

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Das Multiple Myelom

Das Multiple Myelom (auch genannt Morbus Kahler) ist ein Tumor des hämatologischen Systems, der durch die klonale Vermehrung von Plasmazellen im Knochenmark gekennzeichnet ist. Im ersten Stadium der Tumorentwicklung, dem MGUS (Monoklonale Gammopathien unbestimmter Signifikanz) handelt es sich um eine inaktive Phase der Erkrankung, die meist nur zufällig entdeckt wird. Im Serum ist monoklonales Immunglobulin nachweisbar, jedoch vermehren sich die Tumorzellen kaum und verursachen keine Symptome. In der nächsten Phase entsteht ein intramedulläres Multiples Myelom (MM). Ungefähr 1% der Tumorzellen vermehren sich in Abhängigkeit von dem sie umgebenden Knochenmarkstroma. Der Tumor verursacht Knochenzerstörung und weitere Symptome. Später kann sich ein extramedulläres Myelom entwickeln, bei dem die Tumorzellen sich schneller vermehren und im Blut (Plasmazelleukämie) oder anderen extramedullären Organen vorkommen (Smith *et al.*, 2005).

#### 1.1.1 Epidemiologie

Das MM umfasst ungefähr 1% aller humanen Tumorerkrankungen und 10% der hämatologischen Tumore. Ein MGUS tritt bei etwa 1% der über 50 jährigen Menschen auf und die Häufigkeit nimmt mit zunehmendem Alter zu. Desweiteren ist die Inzidenz bei Männern signifikant höher als bei Frauen. In der US-amerikanischen Bevölkerung kommt die Erkrankung häufiger bei Afro-Amerikanern als bei Amerikanern kaukasischen Ursprungs vor (The International Myeloma Working Group, 2003).

#### 1.1.2 Befunde, Symptome und Diagnose

Als Hauptbefunde finden sich Knochenzerstörung, über 10% teilweise atypischer Plasmazellen in Knochenmarkbiopsien, Hyperkalzämie und Anämie infolge der Ausbreitung des Tumors im Knochen und Knochenmark, sowie Niereninsuffizienz aufgrund der Schädigung der Niere durch die großen Mengen an Paraprotein (monoklonales Protein (M-Protein)), das in Form von Immunglobulin von den Tumorzellen gebildet wird. Die Folgen sind Knochenschmerzen bis hin zu Spontanbrüchen, Leistungsminderung, Müdigkeit und Infektanfälligkeit. In selteneren Fällen treten neurologische Störungen auf.

Liegt der Verdacht auf ein Multiples Myelom vor, erfolgt die Diagnose über den Nachweis des monoklonalen Proteins in Blut und Urin mittels Elektrophorese, dem Nachweis der

Knochenzerstörung über bildgebende Verfahren (Röntgen, MRT, CT) und dem Nachweis einer erhöhten Anzahl klonaler Plasmazellen im Knochenmarkaspirat (The International Myeloma Working Group, 2003).

### **1.1.3 Therapie und Prognose**

Eine Therapie wird erst beim Auftreten von Krankheitssymptomen erforderlich. Das bedeutet, dass im klinisch inapparenten Stadium I nicht therapiert und ab den klinisch apparenten Stadien II und III eine zyklische Chemotherapie durchgeführt wird. Bei dem klassischen Therapieschema nach Alexanian wird Melphalan mit Prednisolon kombiniert (Alexanian und Dimopoulos, 1994). Bei älteren Patienten, bei denen keine Hochdosischemotherapie möglich ist, wird als Chemotherapeutikum Melphalan oder ein anderes Alkylanz verwendet und kann mit dem Glucocorticoid Prednisolon kombiniert werden. Neu diagnostizierte Patienten unter 65 Jahre und Patienten über 65 Jahre mit einem guten Allgemeinzustand kommen für eine Hochdosischemotherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation in Frage. Diese werden mit einem Chemotherapieschema vorbehandelt, das eine möglichst große Verringerung der Tumorlast bewirkt und dabei die Gewinnung der Stammzellen nicht beeinträchtigt. Häufig wird dafür eine Kombination aus Vincristin, Adriamycin und Dexamethason (VAD) verwendet. Nach der Entnahme der Stammzellen erfolgt die Konditionierung mit einer hohen Dosis Melphalan und anschließender Rekonstituierung des blutbildenden Systems mittels der entnommenen Stammzellen (Barlogie *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2005; Reece, 2007).

Zu den neueren nicht-genotoxischen Substanzen in der MM Therapie gehören Thalidomid und Lenalidomid, die beide in die Stoffklasse der IMiDs (Immunmodulatorische Derivate) gehören. Ihr genauer Wirkmechanismus ist noch unklar, jedoch beobachtet man unter Therapie eine verringerte Adhärenz der Tumorzellen sowie reduzierte Zytokinproduktion und Angiogenese, dazu eine Verstärkung der T-Zell-Proliferation und Anti-Myelom-Immunität (Reece, 2007). Bortezomib gehört in die Klasse der Proteasominhibitoren, nach deren Anwendung ebenfalls eine Verringerung der Tumorzelladhärenz, Zytokinproduktion und Angiogenese beobachtet wurde. Diese neuen Substanzen wurden bisher bei Patienten, die auf die herkömmliche Behandlung nicht mehr ansprachen, angewendet und diese zeigten gute Ansprechraten (Knop *et al.*, 2006; Richardson *et al.*, 2005).

