



**Der Hitzeschock-Transkriptionsfaktor 1 (HSF1) als
neues potenzielles therapeutisches Ziel
im Multiplen Myelom**

**The heat shock transcription factor 1 (HSF1) as a
new potential therapeutic target
in multiple myeloma**

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Tanja Heimberger
aus
Bretten

Würzburg, 2013

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Utz Fischer

1. Betreuer: Prof. Dr. med. Ralf C. Bargou

2. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Ulrike Holzgrabe

3. Betreuer: Dr. med. Andreas Beilhack

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:.....

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 KLINIK DES MULTIPLER MYELOMS	1
1.1.1 <i>Definition</i>	1
1.1.2 <i>Epidemiologie und Ätiologie</i>	1
1.1.3 <i>Symptome und Diagnostik</i>	2
1.1.4 <i>Therapie und Prognose</i>	3
1.2 PATHOGENESE DES MULTIPLER MYELOMS	5
1.2.1 <i>Die physiologische Entwicklung von Plasmazellen</i>	5
1.2.2 <i>Das Mehrstufenmodell der Pathogenese des Multiplen Myeloms</i>	7
1.2.3 <i>Das onkogene Signalnetzwerk im Multiplen Myelom</i>	8
1.3 DER HITZESCHOCK-TRANSKRIPTIONSFAKTOR 1 (HSF1)	11
1.3.1 <i>Einleitung</i>	11
1.3.2 <i>Definition</i>	11
1.3.3 <i>Struktur</i>	12
1.3.4 <i>Funktion</i>	13
1.3.4.1 <i>Die Regulation der Hitzeschockantwort durch HSF1</i>	13
1.3.4.2 <i>Funktionelles Zusammenspiel von HSF1 und HSF2</i>	14
1.3.5 <i>Klassifikation der Hitzeschockproteine (HSP)</i>	15
1.3.6 <i>Die Funktion von HSF1 in der Tumorigenese</i>	16
1.3.7 <i>Die HSF1-Expression und ihre Bedeutung in humanen Tumoren</i>	17
1.3.8 <i>Die HSP-Expression in humanen Tumoren</i>	18
1.3.9 <i>Das HSF1/HSP-System als therapeutisches Ziel im MM</i>	19
2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	21
3. MATERIAL UND METHODEN	22
3.1 <i>Material</i>	22
3.1.1 <i>Geräte und Zubehör</i>	22
3.1.2 <i>Verbrauchsmaterial</i>	23
3.1.3 <i>Computerprogramme</i>	24
3.1.4 <i>Chemikalien</i>	24
3.1.5 <i>Pharmakologische Inhibitoren</i>	25
3.1.6 <i>Lösungen und Puffer</i>	25
3.1.7 <i>Zellkulturmedien und Zusätze</i>	26
3.1.8 <i>Längenstandards</i>	26

3.1.9 Reaktionssets (Kits)	27
3.1.10 Enzyme	27
3.1.11 Antikörper.....	27
3.1.12 DNA-Oligonukleotide für shRNA-Expressionsvektoren.....	28
3.1.13 Plasmide	29
3.1.14 Bakterienstämme	30
3.1.15 Myelomzelllinien.....	30
3.1.16 Nachweis von Mycoplasmen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
3.2 Methoden	33
3.2.1 Zellkultur	33
3.2.2 Kultivierung humaner Myelomzelllinien.....	34
3.2.3 Isolierung mononukleärer Zellen durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation	34
3.2.4 Gewinnung und Kultivierung primärer Myelomzellen.....	34
3.2.5 Gewinnung primärer B-Zellen.....	35
3.2.6 Zellzahlbestimmung	36
3.2.7 Applikation von pharmakologischen Inhibitoren.....	36
3.2.8 Erzeugung einer Hitzeschock-Stressantwort in MM-Zellen.....	37
3.2.9 Durchflusszytometrie.....	37
3.2.10 Apoptosemessung mittels Annexin V/Propidiumiodid Färbung.....	38
3.2.11 Ermittlung der Transfektionseffizienz.....	39
3.2.12 Zellzyklus- und Proliferationsanalyse mittels BrdU-Färbung.....	39
3.2.13 Elektroporation	41
3.2.14 Aufreinigung von transfizierten Myelomzellen.....	41
3.2.15 Herstellung der shRNA-Expressionsvektoren.....	43
3.2.16 Klonierung von shRNA-Expressionsvektoren	44
3.2.17 Western Blot Analyse	45
3.2.18 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
3.2.19 Proteintransfer auf Nitrocellulose Membran nach dem Prinzip des „Semi-Dry- Blottings“ (Western Blot)	46
3.2.20 Immunchemische Proteinfärbung.....	46
3.2.21 Immunhistochemische Analyse der HSF1-Expression in humanen Plasmazellen in situ	48
3.2.22 Gene expression profiling (GEP) – Affymetrix Microarray Analysen	49

4. ERGEBNISSE	51
4.1 Konstitutive HSF1- und HSP-Proteinexpression ist in Myelomzelllinien häufig vorhanden	51
4.2 Konstitutive HSF1- und HSP-Proteinexpression ist in primären Myelomzellen ex vivo überwiegend vorhanden	52
4.3 In etwas mehr als der Hälfte der primären Myelomfälle ist HSF1 überexprimiert	53
4.4 Induktion der heat shock stress response (HSR) ist in primären B-Zellen und in INA-6- und MM.1S-Zellen möglich	56
4.5 Die pharmakologisch-ausgelöste Stressantwort erzielt das gleiche Induktionsmuster, wie die HSR	57
4.6 HSF1-Knockdown induziert Apoptose in INA-6- und MM.1S-Zellen	57
4.7 Knockdown von HSF1 führt in JJN-3-Zellen zu einem Zellzyklus-Arrest.....	58
4.8 Knockdown von HSF2 hat Einfluss auf die Viabilität in INA-6-Zellen	60
4.9 Genexpressionsanalyse (GEP) nach shRNA-vermitteltem HSF1-Knockdown in INA-6- und MM.1S-Zellen.....	61
4.10 HSF1-Knockdown führt zur Abnahme von HSP in INA-6- und MM.1S-Zellen.....	62
4.11 Analyse des shRNA-vermittelten Knockdowns von HSP40, HSP40-4 und HSP27 in INA-6- und MM.1S-Zellen.....	63
4.11.1 HSP40 und HSP40-4 Knockdown erzielt unterschiedliche Effekte in INA-6- und MM.1S-Zellen.....	64
4.11.2 Knockdown von HSP27 führt in INA-6-Zellen zu einer moderaten Apoptoseinduktion.....	65
4.12 Pharmakologische Inhibition von HSF1 mit Triptolid führt zur Abnahme der Expression von HSF1 und HSP in INA-6- und MM.1S-Zellen.....	66
4.13 Triptolid induziert Apoptose in verschiedenen Myelomzelllinien und in primären Myelomzellen	67
4.14 HSF1-Inhibition unterdrückt die pharmakologisch-induzierte Hochregulation der HSP	69
4.15 Pharmakologische Inhibition von HSF1 mit Triptolid verstärkt den apoptotischen Effekt von NVP-AUY922 und Bortezomib in INA-6- und MM.1S-Zellen	70
5. DISKUSSION	72
5.1 HSF1/HSP-Expressionen in nicht-malignen und malignen B-Zellen	73
5.2 HSF1 vermittelt Überlebenssignale in MM-Zellen.....	75
5.3 HSF1-Depletion führt zur Abnahme der Expression multipler HSP.....	78
5.4 Das HSF1/HSP-Stresssystem ist in MM-Zellen noch funktionsfähig.....	80

5.5 <i>Pharmakologische Inhibition von HSF1 mit Triptolid verstärkt den apoptotischen Effekt von NVP-AUY922 und Bortezomib</i>	81
5.6 <i>Ausblick</i>	82
6. ZUSAMMENFASSUNG	85
SUMMARY	87
7. LITERATURVERZEICHNIS	89
8. ANHANG	108
8.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	108
8.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	112
8.3 TABELLENVERZEICHNIS	114
8.4 DANKSAGUNG	115
8.5 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	116
8.6 PUBLIKATIONSLISTE	117
8.7 CURRICULUM VITAE	118

1. Einleitung

1.1 Klinik des multiplen Myeloms

1.1.1 Definition

Das Multiple Myelom (MM) ist eine maligne hämatologische Erkrankung, die nach der WHO-Klassifikation den indolenten (niedrig-malignen) B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen zugeordnet wird (1). Die klonale Expansion terminal differenzierter, Antikörper-sezernierender B-Zellen (Plasmazellen) im Knochenmark verdrängt die normale Hämatopoese und ist für das MM charakteristisch.

1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie

Mit einer jährlichen Inzidenz von bis zu sechs Neuerkrankungen/100.000 Einwohnern ist das MM, nach den Non-Hodgkin-Lymphomen, die zweithäufigste hämatologische Neoplasie (2, 3). So bilden MM ca. 10 % aller hämatologischen Neoplasien und 1 % aller Krebserkrankungen. Abhängig vom Stadium bei Erstdiagnose führt unbehandelt die Erkrankung nach 4 bis 11 Monaten zum Tod. Beim MM handelt es sich um eine Krankheit, die meist im höheren Lebensalter auftritt (Häufigkeitsgipfel zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr, nur 2 % der Patienten sind bei Diagnosestellung jünger als 40 Jahre) (4). Männer sind etwas häufiger betroffen als Frauen (Verhältnis von Männern zu Frauen etwa 4:3). Weiterhin sind, bezogen auf die US-Bevölkerung, Afroamerikaner etwa doppelt so häufig erkrankt wie weiße US-Amerikaner (5). Als weiterer akzeptierter Risikofaktor gilt eine genetische Prädisposition (positive Familiengeschichte), da familiäre Häufungen aber selten vorkommen, ist auch dieser Faktor umstritten (6, 7). Die Ursachen der Erkrankung sind weitgehend unklar. In früheren Studien wurden chemische Agenzien (Pestizide und Haarfärbemittel), sowie ionisierende Strahlen als Risikofaktoren untersucht, ebenso gilt eine erhöhte Erkrankungsgefahr für Arbeiter, die einer Exposition von Benzin, Hartmetallverbindungen, Schneid- und Mineralölschmiermitteln o.ä. ausgesetzt sind (8-10).

Dem MM kann die asymptomatische Vorstufe, die Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS), voraus gehen. Die Inzidenz des MGUS steigt bei höherem Lebensalter an, sie liegt bei 1 - 3 % bei >50 Jahre und 5 % bei >70 Jahre (11). Durch die fehlende Symptomatik wird das MGUS meist nur per Zufall entdeckt und so ist möglicherweise deswegen die Transformationsrate zum MM, mit 1 % pro Jahr, relativ gering. Eine Langzeitstudie zeigte aber, dass sich die kumulative Wahrscheinlichkeit einer Transformation auf 12 % nach 10 Jahren bzw. 25 % nach 20 Jahren, erhöht (12, 13).

1.1.3 Symptome und Diagnostik

Durch die Expansion der malignen Plasmazellen im Knochenmark wird die normale Hämatopoese verdrängt und es entwickelt sich eine hämatopoetischen Insuffizienz. Die Folgen sind Anämie, welche zu einer physischen Abgeschlagenheit (Fatigue) führt sowie Leukozytopenie (mit gesteigerter Infektanfälligkeit) und Thrombozytopenie (erhöhte Blutungsneigung). Weiterhin führt die Ausbreitung der MM-Zellen im Knochenmark zu einer Hemmung von Osteoblasten und einer Aktivierung von Osteoklasten (14). Diese Verschiebung des Gleichgewichts zwischen knochenaufbauendem und knochenabbauendem System führt zur osteolytischen Knochendestruktion mit erhöhtem Frakturrisiko. Das aus den Knochen freigesetzte Kalzium führt bei einem Drittel der Patienten zu einer klinisch manifestierten Hyperkalzämie (15, 16). Durch die übermäßige Produktion monoklonaler Immunglobuline steigt die Proteinkonzentration im Serum und es kann ein Hyperviskositätssyndrom (Erhöhung der Viskosität des Blutes) auftreten (17). Eine weitere mögliche Folge der monoklonalen Gammopathie ist eine Beeinträchtigung der Nierenfunktion. Die Nierentubuli werden hauptsächlich durch die Ausscheidung der Paraproteine geschädigt. Die erhöhte Kalziumausscheidung begünstigt zusätzlich diesen Defekt (18). Die Diagnose des MM erfolgt über den Nachweis der monoklonalen Immunglobuline im Blut und Urin sowie über den Nachweis der Knochenläsionen durch bildgebende Verfahren. Weiterhin kann durch eine Knochenmarkuntersuchung eine erhöhte Anzahl von Plasmazellen im Knochenmark festgestellt werden. Diese Krankheitsmanifestationen wurden 2003 von der *International Myeloma Working Group* als die so genannten „CRAB-

Kriterien“ zusammengefasst (13). CRAB leitet sich aus den englischen Wörtern „*hypercalcemia*“, „*renal insufficiency*“, „*anemia*“ und „*bone lesions*“ ab. Die Erfüllung eines der Kriterien ist als Behandlungsindikation ausreichend. Die Einteilung der Erkrankung in Stadien wurde 1975 von Salmon und Durie definiert (siehe Tabelle 1)(19). Die klinischen Parameter erlauben eine Einschätzung der präsenten Tumorlast, eine Prognose für den Patienten ist aber nur begrenzt möglich.

Stadien	I	II	III
Kriterien	Alle folgenden Kriterien sind erfüllt: <ul style="list-style-type: none"> •Hämoglobin > 10 g/dl •Serumkalzium normal •Normale Knochenstruktur oder nur ein solitärer Herd (Röntgen) •Niedrige Myelomproteinkonzentration: IgG < 5 g/dl IgA < 3 g/dl Leichtketten im Urin < 4 g/24 h 	Weder I noch III	Mindestens eines der folgenden Kriterien ist erfüllt: <ul style="list-style-type: none"> •Hämoglobin < 8,5 g/dl •Serumkalzium erhöht •fortgeschrittene Knochenläsionen •hohe Myelomproteinkonzentration: IgG > 7 g/dl IgA > 5 g/dl Leichtketten im Urin > 12 g/24h

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms nach Salmon und Durie (19): Ein weiteres Kriterium ist die normale Nierenfunktion (Zusatzbezeichnung A) und (B) eine eingeschränkte Nierenfunktion mit Serumkreatinin > 2 mg/dl. Eine Therapieindikation besteht ab Stadium II.

Daher wurde 2005 von der *International Myeloma Working Group* ein alternatives Internationales Staging System (ISS) eingeführt. Unter ausschließlicher Betrachtung des Serumalbumins und des β 2-Mikroglobulins im Serum, werden die Patienten in drei prognostische Subgruppen eingeteilt (siehe Tabelle 2) (20).

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

Tabelle 2: Internationales Staging System (ISS) für das Multiple Myelom: Die Serumalbumin- und β 2-Mikroglobulin-Konzentration im Serum wird als therapieunabhängiger prognostischer Index verwendet.

1.1.4 Therapie und Prognose

Das MM zählt bis heute zu den weitgehend unheilbaren Krankheiten. Durch eine Behandlung soll der maligne Klon zurückgedrängt werden und eine Verlängerung

des Überlebens erreicht werden. Weiterhin kann eine optimale supportive Therapie helfen die Symptomatik und damit die Lebensqualität zu verbessern. Die initiale Behandlung eines symptomatischen Myelompatienten soll zu einer raschen Krankheitskontrolle und die Normalisierung myelombedingter Komplikationen, wie Nierenfunktionsstörung, Hyperkalzämie oder Anämie führen (21). Eine Therapie wird erst bei auftretenden Krankheitssymptomen erforderlich (CRAB-Kriterien) (19). Ohne Behandlung liegt das durchschnittliche Überleben bei 4-11 Monaten (22). Bei konventioneller Chemotherapie wird das Alkylanz Melphalan mit dem Glukokortikoid Prednison kombiniert, wodurch sich die Lebenserwartung auf ca. 3 Jahre erhöht (23). Ist es auf Grund des Gesundheitszustandes des Patienten möglich, wird als Erstlinientherapie eine hoch dosierte Gabe von Melphalan mit folgender autologer Stammzelltransplantation durchgeführt. Durch diese Behandlung wird ein medianes Überleben von 5-6 Jahre erreicht (24-26).

Erweitert wird das Therapiespektrum durch neuere Substanzen, wie z.B. Lenalidomid und Thalidomid, die beide zur Stoffklasse der immunmodulatorischen Derivate (IMiDs) gehören. Der genaue Wirkmechanismus ist noch unbekannt, jedoch scheint das Zusammenspiel komplexer immunologischer Vorgänge für den Therapieerfolg verantwortlich zu sein. So beobachtet man eine verringerte Zytokinsekretion und Angiogenese (27, 28), sowie eine Stimulation von T-Zellen und natürlichen Killerzellen (29-31). Der Proteasom-Inhibitor Bortezomib ist eine der aktivsten neueren Anti-Myelom-Substanzen. MM-Zellen zeichnen sich durch die exzessive Sekretion monoklonaler Immunglobuline aus. Die ständige Produktion neuer, ungefalteter oder auch mißgefalteter Proteine erfordert eine hohe Aktivität des endoplasmatischen Retikulums (ER) und der „*unfolded protein response*“ (UPR) (32). Dies ist eine andauernde Stress-Situation für die Zellen, die aber für das Überleben der MM-Zellen unabdingbar ist. Das ER/UPR-System ist für die Protein-Homöostase essenziell und soll eine „Überladung“ der Zelle mit Proteinen verhindern (33). Weiterhin wird hierfür auch die gezielte Degradation der Proteine benötigt, was durch die Funktion des Proteasoms erreicht wird. Durch die Behandlung der MM-Zellen mit einem Proteasom-Inhibitor wird der Abbau der Proteine verhindert und es kommt zu einer Akkumulation dieser in der Zelle. Dieser entartete Zustand ist für das ER/UPR-System nicht mehr zu bewältigen und der Zelltod wird eingeleitet (34). Da insbesondere MM-Zellen ein funktionsfähiges ER/UPR-System benötigen, wird der zytotoxische Effekt von Bortezomib möglicherweise auch durch die Destruktion der

Protein-Homöostase erzielt (32, 35). Weiterhin werden im Allgemeinen durch die Blockade des Proteasoms Proteolyse-Prozesse gestört, darüber hinaus sind aber auch weitere Wirkmechanismen beschrieben (36). Sie beinhalten die Inaktivierung des Nukleären Faktors kappa-B (NF κ B), die Stabilisation von Zellzyklus-Proteinen (p21, p27, p53), die Hemmung von intrazellulären Signalkaskaden und die Unterstützung von pro-apoptotische Signalwegen (37, 38). Kombinations- oder Monotherapien mit diesen neueren Substanzen sind hoffnungsvoll, werden zurzeit aber noch untersucht (39, 40).

Die Entwicklung neuer Substanzen hat die Myelomtherapie voran gebracht, jedoch kann nicht jeder Patient von diesen Therapieoptionen profitieren. Erstrebenswert ist die Aufklärung der molekularen Pathogenese des MM um neue, zielgerichtete Therapien entwickeln zu können. Damit könnten dosislimitierende Nebenwirkungen reduziert werden, wodurch sich die Aussicht auf die bessere Wirksamkeit der Therapie erhöht.

1.2 Pathogenese des multiplen Myeloms

1.2.1 Die physiologische Entwicklung von Plasmazellen

B-Zellen entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen über mehrere Stufen von der prä-B-Zelle bis zur Antikörper-sezernierenden Plasmazelle (siehe Abbildung 1). Die frühe Reifungsphase findet im Knochenmark statt. Hier kommt es bereits zur so genannten VDJ-Rekombination: um eine Antikörpervielfalt zu erreichen werden die Gensegmente, die für die variablen Regionen der schweren (IgH, *heavy*) und leichten (IgL, *light*) Immunglobulinketten kodieren, neu arrangiert. Nach der Rekombination wandern die B-Zellen in den Lymphknoten, wo sie nach Antigenkontakt im Keimzentrum zu Lymphoblasten differenzieren. Ein Teil der Lymphoblasten wird zu kurzlebigen Plasmazellen. Der andere Teil der Lymphoblasten wandert in das Keimzentrum der Lymphfollikel, wo es zu einer somatischen Hypermutation kommt. Bei der somatischen Hypermutation werden in die antigenbindende Bereiche der Immunglobulingene Mutationen (vorzugsweise Punktmutationen) eingeführt (41). Dies erhöht die Affinität der Antikörper gegenüber ihren Antigenen. Über die Keimzentrumsselektion werden hochaffine B-

Lymphozyten klonal selektioniert. Diese so genannten Keimzentrums-B-Zellen differenzieren sich entweder zu B-Gedächtniszellen oder Post-Keimzentrums-B-Zellen. Die B-Zellen stellen ihre Produktion von IgM auf IgG, IgD, IgE oder IgA um (IgH Switch). Die Post-Keimzentrums-B-Zellen, die einen IgH-Switch vollzogen haben, wandern zurück in das Knochenmark und differenzieren sich hier terminal zu Plasmazellen (42, 43).

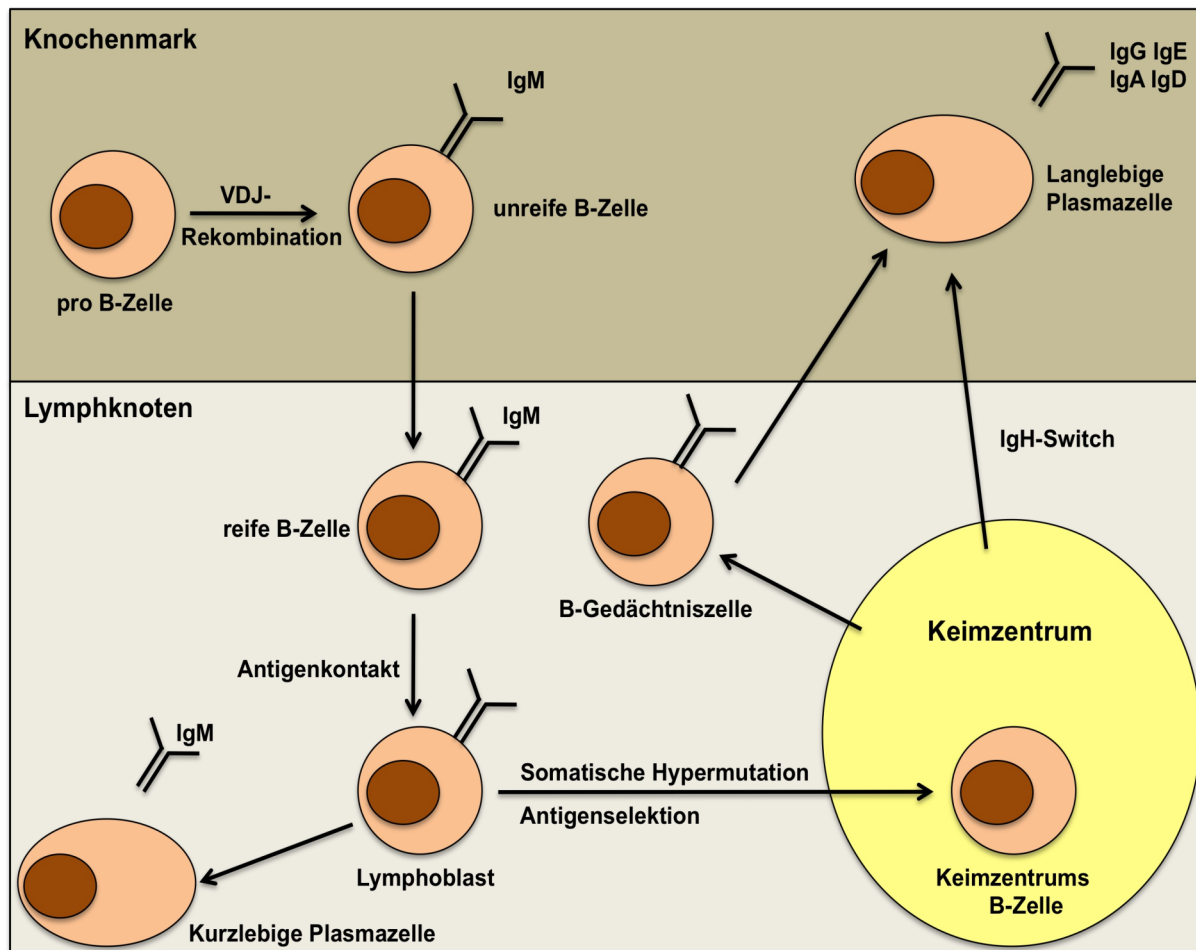


Abbildung 1: Die normale B-Zell-Entwicklung: Im Knochenmark entstehen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen Pro-B-Zellen, die sich durch genetische Umstrukturierungen (VDJ-Rekombination) zu unreifen B-Zellen entwickeln und in den Lymphknoten einwandern. Durch den Antigen-Kontakt kommt es hier zur Entwicklung von Lymphoblasten. Ein Teil durchläuft die somatische Hypermutation der Ig-Gene und wird im Keimzentrum positiv auf die Erkennung von Antigenen selektioniert. Dabei entstehen Keimzentrums-B-Zellen, die sich entweder zu B-Gedächtniszellen oder Post-Keimzentrums-B-Zellen differenzieren. Letztere vollziehen den Ig-Klassenwechsel (IgH-Switch) und wandern zurück in das Knochenmark, wo sie sich zu langlebigen, Ig-sezernierenden Plasmazellen terminal differenzieren (modifiziert nach Kuehl und Bergsagel 2002).

1.2.2 Das Mehrstufenmodell der Pathogenese des Multiplen Myeloms

Die onkogene Transformation, ausgehend von der Post-Keimzentrums-B-Zelle bis hin zum symptomatischen Myelom, verläuft als mehrstufiger Prozess. Das Myelom entwickelt sich über die asymptomatische Vorstufe der Monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) bis zum progressiven intra- oder extramedullären Myelom. Bei der Endstufe erfolgt eine extramedulläre Manifestation als Plasmazelleukämie oder einer Organinfiltration (43). Dieser Prozess wird durch die schrittweise Akkumulation genetischer Läsionen angetrieben (zusammengefasst in Abb. 2) (44). Frühe genetische Veränderungen (verantwortlich für die Entwicklung des MGUS) sind chromosomale Translokationen im Bereich der Immunglobulin-switch-Region des Chromosoms 14. Dies führt dazu, dass ein Onkogen unter die Kontrolle eines Ig-Enhancer-Gens gestellt wird und somit seine Expression dereguliert ist. Als häufiger Translokationspartner wurden die Chromosome 4 (4p16; FGFR3/MMSET), 6 (6p21; Cyclin D3), 11 (11q13; Cyclin D1), 16 (16q23; c-MAF) und 20 (20p11; MAFB) identifiziert (45, 46). Die häufigste genetische Veränderung (bis 55 %) betrifft die monoallelische Deletion des Chromosoms 13 (47). Der Verlust des Chromosoms 13 führt zu einer Überexpression zahlreicher Zellzyklusgenen. Diese erhöhte Expression erzielt einen Überlebensvorteil der malignen Zellen und es wird vermutet, dass dies die schlechte Prognose des Patienten begründet (48, 49). Für Patienten die aber mit neuen Substanzen behandelt werden, scheint die Deletion nicht mehr prognostisch relevant zu sein (50, 51).

Die Krankheitsprogression wird durch sekundäre genetische Veränderungen (Translokationen und Mutationen) eingeleitet. Wenn die betroffenen DNA-Segmente Onkogene oder Tumorsuppressorgene enthalten, wird auf diese Weise die Progression des Myeloms angetrieben (52, 53). So führt die Deregulation des Onkogens *MYC* durch karyotypische Abnormalitäten sowie die Aktivierung von *N-/K-RAS* und *FGFR3* durch Mutationen, zu einer erhöhten Proliferation der Myelomzellen (54, 55). Ebenso führen Mutationen oder Deletionen von Tumor-Suppressor-Genen (z.B. *TP53*, *RB1* und *PTEN*) sowie Mutationen in den Cyklin-abhängigen Kinasen *CDKN2A* und *CDKN2C* zu einem Verlust ihrer Funktion (53). Da transformierte Myelomzellen häufig genetisch instabil sind, kann es darüber hinaus durch DNA-Verluste oder Zugewinne zu veränderten Kopienzahl der Gene kommen (56). Weitere genetische Unregelmäßigkeiten umfassen epigenetische Modifikationen,

wie DNA Hyper- oder Hypomethylationen oder Veränderungen der microRNA-Expressionen (57-59). Die genannten genetischen Aberrationen beeinflussen auch die Signaltransduktion der Myelomzellen. Bei entsprechenden Mutationen (z.B. *N-/K-RAS*, *NFκB*, *PTEN*) kann es zu einer konstitutiven Aktivierung von intrinsischen Signalwegen, unabhängig von der Knochenmark-Mikromilieu, kommen (siehe Kapitel 1.2.3) (53, 60, 61).

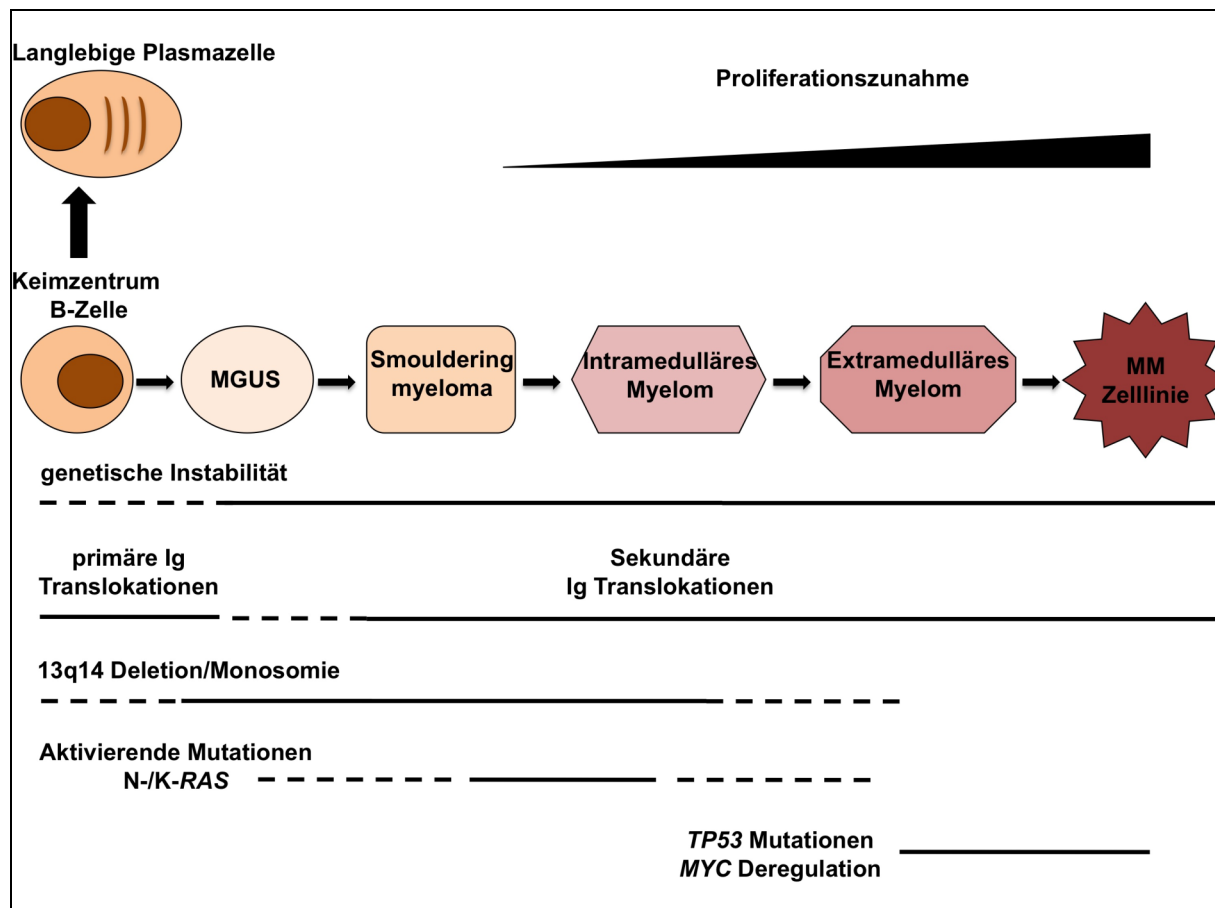


Abbildung 2: Molekulare Pathogenese des Multiplen Myeloms: Frühe genetische Veränderungen, die zur Vorstufe MGUS oder Smouldering Myeloma führen, sind IgH Translokationen und die Deletionen von 13q. Aktivierende Mutationen von *N-/K-RAS* prägen den Übergang zum symptomatischen Myelom. Spätere Stadien, die assoziiert sind mit starker Proliferation der Myelomzellen, sind durch *MYC* Deregulationen und *TP53* Mutationen charakterisiert (modifiziert nach Kuehl und Bergsagel 2002).

1.2.3 Das onkogene Signalnetzwerk im Multiplen Myelom

Bis zu einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium sind die malignen Plasmazellen im Knochenmark eingebettet und somit in einer stetigen Interaktion mit dem Knochenmark-Mikromilieu. In diesem Stadium (sog. intramedulläres Myelom) sind

die Myelomzellen abhängig von den Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren (z.B. IL-6, IGF-1, VEGF), die von den Zellen des Knochenmarks sezerniert werden (62, 63). Das aberrant aktivierte Signalnetzwerk ist charakteristisch für die Proliferation und das Überleben der Myelomzellen. Dabei können die Signalwege über die Bindung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren an ihren entsprechenden Rezeptoren oder durch genetische Läsionen angeregt werden. (siehe Abbildung 3).

Beim Fortschreiten der Erkrankung werden die überlebensnotwendigen Signalwege unabhängig vom Knochenmark-Mikromilieu aktiviert und die Zellen können daraufhin das Knochenmark verlassen (extramedulläres Myelom). Eines der ersten und am besten untersuchten Zytokine ist das Interleukin-6 (IL-6). Als Ligand bindet es an den membranständigen IL-6-Rezeptor und vermittelt über die Phosphorylierung des „*signal transducer and activator of transcription 3*“ (STAT3), durch die Janus-Kinase 1 (JAK), die Aktivierung des JAK/STAT3-Signalwegs. In *in vitro* Untersuchungen konnte durch eine IL-6-Blockade Apoptose in MM-Zelllinien induziert werden (64, 65). Obwohl 50 % der primären Myelome eine Aktivierung von STAT3 aufweisen, ist dies aber nicht zwingend notwendig für das Überleben der Myelomzellen (65). So konnte eine klinische Studie mit einem IL-6-hemmenden Antikörper kein klinisches Ansprechen auf die Behandlung erzielen (66). Übereinstimmend zu diesen Resultaten konnte gezeigt werden, dass eine IL-6-Blockade bei MM-Zellen, die mit Knochenmark-Stromazellen (KMSZ) ko-kultiviert werden, keine Auswirkungen auf das Überleben der MM-Zellen hat (64). Dieses Ergebnis zeigte auf, dass das Knochenmark-Mikromilieu IL-6-unabhängig weitere überlebensfördernde Signalwege aktiviert. Einer dieser überlebensnotwendigen Signalwege ist der „*RAS/mitogen-associated protein kinase*“ (Ras/MAPK) Signalweg. Neben der Aktivierung durch das Knochenmark-Mikromilieu kann dieser Signalweg auch durch Mutationen von *RAS* direkt aktiviert werden. *RAS*-Mutationen sind relativ häufig im MM vorhanden (25-50 %) (53, 54). Liegt eine Mutation vor, so sind die MM-Zellen stark abhängig von der Aktivität des Signalweges (67). Weitere Signalwege, die durch Adhäsionsignale der KMSZ und durch genetische Läsionen stimuliert werden können, ist einerseits der „*phosphatidylinositol3-kinase/Akt*“ (PI3K/Akt) Signalweg (68-70) und andererseits der „*nuclear factor-kappa B*“ (NFκB) Signalweg (60, 61, 67, 71). Im Gegensatz zu dem *RAS*-Signalweg ist PI3K selten im MM mutiert (72). Jedoch ist in 50 % der primären MM das downstream-agierende AKT phosphoryliert und somit aktiviert. Im

Gegensatz zur Aktivierung von STAT3, ist AKT substanziiell für das Überleben der Myelomzellen (73). Durch genetische und epigenetische Modifikationen im kanonischen und nicht-kanonischen NFκB-Signalwegs, kann es zu einer konstitutiven Aktivierung von NFκB in primären MM-Zellen kommen. Das Überleben dieser Zellen ist dann abhängig von der Aktivität des Signalwegs und so führt die Inhibition von NFκB zur Induktion von Apoptose (65, 74). An dieser Stelle muss erwähnt werden, dass die Aktivierung der genannten Signalwege keinesfalls allein linear stattfindet, sondern es gleichermaßen zu Kreuz-Aktivierungen der Signalwege kommt (siehe Abbildung 3).

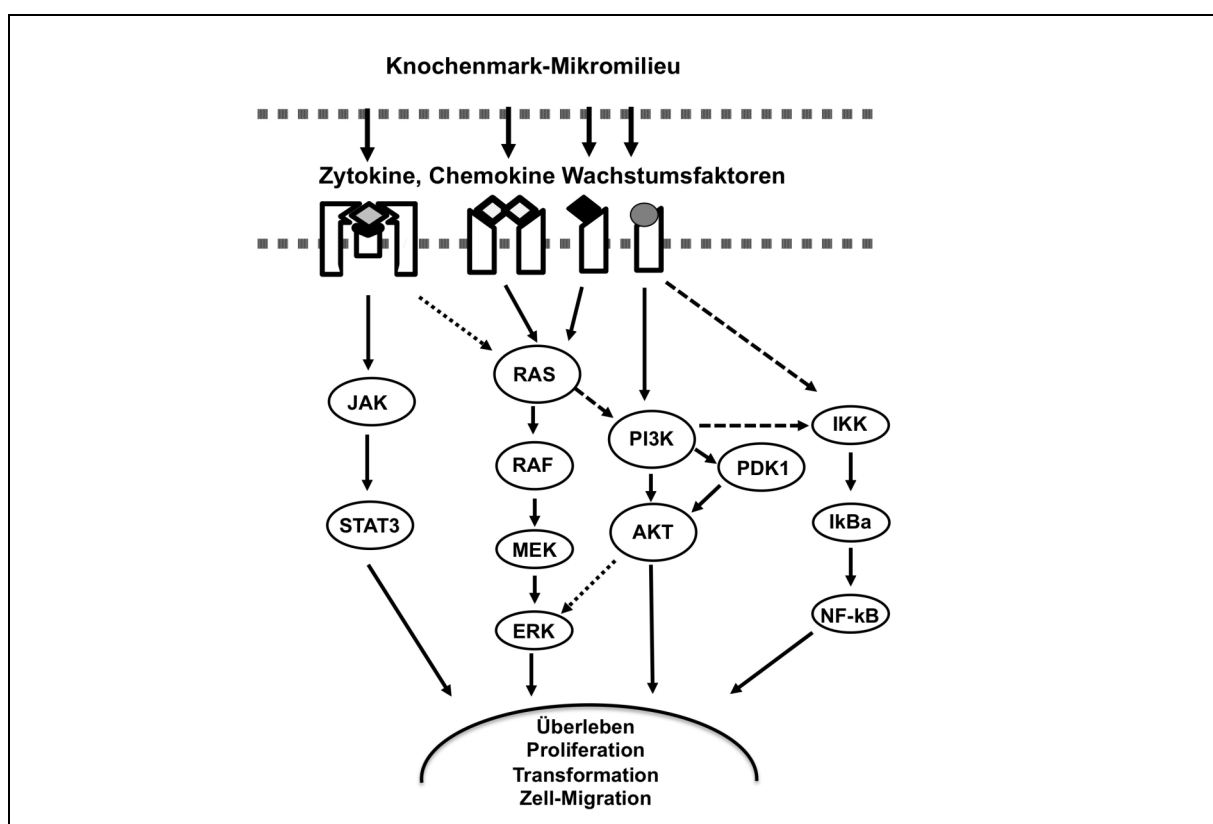


Abbildung 3: Das onkogene Signalnetzwerk im Multiplen Myeloms: Dies ist eine vereinfachte Darstellung des komplexen Zusammenspiels verschiedener Signalwege, die die Überlebens- und Apoptosesignale in den MM-Zellen vermitteln. Die gestrichelten Pfeile stehen für hypothetische Verbindungen.

