auch an Tag 5 noch ungebremst anhält. Es wurde zusätzlich ein Antikörper gegen IKK- α verwendet um mögliche Effekte der IKK- β Stealth Transfektion auf IKK- α abzuschätzen. Die Signalstärke von IKK- α war jedoch nicht beeinflusst.

FACS Messungen belegten, dass die Suppression von IKK- β mittels Stealth-siRNA in AMO-1 zu keiner Zeit eine Veränderung der Viabilität der Zellen bewirkte (Balkendiagramm).

EGFP = Kontrolltransfektion (Expressionsplasmid für Enhanced Green Fluorescent Protein ohne weitere Zusätze); Stealth = IKK- β Stealth-siRNA.



3. ERGEBNISSE

Abbildung 21

Transfektion von Stealth-siRNA in L363 zur effektiven Depletion von IKK- β und Messung der Viabilität

Zur Analyse der Stealth-siRNA-vermittelten Suppression des IKK- β Proteins in L363 Zellen erfolgte die Transfektion mit anschließender Western Blot Analyse an Tag 2, Tag 3 und Tag 5 (d2, d3 und d5). Es zeigte sich eine sehr starke Depletion von IKK- β an allen Tagen, wobei die Analyse der FACS Messungen an den Tagen 2, 3 und 5 keine Veränderung des Überlebens ergab (Balkendiagramm). pSU+EGFP = Kontrolltransfektion (Expressionsplasmid für Enhanced Green Fluorescent Protein und pSUPER ohne Insert); Stealth = IKK- β Stealth-siRNA.

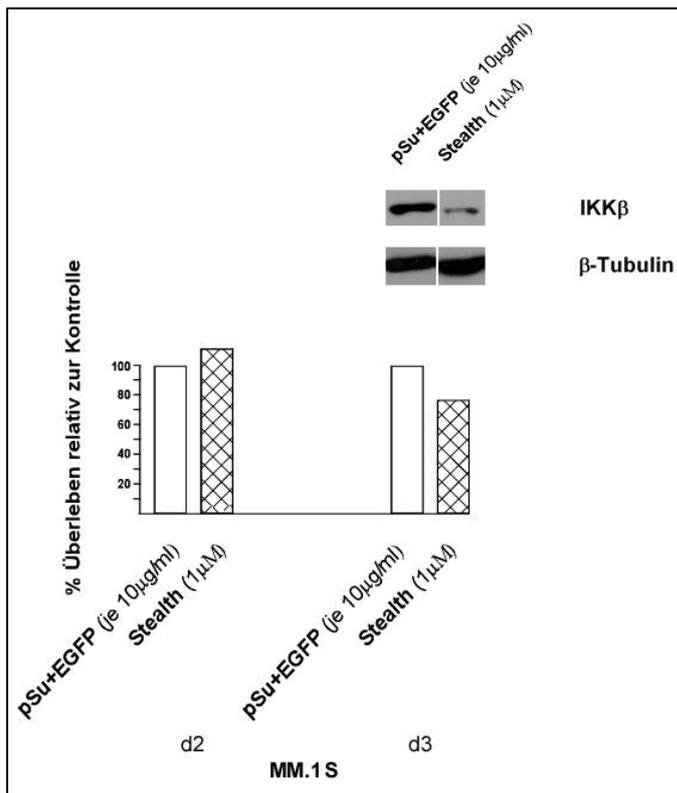


Abbildung 22

Transfektion von IKK- β Stealth-siRNA zur Testung des IKK- β Knockdowns in MM.1S Zellen

An Tag 3 nach Transfektion von IKK- β Stealth-siRNA in MM.1S Zellen konnte eine deutliche Abnahme des IKK- β Proteins im Western Blot detektiert werden. FACS Analysen an Tag 2 und Tag 3 zeigten keine signifikante Abnahme der Überlebensrate (siehe Balkendiagramm).

pSU+EGFP = Kontrolltransfektion (pSUPER Vektor ohne Insert und Expressionsplasmid für Enhanced Green Fluorescent Protein); Stealth = IKK- β Stealth-siRNA.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Transfektion der IKK- β Stealth-siRNA in AMO-1, L363 und MM.1S Zellen zu exzellenten Knockdown Ergebnissen von IKK- β führte, und dass der Depletionseffekt praktisch unvermindert für wenigstens 5 Tage nachweisbar war. Die Depletion von IKK- β war nicht von einer Veränderung des Expressionsspiegels von IKK- α begleitet. Dies bestätigt die Funktionalität und die Spezifität der Stealth-siRNA. Eine nennenswerte Verringerung der Viabilität konnte allerdings in keinem Experiment beobachtet werden.

3. ERGEBNISSE

Zur Relevanz von IKK- α für die Viabilität von Myelomzellen ist wenig bekannt. Die in Myelomzellen vorhandenen Mutationen des NF- κ B Signalwegs führen größtenteils zu einer Akkumulation von NIK und damit zu einer konstitutiven Aktivierung beider Signalwege.⁵⁸ Um die potentielle Relevanz des alternativen Signalwegs für die Viabilität von Myelomzellen zu untersuchen ist somit auch IKK- α zusätzlich als Ziel für Knockdown Experimente in Betracht zu ziehen. Darüber hinaus ist eine katalytische Kompensation der Knockdown bedingten IKK- β Aktivitätsverminderung durch IKK- α nicht auszuschließen.

Dazu erfolgte neben der alleinigen Transfektion von IKK- β Stealth-siRNA zusätzlich die Transfektion von IKK- α (Sequenz siehe 2.2.2 Design der Oligonukleotide) und IKK- β Stealth-siRNA in Kombination. Die Ergebnisse von Western Blot Analysen an Tag 4 nach Elektroporation in L363 und MM.1S Zellen zeigen für beide Zelllinien eine starke Suppression von IKK- α beziehungsweise IKK- β (siehe Abbildung 23). Die am gleichen Tag gemessenen durchflusszytometrischen Werte lieferten keinen Hinweis auf eine Reduktion der Viabilität der Zellen (siehe Balkendiagramm in Abbildung 23).

3. ERGEBNISSE

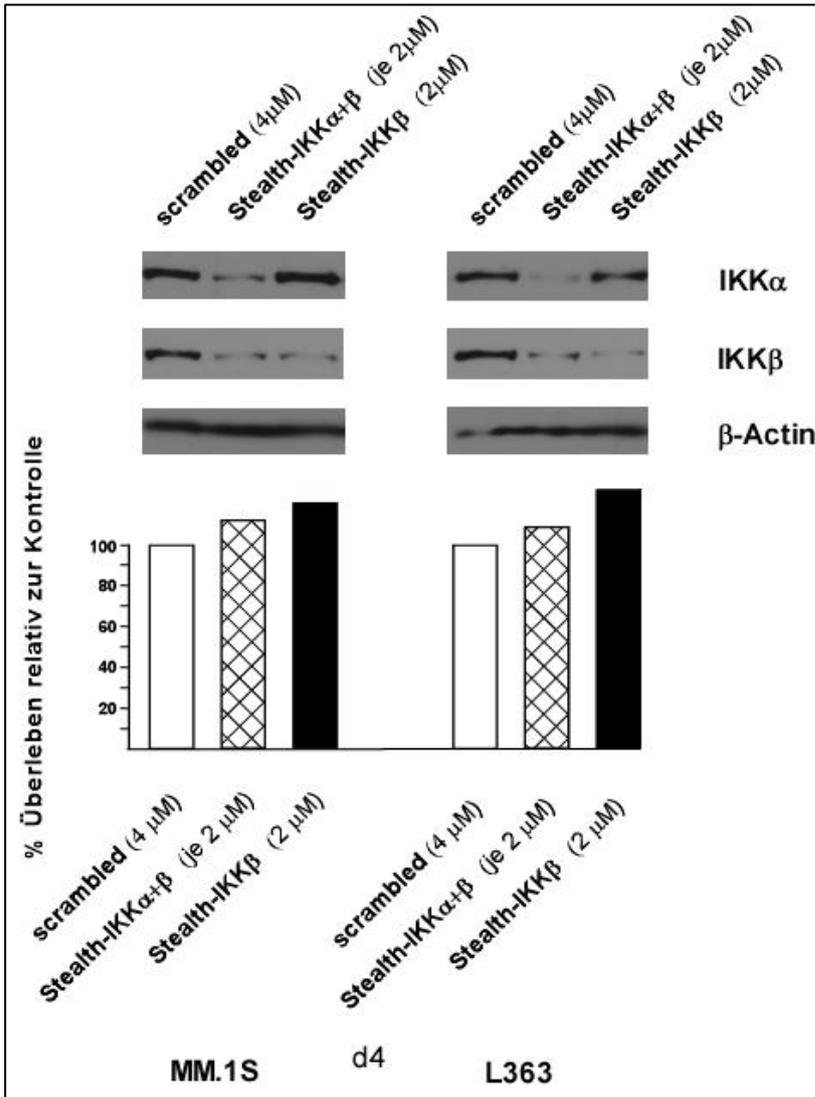


Abbildung 23

Transfektion von IKK- β Stealth-siRNA allein und in Kombination mit IKK- α Stealth-siRNA in L363 und MM.1S Zellen zur Depletion von IKK- α beziehungsweise IKK- β und Messung des Überlebens

Um zu überprüfen ob eine kombinierte Depletion von IKK- α und IKK- β einen Effekt auf die Viabilität von Myelomzellen hat erfolgte die Transfektion von IKK- β Stealth-siRNA allein und in Kombination mit IKK- α Stealth-siRNA. Western Blot Analysen an Tag 4 nach Elektroporation zeigten eine deutliche Reduktion von beiden Zielproteinen. Die am gleichen Tag durchgeführten FACS Analysen zeigten weder für die alleinige Transfektion von IKK- β , noch für die kombinierte Transfektion von IKK- α und IKK- β eine Verringerung der Überlebensrate (siehe Balkendiagramm).

scrambled = Kontroll-siRNA (scrambled siRNA, Sequenz siehe 2.2.2 Design der Oligonukleotide).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass sowohl die RNAi-vermittelte spezifische Suppression der einzelnen Komponenten des IKK-Komplexes (IKK- α , IKK- β

3. ERGEBNISSE

oder IKK- γ) als auch die kombinierte Depletion von IKK- α und IKK- β durch RNAi zu keiner relevanten Verringerung der Viabilität der getesteten Myelomzellen führte. Angesichts der Stärke und Persistenz des Knockdowns steht dieser Befund durchaus im Gegensatz zur Wirkung vieler pharmakologischer IKK Inhibitoren, so dass die Funktionalität des klassischen NF- κ B Signalwegs in den IKK Knockout Zellen im Folgenden etwas näher beleuchtet wurde.

