

Aus der Medizinischen Klinik
mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Hitzeschockprotein 90-Inhibitoren
beim multiplen Myelom

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Britta Lamottke

aus Seeheim-Jugenheim

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. O. Sezer
2. Prof. Dr. K.-H. Pflüger
3. Prof. Dr. med. V. Krenn

Datum der Promotion: 09.09.2011

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	6
1. Einleitung.....	8
1.1. Multiples Myelom: Diagnostik und Therapie.....	8
1.1.1. Epidemiologie, Symptomatik und Stadieneinteilung.....	8
1.1.2. Die Therapie des multiplen Myeloms.....	9
1.1.3. Signalwege beim multiplen Myelom und Angriffsziele neuer Therapeutika.	10
1.2. Hitzeschockprotein 90.....	12
1.2.1. Vorkommen und Funktion.....	12
1.2.2. Hitzeschockprotein 90 als Zielmolekül für die antineoplastische Therapie.	12
1.2.3. AUY922 und HSP990.....	14
1.3. Histondeacetylasen und Histondeacetylaseinhibitoren.....	14
1.4. Zellzyklus und Apoptose.....	16
1.4.1. Caspasen und ihre Rolle bei der Induktion von Apoptose.....	17
1.5. Kombinationseffekte und Synergie.....	18
1.6. Ziel der Arbeit.....	19
2. Material und Methoden.....	21
2.1. Materialien.....	21
2.1.1. Zytostatika.....	21
2.1.2. Antikörper und MACS MicroBeads.....	21
2.1.3. Fertigkits, Chemikalien und Reagenzien.....	22
2.1.4. Puffer und Lösungen.....	23
2.1.5. Verbrauchsmaterial.....	24
2.1.6. Geräte.....	25
2.1.7. Software.....	25
2.2. Zelllinien und Kultivierung.....	26
2.3. Isolation primärer CD138 ⁺ Myelomzellen aus Knochenmarkaspiraten.....	26
2.4. MTT-Test.....	26
2.4.1. Statistische Berechnungen.....	27
2.4.2. Bestimmung des Kombinationsindex.....	27
2.5. Apoptosemessung mittels Annexin V-Färbung.....	28

2.6. Zellzyklusanalyse.....	28
2.6.1. Herstellung des Lymphozytenstandards.....	29
2.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot.....	30
2.7.1. Herstellung der Proben zur Proteinanalyse.....	30
2.7.2. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA.....	30
2.7.3. SDS-Polyacrylamidgel-Gelelektrophorese.....	31
2.7.4. Blotten und Detektion der Proteine.....	31
2.8. Färbung intrazellulärer Proteine und FACS-Analyse.....	32
3. Ergebnisse.....	34
3.1. Die Hsp90-Inhibitoren AUY922 und HSP990 hemmen das Wachstum von Myelomzelllinien sowie primären Myelomzellen im niedrig-nanomolaren Konzentrationsbereich.....	34
3.2. HSP990 induziert Apoptose in Myelomzellen.....	35
3.3. HSP990-Behandlung führt zu einem Zellzyklusarrest in der G2-Phase und zur Aktivierung von Caspase-8.....	36
3.4. Hsp90-Inhibition beeinflusst die Akt- und ERK1/2-Signalkaskaden und führt zu einer Induktion der Hsp70-Expression.....	37
3.5. Die Basalexpression von Hsp70 korreliert nicht mit der Sensitivität hinsichtlich Hsp90-Inhibition.....	40
3.6. Hsp90-Inhibitoren wirken synergistisch in Kombination mit Histondeacetylase-inhibitoren, Melphalan oder Doxorubicin bezüglich der Viabilitätsreduktion von Myelomzellen.....	42
3.7. Die Kombination von AUY922 mit Histondeacetylaseinhibitoren, Melphalan oder Doxorubicin führt zu einer signifikanten Viabilitätsreduktion von primären Myelomzellen verglichen mit der Wirkung der einzelnen Substanzen.....	44
3.8. Die Kombination von HSP90-Inhibitoren mit Melphalan führt zur verstärkten Aktivierung der Caspasen 2, 3, 8 und 9.....	46
4. Diskussion.....	48
4.1. Wirksamkeit von AUY922 und HSP990 als Einzelsubstanzen.....	49
4.2. Stoffwechselveränderungen und Apoptoseeinleitung durch Hsp90-Inhibition.....	50
4.2.1. Apoptoseeinleitung und Zellzyklusarrest.....	50
4.2.2. Akt-Signalweg.....	51
4.2.3. ERK1/2-Signalweg.....	52
4.2.4. JAK/Stat-Signalweg.....	52

4.3. AUY922 bzw. HSP990 in Kombination mit anderen Chemotherapeutika.....	53
4.3.1. Hsp90-Inhibition in Kombination mit Histondeacetylaseinhibition.....	53
4.3.2. Hsp90-Inhibition in Kombination mit Melphalan oder Doxorubicin.....	54
4.4. Vergleich zwischen AUY922 und HSP990.....	55
5. Zusammenfassung.....	56
6. Literaturverzeichnis.....	58
Danksagung.....	66
Erklärung an Eides Statt.....	67
Lebenslauf.....	68
Publikationen.....	69

Abkürzungsverzeichnis

17-AAG	17-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin
17-DMAG	17-Dimethylaminogeldanamycin
APS	Ammoniumpersulfat
ASCT	Autologe Stammzelltransplantation (autologous stem cell transplantation)
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	BCL-2 antagonist of cell death
BAFF	B cell-activating factor
BCA	bicinchoninic acid
BCL-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BCL-X _L	BCL-2 related protein long isoform
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CD	cluster of differentiation
CHIP	carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein
CI	Kombinationsindex nach Chow und Talalay
CLL	chronische lymphatische Leukämie
DISC	death inducing signal complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
ECL	Elektrochemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal regulated kinase (ERK1/2 = p44/42 MAPK)
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (fluorescence activated cell sorting)
FCS	fetales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration (US-amerikanische Behörde für Lebensmittel- und Arzneimittelsicherheit)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GRP94	glucose regulated protein 94
HDAC(s)	Histondeacetylase(n)
HGF	hepatocyte growth factor
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
HSF-1	Hitzeschockfaktor 1 (heat shock factor 1)
Hsc70	konstitutiv exprimiertes Hsp70
Hsp70, Hsp90	Hitzeschockprotein 70 bzw. 90
IC ₅₀	Konzentration, durch die 50% Inhibition erreicht wird

IFN(α)	Interferon (α)
IGF-1	insulin-like growth factor 1
I κ B	Inhibitor of κ B
IL-1, IL-6	Interleukin-1 bzw. -6
JAK	Januskinase
kDa	kilo Dalton
MACS	Magnetisch aktivierte Zellsortierung (magnetic activated cell sorting)
MAP(K)	mitogen-activated protein (kinase)
MCL1	myeloid cell leukaemia sequence 1
MEK	MAPK/ERK Kinase
MFW	mittlerer Fluoreszenzwert
MM	multiples Myelom
MTT	1-Methyl-1H-Tetrazol-5-Thiol
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NF κ B	Nuclear factor κ B
NYHA	New York Heart Association
PBS	Phosphat-gepufferte isotone Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PBS/BSA	PBS / 3% (w/v) BSA
PBS-T	PBS / 0,05% (v/v) Tween 20
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	freie Radikale (reactive oxygen species)
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RT	Raumtemperatur
SAHA	suberoyl anilid hydroxamic acid
SDF-1 α	stromal cell derived factor 1 α
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Stat	signal transducer and activator of transcription
TNF(α)	tumor necrosis factor (α)
TRAIL-R1/2	TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1/2
TRAP1	tumor necrosis factor receptor-associated protein 1
VEGF	vascular endothelial growth factor

1. Einleitung

1.1. Multiples Myelom: Diagnostik und Therapie

1.1.1. Epidemiologie, Symptomatik und Stadieneinteilung

Beim multiplen Myelom (MM) handelt es sich um eine klonale Tumorerkrankung terminal differenzierter B-Lymphozyten, so genannter Plasmazellen, mit diffuser oder multilokulärer Infiltration des Knochenmarks. Es kommt je nach Land mit einer Inzidenz von 1-4:100 000 vor und macht damit etwa 1% aller Neoplasien und etwa 13% aller hämatologischen Erkrankungen aus¹. Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung beträgt 61-62 Jahre, wobei nur 2% der Patienten jünger als 40 Jahre und Männer etwas häufiger als Frauen betroffen sind¹.

Das MM ist charakterisiert durch Knochenmarksinfiltration mit mehr als 10% klonalen Plasmazellen. Diese Myelomzellen bilden monoklonale, immunologisch nicht funktionelle Immunglobuline, die sich im Plasma und/oder Urin detektieren lassen. Die monoklonalen Immunglobuline können zu einem Hyperviskositätssyndrom sowie zur Niereninsuffizienz führen. Durch Stimulation von Osteoklasten und gleichzeitige Hemmung von Osteoblasten kommt es zu Osteolysen und in der Folge zu Knochenschmerzen und pathologischen Frakturen sowie zur Hypercalcämie mit den entsprechenden Symptomen. Die Knochenmarksinfiltration und Verdrängung der dort normalerweise ansässigen Zellen bewirkt eine Panzytopenie. Da die durch die MM-Zellen produzierten Immunglobuline funktionslos sind, kommt es in Kombination mit der Verdrängung der gesunden Plasmazellen aus ihrer Knochenmarksnische zum Antikörpermangelsyndrom mit vermehrter Infektionsanfälligkeit der Patienten.

Stadium I	Erfüllung aller 4 Kriterien: 1. Hb > 10 g/dl 2. Serum-Ca ²⁺ normal 3. keine oder maximal eine Osteolyse 4. niedrige Konzentration monoklonaler Immunglobuline im Serum (IgG < 50 g/l, IgA < 30 g/l) bzw. Leichtketten im Urin (< 4 g/24 h)
Stadium II	weder Stadium I noch Stadium III
Stadium III	Erfüllung mindestens eines Kriteriums: <ul style="list-style-type: none"> • Hb < 8,5 g/dl • Serum-Ca²⁺ > 12 mg/dl • ausgeprägte Osteolysen / Osteoporose • hohe Konzentration monoklonaler Immunglobuline im Serum (IgG > 70 g/l, IgA > 50 g/l) bzw. Leichtketten im Urin (> 12 g/24 h)
Zusatz „B“	bei eingeschränkter Nierenfunktion mit Serum-Kreatinin > 2 mg/dl

Tabelle 1: Stadieneinteilung des multiplen Myeloms nach Durie und Salmon.

Risikogruppe	β_2 -Mikroalbumin	Albumin
I	< 3,5 mg/l	\geq 35 g/l
II	< 3,5 mg/l	< 35 g/l
	3,5 - 5,5 mg/l	-
III	\geq 5,5 mg/l	-

Tabelle 2: Prognosegruppen bei behandlungsbedürftigem multiplem Myelom (International Myeloma Working Group).

Die Stadieneinteilung des MM erfolgt nach Durie und Salmon (Tabelle 1), zusätzlich wurde eine prognostische Einteilung bei behandlungsbedürftigem MM von der International Myeloma Working Group publiziert (Tabelle 2). Eine Therapie wird heutzutage bei Patienten, bei denen eine Endorganschädigung aufgetreten ist, initiiert. Diese Kriterien, die unter dem leicht zu merkenden Namen „CRAB-Kriterien“ zusammengefasst wurden, betreffen eine Funktionsstörung folgender Organe oder Systeme:

C – Calcium (Hyperkalzämie)

R – Renal (Niere)

A – Anemia (Anämie)

B – Bone (Knochen).

1.1.2. Die Therapie des multiplen Myeloms

Die mittlere Überlebenszeit nach Diagnosestellung beträgt derzeit je nach Stadium und Therapie etwa drei bis sieben Jahre, wobei die Prognose seit Ende der 60er Jahre bis etwa 1994 konstant blieb und sich seitdem deutlich verbessert hat¹⁻³.

Ende der 50er Jahre des vergangenen Jahrhunderts gab es mit der Einführung von Melphalan erstmals eine Therapie des MM, die länger andauernde Remissionen bewirkte, kurz darauf zeigten Studien einen Vorteil durch Kortikosteroidgabe². Seit Ende der 60er Jahre erfolgte die Therapie des MM durch eine Kombination von Melphalan und Prednison, was zu einer deutlichen Verbesserung der Prognose mit einer mittleren Überlebenszeit von etwa 2,5 Jahren nach Diagnosestellung führte³. In den folgenden Jahrzehnten gab es trotz etlicher Versuche, Melphalan mit anderen Chemotherapeutika zu kombinieren, kaum Fortschritte in der Therapie des MM².

Anfang der 90er Jahre kam dann die Hochdosischemotherapie mit Melphalan gefolgt von einer autologen Stammzelltransplantation (ASCT) als Therapiealternative hinzu. Hierauf folgte zwischen 1994 und 2000 ein Anstieg der mittleren Lebenserwartung um etwa 12 bis 18 Monate auf knapp vier Jahre³.

Die Suche nach neuen Substanzen mündete schließlich in der Entdeckung neuer wirksamer Medikamente zur Therapie des MM: Als effektive Therapeutika stellten sich die

Immunmodulatoren Thalidomid und sein Derivat Lenalidomid sowie der Proteasom-inhibitor Bortezomib heraus, die für den Anstieg der Lebenserwartung beim MM ab dem Jahr 2000 verantwortlich gemacht werden³. Diese neuen Substanzen wurden zunächst nur für die Sekundärtherapie beim refraktären MM eingesetzt, seit dem Jahr 2008 sind jedoch Thalidomid und Bortezomib jeweils in Kombination mit Melphalan und Prednison auch zur Initialtherapie zugelassen.

Trotz der Fortschritte in der Therapie wird nur eine kleine Subgruppe von MM-Patienten geheilt, bei der Mehrzahl der Patienten handelt es sich beim MM jedoch weiterhin um eine unheilbare Erkrankung mit letztlich infauster Prognose.

1.1.3. Signalwege beim multiplen Myelom und Angriffsziele neuer Therapeutika

Ungeachtet der Entwicklungen der letzten Jahre bleibt das MM eine meist unheilbare Erkrankung. Mit zunehmender Krankheits- und Therapiedauer kommt es oft zu Resistenzen gegenüber den verwendeten zytotoxischen Substanzen. Die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten mit möglichst geringem Nebenwirkungsprofil ist daher für diese Erkrankung von großer Bedeutung. Hierfür ist die Kenntnis der für das Überleben und Wachstum der MM-Zellen wichtigen Signaltransduktionswege von entscheidender Bedeutung, um neue Angriffsziele für die spezifische Therapie auszumachen.

Es gibt im Wesentlichen vier Signalkaskaden, die für das Überleben der MM-Zellen entscheidend sind (Abbildung 1)⁴:

1. Der Januskinase (JAK) / *signal transducer and activator of transcription* (Stat)-Signalweg, der durch die Zytokine Interleukin-6 (IL-6) und Interferon α (IFN α) aktiviert wird. IL-6 wird, angeregt durch direkten Zellkontakt mit den MM-Zellen und von diesen sezerniertes Interleukin-1 (IL-1), im Knochenmark von MM-Patienten durch Monozyten, myeloide Zellen sowie Stromazellen verstärkt exprimiert^{4,11}.
2. Der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) / Akt-Signalweg, der hauptsächlich durch *insulin-like growth factor 1* (IGF-1), im Wesentlichen produziert durch Hepatozyten und Osteoblasten, und Heparin-bindende Faktoren sowie in geringerem Ausmaß durch IL-6 aktiviert wird^{4, 12-16}.
3. Der durch IGF-1 und *B cell-activating factor* (BAFF) sowie durch verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden wie z.B. Akt aktivierten *nuclear factor κ B* (NF κ B)-Signalweg^{4, 16-18}.

4. Der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) / *extracellular signal regulated kinase* (ERK1/2 = p44/42 MAPK)-Signalweg, der durch alle genannten Faktoren aktiviert werden kann^{4, 6, 19}.

Der Großteil der derzeit in Entwicklung befindlichen Therapeutika wirkt entweder als Antagonist an den jeweiligen Zytokinrezeptoren oder inhibiert Komponenten der oben genannten Signalwege innerhalb der MM-Zellen, wobei letzteres auch indirekt beispielsweise durch Aktivierung des Abbaus z.B. über das Proteasom oder verminderte Expression der Signaltransduktoren erfolgen kann²⁰⁻²⁸.

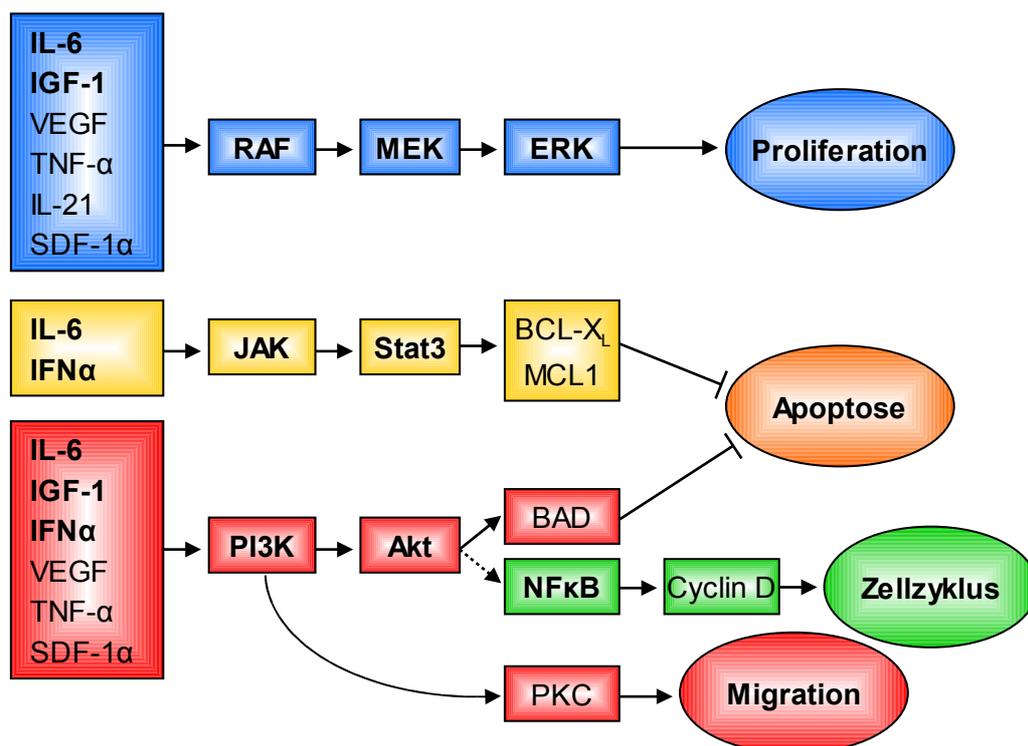


Abbildung 1. Übersicht über die für das Überleben von Myelomzellen wichtigsten Signalwege. Angelehnt an T. Hideshima und K. C. Anderson, Nat. Rev. Cancer 2002²⁹. Die Proliferation von MM-Zellen wird hauptsächlich über den ERK-Signalweg vermittelt, dieser wird im Wesentlichen durch IL-6 und IGF-1 und in geringerem Ausmaß durch weitere Zytokine aktiviert. Sowohl der JAK/Stat3-Signalweg als auch der PI3K/Akt-Signalweg wirken hemmend auf die Apoptose durch Aktivierung antiapoptotischer Faktoren wie *BCL-2 related protein long isoform* (BCL-X_L) und *myeloid cell leukaemia sequence 1* (MCL1) bzw. *BCL-2 antagonist of cell death* (BAD). Beide letztgenannten Signalwege werden durch IL-6 und IFNα aktiviert, wobei der PI3K/Akt-Signalweg noch durch eine Reihe weiterer Faktoren aktiviert werden kann. PI3K aktiviert nicht nur Akt sondern auch Proteinkinase C (PKC), die wiederum an der Migration von MM-Zellen im Knochenmark beteiligt ist. Der NFκB-Signalweg wird unter anderem über den PI3K/Akt-Signalweg aktiviert, über die Aktivierung von Cyclin D trägt er zur Progression des Zellzyklus bei. IL: Interleukin, IGF-1: *insuline like growth factor 1*, VEGF: *vascular endothelial growth factor*, TNFα: *tumor necrosis factor α*, SDF-1α: *stromal cell derived factor 1α*, RAF: Onkogen, MEK: MAPK/ERK Kinase. → Aktivierung; ⊣ Hemmung.

1.2. Hitzeschockprotein 90

1.2.1. Vorkommen und Funktion

Beim Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) handelt es sich um ein ubiquitär vorkommendes Chaperon, dessen Funktion weniger in der *de-novo* Proteinfaltung als viel mehr in der ATP-abhängigen Stabilisierung labiler Signaltransduktionsmoleküle liegt^{30, 31}. Beim Menschen gibt es fünf Isoformen von Hsp90^{32, 33}: Hsp90 α und Hsp90 β kommen im Zytosol vor, wobei Hsp90 β konstitutiv exprimiert wird, wohingegen die Expression von Hsp90 α bei Stress induziert wird. Des Weiteren gibt es mit *glucose regulated protein 94* (GRP94) eine Isoform im endoplasmatischen Retikulum und mit *tumor necrosis factor receptor-associated protein 1* (TRAP1) eine mitochondriale Isoform. Die fünfte Isoform, Hsp90N, wird membrangebunden an der Zelloberfläche exprimiert.

Das Hsp90-Molekül besitzt an seinem Aminoterminus eine Adenosintriphosphat (ATP)-bindende Domäne, am Carboxyterminus eine Domäne, die der Dimerisierung sowie der Assoziation mit Cochaperonen dient, und eine Mitteldomäne, die für die Rekrutierung der Substratmoleküle verantwortlich ist^{34, 35}. Hsp90 ist nur als Homodimer funktionell³⁶. Des Weiteren benötigt es verschiedene Cochaperone, die der Modulation der ATPase-Aktivität, der Stabilisierung von Hsp90 im aktiven, ATP-gebundenen Zustand, sowie der Rekrutierung von Substratmolekülen dienen^{35, 37, 38}. Eine weitere Möglichkeit der Regulation der Hsp90-Aktivität besteht in der posttranslationalen Modifikation z.B. in Form einer Acetylierung, Phosphorylierung oder Nitrosylierung³⁵. Kann Hsp90 seine Chaperonfunktion nicht erfüllen, so kommt es zur Rekrutierung des *carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein* (CHIP), einer E3-Ubiquitinligase, die den Abbau des Substratproteins über den Ubiquitin-Proteasom-Weg einleitet³⁹.

1.2.2. Hitzeschockprotein 90 als Zielmolekül für die antineoplastische Therapie

Auf den ersten Blick scheint es unwahrscheinlich, durch Hemmung eines ubiquitär exprimierten Proteins in einem Organismus gezielt Tumorzellen angreifen zu können. So erfolgte auch die Entdeckung der zytostatischen Effekte des ersten Hsp90-Inhibitors, Geldanamycin, eher zufällig: Geldanamycin wurde 1970 als Antibiotikum aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliert⁴⁰. 1986 wurde im Rahmen eines Substanzscreenings entdeckt, dass Geldanamycin in der Lage ist, den Phänotyp RS-Virus-infizierter, transformierter Zellen wieder zu normalisieren⁴¹. Damals wurde angenommen, der Wirkmechanismus bestünde in der Inhibition der Proteinkinase p60^{src}, erst 1994 konnte gezeigt

werden, dass der tatsächliche Wirkmechanismus in der Inhibition von Hsp90 besteht und dass es sich bei p60^{src} lediglich um eines der Substrate von Hsp90 handelt⁴². Seit her sind zahlreiche Substrate (so genannte "clients") von HSP90 identifiziert worden, zu denen zahlreiche, für viele Stoffwechselwege essentielle Moleküle, wie z.B. Signalweg-Kinasen, gehören (aktualisierte Liste von Substraten unter <http://www.picard.ch>).

