Aus der Medizinischen Klinik m. S. Hämatologie und Onkologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Wirkungen des Proteasominhibitors BSc2118 beim multiplen Myelom und Mantelzelllymphom

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jan Friedrich Sterz

aus Lich

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. O. Sezer

2. Prof. Dr. med. H. Peters

3. Prof. Dr. med. V. Krenn

Datum der Promotion: 29.01.2010

| 1 | Einleitu | ng | 3 |
|---|----------|--|----------|
| | 1.1 Pro | teasom | 3 |
| | 1.1.1 | Struktur und Funktion | 3 |
| | 1.1.2 | Proteasom bei malignen Zellen | 5 |
| | 1.2 Pro | teasominhibition | 5 |
| | 1.2.1 | Präklinische Daten zur Proteasominhibition | 6 |
| | 1.2.2 | Klinische Daten zur Proteasominhibition | 7 |
| | 1.2.3 | Neue Inhibitoren | 8 |
| | 1.3 Mul | tiples Myelom | 9 |
| | 1.3.1 | Biologie der Myelomzellen | 10 |
| | 1.4 Mai | ntelzell-Lymphom | 11 |
| | 1.4.1 | Biologie des Mantelzell-Lymphoms | 12 |
| | 1.5 Ziel | setzung | 13 |
| 2 | Materia | lien und Methoden | 15 |
| | 2.1 Mat | erialien | 15 |
| | 2.1.1 | Laborgeräte und Zubehör | 15 |
| | 2.1.2 | Biochemikalien, Chemikalien und Enzyme | 17 |
| | 2.2 Met | hoden | 20 |
| | 2.2.1 | Zellkultur | 20 |
| | 2.2.1. | 1 Zelllinien | 20 |
| | 2.2.1. | 2 Separation von primären CD138+ Zellen aus Knochenmarkas | spiraten |
| | | von Myelompatienten | 21 |
| | 2.2.1. | 3 Gewinnung von Lymphozyten-angereicherten MNC aus perip | herem |
| | | Blut | 23 |
| | 2.2.1. | 4 Kultivierung | 24 |
| | 2.2.2 | Zellkulturversuche unter Inkubation mit BSc2118 | 25 |
| | 2.2.2. | 1 Proteasominhibitor BSc2118 | 25 |
| | 2.2.2. | 2 Proliferationshemmung | 25 |
| | 2.2.2. | 3 Apoptoseinduktion | 27 |
| | 2.2.2. | 4 Zellzyklus-Analyse | 28 |
| | 2.2.3 | Nachweis der Expression spezifischer Proteine unter Inhibition mit | t |
| | | BSc2118 | 29 |
| | 2.2.3. | 1 Proteinpräparation | 29 |
| | 2.2.3. | 2 Proteinnachweis mittels Western Blot-Verfahren | 31 |

| | 2 | .2.3.3 | Semi-quantitative NF-kB Transkriptionsfaktor-Mengenbestimmung | 36 |
|----|------|-----------|---|----|
| | 2 | .2.3.4 | Bestimmung der Proteasomaktivität | 37 |
| | 2.2. | 4 Erg | ebnisdarstellung | 39 |
| 3 | Erg | ebnisse | | 40 |
| 3 | 8.1 | Nachwe | is von CD138+/CD38+ Zellen | 40 |
| 3 | 8.2 | Zellkultu | ır | 41 |
| 3 | 3.3 | Prolifera | ationshemmung | 42 |
| 3 | 3.4 | Apoptos | seinduktion | 45 |
| 3 | 3.5 | Zellzyklu | us-Analysen | 49 |
| 3 | 3.6 | Proteinr | nachweis | 51 |
| | 3.6. | 1 Imn | nunologischer Proteinnachweis | 51 |
| | 3 | .6.1.1 | Western Blot | 51 |
| | 3 | .6.1.2 | Semi-quantitative NF-кB Transkriptionsfaktor-Bestimmung | 54 |
| | 3.6. | 2 Pro | teasominhibition | 56 |
| 4 | Dis | kussion | | 59 |
| 4 | l.1 | Das Ubi | quitin-Proteasom-System | 59 |
| 4 | 1.2 | Proteas | ominhibitoren: Wirkung und Einsatzgebiet | 59 |
| 4 | 1.3 | Antiproli | iferative Wirkung des BSc2118 | 61 |
| 4 | 1.4 | Proapop | ototische Wirkung des BSc2118 | 62 |
| 4 | 1.5 | BSc211 | 8 induziert G2/M-Zellzyklus-Arrest | 62 |
| 4 | 1.6 | Hemmu | ng spezifischer Zellzyklus regulierender Proteine | 63 |
| 4 | 1.7 | BSc211 | 8 verhindert die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB | 64 |
| 4 | 1.8 | Direkte | Hemmung des Proteasoms durch BSc2118 | 65 |
| 5 | Zus | ammenf | fassung | 67 |
| 6 | Ver | zeichnis | der verwendeten Abkürzungen | 68 |
| 7 | Ver | zeichnis | der Tabellen und Abbildungen | 72 |
| 8 | Lite | raturver | zeichnis | 74 |
| 9 | Eig | ene Pub | likationen | 88 |
| 10 | Erk | lärung a | n Eides Statt | 90 |
| 11 | Dar | nksagun | g | 91 |
| 12 | Cur | riculum | vitae | 92 |

1 Einleitung

1.1 Proteasom

1.1.1 Struktur und Funktion

Das Ubiquitin-Proteasom-System ist in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der translationalen Tumorforschung gerückt [1]. Die Entdeckung des später als Proteasom bezeichneten zellulären Proteinabbauapparates begann mit der Beschreibung rektangulärer Gebilde im Zytoplasma tierischer und pflanzlicher Zellen [2]. In darauf folgenden Jahren wurden von unterschiedlichen Forschergruppen hochmolekulare multikatalytische Proteinasen aus verschiedenen eukaryotischen Geweben isoliert [3, 4]. Später stellte sich heraus, dass diese Enzymaktivitäten dem Proteasom zugeordnet werden konnten.

Das Proteasom stellt einen multikatalytischen Enzymkomplex dar, der sich aus mehreren funktionellen Untereinheiten zusammensetzt. Bestehend aus einer zentralen multikatalytischen Untereinheit (Core Partikel (CP), Sedimentationsgeschwindigkeit dieses Partikels =20 Svedberg (S)), und zwei regulierenden 19S Untereinheiten (Regulierende Partikel (RP)), setzt sich der 26S Gesamt-Proteasom-Komplex zusammen [5]. Das Proteasom ist sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma von Eukaryoten lokalisiert [6]. Das zylinderförmige 20S CP besteht aus je 2 ringförmig angeordneten α - und β - Untereinheiten und bildet den katalytischen Kern [7]. Sowohl α als auch β-Ringe bestehen aus jeweils 7 distinkten Untereinheiten. Zwei außen liegende α-Ringe verhindern den direkten Zugang zum Inneren. Die aktiven Zentren der β-Einheiten sind dem Hohlraum zugewandt und jeweils um ein N-terminales nukleophiles Threonin gelagert [8, 9]. Die beiden zentralen β-Ringe besitzen die eigentliche Proteasenaktivität, die sich im wesentlichen aus drei unterschiedlichen Proteaseaktivitäten zusammensetzt: caspaseartig (β1; auch postglutamylhydrolysierend), trypsinartig (β 2) und chymotrypsinartig (β 5), entsprechend den Peptidspaltstellen (jeweils nach einer sauren, basischen und hydrophoben Bindung) [10, 11]. Abzubauende Proteine werden zunächst kovalent an Ubiquitin gebunden und somit markiert. Das Ubiquitin aktivierende Enzym (E1) erkennt und überträgt letztere auf das Ubiquitin konjugierende Enzym (E2), welches im Zusammenspiel mit der Ubiquitin-Ligase (E3) die kovalente Polyubiquitinierung der Proteine an einem Lysinrest ermöglicht [12, 13]. Die den α-Ringen aufsitzenden 19S RPs erkennen spezifisch polyubiguitinierte Proteine als Proteasomsubstrat, entfalten diese unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) und führen sie dem 20S CP zu [14]. Die Abbildung (Abb.) 1 zeigt schematisch diese Vorgänge.



Abb. 1: Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Ubiquitin aktivierendes Enzym (E1); Ubiquitin konjugierendes Enzym (E2); Ubiquitin-Ligase E3); Ubiquitin (Ub); Ubiquitin abspaltendes Enzym (DUB); Regulierendes Partikel (RP); Core Partikel (CP). (1) Aktivierung von Ubiquitin durch E1 unter Verbrauch von ATP; (2) Übertragung von Ub auf E2; (3) E2+Ub und E3 assoziieren; (4) Polyubiquitinylierung von Zielproteinen; (5) Erkennung der markierten Proteine durch das RP; (6) Verdauung der Zielproteine durch das Proteasom mit Freisetzung von Oligopeptiden; (7) Entfernen der Ubiquitinreste und Freisetzung erneut einsetzbarer Ubiquitin-Monomere.

Als wesentliche Funktion des Proteasoms wurde initial dessen Rolle beim nichtlysosomalen Proteinabbau identifiziert. Das Ubiquitin-Proteasom-System ist für den Umsatz der Mehrzahl intrazellulärer Proteine verantwortlich [15]. Mittlerweile ist bekannt, dass das Proteasom nicht nur eine wichtige Rolle beim Erhalt der Homöostase spielt, sondern darüber hinaus direkt oder indirekt den Ablauf wichtiger Signalkaskaden, wie etwa des Zellzyklus, durch Abbau Zellzyklus regulierender Proteine [16] reguliert. Auch Zellwachstum und Proliferation werden durch den Ubiquitin vermittelten Abbau von Tumorsuppressoren, Protoonkogenen und Komponenten von Signaltransduktionssystemen beeinflusst [13]. Falsch gefaltete Proteine aus dem endoplasmatischen Retikulum werden abgebaut [17], und auch an der Antigenprozessierung ist das Proteasom beteiligt [18].

1.1.2 Proteasom bei malignen Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass die Proteasomaktivität bei verschiedenen malignen Zellen, wie etwa bei Myelomzellen (MC) [19], oder bei Zellen des Mantelzelllymphoms (MCL) [20], konstitutiv erhöht ist. Beim multiplen Myelom (MM) wurde nachgewiesen, dass die zirkulierende Proteasomkonzentration im Serum von MM Patienten im Vergleich zu der Konzentration bei gesunden Probanden deutlich erhöht ist, und einen prognostischen Faktor für das Gesamtüberleben der Patienten mit MM darstellt [21]. Beim MCL wurde gezeigt, dass der cyclinabhängige Kinase-Inhibitor (CDKI) p27^{kip1} (p27), der eine Zellzyklus hemmende Funktion ausübt, durch eine gesteigerte Proteasomaktivität der MCL-Zellen vermehrt abgebaut wird, wodurch die Progression des Zellzyklus der transformierten Zellen gefördert wird [20]. Auch bei verschiedenen leukämischen Zelllinien [22, 23], sowie bei Zellen des Nierenzellkarzinoms wurde eine erhöhte Proteasomaktivität gefunden [24].

1.2 Proteasominhibition

Die Identifizierung der erhöhten Proteasomaktivität bei malignen Zellen, hat zu Überlegungen geführt, das maligne Zellwachstum durch Inhibierung des Proteasoms zu beeinflussen. Die Inhibierung des Proteasoms verhindert den Abbau zahlreicher polyubiquitinierter Zielproteine. Bei proliferierenden, insbesondere transformierten Zellen, kommt eine Proteasominhibition stärker zum Tragen als bei Zellen, die sich in der Gap 0 (G0) - Phase des Zellzyklus befinden [25]. Die Regulierung und Progression des Zellzyklus ist insbesondere am Ende einer Zyklusphase höchst sensitiv an die integrative Verarbeitung zyklusfördernder und -hemmender Signale gekoppelt. Somit entscheiden einerseits die Konzentrationen der unterschiedlichen Cyclin/cyclinabhängige Kinase (CDK) -Komplexe, und andererseits die Konzentrationen der Antagonisten sowie der CDKI über den weiteren Ablauf [26]. Wird das Proteasom effektiv gehemmt, so wird die zelluläre Proteinhomöostase gestört, wodurch es zu einer Stabilisierung und Akkumulation sowohl pro- als auch antiapoptotischer Proteine kommt führt Signalüberflutung [27]. Dies zu und Außerkraftsetzung des Regulationsmechanismus, wodurch es wiederum zum Zellzyklus-Arrest, und schließlich durch Aktivierung von Caspasen zur Apoptoseinduktion kommt [28]. Bei transformierten Zellen spielt der Nukleäre Faktor kappa B (NF-κB) eine wichtige Rolle. Nach Aktivierung im Zytosol und Translokation in den Nukleus, fungiert NF-κB als Chemoresistenz fördernder und antiapoptotischer Transkriptionsfaktor [29]. Der Inhibitor des NF-κB (IκB) ist im Zytosol an NF-κB gebunden, wodurch NF-κB inaktiviert ist. Wird das I-κB phosphoryliert, so wird es schnell vom NF-κB abgespalten und proteasomal abgebaut, wodurch das NF-κB freigegeben wird. Kommt es jedoch zur Proteasominhibition, so wird I-κB stabilisiert und die Aktivierung des NF-κB behindert [30].

Das Lactacystin, ein Stoffwechselprodukt von Bakterien der Gattung Streptomyces war die erste Substanz, bei der proteasominhibierende Eigenschaften nachgewiesen werden konnten [31]. Wenig später konnten proteasomspezifischere und wirksamere halbsynthetische Inhibitoren aus der Klasse der tripeptidischen Aldehydderivate (MG-132) hergestellt werden [32], später folgten peptidische Borsäureester-Derivate wie MG-262 [33] und PS-341. Das PS-341 zeigte in vitro eine besonders potente und spezifische inhibitorische Wirkung gegenüber der chymotrypsinartigen Proteasomaktivität [34].

1.2.1 Präklinische Daten zur Proteasominhibition

In In-vitro-Experimenten an verschiedenen Zelllinien solider Tumoren, wie Pankreas-Karzinom [35] oder Prostata-Karzinom [36], sowie bei Zellen hämatologischer Erkrankungen, wie MM [37] oder bei verschiedenen Leukämiezelllinien [23], konnten antiproliferative und proapoptotische Eigenschaften der unterschiedlichen Proteasominhibitoren gezeigt werden. Das PS-341 erwies sich insbesondere bei hämatologischen Erkrankungen, wie dem MM [38] und dem MCL [39], als besonders wirksame Substanz. Als ein wesentlicher Mechanismus der Anti-Tumor-Wirkung konnte ein Zellzyklus-Arrest via Stabilisierung der CDK-Inhibitoren p21^{waf1/cip1} (p21; [40]) beim MCL, sowie p21 und p27 [41] beim MM, identifiziert werden. Der prolongierte Arrest führt zur Wachstumshemmung und Apoptose [38, 39, 42]. Weiterhin bewirkt PS-341 eine Hemmung des NF-KB, einem stark antiapoptotisch wirksamen Transkriptionsfaktor MM-Zelllinien, [39]. Auch bei welche resistent gegenüber konventioneller Chemotherapie (Melphalan, Dexamethason (DEX), Doxorubicin) waren, überwand PSdie Resistenzen und induzierte Apoptose [38]. PS-341 vermindert die 341

Adhäsionsfähigkeit der MM-Zellen an Knochenmark (KM)-Stromazellen (BMSC) und extrazelluläre Matrix, wodurch die zelladhäsionsvermittelte Medikamentenresistenz (cell-adhesion mediated drug resistence) der MM-Zellen überwunden wird [43]. Auch synergistische Effekte mit konventionellen Zytostatika wurden nachgewiesen [44]. Außerdem konnte eine inhibitorische Wirkung des PS-341 auf Zellen des KM-Mikromilieus von Patienten nachgewiesen werden. Die Expression von Zytokinen durch Knochenmarkstrome, welche Wachstum, Überleben und Chemoresistenz der MC fördern, wurde gehemmt [43]. PS-341 hemmt zudem die durch MC und BMSC geförderte Angiogenese im KM bei MM [45]. Ebenso inhibiert PS-341 in vitro die Osteoklastogenese beim MM [46]; die Osteoblastenaktivität wird hingegen durch PS-341 gefördert, und wirkt somit der Knochendestruktion beim MM (siehe auch 1.3) entgegen [47].

1.2.2 Klinische Daten zur Proteasominhibition

Die viel versprechenden präklinischen Ergebnisse, sowie die relative Selektivität des PS-341 für maligne Zellen, führten zur Initiierung klinischer Studien. In zwei Phase-II und einer Phase-III-Studie konnte die Überlegenheit von PS-341 (Bortezomib, BTZ) im Vergleich zur Standardtherapie beim rezidivierten und refraktären MM gezeigt werden [48, 49, 50]. Die Gesamtansprechraten lagen bei ca. 50 Prozent (%), eine Verlängerung des Gesamtüberlebens um mehr als 6 Monate wurde nachgewiesen [50].

BTZ erhielt im Jahre 2003 durch die amerikanische Food and Drug Administration (FDA) eine beschleunigte Zulassung für die Therapie vorbehandelter Patienten mit rezidiviertem oder refraktärem MM [51]. Laufende Studien beim MM, bei denen BTZ in der Erstlinientherapie eingesetzt wird, zeigen ebenfalls hohe Ansprechraten [52].

Die viel versprechenden Ergebnisse aus den präklinischen Testreihen an Zellen solider Tumoren sowie die hohen klinischen Ansprechraten bei hämatologischen Erkrankungen konnten in klinischen Studien bei Patienten mit soliden Tumoren jedoch nicht erreicht werden (Beispiel: metastasierte neuroendrokrine Tumoren [53]; metastasiertes Mammakarzinom [54]).

1.2.3 Neue Inhibitoren

Die Einführung des Bortezomib als erster Vertreter der neuen Substanzklasse der Proteasominhibitoren hat zu Verbesserungen in der Therapie des MCL, und insbesondere des MM geführt. Dennoch ergibt sich aus den erzielten Ansprechraten, den Überlebenszeiten und dem Nebenwirkungsprofil der Substanz die Notwendigkeit der Weiterentwicklung der Proteasominhibitoren. Mittlerweile befinden sich eine Reihe weiterer Proteasominhibitoren in präklinischer und klinischer Entwicklung. Beispielhaft seien hier als klinisch viel versprechende Substanzen das NPI-0052 (Salinosporamide A [55]) und das PR-171 (Carfilzomib [56]) genannt. Beide Substanzen zeigten in präklinischen Studien mit MM-Zelllinien, dass sie Resistenzen gegen konventionelle Medikamente und auch gegen BTZ zum Teil überwinden können, und ihre Wirkungsdauer durch die kovalente Bindung an das aktive Zentrum des Proteasoms signifikant verlängert ist [57, 58]. In laufenden klinischen Phase-I-Studien konnte eine Wirksamkeit gezeigt werden [59].

Der in dieser Arbeit getestete Proteasominhibitor BSc2118 ist ein Derivat des tripeptidischen Aldehyds MG-132 [32], einem wohlbekannten 20S-Proteasominhibitor. In der Arbeitsgruppe von Prof. Kloetzel (Institut für Biochemie, Charité Campus Mitte) wurde, in Zusammenarbeit mit dem Institut für Organische Chemie der TU-Darmstadt, eine Reihe neuer Tripeptid-Inhibitoren synthetisiert, die alle drei katalytischen Proteasomaktivitäten inhibieren [60]. Für den Inhibitor BSc2118 konnte an Zervixkarzinom (HeLa)- und an Cisplatin-resistenten Melanom (MeWo)-Zelllinien eine deutliche, spezifische Inhibition der Proteasomaktivität (anhand von Röntgen-Kristallstrukturanalysen und Proteasomaktivitätsversuchen), eine Hemmung des Zellwachstums sowie eine Apoptoseinduktion gezeigt werden [60, 61]. Die Abbildung 2 zeigt die vereinfachte Strukturformel des BSc2118.



Abb. 2: Strukturformel des tripeptidischen Proteasominhibitors BSc2118, bestehend aus den Aminosäuren Leucin (Leu), Asparagin (Asp) und einem Aldehyd-Rest, welcher über eine Peptidbindung mit dem Asparagin verbunden ist. R¹ ist ein benzyloxycarbonyl-Rest, R² ein tertiärer Butyl-Rest [60].

1.3 Multiples Myelom

Das Multiple Myelom ist eine maligne Plasmazellerkrankung des Knochenmarks, die histopathologisch zu den Non-Hodgkin-Lymphomen zählt. Mit einer Inzidenz von 5-10/100.000 Einwohnern pro Jahr ist es mit ca. 10% Anteil die zweithäufigste hämatologische Neoplasie mit einem Erkrankungsgipfel bei 62 Jahren [62]. Die monoklonale Plasmazellvermehrung im Knochenmark geht mit einer pathologischen Produktion von Immunglobulinen- oder Immunglobulin-Leichtketten, der soq. monoklonalen Gammopathie bzw. Paraproteinämie einher [63, 64]. Durch die Myelomzellinfiltration kommt es zur Verdrängung der normalen Hämatopoese. Da die klonal produzierten Immunglobulinmoleküle funktionell inaktiv sind, kommt es in der Folge auch zu einem relativen Immunglobulin-Mangel und erhöhter Infektanfälligkeit der Patienten. Dieses im Überfluss produzierte Paraprotein kann durch Ablagerungen im Gewebe außerdem zu Funktionsstörungen und Organschäden, wie einer Cast-Nephropathie, oder einer renalen und kardialen Leichtketten-Amyloidose führen [65]. Ein weiteres wesentliches Merkmal des MM ist die osteolytische Knochendestruktion. Es kommt in nahezu 90% der Erkrankungen zu osteolytischen Knochendestruktionen mit Knochenschmerzen und häufig auftretenden pathologischen Frakturen [66, 67].

Die Standardtherapie des MM bei Patienten unter 60 Jahren ist die Hochdosistherapie mit autologer Stammzell-Transplantation (ASCT) [68]. Patienten, die nicht für eine Hochdosistherapie in Frage kommen, erhielten bisher eine zytostatische Therapie mit alkylierenden Substanzen [69] oder Anthrazyklinen [70] jeweils in Kombination mit Corticosteroiden. Ein wesentlicher Fortschritt der letzten 10 Jahre ist die Einführung neuer Substanzen in die Therapie des multiplen Myeloms. Hier sind in erster Linie die immunmodulatorischen Substanzen (immunomodulatory drugs, IMIDs) Thalidomid und dessen Abkömmling, das Lenalidomid, sowie der Proteasominhibitor BTZ (siehe oben) zu nennen. Für alle drei "neuen Substanzen" konnte in klinischen Phase-II- und Phase-II-Studien die Wirksamkeit sowohl beim rezidivierten/refraktärem MM [71, 72, 73, 74, 75]) als auch in der Erstlinientherapie [76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83] gezeigt werden. Sowohl die IMIDs als auch der Proteasominhibitor Bortezomib besitzen neben direkten Wirkungen auf die Tumorzelle selbst auch Effekte auf Zellen des Microenvironment, welches beim MM eine besondere Rolle spielen (siehe unten), so dass mit den neuen Substanzen, neben der rein zytostatischen Therapie, ein neues Wirkprinzip in die Therapie des MM Eingang gefunden hat.