Tabelle 4

	Propidiumjodid			
	nach IKK-γ 3	nach IKK-β 5	nach Stealth- IKK-β	nach Stealth- IKK-α+β
AMO-1	90 +/- 1 (n=2) an Tag 2	91 +/- 0 (n=2) an Tag 3	108 +/- 14 (n=4) an Tag 3	-
L363	92 +/- 2 (n=2) an Tag 2	87 +/- 6 (n=3) an Tag 2	101,6 +/- 3,5 (n=3) an Tag 4	100 +/- 3 (n=3) an Tag 4
MM.1S	-	-	100 +/- 7(n=3) an Tag 4	100 +/- 16 (n=5) an Tag 4

Zelltodanalyse von elektroporierten Myelomzellen nach Knockdown von NF- κ B Signalwegskomponenten.

Übersichtstabelle der Überlebensmessungen (Propidiumjodidfärbung/FACS-Analyse) von AMO-1, L363 und MM.1S Zellen 2-4 Tage nach Elektroporation von shRNA Expressionskonstrukten gegen IKK- γ (IKK- γ 3) beziehungsweise IKK- β (IKK- β 5) oder nach Elektroporation von Stealth siRNA gegen IKK- β alleine (Stealth-IKK- β) beziehungsweise gegen IKK- α und IKK- β in Kombination (Stealth-IKK- α + β). Die angegebenen Werte stellen die Mittelwerte für die Überlebensrate der IKK-Knockdown-Zellen, bezogen auf die jeweilige Kontrolle (= 100%; relative Überlebensrate) dar, sowie die Standardabweichungen. Die Konzentration der shRNA Expressionskonstrukte beziehungsweise der siRNA entspricht für alle gemessenen Werte der Konzentration, bei der ein deutlicher Knockdown zu verzeichnen war. n = Anzahl der Elektroporationsversuche.

3.3 Effekt des IKK- β Knockdowns mittels Stealth-siRNA auf I κ B- α nach TNF- α Stimulation

Da weder die Suppression von IKK- α , noch IKK- β oder IKK- γ einen Effekt auf das Überleben der Zellen zeigte, stellte sich die Frage ob der transiente Knockdown hinreichend war um den klassischen NF- κ B Signalweg zu blockieren. Idealerweise müssten dazu ELISA Experimente zur Bestimmung der Präsenz von p65 Transkriptionsfaktoren in Zellkernextrakten bewerkstelligt werden. Dies konnte aber auf Grund der für diese Assays benötigten Materialmenge nicht mit dem hier verwendeten Auf- und Anreicherungssystem praktiziert werden. Daher wurde untersucht, ob der RNAi-vermittelte IKK Knockdown ausreichte, um den Grad der Phosphorylierung und die Degradation von I κ B- α nach externer Stimulation des Signalwegs mit TNF- α zu unterbinden.

Die Stealth-siRNA-vermittelte Depletion von IKK- β erfolgte für die TNF- α Stimulationsversuche in MM.1S Zellen, da von den drei in dieser Arbeit verwendeten Myelomzelllinien nur MM.1S eine deutliche Reaktion des klassischen Signalwegs auf TNF- α zeigt. An Tag 3 nach Elektroporation wurde TNF- α zur Signalwegsaktivierung appliziert und es wurden in schneller Folge Zellen für Western Blot Analysen geerntet (0 Minuten, 3 Minuten und 10 Minuten nach TNF- α Applikation). Diese dienten sowohl zur Verifikation der erfolgreichen IKK- β Depletion, als auch zur Bestimmung der Spiegel des phosphorylierten und nicht phosphorylierten I κ B- α Proteins.

Im Idealfall sollte durch den Knockdown von IKK- β die Phosphorylierung und die anschließende Degradation von I κ B- α trotz TNF- α Stimulation ausbleiben.

Das Ergebnis zeigte jedoch, dass die in diesem Experiment erreichte Suppression von IKK- β keine Blockade des klassischen NF- κ B Signalwegs im Sinne einer verminderten I κ B- α Phosphorylierung oder einer verminderten I κ B- α Degradation hervorrief (siehe Abbildung 24). Auch die Kinetik der Phosphorylierung oder der Degradation war durch den niedrigeren IKK- β Spiegel nicht beeinträchtigt.

3. ERGEBNISSE

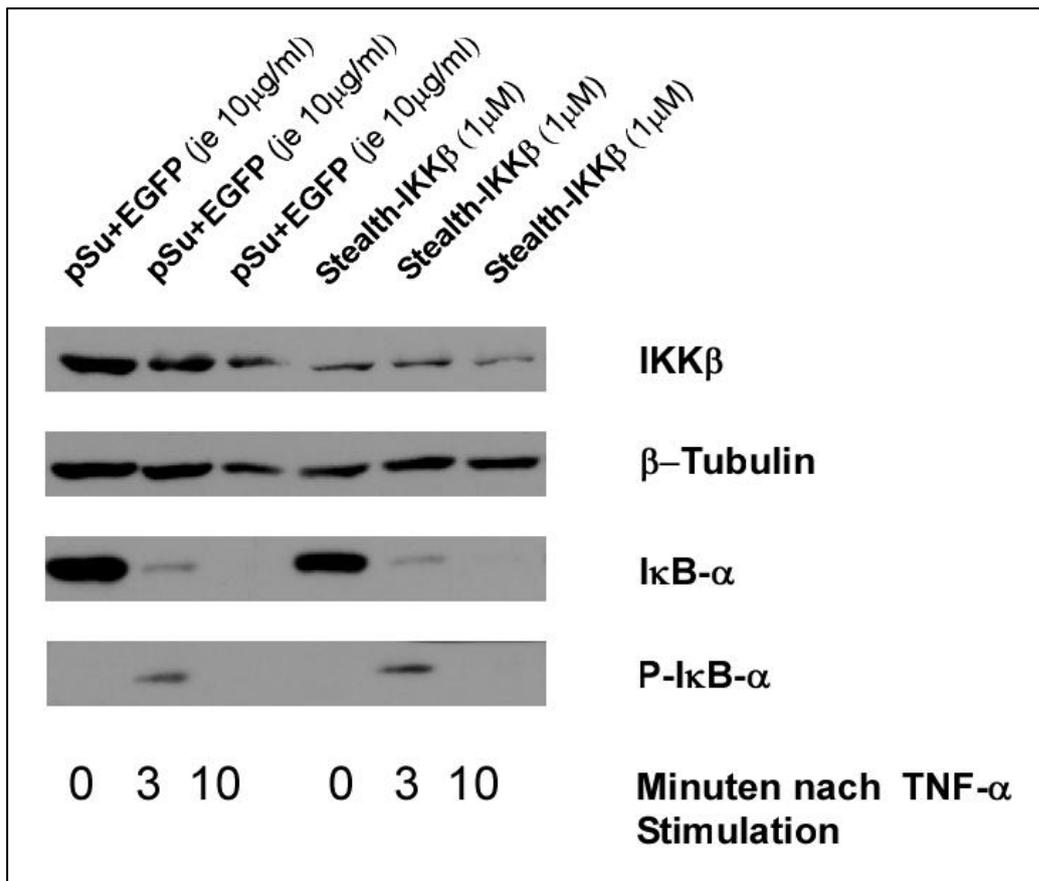


Abbildung 24

Effekt der Suppression von IKK- β auf I κ B- α und phospho-I κ B- α nach TNF- α Stimulation in MM.1S Zellen

Es erfolgte eine Stimulation des NF- κ B Signalwegs mittels TNF- α (100ng/ml) an Tag 3 nach IKK- β Stealth-siRNA-Transfektion. Die Zellen wurden sofort (0), nach 3 Minuten und nach 10 Minuten geerntet und eingefroren. Anschließend folgte eine Western-Blot-Analyse mittels Antikörper gegen IKK- β , I κ B- α und gegen phosphoryliertes I κ B- α (P-I κ B- α).

Trotz signifikanter Depletion von IKK- β zeigte sich keine Verminderung der I κ B- α Phosphorylierung oder der I κ B- α Degradation. Auch die Kinetik der Phosphorylierung und der Degradation von I κ B- α war unverändert.

pSU+EGFP = Kontrolltransfektion (pSUPER Vektor ohne Insert und Expressionsplasmid für Enhanced Green Fluorescent Protein).

Zur Interpretation dieser Experimente ist es allerdings wichtig zu erwähnen, dass für diese extrinsische Signalwegsaktivierung ein sehr starker Stimulus verwendet wurde, der möglicherweise selbst dann durchschlägt wenn eine signifikante Reduktion der IKK Proteine erfolgt ist. Die Relevanz dieses Effekts für die therapeutisch wichtige Frage

der Konsequenzen einer IKK Blockade auf das viel schwächere aber persistente intrinsisch-onkogene NF- κ B Signal bleibt daher unklar. Für eine bessere Einschätzung dieses Befundes wurde daher abschließend untersucht, inwieweit der pharmakologische IKK- β Inhibitor TPCA-1 den TNF- α Stimulationseffekt blockiert, und ob dies mit einer Beeinträchtigung der Viabilität der MM Zellen einhergeht.

3.4 Effekt von TPCA-1 auf I κ B- α nach TNF- α Stimulation

Die oben geschilderten Beobachtungen ließen es möglich erscheinen, dass die Abnahme des IKK- β Spiegels nicht stark genug war um die Signalkaskade nach TNF- α Stimulation zu unterbrechen. Um dies besser beurteilen zu können, wurden MM.1S Zellen mit dem pharmakologischen IKK- β Inhibitor TPCA-1 behandelt. Um die oben erläuterte pharmakologische IKK- β Blockade durchzuführen erfolgte die Aufnahme der Zellen in ein mit Dimethylsulfoxid (DMSO) und TPCA versetztes Vollmedium, wobei DMSO hier als Lösungsmittel für TPCA diente. Nach einer zweistündigen Inkubation der Zellen mit TPCA im Brutschrank wurden die Zellen mit TNF- α (100ng/ml) stimuliert und an den Zeitpunkten 0 Minuten, 3 Minuten und 10 Minuten nach Stimulation geerntet und eingefroren. Die mittels Western Blot Analysen gewonnenen Ergebnisse zeigen eine vollständige Blockade der I κ B- α Phosphorylierung verglichen mit den nur mit DMSO und TNF- α behandelten Kontrollzellen (siehe Abbildung 25, rechter Blot) und entsprechend auch eine Blockade der I κ B- α Degradation nach TNF- α Stimulation (siehe Abbildung 25, linker Blot). Die IKK- β Proteinkonzentration veränderte sich erwartungsgemäß nicht (siehe Abbildung 25). Der Inhibitor ist also in der verwendeten Konzentration durchaus geeignet, um die starke externe Stimulation des klassischen Signalwegs zu unterdrücken. Daher wurde seine Wirkung auf den Zelltod von Myelomzellen untersucht und mit den zuvor ermittelten RNAi Effekten verglichen.

