

3. ERGEBNISSE

3.1 Die Zelllinie MM.1S zeigt, im Gegensatz zur Zelllinie AMO-1, eine konstitutive Akt Aktivierung

In Western-Blot-Analysen fiel auf, dass ein Teil der MM Zelllinien unter unseren Kulturbedingungen eine Phosphorylierung und damit Aktivierung von Akt zeigt. Da sich nur ein Teil der Zelllinien in unseren Händen transfizieren lassen, wurde aus dieser Gruppe eine MM Zelllinie mit konstitutiver Akt-Phosphorylierung (MM.1S) und eine ohne erkennbare Akt-Phosphorylierung (AMO-1) für die folgenden Transfektionsexperimente gewählt. Bei der Betrachtung der einzelnen Akt Isoformen fiel auf, dass AMO-1 kein in Western-Blot-Analyse nachweisbares Akt3 Protein hat.

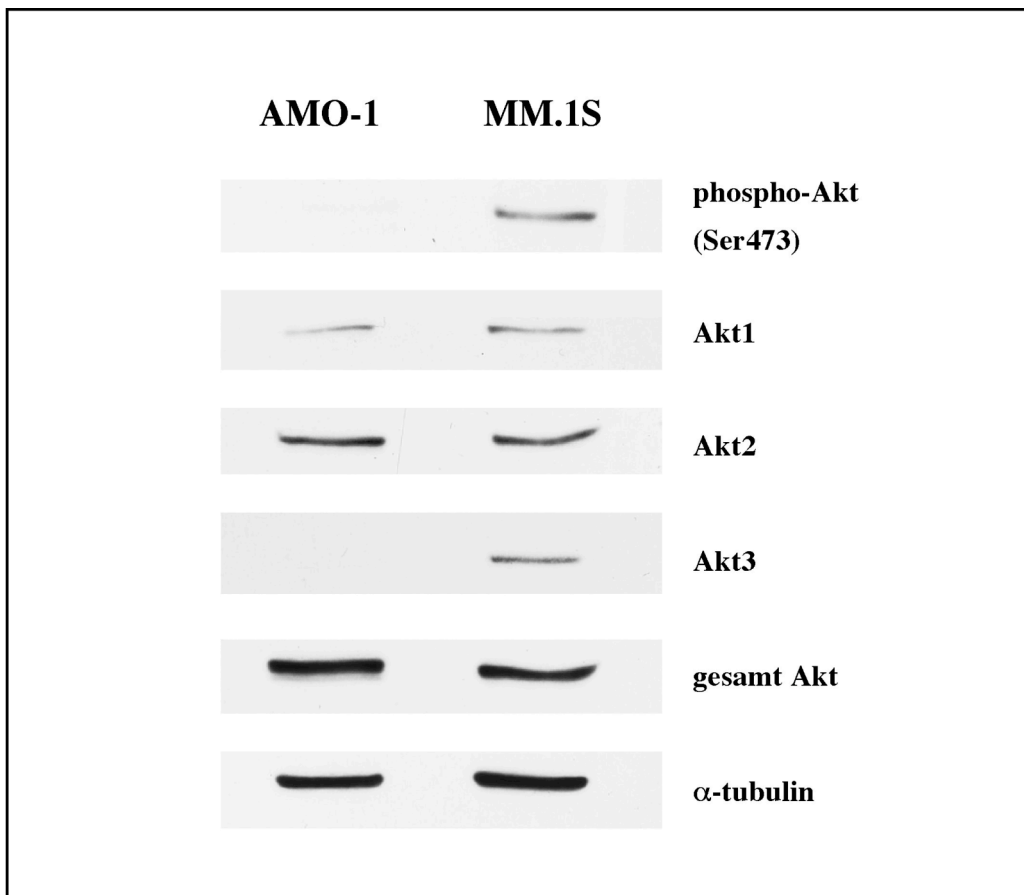


Abb. 3.1: Western-Blot-Analyse von AMO-1 und MM.1S Zellen zur Darstellung der Phosphorylierung an Serin473 von Akt, sowie der Expression der Akt Isoformen und des gesamten Akt Proteins.

AMO-1 und MM.1S Zellen wurden direkt aus der Kulturflasche entnommen und mit Western-Blot-Analyse auf das Vorhandensein von Akt1, Akt2, Akt3 und gesamt Akt untersucht. Desweiteren wurde die Aktivierung von Akt über die Darstellung des phosphorylierten Proteins gezeigt. Als Nachweis für eine gleichmäßige Beladung des Gels diente α -Tubulin.

Im Folgenden wurden MM.1S und AMO-1 Zellen benutzt, um die Frage, ob Akt Aktivierung für das Überleben der Myelomzellen relevant ist durch die Transfektion von siRNA-Konstrukten zu klären und diese Effekte mit denen des pharmakologischen Akt-Inhibitors Akti-1/2 zu vergleichen.

3.2 Transiente Transfektion von MM.1S und AMO-1 Zellen mit pSUPER-siRNA-Expressionskonstrukten reduziert selektiv die einzelnen Akt Isoformen

Um die Akt Kinase möglichst spezifisch und selektiv zu inhibieren und so ihre Bedeutung für die Viabilität von MM Zellen zu bestimmen, wurde die Akt-Synthese durch Verwendung von isoformspezifischen siRNA-Expressionskonstrukten unterbrochen. Die selektiv verringerte Bildung von Akt1, Akt2 oder/und Akt3 Protein in AMO-1 und MM.1S Zellen wurde gezeigt. Um eine Aussage über die Bedeutung der einzelnen Isoformen für die Viabilität machen zu können, mussten die siRNA-Konstrukte die Isoformen spezifisch verringern. Dazu wurden die siRNA-Konstrukte einzeln transfiziert und in Western-Blot-Analysen auf Proteinebene gezeigt, dass das Akt1-Konstrukt nach 72 Stunden zum fast vollständigen Verschwinden von Akt1 Protein führt, ohne die Proteinspiegel von Akt2 und Akt3 zu beeinflussen. Analoges gilt für die siRNA-Expressionskonstrukte gegen Akt2 und Akt3 (siehe Abb. 3.2-1).