Zur deutlich höheren Sensitivität bezüglich Hsp90-Inhibition von maligne transformierten Zellen gegenüber der niedrigen Sensitivität von normalem Gewebe gibt es verschiedene Theorien: Einerseits beinhalten die Substrate von Hsp90 zahlreiche Onkogene, deren Stabilität insbesondere, wenn sie mutiert sind, von Hsp90 abhängig ist und deren Vorhandensein essentiell für das Überleben der malignen Zelle ist⁴³⁻⁴⁷. Des Weiteren weisen diverse Tumorentitäten inklusive des MM eine Überexpression von Hsp90 auf. Dies kann zur Toleranz der malignen Zellen gegenüber Stressoren wie Hypoxie, Azidose und Nährstoffmangel führen⁴⁸⁻⁵⁴. Untersuchungen zeigten zudem eine Anreicherung von Hsp90-Inhibitoren im Tumorgewebe sowie eine etwa 100-fach stärkere Bindung der Hsp90-Inhibitoren an Hsp90 aus Tumorzellen verglichen mit Hsp90 aus normalen Zellen⁵⁵⁻⁵⁸. Hinzu kommt, dass Hsp90 in Tumorzellen hauptsächlich in einem Multichaperonkomplex mit hoher ATPase-Aktivität und hoher Substrataffinität vorkommt, wohingegen es in normalen Zellen größtenteils in latentem, unkomplexiertem Zustand vorliegt^{59, 60}. Erklärungen für diese Tatsachen könnten sowohl tumorspezifische posttranslationale Modifikationen von Hsp90 als auch tumorspezifische Modifikationen der Hsp90-Inhibitoren sein. Zudem weicht das Expressionsmuster der Cochaperone in Tumorzellen möglicherweise von dem normaler Zellen ab oder die Cochaperone könnten modifiziert sein⁶¹.

Geldanamycin selbst fand auf Grund seiner starken Hepatotoxizität in präklinischen Tierversuchen keine klinische Anwendung, seit der Entdeckung seines Potenzials für die Tumorthherapie erfolgte jedoch die Suche nach anderen Substanzen mit gleichem Wirkmechanismus. Der erste Hsp90-Inhibitor, der 1999 in die klinische Testung gelangte, war ein Derivat des Geldanamycins, das 17-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin (17-AAG). Dieses erwies sich zwar bezüglich seiner Toxizität als tolerabel, zeigte jedoch nur mäßiges Ansprechen der Tumorzellen, was möglicherweise durch seine schlechte Löslichkeit im wässrigen Milieu bedingt war^{62, 63}. Eine Weiterentwicklung stellt das 17-Dimethylaminogeldanamycin (17-DMAG) dar, das eine bessere Löslichkeit als 17-AAG aufweist, aber ähnlich gut tolerabel ist. Aktuell werden niedermolekulare synthetische

verschiedenen Transkriptionsfaktoren, Coaktivatoren und Corepressoren – über die Deacetylierung von Histonen zur Freilegung von Aminogruppen, die wiederum mit der negativ geladenen DNA interagieren. Dies führt zur Kondensation der DNA in Form von Nukleosomen, die für die Transkription nicht mehr zugänglich sind. Inzwischen sind auch diverse Nicht-Histon-Proteine bekannt, deren Funktion durch Acetylierung reguliert wird und die Substrate von HDACs sind. Hierzu gehören Transkriptionsfaktoren, Zellzyklusregulatoren, verschiedene intrazelluläre Signalmoleküle und Rezeptoren, DNA-Reparaturenzyme, Komponenten des Zytoskeletts sowie Chaperone inklusive Hsp90⁶⁷⁻⁷⁰.

Ähnlich wie bei den Hsp90-Inhibitoren erfolgte auch die Entdeckung der HDACs als Zielmolekül der antineoplastischen Therapie eher zufällig⁷¹: Bereits 1971 beobachtete C. Friend, dass Dimethylsulfoxid (DMSO) in der Lage ist, in transformierten Zellen eine Differenzierung anzuregen⁷². Wenig später zeigte sich, dass hierfür die polare Komponente des DMSO verantwortlich ist⁷³. In den folgenden Jahren wurden verschiedenste Substanzen entwickelt, die effektiver wirkten und eine geringere Toxizität aufwiesen, was letztlich 1996 in der Entwicklung von *suberoyl anilid hydroxamic acid* (SAHA), bis heute die Leitsubstanz der HDAC-Inhibitoren, gipfelte^{71, 74}. Ein Zusammenhang zwischen den neuen Substanzen und einer verstärkten Histonacetylierung war zwar schon länger bekannt, die Inhibition von HDACs als Wirkmechanismus von SAHA wurde jedoch erst 1998 geklärt⁷⁵.

Inzwischen sind diverse HDAC-Inhibitoren bekannt, die sich in fünf verschiedene Substanzgruppen einteilen lassen: Fettsäuren, zyklische Tetrapeptide, Benzamide, Ketone und Hydroxamsäuren wie SAHA^{67, 76, 77}. Es zeigte sich, dass nur 2-10% aller Gene durch HDAC-Inhibitoren beeinflusst werden, wobei ebenso viele Gene herauf- wie herabreguliert werden und dass vor allem Gene betroffen sind, die eine wichtige Rolle beim Überleben der Zelle spielen^{67, 69, 77-80}. So erfolgt beispielsweise eine verstärkte Expression pro-apoptotischer und eine verminderte Expression anti-apoptotischer Gene. Interessanterweise erwiesen sich transformierte Zellen als etwa zehnfach sensibler gegenüber der HDAC-Inhibition als normale Zellen^{78, 81}. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt einerseits in der Tatsache, dass der Effekt von SAHA reversibel ist und nur relativ kurz anhält, sodass sich normale Zellen mit intakten Signalkaskaden und folglich mehr kompensatorischen Möglichkeiten schneller erholen könnten⁷¹. Andererseits konnte gezeigt werden, dass HDAC-Inhibitoren die Produktion freier Radikale (ROS) bewirken, was in normalen Zellen durch die Expression von

Thioredoxin abgefangen werden kann, wohingegen transformierten Zellen unter der Therapie mit HDAC-Inhibitoren Thioredoxin vermindert und Thyroxin-bindendes Protein-2 verstärkt exprimieren^{82, 83}. Der genaue Mechanismus, über den HDAC-Inhibitoren zum Tod von Tumorzellen führen, ist bislang ungeklärt. Es zeigte sich, dass sowohl Apoptose über den extrinsischen und intrinsischen Weg als auch Autophagie, Nekrose und Modulation der Immunfunktion eine Rolle spielen, zudem wird die Zellmigration und Metastasierung gehemmt^{76, 84}. Die HDAC-Inhibitoren, die bisher in die klinische Testung gelangten, hemmen entweder nur Klasse-I-HDACs oder es handelt sich, wie bei SAHA, um pan-HDAC-Inhibitoren, die alle Zn²⁺-abhängigen HDACs hemmen. Spezifische HDAC-Inhibitoren befinden sich in der Entwicklung, bisher ist jedoch nicht bekannt, ob sie hinsichtlich Wirkung und Verträglichkeit Vorteile bieten.

SAHA (Vorinostat, Zolinza[®]) ist 2006 von der US-amerikanischen Behörde für Lebensmittel- und Arzneimittelsicherheit (FDA) zur Therapie des refraktären kutanen T-Zell-Lymphoms zugelassen worden. Derzeit laufen Phase-III-Studien bei verschiedenen hämatologischen und soliden Tumoren, das MM eingeschlossen.

LBH589 (Panobinostat) gehört ebenfalls in die Klasse der Hydroxamsäure-pan-HDAC-Inhibitoren und zeigt eine ähnlich gute Verträglichkeit wie SAHA. Es weist jedoch eine etwa zehnfach höhere inhibitorische Potenz auf und hat eine längere Halbwertszeit^{85, 86}. Auch mit LBH589 laufen zurzeit verschiedene klinische Studien bei vor allem hämatologischen Neoplasien.

1.4. Zellzyklus und Apoptose

Als Zellzyklus bezeichnet man den Zeitraum zwischen zwei mitotischen Teilungen. Dieser gliedert sich in die Mitose oder M-Phase und die Interphase, die sich wiederum in G1-, S- und G2-Phase unterteilt. In der im Anschluss an die Mitose stattfindenden G1-Phase erfolgt eine Synthese von RNA und Proteinen, die Zelle besitzt einen einfachen diploiden Chromosomensatz (2n). Der Beginn der DNA-Replikation markiert den Übergang zur S-Phase, diese dauert per definitionem so lange, bis die gesamte DNA verdoppelt ist. Die G2-Phase erstreckt sich vom Ende der S-Phase bis zum Beginn der Mitose, in dieser Zeit besitzt die Zelle zwei vollständige diploide Chromosomensätze (4n). In der anschließenden Mitose erfolgt die Zellteilung, bei der jede Tochterzelle einen diploiden Chromosomensatz erhält.

Die molekulare Grundlage für den Ablauf des Zellzyklus bilden Phosphorylierung und Dephosphorylierung. Phasenspezifisch erfolgt die Expression von Cyclinen, diese

agieren als Aktivatoren bestimmter Kinasen, so genannter Cyclin-abhängiger Kinasen (Cdk), die durch Phosphorylierung ihrer Substrate zur Aktivierung der in der entsprechenden Phase des Zellzyklus benötigten Signalwege führen. Mit Übergang in die nächste Phase des Zellzyklus werden die jeweiligen Cycline abgebaut, in der Folge sind die von ihnen abhängigen Kinasen nicht mehr aktiv, ihre Substrate werden wieder dephosphoryliert und die entsprechenden Signalwege deaktiviert.

Das Voranschreiten des Zellzyklus wird an zwei Punkten kontrolliert: Der G1-Restriktionspunkt am Ende der G1-Phase entscheidet über den Beginn der S-Phase und der G2/M-Kontrollpunkt am Ende der G2-Phase über den Beginn der Mitose. Sind nicht alle Voraussetzungen für ein erfolgreiches Voranschreiten des Zellzyklus erfüllt, stoppt der Zellzyklus. Lassen sich die Bedingungen für eine erfolgreiche Zellteilung weiterhin nicht erfüllen, begibt sich die Zelle in Apoptose.

Bei Tumorzellen liegt oft ein Defekt der an den Kontrollpunkten beteiligten Zellzyklusregulatoren vor, sodass es zur ungehemmten Zellteilung kommt.

1.4.1. Caspasen und ihre Rolle bei der Induktion von Apoptose

Die Einleitung der Apoptose erfolgt durch Spaltung und damit Aktivierung verschiedener Caspasen. Bei der Apoptoseinduktion spielen vor allem die Caspasen 2, 8, 9 und 10 eine Rolle⁸⁷. Nach Bindung spezifischer Liganden an Rezeptoren der TNF-Familie, wie z.B. Fas (CD95) oder *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor* (TRAIL-R1 und -R2), die an der Zelloberfläche exprimiert werden, erfolgt die Bildung des so genannten *death inducing signal complex* (DISC), der zur Spaltung und damit zur Aktivierung von Caspase-8 führt⁸⁸⁻⁹⁰. Die Aktivierung von Caspase-10 erfolgt ähnlich wie die von Caspase-8, die genaue Funktion von Caspase-10 ist jedoch noch ungeklärt⁸⁷⁻⁹⁰.

Caspase-9 hingegen wird durch intrazellulären Stress, wie beispielsweise Hitzeschock, Oxidation oder DNA-Schäden, über die Freisetzung von Cytochrom c aus Mitochondrien aktiviert⁹⁰⁻⁹².

Die Aktivierung von Caspase-2 erfordert sowohl Stress, z.B. in Form von DNA-Schädigung, als auch die Aktivierung membrangebundener *tumor necrosis factor* (TNF)-Rezeptoren⁹³. Caspase-2 ist die einzige Caspase, die nicht nur im Zytoplasma sondern auch im Zellkern vorkommt und hier Kontrolle über den G2/M-Kontrollpunkt des Zellzyklus ausübt⁹⁴. Außerdem scheint sie nicht nur als Initiator- sondern auch als Effektorcaspase agieren zu können⁹⁴. Bei der physiologischen Induktion der Apoptose

spielt Caspase-2 vermutlich keine oder nur eine untergeordnete Rolle, wobei ihre vielfältigen Funktionen noch nicht vollständig erforscht sind⁸⁷.

Caspase-3, sowie in geringerem Maß Caspase-6 und -7, werden teils direkt durch die Initiatorcaspasen, teils über weitere Faktoren aktiviert und führen letztendlich über die Spaltung verschiedener Substrate, die vor allem aus Strukturproteinen des Nukleus und des Zytoskeletts sowie diversen intrazellulären Signalmolekülen bestehen, zur Apoptose^{87, 95-98}.

1.5. Kombinationseffekte und Synergie

Die Kombination mehrerer Substanzen gehört bei der antineoplastischen Therapie zum Standard. Es erscheint auf den ersten Blick logisch, dass die Kombination insbesondere von Substanzen mit unterschiedlichem Wirkmechanismus von Vorteil hinsichtlich der benötigten Dosis ist. Dies zu objektivieren kann jedoch problematisch werden: Von Synergie spricht man, wenn der Effekt, der durch Substanzkombination erreicht wird, größer ausfällt als zu erwarten war. Umgekehrt spricht man von einem antagonistischen Effekt, wenn der tatsächlich erreichte Effekt geringer war als der zu erwartende. Die Schwierigkeit liegt nun darin, den erwarteten Effekt zu bestimmen. Eine simple Addition der Effekte ist sinnlos, wie folgendes Beispiel verdeutlicht: Kombiniert man zwei Substanzen, die in der eingesetzten Konzentration jeweils zu 60% Inhibition führen, müsste die Kombination zu einer Inhibition von 120% führen – was unmöglich ist.

Ist zu zwei Kombinationspartnern der jeweilige Wirkmechanismus vollständig bekannt, so ließe sich daraus theoretisch der erwartete Kombinationseffekt berechnen. Die Berechnung gestaltet sich jedoch umso schwieriger, je komplizierter der Wirkmechanismus ist: Im Fall der Hsp90-Inhibition müssten alle Interaktionen, an denen Hsp90 beteiligt ist, berücksichtigt werden. Dies wirft nicht nur mathematische Probleme auf, sondern ist angesichts der vielfältigen Interaktionen und unserer begrenzten Kenntnis darüber nicht möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Beschreibung der Kombinationseffekte das Modell von Chou und Talalay verwendet, bei dem die Berechnung des erwarteten Effekts auf Grundlage der Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Einzelsubstanzen erfolgt⁹⁹. Dabei wird der so genannte Kombinationsindex CI bestimmt, der die Interaktion zweier Substanzen charakterisiert: $CI < 1$ bedeutet Synergie, $CI > 1$ Antagonismus und $CI = 1$ bedeutet, dass beide Substanzen additiv wirken, was dem zu erwartenden Effekt entspricht.

1.6. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der zytotoxischen Effekte der neuartigen Hsp90-Inhibitoren AUY922 und HSP990 auf Zellen des MM. Weder zu AUY922 noch zu HSP990 gab es bei Beginn der experimentellen Arbeit zu dieser Promotion publizierte Daten. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine *in vitro* Untersuchung dieser beiden neuen Hsp90-Inhibitoren bei verschiedenen MM-Zelllinien sowie bei primären Zellen aus Knochenmarkaspirat von MM-Patienten erfolgen. Zunächst sollte eine Untersuchung von AUY922 und HSP990 als Einzelsubstanz erfolgen, im Anschluss sollten beide Hsp90-Inhibitoren mit anderen zytotoxischen Substanzen kombiniert und die Kombinationseffekte analysiert werden. Im Detail sollten dabei die folgenden Fragen geklärt werden:

- ⇒ In welchem Konzentrationsbereich wirkt AUY922 bzw. HSP990 antiproliferativ auf MM-Zellen und wie groß ist der maximal erreichbare Effekt bezüglich der Viabilitätsreduktion?
- ⇒ Gibt es Unterschiede bezüglich der Wirksamkeit von AUY922 bzw. HSP990 zwischen den verschiedenen MM-Zelllinien und primären MM-Zellen?
- ⇒ Erfolgt der zytotoxische Effekt durch AUY922 bzw. HSP990 beim MM durch die Induktion von Apoptose? Falls ja:
 - ⇒ Gibt es einen spezifischen Zeitpunkt des Zellzyklusarrests?
 - ⇒ Über welchen Mechanismus leitet AUY922 bzw. HSP990 die Apoptose bei MM-Zellen ein?
- ⇒ Lässt sich die für andere Hsp90-Inhibitoren beobachtete Expressionssteigerung von Hsp70 auch bei der Behandlung mit AUY922 bzw. HSP990 beobachten?
- ⇒ Wie wirkt sich AUY922 bzw. HSP990 auf die für das Überleben von MM-Zellen entscheidenden intrazellulären Signalkaskaden aus?
- ⇒ Lässt sich durch Kombination von AUY922 bzw. HSP990 mit anderen Substanzen der zytotoxische Effekt auf MM-Zellen steigern? Falls ja:
 - ⇒ Gibt es eine optimale zeitliche Reihenfolge bei der Substanzapplikation?
 - ⇒ Handelt es sich um einen additiven oder synergistischen Effekt?
 - ⇒ Gibt es Unterschiede zwischen den verschiedenen MM-Zelllinien bezüglich des Kombinationseffekts?

- ⇒ Wie erfolgt die Apoptoseeinleitung bei der Kombination von AUY922 bzw. HSP990 mit anderen Substanzen? Gibt es Unterschiede zur Apoptoseeinleitung durch die jeweiligen Einzelsubstanzen?
- ⇒ Gibt es Unterschiede in der Wirkung zwischen AUY922 und HSP990?

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Zytostatika

AUY922	Novartis, Basel, CH
Doxorubicin	Cell Pharm, Hannover
HSP990	Novartis, Basel, CH
LBH589	Novartis, Basel, CH
Melphalan	GlaxoSmithKline, Brentford, UK
SAHA	Alexis Biochemicals, Lausen, CH

Im Fall von Doxorubicin und Melphalan wurden Formulierungen zur i.v. Applikation verwendet, wobei die Melphalan-Lösung direkt vor der Verwendung frisch zubereitet wurde. Alle anderen Zytostatika wurden als Reinsubstanzen in DMSO in einer Stockkonzentration von 10 mM gelöst, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

2.1.2. Antikörper und MACS MicroBeads

Akt Antibody	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Aktin (I-19)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
AlexaFluor647 F(ab') ₂ fragment of goat anti-mouse IgG (H+L)	Invitrogen, Carlsbad, USA
AlexaFluor647 goat anti-rabbit (H+L)	Invitrogen, Carlsbad, USA
AlexaFluor647 Mouse IgG1 κ Isotype Control	BD Biosciences, Rutherford, USA
anti-CD138-FITC	AbD serotec, Kidlington, UK
anti-CD38-PerCP-Cy5	Immunotech, Marseille, F
Anti-Phospho-ERK 1/2 (T202/Y204) AlexaFluor647	BD Biosciences, Rutherford, USA
bovine anti-rabbit IgG HRP	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Caspase-2 (C2) Mouse mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Caspase-3 Antibody	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Caspase-8 (1C12) Mouse mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Caspase-9 Antibody (Human specific)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
CD138 Microbeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Hsp70 [W27] antibody	GeneTex, Irvine, USA
IgG _γ ₁ -FITC	BD Biosciences, Rutherford, USA
Monoclonal Mouse IgG2A Isotype Control Ab	R&D Systems, Minneapolis, USA

Normal Rabbit IgG	R&D Systems, Minneapolis, USA
p44/42 MAP Kinase Antibody	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Phospho-Akt (Ser473) (193H12) Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
polyclonal goat anti-mouse immunoglobulins/HRP	DAKO, Glostrup, DK
polyclonal rabbit anti-goat immunoglobulins/HRP	DAKO, Glostrup, DK

2.1.3. Fertigkits, Chemikalien und Reagenzien

3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
β -Mercaptoethanol (für Zellkultur)	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA
BCA Protein Assay Kit	Pierce Biotechnology, Rockford, USA
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA	AppliChem, Darmstadt
Complete Protease Inhibitor EDTA-free	Roche, Basel, CH
DMSO	AppliChem, Darmstadt
ECL Plus	GE Healthcare, Solingen
Entwickler	Kodak, Rochester, USA
Ethanol 96% unvergällt	J.T.Baker, Phillipsburg, USA
Fetal Bovine Serum (FCS)	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA
Fix Buffer I	BD Biosciences, Rutherford, USA
Fixierer	Kodak, Rochester, USA
Glycerin	Serva, Heidelberg
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
HCl 2M	Merck, Darmstadt
IMDM Zellkulturmedium	PAA Laboratories, Pasching, A
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Methanol	Merck, Darmstadt
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	PAA Laboratories, Pasching, A
Nonidet P40	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PBS	PAA Laboratories, Pasching, A
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Percoll	Biochrom AG, Berlin
PhosphoSafe	Novagen/Merck, Darmstadt

Precision Plus Dual Color Standards	BioRad, Hercules, USA
Propidiumjodid	Bender Med Systems, Heidelberg
Re-Blot Plus Strong Antibody Stripping Solution	Chemicon International, Temecula, USA
rh Annexin V/FITC Kit	Bender Med Systems, Heidelberg
RNase A	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe
RPMI Zellkulturmedium	Gibco/Invitrogen, Carlsbad, USA
SDS	Carl Roth, Karlsruhe
Sperminhydrochlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris Base	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tris(Hydroxymethyl)aminomethan	Merck, Darmstadt
Trisodiumcitrat (2 H ₂ O)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trockenmilchpulver	Nestlé, Vevey, CH
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Türk'sche Lösung	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

2.1.4. Puffer und Lösungen

MTT-1 Reagenz	5 mg/ml 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid in PBS	
MTT-2 Reagenz	10% SDS in 0,01 M HCl	
Lösung B (Zellzyklus) pH 7,6	Trisodiumcitrat (2 H ₂ O)	1 g
	Nonidet P 40	1,0%
	Sperminhydrochlorid	0,522 g
	Tris(Hydroxymethyl)aminomethan	0,061 g
	RNase A	100 mg
	Aqua dest.	auf 1 l
Lösung C (Zellzyklus) pH 7,6	Trisodiumcitrat (2 H ₂ O)	1 g
	Nonidet P 40	1,0%
	Sperminhydrochlorid	0,522 g
	Tris(Hydroxymethyl)aminomethan	0,061 g
	Propidiumjodid	208 mg
	Aqua dest.	auf 1 l
Trenngel 10 / 12 / 15 % (SDS-PAGE)	Aqua dest.	6 / 5 / 3,5 ml
	Rotiphorese Gel 30	5 / 6 / 7,5 ml
	1,5 M Tris-HCl pH 8,8	3,8 ml
	10% SDS (w/v)	150 µl
	APS (w/v)	150 µl
	Temed	6 µl