Der unterschiedliche genetische Hintergrund der MM-Zellen macht eine Generalisierung der Bedeutung um einzelne Signalwegskomponenten schwierig, ermöglicht aber eine Einteilung der MM in Subgruppen. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass eine Einteilung in AKT positive und negative MM-Fälle (73) und z.B. der RAS-Status im MM therapeutisch relevante Parameter sein können (67).

Zusammenfassend kann aber gesagt werden, dass das Zusammenspiel verschiedener onkogener Signalwege das Überleben und die Entwicklung der Myelomzellen propagiert.

1.3 Der Hitzeschock-Transkriptionsfaktor 1 (HSF1)

1.3.1 Einleitung

Den Grundstein der Hitzeschock-Forschung legte Ferruccio Ritossa 1962. Er beobachtete, dass Temperaturerhöhungen die so genannten „Puff-Regionen“ in den Chromosomen der *Drosophila* Larve aktivieren und zu einer gesteigerten Proteinexpression führen. Anschließende Studien zu den induzierten RNAs führten zu der Isolation und Charakterisierung der Hitzeschock-Protein (*hsp*)-Gene und des *hsf1*-Gens aus *Saccharomyces cerevisiae* (75-77). Die Isolation sowie die Klonierung und die Expression des humanen *HSF1* erfolgten dann 1991 (78). Heute ist bekannt, dass Säugetiere drei verschiedene HSF-Isoformen besitzen. Ihnen werden verschiedenen Funktionen zugeordnet. So ist HSF1 essenziell für das Hitzeschock-Stresssystem, die Immunantwort und der Krebsentstehung. Außerdem sind HSF1 und HSF2 maßgeblich an Entwicklungsprozessen des Gehirns, sowie der Oogenese und Spermatogenese beteiligt (79, 80). Hingegen ist die Aktivität von HSF4, im funktionellen Zusammenspiel mit HSF1, für die Entwicklung verschiedener sensorischer Organe (Augenlinse, Olfaktorisches System) wichtig (79, 81, 82). Die Funktion von HSF4 ist unbedeutend für das Hitzeschock-Stresssystem, wohingegen neuere Arbeiten zeigen, dass es zwischen HSF1 und HSF2 zu einer, für die Genregulation wichtiger, Interaktion kommen kann (siehe Kapitel 1.3.4.2).

1.3.2 Definition

Der Transkriptionsfaktor HSF1 wird bei chemischen und physiologischen Stress aktiviert und initiiert die schnelle Synthese der Hitzeschock-Proteine (HSP). HSF1 fungiert daher als wichtigster Mediator der *heat shock stress response* (HSR), ein zelluläres System, welches zur Aufrechterhaltung von überlebensnotwendigen Funktionen benötigt wird (siehe Kap. 1.3.4.1).

1.3.3 Struktur

Das humane HSF1-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 8 auf der Position 24.3 lokalisiert. Das HSF1-Protein ist aus 529 Aminosäuren aufgebaut und besteht aus drei Domänen (siehe Abbildung 4). Am N-Terminus befindet sich die hoch konservierte DNA-bindende Domäne (DBD), die zu der Familie der so genannten „winged-helix-turn-helix“ DBDs gehört (83-85). Als Monomer ist die Bindung an die DNA nicht möglich, erst die trimerisierten Komplexe können die sich wiederholende Sequenz nGAAn (*heat shock elements*, HSE) in der großen Furche der DNA erkennen und die DNA-Bindung initiieren. Darüber hinaus vermittelt die DBD aber auch weitere Interaktionen mit anderen Faktoren, die Einfluss auf die Transaktivierungskapazität der HSF haben (86). Da dadurch Zielgene erkannt werden, wird die DBD als die Signatur-Domäne der HSF angesehen. Die Trimerisierung der HSF wird durch die Anordnung der hydrophoben „heptad repeats“ (HR-A und HR-B), die sich zu einer coiled-coil Struktur formen, vermittelt (87). Die spontane HSF Trimerisierung wird durch die HR-C verhindert (88, 89). Am C-Terminus befindet sich die Transaktivierungsdomäne (TAD), die bei HSF1 aus zwei Modulen (AD1 und AD2) besteht. Sie sind reich an hydrophoben und sauren Resten, was eine schnelle und ausgedehnte Stressantwort sichert. Ursprünglich nahm man an, dass die TAD die Stress-Induktion von HSF1 ermöglicht (90, 91). Mittlerweile wurde aber gezeigt, dass die regulatorische Domäne (RD), zwischen HR-A/HR-B und der Transaktivierungsdomäne, mit ihren zahlreichen Angriffsstellen für post-translationale Modifikationen (PTM), die Stressantwort initiiert (92-97).

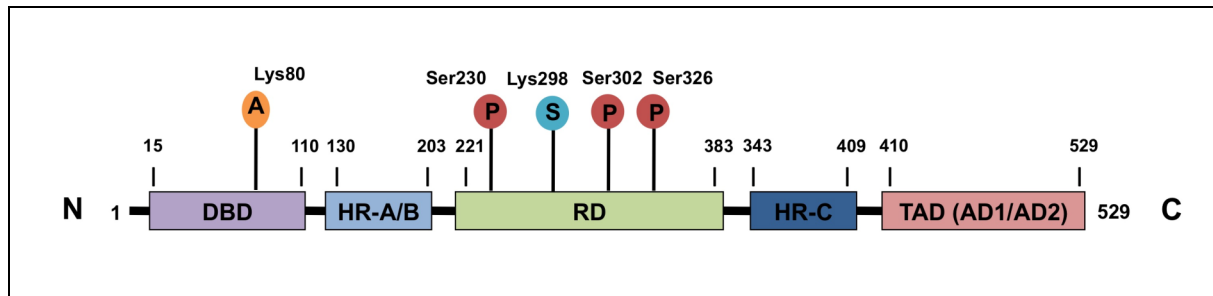


Abbildung 4: Proteinstruktur von HSF1: Die DNA-bindende Domäne (DBD) umfasst den N-terminalen Bereich. Um die DNA binden zu können wird die Trimerisierung, die über die HR-A/B/C Abschnitte reguliert wird, benötigt. Die Transaktivierungskapazität von HSF1 befindet sich im C-terminalen Bereich in der Transaktivierungsdomäne (TAD). Diese Aktivität kann von der zentral liegenden regulatorischen Domäne (RD) gesteuert werden. In diesem Bereich befinden sich zahlreiche Angriffsstellen für post-translationale Modifikationen (hier exemplarisch dargestellt: A für Acetylierung, P für Phosphorylierungen und S für Sumoylierungen).

1.3.4 Funktion

1.3.4.1 Die Regulation der Hitzeschockantwort durch HSF1

Organismen besitzen ein dynamisches Stress-Antwort-System, welches es ihnen ermöglicht, die Auswirkungen von proteotoxischem Stress möglichst zu minimieren und die lebensnotwendigen zellulären Funktionen aufrecht zu erhalten. Da dieses System durch Veränderungen (Erhöhungen) der Temperatur entdeckt und untersucht wurde, wird dieses System „*heat shock stress response*“ (HSR) genannt. Hierbei kommt es zu einer schnellen, erhöhten Synthese von HSP, die als Chaperone bei der Faltung und Re-Faltung von (miß-) gefalteten Proteinen assistieren und so Proteinschädigungen neutralisieren (75, 76, 98, 99). Die transkriptionelle Aktivierung der HSR wird von HSF1 eingeleitet und reguliert. In ungestressten Zellen liegt HSF1 als phosphoryliertes Monomer, gebunden in einem Komplex (u.a. mit HSP90), ohne DNA-Bindungsaktivität sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus vor. Durch einen Stressor kommt es zur Auslösung der HSR. Dabei wird HSF1 hyperphosphoryliert und dissoziiert aus dem inaktiven Komplex. Die HSF1-Monomere trimerisieren und akkumulieren anschließend im Nukleus (100, 101). HSF1 bindet dann an spezifische DNA-Erkennungssequenzen, den HSE (102, 103). Nach der DNA-Bindung wird die Transkription der HSP initiiert. Die Attenuation erfordert zwei regulatorische Schritte: zum einen binden die produzierten HSP (HSP70/HSP40-Komplex, Abb. 5) über einen „*feedback loop*“-Mechanismus an

HSF1, was zur Repression der Transaktivierung des DNA-gebundenen HSF1 führt (104, 105). Zum anderen wird durch die Acetylierung von Lys80 in der DBD die Bindung der DNA inhibiert. Diese Attenuationsphase wird durch den Ausgleich der Acetylierung durch p300 (CREB-binde Protein) und der Deacetylierung von dem Sirtuin SIRT1 reguliert (Abbildung 5) (94, 95, 97, 106-108).

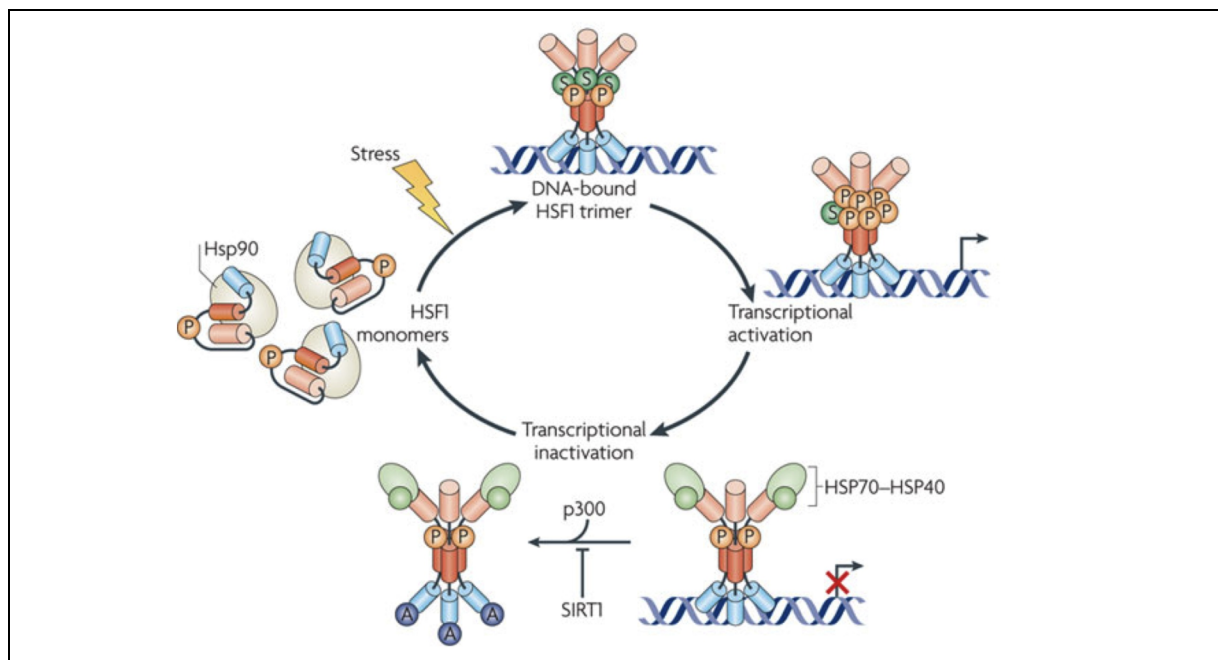


Abbildung 5: Regulation der HSF1-vermittelten HSP-Synthese: Der initiale Aktivierungsschritt ist die Trimerisierung der HSF1-Monomere, die die Bindung an die DNA ermöglicht. Anschließend kommt es zur Transkription der HSP. Die synthetisierten HSP binden in einem *feedback loop*-Mechanismus an HSF1 und starten die Attenuationsphase. Die Acetylierung, die von p300 und SIRT1 reguliert wird, beendet diese Phase. Zahlreiche post-translationale Modifikationen (PTMs) wie Phosphorylierungen, Acetylierungen und Sumoylierungen steuern den Regulationskreislauf (Aktivierung und Attenuation) (Abbildung nach Akerfelt et al. 2010).

1.3.4.2 Funktionelles Zusammenspiel von HSF1 und HSF2

Neuere experimentelle Arbeiten deuten auf eine, für die HSR möglicherweise kritischen, funktionellen Interaktion von HSF1 und HSF2 hin (79). Mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) konnte gezeigt werden, dass sowohl HSF1 als auch HSF2 nach einem Hitzeschock oder einer Hämin-Behandlung an bestimmte *hsp*-Promotoren binden (109, 110). Wobei HSF1 hauptsächlich durch Hitzeschock und HSF2 durch Hämin oder andere chemische Agenzien (u.a. Proteasom-Inhibitoren) aktiviert wird (111). In weiteren Studien wurde gezeigt, dass es nur zu einer HSF2-

Promotor-Bindung kommt, wenn HSF1 bereits an den Promotor gebunden hat. Essenziell dafür ist, dass HSF1 eine intakte DNA-bindende Domäne (DBD) besitzt (109). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die HSF1-HSF2-Heterotrimerisierung eine Plattform bildet, die es ermöglicht auf thermalen Stress- oder Entwicklungs-Stimuli zu reagieren und so die Transkription entsprechend zu regulieren (112). HSF2 kann somit die HSF1-vermittelte Induktion der HSP-Synthese positiv oder negativ, durch die aktive Beteiligung an der transkriptionellen Regulation, beeinflussen. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass HSF2 in mitotischen Zellen an die Promotoren der *hsp70i* (113), *hsp27* und *hsp90* (114) Gene binden kann. Die Bindung an den *hsp70i* Promotor ermöglicht es Zellen, die sich in der G1-Phase befinden, direkt nach einem Stressauslöser die Induktion der HSP70 Synthese herbei zu führen (113). Das Phänomen durch die Bindung eines Transkriptionsfaktors ein Gen zu „markieren“ und somit seine schnelle Transkription zu initiieren, nennt man „*gene-bookmarking*“. Im Gegensatz zu *hsp70i* ist das *bookmarking* von *hsp27* und *hsp90* wichtig für die Erhaltung der konstitutiven Proteinlevel (114).

1.3.5 Klassifikation der Hitzeschockproteine (HSP)

Unter normalen physiologischen Bedingungen agieren HSP als molekulare Chaperone. Hierbei unterstützen sie die Faltungsprozesse der neu synthetisierten Proteine. Unter veränderten physiologischen Bedingungen wird durch die verstärkte Synthese von HSP ein proteotoxischer Schaden verhindert.

Die Nomenklatur der HSP ergibt sich aus der Einteilung der HSP anhand ihrer Größe. Die HSP werden bei Säugern in fünf Klassen unterschieden: HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 und die kleinen HSP (inklusive HSP27). Von diesen sind hauptsächlich HSP90, HSP70 und HSP27 von therapeutischem Interesse, da sie an verschiedene onkogene Proteine binden können und darüber einen regulatorischen Einfluss ausüben (115). Außerdem werden diese, stark induzierbaren HSP, hauptsächlich von HSF1 reguliert (116). Die ubiquitär konstitutiv exprimierten HSP bilden mit weiteren HSP oder Ko-Faktoren verschiedenen Multiproteinkomplexe (117). HSP10 und HSP60 Komplexe vermitteln die Proteinfaltung und schützen vor der Aggregation denaturierter Proteine. Darüber hinaus stabilisieren HSP70- und

HSP90-Komplexe Proteine, die zur Aufrechterhaltung des gesamten zellulären Systems beitragen (118, 119). Hierbei unterliegt insbesondere die Regulation der Apoptose der Funktion der HSP (120). Die wichtigsten Eigenschaften sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Klasse	Vertreter	Vorkommen	Funktion
HSP90	HSP90 $\alpha\beta$ Grp94	Zytosol ER	Reguliert die Signaltransduktion, Re-Faltung von Proteinen, Autoregulation der HSR, involviert im Zellzyklus und der Proliferation
HSP70	HSC70 HSP70 BIP mHSP70	Zytosol Zytosol ER Mitochondrium	Reguliert die Signaltransduktion, fungiert im intra-Organellen Transport, Re-Faltung und Erhaltung von denaturierten Proteinen Autoregulation der HSR, involviert im Zellzyklus und der Proliferation, Anti-apoptotische Aktivität
HSP60	HSP60	Mitochondrium	Re-Faltung von Proteinen, schützt vor Aggregation denaturierter Proteine
HSP40/ DNAJ-Familie	DNAJB1 (HSP40) DNAJA1 (HSP40-4)		Ko-Chaperone von HSP70 und HSC70
Kleine HSPs	HSP27 $\alpha A/\alpha B$ crystallin HSP10	Zytosol Zytosol Mitochondrium	Verhindert die Aggregation und Hitzeinaktivierung von Proteinen, stabilisiert Mikrofilamente, Anti-apoptotische Aktivität Ko-Faktor für HSP60

Tabelle 3: Zusammenfassung der Nomenklatur, Lokalisation und Funktion der wichtigsten HSP-Familien (nach Jolly und Morimoto 2000)

1.3.6 Die Funktion von HSF1 in der Tumorigenese

Dai et al. beschrieben 2007, dass HSF1 auf verschiedenen Ebenen die maligne Transformation von Zellen unterstützen kann. Um den Einfluss von *Hsf1* auf die Tumorigenese zu untersuchen, nutzten sie ein Haut-Karzinogenese-Modell. Bei diesem Mausmodell wird durch eine zweistufige Verabreichung von chemischen Mutagenen eine somatische Mutation in epidermalen Zellen induziert. Es bilden sich zunächst benigne Papilloma, aus denen sich ein kleiner Teil zu malignen Plattenepithelkarzinomen entwickelt. Die *Hsf1*-null Mäuse wiesen aber eine

signifikant verringerte Tumorformation und eine höhere Gesamt-Überlebenszeit, verglichen mit den *Hsf1* Wild-Typ Mäusen, auf. Die Untersuchung der isolierten Tumore zeigte, dass mehrheitlich eine Mutation des Onkogens *H-Ras* vorlag. Um den Zusammenhang von *Hsf1* und der Aktivität von Onkogenen zu evaluieren, wurde ein weiteres Mausmodell (mit Mutation des Tumorsuppressors *Trp53*) untersucht und zusätzlich *in vitro* Experimente mit transduzierten Onkogenen (z.B. *H-RAS* und *PDGF-B*) durchgeführt. Alle Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass *Hsf1*-Depletion einen protektiven Effekt für die Zellen hat. Das bedeutet, dass HSF1 die zelluläre Transformation erst ermöglicht. Hierbei fungiert *Hsf1* aber nicht als klassisches Onkogen, sondern ist involviert in pleiotropischen zellulären Funktionen und wird damit zum Beispiel einer „*non-oncogene-addiction*“ (121). In dieser Funktion ermöglicht HSF1 die Zellproliferation sowie das Zellüberleben nach verschiedenen onkogenen Stimuli. Weiterhin werden Signalwege nach Serum Stimulation aktiviert (verstärkte ERK-Aktivierung), Proteintranslation moduliert und die Glukose Aufnahme sowie die Glykolyse gesteuert. Daher scheint HSF1 durch die Manipulation der zellulären Kernfunktionen den Transformationsprozess zu unterstützen (122). Andere Arbeiten zeigen auch, dass HSF1 in onkogenen Signalnetzwerken agiert und dadurch die Transformation unterstützt. Insbesondere führt die Bindung von Heregulin β 1 (HRG β 1) an den onkogenen Rezeptoren der „*human epidermal growth receptor*“ Familie (z.B. HER2) zu einer verstärkten Aktivität des PI3-Kinase-Signalwegs und induziert so die Aktivität von HSF1. Diese gesteigerte Signalwegsaktivität führt zur Apotoseresistenz, erhöhter Glykolyse, verstärkte Zellproliferation und somit zur Tumorprogression. Hier konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine Depletion von HSF1 eine HER2-induzierte Zelltransformation inhibiert (123-125).

1.3.7 Die HSF1-Expression und ihre Bedeutung in humanen Tumoren

In einigen Tumorentitäten wurde bereits eine aberrant hohe Expression von HSF1 beschrieben. So finden sich erhöhte HSF1-Proteinspiegel in malignen Prostata-Epithelzellen und in Pankreaskarzinom-Zellen (126, 127). Häufig ist eine starke HSF1-Expression ein Marker für ein fortgeschrittenes Krankheitsstadium und geht einher mit einer schlechten Prognose für den Patienten (128, 129). Zum Beispiel

ist in humanen hepatozellulären Karzinomen die Kopienanzahl des *HSF1*-Gens erhöht, was zu einer gesteigerten HSF1-Expression führt. Hier ist die abberant hohe HSF1- Expression ein Marker für einen ungünstigen Krankheitsverlauf (128, 130). Auch findet sich in oralen Plattenepithelkarzinomen eine gesteigerte Expression der HSF1-mRNA. Darüber hinaus korreliert die nukleare HSF1-Expression mit der Tumorgröße und dem histopathologischen Befund (131). In einer umfangreichen Studie von invasiven Brustkrebsfällen, konnte gezeigt werden, dass HSF1 als unabhängiger Prädiktor für ein schlechtes Überleben der Patientinnen steht. In dieser großen Kohorte korrelierte die HSF1-Expression mit dem histologischen Grad, der Tumorgröße und der erhöhten Mortalität in der Estrogen Rezeptor positiven Gruppe (132). Insgesamt weisen die bisherigen Studien auf eine Schlüsselfunktion von HSF1 in der Tumorinitiation und der Tumorprogression hin. Hierbei sind die Tumorzellen von HSF1 abhängig, d.h. durch Depletion von HSF1 kommt es zu gestörten Zellfunktionen woraufhin die Zellen im Zellzyklus arretieren und/oder sterben (122, 127, 129, 130).

1.3.8 Die HSP-Expression in humanen Tumoren

Im Gegensatz zu den noch vereinzelt Daten zu der HSF1-Expression, ist eine starke Überexpression von HSP in humanen Tumoren sehr häufig (133). Die HSP übernehmen hierbei verschiedene Funktionen. Als molekulare Chaperone stabilisieren sie Onkoproteine wie BCR-ABL, mutiertes TP53, mutiertes BRAF, AKT, CDK1, CDK4 und ERBB2/HER2 und erhalten so das onkogene Signalnetzwerk aufrecht (134, 135). Des Weiteren blockieren HSP die natürlichen Mechanismen der Apoptose und der Seneszenz, was zu einer unkontrollierten Tumorprogression führt. Durch diese Eigenschaften stärken HSP onkogene Prozesse und unterstützen so die maligne Transformation. Diese Entwicklung wird von erhöhtem proteotoxischen Stress begleitet, was wiederum die Aktivität der HSP benötigt. Es bleibt aber noch zu untersuchen welche Rolle die HSR bei dieser Adaption der Zellen an die andauernde Stresssituation zukommt.

1.3.9 Das HSF1/HSP-System als therapeutisches Ziel im MM

Für die Überexpression der HSP in malignen Zellen gibt es bis heute noch keine Erklärung. Eine Hypothese ist, dass es durch eine Reihe von mutierten Onkoproteinen zu einer hohen Substratlast kommt und dies eine gesteigerte Aktivität der HSP-Chaperone anregt. Diese These wird dadurch gestützt, dass die HSP90-basierte Chaperon-Maschinerie in Tumorzellen gezwungen ist in ihrer maximalen Leistung zu arbeiten, was dazu führt, dass diese Zellen abhängig von HSP90 sind (136). Diese Erkenntnis führte zu der Entwicklung zahlreicher HSP90-Inhibitoren, deren Wirkung in den letzten Jahren in verschiedenen Tumormodellen untersucht wurde (137). Im MM führte die HSP90-Inhibition *in vitro* zum Zelltod (138, 139), jedoch konnten diese hoffnungsvollen Ergebnisse in klinischen Studien nicht erreicht werden (140). Eine Kombination des HSP90-Inhibitors mit weiteren pharmakologischen Inhibitoren erzielte aber ein besseres Therapieansprechen (141). Es konnte ebenfalls in *in vitro* Versuchen gezeigt werden, dass HSP70 die Funktion des HSP90-Systems unterstützt und selbst eine tragende Rolle bei der Pathogenese des MM einnimmt (142, 143). Da HSF1 als übergeordneter Transkriptionsfaktor essenziell für die HSP-Synthese ist, kann seine Überaktivität in transformierten Zellen u.a. für die starke Präsenz der HSP verantwortlich sein. Hierdurch wird auch HSF1 selbst als therapeutisches Ziel interessant. Obwohl bekannt ist, dass HSP90 und HSP70 bei der Pathogenese des MM eine Rolle spielen und HSP27 bei der Entstehung von Resistenzen gegen Pharmaka involviert ist (144), ist die Funktion und Bedeutung von HSF1 im MM noch unbekannt. Möglicherweise ist ein Grund dafür, dass es bisher noch keine spezifischen HSF1-Inhibitoren gibt. Diverse chemische Agenzien wurden auf ihre HSF1-hemmende Wirkung untersucht (zusammengefasst in Tabelle 4) und Triptolid wird hierbei als der potenteste HSF1-Inhibitor beschrieben (116). Triptolid wurde erstmals 1972 aus der chinesischen Kletterpflanze *Tripterygium wilfordii* isoliert und auf seine Bioaktivität getestet (145). Seither wird seine Wirksamkeit gegen Krebserkrankungen und Entzündungsprozessen untersucht (146, 147). Westerheide et al. (2006) untersuchten die HSF1-inhibitorische Eigenschaft von Triptolid und zeigten, dass HSF1 durch die Blockade der Transaktivierung inhibiert wird. Eine Induktion der HSR (gezeigt durch die fehlende Synthese von HSP72) wurde durch die Behandlung mit Triptolid unterbunden (148). Jedoch hemmt Triptolid die allgemeine RNA-Polymerase

Funktion und beeinflusst so die Aktivität weiterer Transkriptionsfaktoren (z.B.: NFκB) (149, 150). Trotz der fehlenden Spezifität wird in dieser Arbeit Triptolid als pharmakologischer HSF1-Inhibitor verwendet und die Ergebnisse mit der biologischen Depletion von HSF1 mittels shRNA verglichen.

Verbindung	Klasse	Referenz
Quercetin	Flavonoid	(151)
QC12	Quercetin Prodrug	(152)
KNK437	Benzyldenlactam	(153)
Stresgenin B	Streptomyces Fermentationsprodukt	(154)
Triptolid	Diterpen Triepoxid	(148, 150, 155)
Emunin	Emetin Derivat	(156)
NZ28	Emetin Derivat	(156)

Tabelle 4: Chemische Agenzien, die HSF1 inhibierende Wirkung haben (modifiziert nach Whitesell et al. 2009).

2. Zielsetzung der Arbeit

Das multiple Myelom (MM) ist durch ein komplexes, onkogenes Signalnetzwerk charakterisiert. Die konstitutive Aktivität dieses Netzwerkes führt zu einem Überlebensvorteil der malignen Zellen und zur Progression der Erkrankung. Hitzeschockproteine (HSP) stabilisieren als molekulare Chaperone einzelne Komponenten des Netzwerkes und erhalten so die aberrante Signalweiterleitung aufrecht. Im MM konnte gezeigt werden, dass die HSP-Expression (HSP90 und HSP70), im Vergleich zu nicht-malignen Zellen, erhöht ist und dass die MM-Zellen von dieser Präsenz der HSP abhängig sind (138, 139, 142). Unter normalen physiologischen Bedingungen wird die HSP-Synthese vom Hitzeschock-Transkriptionsfaktor 1 (HSF1) reguliert (99). Welche molekularen Ereignisse der Überexpression der HSP aber in malignen Zellen zu Grunde liegen, ist aber weitgehend unklar. Diskutiert wird, ob der erhöhte proteotoxische Stress in malignen Zellen eine ständige maximale Leistung der Chaperonmaschinerie hervorruft und dies allein zu der stark erhöhten Expression der HSP führt oder ob andere Faktoren (z.B. genetische Aberrationen, Kopplung an onkogene Signalwege) entscheidend für eine ständige Aktivierung des HSF1/HSP-Kreislaufs sind (133, 157). Folglich ist die Rolle von HSF1 für die Expression von HSP in Tumorzellen nahezu unbekannt. In dieser Arbeit wird ergründet, welchen Einfluss HSF1 auf die Regulation der HSP-Expression im MM hat. Hierfür wird die Expression von HSF1 in Myelomzelllinien und in primären Myelomzellen dargestellt und mit der Expression der HSP verglichen. Darüber hinaus wird die Regulation der *heat shock stress response* (HSR) durch Hitzeschock und durch pharmakologische Inhibition von HSP90 und des Proteasoms untersucht. Genexpressionsanalysen nach shRNA-vermitteltem Knockdown von HSF1, sollen zusätzlich die Regulation der HSP durch HSF1 verdeutlichen und weitere HSF1-Zielgene aufzeigen. Um zu ermitteln, welchen Stellenwert HSF1 als therapeutischer Angriffspunkt in der Myelomtherapie einnimmt, wird die Zellproliferation und das Zellüberleben nach Depletion von HSF1 betrachtet. Zu diesem Zweck werden ebenfalls die Effekte einer Kombination der pharmakologischen HSF1-Inhibition mit HSP90- oder Proteasom-Inhibition untersucht. Hierbei werden die Auswirkungen der Kombination für die Induktion der HSR und den Einfluss der Kombinationstherapie auf das Zellüberleben eruiert.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Zubehör

Agarosegelkammer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Bakterienschüttler	Infors, Einsbach, Deutschland
Blotapparatur	Bio-Rad, München, Deutschland
Brutschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München, Deutschland
Elektroporationsgerät	Bio-Rad, München, Deutschland
Filmentwicklermaschine	Agfa-Gevaert, Leverkusen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Electron corporation, Langenselbold, Deutschland
Geldokumentationssystem	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Heizblock	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Lichtmikroskop	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Magnetischer Zellseparator „MiniMACS“	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Mikrowelle	Siemens, München, Deutschland
Mikroplattenleser	Bio-Rad, München, Deutschland
Multifuge 3 S-R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Spektralphotometer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
pH-Meter	Hanna Instruments, Woonsocket, USA

Sterilbank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tischzentrifuge Mikro 200	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Waage	Kern, Balingen, Deutschland
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Vortexer	Labinco BV, DG Breda, Niederlande
Zellinkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zellsortierer MoFlo™	Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA

3.1.2 Verbrauchsmaterial

Elektroporationsküvetten	Peqlab, Erlangen, Deutschland
FACS-Röhrchen	BDBiosciences, Heidelberg, Deutschland
Kanülen	Terumo Neolus, Leuven, Belgien
Küvetten	Peqlab, Erlangen, Deutschland
MACS- Säulen (Large Cell Column)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher und Schuell, Dassel, Deutschland
Pipetten	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	Brand, Wertheim, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Röntgenfilme	Raymed Imaging AG, Krauchthal, Schweiz
Zellkulturflaschen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen	Corning Costar, Bodenheim, Deutschland
Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellsiebe	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturplatten	TPP, Trasadingen, Schweiz

3.1.3 Computerprogramme

4 Peaks	Mekentosj B.V., Aalsmer, Niederlande
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems GmbH, München, Deutschland
ACDSee Foto-Editor	ACD Systems, Victoria, USA
Cell Quest™ Pro Research	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Endnote	Adept Software, Deutschland
FlowJo	Tree Star, Ashland, USA
GraphPad Prism	Graphpad Software, La Jolla, USA
Microsoft Office	Microsoft, Seattle, USA

3.1.4 Chemikalien

Acrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Agarose	Cambrex BioScience, Rockland, USA
Ampicillin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Annexin V-APC	Bender MedSystems, Wien, Österreich
Ammoniumperoxiddisulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bovines Serumalbumin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
CD4-Microbeads	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland
CD138-Microbeads	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Apotheke Universitätsklinikum Würzburg, Würzburg, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland

HEPES			Roth, Karlsruhe, Deutschland
Lymphocyte Separation Medium			PAA Laboratories, Pasching, Österreich
LSM1077 (Ficoll-Lösung)			
Magermilchpulver			TSI GmbH, Zeven, Deutschland
Natriumchlorid			Roth, Karlsruhe, Deutschland
OptiPrep			Axis-Shield, Oslo, Norwegen
Salzsäure			Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS			Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED			Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tris			Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween-20			Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.1.5 Pharmakologische Inhibitoren

Bortezomib	LC Laboratories, Woburn, USA
NVP-AUY922	Selleck Chemicals, Houston, USA
Triptolid	Tocris Bioscience, Bristol, UK

3.1.6 Lösungen und Puffer

Die aufgelisteten Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, mit destilliertem Wasser angesetzt.

Annexin V-Bindepuffer	10 mM HEPES pH 7.4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl ₂
B- Zell Isolationspuffer	1x PBS, 2 % FBS, 2mM EDTA
2x Lämmli-Puffer	100 mM Tris pH 6.8, 20 % Glycerol, 8 % SDS, 10 % β-Mercaptoethanol, 0,01 % Bromphenolblau
LB-Medium	5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, 10 g NaCl in 1 l H ₂ O

Lysepuffer	40 mM HEPES, 700 mM NaCl, 2 mM MgCl ₂ , 1 mM EDTA, 0,2 mM EGTA, 100 mM PMSF, 1 mg/ml Pefablock, 1 mg/ml Aprotinin, 100 mM Na ₃ VO ₄ , 100 mM DTT, 10 % NP40
1x PBS	2,7 mM KCl, 2,0 mM KH ₂ PO ₄ , 137 mM NaCl, 10,0 mM Na ₂ HPO ₄
Ponceau S-Färbelösung	0,1 % C ₂₂ H ₁₆ N ₄ Na ₄ O ₁₃ S ₄ in 5 % CH ₃ COOH
Separationspuffer	1x PBS, 2,5 mM EDTA, 5 % FCS
TBS-T-Puffer	20 mM Tris, 140 mM NaCl, 0,1 % Tween20, pH 7.6
1x TGS	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS
Trypanblau-Lösung	1 % C ₃₄ H ₂₈ N ₆ O ₁₄ S ₄ in 0,9 % NaCl
Western Blot-Transferpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 1,3 mM SDS, 20 % Methanol

3.1.7 Zellkulturmedien und Zusätze

RPMI 1640	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
DMEM 1640	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Fötale Rinderserum (FBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin-Lösung	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Natriumpyruvat	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

3.1.8 Längenstandards

Protein-Marker (Prestained Marker, Broad Range)	Protein	New England Biolabs, Frankfurt/Main, Deutschland
DNA-Marker (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder)		Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

3.1.9 Reaktionssets (Kits)

Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Arrays	Affymetrix, Wooburn Green, UK
Dynabeads® Untouched™ Human B-Cells	Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norwegen
DC Protein Assay Kit	Bio-Rad, München, Deutschland
Qiagen Plasmid Maxi/Giga Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Qiagen RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Zyppy Plasmid Mini Prep Kit	Zymo Research, Orange, CA, USA

3.1.10 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
T4 Polynukleotidkinase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
T4 Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

3.1.11 Antikörper

Primärantikörper	Wirtsorganismus	Verdünnung	Bezugsquelle
β-Aktin (A5316)	Maus	1:2000	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
HSF1 (SPA-950)	Ratte	1:1000	Stressgen, Ann Arbor, USA
HSF2 (SPA-950)	Ratte	1:500	Stressgen, Ann Arbor, USA
HSP27 (SPA-803)	Kaninchen	1:1000	Stressgen, Ann Arbor, USA
HSP40 (no.4868)	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling, Frankfurt/Main, Deutschland

HSP40-4 (sc-56400)	Maus	1:1000	Santa Cruz, Heidelberg, Germany
HSP72 (SPA-810)	Maus	1:1000	Stressgen, Ann Arbor, USA
HSC70 (SPA-815)	Ratte	1:1000	Stressgen, Ann Arbor, USA
HSP90 α (AB3466)	Kaninchen	1:1000	Chemicon, Temecula, USA
HSP90 β (AB3468)	Kaninchen	1:1000	Chemicon, Temecula, USA
α -Tubulin	Ratte	1:1000	Biozol, Eching, Deutschland
Sekundär- antikörper	Wirtsorganismus	Verdünnung	Bezugsquelle
Maus, HRP-konjugiert	Ziege	1:20000	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Kaninchen, HRP-konjugiert	Ziege	1:20000	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Ratte, HRP-konjugiert	Ziege	1:20000	Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
BrdU-Alexa 647- konjugiert	Maus	1:5	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 5: Zusammenstellung der Primär- und Sekundärantikörper, die für die Western Blot Analysen verwendet wurden.

3.1.12 DNA-Oligonukleotide für shRNA-Expressionsvektoren

Als Ausgangsvektor für die shRNA-Expressionsvektoren wurde der pSUPER-Vektor (*suppression of endogenous RNA*) ausgewählt (158). Hinter dem Polymerase III H1-RNA Promoter befindet sich ein doppelsträngiges Oligonukleotidfragment, welches

die spezifischen 19-nt Zielsequenz enthält. Die reverse Komplementär-Zielsequenz folgt nach einem 9-nt langen Spacer. Mittels *HindIII* und *BglII* Schnittstellen können hier die entsprechenden Oligonukleotide einkloniert werden. Die Sequenzmaske des kompletten Inserts lautet 5'-GATCCCC-**X**-TTCAAGAGA-**Y**-TTTTTGAAA-3' (Sense) und 5'-AGCTTTTCCAAAA-**X**-TCTCTTGAA-**Y**-GGG-3' (Antisense), wobei -X- jeweils für die Zielsequenz und -Y- für die Komplementär-Sequenz steht. Die DNA-Sequenzen basieren auf Sequenzen der entsprechenden humanen cDNA. Die transkribierte RNA faltet sich zusammen und bildet eine Sekundärstruktur aus, die an der Zielsequenz einer dsRNA mit einem Loop entspricht und im RNAi-Pathway durch Dicer und RISC zu einer funktionellen siRNA prozessiert wird.