1.3.1 Biologie der Myelomzellen

Zytogenetische Veränderungen, besonders die Translokation t(4;14) [84], die Deletion del(13q14) [85] und die Deletion del(17p13) (p53 Lokus) [86, 87], konnten als ungünstige Prognosefaktoren beim MM identifiziert werden. Das zelluläre Transkriptionsprofil im Falle einer Deletion 13 ist sehr stark mit verschiedenen anderen chromosomalen Aberrationen verknüpft, wie etwa der Hochregulierung des Chromosomenabschnittes 1q21-1q42 und der Herunterregulierung von 19p und fast des gesamten Chromosom 11 [88]. Die Deletion 17p13, als einer der stärksten Prognosefaktoren, führt phänotypisch zu einem (partiellen) Verlust von p53, einem der wichtigsten bekannten zellulären Tumorsuppressoren [89, 90]. Bei der t(4;14) kommt die Fibroblast Growth Factor-Rezeptor 3 (FGFR3) - kodierende Sequenz (4p16) durch die Translokation direkt in die Promoter-Region des Immunglobulin (Ig) - Schwerketten-Lokus (IgH) (14q32) zu liegen, wodurch der Rezeptor überexprimiert wird [91]. Durch die Überexpression des FGFR3 an der Oberfläche der Zellen werden diese Interleukin-6 (IL-6) unabhängig [92]. IL-6 ist ein wichtiger Proliferations- und Überlebensfaktor von MM-Zellen [93]. Außerdem wird der Wachstumsstimulus durch IL-6 auf die Zellen verstärkt, sowie deren Apoptoseresistenz gefördert, wenn FGFR3 überexprimiert ist [92].

Die malignen MC sind durch eine Überexpression, konstitutiv gesteigerte Aktivität und Induzierung einer Reihe zellulärer Faktoren, die die Proliferation und das Überleben der Zellen regulieren, charakterisiert. Unter anderem konnten der NF-κB- und der p38 mitogen aktivierte Protein-Kinase (MAPK) - Signalweg als wesentliche Überlebensfaktoren für MC identifiziert werden. NF-κB ist in MC überexprimiert [94]. Es spielt eine Rolle in der MC selbst, wo es als antiapoptotischer Transkriptionsfaktor das Überleben der Zelle fördert [95, 29, 96]. Andererseits wird NF-κB jedoch auch durch Zell-Zell-Kontakte zwischen MC und BMSC in letzteren aktiviert [97]. Dies führt zu IL-6 Expression und Sekretion durch die BMSC. Auch der p38 MAPK-Signalweg spielt eine entscheidende Rolle bei der Sekretion von IL-6 und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in den BMSC [98, 99]. Der Signalweg des Proteasoms spielt insofern eine zentrale Rolle, als dass er direkt in die Aktivierung des NF-κB involviert ist (siehe oben [29]).

Neben den Veränderungen in den MC selbst, spielt somit auch die Interaktion der MC mit den Zellen des KM-Mikromilieus eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie und dem Krankheitsverlauf des MM [43, 100, 101]. Sowohl die MC selbst als auch die BMSC produzieren verschiedene Zytokine, wie IL-6, Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), Stromal cell Derived Factor-1α (SDF1α), Macrophage Inflammatory Protein-1α (MIP1α), Matrix-Metalloproteinasen (MMP) 2+9, Angiopoietin-1 [102] oder Rezeptor Aktivator des NF-κB Liganden (RANKL) [103], die mittels autokriner oder parakriner Mechanismen Proliferation, Apoptose, Chemoresistenz, Angiogenese [104, 105] und Osteoklastenaktivierung im Knochenmark beeinflussen [106, 107]. Die Osteoklasten werden durch Osteoklasten-aktivierende Faktoren wie RANKL und Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor (MCS-F) stimuliert. Diese Faktoren werden von MC und BMSC, nach Induktion durch die MC, gebildet und sezerniert [107]. Gleichzeitig werden Differenzierung und Aktivierung der Osteoblasten durch Osteoblasten-inhibierende Faktoren wie IL-3, IL-7, und DKK-1 gehemmt [108, 109].

Das KM-Mikromilieu fördert somit direkt und indirekt das Wachstum der MC.

1.4 Mantelzell-Lymphom

Das Mantelzell-Lymphom ist eine lymphatische Neoplasie aus der Familie der Non-Hodgkin-Lymphome (NHL). Die Inzidenz beträgt ca. 0,5/100000 Fällen pro Jahr. Das mediane Erkrankungsalter bei Diagnosestellung liegt bei ca. 68 Jahren, Männer sind etwa doppelt so oft betroffen wie Frauen [110].

Typische Manifestationen sind Lymphknotenschwellungen, Hepatosplenomegalie, Befall des Gastrointestinaltraktes, Befall des Knochenmarks und eine leukämische Ausschwemmung [111]. Aufgrund der biologischen Eigenschaften und des klinischen Verlaufs wird die Erkrankung zu den aggressiven Lymphomen gezählt. Die Standardtherapie des MCL besteht aus einer anthrazyklinhaltigen Polychemotherapie in Kombination mit dem monoklonalen Antikörper Rituximab welcher ein bestimmtes Zelloberflächenmolekül des Cluster of Differentiation (CD) erkennt: CD20. Die Einführung der Immuntherapie mit Rituximab hat in den letzten 5 Jahren zu einer deutlichen Verbesserung der Ansprechraten und des Überlebens geführt [112, 113]. Dennoch kann das MCL bei den meisten Patienten nach wie vor nicht kurativ behandelt werden. Die mediane Überlebenszeit nach Diagnosestellung liegt bei ca. 4 Jahren mit weniger als 15% Langzeitüberlebenden [114].

Auch bei Patienten mit MCL konnte in klinischen Studien eine Wirksamkeit von Bortezomib als Mono-Substanz [115, 116] oder in Kombination mit Doxorubicin [117], mit Gesamtansprechraten bis zu 40% [116] gezeigt werden. In einer Phase-II Studie mit Bortezomib bei Patienten mit rezidiviertem/refraktärem MCL wurde bei 141 einbezogenen Patienten eine Ansprechrate (RR) von 33% (8% Vollremission (CR/unbestätigte CR); 26% partielles Ansprechen (PR)) erzielt, was zur Zulassung der Substanz für die Therapie des rezidivierten/refraktären MCL nach konventioneller Therapie führte [118].

1.4.1 Biologie des Mantelzell-Lymphoms

Phänotypisch sind die MCL-Zellen durch die Koexpression der B-Zell assoziierten Antigene CD19 und CD20 sowie des Markers CD5 charakterisiert [119]. Die typischerweise die Lymphomzellen tragen chromosomale Translokation t(11;14)(q13;q32) [120]. Die Translokation führt zu einem Rearrangement im Bereich des Onkogens CCND1 (bcl-1) [121] und zur Überexpression des PRAD-1 Gens, mit Cyclin D1 als Translationsprodukt [122]. In der Gap 1 (G1) - Phase des Zellzyklus assoziiert Cyclin D mit CDKs, um das Retinoblastom-Protein zu phosphorylieren, und die Zelle über den G1-Checkpunkt in die Synthese (S) - Phase zu führen [123]. Cyclin D1 ist hierbei ein essentieller Faktor in proliferierenden Zellen verschiedener epithelialer und mesenchymaler Gewebe, nicht jedoch in gesunden, reifen B-Lymphozyten [124]. Seine konstitutive Überexpression beim MCL führt zur Deregulierung des Zellzyklus-Kontrollpunktes der G1/S-Transition [125]. Die Überexpression führt außerdem zu einer Sequestrierung des CDK-Inhibitors p27 in Cyclin D1/CDK4-Komplexen, wodurch die inhibierende Wirkung des p27 auf den Komplex aus Cyclin E/CDK2 (essentiell für das Eintreten in die S-Phase [26]), und somit den Zellzyklus, effektiv gemindert und die Kontrolle über das Zellwachstum entzogen wird [126].

Sowohl Cyclin D1 [127] als auch die CDKI-Proteine p21 [128] und p27 [41] werden durch das Ubiquitin-Proteasom-System prozessiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die gesteigerte Degradation von p27 als Folge der erhöhten Proteasomaktivität beim MCL mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist [129]. Auch eine konstitutiv erhöhte NF-κB Aktivität konnte in MCL-Zelllinien nachgewiesen werden [39]. Nach Inhibition mit Bortezomib oder dem NF-κB-Inhibitor BAY11 ließ sich in diesen Zellen ein Anstieg des p21 und ein Abbau von Cyclin D1 beobachten [39]. Darüber hinaus konnte mit Proteasominhibitoren wie Bortezomib [39] oder Lactacystin Zellzyklus-Arrest und Apoptose in MCL-Zelllinien induziert werden [130]. Aktuelle Daten zeigen darüber hinaus in vitro und in vivo einen synergistischen Effekt von Bortezomib in Kombination mit Cyclophosphamid und dem Anti-CD20-Antikörper Rituximab beim MCL [131].

1.5 Zielsetzung

Trotz der Fortschritte in der Behandlung des MM und des MCL, sind diese Erkrankungen derzeit bei meisten Patienten nicht heilbar. Die Einführung des Proteasominhibitors Bortezomib stellt eine Bereicherung für die Therapie beider Erkrankungen dar, doch die Dauer des Ansprechens auf eine Therapie mit Bortezomib ist begrenzt. Zusätzlich ergeben sich Limitierungen durch das Toxizitätsprofil der Substanz, insbesondere durch die Neurotoxizität [132]. Daher besteht nach wie vor die Notwendigkeit zur Entwicklung neuerer Proteasominhibitoren mit noch besserer Effektivität und einem günstigeren Toxizitätsprofil.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die in vitro Anti-Tumoraktivität des neuen Tripeptid-Proteasominhibitors BSc2118 beim multiplen Myelom und beim Mantelzell-Lymphom evaluiert werden. Anhand etablierter Zellkulturmodelle sollten die Effekte von BSc2118 auf Zellwachstum und Apoptose sowohl an Myelom, als auch an MCL-Zellen untersucht werden. Nach der Evaluation der Toxizität und Bestimmung der Hemmkonzentrationen an Zelllinien sollte in einem weiteren Schritt eine Testung an primären MC erfolgen, die aus Knochenmarkaspiraten sortiert wurden. Zur Untersuchung der intrazellulären Wirkmechanismen sollten darüber hinaus wichtige molekulare Targets des Proteasoms sowohl beim Myelom als auch beim MCL untersucht werden. Hierbei sind vor allem die Proteasomaktivität, die NF-κB-Aktivität und die Expression Zellzyklus und Apoptose regulierender Proteine, wie p21 und Cyclin D1 von Interesse.

Ziel der Arbeit war es, die antiproliferativen Eigenschaften, sowie einige für die untersuchten Erkrankungen möglicherweise relevante Wirkmechanismen des neuen Proteasominhibitors BSc2118 beim MM und MCL zu charakterisieren.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborgeräte und Zubehör

| Gerät: | Hersteller: |
|--|------------------------------------|
| Blotpapier, extra dick, 20 x 15 cm | Bio-Rad, Hercules, USA |
| Brutschrank, HERACell [®] 240 | Heraeus, Langenselbold |
| Durchflusszytometer, Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Calibur | Becton Dickinson, Rutherford, USA |
| Elektrophorese System, Ready Gel | Bio-Rad, Hercules, USA |
| Feinwaage, HM-300-EC, 0,01 – 310 g | A&D Instruments, Abingdon, GB |
| Geldokumentationseinheit, Gel Jet Imager, Weisslicht und UV-Licht | Intas, Göttingen |
| Lichtmikroskop, Leitz Laborlux S | Leica, Wetzlar |
| Magnetbead-Zellseparationsvorrichtung, Magnetic Cell Sorting (MACS [®]) | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| Mehrkanal-Transferpette [®] -8, 20-200 µl | Eppendorf, Hamburg |
| Mikroliter-Spritze, 50 μl | Hamilton, Bonaduz, CH |
| Mikrotiterplatten-Auswertungssoftware, WinRead | Anthos Mikrosysteme, Krefeld |
| Mikrotiterplatten-Lesegerät, Microplate Reader ht 2 | Anthos Mikrosysteme, Krefeld |
| Mikrotiterplatten-Fluoreszenzlesegerät, Fluorostar | Tecan, Crailsheim |
| Objektträger, geschliffen, 76 x 26 mm | R. Langenbrinck, Teningen |
| Pipetten, Reference, 0,5 μl – 2500 μl | Eppendorf, Hamburg |
| Pipettierhilfe, Multipette [®] Plus | Eppendorf, Hamburg |
| Pipettierhilfe, Pipetboy acu | Integra Biosciences, Fernwald |
| pH-Meter, PH537 Microprocessor | WTW, Weilheim |
| Stromversorgungseinheit, Power Pac 200 | Bio-Rad, Hercules, USA |
| Rotationsschüttler, KS-130 Basic | IKA [®] , Staufen |
| Scientific Imaging Film, BioMax MR, 13 x 18 cm | Kodak, Rochester, USA |

| Semi-dry Blotkammer, Trans-Blot SD | Bio-Rad, Hercules, USA |
|---|-------------------------------------|
| Rotationsschüttler, Thermomixer 4536, temperaturverstellbar | Eppendorf, Hamburg |
| Tischzentrifuge, Biofuge fresco | Heraeus, Langenselbold |
| Tischzentrifuge, Universal 30F | Hettich, Tuttlingen |
| Rotationsrüttler, Vortex REAX Control | Heidolph, Schwabach |
| Wasserbad, Model 1225PC | Unitherm, Würzburg |
| Zellkultur-Laminar-Fluss-Bank, Tecnoflow 3F120-II GS | Integra Biosciences, Fernwald |
| Zell-Zählkammer | Neubauer Feinoptik, Bad Blankenburg |

2.1.2 Biochemikalien, Chemikalien und Enzyme

| Substanz: | Hersteller: | | | |
|---|--|--|--|--|
| Acrylamid-Mischung, Rotiphorese [®] Gel 30 | Carl Roth, Karlsruhe | | | |
| Ammoniumpersulfat (APS) | Sigma-Aldrich, St Louis, USA | | | |
| Annexin V Kit, rekombinant, human | Bender MedSystems, Heidelberg | | | |
| Antikörper (AK): | | | | |
| Kaninchen-anti-Ziege-IgG AK, Horseradish Peroxydase (HRP)- gekoppelt | Dako, Glostrup, DK | | | |
| Monoklonaler (m) AK Maus-anti- humanes Cyclin D1-IgG | Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA | | | |
| Polyklonaler (p) AK Kaninchen-anti- humanes p21-lgG | Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA | | | |
| pAK Ziege-anti humanes β-Aktin-IgG | Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA | | | |
| Rind-anti-Kaninchen-IgG, HRP-gekoppelt | Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA | | | |
| Ziege-anti-Maus-IgG, HRP-gekoppelt | Dako, Glostrup, DK | | | |
| mAK Maus-anti-humanes CD138- Fluoresceinisothiocyanat (FITC) | AbD Serotec, Kidlington, UK | | | |
| mAK Maus-anti-humanes CD38- Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP)- Cyanine 5 (Cy5)-IgG1 | Immunotech, Marseille, F | | | |
| MACS [®] Maus-anti-humanes CD138- Beads | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach | | | |
| Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion V | AppliChem, Darmstadt | | | |
| Bromphenolblau | Sigma-Aldrich, St Louis, USA | | | |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Sigma-Aldrich, St Louis, USA | | | |
| 3-(4,5-Dimethyl <u>t</u> hiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazoliumbromid (MTT Reagenz) | Sigma-Aldrich, St Louis, USA | | | |
| Dithiothreitol (DTT) | Sigma-Aldrich, St Louis, USA | | | |
| Elektrochemiluminszenz-Reagenz ECL ^{+®} , Detektionsreagenz Western Blot | Amersham Biosciences, Piscataway, USA | | | |

| Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz (EDTA) | Sigma-Aldrich, St Louis, USA |
|---|--|
| Ethanol, 96% unvergällt | Dr. K. Hollborn & Söhne, Leipzig |
| Filmentwickler, GBX Developer | Kodak, Rochester, USA |
| Filmfixierer, GBX Fixer | Kodak, Rochester, USA |
| Fetales Kälber-Serum (FKS) | Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA |
| Glycerol | Sigma-Aldrich, St Louis, USA |
| Glycin | Carl Roth, Karlsruhe |
| 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES) | Sigma-Aldrich, St Louis, USA |
| Kaliumchlorid (KCl), per analysis | Merck, Darmstadt |
| Magermilchpulver | Bio-Rad, Hercules, USA |
| 2-Mercaptoethanol | Sigma-Aldrich, St Louis, USA |
| Methanol, per analysis, >99,9% | Merck, Darmstadt |
| Magnesiumchlorid (MgCl ₂ · 6 H ₂ O) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumchlorid (NaCl) | Merck, Darmstadt |
| Natriumhydrogencarbonat (NaOH) | Sigma-Aldrich, St Louis, USA |
| Nonylphenyl-polyethyleneglycol (Nonidet P40; Igepal CA-630) | Sigma-Aldrich, St Louis, USA |
| Phosphat-gepufferte Salzlösung, Phosphate-Buffered Saline (PBS) | PAA Laboratories, Pasching, A |
| Penicillin, 10.000 IE | Biochrom, Berlin |
| Peptid-Substrat, N-Succinyl-Leucin-Leucin- Valin-Tyrosin-7-Amino-4-Methylcumarin (suc-LLVY-AMC) | Bachem, Bubendorf, CH |
| Percoll | Biochrom, Berlin |
| Ponceau S | Sigma-Aldrich, St Louis, USA |
| Propidiumiodid (PI) | Merck, Darmstadt |
| Proteaseninhibitorgemisch Complete [®] | Roche, Basel, CH |
| Proteasominhibitor, BSc2118, 20mM in DMSO gelöst | TU Darmstadt, Institut für Biochemie der Charité |

| | 1 |
|--|--|
| Proteinmengenbestimmungsreagenz, BCA Protein Assay | Pierce Biotechnology, Rockford, USA |
| Proteinmengenbestimmungskit, BCA Protein Assay Kit, Bicinchonsäure, Albumin-Standard (2mg/ml) | Pierce Biotechnology, Rockford, USA |
| PVDF-Membran, Immun-Blot™, 0,2 µm | Bio-Rad, Hercules, USA |
| Referenzproteingemisch zur Molekulargewichtbestimmung, Proteinstandard Precision Plus All Blue, 10-250 kDa Banden | Bio-Rad, Hercules, USA |
| Ribonuklease A (RNase A) | Sigma-Aldrich, St Louis, USA |
| Sodiumdodecylsulfat (SDS) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Salzsäure (HCI), 37% weight/volume (w/v) | Merck, Darmstadt |
| Sperminhydrochlorid | Sigma-Aldrich, St Louis, USA |
| Streptomycin | Biochrom, Berlin |
| Stripping-Puffer, Reblot Plus Strong (10x) | Chemicon International, Temecula, USA |
| Tensid, nichtionisch, Tween [®] 20 | Carl Roth, Karlsruhe |
| N,N,N',N', Tetramethylethylendiamin (TEMED) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Transkriptionsfaktorkit, TransAM™ NF-кВ р65 | Active Motif, Carlsbad, USA |
| Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) | Merck, Darmstadt |
| | |
| Trinatriumcitrat – 2 H ₂ O | Merck, Darmstadt |
| Trinatriumcitrat – 2 H ₂ O Trypanblau | Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, St Louis, USA |
| Trinatriumcitrat – 2 H ₂ O Trypanblau Trypsin/EDTA, in PBS ohne Ca ²⁺ , MG ²⁺ | Merck, Darmstadt Sigma-Aldrich, St Louis, USA Biochrom, Berlin |

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zelllinien

Zur Überprüfung der zytostatischen/zytotoxischen Wirkung des neuen Proteasominhibitors BSc2118 auf MC sowie Mantelzell-Lymphom-Zellen kamen humane Zelllinien zum Einsatz, welche im Labor der Abteilung schon etabliert waren. Außerdem wurden primäre Zellen von Patienten mit aktivem MM verwendet.

Zelllinie OPM-2: Eine Myelomzelllinie welche IgG Lambda-Leichtketten sezerniert. Die Zellen weisen die Translokation t(4;14) (p16.3; q32) auf, welche für die Überexpression des Fusionsproduktes FGF-Rezeptor 3 (FGFR3) verantwortlich ist. Die Zellen exprimieren außerdem die CD-Antigene CD38 und CD138, welche charakteristisch für Plasmazellen (PC) sind [133].

Zellinie U-266: IgE Lambda-Leichtketten und IL-6 sezernierende Myelomzelllinie. Diese Zellen präsentieren die CD-Antigene CD33, CD38 und CD138, sowie das Human Leucocyte Antigene (HLA) - DR auf ihrer Zellmembran [134]. Es findet sich eine Translokation t(1;11)(p33;q13). Außerdem ist die Zellreihe resistent gegen DEX [135].

Zelllinie RPMI-8226: Zelllinie gewonnen aus peripherem Blut eines Myelompatienten. Die Zellen produzieren IgG Lambda-Leichtketten. Die typischen CD-Antigene reifer PC fehlen, CD14 (Monozyten), CD21 (B-Zell Subset) und CD37 (B-Zellen) werden exprimiert [136]. Die Zelllinie weist zudem einen komplex aberranten Karyotyp auf und ist DEX-resistent [135].

<u>Zelllinie HBL-2</u>: Die MCL-Zellreihe HBL-2 weist u.a. die Translokation t(11;14)(q13;32) und zahlreiche Aberrationen auf [137, 138].

<u>Zelllinie JeKo-1:</u> MCL-Zelllinie, deren Zellen charakteristische CD-Antigene eines B-Zell-Klons exprimieren: CD19, CD20, CD37, CD79a sowie HLA-DR. Diese Zellen weisen die Translokation t(11;14)(q13;q32) auf [139].

Zelllinie Granta-519: Leukämisch transformierte Zelllinie eines Mantelzell-Lymphoms, die CD19, CD20, CD37, CD79a, CD80 und CD138 als Oberflächenmarker aufweist und HLA-DR positiv ist. Außerdem weist sie ein Rearrangement auf 9p22 und die Translokation t(11;14)(q13;q32), welche für die typische Cyclin D1-Überexpression verantwortlich ist [140, 141]. Alle Zelllinien außer HBL-2 wurden bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig bezogen. Die HBL-2 wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Dreyling (München) zur Verfügung gestellt.

2.2.1.2 Separation von primären CD138+ Zellen aus Knochenmarkaspiraten von Myelompatienten

Chemikalien und Pufferlösungen:

| Percoll [®] : |
|---|
| Kolloidales Silikat; Dichte: 1,077 g/ml |
| |
| Antikörper: |
| mAK Maus-anti-humanes CD138- FITC |
| mAK Maus-anti-humanes CD38- PerCP-Cy5-lgG1 |
| MACS [®] Maus-anti-humanes CD138-Beads |

Typische CD-Oberflächenmarker von reifen PC sind CD138 und CD38 [142]. CD138 wird auf Plasmazellen exprimiert, und kann daher zur Isolierung von PC und MC aus Knochenmarkaspiraten (im diesem Fall von Myelompatienten) genutzt werden. Es wurden KM-Aspirate von Patienten mit aktivem MM gewonnen. Das Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz (EDTA) - KM-Blut wurde im Verhältnis 2:1 mit PBS verdünnt. Pro 12 ml Polystyren-Röhrchen wurden je 4 ml Percoll (Dichte: 1,077 g/ml) mit je 8 ml des Aspirat-PBS-Gemischs vorsichtig überschichtet. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 300facher Erdbeschleunigung (g) für 30 Minuten (min.). Die MNC-Fraktion, die auch die zu isolierenden CD138+ Knochenmark-PC (Bone Marrow Plasma Cells - BMPC) enthielt, kam durch die Zentrifugation in einer dünnen, weißen Schicht zwischen Plasma und Percoll zu liegen, da die Dichte besonders von Lymphozyten und Monozyten der Dichte von Percoll entspricht. Diese Schicht ließ sich dann mittels Einweg-Pasteurpipette absaugen (siehe Abb. 3).