3. ERGEBNISSE

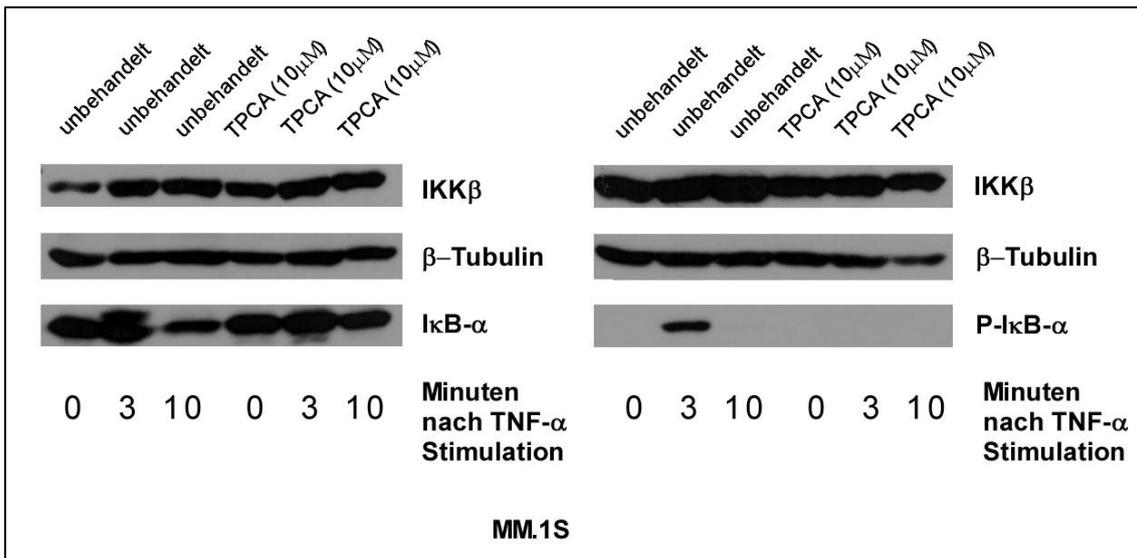


Abbildung 25

Effekt von TPCA auf IκB-α und phospho- IκB-α nach TNF-α Stimulation

MM.1S Zellen wurden entweder nur in mit DMSO versetztem Vollmedium inkubiert („unbehandelt“ = Kontrolle) oder sie wurden in Vollmedium gehalten, das zuvor mit in DMSO gelöstem TPCA (Endkonzentration: 10μM) versetzt worden war. Nach einer zweistündigen Inkubation mit TPCA im Brutschrank erfolgte eine Stimulation mit TNF-α (100ng/ml) und die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 3 und 10 Minuten) nach TNF-α Stimulation geerntet und eingefroren. Es folgte eine Western-Blot-Analyse der Lysate mittels Antikörper gegen IKK-β, IκB-α und phosphoryliertes IκB-α (P-IκB-α). Dabei wurde das gleiche Lysat jeweils zur Herstellung von beiden Blots (rechts und links) verwendet und parallel gefärbt.

3.5 Geringer Effekt von TPCA-1 auf die Überlebensrate von MM.1S

Da durch den IKK-β Inhibitor TPCA-1, im Gegensatz zu der Suppression von IKK-β mittels Stealth-siRNA, eine Blockade der TNF-α-vermittelten extrinsischen IκB-α Phosphorylierung und IκB-α Degradation in MM.1S Zellen erzielt werden konnte, stellte sich die Frage ob TPCA einen Effekt auf das Überleben der Zellen hat. Dazu erfolgte die Messung des Überlebens von MM.1S Zellen nach dreitägiger Inkubation mit dem IKK-β Inhibitor.

3. ERGEBNISSE

Die mittels FACS Analyse ermittelten Daten ergaben, dass sich die relative Überlebensrate bei einer Konzentration von 5µg/ml erst an Tag 3 leicht verminderte (auf etwa 80%) (siehe Abbildung 26 rechts). Bei einer Konzentration von 10µg/ml war schon an Tag 2 ein ähnlicher Effekt zu beobachten (siehe Abbildung 26 links). An Tag 3 ist bei dieser Konzentration eine Verringerung der Überlebensrate auf etwa 70% zu verzeichnen gewesen (siehe Abbildung 26 rechts). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die pharmakologische Blockade von IKK-β der getesteten Myelomzellen nicht mit einem deutlichen Zelltod einhergeht.

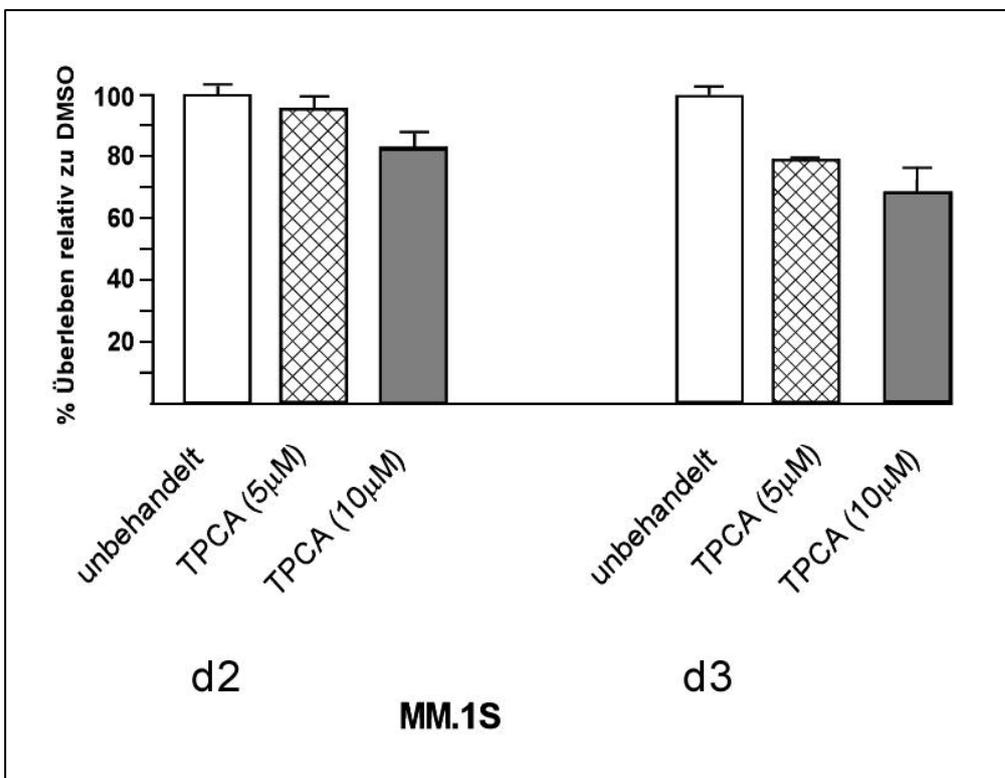


Abbildung 26

Effekt des IKK- β Inhibitors TPCA-1 auf das Überleben von MM.1S Zellen

MM.1S Zellen wurden entweder nur in mit DMSO versetztem Vollmedium gehalten („unbehandelt“ = Kontrolle) oder sie wurden in Vollmedium kultiviert, das zuvor mit in DMSO gelöstem TPCA-1 (Endkonzentrationen: 5 beziehungsweise 10 μ M) versetzt worden war. Am Tag 2 und Tag 3 nach TPCA-1 Applikation erfolgten FACS Analysen zur Darstellung des Überlebens relativ zur Kontrolle (DMSO). Erst an Tag 3 nach der Applikation von TPCA-1 (5 μ M) zeigte sich eine leichte Verminderung der Überlebensrate im Vergleich zur Kontrollpopulation. Bei höherer Konzentration (10 μ M) zeigte sich schon an Tag 2 ein ähnlicher Effekt und an Tag 3 betrug die relative Überlebensrate noch etwa 70%.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass die TNF- α vermittelte Phosphorylierung oder Degradation von I κ B- α prinzipiell durch eine pharmakologische Blockade verhindert werden kann, auch wenn diese Aussage hier streng genommen nur für MM.1S Zellen gemacht werden konnte. Dagegen führte die Depletion von IKK- β durch IKK- β Stealth-siRNA zu keiner Beeinflussung der I κ B- α Phosphorylierung oder Degradation. Beide Verfahren führten nicht zu einer bedeutenden Reduktion der Zellviabilität. Zu berücksichtigen ist, dass die Blockade der in diesen Experimenten durchgeführten sehr starken extrinsischen Stimulation nicht notwendigerweise einen Rückschluss bezüglich der Effektivität oder der Folgen der Blockade der MM-Zell-intrinsischen NF- κ B Aktivierung liefert. Deshalb gilt es mit Hilfe weiterer Experimente, beispielsweise durch die Bestimmung der Menge von p65 und p52 Transkriptionsfaktoren in Zellkernextrakten mittels ELISA, genauere Aussagen über die intrinsische Aktivität von NF- κ B zu erhalten. Obwohl hohe Zellzahlen für solche Assays benötigt werden, ist ihre Durchführung durch die konsequente Verwendung von siRNA statt shRNA bei der Transfektion von Myelomzellen möglich (siehe Steinbrunn et al. (2014)).⁹⁵

4. DISKUSSION

Das Multiple Myelom ist eine klonale bösartige Erkrankung des Knochenmarks, ausgehend von transformierten Plasmazellen, und wird zu den Non-Hodgkin-Lymphomen gezählt. Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit hat sich auf Grund moderner therapeutischer Möglichkeiten auf 50-70% verbessert.⁴⁴ Eine Heilung ist jedoch bis heute nicht möglich, da der Einsatz klassischer und moderner Chemotherapeutika immer auch die Selektion von therapieresistenten Tumorklonen mit sich bringt. Demzufolge ist es wünschenswert, neue molekulare Angriffspunkte zu identifizieren, welche zielgerichtete und individualisiertere Therapieoptionen ermöglichen. Mittlerweile konnte eine Vielzahl von Mutationen identifiziert werden, die an der molekularen Pathogenese des Multiplen Myeloms beteiligt sind.²³ Moderne Sequenzierungsverfahren ganzer Genome der Tumor- und Normalproben von Myelompatienten zeigten eine hohe Mutationslast und insbesondere eine ausgeprägte interindividuelle molekulare Tumorerheterogenität.^{64,65} Daher konnten nur wenig therapierelevante Moleküle identifiziert werden, die als direkter Angriffspunkt für pharmakologische Reagenzien in einer nennenswerten Zahl von Patienten geeignet wären. Trotz der genetischen Komplexität der Krebserkrankung führen die Folgen der Mutationen allerdings möglicherweise nur zur Aktivierung einer übersichtlichen Zahl onkogener Signalwege. Diese Bündelungen onkogener, aktivierender Mutationen, die beispielsweise auch im NF- κ B System vorhanden sind, könnten somit einen Signalweg per se als Angriffspunkt für potentielle pharmakologische Therapeutika ausweisen.

