

**Medizinische Klinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München**



Dissertation

**Der Proteasominhibitor S-2209 induziert Apoptose und
Zellwachstumsarrest in Multiplen Myelomzellen**

Karin Anne Lydia Müller

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. M. Reincke

**Der Proteasominhibitor S-2209 induziert Apoptose und Zell-
wachstumsarrest in Multiplen Myelomzellen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Karin Anne Lydia Müller

aus

Rotthalmünster

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:
PD Dr.med. Ralf Schmidmaier

Mitberichterstatter:
PD Dr. med. Karsten Spiekermann
PD Dr. med. Marcus Hentrich

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:
Dr.med. Philipp Baumann

Dekan:
Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 10.02.2011

*Für
Meine Familie,
Wael und Sonja*

Inhaltsübersicht

Inhaltsübersicht	I
1 Einleitung: Das Multiple Myelom und neue Therapieansätze.....	1
2 Material und Methoden	18
2.1 Der Proteasominhibitor S-2209	18
2.2 Zellkultur.....	18
2.3 Zellvitalitätsmessungen im WST-1 - Proliferationsassay.....	21
2.4 Durchflusszytometrische Analysen	21
2.5 Western Blot.....	24
2.6 Proteasom <i>in vitro</i> Assay	28
2.7 NFκB Inhibitions-Assay	29
2.8 Toxizitätsstudie im Rattenmodell	30
2.9 Proteasom <i>ex vivo</i> Assay	30
2.10 Statistik	31
3 Ergebnisse.....	32
3.1 Das Semipeptid-Carbazon S-2209 wirkt als Proteasominhibitor	32
3.2 S-2209 induziert Apoptose und inhibiert Zellwachstum in humanen Multiplen Myelomzellen	37
3.3 S-2209 zeigt ein günstiges Toxizitätsprofil <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	44
3.4 S-2209 führt zu verminderter Expression von MCL-1, Aktivierung von JNK und erhöhter Expression von p53	47
3.5 S-2209 zeigt eine gesteigerte Wirksamkeit in Kombination mit klassischen Zytostatika in der Therapie des Multiplen Myeloms	51
4 Diskussion	53
4.1 Proteasominhibitoren spielen eine wichtige Rolle in der Therapie des Multiplen Myeloms.....	54
4.2 Der Transkriptionsfaktor NFκB wirkt antiapoptotisch und wird durch Proteasominhibitoren gehemmt.....	59
4.3 S-2209 führt zu einer Stress-induzierten Zellantwort und beeinflusst die Regulation des Zellzyklus.....	61
5 Zusammenfassung.....	65
Anhang 1: Verwendete Materialien und Methoden	67

Anhang 2: Geräte	71
Abbildungsverzeichnis	73
Abkürzungsverzeichnis	74
Literaturverzeichnis	76
Danksagung.....	89
Eidesstattliche Erklärung	90

1 Einleitung: Das Multiple Myelom und neue Therapieansätze

Als hämatologische Erkrankung zählt das Multiple Myelom laut WHO-Klassifikation zur Gruppe der B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome und ist gekennzeichnet durch die Proliferation von klonalen Plasmazellen im Knochenmark. Charakteristisch sind neben der Bildung monoklonaler Immunglobuline eine Insuffizienz der physiologischen Hämatopoese durch Verdrängung, Osteolysen, Nierenfunktionsstörungen und eine erhöhte Infektionsneigung (Cavo et al., 2008).

Der Verlauf der Krankheit ist sehr heterogen und kann unterschiedliche Stadien durchlaufen. Diese reichen von der Präkanzerose, der sogenannten monoklonalen Gammopathie unklarer Signifikanz (MGUS) über das langsam progrediente, asymptomatisch verlaufende Multiple Myelom zum symptomatischen aktiven Myelom bis hin zur Plasmazell-Leukämie. Die Überlebenszeit ab Diagnosestellung variiert dementsprechend und kann sich über Monate bis Jahrzehnte erstrecken in Abhängigkeit von Erkrankungsstadium und Prognosefaktoren.

Epidemiologie

In Europa liegt die Inzidenz bei 4 Neuerkrankungen pro 100 000 Einwohner pro Jahr. Männer sind häufiger betroffen als Frauen. Das Multiple Myelom ist eine Erkrankung des höheren Lebensalters, sehr selten wird die Diagnose vor dem 40. Lebensjahr gestellt. Der Gipfel liegt zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr (Alexander et al., 2007). Das mittlere Alter der betroffenen Männer beträgt 62 Jahre, das der betroffenen Frauen 61 Jahre (Ries et al., 2002). Bei etwa 1% der Neoplasien und 13% aller hämatologischen Malignome handelt es sich um ein Multiples Myelom. Der Nachweis eines monoklonalen Proteins („Paraprotein“) im Serum oder Urin dient als charakteristischer biologischer Marker. Ein sekretorisches Myelom findet man in 95% der Fälle. Davon produzieren 55% IgG, 25% IgA und 1% IgD, IgE oder IgM. Leichtketten-produzierende Myelome (κ - oder λ -Leichtketten) findet man in 20%. Mit einer Häufigkeit von 1-5% tritt ein „nicht-sekretorisches“ Myelom auf (Kyle et al., 2003).

Pathogenese

Ausgangspunkt dieser monoklonalen Neoplasie der Plasmazelle ist eine einzelne B-Zelle, die zumeist außerhalb des Knochenmarks in peripheren lymphatischen Organen ihre Differenzierung zur antikörperproduzierenden Plasmazelle beginnt und zur Myelomzelle entartet (Hallek et al., 1998).

Molekulargenetische Veränderungen werden als Ausgangspunkt der Myelomentwicklung vermutet. In mehr als 50% der Fälle handelt es sich um chromosomale Aberrationen: Chromosom 13 (del 13q14), Chromosom 14 (Immunglobulinlokus, t(11;14), t(4;14)), Chromosom 11 (bcl-1, Cyclin D) oder Chromosom 8 (c-myc) sind oft betroffen. Sehr häufig (67-90% der Fälle) findet man eine anormale Chromosomenanzahl (Fonseca et al., 2007). Weitere Mutationen, wie die p53-Mutation, führen zum Stromaunabhängigen Wachstum und zur Entkopplung der Zellregulation (Kuehl et Bergsagel, 2002).

Mit Ausnahme der Plasmazelleukämie sind die Tumorzellen überwiegend im Knochenmark lokalisiert; die Myelomzellen - wie auch physiologische Plasmazellen - sind auf Interaktionen mit dem Knochenmarkstroma angewiesen, denn dieses vermittelt Signale für Zellwachstum und -überleben. Im Knochenmark adhären die Myelomzellen und fügen sich in das "Microenvironment" ein (Schmidmaier et al., 2004; Schmidmaier et al., 2006). Dieses besteht hauptsächlich aus Knochenmarksstromazellen, welche eine Vielzahl von Zytokinen sezernieren, wie Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) sowie Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10) und Stromal-Derived Factor-1 (SDF-1) (Baumann et al., 2007; Baumann et al., 2008; Roecklein et al., 1995). Diese Zytokine fördern über Signalwege (Abb. 1) wie JAK/STAT, Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt und NFκB Überleben, Proliferation und Migration der Tumorzellen (Brodt et al., 2000; Sanda et al., 2005, Bisping et al., 2005; McCubrey et al., 2006).

Die Signalwege der MAP-Kinasen (MAPK) stehen über spezifische Transkriptionsfaktoren in engem physiologischem Zusammenhang mit Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Apoptose und Kontrolle der Genexpression. Zu den MAPK zählen ERK 1 und ERK 2, die durch Mitogene aktiviert werden, sowie die c-Jun-NH₂-terminalen Kinasen JNK 1 und JNK 2. JNK-Kaskaden können durch Zytokine, Entzündungsmediatoren und Stress aktiviert werden, daher werden sie als „Stress-aktivierte“-Proteinkinasen bezeichnet (Tanoue et Nishida, 2003; Chang et Karin, 2001). Sie sind für die Regulation von Apoptose und Zellproliferation zuständig. Die Aktivierung der MAPK kann zur Phosphorylierung einer Reihe zytoplasmatischer oder nukleärer Proteine, z.B. verschiedener Transkriptionsfaktoren führen, welche wiederum Zielgene des Zellzyklus induzieren. JNK inaktiviert das anti-apoptotische Bcl-2 durch Phosphorylierung und aktiviert pro-apoptotische Faktoren wie Bax.

Außerdem exprimieren die Stromazellen des Knochenmarks auf der Oberfläche Adhäsionsmoleküle wie z.B. ICAM-1 und VCAM, an welche Myelomzellen binden können (Roecklein et al., 1995; Schmidmaier et al., 2004).

Durch das im Knochenmark vorherrschende Zytokinmilieu und durch die Adhäsion der Myelomzellen über Integrine werden die Tumorzellen weniger chemosensibel, weshalb der Begriff „*Cell Adhesion Mediated Drug Resistance*“ eingeführt wurde. Dies ist für Doxorubicin und Melphalan beschrieben (Damiano et al., 1999; Schmidmaier et al., 2004; Schmidmaier et al., 2006; Baumann et al., 2008). Die Adhäsion bewirkt einen Schutz gegen Zytostatika-induzierte Apoptose und erhöht die Nuclear-Factor-Kappa-B (NF- κ B)-abhängige Transkription (Urashima et al., 1996).

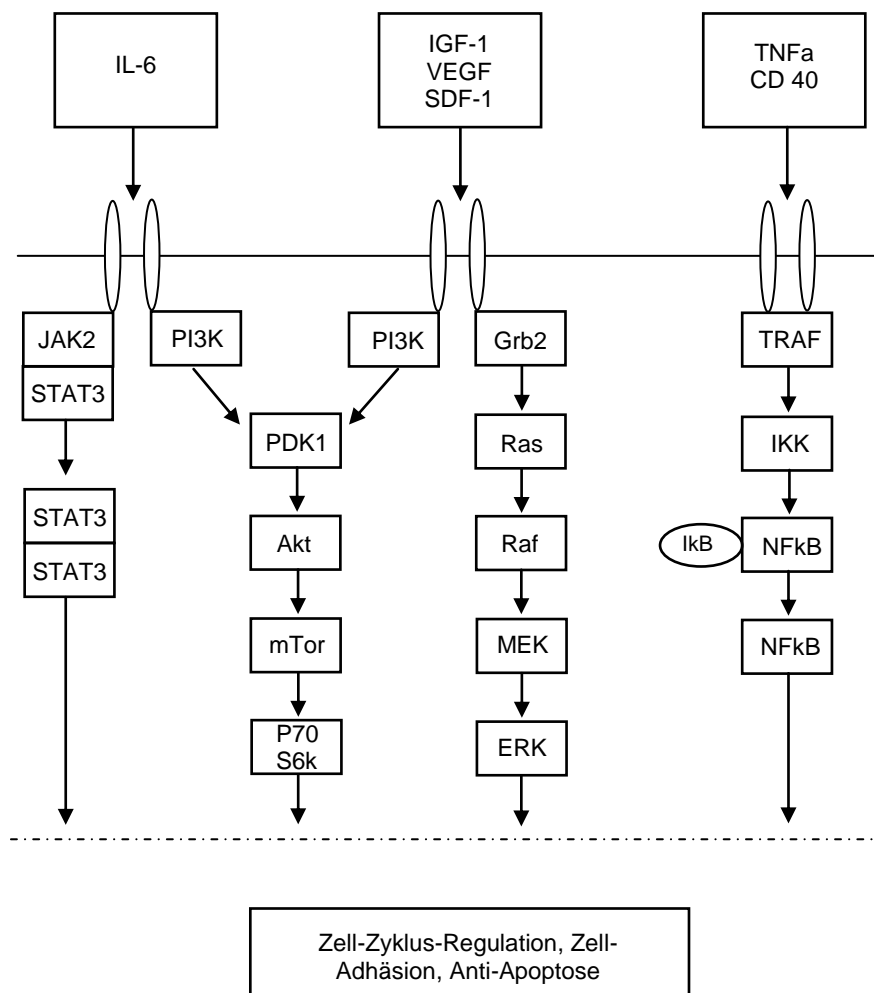


Abbildung 1: Klassische Signaltransduktionswege zur Regulation von Apoptose, Zell-Zyklus und Zell-Adhäsion.

Vereinfachte Darstellung

Krankheitsverlauf

Das Multiple Myelom und die gesteigerte Immunglobulinsynthese sowie die Reaktion des Patienten führen zu Funktionsstörungen unterschiedlicher Organe und zu verschiedenen Symptomen.

Häufigstes Symptom sind Knochenschmerzen, welche bei 70% der Patienten auftreten und vor allem in der Lendenwirbelsäule und in den Rippen lokalisiert sind. Ursache für die Schmerzsymptomatik sind Osteolysen, die aufgrund von Tumorzellproliferation und Osteoklastenaktivierung entstehen. Diese können zu pathologischen Frakturen und radikulären Symptomen führen.

Zweithäufigstes klinisches Problem ist die erhöhte Infektanfälligkeit der Patienten, welche sich vor allem in fortgeschrittenen Stadien als lebensbedrohliche Sepsis manifestieren kann. Ursache ist eine funktionelle Hypogammaglobulinämie, verursacht durch verminderte Produktion und erhöhten Abbau physiologischer Antikörper. Besonders häufig zeigen sich bakterielle Infektionen des Respirationstrakts mit protrahiertem Verlauf (Rajkumar et al., 2009).

Bei 97% aller Patienten findet sich im Verlauf der Erkrankung eine meist normozytäre, normochrome Anämie. Diese kann sich wegen des verdrängenden Wachstums der Myelomzellen und Hemmung der physiologischen Hämatopoese sowie aufgrund von Mangel an Erythropoetin entwickeln (Kyle et al., 2003). Hämorrhagische Diathesen durch inaktivierte Gerinnungsfaktoren treten häufig bei gleichzeitiger Thrombozytopenie auf und verursachen Blutungskomplikationen.

Der Großteil der Patienten wird auch durch eine Niereninsuffizienz auffällig. 25% der Patienten haben zum Zeitpunkt der Diagnose Serumkreatininwerte von größer 2mg/dl. Weitere 25% der Patienten weisen leicht erhöhte Serumkreatininspiegel auf (Kyle et al., 2003). Das Nierenversagen ist Folge vieler verschiedener Faktoren, einschließlich der vermehrten Bildung von Paraprotein und der Hyperkalzämie infolge des Knochenabbaus. Myelomassozierte Nierenschäden betreffen hauptsächlich das Tubulus-System. Freie Leichtketten können die Glomeruli passieren und werden in den proximalen Tubuli resorbiert und abgelagert. Im Unterschied dazu führen glomeruläre Defekte zu einer unspezifischen Ausscheidung von Proteinen. Auch glomeruläre Amyloidablagerungen können, vor allem beim Leichtkettenmyelom mit Nachweis von Bence-Jones-Proteinen im Urin, die Ursache einer Niereninsuffizienz sein (Lamerz et al., 2002).

Die Krankheitsstadien der Myelompatienten werden nach den Kriterien der im Jahr 2003 veröffentlichten Einteilung der International Myeloma Working Group (IMWG, International Myeloma Working Group, 2003) drei Kategorien zugeordnet, der monoklonalen Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS), dem asymptomatischen und dem symptomatischen Myelom. Diese Klassifikation führt als wesentliches Kriterium die myelombedingten Endorganschäden auf. Sie berücksichtigt Anämie, Niereninsuffizienz, Hyperkalzämie und Osteolysen, woraus die Therapieindikation abgeleitet wird.

Die Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz ist durch das Vorhandensein eines monoklonalen Proteins gekennzeichnet, ohne Symptome oder andere Kriterien für die Diagnose eines Multiplen Myeloms. MGUS tritt bei etwa 1% der Bevölkerung auf. Charakteristisch ist ein Serum-M-Protein-Spiegel $<30\text{g/l}$, klonale Plasmazellen im Knochenmark $<10\%$ und keine Gammopathie-assoziierten Endorganschäden.

Patienten mit einem asymptomatischen Multiplen Myelom weisen ein monoklonales Protein und eine erhöhte Anzahl von klonalen Plasmazellen im Knochenmark auf. Anämie und/oder einige wenige Knochenläsionen können auftreten, die Patienten sind jedoch beschwerdefrei. Die Erkrankung schreitet meist über Monate oder Jahre hinweg nicht fort. Charakteristisch für das „Smoldering“ Myelom ist ein Serum-M-Protein-Spiegel $>30\text{g/l}$ und/oder klonale Plasmazellen im Knochenmark $\geq 10\%$, jedoch keine Myelom-assoziierten Endorganschäden oder Symptome.

Patienten, die Symptome aufweisen, zeigen typischerweise M-Protein in Serum und/oder Urin, klonale Plasmazellen im Knochenmark $> 30\%$, $> 90\%$ Plasmazellen mit aberrantem Phänotyp (Durchflusszytometrie) und Myelom-assoziierte Endorganschäden wie Anämie, Nierenversagen, Hyperkalzämie oder Knochenläsionen

Weitere Formen sind das „nicht-sekretorische“ Multiple Myelom oder solitäre intra- und extramedullär gelegene Plasmozytome, die gesondert betrachtet werden müssen.

Bei Patienten mit symptomatischem Myelom ist unmittelbar eine Behandlung erforderlich.

Die klassische Stadieneinteilung nach Durie und Salmon, die im Jahr 1975 eingeführt wurde, wurde durch die Klassifikation der International Myeloma Working Group weitestgehend abgelöst. Nach Salmon und Durie erfolgte die Einteilung in Abhängigkeit von Hämoglobin, Serumkalzium, Ausmaß der Knochenläsionen und Paraproteinkonzentration.

Die klinische Stadieneinteilung der symptomatischen Myelompatienten wird ergänzt durch die Kriterien nach dem International Staging System (ISS, Greipp et al., 2005). Eine wichtige Rolle spielt hierbei die Bestimmung der prognostisch relevanten Faktoren β 2-Microglobulin und Serumalbumin, wodurch eine prognostische Einschätzung vor Einleitung der Therapie möglich wird.

Internationales Staging System (ISS)	
Stadium I	β 2-Microglobulin-Wert < 3.5 mg/l und Albumin \geq 3.5 g/dl
Stadium II	β 2-Microglobulin-Wert < 3.5 mg/l und Albumin < 3.5 g/dl oder β 2-Microglobulin 3.5 - 5.5 mg/l
Stadium III	β 2-Microglobulin-Wert > 5.5 mg/l

Weitere Prognosefaktoren wie die Dauer der Vortherapie, verschiedene Laborparameter wie z.B. C-reaktives Protein (CRP), Lactatdehydrogenase (LDH), Kreatininwerte und die Zytogenetik können zur Planung der individuellen Therapien herangezogen werden (Harousseau et Moreau, 2009).

Die frühzeitige Berücksichtigung des myelombedingten Endorganschadens sowie der Prognosefaktoren stellt ein wesentliches Kriterium in der modernen, risikoadaptierten Therapie des Multiplen Myeloms dar.

Therapie

Die Standardtherapie des Multiplen Myeloms bestand über Jahrzehnte aus einer Kombinationstherapie mit Melphalan und Prednisolon, eingeführt 1968 von Alexanian et al. Zudem wurde in der Vergangenheit auch Cyclophosphamid oder Vincristin mit Doxorubicin und Dexamethason (VAD) eingesetzt. Mit diesem konventionellen Therapieprotokoll werden Remissionsraten um 70% bei neudiagnostizierten Patienten und denen mit Rezidiv erreicht (Ludwig et al., 2004), das mittlere Überleben konnte auf drei Jahre gesteigert werden. Nur 5% der Myelompatienten waren unter dieser Therapie zehn Jahre nach Diagnosestellung noch am Leben.