Sammelgel 4% (SDS-PAGE)	Aqua dest.	3 ml
	Rotiphorese Gel 30	675 µl
	0,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,25 ml
	10% SDS (w/v)	50 µl
	APS (w/v)	50 µl
	Temed	5 µl
10x Elektrophoresepuffer für SDS-PAGE pH 8,3-8,4	Tris-Base (125 mM)	15,15 g
	Glycin (960 mM)	72 g
	SDS (4 mM)	1,4 g
	Aqua dest.	auf 1 l
4x Ladepuffer für SDS-PAGE	0,5 M Tris-HCl	1,25 ml
	Glycerin	2,5 ml
	20% SDS	5 ml
	1% Bromphenolblau	1,25 ml
2x SDS für SDS-PAGE	0,5 M Tris-HCl	0,2 ml
	10% SDS	8 ml
	Glycerin	2 ml
	Aqua dest.	auf 20 ml
10x Transferpuffer für Western Blot	Tris-Base	30,3 g
	Glycin	144 g
	Aqua dest.	auf 900 ml
Blockpuffer	Tris pH 8,0	10 mM
	NaCl	150 mM
	Tween 20	0,1% (v/v)
	Nonidet P 40	0,5% (v/v)
	BSA	0,5% (w/v)
	Trockenmilchpulver	2,5% (w/v)
PBS / 0,05% (v/v) Tween 20 (PBS-T)	PBS	1 l
	Tween 20	500 µl
PBS / 3% (w/v) BSA (PBS/BSA)	PBS	100 ml
	BSA	3 g

2.1.5. Verbrauchsmaterial

96-Loch-Platte unsteril	NUNC/Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Extra thick blotpaper	BioRad, Hercules, USA
FACS tube with cell strainer lid	BD Biosciences, Rutherford, USA
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
KODAK BioMax MR Film	Kodak, Rochester, USA
LS Columns	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
Mikrozentrifugengefäße (1,5 und 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

Multipette® Plus	Eppendorf, Hamburg
Pipetten (2, 5, 10, 25 ml)	BD Falcon, Rutherford, USA bzw. Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen (10, 200, 1000, 2500 µl)	Eppendorf, Hamburg bzw. Sarstedt, Nürnberg
Polystyrene Round-Bottom Tube	BD Falcon, Rutherford, USA
PVDF-Membran	BioRad, Hercules, USA
Zellkulturflaschen 75 cm ²	BD Falcon, Rutherford, USA
Zellkulturplatten (6-, 24-, 96-Loch)	BD Falcon, Rutherford, USA
Zellsiebe	BD Falcon, Rutherford, USA
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	BD Falcon, Rutherford, USA

2.1.6. Geräte

Semi-Dry-Blotter (Trans-Blot SD SEMI-DRY Transfer Cell)	BioRad, Hercules, USA
Brutschrank (HERA cell 240)	Heraeus, Langenselbold
Elektrophoresekammer	BioRad, Hercules, USA
ELISA-Reader (anthos ht2) inkl. Software WinRead 2.3	Anthos Mikrosysteme, Krefeld
FACS Calibur	BD Immunocytometry Systems, Rutherford, USA
Laminarbox (TECHNOFLOW 3F120-II GS)	Integra Biosciences, Fernwald
Lichtmikroskop (diverse)	Leica, Wetzlar
Photokassette (Hypercassette™)	Amersham, Piscataway, USA
Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000, 2500 µl)	Eppendorf, Hamburg bzw. Gilson, Middleton, USA
Pipettierhilfe (Pipetboy)	Integra Biosciences, Fernwald
Schüttler (IKA KS 130 basic)	IKA, Staufen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Vortexer (REAC control)	Heidolph, Schwabach
Wasserbad (julabo SW-21C)	Julabo Labortechnik, Seelbach
Zentrifugen (diverse)	Heraeus, Langenselbold bzw. Hettich, Tuttlingen

2.1.7. Software

CalcuSyn (Version 2.1)	Biosoft, Cambridge, UK
Cellquest	BD Biosciences, Rutherford, USA
ModFit	BD Biosciences, Rutherford, USA
SPSS (Version 17.0)	SPSS Inc./IBM, Chigago, USA

2.2. Zelllinien und Kultivierung

Die MM-Zelllinien OPM-2, U266, RPMI-8226, NCI-H929 und LP-1 wurden über die Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. Die Zelllinie MM.1s wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe um Prof. R. Bargou zur Verfügung gestellt. LP-1-Zellen wurden in IMDM Medium mit 10% FCS kultiviert. Die Zelllinie NCI-H929 wurde in RPMI 1640 Medium unter Zusatz von 20% FCS, 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, und 1% β -Mercaptoethanol kultiviert. Die Kultivierung aller anderen Zelllinien sowie der primären Zellen erfolgte in RPMI 1640 Medium mit 10% FCS. Allen Medien wurde 100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin zugesetzt. Die Zellkultivierung erfolgte im Brutschrank unter sterilen Bedingungen bei 37 °C in einer H₂O-gesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage passagiert und dabei jeweils wieder auf die von der DSMZ empfohlene Zelldichte (je nach Zelllinie 0,25-1·10⁶ Zellen/ml) eingestellt.

2.3. Isolation primärer CD138⁺ Myelomzellen aus Knochenmarkaspiraten

EDTA-gerinnungsgehemmtes Knochenmarkaspirat von MM-Patienten wurde 1:2 mit PBS verdünnt. Mittels Dichtegradientenzentrifugation über Percoll wurden die mononukleären Zellen isoliert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend unter Zusatz von Türk'scher Lösung (90 μ l + 10 μ l Zellsuspension), die der Lyse verbliebener Erythrozyten diente, gezählt. Des Weiteren wurde der Gehalt an CD38⁺CD138⁺ Plasmazellen durchflusszytometrisch bestimmt. Anschließend erfolgte eine magnetische Zellsortierung (MACS) mit Hilfe einer an die Plasmazellanzahl angepassten Menge CD138 MicroBeads. Die sortierten Zellen wurden unter Zusatz von Trypanblau gezählt, ihre Vitalität wurde errechnet und sie wurden durchflusszytometrisch bezüglich ihrer Reinheit untersucht. Je nach Patient lag die Reinheit der isolierten primären MM-Zellen zwischen 89% und 98% und die Vitalität zwischen 66% und 95%.

2.4. MTT-Test

Der MTT-Test dient der Viabilitätstestung anhand der metabolischen Aktivität. Die Zellen werden mit einem Tetrazolium-Salz (MTT-1-Reagenz) inkubiert, stoffwechselaktive Zellen überführen dieses in ein gefärbtes Formazan. Durch die Zugabe eines Puffers (MTT-2-Reagenz), der die Zellmembran angreift und in dem sich die Formazankristalle lösen, färbt sich die gesamte Probe blau. Die Intensität der Färbung lässt sich photometrisch bestimmen, sie ist proportional zur metabolischen Aktivität der Zellen.

Zelllinien wurden auf $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml, primäre Zellen auf $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Pro Vertiefung einer 96-Loch-Zellkulturplatte wurden 50 μ l der Zellsuspension ausgesät. Die Versuche mit Zelllinien wurden mindestens in Vierfach-Bestimmung durchgeführt und in mindestens einem zweiten unabhängigen Versuch mit ähnlichen Ergebnissen bestätigt. Bei primären Zellen wurden die Versuche auf Grund der begrenzten Zellverfügbarkeit im Doppel- oder Dreifachansatz durchgeführt. Primäre Zellen wurden mindestens eine Stunde, Zelllinien über Nacht präinkubiert, dann erfolgte die Zytostatika-Zugabe in Medium doppelt konzentriert in weiteren 50 μ l pro Vertiefung.

Da die Zytostatika mit Ausnahme von Melphalan und Doxorubicin in DMSO gelöst waren, wurde – soweit nicht anders angegeben – immer eine DMSO-Kontrolle entsprechend der höchsten eingesetzten Zytostatikumkonzentration sowie eine Nativkontrolle mitgeführt. Da es sich bei dem verwendeten Melphalan und Doxorubicin um wässrige Lösungen handelte, wurde hier lediglich eine Nativkontrolle mitgeführt.

Vier Stunden vor Ende der Inkubationszeit wurden 10 μ l MTT-1-Reagenz und am Ende der Inkubationszeit 100 μ l MTT-2-Reagenz pro Vertiefung zugegeben. Damit sich die Formazankristalle vollständig lösen konnten, wurden die Platten anschließend für mindestens 24 weitere Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde mittels ELISA-Reader die Extinktion bei 512 nm bestimmt.

2.4.1. Statistische Berechnungen

Berechnungen zur Signifikanz wurden nach dem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben mit der Software SPSS Version 17.0 durchgeführt. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant gewertet und in den Abbildungen mit Stern (*) gekennzeichnet.

2.4.2. Bestimmung des Kombinationsindex

Nach Bestimmung des IC_{50} für alle Einzelsubstanzen, wurden für die Versuche zur Kombination von AUY922 bzw. HSP990 mit HDAC-Inhibitoren, Melphalan oder Doxorubicin von den jeweils untersuchten Einzelsubstanzen Verdünnungsreihen von 40% bis 130% des IC_{50} erstellt sowie eine Verdünnungsreihe mit der Substanzkombination, wobei hier ebenfalls beide Substanzen von 40% bis 130% des IC_{50} eingesetzt wurden, d.h. das Verhältnis zwischen beiden Kombinationspartnern blieb in allen Proben konstant. Die Zugabe von AUY922 bzw. HSP990 erfolgte jeweils 24 h nach der Zugabe des Kombinationspartners, nach weiteren 48 h erfolgte die Bestimmung der Viabilität mittels MTT-Test wie oben beschrieben. Die Berechnungen zur Synergie erfolgten mit Hilfe der Software CalcuSyn (Version 2.1, Biosoft), die auf der Methode von Chou und

Talalay basiert⁹⁹. Dabei wurde aus den drei Versuchsreihen pro Kombinationsversuch der so genannte Kombinationsindex CI bestimmt. CI = 1 bedeutet dabei einen additiven Effekt, CI < 1 Synergie und CI > 1 Antagonismus.

2.5. Apoptosemessung mittels Annexin V-Färbung

Annexine sind Calcium-abhängige, Phospholipid-bindende, intrazelluläre Proteine, deren genaue physiologische Funktion noch ungeklärt ist. Annexin V bindet vorzugsweise Phosphatidylserin, das sich bei vitalen Zellen auf der zytosolischen Seite der Zellmembran befindet. Apoptotische Zellen hingegen präsentieren Phosphatidylserin auch auf der extrazellulären Seite ihrer Zellmembran. Diese Eigenschaft kann zur Apoptosemessung genutzt werden, indem markiertes Annexin V auf die zu untersuchenden Zellen gegeben wird. Apoptotische Zellen können so durchflusszytometrisch von vitalen Zellen unterschieden werden. Eine Gegenfärbung mit Propidiumjodid erlaubt die Diskriminierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen.

Die MM-Zelllinien wurden auf $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Pro Vertiefung einer 24-Loch-Zellkulturplatte wurden 500 μ l der Zellsuspension ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht präinkubiert, dann erfolgte die Zytostatika-Zugabe in Medium doppelt konzentriert in weiteren 500 μ l pro Vertiefung. Es wurde immer eine Nativkontrolle sowie bei Verwendung von in DMSO gelösten Zytostatika eine DMSO-Kontrolle entsprechend der höchsten eingesetzten Zytostatikumkonzentration mitgeführt.

Am Ende der Inkubationszeit (24 bzw. 48 h) wurden die Zellen geerntet und mit Hilfe des rh Annexin V/FITC Kits gemäß den Vorgaben des Herstellers gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels der Software Cellquest (BD Biosciences). Die Berechnung der spezifischen Apoptose (%) erfolgte nach der Formel $(A^+PJ^+ + A^+PJ^-) / (A^+PJ^+ + A^+PJ^- + A^-PJ^-)$ mit A = Annexin V und PJ = Propidiumjodid. Die Versuche wurden stets im Doppelansatz durchgeführt und in mindestens einem zweiten unabhängigen Versuch mit ähnlichen Ergebnissen bestätigt.

2.6. Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusanalyse beruht auf dem unterschiedlichen Gehalt an DNA im Zellkern, je nachdem, in welcher Phase des Zellzyklus die jeweilige Zelle sich befindet: Postmitotische Zellen der G1-Phase besitzen einen einfachen Chromosomensatz, Zellen in der G2-Phase hingegen haben einen doppelten Chromosomensatz. Die DNA-Replikation geschieht während der S-Phase des Zellzyklus, das heißt, der DNA-Gehalt von Zellen der S-Phase befindet sich zwischen dem von Zellen der G1- und Zellen der G2-Phase.

Mit Hilfe von interkalierenden Farbstoffen wie Propidiumjodid kann die DNA-Menge einer Zelle durchflusszytometrisch quantifiziert und hieraus auf die Position der Zelle im Zellzyklus rückgeschlossen werden.

Die MM-Zelllinien wurden auf $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt und 500 μ l der Zellsuspension pro Vertiefung einer 24-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht präinkubiert, dann erfolgte die Zytostatika-Zugabe in Medium doppelt konzentriert in weiteren 500 μ l pro Vertiefung. Da die Zytostatika in DMSO gelöst waren, wurde immer eine DMSO-Kontrolle entsprechend der höchsten eingesetzten Zytostatikumkonzentration sowie eine Nativkontrolle mitgeführt.

Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, zweimal mit PBS gewaschen und dann in 500 μ l kalter PBS resuspendiert, sofort mit 1500 μ l -20 °C kaltem 96% Ethanol vermischt und anschließend für mindestens 24 h bei -20 °C gelagert. Hierdurch erfolgte die Fixierung der Zellen sowie die Permeabilisierung der Zellmembran. Im Folgenden wurden die Proben sowie ein Lymphozytenstandard (siehe 2.6.1.) zweimal mit PBS gewaschen und dann für 15 Min bei Raumtemperatur mit 300 μ l RNase-haltiger Lösung B inkubiert. Dies diente dem Abbau der RNA, da sich sonst im nachfolgenden Schritt Propidiumjodid auch in RNA eingelagert und dies die Bestimmung des DNA-Gehalts verfälscht hätte. Anschließend erfolgte die Zugabe von 300 μ l Propidiumjodid-haltiger Lösung C. Nach einer Inkubation von 2 Stunden im Dunkeln bei 6 °C wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert, wobei der Lymphozytenstandard der Einstellung des Durchflusszytometers diente. Die Auswertung erfolgte mit der Software ModFit (BD Biosciences). Die Versuche wurden stets im Doppelansatz durchgeführt und in einem zweiten unabhängigen Versuch mit ähnlichen Ergebnissen bestätigt.

2.6.1. Herstellung des Lymphozytenstandards

Die Herstellung des Lymphozytenstandards erfolgte aus heparinisiertem Blut eines gesunden Normalspenders. Mittels Dichtegradientenzentrifugation über einen Percoll-Gradienten wurden die mononukleären Zellen isoliert. Verbliebene Thrombozyten wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS bei steigender Beschleunigung (200 G \Rightarrow 300 G \Rightarrow 500 G) entfernt. Die Zellen wurden unter Zusatz von Türk'scher Lösung (90 μ l + 10 μ l Zellsuspension), die der Lyse verbliebener Erythrozyten diente, gezählt. Die Zellen wurden auf $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml PBS eingestellt, pro Probe wurden 500 μ l dieser

Zellsuspension mit 1500 μ l -20 °C kaltem 96% Ethanol vermischt und anschließend für mindestens 24 h bei -20 °C gelagert.

2.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Das Prinzip des Western Blots beruht auf der Auftrennung eines Proteingemischs anhand der Größe der einzelnen Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), dem Elektrotransfer (Blotten) der Proteine auf eine Membran und einer anschließenden Immunodetektion der auf der Membran immobilisierten Proteine.

Durch das SDS wird die Sekundärstruktur der Proteine zerstört, was eine Linearisierung zur Folge hat, zudem werden die Proteine gleichmäßig mit negativer Ladung versehen, sodass die Auftrennung im Gel ausschließlich nach der Molekülgröße erfolgt. Beim Blotten wird die Spannung senkrecht zur Laufrichtung des Gels angelegt, sodass hinterher die Anordnung der Proteine auf der Membran exakt ihrer Anordnung im Gel entspricht. Nachfolgend wird die Membran mit Primärantikörpern behandelt, die spezifisch an das zu untersuchende Protein binden. Mit Hilfe eines Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpers, der den konstanten Teil des Primärantikörpers erkennt, kann das zu untersuchende Protein auf der Membran sichtbar gemacht werden: Die Peroxidase setzt das zugegebene ECL-Reagenz unter Emission von Licht (Chemilumineszenz) um, dies kann mittels eines lichtempfindlichen Films detektiert werden. Je größer die Menge des zu untersuchenden Proteins auf der Membran ist, desto mehr Primär- und Sekundärantikörper kann binden, und desto stärker ist die Intensität des emittierten Lichts.

2.7.1. Herstellung der Proben zur Proteinanalyse

Pro Probe wurden 2,5 ml einer Zellsuspension mit $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Zytostatikazugabe in Medium doppelt konzentriert in weiteren 2,5 ml. Nach erfolgter Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet, zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in 125 μ l Phosphosafe mit Zusatz von 10% Proteaseinhibitorlösung (1 Tablette auf 1 ml H₂O) lysiert. Durch eine 25-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm wurde die Membranfraktion pelletiert, die weitere Analyse erfolgte mit dem Überstand.

2.7.2. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits (Pierce) aus 1:50 in PBS verdünnten Proben in Dreifachbestimmung gemäß den

Angaben des Herstellers. Anhand einer mitgeführten Standardverdünnungsreihe konnte die Proteinkonzentration der Einzelproben berechnet werden.

2.7.3. SDS-Polyacrylamidgel-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der Proteine wurde ein 10-15% Acrylamid-haltiges Trenngel überschichtet mit einem 4% Acrylamid-haltigen Sammelgel verwendet. Pro Probe wurden 20-30 µg Protein eingesetzt, wobei das benötigte Probenvolumen mit 2x SDS auf 16 µl aufgefüllt wurde. Anschließend wurden 8 µl 4x Ladepuffer nach Zusatz von 20% β-Mercaptoethanol zugefügt und die Proben 5 Minuten lang bei 95 °C inkubiert. Dieser Schritt diente der Zerstörung der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine. Pro Geltasche wurden 20 µl der Probe aufgetragen. Da insbesondere beim Primärantikörper immer die Gefahr der Kreuzreaktivität mit anderen in den Proben enthaltenen Proteinen bestand, wurde immer ein Größenmarker (Precision Plus Dual Color Protein Standards) mitgeführt, der eine Zuordnung der Bande des zu untersuchenden Proteins ermöglichte. Die Elektrophorese erfolgte bei 80-100 V so lange, bis die Lauffront am Ende des Trenngels angekommen war.

2.7.4. Blotten und Detektion der Proteine

Nach der Auftrennung der im Zelllysat enthaltenen Proteine mittels SDS-PAGE wurden die Proteine für den Nachweis mittels spezifischer Antikörper auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran geblottet. Zu diesem Zweck wurde das Gel aus der Elektrophoreseapparatur entnommen und das Sammelgel entfernt. Der Blot wurde als Semi-Dry Blot durchgeführt. Vor dem Zusammenbau des Blot-Sandwiches wurden Filterpapiere, Membran und Gel einige Minuten in Blot-Puffer äquilibriert. Beim Blot-Sandwich befanden sich Gel und Membran in der Mitte zwischen jeweils einer Schicht Filterpapier auf beiden Seiten. Geblottet wurde bei 15 V für 30 bis 45 Minuten.

Nach dem Blotten wurde die Membran 1 h lang bei RT in Block-Puffer inkubiert um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurde der Primärantikörper 1:1000 verdünnt (Ausnahme: β-Actin 1:2000) in 50% PBS-T und 50% Blockpuffer verdünnt auf die Membran gegeben und über Nacht bei 6 °C inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal 5 Min mit Waschpuffer gewaschen, bevor der Sekundärantikörper 1:2000 in 90% PBS-T und 10% Blockpuffer verdünnt aufgegeben und mindestens 1 h lang bei RT inkubiert wurde. Im Folgenden wurde die Membran wieder dreimal 5 Min gewaschen. Anschließend wurden die Elektrochemilumineszenz (ECL)-Reagenzien gemischt, pro Membran 1 ml aufgegeben, gut über die gesamte Membran verteilt und

5 Min inkubiert. Die Intensität des Lumineszenzsignals wurde mit Hilfe eines lichtempfindlichen Films entsprechend den Angaben des Herstellers festgehalten.

Um unterschiedliche Proteine auf derselben Membran zu untersuchen, war es nötig, die Antikörper und ECL-Reagenzien der vorherigen Nachweisreaktion von der Membran zu entfernen. Zu diesem Zweck wurde die Membran für 15 Minuten mit Re-Blot Plus Strong Antibody Stripping Solution behandelt. Nach zweimaligem Waschen (jeweils 5 Min) in PBS-T wurde die Membran 1 h lang in Blockpuffer inkubiert, danach erfolgte die Aufgabe des neuen Primärantikörpers wie beschrieben. Auch alle weiteren Schritte wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

2.8. Färbung intrazellulärer Proteine und FACS-Analyse

Der Effekt der Zytostatika auf die intrazellulären Signalmoleküle Akt bzw. Phospho-Akt und ERK1/2 bzw. Phospho-ERK1/2 sowie auf die Hsp70-Expression erfolgte auf Einzelzellebene mittels Durchflusszytometrie.

Hierzu wurden MM-Zelllinien auf $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt und 500 μ l pro Probe in einer 24-Loch-Zellkulturplatte ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Zytostatikuzugabe doppelt konzentriert in weiteren 500 μ l Zellkulturmedium. Je nach Versuch wurden die Zellen für 4-24 h mit dem Zytostatikum inkubiert. Anschließend wurden 750 μ l jeder Probe mit einem identischen Volumen Fix Buffer I (BD Biosciences) versetzt und 20 Min (Akt, Phospho-Akt, Hsp70) bzw. 50 Min (ERK1/2, Phospho-ERK1/2) bei 37 °C auf einem Schüttler fixiert. Die fixierten Zellen wurden zentrifugiert (2000 rpm, 5 Min, 4 °C), der Überstand entfernt und das Zellpellet in -20 °C kaltem Methanol resuspendiert und für 30 Min bei 6 °C inkubiert. Dieser Schritt diente der Permeabilisierung der Zellmembran. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS/BSA gewaschen, bevor die Zugabe des Primärantikörpers in PBS/BSA verdünnt erfolgte (Tabelle 3). Für alle Probenserien wurden Isotypkontrollen mitgeführt, die so verdünnt wurden, dass ihre Konzentration identisch mit der des Primärantikörpers war. Die Zellen wurden für 1 h bei RT im Dunklen mit dem Primärantikörper bzw. der Isotypkontrolle inkubiert, nachfolgend wieder zweimal mit PBS/BSA gewaschen und dann mit einem 1:200 in PBS/BSA verdünnten, Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper für 30 Min bei RT im Dunklen inkubiert (Tabelle 3). Eine Ausnahme bildete Phospho-ERK: Hier war bereits der Primärantikörper bzw. die Isotypkontrolle markiert, sodass kein Sekundärantikörper benötigt wurde. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/BSA wurden die Zellen in 400 μ l PBS resuspendiert und durchflusszytometrisch analysiert. Zur besseren Vergleichbar-

keit verschiedener Messreihen wurden die Instrumenteneinstellungen des FACS-Geräts jeweils so gewählt, dass der mittlere Fluoreszenzwert (MFW, Median der Fluoreszenzwerte aller Messungen auf Einzelzellebene) der Isotypkontrolle bei 4 lag. Die weitere Auswertung erfolgte mit Histogrammen, die mit der Software Cellquest (BD Biosciences) erstellt wurden. Zum Vergleich der verschiedenen Proben und zur relativen Quantifizierung wurde der MFW verwendet.