In den letzten 15 Jahren erschienen verschiedene Publikationen, die IKK- β Inhibitoren als wirksam bis hochwirksam gegen Myelomzellen beschrieben haben.⁶⁻¹⁰ Erwähnenswert ist aber, dass in diesen in vitro Versuchen die Effektstärke der verschiedenen Inhibitoren zur Auslösung des Zelltods mit steigender Spezifität für IKK- β eher abnimmt.¹⁰¹ Demzufolge ist es unklar ob die berichtete Toxizität teilweise oder sogar völlig auf unspezifischen Effekten bei den - oftmals - verwendeten recht hohen Konzentrationen beruht. Um die tatsächliche Bedeutung von IKK- β für das Überleben

4. DISKUSSION

von Myelomzellen zu ergründen, wurde in dieser Arbeit ein Ansatz gewählt, bei dem eine spezifische Suppression von IKK- β mittels RNAi bewerkstelligt werden sollte.

Der NF- κ B Signalweg ist an der Pathogenese einer Reihe bösartiger Erkrankungen beteiligt. So ist bei Hodgkin-Lymphomen bekannt, dass eine Dysregulation des NF- κ B Signalwegs das Überleben der malignen Zellen fördert.¹⁰²⁻¹⁰⁵ Dies ist vor allem durch die herausragende Rolle von NF- κ B bezüglich seiner Regulation der Apoptose erklärbar: Zielgene von NF- κ B Transkriptionsfaktoren kodieren für antiapoptotische Zellzyklusregulatoren wie Proteine der cIAP-Familie und Cyclin-D1.^{106,107}

NF- κ B spielt vermutlich auch in gesunden Plasmazellen eine Rolle. Plasmazellen gesunder Individuen weisen eine erhöhte NF- κ B Aktivität auf, welche auf extrinsische Signale des umgebenden Milieus zurückzuführen ist.⁵⁹ Diese Signale sind unter anderem essentiell für das Überleben gesunder Zellen.¹⁰⁸ Aber auch die Rolle parakriner, NF- κ B-vermittelter Einflüsse von Knochenmarksstromazellen auf maligne Zellen ist belegt.¹⁰⁹

In 17% aller primären Myelomzellen und in 40% aller Myelomzelllinien konnten Mutationen identifiziert werden, die zu einer Aktivierung des NF- κ B Signalwegs führen.⁵⁹ Die Blockade des NF- κ B Signalwegs mittels des IKK- β Inhibitors MLN120b führte bei einer Vielzahl von Myelomzelllinien zu einer graduellen Verminderung des Überlebens.⁵⁷ Es wurden Genexpressionsprofile von MLN120b-sensitiven Zelllinien mit und ohne IKK- β Blockade erstellt.⁵⁷ Die Expression von 11 Genen war durch die Blockade von IKK- β vermindert.⁵⁷ 9 dieser Gene sind bekannte Zielgene von NF- κ B.⁵⁸ Zur Abschätzung der NF- κ B Aktivität wurde der NF- κ B Index eingeführt, der die Expression dieser 9 Gene zusammenfasst um daraus ein relatives Maß für die NF- κ B Signalstärke abzuleiten.⁵⁸ Fast alle analysierten MGUS-Tumore, 80% der primären Myelom-Tumore und etwa 50% der Myelomzelllinien, aber auch gesunde Plasmazellen zeigten einen erhöhten NF- κ B Index verglichen mit unreifen B-Zellen.⁵⁷⁻⁵⁹ Auffallend war im Rahmen dieser Analysen, dass die meisten Myelomzelllinien mit einem erhöhten NF- κ B Index Mutationen im NF- κ B Signalweg aufwiesen.⁵⁸ Des Weiteren korrelierte die Anwesenheit von p65 im Zellkern mit der Höhe des NF- κ B Indexes.⁵⁷

4. DISKUSSION

Diese Hinweise unterstützen die Annahme, dass eine Blockade von IKK- β auf Grund der Aktivierung des klassischen NF- κ B Signalwegs eine therapeutische Option darstellen könnte.

Hideshima et al. (2009) zeigten dagegen in verschiedenen Myelomzelllinien, dass eine Aktivierung von NF- κ B auch mit Zelltoxizität einhergehen kann. Die Behandlung von Myelomzelllinien mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib führte bei Zelllinien und primären Myelom-Zellen zu einer Verminderung der Zellviabilität, obwohl eine Phosphorylierung von IKK- β , eine Degradation von I κ B- α sowie eine verstärkte Konzentration von NF- κ B Transkriptionsfaktoren im Zellkern gemessen werden konnten.¹¹⁰ Die Annahme, dass die Wirkung von Bortezomib auf die Blockade des NF- κ B Signalwegs (mittels Inhibition der proteasomalen Degradation von I κ B- α) zurückzuführen ist, sollte demzufolge differenzierter betrachtet werden. Bei MM.1S Zellen zeigte die Behandlung mit Bortezomib keine Aktivierung des klassischen, jedoch des alternativen NF- κ B Signalwegs, obwohl es auch in dieser Zelllinie zu einer Phosphorylierung von IKK- β und zu einer Degradation von I κ B- α nach Applikation von Bortezomib kam.¹¹⁰

Diese teilweise widersprüchlichen Wirkungen von NF- κ B im Multiplen Myelom unterstreichen die Notwendigkeit einer differenzierteren Analyse des klassischen Signalwegs in verschiedenen Zelllinien.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene RNAi-basierte Ansätze verwendet, um die Relevanz des IKK-Komplexes als möglicher therapeutischer Angriffspunkt eingehender zu charakterisieren. Nachteile der pharmakologischen Analyse (z.B. mittels MLN120b) stellen mögliche unspezifische Effekte dar (siehe Rauert-Wunderlich et al. (2013)).¹⁰¹ Infolgedessen wurde in dieser Arbeit eine hochspezifische Suppression der verschiedenen Bestandteile des IKK-Komplexes, einzeln oder in Kombination angestrebt. Dies erfolgte mittels shRNA Expressionsvektoren und mittels Stealth-siRNA Oligonukleotiden. Die Messung des Effekts der Suppression der Zielproteine auf das Überleben erfolgte mittels FACS Analyse.

Es erfolgte eine transiente Transfektion der shRNA Expressionsvektoren oder der Stealth-siRNA in die Myelomzelllinien AMO-1, L363 und MM.1S. AMO-1 eignete sich

4. DISKUSSION

auf Grund der hohen Transfektionseffizienz insbesondere auch zur initialen Identifizierung funktioneller shRNA-Expressionskonstrukte. L363 war für die Fragestellung dieser Arbeit besonders relevant denn diese Zelllinie wurde in der Veröffentlichung von Annunziata et al. (2007) als MLN120b sensitive Zelllinie charakterisiert: Der IKK- β Inhibitor MLN120b führte bei vielen Zelllinien, wenn auch bei Applikation hoher Konzentrationen, zu einer Verringerung der Viabilität.⁵⁷ Bei der Interpretation dieser Daten ist allerdings wichtig zu beachten, dass ein höherer relativer Anteil toter Zellen bei tage- bis wochenlangen Inkubationszeiten nicht zwangsläufig auf apoptotische Effekte, sondern möglicherweise auch auf eine verringerte Proliferationsrate zurückzuführen ist, sofern die normale Hintergrundrate absterbender Zellen in der Kultur unverändert bleibt. Den Daten von Demchenko et al. (2010) ist zu entnehmen, dass L363 einen relativ hohen NF- κ B Index und Mutationen des NF- κ B Signalwegs aufweist.⁵⁸ Sowohl die NF- κ B Aktivität des klassischen, als auch die des alternativen Signalwegs wird als erhöht angegeben.⁵⁸ Für den alternativen NF- κ B Signalweg wurden p52 (NFKB2) und RelB gemessen und für den klassischen NF- κ B Signalweg p50 (NFKB1) und p65.⁵⁸ MM.1S ist ebenfalls geeignet um den Effekt der Suppression von IKK- β auf die Viabilität zu überprüfen. Ein hoher NF- κ B Index und Mutationen im Signalweg sind zwar in Demchenko et al. (2010) nur für "MM.1" aufgeführt, auf Grund der engen Verwandtschaft der beiden Zelllinien können jedoch ähnliche Mutationen und ein ähnlicher NF- κ B Index in MM.1S erwartet werden.⁹⁴ Auch für die Analyse von I κ B- α nach IKK- β -Suppression war MM.1S trotz erhöhter NF- κ B Aktivität geeignet, da eine messbare Basiskonzentration von I κ B- α vorhanden war. Für AMO-1 Zellen ist kein NF- κ B Index bekannt. Jedoch ist insbesondere der alternative Signalweg konstitutiv deutlich aktiviert (hohes p52:p100 Verhältnis).¹¹¹

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen in der Summe, dass die Suppression von IKK- β durch RNAi in den Zelllinien AMO-1, L363 und MM.1S keine Rolle für das Überleben der Zellen zu spielen scheint. Die Suppression mittels eines shRNA Expressionsvektors sowie diejenige durch siRNA zeigte durchweg bei teilweise sehr guten Knockout-Spiegeln keine nennenswert erhöhte Apoptoserate im Zeitfenster

4. DISKUSSION

von bis zu 5 Tagen nach der Transfektion (siehe Abbildung 17, Abbildung 18, Abbildung 19, Abbildung 20, Abbildung 21, Abbildung 22 und Tabelle 4).