Desweiteren wurde mit Kombinationen der Konstrukte gegen Akt1, Akt2 und Akt3 (letzteres nur in MM.1S) transfiziert (siehe Abb. 3.2-2), um die Auswirkung auf die Akt-Aktivierung zu untersuchen. Die Kombination von pSUPER-Akt1- und pSUPER-Akt2-Plasmid (siAkt1+siAkt2) reduzierte das gesamt Akt-Protein in AMO-1 fast komplett. In MM.1S Zellen führte die Transfektion von pSUPER-Akt1- und pSUPER-Akt2-Plasmid (siAkt1+siAkt2) oder pSUPER-Akt1-, pSUPER-Akt2 und pSUPER-Akt3-Plasmid (siAkt1+siAkt2+siAkt3) sowohl zum Verschwinden des gesamten Akt Proteins, als auch zur deutlichen Verminderung des phosphorylierten Akt. Über die Abnahme der Phosphorylierung des Akt Substrates FoxO1 wurde die verminderte Aktivierung der Akt Kinase gezeigt.

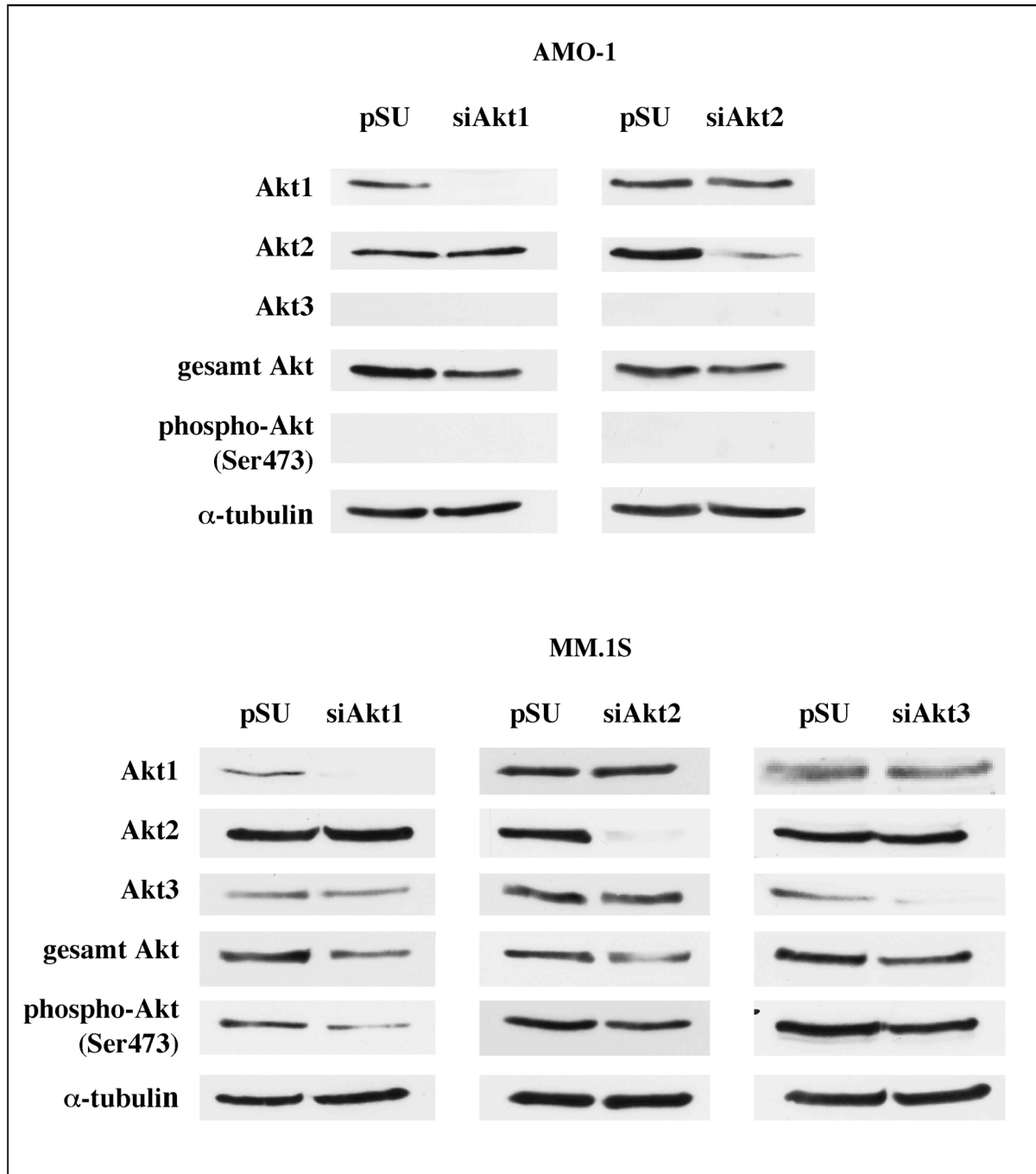


Abb. 3.2-1: Reduzierung der einzelnen Akt Isoenzyme mit pSUPER-Vektor-basierten siRNA-Expressionskonstrukten

Es wurden die Zelllinien AMO-1 und MM.1S mit dem pSUPER-Vektor (pSU), oder mit dem pSUPER-Akt1-Plasmid (siAkt1), dem pSUPER-Akt2-Plasmid (siAkt2) oder mit dem pSUPER-Akt3-Plasmid ((siAkt3) nur bei MM.1S), die die Bildung Akt-isoform-spezifischen siRNAs bewirken, transient transfiziert. Die transfizierten MM Zellen wurden nach 24 Stunden gesortet und nach 72 Stunden für Western-Blot-Analysen geerntet. Die Nitrozellulosemembranen wurden mit Antikörpern gegen Akt1, Akt2, Akt3, das gesamte Akt Protein und an Serin473 phosphoryliertes Akt gefärbt. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Gele diente α -Tubulin.