Die unterschiedlichen Kombinationen von Alkylanzien, Anthrazyklinen, Glukokortikoiden, Vincristin, Etoposid und Platinderivaten ergeben zunächst höhere Ansprechraten und schnelleres Eintreten der Wirkung als bei Melphalan-Monotherapie. Sie sind jedoch mit einer höheren Toxizität verbunden. Im Verlauf der Erkrankung zeigte bisher weder eine andere Monochemotherapie noch eine kombinierte Polychemotherapie ein überlegenes Wirkprofil oder einen Überlebensvorteil gegenüber der Monotherapie mit Melphalan (Gregory et al., 1992; Myeloma Trialists' Collaborative Group, 1998).

Hochdosischemotherapie mit Melphalan und Stammzelltransplantation

Die Eskalation von Melphalan zur Hochdosischemotherapie (HDCT), welche durch eine autologe Stammzell-Transplantation ermöglicht wird, die die therapieassoziierte Mortalität deutlich gesenkt hat, konnte einen signifikanten Überlebensvorteil erbringen und erreicht hohe Remissionsraten. Die autologe Knochenmarktransplantation konnte durch die autologe Blutstammzelltransplantation mit durch Granulozyten-Colony-Stimulating-Faktor (G-CSF) mobilisierten Stammzellen weitgehend abgelöst werden. Sie erwirkt eine noch schnellere hämatopoetische Regeneration. Mit einer zweiten HDCT ist eine weitere Steigerung der Rate der kompletten Remissionen möglich (Attal et al., 1996; Barlogie et al., 1999; Child et al., 2003; Palumbo et al., 2004; Attal et al., 2003; Palumbo et al., 2009).

Dennoch geht die hochdosierte Melphalan-Gabe mit einer erhöhten Mortalität aufgrund der Myelosuppression vor allem bei älteren Patienten einher, weshalb diese Patienten als Risikogruppe einzuordnen sind und die Hochdosistherapie nicht mit vertretbarem Risiko eingeleitet werden kann.

Bei älteren Patienten besteht die Therapie aktuell zumeist in intermittierenden Zyklen von Melphalan in Kombination mit Prednison und Thalidomid oder Bortezomib bzw. Lenalidomid in Kombination mit Dexamethason (Attal et Harrousseau, 2009).

Die Standardtherapie bei jüngeren Patienten besteht derzeit aus einer Induktionschemotherapie, gefolgt von einer (Tandem-)Hochdosis-Chemotherapie mit Melphalan, welche durch eine autologe Stammzelltransplantation ermöglicht wird.

Durch die Stammzelltransplantation können mittlere Überlebenszeiten von 5,5 Jahren erreicht werden (Jantunen et al., 2006) und auch nach erneuter autologer Stammzelltransplantation nach Rezidiv kann eine Verbesserung des Gesamtüberlebens erreicht werden (Elice et al., 2006).

Des Weiteren kann eine allogene Stammzelltransplantation mit myeloablativer Konditionierung durchgeführt werden, für die ein guter Graft-versus-Myelom-Effekt gezeigt

werden konnte, der sich in einer Rate der kompletten Remissionen von 30% widerspiegelt. Komplikativ können eine Graft-versus-Host-Erkrankung und Infektionen auftreten (Bruno et al., 2007; Corradini et al., 2003). Dieses Verfahren steht aufgrund der hohen Frühmortalität fast ausschließlich für jüngere refraktäre Patienten (< 55 Jahre) zur Verfügung (Bruno et al., 2009).

Trotz der Therapiefortschritte in den letzten Jahren ist eine Heilung im Großteil der Fälle nicht möglich. Im Verlauf der Therapie kommt es zur Ausbildung einer Resistenz gegen die Zytostatika (Gregory et al., 1992; Femand et al., 1998; Attal et al., 2001). Nach einem Progress der Grunderkrankung versterben die meisten Patienten an einer Infektion oder den Folgen der Niereninsuffizienz.

Daher sind Substanzen mit anderen Wirkungsmechanismen und Angriffspunkten als die der konventionellen Zytostatika Gegenstand wissenschaftlicher Forschung.

Thalidomid und Lenalidomid

Als erste innovative und aktive Substanz, die Bestandteil von Kombinationstherapien des Multiplen Myeloms wurde, ist das Sedativum Thalidomid zu nennen (Glasmacher et al., 2006; Singhal et al., 2000). Thalidomid hat eine immunmodulierende Funktion, hemmt die Gefäßneubildung, wirkt antiproliferativ auf Myelomzellen und Stromazellen und hat Einfluss auf das Mikroenvironment im Knochenmark. Die Ansprechrate einer Thalidomid-Monotherapie liegt bei 30% und in Kombination mit Dexamethason bei ca. 60%. Häufige Nebenwirkungen sind Müdigkeit, Polyneuropathie, Obstipation, thromboembolische Ereignisse und Hautveränderungen. Aufgrund der Teratogenität ist die Anwendung von Thalidomid während der Schwangerschaft streng kontraindiziert, es gelten strenge Auflagen bezüglich des klinischen Einsatzes. Thalidomid wird unter anderem in Kombination mit Melphalan und Prednison als „First Line“-Therapie bei älteren Myelom-Patienten (>65 Jahre) eingesetzt, oder bei solchen, die für eine Hochdosis-Chemotherapie nicht in Frage kommen (Richardson et al., 2004; Palumbo et al., 2009).

Sein Derivat Lenalidomid besitzt im Vergleich zu Thalidomid ein höheres immunmodulatorisches Potential und günstigeres Nebenwirkungsprofil. Es wirkt antiangiogenetisch, antiproliferativ und proerythropoetisch. Lenalidomid wird in Kombination mit Dexamethason zur Behandlung von Patienten mit Multiplem Myelom mit mindestens einer Vortherapie eingesetzt (Palumbo et al., 2008; Thomas et al., 2007).

Sein Einsatz ist limitiert durch die ausgeprägte Suppression des Knochenmarks bei vortherapierten und älteren Patienten, die vor allem mit Neutropenie und Thrombozy-

topenie einhergeht. Tiefe Beinvenenthrombosen und pulmonale Embolien sind beschrieben. Wie bei Thalidomid ist auch die Anwendung von Lenalidomid während der Schwangerschaft aufgrund der Teratogenität streng kontraindiziert. Bei eingeschränkter Nierenfunktion wird zu Beginn der Therapie eine Dosisanpassung empfohlen. Lenalidomid als Monotherapie und in Kombination mit Dexamethason zeigt bei Patienten mit refraktärem oder rezidiviertem Myelom vielversprechende Ansprechraten (Rajkumar et al., 2006; Rajkumar et al., 2007; Palumbo et Gay, 2009).

Der Unterschied von Thalidomid und Lenalidomid wird derzeit in einer Studie der französischen Myelomgruppe (IFM MM020 Studie) untersucht. Die Ergebnisse der Zulassungsstudie einer Erstlinientherapie mit Melphalan und Prednison versus Chemotherapie mit Melphalan, Prednison und Lenalidomid bei älteren Patienten werden in Kürze erwartet.

Das Proteasom und Proteasominhibitoren

Der Abbau vieler an der Regulation der Zellzyklusprogression beteiligter Proteine wird durch das Proteasom katalysiert. Deshalb stellt die Inhibierung des Proteasoms einen neuen therapeutischen Ansatz bei der Behandlung von Tumorerkrankungen dar, da diese einen hohen Proteinstoffwechsel aufweisen.

Auf diesem Gebiet sind in den letzten Jahren große Fortschritte durch die Herstellung synthetischer Proteasominhibitoren mit verschiedenen Angriffspunkten erreicht worden. Die Mehrzahl dieser Inhibitoren blockiert die Chymotrypsin-artigen Aktivitäten des Proteasoms. Durch die Hemmung dieser Aktivitäten wird die Proteindegradation in der Zelle signifikant verringert. Mit dem Einsatz von Inhibitoren der Trypsin- und Peptidyl-Glutamyl-artigen Aktivitäten des Proteasoms konnte dagegen nur eine geringe Reduktion des zellulären Proteinabbaus erreicht werden (Kisselev et al., 2001).

Aufbau und Funktion des Proteasoms

Proteasomen sind große Multienzymkomplexe, die zahlreich im Zytoplasma und im Zellkern eukaryoter Zellen lokalisiert sind (Reidlinger et al., 1997). Sie dienen dem kontrollierten Abbau von Proteinen in der Zelle und tragen somit wesentlich zur Regulation der Stoffwechselvorgänge bei.

Das humane Proteasom (26S) besteht aus einer 20S- und zwei 19S-Untereinheiten, die ihrerseits aus mehreren Proteinen zusammengesetzt sind (Abb. 2).

Die 20S-Untereinheit wirkt als multikatalytische Protease, die aus vier Ringen besteht, die aus jeweils 7 Untereinheiten zusammengesetzt sind. Die beiden äußeren Ringe

bestehen aus α -Untereinheiten ($\alpha 1$ bis $\alpha 7$), welche der Substraterkennung dienen. Die beiden inneren Ringe bestehen aus β -Untereinheiten ($\beta 1$ bis $\beta 7$) und zeigen proteolytische Aktivität.

Entsprechend ihrer Spaltpräferenzen werden Chymotrypsin-artige, Trypsin-artige und Peptidyl-Glutamylhydrolysierende (Caspase-artige) Aktivitäten des Proteasoms unterschieden. Bei der Protease handelt es sich um eine Threoninprotease (Groll et al., 2001).

Die 19S-Komplexe (Rpn- und Rpt-Proteine) regulieren den Zugang zum 20S-Komplex und identifizieren zum Abbau bestimmte Proteine. Rpn erkennt die für den Abbau markierten Proteine anhand von Ubiquitinmolekülen und bindet diese. Die Kopplung des Ubiquitins an die entsprechenden Proteinsubstrate ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem unter ATP-Verbrauch verschiedene Ubiquitin-konjugierende Enzyme (E1, E2, E3 und E4) aktiviert werden (Koegl et al., 1999; Pickart et al., 2001). Die Substratspezifität dieser Enzyme erlaubt hochspezifische Reaktionen, die notwendig sind, um eine koordinierte Degradation zellulärer Proteine zu gewährleisten (Adams et al., 2003). Rpt-Proteine dagegen hydrolysieren Adenosintriphosphat (ATP).

Das 26S Proteasom ist die wichtigste extralysosomale Protease der Zelle mit katalytischen Untereinheiten, die ubiquitinierte Peptide als Substrate erkennt und abbaut. Auf diese Weise ist das Proteasom an der posttranskriptionellen Regulation einer großen Anzahl von Proteinen beteiligt, die für die Zellzykluskontrolle, Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Apoptose von großer Bedeutung sind. In den malignen Zellen ist eine gesteigerte proteasomale Aktivität und Degradation der Zellzyklus regulierenden Proteine zu finden. Die Hemmung der Proteasom-Aktivität führt zur Wachstumshemmung und Apoptose.

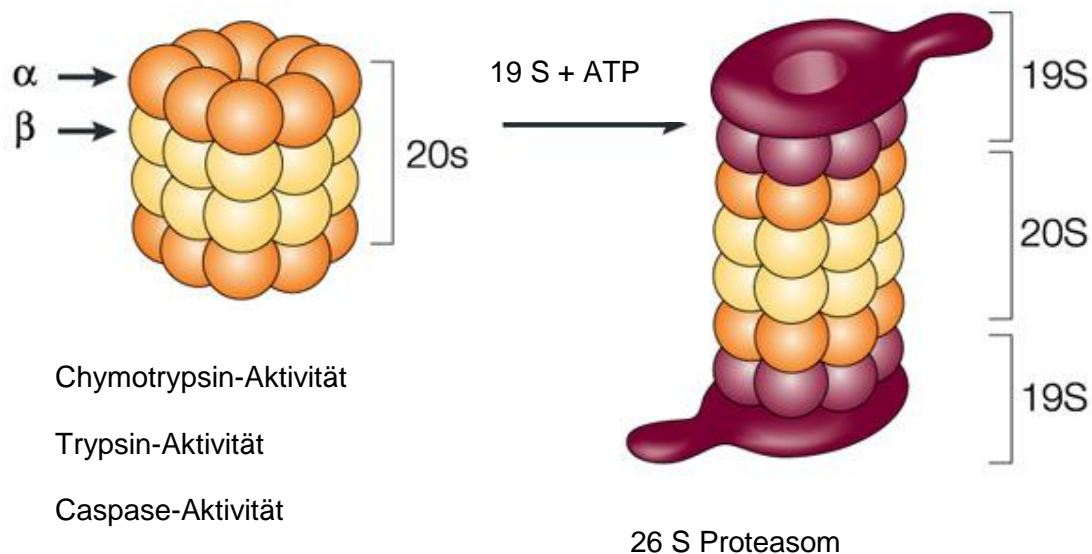


Abbildung 2: Aufbau des Proteasoms.

Die schematische Darstellung (nach Adams et al., 2004) zeigt die Lokalisation der Untereinheiten und der katalytisch aktiven Zentren.

Auch die Aktivität mehrerer Transkriptionsfaktoren wie p53, c-Jun, c-Fos, NF- κ B/I κ B unterliegt der Kontrolle des Ubiquitin-/Proteasom-Systems (Rolfe et al., 1997).

Da der Umsatz von Protein in malignen Zellen deutlich erhöht ist, ist dies ein geeigneter Angriffspunkt für zytotoxische Substanzen unter gleichzeitig geringerem Effekt auf physiologische Zellen (Chauhan et al., 2005; Dalton et al., 2004).

Der Proteasominhibitor Bortezomib

Der Einsatz von Proteasominhibitoren erweiterte die Therapieoptionen des Multiplen Myeloms, besonders bei refraktären Patienten oder im Falle eines Rezidivs.

Der erste zugelassene Vertreter dieser Klasse ist Bortezomib (Velcade®). Hierbei handelt es sich um ein Dipeptid und Borsäure-Analogon, das reversibel an der aktiven Threonin-Untereinheit des 26S-Proteasoms bindet (Adams et al., 2002).

Die Inhibition des Proteinabbaus in der Zelle durch Hemmung des Proteasoms führt zu einer Akkumulation von Signaltransduktionsmolekülen wie plkB α und bewirkt dadurch eine Hemmung der Signaltransduktionswege, die das Überleben der Myelomzellen sichern, wie der durch NF κ B vermittelte Signaltransduktionsweg (Hideshima et al., 2001).

Die Wirkmechanismen von Bortezomib beim Multiplen Myelom bestehen im Einzelnen in einer Hemmung der Proliferation und Induktion von Apoptose in Myelomzellen, indem es die NFkB-Aktivierung blockiert und die NFkB-vermittelte Zytokinproduktion (vor allem von IL-6) in den Knochenmarkstromazellen hemmt.

Bortezomib vermindert die Expression von Adhäsionsmolekülen, wie ICAM-1 und VCAM-1, und somit auch die Interaktion zwischen Myelom- und Stromazellen, die einen wichtigen Stimulus für das Zellwachstum und die Zytostatikaresistenz darstellt. Außerdem hemmt es die Angiogenese (Hideshima et al., 2001; Hideshima et al., 2002). Aufgrund dieses nicht-genotoxischen Wirkprinzips sind Substanzen wie Bortezomib geeignete Agenzien für eine Kombinationstherapie.

Vorhergehende Studien konnten zeigen, dass die Sensitivität von Myelomzellen gegenüber Bortezomib direkt mit ihrer Immunglobulinbiosyntheserate korreliert. Die übermäßige Akkumulation fehlerhaft gefalteter Antikörper bei Hemmung des proteasomalen Abbaus induziert in der Myelomzelle wohl eine terminale „Unfolded Proteine Response“ (UPR), die ebenfalls zur Apoptose führt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass Zellen mit sehr hoher Proteinbiosyntheserate gegenüber Proteasominhibitoren empfindlicher sind. Folglich sollte sich auch in entarteten Plasmazellen eine hohe Ansprechrate gegenüber Proteasominhibition zeigen.

Bortezomib ist bisher der einzige zugelassene Proteasominhibitor in Kombination mit Melphalan und Prednison für die Behandlung von Patienten mit bisher unbehandeltem Multiplem Myelom, die für eine Hochdosis-Chemotherapie mit Knochenmarktransplantation nicht geeignet sind. Für die Erstlinientherapie vor Hochdosistherapie mit Stammzelltransplantation wird eine Verbesserung der Ansprechrate und der Rate kompletter Remissionen sowie eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens nachgewiesen. Daten zur Gesamtüberlebenszeit liegen noch nicht vor (Harousseau et al., 2008). Außerdem ist Bortezomib zugelassen für die Behandlung des progressiven Myeloms von Patienten, die mindestens eine vorangehende Therapie durchlaufen haben und die sich bereits einer Knochenmarktransplantation unterzogen haben oder die für eine Knochenmarktransplantation nicht geeignet sind.

Heute bekannte genetische Marker eines ungünstigen Krankheitsverlaufs sind unter anderem die Deletion 17p13, die Translokation t(4;14)(p16;q32), Monosomie 13/Deletion 13q und die Deletion von p53. Genetische Marker haben bisher nur in Studien Einfluss auf die Behandlungsstrategien (Fonseca et al., 2009). Für Bortezomib zeigte sich auch eine gute Wirksamkeit bei zytogenetischen Risikogruppen (Mateos et al., 2008; Chang et al., 2007; Sagaster et al., 2007). Dies konnte auch im Rahmen der

VISTA-Studie beim Vergleich der Kombinationstherapie mit Bortezomib/Melphalan/Prednison gegenüber Melphalan/Prednison und Thalidomid gezeigt werden (Mateos et al., 2010).

Die Integration von Bortezomib in die Induktions- und Konsolidierungstherapie im Rahmen der Hochdosistherapie mit Tandemtransplantation war auch bei der prognostisch ungünstigen Patientengruppen, unter anderem auch bei p53-Deletion, wirksam. Unter Therapieintensivierung mit Bortezomib zeigte sich eine Erhöhung der Ansprechrate und der Ansprechdauer. Damit könnten das 10-Jahres-Überleben und die Heilungsraten noch weiter erhöht werden, wobei durch Integration von Bortezomib in die Induktions- und Konsolidierungstherapie auch Hochrisiko-Patienten mit prognostisch ungünstigen zytogenetischen Aberrationen profitieren können (Pineda-Roman et al., 2008; Shaughnessy et al., 2009).

Dieses günstige Wirkungsprofil bei refraktärem Myelom und bei Risikopatienten spricht auch für die Entwicklung von neuartigen Proteasom-inhibitoren mit günstigerem Wirkprofil als eine der vielversprechenden Therapiestrategien in der Behandlung des Multiple Myeloms (Altun et al., 2005; Burger et al., 2004; Guedat et al., 2007; Richardson et al., 2007; Palumbo et al., 2010). Nebenwirkungen wie Neuropathien, gastrointestinale Störungen, Neutropenie und Thrombozytopenie limitieren den klinischen Einsatz von Bortezomib erheblich.

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B

NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der durch oxidativen Stress und proinflammatorische Zytokine aktiviert werden kann und als wichtiger Regulator von Inflammationsprozessen sowie von zelleigenen Schutzmechanismen gegen Apoptose gilt. Diese können zum Beispiel durch DNA-Schädigung und Zytokineinfluss hervorgerufen werden (Baeuerle et al., 1997; Yamamoto et al., 2001).