Primärantikörper (inkl. Verdünnung)		Isotypkontrolle	Sekundärantikörper (1:200)
Akt	1:100	Normal Rabbit IgG	AlexaFluor647 goat anti-rabbit (H+L)
Phospho-Akt (Ser473) (193H12)	1:100		
ERK1/2 (= p44/42 MAPK)	1:100		
Phospho-ERK 1/2 (T202/Y204) AlexaFluor647	1:20	AlexaFluor647 Mouse IgG1 κ Isotype control	-
Hsp70 [W27]	1:100	Monoclonal Mouse IgG2A Isotype Control Antibody	AlexaFluor647 F(ab') ₂ fragment of goat anti-mouse IgG (H+L)

Tabelle 3. Primärantikörper mit Verdünnungen, Isotypkontrollen und Sekundärantikörper zur Färbung intrazellulärer Proteine.

3. Ergebnisse

3.1. Die Hsp90-Inhibitoren AUY922 und HSP990 hemmen das Wachstum von Myelomzelllinien sowie primären Myelomzellen im niedrig-nanomolaren Konzentrationsbereich

A Zelllinie	IC ₅₀ AUY922		IC ₅₀ HSP990	
	IC ₅₀ (nM)	max. Inhibition (%)	IC ₅₀ (nM)	max. Inhibition (%)
OPM-2	40	98	37	100
U266	45	75	36	80
RPMI-8226	n.e.	40	157	58
MM.1s	20	100	22	100
NCI-H929	25	100	34	100
LP-1	85	55	101	52

B Patient	IC ₅₀ AUY922	
	IC ₅₀ (nM)	max. Inhibition (%)
1	n.e.	23
2	17	88
3	n.e.	12
4	n.e.	14
5	24	59
6	204	51
7	27	67
8	71	85
9	32	90
10	n.e.	20
11	n.e.	37

Tabelle 4. IC₅₀ und maximal erreichbare Inhibition der Viabilität von Myelomzellen durch Behandlung mit AUY922 bzw. HSP990. MM-Zelllinien (A) und primäre MM-Zellen (B) wurden mit verschiedenen Konzentrationen AUY922 bzw. HSP990 im Bereich zwischen 5 und 500 nM behandelt. Nach 72 h wurde die Viabilität der Zellen mittels MTT-Test bestimmt und der IC₅₀ berechnet (n.e. = nicht erreicht).

MM-Zelllinien sowie primäre Zellen aus Knochenmarkspirat von MM-Patienten wurden mit verschiedenen Konzentrationen AUY922 bzw. HSP990 behandelt. Nach 72 h wurde die Viabilität der Zellen mittels MTT-Test bestimmt (Tabelle 4). Es zeigten sich deutliche Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität der verschiedenen Zelllinien bezüglich der Hsp90-Inhibition: Die Zelllinien OPM-2, MM.1s und NCI-H929 erwiesen sich als sensibel mit IC₅₀-Werten zwischen 20 und 40 nM und einer Reduktion der Viabilität um nahe-

zu 100% für beide getesteten Hsp90-Inhibitoren. Die Zelllinien RPMI-8226 und LP-1 hingegen zeigten sich partiell resistent gegenüber den getesteten Substanzen: Hier lagen die ermittelten IC_{50} -Werte bei 85 nM oder höher oder der IC_{50} wurde gar nicht erreicht und die Viabilität wurde bei diesen Zelllinien um maximal 40-58% gesenkt. Eine Zwischenposition nimmt die Zelllinie U266 ein: Hier wurde mit 45 bzw. 36 nM ein IC_{50} ähnlich wie bei den sensiblen Zelllinien ermittelt, jedoch führten auch sehr hohe Konzentrationen bei dieser Zelllinie nur zu einer Reduktion der Viabilität um 75 bzw. 80%. Ein ähnlich variables Bild wie bei den MM-Zelllinien zeigte sich auch bei mit AUY922 behandelten primären MM-Zellen (Tabelle 4B): Die Zellen von sechs der elf untersuchten Patienten erwiesen sich als partiell resistent, hier wurde der IC_{50} nicht (Patient 1, 3, 4, 10 und 11) bzw. nur gerade eben (Patient 6) erreicht. Bei den restlichen fünf Patienten wurden IC_{50} -Werte zwischen 17 und 71 nM ermittelt und eine Reduktion der Viabilität um 59-90% erreicht.

3.2. HSP990 induziert Apoptose in Myelomzellen

Um herauszufinden, ob die Reduktion der Viabilität von MM-Zellen durch AUY922 bzw. HSP990 durch die Induktion von Apoptose hervorgerufen wird, wurden OPM-2 Zellen mit HSP990 behandelt und nach 48 h durchflusszytometrisch bezüglich ihrer Anfärbbarkeit durch Annexin V untersucht. Zur Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen erfolgte zusätzlich eine Färbung mit Propidiumjodid. Es konnte eine konzentrationsabhängige Zunahme der Annexin⁺PJ⁺ Zellen beobachtet werden sowie eine Zunahme der spezifischen Apoptose von 10% in der DMSO-Kontrolle auf 12, 19, 42 und 59% durch Behandlung mit 10, 25, 50 und 100 nM HSP990 (Abbildung 3).

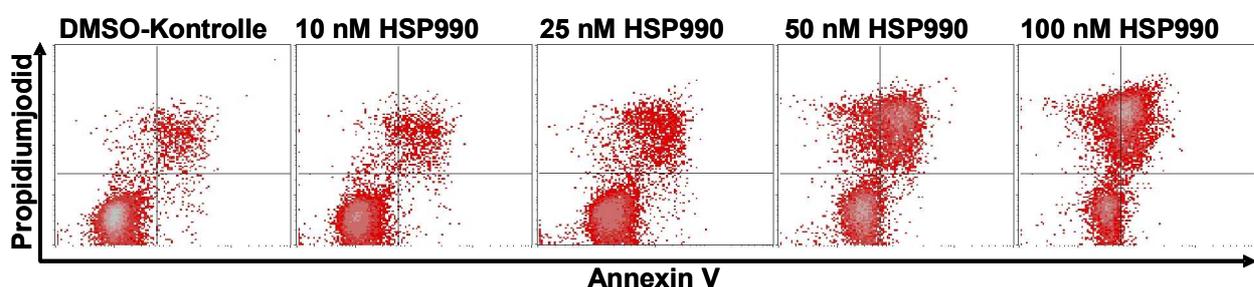


Abbildung 3. HSP990 induziert konzentrationsabhängig Apoptose in Myelomzellen. OPM-2 Zellen wurden für 48 h mit den angegebenen Konzentrationen HSP990 bzw. mit DMSO inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Annexin V und Propidiumjodid gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

3.3. HSP990-Behandlung führt zu einem Zellzyklusarrest in der G2-Phase und zur Aktivierung von Caspase-8

Während des Zellzyklus gibt es mehrere Kontrollpunkte, die dafür sorgen, dass der Zellzyklus nur dann weiter abläuft, wenn alle Voraussetzungen für eine erfolgreiche Zellteilung gegeben sind. Sind nicht alle Voraussetzungen erfüllt, so kann der Zellzyklus nicht weiter voranschreiten, die Zelle verharrt in der entsprechenden Phase entweder bis alle Voraussetzungen erfüllt sind oder sie begibt sich, wenn dies nicht mehr möglich ist, in Apoptose.

OPM-2 Zellen wurden für 24 h mit HSP990 behandelt, anschließend erfolgte die Anfärbung ihrer DNA mittels Propidiumjodid und eine durchflusszytometrische Analyse der Zellen zur Quantifizierung ihres DNA-Gehalts. Je nach DNA-Gehalt konnten die Zellen einer bestimmten Phase des Zellzyklus zugeordnet werden. Ein Vergleich mit DMSO-behandelten Zellen zeigte eine Zunahme der in der G2-Phase befindlichen Zellen von 14% auf 33% vor allem auf Kosten der Zellen in der S-Phase (Abnahme von 31% auf 18%) durch Behandlung mit HSP990 (Abbildung 4).

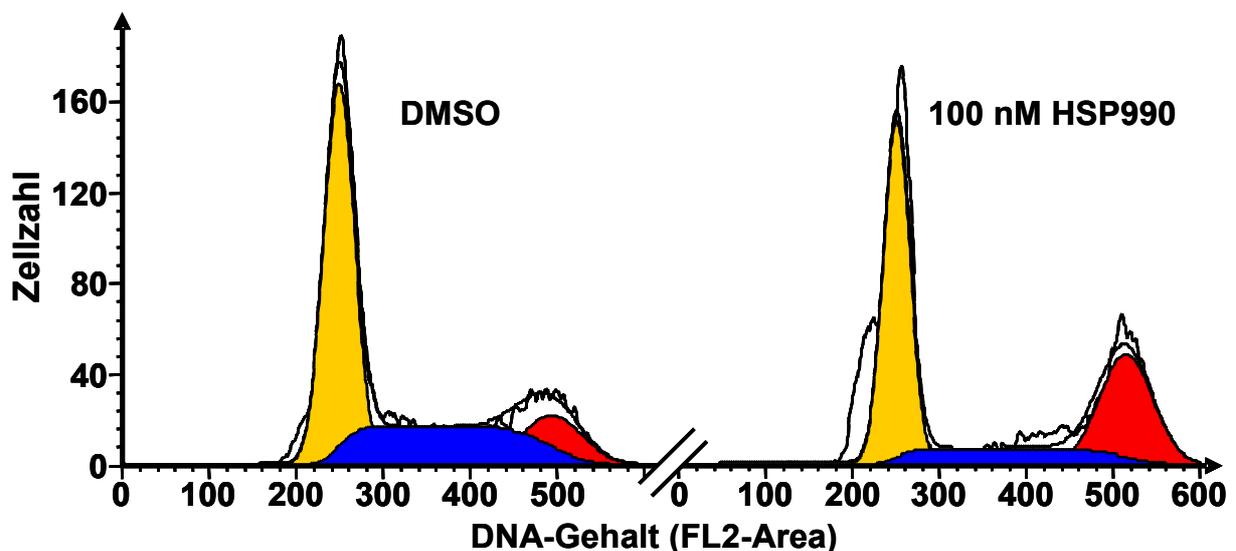


Abbildung 4. HSP990-Behandlung führt zu einem Zellzyklusarrest in der G2-Phase. OPM-2 Zellen wurden für 24 h mit 100 nM HSP990 bzw. DMSO inkubiert, anschließend wurde der DNA-Gehalt der Zellen nach Propidiumjodid-Anfärbung durchflusszytometrisch bestimmt. Mit Hilfe der Software ModFit (BD Biosciences) erfolgte die Zuordnung der Zellen zu den verschiedenen Phasen des Zellzyklus. Gelb: G1-Phase, rot: G2-Phase, blau: S-Phase.

OPM-2 Zellen wurden für verschiedene Zeiträume mit HSP990 behandelt, anschließend lysiert und bezüglich ihres Gehalts an Caspase-2, -8, -9 und -3 sowie den jeweiligen Spaltprodukten mittels Western Blot untersucht. Bereits nach 1 h Inkubation mit HSP990 konnten Spaltprodukte und damit eine Aktivierung von Caspase-8 nachgewie-

sen werden. Im weiteren Verlauf nahm die Menge an Spaltprodukten bis zu 4 h Inkubation weiter zu, um dann langsam wieder abzufallen, wobei auch nach 24 h Inkubation mit HSP990 noch eine geringe Menge an Spaltprodukten nachweisbar war (Abbildung 5). Eine Aktivierung von Caspase-2 konnte weder in der Kontrolle noch in den mit HSP990 behandelten Zellen nachgewiesen werden, im Gegensatz hierzu konnten Spaltprodukte von Caspase-9 bereits in der Kontrolle nachgewiesen werden, durch Behandlung mit HSP990 zeigte sich jedoch keine Änderung der Spaltproduktmenge (Daten nicht gezeigt). Eine Aktivierung der Effektorcaspase-3 zeigte sich in geringem Umfang bereits in der Kontrolle, ab einer Inkubation von 4 h mit HSP990 kam es jedoch zu einer deutlichen Zunahme der Spaltproduktmenge mit einem Maximum nach etwa 6 h, dann blieb die Menge an Spaltprodukten bis zum Endpunkt des Versuchs (24 h) konstant (Abbildung 5).

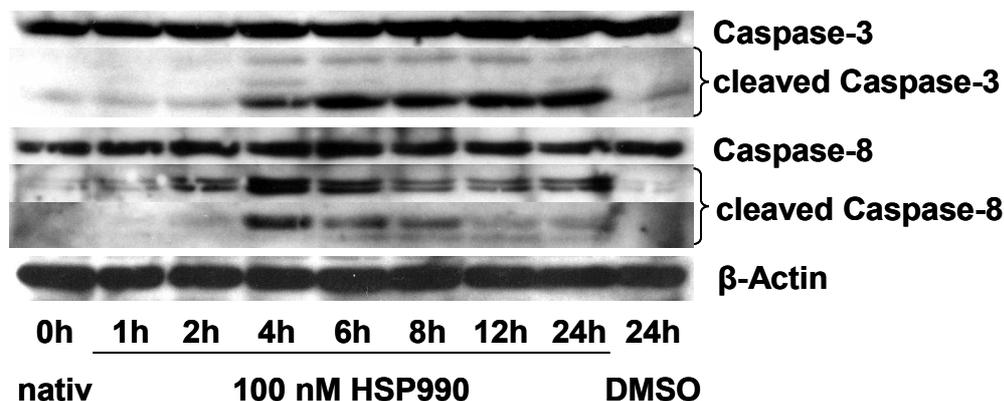


Abbildung 5. HSP990 führt zur Aktivierung der Initiatorcaspase-8 und über diese zur Aktivierung von Caspase-3. OPM-2 Zellen wurden für die angegebenen Zeitspannen mit 100 nM HSP990 behandelt, die Zelllysate wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot bezüglich ihres Gehalts an Caspase-3 und -8 untersucht, β-Actin diente als Beladungskontrolle.

3.4. Hsp90-Inhibition beeinflusst die Akt- und ERK1/2-Signalkaskaden und führt zu einer Induktion der Hsp70-Expression

Zur genaueren Analyse des Mechanismus, über den die HSP90-Inhibition das Wachstum von MM-Zellen hemmt, erfolgte eine durchflusszytometrische Untersuchung der Schlüsselfaktoren Akt und ERK1/2 sowie ihrer phosphorylierten, aktiven Formen. Des Weiteren ist aus der Literatur bekannt, dass Zellen, die mit Hsp90-Inhibitoren behandelt wurden, kompensatorisch ihre Hsp70-Expression erhöhen¹⁰⁰⁻¹⁰⁴. Aus diesem Grund wurde auch die Hsp70-Expression untersucht.

OPM-2 Zellen wurden mit 200 nM HSP990 behandelt, nach 4, 8, 12 und 24 h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit spezifischen Antikörpern gegen Akt, Phospho-

Akt, ERK1/2, Phospho-ERK1/2 oder Hsp70 gefärbt. Anschließend erfolgte die quantitative Bestimmung der jeweiligen Proteinexpression auf Einzelzellebene mittels Durchflusszytometrie.

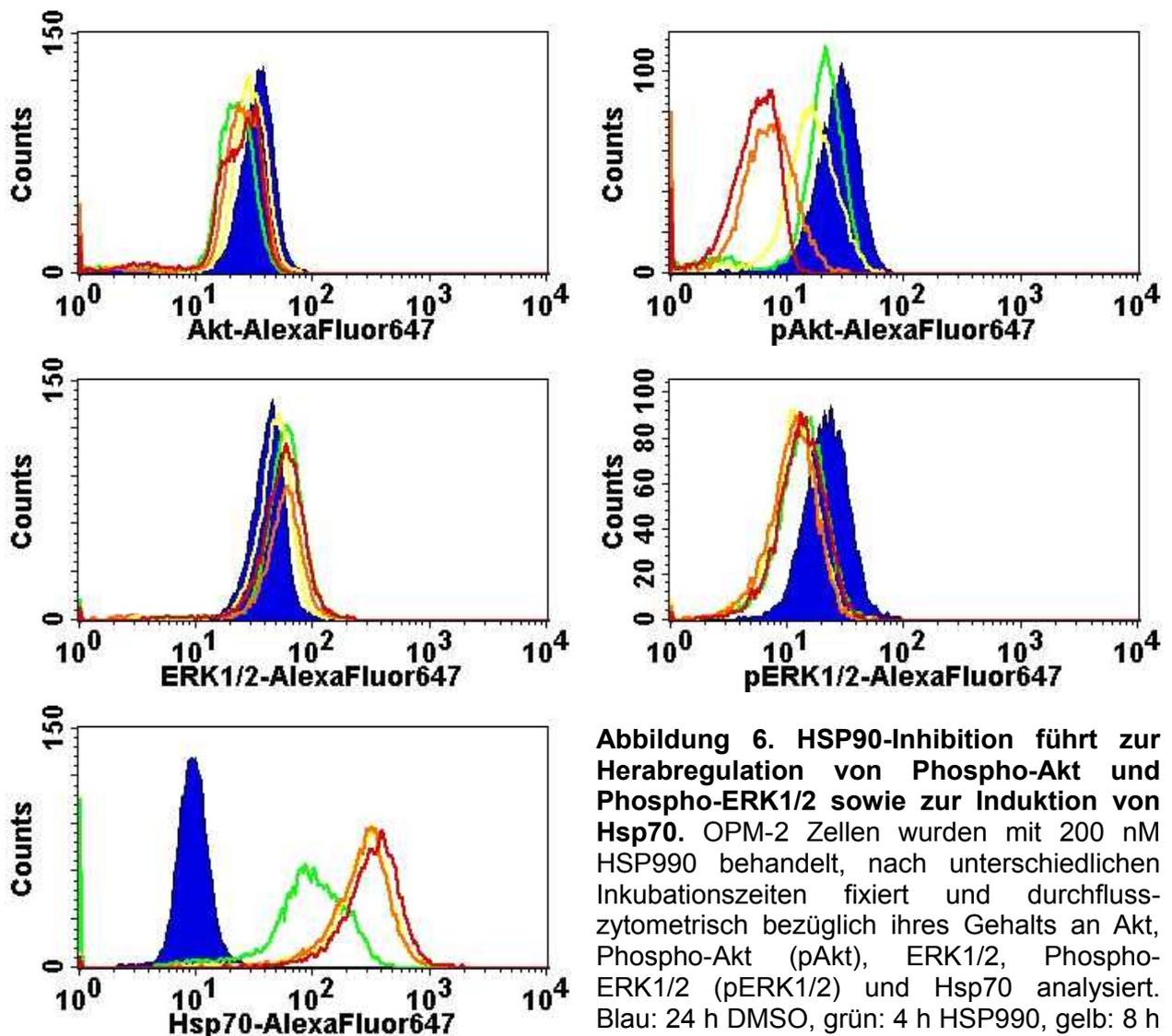


Abbildung 6. HSP90-Inhibition führt zur Herabregulation von Phospho-Akt und Phospho-ERK1/2 sowie zur Induktion von Hsp70. OPM-2 Zellen wurden mit 200 nM HSP990 behandelt, nach unterschiedlichen Inkubationszeiten fixiert und durchflusszytometrisch bezüglich ihres Gehalts an Akt, Phospho-Akt (pAkt), ERK1/2, Phospho-ERK1/2 (pERK1/2) und Hsp70 analysiert. Blau: 24 h DMSO, grün: 4 h HSP990, gelb: 8 h HSP990, orange: 12 h HSP990, rot: 24 h HSP990.

Es zeigte sich eine geringgradige Herabregulation der Akt-Expression bereits nach 4 h HSP990-Behandlung (1,6-fache Abnahme des mittleren Fluoreszenzwertes MFW), die auf demselben Niveau über 24 h persistierte (Abbildung 6). Im Gegensatz hierzu war die Phospho-Akt-Expression zwar ebenfalls schon nach 4 h HSP990-Behandlung vermindert, sank aber mit steigender Behandlungszeit weiter ab (1,4-fache Abnahme des MFW nach 4 h, 1,8-fach nach 8 h, 4-fach nach 12 h und 5-fach nach 24 h). Bezüglich der ERK1/2-Expression zeigte sich eine marginale Expressionserhöhung durch HSP990-Behandlung (1,3-fache Zunahme des MFW nach 24 h), die Phospho-ERK1/2-Expression hingegen nahm bereits nach 4 h ab (1,8-fache Abnahme des MFW) und

blieb dann bis 24 h konstant auf diesem Niveau. Wie bereits für andere Hsp90-Inhibitoren bekannt¹⁰²⁻¹⁰⁴, zeigte sich auch durch Behandlung mit HSP990 eine Zunahme der Hsp70-Expression: Bereits nach 4 h Inkubationszeit stieg der mittlere Fluoreszenzwert um den Faktor 9,7 an, um dann nach 24 h das 34-fache des Ausgangswertes zu erreichen.

Analog zu OPM-2-Zellen wurden auch die anderen fünf MM-Zelllinien durchflusszytometrisch hinsichtlich der Expression von Akt, Phospho-Akt, ERK1/2 und Phospho-ERK1/2 untersucht (Tabelle 5).

Zelllinie	Akt	Phospho-Akt	ERK1/2	Phospho-ERK1/2
OPM-2	(↓)	↓	→	↓
U266	↑	(↑)	→	↓
RPMI-8226	↑	↑	→	↓
MM.1s	↑	↓	(↓)	↓
NCI-H929	↓	(↓)	(↓)	↓
LP-1	→	(↓)	(↓)	→

Tabelle 5. Einfluss von HSP990 auf die Expression von Akt, ERK1/2 und ihre aktivierten, phosphorylierten Formen bei verschiedenen MM-Zelllinien. MM-Zelllinien wurden mit 50 nM (MM.1s, NCI-H929) bzw. 100 nM (OPM-2, U266) bzw. 200 nM (RPMI-8226, LP-1) HSP990 für 16 h behandelt, anschließend fixiert und durchflusszytometrisch bezüglich ihres Gehalts an Akt, Phospho-Akt, ERK1/2 und Phospho-ERK1/2 analysiert. Änderungen des MFW von mehr als 1,5-fach wurden als signifikant (Pfeil nach oben = Zunahme des MFW, Pfeil nach unten = Abnahme des MFW), Änderungen des MFW von 1,2- bis 1,5-fach als Tendenz (Pfeil nach oben bzw. unten in Klammern) und Änderungen des MFW von weniger als 1,2-fach als unverändert (horizontaler Pfeil) definiert.