Die folgenden Oligonukleotide wurden von der Firma BioTez, Berlin synthetisiert.

shRNA	Zielsequenzen
pSU/HSF1-1	5'-GGAGGTGCTGCCCAAGTAC-3' (Position 162-180)
pSU/HSF1-2	5'-GGGCCAGTTTGCCAAGGAG-3' (Position 147-165)
pSU/HSF2-1	5'-AGAGATGGTCCTGTAGAAT-3' (Position 253-271)
pSU/HSP27	5'-GTTCAAAGCAACCACCTGT-3' (Position 722-740)
pSU-HSP40-1	5'-CAGCTGATATCGTCTTTGT-3' (Position 695-714)
pSU-HDJ2-2	5'-GGAGAGAAGTTTAAACAGA-3' (Position 124-142)

Tabelle 6: Zielsequenzen der eingesetzten pSuper-basierten shRNA-Konstrukte

3.1.13 Plasmide

Die nachfolgende Tabelle enthält die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

Vektorname	Basisvektor	Beschreibung	Bezugsquelle
pSUPER	pBluescript-KS	Vektor für die Expression von short hairpin-RNA (shRNA) unter Kontrolle des RNA Polymerase III-Promotors H1	Oligoengine, Seattle, USA

pCD4 Δ	pcDNA3.1+	Vektor für die Expression von CD4 unter Kontrolle des T7-Promotors; Subklonierung von CD4 Δ cDNA aus pMACS4.1 (Miltenyi Biotech) in pcDNA3.1+ (Invitrogen)	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach und Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
pEGFP-N3		Vektor für die Expression von GFP unter Kontrolle des CMV-Promotors	Clontech, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 7: Zusammenfassung und Beschreibung der eingesetzten Plasmide

3.1.14 Bakterienstämme

Escherichia coli XL1-Blue

Stratagene, La Jolla, USA

3.1.15 Myelomzelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende humane Myelomzelllinien verwendet:

Zelllinie	Charakterisierung	Bezugsquelle
AMO-1	Herkunft: aus der Aszitesflüssigkeit einer 64-jährigen Patientin mit IgA- κ -Plasmozytom; Morphologie: runde Zellen in Suspension; IL-6-unabhängig; Chromosomensatz: unbekannt Mutationen: RAS wt, p53 wt	DSMZ, Braunschweig, Deutschland

<p>INA-6</p>	<p>Herkunft: aus der Pleuraleffusion eines 80-jährigen Patienten mit IgG-κ-Plasmazelleukämie; Morphologie: runde bis ovale Zelle in Suspension; strikt abhängig von IL-6; Chromosomensatz: hypotetraploid Mutationen: N-RAS mut, p53 mut</p>	<p>Prof. M. Gramatzki (Kiel, Deutschland) (Burger et al., 2001)</p>
<p>JJN-3</p>	<p>Herkunft: aus dem Knochenmark einer 57-jährigen Patientin mit einer Plasmazelleukämie (IgA1-κ). Morphologie: runde bis ovale Zelle in Suspension. Mononuklear, können aber auch als multinukleare Zellen vorhanden sein. Chromosomensatz: hypotriploid Mutationen: N-RAS mut, p53 wt</p>	<p>DSMZ, Braunschweig, Deutschland</p>
<p>MM.1S</p>	<p>Herkunft: aus peripherem Blut einer 42-jährigen Patientin mit MM (IgA-λ) Morphologie: kleine runde Zellen, Suspension und teilweise adhärent; IL-6-unabhängig; Chromosomensatz: hypodiploid Mutationen: K-RAS mut, p53 mut</p>	<p>LGC Standards, Wesel, Deutschland</p>
<p>OPM-2</p>	<p>Herkunft: aus peripherem Blut einer 56-jährigen Patientin mit MM (IgG-λ); Morphologie: runde Zellen in Suspension; IL-6-unabhängig; Chromosomensatz: hypotriploid/hypotetraploid Mutationen: RAS wt, p53 mut, PTEN deletiert</p>	<p>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH</p>

U266	<p>Herkunft: aus peripherem Blut eines 53-jährigen Patienten mit MM (IgE-λ);</p> <p>Morphologie: runde Zellen in Suspension, einzelne adhärent;</p> <p>IL-6-unabhängig;</p> <p>Chromosomensatz: hypodiploid</p> <p>Mutationen: RAS wt, p53 mut, BRAF mut, RB1 mut</p>	<p>Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH</p>
------	---	--

Tabelle 8: Beschreibung der humanen Myelomzelllinien

3.1.16 Nachweis von Mycoplasmen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mycoplasmen sind kleine, autoreplikative Bakterien, die durch das Überangebot von Nährstoffen in Zellkulturen diese häufig befallen. Durch ihre geringe Größe (0,22 bis 0,2 µm) ist solch eine Kontamination nicht sichtbar. Da Mycoplasmen in den Stoffwechsel der Zellen eingreifen und dies die Eigenschaften von Zellen verändern kann, ist eine Kontamination unerwünscht und wird regelmäßig über eine PCR-Analyse kontrolliert.

Analysiert werden die Medienüberstände der Zellkulturen. Dabei werden 300 µl Zellkulturüberstand 5 min bei 99 °C erhitzt und anschließend kurz abzentrifugiert.

Der PCR-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

2,5 µl	10 x Puffer NH ₄ ⁺
2,5 µl	MgCl ₂
2,5 µl	dNTPs
0,3 µl	Taq Polymerase
1 µl	Primer 3'
1 µl	Primer 5'
14,2 µl	H ₂ O
1 µl	Template

Nach anfänglichem Denaturierungsschritt von 2 min bei 94 °C wurden 35 Zyklen des folgenden Reaktionsschemas durchlaufen:

Denaturierung: 94 °C, 30 sec
Primeranlagerung: 60 °C, 1min
Elongation: 72 °C, 1min

Die PCR-Produkte werden auf einem 1 %igem Agarosegel analysiert. Dabei werden die PCR-Produkte mit Ladepuffer versetzt und anschließend auf das Gel gebracht. Um die Ergebnisse vergleichen zu können, werden eine Positiv- und eine Negativkontrolle mit aufgetragen.

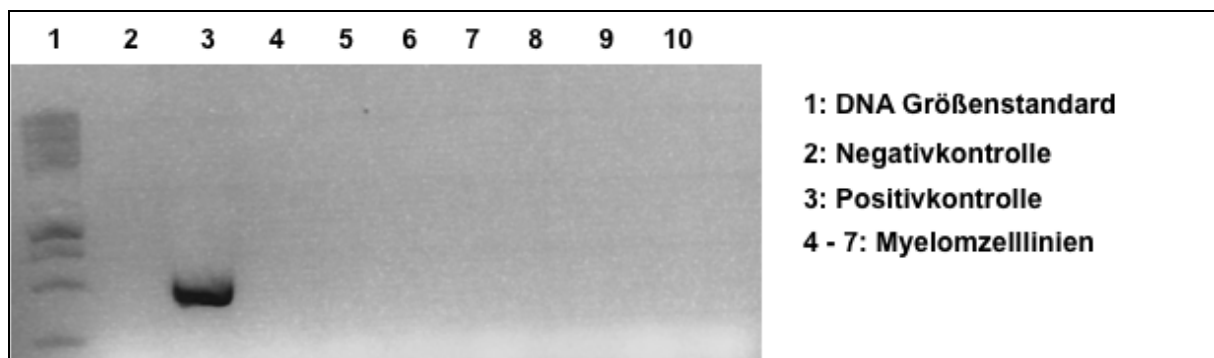


Abbildung 6: Ergebnis einer Mycoplasmen-PCR: In Lane 3 (Positivkontrolle) ist eine starke Bande sichtbar. Die getesteten Myelomzelllinien (Lane 4-7) weisen keine Bande auf, d.h. mittels PCR- Analyse konnte keine Mycoplasmen-Kontamination festgestellt werden.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Inkubation der Zellen erfolgte stets unter den gleichen Voraussetzungen in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Zelllinien wurden nach Erhalt expandiert und in Flüssigstickstoff (N₂) als aliquotierte Original-Zellbanken angelegt. Aus diesen Zellbanken wurde durch weitere Expansionen eine Arbeits-Zellbank erstellt, woraus alle 2-3 Monaten ein neues Aliquot aufgetaut wurde um die Zellkultur zu erneuern. Alle Zelllinien wurden regelmäßig auf Mycoplasmenkontamination mittels PCR Analyse untersucht.

3.2.2 Kultivierung humaner Myelomzelllinien

Die humanen MM-Zelllinien AMO-1, JLN-3, OPM-2 und U266 wurden von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ; Braunschweig) erworben. Die Zelllinie MM.1S wurde von LGC Biolabs (Wesel; ATCC-CRL-2974) bezogen. INA-6 Zellen wurden von Prof. Martin Gramatzki (Kiel) zur Verfügung gestellt. Alle Zelllinien wurden in RPMI-1640 Medium mit den Zusätzen 10 % fötales bovines Serum (FBS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 1 mmol/l Na-Pyruvat und 2 mmol/l L-Glutamin kultiviert. Für die Kultivierung der INA-6 Zellen wurde zusätzlich 2 ng/ml rekombinantes humanes Interleukin-6 (IL-6) supplementiert.

3.2.3 Isolierung mononukleärer Zellen durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Bei der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation werden die zellulären Blut- bzw. Knochenmarkbestandteile nach ihrer spezifischen Dichte aufgetrennt. Das Ficoll wirkt während der Zentrifugation wie ein Filter, so werden Zellen die eine hohe Dichte haben (Erythrozyten und Granulozyten) unter dem Ficoll gesammelt. Zellen mit einer geringeren Dichte (periphere mononukleäre Zellen (PBMC) wie Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten) bilden eine Interphase zwischen Ficoll und dem Zellsuspensionsmedium. Die in der Interphase vorhandenen PBMCs können dann nach der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation abpipettiert, gewaschen und weiter prozessiert werden.

3.2.4 Gewinnung und Kultivierung primärer Myelomzellen

Primäre MM-Zellen wurden aus Routine-Knochenmarkspunktaten von Myelompatienten der Medizinischen Klinik und Poliklinik II, des Universitätsklinikums Würzburg, isoliert. Ein Nachweis der Patientenaufklärung, eine schriftliche Einverständniserklärung der jeweiligen Patienten sowie die Erlaubnis des Ethik-Komitees der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg (Referenznummer 18/09) lagen vor.

Die Isolation der primären Myelomzellen erfolgt über ein immunomagnetisches Zellsortierungsverfahrens am Tag der Knochenmarkspunktion (159). Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Selektion der CD138-positiven Plasmazellen aus den Knochenmarksaspiraten. Nach der Separation der mononukleären Zellfraktion über Ficoll-Dichte-zentrifugation wurden die Zellen in kaltem Separationspuffer (PBS mit 0,5 % FBS und 2,5 mmol/l EDTA) aufgenommen und mit CD138-Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) inkubiert. Über eine im magnetischen Feld befindliche Säule (MACS Large Cell Säulen, Miltenyi) können die, über die microbeads-Antikörper-Konjugate markierten Plasmazellen, isoliert werden. Die im Durchlauf verbliebenen CD138-negativen Zellen werden zur Ausdifferenzierung von Knochenmarkstromazellen (KMSZ) in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) mit 20 % FBS und oben beschriebenen Zusätzen aufgenommen und kultiviert. Die Säule wird mit kaltem Separationspuffer gewaschen und die in der Säule verbliebene CD138 positive Zellfraktion wird mit Vollmedium herausgespült. Auf diese Weise ließen sich hochaufgereinigte MM-Patientenzellen gewinnen (90 bis über 95 % Plasmazellen) (160). Um eine geeignete Versorgung der primären MM-Zellen zu gewährleisten, bzw. das Mikromilieu das für die Pathogenese des MM wichtig ist zu imitieren, wurden die isolierten Zellen entweder mit adhärennten KMSZ ko-kultiviert oder dem Medium 2 ng/ml IL-6 zugesetzt. Durch vorsichtiges Abspülen bei der Entnahme der Zellen ließen sich die MM-Zellen für weitere Analysen wieder von den KMSZ separieren.

3.2.5 Gewinnung primärer B-Zellen

PBMCs wurden über die Ficoll-Dichte-zentrifugation aus so genannten „*buffy coats*“ von gesunden Spendern isoliert. *Buffy Coats* entstehen als Nebenprodukt bei einer Vollblutspende und bestehen hauptsächlich aus weißen Blutkörperchen und Blutplättchen. Die Isolation der B-Zellen erfolgte mittels dem Dynabeads® Untouched™ Human B-cells Systems (Invitrogen, Darmstadt, Germany). Ein Antikörpermix, welcher IgG-Antikörper gegen eine Vielzahl von verschiedenen Oberflächenmarker enthält, wird zunächst mit den PBMCs gemischt. Anschließend erfolgt eine Inkubation mit Dynabeads®. Die Zellen die über die Antikörper an die beads gekoppelt wurden, werden dann über einen Magneten selektioniert und

depletiert. Die gereinigte B-Zell Fraktion wird in Vollmedium aufgenommen und für 16 h in Kultur genommen und anschließend weiter verwendet.

3.2.6 Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit Hilfe des Vitalfarbstoffes Trypanblau durchgeführt. Dieses Prinzip beruht darauf, dass lediglich die geschädigten Zellen durch die permeabilisierte Zellmembran Trypanblau aufnehmen können. Demnach erscheinen tote Zellen unter dem Lichtmikroskop blau gefärbt, während sich vitale Zellen ungefärbt darstellen.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde aus einer Zellsuspension ein Volumen von 20 μ l entnommen, im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau versetzt (Verdünnungsfaktor = 2) und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Zur Bestimmung der Zellzahl pro ml wurde der Mittelwert der gezählten Zellen aus den vier Großquadranten mit dem Kammerfaktor 10^4 und dem Verdünnungsfaktor 2 multipliziert.

3.2.7 Applikation von pharmakologischen Inhibitoren

Für Viabilitätskurven wurden pharmakologische Inhibitoren doppelt konzentriert angesetzt und im Volumenverhältnis 1 : 1 zu den in Medium ausgesäten Zellen gegeben. Als stets mitgeführte Kontrolle wurden Zellen mit äquivalenten Mengen von Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) behandelt. Alle Experimente wurden im Triplikat durchgeführt. Nach der Aufreinigung von Knochenmarkspiraten von Myelom-Patienten steht nur eine geringe Zellzahl primärer Zellen zur Verfügung. Auf Grund dessen wurden Titrationskurven durchgeführt und anhand dieser zwei Konzentrationen ausgewählt, die dann in weiteren Versuchen eingesetzt wurden. Abbildung 7 zeigt zwei sehr unterschiedliche Titrationskurven: in (A) wird ein EC_{90} -Wert bereits bei 16 nM erreicht, wohingegen in (B) erst eine sehr hohe Konzentration zur Apoptose-Induktion führt. Um spezifische Triptolid-Effekte zu erreichen wurde die Triptolidkonzentration dennoch gering gehalten. Für weitere Versuche wurde daher 10 und 20 nM Triptolid appliziert.

Für Western Blot Analyse nach pharmakologischer Inhibition wurden Zellen in 6-well Platten ausgesät und über Nacht mit den entsprechenden Inhibitoren behandelt.

Folgende pharmakologische Inhibitoren wurden verwendet: Triptolid (Tocris Bioscience, Bristol, United Kingdom), NVP-AUY922 (Selleck Chemicals LLC, Houston, USA) und Bortezomib (LC Laboratories, Woburn, USA).

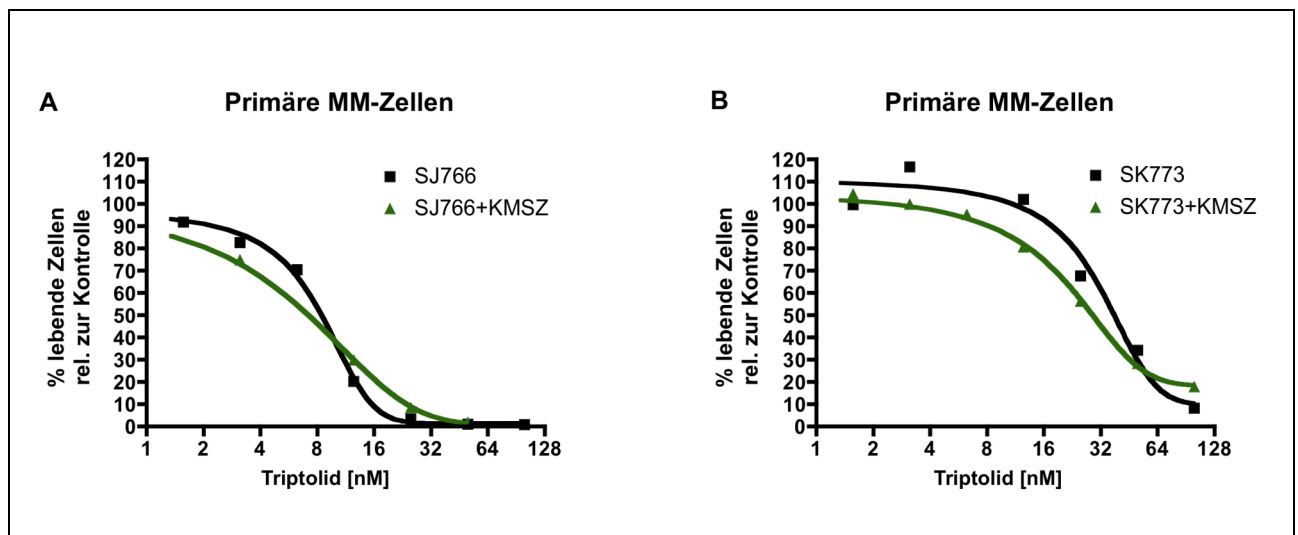


Abbildung 7: Titrationskurve nach Triptolidbehandlung: Isoliert wurden primäre Zellen von Myelom-Patienten. Dargestellt sind zwei verschiedene Titrationskurven unterschiedlicher primärer Zellen mit (grüne Kurve) und ohne Ko-Kultivierung von KMSZ (schwarze Kurve).

3.2.8 Erzeugung einer Hitzeschock-Stressantwort in MM-Zellen

Um eine Hitzeschock-vermittelte Stressreaktion hervorzurufen, werden sowohl MM-Zellen als auch primäre B-Zellen für 6 min bei 42°C auf einem Heizblock inkubiert. Anschließend werden die Zellen für 3 h unter Standardkulturbedingungen (37°C) gehalten. Die entsprechenden Kontrollen werden durchgehend bei 37 °C gehalten. Die Zellen werden daraufhin geerntet und mittels Western Blot analysiert.

3.2.9 Durchflusszytometrie

Prinzip

Die Durchflusszytometrie ermöglicht es, auf Grund von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften, Einzelzellen zu analysieren. Bei der Messung werden die Zellen in eine Trägerflüssigkeit aufgenommen und es entsteht durch das Prinzip

der hydrodynamischen Fokussierung ein Strom einzelner Zellen. Diese vereinzelt Zellen passieren einen Laserstrahl und erzeugen je nach Zelleigenschaft bestimmte Lichtstreuung. Das in geringem Winkel (3-10°) abgelenkte Licht wird als Vorwärtsstreulicht (*forward light scatter*, FSC) bezeichnet und ist ein Maß für die Zellgröße, da große Zellen eine stärkere Lichtstreuung aufweisen als kleine. Das rechtwinklig abgelenkte Licht wird als Seitwärtsstreulicht (*sideward light scatter*, SSC) bezeichnet und dient als Maß für die Granularität von Zellen. Weitere Eigenschaften der Zellen können mittels fluoreszierender Farbstoffe (Fluorochrome) erfasst werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden dann mit spezifischer Wellenlänge angeregt und das emittierte Fluoreszenzspektrum gemessen. Alle Messungen wurden an einem FACSCalibur (CellQuest Software; Becton Dickinson (BD), Heidelberg) durchgeführt.

Anwendung der Durchflusszytometrie in dieser Arbeit

Eingesetzt wurde die Durchflusszytometrie zur Differenzierung zwischen lebenden, nekrotischen und apoptotischen Zellen sowie zu der Ermittlung der Transfektionseffizienz. Weiterhin wurde die Proliferation bzw. Zellzyklusanalysen mittels einer 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) Färbung durchgeführt.

3.2.10 Apoptosemessung mittels Annexin V/Propidiumiodid Färbung

Propidiumiodid (PI) ist ein nicht-membrangängiger Rotfarbstoff, der an die große Furche der DNA bindet und somit entweder als relatives Maß für den DNA-Gehalt oder als Indikator für die prinzipielle Zugänglichkeit von DNA bei permeabilisierten Zellmembranen verwendet werden kann. Annexin V ist ein Ca^{2+} -abhängiges Protein, das mit hoher Affinität an negativ geladene Phospholipide der Zellmembran bindet. Bereits im frühen Stadium der Apoptose kommt es zu charakteristischen Veränderungen der Zellmembran: das Phospholipid Phosphatidylserin transloziert an die Außenseite der intakten Zellmembran. Durch die Doppelfärbung von Annexin V und PI lassen sich die Zellen in eine lebende, apoptotische und nekrotische Fraktion einteilen (siehe Abbildung 8). Die Zellen wurden nach der Ernte mit PBS gewaschen, in 100 μl Puffer (10 mM HEPES [2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure]/NaOH pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl_2) mit 1 μl Annexin

V-FITC sowie 1 $\mu\text{g/ml}$ PI für 10 min lichtgeschützt inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Für GFP-positive Zellen wurde statt Annexin V-FITC (konjugiert mit dem Fluorochrom FITC), das ein ähnliches Fluoreszenzspektrum wie GFP besitzt, Annexin V-APC (Bender MedSystems, Wien, Österreich) oder Annexin V-ATTO647 (Axxora, Lörrach) verwendet.

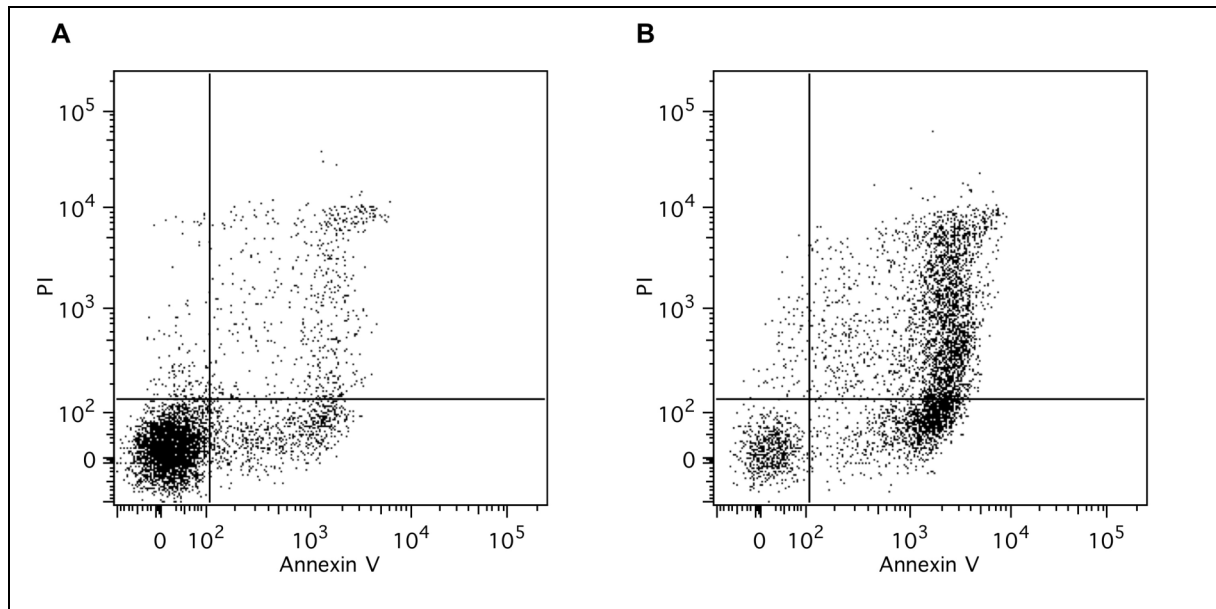


Abbildung 8: FACS-Analyse nach einer AnnexinV/PI-Färbung: In Abb. A ist nahezu die gesamte Zellpopulation viabel (AnnexinV/PI-negativ). Kommt es zur Induktion von Apoptose werden die Zellen mit AnnexinV und PI gefärbt und es kommt zu einer Verschiebung der Zellpopulation im FACS-Bild (B).

3.2.11 Ermittlung der Transfektionseffizienz

Die Effizienz der transienten Transfektion wurde durch die Ko-Transfektion des GFP-Expressionsplasmides ermittelt. Hierfür wurde nach der Transfektion der MM-Zellen der prozentuale Anteil GFP-positiver Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. GFP ist ein Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*, das bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert. Um lebende von toten Zellen zu unterscheiden, wurden die Zellen zusätzlich mit Propidiumiodid gefärbt.

3.2.12 Zellzyklus- und Proliferationsanalyse mittels BrdU-Färbung

Als chemisches Analogon des Nukleosids Thymidin kann BrdU während der DNA-Replikationsphase (S-Phase) anstelle des Thymidins in die neusynthetisierte DNA

eingebaut werden. Über eine Antikörper Reaktion gegen BrdU kann dann anschließend die stattgefundenene Synthese detektiert werden (entspricht der Proliferation der Zellen). Durch eine Ko-Färbung mittels des interkalierenden Farbstoffes PI können anhand des DNA-Gehalts die Zellen einer Zellzyklusphase zugeordnet werden ($2n$ in G0/G1-Phase, $4n$ in G2/M-Phase, dazwischen S-Phase, siehe Abbildung 9). Hierfür wurden zwei Stunden vor der Zellernte $20 \mu\text{mol/l}$ BrdU zu den Zellen gegeben, diese dann geerntet und zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 70 % Ethanol bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen erneut zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in 1 ml 2N HCl mit 0,5 % TritonX-100 für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert und das Pellet durch Inkubation mit 1 ml 0,1 mol/l Natrium-Tetraborat pH 8,5 neutralisiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS und Resuspension der Zellen in $100 \mu\text{l}$ 0,5 % Tween 20 mit 1 % bovinem Serumalbumin (BSA) wurden $20 \mu\text{l}$ monoklonaler Alexa647-konjugierter anti-BrdU Antikörper dazugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Zentrifugation und Waschen in Tween-BSA-PBS wurden die Zellen in $500 \mu\text{l}$ PBS aufgenommen und $50 \mu\text{g/ml}$ PI zugegeben. Schließlich wurde die Suspension durch ein Zellsieb hindurch in ein FACS-Röhrchen überführt und durchflusszytometrisch (FACSCalibur, CellQuest Software) analysiert.

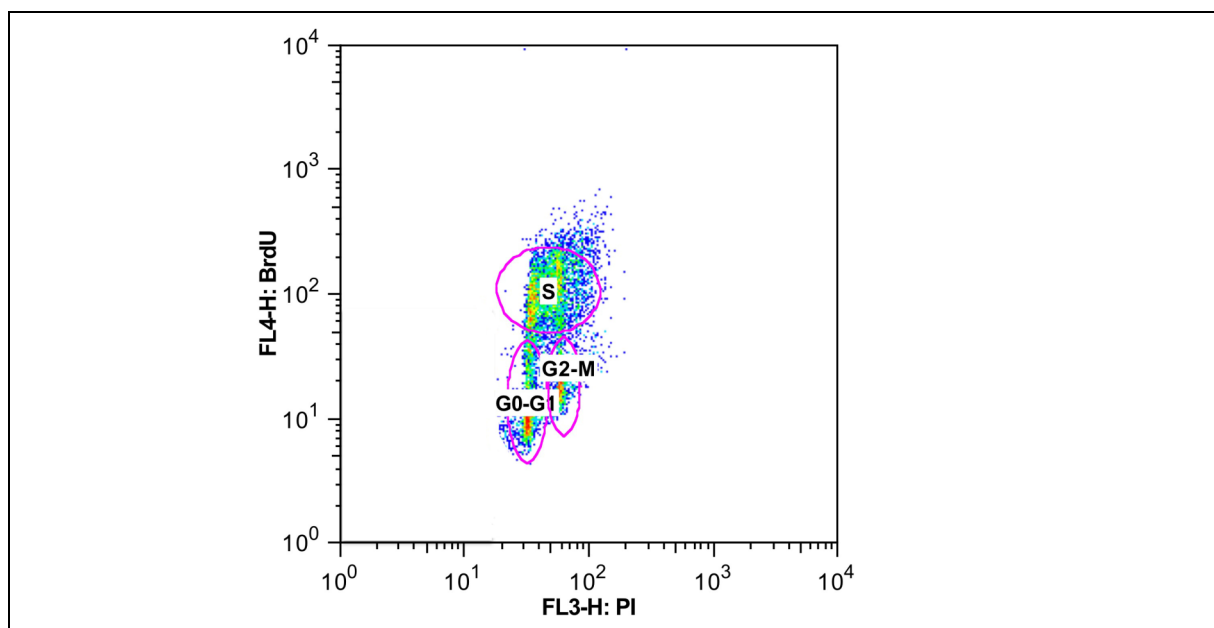


Abbildung 9: FACS-Darstellung einer BrdU-Färbung. Auf der x-Achse wird der DNA-Gehalt der Zellpopulation aufgetragen (ermöglicht durch PI-Färbung). Auf der y-Achse ist die Färbeintensität aufgetragen. Durch die Färbungen ist eine Einteilung in Zellzyklusphasen möglich.

3.2.13 Elektroporation

INA-6 und MM.1S lassen sich mittels Elektroporation transient transfizieren. Hierfür wurden die Zellen in RPMI-1640 Medium ohne weitere Zusätze gewaschen und in einer Dichte von $1,5 \times 10^7$ Zellen pro 500 μ l aufgenommen. Zugegeben wurden die entsprechenden shRNA-Expressionsvektoren, ein Expressionsplasmid für Enhanced Green Fluorescent Protein (pEGFP-N3, zur Ermittlung der Transfektionseffizienz) und ein Expressionsplasmid für trunkiertes CD4 (pCD4 Δ), um später spezifisch die stark transfizierten Zellen aufzureinigen zu können. Die Elektroporation wurde mit einem Gene Pulser 2 in 4 mm Küvetten bei 950 μ F und 280 V (310 V für MM.1S) durchgeführt. Nach dem Strompuls (kontinuierliche Entladung) wurden die Zellen zügig in 3 ml frisches RPMI-1640 Medium überführt und 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie in einer Dichte von maximal 10^5 Zellen/ml in RPMI-Vollmedium aufgenommen und in Zellkulturschalen rekultiviert. Als Kontrolle wurden Zellen mit der entsprechenden Konzentration eines leeren pSUPER-Vektors transfiziert.

3.2.14 Aufreinigung von transfizierten Myelomzellen

Myelomzellen lassen sich nur zu 15 - 40 % (je nach Zelllinie) transfizieren. Um eindeutig interpretierbare Ergebnisse zu erhalten, d.h. die untransfizierten und nekrotisch oder apoptotischen Zellen zu entfernen, müssen die lebenden und transfizierten Zellen separiert werden. Aufgrund von unterschiedlichen Eigenschaften der verwendeten Zelllinien kamen zur Aufreinigung der transfizierten Zellen zwei Methoden zur Anwendung: 1. Zellen wurden mit trunkierten CD4 ko-transfiziert und analog der Aufreinigung der primären Myelomzellen über die magnetische Zellsortierung (MACS) isoliert. Dafür wurden die transfizierten Zellen mit PBS und kaltem Separationspuffer gewaschen und anschließend mit anti-CD4 Beads in Separationspuffer für 20 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Zell-Bead-Suspension über MACS-Säulen („Large Cell“, Miltenyi) gegeben. Nach gründlichem Spülen wurden die gebundenen Zellen mit Vollmedium eluiert und über eine Dichtegradientenzentrifugation in Opti-Prep Medium (Axis-Shield, Oslo, Norwegen) von der toten Zellpopulation abgetrennt. Hierfür wurden die Zellen in 2 ml

Vollmedium aufgenommen und mit 600 μ l Optiprep-Lösung vermischt. Diese Suspension wurde mit 200 μ l PBS überschichtet und anschließend bei 2500 x g für 7 min zentrifugiert. Die viable Zellfraktion sammelt sich ringförmig zwischen den beiden Phasen an und wird dann vorsichtig abgenommen. Die Zellen wurden in Vollmedium gewaschen um die Optiprep-Lösung vollständig zu entfernen und sodann in Kultur genommen. 2. Zellen, die CD4 nicht ausreichend an der Zelloberfläche exprimieren können, wurden über die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (FACS) selektioniert. Die Zellen wurden mit dem EGFP-Plasmid ko-transfiziert und über einen Zellsortierer (MoFlo; Beckman-Coulter, Fullerton, CA, USA) separiert. Bevor die Zellen sortiert wurden, wurden sie gewaschen und mittels der Optiprep-Dichtegradientenzentrifugation von dem Zelldetritus getrennt. Die Zellen wurden auf Eis gehalten und direkt vor der Sortierung zur Vereinzellung durch ein Zellseparationssieb (BD) in ein FACS-Röhrchen gegeben. Bei der Zellsortierung werden die Zellen in einer Trägerflüssigkeit innerhalb einer Düse beschleunigt und einzeln an einem Laserstrahl (so wird die EGFP-Fluoreszenz angeregt) vorbeigeführt. Am Abrisspunkt geht der Flüssigkeitsstrahl in Tröpfchen über, die idealerweise jeweils eine Zelle enthalten und entsprechend ihrer Grün-Fluoreszenz durch ein elektrisches Feld in Richtung Auffangröhrchen abgelenkt werden. Es ist möglich durch Eingrenzung verschiedener Bereiche (Gates) bestimmte Zellen auszuwählen. So kann gewährleistet werden, dass analog zur MACS-Säulen-Aufreinigung nur die stark transfizierten Zellen isoliert wurden.

Die sortierten Zellen wurden in Vollmedium aufgenommen und weiter kultiviert. Exemplarisch sind in Abbildung 10 (A) INA-6 Zellen 24 h nach der Transfektion dargestellt (Transfektionsrate 27 %), nach der Aufreinigung mittels MACS-Sortierung (B) wurde eine Reinheit von 90,2 % erreicht. Dies sind repräsentative Daten, die sowohl mit der MACS-Selektion als auch über GFP-Sortierung erreicht wurden.

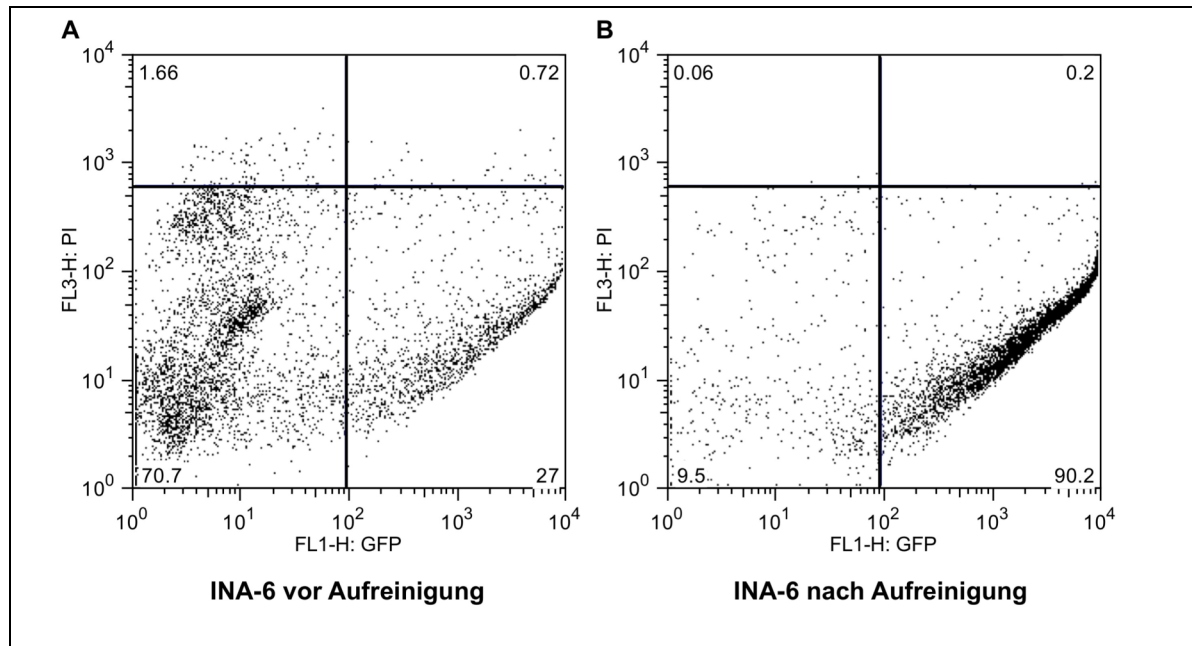


Abbildung 10: FACS-Analyse transfizierter Zellen vor und nach der Aufreinigung: In (A) sind INA-6 Zellen vor der Aufreinigung dargestellt. Die GFP-positiven Zellen (und somit transfizierte Zellen) sind im unteren rechten Quadranten dargestellt (Transfektionsrate 27 %). Nach der Aufreinigung (B) sind über 90 % GFP-positiv und PI-negativ Zellen vorhanden.

3.2.15 Herstellung der shRNA-Expressionsvektoren

Um die jeweiligen Gene „auszuschalten“ werden verschiedene shRNA-Expressionsvektoren mit unterschiedlichen Zielsequenzen generiert. Diese Zielsequenzen wurden anhand der Kriterien nach Tuschl und Kollegen (161) entworfen und als Oligonukleotide in pSUPER kloniert (158). Um eine Insertion in pSUPER vorzunehmen, muss dieser Vektor erst geschnitten werden. Der Restriktionsverdau (Restriktion mit BglII/HindIII) erfolgte für 2 h bei 37 °C. Um eine Re-Ligation des Vektors zu verhindern, wurden zur Dephosphorylation der freien Enden, 1 µl SAP (*shrimp alkaline phosphatase*) für 1 h zugegeben. Anschließend wurden dem verdauten und dephosphorylierten Vektor 30 µl dH₂O und 50 µl Roti-Phenol/Chloroform hinzugefügt. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 14.000 x g wurde die wässrige Phase abgenommen, in 50 µl Roti-Phenol/Chloroform resuspendiert und erneut bei 14.000 x g zentrifugiert. Zur DNA-Fällung wurde der Überstand in 125 µl 96 %-igem Ethanol und 5 µl Natriumacetat (3 M) resuspendiert. Das Gemisch wurde für mindestens 30 min bei -20 °C inkubiert und anschließend 20 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde getrocknet und in 100 µl

dH₂O resuspendiert. Die Restriktion des Vektors wurde mittels eines analytischen Agarosegels überprüft.