Die Zytokine Interleukin-1 (IL-1) und der Tumornekrosefaktor- α (TNF α) gelten als die wichtigsten Aktivatoren (Renard et al., 2001; Sunwoo et al., 2001).

NF- κ B führt zu einer vermehrten Expression verschiedener Überlebensfaktoren und anti-apoptotischer Faktoren wie Bcl-2, Bcl-XL und Bfl-1/A1.

An der malignen Transformation der Myelomzellen sind intrinsische Überlebensmechanismen der Zellen beteiligt, eingeschlossen der Hochregulation der anti-apoptotisch wirkenden Proteine Bcl-2, Bcl-XL und Mcl-1 (Derenne et al., 2002), sowie die Aktivierung des Wachstums- und Überlebensfaktors NF- κ B. Chemotherapie selbst induziert

Zytostatikaresistenz durch NF- κ B-Aktivierung (Ravi et Bedi, 2004; Baumann et al., 2008).

Im Ruhezustand ist NF- κ B im inaktiven Komplex mit dem Inhibitorprotein I κ B im Zytoplasma lokalisiert und wird durch die Kinasen IKK α und IKK β reguliert. Diese I κ B-Kinasen phosphorylieren das Inhibitorprotein I κ B. I κ B wird ubiquitinyliert und kann anschließend proteasomal abgebaut werden. Nach Abspaltung von I κ B gelangt der Transkriptionsfaktor NF- κ B in den Zellkern und aktiviert die Expression bestimmter Gene, die eine Rolle bei der Regulation von Zellwachstum und –überleben spielen, wie Bcl-2, Mcl-1, p53, IL-6, VCAM und ICAM.

Unter anderem induziert NF- κ B auch die Transkription des Gens von I κ B α . Das neu synthetisierte I κ B bewirkt im Zellkern die Abtrennung des NF- κ B Dimers von der DNA und den Rücktransport ins Zytoplasma (Kretz-Remy et al., 2001).

NF- κ B spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Myelomzellen, wird dort vermehrt exprimiert und stellt daher ein großes Problem in der Behandlung dar. Da NF- κ B Zellüberleben und Zytostatikaresistenz vermittelt, ist es ein wichtiger zusätzlicher Angriffspunkt für zytotoxische Substanzen in der Myelomtherapie. Dieser positive Effekt konnte für Bortezomib bereits gezeigt werden (Jurczyszyn et al., 2006, Abb.3).

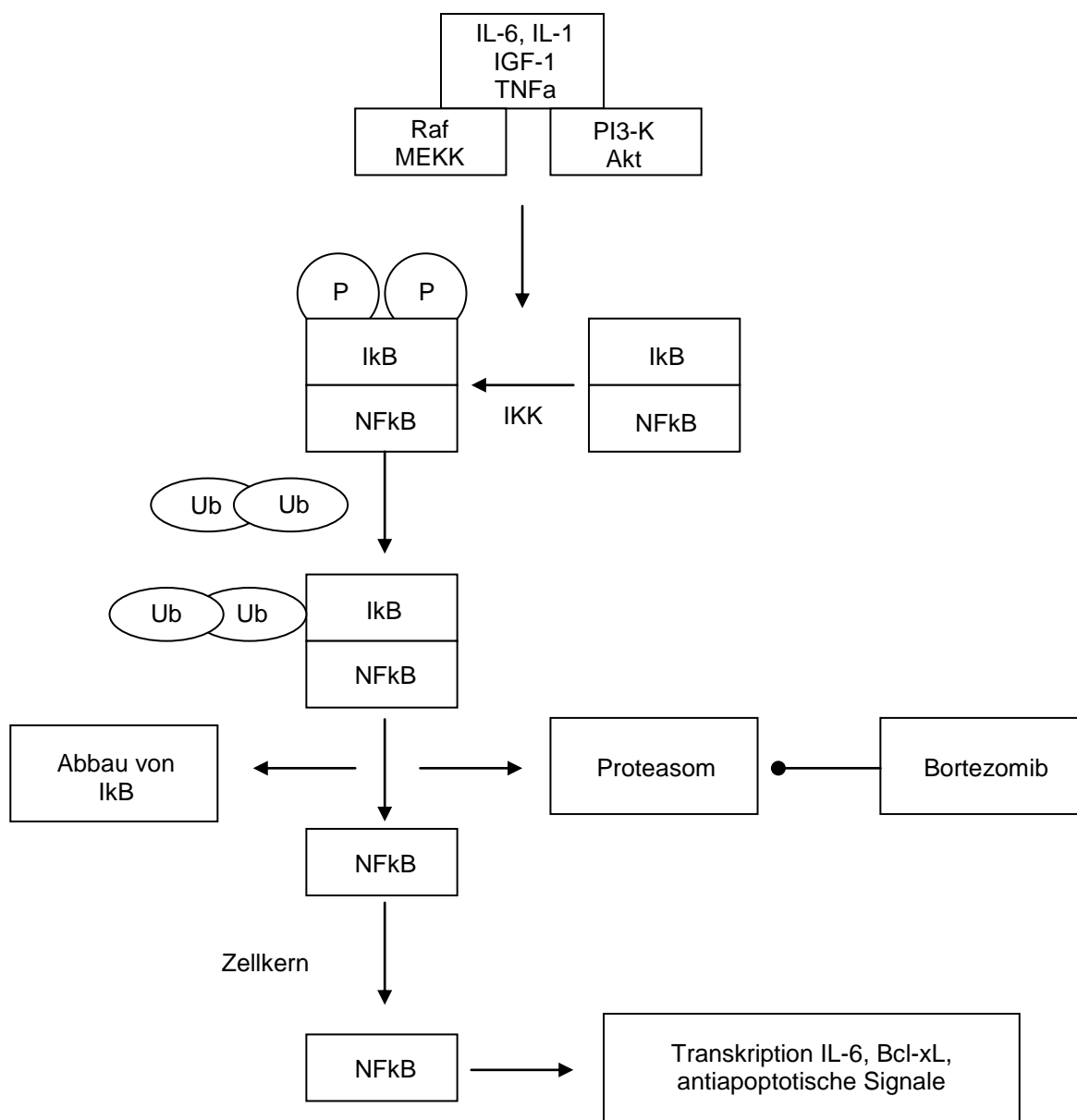


Abbildung 3: Signaltransduktionsweg von NFκappaB.

Die Aktivierung von NF-κB wird unter anderem durch Wachstumsfaktoren und Chemotherapeutika durch Phosphorylierung und proteasomalen Abbau von IκB vermittelt. NF-κB wird freigesetzt und reguliert die Expression von Zytokinen, Zelladhäsionsmolekülen und antiapoptotischen Proteinen (Jurczyszyn et al., 2006).

Das Semicarbazon-Peptid S-2209

Wie oben dargelegt, sind Proteasominhibitoren vielversprechende Substanzen in der Behandlung des Multiplen Myeloms. Gerade in der Kombinationstherapie zeigen sich hierdurch gute Ansprechraten und Überlebensvorteile bei günstigerem Nebenwirkungsprofil. Jedoch ergab sich auch bei Bortezomib ein limitierter Einsatz aufgrund der starken neurotoxischen und myelosuppressiven Nebenwirkungen.

Daher ist die Entwicklung von neuen Proteasominhibitoren mit besserer Wirksamkeit und günstigen Nebeneffekten ein wichtiger Ansatz in der Myelomtherapie, besonders da die Proteasominhibitoren aufgrund ihrer biologischen Angriffspunkte vor allem in malignen Zellen wirksam sind und möglicherweise Zytostatikaresistenzen überwinden können. Besonders in der „Second Line“-Therapie wären Erfolge zu erwarten.

S-2209 [1-[1-{1-[(2,4-Dioxo-imidazolidin-1-ylimino)-methyl]-2-phenyl-ethylcarbamoyl]-2-(1H-indol-3-yl)-ethylcarbamoyl]-2-(1H-indol)] zählt zu einer neuartigen Gruppe von Proteasominhibitoren, den Peptid-Semicarbazonen (Abb.4). Es ist kein Borsäure-Analogon und damit in seiner chemischen Struktur verschieden von Bortezomib. Im Gegensatz zu Bortezomib hemmt S-2209 den proteasomalen Abbau irreversibel über eine Hemmung der Chymotrypsin-Einheit des humanen Proteasoms (Leban et al., 2008).

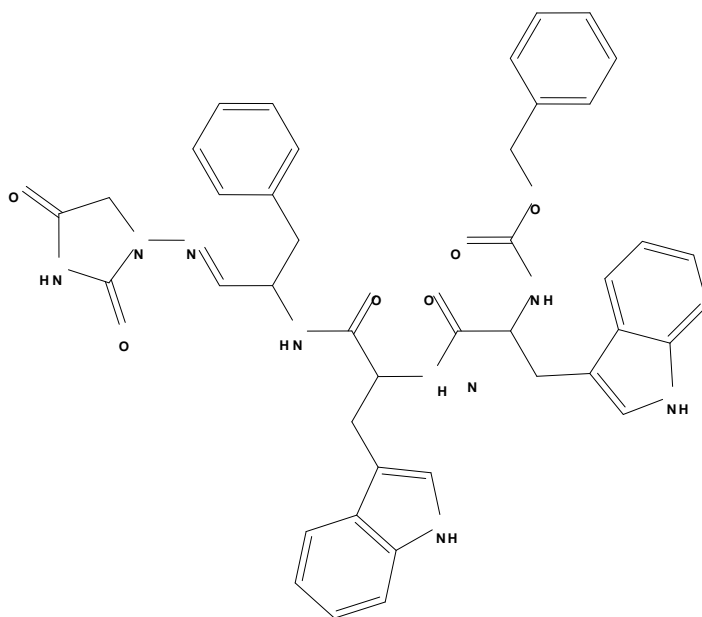


Abbildung 4: Der Proteasominhibitor S-2209.

S-2209 [1-[1-{1-[(2,4-Dioxo-imidazolidin-1-ylimino)-methyl]-2-phenyl-ethylcarbamoyl]-2-(1H-indol-3-yl)-ethylcarbamoyl]-2-(1H-indol)] ist ein Peptid-Semicarbazon.

Aufgrund der andersartigen chemischen Beschaffenheit und der irreversiblen Proteasomhemmung ist von einem anderen Wirkungsprofil auszugehen, als dies durch die reversible Hemmung mit Bortezomib gezeigt wurde. Die Unterschiede in der chemischen Struktur lassen ein anderes Verteilungsmuster in Extra- und Intrazellularraum sowie andere Stoffwechselforgänge in der Zelle erwarten.

Die Charakterisierung von S-2209 und seinen Auswirkungen auf Signaltransduktion und das Überleben der Myelomzelle sind Gegenstand dieser Dissertation, ebenso die Evaluation von S-2209 in Kombination mit anderen Chemotherapeutika, die bereits in der Behandlung des Multiplen Myeloms zugelassen sind.

Aufgrund der irreversiblen Hemmung des Proteasoms ist auf eine günstige Wirkung auf Myelomzellen, die eine hohe Proteasomaktivität aufweisen, zu schließen. Jedoch sind die möglichen unerwünschten Nebenwirkungen zum Beispiel auf nicht regenerierbare Nervenzellen zu bedenken und vor einem klinischen Einsatz im Tiermodell weiter zu evaluieren, weshalb auch die Charakterisierung des Nebenwirkungsprofils wichtig ist.

Im Folgenden kann gezeigt werden, dass S-2209 das Zellwachstum hemmt und Apoptose in Myelomzelllinien und primären humanen Myelomzellen induziert. Hervorzuheben ist dabei, dass S-2209 keine Apoptose bei humanen Lymphozyten bewirkt und ein günstiges Toxizitätsprofil im Tiermodell zeigt.

2 Material und Methoden

Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über den Aufbau der Arbeit und erläutert die angewandten Methoden. Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Materialien, Chemikalien und Geräte findet sich im Anhang.

2.1 Der Proteasominhibitor S-2209

S-2209 [1-[1-{1-[(2,4-Dioxoimidazolidin-1-ylimino)-methyl]-2-phenyl-ethylcarbamoyl]-2-(1H-indol-3-yl)-ethylcarbamoyl]-2-(1H-indol)] zählt zu einer neuartigen Gruppe von Proteasominhibitoren, den Peptid-Semicarbazonen. Im Gegensatz zu anderen Proteasominhibitoren hemmen sie den proteasomalen Abbau irreversibel. Die Substanz wurde freundlicherweise bereitgestellt von 4SC AG, Am Klopferspitz 19a, 82152 Planegg-Martinsried, Deutschland.

2.2 Zellkultur

Die Zellen der verschiedenen Myelomzelllinien wurden, wie im folgenden Abschnitt beschrieben, bearbeitet und kultiviert.

2.2.1 Zelllinien

Die verwendeten Myelomzelllinien U266, OPM-2, NCI-H929 und RPMI-8226 sowie die Stromazelllinie HS-5 stammen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig. Es handelt sich dabei um Proben von Myelompatienten, die zwischen 1966 und 1982 an Kliniken in Schweden, den USA und Deutschland gewonnen wurden. Die Zelllinien unterscheiden sich zytogenetisch und immunologisch (DSMZ, Datenblätter). Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (Boehringer, Ingelheim, Deutschland) mit 10-prozentigem Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS; Boehringer), welches zuvor bei 56 Grad Celsius im Wasserbad über eine Stunde inaktiviert wurde, bei 37°C, 5%CO₂ und 95-100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Es wurde kein Streptomycin/Penicillin verwendet.

Die Zellen wurden mit einer Dichte von etwa 80×10^4 Zellen/ml kultiviert. Die Kulturen wurden im Verlauf wiederholt geteilt und mit Medium auf eine Zellkonzentration von 20×10^4 Zellen/ml verdünnt und weiterkultiviert. Die Zellvitalität wurde vor Beginn eines Experimentes mikroskopisch mittels Trypanblaufärbung sichergestellt. Für die Experimente wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in 6 well plates oder 24 well plates überführt.

2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für das Einfrieren der Zellen wurde zunächst ein Einfriermedium hergestellt (5ml RPMI-1640-Medium, 3ml FCS und 2 ml DMSO), das in Kryoröhrchen auf Eis gelagert wurde. Anschließend wurden 10^7 Zellen aus der Kultur gewonnen, zentrifugiert, zweimal mit kaltem Phosphate-buffered saline (PBS) gewaschen und anschließend in 4,5ml Kulturmedium (RPMI-1640-Medium + 20%FCS) resuspendiert. 0,9ml der Zelllösung wurden mit 0,9ml des Einfriermediums in die Kryoröhrchen gegeben und sofort für 6 Stunden bei -20°C gelagert. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden bei -80°C und schließlich bei -196°C tiefgefroren.

Die Kryoröhrchen mit den Zellen werden zum Auftauen 2 Minuten bei Raumtemperatur angewärmt und schließlich in 37°C warmes Kulturmedium überführt. Es folgen zwei Waschvorgänge mit Kulturmedium, bevor die Zellen in einer Dichte von $20 \cdot 10^4$ Zellen/ml in Zellkulturflaschen überführt werden.

2.2.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen vor Beginn eines Experiments werden $30\mu\text{l}$ der Zelllösung mit Trypanblaulösung im Verhältnis 1:1 gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Nur die toten Zellen nehmen aufgrund ihrer durchlässigen Membran Trypanblau auf, so dass sie blau angefärbt werden und damit mikroskopisch von vitalen Zellen unterschieden werden können.

2.2.4 Gewinnung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Zur Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMC, „Peripheral Blood Mononuclear Cells“) wurden 15 ml EDTA-Blut von freiwilligen gesunden Kontrollpersonen nach deren Einwilligung gewonnen. Die Aufreinigung der mononukleären Zellen erfolgte im Rahmen einer Dichtezentrifugation, für welche Ficollhpaque® verwendet wurde. Dieses Prinzip beruht auf einer von Boyum 1968 entwickelten Methode, wobei sich die PBMC entsprechend ihrer spezifischen Dichte bei Zentrifugation in der Interphase zwischen Plasma-Überstand und Ficollhpaque ansammeln.

Hierzu wurde Ficollhpaque auf Raumtemperatur erwärmt und 20ml in ein 50ml Falcon-Röhrchen überführt.

Das gewonnene Vollblut wurde mit PBS-Lösung auf 20ml aufgefüllt, über das Ficollhpaque geschichtet und anschließend bei 1500rpm ohne Bremse für 30 Minuten bei 20°C zentrifugiert. Hiernach wurde die Interphase („buffy coat“) gewonnen und zweimal mit PBS gewaschen.

Nach Resuspension in Kulturmedium wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^7 /ml in 24 well plates über mindestens 2 und maximal 3 Tage mit dem jeweiligen Zytostatikum inkubiert.

2.2.5 Gewinnung von mononukleären Zellen und Myelomzellen aus dem Knochenmark

Zur Isolierung von Myelomzellen aus Knochenmarkaspirat wurden jeweils 5 ml heparinisiertes Knochenmarkaspirat von Patienten mit Multiplem Myelom gewonnen und wie unter 2.2.4 ausführlich beschrieben mittels Dichtezentrifugation isoliert. Die Patienten hatten nach Aufklärung durch einen Arzt die Zustimmung zur Verwendung des Materials für wissenschaftliche Zwecke gegeben. Ein positives Votum der Ethikkommission liegt vor.

Zur weiteren Aufreinigung wurden die mononukleären Zellen bzw. Myelomzellen des Knochenmarkaspirats mit CD138 MACS Beads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland) entsprechend den Herstelleranweisungen inkubiert.

Die gewonnen mononukleären Zellen wurden hierzu zweimal mit gekühlter Pufferlösung bestehend aus Dulbecco's PBS, 0.5% FCS und 2mM EDTA gewaschen und resuspendiert. CD138 MACS Beads wurden entsprechend den Herstellerangaben zugefügt und für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Es erfolgte ein erneuter Waschschrift mit Pufferlösung und Resuspension in 1ml Puffer und Überführung in die Separationssäule. Nachdem die unmarkierten Zellen die Säule passiert hatten und so von den CD138-positiven Myelomzellen getrennt wurden, wurden die Separationssäulen entfernt und die markierten Myelomzellen in ein 1,5ml Eppendorf Tube überführt. Der Separationsvorgang wurde zweimal wiederholt.

Der Erfolg der Isolierung der CD138-positiven Myelomzellen wurde mittels Durchflusszytometrie und Bestimmung des mit PE-markierten CD138 Oberflächenmarkers überprüft.

Bei einem Nachweis von mehr als 90% CD138-positiven Zellen wurde die Probe für weitere Experimente verwendet. Wie unter 2.2.4 beschrieben, wurde die Konzentration der Zellen bestimmt, auf eine Konzentration von 1×10^7 /ml verdünnt und in 24 Well-Plates über mindestens 2 und maximal 3 Tage mit dem jeweiligen Zytostatikum inkubiert.