Abb. 3: Percoll-Dichtegradient eines Knochenmarkaspirates von einem MM-Patienten nach 30 min. Zentrifugation.

Es folgten zwei Waschschritte mit PBS (175 x g, 10 min.) zur Entfernung der vorhandenen Percoll-Rückstände. Es wurde ein Aliquot der Zellsuspension zur Zellzählung entnommen, sowie ein weiteres zur durchflusszytometrischen Bestimmung des prozentualen Anteils der BMPC/MC an den MNC. Zur FACS-basierten Bestimmung des Plasmazell/Myelomzell-Anteils an der MNC-Population wurde eine Oberflächenmarkierung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen die CD-Antigene CD138 und CD38 vorgenommen. 50 µl Zellsuspension wurden mit 5 µl Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugiertem Maus-anti-CD138-Antikörper und 5 µl Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP)-Cyanine 5 (Cy5)-konjugiertem Maus-anti-CD38-Antikörper für 15 min. lichtgeschützt inkubiert. Danach folgte die Messung der Proben am FACS-Gerät, wobei je mindestens 10⁴ Zellen analysiert wurden. Die Auswertung erfolgte mit der Cellquest Pro-Software (Becton Dickinson, Rutherford, NJ, USA). Als PC/MC-Anteil wurde der prozentuale Anteil doppelt positiver Zellen (CD138+/CD38+) an der Gesamtpopulation der MNC gewertet. Zur Isolierung der CD138+ Zellen wurde nach dem zweiten Waschschritt eine immunmagnetische Methode verwendet, bei der die MNC zuerst mit CD138-gekoppelten Magnetbeads (MACS[®] Micro-Beads, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) inkubiert wurden. Hierzu wurde das Pellet aus MNC zu 9 Teilen in PBS (90 x gezählte MNC/5 x $10^6 = \mu I PBS$) und einem Teil Magnetbead-Lösung resuspendiert und bei +4 Grad Celsius (°C) am Rotator für 15 min. gemischt. Ein weiterer Waschschritt mit PBS (175 x g, 10 min.) diente anschließend der Eliminierung überschüssigen Antikörpers. Das Pellet wurde dann in 4 ml PBS resuspendiert und über ein Zellsieb gegeben, um Zellklumpen zurückzuhalten.

Die Zellsuspension wurde nun über eine Magnetseparationssäule gegeben. Die CD138markierten BMPC/MC wurden dabei an die Magnetsäule gebunden. Die restlichen MNC wurden durch Waschen mit PBS eluiert. Anschließend wurde die Säule aus dem Magneten entfernt. Die Eluierung der BMPC/MC erfolgte mit 2 x 2 ml PBS, welche mit einem Stempel aus der Säule in ein Auffanggefäß gedrückt wurden. Aliquots zur Zellzählung/Vitalitätsbestimmung und durchflusszytometrischen Reinheitsermittlung der separierten Zellpopulation wurden entnommen. Zur Bestimmung des PC/MC-Anteils wurde mittels FACS-Analyse der Anteil der CD138+/CD38+ Zellen an den analysierten MNC ermittelt, und in einem zweidimensionalen Punktdiagramm dargestellt. Es wurden nur Präparationen mit einer Reinheit von >90% (mittels FACS) und einer Vitalität von >90% (mittels Trypanblau-Ausschluss, s.u.) für weiterführende Versuche eingesetzt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das PBS entfernt und durch Kulturmedium ersetzt. Die gewünschte Zelldichte wurde eingestellt und die gewonnene Zellsuspension unter anschließend aufgeführten Kulturbedingungen kultiviert.

2.2.1.3 Gewinnung von Lymphozyten-angereicherten MNC aus peripherem Blut

Chemikalien und Pufferlösungen:

PBS

Percoll[®]: Kolloidales Silikat; Dichte: 1,077 g/ml

Zur Durchführung von MTT-Toxizitätsversuchen wurden mononukleäre Zellen von gesunden Spendern benötigt. Aus Inline-Filtern der Blutbank der Charité, welche der Filterung von Vollblut mit dem Zwecke der Rückhaltung von Leukozyten und Thrombozyten dienten, wurden die herausgefilterten Leukozyten mit einer PBS-Lösung wieder ausgeschwemmt. 4 ml Percoll wurden anschließend mit maximal 8 ml der gewonnenen Zellsuspension in 12 ml Polystyren-Röhrchen vorsichtig überschichtet. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 300 x g für 30 min. Ähnlich wie unter **2.2.1.2** beschrieben, kam die MNC-Fraktion durch die Zentrifugation in einer dünnen, weißen Schicht zwischen PBS und Percoll zu liegen, und ließ sich dann mittels Einweg-Pasteurpipette absaugen (siehe auch Abb. 3). Da besonders die Dichte von Lymphozyten und Monozyten der Dichte des Percolls entspricht, handelte es sich somit bei den gewonnenen Zellen um ein Lymphozyten-angereichertes MNC-Präparat. In 2

Waschschritten mit PBS (175 x g, 10 min.) in einer Verdünnung von mindestens 10:1 wurden die Zellen von den unerwünschten Percoll-Rückständen befreit. Nach Zellzählung und Vitalitätsbestimmung wurde das PBS nach dem zweiten Waschen durch Kultur-Medium ersetzt. Auch hier wurden nur Präparationen mit einer Vitalität von >90% (mittels Trypanblau-Ausschluss, s.u.) für weiterführende Versuche eingesetzt.

2.2.1.4 Kultivierung

Die Zellen wurden bei 37 °C, 100% Luftfeuchtigkeit und 5% Kohlendioxid (CO₂) Atmosphäre gezüchtet. Passagiert wurden die Zellen drei Mal wöchentlich, mit Abzentrifugieren des Mediums und Wiedereinstellen der jeweiligen optimalen Zelldichte durch Hinzugabe von neuem Medium. Als einheitliches Basismedium für Myelom- und Mantelzelllymphom-Zelllinien wurde RPMI 1640 mit folgender Zusammensetzung und Zusätzen verwendet:

Chemikalien und Pufferlösungen:

| Kulturmedium (RPMI 1640): | | |
|---------------------------|-----|--------|
| Penicillin | 100 | µg/ml |
| Streptomycin | 50 | µg/ml |
| FKS | 10 | %(v/v) |

Vitalitätstest und Zellzählung

Jeweils vor den Versuchen sowie beim Passagieren wurden die Zellen mittels Trypanblau-Test auf ihre Vitalität geprüft. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit 0,4% (w/v) Trypanblau-Lösung 2:1 verdünnt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Zelldichte sowie der Anteil toter Zellen wurden lichtmikroskopisch bestimmt. Da ausschließlich tote Zellen mit defekter Zellmembran das Trypanblau inkorporieren, konnte anhand des Anteils blau gefärbter Zellen die Vitalität der Kulturen ermittelt werden.

2.2.2 Zellkulturversuche unter Inkubation mit BSc2118

2.2.2.1 Proteasominhibitor BSc2118

Der Proteasominhibitor BSc2118 wurde in Kooperation des Instituts für Biochemie, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte und des Clemens-Schoepf-Instituts für Organische Chemie und Biochemie (TU Darmstadt) synthetisiert [60]. Dabei handelt es sich um ein tripeptidisches Aldehyd welches auf der Basis der bekannten Struktur des Proteasominhibitors MG-132 hergestellt wurde. Die Lagerung der 20 mM-Stocklösung erfolgte bei -80°C in Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel. Unter diesen Bedingungen blieb die Substanz mindestens 6 Monate stabil. Die in Zellsuspensionen eingesetzten Konzentrationen der Substanz rangierten zwischen 0 und 1000 nM. Die DMSO-Konzentration in den Versuchsansätzen war <0,1%, lediglich in der höchsten Zytostatika-Konzentration (1000 nM) beim MTT-Test lag der DMSO-Gehalt bei 0,18%. Das Molekulargewicht des BSc2118 beträgt 534 gmol⁻¹. Besonders die Aldehydgruppe der Substanz ist für dessen Lipophilie verantwortlich, wodurch das Molekül Membranen penetriert, und somit Zellmembranen und auch die Blut-Gehirn-Schranke überwindet.

2.2.2.2 Proliferationshemmung

MTT-Test

Der MTT-Test dient der Messung der metabolischen Aktivität von Zellen, wobei durch Vergleich mit einem Kontrollansatz auf deren Wachstum, Überleben und die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀-Wert) eines bei diesen Zellen eingesetzten Pharmakons, rückgeschlossen werden kann. Gelöste Substanzen können so auf eine proliferationshemmende Wirkung dosisabhängig untersucht werden. Der Test basiert auf der Spaltung des Tetrazoliumrings des wasserlöslichen gelben Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromide MTT). Mitochondriale Dehydrogenasen der Atmungskette vitaler Zellen wandeln das MTT in wasserunlösliches dunkelblaues Formazan um [143], dessen optische Dichte (OD) nach Solubilisierung photometrisch gemessen werden kann.

Chemikalien und Pufferlösungen:

| MTT Reagens: | | Solubilisierungslösung: | |
|--------------|-------|----------------------------|------------|
| MTT | 12 mM | SDS | 10 % (w/v) |
| in PBS | | HCI | 10 mM |
| | | ad Aqua destillata (dest.) | |

Die Tests wurden auf 96-Well Platten durchgeführt, pro Vertiefung wurden 5 x 10⁴ Zellen ausgesät. Wegen geringer Proliferation wurden bei primären MM-Zellen 1 x 10⁵ Zellen pro Well eingesetzt). Das in DMSO gelöste und in Medium verdünnte BSc2118 wurde jeweils als Sechsfachbestimmung in unterschiedlichen Konzentrationen (10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1000 [nM]) hinzu pipettiert. Es wurden eine Nativ- und eine **DMSO-Kontrolle** die mitgeführt, wobei letztere sicherstellte. dass Proliferationshemmung nicht auf das Lösungsmittel, sondern ausschließlich auf den Proteasominhibitor zurückzuführen war. Nach 44 h Inkubation bei beschriebenen Kulturbedingungen, wurden je 10 µl MTT-Reagens dazugegeben; die MTT-Konzentration betrug 0,5 mg/ml (1,2 mM). Gestoppt wurden die Versuche nach insgesamt 48 h durch Hinzugabe von je 100 µl/Well Solubilisierungslösung, wodurch die Zellen lysiert und das gebildete Formazan freigesetzt und gelöst wurden. Nach 12 h wurde die OD in den Wells bei einer Wellenlänge von 550 nm photometrisch bestimmt. Die gemessenen OD-Werte wurden prozentual in Relation zum Kontrollansatz angegeben. Es wurde eine Vitalitätskurve erstellt. Dabei wurden die OD-Werte (in Prozent der Kontrolle, Y-Achse) in Funktion der eingesetzten Konzentration des BSc2118 (X-Achse) aufgetragen. Sowohl Dosis- als auch OD-Werte waren logarithmisiert. Somit folgt die Vitalitätskurve der linearen Regressionsfunktion:

log[y]=log[(1/((100-k)/100))-1]

wobei k den jeweiligen prozentualen OD-Wert relativ zum Kontrollansatz darstellt. Der logarithmische IC_{50} -Wert ist am Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der X-Achse zu finden, denn: Wenn k=50; log[y]=0.

Mit dieser Gleichung wurde dann der jeweilige logarithmische Wert der IC_{50} berechnet, der in der graphischen Funktion den Schnittpunkt der Geraden mit der X-Achse darstellt. Die logarithmische Umkehr aus dem ermittelten Wert ergab dann den IC_{50} -Wert in nM.

2.2.2.3 Apoptoseinduktion

Annexin V-Test

Zur Apoptosemessung wurde ein standardisierter Annexin V-Testkit (Bender MedSystems, Heidelberg) verwendet, welcher die Möglichkeit bietet, apoptototische Zellen durchflußzytometrisch nachzuweisen und zu guantifizieren. Annexin V ist ein phospholipidbindendes kalziumabhängiges Protein, welches im Zytoplasma vorkommt. Annexin V besitzt eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin (PS), welches bei vitalen Zellen an die Innenseite der Plasmamembran angelagert ist. Schon in der frühen Phase der Apoptose wird PS auf die extrazelluläre Seite der Membran verlagert, und besitzt dann prokoagulatorische und proinflammatorische Eigenschaften. Externalisiertes PS kann dann durch FITC gekoppeltes Annexin markiert werden, wodurch frühapoptotische Zellen erkannt werden können [144]. Mit Propidiumiodid (PI), einer Desoxyribonukleinsäure (DNA) - interkalierenden Substanz mit Eigenfluoreszenz, welche nur über Zellmembrandefekte spätapoptotischer oder nekrotischer Zellen in das Zellinnere gelangt, können weitere Zellen in späteren Apoptose-Stadien markiert und unterschieden werden [145]. Durchflußzytometrisch lassen sich die doppelt markierten Zellpopulationen in Untergruppen einteilen: Vitale Zellen (FITC⁻/PI⁻), frühapoptotische Zellen (FITC⁺/PI⁻) sowie spätapoptotische Zellen (FITC⁺/PI⁺).

| Annexin-V Kit Bender MedSystems: | | | Propidiumiodid | 20 | µg/ml |
|----------------------------------|------|---------|-------------------|-----|-------|
| Annexin V-FITC pH 7,4 | 4 | µg/ml | | | |
| TRIS Base | 50 | mM | Bindungspuffer: | | |
| NaCl | 100 | mM | HEPES/NaOH pH 7,4 | 10 | mМ |
| BSA | 1 | % (w/v) | NaCl | 140 | mМ |
| NaN ₃ | 0,02 | % (w/v) | CaCl ₂ | 2,5 | mМ |

Chemikalien und Pufferlösungen:

Frisch passagierte Zellen wurden je als Doppelbestimmungen auf einer 24-Well Platte ausgesät. Pro Well wurden 5 x 10^5 Zellen bei oben genannten Bedingungen kultiviert. Nach 24 h wurde BSc2118 in den zelllinienspezifischen Dosen ½ x IC₅₀, 1 x IC₅₀ und 5 x IC₅₀ hinzugefügt. Nach weiteren 48 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen geerntet und 2 Mal mittels Zentrifugation bei 150 x g für 10 min. mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellpellets in je 195 µl Bindungspuffer resuspendiert und mit 5 µl (100 ng/ml) Annexin V-Lösung und 2,5 mM CaCl₂ für 10 min. lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt (s. o.) wurden die Pellets in 190 μ l Bindungspuffer aufgenommen und mit 10 μ l (1 μ g/ml) PI-Lösung versetzt. Innerhalb von 15 min. wurden die Proben am FACS-Gerät gemessen. Die spezifischen Apoptoseraten wurden wie folgt ermittelt: [(Apoptoserate in behandelten Zellen – Apoptoserate in Kontrolle) / (100 - Apoptoserate in Kontrolle)] x 100.

2.2.2.4 Zellzyklus-Analyse

Als DNA-Marker wurde Propidiumiodid eingesetzt, welches in doppelsträngige Nukleinsäure interkaliert [146]. Die Markierung erfolgte quantitativ in Relation zur vorhandenen DNA-Menge. Letztere schwankt besonders bei proliferierenden Zellen, welche aktiv am Zellzyklus teilnehmen. Das Propidiumiodid wurde durch den Argon-Laser des FACS zur Eigenfluoreszenz angeregt. Anhand der Markierung der DNA dieser Zellen mit PI war eine Quantifizierung der DNA-Menge, und folglich ein Rückschluss auf eine bestimmte Zellzyklus-Phase (G1, S, Gap 2/Mitose (G2/M)) möglich. Die Zellzyklus-Analyse einer Einzelzell-Suspension am FACS-Gerät ermöglicht somit das Erstellen eines Zellzyklus-Profils für eine Zellpopulation zu einem gegebenen Zeitpunkt. Veränderungen dieses Profils durch Behandlung der Zellen mit einer Substanz können erfasst werden. Verschiebt sich hierbei die Gewichtung der Phasen in Richtung einer Phase, wird dies als Arrest bezeichnet, da die Zellen, welche sich vermehrt in dieser Phase befinden, zumindest temporär an der Vollendung des Zyklus behindert sind. Entsprechend kann man eine zytostatische Wirkung einer Substanz nachweisen.

| Ethanol | 96 | % (v/v) | | | |
|---|-----|---------|---|-----|---------|
| Permeabilisierungslösung: | | | <u>Färbepuffer:</u> | | |
| Trinatriumzitrat [·] 2H ₂ O | 3,4 | mМ | Trinatriumzitrat ⁻ 2H ₂ O | 3,4 | mМ |
| Nonidet P40 | 1 | % (v/v) | Nonidet P40 | 1 | % (v/v) |
| Sperminhydrochlorid | 0,5 | mg/ml | Sperminhydrochlorid | 0,5 | mg/ml |
| TRIS Base | 0,5 | mМ | TRIS Base | 0,5 | mМ |
| RNase A | 0,1 | mg/ml | Propidiumiodid | 0,3 | mМ |
| pH auf 7,6 | | | pH auf 7,6 | | |
| ad Aqua dest. | | | ad Aqua dest. | | |

Chemikalien und Pufferlösungen:

Die Zellkulturen wurden mit einer Dichte von 5 x 10^5 Zellen/Well auf 24-Well Platten ausgesät und mit BSc2118, jeweils in der Konzentration ihrer 0,5 x IC₅₀ und 1 x IC₅₀ für 0 h, 24 h und 48 h, inkubiert. Nach dem Ernten wurden die Proben in FACS-Rundboden-Röhrchen überführt, je 2 Mal 10 min. mittels Zentrifugation bei 150 x g mit PBS gewaschen. Die Pellets wurden anschließend in je 500 µl PBS aufgenommen. Anschließend wurden je 1,5 ml eiskaltes reines Ethanol vorsichtig hinzu pipettiert. Die anschließend mit Parafilm versiegelten Röhrchen wurden bei -20 °C gelagert und die Proben mindestens 24 h fixiert.

Vor der Messung wurden die Proben erneut 2 Mal mit PBS gewaschen (Zentrifugation: 150 x g; 10 min.). Dann folgte die Zellpermeabilisierung anhand von je 300 μ l kaltem Zitrat-Puffer für 15 min. bei Raumtemperatur. Die darin enthaltene Ribonuklease (RNase) A zerstörte die in den Zellen vorhandene Ribonukleinsäure (RNA), damit ausschließlich DNA während des Markierungsschrittes angefärbt würde. Danach wurde die DNA mit 300 μ l Färbepuffer (mit PI 10 μ g/ml) für 2 h bei +4 °C im Dunkeln inkubiert.

In der folgenden FACS-Analyse wurden das intrazellulär gebundene Propidiumiodid durch einen monochromatischen Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und anschließend dessen Eigenfluoreszenz gemessen. Diese war wiederum proportional zur intrazellulär vorhandenen DNA-Menge, was einen Rückschluss auf die Zellzyklus-Phase jeder einzelnen Zelle ermöglichte. Die Messergebnisse wurden als Punktdiagramm und als Histogramm der vorhandenen DNA-Menge dargestellt (Software: Cellquest Pro[®] und ModFit-Software[®], Becton Dickinson, Rutherford, NJ, USA). Anhand der Bestimmung der Fläche unter der Kurve (des Histogramms) war dann die anteilmäßige Zuordnung der Zellpopulation zu den jeweiligen Zellzyklus-Phasen möglich.

2.2.3 Nachweis der Expression spezifischer Proteine unter Inhibition mit BSc2118

2.2.3.1 Proteinpräparation

Zur weiterführenden Analyse auf Proteinebene wie Proteasomaktivitätsmessungen, Western Blot-Analysen sowie NF-kB – Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) -Versuche, wurden Proteinextrakte aus den verschieden behandelten Zellen hergestellt.

Chemikalien und Pufferlösungen:

| Lysispuffer (LP): | | |
|--|------|----------------|
| HEPES pH 7,2 | 100 | mM |
| KCI | 100 | mM |
| MgCl ₂ | 2 | mM |
| DTT | 5 | mM |
| Nonidet P40 | 0,1% | (v/v) |
| Complete [®] ; Proteaseninhibitor-Gemisch | 2 | Tabletten/10ml |
| ad Aqua dest. | | (Tabl.) |

Gewinnung von Gesamtzellextrakten

Alle Arbeitsschritte wurden, zum Stoppen intrazellulärer Stoffwechselaktivität, auf Eis bzw. bei +4 °C durchgeführt. Zur Präparation unfraktionierter Extrakte wurden die Zellen nach Asservation zunächst je zweimal in PBS gewaschen (Zentrifugation: 125 x g; 10 min.). Dann wurde dem Zellpellet Lysispuffer (LP) beigemengt und 20 min. inkubiert. Durch das Detergens (Nonidet P40) wurden die Zellmembranen aufgeschlossen, und intrazelluläres Protein freigesetzt. Dithiothreitol (DTT) diente als reduzierendes Agens zur Denaturierung der Proteine durch Aufbrechen von Disulfidbrücken. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (15000 x g; 25 min.), der proteinhaltige Überstand aliquotiert und für weiterführende Versuche bei -80 °C eingefroren.

Die Proteinmengenbestimmung wurde mittels der BCA-Methode durchgeführt. Bei dieser Reaktion werden Kupferionen (Cu^{2+}) im alkalischen Milieu durch Proteine reduziert (zu Cu^{+}) und bilden mit der Bicinchonsäure (Bicinchoninic Acid, BCA) einen Komplex, welcher photometrisch bei 562 nm detektierbar ist [147]. Zur quantitativen Ermittlung diente eine Eichkurve, ermittelt anhand einer Standardreihe aus Lösungen definierter Proteinkonzentrationen (5 bis 500 µg/ml) an Rinderserumalbumin (<u>B</u>ovine <u>S</u>erum <u>A</u>lbumin – BSA; Stocklösung mit 2,0 mg/ml).

Chemikalien und Pufferlösungen:

| Bicinchonsäurelösung(A): | (Pierce) | | Lösung C: | | |
|---|----------|---------|----------------------|----------|---------|
| Na-Karbonat | | k.A. | Lösungen A und B | 50:1 | (v/v) |
| Na-Bikarbonat | | k.A. | | | |
| Na-Tartrat | | k.A. | | | |
| NaOH | 0,1 | М | | | |
| Kupfersulfatlösung (B): | (Pierce) | | BSA-Proteinstandard: | (Pierce) | |
| CuSO ₄ [·] 5 H ₂ O | 4 | % (w/v) | BSA | 2,0 | mg/ml |
| | | | NaCl | 0,9 | % (w/v) |
| | | | NaN ₃ | | k.A. |
| | | | ad Aqua dest. | | |

k.A.: keine Angaben des Herstellers.