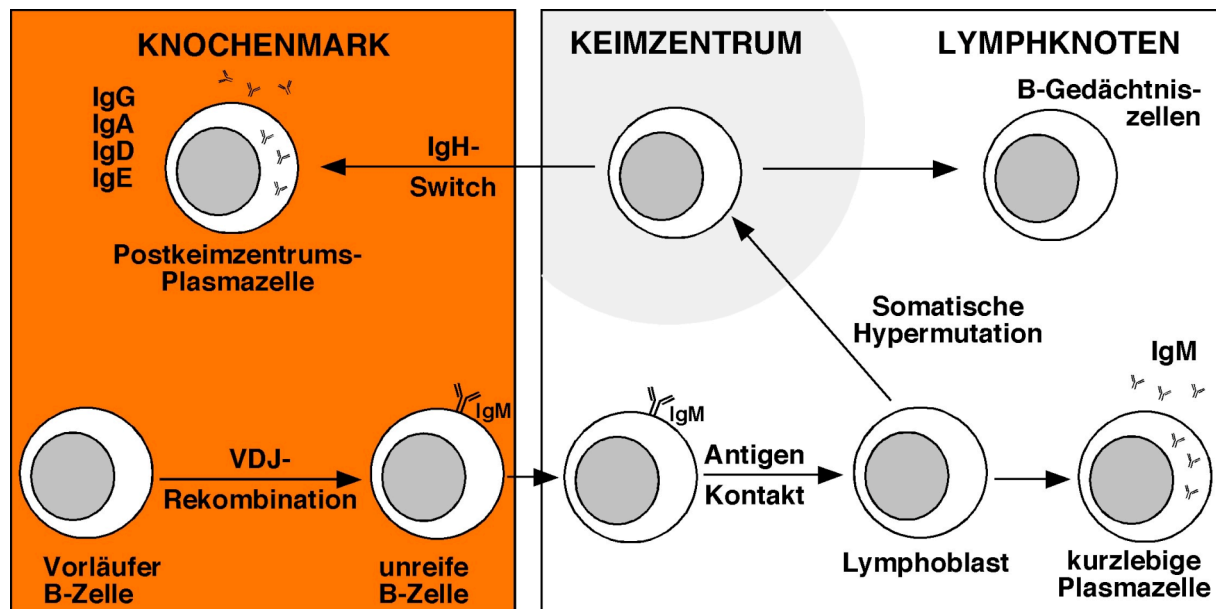
Die Bildung von Osteolysen kann durch die Gabe von Bisphosphonaten (z.B. Pamidronat) oder durch lokale Bestrahlung verzögert werden. Bei Knochenschmerzen und drohenden Frakturen ist eine operative Fixierung möglich.

Untherapiert liegt die mittlere Überlebenszeit ab dem Auftreten von Symptomen bei 6 Monaten. Unter Therapie mit Melphalan/Prednison verlängert sie sich auf bis zu 3 Jahre, nach Hochdosis-Therapie mit Melphalan und anschließender autologer Stammzelltransplantation auf durchschnittlich 5 Jahre (Barlogie *et al.*, 2004).

## 1.1.4 Pathogenese

### 1.1.4.1 Normale Plasmazellentwicklung

Die Vorläufer der Plasmazellen entstehen im Knochenmark aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Aus Vorläufer-B-Zellen entwickeln sich unreife B-Zellen, die sich durch eine abgeschlossene VDJ-Rekombination, das heißt der Umordnung der V-, D- und J-Gene für die Sequenz der schweren Immunglobulin-Kette (IgH) und der V- und D-Gene für die leichten Immunglobulin-Ketten (IgL), auszeichnen. Diese unreifen B-Zellen exprimieren funktionelle Immunglobuline (IgM) an der Oberflächen und wandern aus dem Knochenmark aus. Die Reifung durch Kontakt mit einem Antigen führt zur Proliferation und zur Differenzierung zu Lymphoblasten. Letztere differenzieren entweder zu kurzlebigen Plasmazellen, die in der Regel IgM sezernieren und innerhalb von drei Tagen absterben.



**Abb. 1.4.1: Die normale B-Zellentwicklung**

Im Knochenmark entstehen aus pluripotenten Stammzellen Vorläufer B-Zellen, die sich über genetische Umstrukturierung zu unreifen B-Zellen entwickeln und in die Lymphknoten auswandern. Dort kommt es durch den Kontakt mit einem Antigen zur Entwicklung kurzlebiger, IgM-sezernierender Plasmazellen. Ein Teil der Lymphoblasten durchläuft eine Hypermutation der Ig-Gene und wird im Keimzentrum positiv auf die Erkennung von Antigenen selektioniert. Anschließend differenzieren diese Zellen zu B-Gedächtniszellen oder wandern als Immunglobulin-sezernierende Postkeimzentrums-Plasmazellen nach Umstellung auf die Isotypen IgG, IgA, IgD oder IgE wieder ins Knochenmark ein.

Oder sie wandern nach Antigenkontakt in die Keimzentren der Lymphknoten. Dort findet eine somatische Hypermutation der Ig-Gensequenzen und, durch erneuten Antigenkontakt, eine positive Selektion geeigneter Klone statt. Zellen, die keinen erneuten Kontakt mit dem Antigen haben, erliegen dem programmierten Zelltod. Positiv selektionierte Zellen vollziehen einen IgH-„Switch“ (Ig-Schwerketten-„Switch“), das heißt eine Umstellung der Immunglobulinsynthese von IgM auf IgG, IgD, IgA oder IgE. Diese so entstandenen Post-Keimzentrums-Plasmazellen wandern wieder ins Knochenmark und entwickeln sich unter dem Einfluss von IL-6 und anderen Zytokinen des Knochenmarkmilieus zu langlebigen Plasmazellen. Sie bilden 80 % der im Körper zirkulierenden Antikörper.