2.3 Zellvitalitätsmessungen im WST-1 - Proliferationsassay

Zur Quantifizierung von vitalen, metabolisch aktiven Zellen in einer Probe wurde eine Messung nach WST-1-Assay-Protokoll zur Bestimmung der Zellvitalität durchgeführt gemäß den Instruktionen des Herstellers (Roche, Penzberg, Deutschland). In den Mitochondrien vitaler Zellen erfolgt die Umsetzung des Tetrazoliumsalzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]-1,3-benzenedisulfonate) zu orangefarbigem Formazan durch das Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System. Die Orangefärbung und damit die Zunahme der optischen Dichte der Zellsuspension kann bei einer Wellenlänge von 440 – 690nm mit Hilfe eines Photometers bestimmt werden. Da avitale Zellen den Farbstoff nicht umsetzen können, korreliert die Anzahl vitaler Zellen mit Extinktionserhöhung bei 440nm, die gegen eine Referenzwellenlänge von 680nm im Photometer gemessen wurde. In den durchgeführten Versuchen wurde eine Zellkonzentration von $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml der jeweiligen Zelllinien verwendet und jeweils als 8-fach-Ansatz in 96 well plates (100µl/well) kultiviert. Nach dreitägiger Inkubation mit dem jeweiligen Zytostatikum wurde WST-1 im Verhältnis 1:10 (10µl) zugegeben und drei Stunden inkubiert. Die Analyse beinhaltet eine Messung der behandelten Zellproben, Kontrollen (Färbung nicht behandelter Zellen) und Blanks (Färbung von Medium).

2.4 Durchflusszytometrische Analysen

Die Durchflusszytometrie wird zur Charakterisierung von Zellen nach ihrer Größe, Granularität, Struktur ihrer Zellwand und nach intrazellulären Bestandteilen angewendet. Zellen emittieren nach spezifischer Fluorochrom-Anfärbung und Anregung durch einen Laser charakteristische optische Signale.

Zur Detektion der qualitativen und quantitativen Expression eines Oberflächenmoleküls inkubiert man die Zellen mit dem spezifischen Antikörper, welcher mit einem Farbstoff (FITC, PE) markiert ist. Die Zellen werden einzeln am Laserstrahl vorbeigeleitet und führen zu einer Ablenkung und Streuung des Lichtstrahls, auf der Zelloberfläche befindliche fluoreszenzmarkierte Antikörper werden angeregt und führen zur Emission von Photonen. Bei der Detektion des gestreuten Lichtes unterscheidet man den sogenannten „Forward Scatter“ und den „Side Scatter“: Das Laserlicht, das nur wenig in Bezug auf die Achse des einfallenden Laserstrahls abgelenkt wird, trägt den Namen „Forward Scatter“. Diese messtechnische Größe ist proportional zum Zellvolumen. Das Laserlicht, das um Winkel im Bereich von 90° zum einfallenden Laserstrahl gestreut wird, wird „Side Scatter“ genannt. Diese messtechnische Größe ist proportional zur Granularität der Zelle, die das Licht streut. Mit Hilfe dieses Parameters lassen sich so z.B. Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten differenzieren.

Das Fluoreszenzlicht, das die Zelle je nach eingesetztem Reagenz zusätzlich emittiert, ist in allen Winkeln bezogen auf den einfallenden Laserstrahl messbar (FL1, 2, 3). Es befähigt das Gerät zusätzliche Charakteristika der Zelle, z.B. die Expression von Oberflächenmolekülen, zu messen. Eine gleichzeitige Messung mit bis zu vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Antikörpern ist möglich, wenn sich die eingesetzten Farbstoffe in ihren Emissionsspektren unterscheiden.

2.4.1 Analyse der Oberflächenmarkerexpression

Für die Analyse der Oberflächenmarkerexpression auf der Zellmembran werden die zu untersuchenden Zellen mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper, der entweder an Fluoresceinisothiocyanat (FITC) oder an Phycoerythrin (PE) gebunden ist, inkubiert und mittels Durchflusszytometrie charakterisiert. Fluoresceinisothiocyanat und Phycoerythrin sind die am häufigsten verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.

Die Zellkonzentration der zu messenden Proben lag bei $2 \cdot 10^5$ Zellen. Die entsprechende Zelllösung wird mit 1500rpm bei 8°C für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, die Zellen in 1000µl PBS resuspendiert, 100µl davon mit 10µl des jeweiligen Antikörpers versetzt. Es folgt eine 10minütige Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur. Vor der Durchflusszytometrie werden jeder Probe 400µl PBS hinzugefügt.

Die Analyse erfolgt innerhalb von einer Stunde im Epics Coulter XL-Durchflusszytometer.

2.4.2 Apoptosedetektion mittels Annexin-PI-Apoptose Assay

In vitalen Zellen besteht eine Asymmetrie der Zellmembran. So kommt Phosphatidylserin bei vitalen Zellen nur an der Innenseite der Zellmembran vor. Zu Beginn der Apoptose verliert die Zelle die Fähigkeit, diese Asymmetrie aufrecht zu erhalten, so dass Phosphatidylserin auch in die äußere Membran gelangt.

AnnexinV ist ein Phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität zu Phosphatidylserin und kann daher zur Detektion von apoptotischen Zellen herangezogen werden. Durch Koppelung von AnnexinV mit Fluorescein-Thioisocyanat (FITC), welches von einem Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488nm angeregt werden kann, wird die Emission des FITC-Moleküls bei einer Wellenlänge von 518nm im Durchflusszytometer gemessen und die apoptotischen Zellen so quantifiziert.

Da nekrotische Zellen durch den Verlust der Membranintegrität ebenfalls AnnexinV binden, lassen sich allein mit Hilfe der AnnexinV-Färbung frühapoptotische nicht von

nekrotischen bzw. spätapoptotischen Zellen unterscheiden. Um diese Zellpopulationen zu differenzieren, kombiniert man die AnnexinV-FITC- mit einer Propidiumjodid (PI)-Färbung. Propidiumjodid (PI) ist ein Farbstoff, der sich an die DNA nekrotischer oder spätapoptotischer Zellen anlagert. Wird PI mit einem Argonlaser bei 488nm angeregt, wird Licht der Wellenlänge 617nm emittiert und kann im Durchflusszytometer gemessen werden (Abb.5).

PI ist im Gegensatz zu FITC ein nach optischer Anregung nicht grün sondern rot fluoreszierender Farbstoff.

Durch die Kombination der beiden Färbungen können die Stadien des Zelluntergangs beschrieben werden. Vitale Zellen sind folglich sowohl AnnexinV-FITC- als auch PI-negativ. Zellen in der frühen Apoptose sind AnnexinV-FITC positiv und Propidiumjodid negativ. Nekrotische und spätapoptotische Zellen lassen sich durch beide Moleküle anfärben.

Im Versuchsaufbau werden jeweils 4 ml einer Zellsuspension mit $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml in einer 6-well-Platte mit der jeweiligen Testsubstanz als 3-fach-Ansatz inkubiert. Die Proben werden mit 1500 rpm bei 8°C 6 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, bevor das Zellpellet in 300µl kaltem „Binding Buffer“ (10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂) resuspendiert wird. Jeweils 100µl dieser Zellsuspension werden in neue FACS-Tubes transferiert und mit 5µl AnnexinV-FITC versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunklen werden 10µl PI in einer PBS-Verdünnung von 1:20 hinzugefügt. Nach Zugabe von weiteren 300µl „Binding Buffer“ erfolgt nun die Analyse am FACS-Gerät, wobei die Kanäle FL1 (Annexin V-FITC) und FL3 (Propidiumjodid) am Epics Coulter XL Durchflusszytometer verwendet werden.

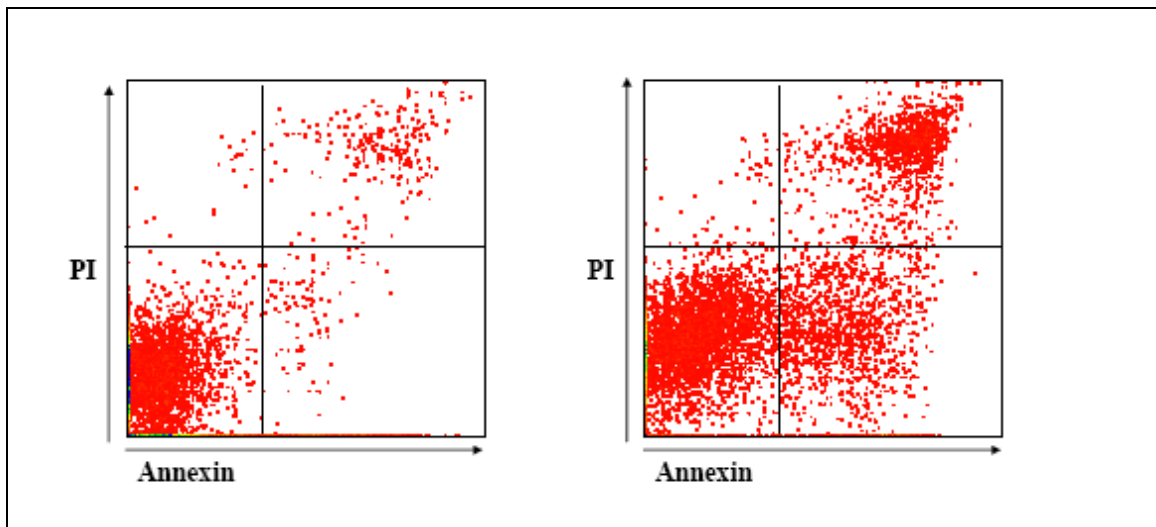


Abbildung 5: Das Annexin V - Propidiumjodid - Apoptose Assay.

NCI-H929-Zellen nach 48-stündiger Kultur als Kontrolle (linkes Bild) oder Inkubation mit 30 μM Melphalan (rechtes Bild). Die Abbildung zeigt eine deutliche Verlagerung der Zellen vom Annexin/PI-negativen Bereich über den Annexin-positiven (frühe Apoptose) in den Annexin/PI-positiven Bereich (späte Apoptose). (Annexin-V-FITC=FL1, Propidiumjodid=FL3).

2.4.3 DiOC6 Apoptose Assay

Im DiOC6-Apoptose-Assay erfolgte die Analyse von Änderungen des transmembranösen Mitochondrienpotentials. Als weiterer Parameter der Apoptose-Induktion wurde der Verlust des Mitochondrienpotentials durchflusszytometrisch bestimmt. DiOC6 (3,3'-Dihexyloxycarbocyanine Jodid; Aldrich, Milwaukee, WI, USA) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich bei intaktem Mitochondrienpotential an den Mitochondrien anreichert. In apoptotischen Zellen ist das Mitochondrienpotential zerstört und der Farbstoff DiOC6 wird in den avitalen Zellen nicht akkumuliert. Somit lässt sich die Induktion von Apoptose mittels DiOC6 durchflusszytometrisch nachweisen.

Nach 2 Waschschritten mit PBS wurden die Zellen in 50 μl PBS resuspendiert und 150 μl PBS mit 40nM DiOC6 hinzugefügt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zur zweifachen Färbung mit DiOC6 und PI wurden der Zellsuspension 10 μl PI in einer PBS-Verdünnung von 1:20 hinzugefügt. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis über 30 Minuten, wurden die Zellen am Durchflusszytometer analysiert (Coulter EPICS XL-MCL; System II).

2.5 Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren, um die qualitative und semiquantitative Expression von Proteinen darzustellen. Dabei können in einem mehrschrittigen Verfahren verschiedene Proteine mittels Chemolumineszenz nachgewiesen werden. Die Zellen wer-

den lysiert und die intrazellulären Proteine der Zellen mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteine werden auf eine Membran übertragen und mit monoklonalen Antikörpern identifiziert.

Zellyse

Nach Inkubation werden für jedes Motiv mindestens $1 \cdot 10^8$ Zellen lysiert, die zuvor mit unterschiedlichen Konzentrationen an Testsubstanz (Konzentrationsreihe) bzw. unterschiedlich lange als Zeitversuch im Brutschrank inkubiert worden waren. Die Zellen werden bei 1500 U/min für 8 Minuten bei 8°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen einmal mit 4ml eiskaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Danach wird der Überstand dekantiert, die Zellpellets werden in 1ml PBS resuspendiert und in 1,5ml Tubes transferiert. Im Anschluss erfolgt eine Zentrifugation bei 2500 U/min für 6 Minuten bei 4°C, so dass der zellfreie Überstand anschließend vollständig abpipettiert und verworfen werden kann. Nach der Zugabe von 100µl Lysepuffer (siehe Tabelle) wird die Zellsuspension gevortext und zum Lysieren der Zellen und somit Freisetzen der intrazellulären Proteine 30 Minuten lang auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgt die Zugabe von 10µl 10% NP-40 (IGEPAL CA-630) zur weiteren Lyse der Zytoplasmamembran. Nach 15-minütiger Inkubation im Überkopfschüttler bei 4°C wird die Probe bei 13.000 U/min für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände, welche die zu evaluierenden intrazellulären Proteine enthalten, werden anschließend in neue Eppendorf-Gefäße transferiert und die Pellets mit den Zellresten verworfen. Nun erfolgt die Bestimmung der Proteinkonzentrationen mit Hilfe des photometrischen Bradford-Assays. Dazu werden 2µl der jeweiligen Probe mit 800µl Aqua dest. und 200µl eines Färbereagens (BioRad Protein Assay Solution®) versetzt. Dieses Reagenz enthält u.a. Coomassie-Brillant-Blau, einen Triphenylmethanfarbstoff, der zum Anfärben von Proteinen verwendet wird. Er lagert sich an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an und färbt damit Proteine unspezifisch an. Nach 5 Minuten wird nun die Proteinkonzentration bei 595nm auf der Grundlage einer Eichkurve mit Hilfe des Eppendorf BioPhotometers bestimmt.

Gelelektrophorese

Durch Verdünnung mit Lysepuffer werden die Proteinkonzentrationen der verschiedenen Proben einander zunächst mengenmäßig angepasst. Jeweils 50µl einer Probe werden mit Loading Buffer im Verhältnis 1:1 versetzt, um die Probe zu beschweren und später das Beladen der Geltaschen zu ermöglichen. Die Proben werden gut verschlossen, für 5 Minuten durch Kochen denaturiert und bei 6000 U/min für 2 Minuten bei 4°C

zentrifugiert. Nun folgt das Beladen der vorbereiteten Polyacrylamidgele mit den Proben.

Trenngel (für 4 Gele):

Substanz	10%	12%	15%
Aqua dest.	10,4ml	8,8ml	5,9ml
Tris (1,5M, pH 8,8)	6,3ml	6,3ml	6,3ml
Acrylamid/Bis (30% (37.5:1))	8,3ml	9,8ml	12,3ml
APS (10%)	250µl	250µl	250µl
TEMED	15µl	15µl	15µl

Die Trenngele werden nach den obigen Angaben gegossen, wobei die Gelplatten zu $\frac{3}{4}$ mit der jeweiligen Gellösung gefüllt und mit Isopropanol überschichtet werden, so dass ein glatter Abschluss entsteht. Nach erfolgter Polymerisation kann nach ca. 30 Minuten das Sammelgel gegossen werden.

Sammelgel (für 4 Gele):

Substanzen	Volumen
Aqua dest.	9ml
Tris (1M, pH 6,8)	3,8ml
Acrylamid/Bis (30% (37.5:1))	1,9ml
APS (10%)	250 µl
TEMED	25µl

Isopropanol wird verworfen, anschließend wird das Sammelgel gegossen und die Kämmen als „Taschenschablone“ eingefügt. Nach dem Auspolymerisieren werden die Gele in die Elektrophoresebehälter gestellt, die mit Elektrophoresepuffer gefüllt werden. Die Kämmen werden entfernt und die Taschen können gespült und anschließend mit jeweils 10µl der Proteinlösung bzw. 7µl des Markers (Kaleidoscope-precision plus protein standard-Biorad) beladen werden. Im Anschluss wird die Elektrophorese mit Hilfe des Power Supplies „Power Pac 300“ (BioRad) bei zunächst 80V gestartet. Nach-

dem die Proteine das Trenngel erreicht haben, wird die angelegte Spannung auf 100V erhöht.

Transferblot

Um die nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine von den Gelen auf die PVDF-Membranen zu transferieren, werden letztere und Filterpapiere zurechtgeschnitten. Die Membranen werden für 15 Sekunden in Methanol 100%, 2 Minuten in Wasser und zusammen mit den Schwämmen und Filterpapieren für 2 Minuten in Transferpuffer geschwenkt. Der Gellauf wird nach ca. 2 Stunden gestoppt, die vom Sammelgel befreiten Gele luftblasenfrei auf die vorbereiteten Membranen zwischen Filterpapiere und Schwämme gelegt, in die Transferbehälter gesetzt und diese mit Transferpuffer gefüllt. Der anschließende Transfer erfolgt bei 23V über Nacht im Kühlraum.

Proteinnachweis

Der Proteinnachweis basiert auf einem mehrschrittigen Verfahren, bei dem ein Primärantikörper an das Protein auf der Membran bindet. Ein Sekundärantikörper, der mit einer Peroxidase konjugiert ist und so mittels Chemolumineszenz nachgewiesen werden kann, bindet wiederum an den Primärantikörper. Im Einzelnen werden die Membranen nach erfolgtem Transfer luftgetrocknet, bevor sie mit jeweils 15ml einer Magermilchpulverlösung (M-TBS-T) für 1 Stunde bei 40 Mot1/min auf einem Schüttler inkubiert werden, um so unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern.

Bei 70 Mot1/min werden die Membranen nun viermal für jeweils 8 Minuten gewaschen. Anschließend werden die primären Antikörper im Verhältnis 1:1000 mit TBST- Puffer verdünnt und jeweils 10ml davon auf die Membranen gegeben. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 40 Mot1/min im Kühlraum. Am folgenden Tag werden die Membranen zunächst viermal mit TBS-T-Puffer bei 70 Mot1/min gewaschen, um so die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Anschließend werden jeweils 10ml der benötigten sekundären Antikörper, im Verhältnis 1:2000 mit M-TBS-T-Puffer verdünnt, hinzugegeben. Nach erfolgter Inkubation bei 40 Mot1/min über eine Stunde werden die Membranen erneut viermal mit TBS-T-Puffer bei 70 Mot1/min gewaschen, im Anschluss werden 3ml der ECL-Lösung je Membran zugegeben, bevor nach unterschiedlichen Expositionszeiten die Chemolumineszenz der Banden auf Röntgenfilm festgehalten werden kann.

Membran-Stripping

Um die Membranen für den Nachweis anderer Proteine wiederverwenden zu können, müssen sie zunächst von Antikörpern befreit werden. Dazu werden die Membranen in

einer Mischung aus 100ml Stripping-Lösung und 960µl Mercaptoethanol für 30 Minuten bei 50°C im Wasserbad geschwenkt. Anschließend werden die Membranen viermal bei 70 Mot1/min für jeweils 8 Minuten gewaschen und es kann mit den Arbeitsschritten des Proteinnachweises fortgefahren werden.