Es fanden sich deutliche Unterschiede zwischen den Zelllinien hinsichtlich des Effekts der Hsp90-Inhibition auf den Akt- und ERK1/2-Signalweg: Die Expression von ERK1/2 zeigte sich in drei der sechs Zelllinien (OPM-2, U266 und RPMI-8226) durch Hsp90-Inhibition unbeeinflusst, in den restlichen drei Zelllinien (MM.1s, NCI-H929 und LP-1) zeigte sich tendenziell eine Abnahme der ERK1/2-Expression durch Behandlung mit HSP990. Phospho-ERK1/2 hingegen wurde in allen getesteten Zelllinien mit Ausnahme von LP-1 durch Hsp90-Inhibition herabreguliert, wobei sich die Zelllinie LP-1 in Bezug auf die Expression aller untersuchten Proteine durch Hsp90-Inhibition relativ unbeeinflusst erwies. Die Expression von Akt wurde infolge der Hsp90-Inhibition in OPM-2- und NCI-H929-Zellen vermindert, in U266-, RPMI-8226- und MM.1s-Zellen hingegen verstärkt. Mit Ausnahme der Zelllinie MM.1s zeigte sich die Expression von Akt und

Phospho-Akt durch Hsp90-Inhibition gleichsinnig beeinflusst, in MM.1s-Zellen fand sich jedoch eine Zunahme der Akt- und eine Abnahme der Phospho-Akt-Expression.

3.5. Die Basalexpression von Hsp70 korreliert nicht mit der Sensitivität hinsichtlich Hsp90-Inhibition

Wie bereits in der Literatur beschrieben, zeigte sich auch im Rahmen dieser Arbeit infolge der Hsp90-Inhibition eine Expressionssteigerung von Hsp70. Dies lässt sich als Versuch der Zellen, den Konsequenzen der Hsp90-Inhibition durch Überexpression eines anderen Chaperons, das die Funktion von Hsp90 zumindest partiell übernehmen könnte, interpretieren. Wenn dies zutreffen sollte, stellt sich die Frage, ob die Höhe der basalen Expression von Hsp70 für die unterschiedliche Sensitivität der verschiedenen Zellpopulationen bezüglich Hsp90-Inhibition verantwortlich ist. Aus diesem Grund erfolgte eine durchflusszytometrische Quantifizierung des Hsp70-Gehalts verschiedener MM-Zelllinien: Die Zelllinien OPM-2, U266, RPMI-8226, MM.1s, NCI-H929 und LP-1 wurden für 16 h mit oder ohne HSP990 kultiviert. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Hsp70-Expression, wobei jeweils eine Isotypkontrolle als Referenz diente. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 dargestellt, die zugehörigen Änderungen des mittleren Fluoreszenzwertes (MFW) finden sich in Tabelle 6.

Betrachtet man nur die Zelllinien OPM-2, U266 und RPMI-8226, so zeigte sich eine gewisse Übereinstimmung zwischen der Höhe der basalen Hsp70-Expression und der Resistenz der Zellen gegenüber der Hsp90-Inhibition: Die Zelllinie RPMI-8226, die eine partielle Resistenz gegenüber Hsp90-Inhibition aufwies (Tabelle 4), zeigte mit einer 60-fachen Erhöhung des MFW verglichen mit der Isotypkontrolle eine relativ hohe basale Hsp70-Expression. Die sensibleren Zelllinien OPM-2 und U266, deren IC_{50} -Werte für die untersuchten Hsp90-Inhibitoren im mittleren Bereich lagen, wiesen eine wesentlich geringere basale Expression von Hsp70 mit einer Erhöhung des MFW um den Faktor 5 (OPM-2) bzw. 6 (U266) verglichen mit der jeweiligen Isotypkontrolle auf.

Bei der sehr sensiblen Zelllinie NCI-H929 hingegen zeigte sich mit einer 12-fachen Erhöhung des MFW zwar eine erheblich geringere Hsp70-Expression als bei der Zelllinie RPMI-8226, jedoch eine deutlich höhere Expression als in OPM-2- oder U266-Zellen. Die Zelllinie MM.1s, die von den untersuchten Zelllinien den niedrigsten IC_{50} sowohl für HSP990 als auch für AUY922 zeigte (Tabelle 4), wies jedoch die höchste Hsp70-Expression auf. Umgekehrt zeigte die gegenüber Hsp90-Inhibition partiell resistente Zelllinie LP-1 eine basale Hsp70-Expression im mittleren Bereich.

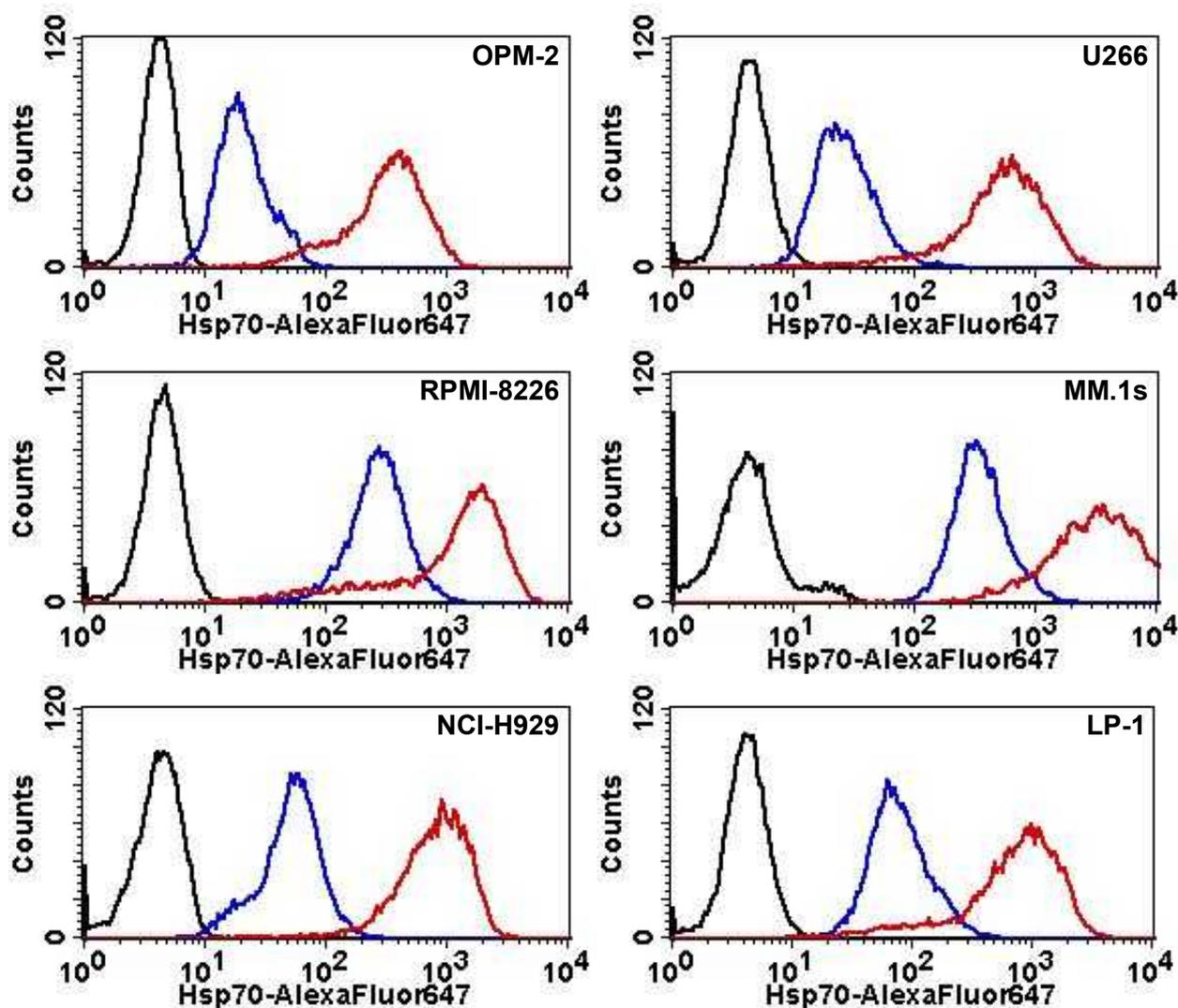


Abbildung 7. Die Hsp70-Basalexpression korreliert nicht mit der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Hsp90-Inhibition. MM-Zelllinien wurden mit 50 nM (MM.1s, NCI-H929) bzw. 100 nM (OPM-2, U266) bzw. 200 nM (RPMI-8226, LP-1) HSP990 oder einer entsprechenden Konzentration DMSO behandelt. Nach 16 h wurden sie fixiert und durchflusszytometrisch bezüglich ihres Gehalts an Hsp70 analysiert. Dabei wurden die Instrumenteneinstellung des FACS-Geräts so gewählt, dass die Isotypkontrolle bei allen Zelllinien einen MFV von 4 aufwies. Schwarz: Isotypkontrolle, blau: DMSO, rot: HSP990.

Referenz	Hsp70 basal	Hsp70 nach Hsp90-Inhibition	
	Isotypkontrolle	Isotypkontrolle	DMSO-Kontrolle
OPM-2	5	79	17
U266	6	125	21
RPMI-8226	60	311	5
MM.1s	78	704	9
NCI-H929	12	191	15
LP-1	17	186	11

Tabelle 6 (zu Abbildung 7). Hsp70-Expression basal und nach Hsp90-Inhibition. Angabe der Änderung des MFV in Vielfachen des MFV der jeweiligen Referenz.

Allen untersuchten Zelllinien war gemeinsam, dass die Zugabe von HSP990 zu einem signifikanten Anstieg der Hsp70-Expression mit einer Erhöhung des MFW um den Faktor 5 bis 21 (Tabelle 6) verglichen mit der basalen Expression führte. Im Vergleich zur jeweiligen Isotypkontrolle zeigte sich bei der Hsp70-Messung nach HSP990-Behandlung eine Zunahme des MFW um den Faktor 79 bis 704 (Tabelle 6). Es fand sich keine Korrelation zwischen der Höhe der Hsp70-Expression nach Hsp90-Inhibition und dem Ansprechen der Zellen auf die Therapie mit HSP990 (Tabelle 4+6, Abbildung 7).

3.6. Hsp90-Inhibitoren wirken synergistisch in Kombination mit Histoneacetylaseinhibitoren, Melphalan oder Doxorubicin bezüglich der Viabilitätsreduktion von Myelomzellen

Die Kombination mehrerer zytotoxischer Substanzen bei der Tumorthherapie ist heutzutage Standard, da sich so Resistenzen gegenüber Einzelsubstanzen überwinden lassen bzw. die Resistenzentstehung vermieden wird. Zudem kann durch die Ausnutzung synergistischer Effekte eine niedrigere Dosis der Einzelsubstanz eingesetzt werden, wodurch mit geringeren Nebenwirkungen zu rechnen ist. Da sich die getesteten MM-Zelllinien und primären MM-Zellen zum Teil als resistent gegenüber AUY922 bzw. HSP990 erwiesen (Tabelle 4), wurde nun zur Resistenzüberwindung die Kombination mit den HDAC-Inhibitoren SAHA oder LBH589 oder mit den bereits seit mehreren Jahrzehnten in der MM-Therapie angewendeten Substanzen Melphalan oder Doxorubicin getestet.

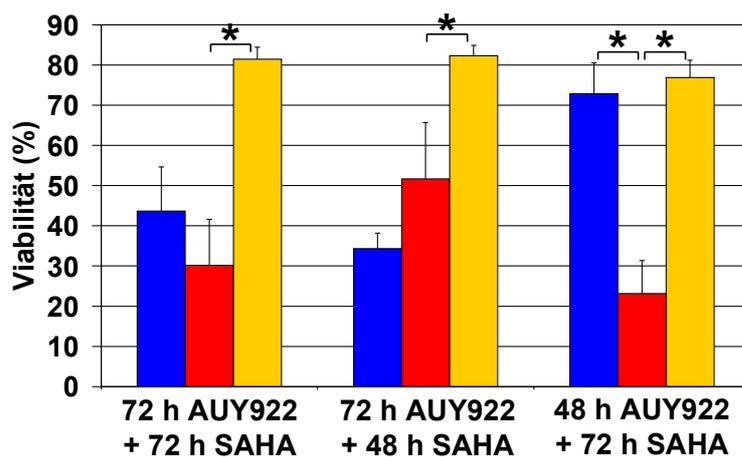


Abbildung 8. Die Kombination von AUY922 mit SAHA wirkt am effektivsten bezüglich der Viabilitätsreduktion von Myelomzellen, wenn die Zellen mit SAHA präinkubiert werden bevor AUY922 zugegeben wird. OPM-2 Zellen wurden mit AUY922 und SAHA behandelt, wobei die Substanzen entweder gleichzeitig zugegeben wurden oder eine der beiden Substanzen für 24 h allein präinkubiert wurde, bevor die zweite Substanz zugegeben wurde. Nach insgesamt

72 h wurde die Viabilität mittels MTT-Test bestimmt. Blau: AUY922, gelb: SAHA, rot: AUY922 + SAHA. * bedeutet Signifikanz $p < 0,05$.

In einem ersten Schritt erfolgte die Bestimmung der optimalen zeitlichen Reihenfolge der Substanzzugabe. Hier zeigte sich in allen Fällen der stärkste Effekt bezüglich der Viabilitätsreduktion, wenn der Kombinationspartner vor der Zugabe des Hsp90-Inhibitors für 24 h präinkubiert wurde. Dies ist beispielhaft für die Kombination von AUY922 mit SAHA in Abbildung 8 dargestellt.

Für die folgenden Versuche wurden die Zellen grundsätzlich mit dem Kombinationspartner (SAHA bzw. LBH589 bzw. Melphalan bzw. Doxorubicin) für 24 h präinkubiert, anschließend erfolgte die Zugabe von AUY922 bzw. HSP990 und nach weiteren 48 h die Viabilitätsbestimmung. Um den Kombinationseffekt genauer zu analysieren, wurde der Kombinationsindex CI nach der Methode von Chou und Talalay bestimmt, hierbei bedeutet $CI = 1$ einen additiven, $CI < 1$ einen synergistischen und $CI > 1$ einen antagonistischen Effekt durch die Kombination zweier Substanzen⁹⁹. Die Versuche wurden mit OPM-2 Zellen als Beispiel für eine sensible Zelllinie und mit RPMI-8226 Zellen als Beispiel für eine resistente Zelllinie bezüglich alleiniger Hsp90-Inhibition durchgeführt.

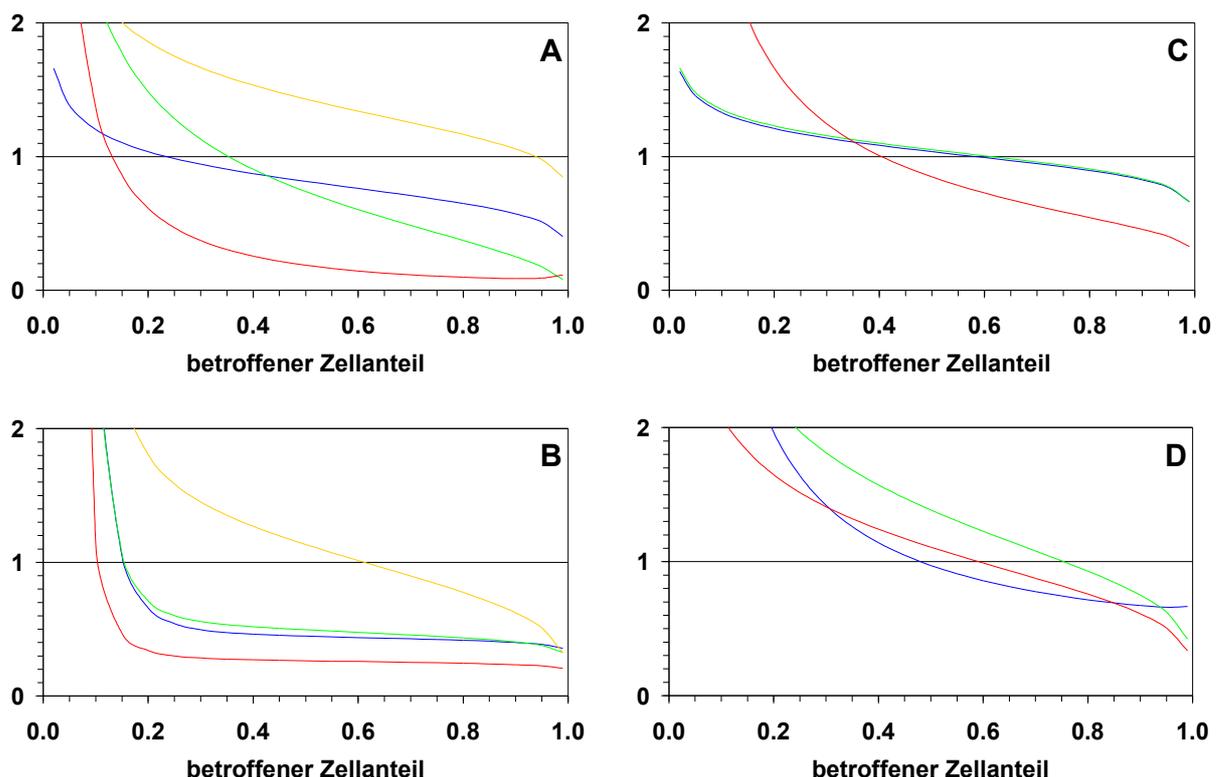


Abbildung 9. Die Kombination von HSP90-Inhibitoren mit Histondeacetylaseinhibitoren, Melphalan oder Doxorubicin wirkt synergistisch bezüglich der Viabilitätsreduktion von Myelomzellen. OPM-2 bzw. RPMI-8226 Zellen wurden mit Fraktionen des IC_{50} von SAHA (S, blau), LBH589 (L, grün), Melphalan (M, rot) oder Doxorubicin (D, gelb) behandelt, nach 24 h erfolgte die Zugabe von AUY922 bzw. HSP990 ebenfalls in Fraktionen des jeweiligen IC_{50} . Nach weiteren 48 h wurde die Viabilität der Zellen mittels MTT-Test bestimmt und der Kombinationsindex mit Hilfe der Software CalcuSyn (Biosoft) ermittelt. A) OPM-2: AUY922 + S/L/M/D; B) RPMI-8226: AUY922 + S/L/M/D; C) OPM-2: HSP990 + S/L/M; D) RPMI-8226: HSP990 + S/L/M.

Wie in Abbildung 9A dargestellt, zeigte sich bei OPM-2 Zellen ein synergistischer Effekt ($CI < 0,85$) durch die Kombination von AUY922 mit SAHA, LBH589 oder Melphalan, wobei der Effekt für die Kombination mit Melphalan am stärksten ausgeprägt war ($CI < 0,3$). Die Kombination mit Doxorubicin hingegen wirkte maximal additiv bezüglich der Viabilitätsreduktion von OPM-2 Zellen ($CI \approx 1$). Bei RPMI-8226 Zellen zeigte sich eine stärkere Synergie, erkennbar an niedrigeren CI-Werten, durch die Kombination von AUY922 mit SAHA, LBH589 oder Melphalan verglichen mit den bei OPM-2 Zellen beobachteten Effekten. Außerdem erwies sich bei RPMI-8226 Zellen auch die Kombination von AUY922 mit Doxorubicin als synergistisch, wenngleich hier der synergistische Effekt schwächer ausgeprägt war als bei den anderen Substanzkombinationen ($CI < 0,85$ ab einem betroffenen Zellanteil von 60%) (Abbildung 9B). Analoge Versuche wurden auch für die Kombination von HSP990 mit SAHA, LBH589 oder Melphalan durchgeführt, hier zeigten zwar ebenfalls synergistische Effekte sowohl bei OPM-2 als auch bei RPMI-8226 Zellen, diese waren jedoch grundsätzlich schwächer ausgeprägt als in der Kombination mit AUY922 anstelle von HSP990 (Abbildung 9C+D).

3.7. Die Kombination von AUY922 mit Histondeacetylaseinhibitoren, Melphalan oder Doxorubicin führt zu einer signifikanten Viabilitätsreduktion von primären Myelomzellen verglichen mit der Wirkung der einzelnen Substanzen

Nachdem sich in MM-Zelllinien synergistische Effekte durch Kombination eines HSP90-Inhibitors mit verschiedenen anderen Zytostatika zeigten, wurde untersucht, ob sich diese Effekte auch bei primären MM-Zellen beobachten lassen und ob sich auch hier eine vorhandene Resistenz gegenüber der Hsp90-Inhibition überwinden lässt. Hierzu wurden Zellen aus Knochenmarkaspirat von drei Patienten untersucht, wobei die Zellen von zwei der drei Patienten gegenüber AUY922-Monotherapie partiell resistent waren (maximale Inhibition Patient A: 59%, Patient B: 51%, Patient C: 90%; entsprechend Patient 5, 6 und 9 aus Tabelle 4). Die Zellen wurden mit dem Kombinationspartner für 24 h präinkubiert, anschließend erfolgte die Zugabe von AUY922 und nach weiteren 48 h wurde die Viabilität mittels MTT-Test bestimmt.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, führte die Kombination von AUY922 mit SAHA (Abbildung 10A), LBH589 (Abbildung 10B), Melphalan oder Doxorubicin (Abbildung 10C) zu einer statistisch signifikant erniedrigten Viabilität verglichen mit dem Effekt der jeweiligen Einzelsubstanzen ($p < 0,05$). So führte die Behandlung mit 50 nM AUY922 allein zu

einer Viabilitätsreduktion von 26, 24 bzw. 59% bei den Zellen von Patient A, B bzw. C. Eine Monotherapie mit 1 μM SAHA reduzierte die Viabilität um 18 bzw. 21 bzw. 28% und mit 8 nM LBH589 um 26 bzw. 24 bzw. 51% (Patient A bzw. B bzw. C). Die Kombination von AUY922 mit SAHA führte zu einer Viabilitätsreduktion um 66 bzw. 47 bzw. 82% und die Kombination von AUY922 mit LBH589 zu einer Viabilitätsreduktion um 77 bzw. 63 bzw. 85% bei Zellen von Patient A bzw. B bzw. C.