#### 1.1.4.2 Die Entwicklung der malignen Plasmazelle

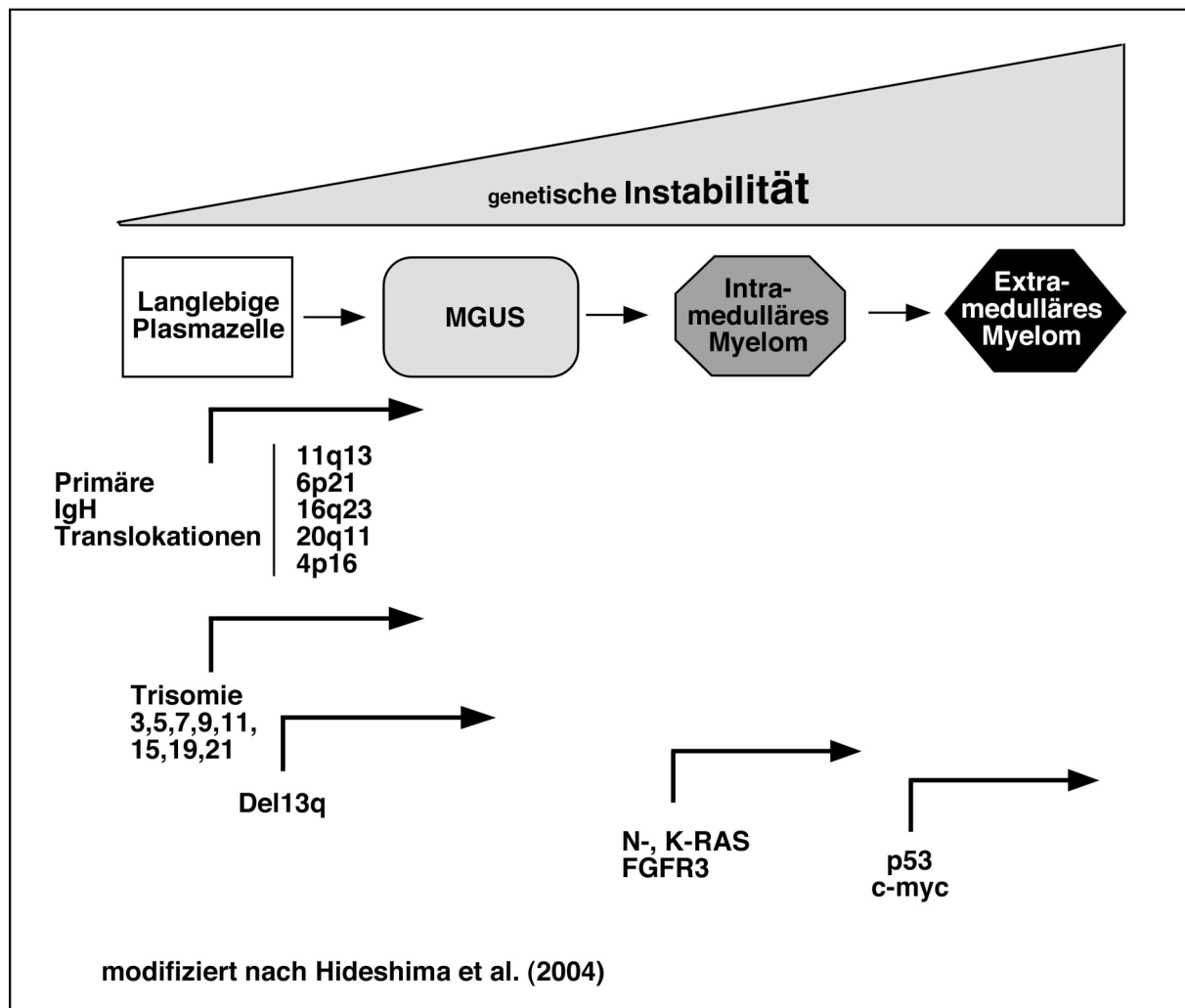
Die malignen Plasmazellen des Multiplen Myeloms sind stark somatisch hypermutiert, was darauf hindeutet, dass die entscheidenden onkogenen Ereignisse entweder nach der oben beschriebenen Entwicklung zur langlebigen Plasmazelle stattfinden oder parallel zu dieser ohne sie zu beeinträchtigen (Hallek *et al.*, 1998).

Die Entwicklung von Plasmazellanomalien ist durch eine Vielzahl genetischer Läsionen gekennzeichnet, deren Auftreten sehr variabel von Patient zu Patient ist. Dabei werden primäre, frühe genetische Veränderungen und sekundäre, späte Ereignisse unterschieden (Fonseca *et al.*, 2004). Eine übersichtliche Darstellung findet sich in Abbildung 1.1.4.2. Primäre IgH-Translokationen treten im MGUS und frühen Krankheitsstadien des MM etwa gleich häufig auf (40-60 %), nehmen dann aber mit Krankheitsprogression bis auf 90 % zu. Dabei gelangen Protoonkogene unter den Einfluss von Enhancern der Immunglobulingene auf Chromosom 14. Sie werden dadurch verstärkt aktiviert und damit zu Onkogenen, also zu Genen, die die Tumorentwicklung fördern. Bei den im Multiplen Myelom am häufigsten auftretenden Translokationen handelt es sich um:

betroffener Chromosomenlocus	die dadurch entstehende Translokation	dadurch Überexpression von
11q13	t(11;14)(q13;q32)	Bcl-1, Cyclin D1
4p16	t(4;14)(p16;q32)	FGFR3, MMSET
6p21	t(6;14)(p21;q32)	Cyclin D3
20q11	t(14;20)(q32;q11)	mafB
16q23	t(14;16)(q32;q23)	C-maf