Pufferlösungen

Lysepuffer (für 10ml)	Aqua dest. 8.18ml, Tris (1M, pH 7.6) 250µl, NaF (1M) 100µl, EDTA (0.5M) 200µl, Aprotinin (2.1mg/ml) 50µl, Leupeptin (5mg/ml) 20µl, PMSF (100mM) 100µl, Na ₃ VO ₄ (100mM) 100µl
Elektrophoresepuffer (10x, pH 8.3)	Tris 151.4g, Glycin 720.65g, Natriumdodecylsulfat 50g, auf 5l gereinigtes Wasser, pH 8.3 mit HCl einzustellen
Transfer-Puffer	Tris 30.28g, Glycin 144.13g, Methanol 1580g, auf 10l gereinigtes Wasser
TBS (10x, pH 7.6)	Tris 121g, Natriumchlorid 400g, auf 5l gereinigtes Wasser, pH 7.6 mit HCl einzustellen
TBS-T-Puffer	100ml TBS, 900ml Aqua dest., 500µl Tween20 (0,05 %)
M-TBS-T	10g Magermilchpulver, 200ml TBS-T-Puffer
Solution A	200ml 0.1M TRIS-HCl (pH 8.6), 0.05g Luminol Sodium Salt
Solution B	0.011g para-Hydroxycoumarinsäure gelöst in 10ml DMSO
ECL-Lösung	10ml Solution A, 3µl H ₂ O ₂ , 1 ml Solution B
Stripping-Lösung	7.56g Tris, 20g SDS, pH 6.7, vor Anwendung: Zugabe von β-ME

2.6 Proteasom *in vitro* Assay

Leukozyten von gesunden Kontrollpersonen wurden isoliert und mittels Ultraschall ly-siert. Zelluläre Proteine wurden isoliert und die Konzentration wurde im Bradford Assay bestimmt. Die Chymotrypsin-Aktivität des humanen 26S Proteasoms (Immatics, Tübingen) wurde im Tecan Ultra Plate Reader bestimmt durch Umsetzung des fluoreszieren- den Substrats Suc-LLVY-AMC (Bachem). Nachfolgend wurden in den Wells einer schwarzen 96 Well Polypropylen-Platte 2µl des Proteasominhibitors in DMSO gelöst und mit 50µl der Substrat-Lösung vermischt (25mM HEPES pH 7.5, 0.5mM EDTA,

75µM Suc-LLVY-AMC). Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 150µl Proteasom-Lösung gestartet (20µg aus lysierten Zellen gewonnenes 26S Proteasom in 25mM HEPES pH 7.5, 0.5mM EDTA, 0.033% (w/v) SDS, vorinkubiert für 10 min bei Raumtemperatur). Die Hydrolyse des Substrates erfolgte nach der Fluoreszenzspektroskopie (Wellenlänge zur Erregung: 360nm; Wellenlänge Emission: 465nm) über 20min bei 30°C. Die gemessenen Signale wurden als relative Fluoreszenzeinheiten (fluorescence units, RFU) pro Minute angegeben. Um den IC₅₀-Wert festzulegen, wurden acht Inhibitorkonzentrationen bestimmt. Die Daten wurden als Dreifach-Ansatz an einem Messungstag erhoben. Um die Dosis-Antwort-Kurve und den IC₅₀ zu erhalten, wurden die Messwerte mittels SigmaPlot als 4 Parameter Logistic Kurve dargestellt (Proteasom *in vitro* Assay in Kooperation mit 4SC, Martinsried, München, Deutschland. Die Experimente wurden in den Räumlichkeiten von 4SC in Martinsried durchgeführt.).

2.7 NFκB Inhibitions-Assay

Die transfizierte Zelllinie A549-NFκB-SEAP wurde verwendet, um die Inhibition der durch NFκB vermittelten Signaltransduktion zu bestimmen. Die Zellen der exponentiell wachsenden Zellkultur mit einer Zellvitalität von mehr als 90% wurden für dieses Assay verwendet. Die Zellen wurden zentrifugiert und in Assay-Medium (IMDM, bestehend aus HEPES mit L-Gln (Gibco, 21056-023), 1mM Na-Pyruvat, 2% FCS und Penicillin/Streptomycin) resuspendiert mit einer Endkonzentration von 4x10⁵/ml. 50µl dieser Suspension wurden in die Well Plates gegeben und für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 37° Celsius und 5% CO₂ über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde die Zellsuspension mit weiteren 100µl Assay-Medium verdünnt. 50µl der S-2209-Verdünnungsreihen wurden den zu testenden Wells zugefügt. Die Zellen wurden für 8h bei 37°C inkubiert und dann mit 10ng/ml TNFα stimuliert und für weitere 18h inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Aktivität von SEAP mittels CSPD-Substrat bestimmt. 100µl des Überstands eines jeden Wells wurden auf eine neue Platte transferiert, Hitze-inaktiviert und erneut zentrifugiert (2000 rpm für 5 Minuten). Dann wurden 50µl pro Well entnommen, auf eine neue Microreader-Platte transferiert und 50µl des verdünnten CSPD-Substrates (1:15) zugegeben. Es erfolgte die erneute Inkubation für 40 Minuten. Die Analyse erfolgte im Tecan Ultra Reader. (NFκB - Inhibitions-Assay in Kooperation mit 4SC, Martinsried, München, Deutschland. Die Experimente wurden in den Räumlichkeiten von 4SC in Martinsried durchgeführt.)

2.8 Toxizitätsstudie im Rattenmodell

Ziel dieser Versuche war es die maximal tolerierte Dosis von S-2209 zu bestimmen. 11 männliche Wistar Ratten wurden hierzu in der Toxizitätsstudie behandelt. Eine Cremophor-Lösung (3% S-2209, 20% Cremophor EL, 77% NaCl 0.9%) wurde als Arzneimittelträger verwendet. S-2209 wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen in Konzentrationen von 5, 10 oder 15mg/kg Körpergewicht intravenös injiziert. Das Körpergewicht wurde an Tag 1, 2, 3, 5 und 8 bei den behandelten Tieren und den Kontrolltieren bestimmt. Laborchemisch wurden an Tag 1, 3 und 5 ASAT, ALAT, ALP, Kreatinin und Hämoglobin jeweils 30 min vor Injektion von S-2209 bestimmt (Toxizitätsstudie im Rattenmodell in Kooperation mit 4SC, Martinsried, München, Deutschland. Die Experimente wurden in den Räumlichkeiten von 4SC in Martinsried durchgeführt. Tierversuchsantrag wurde durch 4SC gestellt.).

2.9 Proteasom *ex vivo* Assay

Zur weiteren Charakterisierung des Proteasominhibitors und der Wirkung von S-2209 auf das Proteasom wurde ein *ex vivo* Proteasom-Zell-Assay durchgeführt. Hierzu wurde den Tieren 10ml Vollblut entnommen und der Assay mit isolierten PBMC und lysierten PBMC durchgeführt.

Je 2 Wistar Ratten wurden mit NaCl (Kontrolle) oder mit S-2209 4, 8, 12, oder 16mg/kg Körpergewicht (Gabe von S-2209 an d1-d3) oder Bortezomib 0.1mg/kg Körpergewicht (Gabe von Bortezomib an d1) behandelt.

Die proteasomale Aktivität wurde 1h nach der Gabe der Substanzen bei den Blutzellen und den Zelllysaten bestimmt.

Die PBMC wurden mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten isoliert. Die PBMC-Fraktion wurde dreimal in eiskalter PBS-Pufferlösung gewaschen und nachfolgend mittels Ultraschall lysiert. Das Zelllysate wurde für 10min mit 18000rpm zentrifugiert, der Überstand gewonnen und die Gesamtproteinkonzentration mit standardisiertem Bradford Assay bestimmt. Anschließend wurden Aktivitäts-Assays wie oben beschrieben durchgeführt mit dem Unterschied, dass 20µg des Gesamtproteins verwendet wurde. Die Messungen mit lysierten PBMC der behandelten Tiere wurden bei 37°C und ohne SDS durchgeführt.

Zur Messung wurde eine Fluoreszenz-Spektroskopie (Wellenlänge Erregung: 360 nm; Wellenlänge Emission: 465 nm) über 20min bei 30°C durchgeführt. Die initialen Geschwindigkeiten wurden als Veränderung der relativen Fluoreszenz-Units (RFU) pro Minute berechnet. Um die Dosis-Antwort-Kurve und den Wert des IC₅₀ festzulegen,

wurden acht verschiedene Inhibitorkonzentrationen in diesem Assay verwendet. Die Daten wurden an einem Messungstag als Dreifach-Ansatz erhoben. Um die IC_{50} -Werte zu erhalten, wurden die Messwerte mit dem Programm GraFit als 4 Parameter Logistic Kurve dargestellt (Proteasom *ex vivo* Assay in Kooperation mit 4SC, Martinsried, München, Deutschland. Die Experimente wurden in den Räumlichkeiten von 4SC in Martinsried durchgeführt. Tierversuchsantrag wurde durch 4SC gestellt.).

2.10 Statistik

In den Abbildungen werden die Mittelwerte mit den Standardabweichungen von repräsentativen Versuchen gezeigt. Die Daten wurden in mindestens 2 voneinander unabhängigen Experimenten bestätigt. Um verschiedene Gruppen zu vergleichen, wurde eine Wilcoxon Analyse durchgeführt (SPSS 15.0 für Windows). Die deskriptive Statistik wurde mittels Excel ausgewertet und die statistische Signifikanz mit dem Kruskal-Wallis-Test berechnet. Werte mit $p < 0.05$ wurden als statistisch signifikant bewertet.

3 Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit detailliert beschrieben.

3.1 Das Semipeptid-Carbazon S-2209 wirkt als Proteasominhibitor

Die Substanz S-2209 repräsentiert eine neue Klasse von potenten Proteasominhibitoren, die die Aktivität des Proteasoms in der Zelle hemmen. S-2209 unterscheidet sich strukturell von dem bereits klinisch angewendeten Bortezomib. Das Wirkungs- und das Nebenwirkungsprofil von S-2209 *in vitro* und *in vivo* wurden daher im Vergleich zu Bortezomib untersucht. Da S-2209 das Proteasom im Gegensatz zu Bortezomib irreversibel hemmt und es sich in seiner Strukturformel unterscheidet, ist ein anderer Wirkungsmechanismus in der Myelomzelle zu erwarten.

3.1.1 S-2209 hemmt die Chymotrypsin-Einheit des Proteasoms

Der Wirkungsmechanismus von S-2209 als Proteasominhibitor konnte mittels eines *in vitro* Proteasome-Glow™ Zell-basierten Assays bestätigt werden. Hierbei handelt es sich um einen Lumineszenz-Assay, in welchem die Aktivität der Chymotrypsin-ähnlichen Protease nachgewiesen werden kann, welche mit dem Proteasomkomplex assoziiert ist.

Das Reagenz des Assays beinhaltet das lumineszierende Succinyl-Substrat Suc-LLVY-Aminoluciferin (Succinyl-Leucin-Leucin-Valin-Tyrosin-Aminoluciferin) des Proteasoms in einer Pufferlösung.

Durch den proteasomalen Abbau von Suc-LLVY-Aminoluciferin entsteht ein Lumineszenz-Signal, welches durch die Reaktion der Luciferase generiert wird und durch Detektion der Lumineszenz nachgewiesen werden kann. Die Lumineszenz wurde festgelegt als relative light units (RLU), welche im Tecan Ultra Plate Reader gemessen wurden. Mit abnehmender Konzentration von S-2209 zeigte sich eine Zunahme der Lumineszenz, was für eine abnehmende Hemmung des Proteasoms spricht.

S-2209 hemmt nachgewiesen die Aktivität der Chymotrypsin-ähnlichen Protease des Proteasoms und bei Konzentrationen von ~220nM zeigte sich die halb maximale effektive Konzentration (IC₅₀) (Abb.6).

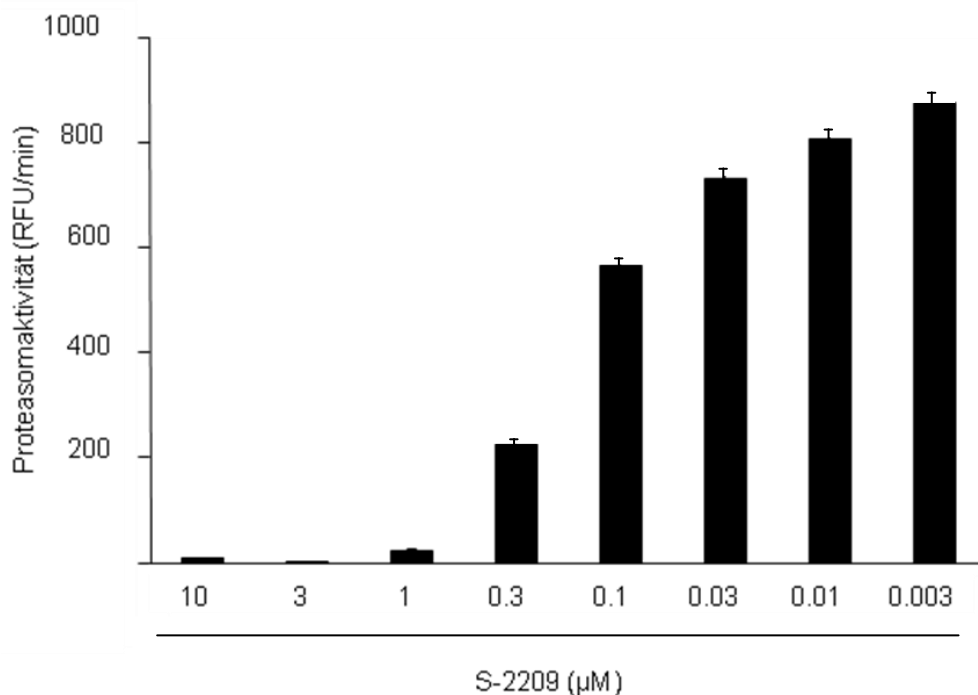


Abbildung 6: S-2209 wirkt als Proteasominhibitor.

Leukozyten wurden von 3 gesunden Kontrollpersonen isoliert, mit PBS gewaschen und Protein wurde extrahiert. Der Proteasom Glow® Assay wurde zum Nachweis und Bestimmung der Proteasomaktivität nach Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen von S-2209 durchgeführt. Zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes wurden acht verschiedene Konzentrationen des Proteasominhibitors S-2209 verabreicht. Die Daten wurden als Dreifach-Ansatz erhoben. Um die Dosis-Antwort-Kurven und IC_{50} -Werte zu erhalten, wurden die Daten mittels SigmaPlot in eine 4 Parameter Logistic Funktion gebracht.

In einem weiterführenden Experiment wurde die Proteasominhibition durch S-2209 und Bortezomib in einem *ex vivo* Zell-Assay miteinander verglichen. Je 2 männliche Wistar Ratten wurden mit Natriumchlorid, S-2209 in einer Konzentration von 4, 8, 12 oder 16mg/kg oder Bortezomib 0.1mg/kg behandelt. Die proteasomale Aktivität wurde 1h nach der Gabe der Substanzen in den peripheren Blutzellen und Zelllysaten bestimmt. Im Proteasominhibitions-Assay zeigt sich, dass die Behandlung mit 16mg/kg S-2209 mit einer geringgradig höheren Proteasominhibition einhergeht als die Behandlung mit Bortezomib 0.1mg/kg (87% Proteasominhibition unter S-2209 versus 70% Proteasominhibition unter Bortezomib; Abb. 7).

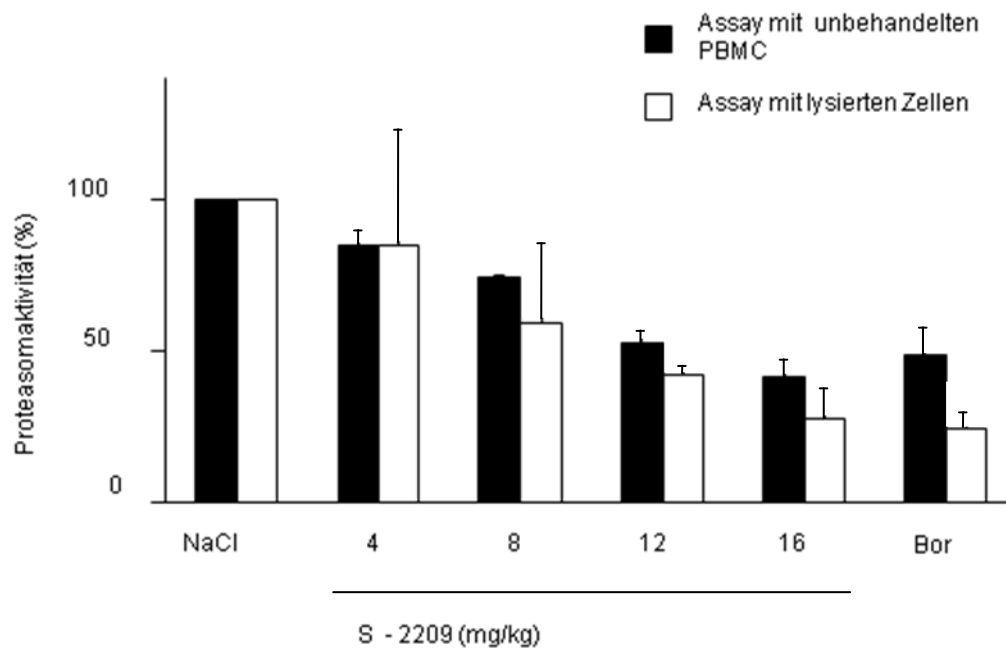


Abbildung 7: S-2209 hemmt die 20S-Einheit des Proteasoms in gering höherem Ausmaß als Bortezomib.

Je 2 Wistar Ratten wurden mit NaCl (Kontrolle) oder mit S-2209 4, 8, 12 oder 16mg/kg Körpergewicht (Gabe von S-2209 an d1-d3) oder Bortezomib 0.1mg/kg Körpergewicht (Gabe von Bortezomib an d1) behandelt. An Tag 3 wurden je 10 ml Blut der Tiere entnommen und PBMC mittels Ficoll-Hypaque isoliert. Die PBMC-Fraktion wurde gewaschen und nachfolgend untersucht. Proteasomaktivitäts-Assays wurden wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die Messungen der PBMC-Lysate der Ratten fanden bei 37°C statt ohne SDS. In der Abbildung sieht man die Hemmung der Proteasomaktivität in Abhängigkeit von der Dosis.

3.1.2 Der Proteasominhibitor S-2209 führt zu einer verstärkten Phosphorylierung von IκB

Zusätzlich wurde der Einfluss von S-2209 auf die semiquantitative intrazelluläre Expression von IκB und dessen Phosphorylierung untersucht.

Hierzu wurde die Myelomzelllinie U266 mit steigenden Konzentrationen von S-2209 über 36 Stunden inkubiert und die Proteinexpression mittels Western Blot bestimmt. Hier konnte gezeigt werden, dass sich die Konzentration von IκB in den Myelomzellen in Abhängigkeit von der Dosis von S-2209 in U266-Myelom-Zellen nicht ändert, jedoch die Konzentration von pIκB konzentrationsabhängig zunimmt (Abb. 8).

Diese Ergebnisse bestätigen, dass S-2209 als Proteasominhibitor wirksam ist, da pIκB unter physiologischen Bedingungen im Proteasom abgebaut wird.

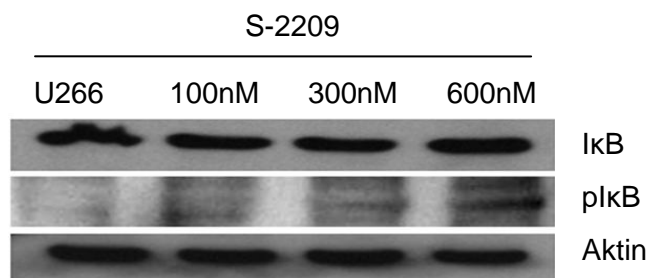


Abbildung 8: S-2209 führt zu einer Zunahme von p-IκBα und ist als Proteasominhibitor wirksam. U266-Zellen wurden mit zunehmenden Konzentrationen von S-2209 über 36h inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen geerntet, lysiert und direkt auf SDS-PAGE aufgetragen, auf Membranen transferiert und der Western Blot mit Antikörpern gegen IκBα und p-IκBα durchgeführt.