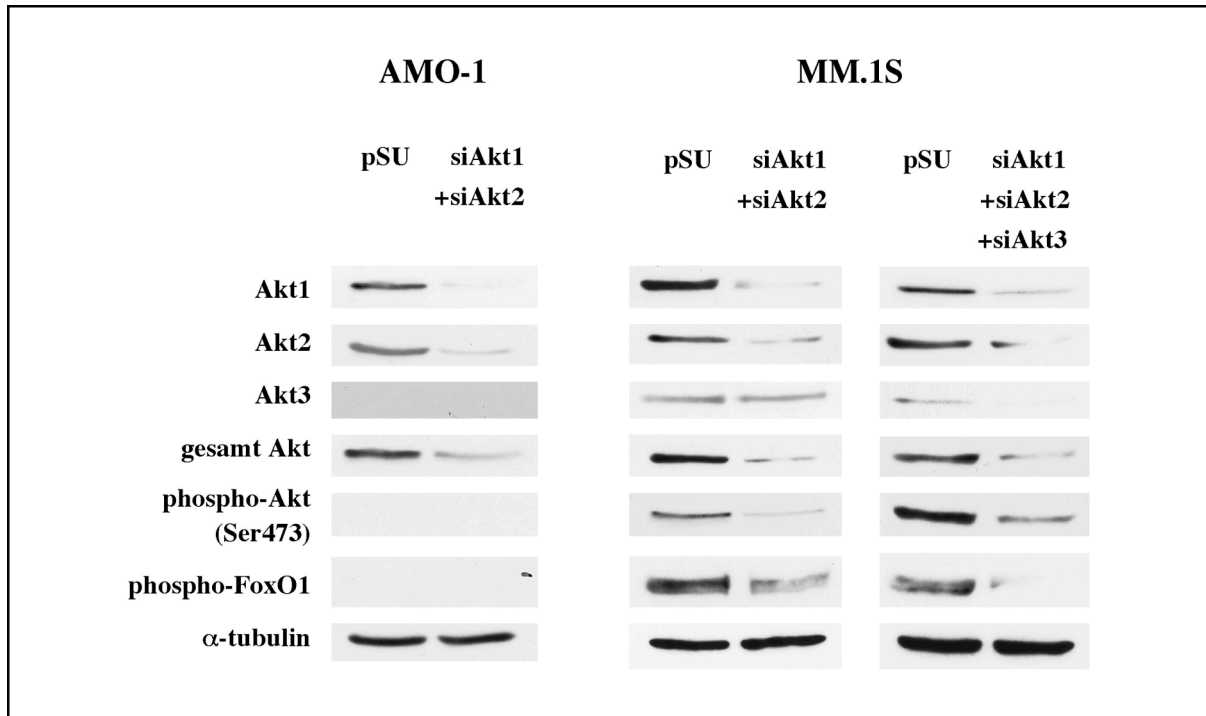


Abb. 3.2-2: Der "Knock-down" der Akt Isoenzyme mit den siRNA-Konstrukten führte zu einer Abnahme der Akt-Aktivierung und einer reduzierten Phosphorylierung des Akt Substrates FoxO1.

Die Zelllinien AMO-1 und MM.1S wurden mit dem pSUPER-Vektor (pSU), mit dem pSUPER-Akt1- und pSUPER-Akt2-Plasmid (siAkt1+siAkt2) oder mit dem pSUPER-Akt1-, pSUPER-Akt2- und pSUPER-Akt3-Plasmid ((siAkt1+siAkt2+siAkt3) nur MM.1S) transfiziert. Die MM Zellen wurden nach 24 Stunden gesortet und nach 72 Stunden für Western-Blot-Analysen geerntet. Die Membranen wurden mit Antikörpern gegen Akt1, Akt2, Akt3, das gesamte Akt Protein, an Serin473 phosphoryliertes Akt und phospho-FoxO1 gefärbt. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Gele diente α -Tubulin.

3.3 Transfektion mit pSUPER-Akt1- und pSUPER-Akt2-siRNA-Expressionskonstrukten induziert Apoptose in MM.1S, aber nicht in AMO-1 Zellen

Um die Auswirkung der Reduzierung der Akt-Proteine und Akt-Aktivität auf die Viabilität von AMO-1 und MM.1S Zellen zu bestimmen, wurde der Anteil lebender Zellen am 6. Tag nach der Transfektion der Akt-siRNA-Expressionskonstrukte mittels AnnexinV-ATTO 647 und Propidiumjodid Färbung durchflusszytometrisch bestimmt.

In AMO-1 Zellen hatte weder der einzelne "Knock-down" von Akt1 oder Akt2, noch die kombinierte Supprimierung beider Isozyme einen Einfluß auf die Viabilität der Zellen. Im Gegensatz dazu induzierte der siRNA-vermittelte "Knock-down" von Akt1, sowie in geringerem Maße auch der von Akt2, Apoptose in MM.1S Zellen. Die Supprimierung von Akt3 hatte nur eine geringe Abnahme der Viabilität der MM.1S Zellen zur Folge.

Kombinierter "Knock-down" von Akt1, Akt2 oder/und Akt3 verringerte die Viabilität, verglichen mit der des Einzel-"Knock-downs" von Akt1 in MM.1S Zellen nicht.