Es wurden jeweils 2 μ l Proteinextrakt in einem Verhältnis von 50:1 mit PBS verdünnt. Auf einer 96-Well Platte wurden dann jeweils Dreifachbestimmungen à 30 μ l Proteinprobe durchgeführt. Hierzu wurden die Proben eine Stunde mit je 200 μ l BCA-Reagens-Gemisch bei +37 °C auf dem Rüttler inkubiert. Anschließend wurde am Mikrotiterplatten-Lesegerät die Extinktion photospektrometrisch gegen einen Leerwert mit PBS bei 562 nm Wellenlänge gemessen. Es wurde jeweils eine Standardreihe mit Rinderserumalbuminproben bekannter Proteinmengen (5, 10, 25, 50, 100, 250 und 500 μ g/ml) mitgeführt. Mit diesen Standardproben wurde anhand einer linearen Regression (y=ax+b, wobei hier b=0) eine Eichkurve erstellt. Der Proteinmengengehalt der zu messenden Proben wurde anhand der Eichkurve ermittelt.

2.2.3.2 Proteinnachweis mittels Western Blot-Verfahren

Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der elektrophoretischen Auftrennung und Darstellung der Proteine eines Proteingemisches in einem elektrischen Feld nach deren Molekulargewicht [148]. Das stark negativ geladene SDS lagert sich an die Proteine an, sobald das Proteingemisch bei 95 °C denaturiert wird. Dadurch erhalten die entfalteten Proteine eine negative Ladung, weshalb alle Proteine im elektrischen Feld Richtung Anode wandern. Die Migrationsgeschwindigkeit der Proteine im Gel hängt somit von der angelegten Spannung, der Porengröße des verwendeten Gels und dem Molekulargewicht der Proteine ab. Anhand eines mitgeführten Proteinstandards, dessen Proteinbanden

jeweils Protein bekannten Molekulargewichts entsprechen, ist zudem eine Bestimmung des Molekulargewichtes der aufgetrennten Proteine möglich.

| Acrylamidlösung (30%) | | | TEMED | 99 | % (v/v) |
|--------------------------------|-----|---------|-----------------------------|--------|---------|
| Acrylamid | 30 | % (w/v) | | | |
| Bisacrylamid | 0,8 | % (w/v) | SDS-Probenpuffer (Laemmli): | | |
| | | | TRIS-HCI; pH 6,8 | 125 | mМ |
| <u>1,5 M TRIS-HCI, pH 8,8:</u> | | | SDS | 1 | % (w/v) |
| TRIS Base | 1,5 | Μ | Glycerin | 5 | % (v/v) |
| pH mit HCl auf 8,8 | | | β-Mercaptoethanol | 2,5 | % (v/v) |
| ad Aqua dest. | | | Bromphenolblau | 0,0005 | % (w/v) |
| <u>0,5 M TRIS-HCI, pH 6,8:</u> | | | Precision Plus All Blue; | | |
| TRIS Base | 0,5 | Μ | Proteinstandard 10-250 kDa | | |
| pH mit HCl auf 6,8 | | | | | |
| ad Aqua dest. | | | Elektrophoresepuffer: | | |
| | | | TRIS Base 125 mM | 25 | mМ |
| <u>10% SDS:</u> | 10 | % (w/v) | Glycin 960 mM | 192 | mМ |
| ad Aqua dest. | | | SDS 4mM | 0,1 | % (w/v) |
| | | | pH auf 8,3 | | |
| 2x SDS: | | | ad Aqua dest. | | |
| 0,5 M Tris-HCI, 250mM | 1 | % (v/v) | | | |
| SDS | 4 | % (w/v) | <u>10% APS:</u> | 10 | % (w/v) |
| Glycerol | 10 | % (v/v) | ad Aqua dest. | | |
| ad Aqua dest. | | | | | |

Chemikalien und Pufferlösungen:

Die einzusetzenden Gele wurden je zwischen zwei Glasplatten gegossen und hatten eine einheitliche Dicke von 1 mm. Die homogenen Trenngele hatten einen Acrylamidanteil von 12%. Die Acrylamidkonzentration der Sammelgele betrug 4%. Tabelle 2 zeigt die Zusammensetzungen der Gellösungen.

| | Sammelgele | Trenngele | | |
|------------------------|------------|-----------|--|--|
| Acrylamidanteil [%] | 4 | 12 | | |
| | | | | |
| Puffer [ml]: | | | | |
| Acrylamidlösung (30%) | 1,35 | 6 | | |
| 1,5 M TRIS-HCI, pH 8,8 | - | 3,8 | | |
| 0,5 M TRIS-HCI, pH 6,8 | 2,5 | - | | |
| Aqua dest. | 6 | 5 | | |
| 10% SDS | 0,1 | 0,15 | | |
| | | | | |
| Polymerisation [µl]: | | | | |
| 10% APS | 100 | 150 | | |
| TEMED | 10 | 6 | | |

Tab. 1: Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gellösungen

Zuerst wurde die Lösung für das Trenngel angesetzt; nach Hinzugabe von Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED) welche die Polymerisation katalysieren, wurde die Gellösung zügig in die Glaskammer gegossen. Nach etwa 30 min. Inkubation bei Raumtemperatur war die Polymerisation abgeschlossen. Ein 1 mm dicker Plastikkamm wurde zur Erstellung der Probentaschen in das Sammelgel eingelassen. Die zur elektrophoretischen Trennung eingesetzten Gesamtzellsolubilisate wurden unter Verwendung des Lysispuffers aus je 5 x 10^6 Zellen pro Probe gewonnen (Details siehe Abschnitt **2.2.3.1 Proteinpräparation**). Die Proben wurden zum Absetzen etwaiger verbliebener Zelltrümmer vor Weiterverarbeitung abzentrifugiert (+4 °C; 15000 x g; 5 min.), in Laemmli-Probenpuffer und SDS-Lösung gelöst, und auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt. Dann wurden die Proteinproben 5 min. auf dem Rüttler bei +95 °C denaturiert, erneut zentrifugiert und bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis gelagert.

Die Proteinproben und der Proteinstandard wurden mittels Mikroliterspritze in die Probentaschen überführt. Nach Anlegen der Stromversorgung erfolgte die Elektrophorese bei 100 V, 35 mA, 300 W und konstanter Spannung. Die Auftrennung wurde gestoppt wenn die durch das Bromphenolblau gefärbte Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte, was nach ca. 100-120 min. erfolgte.

Proteintransfer mittels Western Blot-Verfahren

Für den weiteren Versuchsablauf wurden die in der Elektrophorese aufgetrennten Proteine per Elektrotransfer aus dem Acrylamidgel auf eine Polyvinyliden Difluorid (PVDF) - Membran nach dem Prinzip des "semi-dry" Western Blot-Verfahrens transferiert.

Chemikalien und Pufferlösungen:

| 10x Transferpuffer: | | | 1x Transferpuffer: | | |
|---------------------|------|---------|--------------------|----|---------|
| TRIS Base | 250 | mM | 10x Transferpuffer | 10 | % (v/v) |
| Glycin | 1920 | mМ | Methanol | 20 | % (v/v) |
| ad Aqua dest. | | | ad Aqua dest. | | |
| | | | | | |
| Ponceau S Lösung: | | | | | |
| Ponceau S | 0,1 | % (w/v) | | | |
| Essigsäure | 5 | % (v/v) | | | |

PVDF-Membranen wurden auf Gelgröße zugeschnitten und ca. 30 sec. in Methanol aktiviert. Anschließend wurden diese dann mit dem ebenfalls zugeschnittenen Western Blot-Filterpapier (BIO-RAD) in Transferpuffer getränkt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Sammelgel vom Trenngel gelöst und letzteres für 1-2 min. in Transferpuffer equilibriert. Filterpapier, Gel und PVDF-Membran wurden dann wie folgt auf der Anode der Apparatur übereinander geschichtet:

Kathode (–)

Filterpapier SDS-Polyacrylamidgel PVDF-Membran Filterpapier Anode (+)
Nach 50-60 min. bei 50 mA/cm² wurde der Transfer gestoppt und die Membranen wie unten beschrieben weiterbehandelt. Optimale Transferbedingungen bezüglich Strom und Lauftest wurden in getrennten Versuchsreihen für das jeweilige Protein ermittelt.

Zur Überprüfung des Transfers vom Gel auf die PVDF-Membran wurden mittels reversibler Ponceau S-Färbung die Proteinbanden sichtbar gemacht [149]. Hierzu wurden die Membranen in die Färbelösung gelegt und anschließend in destilliertem Wasser gewaschen. Die rot gefärbten Proteinbanden wurden so sichtbar. Die Färbung der Banden wurde durch Auswaschen mit Aqua dest. wieder rückgängig gemacht.

Auf PVDF-Membran transferierte Proteine können spezifisch mittels indirekter Immunmarkierung durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

| PBS-T: | | | Zweitantikörperlösungen: | | |
|--------------------------|------|---------|--|------|----------|
| TWEEN [®] 20 | 0,05 | % (v/v) | PBS-T | 90 | % (v/v) |
| ad PBS | | | Absättigungslösung | 10 | % (v/v) |
| | | | Zweitantikörper | 1: | 1500 |
| Absättigungslösung: | | | | | |
| TRIS pH 8,0 | 10 | mМ | <u>ECL^{+®}:</u> (A:B; 40:1) <u>Chemolumin</u> | esze | enz-Lsg: |
| NaCl | 150 | mМ | Lösung A | 2 | ml |
| Tween [®] 20 | 0,1 | % (v/v) | Lösung B | 50 | μl |
| Nonidet P40 | 0,5 | % (v/v) | | | |
| BSA (Albumin Fraktion V) | 0,5 | % (w/v) | Entwicklerlösung | | |
| Magermilchpulver | 2,5 | % (w/v) | GBX Entwickler | 103 | ml |
| | | | Aqua dest. | 370 | ml |
| Erstantikörperlösungen: | | | | | |
| PBS-T | 90 | % (v/v) | <u>Fixiererlösung</u> | | |
| Absättigungslösung | 10 | % (v/v) | GBX Fixierer | 103 | ml |
| Erstantikörper | 1: | 1000 | ad Aqua dest. | 370 | ml |

Chemikalien und Pufferlösungen:

Im Anschluss an die Ponceau S-Färbung wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur in der Absättigungslösung auf dem Schüttler behandelt, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Es folgte die Inkubation bei +4 °C über Nacht in der Erstantikörperlösung. Nach 12 h wurde die Membran 4 x 10 min. in PBS-Tween (PBS-T) bei Raumtemperatur auf dem Rüttler gewaschen. Es folgte die Inkubation mit der zugehörigen Zweitantikörperlösung für 1 h. Wieder wurde die Membran mit PBS-T gewaschen (4 x 10 min.), um nicht gebundene Antikörper zu eliminieren. Elektrochemiluminszenz Plus

(ECL⁺) - Lösung wurde dann auf die Membran geträufelt, 1 min. inkubiert, wieder entfernt und die Membran in die Photokassette eingebracht. Die an den Zweitantikörper gekoppelte Horseradish-Peroxydase (HRP) baute in Anwesenheit von Peroxid das Substrat Lumigen PS-3 Acridan in einer Enzymreaktion zu dem Licht emittierenden Acridiniumester ab. Hierzu wurde der Film 2 min. in Entwicklerlösung getaucht, anschließend kurz in einem Wasserbad gewaschen, weitere 2min. in der Fixiererlösung behandelt und nach Waschung getrocknet.

2.2.3.3 Semi-quantitative NF-kB Transkriptionsfaktor-Mengenbestimmung

Zur Detektion des in MC und in Mantelzell-Lymphomzellen überexprimierten, antiapoptotisch wirkenden Transkriptionsfaktors NF-κB wurde ein kommerziell erhältlicher, Sandwich-ELISA basierter Test eingesetzt, der mittels eines monoklonalen Antikörpers die NF-κB-Untereinheit p65 (relA) detektiert.

| <u>TransAM NF-кВ Kit[®]:</u> | | | Waschpuffer AM2 | | k.A. |
|---------------------------------------|------|---------|-------------------------------|------|-------|
| Complete Lysispuffer: | | k.A. | | | |
| DTT | 5 | mМ | Antikörper-Bindungspuffer AM2 | | k.A. |
| Proteaseninhibitorgemisch | 1 | % (v/v) | | | |
| Lysispuffer AM2 | ad 1 | ml | NF-kB p65 Erstantikörper | 0,8 | µg/µl |
| Complete Bindungspuffer: | | k.A. | HRP-IgG Zweitantikörper | 0,25 | µg/µl |
| DTT | 2 | mМ | | | |
| Heringsperma DNA (1µg/µl) | 1 | % (v/v) | Entwicklungslösung | | k.A. |
| Bindungspuffer AM3 | ad 1 | ml | | | |
| | | | Stopplösung | | k.A. |
| Positivkontrolle: | | | | | |
| Jurkat Nuklearextrakt | 2,5 | µg/µl | | | |

Chemikalien und Pufferlösungen:

k.A.: keine Angaben des Herstellers.

Es wurden je 5 x 10^6 Zellen/Probe eingesetzt. Die ausgesäten Zellen wurden 1 h mit BSc2118 in Konzentrationen von 1 - 10^4 nM behandelt und direkt im Anschluß mit 5 ng/ml Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) für 15 min. inkubiert. TNF α triggert den proteasomabhängigen Abbau des I- κ B, wodurch NF- κ B freigesetzt und detektierbar wird. Die Arbeitsschritte zur Herstellung von Gesamtzellextrakten erfolgten auf Eis bzw. bei +4 °C (siehe **2.2.3.1 Proteinpräparation**).

Die auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellten Gesamtzellextrakte wurden 1 h bei 37 °C auf der zum Kit mitgelieferten Mikrotiterplatte inkubiert. In den Zellextrakten enthaltenes p65 (relA) NF-kB bindet dabei an eine Oligonukleotidsequenz (5'-GGGACTTTCC-3'), welche auf der 96-Well Platte immobilisiert ist. Dann folgte ein dreifacher Waschschritt mit jeweils 200 µl Waschpuffer/Well und anschließendem Entleeren der Wells). Es folgt die spezifische immunologische Markierung per NF-kB-Erstantikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Waschschritt folgte die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten Zweitantikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Nach erneuter Waschung wurden je 100µl/Well der Entwicklungslösung pipettiert und 2-10 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln in verscheidenen Zeitintervallen inkubiert, bis es zu einer deutlichen Farbreaktion durch Verstoffwechselung des Substrates durch die Peroxidase kam. Die OD des Produktes wurde anschließend bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenz 655 nm) photometrisch bestimmt, und war proportional zur gebundenen Menge NF-KB. Das mitgelieferte Jurkat Nuklearextrakt diente als Positivkontrolle. Die Menge an NF-KB wurde relativ zur Jurkat-Kontrolle in Prozent ausgedrückt. Sowohl die zelluläre Stressreaktion auf die Behandlung mit TNFa und reaktivem Anstieg des aktivierten NF-kB, als auch die eigentlichen Auswirkungen der Proteasominhibition auf die NF-kB Aktivität konnten so gualitativ erfasst werden.

2.2.3.4 Bestimmung der Proteasomaktivität

Der Nachweis einer spezifischen Hemmung der zellulären Proteasomaktivität in vitro erfolgte anhand einer fluoreszenzbasierten Bestimmung eines peptidgebundenen, proteasomspezifischen Substrats, welches nach proteasomaler Abspaltung von seiner Trägersubstanz eine detektierbare Eigenfluoreszenz besitzt. Es wurden Zellextrakte mit BSc2118 behandelter Zellen mit dem Peptid-Substrat N-Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-7-Amino-4-Methylkumarin (suc-LLVY-AMC), welches durch die β_5 -Untereinheit des Proteasoms degradiert wird, inkubiert. Die chymotrypsinähnliche Proteaseaktivität verursacht die Abspaltung des Fluorochroms AMC von dem Trägerpeptid. Die jeweils ermittelte Fluoreszenz war somit ein direkt-proportionales Maß für die chymotrypsinähnliche Proteasomaktivität der getesteten Zellen. Die Inhibition der β₅-Proteasomaktivität durch BSc2118 war demnach umgekehrt proportional zur ermittelten Fluoreszenz.

Chemikalien und Pufferlösungen:

| Assay-Puffer: | | | Lysispuffer: | |
|------------------------|-----|----|------------------------------------|------------|
| TRIS-HCI pH 7,2 | 50 | mМ | HEPES pH 7,2 100 | mМ |
| DTT | 1 | mМ | KCI 100 | mМ |
| EDTA | 0,5 | mМ | MgCl ₂ 2 | mМ |
| ad Aqua dest. | | | DTT 5 | mМ |
| | | | Nonidet P40 0,1% | (v/v) |
| Peptidsubstrat-Lösung: | | | Complete [®] Proteasen- 2 | Tabl./10ml |
| Suc-LLVY-AMC | 100 | μM | inhibitorgemisch | |
| ad Assay-Puffer | | | | |

Es wurden 2,5 x 10⁶ Zellen pro Ansatz verwendet. Die Aussaat erfolgte auf 6-Well Platten, die über 12 h im Brutschrank kultiviert wurden. Anschließend wurde 1 h mit BSc2118 behandelt (0, DMSO, 50, 100, 500, 1000 [nM]). Für den weiteren Versuchsverlauf wurden anschließend aus den Zellen Gesamtzellextrakte gewonnen. Die gewaschenen Zellen wurden 20 min. mit Lysispuffer inkubiert (Details siehe Abschnitt **1.2.3.1 Proteinpräparation**). Von den gewonnenen Zellextrakten wurden jeweils Aliquots zur Proteinmengenbestimmung entnommen.

Die Ermittlung Proteasomaktivität der Gesamtzellextrakte der erfolgte als Doppelbestimmung mit je 5 µl Zellextrakt pro Well auf 96-Well Mikrotiterplatten mit schwarzem Flachboden. Nach 30 min. Inkubation bei +37 °C mit 100 µl/Well Peptidsubstratlösung wurde die Fluoreszenz am Mikrotiterplatten-Fluoreszenzlesegerät gemessen. Die Wellenlänge zur Anregung betrug 360 nm. Die Eigenfluoreszenz des AMC wurde bei 460 nm Wellenlänge gemessen. Die Abnahme der Fluoreszenz in Funktion des Anstiegs der applizierten Dosis wurde prozentual in Relation zum Fluoreszenzwert des jeweils mitgeführten unbehandelten Kontrollansatzes einer jeden Zellreihe ausgedrückt. Die gemessenen Werte wurden anhand der jeweils zuvor ermittelten Proteinkonzentrationen der Proben auf die jeweilige Gesamtproteinkonzentration der Proben bezogen.

2.2.4 Ergebnisdarstellung

Die im folgenden Kapitel dargestellten Ergebnisse sind größtenteils mathematisch ermittelte arithmetische Mittelwerte, welche aus mindestens n=2 Versuchsansätzen (Ergebnis und Bestätigung des Ergebnisses) generiert wurden. Der entstandene Fehler ist in Form der Standardabweichung s_x wiedergegeben. Die Formel zur Berechnung der Standardabweichung lautet:

$$s_x = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2}$$

mit n dem Stichprobenumfang, x_i den Merkmalsausprägungen am i-ten Element der Stichprobe und \bar{x} dem arithmetischen Mittel der Stichprobe. Diese Darstellungsart trifft auf die Proliferationsversuche, die Apoptoseversuche, die NF- κ B Transkriptionsfaktor-Mengenbestimmungen und die Proteasomaktivitätsversuche zu.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis von CD138+/CD38+ Zellen

Der immunologische Nachweis des Anteils Knochenmark-Plasmazellen von (BMPC)/MC an isolierten humanen mononukleären Knochenmarkzellen (MNC) gelang anhand von FACS-Analysen. Diese Bestimmung war insofern wichtig, da sie eine Aussage sowohl über den prozentualen Infiltrationsgrad des Knochenmarks durch MC erlaubte, als auch, in Verbindung mit der Gesamtzellzahl der Probe, Auskunft über die erwartungsgemäß zu isolierende PC/MC-Zahl gab. Diese Zellen dienten dann der Bestätigung von an Zelllinien vorgenommenen Versuchen. Die vor der FACS-Messung mit den plasmazell-spezifischen fluoreszenzmarkierten CD138- und CD38-Antikörpern inkubierten MNC fanden sich je nach ihrer Antigenität in einem der vier Quadranten des Punktdiagrammes wieder. Da CD38 nicht ausschließlich auf Plasmazellen, sondern auch auf Monozyten exprimiert wird, befanden sich im oberen linken Quadranten viele Zellen. Die gesuchten doppelt positiven BMPC/MC erschienen im rechten oberen Quadranten. Die Abb. 4 zeigt das Punktdiagramm einer FACS-Messung einer solchen Leukozyten-Suspension. Jeder Punkt entspricht einer Zelle.



Abb. 4: Quantifizierung CD138/CD38 positiver Zellen in einer Probe aus MNC eines MM-Patienten vor immunmagnetischer Separation.

Nach der Separation erfolgte die Bestimmung der Reinheit der gewonnen PC/MC-Population am Durchflusszytometer. Da die Separation zu einer Trennung der PC/MC von den restlichen MNC diente, musste dies jeweils noch überprüft werden. Bei einer ausreichend reinen Population resuspendierter PC/MC erschienen somit fast ausschließlich Zellen im oberen rechten Quadranten des Punktdiagrammes. Im Durchschnitt hatten die zu Versuchen verwendeten Populationen einen PC/MC-Anteil von 93%. Ein entsprechendes Diagramm ist in Abbildung 5 zu sehen.



Abb. 5: Ermittlung des Reinheitsgrades der CD138/CD38 positiven Zellpopulation nach immunmagnetischer Separation aus Knochenmark-MNC von MM-Patienten.

3.2 Zellkultur

Unter den im Methodenteil beschriebenen Zellkulturbedingungen proliferierten die Zellkulturen mit Verdopplungszeiten von ca. 24-48 h. Die Zelllinien OPM-2 und U-266 hatten eine Verdoppelungszeit von 2 Tagen, in denen die Zelldichte der Suspensionen um 0,5 x 10^6 Zellen/ml anstieg. RPMI-8226 proliferierte etwas langsamer, und brauchte 3-4 Tage um eine Verdopplung der Zellzahl zu erreichen. Die Proliferationsrate der MCL-Zelllinien lag insgesamt höher, nach 2 Tagen wurde eine Verdreifachung der Zelldichte von ursprünglich 0,5 x 10^6 Zellen/ml auf 1,5 x 10^6 Zellen/ml erreicht. Die Vitalitätsraten der Zelllinien lagen jeweils oberhalb der erforderlichen 90%. U-266 und

RPMI-8226 wiesen meist Raten von knapp über 90% Vitalität auf. Die Kulturen der Mantelzelllinien erreichten im Schnitt 96% Vitalität. OPM-2 erreichte mit 96%-99% die höchste durchschnittliche Vitalität.

3.3 **Proliferationshemmung**

Bei den MM-Zellen zeigte sich, dass alle drei Zellreihen dosisabhängig auf das BSc2118 ansprachen. Bei OPM-2 und U-266 war ab einer Dosis von 50 nM eine signifikante Abnahme der Viabilität zu verzeichnen. Der Kurvenverlauf der Viabilität der Zelllinie OPM-2 verlief im sigmoidalen Teil steiler als bei U-266. Der IC₅₀-Wert des BSc2118 nach 48 h lag bei OPM-2 mit 52 nM niedriger als bei U-266 mit 65 nM. Beide lagen jedoch im niedrigen nanomolaren Bereich. Die Plateau-Phase im Anschluß an den sigmoidalen Teil der Kurve war bei beiden Zelllinien vergleichbar. Die Zellreihe RPMI-8226 war deutlich weniger sensitiv. Erst bei einer Dosis von 250 nM trat ein deutlicher Effekt des BSc2118 auf. Der IC₅₀-Wert des BSc2118 lag bei der Zellreihe RPMI-8226 nach 48h mit 287 nM im mittleren nanomolaren Bereich. Die Ergebnisse der Proliferationstests bei den MM-Zellreihen nach 48h Inkubation mit BSc2118 sind in der Abbildung 6 dargestellt.