3.1.3 S-2209 hemmt die Aktivität von NFκB

Die Inhibition von NFκB wird als einer der Hauptmechanismen für den Einsatz von Proteasominhibitoren in der Behandlung von Patienten mit neoplastischen Erkrankungen beschrieben (Adams et al., 2002; Tergaonkar et al., 2002; Nakanishi et al., 2005; Piva et al., 2006). Dieser Transkriptionsfaktor ist vermehrt in malignen Zellen exprimiert und anti-apoptotisch wirksam (Derenne et al., 2002; Ravi et Bedi, 2004; Baumann et al., 2008).

Beim Multiplen Myelom werden die malignen Plasmazellen von einer großen Anzahl von Zytokinen wie Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-4 (IL-4) oder durch die Adhäsion an Stromazellen des Knochenmarks, vermittelt durch Integrine wie ICAM-1 oder VCAM-1, stimuliert (Schmidmaier et al., 2004; Baumann et al., 2007).

Diese Stimulation führt zu einer Aktivierung von NFκB. NFκB inhibiert die Apoptose und induziert Zellproliferation (Dalton et al., 2004). Die alleinige Inkubation mit alkylierenden Substanzen wie Melphalan führt zu einer rapiden Aktivierung von NFκB (Baumann et al., 2007), was im Verlauf der Therapie zu Resistenzen der Myelomzellen führt. Therapieresistente Myelomzelllinien zeigen erhöhte Werte von NFκB (Ma et al., 2003).

Wegen der klinischen Relevanz von NFκB beim Multiplen Myelom wurde der Einfluss von S-2209 auf die Aktivität von NFκB untersucht. Hierzu wurde ein A549-NFκB-SEAP-Zell-Assay verwendet.

Die Zelllinie A549-NFκB-SEAP ist mit dem Reporter gen pNFκB-SEAP transfiziert, in welchem die Expression des SEAP-Reportergens durch die NFκB-regulierende Einheit kontrolliert wird.

Die Stimulation dieser Zellen mit humanem TNFα führt zu einer erhöhten Expression des SEAP-Proteins im Überstand des Zellkulturmediums, welche damit eine erhöhte

Aktivität von NFκB nachweist. In Abbildung 9 wird gezeigt, dass es in mit S-2209 vorbehandelte Zellen zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen Reduktion der Expression von SEAP im Überstand kommt. Dies reflektiert die Hemmung der NFκB-Aktivität in den Zellen. Der berechnete IC₅₀ in diesem NFκB-Inhibition-Assay beträgt 900nM.

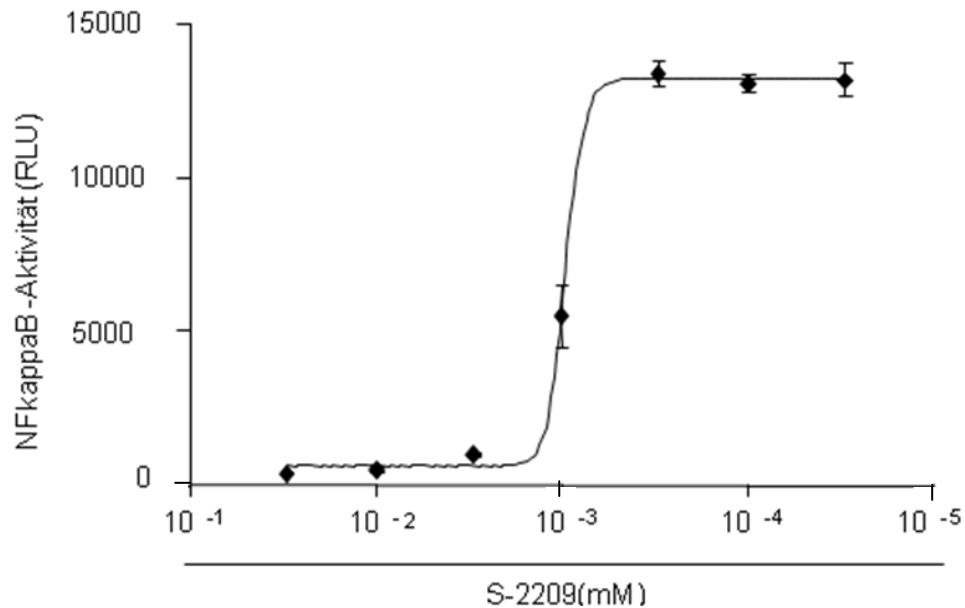


Abbildung 9: S-2209 hemmt die NFκB-Aktivität.

Ein Reporter-gen-Assay wurde verwendet, um die Inhibition der NFκB-Aktivität zu bestimmen. A549-NFκB-SEAP-Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen von S-2209 über 8h inkubiert. Die Zellen wurden mit 10ng/ml TNFα für weitere 18 Stunden stimuliert. Nach Inkubation wurde die Aktivität von exprimiertem SEAP im ELISA Reader bestimmt.

3.2 S-2209 induziert Apoptose und inhibiert Zellwachstum in humanen Multiplen Myelomzellen

Des Weiteren wurde untersucht, ob die durch S-2209 induzierte Proteasominhibition zu einer Hemmung des Zellwachstums und zur Apoptose von Myelomzellen führt.

3.2.1 S-2209 inhibiert das Zellwachstum von Multiplen Myelomzellen

Myelomzelllinien (OPM2, NCI-H929, U266 und RPMI-8226) wurden über 72h mit ansteigenden Konzentrationen von S-2209 inkubiert. Danach wurde die Hemmung des Zellwachstums durch Bestimmung der Zellvitalität im WST-1-Assay gemessen. In diesem Assay wird Tetrazoliumsalz (WST-1) durch die Succinat-Tetrazolium-Reduktase in Formazan umgesetzt, welches nur in der mitochondrialen Atmungskette zu finden ist. Die Quantität der Formazan-Färbung korreliert daher direkt mit der Anzahl an metabolisch aktiven, vitalen Zellen. Dies wurde im Photometer (ELISA Reader) quantifiziert.

Abbildung 10 zeigt, dass S-2209 das Zellwachstum in Abhängigkeit der Dosis in allen vier Zelllinien hemmt. Der IC_{50} -Wert liegt dabei je nach Zelllinie zwischen 100nM bei U266-Zellen und 300nM bis 600nM bei RPMI-8226-Zellen.

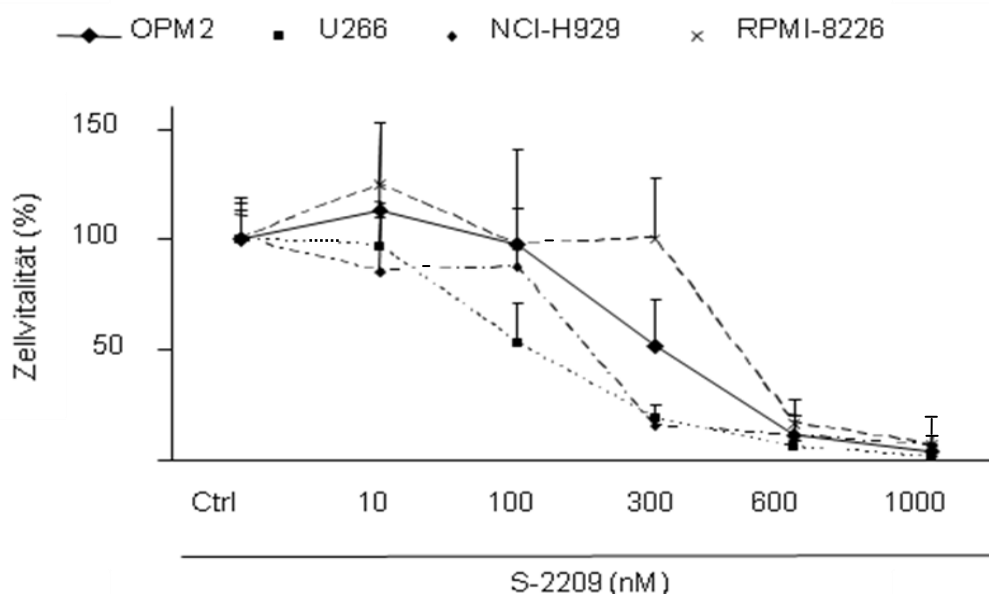


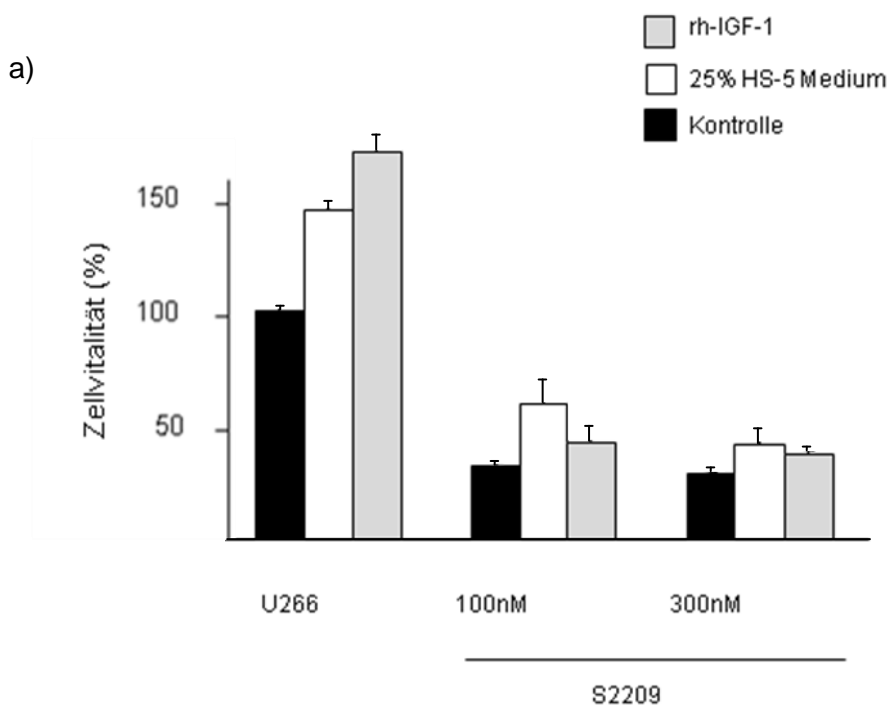
Abbildung 10: S-2209 inhibiert das Zellwachstum.

Die Myelom-Zelllinien NCI-H929, OPM-2, RPMI-8226 und U266 wurden als unbehandelte Kontrolle (Ctrl) und mit 10nM, 100nM, 300nM, 600nM oder 1µM S-2209 über 72h inkubiert. Zellwachstum wurde mittels WST-1 Assay bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen werden gezeigt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse von 2 unabhängigen Experimenten.

Einige Studien konnten zeigen, dass Zytokine und Wachstumsfaktoren des Knochenmarkmilieus wie IGF-1 das Zellwachstum der Plasmazellen stimulieren und zu Proliferation und Zellüberleben führen. Daher wurde überprüft, ob S-2209 den wachstumsstimulierenden Effekten von Zytokinen und Wachstumsfaktoren entgegen wirken kann.

NCI-H929- und U266-Zelllinien wurden mit 100nM oder 300nM S-2209 und 25%igem HS5 - Stromazellmedium (gewonnen aus dem Überstand nach 48h Zellkultur von HS-5-Zellen) oder 200ng/ml IGF-1 inkubiert. Beide Zelllinien ließen sich mit IGF-1 und 25% HS-5-Medium stimulieren. Mit IGF-1 kam es zu einem zusätzlichen Zellwachstum von 66% bei NCI-H929 und 69% bei U266, mit 25% HS-5-Medium zu einer Wachstumszunahme von 67% bei NCI-H929 und 45% bei U266.

Nach Inkubation mit S-2209 zeigte sich eine signifikante, konzentrationsabhängige Zellwachstumshemmung. Der stimulierende Effekt von Wachstumsfaktoren und Zytokinen auf das Zellwachstum wurde durch S-2209 inhibiert (Abb. 11a, b).



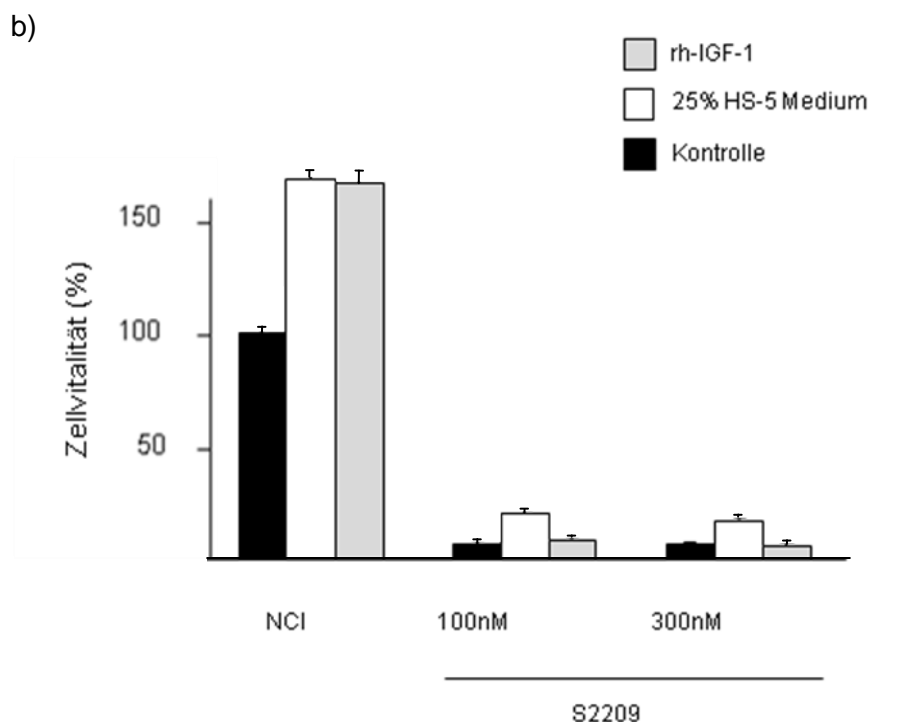


Abbildung 11a, b: S-2209 hemmt Zellwachstum nach Stimulation mit IGF-1 und Zytokinen.

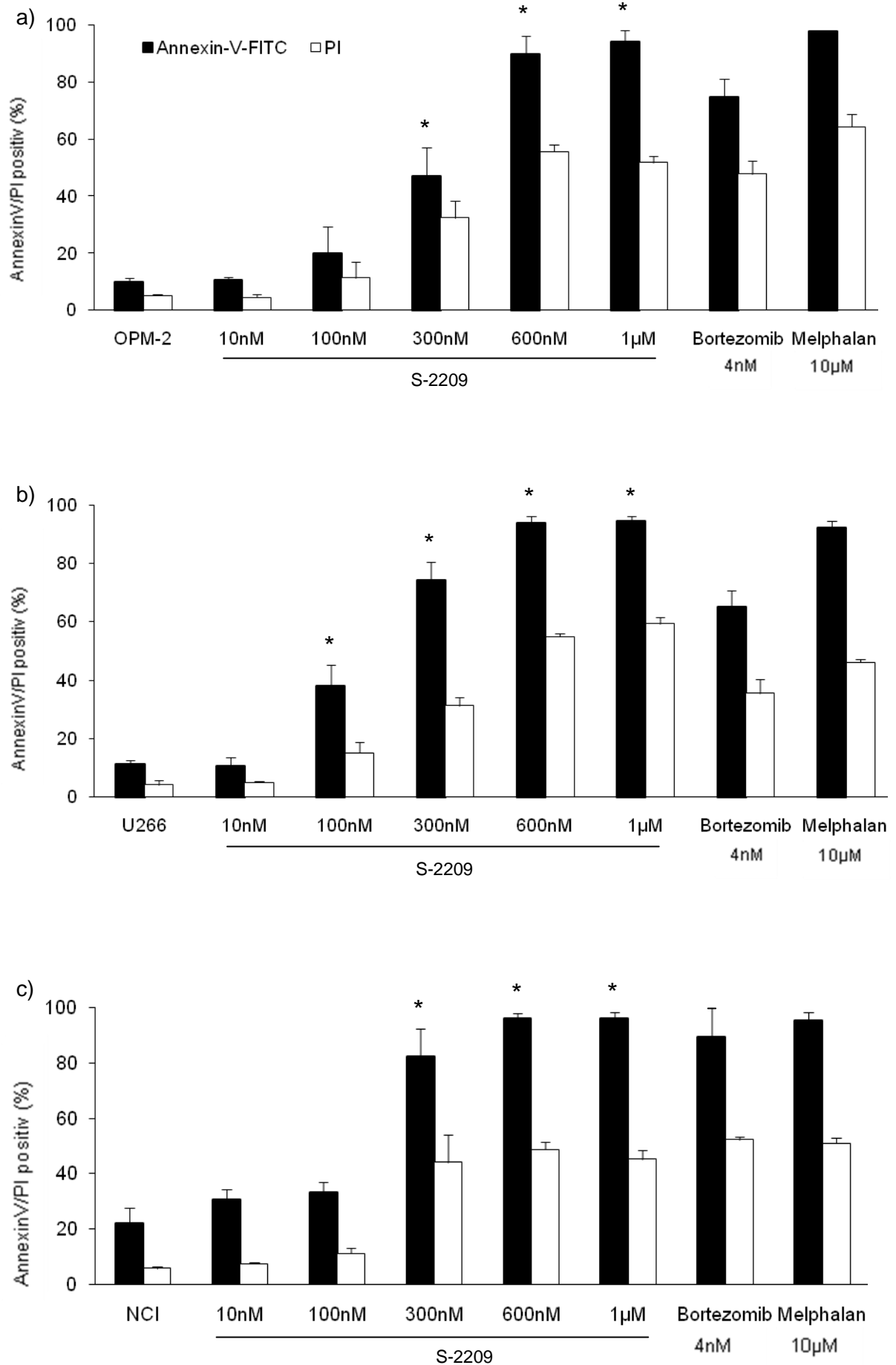
NCI-H929 und U266-Myelomzellen wurden als Kontrolle, mit 100nM oder 300nM S-2209 und mit 100ng/ml IGF-1 oder 25% Medium-Überstand von HS-5-Stromazellen kultiviert. Nach 48 h Inkubationszeit wurden die Zellen gewonnen und im WST-1-Assay untersucht.

3.2.2 S-2209 induziert Apoptose in humanen Multiplen Myelomzellen

3.2.2.1 Annexin-V-FITC/Propidiumjodid und DiOC6/Propidiumjodid

Die Induktion von Apoptose in Myelomzellen durch S-2209 wurde wie folgt untersucht:

Die Myelomzellen von vier verschiedenen Zelllinien wurden mit steigenden Konzentrationen von S-2209 über 72h inkubiert und die Zellen mit Annexin-V-FITC- und Propidiumjodid gefärbt. Vergleichbar mit den Ergebnissen des WST-1-Assays, konnte Apoptose bei Konzentrationen von S-2209 im Bereich von 100nM bis 600nM induziert werden (Abb. 12 a-d). IC_{50} Werte lagen bei 100 bis 300nM bei U266-Zellen und 300 bis 600nM bei OPM2-Zellen. Im Vergleich zu einer zytostatischen Behandlung mit Melphalan 10 μ M oder Bortezomib 4nM konnte nach Inkubation der Myelomzellen mit S-2209 ein höherer oder zumindest gleich hoher Anteil an apoptotischen Zellen nachgewiesen werden.