3.2.16 Klonierung von shRNA-Expressionsvektoren

Die Oligonukleotide, die für die Insertion in pSUPER verwendet wurden, wurden von Biotex (Berlin-Buch) bezogen. Sie wurden nach Erhalt in dH₂O gelöst (Endkonzentration: 150 nM) und in Oligonukleotid-Annealing-Puffer (OAB; 100 mM Kaliumacetat, 2mM Magnesiumacetat, 30 mM HEPES-KOH pH 7,4 in DEPC [Diethylpyrocarbonat]-H₂O) für 4 min bei 95 °C erhitzt. Die Temperatur wurde anschließend auf 70 °C (für 10 min) herabgesetzt und dann weiterhin über Nacht in einem sich abkühlenden Wasserbad auf 4 °C herabgekühlt. Die nun doppelsträngig vorliegenden Oligonukleotide wurden mit Hilfe von T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert und mit T4-DNA Ligase in den geschnittenen pSUPER Vektor eingebracht. Die Transformation erfolgte in den *E. coli* XL-1 Blue Zellen, dafür wurden diese auf Eis aufgetaut und mit 2 µl des Ligationsansatzes (oder entsprechender Kontrolle) versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen für eine effiziente Transformation einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 sek ausgesetzt, um das Plasmid aufzunehmen. Den Zellen wurde 1 ml LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefe-extrakt, 10 g/l NaCl) zugegeben und anschließend für 1 h in einem Schüttler bei 37 °C und 250 rpm kultiviert. Danach wurden die Zellen pelletiert, in einem Volumen von 50 µl LB-Medium resuspendiert und auf eine vorgewärmte LB-Agarplatte (+100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert. Über Nacht wurde diese bei 37 °C inkubiert. Da das eingesetzte Plasmid eines Ampicillin-Resistenzgens besitzt, konnten nur erfolgreich transformierte Kolonien auf der Agarplatte wachsen. Analog der Klonierungen wurden Kontrollen ohne Insert mitgeführt, auf den Agarplatten (+Ampicillin) sollten dann entsprechend keine Kolonien wachsen. Um die erfolgreiche Insertion in das Plasmid zu verifizieren, wurden einzelne Kolonien gepickt und in 3 ml LB-Ampicillin-Medium über Nacht in einem Inkubator kultiviert. Die Plasmide wurden mit dem Zyppy Plasmid Mini Prep Kit extrahiert und mittels geeignetem Kontrollverdau (EcoRI/HindIII) identifiziert. Diese ausgesuchten Klone wurden sequenziert und danach wurde mit dem Qiagen Plasmid Maxi oder Giga Kit eine größere, für die Folgeexperimente ausreichende, Plasmidmenge hergestellt.

3.2.17 Western Blot Analyse

Probenvorbereitung

Zur Herstellung von Gesamtproteinzelllysaten wurden die Zellen zunächst geerntet und durch Zentrifugation pelletiert. Um das Medium vollständig zu entfernen, wird das Zellpellet mit PBS gewaschen und direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das Pellet wird anschließend mit kaltem Lysepuffer versetzt und für 15 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (bei 4 °C und 10.000 x g für 15 min) werden Zelltrümmer und unlösliche Zellbestandteile von dem Proteinlysat getrennt. Um die erhaltene Proteinkonzentration zu bestimmen wurden jeweils 5 µl mit dem DC Protein Assay Kit nach der Lowry Methode gemäß Herstellerangaben aufbereitet und als Doppelwerte mit einem Microplate Reader gemessen. Als Standardreferenzkurve wurde eine BSA-Konzentrationsreihe verwendet. Die Proben wurden auf die gleichen Proteinkonzentrationen eingestellt. Um Die Proteine zu denaturieren, wurden die Proben mit Laemmli-Puffer versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht.

3.2.18 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinauftrennung durch die diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte nach der Methode von Laemmli (162). Um eine Auftrennung des Proteingemisches gemäß des Molekulargewichts der verschiedenen Proteine zu erreichen, muss die Eigenladung der Proteinmoleküle überdeckt werden. Dies geschieht durch die Zugabe des anionischen Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat), welches sich an die hydrophoben Regionen der Proteine anlagert, die Wasserstoffbrückenbindungen löst und somit die Zerstörung der Sekundär- und Tertiärstruktur bewirkt. Weiterhin wird durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol Disulfidbrückenbindungen zerstört und die Sekundärstruktur ebenso aufgelöst.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 10 %-igen Trenngel (Zusammensetzung siehe Tabelle). Die Elektrophorese erfolgte für 15 min bei 80 V und anschließend bei 110 V bis die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hat.

Zusammensetzung des Sammel- und Trenngels

	Sammelgel	Trenngel (10 %)
Rotiphorese (Acrylamid/Bisacrylamid)	0,83 ml	3,3 ml
1 M Tris pH 8.8	-	3,8 ml
1 M Tris pH 6.8	0,58 ml	-
ddH ₂ O	3,5 ml	2,9 ml
10 % SDS	50 µl	100 µl
10 % APS	50 µl	100 µl
TEMED	2,5 µl	5 µl

3.2.19 Proteintransfer auf Nitrocellulose Membran nach dem Prinzip des „Semi-Dry-Blottings“ (Western Blot)

Den Transfer elektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf eine proteinbindende Trägermembran und die nachfolgende Detektion mit Antikörpern, welche die Epitope der Proteine erkennen, bezeichnet man als Western Blot. Der Transfer erfolgte in einer Semi-Dry Blottingkammer bei 15 V für 50 min. Hierfür wurden Trenngel, Membran und zweimal drei Lagen Filterpapier in Transferpuffer äquilibriert und im Sandwichverfahren angeordnet. Nach dem Transfer wurde die Membran reversibel mit Ponceau S Rot gefärbt, um die Qualität und die gleichmäßige Beladung zu kontrollieren. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurde die Membran in TBS-T-Puffer mit 5 % Milchpulver für 1 h bei RT inkubiert.

3.2.20 Immunchemische Proteinfärbung

Das Prinzip der Proteinfärbung beruht auf der Anheftung eines Primärantikörpers an sein Antigen und der Bindung eines Sekundärantikörpers an diesen Komplex. Zum Nachweis dieser Reaktion ist an den sekundären Antikörper Meerrettich-Peroxidase

(*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt, was durch eine Lichtreaktion einen Nachweis auf einen Röntgenfilm ermöglicht (siehe Abbildung 11). Die Membran wurde bei 4 °C über Nacht auf einem Schüttler mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert. Nach 3 x 5 min waschen mit TBS-T wird die Membran mit dem HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurde die Membran noch mal mit TBS-T gewaschen um den Sekundärantikörper vollständig zu entfernen. Zum Nachweis der gebundenen Antikörper wurde 2 ml *Enhanced Chemi-Lumineszens-Lösung* (ECL, 100 mM Tris pH 8,8, 2,5 mM Luminol, 0,2 mM p-Cumarsäure, 3 mM Wasserstoffperoxid) auf die Membran gegeben. Nach 2 min wurde die Flüssigkeit entfernt und die photosensitiven Filme in einer Dunkelkammer aufgelegt und entwickelt.

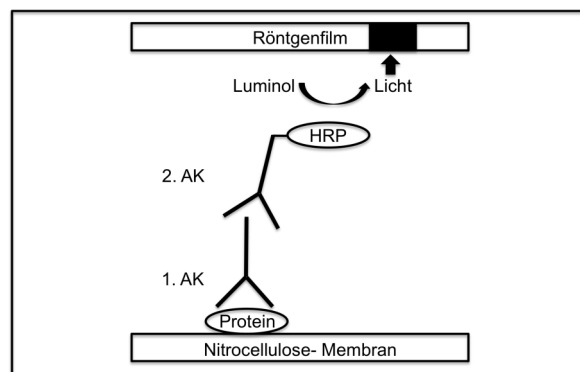


Abbildung 11: Prinzip der Immunfärbung: Zuerst erfolgt die Bindung des ersten Antikörpers, welcher gegen ein Epitop des Proteins gerichtet ist. An ihn bindet der HRP-gekoppelte Zweitantikörper. Durch die Chemolumineszenz-Reaktion wird Licht auf einen Röntgenfilm emittiert und das Protein so sichtbar gemacht.

In manchen Fällen war es notwendig, eine Membran mehrfach zu färben. Um die Antikörper von der Membran zu lösen, wurde diese über Nacht in Stripping Puffer (200 mM Glyzin, 20 % SDS, 1 % Tween-20, pH 2,2) bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit TBS-T gewaschen und erneut für 1 h in 5 % Milchpulver/TBS-T bei RT inkubiert. Die Membran konnte daraufhin erneut mit einem Primärantikörper gefärbt werden. Diese Prozedur wurde nur für Färbungen mit Antikörpern aus verschiedenen Spezies durchgeführt.

3.2.21 Immunhistochemische Analyse der HSF1-Expression in humanen Plasmazellen *in situ*

Um die Expression von HSF1 in nicht-malignen B-Zellen zu untersuchen, wurden Biopsien von humanen Tonsillen mit Keimzentrumsreaktion (n = 5) oder Biopsien von nicht-Myelompatienten (n = 3) verwendet. Um die Expression in transformierten Zellen zu analysieren wurden Knochenmarksbiopsien von MGUS- Patienten (n = 3) und MM Patienten (n = 54, 48 aus KM und 6 aus extramedullären Lokalisationen) überprüft. Die Diagnosen wurden anhand der WHO Richtlinien für Formalin-fixierte, in Paraffin eingebettete Gewebeproben erstellt (163). Diese beinhalten eine konventionelle Giemsa Färbung um verschiedenen Zelltypen zu unterscheiden, sowie immunhistochemische Färbung welche die Plasmazellmarker (CD138) und die Immunglobulin Leichtkettenrestriktion anzeigen. Diese Arbeiten wurden von Dr. Mindaugas Andrulis, Pathologie Heidelberg, durchgeführt. Bei den untersuchten Patientenproben waren 16 Biopsien von neu diagnostizierten MM-Patienten und 38 MM-Patienten waren schon chemotherapeutisch vorbehandelt. Durch eine Hitzebehandlung werden die Antigene in den Paraffin eingebetteten Gewebeproben demaskiert (138) und anschließend können die Proben mittels immunhistochemischer oder immunfluoreszierender Färbung analysiert werden. Der Primärantikörper gegen HSF1 (Stressgen) in Kombination mit einem biotynilierten Zweitantikörper (Dianova, Hamburg, Deutschland) und einem streptavidin/3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) basierendem Detektionskit (Dako, Hamburg, Deutschland) wurden verwendet um die HSF1-Expression zu analysieren. Die Zellkerne wurden mit Hämatoxilin (Merck, Darmstadt, Deutschland) angefärbt. Für die Doppelfluoreszenzfärbung wurden die anti-CD138/anti-HSF1 Antikörper spezifisch mit FITC oder Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA) markiert. Die Bilder wurden entweder mit einem BX Lichtmikroskop ausgestattet mit einer DP50-CCD Kamera (beides von Olympus, Hamburg, Deutschland) oder mit einem TCS SP2 Konfokal System, ausgestattet mit einem DMRE Mikroskop und einem HCX PLAPO 40x/1.25 NA Ölimmersionsobjektiv. Verarbeitet wurden die Bilder mit der Leica Confocal Software Version 2.61 (alles von Leica Microsystems, Mannheim, Deutschland). Alle Gewebeproben wurden von Dr. Andrulis begutachtet und anhand eines Scoring Systems weiter klassifiziert. Die Einteilung war wie folgt:

HSF1 hoch-exprimierend entspricht ≥ 50 % HSF1-positive Zellen (19/28 Fälle), mittel exprimierend (10 - 50 %, 3/28) und schwach exprimierend (< 10 %, 6/28).

3.2.22 Gene expression profiling (GEP) – Affymetrix Microarray Analysen

Eine Genomweite Analyse nach shRNA-vermitteltem Knockdown von HSF1 sollte mögliche Zielgene von HSF1 aufzeigen. Hierfür wurden INA-6 und MM.1S Zellen wie bereits beschrieben transient transfiziert und an Tag drei geerntet. Aus diesen Zellen wurde die RNA mittels des RNAeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Diese Versuche wurden mehrfach wiederholt um die zwei Versuche mit der besten RNA Qualität auszuwählen. Die Auswahl erfolgte über die RIN-Werte (*RNA integrity numbers*). Diese Auswahl und die folgenden Arbeitsschritte wurden bis zur Rohdatenanalyse der Microarrays in Kollaboration mit der Microarray Core Facility des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung Würzburg (IZKF) von Frau Dr. Susanne Kneitz und Mitarbeitern durchgeführt.

Durch degradierte RNA oder durch Verunreinigungen mit DNA oder Proteinen, kann die Qualität der RNA stark beeinträchtigt werden. Um dies auszuschließen wurde mit einem Bioanalyzer 2100 (Agilent) die Qualität der Gesamt-RNA bestimmt. Hierfür wurde die RNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen und in einem elektrischen Feld in einzelne Fraktionen aufgetrennt. Das Ergebnis wird als Peaks dargestellt, aus denen sich anschließend die RIN-Werte berechnen (Maß der RNA-Degradation, Optimalwert 10.0) lassen. Ausgesucht wurden entsprechend dem Ergebnis die geeigneten RNA-Präparationen für die Microarray Analyse.

Mit Reverser Transkriptase wurde zunächst die Gesamt-RNA in doppelsträngige cDNA umgeschrieben und aufgereingt. Aus der erhaltenen cDNA wurde in einer *in vitro*-Transkription biotinylierte cRNA generiert und gleichzeitig amplifiziert. Die cRNA wurde aufgereinigt, fragmentiert und in einem Hybridisierungscocktail mit den Chip-Arrays hybridisiert. Verwendet wurden hierbei Affymetrix Human Genome U133A 2.0 Arrays. Die Fluoreszenzfärbung erfolgte mit Streptavidin Phycoerythrin SAPE. Anschließend wurden die Arrays gescannt und bioinformatisch mit R Version 2.7.1 und Bioconductor-Softwarepaketen (r-project.org) analysiert. Die Vollständigkeit der cDNA- und cRNA-Synthese wurde über die relative Signalstärke der Housekeeping-Gene GAPDH und HSA jeweils am 5'- und 3'-Ende kontrolliert. Die Hybridisierungs-

kontrolle erfolgte über Herstellereigene Chip-interne Kontroll-Sonden. Die einzelnen Chips wurden über alle Gen-Sets normalisiert und schließlich die Datensätze pSUPER-Leervektor versus pSU/HSF1-1 Transfektion (im Duplikat) auf Expressionsunterschiede verglichen. Die relative Stärke der Expressionsänderung (bezogen auf die entsprechende Kontrolle) wird hierbei als Fold Change (FC) angegeben. Der Grenzwert für die Auswahl der Gene wurde auf einen FC von 1,5 bestimmt. Ab diesem Wert werden von vielen Autoren Expressionsunterschiede als relevant betrachtet (164, 165).

4. Ergebnisse

4.1 Konstitutive HSF1- und HSP-Proteinexpression ist in Myelomzelllinien häufig vorhanden

Mit Hilfe von Western Blot-Analysen wurde die Proteinexpression von HSF1 und verschiedenen HSP dargestellt. Die Synthese der HSP wird nach einem Stressauslöser stark angeregt. Die Literatur beschreibt hierbei, dass insbesondere HSP27 und HSP70 sehr schnell und stark hochreguliert werden (induzierbare HSP) (110). Um eine Aussage über die vorhandenen Proteinmengen in malignen und nicht-malignen Zellen treffen zu können, wurden die Proteinexpressionen von MM-Zellen und von B-Zellen gesunder Spender verglichen (Abbildung 12). Unter Standardzellkulturbedingungen ist in nicht-malignen B-Zellen HSF1 nur sehr schwach exprimiert, wohingegen drei von sechs untersuchten MM-Zelllinien eine sehr starke HSF1-Expression aufweisen (INA-6, MM.1S, JJN-3). Gegenüber diesen Zelllinien, zeigen die drei weiteren getesteten Zelllinien (OPM-2, AMO-1, U226) eine schwächere bis sehr schwache HSF1-Expression. Die Stärke der HSP-Expression korreliert nicht immer mit der HSF1-Expression. Die analysierten MM-Zelllinien zeigen eine konstitutiv starke Präsenz der HSP: HSP90 α und β , HSP73, HSP40 und HSP40-4. In den untersuchten B-Zellen hingegen ist nur eine deutliche Expression von HSP90 α und β sowie HSP40 und HSP40-4 zu sehen. Die induzierbaren HSP70 und HSP27 sind in den untersuchten MM-Zelllinien auch konstitutiv, wenngleich sehr heterogen, exprimiert. In den nicht-malignen B-Zellen sind diese HSP dagegen nur sehr schwach oder nicht vorhanden.

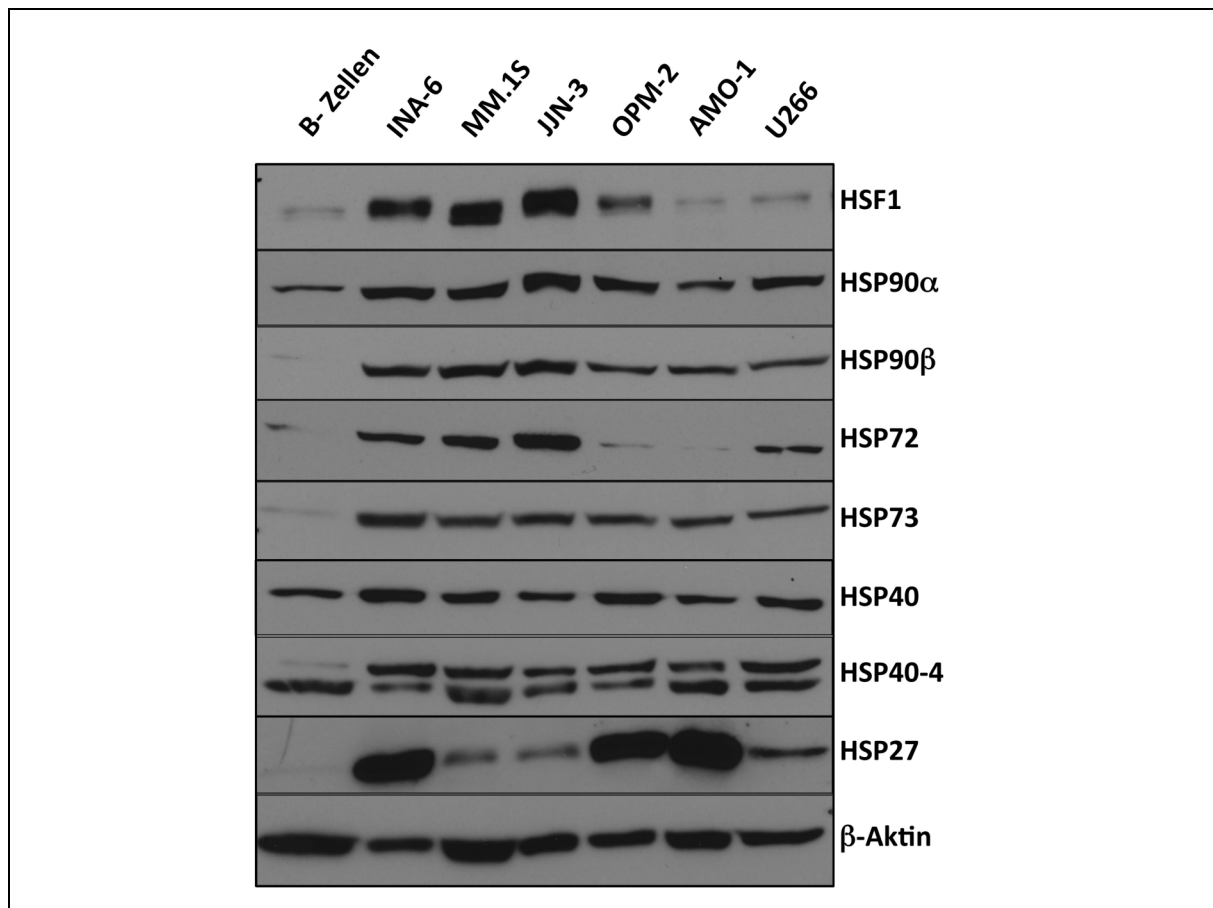


Abbildung 12: Expressionsanalyse von HSF1 und HSP in MM-Zelllinien. Mittels Western Blot-Analysen wird die Proteinexpression von HSF1 und HSP in MM-Zelllinien mit der in nicht-malignen B-Zellen verglichen. Die HSF1-Expression ist sehr heterogen. Es lassen sich zwei Gruppen mit einer starken und schwachen HSF1-Expression beschreiben. HSP90 α/β , HSP73 und HSP40/40-4 sind in allen Zelllinien konstitutiv stark exprimiert. Die weiteren HSP sind sehr heterogen exprimiert und korrelieren nicht immer mit der Expression von HSF1. Es wurde die gleiche Gesamtproteinmenge aufgetragen, als Vergleichskontrolle dient β -Aktin.

4.2 Konstitutive HSF1- und HSP-Proteinexpression ist in primären Myelomzellen *ex vivo* überwiegend vorhanden

Um zu eruieren, ob in primären MM-Zellen HSF1 und HSP exprimiert sind, wurden im Rahmen einer diagnostischen Knochenmarkspunktion primäre Myelomzellen mittels CD138 MACS-Isolation gewonnen und ebenfalls mittels Western Blot analysiert (Abbildung 13). Hier zeigte sich, dass in allen neun Patientenproben HSF1 in unterschiedlich starker Ausprägung vorhanden ist. Auch hier sind HSP90 α und β sowie HSP40 und HSP40-4 konstitutiv stark exprimiert, wohingegen HSP73 und HSP27 heterogen, partiell aber auch sehr stark, vorkommen. Konstitutives HSP72 konnte in nur zwei Fällen der neun getesteten Patientenproben detektiert werden.

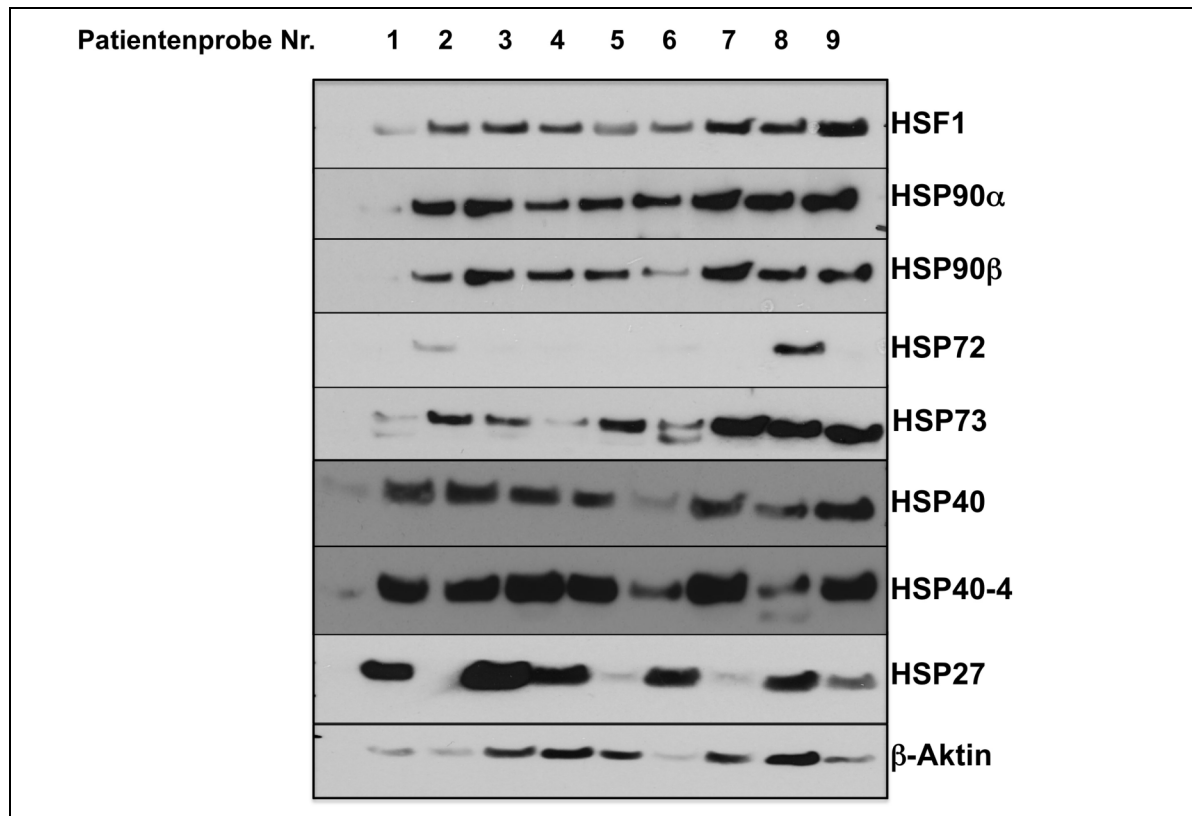


Abbildung 13: HSF1/HSP-Expressionsanalyse in primären MM-Zellen. HSF1 konnte in jeder getesteten Patientenprobe detektiert werden. Extrem starke Expressionen weisen die HSP90, HSP40 und in einigen Fällen HSP27 auf. Konstitutives HSP72 konnte in zwei Fällen nachgewiesen werden. Es wurde jeweils die gleiche Zellzahl aufgetragen, als Vergleichskontrolle dient β -Aktin, welches in den verschiedenen Proben unterschiedlich stark vorhanden ist.

4.3 In etwas mehr als der Hälfte der primären Myelomfälle ist HSF1 überexprimiert

Um die HSF1-Expression *in situ* in Plasmazellen (PCs) zu untersuchen, wurde die HSF1-Färbung von Knochenmarksbiopsien etabliert. Normale, prä-maligne und maligne Plasmazellen (MM-Zellen) wurden einerseits durch immunhistochemische Analyse mit ACE als chromogenes Substrat und mit einer HSF1 und CD138 Doppelimmunfluoreszenzfärbung untersucht (Abbildung 14). HSF1 war in normalen und prä-malignen PCs nicht oder nur schwach exprimiert wohingegen in 50 % der untersuchten MM-Biopsien (28/54 Fälle) eine positive HSF1-Färbung vorlag. Je nach Stärke der HSF1-Expression wurden die HSF1-positiven Fälle weiter als HSF1 hoch (≥ 50 %), mittel (10 - 50 %) und schwach (≤ 10 %) exprimierend unterteilt. 68 % (19/28) der Biopsien wiesen eine starke HSF1-Expression auf, 11 % (3/28) zeigten

ein mittelstarke HSF1-Expression und 21 % der untersuchten Proben waren schwach (6/28) HSF1-positiv. Interessanterweise waren alle fünf extramedullären MM und sieben von acht MM-Proben mit einer anaplastischen Morphologie HSF1-positiv. Da die HSF1 Untersuchungen an einer Biopsienserie durchgeführt wurde, welche bereits im Rahmen einer anderen Studie auf HSP90- und HSP70-Expression untersucht wurde, konnten diese Färbungen einander gegenübergestellt werden (zusammengefasst in Tabelle 9). Die HSF1-positive Subgruppe zeigte eine 100-prozentige Übereinstimmung mit HSP70 (panHSP70-Färbung umfasst HSP72 und HSP73) und eine starke Ko-Expression von HSP90 (89 %, HSP90 α/β zusammengefasst). In der HSF1-negativen Gruppe war die Anzahl der HSP-positiven Färbungen wesentlich geringer (HSP90: 69 %; HSP70: 34 %). Alle Färbungen wurden in Kooperation mit Dr. Mindaugas Andrulis (Pathologisches Institut Heidelberg) durchgeführt.

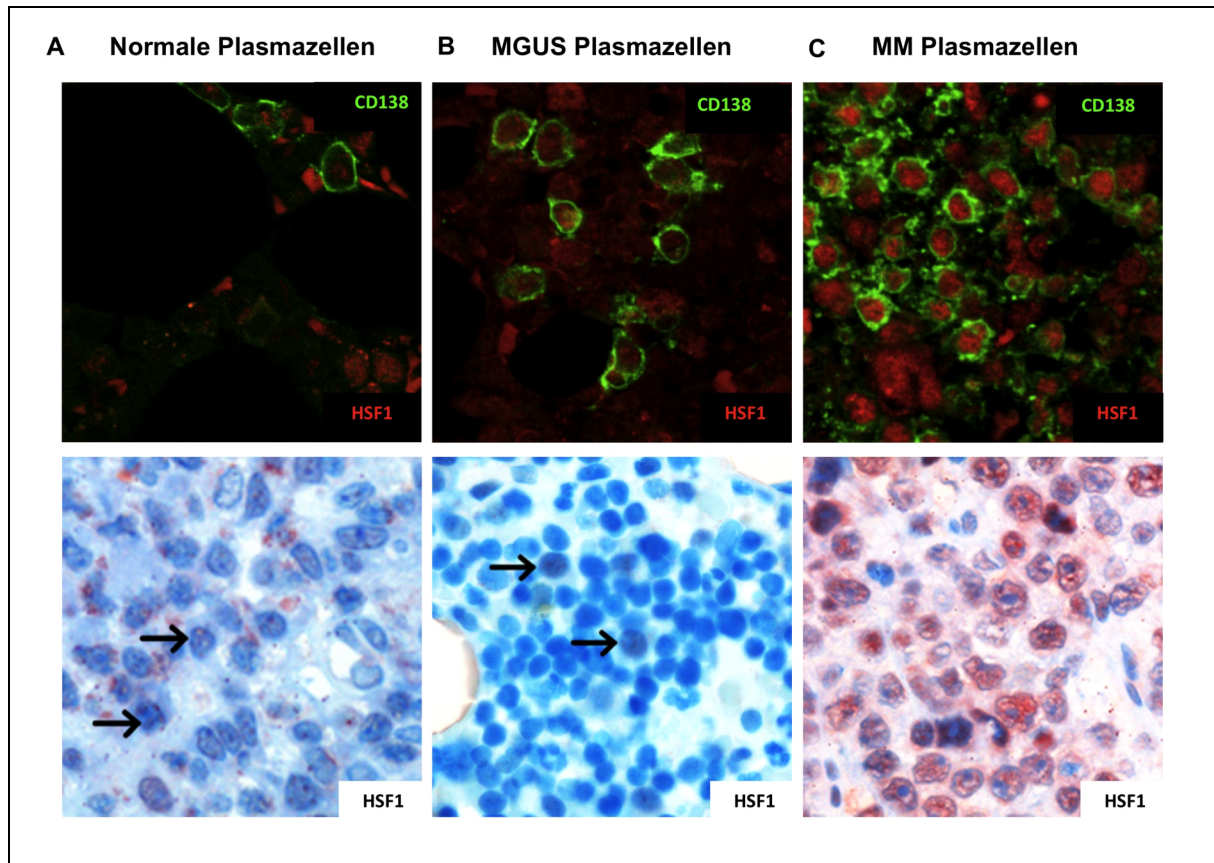


Abbildung 14: Beispiele für immunhistochemische und Immunfluoreszenzfärbung von HSF1 in Knochenmarksbiopsien *in situ*. Dargestellt sind normale nicht-maligne Plasmazellen (A), Plasmazellen eines MGUS Patienten (B) und (C) Biopsien zweier MM Patienten. Die Pfeile zeigen auf Plasmazellen die auf Grund ihrer Morphologie (in den MGUS Proben) und der Detektion von monoklonalen Immunglobulin-Leichtketten bestimmt wurden. HSF1 ist in beiden Färbungen rot dargestellt, der Plasmazellmarker CD138 ist in der Fluoreszenzfärbung grün dargestellt.

HSF1 Expression		HSP90 positiv	HSP70 positiv
n		n [%]	n [%]
positiv	28	25 (89 %)	28 (100 %)
negativ	26	18 (69 %)	9 (34 %)

Tabelle 9: Gegenüberstellung der HSF1- und HSP-Färbungen *in situ*. Ca. 50 % der untersuchten Biopsien waren HSF1-positiv. In dieser Gruppe gab es eine 100-prozentige Korrelation mit der HSP70- und eine hohe Übereinstimmung mit der HSP90-Expression. In der HSF1-negativen Gruppe wurden deutlich weniger Ko-Expressionen von HSP90 oder HSP70 mit HSF1 nachgewiesen.

4.4 Induktion der *heat shock stress response* (HSR) ist in primären B-Zellen und in INA-6- und MM.1S-Zellen möglich

Die *heat shock stress response* (HSR) ist für Zellen eine wichtige, evolutionär stark konservierte Stressantwort. Unter extremen Bedingungen können durch die erhöhte HSP-Synthese zellulär wichtige Prozesse unterstützt und somit geschützt werden. Durch den onkogenen Stress in transformierten Zellen weisen diese oftmals eine aberrante Funktion (chronische Daueraktivierung) des Systems auf. Wie gezeigt wurde, haben MM-Zellen eine erhöhte HSP-Expression und sind von dieser auch abhängig (138, 142). Um festzustellen ob das HSF1/HSP-Netzwerk in Myelomzellen noch intakt ist, wurden INA-6- und MM.1S-Zellen einem Hitzeschock ausgesetzt. Dafür wurden die Zellen für 6 min bei 42 °C in einem Heizblock inkubiert und anschließend für weitere 3 h bei 37 °C im Brutschrank gehalten. Um eine Aussage zu der myelomspezifischen Hitzestressantwort treffen zu können, wurde das gleiche Prozedere an B-Zellen von gesunden Spendern durchgeführt. Die nicht-malignen B-Zellen zeigen nahezu das gleiche Induktionsmuster wie die Myelomzellen, obwohl diese eine anormale, erhöhte HSP-Expression aufweisen (siehe Abbildung 15). In beiden Fällen konnte eine Hochregulation der HSP90 α , HSP72, HSP40 und HSP27 beobachtet werden.

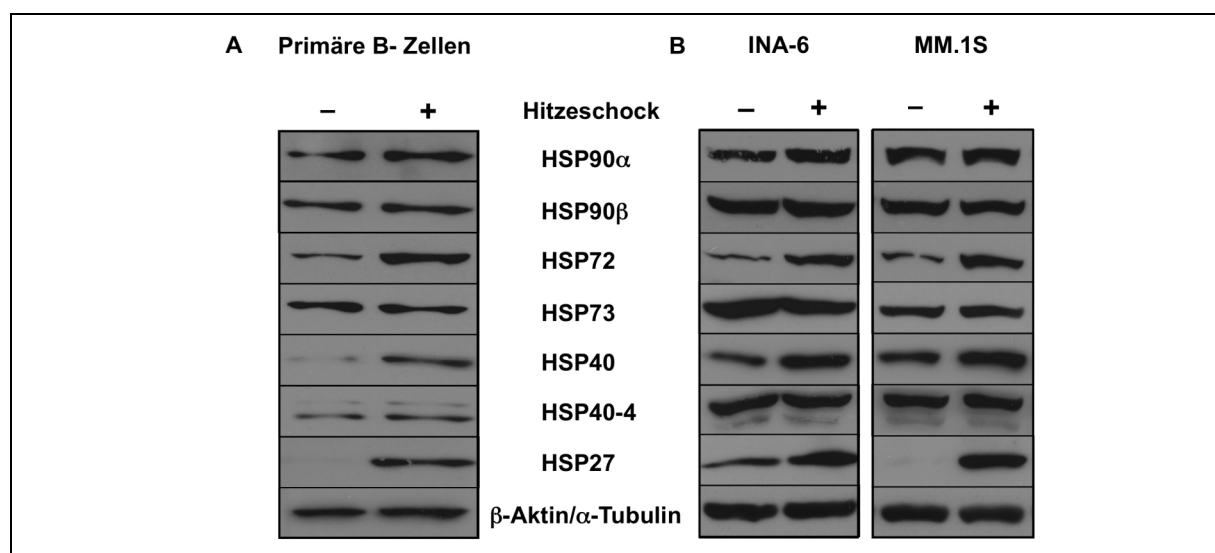


Abbildung 15: Auslösen der HSF1/HSP-Hitzeschockantwort. Dargestellt sind die HSP-Proteinspiegel in nicht-malignen B-Zellen (A), die von einem gesunden Spender isoliert wurden und zwei MM-Zelllinien (B). In beiden Zellsystemen kam es zu einer Hochregulation von HSP90 α , HSP72, HSP40 und HSP27. β -Aktin und α -Tubulin dienen als Ladungskontrolle.

4.5 Die pharmakologisch-ausgelöste Stressantwort erzielt das gleiche Induktionsmuster, wie die HSR

Durch eine Behandlung mit bestimmten antitumoralen Medikamenten, wie Proteasomen-, HDAC- oder HSP90-Inhibitoren, kommt es zu einer Induktion der HSR und damit der HSP. Es wird vermutet, dass dies ein kompensatorischer Rettungsmechanismus ist, der zum Zellüberleben beitragen soll. Da es bisher aber noch weitgehend unklar ist ob diese pharmakologisch-induzierte Stressantwort identisch mit der HSR nach thermalem Stress ist, wurde in diesem Versuch der Einfluss des Proteasom-Inhibitors Bortezomib und dem HSP90-Inhibitor NVP-AUY922 auf die HSP-Expression in INA-6- und MM.1S-Zellen untersucht (dargestellt in Abbildung 16). Nach der Behandlung der Zellen mit beiden Inhibitoren konnte auch hier eine Zunahme der HSP72, HSP40 und HSP27 in beiden Zelllinien beobachtet werden.

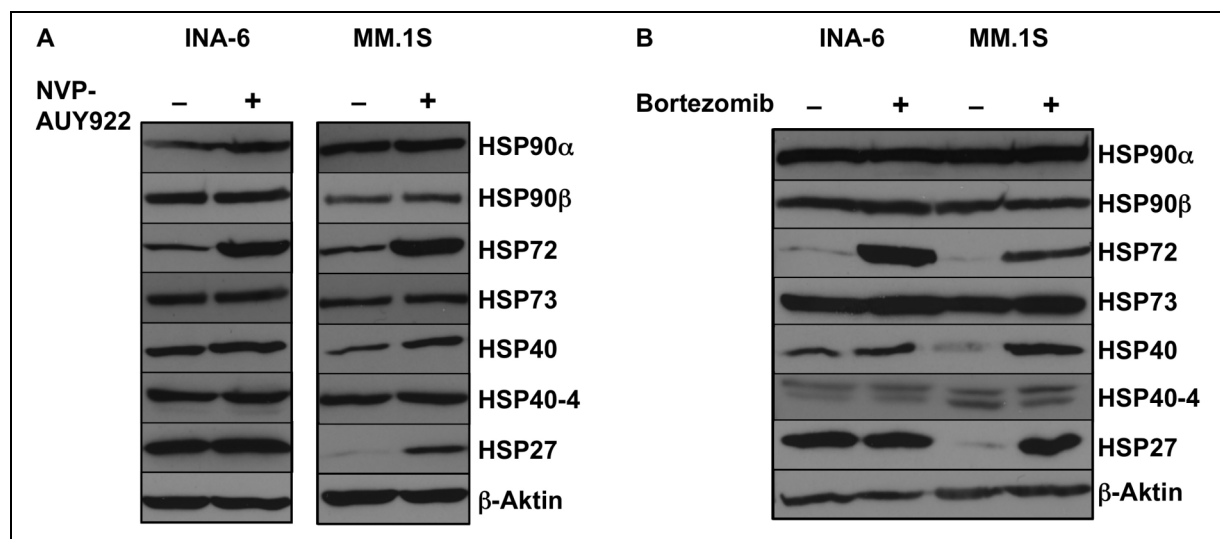


Abbildung 16: Induktion der HSP durch pharmakologische Inhibitoren. Dargestellt sind die HSP-Expressionen nach pharmakologischer Inhibition von HSP90 mit NVP-AUY922 (A) und nach Inhibition des Proteasoms mit Bortezomib (B). Es kommt zu einer Hochregulation der HSP72, HSP40 und HSP27.

4.6 HSF1-Knockdown induziert Apoptose in INA-6- und MM.1S-Zellen

Um HSF1 selektiv zu inhibieren, wurden shRNA-Konstrukte gegen HSF1 generiert. Da „*off-target*“ Effekte unerwünscht und somit ausgeschlossen werden sollten, wurden zwei verschiedene shRNA-Konstrukte verwendet (pSU/HSF1-1 und

pSU/HSF1-2). In Abb.17 A+C, ist der HSF1-Knockdown in INA-6 und MM.1S 48 h nach der Transfektion dargestellt. Zu diesem Zeitpunkt lies sich bereits eine starke Abnahme des HSF1-Proteins nachweisen. Die Herunterregulation der HSF1-Expression führte in beiden getesteten Zelllinien zur Induktion von Apoptose. Die Apoptosemessung wurde 72 h nach der Transfektion mittels der AnnexinV/PI-Färbung und anschließender FACS-Analyse durchgeführt. In INA-6-Zellen wurde die Anzahl der viablen Zellen bis auf 40 % reduziert und in MM.1S-Zellen wurde die viable Zellfraktion bis auf 10 % minimiert (Abb. 17, B+D).