Da auch IKK- γ für die Signaltransduktion des klassischen NF- κ B Signalwegs und für die Gesundheit eines Organismus eine wichtige Rolle spielt (in Tierexperimenten war das Überleben von IKK- γ (-/-) Knockout-Mäusen sogar stärker beeinträchtigt als in IKK- β (-/-) Knockout Mäusen),¹¹² wurden Experimente mit einem IKK- γ shRNA Expressionsvektor durchgeführt. Hierbei sind allerdings ebenfalls keine wesentlichen Veränderungen der Überlebensrate nach Suppression zu verzeichnen gewesen (siehe Abbildung 16).

Obwohl in der Vergangenheit IKK- α eine geringere Rolle für die Aktivierung von NF- κ B zugesprochen wurde, sind Hinweise vorhanden, dass auch IKK- α für die Expression von NF- κ B Zielgenen notwendig ist.⁸⁴ Darüber hinaus führen die meisten Mutationen im NF- κ B System zu einer erhöhten Bereitstellung der NF- κ B induzierenden Kinase (NIK) und damit zu einer vermehrten Aktivierung des alternativen (und - im onkogenen Zusammenhang - offenbar gleichzeitig auch des klassischen) Signalwegs.⁵⁸ Um die Relevanz von IKK- α - das Protein stellt eine wichtige Komponente des alternativen Signalwegs unterhalb von NIK dar - für das Überleben von Myelomzellen zu untersuchen, erfolgte die Transfektion von IKK- α Stealth-siRNA alleine und in Kombination mit IKK- β Stealth-siRNA. Die RNAi vermittelte Depletion der Zielproteine führte jedoch auch in diesen Versuchsansätzen nicht zum Verlust der Viabilität der getesteten Zellen (siehe Abbildung 23).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse somit, dass die RNAi-vermittelte molekulare Suppression der drei einzelnen Komponenten des IKK-Komplexes, IKK- α , IKK- β beziehungsweise IKK- γ , keinen nachteiligen Überlebenseffekt in den Myelomzelllinien AMO-1, L363 und MM.1S hatte. Darüber hinaus hatte auch die kombinierte Depletion von IKK- α und IKK- β keine nennenswerte apoptotische Wirkung. Ein solches Ergebnis war insbesondere für die Zelllinien L363 und MM.1S überraschend, denn da L363 laut Annunziata et al. (2007) zu den MLN120b sensitiven Zelllinien gehört, sollte bei einer signifikanten Abhängigkeit des Überlebens dieser Zelllinie vom klassischen NF- κ B Weg zumindest die Suppression von IKK- β zu einer Verringerung der Viabilität geführt

4. DISKUSSION

haben. Potenziell sind drei Hauptgründe denkbar, warum die RNAi-vermittelte und die publizierten pharmakologischen Wirkungen (die allerdings selbst wiederum ein breites Spektrum der Wirksamkeit repräsentieren, siehe unten.) nicht identisch sind:

i) der RNAi-vermittelte Effekt war nicht ausreichend, um die Aktivität des klassischen NF- κ B Signalwegs hinreichend zu unterdrücken. Dies ist gerade bei Kinasen nicht immer einfach zu quantifizieren, und da der entscheidende Assay, nämlich die Messung der Präsenz von NF- κ B Transkriptionsfaktoren in Kernpräparaten aufgrund des limitierten Materials nicht durchgeführt werden konnte, war dies in dieser Arbeit nicht abschließend zu beurteilen. Allerdings waren die erreichten Knockdownspiegel in der Mehrzahl der Versuche durchaus ausgezeichnet und vergleichbar mit Werten, bei denen in anderen Signalwegen mit den hier verwendeten Methoden klare funktionelle Ergebnisse zu erzielen waren.¹¹³⁻¹¹⁵

ii) das gewählte Zeitfenster war zu kurz, um funktionelle Konsequenzen zu messen. Diese Möglichkeit besteht, und da für pharmakologische Inhibitoren sowohl fulminante als auch sehr langsame Zelltodwirkungen bei Myelomzellen beschrieben sind (siehe Annunziata et al. (2007) und Rauert-Wunderlich et al. (2013)^{57,101} gibt es genau genommen nicht einmal einen Maßstab, auf den man eine eindeutige Einschätzung beziehen könnte. Mit den hier verwendeten transienten Expressionssystemen ist diese Frage nicht zu beantworten und eine Konsequenz aus den hier beschriebenen Befunden ist, dass im Rahmen des Teilprojekts 8 "Regulierung, Einbindung und Bedeutung des NF- κ B-Systems im onkogenen Signalnetzwerk des Multiplen Myeloms" der Klinischen Forschergruppe 216 "Multiples Myelom" Systeme zur stabilen induzierten RNAi-vermittelten Depletion von Komponenten des NF- κ B Systems in der Entwicklung sind (Dr. Thorsten Stühmer, mündliche Korrespondenz).

iii) Die Blockade des klassischen (und/oder alternativen) NF- κ B Systems ist in Myelomzellen doch nicht von besonderer Bedeutung, und die pharmakologischen Effekte sind potentiell eher auf andere Wirkungen zurückzuführen.

4. DISKUSSION

Wie oben kurz erwähnt ist in der Folge dieser Arbeit die Fragestellung der Bedeutung des NF- κ B Systems in Myelomzellen im Labor weiter bearbeitet worden (Teilprojekt 8 der Klinischen Forschergruppe 216). Unter anderem durch die transiente Expression eines Expressionsvektors für dominant negatives I κ B- α konnte dabei gezeigt werden, dass dieses Reagenz die p65 Aktivität im Zellkern von L363 Zellen völlig unterdrückt, doch ließen sich auch unter diesen Bedingungen keinerlei Effekte auf die Apoptose oder auch nur auf die Proliferation von L363 Zellen nachweisen (Dr. Thorsten Stühmer, mündliche Korrespondenz), was die in dieser Arbeit beschriebenen Befunde unterstützt. Gleichfalls blieb ein transientes Ausschalten von p52 in verschiedenen MM Zelllinien wirkungslos (Dr. Thorsten Stühmer, mündliche Korrespondenz), was ebenfalls mit dem hier beobachteten Fehlen von Auswirkungen des IKK- α Knockdowns vereinbar ist, wogegen ein Knockdown von NIK durchaus zu erhöhtem Zelltod der MM Linien JLN-3 und L363 führte (Dr. Thorsten Stühmer, mündliche Korrespondenz). Es ist somit denkbar, dass, obwohl eine intrinsische Aktivitätssteigerung von NIK den alternativen und den klassischen Signalweg in Myelomzellen zweifellos aktiviert, die eigentliche für das Überleben von Myelomzellen wichtige Funktion von NIK unabhängig von NF- κ B ist, oder vielleicht als weitere Säule parallel zum NF- κ B Signal verläuft. In beiden Fällen wäre dann NIK der therapeutisch potentiell interessanteste therapeutische Angriffspunkt, und das Design von "small molecule" NIK Inhibitoren ist durchaus ein hochaktuelles Gebiet der pharmazeutischen Forschung. Für eine solche Annahme könnte auch sprechen, dass die große Mehrzahl der gefundenen Mutationen des NF- κ B Systems von Myelomzellen zu einer Verlängerung der Halbwertszeit von NIK führt (also z.B. Deletion von TRAF2, TRAF3, NIK-Translokationen), was bei dieser konstitutiv aktiven Kinase mit sehr kurzer Halbwertszeit einer direkten Aktivitätsvermehrung gleichkommt. Dieses Muster unterscheidet sich deutlich von der hohen mutationsbedingten NF- κ B Aktivierung von Hodgkin Zellen, wo genetische Läsionen durchaus (auch) weiter unten im Signalweg zu finden sind und oft die Inaktivierung von inhibitorischen Proteinen der Transkriptionsfaktoren betreffen.¹¹⁶ Gegen eine solche Rolle von NIK spricht allerdings, dass die Depletion von IKK- α keinen Einfluss auf Myelomzellen hatte, und IKK- α nach wie vor das einzige experimentell belegte

4. DISKUSSION

Substrat der NIK ist, von einer einzigen neueren Publikation einmal abgesehen.¹¹⁷ Allerdings ist wiederum nicht auszuschließen, dass in transformierten und NIK dysregulierten Zellen Substrate wichtig werden, die in regulären Zellen, also den für die meisten grundlagenwissenschaftlichen Analysen der NF- κ B Signalwege verwendeten Systemen, so nicht gelten. Auch dies ist ein interessantes Feld für zukünftige Untersuchungen, insbesondere wenn induzierbare Knockout-Systeme für NIK in MM Zellen etabliert werden könnten.

Kurz diskutiert werden sollen abschließend auch noch die TNF- α -Experimente zur Testung der Funktionalität des klassischen NF- κ B Wegs nach IKK- β Knockdown. Eine verminderte Degradation von I κ B- α nach TNF- α Stimulation hätte auf jeden Fall bedeutet, dass eine effektive Blockade des klassischen NF- κ B Signalwegs erzielt wurde. Die durch transiente Transfektion von IKK- β Stealth-siRNA hervorgerufene Depletion von IKK- β führte in der Zelllinie MM.1S jedoch nicht zu einer Verminderung der Phosphorylierung und somit auch nicht zu einer nennenswerten Verminderung der Degradation von I κ B- α nach TNF- α Zugabe (siehe Abbildung 24). Es ist auch keine Veränderung der Kinetik dieser Parameter zu verzeichnen gewesen (siehe Abbildung 24). Dagegen ließ sich der klassische Signalweg mit dem small molecule IKK- β Inhibitor TPCA-1 (10 μ M) durchaus so blockieren, dass der TNF- α Effekt vollständig unterbunden wurde (siehe Abbildung 25). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist, dass der Knockdown von IKK- β in MM.1S Zellen nicht hinreichend stark war um wirklich die Gesamtaktivität der Kinase so stark zu beeinträchtigen, dass es nicht zu einem "Durchschlagen" der TNF- α Wirkung kommt. Diese war bei einer unphysiologisch hohen Konzentration des Zytokins von 100ng/ml möglicherweise ohnehin übertrieben stark ausgeprägt. Insofern ist die Aussagekraft dieses Experiments bezüglich der Beeinflussung der viel geringeren aber dafür permanenten intrinsischen NF- κ B Aktivität durch den IKK- β Knockdown unklar. Gleiches gilt für die generelle Relevanz dieses externen Stimulus, denn obwohl TNF- α prinzipiell zu den starken Stimulantien des klassischen NF- κ B Signalwegs zählt, reagieren nur die wenigsten Myelomzelllinien überhaupt auf eine TNF- α Zugabe (Dr. Thorsten Stühmer, mündliche Korrespondenz).