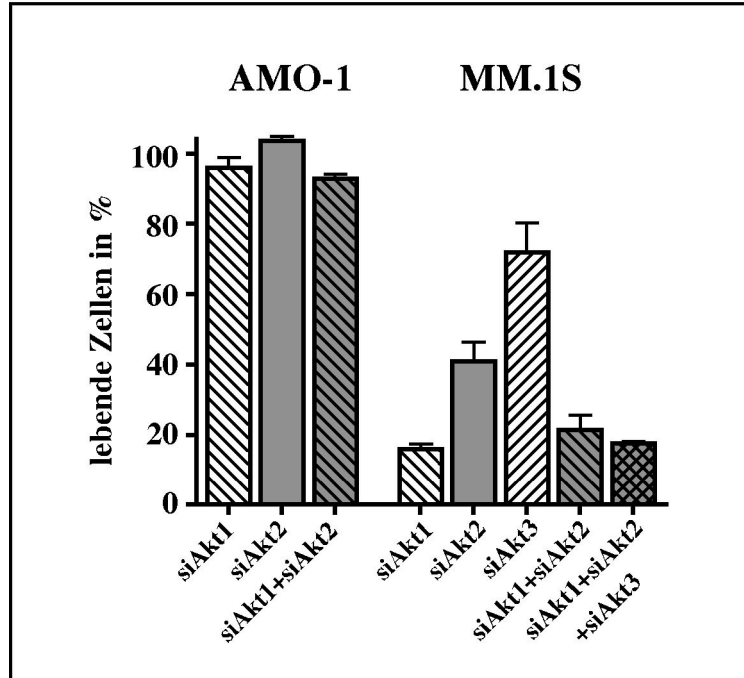


Abb. 3.3: Anteil überlebender Zellen nach Akt-"knock-down" mit siRNA-Expressionskonstrukten

Die mit den siRNA-Expressionskonstrukten transfizierten Zellen wurden nach dem Sorten in Kokultur mit KMSZ gehalten und an Tag 6 nach der Transfektion von den KMSZ abgespült. Der Anteil lebender Zellen wurde mit AnnexinV-ATTO 647/Propidiumjodid Färbung und durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Bei jeder Versuchsreihe wurden als Kontrolle Zellen mit dem leeren pSUPER-Vektor transfiziert und ansonsten gleich behandelt. Die Viabilität dieser Kontrollzellen wurde als 100% gesetzt. Gezeigt ist das Resultat aus 3 unabhängigen Experimenten wobei der Balken die Standardabweichung vom Mittelwert markiert.

3.4 Der Akt Inhibitor Akti-1/2 verringert die Akt Aktivierung in MM.1S Zellen und induziert Apoptose in MM.1S, aber nicht in AMO-1 Zellen

AMO-1 und MM.1S Zellen wurden über Nacht mit 10 μ M Akti-1/2 oder einer entsprechenden Menge des Lösungsmittels DMSO behandelt und anschließend auf das Vorhandensein von Akt Aktivierung untersucht. Es wurde die Phosphorylierung von Akt und des Akt Substrats FoxO1 betrachtet. Desweiteren wurde die Viabilität nach 5 Tagen Inhibitorbehandlung mittels AnnexinV-FITC und PI Färbung bestimmt.

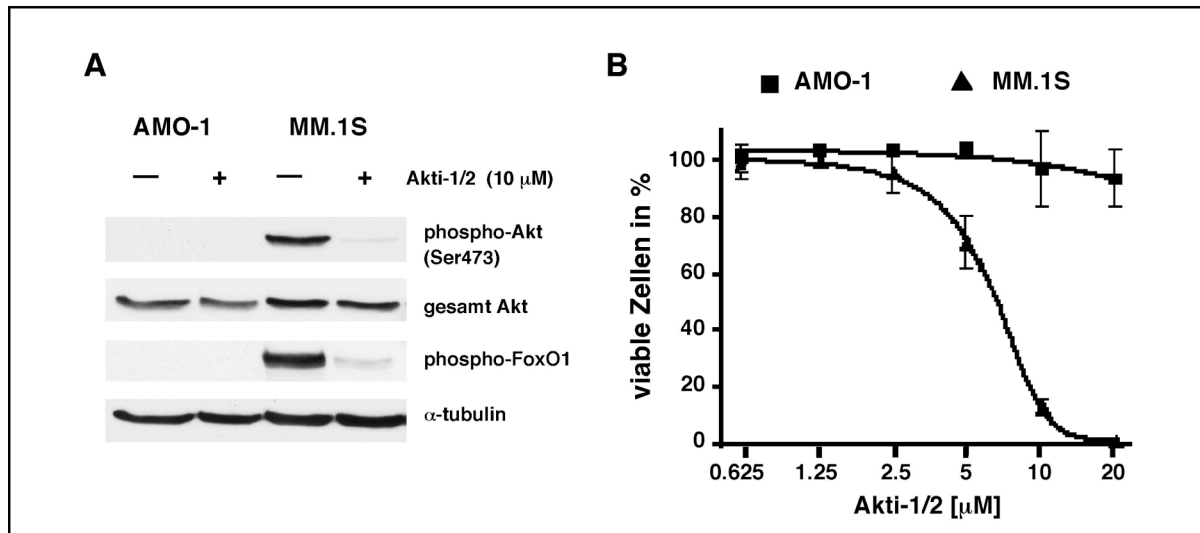


Abbildung 3.4: Akti-1/2 blockiert die Akt Aktivierung und induziert Apoptose in MM.1S, aber nicht in AMO-1 Zellen

(A) AMO-1 und MM.1S Zellen wurden über Nacht mit 10 μ M Akti-1/2 oder einer entsprechenden Menge DMSO behandelt und anschließend mit Western-Blot-Analyse die Menge an gesamt Akt Protein und die Phosphorylierung von Akt und FoxO1 dargestellt. Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung des Gels wurde α -Tubulin verwendet. (B) AMO-1 und MM.1S Zellen wurden in Kokultur mit KMSZ für 5 Tage mit unterschiedlichen Konzentrationen Akti-1/2 behandelt und der Anteil lebender Zellen mit AnnexinV-FITC und PI Färbung bestimmt und relativ zur DMSO-Kontrolle angegeben. Die Abbildung zeigt das Ergebnis von 3 Wiederholungen des Experiments und die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Akti-1/2 minimiert die konstitutive Akt-Phosphorylierung in MM.1S Zellen (siehe Abb. 3.4 (A)). Die Abnahme der Aktivität von Akt lässt sich auch an der Verringerung der Phosphorylierung des Akt Substrats FoxO1 erkennen. Die Akt-Inhibition hat in MM.1S Zellen eine ausgeprägte dosisabhängige Apoptose zu Folge, wohingegen die Viabilität der AMO-1 Zellen von der Inhibitor-Behandlung nicht beeinträchtigt wurde (siehe Abb. 3.4 (B)). Dieses Ergebnis reproduziert die Effekte der Akt-siRNAs und ist ein starker Hinweis darauf, dass der pharmakologische Inhibitor seine apoptotische Wirkung in Myelomzellen primär über die Inhibition von Akt vermittelt.