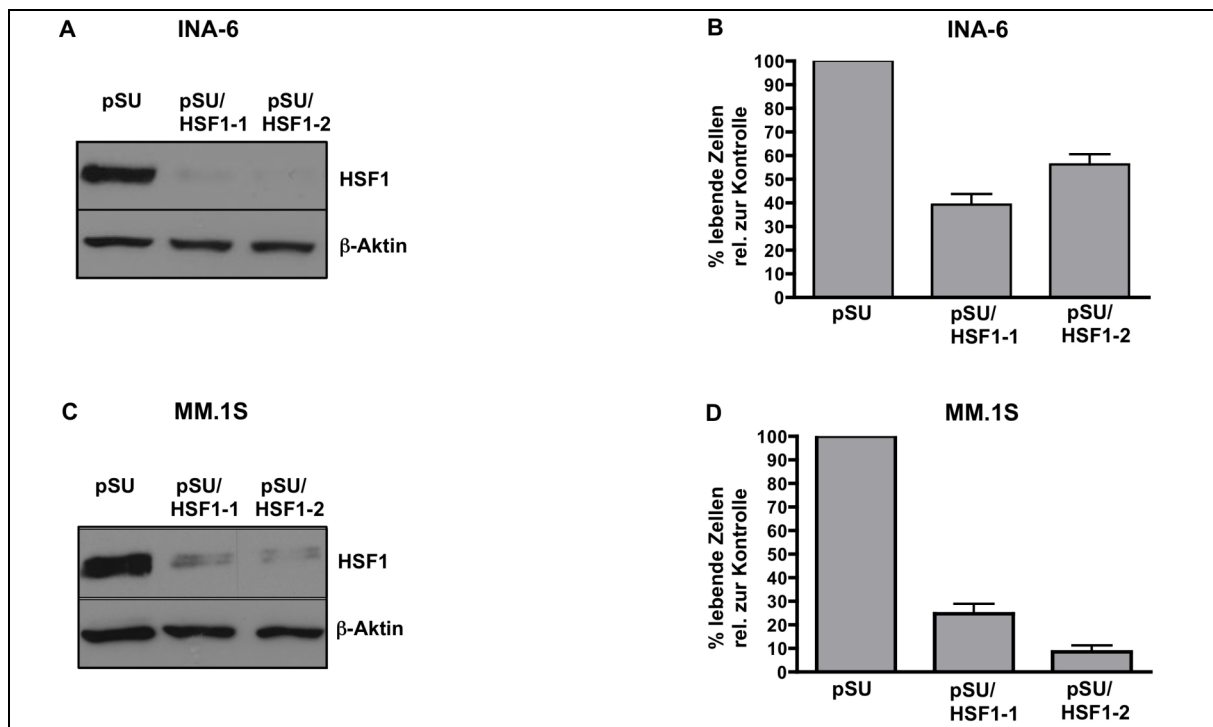


Abbildung 17: HSF1-Knockdown in MM-Zellen. Dargestellt sind Western Blot Analyse des shRNA-vermittelten Knockdowns von HSF1, 48 h nach der Transfektion (A+C). β -Aktin dient als Ladungskontrolle. Knockdown durch beide shRNA-Konstrukte führen zur Apoptoseinduktion in den getesteten Zelllinien (B+D) Jeder Versuch wurde mindestens dreimal wiederholt.

4.7 Knockdown von HSF1 führt in JJN-3-Zellen zu einem Zellzyklus-Arrest

Weitere Versuche wurden mit der intern erst kürzlich etablierten Zelllinie JJN3 durchgeführt. Diese Zelllinie weist eine starke HSF1-Expression auf (ähnlich der INA-6- und MM.1S-Zellen) und zeigt eine etwas stärkere konstitutive Expression von HSP72 und eine schwache konstitutive Expression von HSP27. Die Western Blot-Analyse und die AnnexinV/PI-Messung erfolgte 72 h und 96 h nach der

Transfektion. Das sehr stark exprimierte HSF1-Protein konnte durch die beiden shRNA-Konstrukte nicht vollständig herabreguliert werden (Abb. 18, A). Ein stärkerer Knockdown wurde mit der shRNA1 erreicht, was zu einer maximalen Apoptoserate von 40 % führte (pSU/HSF1-1, (B)).

Die Zellzyklusanalyse mittels BrdU-Messung zeigte, dass die Zellen in der G1/S-Phase akkumulieren, bzw. die Anzahl der Zellen in der S-Phase stark abnimmt. Ebenso lässt sich hier eine Zunahme der Zellfragmente (SubG1, repräsentiert apoptotische Zellen) erkennen (C). Eine partielle Induktion von Apoptose konnte hier nachgewiesen werden.

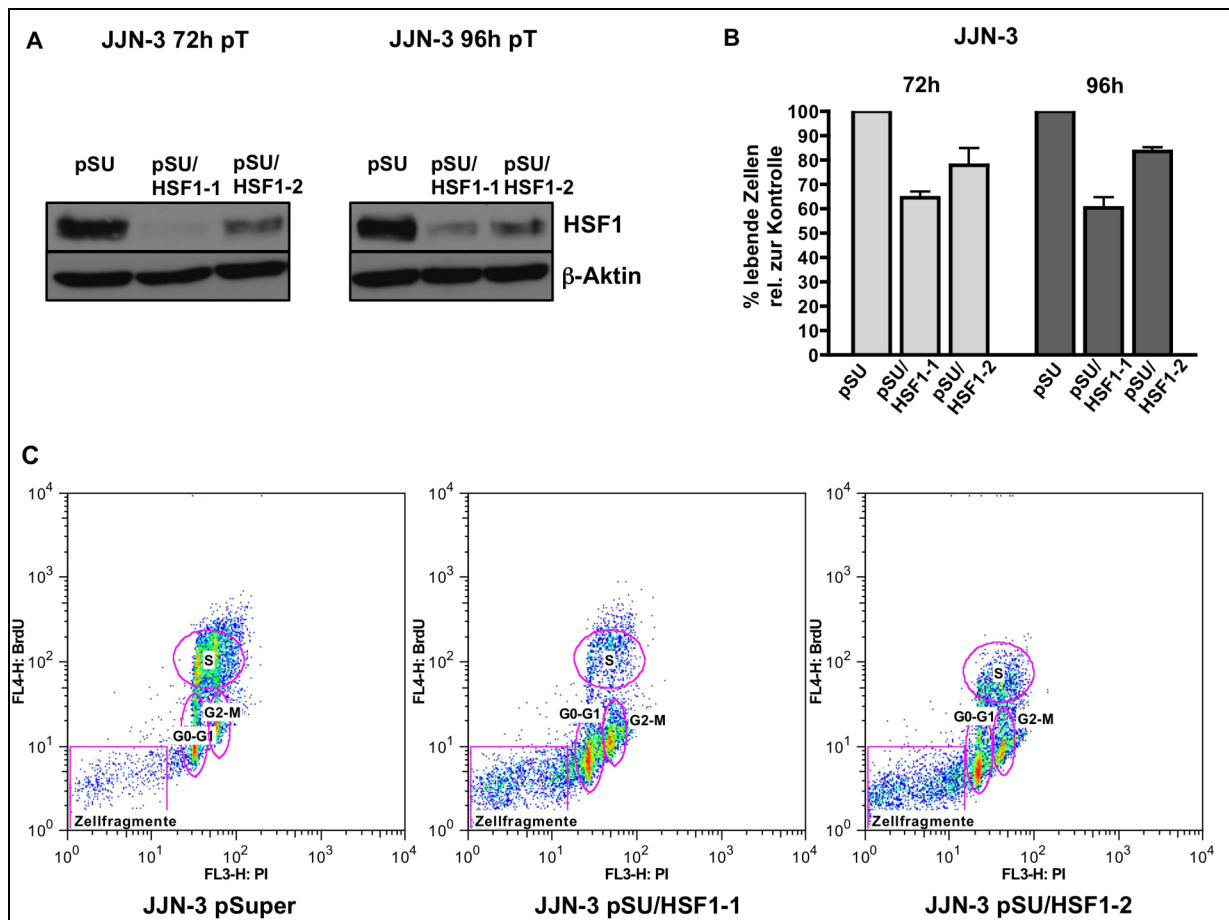


Abbildung 18: Knockdown von HSF1 in JJJN-3 Zellen. Die Westernblot-Analyse (A) zeigt, dass das Protein nicht vollständig herunterreguliert wird. Dargestellt sind zwei verschiedene Zeitpunkte nach der Transfektion (post Transfektion, pT). β -Aktin dient als Ladungskontrolle. Die Viabilitätsrate der Zellen sinkt auf bis zu 60 %. Die BrdU-Färbung zeigt, dass es zu einer Akkumulation der Zellen in der G1-Phase kommt und die Zellzahl in der S-Phase stark abnimmt (C). Weiterhin kommt es auch zu einer Zunahme der Zellfragmente, dies repräsentiert die SubG1-Phase (apoptotische Zellen).

4.8 Knockdown von HSF2 hat Einfluss auf die Viabilität in INA-6-Zellen

Es wurde vorbeschrieben, dass HSF2 in der Interaktion mit HSF1 die Transkription der HSP beeinflussen kann (109, 112). Da deshalb nicht nur HSF1 potenziell wichtig für die erhöhte HSP-Expression in MM-Zellen wäre, haben wir den Einfluss von HSF2 auf die Zellviabilität in den INA-6- und MM.1S-Zelllinien untersucht. Dafür wurde eine shRNA generiert und die Zellen transient transfiziert. Die Western Blot-Analyse und die AnnexinV/PI-FACS Analyse wurde 72 h nach der Transfektion durchgeführt. Der Knockdown von HSF2 führte zu einer partiellen Apoptoseinduktion. In INA-6-Zellen wurde eine Apoptoserate von 40 % erreicht, wohingegen die Apoptoserate bei den MM.1S bei ca. 20 % lag (Abb. 19 (B+D)). Es wäre aber denkbar, dass der Knockdown von HSF2 eine ausgleichende, verstärkte Aktivität von HSF1 hervorruft. Auf Grund dessen wurde ein kombinierter Knockdown von HSF1 und HSF2 durchgeführt. Die gemeinsame Inhibition von HSF1 und HSF2 führte, verglichen mit dem alleinigen Knockdown von HSF1, zu leicht verstärkten apoptotischen Effekten (Abb. 19, B+D). Bei der Western Blot-Analyse wurde festgestellt, dass der Knockdown von HSF1 auch zu einer Abnahme von HSF2 in den getesteten Zelllinien führte (Abb. 19, (A+C)). HSF2 wird somit vermutlich über HSF1 reguliert und es kommt zu keiner konträren Hochregulation von HSF1 oder HSF2 als Zell-Rettungsmechanismus.

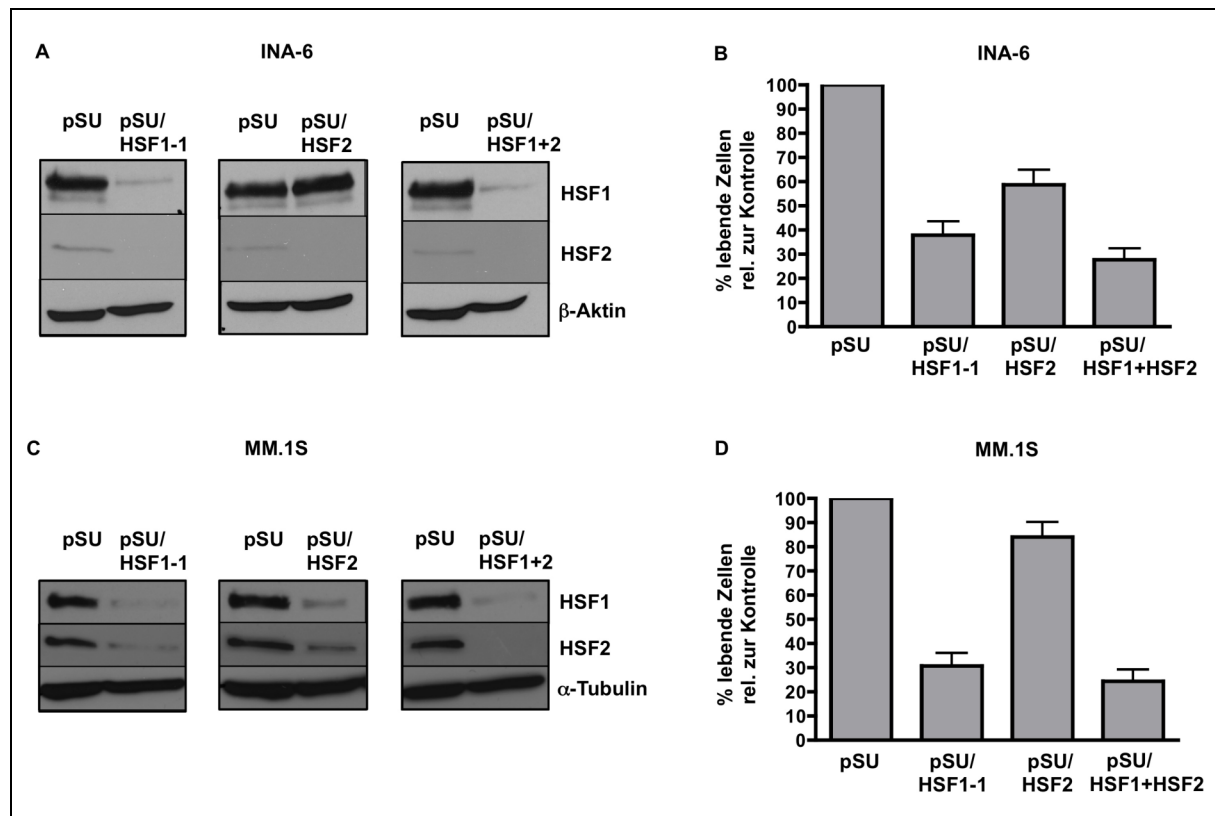


Abbildung 19: Knockdown von HSF1 und HSF2 in MM-Zellen: Dargestellt sind die shRNA-vermittelten Knockdown Experimente von HSF1, HSF2 und der Kombination beider shRNAs (A+C). Die Blockade von HSF1 führt hier zu einer Abnahme von HSF2. β -Aktin/ α -Tubulin dient als Ladungskontrolle. In B+D sind die Viabilitätsraten der Zellen relativ zur pSUPER Kontrolle dargestellt. Es kommt zu einer leicht verstärkten Apoptoseinduktion durch die kombinierte Inhibition von HSF1 und HSF2.

4.9 Genexpressionsanalyse (GEP) nach shRNA-vermitteltem HSF1-Knockdown in INA-6- und MM.1S-Zellen

Um die Genexpressionsveränderungen nach shRNA-vermitteltem Knockdown von HSF1 zu untersuchen, wurden cDNA-Microarrayanalysen durchgeführt. Es zeigte sich, dass eine Vielzahl von Genen differentiell exprimiert wurden (INA-6, 489 Gene, MM.1S, 1214 Gene, mit einem FC $\geq \pm 1,5$ und $p < 0,05$). Denkbar ist, dass zahlreiche Gene nicht direkt durch HSF1 reguliert werden, sondern es ebenso durch die Induktion der Apoptose zu einer Veränderung der Genexpression kommt. Der Fokus der Analyse wurde aufgrund der großen Anzahl potenzieller HSF1-Zielgene auf die HSP gelegt. Über die cDNA-Microarrayanalyse wurden die ausgeprägten Genexpressionsveränderungen der HSP nach HSF1-Knockdown festgestellt (Abbildung 20, A). Neben den für das MM relevanten HSP90 und HSP70 fiel auf, dass die HSP27 sowie HSP40 und 40-4 extrem stark reguliert wurden. Ihre

Bedeutung für das MM ist bisher unbekannt und wurde deswegen zusätzlich untersucht.

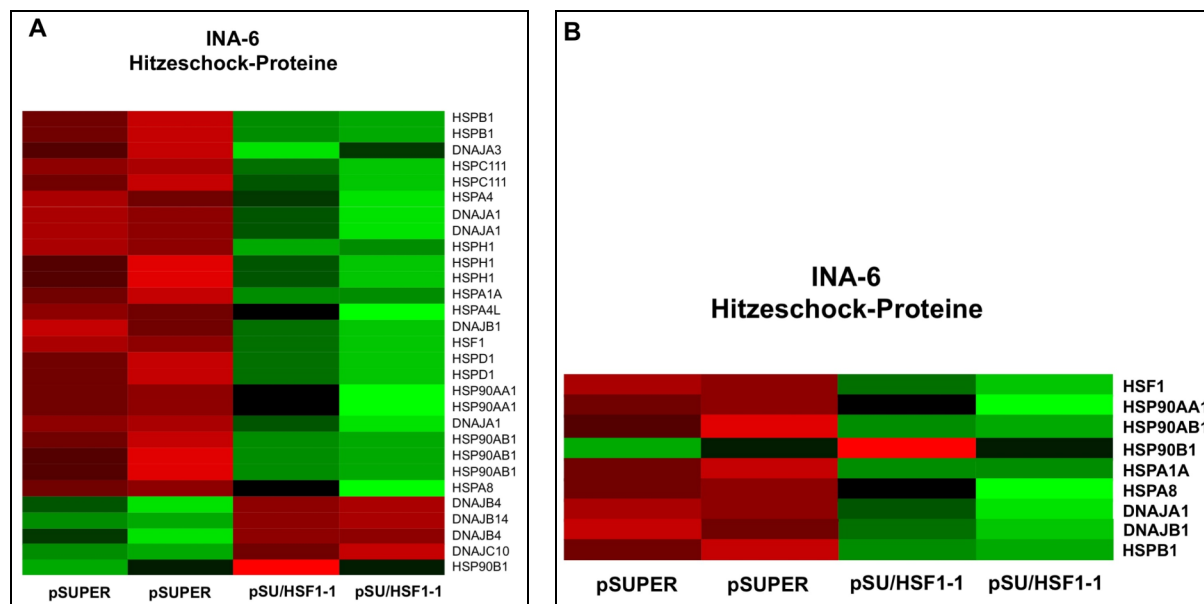


Abbildung 20: Heat Plot-Darstellung der regulierten HSP: Heat Plot Darstellung der regulierten Gene, die für HSP in den INA-6 Zellen kodieren (A). In (B) sind die HSP separat vergrößert dargestellt, die anschließend (oder bereits) umfassender in INA-6- und MM.1S-Zellen untersucht wurden. Die Farbe rot repräsentiert eine vermehrte Genexpression, die Farbe grün steht für eine verminderte Genexpression. Repräsentativ dargestellt sind die Ergebnisse der INA-6 Zellen, die Analyse der MM.1S Zellen führte zu ähnlichen Resultaten.

4.10 HSF1-Knockdown führt zur Abnahme von HSP in INA-6- und MM.1S-Zellen

Um die Ergebnisse der Microarrayanalyse zu bestätigen, wurde mittels Western Blot-Analysen die Auswirkungen der shRNA-vermittelten HSF1-Inhibition auf die Expression multipler HSP untersucht (66 h nach der Transfektion mit dem pSU/HSF1-1 Konstrukt). Die HSF1-Depletion beeinflusste die Expression der HSP in unterschiedlichem Ausmaß (siehe Abbildung 21). Es zeigte sich, dass die Proteinmengen der induzierbaren HSP, HSP72, HSP40 und HSP27 am stärksten abnahmen, wohingegen die konstitutiv stark exprimierten HSP (HSP90 und HSP73) schwächer herunterreguliert wurden.

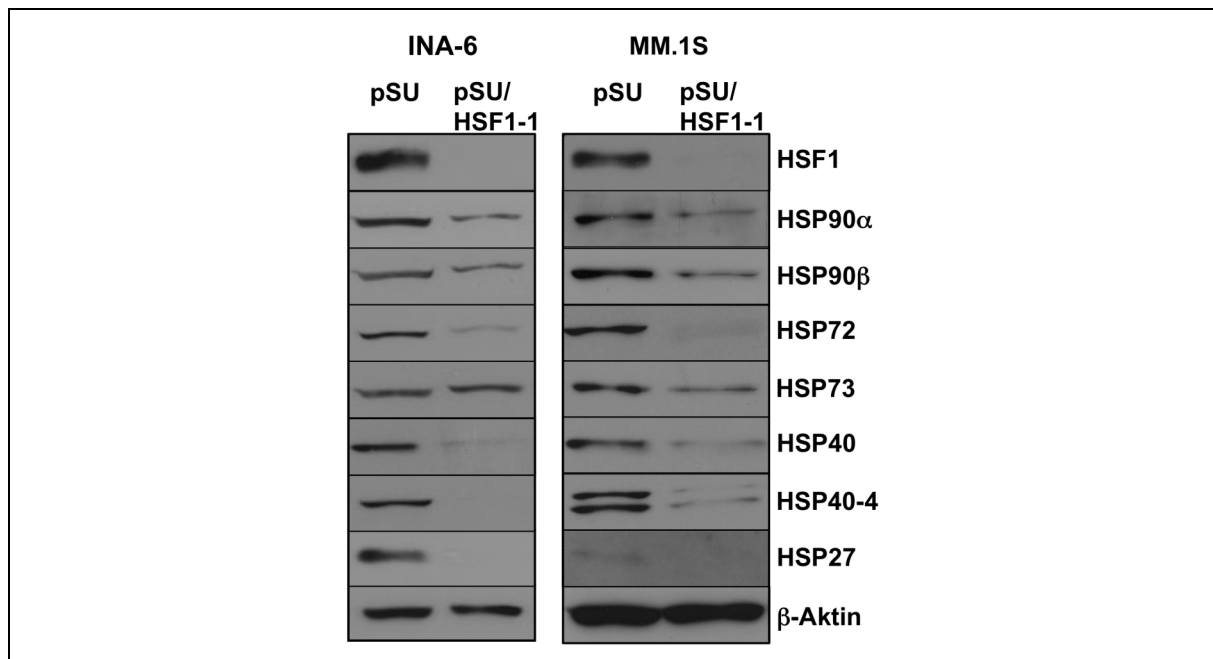


Abbildung 21: Western Blot-Analyse nach HSF1-Knockdown: Expressionsanalyse verschiedener HSP nach shRNA-vermitteltem Knockdown von HSF1 in INA-6- (A) und MM.1S- (B) Zellen. Die HSP72, HSP40, HSP40-4 und HSP27 wurden stärker herunterreguliert, als die HSP90 und HSP73. β -Aktin dient als Ladungskontrolle.

4.11 Analyse des shRNA-vermittelten Knockdowns von HSP40, HSP40-4 und HSP27 in INA-6- und MM.1S-Zellen

Da die bisherigen Untersuchungen gezeigt haben, dass die HSP72, HSP40, HSP40-4 und HSP27 am stärksten durch HSF1-Knockdown reguliert wurden, wurden die Auswirkungen des jeweiligen HSP-Knockdowns in MM-Zellen untersucht. Da es aus unserer Gruppe bereits Arbeiten gibt, die gezeigt haben, dass HSP70 und HSP90 einen Einfluss auf die Zellviabilität haben, wurde in dieser Arbeit HSP40, HSP40-4 und HSP27 untersucht. Für das jeweilige Zielprotein wurden multiple shRNAs mit verschiedenen Zielsequenzen konstruiert und anschließend mit einer gut funktionierenden shRNA weiter gearbeitet (hier exemplarisch dargestellt, Abb. 22). Das Austesten der HSP27 shRNA-Konstrukte wurde unter meiner Anleitung von Stephanie Fischbach im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt.

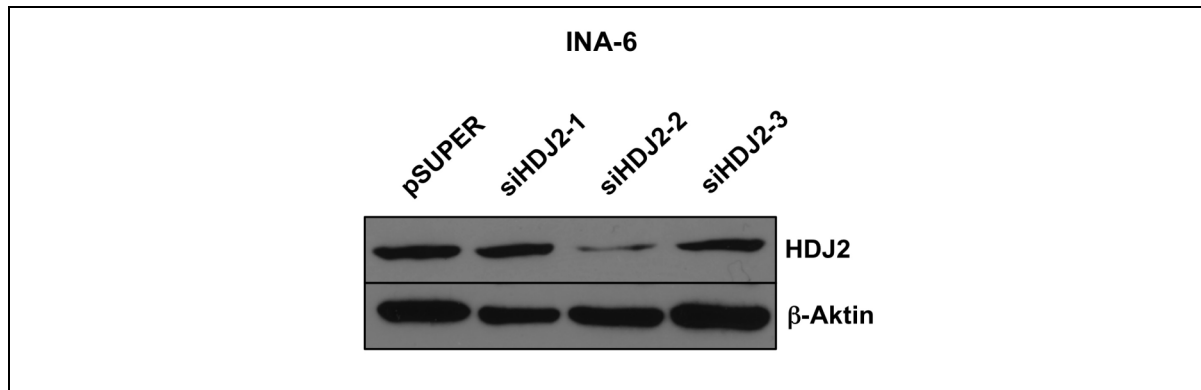


Abbildung 22: Exemplarische Darstellung der Validierung verschiedener shRNAs in MM-Zelllinien. Für die jeweiligen Zielgene wurden mindestens drei shRNAs generiert und getestet. Die shRNA, die die stärkste Regulation hervorrief, wurde für die weiteren Versuche ausgewählt. Hier wurden die siHDJ2-2 weiter verwendet.

4.11.1 HSP40 und HSP40-4 Knockdown erzielt unterschiedliche Effekte in INA-6- und MM.1S-Zellen

Anmerkung: Um eine Verwechslung der verschiedenen HSP40 Proteine zu vermeiden wird der Alias HDJ2 für HSP40-4 in diesem Abschnitt verwendet. Von den drei generierten shRNA-Konstrukten wurde das Konstrukt siHDJ2-2 ausgewählt und für die Viabilitätsanalysen eingesetzt. Für HSP40 wurde für weitere Untersuchungen das Konstrukt HSP40-1 ausgewählt. Die Viabilitätsanalysen mittels AnnexinV/PI-Färbung und FACS-Messung wurden für die INA-6 nach 72 h und für die MM.1S nach 96 h durchgeführt (*post transfection*, pT). Der Knockdown von HDJ2 reduzierte die Viabilität in beiden getesteten Zelllinien auf ca. 60-80 % (Abb. 23, B). Der Knockdown von HSP40 hatte in INA-6-Zellen keinen Effekt auf das Zellüberleben, wohingegen die Viabilität der MM.1S-Zellen auf 40 % minimiert wurde (Abb. 23, C).

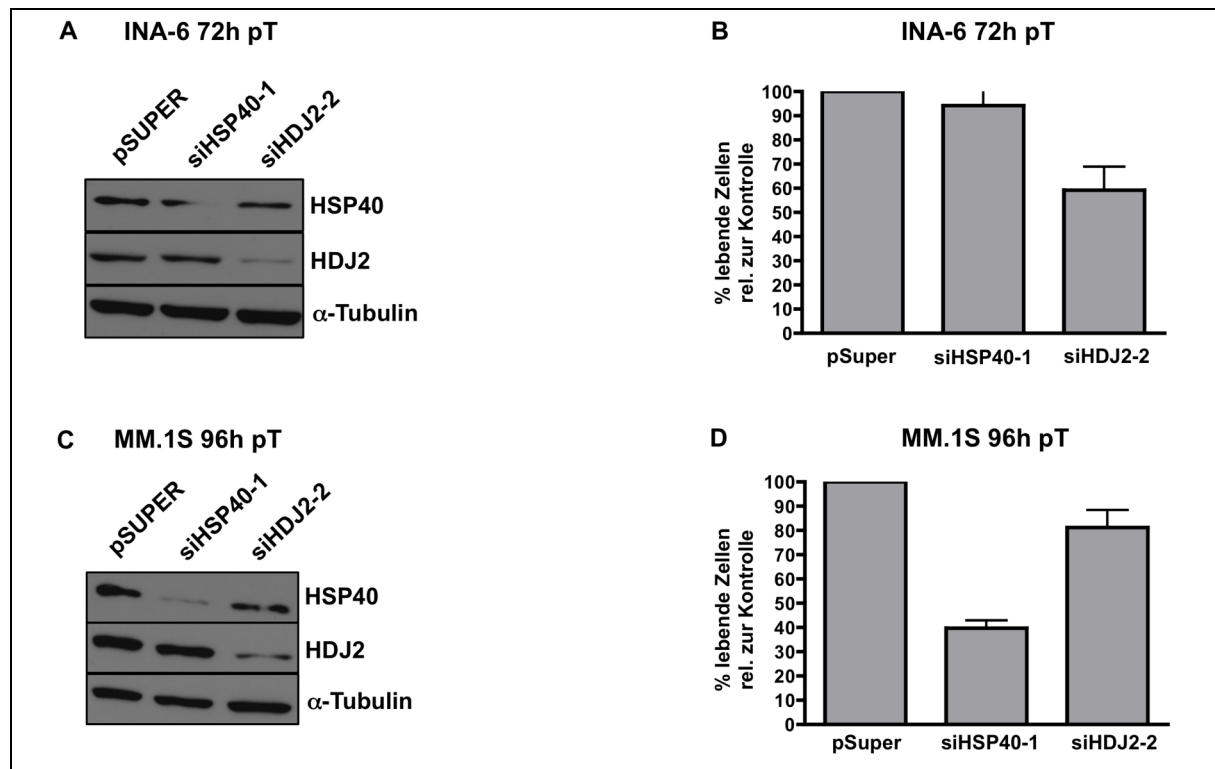


Abbildung 23: Knockdown von HSP40 und HDJ2 in MM-Zellen. Darstellung des shRNA-vermittelten Knockdowns von HSP40 und HDJ2 in INA-6- (A) und MM.1S-Zellen (B) und die jeweiligen Auswirkungen auf das Zellüberleben (B+D). Die Western Blot-Darstellungen zeigen, dass die generierten shRNA-Konstrukte spezifisch für das jeweilige Protein sind. Die Induktion der Apoptose wird bei INA-6 nach Knockdown von HDJ2 und bei MM.1S nach Depletion von HSP40 initiiert.

4.11.2 Knockdown von HSP27 führt in INA-6-Zellen zu einer moderaten Apoptoseinduktion

INA-6-Zellen wurden mit dem siHSP27-4 Konstrukt transient transfiziert und nach 72 und 96 h wurde die Viabilität mittels AnnexinV/PI-Messung ermittelt. Der Knockdown von HSP27 führt in INA-6 Zellen zu einer Apoptoseinduktion von ca. 30 %. Die MM.1S-Zelllinie konnte nicht untersucht werden, da sie HSP27 nur sehr schwach, im Wester Blot kaum darstellbar, exprimiert.

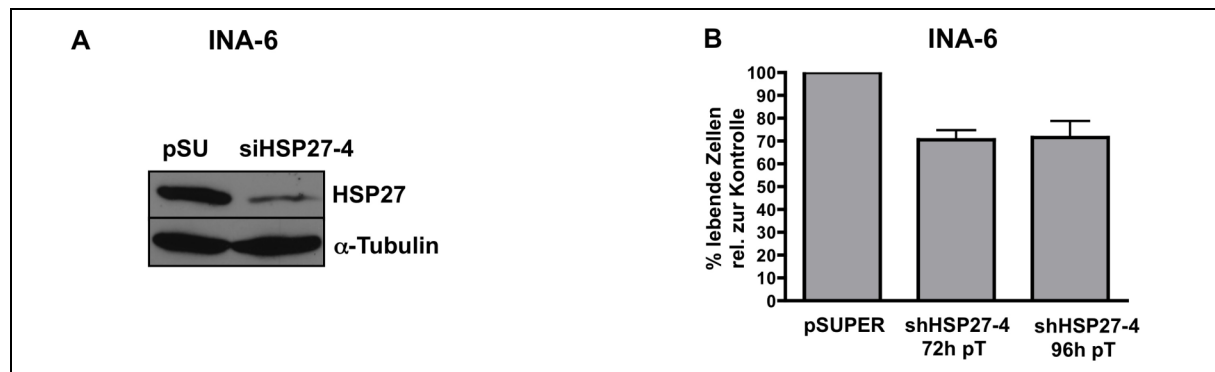


Abbildung 24: HSP27-Knockdown in INA-6 Zellen. Die Western Blot-Analyse zeigt den HSP27-Knockdown 72 h nach der Transfektion (A). α -Tubulin dient als Ladungskontrolle. Der Knockdown verringert die Zellviabilität um ca. 30 % (B).

4.12 Pharmakologische Inhibition von HSF1 mit Triptolid führt zur Abnahme der Expression von HSF1 und HSP in INA-6- und MM.1S-Zellen

Für die pharmakologische Inhibition von HSF1 wurde die Substanz Triptolid (isoliert aus der chinesischen Heilpflanze *tripterygium wilfordii*) eingesetzt. Die Gruppe um Westerheide et al. (2006) zeigte, dass durch Vorbehandlung mit Triptolid die HSF1-vermittelte Hochregulation von HSP72 durch einen Hitzeschock inhibiert wurde (148). Welche Auswirkung die Behandlung mit Triptolid auf die konstitutive Proteinexpression hat, ist aber bisher noch unbekannt. Zunächst wurde durch Western Blot-Analyse der Effekt von Triptolid auf die Proteinexpression von HSF1 und den HSP untersucht. Dafür wurden die Zellen für 48 h mit 20 nM Triptolid behandelt. Hier zeigte sich, dass das HSF1-Protein selbst reduziert wurde. Dies hatte zur Folge, dass auch die konstitutive HSP-Expression vermindert wurde (Abb. 25). Die Auswirkungen der Triptolid-Behandlung sind demnach kongruent mit den generierten Ergebnissen nach shRNA-vermittelter Inhibition von HSF1. Da die gleichen Ergebnisse, wie bei dem biologischen Versuchsansatz erzeugt wurden, zeigen diese Resultate erstmalig, dass Triptolid als geeigneter pharmakologischer HSF1-Inhibitor appliziert werden kann.

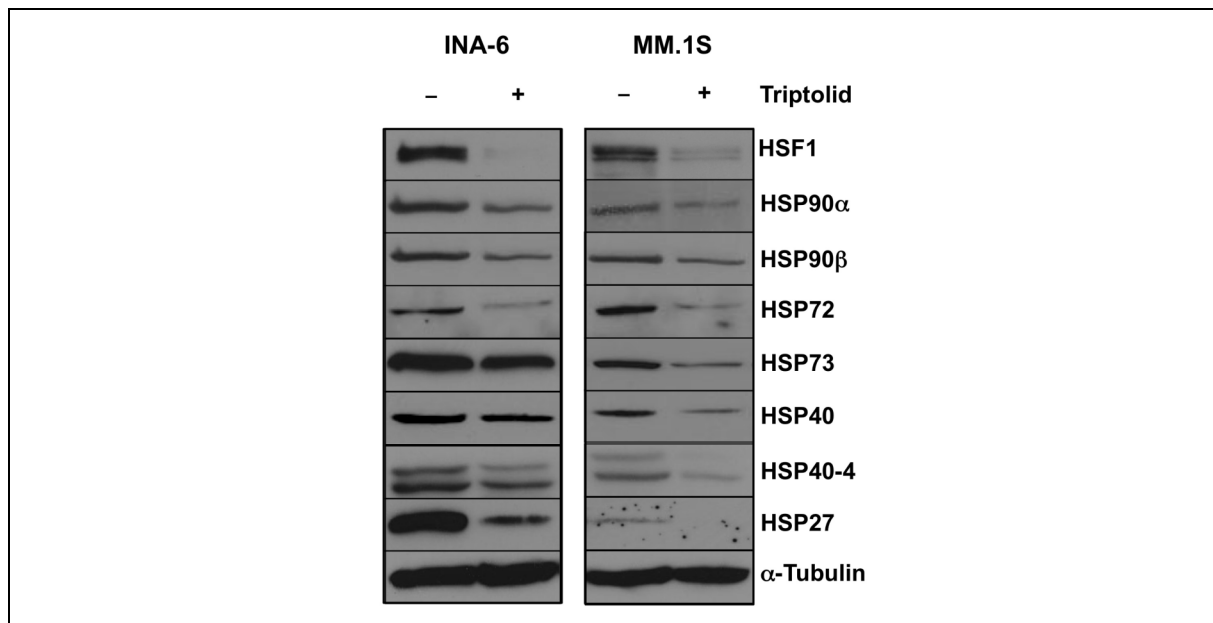


Abbildung 25: Western Blot Analyse nach Triptolid-Behandlung. Die Behandlung mit Triptolid führt in INA-6- und MM.1S-Zellen zu einer verminderten Expression von HSF1 und aller untersuchten HSP. α -Tubulin dient als Ladungskontrolle.

4.13 Triptolid induziert Apoptose in verschiedenen Myelomzelllinien und in primären Myelomzellen

Um die Auswirkung der Triptolid Behandlung auf die Viabilität der Myelomzellen zu untersuchen, wurden mehrere Myelomzelllinien mit verschiedenen Triptolidkonzentrationen behandelt. Nach drei Tagen erfolgte eine Apoptosemessung basierend auf der AnnexinV/PI-Färbung am FACS. Alle getesteten MM-Zelllinien waren sensitiv auf die Triptolid-Behandlung, nur die AMO-1- und die U266-Zelllinien benötigten höhere Triptolidkonzentrationen zur Apoptoseinduktion. Diese beiden Zelllinien weisen aber auch die geringste HSF1-Proteinexpression auf und sind daher vermutlich weniger sensitiv auf die HSF1-Inhibition. Eine wirkliche Resistenz war aber nicht vorhanden, da die maximal eingesetzte Konzentration noch im nM Bereich liegt (Abb. 26, A). Zudem wurden primäre MM-Zellen mit Triptolid behandelt. Da von primären MM-Zellen nur geringe Zellzahlen zur Verfügung stehen, wurden nach Test-Titrationsreihen zwei Triptolidkonzentrationen ausgewählt. Die primären Zellen wurden entweder mit zugesetztem IL-6 oder auf KMSZ kultiviert. Da die Ko-Kultivierung mit KMSZ das natürliche Milieu der MM-Zellen besser repräsentiert, vermittelt dies oftmals Resistenzen gegenüber pharmakologischen Substanzen. Die getesteten primären

MM-Zellen zeigten jedoch eine konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion, die auch durch Ko-Kultivierung mit KMSZ nicht vermindert wurde (Abb. 26, B). Darüber hinaus hatte Triptolid keinen zytotoxischen Effekt auf die KMSZ (Abb. 27).