IgH Translokationen scheinen zu den frühen tumorigenen Effekten zu gehören. Dennoch kann es nicht das einzige Ereignis sein, das zu einer Krankheitsprogression führt, da bei MGUS Patienten mit IgH-Translokation oft jahrelang kein Fortschreiten der Erkrankung zum MM zu erkennen ist, wohingegen es auch MM Patienten ohne diese genetische Veränderung gibt (Hallek *et al.*, 1998; Fonseca *et al.*, 2004).

Mit den Veränderungen auf Chromosom 13 sind bisher keine spezifischen genetischen Mechanismen assoziiert. Jedoch haben Patienten mit Deletion des langen Arms von Chromosom 13 (del13q) eine schlechtere Prognose mit verkürzter Überlebenszeit und einem geringeren therapeutischen Ansprechen (Fonseca *et al.*, 2004).



**Abb. 1.1.4.2: Auftreten genetischer Läsionen in den Stadien der malignen Plasmazellentwicklung**

Zu den frühesten Veränderungen, die auch schon in MGUS-Fällen gefunden werden, gehören IgH Translokationen und Trisomien. Aktivierende N- und K-RAS Mutationen scheinen gehäuft zum Zeitpunkt des Übergangs vom MGUS zum MM aufzutreten. Translokationen, die zur Überexpression von FGFR3 führen, treten in der Regel erst beim intramedullären MM auf. Zu den späten genetischen Veränderungen gehören außerdem inaktivierende Mutationen von *p53* und Translokationen, die zur Dysregulation von *c-myc* führen.

Sekundäre genomische Veränderungen findet man nicht im MGUS. Dazu gehören aktivierende Mutationen von *N-RAS* und *K-RAS*, Überexpression von *FGFR3*, *p53*-Inaktivierung durch Deletion oder Mutation, sowie Translokationen von *c-myc* (Hallek *et al.*, 1998; Hideshima *et al.*, 2004).

Die chromosomalen Veränderungen nehmen mit dem Fortschreiten der Erkrankung zu, was bedeuten könnte, dass immer weitere Mutationen für die Entwicklung vom MGUS über das intramedulläre zum extramedullären MM benötigt werden, wo die Tumorzellen letztendlich ohne Unterstützung des Knochenmarkmikromilieu überleben können.

Bei der Betrachtung der Signaltransduktion kommt den genetischen Veränderungen Bedeutung zu, da beispielsweise die aktivierenden Mutationen von *N-* und *K-RAS* nachgeschaltete Signalwege, wie den "mitogen-activated-protein-kinase"-Signalweg konstitutiv aktivieren und so den Tumorzellen einen Überlebens- und Proliferationsvorteil verschaffen können. Ein weiteres Beispiel ist die Translokation t(4;14), die zur Überexpression des "fibroblast growth factor receptor 3" (*FGFR3*) führen kann. Da das Knochenmarkmilieu "fibroblast growth factor" bildet, werden somit über die erhöhte FGF-Rezeptor-Dichte auf MM Zellen Signalwege stimuliert, die für eine erhöhte Viabilität und Proliferation der Tumorzellen sorgen.

### **1.1.4.3 Interaktion der MM Zellen mit dem Knochenmarkmikromilieu**

Die malignen Plasmazellen sind bis zu einem sehr fortgeschrittenen Krankheitsstadium im Knochenmark eingebettet und erhalten von diesem die nötigen Überlebens- und Wachstumssignale (sog. intramedulläres Multiples Myelom). Erst mit dem Fortschreiten der Erkrankung erfolgt die Aktivierung bestimmter Signaltransduktionswege unabhängig von äußeren Stimuli und die Tumorzellen sind in der Lage, das Knochenmark zu verlassen (sog. extramedulläres Multiples Myelom).

Das Knochenmarkmilieu wird vor allem von zellulären Bestandteilen, wie Knochenmarkstromazellen (KMSZ), Osteoklasten, Osteoblasten und Endothelzellen gebildet. Dazu kommen extrazelluläre Matrixproteine, wie zum Beispiel Fibronectin und Kollagen. Neben der Interaktion mit anderen Zellen sowie der extrazellulären Matrix steigert eine große Anzahl sezernierter Zytokine das Überleben, die Proliferation, den Stoffwechsel und die Resistenz der Myelomzellen gegen Medikamente. Die Interaktion von KMSZ mit MM Zellen fördert transkriptionell die Bildung einer Reihe von Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise Interleukin-6 (IL-6) und "insulin-like growth factor-1" (IGF-1), die über Rezeptor-Thyrosin-Kinasen und rezeptorassoziierte Adapterproteine anti-apoptotische und

proliferationsfördernde Signalkaskaden stimulieren (Gunn *et al.*, 2006; Mitsiades *et al.*, 2004). Die extrazellulären Matrixproteine binden beispielsweise an Syndekan-1 (CD138), ein vom Großteil der malignen Plasmazellen exprimiertes Oberflächenmolekül, und bewirken die verstärkte Bildung von Matrix Metalloproteinase 1, die die Knochenresorption und damit auch die Tumorinvasivität fördert (Sanderson *et al.*, 1994). Zu den vom Mikromilieu stimulierten Signaltransduktionswegen gehört der PI3K/Akt-Signalweg (Hideshima *et al.*, 2007).