4. DISKUSSION

Obwohl die Blockade des klassischen Signalwegs durch TPCA-1 bei einer Konzentration von 10 μ M praktisch vollständig war, führte diese Behandlung selbst nach 3 Tagen nur zu relativ schwachen Zelltodeffekten (siehe Abbildung 26, siehe auch Rauert-Wunderlich et al. (2013)).¹⁰¹ Obwohl die Affinität von TPCA zu IKK- β etwa 550 mal größer als zu anderen Kinasen und etwa 22 mal größer als zu IKK- α ist,¹¹⁸ kann bei dieser Konzentration nicht ausgeschlossen werden, dass selbst diese schwache Wirkung unspezifischen Toxizitäten beruht. Unspezifische Wirkungen können bei pharmakologischen Substanzen durchaus auch auf Effekten beruhen, die nichts mit einer Bindung an strukturell verwandte Stellen, z.B. die ATP-Bindungsstellen verschiedener Kinasen, zu tun haben. So kann beispielsweise die Bildung von Aggregaten auf Grund ihrer ab- und adsorptiven Eigenschaften zu einer Inhibition von Enzymen führen.¹¹⁹

Bestätigt wurde die nur schwache anti-Myelom-Wirkung von TPCA-1 durch Experimente mit dem Neddylierungs-Inhibitor MLN4924, der ebenfalls den klassischen Signalweg vollkommen hemmt indem er die Ubiquitinylierung und damit den proteasomalen Abbau von I κ B- α verhindert.¹⁰¹ Insofern deuten sowohl die si/shRNA Experimente, als auch zwei verschiedene pharmakologische Inhibitoren des klassischen NF- κ B Wegs darauf hin, dass eine kurz- bis mittelfristige Blockade dieses Signalwegs bestenfalls nur geringe apoptotische Wirkungen in Myelomzellen bewirkt. Ein Anspruch auf besondere Bedeutung des IKK-Komplexes als Zielstruktur für eine Myelomtherapie ist auf dieser Datengrundlage folglich derzeit nicht abzuleiten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Obwohl diverse Mutationen des NF- κ B Systems in Myelomzelllinien und primären Myelomzellen eine pathogenetische Beteiligung andeuten,^{57,59} ist die Relevanz des IKK-Komplexes als molekularer Angriffspunkt für die Entwicklung medikamentöser Therapieoptionen noch nicht ausreichend geklärt. Zwar führte die Applikation des IKK- β Inhibitors MLN120b dosisabhängig und längerfristig zu einer Reduktion der Zellviabilität in einer Vielzahl von Myelomzelllinien,⁵⁷ doch kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei höheren Konzentrationen unspezifische Wirkungen für die beobachteten Effekte (mit-) verantwortlich sind.

Aus diesem Grund erfolgte in der vorliegenden Arbeit eine spezifische Suppression von IKK- α , IKK- β oder IKK- γ mittels transienter Transfektion von shRNA-Expressionsvektoren oder Stealth-siRNA. Es folgte die Charakterisierung der verminderten Zielproteinspiegel mittels Western-Blot und die Messung der Viabilität der Zellen mittels FACS Analysen. Darüber hinaus wurde in TNF- α Stimulationsexperimenten der Effekt der Suppression von IKK- β mittels Stealth-siRNA auf (Phospho-)I κ B- α analysiert. Schließlich erfolgte die Applikation des IKK- β Inhibitors TPCA, dessen Wirkung auf die Zellviabilität und auf die TNF- α -vermittelte Phosphorylierung und Degradation von I κ B- α in MM.1S Zellen untersucht wurde.

Die Experimente mit Stealth-siRNA zeigten, dass weder die Suppression von IKK- β , noch die Suppression von IKK- α oder IKK- γ in AMO-1, L363 oder MM.1S eine Verminderung der Zellviabilität bewirken konnte. Auch eine kombinierte Suppression von IKK- α zusammen mit IKK- β in L363 und MM.1S Zellen bewirkte keinen vermehrten Zelltod. Dagegen zeigte die Behandlung von MM.1S Zellen mit hohen Konzentrationen von TPCA einen geringen Effekt auf das Überleben dieser Zellen. Die Suppression von IKK- β mittels Stealth-siRNA in MM.1S konnte nicht die TNF- α vermittelte I κ B- α Phosphorylierung und Degradation verhindern. Sowohl die hohe TNF- α Konzentration von 100ng/ml, als auch eine unvollständige Suppression von IKK- β könnte dazu

5. ZUSAMMENFASSUNG

beigetragen haben. In analogen Experimenten mit TPCA konnte die TNF- α vermittelte I κ B- α Phosphorylierung und Degradation dagegen effektiv unterdrückt werden.

In der Zusammenschau der Ergebnisse konnte somit eine potenzielle therapeutische Relevanz des IKK-Komplexes als molekularer Angriffspunkt für eine Myelomtherapie nicht gefunden werden.

Eine noch detailliertere Analyse der Funktionalität des Signalwegs (insbesondere eine Messung der Aktivität der NF- κ B Transkriptionsfaktoren im Zellkern) und die Etablierung stabiler und induzierbarer Expressionssysteme für längerfristige Untersuchungen der RNAi Wirkungen in Myelomzellen, stellen weiterführende Wege zu einer umfangreicheren Beurteilung der pathobiologischen und therapeutischen Bedeutung des NF- κ B Systems dar. Darüber hinaus sind die das NF- κ B System betreffenden Mutationen genauer hinsichtlich ihrer potenziellen Wirkung auf NF- κ B unabhängige Signalwege zu untersuchen.

Teilergebnisse der hier dargestellten Versuche haben Eingang in die folgende Publikation gefunden:

H. Rauert-Wunderlich, D. Siegmund, **E. Maier**, T. Giner, R.C. Bargou, H. Wajant, T. Stühmer "The IKK inhibitor Bay 11-7082 induces cell death independent from inhibition of activation of NF κ B transcription factors". *PLoS One* **8**(3), e59292 (2013).

6. ANHANG

pSUPER (3176bp):

VEKTOR: pSUPER.basic

KATALOG#: VEC-PBS-0001/0002

Schnittstellen:

Bgl II: 928

Hin dIII: 934

Eco RI: 707

Sal I: 949

Xho I: 955

Klonierung (64-nt Insert)

Eco RI – *Hin* dIII : Positiver Klon : 291 bp Fragment

Eco RI – *Hin* dIII : Negativer Klon : 227 bp Fragment

Vektor Charakteristika

f1(+) origin: 441-135

H1 promoter: 708 - 934

pUC origin: 1373-2040

Ampicillin Resistenz ORF: 3048-2191

T7 Primer Bindungssequenz (AATACGACTCACTATAG): 627-643

T3 Primer Bindungssequenz (CTTTAGTGAGGGTTAAT): 989-1005

M13(-20) Primer Bindungssequenz (GTAAAACGACGGCCAGT): 600-616

M13 Rückwärts Primer Bindungssequenz (CATGGTCATAGCTGTT): 1023-1038

6. ANHANG

Vektorsequenz: Schnittstellen für *Bgl* II (rot), *Hin* dIII (braun) und *Eco* RI (schwarz) sind hervorgehoben

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTTGTTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCAT
TTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAAATAGACCGAGATA
GGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGT
CAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCCATAATCAA
GTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTT
AGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAAGAAAGCGAAAGGAGC
GGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGC
TTAATGCGCCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTGCCATTACAGGCTGCGCACTGTTGGGAAGGG
CGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCG
ATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGC
GCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACC GCGGTGGCGGCCGCTCTAGA
ACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGAACCGTACGCTCATCAACCCGCTCCAAGGAA
TCGCGGGCCAGTGTCACTAGGCGGGAACACCAGCGCGCTGCGCCCTGGCAGGAAGATGG
CTGTGAGGGACAGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTTGCATGTCGCTATGTGTTCTGGGAAAT
CACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACAGA
TCTAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGGGGGGCGCGGTACCCAGCTTTTGTTCCTTT
AGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATGT
TATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGC
CTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAA
ACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATT
GGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGGGAGC
GGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAA
AGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTGGCG
TTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTG
GCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCT
CTCCTGTTCCGACCCCTGCGCCTTACCGGATACCTGTCCGCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTG
GCGCTTTCTCATAGCTCACGCTACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCCGCT
GGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTC
TTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATT
AGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTA
CACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAG
TTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGAAG
CAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTC
TGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGA
TCTTCACCTAGATCCTTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAG
TAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCT
ATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCT
TACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTA
TCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCCCTGCAACTTTATCCGC
CTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCGCCAGTTAATAGTT
TGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCT
TCATTACGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAA
AGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATATCAC
TCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCT
GTGACTGGTGTGACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGATGCGGGCAGCCGAGTTGCTC
TTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCA
TTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCG
ATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGG
GTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTT
GAATACTCATACTCTTCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATG
AGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCC
CCGAAAAGTGCCAC

7. LITERATUR

1. Herold, G. *Innere Medizin*, (2011).
2. Kyle, R.A. & Rajkumar, S.V. Multiple Myeloma. *Blood* **111**, 2962-2972 (2008).
3. International Myeloma Working, G. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* **121**, 749-757 (2003).
4. Bahlis, N.J. Darwinian evolution and tiding clones in multiple myeloma. *Blood* **120**, 927-928 (2012).
5. Lin, Y., Bai, L., Chen, W. & Xu, S. The NF-kappaB activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **14**, 45-55 (2010).
6. Hideshima, T., *et al.* MLN120B, a novel IkappaB kinase beta inhibitor, blocks multiple myeloma cell growth in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* **12**, 5887-5894 (2006).
7. Hideshima, T., *et al.* Biologic sequelae of IkappaB kinase (IKK) inhibition in multiple myeloma: therapeutic implications. *Blood* **113**, 5228-5236 (2009).
8. Watanabe, M., *et al.* A novel NF-kappaB inhibitor DHMEQ selectively targets constitutive NF-kappaB activity and induces apoptosis of multiple myeloma cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer* **114**, 32-38 (2005).
9. Sanda, T., *et al.* Growth inhibition of multiple myeloma cells by a novel IkappaB kinase inhibitor. *Clin Cancer Res* **11**, 1974-1982 (2005).
10. Jourdan, M., *et al.* Targeting NF-kappaB pathway with an IKK2 inhibitor induces inhibition of multiple myeloma cell growth. *Br J Haematol* **138**, 160-168 (2007).
11. Classen, M., Diehl, V., Kochsiek, K. *Innere Medizin*. **5**, 775 (2009).
12. Kyle, R.A., *et al.* Prevalence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med* **354**, 1362-1369 (2006).
13. Kyle, R.A., *et al.* A Long-Term Study of Prognosis in Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance. *N Engl J Med* **346**, 564-569 (2002).
14. Weiss, B.M., Abadie, J., Verma, P., Howard, R.S. & Kuehl, W.M. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients. *Blood* **113**, 5418-5422 (2009).
15. Landgren, O., *et al.* Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood* **113**, 5412-5417 (2009).
16. Becker, N. Epidemiology of multiple myeloma. *Recent Results Cancer Res* **183**, 25-35 (2011).
17. Sant, M., *et al.* EURO CARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *Eur J Cancer* **45**, 931-991 (2009).
18. Provan, D. *Oxford Handbook of Clinical Haematology*, (2004).
19. Giuliani, N., Rizzoli, V. & Roodman, G.D. Multiple myeloma bone disease: pathophysiology of osteoblast inhibition. *Blood* **108**, 3992-3996 (2006).
20. Yaccoby, S., *et al.* Antibody-based inhibition of DKK1 suppresses tumor-induced bone resorption and multiple myeloma growth in vivo. *Blood* **109**, 2106-2111 (2007).
21. Durie, B.G. & Salmon, S.E. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* **36**, 842-854 (1975).
22. Greipp, P.R., *et al.* International Staging System for Multiple Myeloma. *J Clin Oncol* **23**, 3412-3420 (2005).