Die Ergebnisse der Proliferationsversuche wurden bei den MM-Zelllinien durch Versuche an separierten BMPC/MC von Myelom-Patienten bestätigt. Diese primären Zellen stammten von drei Patienten:

- Bei **Patient 1** (Zustand nach Therapie mit Adriamycin/DEX). Bei den MC wurden keine chromosomalen Aberrationen festgestellt, die als besondere Risikofaktoren gelten.
- Bei den MC des **Patienten 2** (Erstdiagnose, keine Therapie vor Knochenmarkpunktion) wurde eine t(4;14) gefunden.
- Der Karyotyp der Plasmazellen des **Patienten 3** (Erstdiagnose, keine Therapie vor Knochenmarkpunktion) beinhaltete die Aberrationen t(4;14) und del(13).

Alle getesteten primären Zellkulturen wiesen ein dosisabhängiges Ansprechen auf das BSc2118 auf. Ab 250 nM zeigte sich bei allen primären Kulturen ein Viabilitätsverlust. Das Ansprechen der jeweiligen Zellkulturen war jedoch unterschiedlich. Die Zellen des **Patienten 1** waren am sensitivsten, ihr IC_{50} -Wert für BSc2118 lag bei 264 nM. Die Zellen des **Patienten 2** waren etwas weniger sensitiv mit einem IC_{50} -Wert von 282 nM. Bei den Zellen des **Patienten 3** lag der IC_{50} -Wert des BSc2118 mit 370 nM höher als bei den Zellen des **Patienten 2**. Die durchschnittliche IC_{50} für alle drei Patienten betrug 305 nM. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 7 dargestellt.



Abb. 6: MTT-Test. Dosisabhängige Wachstumshemmung durch den Proteasominhibitor BSc2118. Inkubationszeit 48 h. Getestete MM-Zelllinien: OPM-2, U-266 und RPMI-8226.



Abb. 7: MTT-Test. Dosisabhängige Wachstumshemmung durch den Proteasominhibitor BSc2118. Inkubationszeit 48 h. Getestete Zellen: Primäre MM-Zellen der Patienten 1, 2 und 3.



Abb. 8: MTT-Test. Dosisabhängige Wachstumshemmung durch den Proteasominhibitor BSc2118. Inkubationszeit 48 h. Getestete Mantelzelllymphom-Zelllinien: JeKo-1, HBL-2 und Granta-519.

Ebenso wie die Myelomzelllinien wiesen alle Mantelzelllinien ein dosisabhängiges Ansprechen auf das BSc2118 auf. Die Sensitivität gegenüber dem BSc2118 war bei der Zellreihe HBL-2 am ausgeprägtesten. Die IC₅₀ des BSc2118 betrug hier nach 48h 82 nM. Die Zellreihe JeKo-1 war mit einem IC₅₀-Wert von 130 nM nach 48h etwas weniger sensitiv. Granta-519 war mit einer IC₅₀ von 262 nM die Zellreihe mit dem schwächsten Ansprechen auf BSc2118. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt.



Abb. 9: MTT-Test. Dosisabhängige Wachstumshemmung durch den Proteasominhibitor BSc2118. Inkubationszeit 48 h. Getestete Zellen: Lymphozyten gesunder Spender.

In den MTT-Toxizitätsversuchen mit humanen Lymphozyten gesunder Spender konnte gezeigt werden, dass gesunde Lymphozyten im Vergleich zu den transformierten Zellkulturen eine deutlich verminderte Sensitivität für BSc2118 aufweisen. Die Viabilität der Lymphozytenkulturen lag bei der maximal applizierten Dosis von 1000 nM im Durchschnitt noch bei 83%. Bei allen Toxizitätsversuchen lag somit die halbletale Dosis des BSc2118 deutlich über 1000 nM. Auch bei diesen primären Zellen gesunder Spender zeigte sich eine dosisabhängige Minderung der Viabilität. Die Ergebnisse sind in Abbildung 9 dargestellt. Alle berechneten IC_{50} -Werte sind außerdem in der Tabelle 3 dargestellt.

3.4 Apoptoseinduktion

Bei den MM-Zellreihen konnte gezeigt werden, dass das BSc2118 apoptotisch auf die transformierten Zellen wirkt, und dieser Effekt dosisabhängig ist. Nach 48 h Inkubation der Zellen mit BSc2118 lagen die spezifischen Apoptoseraten der Myelom-Zellkulturen bei der jeweiligen zelllinienspezifisch niedrigsten Dosis bei 1% (U-266, 33 nM), 5,5% (OPM-2, 26 nM) und 9,5% (RPMI-8226, 144 nM). Bei der jeweils applizierten IC₅₀ waren die Apoptoseraten der Zelllinien OPM-2 (52 nM) und U-26 (65 nM) mit jeweils 30% und

29,5% vergleichbar. Die Apoptose-Rate lag bei RPMI-8226 (288 nM) mit 63% signifikant höher. Bei der jeweiligen fünffachen IC_{50} erreichten alle drei Zelllinien vergleichbare Apoptoseraten mit 71% (OPM-2, 260 nM), 76% (U-266, 325 nM) und 75% (RPMI-8226, 1435 nM). Die Ergebnisse sind in der Abbildung 10 dargestellt.



Abb. 10: Annexin V-Test, durchflußzytometrische Bestimmung. Dosisabhängige spezifische Apoptoseraten nach 48 h Inkubation mit BSc2118 bei den MM-Zelllinien OPM-2, U-266 und RPMI-8226.

Die Annexin V-Versuche an den MM-Zellreihen wurden anschließend ebenfalls durch Versuche an primären CD138+ MC aus Patientenmaterial überprüft. Die verwendeten Zellen stammten von denselben Patienten, deren Zellen für die MTT-Tests eingesetzt wurden (**Patient 1** ohne bekannte chromosomale Aberrationen und **Patient 2** mit einer bekannten Translokation t(4;14)). Bei einer Dosis von 50 nM war die spezifische Apoptoserate bei beiden Zellkulturen mit 2% identisch. Wurden 100 nM BSc2118 verabreicht, so betrugen die jeweiligen Apoptoseraten 10% (**Patient 1**) und 15% (**Patient 2**). Die höchste applizierte Dosis von 500 nM führte bei den Zellen des **Patienten 1** zu einer Apoptoserate von 89%, und bei denen des **Patienten 2** zu einer Apoptoserate von 82%. Auch bei diesen primären Zellen wurde eine Dosisabhängigkeit des Effekts gezeigt. BSc2118 wirkte, wie auch schon bei den MTT-Tests, bei den Zellen beider Patienten in vergleichbarem Maße proapoptotisch. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt.



Abb. 11: Annexin V-Test, durchflußzytometrische Bestimmung. Dosisabhängige spezifische Apoptoseraten nach 48 h Inkubation mit BSc2118 bei den primären MC der Patienten 1 und 2. Da für die primären Zellen keine IC₅₀-Werte vorlagen, wurden die Dosen 50 nM, 100 nM und 500 nM eingesetzt.

Ebenso wie bei den MM-Zellen. konnte bei den Mantelzellreihen eine Dosisabhängigkeit der Apoptose-Induktion festgestellt werden. Bei den Mantelzell-Lymphomzelllinien hatte BSc2118 bei HBL-2 die stärkste proapoptotische Wirkung. Die niedrigste angewandte Dosis (halbe IC₅₀) verursachte eine spezifische Apoptoserate von 15,5% (HBL-2, 41 nM). Bei der IC₅₀ (82 nM) lag die spezifische Apoptoserate bei 95,5%, bei der fünffachen IC₅₀ (410 nM) bei 97%. JeKo-1 wies bei 65 nM eine Apoptoserate von 5,5% auf. Bei der einfachen IC₅₀ (130 nM) waren 41,5% der Zellen apoptotisch, und bei der fünffachen IC₅₀ (650 nM) waren es 98%. Bei der Zelllinie Granta-519 waren jeweils 8,5% (131 nM), 55,5% (IC₅₀, 262 nM) und 81,5% (fünffache IC₅₀, 1310 nM) der Zellen apoptotisch. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 12 dargestellt.



Abb. 12: Annexin V-Test, durchflußzytometrische Bestimmung. Dosis-abhängige spezifische Apoptoseraten nach 48 h Inkubation mit BSc2118 bei den MCL-Zelllinien JeKo-1, HBL-2 und Granta-519.

Zusätzlich zu den IC_{50} -Werten finden sich in der Tabelle 3, ergänzend zu den Abbildungen, auch die Apoptoseraten.

| | Wachstumshemmung (MTT-Test) IC ₅₀ [nM] | A (Ann | poptoserat exin V-Vers [%] | e such) |
|--------------------------|---|------------|----------------------------------|------------|
| Zelllinien: | BSc2118: | 0,5 * IC50 | 1 * IC50 | 5 * IC50 |
| OPM-2 | 52 | 5,5 | 30 | 71 |
| U-266 | 65 | 1 | 29,5 | 76 |
| RPMI-8226 | 287 | 9,5 | 63 | 75 |
| JeKo-1 | 130 | 5,5 | 41,5 | 98 |
| HBL-2 | 82 | 15,5 | 95,5 | 97 |
| Granta-519 | 262 | 8,5 | 55,5 | 81,5 |
| Primäre Myelomzellen: | | | | |
| Patient 1 | 264 | 2 | 10 | 89 |
| Patient 2 | 282 | 2 | 15 | 82 |
| Patient 3 | 370 | - | - | - |
| Lymphozyten (buffy coat) | >>1000 | - | - | - |

3.5 Zellzyklus-Analysen

In allen MM- und MCL-Zelllinien konnte ein dosisabhängiger Arrest in der G2/M-Phase durch Behandlung mit BSc2118 nachgewiesen werden. Der proliferationshemmende Effekt des BSc2118 war bei der MM-Zelllinie OPM-2 am stärksten ausgeprägt. Nach 24 h Exposition mit der IC₅₀ des BSc2118 (52 nM) betrug der G2/M-Zuwachs bei OPM-2 36%. RPMI-8226 wies in diesen Versuchen einen durchschnittlichen G2/M-Zuwachs von 29% auf. Bei U-266 war der G2/M-Zuwachs mit 10% im Durchschnitt am schwächsten ausgeprägt. In der Abbildung 13 sind die Ergebnisse dargestellt, in Verbindung mit der jeweils mitgeführten Kontrolle.



Abb. 13: G2/M Zellzyklus-Arrest nach Behandlung mit BSc2118. Aufgeführt sind je Kontrolle und Ergebnis nach 24 h Inkubation mit der jeweiligen IC₅₀. Behandelte MM-Zelllinien waren OPM-2, U-266 und RPMI-8226.

Bei den MCL-Zelllinien konnte ebenfalls nach 24 h Inkubation mit BSc2118 ein dosisabhängiger Arrest in der G2/M-Phase durch die Behandlung nachgewiesen werden. Der proliferationshemmende Effekt des BSc2118 war bei der Zelllinie JeKo-1 am deutlichsten ausgeprägt mit im Durchschnitt einem G2/M-Zuwachs von 16%, und maximal 18%. Die Zellzyklus-Aktivität der Zellreihe HBL-2 wurde in ähnlichem Maße gehemmt, und wies auch einen G2/M-Zuwachs von 16% nach 24h auf. Bei der Zellreihe Granta-519 lag der durchschnittliche G2/M-Zuwachs mit 13%, und maximal 16%, etwas niedriger. In Abbildung 14 sind die Ergebnisse dargestellt.



Abb. 14: G2/M Zellzyklus-Arrest nach Behandlung mit BSc2118. Aufgeführt sind je Kontrolle und Ergebnis nach 24 h Inkubation mit der jeweiligen IC₅₀. Behandelte Mantelzelllymphom-Zelllinien waren JeKo-1, HBL-2 und Granta-519.

3.6 Proteinnachweis

3.6.1 Immunologischer Proteinnachweis

3.6.1.1 Western Blot

Nachweis von p21^{waf1/cip1} bei den MM-Zelllinien

Bei allen MM-Zelllinien wurde eine Stabilisierung des p21 (Molekulargewicht 21 kDa) nach Behandlung mit BSc2118 beobachtet. Bei den OPM-2 Kontrollansätzen (Nativ und DMSO) konnte nur eine äußerst schwache, p21 repräsentierende Bande nachgewiesen werden. Bei 100 nM BSc2118 war diese Bande sehr kräftig ausgeprägt. Bei einer letalen Dosis von 1000 nM war die entsprechende p21 Bande sichtbar stärker ausgeprägt als bei 100 nM. Bei U-266 waren die Kontrollbanden deutlicher sichtbar als bei OPM-2. Die p21 Bande bei 100 nM dokumentiert jedoch eine deutliche Signalzunahme im Vergleich zu den Kontrollbanden, ist jedoch etwas schwächer ausgeprägt als bei OPM-2. Auch bei U-266 nahm die Bande bei 1000 nM nochmals kräftig an Breite und Intensität im Vergleich zu 100 nM zu, und war im Vergleich zu OPM-2 sichtbar signalintensiver. Auch bei RPMI-8226 war die Intensität der Kontrollbanden für p21, ähnlich wie bei U-266, schwach, jedoch deutlich sichtbar. Auch hier fand bei 100 nM eine deutliche Stabilisierung des p21 im Vergleich zu den Kontrollen statt. Die Bande bei 1000 nM ist in etwa mit der bei 100 nM vergleichbar. Eine weitere Zunahme der Signalintensität hat nicht stattgefunden. Bei OPM-2 und U-266 kann demnach von einer Dosisabhängigkeit der Stabilisierung des p21 gesprochen werden, welche bei RPMI-8226 unter diesen Bedingungen nicht sicher zu erkennen ist. Die β-Aktin Banden gleicher Signalintensität dokumentieren, dass in die verschiedenen Geltaschen bei der Elektrophorese in etwa die gleichen Mengen an Gesamtprotein pipettiert wurden. Abbildung 15 dokumentiert die Ergebnisse der Western Blot-Versuche an den MC.



Abb. 15: Western Blot. Inkubationszeit der Zellen mit BSc2118: 8 h. Stabilisierung des CDK-Inhibitors p21 in den Myelomzelllinien OPM-2, U-266 und RPMI-8226.

Nachweis von p21^{waf1/cip1} und Cyclin D₁ bei den Mantelzell-Lymphomzelllinien

Wie bei den MC, so wurde p21 auch in den Mantelzellen nach 8 h Inkubation mit BSc2118 im Vergleich zur Kontrolle deutlich sichtbar stabilisiert. Zusätzlich zu p21 wurde bei den Mantelzellen das Zellzyklus-Protein Cyclin D1 (Molekulargewicht 33,4 kDa) untersucht. Die Abbildung 10 präsentiert die Ergebnisse. Dargestellt sind Banden von p21, Cyclin D1 und β -Aktin.

Bei JeKo-1 waren die Kontrollbanden für p21 nur schwer zu erkennen, jedoch nachweisbar. Bei 100 nM BSc2118 nahm die Intensität der Bande im Vergleich zur Kontrolle geringfügig zu, und war dann bei 1000 nM sichtbar größerer Intensität. Bei HBL-2 war schon die p21-Bande der Kontrollansätze starker Intensität. Bei 100 nM nahm die Bande an Breite und Intensität zu. Die Intensität der Bande bei 200 nM war im Vergleich zu der bei 100 nM sichtbar schwächer, und lag sogar geringfügig unter der der Kontrollbanden. Die Kontrollbanden für p21 bei Granta-519 wiesen eine geringe Intensität auf. Die Bandestärke nahm bei 100 nM BSc2118 dann deutlich erkennbar zu. Auch die Bande bei 1000 nM war noch sichtbar signalintensiver als jene der Kontrollansätze, reichte jedoch in ihrer Intensität nicht ganz an die Bande bei 100 nM heran.



Abb. 16: Western Blot. Inkubationszeit der Zellen mit BSc2118: 8 h. Stabilisierung von p21 und Abbau von Cyclin D1 in den Mantelzelllymphom-Zelllinien JeKo-1, HBL-2 und Granta-519.

Bei dem Nachweis von Cyclin D1 traten bei JeKo-1 und Granta-519 teilweise mehrere Banden auf. Die stärkste Bande bei allen Cyclin D1-Nachweisen und allen drei Zelllinien trat im Bereich von 33 kDa auf. Durch Behandlung mit BSc2118 war nach 8 h bei JeKo-1 und HBL-2 eine geringfügige Abnahme der Bandenstärke bei 100 nM zu verzeichnen, bei Granta-519 war dieser Effekt erst bei 1000 nM nachweisbar. Sowohl bei JeKo-1 als auch bei Granta-519 konnten, trotz des monoklonalen Antikörpers, mehrere Banden detektiert werden. Bei den zusätzlichen Banden mit geringerem Molekulargewicht als 33 kDa könnte es sich um Abbauprodukte des Cyclin D1 handeln. Nach Inkubation mit 1000 nM BSc2118 erschien bei JeKo-1 eine zusätzliche Bande auf der Höhe der 20 kDa Referenzbande. Im Bereich von 29 kDa war bei beiden Zellreihen eine zusätzliche schwächere Bande sichtbar, die bei Granta-519 bei 1000 nM BSc2118 verschwand. Sowohl bei der Behandlung mit 100 nM als auch mit 1000 nM trat bei Granta-519 eine zusätzliche Bande im Bereich von 31 kDa auf. Die Ergebisse sind in der Abbildung 16 dargestellt.

3.6.1.2 Semi-quantitative NF-kB Transkriptionsfaktor-Bestimmung

In den Zellreihen OPM-2 und RPMI-8226 konnte gezeigt werden, dass durch TNFa-Stimulation die NF-kB p65 (relA) Untereinheit induziert werden konnte. Die NF-kB Induktion konnte durch BSc2118 dosisabhängig inhibiert werden. In U-266 war eine Stimulation durch TNFa nicht erfolgreich. Auch eine Hemmung der vorhandenen Basis-Aktivität war bei den eingesetzten Dosen BSc2118 nicht möglich. Die Behandlung mit 10 nM BSc2118 konnte weder bei OPM-2 noch bei RPMI-8226 eine signifikante Abnahme des freiwerdenden NF-kB p65 hervorrufen. Bei einer Dosis von 100 nM war ein Aktivitätsverlust des NF-KB von 5-10% nachweisbar. Erst bei 1000 nM war eine signifikante Inhibition des NF-kB nachweisbar. Im Schnitt 52% weniger NF-kB als in dem Kontrollansatz wurden bei dieser Dosis in den OPM-2 Zellen freigesetzt. Bei RPMI-8226 sank die Aktivität auf 65% der Kontrolle. Die maximal applizierte Dosis von 10000 nM führte zu einer weiteren Zunahme der Hemmung der NF-KB Freisetzung. In der Zelllinie OPM-2 war bei dieser Dosis nur noch eine Aktivität von 28% des Ausgangswertes des NF-kB nachweisbar, bei RPMI-8226 waren es 42%. Die Ergebnisse der ELISA-basierten Bestimmung des NF-KB aus den gewonnenen Zellextrakten der MM-Zellen sind im Folgenden in der Abbildung 17 dargestellt.

Ähnlich wie bei der Zellreihe U-266 war in den Mantelzelllymphom-Zelllinien die Induktion via TNFα nicht erfolgreich. Da auch bei wiederholten Versuchen die Induktion nicht gelang, ist zu erwägen, ob TNFα überhaupt zur Induktion von NF-κB in den Mantelzellen geeignet ist. Es wurde jedoch eine Grundaktivität gemessen, welche hemmbar war. Die NF-κB Freisetzung wurde, analog zu den MM-Zelllinien, ab einer Dosis von 1000 nM nachweislich gehemmt. Bei dieser Dosis war die Hemmung bei Granta-519 mit 40% verbleibendem aktiven NF-κB im Vergleich zur Kontrolle am deutlichsten, gefolgt von HBL-2 mit 47% und JeKo-1 mit 73%. Ebenso wie bei den MM-Zelllinien war eine Steigerung der Dosis auf 10000 nM mit einer Zunahme der Hemmung verbunden. Nur noch 23% der NF-κB Referenzmenge wurden bei Granta519 detektiert, 28% waren es bei HBL-2 und 42% bei JeKo-1. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 18 dargestellt.



Abb. 17: ELISA-basierte NF-κB Transkriptionsfaktor-Bestimmung. Inhibition der NF-κB-Aktivität in Zell-Extrakten durch Proteasominhibition nach 1 h Inkubation mit BSc2118 und anschließender Stimulation durch TNFα in den MM-Zelllinien OPM-2 und RPMI-8226.



Abb. 18: ELISA-basierte NF-κB Transkriptionsfaktor-Bestimmung. Inhibition der NF-κB-Aktivität in Zell-Extrakten durch Proteasominhibition nach 1 h Inkubation mit BSc2118 und anschließender Stimulation durch TNFα in den MCL-Zelllinien JeKo-1, HBL-2 und Granta-519.

3.6.2 Proteasominhibition

Bei allen getesteten Zelllinien war eine dosisabhängige Hemmung der chymotrysinähnlichen Proteasomaktivität durch BSc2118 nachweisbar. Mit steigender Dosis BSc2118 nahm die gemessene Fluoreszenz ab.

Bei allen drei MM-Zelllinien trat ab einer Dosis von 50 nM BSc2118 eine signifikante Hemmung der chymotrypsinähnlichen Aktivität des Proteasoms ein. Bei OPM-2 wurden im Mittel noch 76%, bei U-266 noch 82% und bei RPMI-8226 noch 76% der Kontrollaktivität gemessen. Bei 100 nM BSc2118 sanken die gemessenen Aktivitäten weiter auf jeweils 62% (OPM-2), 65% (U-266) und 60% (RPMI-8226) ab. Bei 500 nM BSc2118 näherte sich die erzielte Hemmung bei allen Zelllinien dem Maximaleffekt. Es wurden durchschnittlich noch 24%, 27% und 32% der Ausgangsaktivitäten gemessen. Bei einer Verdopplung der Dosis auf 1000 nM trat nur noch eine geringfügige Zunahme der Hemmung von 1-4% auf. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 19 dargestellt.



Abb. 19: Proteasomaktivitätsmessungen. Dosisabhängige Abnahme der chymotrypsinähnlichen Proteasomaktivität in Zellextrakten, welche 1 h mit BSc2118 behandelt wurden. Messung anhand der Eigenfluoreszenz des durch Peptidhydrolyse frei werdenden AMC in Extrakten der Myelomzelllinien OPM-2, U-266 und RPMI-8226.

Die Ergebnisse bei den MM-Zelllinien konnten an primären MC eines Patienten bestätigt werden. Auch hier war eine dosisabhängige Hemmung der chymotrysinähnlichen Proteasomaktivität durch BSc2118 nachweisbar. Die primären Zellen waren insgesamt etwas weniger sensitiv gegenüber dem BSc2118 als die Zelllinien. Erst ab einer Dosis von 100 nM trat eine signifikante Hemmung des Proteasoms ein. Es wurden 80% der Kontrollaktivität gemessen. Bei einer Dosis von 500 nM sank die gemessene Aktivität auf 40% ab, und lag bei der maximal applizierten Dosis von 1000 nM bei 32%. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 20 dargestellt.