Da die Kokultur von primären MM Zellen mit KMSZ die Viabilität und Widerstandsfähigkeit der Tumorzellen erhöht, wurde der Großteil der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Viabilität in diesem Kokulturmodell durchgeführt.

## 1.2 Der PI3K-Akt Signalweg

### 1.2.1 Struktur von Akt:

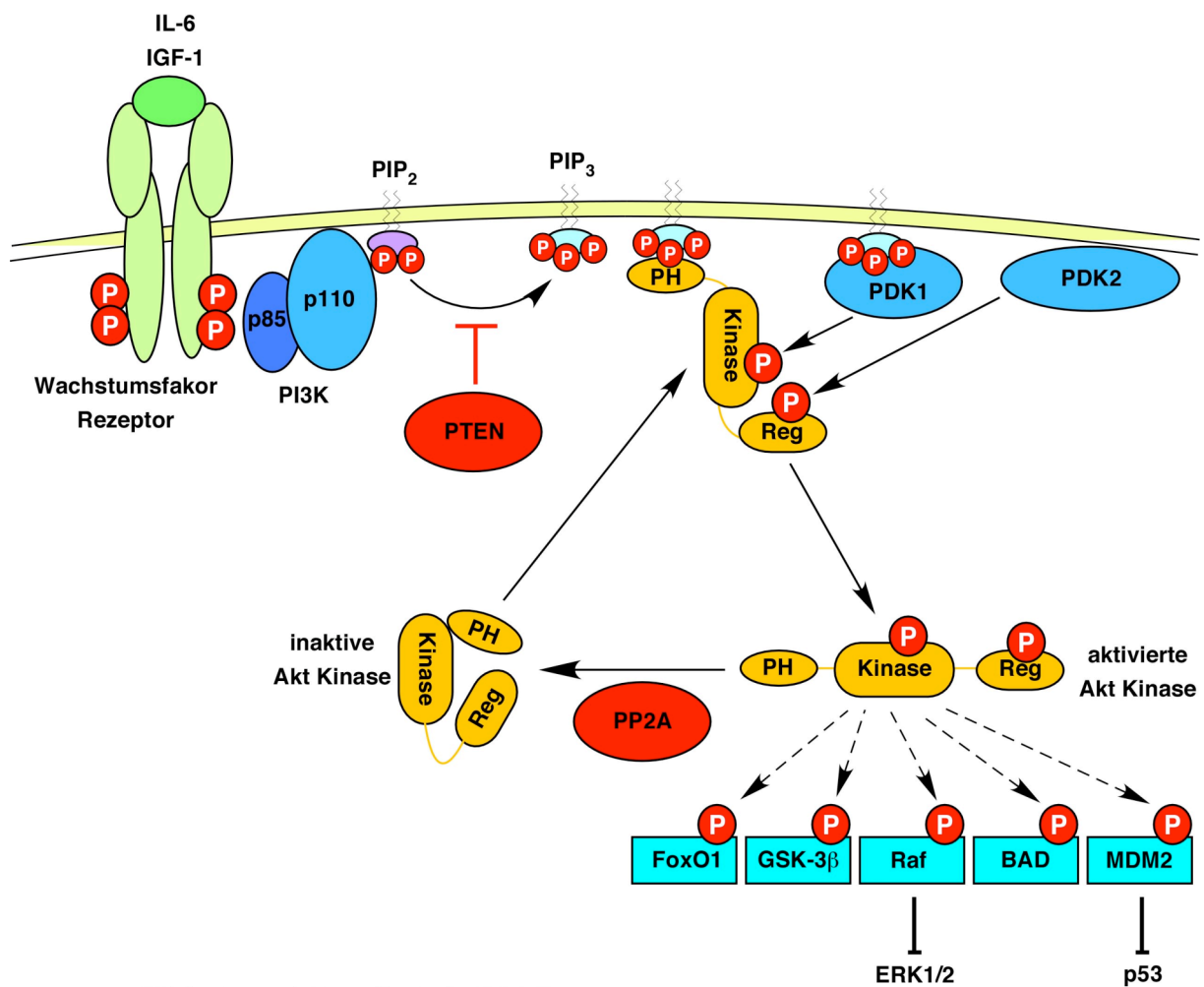
Die Proteinfamilie der Akt kinasen besteht aus drei Isoenzymen: Akt1/PKB $\alpha$ , Akt2/PKB $\beta$  und Akt3/PKB $\gamma$ . Synonym wird der Name Proteinkinase B (PKB) verwendet. Der Aufbau besteht einheitlich aus einer N-terminalen "pleckstrin homology" (PH) Domäne, einer Kinase Domäne und endet C-terminal mit einem regulatorischen hydrophoben Motiv (Kumar und Madison, 2005). Die PH Domäne ist mit der Kinase Domäne über ein Verbindungsstück (sog. "linker region") verbunden. Die paarweise prozentuale Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz beträgt zwischen den einzelnen Akt-Isoformen:

	PH Domäne (in Akt1: 1-107)	Verbindungsstück (in Akt1: 108-148)	Kinase Domäne (in Akt1: 149-408)	C-Terminus (in Akt1: 409-480)
Akt1/Akt2	80%	46%	90%	66%
Akt1/Akt3	84%	40%	88%	76%
Akt2/Akt3	76%	17%	87%	70%