3.5 Der Akt Inhibitor Akti-1/2 blockiert die Akt Aktivierung in primären MM Zellen

Um den Inhibitor Akti-1/2 in primären MM Zellen einzusetzen, sollte seine Fähigkeit Akt auch in primären MM Zellen zu inhibieren geprüft werden. Dazu wurden isolierte Myelomzellen von 4 verschiedenen Myelompatienten mit 10 μ M Akti-1/2 über Nacht

behandelt, anschließend mit IL-6 (25 ng/ml) und IGF-1 (50 ng/ml) stimuliert, um ein starkes phospho-Akt Signal zu induzieren, und mit Western-Blot-Analysen untersucht (Abb. 3.5 (A)).

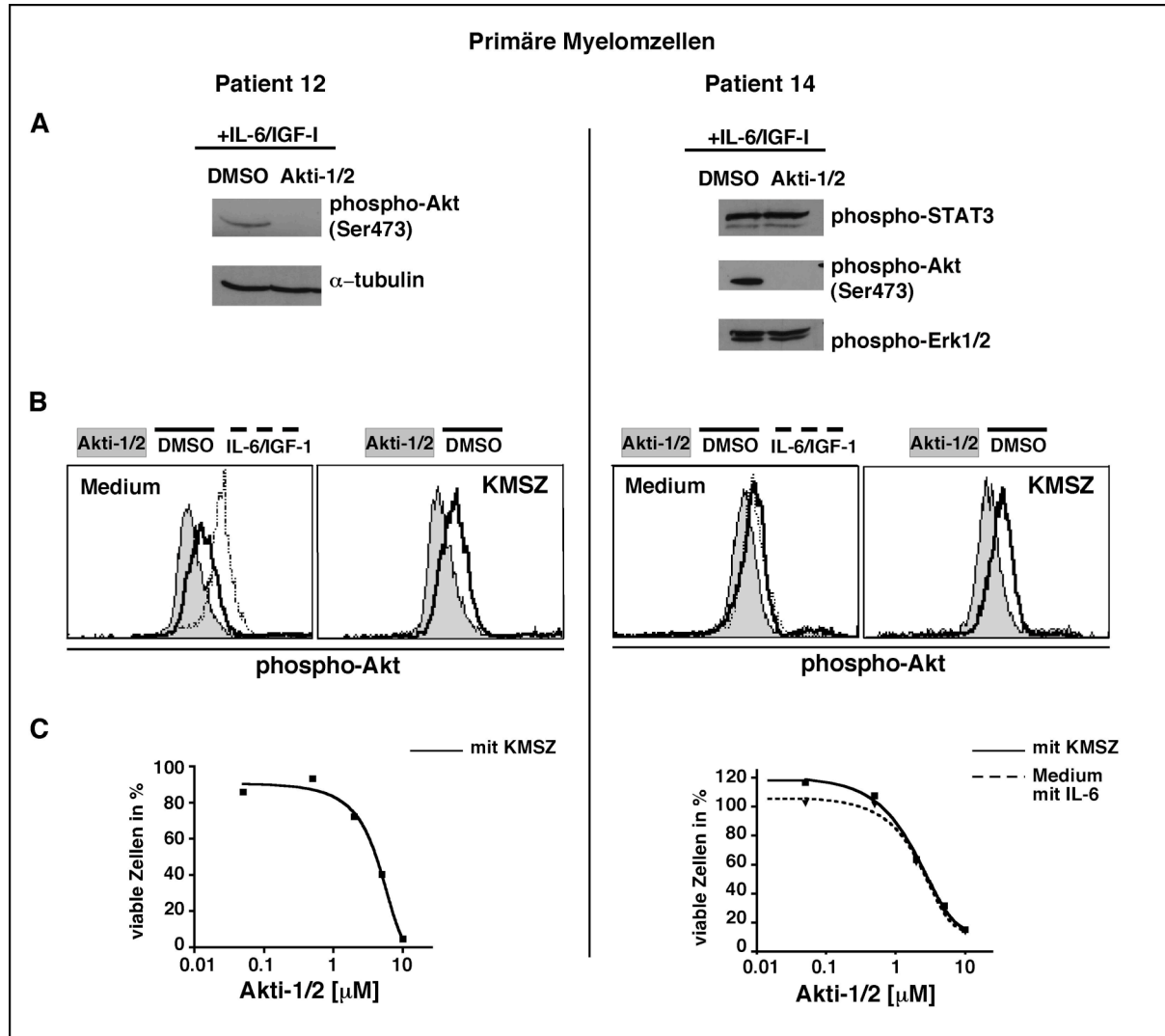


Abb. 3.5: Akti-1/2 blockiert die Akt Aktivität in primären MM Zellen

Exemplarisch sind die Ergebnisse der Patienten 12 und 14 gezeigt. **(A)** Primäre MM Zellen wurden mit 10 μM Akti-1/2 oder einer entsprechenden Menge DMSO über Nacht behandelt und anschließend mit 25 ng/ml IL-6 und 50 ng/ml IGF-1 stimuliert. In Western-Blot-Analysen wurde die Phosphorylierung von Akt bestimmt. Mit α-Tubulin bzw. phospho-STAT3 und phospho-ERK1/2 (bei Patient 14) wurde eine gleichmäßige Beladung des Gels festgestellt. **(B)** Primäre MM Zellen wurden mit und ohne Kokultur auf KMSZ mit Akti-1/2 oder einer entsprechenden Menge DMSO über Nacht behandelt. Ein weiterer Ansatz wurde als Positivkontrolle für Akt-Phosphorylierung mit IL-6 (25 ng/ml) und IGF-1 (50 ng/ml) 15 Minuten vor der Fixierung stimuliert. Anschließend wurde die Phosphorylierung von Akt mittels intrazellulärer Färbung und Durchflusszytometrie bestimmt. Für die Zellen der Patienten 12 und 14 ist in **(C)** die Viabilität an Tag 5 der Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Akti-1/2 mit und ohne (nur Patient 12) Kokultur mit KMSZ dargestellt. Die DMSO-Kontrolle wurde als 100% gesetzt und der Anteil lebender Zellen nach Akti-1/2 Behandlung wurde auf die DMSO-Kontrolle bezogen.