Ergebnisse

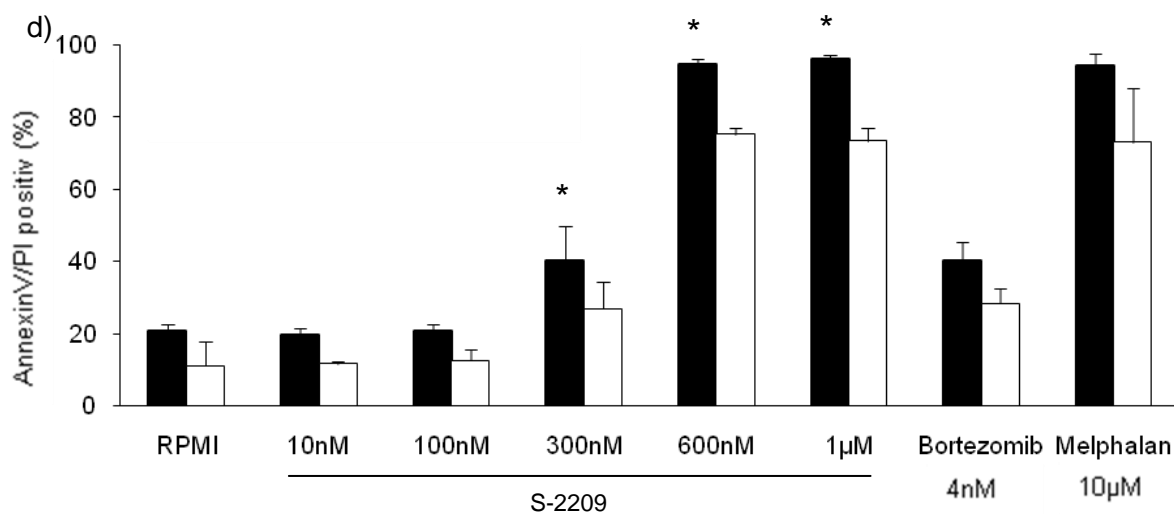


Abbildung 12a, b, c, d: S-2209 induziert Apoptose in Myelomzellen, Annexin-V-FITC/Propidiumjodid Durchflusszytometrie.

OPM-2 (a), U266 (b), NCI-H929 (c) und RPMI-8226 (d) wurden als Kontrolle und mit S-2209 in Konzentrationen von 10nM, 100nM, 300nM, 600nM und 1µM oder 10µM Melphalan oder 4nM Bortezomib über 72h inkubiert. Induktion von Apoptose wurde in der Durchflusszytometrie nach Färbung mit Annexin- V-FITC / Propidiumjodid bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen werden gezeigt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse von 2 unabhängigen Experimenten. * $p < 0.05$ versus Kontrolle.

Als weitere Methode zum Nachweis von Apoptose wurden die Zellen mit DiOC6/Propidiumjodid gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei wurde der Verlust der transmembranösen mitochondrialen Spannung nachgewiesen. Wie in den vorhergehenden Experimenten wurden die Zelllinien OPM-2 und U266 mit steigenden Konzentrationen von S-2209 über 72 Stunden inkubiert. Wie erwartet kam es zu einem konzentrationsabhängigen Verlust des mitochondrialen transmembranösen Spannungspotentials (Abb. 13 a, b).

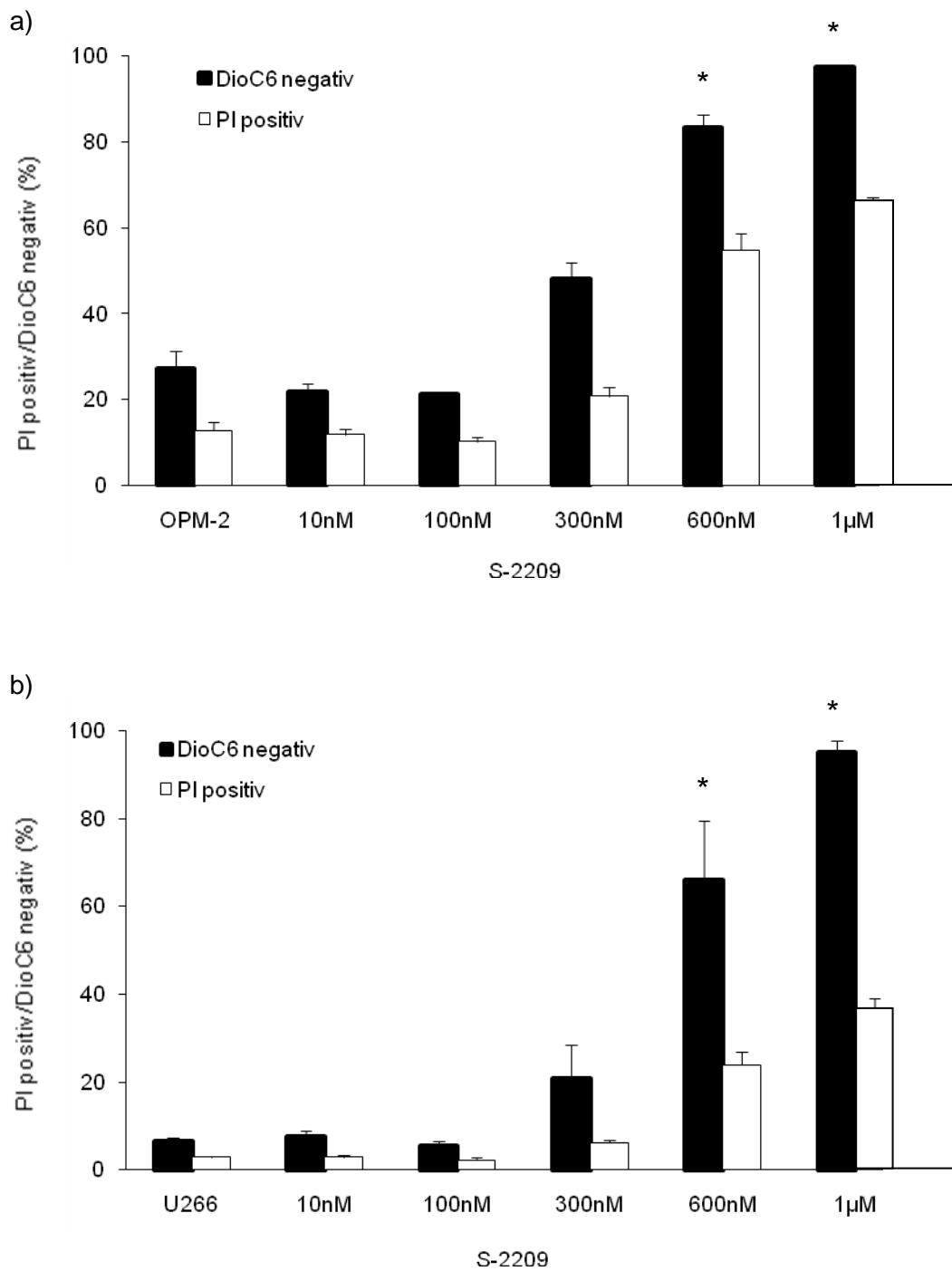


Abbildung 13a, b: S-2209 induziert Apoptose. DiOC6/Propidiumjodid-Protokoll.

OPM-2- (a), und U266- (b) Myelomzellen wurden als Kontrolle und mit S-2209 in Konzentrationen von 10nM, 100nM, 300nM, 600nM und 1µM über 72h inkubiert. Der Verlust des mitochondrialen Spannungspotentials wurde in der Durchflusszytometrie nach DiOC6/Propidiumjodid-Färbung bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen werden gezeigt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse von 2 unabhängigen Experimenten. * $p < 0.05$ versus Kontrolle.

3.2.2.2 Nachweis der Caspase-Spaltung mittels Western Blot

Zur weiteren Bestätigung der Apoptoseinduktion durch den Proteasominhibitor S-2209 wurde mittels Western Blot die Spaltung der Caspasen 3, 8 und 9 untersucht. Hierzu wurden U266-Myelomzellen mit steigenden Konzentrationen von S-2209 über 24h inkubiert und anschließend die Proteinexpression im Western Blot analysiert. Hier konnte als weiterer Nachweis einer Apoptoseinduktion durch S-2209 gezeigt werden, dass die Caspase-3, Caspase-8 und Caspase-9 aktiviert und gespalten werden (Abb. 14).

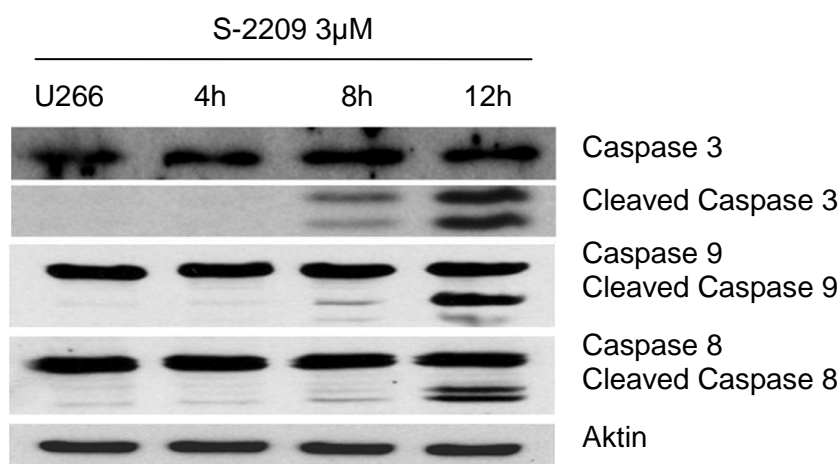


Abbildung 14: S-2209 induziert Apoptose und führt zu einer Spaltung von Caspase-3, -8 und -9. U266-Myelomzellen wurden mit einer S-2209 Konzentration von 3μM für 4h, 8h, oder 12h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert und direkt auf SDS-PAGE aufgetragen, auf Membranen transferiert und mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern inkubiert.

Mit unterschiedlichen Methoden konnte nach Inkubation der Myelomzellen mit S-2209 eine signifikante Reduktion der Zellvitalität, eine Inhibition des Zellwachstums sowie die Induktion von Apoptose nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein IC_{50} -Wert zwischen ~100 und 600nM.

3.2.2.3 S-2209 induziert Apoptose in primären Multiplen Myelomzellen

Die Wirkung von S-2209 wurde auch bei primären Myelomzellen (hBMSC) untersucht. Mononukleäre Zellen aus frischem Knochenmarkspirat von zehn aufeinanderfolgenden Patienten mit Multiplem Myelom wurden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert. Alle Patienten befanden sich im Stadium IIIA nach Salmon und Durie. Mit Hilfe von MACS-Beads wurden die CD138-positiven Zellen von den restlichen mononukleären Zellen getrennt. Ein Anteil von 90% oder mehr an CD138-positiven Zellen (Myelomzellen) war Voraussetzung für die Verwendung der Probe.

Die Myelomzellen wurden mit steigenden Konzentrationen von S-2209 über 48h oder 72h inkubiert. Durchflusszytometrisch wurde nach Annexin-/PI-Färbung die Anzahl der apoptotischen Zellen bestimmt.

Auch bei primären Myelomzellen zeigte sich in Abhängigkeit von Zeit und Konzentration eine Induktion von Apoptose durch S-2209. Wie in Abbildung 15 dargestellt, induziert S-2209 bereits nach 48h Inkubationszeit Apoptose, zeigt jedoch nach 72h einen höheren Anteil an AnnexinV-/PI-positiven Zellen. Der Effekt von S-2209 war in den höchsten Konzentrationen vergleichbar mit Bortezomib in einer Konzentration von 4nM oder Melphalan 10 μ M.

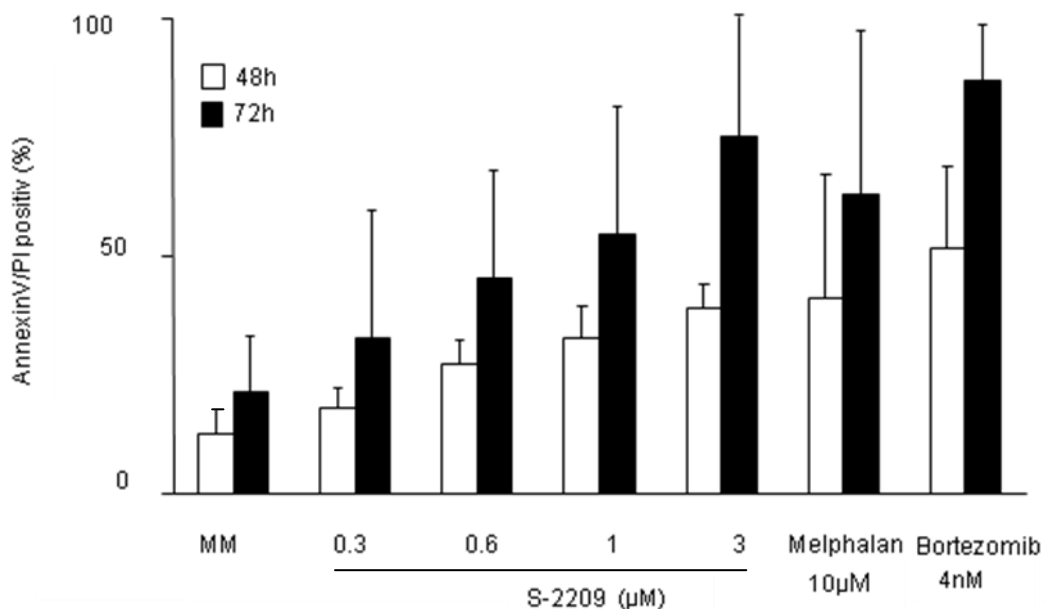


Abbildung 15: S-2209 induziert Apoptose in primären Myelomzellen.

Primäre Myelomzellen von 10 Myelompatienten wurden isoliert mittels CD138-MACS Beads wie im Methodenteil beschrieben. Myelomzellen wurden als Kontrolle (MM) und mit S-2209 in Konzentrationen von 300nM, 600nM, 1 μ M und 3 μ M oder 10 μ M Melphalan oder 4nM Bortezomib über 48h oder 72h inkubiert. Induktion von Apoptose wurde in der Durchflusszytometrie nach Färbung mit Annexin- V-FITC / Propidiumjodid bestimmt. Mittelwerte und Standardabweichungen werden gezeigt.

3.3 S-2209 zeigt ein günstiges Toxizitätsprofil *in vitro* und *in vivo*

Zur weiteren Charakterisierung des neuen Proteasominhibitors S-2209 wurde auch das Toxizitätsprofil *in vitro* und *in vivo* untersucht, um den Bereich der tolerierten Dosierungen festlegen zu können. Des Weiteren sollten die möglichen Nebenwirkungen in den verwendeten Konzentrationsbereichen eingeordnet werden.

3.3.1 S-2209 induziert keine Apoptose in mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Nachdem S-2209 in der Zellkultur zu Zellwachstumsarrest und Apoptose von Myelomzellen führt, wurde nun die Auswirkung auf mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von gesunden Kontrollpersonen untersucht.

PBMC wurden isoliert und mit steigenden Konzentrationen von S-2209, Bortezomib oder Melphalan für 48h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen nach Annexin-V-FITC/PI-Protokoll im Durchflusszytometer gemessen. Abbildung 16 zeigt, dass Melphalan als Positivkontrolle im Gegensatz zu Bortezomib signifikant Apoptose bei PBMC gesunder Kontrollpersonen induziert.

S-2209 induziert keine Apoptose in humanen PBMC, auch nicht bei einer Dosissteigerung bis hin zu 3µM.

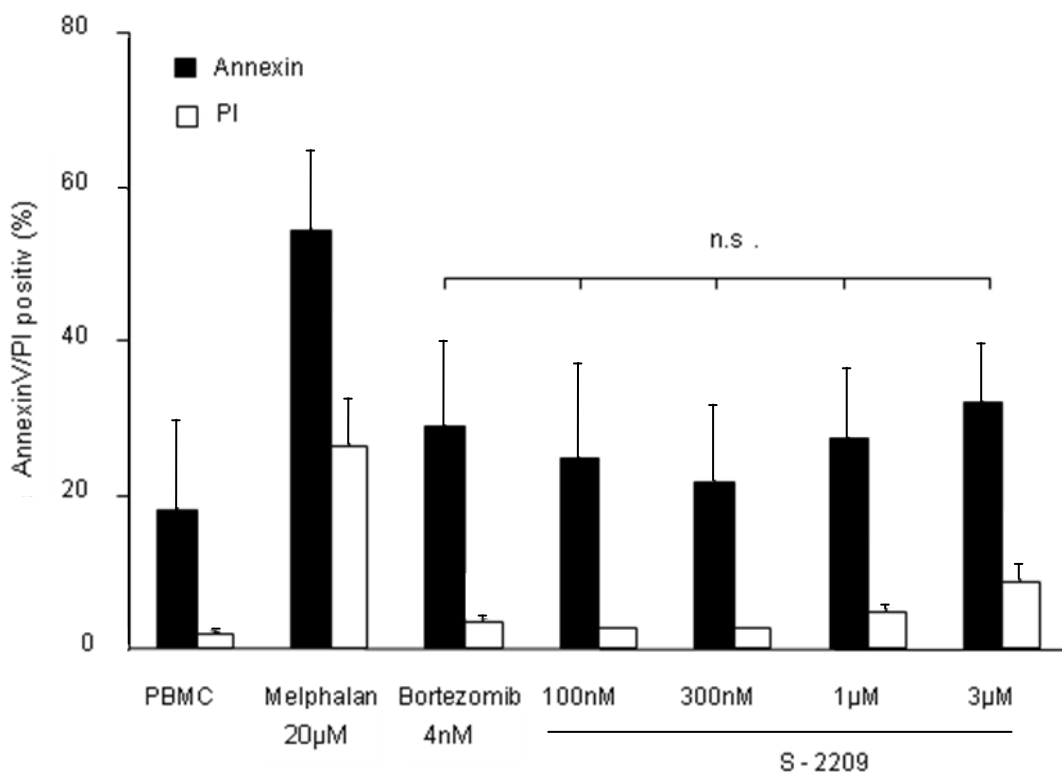


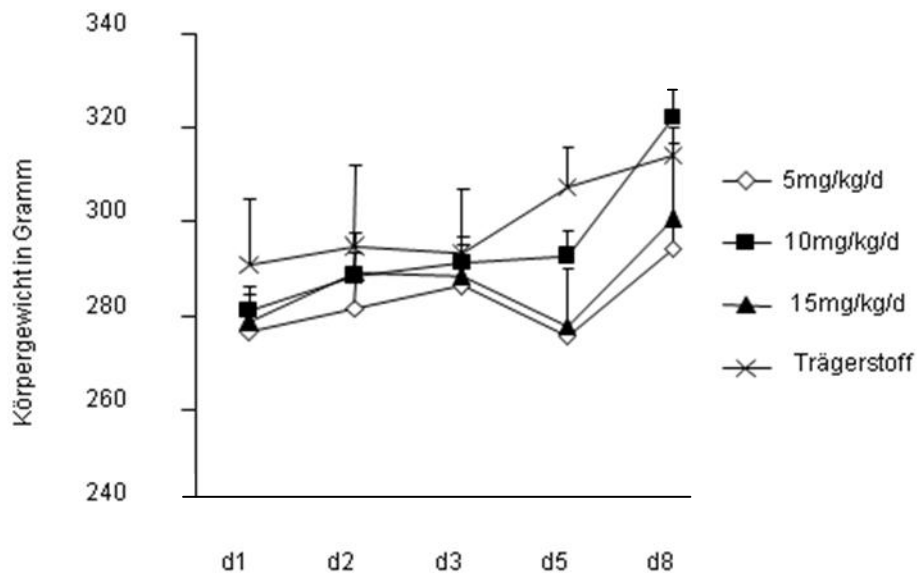
Abbildung 16: S-2209 induziert keine Apoptose in mononukleären Zellen des peripheren Blutes.