Abb. 20: Proteasomaktivitätsmessungen. Dosisabhängige Abnahme der chymotrypsinähnlichen Proteasomaktivität in Zellextrakten, welche 1 h mit BSc2118 behandelt wurden. Messung anhand der Eigenfluoreszenz des durch Peptidhydrolyse frei werdenden AMC an Extrakten primärer MC eines Patienten.

Wie bei den Myelomzelllinien trat auch bei den MCL-Zelllinien ab einer Dosis von 50 nM eine signifikante Hemmung der Proteasomaktivität ein. HBL-2 war mit einer gemessenen mittleren Aktivität von 65% des Kontrollansatzes die sensitivste Zelllinie. Es folgten JeKo-1 mit 76% und Granta-519 mit 86% verbleibender Aktivität. Der deutlichste Zuwachs der Hemmung trat auch bei den MCL-Zellen erst bei einer Dosis von 500 nM auf. Hier wurden Aktivitäten von jeweils 24% (HBL-2), 38% (Jeko-1) und 39% (Granta-519) gemessen. Eine Verdopplung der Dosis auf 1000 nM verursachte bei allen Zellreihen noch eine Zunahme der Hemmung im Bereich von 9-13%. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 21 dargestellt.



Abb. 21: Proteasomaktivitätsmessungen. Dosisabhängige Abnahme der chymotrypsinähnlichen Proteasomaktivität in Zellextrakten, welche 1 h mit BSc2118 behandelt wurden. Messung anhand der Eigenfluoreszenz des durch Peptidhydrolyse frei werdenden AMC in Extrakten der Mantelzelllymphom-Zelllinien JeKo-1, HBL-2 und Granta-519.

4 Diskussion

4.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Von der elektronenmikroskopischen Entdeckung zylindrischer makromolekularer Partikel in Archaebacteriae und Eukaryoten [2] bis hin zur Erkenntnis, dass es sich beim Ubiguitin-Proteasom-System um den wichtigsten Mechanismus zum Abbau intrazellulärer Proteine handelt [13], war es ein langer Weg. Er führte über die Entdeckung der Proteaseaktivität der tonnenförmigen 20S Partikel und die Aufklärung deren Rolle und Funktion im Zusammenspiel mit dem parallel entdeckten Ubiquitinylierungsapparat, bis hin zum Verständnis der Komplexbildung des 20S mit den regulierenden 19S Untereinheiten zum 26S Gesamtkomplex [150]. Schließlich wurde auch nachgewiesen, dass es sich bei diesem katabolen Proteinabbausystem um ein endergones, ATP-abhängiges Procedere handelt [151, 152]. Nachdem das Ubiquitin-Proteasom-System entdeckt und seine zentrale Rolle im Abbau schnelllebiger und defekter Proteine verstanden war, avancierte es rasch zu einem neuen, interessanten Forschungsgebiet in der Onkologie. Untersuchungen zeigten, dass unterschiedlichste zelluläre Signalwege und Prozesse direkt oder indirekt von der Aktivität des Systems beeinflusst werden, manche davon mit essentieller Bedeutung für die Zelle und ihr Überleben: So werden etwa die Effektor-Proteine von Zellzyklus und Apoptose, aber auch Transkriptionsfaktoren und Onkogene, durch das Proteasom abgebaut und somit reguliert [13]. Kombiniert mit der Tatsache, dass sich transformierte Zellen meist unkontrolliert teilen und proliferieren, und somit in einem höheren Maße von ihrer Homöostase abhängen als gesunde, differenzierte Zellen, macht das Proteasom zu einem neuen alternativen Angriffspunkt in der onkologischen Forschung. Es wurde für verschiedene Tumoren postuliert, dass deren erhöhte Proteasomaktivität nicht ausschließlich reaktiv ist, sondern teilweise auch mit der eigentlichen Pathogenese der Erkrankung in Zusammenhang steht [20].

4.2 **Proteasominhibitoren: Wirkung und Einsatzgebiet**

Nach der Entdeckung des ersten Proteasominhibitors, dem natürlich vorkommenden Lactacystin, einem Metaboliten von Streptomyces aus der Gattung der Actinobacteriae, [31, 153] wurden sukzessiv potentere Proteasominhibitoren synthetisiert: Erst Substanzen aus der Familie der Peptidaldehyde wie MG-132, später dann Peptidboronate wie MG-262, zu denen auch Bortezomib (PS-341) gehört, welches sowohl beim multiplen Myelom (seit 2003) als auch beim Mantelzelllymphom (seit 2006) in der Zweitlinientherapie zugelassen ist. Es inhibiert in unterschiedlichem Maße alle drei proteolytischen Untereinheiten des Proteasoms: Die trypsinähnliche, die caspaseähnliche und in besonderem Maße die chymotrypsinähnliche Aktivität [34]. Wie sich diese Hemmung im Weiteren auswirkt, ist nur zum Teil bekannt. So wurde jedoch bei beiden Erkrankungen beispielsweise eine konstitutiv erhöhte Aktivität des antiapoptotischen Transkriptionsfaktors NF-kB beschrieben, welche im Zuge der Proteasominhibition mit Bortezomib in vitro effektiv reduziert werden konnte [39, 154]. Auch der universelle CDK-Inhibitor p21, welcher eine wichtige Rolle bei der Regulierung und Inhibition des Zellzyklus übernimmt, wurde nach Proteasominhibition bei MM und MCL stabilisiert [39, 40]. In diesen Experimenten konnten sowohl Zellzyklus-Arrests beobachtet, als auch spezifisch Apoptose in den MM- und MCL-Zellen eingeleitet werden. Entscheidend war jedoch das Überwinden von Resistenzen gegenüber klassischen Chemotherapeutika durch Proteasominhibition [38]. Mittlerweile ist Bortezomib (Velcade®) ein wichtiger Bestandteil der Therapie beim MM, sowohl in der initialen Behandlung, als auch in der Rezidivtherapie [50]. Doch das Auftreten Dosis limitierender Toxizitäten und Nebenwirkungen wie Thrombozytopenie, Neutropenie und Polyneuropathie ist klinisch relevant und deutet darauf hin, dass neuere, weniger toxische Proteasominhibitoren vorteilhaft wären.

Die Arbeitsgruppe um Professor Kloetzel vom Institut für Biochemie der Charité hat in ΤU Zusammenarbeit mit der Darmstadt eine ganze Reihe neuartiger Proteasominhibitoren entworfen und synthetisiert. BSc2118 ist die am meisten Erfolg versprechende dieser Substanzen, welche Derivate des MG-132 sind. Es handelt sich dabei um ein tripeptidisches Aldehyd, welches reversibel an das Threonin aller drei aktiven Zentren des Proteasoms bindet [60]. In in vitro Versuchen an Zervixkarzinom (MeWo) – Zelllinien (HeLa) – und Melanom wurde seine spezifische Proteasomhemmung und Antitumoraktivität gezeigt [61]. Wie diese Substanz auf Zellen hämatologischer Malignome wirkt, war bis zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht erforscht worden, und daher Thema dieser Arbeit.

4.3 Antiproliferative Wirkung des BSc2118

In der vorliegenden Arbeit wurde die antiproliferative Wirkung des BSc2118 an Myelomund Mantelzellen mittels MTT-Test ermittelt. Es konnte sowohl bei allen eingesetzten transformierten MM-Zelllinien (OPM-2, U-266 und RPMI-8226), als auch bei den primären MC ein wachstumshemmender und die Viabilität der Zellen beeinträchtigender, dosisabhängiger Effekt des BSc2118 nachgewiesen werden. Anhand der erhobenen Daten wurden die IC₅₀-Werte für die einzelnen Zellpopulationen berechnet. Bei den Myelomzelllinien betrug dieser Wert im Durchschnitt 135 nM (52-287). Bei den primären MC lag der durchschnittliche Wert des BSc2118 mit 305 nM (264-370) über dem der Zelllinien. Die Sensitivität variierte interessanterweise nicht ausschlaggebend in Abhängigkeit des Auftretens der Translokation t(4;14). Dies ist klinisch von Interesse, da t(4;14) ein ungünstiger Prognosefaktor beim MM ist (Keats JJ et al. 2006 [85]), und mit verringertem Überleben sowohl bei konventioneller als auch bei Hochdosistherapie einhergeht.

Auch bei den MCL-Zelllinien JeKo-1, HBL-2 und Granta-519 konnte dem BSc2118 ein starker dosisabhängiger antiproliferativer Effekt nachgewiesen werden. Der durchschnittliche IC₅₀-Wert für BSc2118 betrug 158 nM (82-262). Primäre MCL-Lymphozyten zur Bestätigung der Resultate an den Zellreihen standen leider nicht zur Verfügung.

Ähnlich wie in der Arbeit von Młynarczuk-Biały et al. an primären Fibroblasten, konnte in dieser Arbeit durch MTT-Toxizitätsversuche an Lymphozyten-angereicherten MNC gesunder Spender nachgewiesen werden, dass der Proteasominhibitor BSc2118 eine tumorselektive Toxizität besitzt [61]. Tatsächlich lag der IC₅₀-Wert der Lymphozyten deutlich über 1000 nM, und somit weit oberhalb des Wertes aller getesteten transformierten Zellen. Damit konnte nachgewiesen werden, dass gesunde Zellen zwar durch für maligne Zellen letale Dosen vorübergehend gehemmt, jedoch nicht apoptotisch werden [155].

4.4 **Proapoptotische Wirkung des BSc2118**

In weiterführenden Untersuchungen wurde als nächstes die Fähigkeit des BSc2118 zur Apoptoseinduktion untersucht. Nach 48 h Inkubation mit dem jeweiligen halben, ganzen und fünffachen IC₅₀-Wert für BSc2118 konnte anhand des Annexin V-Tests bei allen MM- und MCL-Zelllinien gezeigt werden, dass BSc2118 spezifisch Apoptose induziert, und die Apoptose-Rate dosisabhängig ist. Dieser Effekt ließ sich bei den Myelom-Versuchen an primären Zellen der **Patienten 1** und **2** bestätigen: Hier wurden die angewandten Dosen (50 nM, 100 nM und 500 nM) durch Erfahrungswerte ausgewählt, da die IC₅₀-Werte für die jeweiligen Primärzellen natürlich nicht bekannnt waren. Wie auch schon in den MTT-Versuchen wurde auch hier die Aktivität des BSc2118, und damit dessen proapoptotische Wirkung, offensichtlich nicht durch das Auftreten des prognostisch ungünstigen Faktors t(4;14) beeinträchtigt. Die Dosis von 500 nM, die etwa der doppelten IC₅₀ Dosis entsprach, konnte bei den Zellen der **Patienten 1** und **2**, unabhängig vom chromosomalen Status, eine Apoptoserate von >80% (89% und 82%) erzielen.

4.5 BSc2118 induziert G2/M-Zellzyklus-Arrest

Vergleichbar zu vorherigen Versuchen mit BSc2118 in anderen in vitro Tumormodellen, wurde die Substanz auch in dieser Studie auf ihre Fähigkeit, Zellzyklus-Arrest auszulösen, getestet. In MeWo Melanom-Zellen etwa, bewirkte es einen deutlichen G2/M-Arrest nach 24 h und 48 h Inkubation [61]. In dieser Arbeit konnte ein solcher G2/M-Arrest für alle MM-Zellreihen zeigt werden. Bereits nach 24 h Inkubation bei dem jeweiligen zelllinienspezifischen IC₅₀-Wert war dieser Effekt deutlich nachweisbar. Bei den Myelomzelllinien belief sich die G2/M-Zuwachsrate nach Inkubation im Vergleich zum Kontrollansatz auf durchschnittlich 25% (10-36) nach 24 h. Unter vergleichbaren Bedingungen wurde auch bei den MCL-Zelllinien ein Zellzyklus-Arrest durch Einwirken von BSc2118 demonstriert; im Schnitt wurde ein Zuwachs von 15% (13-16) gemessen. Diese Daten stehen somit in Einklang mit jenen zu Bortezomib in MM-Zelllinien, wo gezeigt wurde, dass die Substanz trotz erfolgtem Zellzyklus-Arrest in der Lage war diesen zu durchbrechen und Apoptose auszulösen [38].

4.6 Hemmung spezifischer Zellzyklus regulierender Proteine

Zusätzlich zu den Zellzyklus-Versuchen wurden alle Zelllinien auf die Expression des Zellzyklus regulierenden CDK-Inhbitors p21 hin geprüft. In geringerer Konzentration stabilisiert p21 zwar Cyclin D/CDK4-Komplexe und fördert damit die Progression der Zelle während des Zellzyklus [26]. Wird es jedoch stärker exprimiert, beispielsweise nach Induktion durch den Tumorsuppressor p53, so übernimmt es eine stark hemmende Funktion auf anwesende Cyclin/CDK-Komplexe, wodurch der Zellzyklus zum Erliegen kommen kann. Außerdem ist bekannt, dass p21 auch eine Verbindung mit dem DNA-Polymerase-δ-Elongationsfaktor Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) eingehen kann, wodurch dessen Funktion bei der DNA-Replikation, nicht jedoch der DNA-Reparatur, gehemmt wird. Der Zellzyklus-Regulator p21 übt somit auf zwei Ebenen einen antiproliferativen und Zellzyklus hemmenden Effekt aus [26]. In den vorangehenden Versuchen konnte demonstriert werden, dass in allen MM- und MCL-Zelllinien p21 schon nach 8 h Inkubation mit BSc2118 durch dessen proteasominhibitorische Wirkung vermindert abgebaut und somit stabilisiert wird. Tatsächlich konnten in den Zellzyklus-Versuchen, nach 24 h Inkubation mit BSc2118, G2/M-Arrests dargestellt werden, und somit die Zellzyklus hemmende Wirkung des BSc2118 in den MM-Zellen und MCL-Zellen nachgewiesen werden. Die bekannteste Zellzyklus hemmende Wirkung des p21 erfolgt über die CDK4/CDK6 und CDK2-Inhibition in der G1-Phase, wodurch ein G1-Arrest ausgelöst werden kann. P21 ist jedoch auch in der Lage, indirekt die CDK1 (cdc2) zu hemmen [156]. CDK1 bildet zusammen mit Cyclin B den, für die Transition von der G2- in die M-Phase essentiellen, Mitose-Promoting Factor (MPF), und ist dessen katalytische Untereinheit [157]. BSc2118 übt daher seinen Zellzyklus hemmenden Effekt in der G2/M-Phase des Zellzyklus wahrscheinlich via p21 durch Hemmung des MPF aus. Diese Hypothese würde auch die aus den Zellzyklus-Versuchen gewonnenen Daten mit BSc2118 stützen.

Cyclin D1 spielt beim Mantelzell-Lymphom schon bei der Diagnostik eine wichtige Rolle. Denn der Nachweis der Translokation t(11;14)(q13;q32) bei malignen Zellen eines Patienten deutet mit recht hoher Wahrscheinlichkeit auf eine MCL-Erkrankung hin, für die diese chromosomale Aberration typisch, und gleichzeitig für die Überexpression des Cyclin D1 verantwortlich ist. Es konnte gezeigt werden, dass Cyclin D1 in MCL nicht nur überexprimiert wird, sondern auch den CDK-Inhibitor p27 sequestriert, wodurch dieser nicht mehr in der Lage ist, an der Modulierung der Zellzyklus-Aktivität durch Inhibition des Cyclin E/CDK2-Komlexes teilzunehmen [126]. Tatsächlich gelang es in der vorliegenden Arbeit in den Western Blot-Analysen eine Abnahme des überexprimierten Cyclin D1 in den drei MCL-Zelllinien JeKo-1, HBL-2 und Granta-519 nach Behandlung mit BSc2118 darzustellen. Anders als im Falle des p21, dürfte diese Veränderung zumindest teilweise indirekt, durch die inhibitorische Wirkung der Proteasominhibition auf die NF-κB Aktivität zustande kommen. Denn NF-κB ist bekannt dafür, auch ein Transkriptionsfaktor für das Cyclin D1 kodierende Gen CCND1 zu sein. Wird das NF-κB jedoch daran gehindert, in den Zellkern zu wandern, so schlägt sich dies dementsprechend auch in einer Abnahme der Cyclin D1-Expression nieder [158]. Folglich trägt BSc2118 dazu bei, die durch die Cyclin D1 hervorgerufene, dysregulierte Zellzyklus-Progression in MCL zu drosseln, und übt zusätzlich über diesen indirekten Mechanismus einen antiproliferativen Effekt auf die malignen Zellen aus.

4.7 BSc2118 verhindert die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB

Der Transkriptionsfaktor NF-kB wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht. Man fand heraus, dass es sich im Grunde nicht um einen Faktor, sondern eine Familie von Dimeren aus der Rel/NF-kB Proteinfamilie handelt. Bei den Säugetieren existieren die Untereinheiten p50/p105 (NF-kB1), p65 (ReIA), c-Rel, p52/p100 (NF-kB2) und ReIB [159]. Sie kommen als Homo- oder Heterodimere im Zytoplasma vor, und sind in ihrer inaktiven Form an ein Inhibitorprotein aus der I-κB Familie (I-κBα; I-κBβ, I-κBγ, Bcl-3, p105 und p100) gebunden [160]. Erstaunlich ist die Fülle an Stimuli, welche die NF-κB Aktivierung auslösen können. Unter anderem können Zytokine (TNFα, IL-1, IL-2), bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), virale Infektionen (HIV-1, HTLV-1, HBV, EBV), bestimmte chemische Verbindungen wie Phorbolester, aber auch UV- und Röntgenstrahlung die Aktivierung in Gang setzen [161]. Beim Myelom wurde herausgefunden, dass die auto- und parakrine Sekretion von TNFa durch die Plasmazellen selbst, sowie durch das Mikromilieu, für eine erhöhte Aktivität des NF-κB sorgt [94]. Deshalb wurde bei den hier durchgeführten Versuchen auch TNFa zur Aktivierung des NF-kB Weges in den Zellen verwendet [101]. Es wurde gezeigt, dass zur Aktivierung und Freisetzung des NF-kB der I-kB Kinase Komplex (IKK) das I-kB phosphorylieren muss, wodurch dieses polyubiquitiniert und über das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut wird [162]. Identifizierte Zielgene des NF-kB kodieren unter anderem antiapoptotische Proteine (BCL-xL), Wachstumsfaktoren (IL-6; VEGF), Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1), Substanzen, die für die Invasion (CXCR4) und Metastasierung relebant sind (MMP 2 und 9), sowie Zellzyklus-Moleküle (Cyclin D), die wiederum das Tumorwachstum fördern [163]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in den MM-Zelllinien OPM-2 und RPMI-8226 eine Induktion des NF-KB Weges durch TNFa möglich ist, und die NF-kB Aktivität durch Proteasominhibition stark vermindert werden kann. In diesen Modellen scheint NF-kB somit eine Rolle in der Neutralisierung proapoptotischer Stimuli darzustellen. Bei den ebenso wenig stimulierbaren Mantelzellen könnte dies dahergehend zu erklären sein, dass eventuell TNF α nicht das optimale Stimulans darstellt. Es ist bekannt, dass in Mantelzell-Lymphomzellen Gene, welche mit den TNF- und NF-kB-Signalwegen verwandt sind, häufig aktiv sind [164]. Inwiefern sie jedoch auch den TNF-Rezeptor TNFR1 besitzen, wurde von uns nicht erforscht. Andere Forscher konnten jedoch in Mantelzell-Lymphomzellen mehrerer Patienten keine Aktivität des Genes für TNFR1 nachweisen [165]. Da in den hier durchgeführten Versuchen jedoch eine Grundaktivität gemessen wurde, und diese auch hemmbar war, scheint auch in den hier eingesetzten Zelllinien der NF-kB Weg zumindest teilweise dem Überleben der Mantelzellen zuträglich zu sein. Dies würde auch die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen bestätigen. So haben Pham et al. eine erhöhte NF-kB Grundaktivität in MCL-Zelllinien (Mino und DB) und primären MCL-Zellen gemessen. Nach Gabe von Bortzomib konnten sie auch eine verminderte Expression von Cyclin D nachweisen [39].

4.8 Direkte Hemmung des Proteasoms durch BSc2118

In den abschließenden Versuchen zur Proteasominhibition wurden die Proteasomkomplexe in den Zellextrakten, die aus den behandelten Zelllinien gewonnenen wurden, durch BSc2118 dosisabhängig und spezifisch gehemmt: Mit zunehmender Dosis BSc2118 lagen die ermittelten Fluoreszenz-Werte niedriger als bei dem jeweiligen Kontrollansatz. Dies bedeutet, dass die gewonnenen Proteasom-Komplexe zu einem Anteil aktiv durch BSc2118 gehemmt waren. Bei der applizierten Dosis von maximal 1000 nM lag die ermittelte Proteasomaktivität bei allen MM-Zelllinien (OPM-2: 24%; U-266: 27%; RPMI-8226: 32%) und auch bei den primären MC von einem Patienten (32%) unter einem Drittel der Ausgangsaktivitäten. Auch bei allen MCL-Zelllinien konnte bei der Maximaldosis 1000 nM eine Senkung der Proteasomaktivitäten auf weniger als ein Drittel der Kontrollaktivität erzielt werden. Diese Versuche bestätigen somit, dass der getestete Inhibitor spezifisch das Proteasom der Zellen hemmt, wodurch der Wirkmechanismus der Substanz bei MMund MCL-Zellen nachgewiesen ist.

5 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnten wir in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass BSc2118 Anti-Tumor Effekte in vitro besitzt. Sowohl in den Myelomzelllinien, den primären MC als auch in den Mantelzelllymphom-Zelllinien konnte dosisabhängig das Zellwachstum gehemmt und Apoptose herbeigeführt werden. In den MC war dieser Effekt von dem Auftreten der ungünstigen zytogenetischen Aberration t(4;14) unabhängig. In Proteasominhibitionstests konnte bei allen Zelllinien gezeigt werden, dass die Substanz spezifisch eine Hemmung des Proteasoms induziert. Der Apoptoseinduktion ging die Inhibition der NF-kB-Aktivierung, sowie die Stabilisierung des Zellzyklus regulierenden Proteins p21 und ein Zellzyklus-Arrest voraus. Bei den Mantelzelllinien konnte zusätzlich noch eine Abnahme des antiapoptotischen Proteins Cyclin D1 nachgewiesen werden. Die toxische Dosis BSc2118 in den MNC aus peripherem Blut gesunder Probanden war um ein Mehrfaches höher als die toxischen Dosen in den transformierten Zellen, was auf eine gute therapeutische Breite der Substanz hindeutet. Diese Daten bilden die Grundlage für weiterführende Untersuchungen in vivo.