### 1.2.2 Aktivierung von Akt:

Akt wird in mehreren Schritten durch die Verlagerung an die Zellmembran und Phosphorylierung aktiviert (Bellacosa *et al.*, 1998). Dazu müssen zunächst beispielsweise Wachstumsfaktoren oder Zytokine Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktivieren. Dadurch kann die regulatorische Untereinheit (p85) von PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) an die zytoplasmatische Domäne dieser Rezeptoren oder rezeptorassoziierten Adapterproteinen

binden. Diese Bindung bringt PI3K in unmittelbare Nähe der Plasmamembran und aktiviert die katalytische Untereinheit (p110). PI3K phosphoryliert Phosphoinositide, so dass Phosphoinositid-3 Phosphat (PIP3 und PIP2) entsteht. Sowohl an PIP3 als auch an PIP2 bindet die PH-Domäne von Akt mit hoher Affinität und Akt wird dadurch an die Zellmembran verlagert, wo es an zwei Aminosäureresten phosphoryliert wird: Threonin (Thr) 308 (Terminologie für Akt1; dies entspricht Thr309 in Akt2 und Thr305 in Akt3) und Serin (Ser) 473 (Ser474 in Akt2, Ser472 in Akt3) (Franke *et al.*, 1995). Beide Phosphorylierungen werden benötigt, um Akt maximal zu aktivieren.



modifiziert nach Brazil *et al.* (2004)

**Abb. 1.2.2: Aktivierung der Akt-Kinase und ihre Substrate**

Wachstumsfaktoren wie IGF-1 aktivieren über Rezeptoren "phosphatidylinositol 3-kinase" (PI3K), die Phosphoinositide (PIP) phosphoryliert. Über diese wird Akt an die Zellmembran verlagert und von "3'-phosphoinositide-dependent kinase" 1 und 2 (PDK1 und 2) phosphoryliert und damit aktiviert. Im aktivierten Zustand phosphoryliert Akt zahlreiche Substrate, wie beispielsweise den Transkriptionsfaktor "forkhead box class O 1" (FoxO1).



Die Kinase, die Threonin phosphoryliert ist PDK1 (3'-phosphoinositide-dependent kinase 1), die ebenfalls eine PH-Domäne trägt und darüber an die Zellmembran und so in räumliche Nähe zu Akt gebracht wird (Brazil *et al.*, 2004). Für PDK2 (3'-Phosphoinositide-Dependent Kinase 2), das für die Serin-Phosphorylierung verantwortlich ist, gibt es mehrere potentielle Kandidaten, darunter ILK (integrin-linked kinase), MAPKAPK2 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2), sowie PDK1 und Akt selbst (Dong und Liu, 2005). In dieser Arbeit werden die Begriffe "phosphoryliertes Akt" und "aktiviertes Akt" synonym verwendet.

Einer der Gegenspieler dieses Aktivierungsmechanismus ist die 3' Lipidphosphatase PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten), die Phosphoinositide dephosphoryliert und damit die "Ankerstellen" für Akt an der Zellmembran verringert (Di Cristofano und Pandolfi, 2000).

Aktiviertes Akt wird unmittelbar durch Phosphatasen wie Proteinphosphatase 2A (PP2A) oder PHLPP dephosphoryliert und damit inaktiviert (Gao *et al.*, 2005).

### **1.2.3 Substrate von Akt und deren Einfluss auf Zellfunktionen**

Die Akt Kinasen haben Einfluß auf die Proliferation, das Überleben und den Stoffwechsel der Tumorzellen, sowie auf die Bildung von Blutgefäßen im Tumor. Die Zellteilung wird, unter anderem, durch die Phosphorylierung von GSK-3 $\beta$  und dem damit verbundenen verringerten Abbau von Cyclin D1 gefördert (Cross *et al.*, 1995; Diehl *et al.*, 1998). Akt-Aktivierung verbessert das Überleben der Tumorzellen durch die Verhinderung des programmierten Zelltods über Mechanismen, die in die Caspase-Kaskade und die transkriptionelle Apoptoseregulation eingreifen. So verhindert Akt über die Phosphorylierung des pro-apoptotischen Faktors BAD die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien und damit die Einleitung des programmierten Zelltods durch die Aktivierung von Caspasen (Creagh und Martin, 2001). Als weiterer potentieller "pro-survival" Mechanismus ist eine Phosphorylierung von MDM2 beschrieben worden, durch die es den proteasomalen Abbau von p53 fördert (Mayo und Donner, 2001). Da es eine zentrale Funktion von p53 ist, den programmierten Zelltod von genetisch veränderten Zellen transkriptionell zu steuern, wirkt die Verringerung der p53-Menge anti-apoptotisch. Akt phosphoryliert und inaktiviert den Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor "forkhead box class O 1" (FoxO1), der die Expression von apoptose-relevanten Genen, wie beispielsweise des Fas-Liganden, steuert (Brunet *et al.*, 1999). ERK-1/2 hat Einfluß auf die Proliferation von MM Zellen. Es wurde berichtet, dass Akt Raf durch Phosphorylierung hemmt und dadurch die Aktivierung von

ERK1/2 in einer humanen Brustkrebszelllinie indirekt vermindert (Zimmermann und Moelling, 1999). Erhöhte ERK1/2-Phosphorylierung wurde nach dem Einsatz des Multi-Kinase-Inhibitors Perifosine im MM beobachtet und dessen inhibitorischer Wirkung auf Akt zugeschrieben (Hideshima *et al.*, 2006). Eines der Zielproteine von Akt, dessen Phosphorylierung in dieser Arbeit als Nachweis für eine veränderte Akt-Aktivierung untersucht wurde, ist FoxO1.