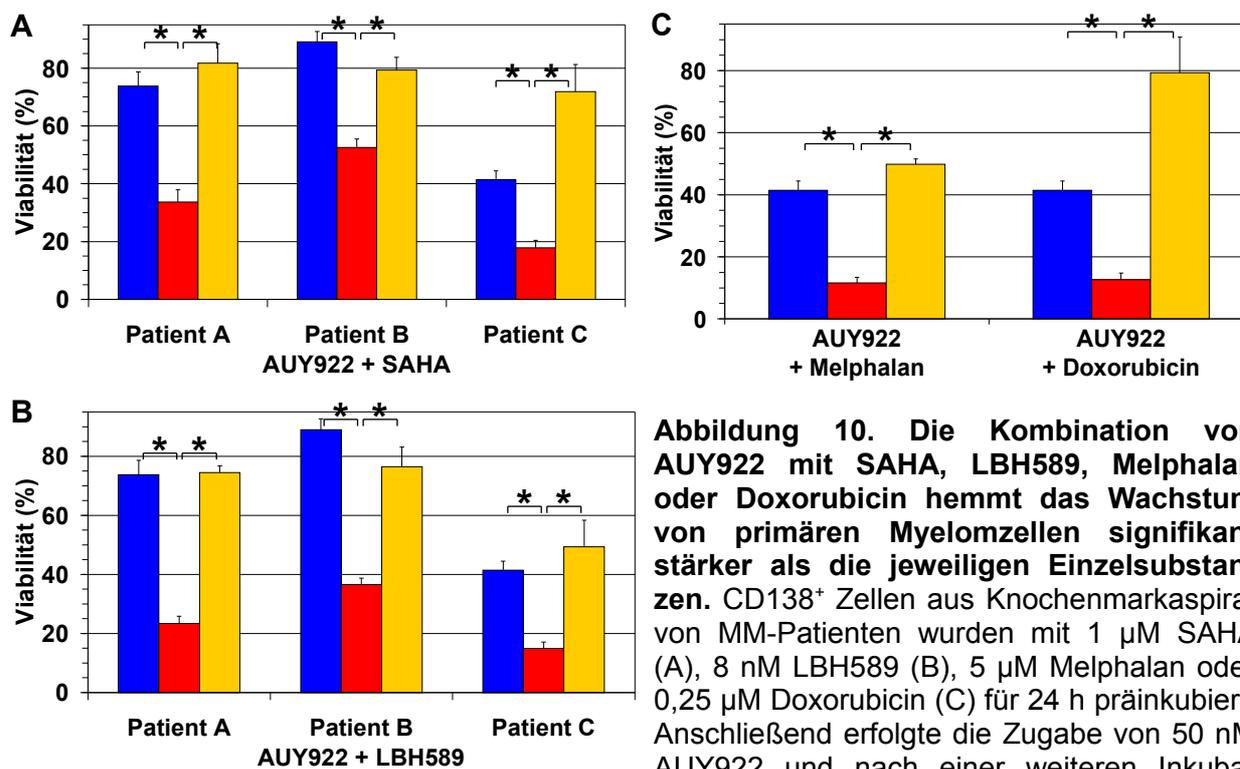


Abbildung 10. Die Kombination von AUY922 mit SAHA, LBH589, Melphalan oder Doxorubicin hemmt das Wachstum von primären Myelomzellen signifikant stärker als die jeweiligen Einzelsubstanzen. CD138⁺ Zellen aus Knochenmarkaspirat von MM-Patienten wurden mit 1 μM SAHA (A), 8 nM LBH589 (B), 5 μM Melphalan oder 0,25 μM Doxorubicin (C) für 24 h präinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 nM AUY922 und nach einer weiteren Inkubationszeit von 48 h wurde die Viabilität der Zellen mittels MTT-Test bestimmt. Blau: AUY922, gelb: Kombinationspartner, d.h. SAHA (A) bzw. LBH589 (B) bzw. Melphalan (C, links) bzw. Doxorubicin (C, rechts), rot: AUY922 + Kombinationspartner. * bedeutet Signifikanz $p < 0,05$. (Abb. 10C: nur Patient C)

tionszeit von 48 h wurde die Viabilität der Zellen mittels MTT-Test bestimmt. Blau: AUY922, gelb: Kombinationspartner, d.h. SAHA (A) bzw. LBH589 (B) bzw. Melphalan (C, links) bzw. Doxorubicin (C, rechts), rot: AUY922 + Kombinationspartner. * bedeutet Signifikanz $p < 0,05$. (Abb. 10C: nur Patient C)

Für Melphalan und Doxorubicin konnten auf Grund der begrenzten Verfügbarkeit an primären Zellen nur Daten für Patient C erhoben werden. Hier reduzierte eine Monotherapie mit 5 μM Melphalan die Viabilität um 50%, mit 0,25 μM Doxorubicin um 21% und mit 50 nM AUY922 um 59%. Die Kombination von AUY922 mit Melphalan bzw. Doxorubicin zeigte verglichen mit dem durch Monotherapie hervorgerufenen Effekt eine signifikante Viabilitätsreduktion um 88 bzw. 87%.

Zusammenfassend erniedrigten somit alle getesteten Substanzkombinationen bei den Zellen aller drei Patienten signifikant die Viabilität verglichen mit dem Effekt einer Monotherapie mit den jeweiligen Einzelsubstanzen und die relative Resistenz der Zellen von Patient A und B gegenüber AUY922-Monotherapie konnte durch die Kombinations-

therapie überwunden werden (größere Viabilitätsreduktion durch die Kombinations-therapie mit zwei eher niedrig dosierten Substanzen als durch hoch dosiertes AUY922 allein).

3.8. Die Kombination von HSP90-Inhibitoren mit Melphalan führt zur verstärkten Aktivierung der Caspasen 2, 3, 8 und 9

Wie bereits gezeigt, wird die Apoptose durch Behandlung mit AUY922 oder HSP990 über Caspase-8 eingeleitet (Abbildung 5). Im Folgenden wurde nun untersucht, ob die Kombination von Hsp90-Inhibitoren mit anderen Zytostatika möglicherweise weitere Wege der Apoptoseeinleitung aktiviert. Hierzu wurden OPM-2-Zellen mit SAHA, LBH589, Doxorubicin oder Melphalan für 4 h präinkubiert, dann erfolgte die Zugabe von AUY922 bzw. HSP990 und nach weiteren 8 h wurden die Zellen lysiert und bezüglich des Gehalts verschiedener Caspasen mittels Western Blot untersucht.

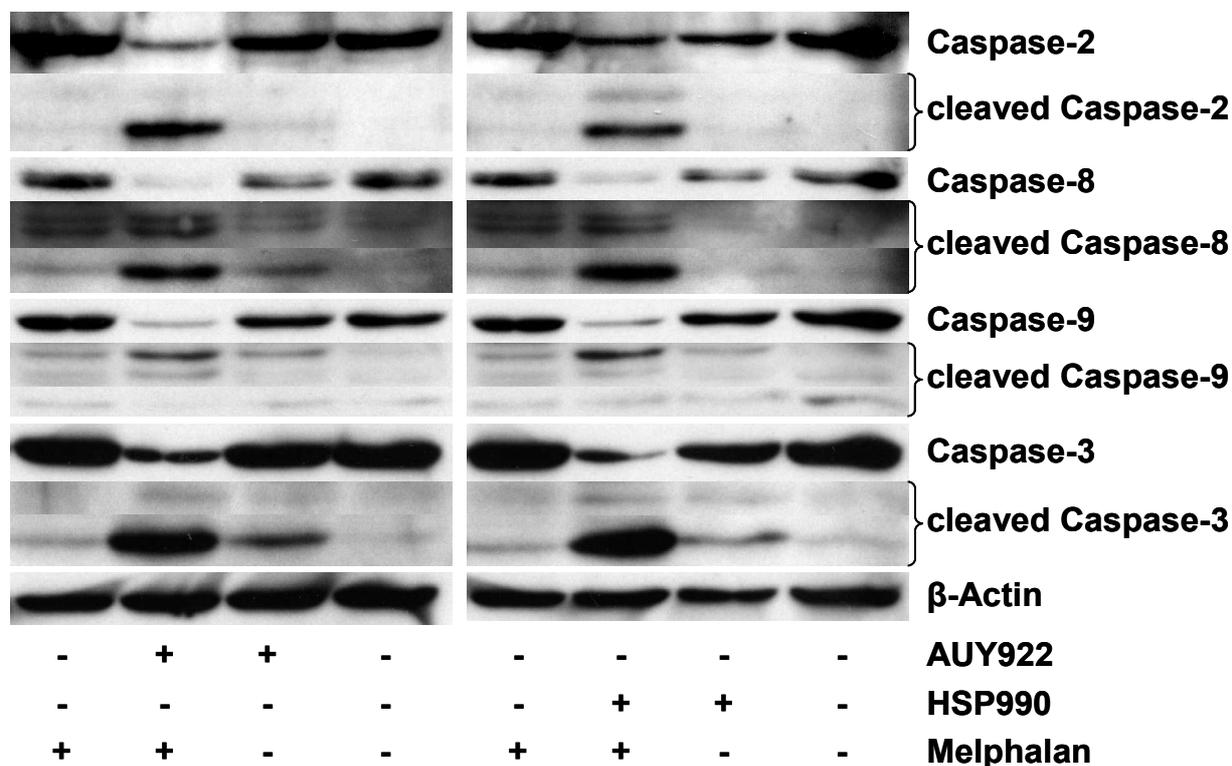


Abbildung 11. Die Kombination von HSP90-Inhibitoren mit Melphalan führt zur verstärkten Aktivierung der Caspasen 2, 8, 9 und 3. OPM-2 Zellen wurden für 4 h mit 15 µM Melphalan behandelt, dann erfolgte die Zugabe von 40 nM AUY922 bzw. HSP990 und nach einer weiteren Inkubationszeit von 8 h mit beiden Substanzen wurden die Zellen lysiert. Die Zelllysate wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot bezüglich der Expression der Caspasen 2, 8, 9 und 3 sowie der zugehörigen Spaltprodukte untersucht. β-Actin diente als Beladungskontrolle.

Im Fall der Kombination mit HDAC-Inhibitoren oder Doxorubicin zeigte sich nur die bereits durch die Hsp90-Inhibitor-Monotherapie bewirkte Aktivierung von Caspase-8, jedoch keine Aktivierung anderer Initiatorcaspasen (Daten nicht gezeigt). Die Kombi-

nation von AUY922 oder HSP990 mit Melphalan hingegen führte erstens zu einer verstärkten Aktivierung von Caspase-8 durch die Kombinationstherapie verglichen mit dem Effekt der jeweiligen Einzelsubstanzen und zweitens wurden durch die Kombinationstherapie zusätzlich Caspase-2 und -9 als weitere Initiatorcaspasen aktiviert (Abbildung 11). In Übereinstimmung mit der verstärkten Aktivierung der verschiedenen Initiatorcaspasen wurde auch Caspase-3 als letztes Glied der Caspasenkaskade durch die Kombination von AUY922 bzw. HSP990 mit Melphalan stärker aktiviert, als es durch die jeweiligen Einzelsubstanzen der Fall war.

4. Diskussion

Obwohl dank neuer Therapiemöglichkeiten wie der Hochdosischemotherapie mit Melphalan in den letzten zwei Jahrzehnten eine deutliche Verbesserung der Prognose beim MM erreicht werden konnte, handelt es sich beim MM weiterhin um eine Krankheit, die bei der überwiegenden Mehrzahl der Patienten nicht geheilt werden kann. Neue medikamentöse Therapien sollen einerseits die Lebenserwartung der Patienten verbessern, andererseits jedoch durch ihre Nebenwirkungen die Lebensqualität möglichst wenig beeinträchtigen. Um die Wirkung auf Nicht-Tumorzellen – und damit die unerwünschten Wirkungen – so gering wie möglich zu halten, werden Substanzen gesucht, deren Angriffsziele ganz überwiegend in malignen Zellen vorliegen oder die für maligne Zellen eine weitaus größere Bedeutung haben als für normale Zellen. Bei der präklinischen Entwicklung neuer, spezifischer Therapien des MM sind in den letzten Jahren als mögliche Zielstrukturen vor allem die vier Signalwege in den Mittelpunkt gerückt, die für das Überleben und die Proliferation von MM-Zellen besonders wichtig sind: der JAK/Stat-, PI3K/Akt-, NFκB- und der MAPK-Signalweg über ERK1/2 als MAPK⁴.

Im Vergleich zur unspezifischen zytostatischen Therapie mit Substanzen wie beispielsweise Melphalan, das eine globale Alkylierung der DNA verursacht, gibt es bei der zielgerichteten antineoplastischen Therapie jedoch auch einige Probleme: Die Signalwege sind zum Teil redundant, das heißt bei Ausschaltung eines einzelnen Signalwegs kann die Zelle durch verstärkte Aktivierung der anderen Signalwege der antiproliferativen Wirkung eines Inhibitors entgehen und zumindest partiell resistent werden^{105, 106}. Außerdem sind die verschiedenen Signalkaskaden je nach zu Grunde liegender Genetik bei individuellen Patienten von unterschiedlicher Relevanz, sodass die Ausschaltung ein und desselben Signalwegs bei verschiedenen Patienten zu einem unterschiedlichen Ansprechen auf die Therapie führen kann¹⁰⁷⁻¹¹¹.

Der Vorteil von Hsp90 als Ziel der antineoplastischen Therapie im Vergleich zum direkten Angriff auf eine spezifische Signalwegkomponente liegt darin, dass zentrale Komponenten aller vier entscheidenden Signalwege Hsp90-Substrate sind, das heißt Hsp90-Inhibition wirkt sich auf alle vier Signalwege aus (Tabelle 7)¹¹²⁻¹²¹.

Zudem ist die Kombination verschiedener Substanzen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen (z.B. DNA-Schädigung in Kombination mit Kinaseinhibition) äußerst sinnvoll: Auf diese Weise kann die Zelle die Blockade eines Signalwegs nicht oder nur

schwer durch Verstärkung eines anderen kompensieren und die Resistenzbildung wird vermindert.

Signalweg	Signalwegkomponente und Hsp90-Substrat
JAK/Stat	JAK1 ^{112, 113} , Stat3 ¹¹³⁻¹¹⁵
PI3K/Akt	IGF-1-Rezeptor ¹¹⁶ , Akt ^{117, 118}
NFκB	<i>Inhibitor of κB</i> (IκB) -Kinasen α, β, γ, ε ^{119, 120}
MAPK	Raf-1 ¹²¹ , MAP/ERK Kinase (MEK) ¹²¹

Tabelle 7. Beispiele für Hsp90-abhängige Signalwegkomponenten beim multiplen Myelom

4.1. Wirksamkeit von AUY922 und HSP990 als Einzelsubstanzen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die beiden neuen, niedermolekularen Hsp90-Inhibitoren AUY922 und HSP990 effektiv die Proliferation von MM-Zellen hemmen können. Allerdings ist die Wirksamkeit beider Substanzen sowohl bei primären Zellen als auch bei Zelllinien stark abhängig von den Eigenschaften der individuellen Tumorphosphopopulation bzw. Zelllinie: Es gibt Patientenzellen sowie Zelllinien, die bereits infolge einer Exposition mit geringen Konzentrationen AUY922 bzw. HSP990 ihren Stoffwechsel vollkommen einstellen, Zellen anderen Ursprungs hingegen weisen selbst gegenüber hohen Substanzkonzentrationen eine Resistenz auf. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die unterschiedliche Hsp90-Inhibitoren nicht nur beim MM sondern auch bei anderen Neoplasien hinsichtlich ihrer Wirksamkeit untersuchten^{25, 122-129}.

Die Ursache für das unterschiedliche Ansprechen auf die Therapie mit Hsp90-Inhibitoren ist bislang ungeklärt, möglicherweise könnten individuelle genetische Veränderungen für die Sensitivität der Zellen verantwortlich sein: So könnte einerseits das Hsp90-Molekül selbst mutiert und damit seine Affinität zu den eingesetzten Inhibitoren verändert sein. Andererseits könnten einige der Hsp90-Substrate so mutiert sein, dass sie auch ohne Anwesenheit eines Chaperons funktionell bleiben und eine Hsp90-Inhibition entsprechend folgenlos bliebe. Weiterhin ist denkbar, dass die Hsp90-Substrate zwar durch Hsp90 stabilisiert werden und ihre Funktion somit besser erfüllen können, das heißt jedoch nicht, dass sie ohne Hsp90 vollkommen funktionslos sein müssen. Dies würde die partielle Resistenz einiger Zellklone gegenüber Hsp90-Inhibition erklären: Auf einem niedrigeren Niveau könnten die für das Überleben der Zelle notwendigen Signalwege auch ohne Hsp90 aktiv sein. Entsprechend wäre auch

eine weitere Dosissteigerung des Hsp90-Inhibitors ab der Konzentration, bei der alle Hsp90-Moleküle einer Zelle gehemmt sind, ohne weiteren Effekt.

Zusätzlich könnte das spezifische Profil einer Zelle an Cochaperonen sowie an posttranslationalen Modifikationen die Interaktion zwischen Hsp90 und seinem Inhibitor sowie zwischen Hsp90 und seinen Substraten beeinflussen.

Eine weitere Erklärung für das unterschiedliche Ansprechen auf die Hsp90-Inhibition könnte sein, dass andere Chaperone zumindest teilweise die Funktion von Hsp90 übernehmen. Diese Theorie wird durch die bereits bekannte und auch hier beobachtete Expressionssteigerung von Hsp70 nach Applikation von Hsp90-Inhibitoren gestützt¹⁰⁰⁻¹⁰⁴. Zudem konnten Zaarur et al. zeigen, dass eine Hemmung der Hochregulation von Hitzeschockproteinen durch *knockout* des Transkriptionsfaktors *heat shock factor 1* (HSF-1) zu einem sensitiveren Ansprechen verschiedener Tumorzellen auf Hsp90-Inhibitoren führt¹³⁰. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Expressionslevel von Hsp70 und dem Ansprechen auf die Hsp90-Inhibition gefunden werden: So war zwar in unbehandelten OPM-2- und U266-Zellen die Hsp70-Expression geringer als in den partiell resistenten RPMI-8226-Zellen, die sensitiven Zelllinien MM.1s und NCI-H929 hingegen wiesen eine ähnlich hohe bzw. höhere Hsp70-Expression auf als RPMI-8226-Zellen (Abbildung 7, Tabelle 6). Trotzdem könnte Hsp70 an einer Resistenz gegenüber Hsp90-Inhibition beteiligt sein, wobei vermutlich nicht ausschließlich die Menge an Hsp70 sondern viel mehr seine Funktionalität in Abhängigkeit beispielsweise von zellspezifischen Mutationen, posttranslationalen Modifikationen und Cofaktoren entscheidend sein dürfte.

4.2. Stoffwechselveränderungen und Apoptoseeinleitung durch Hsp90-Inhibition

4.2.1. Apoptoseeinleitung und Zellzyklusarrest

Die Einleitung der Apoptose durch Hsp90-Inhibition erfolgte bei den untersuchten Zelllinien bereits nach zwei Stunden über die Spaltung von Caspase-8. Dies könnte durch die Aktivierung von Rezeptoren der TNF-Familie induziert werden, es ist jedoch auch denkbar, dass die Hsp90-Inhibition zu einer Destabilisierung zytosolischer Repressoren der Caspasenaktivierung führt. Im Weiteren bewirkten sowohl AUY922 und HSP990 als auch die Vorgängersubstanz 17-AAG einen deutlichen Zellzyklusarrest in der G2-Phase (OPM-2, RPMI-8226 und U266; Daten zum Teil nicht gezeigt). Induktion eines Zellzyklusarrestes speziell in der G2-Phase ist jedoch keine regelhafte Eigenschaft der Hsp90-Inhibitoren, da je nach Tumorart der durch Hsp90-Inhibition induzierte Arrest

auch in anderen Phasen des Zellzyklus stattfinden kann^{103, 128, 129, 131}. Hier scheint der Tumortyp entscheidend zu sein.

4.2.2. Akt-Signalweg

Bezüglich der für das Wachstum von MM-Zellen entscheidenden Signaltransduktionswege zeigte sich in OPM-2-Zellen zwar nur eine geringe Verminderung der Gesamt-Akt-Expression, die Menge der aktiven, phosphorylierten Form sank nach 24 h Hsp90-Inhibition jedoch auf 20% des Ausgangsniveaus ab (Abbildung 6). Dies lässt auf eine deutliche Hemmung des PI3K/Akt-Signalweges schließen, was wiederum auch eine verminderte NFκB-Aktivierung zur Folge hat¹⁶. Eine Verminderung der Expression von Akt bzw. Phospho-Akt in MM-Zellen ist in der Literatur auch infolge einer Hsp90-Inhibition mit anderen Substanzen wie beispielsweise 17-AAG beschrieben^{104, 132}.

Zöllinger et al. konnten zeigen, dass es Akt-abhängige und -unabhängige Zellklone sowohl bei MM-Zelllinien als auch bei primären MM-Zellen gibt: Akt-abhängige Klone, wie z.B. die Zelllinie OPM-2 oder MM.1s, exprimieren Phospho-Akt und ihr Wachstum lässt sich durch Akt-Inhibitoren hemmen. Die Akt-unabhängigen Klone, beispielsweise die Zelllinie U266, weisen dagegen kein Phospho-Akt auf und sind resistent gegenüber Akt-Inhibitoren¹¹¹. Im Rahmen dieser Arbeit konnte – in Einklang mit den Ergebnissen von Zöllinger et al. – in U266-Zellen kein Phospho-Akt nachgewiesen werden, interessanterweise zeigte sich jedoch bei dieser Zelllinie eine geringe Menge Phospho-Akt nach Hsp90-Inhibition. Dies könnte bedeuten, dass die Zellen alternative, sonst inaktivierte Stoffwechselwege aktivieren, um den Folgen der Hsp90-Inhibition zu entgehen, andererseits bietet es eine mögliche Erklärung, weshalb sich das Wachstum von U266-Zellen im Vergleich zu OPM-2-Zellen durch Hsp90-Inhibition nicht vollständig unterdrücken lässt: Da U266-Zellen normalerweise nicht auf Phospho-Akt angewiesen sind, könnte ihnen im zellulären Stress eine geringe Menge ausreichen, wohingegen OPM-2-Zellen Akt-abhängig sind und damit bereits eine unvollständige Hemmung dieses Signalweges zu einer Beeinträchtigung des Wachstums führen könnte.

Eine ähnliche Erklärung bietet sich auch für die partielle Resistenz der Zelllinie RPMI-8226 gegenüber Hsp90-Inhibition an: Hier war zwar bereits in unbehandelten Zellen Phospho-Akt nachweisbar, die Expression stieg jedoch infolge der Behandlung mit Hsp90-Inhibitoren weiter an. Möglicherweise ist Phospho-Akt in diesen Zellen auch in Abwesenheit von Hsp90 funktionell, sodass seine Expressionserhöhung die Hemmung anderer Signalkaskaden zumindest teilweise ausgleichen kann.

Bei den gegenüber Hsp90-Inhibition sehr sensiblen MM.1s-Zellen hingegen wurde zwar die Gesamt-Akt-Expression durch Hsp90-Inhibition verstärkt, die Phospho-Akt-Expression hingegen nahm ab. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Zellen zwar versuchen, die Beeinflussung des Akt-Signalwegs durch Hsp90-Inhibition mittels Expressionssteigerung von Akt auszugleichen. Hsp90 ist jedoch notwendig, um Phospho-Akt zu stabilisieren, sodass es trotz Zunahme von Gesamt-Akt zu einer Abnahme der Phospho-Akt-Menge und damit zu einer (partiellen) Inaktivierung der Akt-Signalkaskade kommt.

4.2.3. ERK1/2-Signalweg

Die Hemmung des ERK1/2-Signalwegs zeigte sich im Vergleich zum Akt-Signalweg bei OPM-2-Zellen weniger stark ausgeprägt: Die Gesamt-ERK1/2-Expression nahm nach Hsp90-Inhibition sogar leicht zu. Aber auch hier sank die Menge der aktiven, phosphorylierten Form ab, allerdings nur auf 55% des Ausgangsniveaus (Abbildung 6).

Der Vergleich der verschiedenen MM-Zelllinien zeigte eine durchweg einheitliche Beeinflussung des ERK1/2-Signalwegs durch Hsp90-Inhibition (Tabelle 5): Die Gesamt-ERK1/2-Expression war bei allen Zelllinien unbeeinflusst oder nur geringfügig verändert, die Expression von Phospho-ERK1/2 als Marker für die Aktivität des Signalwegs hingegen wurde durch Hsp90-Inhibition bei allen untersuchten Zelllinien vermindert. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die den Einfluss verschiedener Hsp90-Inhibitoren beim MM und anderen Tumoren auf den ERK1/2-Signalweg untersuchten^{104, 133, 134}.

4.2.4. JAK/Stat-Signalweg

Die Expression von Gesamt-Stat3 als Endpunkt des JAK/Stat-Signalwegs zeigte sich bei den hier analysierten MM-Zelllinien durch Hsp90-Inhibition unbeeinflusst (Daten nicht gezeigt). Eine Phosphorylierung von Stat3, gleichbedeutend mit der Aktivierung des Signalwegs, war von den sechs getesteten MM-Zelllinien nur in der Zelllinie U266 nachweisbar, hier zeigte sich eine leichte Expressionsabnahme (1,3-fache Abnahme des MFW) durch Hsp90-Inhibition (Daten nicht gezeigt).