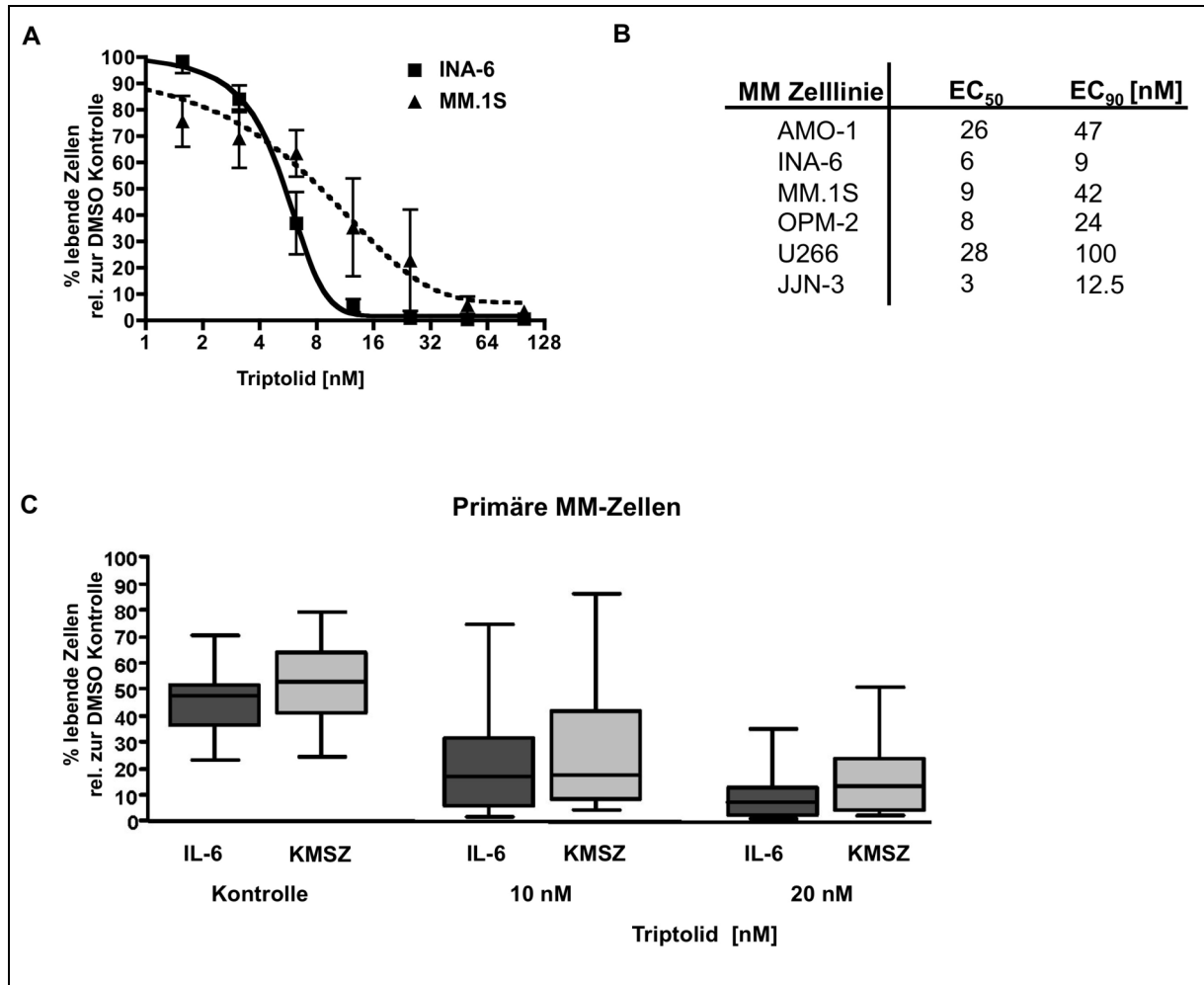


Abbildung 26: Behandlungen mit Triptolid: Es wurden verschiedene Zelllinien mit Triptolid behandelt. Die Titrationskurven für INA-6 und MM.1S sind in A abgebildet, für die weiteren Zelllinien sind die EC₅₀- und EC₉₀-Werte tabellarisch zusammengefasst. Jedes Experiment wurde im Triplikate durchgeführt. B zeigt die Darstellung der Primärzellen; Im Vergleich sind die Kultivierung der Zellen mit IL-6 und die Ko-Kultivierung mit KMSZ abgebildet.

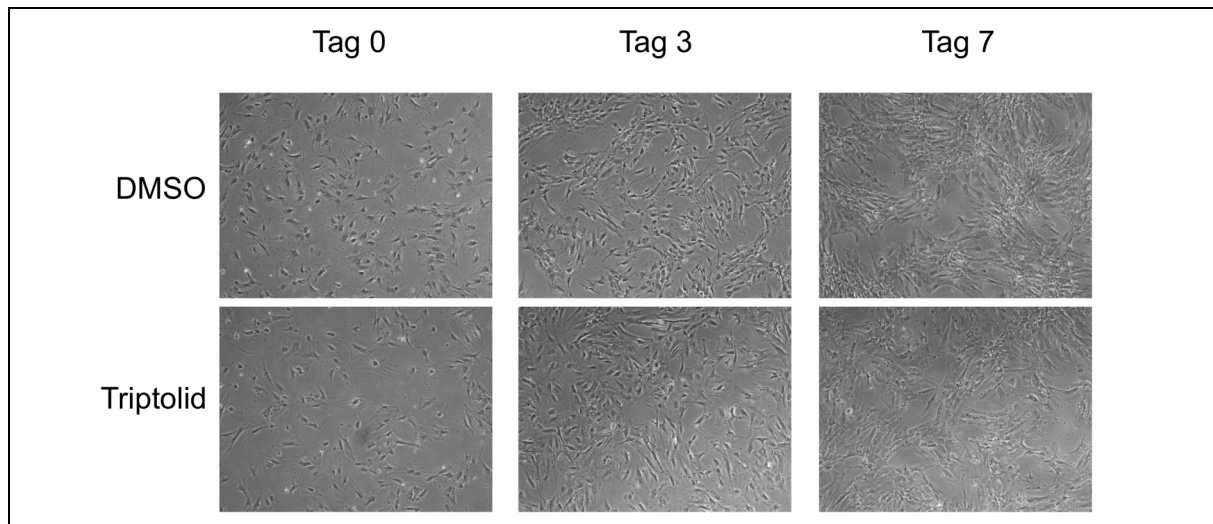


Abbildung 27: Behandlung von KMSZ mit Triptolid: Die Behandlung mit 20 nM Triptolid über mehrere Tage hatte keinen negativen Einfluss auf die Zellviabilität der KMSZ.

4.14 HSF1-Inhibition unterdrückt die pharmakologisch-induzierte Hochregulation der HSP

Der Proteasom-Inhibitor Bortezomib wird bereits in der Myelomtherapie verwendet, wohingegen der HSP90-Inhibitor NVP-AUY922 sich noch in klinischer Erforschung befindet. Bei Behandlung mit diesen Inhibitoren wird in MM-Zellen eine Stressreaktion ausgelöst und es kommt zu einer kompensatorischen Hochregulation mehrerer HSP (HSP72, HSP40/40-4 und HSP27, siehe Abschnitt 4.5). Es wird folglich über die pharmakologische Inhibition des Proteasoms und von HSP90 eine Stressreaktion (analog zur „Hitzeschockreaktion“) herbeigeführt. Diese potenziell protektive Zellantwort könnte Resistenzen gegenüber den pharmakologischen Inhibitoren vermitteln. Es ist deshalb von klinischem Interesse diese Reaktion einzuschränken bzw. auszuschalten. Für die Versuche wurde HSF1 vor der Behandlung mit den Inhibitoren entweder pharmakologisch mit Triptolid blockiert oder mittels shRNA depletiert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl durch die shRNA-vermittelte, als auch durch die pharmakologische Inhibition von HSF1, die Hochregulation der induzierbaren HSP (HSP72, HSP40 und HSP27) vermindert oder verhindert werden kann (Abb. 28). Dies beweist, dass die ausgelöste pharmakologische Stressantwort HSF1-abhängig reguliert wird.

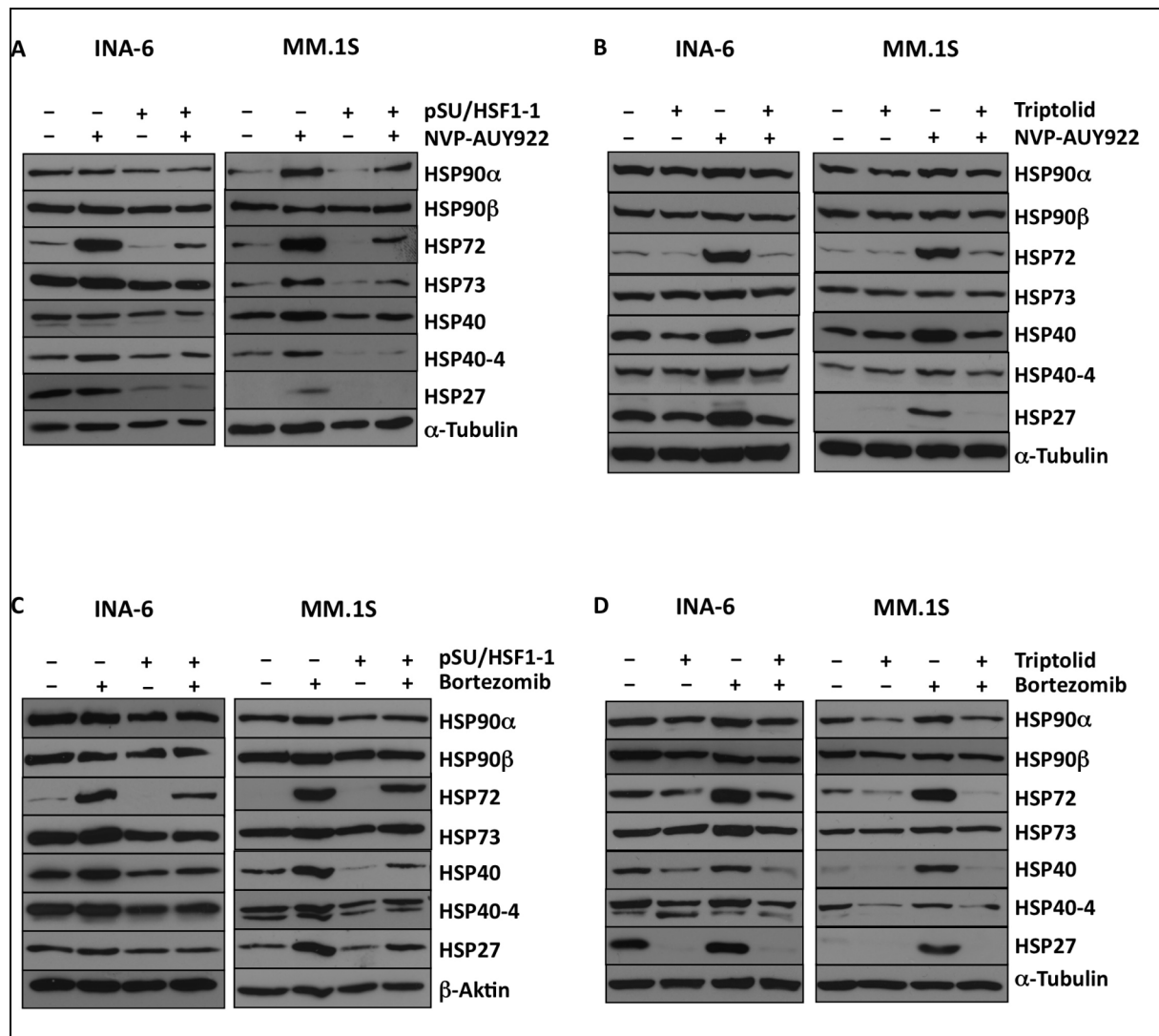


Abbildung 28: HSF1-Inhibition unterdrückt die pharmakologisch-induzierte Hochregulation von HSP. In INA-6 und MM.1S wird einerseits durch shRNA (A+C) und andererseits durch Triptolid (B+D) HSF1 depletiert und anschließend entweder NVP-AUY922 (A+B) oder Bortezomib (C+D) zugegeben. Durch das selektive Blockieren von HSF1 wird eine kompensatorische Hochregulation der streng HSF1-abhängigen HSP (insbesondere HSP72) inhibiert.

4.15 Pharmakologische Inhibition von HSF1 mit Triptolid verstärkt den apoptotischen Effekt von NVP-AUY922 und Bortezomib in INA-6- und MM.1S-Zellen

Kombinationstherapien sind insbesondere beim multiplen Myelom von großem klinischem Interesse. Triptolid, welches die kompensatorische Hochregulation der induzierbaren HSP nach Behandlung mit NVP-AUY922 und Bortezomib inhibiert, wurde deshalb mit diesen beiden pharmakologischen Inhibitoren kombiniert und die Viabilität der MM-Zellen untersucht. Dafür wurden die Einzelkonzentrationen so

gewählt, dass sie maximal den EC_{50} -Wert erreichen, also noch keine starke Apoptoseinduktion vorhanden ist. Die Kombinationen von Triptolid mit dem HSP90-Inhibitor NVP-AUY922 erzielte in den INA-6-Zellen eine nahezu vollständige Apoptoseinduktion. In den MM.1S-Zellen wurde die viable Zellfraktion auf ca 35 % reduziert. Hier erreichten aber die ausgewählten Konzentrationen der Einzelsubstanzen nur eine geringe Apoptoseinduktion (Viabilitätsrate 70 - 90 %). Bei der Kombination von Triptolid mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib wurde in beiden untersuchten Zelllinien ein nahezu vollständiges Zellsterben erreicht (siehe Abb. 29).

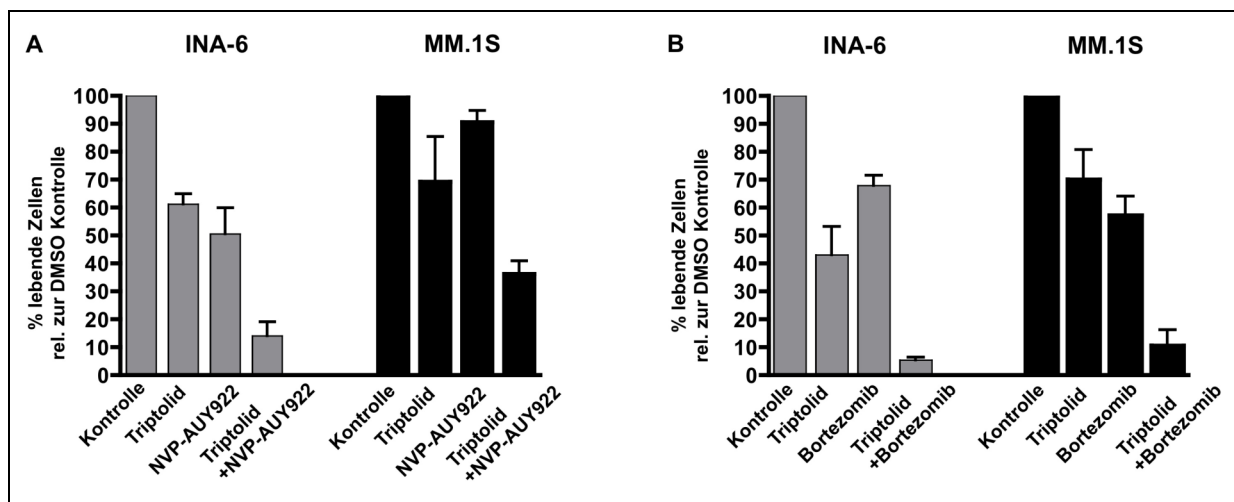


Abbildung 29: Kombinationsbehandlung von Triptolid mit NVP-AUY922 oder Triptolid mit Bortezomib. Viabilitätsanalyse der INA-6- und MM.1S-Zellen nach Behandlung mit Triptolid/NVP-AUY922 und Triptolid/Bortezomib und der jeweiligen Kombinationen der Inhibitoren. Die Kombinationen führen zu einem verstärkten apoptotischen Effekt.

5. Diskussion

Bis zum heutigen Tag gilt das MM als unheilbare Erkrankung. Die Aufklärung der molekularen Eigenschaften des MM und die Erforschung neuer potenzieller therapeutischer Angriffspunkte ist daher unabdingbar. Um eine zielgerichtete Behandlung für die Patienten zu erreichen, ist eine kausale Verbindung der Pathogenese des MM und der Therapiewahl erstrebenswert. Umfangreiche Genom-Sequenzierungen zeigten, dass aktivierende Mutationen, wie Mutationen der Onkogene *RAS*, *FGFR3* und Mutationen im *NFκB*-Signalweg sowie inaktivierende Mutationen der Tumor-Suppressoren *PTEN* und *TP53*, in MM-Zellen vorkommen und wahrscheinlich zur Tumorentstehung oder Tumorerhaltung beitragen (43, 54, 60, 61, 72, 166). Diese Abhängigkeit der Zellen von onkogener Aktivität oder von einer Tumor-Suppressor Funktion bezeichnet man als „*oncogene addiction*“ (167). Zielgerichtete Therapien können auf Onkogene ausgerichtet sein, so erbrachte z.B. die Entwicklung von Inhibitoren für onkogene Proteinkinasen (z.B. Glivec für BCR-ABL-positive CML) enormen Fortschritt in der Krebstherapie (168). Jedoch existieren zahlreiche Gene die selbst nicht mutiert und folglich nicht primär tumorigen sind. Sie agieren nicht als „klassische“ Onkogene, nehmen aber in einem onkogenen Signalweg wichtige Schlüsselfunktionen ein. Die Modulation dieser Gene führt meist zu vielfältigen toxischen Effekten in Krebszellen und ist deswegen als Ziel genauso effektiv in der Anti-Krebs-Therapie. Dieses Phänomen wird als „*non-oncogene addiction*“ bezeichnet (121, 169). In einem genetischen *Hsf1*-Knockout Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Tumorbildung nach Aktivierung von onkogenem *Ras* oder nach einer Hotspotmutation in *Trp53*, effektiv unterdrückt wurde. Die weiteren *in vitro* Ergebnisse von Dai et al. (2007) zeigten hierbei, dass HSF1 zahlreiche zelluläre Funktionen unterstützt. HSF1 begünstigt die Zellproliferation und das Überleben der Tumorzellen, verstärkt die Aktivierung von Signalwegen, moduliert die Proteintranslation und unterstützt die Glukoseaufnahme und die Glykolyse (122). HSF1 agiert hierbei nicht als klassisches Onkogen, da die HSF1-Überexpression nicht direkt zur Transformation der Zellen führt. Vielmehr wurde gezeigt, dass HSF1 ein Netzwerk von substanzialen Zellmechanismen reguliert, die für die Tumorigenese benötigt werden. Diese Arbeit beschreibt erstmalig, dass die

Funktion von HSF1 dem beschriebenen Phänomen der „*non-oncogene addiction*“ entspricht. Obwohl diese Erkenntnisse nahe legen, dass HSF1 in der malignen Transformation eine wichtige Rolle spielt, ist seine genaue Regulation und Funktion in humanen Tumoren noch unbekannt.

5.1 HSF1/HSP-Expressionen in nicht-malignen und malignen B-Zellen

Die physiologische Funktion von HSF1 ist die Koordination der evolutionär hoch konservierten Hitzeschockantwort. HSF1 ist der zentrale Transkriptionsfaktor, der nach einem Stress-Impuls die Synthese der HSP initiiert. Unterscheiden kann man hierbei zwei Gruppen der HSP: die stark (Stress-) induzierbaren HSP (z.B. HSP72) und die Gruppe der grundsätzlich konstitutiv stark vorhandenen HSP (z.B. HSP73). In ungestressten Zellen existiert HSF1 als Monomer, gebunden in einem HSP90-basierten oder HSP70/HSP40 Chaperonkomplex (104, 170). Kommt es zu einer Stressreaktion, dissoziiert HSF1 aus dem Komplex, trimerisiert, phosphoryliert und transloziert in dieser aktiven Form in den Nukleus. Hier bindet HSF1 an die Konsensus-Hitzeschockelemente (HSE) im Promoterbereich der Zielgene und initiiert die Transkription (99). Durch die Synthese der HSP nach einem Stressstimulus werden die wichtigsten zelluläre Funktionen aufrechterhalten. HSP unterstützen als molekulare Chaperone die Proteinfaltung, verhindern Proteinaggregation und sind am proteolytischen Abbau missgefalteter Proteine beteiligt (171). Sie erhalten somit die zelluläre Homöostase, stabilisieren das onkogene Signalnetzwerk und tragen zum Zellüberleben bei (115, 120). Weiterhin nehmen sie Schlüsselfunktionen bei der Regulation der Apoptose ein (172). Die maligne Transformation stellt ebenso eine Stresssituation für das zelluläre Gleichgewicht dar. Die Entartung der Zelle erfordert ein überaktiviertes, dereguliertes Zellsystem, welches die Anpassung an die veränderten Gegebenheiten (z.B. erhöhte Translation, Proteinüberladung) ermöglicht. Da HSP eine Vielzahl von zellulären Prozessen unterstützen, ist der Verlauf der malignen Transformation mit einer erhöhten HSP-Aktivität verbunden („*addiction to chaperone*“-Hypothese) (173). Im MM konnte bisher gezeigt werden, dass die HSP90 und HSP70 überexprimiert sind und dass das Überleben der MM-Zellen abhängig von dieser erhöhten Expression ist (138, 139, 142). Ob die HSF1/HSP-Regulation in malignen Zellen aber in gleicher Weise, wie in

untransformierten Zellen funktioniert und somit die erhöhte HSP-Expression über HSF1 vermittelt wird, ist bisher unklar.

Die Expressionsanalysen der Myelomzelllinien zeigten, dass HSF1 in drei von sechs getesteten Zelllinien stark exprimiert wird. Im Gegensatz dazu war in frisch isolierten B-Zellen von gesunden Spendern nahezu keine HSF1-Expression vorhanden. Lediglich die HSP90 α und HSP40/HSP40-4 waren in den nicht-malignen B-Zellen detektierbar. Interessanterweise wiesen die Myelomzelllinien eine uneinheitliche Expression der HSP auf. Hierbei zeigten sie eine konstitutiv starke Präsenz der HSP90 α und β , HSP73, HSP40 und HSP40-4. Jedoch war die Stärke der HSF1-Expression nicht kongruent mit der Expression der HSP. Da Zelllinien aus einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium (meist Plasmazelleukämie) generiert werden, weisen sie bereits zahlreiche genetische Abberationen und Mutationen auf. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Patienten bereits chemotherapeutisch behandelt wurden, was wiederum die Proteinexpression in den Zellen verändern kann. Untersucht wurde zusätzlich die HSF1-Expression in Knochenmark (KM)-Biopsien von nicht-MM-, MGUS- und Myelom-Patienten. HSF1 war in 50 % der untersuchten Proben überexprimiert, wohingegen normale- oder prä-maligne Plasmazellen keine oder nur eine sehr schwache HSF1-Expression aufwiesen. Auffallend war, dass alle Biopsien von extramedullär manifestierten Tumoren sowie fast alle Tumore mit anaplastischer Morphologie, eine starke HSF1-Expression zeigten. Dies würde dafür sprechen, dass die HSF1-Expression mit der Krankheitsprogression einhergeht. Unsere Ergebnisse sind übereinstimmend mit kürzlich veröffentlichten HSF1/HSP-Expressionanalysen in Hodgkin Lymphomen, die gleichfalls starke HSF1- und HSP-Expressionen aufweisen (174). Weiterhin wurde gezeigt, dass hohe HSF1-Proteinlevel eine schlechte Prognose in Brustkrebsfällen und bei Leberkrebs aufzeigen (128, 132). Da das verwendete MM-Probenkollektiv für frühere Untersuchungen bereits auf die HSP90- und HSP70-Proteinexpression analysiert wurde, verglichen wir diese Daten mit den HSF1-Expressionsdaten. Dabei konnten wir zeigen, dass die HSF1-positiven Fälle auch positiv für HSP70 (100 %) und HSP90 (89 %) waren. Allerdings waren unter den HSF1-negativen Biopsien auch HSP70 (34 %) und HSP90 (69 %) positive Fälle, was darauf schließen lässt, dass noch andere Transkriptionsfaktoren an der Regulation der konstitutiven HSP-Expression beteiligt sind. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bereits bei der Untersuchung von soliden Tumoren (Prostata-Adenokarzinomen) gemacht. Hier

war HSF1 in malignen Prostataepithelzellen überexprimiert, wobei die HSP90- und HSP70-Expression sich in HSF1 hoch- oder niedrig-exprimierenden Zelllinien nicht unterschied. Zusätzlich wurde HSF1 über retrovirale Transduktion in Zelllinien überexprimiert, was ebenso keinen Einfluss auf die Stärke der HSP90- und HSP70-Expression hatte (126). In nicht-malignen Zellen, Zellen die aus *Hsf1*-Knockout Mäusen isoliert wurden (*mouse embryonic fibroblast cells*, MEFs), wurde ebenso eine basale Expression von HSP (HSP90 und HSP70) beschrieben. Dies zeigt, dass nicht nur in malignen Zellen HSP durch mehrerer Transkriptionsfaktoren reguliert werden (123, 175-177). Pirkkala et al. (2000) beobachteten, dass in Wildtyp und *Hsf1*-Knockout MEFs insbesondere HSP90 und HSP73 die gleichen basalen Expressionslevel aufwiesen. Darüber hinaus zeigten sie, dass durch Überexpression von HSF1 diese Proteinlevel gleich blieben (178). Diese Beobachtungen legen nahe, dass die basale konstitutive Expression von HSP90 und HSP73 in einem nicht-malignen Zellmodell vorwiegend HSF1-unabhängig ist und den Normalzustand der Zellen repräsentiert. Dies könnte auch bei transformierten Zellen der Fall sein und würde erklären, warum es in HSF1-negativen MM-Biopsien auch zu einer HSP90- und HSP70-Expression kommt.

5.2 HSF1 vermittelt Überlebenssignale in MM-Zellen

Um zu untersuchen, ob die Überexpression von HSF1 in MM-Zellen im Sinne einer „*non-oncogene addiction*“ essenziell für überlebensnotwendige Zellmechanismen ist, wurde HSF1 in MM-Zelllinien inhibiert. Hierfür wurde einerseits HSF1 durch shRNA-vermitteltem Knockdown depletiert und andererseits durch den pharmakologischen Inhibitor Triptolid gehemmt. In beiden Ansätzen führt die Inhibition von HSF1 zum Zelltod, bzw. zum Zellzyklus-Arrest. In INA-6- und MM.1S-Zellen führte der shRNA-vermittelte Knockdown zu einer nahezu vollständigen Herunterregulation des HSF1-Proteins. Dieses Ergebnis wurde überraschenderweise auch mit Triptolid beobachtet. Bisher konnte lediglich gezeigt werden, dass die Induktion von HSP72 mit Triptolid verhindert werden kann, Untersuchungen über die Auswirkungen auf die basale HSF1-Proteinexpression sind derzeit nicht vorhanden (148). Neben der Funktion eines HSF1-Inhibitors wurde beschrieben, dass Triptolid die RNA-Polymerase Aktivität hemmt und es zu einem Abbau von kurzlebiger mRNA (insbesondere der mRNA von Transkriptionsfaktoren) kommt, dies könnte gleichfalls den Effekt der

verminderten HSF1-Proteinexpression erklären (149). Zurzeit gibt es keinen HSF1-selektiven Inhibitor, die bestehende Literatur beschreibt aber Triptolid als am besten geeigneter HSF1-Inhibitor, der derzeit Verwendung findet (79, 116). Arbeiten anderer Gruppen zeigten, dass Triptolid die HSP70-Proteinexpression in Neuroblastomen (179) und in Pankreastumoren (155) verringert und dies zur Apoptose führt. Da dieser Effekt vermutlich über HSF1 initiiert wird, ist dies ein weiterer indirekter Beweis dafür, dass Triptolid ein adäquater pharmakologischer HSF1-Inhibitor ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals dargestellt werden, dass die Behandlung mit Triptolid zu der Reduktion des HSF1-Proteinlevels führt. Da es methodisch nur begrenzt möglich ist, jede Zelllinie und primäre MM-Zellen mit shRNA zu transfizieren, konnte mit dem Einsatz von Triptolid als dienlicher HSF1-Inhibitor ein größeres Spektrum an Zelllinien und von Patienten isolierten Myelomzellen untersucht werden. Bei den getesteten Zelllinien zeigten zwei Linien (AMO-1 und U266) eine flache Überlebenskurve. Beide Zelllinien wiesen allerdings eine niedrige HSF1-Proteinexpression auf. Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass die Menge des HSF1-Proteins relevant für die Erhaltung der überlebensnotwendigen zellulären Funktionen ist, bzw. Zellen die einen niedrigen HSF1-Proteinspiegel aufweisen nicht zwingend von HSF1 abhängig sind. Die Quantität des HSF1-Proteins könnte somit mit dem Ansprechen auf eine anti-HSF1 Therapie einhergehen. Durch Western Blot Analysen von Patientenproben (n=9) konnte das HSF1-Protein, wenn auch in unterschiedlich starker Ausprägung, in allen Probe nachgewiesen werden. Entsprechend wiesen die primären Myelomzellen ebenso keine Resistenz gegenüber der Triptolid-Behandlung auf. Auch die Ko-Kultivierung von primären Myelomzellen mit KMSZ führte zu keinem verminderten Ansprechen auf die HSF1-Inhibition, wobei die Viabilität der KMSZ nicht von der Triptolid-Behandlung beeinflusst wurden. Unsere Ergebnisse sind übereinstimmend mit Beobachtungen in anderen Tumorentitäten, die zeigen, dass Triptolid oder siRNA-vermittelter Knockdown von HSF1, Apoptose induziert (127, 147). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass durch HSF1-Depletion weitere anti-Tumor-Effekte, wie Proliferationsarrest, Seneszenz und Sensitivitätserhöhung gegenüber Chemotherapeutika, verursacht wird (125, 156, 180). Ein weites Spektrum an Tumorzellen wurde mittels shRNA-vermitteltem Knockdown untersucht, wodurch gezeigt werden konnte, dass die Inhibition von HSF1 in allen untersuchten Krebszelllinien eine Wirkung ausübte. Nicht-maligne Zellen, wie Brustepithelzellen und Lungenfibroblasten, waren hingegen nahezu

resistent gegenüber der HSF1-Depletion (122). Folglich sind in dieser Arbeit generierte Ergebnisse am MM mit dem Ergebnis aus soliden Tumormodellen vergleichbar, die zeigen, dass transformierte Zellen auf eine erhöhte Expression und somit Funktion von HSF1 angewiesen sind.

Genetischer Knockout von *Hsf1* in Mausmodellen zeigte, dass keine Hitzeschockantwort mehr möglich ist, die basalen Level der HSP (HSP90 und HSP70) aber erhalten bleiben (116). Unter standardisierten Laborbedingungen ist deswegen HSF1 für das Wachstum und Überleben der Mäuse erlässlich (181). Weibliche Tiere sind auf Grund der defekten Keimzellentwicklung infertil (182, 183). Obwohl die Tiere im Allgemeinen kleiner sind, weisen sie jedoch keine schwerwiegenden Organsystem-Abnormalitäten auf. Ohne akute Stressoren, wie erhöhte Temperaturen oder Endotoxine, haben sie eine normale Lebenserwartung. Die Lebenszeiten variieren aber bei den unterschiedlichen Mausstämmen (184). Jedoch stehen die generierten Ergebnisse in *Hsf1*-Knockout Mausmodellen in starkem Kontrast zu dem einfacheren Modellsystem *Caenorhabditis elegans*, in welchem der genetische Knockout des entsprechenden HSF1 Orthologs die Lebenserwartung signifikant verringert (185, 186). Warum es diesen Unterschied gibt, ist bisher unbekannt, weitere Forschung in diesem Bereich könnte aber zu Tage bringen, welche einzigartigen Aspekte der HSF1-Funktionen in Säugern zum Tragen kommen. Die bisherigen Ergebnisse, insbesondere die Erkenntnis, dass eine HSF1-Depletion nur geringe Auswirkungen auf nicht-maligne Zellen haben wird, würde eine anti-HSF1 Therapie in transformierten Zellen ermöglichen.

Insbesondere die Möglichkeit einer HSF1-Inhibition bei MM-Patienten wird durch die Tatsache unterstützt, dass *Hsf1*-Knockout Mäuse eine normale Bildung von B- und T-Lymphozyten im Thymus oder in peripheren Lymphorganen haben (187). Auch die Isolation der B- und T-Lymphozyten und die anschließende Kultivierung *in vitro* zeigte, dass es keinen Unterschied in der Proliferation von Wildtyp und *Hsf1*-Knockout Zellen gibt (188). Diese Erkenntnisse implizieren, dass eine anti-HSF1 Therapie bei MM-Patienten hauptsächlich Effekte in den malignen Zellen erzielen wird und somit unerwünschte Nebenwirkungen minimiert werden können.

Da die Initiation der Transkription meist durch mehrere Faktoren reguliert wird (Transkriptionskomplexe) und insbesondere das Zusammenspiel von HSF1 und HSF2 für die Art der Stressinduktion eine Rolle zu spielen scheint (109, 189), wurde HSF2 als Ko-regulatorischer Transkriptionsfaktor untersucht. HSF2 kann bei der

Entwicklung neuer Therapieansätze ebenso ein nützliches Ziel sein, da beschrieben wurde, dass HSF2 durch Proteasom-Inhibition aktiviert werden kann und dies eine Stressantwort auslöst. (112, 190). Es kommt zu einer Induktion von HSP, was wiederum eine Resistenz gegenüber der Behandlung herbeiführen kann (191). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in *Hsf2*-Knockout Zellen die Proteasomenaktivität, durch die verminderte Expression bestimmter Proteasomenuntereinheiten, geringer ist (191). Der shRNA-vermittelte Knockdown von HSF2 hatte jedoch nur minimalen Einfluss auf das Zellüberleben der MM-Zellen. Ein kombinierter shRNA-vermittelter Knockdown von HSF1 und HSF2 potenzierte geringfügig die durch HSF1-Depletion erreichten Effekte. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von HSF1 zu einer Herunterregulation von HSF2 führt. Dieser Effekt wurde auch schon von anderen Gruppen beobachtet, der regulierende Mechanismus ist aber bisher unbekannt (112, 192).

5.3 HSF1-Depletion führt zur Abnahme der Expression multipler HSP

Sowohl die pharmakologische Inhibition von HSF1 mittels Triptolid, als auch der shRNA-vermittelte Knockdown von HSF1 führte zur fast vollständigen Reduktion des HSF1-Proteins. Da diese Abnahme in MM-Zellen Apoptose induziert, wurde untersucht, welchen Einfluss die HSF1-Depletion auf die Expression der nachgeschalteten Proteine hat. Da HSF1 der Master-Regulator der HSP-Synthese ist, standen diese hier im Fokus. Unter Stressbedingungen wird ihre Synthese verstärkt, um einerseits die Reparatur und Re-Faltung beschädigter Polypeptide zu unterstützen (193), andererseits die Klientenproteine, die für den Erhalt von komplexen Signalwegen zuständig sind, zu stabilisieren (194, 195). Darüber hinaus können HSP70 und HSP27 den programmierten Zelltod inhibieren, indem sie direkt in den Caspase-abhängigen Apoptose-Signalweg eingreifen (172). Diese Funktionen ergeben einen zytoprotektiven Effekt, der auch einen Vorteil für transformierte Zellen darstellt. So findet man oft erhöhte HSP-Expression in Tumorzellen, auch im MM (138, 196). Ob die aberrant hohe HSP-Expression in Tumorzellen auch hauptsächlich über HSF1 vermittelt wird, ist bisher aber noch unklar.

Zunächst wurde nach shRNA-vermitteltem Knockdown ein *Gene Expression Profiling* (GEP) mittels Affymetrix Microarrays durchgeführt. Überraschenderweise zeigte das GEP, dass außerordentlich viele Gene reguliert waren. Denkbar ist, dass durch die

Induktion der Apoptose zusätzlich viele Gene indirekt reguliert waren und es auf diese Weise zu zahlreichen „falsch positiven“ Genexpressionsveränderungen kommt. Da die Bedeutung von HSP90 und HSP70 für das MM bereits bekannt ist (138, 139, 142), wurde zunächst der Fokus der Analyse auf die Regulation verschiedener HSP gelegt. Hierbei wurde festgestellt, dass die Expression weiterer HSP, wie HSP27, HSP40 und 40-4 stark herabgesetzt war. Da im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden konnte, welche weiteren Genregulationen direkt durch HSF1 oder indirekt durch die Induktion der Apoptose herbeigeführt wurden, wurden nur die HSP weiter betrachtet. Dennoch wurde aber durch die GEP-Analyse erkennbar, dass HSF1 durch die Regulation einer Vielzahl von Genen, die an biologischen Prozessen beteiligt sind, die zellulären Funktionen der MM Zellen unterstützt. Zu entsprechendem Ergebnis kamen auch Page und Kollegen (2006), die Genomweite Analysen an HeLa Zellen durchführten (197). Für spezifischere Aussagen muss in Nachfolgeprojekten weitere Analysen des GEP durchgeführt werden.

Alle weiteren Untersuchungen der HSF1/HSP-Regulation wurden auf Proteinebene mit Western Blot-Analysen durchgeführt. Auch hier führten der shRNA-vermittelte Knockdown sowie die pharmakologische Inhibition von HSF1 in MM-Zellen zu einer Abnahme der HSP. Hierbei waren die stark exprimierten HSP90 α und HSP90 β , sowie HSP73 nur schwach herunterreguliert, wohingegen es zu einer drastischen Abnahme bei den HSP72, HSP40 und HSP27 kam. Diese Gruppe umfasst die induzierbaren HSP, die nach Hitzeschock und pharmakologischer Behandlung am stärksten hoch reguliert wurden. Genomweite Analysen an Wildtyp und *Hsf1*-Knockout MEFs sowie an drei humanen Zelllinien haben gezeigt, dass diese HSP nach Hitzeschock mit am stärksten induziert werden (110). Somit ist speziell diese Gruppe im MM aberrant, streng HSF1-abhängig, überexprimiert. Jedoch sind im MM auch die basalen Level der konstitutiv stark exprimierten HSP (HSP90 α/β und HSP73) nach HSF1-Depletion verringert worden. Dies steht im Gegensatz zu anderen Krebszelllinien, bei denen eine Reduktion der HSP durch Knockdown von HSF1 nicht erreicht werden konnte (116). In einem Pankreastumormodell wurde eine Abnahme der HSP90, HSP70 und HSP27 beobachtet, jedoch wurden diese Daten mit einem von dieser Gruppe generierten Inhibitor erhoben und nicht mittels siRNA verifiziert (198). Die strenge Abhängigkeit der überexprimierten HSP von HSF1 ist daher ein Charakteristikum des MM.