### **1.2.4 Die Rolle von Akt in Tumoren und seine Bedeutung als pharmakologische Zielstruktur**

Die Aktivierung der Akt Kinase wurde für eine große Anzahl humaner Tumorentitäten beschrieben (siehe Tabelle 1 in Bellacosa *et al.*, 2005) und war teilweise stark assoziiert mit einer fortgeschrittenen Form der Neoplasie. Verstärkte Akt1 Aktivität wurde in 40-50% der Brust-, Ovarial- und Prostatatumore, Akt2 Aktivierung in 30-40% der Ovarial- und Pankreas-karzinome und verstärkte Akt3 Aktivität in hormon-unabhängigen Brust- und Prostatakarzinomen, einer aggressiven Form dieser Tumore, festgestellt (Altomare und Testa, 2005).

Die funktionelle Bedeutung dieser Beobachtungen ist vielfach noch unklar. Jedoch liefert eine Reihe von Untersuchungen einen begründeten Verdacht, dass erhöhte Akt-Aktivierung die Tumorentwicklung fördert. So blockieren konstitutiv aktive Akt-Konstrukte PTEN-induzierte Apoptose und verringern die Sensitivität gegenüber zytotoxischen Substanzen (Li *et al.*, 1998; Whang *et al.*, 2004). Desweiteren bewirkten PTEN-Expressionskonstrukte in PTEN-defizienten Tumorzellen eine Verringerung der Akt-Aktivierung mit Zellzyklusarrest und Apoptose (Lu *et al.*, 1999; Di Cristofano und Pandolfi, 2000). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass eine inaktivierbare Form von Akt Apoptose in Tumorzellen mit konstitutiv aktivem Akt induziert, aber nicht in Tumorzellen mit geringer Akt-Aktivierung (Jetzt *et al.*, 2003). Kürzlich wurde eine aktivierende Mutation von Akt1 in Mamma-, Colon- und Ovarialkarzinomen beschrieben, die transformierend wirkt und Leukämie in Mäusen auslöst (Carpten *et al.*, 2007). Diese Beobachtungen liefern eine Basis für die Entwicklung von Akt-Inhibitoren zur Tumor-Therapie.

### **1.2.5 Der Akt-Inhibitor Akti-1/2**

Akti-1/2 entstammt einer Reihe vor kurzem beschriebener "small compound" Inhibitoren spezifisch für Akt1 und Akt2. Akti-1/2 blockiert die Phosphorylierung und Aktivierung von Akt reversibel über einen Prozeß der abhängig von der PH-Domäne ist. Mögliche

Erklärungen dafür wären, dass alle Bindungsstellen des Inhibitors auf der PH-Domäne liegen oder sie sich nur bei Vorhandensein der PH-Domäne bilden (Barnett *et al.*, 2005).

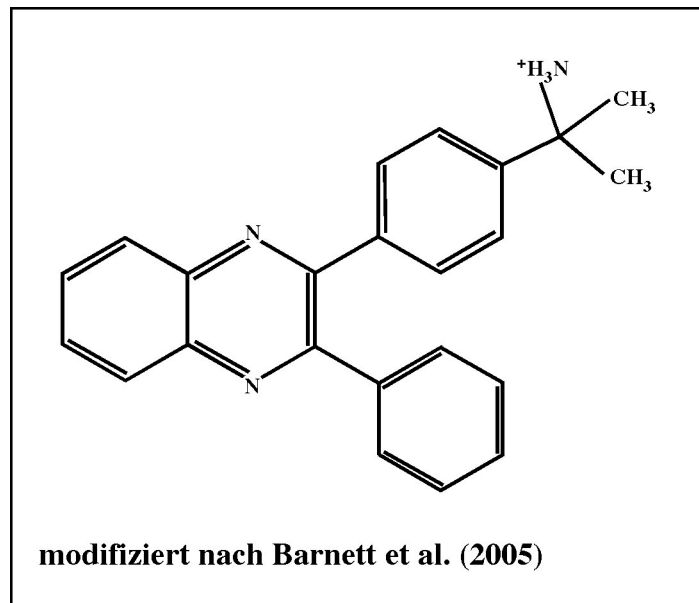


Abb. 1.2 Struktur des Inhibitors Akti-1/2

### 1.3 Die Rolle des PI3K-Akt Signalwegs im Multiplen Myelom

Es wurde in immunhistochemischen Analysen von Knochenmarkbiopsaten von Myelompatienten gezeigt, dass Akt häufig in phosphorylierter und damit aktivierter Form vorliegt (Hsu *et al.*, 2001). Eine mögliche Ursache ist, dass der Akt Signalweg von einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren, die auch vom Knochenmarkmikromilieu gebildet werden, aktiviert wird (Lentzsch *et al.*, 2004; Hideshima *et al.*, 2001). Desweiteren führen Deletionen des Tumorsuppressors *PTEN* zu einer erhöhten Akt-Aktivierung in zwei Myelomzelllinien (OPM2 und  $\Delta 47$ ) (Hyun *et al.*, 2000). *PTEN* Deletionen wurden in 6% der Patienten mit Multiplem Myelom und in 20% der Plasmazelleukämien gefunden (Chang *et al.*, 2005). Da bisher keine spezifischen Akt Inhibitoren zur Verfügung standen, wurde Akt indirekt über PI3K Inhibitoren wie LY294002 und Wortmannin gehemmt. Diese Versuche konnten zeigen, dass PI3K Inhibitoren das Wachstum stark hemmen und Apoptose induzieren (Pene *et al.*, 2002; Tu *et al.*, 2000) und dass dieser Effekt in Zelllinien mit konstitutivem phospho-Akt Signal deutlicher ist. Desweiteren wurde in zwei Zelllinien mit einer konstitutiv aktiven Form von Akt gezeigt, dass aktiviertes Akt die Resistenz gegenüber Dexametason-induzierter Apoptose erhöht (Hsu *et al.*, 2002) und somit zur Resistenz gegen Chemotherapeutika

beiträgt. Aufgrund dieser Daten wird angenommen, dass der PI3K/Akt Signalweg eine wichtige Rolle für das Überleben und die Proliferation des MM spielt.

