

**Aus dem Institut für Immunologie und Molekularbiologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

**Die Bedeutung der Akt-Kinase für die Viabilität der Tumorzellen  
und als therapeutischer Angriffspunkt im Multiplen Myelom**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von  
Angela Maria Zöllinger  
Tierärztin  
aus Wangen im Allgäu**

**Berlin 2008**

**Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

<b>Dekan:</b>	<b>Prof. Dr. Leo Brunnberg</b>
<b>Erster Gutachter:</b>	<b>Prof. Dr. Michael F. G. Schmidt</b>
<b>Zweiter Gutachter:</b>	<b>Prof. Dr. Ralf C. Bargou</b>
<b>Dritter Gutachter:</b>	<b>Prof. Dr. Achim Gruber</b>

**Deskriptoren: Myeloma, Multiple Myeloma (MeSH), therapy, protein-kinase, Proto-Oncogene Proteins c-akt (MeSH), Protein Kinase Inhibitors (MeSH), RNA; RNA interference, RNA, Small interfering (MeSH)**

**Tag der Promotion: 03. Juli 2008**

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
1.1	<b>Das Multiple Myelom</b>	<b>4</b>
1.1.1	Epidemiologie	4
1.1.2	Befunde, Symptome, Diagnose	4
1.1.3	Therapie und Prognose	5
1.1.4	Pathogenese	6
1.1.4.1	Normale Plasmazellentwicklung	6
1.1.4.2	Die schrittweise Entwicklung der malignen Plasmazelle	7
1.1.4.3	Interaktion der MM Zellen mit dem Knochenmark- mikromilieu	9
1.2	<b>Der PI3K-Akt Signalweg</b>	<b>10</b>
1.2.1	Struktur von Akt	10
1.2.2	Aktivierung von Akt	10
1.2.3	Substrate von Akt und deren Einfluss auf Zellfunktionen	12
1.2.4	Die Rolle von Akt in Tumoren und sein Bedeutung als pharmakologisches Target	13
1.2.5	Der Akt-Inhibitor Akti-1/2	13
1.3	<b>Die Rolle des PI3K-Akt Signalwegs im Multiplen Myelom</b>	<b>14</b>
1.4	<b>Zielstellung der Arbeit</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>17</b>
2.1	<b>Zellen und Zellkulturtechnik</b>	<b>17</b>
2.1.1	Humane Myelomzelllinien	17
2.1.2	Gewinnung primärer Myelomzellen	17
2.1.3	Gewinnung von Knochenmarkstromazellen (KMSZ)	18
2.1.4	Kokultur von Myelomzellen mit KMSZ	18
2.1.5	Transiente Transfektion von Myelomzelllinien mittels Elektroporation	18
2.1.6	Behandlung mit dem Akt-Inhibitor Akti-1/2	20
2.2	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>21</b>
2.2.1	Klonierung vektorbasierter siRNA-Expressions- konstrukte gegen Akt	21

2.2.1.1	Spaltung und Dephosphorylierung des pSUPER-Vektors	22
2.2.1.2	Vorbereitung des Oligonukleotid-"Inserts"	23
2.2.1.2.1	"Annealing" der komplementären Oligonukleotide	23
2.2.1.2.2	Kinase-Reaktion	24
2.2.1.3	Ligation des Oligonukleotid-"Inserts" in den vorbereiteten pSUPER-Vektor	24
2.2.1.4	Transformation in kompetente <i>E. Coli</i>	25
2.2.1.5	Picken von Klonen	25
2.2.1.6	Plasmid-DNA-Aufreinigung mit Qiaprep miniprep	25
2.2.1.7	Diagnostischer Verdau	26
2.2.1.8	Sequenzierung des Expressionsplasmids und Test auf Funktionalität	27
2.2.1.9	Protokoll zur Plasmidgewinnung mit QIAGEN Plamid Maxi Kit	27
2.2.2	Sequenzanalyse von Akt1	28
2.2.2.1	Synthese von cDNA	28
2.2.2.1.1	Präparation der RNA aus Myelomzellen	28
2.2.2.1.2	Reverse Transkription von RNA (RT-PCR)	28
2.2.2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	29
2.2.3	Reagenzien für die molekularbiologischen Methoden	30
<b>2.3</b>	<b>Biologische und proteinbiochemische Methoden</b>	<b>31</b>
2.3.1	Bestimmung der Viabilität der MM Zellen	31
2.3.2	Western-Blot-Analyse	31
2.3.2.1	Präparation des Zellproteins, elektrophoretische Auftrennung und "blotten" auf Nitrozellulosemembran	31
2.3.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry	32
2.3.2.3	Testen der Isoformspezifität der Antikörper gegen Akt1, Akt2 oder Akt3	33
2.3.3	Bestimmung des phosphorylierten Akt-Proteins mit intrazellulärer Färbung und durchflusszytometrischer Analyse	33
2.3.4	Bestimmung des phosphorylierten Akt-Proteins mit immunhistochemischer Analyse	35

2.3.5	Reagenzien für biologische und proteinbiochemische Methoden	
2.4	<b>Hersteller</b>	<b>37</b>
3	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>38</b>
3.1	<b>Die Zelllinie MM.1S zeigt, im Gegensatz zur Zelllinie AMO-1, eine konstitutive Akt Aktivierung</b>	<b>38</b>
3.2	<b>Transiente Transfektion von MM.1S und AMO-1 Zellen mit p-SUPER-Akt-siRNA-Konstrukten reduziert selektiv die einzelnen Akt Isoformen</b>	<b>39</b>
3.3	<b>Transfektion mit p-SUPER-Akt1- und p-SUPER-Akt2-siRNA-Konstrukten induziert Apoptose in MM.1S, aber nicht in AMO-1 Zellen</b>	<b>41</b>
3.4	<b>Der Akt-Inhibitor Akti-1/2 verringert die Akt Aktivierung in MM.1S Zellen und induziert Apoptose in MM.1S, aber nicht in AMO-1 Zellen</b>	<b>42</b>
3.5	<b>Der Akt-Inhibitor Akti-1/2 blockiert die Akt Aktivierung in primären MM Zellen</b>	<b>43</b>
3.6	<b>Primäre MM Zellen mit konstitutiver Akt Aktivierung reagieren, im Gegensatz zu solchen ohne aktiviertes Akt, mit Apoptose auf Akt Inhibition</b>	<b>45</b>
3.7	<b>Die Mutation in Akt1, die zu einem E17K-Aminosäureaustausch und konstitutiver Akt Aktivierung führt, wurde in primären MM Patientenproben nicht gefunden</b>	<b>49</b>
4.	<b>DISKUSSION</b>	<b>50</b>
5.	<b>ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY</b>	<b>55</b>
6.	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>59</b>
7.	<b>ANHANG</b>	<b>64</b>
7.1	<b>Tabelle 1: Patientencharakteristika und Versuchsergebnisse</b>	<b>64</b>
7.2	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>66</b>

<b>7.3</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>69</b>
<b>7.4</b>	<b>Vorab veröffentliche Teilergebnisse dieser Arbeit</b>	<b>70</b>
<b>7.5</b>	<b>Selbständigkeitserklärung</b>	<b>71</b>