Speziell HSP90 und HSP70 wurde im MM untersucht und es wurde gezeigt, dass diese HSP essenziell für das Zellüberleben sind (138, 139, 142). Aber auch die Bedeutung von HSP27 für das Entstehen von Resistenzmechanismen, wurden im MM beschrieben (199-201). Da die konstitutiv stark exprimierten HSP (HSP90 und HSP73) nach HSF1-Knockdown nur gering abnahmen, wurde weiterhin der Einfluss der HSP40 und HSP27 auf das Zellüberleben untersucht. HSP40 ist ein wichtiges Ko-Chaperon von HSP70. Die HSP70 Chaperon-Aktivität wird durch die Bindung der Ko-Chaperone (HSP40/HSP40-4) am C-terminus von HSP70 verstärkt. Zunächst bindet HSP40 die ungefalteten Proteine und transferiert diese zu HSP70. Nachdem der Transfer beendet ist, dissoziiert HSP40 aus dem HSP70 Komplex und unterstützt die Hydrolyse des HSP70 gebundenen ATPs (202, 203). HSP40 stimuliert die ATPase-Aktivität von HSP70 und stabilisiert so die Substrat-gebundene Form (204, 205). Im Vergleich zu anderen HSP ist HSP40 nur wenig untersucht. Jedoch wurde erst kürzlich auch ihnen eine Überexpression und Funktion in transformierten Zellen zugeschrieben, über ihre physiologische Rolle ist jedoch weiterhin wenig bekannt (206). HSP27 ist im Gegensatz zu den meisten Chaperonen ATP-unabhängig. Es kann sich an ungefaltete Proteine anlagern und hält diese in einem „faltungsbereiten“ Zustand. Die Chaperonaktivität von HSP27 wird durch Phosphorylierung und Oligomerisation nach einem Stress-Auslöser reguliert (207). Wie andere Chaperone ist HSP27 ein Überlebensfaktor und spielt bei der Regulation der Apoptose eine wichtige Rolle (172). Nach shRNA-vermitteltem Knockdown der jeweiligen HSP konnte eine Apoptoserate von 30 – 60 % (Variabilität bei den Zelllinien) erreicht werden. Da jede einzelne HSP-Inhibition Auswirkungen auf das Überleben oder der Proliferation von MM-Zellen hat, schlussfolgern wir daraus, dass das gleichzeitige Eliminieren multipler HSP zu einem summierten starken apoptotischen Effekt führt.

5.4 Das HSF1/HSP-Stresssystem ist in MM-Zellen noch funktionsfähig

Wie bisher gezeigt werden konnte, sind in MM-Zellen, im Gegensatz zu nicht-malignen Plasmazellen, HSF1 und HSP aberrant hoch exprimiert. Da dies auf ein dereguliertes Stresssystem hinweist, wurde untersucht, wie MM-Zellen auf thermalen Stress (Hitzeschock) reagieren. Nach einem Hitzeschock wurden in nicht-malignen B-Zellen und MM-Zellen, die gleichen HSP (HSP72, HSP40 und HSP27) induziert. Dies zeigt, dass trotz einer offensichtlichen Fehlregulation des HSF1/HSP-

Systems die ursprüngliche Eigenschaft, die Stressantwort, erhalten ist. Dies ist von großer therapeutischer Bedeutung, da pharmakologische Inhibitoren, wie Proteasom-, HSP90- und HDAC-Inhibitoren dieses Stresssystem ebenso aktivieren und eine kompensatorische HSP-Expression hervorrufen können (139, 178, 190, 208-210). Diese Reaktion konnte auch in den hier untersuchten Zelllinien beobachtet werden. Der HSP-Anstieg nach Behandlung mit pharmakologischen Inhibitoren wurde assoziiert mit einem potenziellen Rettungsmechanismus und einem entstehenden Resistenzverhalten gegenüber der Behandlung (139, 178, 208, 209, 211, 212). Weiterhin kann die Detektion der erhöhten HSP nach Behandlung eines Patienten als Marker für das Ansprechen gegenüber der Therapie verwendet werden (213). Diese Versuche sind ein Indiz dafür, dass die thermale und die pharmakologische Induktion der HSP-Synthese streng HSF1-abhängig sind und somit durch HSF1-Modulation beeinflussbar sein könnten. Um dies näher zu untersuchen, wurde HSF1 einerseits durch eine Behandlung mit Triptolid und andererseits durch shRNA-vermittelten Knockdown depletiert und anschließend mit einem HSP90- und einem Proteasom-Inhibitor (NVP-AUY922 und Bortezomib) behandelt. Mit beiden Ansätzen konnte eine Induktion der HSP-Synthese nahezu vollständig inhibiert werden. Damit konnte gezeigt werden, dass die Modulation von HSF1 Auswirkungen auf chemotherapeutische Behandlungsansätze haben kann.

5.5 Pharmakologische Inhibition von HSF1 mit Triptolid verstärkt den apoptotischen Effekt von NVP-AUY922 und Bortezomib

Der Einsatz von Proteasom-Inhibitoren in der MM-Therapie hatte durchschlagenden Erfolg. Kombinationstherapien mit Bortezomib werden immer häufiger gewählt, insbesondere bei der Therapie relapsierender Myelompatienten (214). Die Behandlung mit Proteasom-Inhibitoren aktiviert aber auch das HSF1/HSP-System. Die Inhibition der Proteindegradationsmaschinerie und die daraus resultierenden Akkumulation der Proteine wirkt als Stresssignal und aktiviert die Synthese der HSP (178, 208, 215). Ein weiterer neuer und viel versprechender Ansatzpunkt in der Krebstherapie ist die pharmakologische Inhibition von HSP90 (216). Basierend auf das benzochinoide Ansamycin *Geldanamycin* wurden bisher zahlreiche Derivate generiert und getestet (insbesondere 17-AAG und 17-DMAG). Diese Substanzen

blockieren die ATP-Bindestelle von HSP90 und inaktivieren so die intrinsische ATPase-Aktivität. Die Bildung eines multimeren HSP90-Chaperonkomplex wird dadurch verhindert und das Chaperoning von Klientenproteinen gestört. Diese werden dann für die proteasomale Degradation gekennzeichnet und abgebaut (217, 218). *In vitro* Studien im MM bewiesen die Abhängigkeit der MM-Zellen von HSP90 (139, 160, 219). Als einzelnes Agens konnte der HSP90-Inhibitor Tanespimycin (17-AAG) aber in einer Phase I/II Studie nur geringe Effekte erzielen (140), jedoch erzielte die Kombination mit Bortezomib ein besseres klinisches Ansprechen als die Einzelsubstanzen (141). Es wurde beobachtet, dass die Kombination beider Einzelsubstanzen, zu einer dramatischen Erhöhung der ubiquitinierten Proteine führt. Daraufhin kommt es zu einer Überlastung und folglich, zu einer Funktionsverminderung des Endoplasmatischen Retikulums (139). Zusätzlich wurde gezeigt, dass Tanespimycin Wirkung auf die „*unfolded protein response*“ hat (220). Somit erreichen die HSP90- und die Proteasom-Inhibition das gleiche Zielsystem, was die initiale Idee der Kombination beider Substanzen begründet.

Auch die HSP90-Inhibition führt zur Induktion der HSP-Synthese. HSF1 ist unter normalen Zellbedingungen an HSP90 gebunden, wird aber HSP90 inhibiert, löst sich dieser Komplex und HSF1 wird als Transkriptionsfaktor aktiv (221-223). Durch diese Aktivierung des HSF/HSP-Netzwerks wird kompensatorisch die Induktion anderer HSP eingeleitet, um so die Behandlung zu überleben. Die pharmakologische HSF1-Inhibition mit Triptolid zeigte, dass die Kombination der HSF1-Blockade mit der Proteasom- oder HSP90-Inhibition zu einem verstärkten apoptotischem Effekt führt. Dieses Ergebnis bestätigt Beobachtungen von anderen Arbeitsgruppen, die zeigten, dass die HSF1-Inhibition zur Sensitivierung gegenüber anderen, HSP-induzierenden, Therapien führt (156, 192, 224).

5.6 Ausblick

Ein komplexes onkogenes Signalnetzwerk trägt zu der Entstehung und Entwicklung des MM maßgebend bei. Dieses Netzwerk wird durch genetische Abberationen und dem Knochenmark-Mikromilieu stimuliert. Zahlreiche Untersuchungen von Signalwegen, z.B. des RAS/MAPK/ERK- oder PI3K/AKT-Signalwegs, zeigten die Relevanz dieser Netzwerke für das Überleben der Myelomzellen auf (43, 225, 226). Interessanterweise sind es auch diese Signalwege, die in nicht-malignen Zellen

über Phosphorylierungen HSF1 aktivieren und deaktivieren können (227). So werden vor allem die HSF1-deaktivierenden Phosphorylierungen durch GSK-3 β (228), PKC-Isoformen (229) und durch ERK1 (230, 231) reguliert. Dadurch kann die onkogene Kinase AKT über die Modulation der inhibitorischen Phosphorylierung von GSK-3 β , die Aktivität von HSF1 beeinflussen (123, 232). AKT selbst unterstützt Transformationsprozesse und fungiert als wichtiges Überlebensprotein im MM (73). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass im MM die Blockade von PI3K zu einer Abnahme von HSF1 und folglich auch von HSP70 führt (142). Eine ähnliche Beobachtung konnte im Modell der CML gemacht werden, in welchem die Inhibition von AKT/GSK-3 β und die Aktivierung von ERK1/2 durch Resveratrol zu einer Reduktion von HSP70 führt (233). Allgemein stützen die durch HSF1 synthetisierten HSP als molekulare Chaperone einzelne Komponenten verschiedener Signalwege (wie z.B. AKT) und erhalten somit die Signalweiterleitung aufrecht (133, 234). Die Überexpression von HSP90 und HSP70 und die Bedeutung für das Überleben von MM-Zellen wurde bereits beschrieben (138, 139, 142, 235). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass weitere HSP Einfluss auf das Zellüberleben nehmen. Durch die Minderung der HSF1-Aktivität konnten multiple HSP inhibiert werden, was wiederum zur Destabilisation des onkogenen Signalnetzwerks im MM führen könnte. Mit der pharmakologischen HSP90-Inhibition wurde dieses Prinzip als therapeutischer Ansatzpunkt bereits aufgegriffen, jedoch hatte die Einzeltherapie im MM noch keinen durchschlagenden Erfolg (140). In *in vitro* Studien hat man bereits zeigen können, dass durch Kombinationsblockaden innerhalb des gleichen Systems, z.B. durch gleichzeitiger HSP70 und HSP90 oder HSP27/HSP90-Blockade, ein verbesserter therapeutischer Effekt erzielt werden kann (143, 236-238). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Blockade des übergeordneten Regulator, HSF1, jegliche HSP-Aktivität eingeschränkt wird und so eine kompensatorische Hochregulation weiterer HSP verhindert wird. Bis zum heutigen Tage gibt es noch keinen geeigneten, spezifischen, klinisch anwendbaren HSF1-Inhibitor. Triptolid ist auf Grund der schlechten Wasserlöslichkeit und dem schnellen Abbau zurzeit noch nicht klinisch einsetzbar (147), mit neuen Derivaten soll aber eine bessere Bioverfügbarkeit erreicht werden (239, 240).

Abschließend konnte aber nicht geklärt werden warum HSF1 im MM überexprimiert ist. Denkbar ist, dass der erhöhte proteotoxische Stress, der in Tumorzellen vorherrscht, eine erhöhte Aktivierung des Hitzeschock-Stresssystems bedingt. Ein

wichtiger Faktor hierfür wäre auch das Vorkommen von Aneuploidien in MM-Zellen. Aneuploidie führt in Krebszellen zu einem bedeutenden Ungleichgewicht von Komponenten zahlreicher Proteinkomplexe. So konnte in Hefe-Zellen gezeigt werden, dass eine zusätzliche Kopie eines einzelnen Chromosomes ausreicht um die Hitzeschockantwort auszulösen (241). Dies führt wiederum zur Synthese der HSP und ermöglicht so die Adaption an diese Stresssituation. Eine erhöhte Aktivität des HSF1/HSP-Netzwerks kann auch durch genetische Abberationen initiiert sein. So ist beschrieben, dass HSF1 durch das Signaling via der Kinasen der onkogenen erbB-Familie aktiviert wird (123). Es konnte gezeigt werden, dass Heregulin- β 1 an die Zelloberfläche von Brustkrebszellen bindet und das zu einer erhöhten HSP-Expression führt. Dies führt dann wiederum zu einem verstärkten Zellüberleben und unterstützt die Transformation durch die Stabilisation von HSF1. Heregulin aktiviert HSF1 durch einen Signalweg, der durch HER2 und PI3K stimuliert wird. Da PI3K ein Schlüsselenzym in der malignen Progression, insbesondere durch seine Aktivierung über PTEN Mutationen und der Induktion von C-MYC ist, kann dieser Mechanismus wichtig sein für die erhöhte Expression der HSP in Tumoren (242). Allerdings kann das Onkogen C-MYC auch durch die direkte Promoterbindung (an die HSE) die wichtigsten HSP umgehend regulieren (243). So wurde gezeigt, dass C-MYC den *HSP90 α* Promoter aktivieren kann und dass die Inhibition dieser Interaktion die transformierende Eigenschaft von C-MYC mindert (244). Weiterhin wird die HSP-Expression auch durch die normale Funktion der Tumor-Suppressoren *TP53* oder *TP63* gezügelt, diese Funktion ist aber in vielen Tumoren durch Mutationen deaktiviert (133). Alle genannten Onkogene oder onkogene Signalwege spielen bei der Pathogenese des MM und der Krankheitsprogression eine Rolle. Ob diese Kombination oder einzelne Komponenten für die aberrante HSF/HSP-Aktivität verantwortlich sind, bleibt weiterhin zu untersuchen. Da aber die Aktivität der Signalwege einem komplexen *feedback loop* Mechanismus unterliegt, wird durch die Modulation von HSF1, der resultierenden Regulation multipler HSP und den folgenden Auswirkungen auf deren Klienten, eine pleiotrope Wirkung erzielt. Somit kann die anti-HSF1 Therapie, insbesondere in Kombination mit Proteasom- und HSP90-Inhibitoren, eine neue, hoffnungsvolle Therapieoption für MM Patienten sein.

6. Zusammenfassung

Die evolutionär hoch konservierte Hitzeschock-Antwort (*heat shock stress response*, HSR) ermöglicht Zellen sich an Stresssituationen anzupassen und so dem programmierten Zelltod zu entgehen. Die Regulation der HSR unterliegt dem Hitzeschock-Transkriptionsfaktor 1 (HSF1), der nach einem Stress-Impuls umgehend die Synthese der Hitzeschock-Proteine (HSP) initiiert. Als molekulare Chaperone assistieren die HSP bei der Faltung und den intrazellulären Transport ihrer Klientenproteine und erhalten so die lebensnotwendigen zellulären Funktionen aufrecht. Während das HSF1/HSP-System vorteilhaft für normale Zellen ist, kann es aber auch den Prozess der malignen Transformation unterstützen. In verschiedenen Tumorentitäten wurde eine Abhängigkeit der malignen Zellen von HSP, vereinzelt auch von HSF1, beschrieben. Im multiplen Myelom (MM) stabilisieren HSP u.a. Klientenproteine in einem komplexen onkogenen Signalnetzwerk und erhalten so eine aberrante Signalweiterleitung aufrecht. Wegen dieser wichtigen Funktion ist die Inhibition der HSP (insbesondere HSP90) bereits ein therapeutischer Ansatzpunkt, der jedoch im MM noch nicht zu dem erhofften Erfolg führte. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass es zu einer Induktion der HSP nach einer Behandlung mit neuen, antitumoralen Medikamenten (Proteasom-, HDAC- und HSP90-Inhibitoren) kommt. Diese kompensatorische Hochregulation der HSP ist assoziiert mit einem Resistenzverhalten gegenüber der Therapie und ist somit unerwünscht. Die bisherigen Untersuchungen legen aber auch nahe, dass HSF1 selbst eine wichtige Funktion bei der malignen Transformation einnimmt. So wurde gezeigt, dass der funktionelle Verlust von HSF1 vor der onkogenen *Ras* oder mutierten *Trp53* getriebenen Tumorigenese schützt. In der vorliegenden Arbeit wurden daher die Expression von HSF1, seine Rolle in der HSP-Regulierung und den Beitrag zum Überleben und Resistenzen in MM-Zellen analysiert.

Untersuchungen der HSF1-Expression in Knochenmarkbiopsien von Myelompatienten und in Myelomzelllinien zeigten, dass in ca. 50 % der untersuchten Biopsien und Zelllinien eine hohe HSF1-Expression vorhanden ist. Sowohl der shRNA-vermitteltem Knockdown von HSF1 als auch die pharmakologische Inhibition mit Triptolid induzierten Apoptose in MM-Zellen. Durch Microarrayanalysen nach

shRNA-vermitteltem Knockdown und der anschließenden Verifikation über Western Blot konnte gezeigt werden, dass nach der HSF1-Depletion zahlreiche HSP (HSP90, HSP70, HSP40 and HSP27) vermindert exprimiert wurden. Einzelne Knockdown Experimente der HSP40 und HSP27 führten zu moderaten Zellsterben, so dass geschlussfolgert werden kann, dass die gleichzeitige Minderung multipler HSP, durch die Depletion von HSF1, zu einem summierten starken apoptotischen Effekt führt.

In weiteren Studien stellte sich heraus, dass in MM-Zellen, trotz des deregulierten Systems und der aberrant hohen Expression der HSP, eine Stressantwort ausgelöst werden kann. Dies konnte durch den „klassischen“ Hitzeschock und durch die Behandlung mit pharmakologischen Inhibitoren von HSP90 und des Proteasoms erreicht werden. Diese unerwünschte Reaktion auf Therapeutika wird vermutlich durch einen kompensatorischen Zellrettungsmechanismus ausgelöst, der zu Resistenzen gegenüber der Behandlung führen kann. Durch die Inhibition von HSF1 mit Triptolid und durch shRNA-vermitteltem Knockdown, konnte diese zelluläre Antwort unterbunden werden. Darüber hinaus führte die pharmakologische Inhibition von HSF1 in Kombination mit HSP90 (mit NVP-AUY922) oder Proteasom-Inhibition (mit Bortezomib) zu einem verstärkten apoptotischen Effekt in MM-Zellen.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass HSF1 essenziell für die Regulation der HSP im MM ist. Darüber hinaus kann die Inhibition von HSF1, besonders in Kombination mit HSP90- oder Proteasom-Inhibition, eine neue hoffnungsvolle Therapieoption für Myelompatienten darstellen.

Summary

The heat shock stress response (HSR) represents an evolutionarily highly conserved salvage mechanism, which helps cells to cope with situations of stress and thus mediates protection from cell death. This stress response program is regulated by the heat shock transcription factor 1 (HSF1), which regulates expression and activity of heat shock proteins (HSPs). HSPs act as molecular chaperones to restore and maintain normal folding and intracellular trafficking of their cognate client proteins. The HSF1/HSP-controlled stress response can be beneficial in normal cells. However, its activation may also protect malignant cells from cell death induced by oncogene activation during malignant transformation or by drug-induced stress under therapeutic intervention. Various HSPs, as well as HSF1, have already been implicated in the pathogenesis of human cancer. In multiple myeloma (MM) HSPs stabilize components of a complex oncogenic signaling network, sustaining an aberrant signaling. In addition, an up-regulation of HSPs was reported after treatment with some new anti-MM agents, e.g. proteasome-, HDAC- and HSP90-inhibitors, suggesting that HSPs may contribute to drug resistance. For this reason, inhibition of HSPs (especially HSP90) is used as therapeutic approach. However, a clinical Phase I/II trial study showed that treatment with an HSP90 inhibitor as single agent had only limited anti-MM effects. Consequently, research effort is shifted towards blocking the induction of the heat shock stress response. For this purpose, HSF1 is regarded to be a promising target. Recently, it has been demonstrated that HSF1 contributes to malignant transformation in mouse models of tumorigenesis driven by oncogenic *Ras* or by functional loss of the *Trp53* tumor suppressor. In the present study we therefore investigated the expression of HSF1, analyzed its role in the regulation of HSPs and its contribution to the survival and drug resistance in MM cells.

We found that HSF1 protein was overexpressed in about half of the analyzed MM patient samples as well as in a majority of MM cell lines, whereas normal and premalignant MGUS plasma cells exhibited no or only weak HSF1 expression *in situ*. Both shRNA-mediated knockdown and pharmacological inhibition of HSF1 led to induction of apoptosis in MM cell lines and in primary MM cells. These results were affirmed by microarray analysis after shRNA-mediated knockdown and further

verified by western blots, which revealed a decrease in numerous HSP (HSP90, HSP70, HSP40 and HSP27) after HSF1 depletion. Furthermore, individual knockdown experiments of HSP40 and HSP27 resulted in moderate cell death, leading to the conclusion that the simultaneous reduction of multiple HSP, by the inhibition of HSF1, achieves an additive strong apoptotic effect in MM cells. To study the stress response system in MM cells, we performed heat shock experiments and applied pharmacological HSP90- and proteasome-inhibitors. Despite the aberrant high expression of HSP in MM cells, both treatments showed an induction of the HSR and a stimulation of the synthesis of HSP. This adverse response to therapeutic agents is probably due to an onset of a compensatory cell rescue mechanism that leads to drug resistance. However, we were able to suppress this cellular response by the inhibition of HSF1 with triptolide and shRNA-mediated knockdown. Moreover, the combination of pharmacological HSF1-inhibition and HSP90 (with NVP AUY922) or HSF1 and proteasome inhibition (with bortezomib) resulted in an increased apoptotic effect in MM cells. In summary, these results suggest an important role for HSF1 in the regulation of major HSPs. Furthermore, the inhibition of HSF1 represents a promising new treatment strategy for MM patients, particularly in combination with HSP90 or proteasome inhibitors.

7. Literaturverzeichnis

1. Stein H. Die neue WHO-Klassifikation der malignen Lymphome. *Der Pathologe* 2000; (212): 101-105.
2. Phekoo KJ, Schey SA, Richards MA, Bevan DH, Bell S, Gillett D, et al. A population study to define the incidence and survival of multiple myeloma in a National Health Service Region in UK. *Br J Haematol* 2004 Nov; 127(3): 299-304.
3. Harousseau JL, Dreyling M. Multiple myeloma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2008 May; 19 Suppl 2: ii55-57.
4. Durie BG. The epidemiology of multiple myeloma. *Semin Hematol* 2001 Apr; 38(2 Suppl 3): 1-5.
5. Brown LM, Gridley G, Check D, Landgren O. Risk of multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance among white and black male United States veterans with prior autoimmune, infectious, inflammatory, and allergic disorders. *Blood* 2008 Apr 1; 111(7): 3388-3394.
6. Deshpande HA, Hu XP, Marino P, Jan NA, Wiernik PH. Anticipation in familial plasma cell dyscrasias. *Br J Haematol* 1998 Dec; 103(3): 696-703.
7. Lynch HT, Watson P, Tarantolo S, Wiernik PH, Quinn-Laquer B, Isgur Bergsagel K, et al. Phenotypic heterogeneity in multiple myeloma families. *J Clin Oncol* 2005 Feb 1; 23(4): 685-693.
8. Pearce NE, Smith AH, Howard JK, Sheppard RA, Giles HJ, Teague CA. Case-control study of multiple myeloma and farming. *Br J Cancer* 1986 Sep; 54(3): 493-500.
9. Ichimaru M, Ishimaru T, Mikami M, Matsunaga M. Multiple myeloma among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki, 1950-76: relationship to radiation dose absorbed by marrow. *J Natl Cancer Inst* 1982 Aug; 69(2): 323-328.
10. Alexander DD, Mink PJ, Adami HO, Cole P, Mandel JS, Oken MM, et al. Multiple myeloma: a review of the epidemiologic literature. *Int J Cancer* 2007; 120 Suppl 12: 40-61.
11. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Offord JR, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2006 Mar 30; 354(13): 1362-1369.
12. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2002 Feb 21; 346(8): 564-569.

13. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003 Jun; 121(5): 749-757.
14. Terpos E, Politou M, Rahemtulla A. New insights into the pathophysiology and management of bone disease in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2003 Dec; 123(5): 758-769.
15. Berenson JR. Advances in the biology and treatment of myeloma bone disease. *Semin Oncol* 2002 Dec; 29(6 Suppl 17): 11-16.
16. Terpos E, Dimopoulos MA. Myeloma bone disease: pathophysiology and management. *Ann Oncol* 2005 Aug; 16(8): 1223-1231.
17. Russel J, Powlws,RL. The relationship between serum viscosity, hypervolaemia and clinical manifestations associated with circulating paraprotein. *British Journal of Hematology* 1978; (39): 163-175.
18. Jacobson DR, Zolla-Pazner S. Immunosuppression and infection in multiple myeloma. *Semin Oncol* 1986 Sep; 13(3): 282-290.
19. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 1975 Sep; 36(3): 842-854.
20. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005 May 20; 23(15): 3412-3420.
21. Giralt S, Stadtmauer EA, Harousseau JL, Palumbo A, Bensinger W, Comenzo RL, et al. International myeloma working group (IMWG) consensus statement and guidelines regarding the current status of stem cell collection and high-dose therapy for multiple myeloma and the role of plerixafor (AMD 3100). *Leukemia* 2009 Oct; 23(10): 1904-1912.
22. Bataille R, Harousseau JL. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 1997 Jun 5; 336(23): 1657-1664.
23. Alexanian R, Dimopoulos M. The treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med* 1994 Feb 17; 330(7): 484-489.
24. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N Engl J Med* 1996 Jul 11; 335(2): 91-97.
25. Munshi NC. Plasma cell disorders: an historical perspective. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2008: 297.

26. Palumbo A, Sezer O, Kyle R, Miguel JS, Orłowski RZ, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group guidelines for the management of multiple myeloma patients ineligible for standard high-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation. *Leukemia* 2009 Oct; 23(10): 1716-1730.
27. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Richardson PG, Hideshima T, et al. Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Blood* 2002 Jun 15; 99(12): 4525-4530.
28. D'Amato RJ, Loughnan MS, Flynn E, Folkman J. Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Apr 26; 91(9): 4082-4085.
29. Reece DE. Management of multiple myeloma: the changing landscape. *Blood Rev* 2007 Nov; 21(6): 301-314.
30. Xu W, Celeridad M, Sankar S, Webb DR, Bennett BL. CC-4047 promotes Th1 cell differentiation and reprograms polarized human Th2 cells by enhancing transcription factor T-bet. *Clin Immunol* 2008 Sep; 128(3): 392-399.
31. Wu L, Adams M, Carter T, Chen R, Muller G, Stirling D, et al. lenalidomide enhances natural killer cell and monocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-treated CD20+ tumor cells. *Clin Cancer Res* 2008 Jul 15; 14(14): 4650-4657.
32. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* 1999 May 15; 13(10): 1211-1233.
33. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005 Oct; 115(10): 2656-2664.
34. Suh DH, Kim MK, Kim HS, Chung HH, Song YS. Unfolded protein response to autophagy as a promising druggable target for anticancer therapy. *Ann N Y Acad Sci* 2012 Oct; 1271: 20-32.
35. Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest* 2002 Nov; 110(10): 1389-1398.
36. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, et al. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl J Med* 2005 Jun 16; 352(24): 2487-2498.
37. Hideshima T, Mitsiades C, Akiyama M, Hayashi T, Chauhan D, Richardson P, et al. Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood* 2003 Feb 15; 101(4): 1530-1534.
38. Boccadoro M, Morgan G, Cavenagh J. Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor bortezomib in cancer therapy. *Cancer Cell Int* 2005 Jun 1; 5(1): 18.

39. Richardson PG, Mitsiades C, Schlossman R, Ghobrial I, Hideshima T, Munshi N, et al. Bortezomib in the front-line treatment of multiple myeloma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2008 Jul; 8(7): 1053-1072.
40. Palumbo A, Hajek R, Delforge M, Kropff M, Petrucci MT, Catalano J, et al. Continuous lenalidomide treatment for newly diagnosed multiple myeloma. *N Engl J Med* 2012 May 10; 366(19): 1759-1769.
41. Wagner SD, Neuberger MS. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annu Rev Immunol* 1996; 14: 441-457.
42. Liu YJ, Banchereau J. Regulation of B-cell commitment to plasma cells or to memory B cells. *Semin Immunol* 1997 Aug; 9(4): 235-240.
43. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* 2002 Mar; 2(3): 175-187.
44. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood* 2007 Apr 15; 109(8): 3489-3495.
45. Bergsagel PL, Kuehl WM. Critical roles for immunoglobulin translocations and cyclin D dysregulation in multiple myeloma. *Immunol Rev* 2003 Aug; 194: 96-104.
46. Kuehl WM, Bergsagel PL. Early genetic events provide the basis for a clinical classification of multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005: 346-352.
47. Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ, Rajkumar SV, Hoyer JD, Lust JA, et al. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2002 Aug 15; 100(4): 1417-1424.
48. Claudio JO, Masih-Khan E, Stewart AK. Insights from the gene expression profiling of multiple myeloma. *Curr Hematol Rep* 2004 Jan; 3(1): 67-73.
49. Barlogie B, Shaughnessy J, Tricot G, Jacobson J, Zangari M, Anaissie E, et al. Treatment of multiple myeloma. *Blood* 2004 Jan 1; 103(1): 20-32.
50. Avet-Loiseau H, Soulier J, Fermand JP, Yakoub-Agha I, Attal M, Hulin C, et al. Impact of high-risk cytogenetics and prior therapy on outcomes in patients with advanced relapsed or refractory multiple myeloma treated with lenalidomide plus dexamethasone. *Leukemia* 2010 Mar; 24(3): 623-628.
51. Jagannath S, Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, et al. Bortezomib appears to overcome the poor prognosis conferred by chromosome 13 deletion in phase 2 and 3 trials. *Leukemia* 2007 Jan; 21(1): 151-157.
52. Walker BA, Leone PE, Chiecchio L, Dickens NJ, Jenner MW, Boyd KD, et al. A compendium of myeloma-associated chromosomal copy number abnormalities and their prognostic value. *Blood* 2010 Oct 14; 116(15): e56-65.

53. Morgan GJ, Walker BA, Davies FE. The genetic architecture of multiple myeloma. *Nat Rev Cancer* 2012 Apr 12.
54. Bezieau S, Devilder MC, Avet-Loiseau H, Mellerin MP, Puthier D, Pennarun E, et al. High incidence of N and K-Ras activating mutations in multiple myeloma and primary plasma cell leukemia at diagnosis. *Hum Mutat* 2001 Sep; 18(3): 212-224.
55. Shou Y, Martelli ML, Gabrea A, Qi Y, Brents LA, Roschke A, et al. Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 Jan 4; 97(1): 228-233.
56. Avet-Loiseau H, Li C, Magrangeas F, Gouraud W, Charbonnel C, Harousseau JL, et al. Prognostic significance of copy-number alterations in multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2009 Sep 20; 27(27): 4585-4590.
57. Walker BA, Wardell CP, Chiecchio L, Smith EM, Boyd KD, Neri A, et al. Aberrant global methylation patterns affect the molecular pathogenesis and prognosis of multiple myeloma. *Blood* 2011 Jan 13; 117(2): 553-562.
58. Roccaro AM, Sacco A, Thompson B, Leleu X, Azab AK, Azab F, et al. MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma. *Blood* 2009 Jun 25; 113(26): 6669-6680.
59. Marango J, Shimoyama M, Nishio H, Meyer JA, Min DJ, Sirulnik A, et al. The MMSET protein is a histone methyltransferase with characteristics of a transcriptional corepressor. *Blood* 2008 Mar 15; 111(6): 3145-3154.
60. Annunziata CM, Davis RE, Demchenko Y, Bellamy W, Gabrea A, Zhan F, et al. Frequent engagement of the classical and alternative NF-kappaB pathways by diverse genetic abnormalities in multiple myeloma. *Cancer Cell* 2007 Aug; 12(2): 115-130.
61. Keats JJ, Fonseca R, Chesi M, Schop R, Baker A, Chng WJ, et al. Promiscuous mutations activate the noncanonical NF-kappaB pathway in multiple myeloma. *Cancer Cell* 2007 Aug; 12(2): 131-144.
62. Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 1998 Jan 1; 91(1): 3-21.
63. Klein B. Cytokine, cytokine receptors, transduction signals, and oncogenes in human multiple myeloma. *Semin Hematol* 1995 Jan; 32(1): 4-19.
64. Chatterjee M, Stühmer T, Herrmann P, Bommert K, Dörken B, Bargou RC. 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* 2004 Dec 1; 104(12): 3712-3721.

65. Bharti AC, Shishodia S, Reuben JM, Weber D, Alexanian R, Raj-Vadhan S, et al. Nuclear factor-kappaB and STAT3 are constitutively active in CD138+ cells derived from multiple myeloma patients, and suppression of these transcription factors leads to apoptosis. *Blood* 2004 Apr 15; 103(8): 3175-3184.
66. Trikha M, Corringham R, Klein B, Rossi JF. Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence. *Clin Cancer Res* 2003 Oct 15; 9(13): 4653-4665.
67. Steinbrunn T, Stühmer T, Gattenlöhner S, Rosenwald A, Mottok A, Unzicker C, et al. Mutated RAS and constitutively activated Akt delineate distinct oncogenic pathways, which independently contribute to multiple myeloma cell survival. *Blood* 2011 Feb 10; 117(6): 1998-2004.
68. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 1998 Sep 1; 334 (Pt 2): 297-314.
69. Ogata A, Chauhan D, Teoh G, Treon SP, Urashima M, Schlossman RL, et al. IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J Immunol* 1997 Sep 1; 159(5): 2212-2221.
70. Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* 2007 Aug; 7(8): 585-598.
71. Demchenko YN, Kuehl WM. A critical role for the NFkB pathway in multiple myeloma. *Oncotarget* 2010 May; 1(1): 59-68.
72. Chapman MA, Lawrence MS, Keats JJ, Cibulskis K, Sougnez C, Schinzel AC, et al. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* 2011 Mar 24; 471(7339): 467-472.
73. Zöllinger A, Stühmer T, Chatterjee M, Gattenlöhner S, Haralambieva E, Müller-Hermelink HK, et al. Combined functional and molecular analysis of tumor cell signaling defines 2 distinct myeloma subgroups: Akt-dependent and Akt-independent multiple myeloma. *Blood* 2008 Oct 15; 112(8): 3403-3411.
74. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Richardson PG, Hideshima T, et al. Biologic sequelae of nuclear factor-kappaB blockade in multiple myeloma: therapeutic applications. *Blood* 2002 Jun 1; 99(11): 4079-4086.
75. Lindquist S. The heat-shock response. *Annu Rev Biochem* 1986; 55: 1151-1191.
76. Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988; 22: 631-677.
77. Wiederrecht G, Seto D, Parker CS. Isolation of the gene encoding the *S. cerevisiae* heat shock transcription factor. *Cell* 1988 Sep 9; 54(6): 841-853.

78. Rabindran SK, Giorgi G, Clos J, Wu C. Molecular cloning and expression of a human heat shock factor, HSF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 Aug 15; 88(16): 6906-6910.
79. Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010 Aug; 11(8): 545-555.
80. Jedlicka P, Mortin MA, Wu C. Multiple functions of Drosophila heat shock transcription factor in vivo. *EMBO J* 1997 May 1; 16(9): 2452-2462.
81. Fujimoto M, Izu H, Seki K, Fukuda K, Nishida T, Yamada S, et al. HSF4 is required for normal cell growth and differentiation during mouse lens development. *EMBO J* 2004 Oct 27; 23(21): 4297-4306.
82. Takaki E, Fujimoto M, Sugahara K, Nakahari T, Yonemura S, Tanaka Y, et al. Maintenance of olfactory neurogenesis requires HSF1, a major heat shock transcription factor in mice. *J Biol Chem* 2006 Feb 24; 281(8): 4931-4937.
83. Damberger FF, Pelton JG, Harrison CJ, Nelson HC, Wemmer DE. Solution structure of the DNA-binding domain of the heat shock transcription factor determined by multidimensional heteronuclear magnetic resonance spectroscopy. *Protein Sci* 1994 Oct; 3(10): 1806-1821.
84. Harrison CJ, Bohm AA, Nelson HC. Crystal structure of the DNA binding domain of the heat shock transcription factor. *Science* 1994 Jan 14; 263(5144): 224-227.
85. Vuister GW, Kim SJ, Orosz A, Marquardt J, Wu C, Bax A. Solution structure of the DNA-binding domain of Drosophila heat shock transcription factor. *Nat Struct Biol* 1994 Sep; 1(9): 605-614.
86. Bulman AL, Hubl ST, Nelson HC. The DNA-binding domain of yeast heat shock transcription factor independently regulates both the N- and C-terminal activation domains. *J Biol Chem* 2001 Oct 26; 276(43): 40254-40262.
87. Sorger PK, Nelson HC. Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif. *Cell* 1989 Dec 1; 59(5): 807-813.
88. Chen Y, Barlev NA, Westergaard O, Jakobsen BK. Identification of the C-terminal activator domain in yeast heat shock factor: independent control of transient and sustained transcriptional activity. *EMBO J* 1993 Dec 15; 12(13): 5007-5018.
89. Rabindran SK, Haroun RI, Clos J, Wisniewski J, Wu C. Regulation of heat shock factor trimer formation: role of a conserved leucine zipper. *Science* 1993 Jan 8; 259(5092): 230-234.
90. Jurivich DA, Sistonen L, Kroes RA, Morimoto RI. Effect of sodium salicylate on the human heat shock response. *Science* 1992 Mar 6; 255(5049): 1243-1245.
91. Shi Y, Kroeger PE, Morimoto RI. The carboxyl-terminal transactivation domain of heat shock factor 1 is negatively regulated and stress responsive. *Mol Cell Biol* 1995 Aug; 15(8): 4309-4318.

92. Newton EM, Knauf U, Green M, Kingston RE. The regulatory domain of human heat shock factor 1 is sufficient to sense heat stress. *Mol Cell Biol* 1996 Mar; 16(3): 839-846.
93. Holmberg CI, Tran SE, Eriksson JE, Sistonen L. Multisite phosphorylation provides sophisticated regulation of transcription factors. *Trends Biochem Sci* 2002 Dec; 27(12): 619-627.
94. Hietakangas V, Ahlskog JK, Jakobsson AM, Hellesuo M, Sahlberg NM, Holmberg CI, et al. Phosphorylation of serine 303 is a prerequisite for the stress-inducible SUMO modification of heat shock factor 1. *Mol Cell Biol* 2003 Apr; 23(8): 2953-2968.
95. Hietakangas V, Anckar J, Blomster HA, Fujimoto M, Palvimo JJ, Nakai A, et al. PDSM, a motif for phosphorylation-dependent SUMO modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Jan 3; 103(1): 45-50.
96. Guettouche T, Boellmann F, Lane WS, Voellmy R. Analysis of phosphorylation of human heat shock factor 1 in cells experiencing a stress. *BMC Biochem* 2005; 6: 4.
97. Westerheide SD, Anckar J, Stevens SM, Jr., Sistonen L, Morimoto RI. Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science* 2009 Feb 20; 323(5917): 1063-1066.
98. Wu C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 441-469.
99. Morimoto RI. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 1993 Mar 5; 259(5100): 1409-1410.
100. Baler R, Dahl G, Voellmy R. Activation of human heat shock genes is accompanied by oligomerization, modification, and rapid translocation of heat shock transcription factor HSF1. *Mol Cell Biol* 1993 Apr; 13(4): 2486-2496.
101. Sarge KD, Murphy SP, Morimoto RI. Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor 1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol Cell Biol* 1993 Mar; 13(3): 1392-1407.
102. Pelham HR. A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp 70 heat-shock gene. *Cell* 1982 Sep; 30(2): 517-528.
103. Amin J, Ananthan J, Voellmy R. Key features of heat shock regulatory elements. *Mol Cell Biol* 1988 Sep; 8(9): 3761-3769.
104. Shi Y, Mosser DD, Morimoto RI. Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev* 1998 Mar 1; 12(5): 654-666.
105. Guo Y, Guettouche T, Fenna M, Boellmann F, Pratt WB, Toft DO, et al. Evidence for a mechanism of repression of heat shock factor 1 transcriptional activity by a multichaperone complex. *J Biol Chem* 2001 Dec 7; 276(49): 45791-45799.