### **1.4 Zielstellung der Arbeit**

Bisher wurde gezeigt, dass die Akt Kinase *in situ* im Multiplen Myelom aktiviert ist. In anderen Tumorentitäten stellte man fest, dass aktiviertes Akt das Wachstum der Tumorzellen fördert und antiapoptotisch wirkt. Bisher wurden im MM weder spezifische Akt Inhibitoren verwendet, noch "Knock-down" Versuche zur gezielten Ausschaltung einer oder mehrerer Akt Isoformen gemacht und somit gezeigt, dass die erzielten Effekte tatsächlich durch die Blockade der Akt Kinase ausgelöst wurden. Somit ist die Bedeutung von Akt für das Überleben und die Vermehrung der MM Zellen, sowie die Relevanz als therapeutischer Angriffspunkt noch nicht eindeutig geklärt. Als primäre Fragestellung ergab sich daraus, die Bedeutung der Akt Kinase für die Viabilität von MM Zellen zu bestimmen. Dazu sollten die Akt Isoformen mittels siRNA in den Myelomzelllinien AMO-1 und MM.1S depletiert werden und der dadurch ausgelöste Effekt mit der Wirkung eines neuentwickelten Akt Inhibitors (Akti-1/2) verglichen werden. Desweiteren sollten mit siRNA die Isoformen Akt1, Akt2 und Akt3 einzeln ausgeschaltet werden, um deren individuellen Beitrag zum Überleben der Myelomzellen zu bestimmen. Dazu sollten für jede Akt-Isoform mehrere vektorbasierte siRNA-Expressionskonstrukte kloniert werden und diese auf einen effizienten "Knock-down" des Zielproteins getestet werden.

Die bisherigen Versuche zum PI3K/Akt-Signalweg wurden fast ausschließlich mit Myelomzelllinien durchgeführt. Diese Zelllinien werden in der Regel aus Plasmazelleukämien gewonnen, und damit aus Tumorzellen, die genetisch schon sehr stark verändert sind. Unter den Myelomen stellen Plasmazelleukämien jedoch nur einen kleinen Anteil. Sie stellen somit eine durch ihre Verfügbarkeit und leichte Handhabung nützliche, aber auch artifizielle Ressource dar, die die Verhältnisse in primären Tumorzellen nur vage widerspiegelt. Deshalb war es ein weiteres Ziel der Arbeit, die Analysen, wenn möglich, mit primären Patientenzellen durchzuführen. Dafür sollte die Anzahl der für ein Experiment benötigten Patientenzellen auf ein Minimum reduziert werden, da die Zahl der Tumorzellen, die bei einer Knochenmarkpunktion isoliert werden, in der Regel unter  $1 \times 10^6$  liegt. Dazu sollte die Technik der intrazellulären Phospho-Akt Färbung mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse im Labor etabliert werden, um trotz der geringen Zellzahl detaillierte Signaltransduktionsanalysen des Akt Signalwegs *in vitro* durchzuführen. Das Ziel war es auf diese Weise den Aktivitätsstatus der Akt Kinase und die Wirksamkeit des Akt

Inhibitors mit intrazellulärer Phospho-Akt Färbung und anschließender durchflusszytometrischer Analyse in aufgereinigten MM Zellen aus Knochenmarkpunktaten zu bestimmen. Parallel dazu sollte die Akt Aktivierung *in situ* mittels immunhistochemischer Analyse in Knochenmarkbiopsien untersucht werden. Da primäre MM Zellen gegenwärtig nicht effizient transfizierbar sind, sollte die Akt Kinase pharmakologisch mit dem Akt Inhibitor Akti-1/2 inhibiert und die Auswirkung auf die Viabilität der primären MM Zellen untersucht werden.

Um eine mögliche Ursache für die konstitutive Akt-Aktivierung zu finden, war es ein weiteres Ziel der Arbeit, MM Patientenproben auf eine kürzlich beschriebene aktivierende Mutation in *Akt1* zu untersuchen.

Zusammengefaßt ergaben sich für diese Arbeit folgende konkrete Fragestellungen:

1. Die Bedeutung der Akt Kinase für die Viabilität von AMO-1 und MM.1S Zellen sollte mittels siRNA-"Knock-down" und eines pharmakologischen Inhibitors (Akti-1/2) untersucht werden. Außerdem sollte der individuelle Beitrag einzelner Akt-Isoformen zum Überleben der Tumorzellen bestimmt werden.
2. Desweiteren sollte die Aktivität der Akt Kinase in primären MM Zellen *in vitro* und *in situ* analysiert werden.
3. Parallel sollte in denselben Patientenproben die Bedeutung der Akt Kinase für die Viabilität von primären MM Zellen ermittelt werden.
4. Desweiteren sollte untersucht werden, ob eine aktivierende Mutation in *Akt1* in Myelomzellen nachweisbar ist, und somit einen potentiellen Mechanismus für die konstitutive Aktivierung von Akt darstellt.