Gleichzeitig wurden primäre MM Patientenzellen (n=20) ohne und in Kokultur mit KMSZ kultiviert und mit Akti-1/2 (10 μ M) behandelt, um zu zeigen, dass Akti-1/2 sowohl eine konstitutiv vorhandene Akt-Phosphorylierung (Abb. 3.5 (B)/links) als auch eine durch KMSZ induzierte Akt-Phosphorylierung (Abb. 3.5 (B)/rechts) hemmt. Das phosphorylierte Akt Protein wurde mittels intrazellulärer Färbung und Durchflusszytometrie bestimmt.

Die Western-blots zeigen, dass Akti-1/2 die Akt-Phosphorylierung in primären MM Zellen verhindert (Abb. 3.5 (A)).

Die Blockade der Akt-Phosphorylierung konnte auch mittels intrazellulärer phospho-Akt-Färbung und Durchflusszytometrie in Medium ohne IL-6 und in Kokultur mit KMSZ gezeigt werden (Abb. 3.5 (B)). Bei den Zellen der Patienten 12 und 14 führte die Akt-Blockade zu einer deutlichen Abnahme der Viabilität (Abb. 3.5 (C)). Bei drei untersuchten MM Patientenproben zeigte Ko-kultur mit KMSZ keine verbesserte Viabilität verglichen mit Zellen, die in Medium mit zugesetztem IL-6 kultiviert wurden (Abb. 3.5 (C), Patient 12).

3.6 Primäre MM Zellen mit konstitutiver Akt Aktivierung reagieren, im Gegensatz zu solchen ohne aktiviertes Akt, mit Apoptose auf Akt Inhibition

Es wurde von konstitutiver Akt Aktivierung in MM Zellen in Knochenmarkbioptaten berichtet (Hsu *et al.*, 2001). Um festzustellen, ob diese Beobachtung ein prognostischer Marker für die Sensitivität gegenüber Akt Inhibition darstellt, wurde der Akt Aktivierungsstatus in MM Patientenproben mittels IHC-Färbungen sowie intrazellulärer phospho-Akt Färbung und anschließender Durchflusszytometrie bestimmt und mit der Sensitivität von Myelomzellen derselben Patientenprobe gegenüber Akt-Inhibition mit Akti-1/2 verglichen. Eine detaillierte Auflistung der Ergebnisse aller untersuchter Patientenproben befindet sich in der Tabelle 1 im Anhang.

In Abbildung 3.6-1 sind beispielhaft die Ergebnisse von zwei MM Patienten gezeigt. Die Knochenmarkbioptate zeigen dichtgepackt CD138-positive, maligne Plasmazellen (Abb. 3.6 (A1+2) linkes Bild und Inset). In MM Zellen von Patient 17 wurde weder in immunhistochemischen Färbungen auf phospho-Akt, noch mittels intrazellulärer phospho-Akt Färbung und Durchflusszytometrie eine Akt Aktivierung festgestellt (A1 rechtes Bild +B1) und die Viabilität wurde durch Akt Inhibition nicht beeinträchtigt (C1). Dagegen zeigten die MM Zellen von Patient 6 eine deutliche Akt Phosphorylierung (A2 rechtes Bild +B2) und reagierten sehr sensitiv gegenüber Akti-1/2 in einer Konzentration von 10 μ M (C2).