6 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Sofern die im Text verwendeten Abkürzungen nicht dem SI-Basiseinheitensystem, dessen abgeleiteten Einheiten, sowie dem Periodensystem der Elemente angehören, sind sie hier aufgelistet.

| % | Prozent |
|------------|-----------------------------------|
| Abb. | Abbildung |
| AK | Antikörper |
| APS | Ammoniumperoxydsulfat |
| Aqua dest. | Aqua destillata |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| ASP | Asparagin |
| BCA | Bicinchinonsäure-Assay |
| BCL-xL | B-cell lymphoma-extra large |
| BMPC | Bone Marrow Plasma Cells |
| BMSC | Bone Marrow Stromal Cells |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| BTZ | Bortezomib |
| С°С | Grad Celsius |
| CCND1 | Cyclin D1 encoding gene |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CDK | Cyclin Dependent-Kinase |
| CDKI | Cyclin Dependent-Kinase-Inhibitor |
| CR | Vollremission |
| CXCR4 | CXC Chemokine Receptor 4 |
| Cy5 | Cyanine 5 (Farbstoff) |
| del | Deletion |
| DEX | Dexamethason |
| DKK-1 | Dickkopf homolog 1 |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| E1 | Ubiquitin aktivierendes Enzym |

| E2 | Ubiquitin konjugierende Enzym |
|------------------|---|
| E3 | Ubiquitin-Ligase |
| EBV | Epstein-Barr-Virus |
| ECL⁺ | Elektrochemilumineszenz Plus Reagenz |
| EDTA | Ethylendiamintetracetat |
| ELISA | Enzyme-Linked Immunosorbent Assay |
| FACS | Fluorescence Activated Cell Sorting |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FGF | Fibroblast Growth Factor |
| FGFR3 | FGF Rezeptor 3 |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat (Farbstoff) |
| FKS | Fötales Kälberserum |
| g | Erdbeschleunigung, Standardwert: 9,80665 ms ⁻² |
| G0-Phase | Gap 0 Phase des Zellzyklus |
| G1-Phase | Gap 1 Phase des Zellzyklus |
| G2/M-Phase | Gap2/Mitose-Phase des Zellzyklus |
| h | Stunde(n) |
| HBV | Hepatitis B-Virus |
| HEPES | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure |
| HIV | Humanes Immundefizienz-Virus |
| HLA | Human Leucocyte Antigene |
| HRP | Horseradish Peroxydase |
| HTLV | Humanes T-Lymphozyten-Virus |
| I-κB | Inhibitor des NF-κB |
| IC ₅₀ | mittlere inhibitorische Konzentration |
| ICAM-1 | Intercellular Adhesion Molecule 1 |
| lg | Immunglobulin |
| IGF-1 | Insulin-like Growth Factor 1 |
| IL | Interleukin |
| IMID | Immunomodulatory drug |
| k.A. | keine Angaben des Herstellers |
| kDa | Kilodalton |
| KM | |
| | Knochenmark |

| Leu | Leucin |
|---|--|
| LP | Lysispuffer |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| m | Monoklonal |
| MACS® | Magnetic Cell Sorting: Magnetische Zellseparation |
| MAPK | Mitogen Aktivierte Proteinkinase |
| MC | Myelomzelle(n) |
| MCL | Mantelzelllymphom |
| MCS-F | Macrophage Colony Stimulating Factor |
| min. | Minute(n) |
| MIP1α | Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha |
| MM | Multiples Myelom |
| MMP | Matrix Metalloprotease |
| MNC | Mononukleäre Zellen |
| MTT | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid |
| NF-кВ | Nukleärer Faktor kappa B |
| NHL | Non-Hodgkin-Lymphom |
| | |
| Nonidet P40 | Nonylphenyl-polyethyleneglycol |
| Nonidet P40 OD | Nonylphenyl-polyethyleneglycol Optische Dichte |
| Nonidet P40 OD p | Nonylphenyl-polyethyleneglycol Optische Dichte Polyklonal |
| Nonidet P40 OD p p21 | Nonylphenyl-polyethyleneglycol Optische Dichte Polyklonal p21 ^{waf1/cip1} , CDKI |
| Nonidet P40 OD p p21 p27 | Nonylphenyl-polyethyleneglycol Optische Dichte Polyklonal p21 ^{waf1/cip1} , CDKI p27 ^{kip1} , CDKI |
| Nonidet P40 OD p p21 p27 PAGE | Nonylphenyl-polyethyleneglycol Optische Dichte Polyklonal p21 ^{waf1/cip1} , CDKI p27 ^{kip1} , CDKI Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| Nonidet P40 OD p p21 p27 PAGE PBS | Nonylphenyl-polyethyleneglycol Optische Dichte Polyklonal p21 ^{waf1/cip1} , CDKI p27 ^{kip1} , CDKI Polyacrylamid-Gelelektrophorese Phosphate Buffered Saline |
| Nonidet P40 OD p p21 p27 PAGE PBS PBS-T | Nonylphenyl-polyethyleneglycol Optische Dichte Polyklonal p21 ^{waf1/cip1} , CDKI p27 ^{kip1} , CDKI Polyacrylamid-Gelelektrophorese Phosphate Buffered Saline PBS-Tween |
| Nonidet P40 OD p p21 p27 PAGE PBS PBS-T PC | Nonylphenyl-polyethyleneglycol Optische Dichte Polyklonal p21 ^{waf1/cip1} , CDKI p27 ^{kip1} , CDKI Polyacrylamid-Gelelektrophorese Phosphate Buffered Saline PBS-Tween Plasma Cell |
| Nonidet P40 OD p p21 p27 PAGE PBS PBS-T PC PCNA | Nonylphenyl-polyethyleneglycol Optische Dichte Polyklonal p21 ^{waf1/cip1} , CDKI p27 ^{kip1} , CDKI Polyacrylamid-Gelelektrophorese Phosphate Buffered Saline PBS-Tween Plasma Cell Proliferating Cell Nuclear Antigen |
| Nonidet P40 OD p p21 p27 PAGE PBS PBS-T PC PCNA PerCP | Nonylphenyl-polyethyleneglycol Optische Dichte Polyklonal p21 ^{waf1/cip1} , CDKI p27 ^{kip1} , CDKI Polyacrylamid-Gelelektrophorese Phosphate Buffered Saline PBS-Tween Plasma Cell Proliferating Cell Nuclear Antigen Peridinin-Chlorophyll-Protein (Farbstoff) |
| Nonidet P40 OD p p21 p27 PAGE PBS PBS-T PC PCNA PerCP PI | Nonylphenyl-polyethyleneglycol Optische Dichte Polyklonal p21 ^{waf1/cip1} , CDKI p27 ^{kip1} , CDKI Polyacrylamid-Gelelektrophorese Phosphate Buffered Saline PBS-Tween Plasma Cell Proliferating Cell Nuclear Antigen Peridinin-Chlorophyll-Protein (Farbstoff) |
| Nonidet P40 OD p p21 p27 PAGE PBS PBS-T PC PCNA PerCP PI pH | Nonylphenyl-polyethyleneglycol Optische Dichte Polyklonal p21 ^{waf1/cip1} , CDKI p27 ^{kip1} , CDKI Polyacrylamid-Gelelektrophorese Phosphate Buffered Saline PBS-Tween Plasma Cell Proliferating Cell Nuclear Antigen Peridinin-Chlorophyll-Protein (Farbstoff) Propidiumiodid -log ₁₀ H ⁺ |
| Nonidet P40 OD p p21 p27 PAGE PBS PBS-T PC PCNA PerCP PI pH PR | Nonylphenyl-polyethyleneglycol Optische Dichte Polyklonal p21 ^{waf1/cip1} , CDKI p27 ^{kip1} , CDKI Polyacrylamid-Gelelektrophorese Phosphate Buffered Saline PBS-Tween Plasma Cell Proliferating Cell Nuclear Antigen Peridinin-Chlorophyll-Protein (Farbstoff) Propidiumiodid -log ₁₀ H ⁺ Partielles Ansprechen |
| Nonidet P40 OD p p21 p27 PAGE PBS PBS-T PC PCNA PerCP PI pH PR PRAD-1 | Nonylphenyl-polyethyleneglycol Optische Dichte Polyklonal p21 ^{waf1/cip1} , CDKI p27 ^{kip1} , CDKI Polyacrylamid-Gelelektrophorese Phosphate Buffered Saline Phosphate Buffered Saline PBS-Tween Plasma Cell Proliferating Cell Nuclear Antigen Peridinin-Chlorophyll-Protein (Farbstoff) Propidiumiodid -log ₁₀ H ⁺ Partielles Ansprechen entspricht dem CCND1 |
| Nonidet P40 OD p p21 p27 PAGE PBS PBS-T PC PCNA PerCP PI PR PRAD-1 PS | Nonylphenyl-polyethyleneglycol Optische Dichte Polyklonal p21 ^{waf1/cip1} , CDKI p27 ^{kip1} , CDKI Polyacrylamid-Gelelektrophorese Phosphate Buffered Saline Phosphate Buffered Saline PBS-Tween Plasma Cell Plasma Cell Proliferating Cell Nuclear Antigen Peridinin-Chlorophyll-Protein (Farbstoff) Propidiumiodid -log ₁₀ H ⁺ Partielles Ansprechen entspricht dem CCND1 Phosphatidylserin |
| RANKL | Receptor Activator of NF-кВ Ligand |
|--------------|--|
| relA | V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A |
| RNA | Ribonucleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| RR | Response Rate |
| S | Sedimentationskonstante, Einheit: Svedberg (10 ⁻¹³ s) |
| S-Phase | Synthese-Phase des Zellzyklus |
| SDF1a | Stromal Cell-Derived Factor 1 alpha |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| S.O. | siehe oben |
| sog. | sogenannte |
| s.u. | siehe unten |
| suc-LLVY-AMC | N-Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-7-Amino- |
| | 4-Methylcumarin |
| t | Translokation |
| Tabl. | Tablette(n) |
| TEMED | N,N,N',N', Tetramethylethylendiamin |
| ΤΝFα | Tumornekrosefaktor alpha |
| TRIS | Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan |
| u.a. | unter anderem |
| UV | Ultraviolett |
| VCAM-1 | Vascular Cell Adhesion Molecule 1 |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| v/v | volume/volume |
| w/v | weight/volume |

7 Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

| Tab. 1: | Zusammensetzung der SDS-PAGE-Gellösungen |
|--------------|--|
| Tab. 2: | Ergebnisse der Proliferations- und Apoptose-Versuche |
| Abb. 1: | Schematische Darstellung des Ubiquitin-Proteasom-Systems4 |
| Abb. 2: | Strukturformel des tripeptidischen Proteasominhibitors BSc21189 |
| Abb. 3: | Percoll-Dichtegradient eines MM-Knochenmarkaspirates |
| Abb. 4: | Quantifizierung CD138+/CD38+ Plasmazellen in einer Probe aus MNC eines |
| | MM-Patienten vor immunmagnetischer Separation. |
| Abb. 5: | Ermittlung der Reinheit einer CD138+/CD38+ Plasmazell-Population nach |
| | immunmagnetischer Separation aus MNC eines MM-Patienten41 |
| Abb. 6: | MTT-Test. Dosisabhängige Wachstumshemmung durch den |
| | Proteasominhibitor BSc2118 an den MM-Zelllinien OPM-2, U-266 und |
| | RPMI-822643 |
| Abb. 7: | MTT-Test. Dosisabhängige Wachstumshemmung durch den Proteasom- |
| | inhibitor BSc2118 an den primären MM-Zellen der Patienten 1, 2 und 343 |
| Abb. 8: N | MTT-Test. Dosisabhängige Wachstumshemmung durch den Proteasom- |
| | inhibitor BSc2118an den MCL-Zelllinien JeKo-1, HBL-2 und Granta-51944 |
| Abb. 9: | MTT-Test. Dosisabhängige Wachstumshemmung durch den Proteasom- |
| | inhibitor BSc2118 an Lymphozyten gesunder Spender45 |
| Abb. 10: | Annexin V-Test, durchflußzytometrische Bestimmung der spezifischen |
| | Apoptoseraten nach 48h Inkubation mit BSc2118 bei den MM-Zelllinien |
| | OPM-2, U-266 und RPMI-822646 |
| Abb. 11: | Annexin V-Test, durchflußzytometrische Bestimmung der spezifischen |
| | Apoptoseraten nach 48 h Inkubation mit BSc2118 bei den primären |
| | Myelomzellen der Patienten 1 und 247 |
| Abb. 12: | Annexin V-Test, durchflußzytometrische Bestimmung der spezifischen |
| | Apoptoseraten nach 48 h Inkubation mit BSc2118 bei den MCL-Zelllinien |
| | JeKo-1, HBL-2 und Granta-51948 |
| Abb. 13: Zel | Zellzyklus-Versuche nach 24 h Behandlung mit BSc2118 bei den MM- |
| | Zelllinien OPM-2, U-266 und RPMI-822649 |
| Abb. 14: | Zellzyklus-Versuche nach 24h Behandlung mit BSc2118 bei den MCL- |
| | Zelllinien JeKo-1, HBL-2 und Granta-51950 |

- Abb. 15:Western Blot. Expression des p21 nach 8h Inkubationszeit der MM-Zelllinienen OPM-2, U-266 und RPMI-8226 mit BSc2118.52
- *Abb. 16*: Western Blot. Expression des p21 und Cyclin D1 nach 8h Inkubationszeit der MCL-Zelllinienen JeKo-1, HBL-2 und Granta-519 mit BSc2118......53
- Abb. 18: ELISA-basierte NF-κB Transkriptionsfaktor-Bestimmung in Zell-Extrakten der MCL-Zelllinien JeKo-1, HBL-2 und Granta-519 nach 1h Inkubation der Zellen mit BSc2118 und anschließender Stimulation durch TNFα......55
- Abb. 19:Proteasomaktivitätsmessungen in Zellextrakten der MM-Zelllinien OPM-2,U-266 und RPMI-8226 nach 1h Inkubation der Zellen mit BSc2118.56

8 Literaturverzeichnis

1 Orlowski RZ. The ubiquitin proteasome pathway from bench to bedside. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2005:220-5.

2 Shelton E, Kuff EL, Maxwell ES, Harrington JT. Cytoplasmic particles and aminoacyl transferase I activity. J Cell Biol 1970;45:1-8.

3 Dahlmann B, Kuehn L, Rutschmann M, Reinauer H. Purification and characterization of a multicatalytic high-molecular-mass proteinase from rat skeletal muscle. Biochem J 1985;228:161-70.

4 Wilk S, Orlowski M. Cation-sensitive neutral endopeptidase: isolation and specificity of the bovine pituitary enzyme. J Neurochem 1980;35:1172-82.

5 Seeger M, Ferrell K, Dubiel W. The 26S proteasome: a dynamic structure. Mol Biol Rep 1997;24:83-8.

6 Hilt W, Wolf DH. Proteasomes of the yeast S. cerevisiae: genes, structure and functions. Mol Biol Rep 1995;21:3-10.

7 Eytan E, Ganoth D, Armon T, Hershko A. ATP-dependent incorporation of 20S protease into the 26S complex that degrades proteins conjugated to ubiquitin. Proc Natl Acad Sci U S A 1989;86:7751-5.

8 Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. Chem Biol 2001;8:739-58.

9 Bochtler M, Ditzel L, Groll M, Hartmann C, Huber R. The proteasome. Annu Rev Biophys Biomol Struct 1999;28:295-317.

10 Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. Annu Rev Biochem 1996;65:801-47.

11 Adams J, Palombella VJ, Elliott PJ. Proteasome inhibition: a new strategy in cancer treatment. Invest New Drugs 2000;18:109-21.

12 Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system for protein degradation. Annu Rev Biochem 1992;61:761-807.

13 Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. Annu Rev Biochem 1998; 67:425-79.

14 Glickman MH, Rubin DM, Fu H, et al. Functional analysis of the proteasome regulatory particle. Mol Biol Rep 1999;26:21-8.

15 Rock KL, Gramm C, Rothstein L, et al. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. Cell 1994;78:761-71.

16 Richter-Ruoff B, Wolf DH. Proteasome and cell cycle. Evidence for a regulatory role of the protease on mitotic cyclins in yeast. FEBS Lett 1993;336:34-6.

17 Hiller MM, Finger A, Schweiger M, Wolf DH. ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. Science. 1996;273:1725-8.

18 Yang Y, Waters JB, Früh K, Peterson PA. Proteasomes are regulated by interferon gamma: implications for antigen processing. Proc Natl Acad Sci U S A 1992;89:4928-32.

19 Magill L, Lynas J, Morris TC, Walker B, Irvine AE. Proteasome proteolytic activity in hematopoietic cells from patients with chronic myeloid leukemia and multiple myeloma. Haematologica 2004;89:1428-33.

20 Bogner C, Peschel C, Decker T. Targeting the proteasome in mantle cell lymphoma: a promising therapeutic approach. Leuk Lymphoma 2006;47:195-205.

21 Jakob C, Egerer K, Liebisch P, et al. Circulating proteasome levels are an independent prognostic factor for survival in multiple myeloma. Blood 2007;109:2100-5.

22 Kumatori A, Tanaka K, Inamura N, et al. Abnormally high expression of proteasomes in human leukemic cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1990;87:7071-5.

23 Naujokat C, Sezer O, Zinke H, Leclere A, Hauptmann S, Possinger K. Proteasome inhibitors induced caspase-dependent apoptosis and accumulation of p21WAF1/Cip1 in human immature leukemic cells. Eur J Haematol 2000;65:221-36.

24 Kanayama H, Tanaka K, Aki M, et al. Changes in expressions of proteasome and ubiquitin genes in human renal cancer cells. Cancer Res. 1991; 51:6677-85.

25 Adams J. Proteasome inhibitors as new anticancer drugs. Curr Opin Oncol 2002;14:628-34.

26 Johnson DG, Walker CL. Cyclins and cell cycle checkpoints. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1999;39:295-312.

27 Naujokat C, Hoffmann S. Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. Lab Invest 2002;82:965-80.

28 Adams J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. Cancer Treat Rev 2003;29 Suppl 1:3-9.

29 Baldwin AS. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. J Clin Invest 2001;107:241-6.

30 Henkel T, Machleidt T, Alkalay I, Krönke M, Ben-Neriah Y, Baeuerle PA. Rapid proteolysis of I kappa B-alpha is necessary for activation of transcription factor NF-kappa B. Nature 1993;365:182-5.

31 Fenteany G, Standaert RF, Lane WS, Choi S, Corey EJ, Schreiber SL. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. Science 1995;268:726-31.

32 Lee DH, Goldberg AL. Selective inhibitors of the proteasome-dependent and vacuolar pathways of protein degradation in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem 1996;271:27280-4.

33 Yuehong MA, D'Antona D, LaChapelle L, Ryu JS, Guller S. Role of the proteasome in the regulation of fetal fibronectin secretion in human placenta. Ann N Y Acad Sci 2001;943:340-51.

34 Adams J. The development of proteasome inhibitors as anticancer drugs. Cancer Cell 2004;5:417-21.

35 Shah SA, Potter MW, McDade TP, et al. 26S proteasome inhibition induces apoptosis and limits growth of human pancreatic cancer. J Cell Biochem 2001;82:110-22.

36 Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, et al. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. Cancer Res 1999;59:2615-22.

37 Adams J. Proteasome inhibition in cancer: development of PS-341. Semin Oncol 2001;28:613-9.

38 Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. Cancer Res 2001;61:3071-6.

39 Pham LV, Tamayo AT, Yoshimura LC, Lo P, Ford RJ. Inhibition of constitutive NF-kappa B activation in mantle cell lymphoma B cells leads to induction of cell cycle arrest and apoptosis. J Immunol 2003;171:88-95.

40 Blagosklonny MV, Wu GS, Omura S, el-Deiry WS. Proteasome-dependent regulation of p21WAF1/CIP1 expression. Biochem Biophys Res Commun 1996;227:564-9. 41 Pagano M, Tam SW, Theodoras AM, et al. Role of the ubiquitinproteasome pathway in regulating abundance of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. Science 1995;269:682-5.

42 Zavrski I, Naujokat C, Niemöller K, et al. Proteasome inhibitors induce growth inhibition and apoptosis in myeloma cell lines and in human bone marrow myeloma cells irrespective of chromosome 13 deletion. J Cancer Res Clin Oncol 2003;129:383-91.

43 Anderson KC. Targeted therapy of multiple myeloma based upon tumormicroenvironmental interactions. Exp Hematol 2007;35:155-62.

44 von Metzler I, Heider U, Mieth M, et al. Synergistic interaction of proteasome and topoisomerase II inhibition in multiple myeloma. Exp Cell Res 2009;315:2471-8.

45 Roccaro AM, Hideshima T, Raje N, et al. Bortezomib mediates antiangiogenesis in multiple myeloma via direct and indirect effects on endothelial cells. Cancer Res 2006;66:184-91.

46 von Metzler I, Krebbel H, Hecht M, et al. Bortezomib inhibits human osteoclastogenesis. Leukemia 2007;21:2025-34.

47 Heider U, Kaiser M, Müller C, et al. Bortezomib increases osteoblast activity in myeloma patients irrespective of response to treatment. Eur J Haematol 2006;77:233-8.

48 Jagannath S, Barlogie B, Berenson J, et al. A phase 2 study of two doses of bortezomib in relapsed or refractory myeloma. Br J Haematol 2004;127:165-72.

49 Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, et al. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. N Engl J Med 2003;348:2609-17.

50 Richardson PG, Sonneveld P, Schuster M, et al. Extended follow-up of a phase 3 trial in relapsed multiple myeloma: final time-to-event results of the APEX trial. Blood 2007;110:3557-60.

51 Kane RC, Bross PF, Farrell AT, Pazdur R. Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. Oncologist 2003;8:508-13.

52 San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, et al; VISTA Trial Investigators. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. N Engl J Med 2008;359:906-17. 53 Shah MH, Young D, Kindler HL, et al. Phase II study of the proteasome inhibitor bortezomib (PS-341) in patients with metastatic neuroendocrine tumors. Clin Cancer Res 2004;10:6111-8.

54 Yang CH, Gonzalez-Angulo AM, Reuben JM, et al. Bortezomib (VELCADE) in metastatic breast cancer: pharmacodynamics, biological effects, and prediction of clinical benefits. Ann Oncol 2006;17:813-7.

55 Chauhan D, Catley L, Li G, et al. A novel orally active proteasome inhibitor induces apoptosis in multiple myeloma cells with mechanisms distinct from Bortezomib. Cancer Cell 2005;8:407-19.

56 Stapnes C, Døskeland AP, Hatfield K, et al. The proteasome inhibitors bortezomib and PR-171 have antiproliferative and proapoptotic effects on primary human acute myeloid leukaemia cells. Br J Haematol 2007;136:814-28.

57 Chauhan D, Hideshima T, Anderson KC. A novel proteasome inhibitor NPI-0052 as an anticancer therapy. Br J Cancer 2006;95:961-5.

58 Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM, et al. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. Blood 2007;110:3281-90.

59 Alsina M, Trudel S, Vallone M, Molineaux C, Kunkel L and Goy A. Phase 1 Single Agent Antitumor Activity of Twice Weekly Consecutive Day Dosing of the Proteasome Inhibitor Carfilzomib (PR-171) in Hematologic Malignancies. Blood 2007;110 (ASH Annual Meeting Abstracts):411.

60 Braun HA, Umbreen S, Groll M, et al. Tripeptide mimetics inhibit the 20 S proteasome by covalent bonding to the active threonines. J Biol Chem 2005;280:28394-401.

61 Mlynarczuk-Bialy I, Roeckmann H, Kuckelkorn U, et al. Combined effect of proteasome and calpain inhibition on cisplatin-resistant human melanoma cells. Cancer Res 2006;66:7598-605.

62 Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. Blood 2008;111:2962-72.