7. LITERATUR

23. Chesi, M. & Bergsagel, P.L. Molecular pathogenesis of multiple myeloma: basic and clinical updates. *Int J Hematol* **97**, 313-323 (2013).
24. Sirohi, B. & Powles, R. Multiple myeloma. *Lancet* **363**, 875-885 (2004).
25. Kyle, R.A., *et al.* Clinical Course and Prognosis of Smoldering (Asymptomatic) Multiple Myeloma. *N Engl J Med* **356**, 2582-2590 (2007).
26. Barlogie, B., Smith, L. & Alexanian, R. Effective treatment of advanced multiple myeloma refractory to alkylating agents. *N Engl J Med* **310**, 1353-1356 (1984).
27. Alexanian, R., Dimopoulos, M.A., Delasalle, K. & Barlogie, B. Primary Dexamethasone Treatment of Multiple Myeloma. *Blood* **80**, 887-890 (1992).
28. Child, J.A., *et al.* High-Dose Chemotherapy with Hematopoietic Stem-Cell Rescue for Multiple Myeloma. *N Engl J Med* **348**, 1875-1883 (2003).
29. Attal, M., *et al.* A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N Engl J Med* **335**, 91-97 (1996).
30. Barlogie, B., *et al.* Treatment of multiple myeloma. *Blood* **103**, 20-32 (2004).
31. Singhal, S., *et al.* Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* **341**, 1565-1571 (1999).
32. Richardson, P.G., *et al.* A Phase 2 Study of Bortezomib in Relapsed, Refractory Myeloma. *N Engl J Med* **348**, 2609-2617 (2003).
33. Richardson, P.G., *et al.* Immunomodulatory drug CC-5013 overcomes drug resistance and is well tolerated in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood* **100**, 3063-3067 (2002).
34. Richardson, P.G., *et al.* A randomized phase 2 study of lenalidomide therapy for patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood* **108**, 3458-3464 (2006).
35. Lonial, S., Kaufman, J., Laubach, J. & Richardson, P. Elotuzumab: a novel anti-CS1 monoclonal antibody for the treatment of multiple myeloma. *Expert Opin Biol Ther* **13**, 1731-1740 (2013).
36. Badros, A. In the Age of Novel Therapies, What Defines High-Risk Multiple Myeloma? *J Natl Compr Canc Netw* **8**, 28-34 (2010).
37. Smith, A., *et al.* Guidelines on the diagnosis and management of multiple myeloma 2005. *Br J Haematol* **132**, 410-451 (2006).
38. Riccardi, A., *et al.* Long-term survival of stage I multiple myeloma given chemotherapy after diagnosis or at progression of the disease: a multicentre randomized study. Cooperative Group of Study and Treatment of Multiple Myeloma. *British Journal of Cancer* **82**, 1254-1260 (2000).
39. Rajkumar, S.V., *et al.* Thalidomide as initial therapy for early-stage myeloma. *Leukemia* **17**, 775-779 (2003).
40. Weber, D., Rankin, K., Gavino, M., Delasalle, K. & Alexanian, R. Thalidomide alone or with dexamethasone for previously untreated multiple myeloma. *J Clin Oncol* **21**, 16-19 (2003).
41. Mateos, M.V., *et al.* Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med* **369**, 438-447 (2013).
42. Brenner, H., Gondos, A. & Pulte, D. Expected long-term survival of patients diagnosed with multiple myeloma in 2006–2010. *Haematologica* **94**, 270-275 (2009).
43. Raab, M.S., Podar, K., Breitkreutz, I., Richardson, P.G. & Anderson, K.C. Multiple myeloma. *Lancet* **374**, 324-339 (2009).
44. Bergsagel, P.L., Mateos, M.V., Gutierrez, N.C., Rajkumar, S.V. & San Miguel, J.F. Improving overall survival and overcoming adverse prognosis in the treatment of cytogenetically high-risk multiple myeloma. *Blood* **121**, 884-892 (2013).

7. LITERATUR

45. Kumar, S.K., *et al.* Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* **111**, 2516-2520 (2008).
46. Lüllmann-Rauch, R. *Histologie, Verstehen-Lernen-Nachschnagen*, (2003).
47. Kuehl, W.M. & Bergsagel, P.L. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* **2**, 175-187 (2002).
48. Löffler, G. & Petrides, P.E. *Biochemie und Pathobiochemie*, (2003).
49. Nossal, G.J. & Riedel, C. Sudden appearance of anti-protein IgG1-forming cell precursors early during primary immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 4679-4683 (1989).
50. Peng, H.Z., *et al.* Nonimmunoglobulin gene hypermutation in germinal center B cells. *Blood* **93**, 2167-2172 (1999).
51. Papavasiliou, F.N. & Schatz, D.G. Cell-cycle-regulated DNA doublestrand breaks in somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Nature* **408**, 216-221 (2000).
52. Bergsagel, P.L. & Kuehl, W.M. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol* **23**, 6333-6338 (2005).
53. Koppers, R. & Dalla-Favera, R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* **20**, 5580-5594 (2001).
54. van den Akker, T.W., de Glopper-van der Veer, E., Radl, J. & Benner, R. The influence of genetic factors associated with the immunoglobulin heavy chain locus on the development of benign monoclonal gammopathy in ageing IgH-congenic mice. *Immunology* **65**, 31-35 (1988).
55. Chesi, M., *et al.* AID-dependent activation of a MYC transgene induces multiple myeloma in a conditional mouse model of post-germinal center malignancies. *Cancer Cell* **13**, 167-180 (2008).
56. Rasmussen, T., Kuehl, M., Lodahl, M., Johnsen, H.E. & Dahl, I.M. Possible roles for activating RAS mutations in the MGUS to MM transition and in the intramedullary to extramedullary transition in some plasma cell tumors. *Blood* **105**, 317-323 (2005).
57. Annunziata, C.M., *et al.* Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* **12**, 115-130 (2007).
58. Demchenko, Y.N., *et al.* Classical and/or alternative NF-kappaB pathway activation in multiple myeloma. *Blood* **115**, 3541-3552 (2010).
59. Keats, J.J., *et al.* Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* **12**, 131-144 (2007).
60. Smadja, N.V., *et al.* Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* **98**, 2229-2238 (2001).
61. Carrasco, D.R., *et al.* High-resolution genomic profiles define distinct clinico-pathogenetic subgroups of multiple myeloma patients. *Cancer Cell* **9**, 313-325 (2006).
62. Fonseca, R., *et al.* The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood* **102**, 2562-2567 (2003).
63. Smadja, N.V., *et al.* Further cytogenetic characterization of multiple myeloma confirms that 14q32 translocations are a very rare event in hyperdiploid cases. *Genes Chromosomes Cancer* **38**, 234-239 (2003).
64. Chapman, M.A., *et al.* Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* **471**, 467-472 (2011).
65. Lohr, J.G., *et al.* Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy. *Cancer Cell* **25**, 91-101 (2014).
66. Hacker, H. & Karin, M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE* **2006**, re13 (2006).

7. LITERATUR

67. Bonizzi, G. & Karin, M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol* **25**, 280-288 (2004).
68. Grossmann, M., *et al.* The anti-apoptotic activities of Rel and RelA required during B-cell maturation involve the regulation of Bcl-2 expression. *EMBO J* **19**, 6351-6360 (2000).
69. Hayden, M.S. & Ghosh, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**, 344-362 (2008).
70. Arenzana-Seisdedos, F., *et al.* Nuclear localization of I kappa B alpha promotes active transport of NF-kappa B from the nucleus to the cytoplasm. *Journal of Cell Science* **110**, 369-378 (1997).
71. Beg, A.A., *et al.* I kappa B interacts with the nuclear localization sequences of the subunits of NF-kappa B: a mechanism for cytoplasmic retention. *Genes Dev* **6**, 1899-1913 (1992).
72. Yaron, A., *et al.* Identification of the receptor component of the IkappaBalpha-ubiquitin ligase. *Nature* **396**, 590-594 (1998).
73. Sun, S.C., Ganchi, P.A., Ballard, D.W. & Greene, W.C. NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* **259**, 1912-1915 (1993).
74. Arenzana-Seisdedos, F., *et al.* Inducible nuclear expression of newly synthesized I kappa B alpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NF-kappa B. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 2689-2696 (1995).
75. Karin, M. & Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annual Review of Immunology* **18**, 621-663 (2000).
76. DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E. & Karin, M. A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* **388**, 548-554 (1997).
77. Mercurio, F., *et al.* IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* **278**, 860-866 (1997).
78. Zandi, E., Rothwarf, D.M., Delhase, M., Hayakawa, M. & Karin, M. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* **91**, 243-252 (1997).
79. Yamaoka, S., *et al.* Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* **93**, 1231-1240 (1998).
80. Li, Z.W., *et al.* The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med* **189**, 1839-1845 (1999).
81. Schrefelbauer, B., Polley, S., Behar, M., Ghosh, G. & Hoffmann, A. NEMO ensures signaling specificity of the pleiotropic IKKbeta by directing its kinase activity toward IkappaBalpha. *Molecular Cell* **47**, 111-121 (2012).
82. Hu, Y., *et al.* Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase. *Science* **284**, 316-320 (1999).
83. Takeda, K., *et al.* Limb and skin abnormalities in mice lacking IKKalpha. *Science* **284**, 313-316 (1999).
84. Li, X., *et al.* IKKalpha, IKKbeta, and NEMO/IKKgamma are each required for the NF-kappa B-mediated inflammatory response program. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 45129-45140 (2002).
85. Senftleben, U., *et al.* Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* **293**, 1495-1499 (2001).
86. Xiao, G., Harhaj, E.W. & Sun, S.C. NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Molecular Cell* **7**, 401-409 (2001).