106. Xia W, Guo Y, Vilaboa N, Zuo J, Voellmy R. Transcriptional activation of heat shock factor HSF1 probed by phosphopeptide analysis of factor 32P-labeled in vivo. *J Biol Chem* 1998 Apr 10; 273(15): 8749-8755.
107. Anckar J, Hietakangas V, Denessiouk K, Thiele DJ, Johnson MS, Sistonen L. Inhibition of DNA binding by differential sumoylation of heat shock factors. *Mol Cell Biol* 2006 Feb; 26(3): 955-964.
108. Xu YM, Huang DY, Chiu JF, Lau AT. Post-Translational Modification of Human Heat Shock Factors and Their Functions: A Recent Update by Proteomic Approach. *J Proteome Res* 2012 Apr 11.
109. Ostling P, Bjork JK, Roos-Mattjus P, Mezger V, Sistonen L. Heat shock factor 2 (HSF2) contributes to inducible expression of hsp genes through interplay with HSF1. *J Biol Chem* 2007 Mar 9; 282(10): 7077-7086.
110. Trinklein ND, Murray JI, Hartman SJ, Botstein D, Myers RM. The role of heat shock transcription factor 1 in the genome-wide regulation of the mammalian heat shock response. *Mol Biol Cell* 2004 Mar; 15(3): 1254-1261.
111. Mathew A, Mathur SK, Jolly C, Fox SG, Kim S, Morimoto RI. Stress-specific activation and repression of heat shock factors 1 and 2. *Mol Cell Biol* 2001 Nov; 21(21): 7163-7171.
112. Sandqvist A, Bjork JK, Akerfelt M, Chitikova Z, Grichine A, Vourc'h C, et al. Heterotrimerization of heat-shock factors 1 and 2 provides a transcriptional switch in response to distinct stimuli. *Mol Biol Cell* 2009 Mar; 20(5): 1340-1347.
113. Xing H, Wilkerson DC, Mayhew CN, Lubert EJ, Skaggs HS, Goodson ML, et al. Mechanism of hsp70i gene bookmarking. *Science* 2005 Jan 21; 307(5708): 421-423.
114. Wilkerson DC, Skaggs HS, Sarge KD. HSF2 binds to the Hsp90, Hsp27, and c-Fos promoters constitutively and modulates their expression. *Cell Stress Chaperones* 2007 Autumn; 12(3): 283-290.
115. Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 2005 Oct; 5(10): 761-772.
116. Whitesell L, Lindquist S. Inhibiting the transcription factor HSF1 as an anticancer strategy. *Expert Opin Ther Targets* 2009 Apr; 13(4): 469-478.
117. Buchner J. Hsp90 & Co. - a holding for folding. *Trends Biochem Sci* 1999 Apr; 24(4): 136-141.
118. Netzer WJ, Hartl FU. Protein folding in the cytosol: chaperonin-dependent and -independent mechanisms. *Trends Biochem Sci* 1998 Feb; 23(2): 68-73.
119. Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003 Feb; 228(2): 111-133.

120. Sreedhar AS, Csermely P. Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2004 Mar; 101(3): 227-257.
121. Solimini NL, Luo J, Elledge SJ. Non-oncogene addiction and the stress phenotype of cancer cells. *Cell* 2007 Sep 21; 130(6): 986-988.
122. Dai C, Whitesell L, Rogers AB, Lindquist S. Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. *Cell* 2007 Sep 21; 130(6): 1005-1018.
123. Khaleque MA, Bharti A, Sawyer D, Gong J, Benjamin IJ, Stevenson MA, et al. Induction of heat shock proteins by heregulin beta1 leads to protection from apoptosis and anchorage-independent growth. *Oncogene* 2005 Sep 29; 24(43): 6564-6573.
124. Zhao YH, Zhou M, Liu H, Ding Y, Khong HT, Yu D, et al. Upregulation of lactate dehydrogenase A by ErbB2 through heat shock factor 1 promotes breast cancer cell glycolysis and growth. *Oncogene* 2009 Oct 22; 28(42): 3689-3701.
125. Meng L, Gabai VL, Sherman MY. Heat-shock transcription factor HSF1 has a critical role in human epidermal growth factor receptor-2-induced cellular transformation and tumorigenesis. *Oncogene* 2010 Sep 16; 29(37): 5204-5213.
126. Hoang A. A Novel Association between the Human Heat Shock Transcription Factor 1 (HSF1) and Prostate Adenocarcinoma *The American Journal of Pathology* 2000; 156(3).
127. Dudeja V, Chugh RK, Sangwan V, Skube SJ, Mujumdar NR, Antonoff MB, et al. Prosurvival role of heat shock factor 1 in the pathogenesis of pancreatobiliary tumors. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011 Jun; 300(6): G948-955.
128. Fang F, Chang R, Yang L. Heat shock factor 1 promotes invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer* 2011 Aug 25.
129. Jin Y, Zhen Y, Haugsten EM, Wiedlocha A. The driver of malignancy in KG-1a leukemic cells, FGFR1OP2-FGFR1, encodes an HSP90 addicted oncoprotein. *Cell Signal* 2011 Nov; 23(11): 1758-1766.
130. Woo HG, Park ES, Lee JS, Lee YH, Ishikawa T, Kim YJ, et al. Identification of potential driver genes in human liver carcinoma by genomewide screening. *Cancer Res* 2009 May 1; 69(9): 4059-4066.
131. Ishiwata J, Kasamatsu A, Sakuma K, Iyoda M, Yamatoji M, Usukura K, et al. State of heat shock factor 1 expression as a putative diagnostic marker for oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 2012 Jan; 40(1): 47-52.
132. Santagata S, Hu R, Lin NU, Mendillo ML, Collins LC, Hankinson SE, et al. High levels of nuclear heat-shock factor 1 (HSF1) are associated with poor prognosis in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 Nov 8; 108(45): 18378-18383.

133. Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci* 2006 Mar; 31(3): 164-172.
134. Dai C, Whitesell L. HSP90: a rising star on the horizon of anticancer targets. *Future Oncol* 2005 Aug; 1(4): 529-540.
135. Solit DB, Rosen N. Hsp90: a novel target for cancer therapy. *Curr Top Med Chem* 2006; 6(11): 1205-1214.
136. Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, Zhang L, Boehm MF, Fritz LC, et al. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* 2003 Sep 25; 425(6956): 407-410.
137. Allegra A, Sant'antonio E, Penna G, Alonci A, D'Angelo A, Russo S, et al. Novel therapeutic strategies in multiple myeloma: role of the heat shock protein inhibitors. *Eur J Haematol* 2011 Feb; 86(2): 93-110.
138. Chatterjee M, Jain S, Stühmer T, Andrulis M, Ungethum U, Kuban RJ, et al. STAT3 and MAPK signaling maintain overexpression of heat shock proteins 90alpha and beta in multiple myeloma cells, which critically contribute to tumor-cell survival. *Blood* 2007 Jan 15; 109(2): 720-728.
139. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Kung AL, Davies FE, et al. Antimyeloma activity of heat shock protein-90 inhibition. *Blood* 2006 Feb 1; 107(3): 1092-1100.
140. Richardson PG, Chanan-Khan AA, Alsina M, Albitar M, Berman D, Messina M, et al. Tanespimycin monotherapy in relapsed multiple myeloma: results of a phase 1 dose-escalation study. *Br J Haematol* 2010 Aug; 150(4): 438-445.
141. Richardson PG, Chanan-Khan AA, Lonial S, Krishnan AY, Carroll MP, Alsina M, et al. Tanespimycin and bortezomib combination treatment in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: results of a phase 1/2 study. *Br J Haematol* 2011 Jun; 153(6): 729-740.
142. Chatterjee M, Andrulis M, Stühmer T, Müller E, Hofmann C, Steinbrunn T, et al. The PI3K/Akt signalling pathway regulates the expression of Hsp70, which critically contributes to Hsp90-chaperone function and tumor cell survival in multiple myeloma. *Haematologica* 2012 Oct 12.
143. Powers MV, Clarke PA, Workman P. Dual targeting of HSC70 and HSP72 inhibits HSP90 function and induces tumor-specific apoptosis. *Cancer Cell* 2008 Sep 9; 14(3): 250-262.
144. Chauhan D, Li G, Podar K, Hideshima T, Shringarpure R, Catley L, et al. The bortezomib/proteasome inhibitor PS-341 and triterpenoid CDDO-Im induce synergistic anti-multiple myeloma (MM) activity and overcome bortezomib resistance. *Blood* 2004 Apr 15; 103(8): 3158-3166.

145. Kupchan SM, Court WA, Dailey RG, Jr., Gilmore CJ, Bryan RF. Triptolide and triptidiolide, novel antileukemic diterpenoid triepoxides from *Tripterygium wilfordii*. *J Am Chem Soc* 1972 Oct 4; 94(20): 7194-7195.
146. Chen BJ. Triptolide, a novel immunosuppressive and anti-inflammatory agent purified from a Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook F. *Leuk Lymphoma* 2001 Jul; 42(3): 253-265.
147. Liu Q. Triptolide and its expanding multiple pharmacological functions. *Int Immunopharmacol* 2011 Mar; 11(3): 377-383.
148. Westerheide SD, Kawahara TL, Orton K, Morimoto RI. Triptolide, an inhibitor of the human heat shock response that enhances stress-induced cell death. *J Biol Chem* 2006 Apr 7; 281(14): 9616-9622.
149. Vispe S, DeVries L, Creancier L, Besse J, Breand S, Hobson DJ, et al. Triptolide is an inhibitor of RNA polymerase I and II-dependent transcription leading predominantly to down-regulation of short-lived mRNA. *Mol Cancer Ther* 2009 Oct; 8(10): 2780-2790.
150. Leuenroth SJ, Crews CM. Triptolide-induced transcriptional arrest is associated with changes in nuclear substructure. *Cancer Res* 2008 Jul 1; 68(13): 5257-5266.
151. Hansen RK, Oesterreich S, Lemieux P, Sarge KD, Fuqua SA. Quercetin inhibits heat shock protein induction but not heat shock factor DNA-binding in human breast carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 Oct 29; 239(3): 851-856.
152. Mulholland PJ, Ferry DR, Anderson D, Hussain SA, Young AM, Cook JE, et al. Pre-clinical and clinical study of QC12, a water-soluble, pro-drug of quercetin. *Ann Oncol* 2001 Feb; 12(2): 245-248.
153. Yokota S, Kitahara M, Nagata K. Benzylidene lactam compound, KNK437, a novel inhibitor of acquisition of thermotolerance and heat shock protein induction in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 2000 Jun 1; 60(11): 2942-2948.
154. Akagawa H, Takano Y, Ishii A, Mizuno S, Izui R, Sameshima T, et al. Stresgenin B, an inhibitor of heat-induced heat shock protein gene expression, produced by *Streptomyces* sp. AS-9. *J Antibiot (Tokyo)* 1999 Nov; 52(11): 960-970.
155. Phillips PA, Dudeja V, McCarroll JA, Borja-Cacho D, Dawra RK, Grizzle WE, et al. Triptolide induces pancreatic cancer cell death via inhibition of heat shock protein 70. *Cancer Res* 2007 Oct 1; 67(19): 9407-9416.
156. Zaarur N, Gabai VL, Porco JA, Jr., Calderwood S, Sherman MY. Targeting heat shock response to sensitize cancer cells to proteasome and Hsp90 inhibitors. *Cancer Res* 2006 Feb 1; 66(3): 1783-1791.
157. Voellmy R. On mechanisms that control heat shock transcription factor activity in metazoan cells. *Cell Stress Chaperones* 2004 Summer; 9(2): 122-133.

158. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 2002 Apr 19; 296(5567): 550-553.
159. Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 1990; 11(2): 231-238.
160. Stühmer T, Zöllinger A, Siegmund D, Chatterjee M, Grella E, Knop S, et al. Signalling profile and antitumour activity of the novel Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 in multiple myeloma. *Leukemia* 2008 Aug; 22(8): 1604-1612.
161. Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 2002 Feb; 26(2): 199-213.
162. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 Aug 15; 227(5259): 680-685.
163. Grogan TM, Camp, B.V., Kyle R., Müller-Hermelink. H., Harris, N. (ed). *Plasma cell Neoplasms: WHO Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissue.* IARC press, Lyon, 2001. 142-165pp
164. Walker J, Rigley K. Gene expression profiling in human peripheral blood mononuclear cells using high-density filter-based cDNA microarrays. *J Immunol Methods* 2000 May 26; 239(1-2): 167-179.
165. Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T, Neale GA, Mihara K, Pui CH, et al. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2001 Apr 1; 97(7): 2115-2120.
166. Neri A, Baldini L, Trecca D, Cro L, Polli E, Maiolo AT. p53 gene mutations in multiple myeloma are associated with advanced forms of malignancy. *Blood* 1993 Jan 1; 81(1): 128-135.
167. Weinstein IB. Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* 2002 Jul 5; 297(5578): 63-64.
168. Druker BJ. Inhibition of the Bcr-Abl tyrosine kinase as a therapeutic strategy for CML. *Oncogene* 2002 Dec 9; 21(56): 8541-8546.
169. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 2009 Mar 6; 136(5): 823-837.
170. Boyault C, Zhang Y, Fritah S, Caron C, Gilquin B, Kwon SH, et al. HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates. *Genes Dev* 2007 Sep 1; 21(17): 2172-2181.
171. Parsell DA, Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 1993; 27: 437-496.

172. Garrido C, Brunet M, Didelot C, Zermati Y, Schmitt E, Kroemer G. Heat shock proteins 27 and 70: anti-apoptotic proteins with tumorigenic properties. *Cell Cycle* 2006 Nov; 5(22): 2592-2601.
173. Ciocca DR, Arrigo AP, Calderwood SK. Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update. *Arch Toxicol* 2013 Jan; 87(1): 19-48.
174. Santon A, Garcia-Cosio M, Cristobal E, Pascual A, Muriel A, Garcia-Larana J. Expression of heat shock proteins in classical Hodgkin lymphoma: correlation with apoptotic pathways and prognostic significance. *Histopathology* 2011 Jun; 58(7): 1072-1080.
175. Bagatell R, Paine-Murrieta GD, Taylor CW, Pulcini EJ, Akinaga S, Benjamin IJ, et al. Induction of a heat shock factor 1-dependent stress response alters the cytotoxic activity of hsp90-binding agents. *Clin Cancer Res* 2000 Aug; 6(8): 3312-3318.
176. Zhang Y, Huang L, Zhang J, Moskophidis D, Mivechi NF. Targeted disruption of hsf1 leads to lack of thermotolerance and defines tissue-specific regulation for stress-inducible Hsp molecular chaperones. *J Cell Biochem* 2002; 86(2): 376-393.
177. Jin X, Moskophidis D, Hu Y, Phillips A, Mivechi NF. Heat shock factor 1 deficiency via its downstream target gene alphaB-crystallin (Hspb5) impairs p53 degradation. *J Cell Biochem* 2009 Jun 1; 107(3): 504-515.
178. Pirkkala L, Alastalo TP, Zuo X, Benjamin IJ, Sistonen L. Disruption of heat shock factor 1 reveals an essential role in the ubiquitin proteolytic pathway. *Mol Cell Biol* 2000 Apr; 20(8): 2670-2675.
179. Antonoff MB, Chugh R, Skube SJ, Dudeja V, Borja-Cacho D, Clawson KA, et al. Role of Hsp-70 in triptolide-mediated cell death of neuroblastoma. *J Surg Res* 2010 Sep; 163(1): 72-78.
180. Nakamura Y, Fujimoto M, Hayashida N, Takii R, Nakai A, Muto M. Silencing HSF1 by short hairpin RNA decreases cell proliferation and enhances sensitivity to hyperthermia in human melanoma cell lines. *J Dermatol Sci* 2010 Dec; 60(3): 187-192.
181. McMillan DR, Xiao X, Shao L, Graves K, Benjamin IJ. Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-inducible apoptosis. *J Biol Chem* 1998 Mar 27; 273(13): 7523-7528.
182. Christians ES, Benjamin IJ. Heat shock response: lessons from mouse knockouts. *Handb Exp Pharmacol* 2006; (172): 139-152.
183. Christians E, Davis AA, Thomas SD, Benjamin IJ. Maternal effect of Hsf1 on reproductive success. *Nature* 2000 Oct 12; 407(6805): 693-694.
184. Steele AD, Hutter G, Jackson WS, Heppner FL, Borkowski AW, King OD, et al.

Heat shock factor 1 regulates lifespan as distinct from disease onset in prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Sep 9; 105(36): 13626-13631.

185. Hsu AL, Murphy CT, Kenyon C. Regulation of aging and age-related disease by DAF-16 and heat-shock factor. *Science* 2003 May 16; 300(5622): 1142-1145.

186. Morley JF, Morimoto RI. Regulation of longevity in *Caenorhabditis elegans* by heat shock factor and molecular chaperones. *Mol Biol Cell* 2004 Feb; 15(2): 657-664.

187. Min JN, Huang L, Zimonjic DB, Moskophidis D, Mivechi NF. Selective suppression of lymphomas by functional loss of Hsf1 in a p53-deficient mouse model for spontaneous tumors. *Oncogene* 2007 Aug 2; 26(35): 5086-5097.

188. Inouye S, Izu H, Takaki E, Suzuki H, Shirai M, Yokota Y, et al. Impaired IgG production in mice deficient for heat shock transcription factor 1. *J Biol Chem* 2004 Sep 10; 279(37): 38701-38709.

189. Trinklein ND, Chen WC, Kingston RE, Myers RM. Transcriptional regulation and binding of heat shock factor 1 and heat shock factor 2 to 32 human heat shock genes during thermal stress and differentiation. *Cell Stress Chaperones* 2004 Mar; 9(1): 21-28.

190. Kawazoe Y, Nakai A, Tanabe M, Nagata K. Proteasome inhibition leads to the activation of all members of the heat-shock-factor family. *Eur J Biochem* 1998 Jul 15; 255(2): 356-362.

191. Lecomte S, Desmots F, Le Masson F, Le Goff P, Michel D, Christians ES, et al. Roles of heat shock factor 1 and 2 in response to proteasome inhibition: consequence on p53 stability. *Oncogene* 2010 Jul 22; 29(29): 4216-4224.

192. Rossi A, Ciafre S, Balsamo M, Pierimarchi P, Santoro MG. Targeting the heat shock factor 1 by RNA interference: a potent tool to enhance hyperthermochemotherapy efficacy in cervical cancer. *Cancer Res* 2006 Aug 1; 66(15): 7678-7685.

193. Craig EA. The heat shock response. *CRC Crit Rev Biochem* 1985; 18(3): 239-280.

194. Dugaard M, Rohde M, Jaattela M. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. *FEBS Lett* 2007 Jul 31; 581(19): 3702-3710.

195. Taipale M, Jarosz DF, Lindquist S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010 Jul; 11(7): 515-528.

196. Khalil AA, Kabapy NF, Deraz SF, Smith C. Heat shock proteins in oncology: Diagnostic biomarkers or therapeutic targets? *Biochim Biophys Acta* 2011 Dec; 1816(2): 89-104.

197. Page TJ, Sikder D, Yang L, Pluta L, Wolfinger RD, Kodadek T, et al. Genome-

wide analysis of human HSF1 signaling reveals a transcriptional program linked to cellular adaptation and survival. *Mol Biosyst* 2006 Dec; 2(12): 627-639.

198. Xia Y, Liu Y, Rocchi P, Wang M, Fan Y, Qu F, et al. Targeting heat shock factor 1 with a triazole nucleoside analog to elicit potent anticancer activity on drug-resistant pancreatic cancer. *Cancer Lett* 2012 May 28; 318(2): 145-153.

199. Chauhan D, Li G, Hideshima T, Podar K, Mitsiades C, Mitsiades N, et al. Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. *Blood* 2003 Nov 1; 102(9): 3379-3386.

200. Hideshima T, Podar K, Chauhan D, Ishitsuka K, Mitsiades C, Tai YT, et al. p38 MAPK inhibition enhances PS-341 (bortezomib)-induced cytotoxicity against multiple myeloma cells. *Oncogene* 2004 Nov 18; 23(54): 8766-8776.

201. Navas TA, Nguyen AN, Hideshima T, Reddy M, Ma JY, Haghazari E, et al. Inhibition of p38alpha MAPK enhances proteasome inhibitor-induced apoptosis of myeloma cells by modulating Hsp27, Bcl-X(L), Mcl-1 and p53 levels in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Leukemia* 2006 Jun; 20(6): 1017-1027.

202. Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 2002 Mar 8; 295(5561): 1852-1858.

203. Bukau B, Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 1998 Feb 6; 92(3): 351-366.

204. Freeman BC, Myers MP, Schumacher R, Morimoto RI. Identification of a regulatory motif in Hsp70 that affects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1. *EMBO J* 1995 May 15; 14(10): 2281-2292.

205. Minami Y, Hohfeld J, Ohtsuka K, Hartl FU. Regulation of the heat-shock protein 70 reaction cycle by the mammalian DnaJ homolog, Hsp40. *J Biol Chem* 1996 Aug 9; 271(32): 19617-19624.

206. Mitra A, Shevde LA, Samant RS. Multi-faceted role of HSP40 in cancer. *Clin Exp Metastasis* 2009; 26(6): 559-567.

207. Haslbeck M, Buchner J. Chaperone function of sHsps. *Prog Mol Subcell Biol* 2002; 28: 37-59.

208. Bush KT, Goldberg AL, Nigam SK. Proteasome inhibition leads to a heat-shock response, induction of endoplasmic reticulum chaperones, and thermotolerance. *J Biol Chem* 1997 Apr 4; 272(14): 9086-9092.

209. Meriin AB, Gabai VL, Yaglom J, Shifrin VI, Sherman MY. Proteasome inhibitors activate stress kinases and induce Hsp72. Diverse effects on apoptosis. *J Biol Chem* 1998 Mar 13; 273(11): 6373-6379.

210. Stühmer T, Arts J, Chatterjee M, Borawski J, Wolff A, King P, et al. Preclinical anti-myeloma activity of the novel HDAC-inhibitor JNJ-26481585. *Br J Haematol* 2010 May; 149(4): 529-536.

211. Lee DH, Goldberg AL. Proteasome inhibitors cause induction of heat shock proteins and trehalose, which together confer thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 1998 Jan; 18(1): 30-38.
212. Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Fanourakis G, Gu X, et al. Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Oct 29; 99(22): 14374-14379.
213. Banerji U, Walton M, Raynaud F, Grimshaw R, Kelland L, Valenti M, et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships for the heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitor 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin in human ovarian cancer xenograft models. *Clin Cancer Res* 2005 Oct 1; 11(19 Pt 1): 7023-7032.
214. Palumbo A, Anderson K. Multiple myeloma. *N Engl J Med* 2011 Mar 17; 364(11): 1046-1060.
215. Zhou M, Wu X, Ginsberg HN. Evidence that a rapidly turning over protein, normally degraded by proteasomes, regulates hsp72 gene transcription in HepG2 cells. *J Biol Chem* 1996 Oct 4; 271(40): 24769-24775.
216. Kim YS, Alarcon SV, Lee S, Lee MJ, Giaccone G, Neckers L, et al. Update on Hsp90 inhibitors in clinical trial. *Curr Top Med Chem* 2009; 9(15): 1479-1492.
217. Panaretou B, Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW, et al. ATP binding and hydrolysis are essential to the function of the Hsp90 molecular chaperone in vivo. *EMBO J* 1998 Aug 17; 17(16): 4829-4836.
218. Stebbins CE, Russo AA, Schneider C, Rosen N, Hartl FU, Pavletich NP. Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* 1997 Apr 18; 89(2): 239-250.
219. Stühmer T, Chatterjee M, Grella E, Seggewiss R, Langer C, Müller S, et al. Anti-myeloma activity of the novel 2-aminothienopyrimidine Hsp90 inhibitor NVP-BEP800. *Br J Haematol* 2009 Nov; 147(3): 319-327.
220. Davenport EL, Moore HE, Dunlop AS, Sharp SY, Workman P, Morgan GJ, et al. Heat shock protein inhibition is associated with activation of the unfolded protein response pathway in myeloma plasma cells. *Blood* 2007 Oct 1; 110(7): 2641-2649.
221. Zou J, Guo Y, Guettouche T, Smith DF, Voellmy R. Repression of heat shock transcription factor HSF1 activation by HSP90 (HSP90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell* 1998 Aug 21; 94(4): 471-480.
222. Ali A, Bharadwaj S, O'Carroll R, Ovsenek N. HSP90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in *Xenopus* oocytes. *Mol Cell Biol* 1998 Sep; 18(9): 4949-4960.
223. Bharadwaj S, Ali A, Ovsenek N. Multiple components of the HSP90 chaperone complex function in regulation of heat shock factor 1 In vivo. *Mol Cell Biol* 1999 Dec; 19(12): 8033-8041.

224. Yang M, Huang J, Pan HZ, Jin J. Triptolide overcomes dexamethasone resistance and enhanced PS-341-induced apoptosis via PI3k/Akt/NF-kappaB pathways in human multiple myeloma cells. *Int J Mol Med* 2008 Oct; 22(4): 489-496.
225. Podar K, Chauhan D, Anderson KC. Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy. *Leukemia* 2009 Jan; 23(1): 10-24.
226. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple myeloma. *Lancet* 2009 Jul 25; 374(9686): 324-339.
227. Calderwood SK, Xie Y, Wang X, Khaleque MA, Chou SD, Murshid A, et al. Signal Transduction Pathways Leading to Heat Shock Transcription. *Sign Transduct Insights* 2010; 2: 13-24.
228. Xavier IJ, Mercier PA, McLoughlin CM, Ali A, Woodgett JR, Ovsenek N. Glycogen synthase kinase 3beta negatively regulates both DNA-binding and transcriptional activities of heat shock factor 1. *J Biol Chem* 2000 Sep 15; 275(37): 29147-29152.
229. Holmberg CI, Roos PM, Lord JM, Eriksson JE, Sistonen L. Conventional and novel PKC isoenzymes modify the heat-induced stress response but are not activated by heat shock. *J Cell Sci* 1998 Nov; 111 (Pt 22): 3357-3365.
230. Chu B, Zhong R, Soncin F, Stevenson MA, Calderwood SK. Transcriptional activity of heat shock factor 1 at 37 degrees C is repressed through phosphorylation on two distinct serine residues by glycogen synthase kinase 3 and protein kinases Calpha and Czeta. *J Biol Chem* 1998 Jul 17; 273(29): 18640-18646.
231. Knauf U, Newton EM, Kyriakis J, Kingston RE. Repression of human heat shock factor 1 activity at control temperature by phosphorylation. *Genes Dev* 1996 Nov 1; 10(21): 2782-2793.
232. Bijur GN, Jope RS. Opposing actions of phosphatidylinositol 3-kinase and glycogen synthase kinase-3beta in the regulation of HSF-1 activity. *J Neurochem* 2000 Dec; 75(6): 2401-2408.
233. Banerjee Mustafi S, Chakraborty PK, Raha S. Modulation of Akt and ERK1/2 pathways by resveratrol in chronic myelogenous leukemia (CML) cells results in the downregulation of Hsp70. *PLoS One* 2010; 5(1): e8719.
234. Mosser DD, Morimoto RI. Molecular chaperones and the stress of oncogenesis. *Oncogene* 2004 Apr 12; 23(16): 2907-2918.
235. Davenport EL, Zeisig A, Aronson LI, Moore HE, Hockley S, Gonzalez D, et al. Targeting heat shock protein 72 enhances Hsp90 inhibitor-induced apoptosis in myeloma. *Leukemia* 2010 Oct; 24(10): 1804-1807.
236. Guo F, Rocha K, Bali P, Pranpat M, Fiskus W, Boyapalle S, et al. Abrogation of heat shock protein 70 induction as a strategy to increase antileukemia activity of heat

shock protein 90 inhibitor 17-allylamino-demethoxy geldanamycin. *Cancer Res* 2005 Nov 15; 65(22): 10536-10544.

237. McCollum AK, Teneyck CJ, Sauer BM, Toft DO, Erlichman C. Up-regulation of heat shock protein 27 induces resistance to 17-allylamino-demethoxygeldanamycin through a glutathione-mediated mechanism. *Cancer Res* 2006 Nov 15; 66(22): 10967-10975.

238. Powers MV, Clarke PA, Workman P. Death by chaperone: HSP90, HSP70 or both? *Cell Cycle* 2009 Feb 15; 8(4): 518-526.

239. Zhou B, Li X, Tang H, Miao Z, Feng H, Li Y. Total synthesis of novel D-ring-modified triptolide analogues: structure-cytotoxic activity relationship studies on the D-ring of triptolide. *Org Biomol Chem* 2011 May 7; 9(9): 3176-3179.

240. Zhou ZL, Yang YX, Ding J, Li YC, Miao ZH. Triptolide: structural modifications, structure-activity relationships, bioactivities, clinical development and mechanisms. *Nat Prod Rep* 2012 Apr; 29(4): 457-475.

241. Torres EM, Sokolsky T, Tucker CM, Chan LY, Boselli M, Dunham MJ, et al. Effects of aneuploidy on cellular physiology and cell division in haploid yeast. *Science* 2007 Aug 17; 317(5840): 916-924.

242. Bader AG, Kang S, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer* 2005 Dec; 5(12): 921-929.

243. Taira T, Sawai M, Ikeda M, Tamai K, Iguchi-Ariga SM, Ariga H. Cell cycle-dependent switch of up- and down-regulation of human hsp70 gene expression by interaction between c-Myc and CBF/NF-Y. *J Biol Chem* 1999 Aug 20; 274(34): 24270-24279.

244. Teng SC, Chen YY, Su YN, Chou PC, Chiang YC, Tseng SF, et al. Direct activation of HSP90A transcription by c-Myc contributes to c-Myc-induced transformation. *J Biol Chem* 2004 Apr 9; 279(15): 14649-14655.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

17-AAG	17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin
17-DMAG	17-(Dimethylaminoethylamino)-17-demethoxygeldanamycin
Akt	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
Amp	Ampicillin
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CDK	Cyclin-dependant kinase
cDNA	Copy-DNA
ChIP	Chromatin Immunpräzipitation
c-MAF	musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog
c-Myc	human homologe of the MC29 avian myelocytomatosis virus oncogene
DMEM	Dulbeccos Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EGFP	Enhanced GFP
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FC	Fold Change

FCS	fetal calf serum
FGFR-3	Fibroblast growth factor receptor-3
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward light scatter
g	Gramm
GEP	Gene Expression Profiling
GFP	Green Fluorescent Protein
GSK3- β	Glykogen Synthase Kinase 3- β
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich (horse radish)-Peroxidase
HS	Hitzeschock
HSE	Hitzeschock-Element
HSF	Hitzeschock-Transkriptionsfaktor
HSP	Hitzeschockprotein
HSR	heatschock stress response
Ig	Immunglobulin
IGF-1	Insulin-like growth factor- 1
IL-6	Interleukin-6
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kilo-Dalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KMSZ	Knochenmarkstromazellen
l	Liter
LB	Luria-Bertani
μ	mikro
M	mol/l
mM	Millimol
ml	Milliliter
MACS	magnetic cell separation
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEK	MAP/ERK Kinase
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
MM	Multiples Myelom
mRNA	messenger-RNA
mut	mutiert
n	nano
ng	nanogramm
nM	nanomolar
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NF-κB	Nukleärer Faktor -κB
NP-40	Nonidet P-40
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDK1	pyruvate dehydrogenase kinase 1
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PH	Pleckstrin homology
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pSU	pSuper
pSUPER	pSUPER shRNA-Expressionsvektor(suppression of endogenous RNA)
pT	post transfection
PTEN	phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten
RAS	rat sarcoma viral oncogene homolog
RB1	Retinoblastoma 1
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
SAP	shrimp alkaline phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat

s	Sekunde
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
SSC	sideward light scatter
STAT	signal transducer and activator of transcription
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Tris gepufferte Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGS	Tris-Glyzin-SDS-Puffer
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
Tris	a,a,a-Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
Tween-20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitan-monolaurat
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die normale B-Zell-Entwicklung.	6
Abbildung 2: Molekulare Pathogenese des Multiplen Myelom.	8
Abbildung 3: Das onkogene Signalnetzwerk im Multiplen Myeloms.	10
Abbildung 4: Proteinstruktur von HSF1.	13
Abbildung 5: Regulation der HSF1-vermittelten HSP-Synthese.	14
Abbildung 6: Ergebnis einer Mycoplasmen-PCR.	33
Abbildung 7: Titrationskurve nach Triptolidbehandlung.	37
Abbildung 8: FACS-Analyse nach einer AnnexinV/PI-Färbung.	39
Abbildung 9: FACS-Darstellung einer BrdU-Färbung.	40
Abbildung 10: FACS-Analyse transfizierter Zellen vor und nach der Aufreinigung.	43
Abbildung 11: Prinzip der Immunfärbung.	47
Abbildung 12: Expressionsanalyse von HSF1 und HSP in MM-Zelllinien.	52
Abbildung 13: HSF1/HSP-Expressionsanalyse in primären MM-Zellen.	53
Abbildung 14: Beispiele für immunhistochemische und Immunfluoreszenzfärbung von HSF1 in Knochenmarksbiopsien <i>in situ</i> .	55
Abbildung 15: Auslösen der HSF1/HSP-Hitzeschockantwort.	56
Abbildung 16: Induktion der HSP durch pharmakologische Inhibitoren.	57
Abbildung 17: HSF1-Knockdown in MM-Zellen.	58
Abbildung 18: Knockdown von HSF1 in JJN-3 Zellen.	59
Abbildung 19: Knockdown von HSF1 und HSF2 in MM-Zellen.	61
Abbildung 20: Heat Plot-Darstellung der regulierten HSP.	62
Abbildung 21: Western Blot-Analyse nach HSF1-Knockdown.	63
Abbildung 22: Exemplarische Darstellung der Validierung verschiedener shRNAs in MM-Zelllinien.	64
Abbildung 23: Knockdown von HSP40 und HDJ2 in MM-Zellen.	65
Abbildung 24: HSP27-Knockdown in INA-6 Zellen.	66
Abbildung 25: Western Blot Analyse nach Triptolid-Behandlung.	67
Abbildung 26: Behandlungen mit Triptolid.	68
Abbildung 27: Behandlung von KMSZ mit Triptolid.	69
Abbildung 28: HSF1-Inhibition unterdrückt die pharmakologisch-induzierte Hochregulation von HSP.	70

Abbildung 29: Kombinationsbehandlung von Triptolid mit NVP-AUY922 oder
Triptolid mit Bortezomib.

71

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung des Multiplen Myeloms nach Salmon und Durie.	3
Tabelle 2: Internationales Staging System (ISS) für das Multiple Myelom.	3
Tabelle 3: Zusammenfassung der Nomenklatur, Lokalisation und Funktion der wichtigsten HSP-Familien.	16
Tabelle 4: Chemische Agenzien, die HSF1 inhibierende Wirkung haben.	20
Tabelle 5: Zusammenstellung der Primär- und Sekundärantikörper, die für die Western Blot Analysen verwendet wurden.	28
Tabelle 6: Zielsequenzen der pSuper-basierten shRNA-Konstrukte.	29
Tabelle 7: Zusammenfassung und Beschreibung der eingesetzten Plasmide.	30
Tabelle 8: Beschreibung der humanen Myelomzelllinien.	32
Tabelle 9: Gegenüberstellung der HSF1- und HSP-Färbungen <i>in situ</i> .	55

8.4 Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Ralf C. Bargou für die Bereitstellung des Themas sowie die Übernahme des Erstgutachtens.

Für die Übernahme des Koreferats und die Betreuung im Rahmen des Promotionskomitees möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Ulrike Holzgrabe und Herrn Dr. Andreas Beilhack bedanken.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Manik Chatterjee, der durch seine Betreuung wesentlich zu der Qualität der Arbeit beigetragen hat. Außerdem danke ich Dr. Thorsten Stühmer und Dr. Dr. Torsten Steinbrunn für die anregenden Diskussionen und der stetigen Hilfsbereitschaft bei jeglichen Problemen- Qapla´.

Für die schöne Zeit und die Hilfsbereitschaft bei jeglichen Laborarbeiten, möchte ich mich herzlich bei allen Labormitarbeitern (auch die Ehemaligen) bedanken. Ganz besonders bei Heike, Evelyn und Johanna, die mich damals gut aufgenommen haben und mittlerweile vielmehr Freunde als Arbeitskolleginnen sind.

Ein weiterer Dank geht an Franziska und Robert, die immer wieder mal Korrektur lesen mussten, Ratschläge gaben oder bei Statistikproblemen halfen, also allzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die bedingungslose, emotionale Unterstützung in allen Phasen der Doktorarbeit.

8.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die Dissertation „Der Hitzeschock-Transkriptionsfaktor 1 (HSF1) als neues potenzielles therapeutisches Ziel im Multiplen Myelom“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

.....
Ort, Datum, Unterschrift

8.6 Publikationsliste

Heimberger T, Andrulis M, Riedel S, Stühmer T, Schraud H, Beilhack A, Bumm T, Bogen B, Einsele H, Bargou RC, Chatterjee M. "The heat shock transcription factor 1 as a new potential therapeutic target in multiple myeloma". British Journal of Haematology 2012 Dec 18. doi: 10.1111/bjh.12164

Chatterjee M., Andrulis M, Stühmer T, Schraud H, **Heimberger T**, Steinbrunn T, Einsele H, Bargou RC. "The PI3K/Akt signalling pathway regulates the expression of Hsp70, which critically contributes to Hsp90-chaperone function and tumor cell survival in multiple myeloma". Haematologica, 2012, Oct. 12

Bringmann G, Rüdener S, Irmer A, Bruhn T, Brun R, **Heimberger T**, Stühmer T, Bargou R, Chatterjee M.: "Antitumoral and antileishmanial dioncoquinones and ancistroquinones from cell cultures of *Triphyophyllum peltatum* (Dioncophyllaceae) and *Ancistrocladus abbreviatus* (Ancistrocladaceae)". Phytochemistry. 2008 Oct;69(13):2501-9.

8.7 Curriculum Vitae

Persönliche Angaben:

Name: Tanja Heimberger
Geburtsdatum und -ort: 01.08.1981 in Bretten
Familienstand: ledig

Studium:

Seit Sept. '07: Promotion an der „Graduate School of Life Sciences“
Universität Würzburg, Lehrstuhl Translationale
Onkologie, AG Experimentelle Hämatologie
Thema: "Der Hitzeschock- Transkriptionsfaktor 1
(HSF1) als neues therapeutisches Ziel im Multiplen
Myelom“

Juli '06 bis April '07: Diplomarbeit am DKFZ Heidelberg,
Abteilung Tumorstudiologie, AG Schlehofer
Thema: "Effekt und Interaktion der Kombination von
Parvovirus H-1 mit Temozolomid in Zellkulturen
maligner Gliome"

Okt '01 bis April '07: Diplomstudiengang Biologie an der Ruprecht-Karls-
Universität Heidelberg.
Hauptfach: Zellbiologie
Nebenfächer: Molekularbiologie und Pharmakologie

Schulbildung:

Juli 2001: Abitur
Sept. 1992 – Juli 2001: Melanchthongymnasium Bretten
Sept. 1988 – Juli 1992: Grundschule, J. P. Hebelschule in Bretten

Würzburg, den 10. April 2013