63 Kyle RA. Monoclonal gammopathy of undetermined significance. Natural history in 241 cases. Am J Med 1978;64:814-26.

64 Kyle RA, Rajkumar SV. Monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering multiple myeloma. Hematol Oncol Clin North Am 2007;21:1093-113.

65 Cone L, Uhr JW. Immunological deficiency disorders associated with chronic lymphocytic leukaemia and multiple myeloma. J Clin Invest 1964;43:2241-8.

66 Sezer O. Myeloma bone disease: Recent advances in biology, diagnosis and treatment. Oncologist 2009;14:276-283.

67 Lentzsch S, Ehrlich LA, Roodman GD. Pathophysiology of multiple myeloma bone disease. Hematol Oncol Clin North Am 2007;21:1035-49.

68 Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Français du Myélome. N Engl J Med 1996;335:91-7.

69 Barlogie B, Alexanian R, Smallwood L, et al. Prognostic factors with highdose melphalan for refractory multiple myeloma. Blood 1988;72:2015-9.

70 Samson D, Gaminara E, Newland A, et al. Infusion of vincristine and doxorubicin with oral dexamethasone as first-line therapy for multiple myeloma. Lancet 1989;2:882-5.

71 Singhal S, Mehta J, Desikan R, et al. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. N Engl J Med 1999;341:1565-71.

72 Richardson PG, Schlossman RL, Weller E, et al. Immunomodulatory drug CC-5013 overcomes drug resistance and is well tolerated in patients with relapsed multiple myeloma. Blood 2002;100:3063–7.

73 Dimopoulos MA, Spencer A, Attal M, Prince M, Harousseau JL, Dmoszynska A. Study of lenalidomide plus dexamethasone versus dexamethasone alone in relapsed or refractory multiple myeloma: results of a phase 3 study (MM-010) Blood 2005;106 (ASH Annual Meeting Abstracts):6.

74 Kropff M, Bisping G, Schuck E, et al; Deutsche Studiengruppe Multiples Myelom. Bortezomib in combination with intermediate-dose dexamethasone and continuous low-dose oral cyclophosphamide for relapsed multiple myeloma. Br J Haematol 2007;138:330-7.

75 Davies FE, Wu P, Jenner M, Srikanth M, Saso R, Morgan GJ. The combination of cyclophosphamide, velcade and dexamethasone induces high response rates with comparable toxicity to velcade alone and velcade plus dexamethasone. Haematologica 2007;92:1149-50.

79

76 Palumbo A, Bringhen S, Caravita T, et al; Italian Multiple Myeloma Network, GIMEMA. Oral melphalan and prednisone chemotherapy plus thalidomide compared with melphalan and prednisone alone in elderly patients with multiple myeloma: randomised controlled trial. Lancet 2006;367:825-31.

77 Palumbo A, Falco P, Corradini P, et al; GIMEMA--Italian Multiple Myeloma Network. Melphalan, prednisone, and lenalidomide treatment for newly diagnosed myeloma: a report from the GIMEMA--Italian Multiple Myeloma Network. J Clin Oncol 2007;25:4459-65.

78 Harousseau JL, Mathiot C, Attal M et al. VELCADE/Dexamethasone (Vel/D) Versus VAD as Induction Treatment Prior to Autologous Stem Cell Transplantion (ASCT) in Newly Diagnosed Multiple Myeloma (MM): Updated Results of the IFM 2005/01 Trial. Blood 2007;110(Suppl 1): abstract 450.

79 Miguel JFS, Schlag R, Khuageva N, et al. MMY-3002: A Phase 3 Study Comparing Bortezomib-Melphalan-Prednisone (VMP) with Melphalan-Prednisone (MP) in Newly Diagnosed Multiple Myeloma. Blood 2007;110 (ASH Annual Meeting Abstracts):76.

80 Jagannath S, Durie BG, Wolf J, et al. Bortezomib therapy alone and in combination with dexamethasone for previously untreated symptomatic multiple myeloma. Br J Haematol 2005;129:776-83.

81 Oakervee HE, Popat R, Curry N, et al. PAD combination therapy (PS-341/bortezomib, doxorubicin and dexamethasone) for previously untreated patients with multiple myeloma. Br J Haematol 2005;129:755-62.

82 Oakervee H, Popat R, Cavenagh JD. Use of bortezomib as induction therapy prior to stem cell transplantation in frontline treatment of multiple myeloma: impact on stem cell harvesting and engraftment. Leuk Lymphoma 2007;48:1910-21.

83 Mateos MV, Hernandez JM, Hernandez MT, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: results of a multicenter phase 1/2 study. Blood 2006;108:2165-72.

84 Avet-Loiseau H. Role of genetics in prognostication in myeloma. Best Pract Res Clin Haematol 2007;20:625-35.

85 Tricot G, Barlogie B, Jagannath S, et al. Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities. Blood 1995;86:4250-6.

86 Drach J, Ackermann J, Fritz E, et al. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. Blood 1998;92:802–9.

87 Fonseca R, Blood E, Rue M, et al. Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma. Blood 2003;101:4569–4575.

88 Agnelli L, Bicciato S, Fabris S, et al. Integrative genomic analysis reveals distinct transcriptional and genetic features associated with chromosome 13 deletion in multiple myeloma. Haematologica 2007;92:56-65.

89 Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53, Nat Rev Cancer 2002;2:594–604.

90 Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell 1997;88:323–331.

91 Richelda R, Ronchetti D, Baldini L, et al. A novel chromosomal translocation t(4; 14)(p16.3; q32) in multiple myeloma involves the fibroblast growth-factor receptor 3 gene. Blood 1997;90:4062-70.

92 Plowright EE, Li Z, Bergsagel PL, et al. Ectopic expression of fibroblast growth factor receptor 3 promotes myeloma cell proliferation and prevents apoptosis. Blood 2000;95:992-8.

93 Kawano M, Hirano T, Matsuda T, et al. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. Nature 1988;332:83-5.

94 Chauhan D, Anderson KC. Mechanisms of cell death and survival in multiple myeloma (MM): Therapeutic implications. Apoptosis 2003;8:337-43.

95 Kruppa G, Thoma B, Machleidt T, Weigmann K, Kronke M. Inhibition of tumor necrosis factor (TNF)-mediated NF-kappa B activation by selective blockade of the human 55–kDa TNF receptor. J Immunol 1992;148:3152–7.

96 Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, et al. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. J Biol Chem 2002;277:16639-47.

97 Chauhan D, Uchiyama H, Akbarali Y, et al. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. Blood 1996;87:1104-12.

98 Platanias LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. Blood 2003;101:4667-79.

99 Hideshima T, Akiyama M, Hayashi T, et al. Targeting p38 MAPK inhibits multiple myeloma cell growth in the bone marrow milieu. Blood 2003;101:703-5.

100 Hideshima T, Chauhan D, Podar K, Schlossman RL, Richardson P, Anderson KC. Novel therapies targeting the myeloma cell and its bone marrow microenvironment. Semin Oncol 2001;28:607-12.

101 Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, Richardson P, Anderson KC. The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. Oncogene 2001;20:4519-27.

102 Podar K, Chauhan D, Anderson KC. Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy. Leukemia 2009;23:10-24.

103 Sezer O, Heider U, Jakob C, Eucker J, Possinger K. Human bone marrow myeloma cells express RANKL. J Clin Oncol 2002;20:353-4.

104 Vacca A, Ribatti D. Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. Leukemia 2006;20:193-9.

105 Jakob C, Sterz J, Zavrski I, et al. Angiogenesis in multiple myeloma. Eur J Cancer 2006;42:1581-90.

106 Abe M, Hiura K, Wilde J, et al. Osteoclasts enhance myeloma cell growth and survival via cell-cell contact: a vicious cycle between bone destruction and myeloma expansion. Blood 2004;104:2484-91.

107 Yaccoby S, Wezeman MJ, Henderson A, et al. Cancer and the microenvironment: myeloma-osteoclast interactions as a model. Cancer Res 2004;64:2016-23.

108 Giuliani N, Rizzoli V, Roodman GD. Multiple myeloma bone disease: Pathophysiology of osteoblast inhibition. Blood 2006;108:3992-6.

109 Roodman GD. Bone building with bortezomib. J Clin Invest 2008;118:462-4.

110 Zhou Y, Wang H, Fang W, et al. Incidence trends of mantle cell lymphoma in the United States between 1992 and 2004. Cancer 2008;113:791-8.

111 Vandenberghe E. Mantle cell lymphoma. Blood Rev 1994;8:79-87.

112 Dreyling M, Weigert O, Hiddemann W; European MCL Network. Current treatment standards and future strategies in mantle cell lymphoma. Ann Oncol 2008;19 Suppl 4:iv41-4.

113 Lenz G, Dreyling M, Hoster E et al. Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). J Clin Oncol 2005;23:1984– 92.

114 Tiemann M, Schrader C, Klapper W, et al; European MCL Network. Histopathology, cell proliferation indices and clinical outcome in 304 patients with mantle cell lymphoma (MCL): a clinicopathological study from the European MCL Network. Br J Haematol 2005;131:29-38.

115 Orlowski RZ, Stinchcombe TE, Mitchell BS, et al. Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies. J Clin Oncol 2002;20:4420-7.

116 Goy A, Younes A, McLaughlin P, et al. Phase II study of proteasome inhibitor bortezomib in relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol 2005;23:667-75.

117 Orlowski RZ, Nagler A, Sonneveld P, et al. Randomized phase III study of pegylated liposomal doxorubicin plus bortezomib compared with bortezomib alone in relapsed or refractory multiple myeloma: combination therapy improves time to progression. J Clin Oncol 2007;25:3892-901.

118 Fisher RI, Bernstein SH, Kahl BS, et al. Multicenter phase II study of bortezomib in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. J Clin Oncol 2006;24:4867-74.

119 Leonard JP, Schattner EJ, Coleman M. Biology and management of mantle cell lymphoma. Curr Opin Oncol 2001;13:342-7.

120 Bosch F, Jares P, Campo E, et al. PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: a highly specific marker of mantle cell lymphoma. Blood 1994;84:2726-32.

121 Rodig SJ, Healey BM, Pinkus GS, Kuo FC, Cin PD, Kutok JL. Mantle cell lymphoma arising within primary nodal marginal zone lymphoma: a unique presentation of two uncommon B-cell lymphoproliferative disorders. Cancer Genet Cytogenet 2006;171:44-51. 122 Zukerberg LR, Benedict WF, Arnold A, Dyson N, Harlow E, Harris NL. Expression of the retinoblastoma protein in low-grade B-cell lymphoma: relationship to cyclin D1. Blood 1996;88:268-76.

123 Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Genes Dev 1999;13:1501-12.

124 Ott MM, Bartkova J, Bartek J, et al. Cyclin D1 expression in mantle cell lymphoma is accompanied by downregulation of cyclin D3 and is not related to the proliferative activity. Blood 1997;90:3154-9.

125 Lukás J, Jadayel D, Bartkova J, Nacheva et al. BCL-1/cyclin D1 oncoprotein oscillates and subverts the G1 phase control in B-cell neoplasms carrying the t(11;14) translocation. Oncogene 1994;9:2159-67.

126 Quintanilla-Martinez L, Davies-Hill T, Fend F, et al. Sequestration of p27Kip1 protein by cyclin D1 in typical and blastic variants of mantle cell lymphoma (MCL): implications for pathogenesis. Blood 2003;101:3181-7.

127 Diehl JA, Zindy F, Sherr CJ. Inhibition of cyclin D1 phosphorylation on threonine-286 prevents its rapid degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. Genes Dev 1997;11:957-72.

128 Bloom J, Amador V, Bartolini F, DeMartino G, Pagano M. Proteasomemediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitinylation. Cell 2003;115:71-82.

129 Chiarle R, Budel LM, Skolnik J, et al. Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. Blood 2000;95:619-26.

130 Bogner C, Ringshausen I, Schneller F, et al. Inhibition of the proteasome induces cell cycle arrest and apoptosis in mantle cell lymphoma cells. Br J Haematol 2003;122:260-8.

131 Wang M, Han XH, Zhang L, et al. Bortezomib is synergistic with rituximab and cyclophosphamide in inducing apoptosis of mantle cell lymphoma cells in vitro and in vivo. Leukemia 2008;22:179-85.

132 Richardson PG, Briemberg H, Jagannath S, et al. Frequency, characteristics, and reversibility of peripheral neuropathy during treatment of advanced multiple myeloma with bortezomib. J Clin Oncol 2006;24:3113-20.

133 Katagiri S, Yonezawa T, Kuyama J, et al. Two distinct human myeloma cell lines originating from one patient with myeloma. Int J Cancer 1985;36:241-6.

134 Nilsson K, Bennich H, Johansson SG, Pontén J. Established immunoglobulin producing myeloma (IgE) and lymphoblastoid (IgG) cell lines from an IgE myeloma patient. Clin Exp Immunol 1970;7:477-89.

135 Chauhan D, Li G, Hideshima T, et al. Hsp27 inhibits release of mitochondrial protein Smac in multiple myeloma cells and confers dexamethasone resistance. Blood 2003;102:3379-86.

136 Matsuoka Y, Moore GE, Yagi Y, Pressman D. Production of free light chains of immunoglobulin by a hematopoietic cell line derived from a patient with multiple myeloma. Proc Soc Exp Biol Med 1967;125:1246-50.

137 Abe M, Nozawa Y, Wakasa H, Ohno H, Fukuhara S. Characterization and comparison of two newly established Epstein-Barr virus-negative lymphoma B-cell lines. Surface markers, growth characteristics, cytogenetics, and transplantability. Cancer 1988;61:483-90.

138 Tucker CA, Bebb G, Klasa RJ, et al. Four human t(11;14)(q13;q32)containing cell lines having classic and variant features of Mantle Cell Lymphoma. Leuk Res 2006;30:449-57.

139 Jeon HJ, Kim CW, Yoshino T, Akagi T. Establishment and characterization of a mantle cell lymphoma cell line. Br J Haematol 1998;102:1323-6.

140 Jadayel DM, Lukas J, Nacheva E, et al. Potential role for concurrent abnormalities of the cyclin D1, p16CDKN2 and p15CDKN2B genes in certain B cell non-Hodgkin's lymphomas. Functional studies in a cell line (Granta 519). Leukemia 1997;11:64-72.

141 Rudolph C, Steinemann D, Von Neuhoff N, et al. Molecular cytogenetic characterization of the mantle cell lymphoma cell line GRANTA-519. Cancer Genet Cytogenet 2004;153:144-50.

142 Santonocito AM, Consoli U, Bagnato S, et al. Flow cytometric detection of aneuploid CD38(++) plasmacells and CD19(+) B-lymphocytes in bone marrow, peripheral blood and PBSC harvest in multiple myeloma patients. Leuk Res 2004;28:469-77.

143 Campling BG, Pym J, Galbraith PR, Cole SP. Use of the MTT assay for rapid determination of chemosensitivity of human leukemic blast cells. Leuk Res 1988;12:823-31.

144 Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. Blood 1994;84:1415-20.

145 Allen RT, Hunter WJ 3rd, Agrawal DK. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. J Pharmacol Toxicol Methods 1997;37:215-28.

146 Lacombe F, Belloc F. Flow cytometry study of cell cycle, apoptosis and drug resistance in acute leukemia. Hematol Cell Ther 1996;38:495-504.

147 Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem 1985;150:76-85.

148 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227:680-5.

149 Salinovich O, Montelaro RC. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfatepolyacrylamide gel electrophoresis. Anal Biochem 1986;156:341-7.

150 Eytan E, Ganoth D, Armon T, Hershko A. ATP-dependent incorporation of 20S protease into the 26S complex that degrades proteins conjugated to ubiquitin. Proc Natl Acad Sci U S A 1989;86:7751-5.

151 Etlinger JD, Goldberg AL. A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. Proc Natl Acad Sci U S A 1977;74:54-8.

152 Ciechanover A, Elias S, Heller H, Ferber S, Hershko A. Characterization of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. J Biol Chem 1980;255:7525-8.

153 Omura S, Fujimoto T, Otoguro K, et al. Lactacystin, a novel microbial metabolite, induces neuritogenesis of neuroblastoma cells. J Antibiot (Tokyo) 1991;44:113-6.

154 Bharti AC, Donato N, Singh S, Aggarwal BB. Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates the constitutive activation of nuclear factor-kappa B and IkappaBalpha kinase in human multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and induction of apoptosis. Blood 2003;101:1053-62.

155 Fennell DA, Chacko A, Mutti L. BCL-2 family regulation by the 20S proteasome inhibitor bortezomib. Oncogene 2008;27:1189-97.

156 Göke R, Barth P, Schmidt A, Samans B, Lankat-Buttgereit B. Programmed cell death protein 4 suppresses CDK1/cdc2 via induction of p21(Waf1/Cip1). Am J Physiol Cell Physiol 2004;287:C1541-6.

157 Dorée M, Hunt T. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? J Cell Sci 2002;115:2461-4.

158 Hinz M, Krappmann D, Eichten A, Heder A, Scheidereit C, Strauss M. NFkappaB function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G0/G1-to-Sphase transition. Mol Cell Biol 1999;19:2690-8.

159 Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. Genes Dev 2004;18:2195-224.

160 Gilmore TD, Morin PJ. The I kappa B proteins: members of a multifunctional family. Trends Genet 1993;9:427-33.

161 Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S. Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. Genes Dev 1995;9:2723-35.

162 Krappmann D, Scheidereit C. A pervasive role of ubiquitin conjugation in activation and termination of IkappaB kinase pathways. EMBO Rep 2005;6:321-6.

163 Sethi G, Sung B, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB activation: from bench to bedside. Exp Biol Med 2008;233:21-31.

164 Martínez N, Camacho FI, Algara P, et al. The molecular signature of mantle cell lymphoma reveals multiple signals favoring cell survival. Cancer Res 2003;63:8226-32.

165 Ek S, Högerkorp CM, Dictor M, Ehinger M, Borrebaeck CA. Mantle cell lymphomas express a distinct genetic signature affecting lymphocyte trafficking and growth regulation as compared with subpopulations of normal human B cells. Cancer Res 2002;62:4398-405.

9 Eigene Publikationen

1 <u>Sterz J</u>, Jakob C, Kuckelkorn U, Heider U, Mieth M, Kaiser M, Lamottke B, Kloetzel PM, Sezer O, von Metzler I. BSc2118 is a Novel Proteasome Inhibitor with Activity against Multiple Myeloma (eingereicht).

2 Jakob C, Goerke A, Terpos E, <u>Sterz J</u>, Heider U, Kühnhardt D, Rötzer S, Kleeberg L, Mieth M, von Metzler I, Müller C, Sezer O. Serum levels of total-RANKL in multiple myeloma. Clin Lymphoma Myeloma 2009 (im Druck). IF: 1,596

3 Jakob C, <u>Sterz J</u>, Liebisch P, Mieth M, Rademacher J, Goerke A, Heider U, Fleissner C, Kaiser M, von Metzler I, Müller C, Sezer O. Incorporation of the bone marker carboxy-terminal telopeptide of type-1 collagen improves prognostic information of the International Staging System in newly diagnosed symptomatic multiple myeloma. Leukemia 2008;22:1767-72. IF: 8,634

4 <u>Sterz J</u>, von Metzler I, Hahne JC, Lamottke B, Rademacher J, Heider U, Terpos E, Sezer O. The potential of proteasome inhibitors in cancer therapy. Expert Opin Investig Drugs 2008;17:879-95. IF: 4,058

5 Heider U, von Metzler I, Kaiser M, Rosche M, <u>Sterz J</u>, Rötzer S, Rademacher J, Jakob C, Fleissner C, Kuckelkorn U, Kloetzel PM, Sezer O. Synergistic interaction of the histone deacetylase inhibitor SAHA with the proteasome inhibitor bortezomib in mantle cell lymphoma. Eur J Haematol 2008;80:133-42. IF: 2,237

6 Jakob C, Egerer K, Liebisch P, Türkmen S, Zavrski I, Kuckelkorn U, Heider U, Kaiser M, Fleissner C, <u>Sterz J</u>, Kleeberg L, Feist E, Burmester GR, Kloetzel PM, Sezer O. Circulating proteasome levels are an independent prognostic factor for survival in multiple myeloma. Blood 2007;109:2100-5. IF: 10,896

7 Hecht M, Heider U, Kaiser M, von Metzler I, <u>Sterz J</u>, Sezer O. Osteoblasts promote migration and invasion of myeloma cells through upregulation of matrix metalloproteinases, urokinase plasminogen activator, hepatocyte growth factor and activation of p38 MAPK. Br J Haematol 2007;138:446-58. IF: 4,490

8 von Metzler I, Krebbel H, Hecht M, Manz RA, Fleissner C, Mieth M, Kaiser M, Jakob C, <u>Sterz J</u>, Kleeberg L, Heider U, Sezer O. Bortezomib inhibits human osteoclastogenesis. Leukemia 2007;21:2025-34. IF: 6,924

9 Zavrski I, Kleeberg L, Kaiser M, Fleissner C, Heider U, <u>Sterz J</u>, Jakob C, Sezer O. Proteasome as an emerging therapeutic target in cancer. Curr Pharm Des 2007;13:471-85. IF: 4,868 10 Jakob C, <u>Sterz J</u>, Zavrski I, Heider U, Kleeberg L, Fleissner C, Kaiser M, Sezer O. Angiogenesis in multiple myeloma. Eur J Cancer 2006;42:1581-90. IF: 4,167

11 Eucker J, Sterz J, Krebbel H, Zavrski I, Kaiser M, Zang C, Heider U, Jakob C, Elstner E, Sezer O. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit proliferation and induce apoptosis in mantle cell lymphoma. Anticancer Drugs 2006;17:763-9. IF: 2,245

12 Kaiser M, Zavrski I, <u>Sterz J</u>, Jakob C, Fleissner C, Kloetzel PM, Sezer O, Heider U. The effects of the histone deacetylase inhibitor valproic acid on cell cycle, growth suppression and apoptosis in multiple myeloma. Haematologica 2006;91:248-51. IF: 5,032

13 Heider U, Kaiser M, <u>Sterz J</u>, Zavrski I, Jakob C, Fleissner C, Eucker J, Possinger K, Sezer O. Histone deacetylase inhibitors reduce VEGF production and induce growth suppression and apoptosis in human mantle cell lymphoma. Eur J Haematol 2006;76:42-50. IF: 1,863

Summe der Impact Faktoren: 57,01

Erklärung an Eides Statt

Ich, Jan Friedrich Sterz geb. am 15.07.1976 in Lich, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Wirkungen des Proteasominhibitors BSc2118 beim multiplen Myelom und Mantelzelllymphom" 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.

Datum: 12.08.2009

Unterschrift:

(Jan Friedrich Sterz)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Orhan Sezer, der diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht hat, und der mir mit seiner engagierten Betreuung während der letzten Jahre immer zur Seite stand. Weiterhin bedanke ich mich bei meinen beiden Betreuern Dr. med. Christian Jakob und Dr. med. Ivana von Metzler für die Einführung in das Forschungsgebiet, die gute Zusammenarbeit und stetige Betreuung seither. Ebenso möchte ich mich herzlich bei allen anderen Mitarbeitern der Klinik bedanken, dir mir durch ihr Wissen oder ihre Tätigkeit beruflich und privat beigestanden haben. Selbstverständlich möchte ich auch meine Eltern und Freunde in diese Danksagung einbinden, denn ohne sie wäre die ganze Arbeit ebenso wenig realisierbar gewesen.

Curriculum vitae

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