Catlett-Falcone et al. konnten zeigen, dass die Zelllinie U266 – im Gegensatz zu den anderen im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten MM-Zelllinien – einen konstitutiv aktiven JAK/Stat3-Signalweg aufweist, der abhängig von autokrin sezerniertem IL-6 ist¹⁰⁷. Die Stat3-Aktivierung lässt sich durch Zugabe von zusätzlichem IL-6 noch steigern. Im Rahmen anderer Arbeiten, bei denen die Zellen grundsätzlich mit IL-6

stimuliert wurden, konnte auch in weiteren IL-6-abhängigen MM-Zelllinien aktives Phospho-Stat3 nachgewiesen werden^{104, 134}. Bei den hier vorgestellten Versuchen wurde jedoch kein IL-6 zugesetzt, sodass es nicht verwunderlich ist, dass auch in unbehandelten Zellen mit Ausnahme der Zelllinie, die sich autokrin mit IL-6 stimuliert, kein Phospho-Stat3 messbar war.

Dies lässt darauf schließen, dass Hsp90-Inhibition zwar erwartungsgemäß den JAK/Stat-Signalweg hemmen kann, in fünf der sechs getesteten Zelllinien ist dieser Signalweg jedoch in Abwesenheit von IL-6 ohnehin inaktiv.

4.3. AUY922 bzw. HSP990 in Kombination mit anderen Chemotherapeutika

Nicht nur im Rahmen dieser Arbeit sondern auch bei Untersuchungen anderer Gruppen zeigte sich, dass das Ansprechen von MM- sowie anderen Tumorzellen auf alleinige Hsp90-Inhibition sehr variabel ist^{25, 122-129}. Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll, bei der antineoplastischen Therapie einen Hsp90-Inhibitor mit mindestens einer anderen Substanz zu kombinieren. Andere Gruppen zeigten bereits bei verschiedenen Tumor-entitäten einen zusätzlichen zytotoxischen Effekt durch Kombination von Hsp90-Inhibitoren mit zytotoxischen Substanzen wie Etoposid (Topoisomeraseinhibitor)¹³⁵, Taxol (Mitosespindelgift)¹³⁶, Cisplatin (Querverknüpfung der DNA)¹⁰¹ oder Cytarabin (Pyrimidinantagonist)¹³⁷ sowie mit zielgerichteten Therapeutika wie Imatinib (Tyrosinkinaseinhibitor)¹³⁸, Bortezomib (Proteasominhibitor)^{139, 140} oder Rituximab (Anti-CD20)¹⁴¹. Bisher finden sich in der Literatur keine Angaben zur Kombination von Hsp90-Inhibitoren mit Melphalan (Alkylans) oder Doxorubicin (Anthrazyklin). Hingegen gibt es einige Publikationen zur Kombination von HDAC- mit Hsp90-Inhibitoren, bislang allerdings nicht beim MM¹⁴²⁻¹⁴⁵.

Es zeigte sich, dass die Kombination von AUY922 bzw. HSP990 mit HDAC-Inhibitoren oder Melphalan oder Doxorubicin synergistisch bezüglich der Apoptoseinduktion wirkt (Abbildung 9). Die Synergie war bei der gegenüber alleiniger Hsp90-Inhibition partiell resistenten Zelllinie RPMI-8226 stärker ausgeprägt (kleinerer CI), als bei der Zelllinie OPM-2, die sich bereits gegenüber alleiniger Hsp90-Inhibition sensibel zeigte. So ließ sich mittels aller getesteten Kombinationen die primäre Resistenz von RPMI-8226-Zellen gegenüber Hsp90-Inhibition überwinden.

4.3.1. Hsp90-Inhibition in Kombination mit Histondeacetylaseinhibition

Aus der Arbeit anderer Gruppen ist bekannt, dass acetyliertes Hsp90 sowohl ATP, als auch Cochaperone und Substratproteine weniger stark bindet als deacetyliertes, des

Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Bindung des Hsp90-Inhibitors 17-AAG an acetyliertes Hsp90 stärker ist als an deacetyliertes^{70, 146}. Hsp90 befindet sich im Zytoplasma, wohingegen die meisten HDACs im Nukleus lokalisiert sind. Bei HDAC6 jedoch handelt es sich um ein überwiegend im Zytosol vorkommendes Protein, von dem außerdem gezeigt werden konnte, dass Hsp90 zu seinen Substraten zählt¹⁴⁷⁻¹⁵⁰.

Diese Fakten machen die Kombination von HDAC- mit Hsp90-Inhibitoren sehr viel versprechend. Bemerkenswert ist, dass die verschiedenen Substanzkombinationen bei gleichzeitiger Zugabe bestenfalls eine additive Wirkung zeigten und erst bei Präinkubation des HDAC-Inhibitors eine Synergie erreicht wurde. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass Hsp90 zuerst acetyliert werden muss, damit anschließend seine Bindung und damit Empfindlichkeit gegenüber einem Hsp90-Inhibitor erhöht ist^{70, 146, 147}. Bei Versuchen anderer Arbeitsgruppen zeigte sich zum Teil ebenfalls eine Sequenzabhängigkeit bei der Kombination von Hsp90-Inhibitoren mit anderen Substanzen, auch hier musste der Hsp90-Inhibitor nach Präinkubation mit dem Kombinationspartner zugegeben werden, um einen maximalen Effekt zu erreichen^{137, 151, 152}. Hier wurde postuliert, dass die Hsp90-Inhibition einen profunden Zellzyklusarrest bewirkt und dass deshalb weitere Substanzen, die in anderen Phasen des Zellzyklus wirken bzw. die für ihre Wirkung ein Minimum an Proliferation benötigen, nicht mehr wirken können, sodass es nur zu einer Synergie kommt, wenn der Kombinationspartner seine Wirkung entfalten kann bevor der Hsp90-Inhibitor zum Zellzyklusarrest führt. Diese Erklärung könnte auch auf die Kombination von HDAC- mit Hsp90-Inhibitoren zutreffen.

Im Hinblick auf die beiden verschiedenen getesteten HDAC-Inhibitoren konnten nur minimale Unterschiede festgestellt werden: Die Synergie beider Hsp90-Inhibitoren mit SAHA war tendenziell etwas stärker ausgeprägt als mit LBH589.

4.3.2. Hsp90-Inhibition in Kombination mit Melphalan oder Doxorubicin

Bei Melphalan, einem Alkylans, handelt es sich um eine seit den 1960er Jahren etablierte Substanz zur Therapie des MM. Trotz der Entwicklungen der letzten Jahre ist Melphalan – mit Ausnahme der Induktionstherapie vor Stammzellmobilisation für die auf die Hochdosischemotherapie folgende ASCT – weiterhin Bestandteil vieler gängiger Therapieschemata¹⁵³⁻¹⁵⁵. Auch die Anwendung der Substanzen Thalidomid und Bortezomib in der Erstlinientherapie des MM ist in Europa nur in Kombination mit Melphalan und Prednison zugelassen.

Doxorubicin ist eine in die DNA interkalierende Substanz, die in der Folge die Matrizenfunktion und damit die DNA- und RNA-Synthese blockiert. Doxorubicin wird ebenfalls schon seit Längerem zur Therapie des MM eingesetzt¹⁵⁵⁻¹⁵⁸.

Melphalan zeigte in Kombination mit beiden getesteten Hsp90-Inhibitoren sowohl bei OPM-2- als auch bei RPMI-8226-Zellen eine stärkere Synergie (kleinerer CI) als alle anderen getesteten Substanzkombinationen. Die Kombination von Doxorubicin mit Hsp90-Inhibitoren hingegen zeigte nur einen additiven bis schwach synergistischen Effekt. Allerdings war auch hier eine Präinkubation von Melphalan bzw. Doxorubicin vor Zugabe des Hsp90-Inhibitors von entscheidender Bedeutung hinsichtlich der Ausprägung des synergistischen Effekts. Hierfür könnte ebenfalls der profunde Zellzyklusarrest durch die Hsp90-Inhibitoren verantwortlich sein: Melphalan und Doxorubicin wirken zwar phasenunspezifisch, der zytotoxische Effekt zeigt sich aber in beiden Fällen nur in der S-Phase des Zellzyklus. Bei Präinkubation oder gleichzeitiger Zugabe eines Hsp90-Inhibitors kommt es möglicherweise so schnell zum Zellzyklusarrest, dass Melphalan bzw. Doxorubicin seine Wirkung nur noch unzureichend entfalten kann.

4.4. Vergleich zwischen AUY922 und HSP990

Auffällig ist, dass beide untersuchten Substanzen auf die jeweiligen Zelllinien einen nahezu identischen Effekt ausübten, sowohl was den IC_{50} als auch was die maximal erreichbare Viabilitätsinhibition sowie den konzentrationsabhängigen Apoptoseindex betrifft. In jeweils gleicher Konzentration waren die Effekte beider Substanzen auf die Expression verschiedener Signaltransduktoren wie (p-)Akt und (p-)ERK1/2 fast identisch, Gleiches gilt für die Induktion von Hsp70 und die Einleitung der Apoptose durch die untersuchten Caspasen (Daten zum Teil nicht gezeigt). Sämtliche Versuche mit AUY922 und HSP990 als Einzelsubstanz legen nahe, dass möglicherweise die chemische Struktur der inhibitorischen Domänen der beiden Substanzen ähnlich ist.

Geringfügige Unterschiede zeigten sich jedoch bei der Kombination von AUY922 bzw. HSP990 mit anderen Substanzen: So wies zwar bei beiden Hsp90-Inhibitoren die Kombination mit Melphalan die stärkste Synergie auf und die Synergie war bei RPMI-8226-Zellen unabhängig vom Kombinationspartner stärker ausgeprägt als bei OPM-2-Zellen, bei allen untersuchten Kombinationen zeigte sich jedoch ein etwas stärkerer synergistischer Effekt beim Einsatz von AUY922 als Hsp90-Inhibitor verglichen mit HSP990.

5. Zusammenfassung

Beim multiplen Myelom handelt es sich um eine Neoplasie terminal differenzierter B-Lymphozyten, die durch eine diffuse oder multilokuläre Infiltration des Knochenmarks mit malignen Plasmazellen und die Produktion monoklonaler Immunglobuline gekennzeichnet ist. Trotz weitreichender Fortschritte in der Therapie, die in den letzten zwei Jahrzehnten zu verzeichnen waren, handelt es sich um eine Krankheit, die bislang nur bei einem kleinen Teil der Patienten geheilt werden kann. Neuartige zielgerichtete medikamentöse Therapien (so genannte „targeted therapies“) sind Gegenstand der aktuellen Forschung²⁰⁻²⁸. Eines dieser neuen Angriffsziele sind Chaperone der Familie Hsp90, die zwar ubiquitär von allen Zellen exprimiert werden, auf deren Inhibition Tumorzellen aber weitaus sensibler reagieren als nicht-neoplastische Zellen⁴³⁻⁶⁰. Der erste Hsp90-Inhibitor, der kürzlich in die klinische Testung gelangte, war das 17-Allyl-amino-17-Demethoxygeldanamycin (17-AAG). Dieses Geldanamycin-Derivat zeichnet sich durch eine relativ geringe inhibitorische Potenz aus^{62, 63}. Jüngst konnten mit Hilfe moderner chemischer Verfahren synthetische, hoch selektive Hsp90-Inhibitoren entwickelt werden.

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die beiden neuen, synthetischen, niedermolekularen Hsp90-Inhibitoren AUY922 und HSP990 in der Lage sind, das Wachstum von Myelomzelllinien sowie von primären Tumorzellen von Patienten mit multiplen Myelom zu hemmen. AUY922 und HSP990 führten bei den untersuchten Zelllinien – eingeleitet durch Caspase-8 – zum Zellzyklusarrest in der G2-Phase und zur Induktion von Apoptose. Im Hinblick auf die für das Überleben von Myelomzellen wichtigsten Signalwege zeigte sich eine Hemmung der MAPK-Signalkaskade über ERK1/2 sowie zumindest in einem Teil der untersuchten Zelllinien eine Hemmung der Akt-Signalkaskade. Ein Einfluss auf den JAK/Stat-Signalweg konnte von den untersuchten Zelllinien nur in U266-Zellen gefunden werden, dies ist jedoch auch die einzige der analysierten Zelllinien, die unter den verwendeten Versuchsbedingungen einen aktiven JAK/Stat-Signalweg aufweist. Als Reaktion auf die Hsp90-Inhibition erfolgte kompensatorisch eine Hochregulation der Hsp70-Expression.

Da sich deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelllinien bzw. primären Myelomzellen hinsichtlich des Ansprechens auf eine Monotherapie mit AUY922 bzw. HSP990 zeigten und einige Zelllinien bzw. sortierte Myelomzellen von Patienten mit multiplen Myelom eine primäre Resistenz gegenüber den untersuchten Substanzen

aufwies, wurde die Kombination der beiden Hsp90-Inhibitoren mit HDAC-Inhibitoren, Melphalan oder Doxorubicin untersucht. Hier konnten unter der Bedingung, dass der Kombinationspartner vor der Zugabe des Hsp90-Inhibitors präinkubiert wurde, synergistische Effekte für alle getesteten Kombinationen gezeigt werden. Interessanterweise war die Synergie bei der gegenüber alleiniger Hsp90-Inhibition partiell resistenten Zelllinie RPMI-8226 stärker ausgeprägt als bei der sensiblen Zelllinie OPM-2. Die partielle Resistenz der RPMI-8226-Zellen gegenüber alleiniger Hsp90-Inhibition konnte durch Kombination mit allen getesteten Substanzen vollständig überwunden werden (Viabilitätsreduktion um 100%).

In einer Monotherapie verhielten sich die beiden untersuchten Hsp90-Inhibitoren hinsichtlich Apoptoseinduktion und Effekt auf die intrazellulären Signalkaskaden identisch. Bei den Kombinationsversuchen zeigte sich jedoch grundsätzlich eine etwas stärker ausgeprägte Synergie bei Verwendung von AUY922 verglichen mit HSP990.

Da sich sowohl AUY922 sowie HSP990 zurzeit in der frühen klinischen Entwicklung befinden, könnten die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten eine Grundlage für klinische Studien mit möglichen Kombinationspartnern wie Melphalan darstellen.

6. Literaturverzeichnis

1. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple myeloma. *Lancet* 2009;374(9686):324-39.
2. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood* 2008;111(6):2962-72.
3. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 2008;111(5):2516-20.
4. Klein B, Tarte K, Jourdan M, et al. Survival and proliferation factors of normal and malignant plasma cells. *International journal of hematology* 2003;78(2):106-13.
5. Costes V, Portier M, Lu ZY, Rossi JF, Bataille R, Klein B. Interleukin-1 in multiple myeloma: producer cells and their role in the control of IL-6 production. *British journal of haematology* 1998;103(4):1152-60.
6. Ferlin-Bezombes M, Jourdan M, Liautard J, Brochier J, Rossi JF, Klein B. IFN-alpha is a survival factor for human myeloma cells and reduces dexamethasone-induced apoptosis. *J Immunol* 1998;161(6):2692-9.
7. Kawano M, Hirano T, Matsuda T, et al. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 1988;332(6159):83-5.
8. Klein B, Zhang XG, Jourdan M, et al. Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood* 1989;73(2):517-26.
9. Lokhorst HM, Lamme T, de Smet M, et al. Primary tumor cells of myeloma patients induce interleukin-6 secretion in long-term bone marrow cultures. *Blood* 1994;84(7):2269-77.
10. Portier M, Rajzbaum G, Zhang XG, et al. In vivo interleukin 6 gene expression in the tumoral environment in multiple myeloma. *European journal of immunology* 1991;21(7):1759-62.
11. Uchiyama H, Barut BA, Mohrbacher AF, Chauhan D, Anderson KC. Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood* 1993;82(12):3712-20.
12. Wang YD, De Vos J, Jourdan M, et al. Cooperation between heparin-binding EGF-like growth factor and interleukin-6 in promoting the growth of human myeloma cells. *Oncogene* 2002;21(16):2584-92.
13. Pfeffer LM, Mullersman JE, Pfeffer SR, Murti A, Shi W, Yang CH. STAT3 as an adapter to couple phosphatidylinositol 3-kinase to the IFNAR1 chain of the type I interferon receptor. *Science (New York, NY)* 1997;276(5317):1418-20.
14. Tu Y, Gardner A, Lichtenstein A. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase pathway in multiple myeloma plasma cells: roles in cytokine-dependent survival and proliferative responses. *Cancer research* 2000;60(23):6763-70.
15. Derksen PW, Keehnen RM, Evers LM, van Oers MH, Spaargaren M, Pals ST. Cell surface proteoglycan syndecan-1 mediates hepatocyte growth factor binding and promotes Met signaling in multiple myeloma. *Blood* 2002;99(4):1405-10.
16. Mitsiades CS, Mitsiades N, Poulaki V, et al. Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Oncogene* 2002;21(37):5673-83.
17. Moreaux J, Legouffe E, Jourdan E, et al. BAFF and APRIL protect myeloma cells from apoptosis induced by interleukin 6 deprivation and dexamethasone. *Blood* 2004;103(8):3148-57.
18. Mackay F, Browning JL. BAFF: a fundamental survival factor for B cells. *Nat Rev Immunol* 2002;2(7):465-75.
19. Ge NL, Rudikoff S. Insulin-like growth factor I is a dual effector of multiple myeloma cell growth. *Blood* 2000;96(8):2856-61.
20. Anderson KC. Targeted therapy of multiple myeloma based upon tumor-microenvironmental interactions. *Experimental hematology* 2007;35(4 Suppl 1):155-62.
21. Armand JP, Burnett AK, Drach J, Harousseau JL, Lowenberg B, San Miguel J. The emerging role of targeted therapy for hematologic malignancies: update on bortezomib and tipifarnib. *The oncologist* 2007;12(3):281-90.
22. Chinnaiyan P, Allen GW, Harari PM. Radiation and new molecular agents, part II:

- targeting HDAC, HSP90, IGF-1R, PI3K, and Ras. *Seminars in radiation oncology* 2006; 16(1):59-64.
23. Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nature reviews* 2007;7(8):585-98.
24. Jain P, Gupta S, Parikh PM. Newer therapeutic molecules for multiple myeloma. *Indian journal of cancer* 2008;45(4):142-8.
25. Mitsiades CS, Hayden PJ, Anderson KC, Richardson PG. From the bench to the bedside: emerging new treatments in multiple myeloma. *Best practice & research* 2007;20(4):797-816.
26. Mitsiades CS, Hideshima T, Chauhan D, et al. Emerging treatments for multiple myeloma: beyond immunomodulatory drugs and bortezomib. *Seminars in hematology* 2009;46(2):166-75.
27. Ocio EM, Mateos MV, Maiso P, Pandiella A, San-Miguel JF. New drugs in multiple myeloma: mechanisms of action and phase I/II clinical findings. *The lancet oncology* 2008; 9(12):1157-65.
28. Podar K, Chauhan D, Anderson KC. Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy. *Leukemia* 2009;23(1):10-24.
29. Hideshima T, Anderson KC. Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma. *Nature reviews* 2002; 2(12):927-37.
30. Nathan DF, Vos MH, Lindquist S. In vivo functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 chaperone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94(24):12949-56.
31. Pratt WB, Morishima Y, Osawa Y. The Hsp90 chaperone machinery regulates signaling by modulating ligand binding clefts. *The Journal of biological chemistry* 2008;283(34): 22885-9.
32. Banerji U. Heat shock protein 90 as a drug target: some like it hot. *Clin Cancer Res* 2009;15(1):9-14.
33. Powers MV, Workman P. Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology. *FEBS letters* 2007;581(19):3758-69.
34. Prodromou C, Pearl LH. Structure and functional relationships of Hsp90. *Current cancer drug targets* 2003;3(5):301-23.
35. Wandinger SK, Richter K, Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery. *The Journal of biological chemistry* 2008;283(27):18473-7.
36. Pearl LH, Prodromou C. Structure, function, and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone. *Advances in protein chemistry* 2001;59:157-86.
37. Pearl LH, Prodromou C, Workman P. The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. *The Biochemical journal* 2008;410(3):439-53.
38. Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Experimental biology and medicine* (Maywood, NJ) 2003;228(2):111-33.
39. Connell P, Ballinger CA, Jiang J, et al. The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nature cell biology* 2001;3(1):93-6.
40. DeBoer C, Meulman PA, Wnuk RJ, Peterson DH. Geldanamycin, a new antibiotic. *The Journal of antibiotics* 1970;23(9):442-7.
41. Uehara Y, Hori M, Takeuchi T, Umezawa H. Phenotypic change from transformed to normal induced by benzoquinoid ansamycins accompanies inactivation of p60src in rat kidney cells infected with Rous sarcoma virus. *Molecular and cellular biology* 1986; 6(6):2198-206.
42. Whitesell L, Mimnaugh EG, De Costa B, Myers CE, Neckers LM. Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994;91(18):8324-8.
43. Neckers L. Heat shock protein 90: the cancer chaperone. *Journal of biosciences* 2007;32(3):517-30.
44. Shimamura T, Lowell AM, Engelman JA, Shapiro GI. Epidermal growth factor receptors harboring kinase domain mutations associate with the heat shock protein 90 chaperone and are destabilized following exposure to geldanamycins. *Cancer research* 2005;65(14): 6401-8.