Primäre MM Zellen

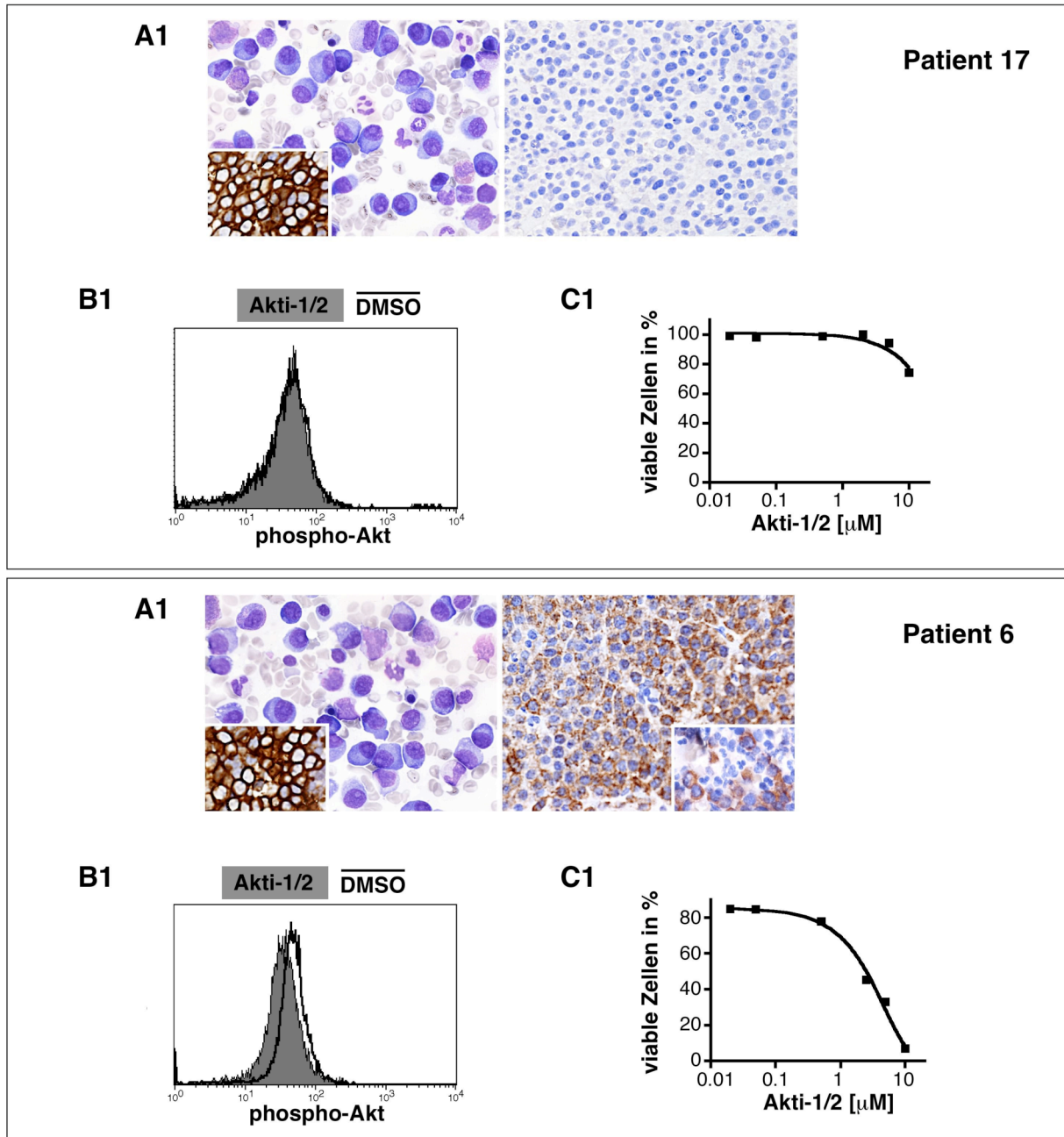


Abb. 3.6-1: Beispielhafte Darstellung zweier Patientenproben mit unterschiedlicher Akt Aktivierung und Sensitivität gegenüber Akt Inhibition

(A1+2) Darstellung der malignen Plasmazellen in Knochenmarksbioptaten mittels Giemsa-Färbung (Übersicht links) und IHC-Färbung auf den Plasmazellmarker CD138 (Inset links), daneben eine IHC Färbung auf phospho-Akt in einem dichtgepackten Plasmazellinfiltrat (Übersicht rechts) und einem nur gering mit Plasmazellen durchsetzten Ausschnitt (A2, Inset rechts). (B1+B2) Primäre MM Zellen wurden über Nacht mit 10 μM Akti-1/2 oder einer entsprechenden Menge DMSO inkubiert und der Anteil an phosphoryliertem Akt mittels intrazellulärer Färbung und Durchflusszytometrie bestimmt. (C1+2) Nach 5 Tagen Inkubation mit Akti-1/2 in Kokultur mit KMSZ wurde die Viabilität der primären MM Zellen mittels AnnexinV-FITC/ PI-Färbung bestimmt. Dargestellt ist die Viabilität nach Akti-1/2 Behandlung bezogen auf die DMSO-Kontrolle.

Insgesamt wurde die Viabilität von 30 MM Patientenproben nach 5 Tagen Behandlung mit 10 μ M Akti-1/2 in Kokultur mit KMSZ bestimmt (Abb. 3.6-2 (A)). Desweiteren wurde in 19 Knochenmarkbioptaten mittels immunhistochemischer phospho-Akt-Färbung *in situ* und in MM Zellen von 20 Patientenproben durch intrazelluläre phospho-Akt-Färbung und Durchflusszytometrie *in vitro* die Aktivierung von Akt bestimmt.

Von den 30 auf ihre Viabilität untersuchten MM Tumorisolate zeigten 15 eine eher geringe bis nicht vorhandene Sensitivität gegenüber der Akti-1/2 Behandlung, wohingegen die anderen 15 Proben sehr sensitiv auf Akt Inhibition reagierten (Abb. 3.6-2 (A)).

Für 19 dieser 30 pharmakologisch untersuchten Tumorisolate standen Knochenmarkbioptate zur Analyse des *in situ* Status von phospho-Akt zur Verfügung. In der IHC zeigten 10 MM Patientenproben eine deutliche phospho-Akt-Färbung, von denen wiederum 8 sensitiv auf den Inhibitor reagierten (Abb. 3.6-2 (B)). Von den 9 Bioptaten ohne erkennbare Akt-Phosphorylierung waren alle insensitiv gegenüber Akt Inhibition (Abb. 3.6-2 (B)).

Bei 20 Tumorisolaten standen genug Myelomzellen zur Verfügung, um den phospho-Akt Status mittels intrazellulärer phospho-Akt-Färbung und Durchflusszytometrie zu bestimmen. In 13 von 20 auf diese Weise untersuchten MM Proben wurde eine konstitutive Akt Aktivierung festgestellt und von diesen 13 Proben waren 12 sensitiv gegenüber Akt Inhibition (Abb. 3.6-2 (C)). Alle 7 MM Proben ohne konstitutive Akt Aktivierung zeigten nur geringgradige Apoptose nach Akti-1/2 Behandlung.

Zusammengefaßt zeigten von 26 auf Akt Phosphorylierung untersuchten Patientenproben 15 eine Phosphorylierung von Akt. Von diesen "Phospho-Akt-positiven" reagierten 13 sensitiv auf Akti-1/2-Behandlung. Alle 11 Patientenproben ohne erkennbare Akt-Phosphorylierung waren resistent gegenüber dem Inhibitor.