7. LITERATUR

87. Dejardin, E., *et al.* The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways. *Immunity* **17**, 525-535 (2002).
88. Hinz, M. & Scheidereit, C. The IkappaB kinase complex in NF-kappaB regulation and beyond. *EMBO Reports* **15**, 46-61 (2014).
89. Perkins, N.D. NF-kappaB: tumor promoter or suppressor? *Trends in Cell Biology* **14**, 64-69 (2004).
90. Gilmore, T.D. & Herscovitch, M. Inhibitors of NF-kappaB signaling: 785 and counting. *Oncogene* **25**, 6887-6899 (2006).
91. Shimizu, S., *et al.* Establishment of a CD4-positive plasmacytoma cell line (AMO1). *Leukemia* **7**, 274-280 (1993).
92. Diehl, V., *et al.* Long-term cultivation of plasma cell leukemia cells and autologous lymphoblasts (LCL) in vitro: a comparative study. *Blut* **36**, 331-338 (1978).
93. Goldman-Leikin, R.E., *et al.* Characterization of a novel myeloma cell line, MM.1. *J Lab Clin Med* **113**, 335-345 (1989).
94. Greenstein, S., *et al.* Characterization of the MM.1 human multiple myeloma (MM) cell lines: a model system to elucidate the characteristics, behavior, and signaling of steroid-sensitive and -resistant MM cells. *Exp Hematol* **31**, 271-282 (2003).
95. Steinbrunn, T., Chatterjee, M., Bargou, R.C. & Stühmer, T. Efficient transient transfection of human multiple myeloma cells by electroporation--an appraisal. *PLoS One* **9**, e97443 (2014).
96. Brummelkamp, T.R., Bernards, R. & Agami, R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**, 550-553 (2002).
97. OligoEngine. pSUPER Manual : A Vector System for Expression of Short Interfering RNA. (2003).
98. Hu, W., Li, F., Mahavadi, S. & Murthy, K.S. Interleukin-1beta up-regulates RGS4 through the canonical IKK2/IkappaBalpha/NF-kappaB pathway in rabbit colonic smooth muscle. *Biochem J* **412**, 35-43 (2008).
99. Tijsterman, M. & Plasterk, R.H. Dicers at RISC; the mechanism of RNAi. *Cell* **117**, 1-3 (2004).
100. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275 (1951).
101. Rauert-Wunderlich, H., *et al.* The IKK inhibitor Bay 11-7082 induces cell death independent from inhibition of activation of NFkappaB transcription factors. *PLoS One* **8**, e59292 (2013).
102. Emmerich, F., *et al.* Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. *Blood* **94**, 3129-3134 (1999).
103. Krappmann, D., *et al.* Molecular mechanisms of constitutive NF-kappaB/Rel activation in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Oncogene* **18**, 943-953 (1999).
104. Bargou, R.C., *et al.* Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* **100**, 2961-2969 (1997).
105. Bargou, R.C., *et al.* High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* **87**, 4340-4347 (1996).
106. Deveraux, Q.L. & Reed, J.C. IAP family proteins--suppressors of apoptosis. *Genes Dev* **13**, 239-252 (1999).
107. Hinz, M., *et al.* NF-kappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-S-phase transition. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 2690-2698 (1999).

7. LITERATUR

108. O'Connor, B.P., *et al.* BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells. *J Exp Med* **199**, 91-98 (2004).
109. Hideshima, T., Chauhan, D., Schlossman, R., Richardson, P. & Anderson, K.C. The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. *Oncogene* **20**, 4519-4527 (2001).
110. Hideshima, T., *et al.* Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood* **114**, 1046-1052 (2009).
111. Rauert, H., Stühmer, T., Bargou, R., Wajant, H. & Siegmund, D. TNFR1 and TNFR2 regulate the extrinsic apoptotic pathway in myeloma cells by multiple mechanisms. *Cell Death Dis* **2**, e194 (2011).
112. Schmidt-Supprian, M., *et al.* NEMO/IKK gamma-deficient mice model incontinentia pigmenti. *Molecular Cell* **5**, 981-992 (2000).
113. Chatterjee, M., *et al.* Combined disruption of both the MEK/ERK and the IL-6R/STAT3 pathways is required to induce apoptosis of multiple myeloma cells in the presence of bone marrow stromal cells. *Blood* **104**, 3712-3721 (2004).
114. Zöllinger, A., *et al.* Combined functional and molecular analysis of tumor cell signaling defines 2 distinct myeloma subgroups: Akt-dependent and Akt-independent multiple myeloma. *Blood* **112**, 3403-3411 (2008).
115. Hofmann, C., *et al.* PI3K-dependent multiple myeloma cell survival is mediated by the PIK3CA isoform. *Br J Haematol* **166**, 529-539 (2014).
116. Schmitz, R., Stanelle, J., Hansmann, M.L. & Kuppers, R. Pathogenesis of classical and lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma. *Annu Rev Pathol* **4**, 151-174 (2009).
117. Häcker, H., Chi, L., Rehg, J.E. & Redecke, V. NIK prevents the development of hypereosinophilic syndrome-like disease in mice independent of IKKalpha activation. *J Immunol* **188**, 4602-4610 (2012).
118. Podolin, P.L., *et al.* Attenuation of murine collagen-induced arthritis by a novel, potent, selective small molecule inhibitor of I kappa B Kinase 2, TPCA-1 (2-[(aminocarbonyl)amino]-5-(4-fluorophenyl)-3-thiophenecarboxamide), occurs via reduction of proinflammatory cytokines and antigen-induced T cell Proliferation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **312**, 373-381 (2004).
119. McGovern, S.L. & Shoichet, B.K. Kinase inhibitors: not just for kinases anymore. *J Med Chem* **46**, 1478-1483 (2003).

8. ABBILDUNGEN

ABBILDUNG 1.....	6
ABBILDUNG 2.....	11
ABBILDUNG 3.....	14
ABBILDUNG 4.....	19
ABBILDUNG 5.....	25
ABBILDUNG 6.....	28
ABBILDUNG 7.....	30
ABBILDUNG 8.....	31
ABBILDUNG 9.....	32
ABBILDUNG 10.....	34
ABBILDUNG 11.....	42
ABBILDUNG 12.....	43
ABBILDUNG 13.....	54
ABBILDUNG 14.....	55
ABBILDUNG 15.....	56
ABBILDUNG 16.....	58
ABBILDUNG 17.....	59
ABBILDUNG 18.....	60
ABBILDUNG 19.....	62
ABBILDUNG 20.....	64
ABBILDUNG 21.....	65
ABBILDUNG 22.....	65
ABBILDUNG 23.....	67
ABBILDUNG 24.....	70
ABBILDUNG 25.....	72
ABBILDUNG 26.....	74
ABBILDUNG 27.....	87

9. DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich Prof. Dr. Ralf Bargou danken für die Ermöglichung der vorliegenden Arbeit – sowohl in finanzieller, als auch in konzeptioneller Hinsicht.

Auf Grund der geduldigen und konstanten Betreuung, sowie für die zahlreichen gedanklichen Anstöße gilt Dr. Thorsten Stühmer mein aufrichtiger Dank. Dabei konnte ich mich bei allen Fragen zur experimentellen Durchführung oder bei der Überarbeitung der schriftlichen Form dieser Arbeit stets auf seinen Rat verlassen. Darüber hinaus möchte ich mich für die Erstellung von Empfehlungsschreiben herzlich bedanken. In Erinnerung werden mir mit Sicherheit insbesondere die angenehme zwischenmenschliche Art und die interessanten gemeinsamen Gespräche bleiben. Danken möchte ich auch Evelyn Brandt, die mir vor allem zu Beginn im Labor bei der Durchführung der Experimente zur Seite gestanden hat.

Meiner Freundin Lea Liebchen, möchte ich in besonderer Weise meinen Dank aussprechen, sowohl für die Hilfe bei der Fertigstellung der vorliegenden Arbeit, als auch für die wertvolle Zeit abseits von wissenschaftlichen Diskursen.

Ich möchte meinen Eltern, Irina Maier und Viktor Maier, und meinen Schwestern, Elli Rupp und Olga Schmidt, danken, die mich stets in verschiedensten Lebenslagen unterstützt haben und auf die ich mich immer verlassen konnte und kann.

Auch meinen Freunden Andreas Diekhöfer, Katharina Wietschorke und Rafael Hummel danke ich für die hilfreichen Verbesserungsvorschläge und Gedanken zu der vorliegenden Arbeit.

Die für diese Arbeit aufgewendete Zeit konnte ich zum großen Teil durch die finanzielle Unterstützung durch das Dr. Friedrich Amend Stipendium aufbringen. Daher möchte ich auch Dr. Friedrich Amend und Ute Deichmann einen großen Dank aussprechen.

10. LEBENS LAUF

- 1998 bis 2007** Otto-Hahn Gymnasium in Nagold, Baden-Württemberg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,6)
- 04/2008 bis 10/2014** Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Studium der Medizin
Gesamtnote: 1,66
- 04/2010 bis 10/2010** Freisemester Sommer 2010 für den experimentellen Teil der medizinischen Promotion über die Analyse des IKK Komplexes beim Multiplen Myelom. (Doktorvater: Prof. Dr. Ralf Bargou, Universität Würzburg, Medizin II, Hämatologie/Onkologie)
- 2010 bis 2013** Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Begleitstudiengang: Experimentelle Medizin
Gesamtnote: 1,1
- 08/2013 bis 06/2014** Praktisches Jahr: Universitätsmedizin Berlin Charité und Universitäts-Kinderklinik Basel
- Seit 06/2015** Wissenschaftlicher Mitarbeiter bei Prof. Dr. Michael Brecht, Humbolt Universität zu Berlin, Institut für Biologie, Bernstein Center for Computational Neuroscience
- Publikationen:** H. Rauert-Wunderlich, D. Siegmund, **E. Maier**, T. Giner, R.C. Bargou, H. Wajant, T. Stühmer "The IKK inhibitor Bay 11-7082 induces cell death independent from inhibition of activation of NFκB transcription factors". In: *PLoS One* **8**(3), e59292 (2013).

Berlin, den 10.08.2015

Eduard Maier