45. Weinstein IB, Joe A. Oncogene addiction. *Cancer research* 2008;68(9):3077-80; discussion 80.
46. Whitesell L, Lindquist SL. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nature reviews* 2005;5(10):761-72.
47. Workman P, Burrows F, Neckers L, Rosen N. Drugging the cancer chaperone HSP90: combinatorial therapeutic exploitation of oncogene addiction and tumor stress. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007;1113:202-16.
48. Chatterjee M, Jain S, Stuhmer T, 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;109(2):720-8.
49. Ciocca DR, Clark GM, Tandon AK, Fuqua SA, Welch WJ, McGuire WL. Heat shock protein hsp70 in patients with axillary lymph node-negative breast cancer: prognostic implications. *Journal of the National Cancer Institute* 1993;85(7):570-4.
50. Eccles SA, Massey A, Raynaud FI, et al. NVP-AUY922: a novel heat shock protein 90 inhibitor active against xenograft tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Cancer research* 2008;68(8):2850-60.
51. Kaur J, Ralhan R. Differential expression of 70-kDa heat shock-protein in human oral tumorigenesis. *International journal of cancer* 1995;63(6):774-9.
52. Kimura E, Enns RE, Alcaraz JE, Arboleda J, Slamon DJ, Howell SB. Correlation of the survival of ovarian cancer patients with mRNA expression of the 60-kD heat-shock protein HSP-60. *J Clin Oncol* 1993;11(5):891-8.
53. Ralhan R, Kaur J. Differential expression of Mr 70,000 heat shock protein in normal, premalignant, and malignant human uterine cervix. *Clin Cancer Res* 1995;1(10):1217-22.
54. Santarosa M, Favaro D, Quايا M, Galligioni E. Expression of heat shock protein 72 in renal cell carcinoma: possible role and prognostic implications in cancer patients. *Eur J Cancer* 1997;33(6):873-7.
55. Banerji U, Walton M, Raynaud F, 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;11(19 Pt 1):7023-32.
56. Eiseman JL, Lan J, Lagattuta TF, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of 17-demethoxy 17-[[[2-dimethylamino)ethyl]-amino]geldanamycin (17DMAG, NSC 707545) in C.B-17 SCID mice bearing MDA-MB-231 human breast cancer xenografts. *Cancer chemotherapy and pharmacology* 2005;55(1):21-32.
57. Kamal A, Thao L, Sensintaffar J, et al. A high-affinity conformation of Hsp90 confers tumour selectivity on Hsp90 inhibitors. *Nature* 2003;425(6956):407-10.
58. Sydor JR, Normant E, Pien CS, et al. Development of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin hydroquinone hydrochloride (IPI-504), an anti-cancer agent directed against Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103(46):17408-13.
59. Gooljarsingh LT, Fernandes C, Yan K, et al. A biochemical rationale for the anticancer effects of Hsp90 inhibitors: slow, tight binding inhibition by geldanamycin and its analogues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103(20):7625-30.
60. Maroney AC, Marugan JJ, Mezzasalma TM, et al. Dihydroquinone ansamycins: toward resolving the conflict between low in vitro affinity and high cellular potency of geldanamycin derivatives. *Biochemistry* 2006;45(17):5678-85.
61. Chiosis G, Neckers L. Tumor selectivity of Hsp90 inhibitors: the explanation remains elusive. *ACS chemical biology* 2006;1(5):279-84.
62. Ramanathan RK, Trump DL, Eiseman JL, et al. Phase I pharmacokinetic-pharmacodynamic study of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin (17AAG, NSC 330507), a novel inhibitor of heat shock protein 90, in patients with refractory advanced cancers. *Clin Cancer Res* 2005;11(9):3385-91.
63. Solit DB, Osman I, Polsky D, et al. Phase II trial of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin in patients with metastatic melanoma. *Clin Cancer Res* 2008;14(24):8302-7.
64. Taldone T, Gozman A, Maharaj R, Chiosis G. Targeting Hsp90: small-molecule inhibitors

- and their clinical development. *Current opinion in pharmacology* 2008;8(4):370-4.
65. Brough PA, Aherne W, Barril X, et al. 4,5-diarylisoazole Hsp90 chaperone inhibitors: Potenzial therapeutic agents for the treatment of cancer. *Journal of medicinal chemistry* 2008;51(2):196-218.
66. Glaser KB. HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based Potenzial. *Biochemical pharmacology* 2007;74(5):659-71.
67. Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol Cancer Res* 2007;5(10):981-9.
68. Kovacs JJ, Murphy PJ, Gaillard S, et al. HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Molecular cell* 2005;18(5):601-7.
69. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nature reviews* 2006;6(1):38-51.
70. Scroggins BT, Robzyk K, Wang D, et al. An acetylation site in the middle domain of Hsp90 regulates chaperone function. *Molecular cell* 2007;25(1):151-9.
71. Marks PA, Breslow R. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nature biotechnology* 2007;25(1):84-90.
72. Friend C, Scher W, Holland JG, Sato T. Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1971;68(2):378-82.
73. Tanaka M, Levy J, Terada M, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA. Induction of erythroid differentiation in murine virus infected erythroleukemia cells by highly polar compounds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1975;72(3):1003-6.
74. Richon VM, Webb Y, Merger R, et al. Second generation hybrid polar compounds are potent inducers of transformed cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93(12):5705-8.
75. Richon VM, Emiliani S, Verdin E, et al. A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95(6):3003-7.
76. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5(9):769-84.
77. Emanuele S, Lauricella M, Tesoriere G. Histone deacetylase inhibitors: apoptotic effects and clinical implications (Review). *International journal of oncology* 2008;33(4):637-46.
78. Armeanu S, Pathil A, Venturelli S, et al. Apoptosis on hepatoma cells but not on primary hepatocytes by histone deacetylase inhibitors valproate and ITF2357. *Journal of hepatology* 2005;42(2):210-7.
79. Marks PA, Richon VM, Rifkind RA. Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *Journal of the National Cancer Institute* 2000;92(15):1210-6.
80. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, et al. Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101(2):540-5.
81. Zhang C, Richon V, Ni X, Talpur R, Duvic M. Selective induction of apoptosis by histone deacetylase inhibitor SAHA in cutaneous T-cell lymphoma cells: relevance to mechanism of therapeutic action. *The Journal of investigative dermatology* 2005;125(5):1045-52.
82. Butler LM, Zhou X, Xu WS, et al. The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99(18):11700-5.
83. Xu W, Ngo L, Perez G, Dokmanovic M, Marks PA. Intrinsic apoptotic and thioredoxin pathways in human prostate cancer cell response to histone deacetylase inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006;103(42):15540-5.

84. Frew AJ, Johnstone RW, Bolden JE. Enhancing the apoptotic and therapeutic effects of HDAC inhibitors. *Cancer letters* 2009;280(2):125-33.
85. Atadja P. Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat (LBH589): successes and challenges. *Cancer letters* 2009;280(2):233-41.
86. Rasheed W, Bishton M, Johnstone RW, Prince HM. Histone deacetylase inhibitors in lymphoma and solid malignancies. *Expert review of anticancer therapy* 2008;8(3):413-32.
87. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Caspases - an update. *Comparative biochemistry and physiology* 2008;151(1):10-27.
88. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO journal* 1995;14(22):5579-88.
89. Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell death and differentiation* 2003;10(1):26-35.
90. Kurokawa M, Kornbluth S. Caspases and kinases in a death grip. *Cell* 2009;138(5):838-54.
91. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular cell* 2002;9(2):423-32.
92. Finkel E. The mitochondrion: is it central to apoptosis? *Science (New York, NY)* 2001;292(5517):624-6.
93. Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica* 2005;37(11):719-27.
94. Kumar S. Caspase 2 in apoptosis, the DNA damage response and tumour suppression: enigma no more? *Nature reviews* 2009;9(12):897-903.
95. Denault JB, Salvesen GS. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chemical reviews* 2002;102(12):4489-500.
96. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual review of biochemistry* 1999;68:383-424.
97. Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell death and differentiation* 2003;10(1):76-100.
98. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell death and differentiation* 1999;6(11):1028-42.
99. Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in enzyme regulation* 1984;22:27-55.
100. Cervantes-Gomez F, Nimmanapalli R, Gandhi V. Transcription inhibition of heat shock proteins: a strategy for combination of 17 - allylamino - 17 - demethoxygeldanamycin and actinomycin d. *Cancer research* 2009;69(9):3947-54.
101. McCollum AK, Lukasiewicz KB, Teneyck CJ, Lingle WL, Toft DO, Erlichman C. Cisplatin abrogates the geldanamycin-induced heat shock response. *Molecular cancer therapeutics* 2008;7(10):3256-64.
102. Gabai VL, Budagova KR, Sherman MY. Increased expression of the major heat shock protein Hsp72 in human prostate carcinoma cells is dispensable for their viability but confers resistance to a variety of anticancer agents. *Oncogene* 2005;24(20):3328-38.
103. Powers MV, Clarke PA, Workman P. Dual targeting of HSC70 and HSP72 inhibits HSP90 function and induces tumor-specific apoptosis. *Cancer cell* 2008;14(3):250-62.
104. Stuhmer T, Chatterjee M, Grella E, et al. Anti-myeloma activity of the novel 2-aminothienopyrimidine Hsp90 inhibitor NVP-BEP800. *British journal of haematology* 2009;147(3):319-27.
105. Hideshima T, Catley L, Yasui H, et al. Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Blood* 2006;107(10):4053-62.
106. Lentzsch S, Chatterjee M, Gries M, et al. PI3-K/AKT/FKHR and MAPK signaling cascades are redundantly stimulated by a variety of cytokines and contribute independently to proliferation and survival of multiple myeloma cells. *Leukemia* 2004;18(11):1883-90.

107. Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, et al. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 1999; 10(1):105-15.
108. Hu L, Shi Y, Hsu JH, Gera J, Van Ness B, Lichtenstein A. Downstream effectors of oncogenic ras in multiple myeloma cells. *Blood* 2003;101(8):3126-35.
109. Wang S, Tricot G, Shi L, et al. RARalpha2 expression is associated with disease progression and plays a crucial role in efficacy of ATRA treatment in myeloma. *Blood* 2009;114(3):600-7.
110. Zhang B, Fenton RG. Proliferation of IL-6-independent multiple myeloma does not require the activity of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2). *Journal of cellular physiology* 2002;193(1):42-54.
111. Zollinger A, Stuhmer T, Chatterjee M, 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; 112(8):3403-11.
112. Shang L, Tomasi TB. The heat shock protein 90-CDC37 chaperone complex is required for signaling by types I and II interferons. *The Journal of biological chemistry* 2006;281(4):1876-84.
113. Schoof N, von Bonin F, Trumper L, Kube D. HSP90 is essential for Jak-STAT signaling in classical Hodgkin lymphoma cells. *Cell Commun Signal* 2009;7:17.
114. Sato N, Yamamoto T, Sekine Y, et al. Involvement of heat-shock protein 90 in the interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3. *Biochemical and biophysical research communications* 2003;300(4):847-52.
115. Shah M, Patel K, Fried VA, Sehgal PB. Interactions of STAT3 with caveolin-1 and heat shock protein 90 in plasma membrane raft and cytosolic complexes. Preservation of cytokine signaling during fever. *The Journal of biological chemistry* 2002;277(47):45662-9.
116. Martins AS, Ordonez JL, Garcia-Sanchez A, et al. A pivotal role for heat shock protein 90 in Ewing sarcoma resistance to anti-insulin-like growth factor 1 receptor treatment: in vitro and in vivo study. *Cancer research* 2008;68(15):6260-70.
117. Basso AD, Solit DB, Chiosis G, Giri B, Tsihchlis P, Rosen N. Akt forms an intracellular complex with heat shock protein 90 (Hsp90) and Cdc37 and is destabilized by inhibitors of Hsp90 function. *The Journal of biological chemistry* 2002;277(42):39858-66.
118. Sato S, Fujita N, Tsuruo T. Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000;97(20): 10832-7.
119. Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, et al. A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nature cell biology* 2004; 6(2):97-105.
120. Chen G, Cao P, Goeddel DV. TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Molecular cell* 2002;9(2):401-10.
121. Stancato LF, Silverstein AM, Owens-Grillo JK, Chow YH, Jove R, Pratt WB. The hsp90-binding antibiotic geldanamycin decreases Raf levels and epidermal growth factor signaling without disrupting formation of signaling complexes or reducing the specific enzymatic activity of Raf kinase. *The Journal of biological chemistry* 1997;272(7):4013-20.
122. Boll B, Eltaib F, Reiners KS, et al. Heat shock protein 90 inhibitor BIIB021 (CNF2024) depletes NF-kappaB and sensitizes Hodgkin's lymphoma cells for natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Clin Cancer Res* 2009;15(16): 5108-16.
123. Breinig M, Caldas-Lopes E, Goepfert B, et al. Targeting heat shock protein 90 with non-quinone inhibitors: a novel chemotherapeutic approach in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2009; 50(1):102-12.
124. Caldas-Lopes E, Cerchietti L, Ahn JH, et al. Hsp90 inhibitor PU-H71, a multimodal inhibitor of malignancy, induces complete responses in triple-negative breast cancer models. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106(20):8368-73.
125. Moser C, Lang SA, Kainz S, et al. Blocking heat shock protein-90 inhibits the invasive properties and hepatic growth of

- human colon cancer cells and improves the efficacy of oxaliplatin in p53-deficient colon cancer tumors in vivo. *Molecular cancer therapeutics* 2007;6(11):2868-78.
126. Rao R, Lee P, Fiskus W, et al. Co-treatment with heat shock protein 90 inhibitor 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin (DMAG) and vorinostat: a highly active combination against human mantle cell lymphoma (MCL) cells. *Cancer biology & therapy* 2009;8(13):1273-80.
127. Trentin L, Frasson M, Donella-Deana A, et al. Geldanamycin-induced Lyn dissociation from aberrant Hsp90-stabilized cytosolic complex is an early event in apoptotic mechanisms in B-chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008;112(12):4665-74.
128. Samadi A, Loo P, Mukerji R, et al. A novel HSP90 modulator with selective activity against thyroid cancers in vitro. *Surgery* 2009;146(6):1196-207.
129. Wong C, Chen S. Heat shock protein 90 inhibitors: new mode of therapy to overcome endocrine resistance. *Cancer research* 2009;69(22):8670-7.
130. 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 research* 2006;66(3):1783-91.
131. Burrows F, Zhang H, Kamal A. Hsp90 activation and cell cycle regulation. *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2004;3(12):1530-6.
132. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, et al. Antimyeloma activity of heat shock protein-90 inhibition. *Blood* 2006;107(3):1092-100.
133. Okawa Y, Hideshima T, Steed P, et al. SNX-2112, a selective Hsp90 inhibitor, potently inhibits tumor cell growth, angiogenesis, and osteoclastogenesis in multiple myeloma and other hematologic tumors by abrogating signaling via Akt and ERK. *Blood* 2009;113(4):846-55.
134. Stuhmer T, Zollinger A, Siegmund D, et al. Signalling profile and antitumour activity of the novel Hsp90 inhibitor NVP-AUY922 in multiple myeloma. *Leukemia* 2008;22(8):1604-12.
135. Yao Q, Weigel B, Kersey J. Synergism between etoposide and 17-AAG in leukemia cells: critical roles for Hsp90, FLT3, topoisomerase II, Chk1, and Rad51. *Clin Cancer Res* 2007;13(5):1591-600.
136. Solit DB, Basso AD, Olshen AB, Scher HI, Rosen N. Inhibition of heat shock protein 90 function down-regulates Akt kinase and sensitizes tumors to Taxol. *Cancer research* 2003;63(9):2139-44.
137. Mesa RA, Loegering D, Powell HL, et al. Heat shock protein 90 inhibition sensitizes acute myelogenous leukemia cells to cytarabine. *Blood* 2005;106(1):318-27.
138. Radujkovic A, Schad M, Topaly J, et al. Synergistic activity of imatinib and 17-AAG in imatinib-resistant CML cells overexpressing BCR-ABL--Inhibition of P-glycoprotein function by 17-AAG. *Leukemia* 2005;19(7):1198-206.
139. Mimnaugh EG, Xu W, Vos M, et al. Simultaneous inhibition of hsp 90 and the proteasome promotes protein ubiquitination, causes endoplasmic reticulum-derived cytosolic vacuolization, and enhances antitumor activity. *Molecular cancer therapeutics* 2004;3(5):551-66.
140. Mimnaugh EG, Xu W, Vos M, Yuan X, Neckers L. Endoplasmic reticulum vacuolization and valosin-containing protein relocalization result from simultaneous hsp90 inhibition by geldanamycin and proteasome inhibition by velcade. *Mol Cancer Res* 2006;4(9):667-81.
141. Johnson AJ, Wagner AJ, Cheney CM, et al. Rituximab and 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin induce synergistic apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *British journal of haematology* 2007;139(5):837-44.
142. George P, Bali P, Annavarapu S, et al. Combination of the histone deacetylase inhibitor LBH589 and the hsp90 inhibitor 17-AAG is highly active against human CML-BC cells and AML cells with activating mutation of FLT-3. *Blood* 2005;105(4):1768-76.
143. Nguyen A, Su L, Campbell B, Poulin NM, Nielsen TO. Synergism of heat shock protein 90 and histone deacetylase inhibitors in synovial sarcoma. *Sarcoma* 2009;2009:794901.
144. Rahmani M, Reese E, Dai Y, et al. Cotreatment with suberanoylanilide hydroxamic acid and 17-allylamino 17-demethoxygeldanamycin synergistically induces apoptosis in Bcr-Abl+ Cells sensitive and resistant to

- STI571 (imatinib mesylate) in association with down-regulation of Bcr-Abl, abrogation of signal transducer and activator of transcription 5 activity, and Bax conformational change. *Molecular pharmacology* 2005;67(4):1166-76.
145. Rahmani M, Yu C, Dai Y, et al. Coadministration of the heat shock protein 90 antagonist 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin with suberoylanilide hydroxamic acid or sodium butyrate synergistically induces apoptosis in human leukemia cells. *Cancer research* 2003;63(23):8420-7.
146. Yang Y, Rao R, Shen J, et al. Role of acetylation and extracellular location of heat shock protein 90alpha in tumor cell invasion. *Cancer research* 2008;68(12):4833-42.
147. Bali P, Pranpat M, Bradner J, et al. Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *The Journal of biological chemistry* 2005;280(29):26729-34.
148. Boyault C, Sadoul K, Pabion M, Khochbin S. HDAC6, at the crossroads between cytoskeleton and cell signaling by acetylation and ubiquitination. *Oncogene* 2007;26(37):5468-76.
149. Kekatpure VD, Dannenberg AJ, Subbaramaiah K. HDAC6 modulates Hsp90 chaperone activity and regulates activation of aryl hydrocarbon receptor signaling. *The Journal of biological chemistry* 2009;284(12):7436-45.
150. Rao R, Fiskus W, Yang Y, et al. HDAC6 inhibition enhances 17-AAG-mediated abrogation of hsp90 chaperone function in human leukemia cells. *Blood* 2008;112(5):1886-93.
151. Munster PN, Basso A, Solit D, Norton L, Rosen N. Modulation of Hsp90 function by ansamycins sensitizes breast cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis in an RB- and schedule-dependent manner. See: E. A. Sausville, Combining cytotoxics and 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin: sequence and tumor biology matters, *Clin. Cancer Res.*, 7:2155-2158,2001. *Clin Cancer Res* 2001;7(8):2228-36.
152. Sausville EA. Combining cytotoxics and 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin: sequence and tumor biology matters. Commentary re: P. Munster et al., Modulation of Hsp90 function by ansamycins sensitizes breast cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis in an RB- and schedule-dependent manner. *Clin. Cancer Res.*, 7: 2228-2236, 2001. *Clin Cancer Res* 2001;7(8):2155-8.
153. Blade J, Rosinol L. Advances in therapy of multiple myeloma. *Current opinion in oncology* 2008;20(6):697-704.
154. Facon T, San Miguel J, Mateos MV, Hulin C. Frontline treatment in elderly patients with multiple myeloma. *Seminars in hematology* 2009;46(2):133-42.
155. Palumbo A, Rajkumar SV. Treatment of newly diagnosed myeloma. *Leukemia* 2009;23(3):449-56.
156. Ludwig H, Beksac M, Blade J, et al. Current multiple myeloma treatment strategies with novel agents: a European perspective. *The oncologist* 2010;15(1):6-25.
157. Rajkumar SV, Sonneveld P. Front-line treatment in younger patients with multiple myeloma. *Seminars in hematology* 2009;46(2):118-26.
158. Saad AA, Sharma M, Higa GM. Treatment of multiple myeloma in the targeted therapy era. *The Annals of pharmacotherapy* 2009;43(2):329-38.

Danksagung

Zuallererst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Sezer für die Überlassung des Themas für diese Arbeit sowie für die regelmäßigen Besprechungen der Ergebnisse und der weiteren experimentellen Vorgehensweise danken. Ohne seine großzügige und vertrauensvolle Unterstützung hätte diese Arbeit nicht zustande kommen können.

Ein großes Dankeschön geht an meinen Betreuer Herrn Dr. med. Martin Kaiser, der trotz der räumlichen Entfernung bei Problemen immer erreichbar war und dann auch immer sehr schnell Zeit für ein persönliches Treffen gefunden hat.

Bei Jan Sterz und Helga Kemmer möchte ich mich für die gute Einarbeitung im Labor bedanken. Auch Herrn Dr. rer. nat. Jens Hahne gilt mein Dank, da er mir während der kurzen Zeit, die wir gemeinsam in der Arbeitsgruppe waren, bei Fragen immer gerne zur Verfügung stand und mit konstruktiver Kritik weiter half.

Ganz besonders herzlich danke ich Frau Dr. rer. nat. Maren Mieth, die mir während meiner gesamten Zeit in der Arbeitsgruppe immer mit Rat und Tat zur Seite stand und zudem maßgeblich am guten Arbeitsklima im Forschungslabor der Onkologie und Hämatologie beteiligt war.

Christiane Feldmann und Annekathrin Kratz möchte ich danken, weil sie seit ihrem Arbeitsbeginn im Forschungslabor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie durch ihre freundliche und hilfsbereite Art dazu beigetragen haben, das ohnehin schon angenehme Arbeitsklima noch weiter zu verbessern.

Erklärung an Eides Statt

Ich, Britta Lamottke, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Hitzeschockprotein 90-Inhibitoren beim multiplen Myelom“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 14.12.2010

Britta Lamottke

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

1. Lamottke B*, Kaiser M*, Mieth M, Heider U, Kleeberg L, Gao Z, Nikolova Z, Jensen MR, Sterz J, von Metzler I, Sezer O. The novel, orally bioavailable HSP90 inhibitor NVP-HSP990 induces cell cycle arrest and apoptosis in multiple myeloma cells and acts synergistically with melphalan by increased cleavage of caspases. (eingereicht).
2. Kaiser M*, Lamottke B*, Mieth M, Jensen MR, Quadt C, Garcia-Echeverria C, Atadja P, Heider U, von Metzler I, Türkmen S, Sezer O. Synergistic action of the novel HSP90 inhibitor NVP-AUY922 with histone deacetylase inhibitors, melphalan, or doxorubicin in multiple myeloma. Eur J Haematol. 2010 Apr;84(4):337-44.
3. von Metzler I, Heider U, Mieth M, Lamottke B, Kaiser M, Jakob C, Sezer O. Synergistic interaction of proteasome and topoisomerase II inhibition in multiple myeloma. Exp Cell Res. 2009 Aug 15;315(14):2471-8
4. Heider U, Rademacher J, Lamottke B, Mieth M, Moebis M, von Metzler I, Assaf C, Sezer O. Synergistic interaction of the histone deacetylase inhibitor SAHA with the proteasome inhibitor bortezomib in cutaneous T cell lymphoma. Eur J Haematol. 2009 Jun;82(6):440-9
5. Heider U, Kaiser M, Mieth M, Lamottke B, Rademacher J, Jacob C, Braendle E, Stover D, Sezer O. Serum concentrations of DKK-1 decrease in patients with multiple myeloma responding to anti-myeloma treatment. Eur J Haematol. 2009 Jan;82(1):31-8
6. Sterz J, von Metzler I, Hahne JC, Lamottke B, Rademacher J, Heider U, Terpos E, Sezer O. The Potenzial of proteasome inhibitors in cancer therapy. Expert Opin Investig Drugs 2008 Jun;17(6):879-895
7. Kaiser M, Lamottke B, Jensen MR, Mieth M, Heider U, Rademacher J, Jacob C, Sezer O. The novel Hsp90 inhibitor AUY922 induces cell cycle arrest and apoptosis in myeloma and overcomes protection by bone marrow stroma. Vortrag, Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, Wien, 2008. Onkologie 2008; 31 (Suppl 4): V519
8. Heider U, Rademacher J, Möbs M, Lamottke B, Mieth M, Assaf C, Sezer O. The histone deacetylase inhibitor SAHA and the proteasome inhibitor bortezomib synergistically induce apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma. Vortrag, Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, Wien, 2008. Onkologie 2008; 31 (Suppl 4): V429
9. Heider U, Kaiser M, Mieth M, Lamottke B, Rademacher J, Jakob C, Sezer O. Serum concentrations of DKK-1 decrease in patients with multiple myeloma responding to therapies with bortezomib, thalidomide, lenalidomide or autologous stem cell transplantation. Vortrag, Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie, Wien, 2008. Onkologie 2008; 31 (Suppl 4): V520

* beide Autoren haben gleichwertig zur Publikation beigetragen