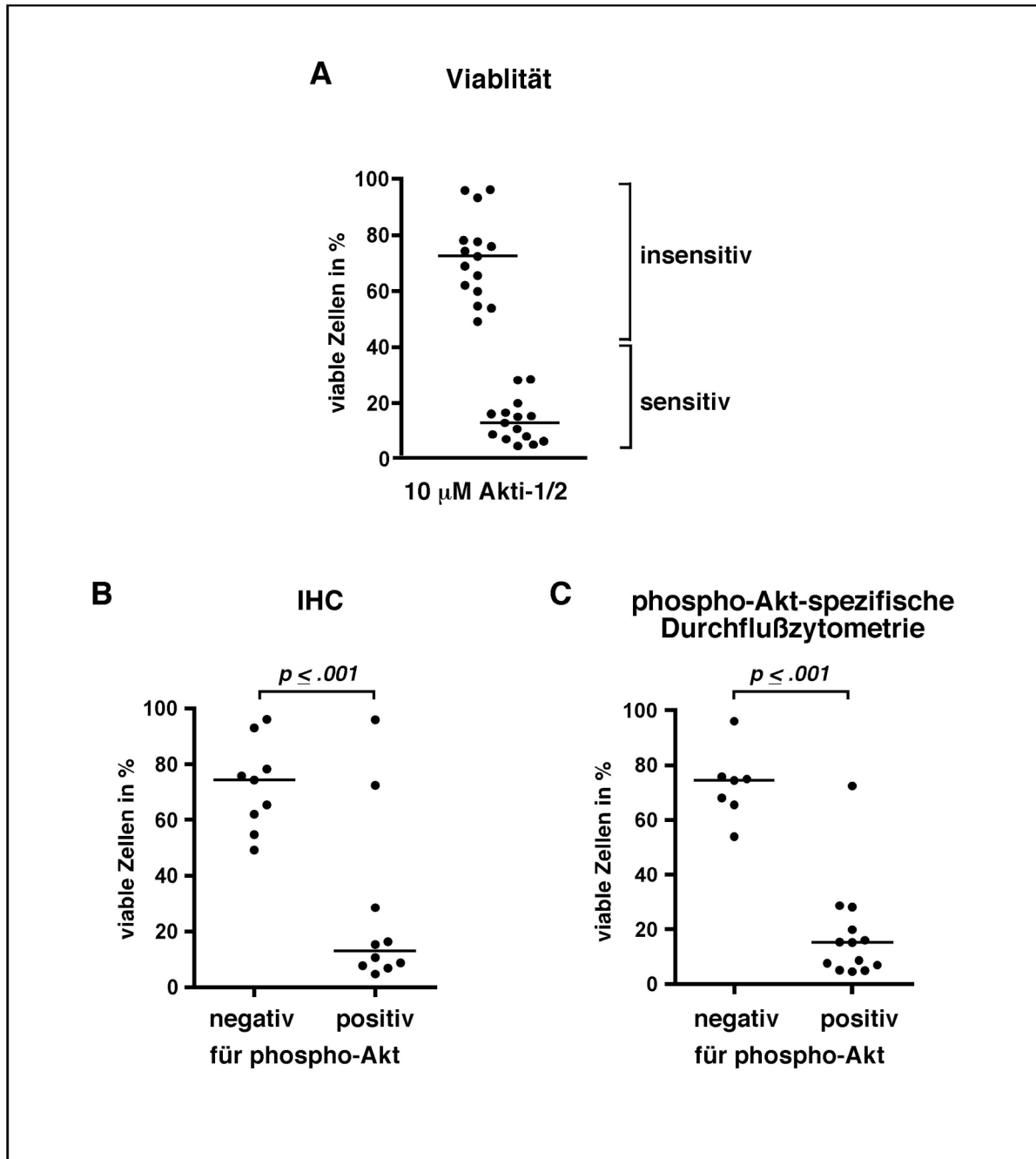


Abb. 3.6-2: Überblick über die Untersuchungen auf Akt Aktivierung und Viabilität nach Akt Inhibition von 30 MM Patientenproben

(A) MM Zellen aus 30 MM Patientenproben wurden in Kokultur mit KMSZ für 5 Tage mit 10 μ M Akti-1/2 behandelt und die Viabilität mit AnnexinV-FITC/ PI-Färbung bestimmt. Angegeben ist der Anteil lebender MM Zellen verglichen mit der DMSO Kontrolle. Die Proben sind aufgeteilt in solche mit einer Viabilität > 35% (insensitiv) oder \leq 35% (sensitiv). Die Balken geben den Median für die jeweilige Gruppe an. (B+C) Die immunhistochemisch auf phospho-Akt gefärbten Knochenmarkbiopate (n=19) wurden aufgeteilt in solche ohne und solche mit erkennbarer phospho-Akt-Färbung (B). Desgleichen wurden mittels intrazellulärer phospho-Akt Färbung und Durchflusszytometrie die Veränderung in der Medianen-Fluoreszenz-Intensität (MFI) nach der Behandlung mit Akti-1/2 bestimmt und die Proben (n=20) in solche ohne (< 1.3-fache MFI) und solche mit (\geq 1.3-fache MFI) konstitutiver Akt-Aktivierung aufgeteilt (C). Für jede Patientenprobe ist die Viabilität der MM Zellen nach 5 Tagen Behandlung mit 10 μ M Akti-1/2 in Kokultur mit KMSZ und bezogen auf die DMSO-Kontrolle angegeben. Der *p*-Wert wurde mit dem unpaired Students-*t*-Test bestimmt. Die Balken geben den Median für die jeweilige Gruppe an.

3.7 Die Mutation in Akt1, die zu einem E17K-Aminosäureaustausch und konstitutiver Akt Aktivierung führt, wurde in primären MM Patientenproben nicht gefunden

Von 8 MM Zelllinien und isolierten Tumorzellen aus 20 MM Patientenproben wurde cDNA generiert und das 5'-Ende von Akt1 sequenziert. Die beschriebene Mutation, durch die die Aminosäure Glutaminsäure durch Lysin ersetzt wird, zeigt sich in der Sequenz von Akt1 durch eine Veränderung des Basentriplets von GAG zu AAG. Diese Veränderung wurde in keiner der untersuchten Proben gefunden.