PBMC wurden von 2 gesunden Kontrollpersonen isoliert, mit PBS gewaschen und jeweils mit 20µM Melphalan, 4nM Bortezomib und steigenden Konzentrationen von S-2209 inkubiert. Nach einer Inkubation von 48h wurden die Zellen gesammelt, mit Annexin-V-FITC und Propidiumjodid gefärbt und die Apoptoseinduktion in der Durchflusszytometrie bestimmt.

3.3.2 S-2209 zeigt *in vivo* ein günstiges Toxizitätsprofil

Um das günstige Toxizitätsprofil von S-2209 *in vitro* weiter zu verifizieren, wurden *in vivo* Experimente in einem Rattenmodell zur Klärung der Toxizität der verwendeten Konzentrationen von S-2209 durchgeführt. Untersucht wurden 11 männliche Wistar-Ratten. Die Kontrollgruppe erhielt den Arzneimittelträgerstoff Cremophor. Die übrigen wurden mit einer S-2209-Konzentration von 5, 10 oder 15mg/kg Körpergewicht an drei aufeinander folgenden Tagen behandelt. Veränderungen von Körpergewicht und laborchemischen Parametern waren die Messgrößen, die Aufschluss über die Verträglichkeit von S-2209 geben sollten. Das Körpergewicht wurde an Tag 1, 2, 3, 5 und 8 bestimmt. Die Serumspiegel von ALAT, ASAT, ALP, Kreatinin und Hämoglobin wurden an Tag 1, 3 und 5 jeweils 30 Minuten vor S-2209-Gabe bestimmt. Bezüglich des Körpergewichts konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Tieren gefunden werden (Abb. 17 a). Laborchemisch zeigten sich gering erhöhte Hämoglobinwerte bei allen Tieren an Tag 5. Ebenso zeigten sich bei allen Tieren grenzwertig erhöhte Werte von ASAT an Tag 3, die sich an Tag 5 wieder normalisiert hatten (Abb. 17 b).

a)



b)

S-2209

	pre-dose	Vehicle		5 mg/kg/d		10 mg/kg/d		15 mg/kg/d	
		d3	d5	d3	d5	d3	d5	d3	d5
ALAT	63.6 ± 5.9	65.0	60.5	62.8	51.3	64.2	54.3	77.8	53.7
ASAT	88.3 ± 5.9	86.8	78.1	113.7	81.3	113.7	82.5	117.7	84.6
ALP	597 ± 164	--	224.5	--	170.7	--	221.3	--	263.7
Crea	< 500	--	509	--	< 500	--	< 500	--	518
HB	14.5 ± 0.9	--	16.8	--	16.6	--	16.2	--	17.0

Abbildung 17a, b: S-2209 zeigt ein günstiges Toxizitätsprofil *in vivo*.

11 männliche Wistar Ratten wurden behandelt. Eine Cremophor-Formulation (3% S-2209, 20% Cremophor EL, 77% Natriumchlorid 0.9%) wurde verwendet, um die Substanz zu verabreichen. S-2209 wurde in Konzentrationen von 5, 10 oder 15mg/kg Körpergewicht intravenös an drei aufeinanderfolgenden Tagen injiziert. Das Körpergewicht wurde an Tag 1, 2, 3, 5 und 8 bei den behandelten und Kontrolltieren bestimmt. Laborchemisch wurden an Tag 1, 3 und 5 ASAT, ALAT, ALP, Kreatinin und Hämoglobin bestimmt. Abbildung 17a zeigt die Entwicklung des Körpergewichts im Verlauf. Abbildung 17b zeigt die laborchemischen Parameter.

3.4 S-2209 führt zu verminderter Expression von MCL-1, Aktivierung von JNK und erhöhter Expression von p53

Beim Multiplen Myelom werden die Plasmazellen durch eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren stimuliert, welche häufig zu einer Aktivierung der zentralen Signalwege (JAK/STAT-, MEK/ERK-, PI3-Kinase/Akt-Signalkaskade) führen. Die Aktivierung dieser Signaltransduktionswege ist maßgeblich an der Regulation von Zellmigration, Zellüberleben, Zellzyklus, Zellproliferation und vermittelter Zytostatikaresistenz beteiligt.

Um Veränderungen in der Expression dieser Proteine zu detektieren, wurde die Zelllinie U266 mit steigenden Konzentrationen von S-2209 über 24h inkubiert. Anschließend wurde die Expression der intrazellulären Proteine sowie die Phosphorylierung von Signalproteinen im Western Blot untersucht.

Die intrazelluläre Konzentration der Signalproteine des ERK-, AKT-, P70S6k- oder STAT3-Signaltransduktionsweges und der aktivitätsrelevante Phosphorylierungsstatus dieser Proteine zeigten sich durch S-2209 unbeeinflusst (Abb. 18).

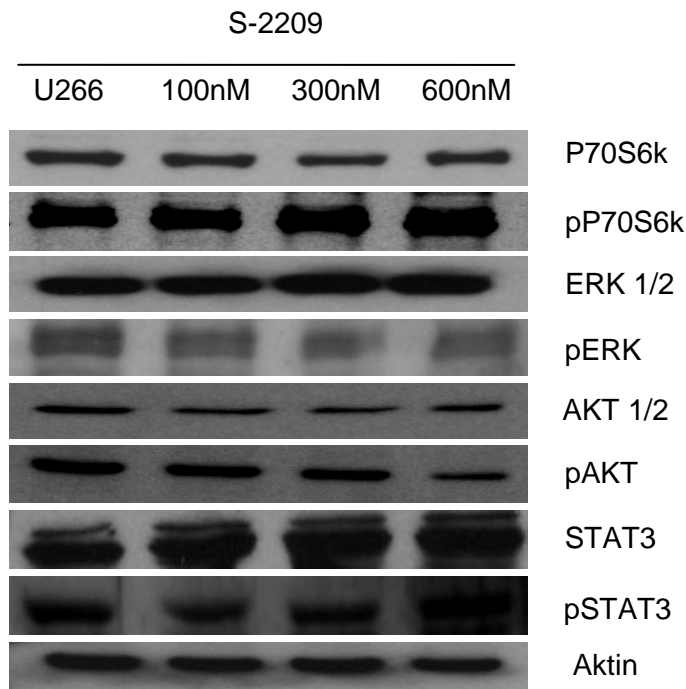


Abbildung 18: S-2209 beeinflusst die Signaltransduktionswege von ERK, AKT, P70S6k oder STAT3 nicht.

U266-Myelomzellen wurden mit steigenden Konzentrationen von S-2209 über 36h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert und direkt auf SDS-PAGE aufgetragen, auf Membranen transferiert und mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern inkubiert. Aktin-Immunoblotting wurde als Kontrolle für gleichmäßiges Proteinloading durchgeführt.

Pei et al. (Pei et al., 2003) konnten zeigen, dass Bortezomib zu einer Zunahme von anti-apoptotischen mitochondrialen Proteinen in Myelomzellen führt. Außerdem führt die gleichzeitige Inkubation von Myelomzellen mit Bortezomib und einem Inhibitor von Bcl-XL und Mcl-1 zu einer vermehrten Zytotoxizität (Navas et al., 2006).

Bei U266-Myelomzellen wurde der Effekt von S-2209 auf die Proteinexpression untersucht. Nach Inkubation der U266-Zellen mit steigenden Konzentrationen von S-2209 wurde die Expression von Mcl-1, Bad, Bclx-S/L, Bax und Bcl-2 im Western Blot bestimmt. Die Expression von Bad, Bclx-S/L, Bax und Bcl-2 wurde nicht beeinflusst, wohingegen die Expression von Mcl-1 bereits in einer Konzentration von 300nM S-2209 stark reduziert wurde (Abb. 19).

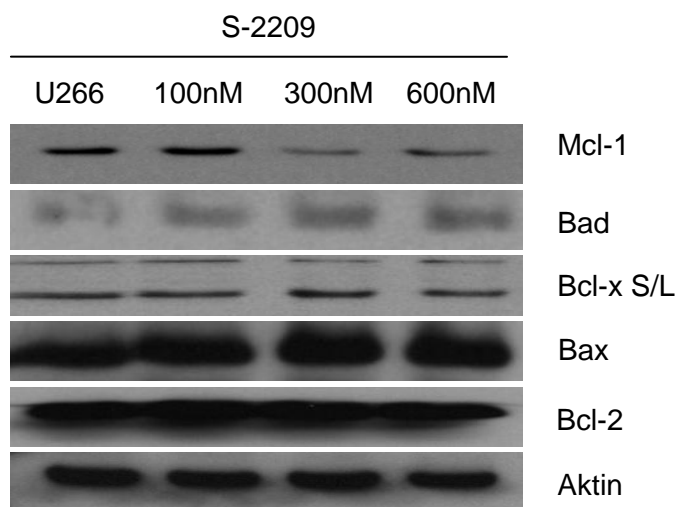


Abbildung 19: S-2209 reduziert die Expression von Mcl-1.

U266-Myelomzellen wurden mit steigenden Konzentrationen von S-2209 über 36h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert und direkt auf SDS-PAGE aufgetragen, auf Membranen transferiert und mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern inkubiert. Aktin-Immunoblotting wurde als Kontrolle für gleichmäßiges Proteinloading durchgeführt.

Da der Transkriptionsfaktor p53, der eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Neoplasien spielt, ebenfalls im Proteasom abgebaut wird, wurde der Einfluss von S-2209 auf die Proteinexpression von p53 untersucht. U266-Myelomzellen wurden mit steigenden Konzentrationen von S-2209 behandelt. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der p53-Proteinexpression (Abb.20).

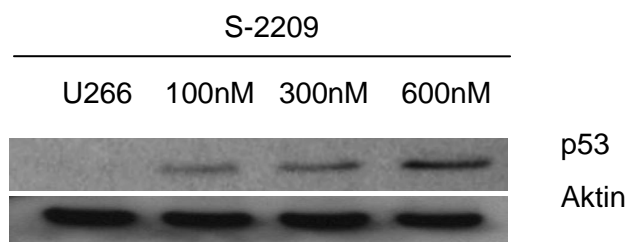


Abbildung 20: S-2209 führt zu einer vermehrten Expression von p53.

U266-Myelomzellen wurden mit steigenden Konzentrationen von S-2209 über 36h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert und direkt auf SDS-PAGE aufgetragen, auf Membranen transferiert und mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern inkubiert. Aktin-Immunoblotting wurde als Kontrolle für gleichmäßiges Proteinloading durchgeführt.

Des Weiteren wurde untersucht, ob S-2209 eine Stressantwort in der Zelle induziert, indem die Stress-induzierte Proteinkinase JNK im Western Blot bestimmt wurde. Durch Zunahme der Bande von pJNK als Hinweis auf eine vermehrte Aktivierung der JNK im

Zeitverlauf und eine tendenzielle Herunterregulierung von JNK ergaben sich Hinweise auf die Induktion der Stressantwort in der Zelle durch S-2209 (Abb. 21).

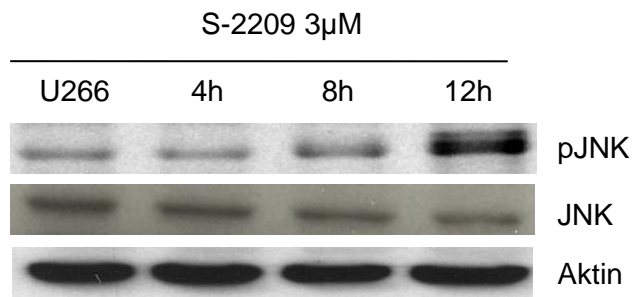


Abbildung 21: S-2209 führt zu einer vermehrten Phosphorylierung der JNK.

U266-Myelomzellen wurden mit steigenden Konzentrationen von S-2209 über 36h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert und direkt auf SDS-PAGE aufgetragen, auf Membranen transferiert und mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern inkubiert. Aktin-Immunoblotting wurde als Kontrolle für gleichmäßiges Proteinloading durchgeführt.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der Analyse der Proteinexpression darauf hin, dass die Inkubation mit dem Proteasominhibitor S-2209 durch Inhibition des Proteasoms und der NF κ B-Aktivität zu einer Änderung der Expression von anti-apoptotischen Proteinen und zur Aktivierung der Stress-induzierten Zellantwort der Myelomzellen führt. Die Behandlung mit S-2209 ist assoziiert mit einer verminderten Expression von MCL-1, einer Aktivierung von JNK und einer gesteigerten Expression von p53. Die klassischen Signaltransduktionswege werden nicht beeinflusst.

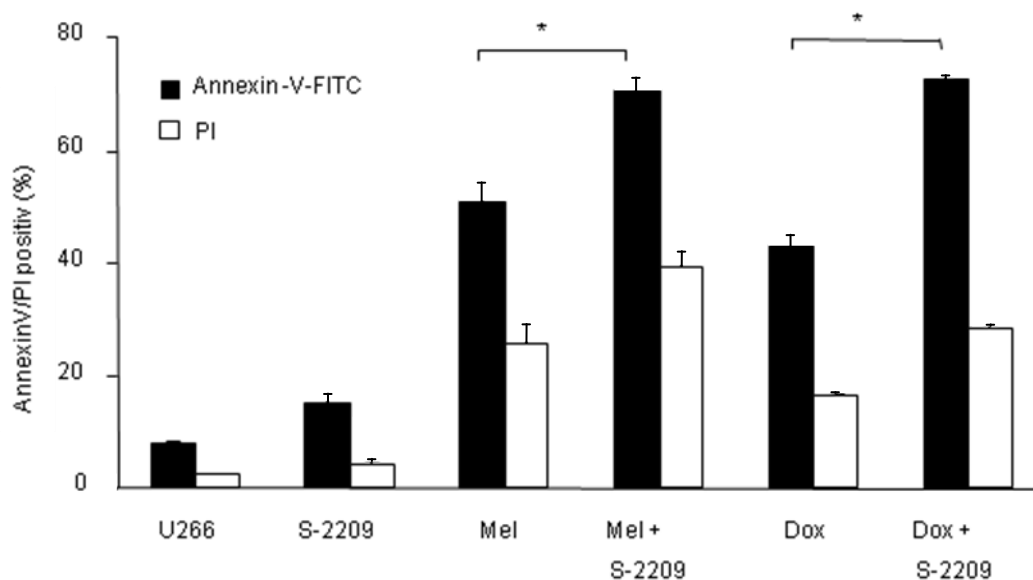
3.5 S-2209 zeigt eine gesteigerte Wirksamkeit in Kombination mit klassischen Zytostatika in der Therapie des Multiplen Myeloms

In der Therapie des Multiplen Myeloms werden häufig Zytostatika kombiniert, um die Wirksamkeit und die Ansprechrates zu erhöhen und Nebenwirkungen zu verringern. Vorhergehende Studien haben gezeigt, dass Melphalan und Doxorubicin NF κ B in Myelomzellen aktivieren und damit eine Chemoresistenz induzieren. Dies weist darauf hin, dass eine alleinige Gabe dieser Alkylanzien in der Zelle einen intrinsischen Reparaturmechanismus als Rescue-Mechanismus auslöst (Baumann et al., 2007; Ma et al., 2003).

Da S-2209 ein Proteasominhibitor ist und die Aktivierung von NF κ B inhibiert, wurde S-2209 mit den klassischen Zytostatika Melphalan und Doxorubicin kombiniert, mit dem Ziel, die zelluläre Gegenreaktion zu unterdrücken und damit additive und / oder synergistische Wirkungen bezüglich Apoptoseinduktion zu erreichen. Die Zelllinien OPM-2 und U266 wurden mit 100nM S-2209 und 5 μ M Melphalan oder 300nM Doxorubicin über 72h inkubiert. Die Apoptoseinduktion wurde in der Durchflusszytometrie nach Annexin-V-FITC-/PI-Färbung bestimmt.

Es zeigte sich eine verstärkte Wirkung der Substanzen mit einer gesteigerten Apoptoseinduktion bei Kombination der Wirksubstanzen. S-2209 in Kombination mit Melphalan zeigte eine um 25% erhöhte Apoptoserate in den behandelten Zellen der OPM-2-Zelllinie bzw. 38% in der U266-Zelllinie. In Kombination mit Doxorubicin zeigte sich eine erhöhte Apoptoseinduktion von 44% in OPM-2-Zellen und 69% in U266-Zellen (Abb. 22).

a)



b)

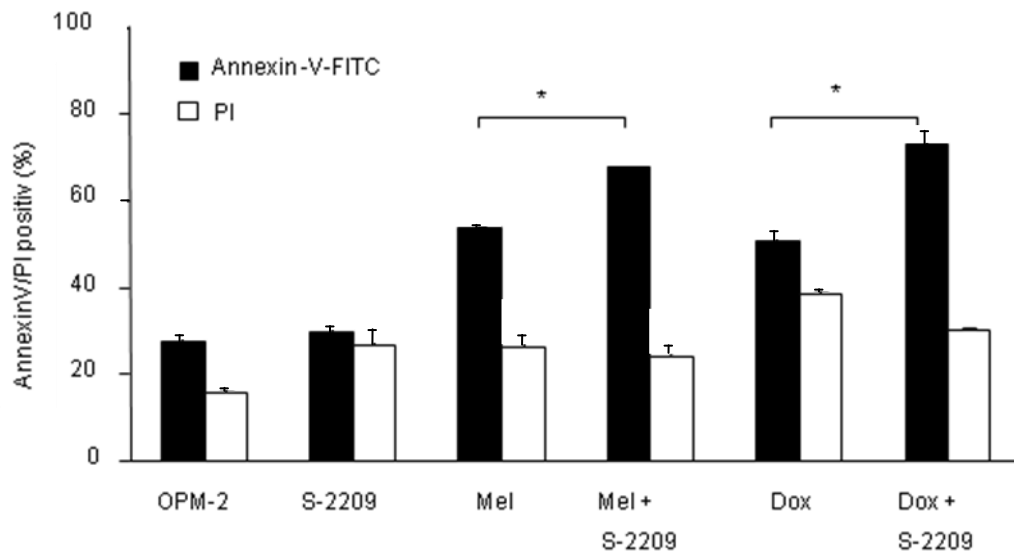


Abbildung 22 a, b: S-2209 zeigte eine gesteigerte Wirksamkeit in Kombination mit klassischen Zytostatika der Myelom-Therapie.

S-2209 erhöht die apoptotische Wirkung von Melphalan und Doxorubicin. OPM-2- und U266-Myelomzellen wurden jeweils mit 100nM S-2209 inkubiert und zusätzlich wurden 5µM Melphalan oder 300nM Doxorubicin der Zellkultur zugegeben. Die Zellen wurden für 72h inkubiert. Nach Ernten der Kulturen wurden die Zellen weiterbehandelt und mit Annexin-V-FITC und Propidiumiodid gefärbt. Induktion von Apoptose wurde in der Durchflusszytometrie bestimmt. In allen Abbildungen sind die verwendeten Zelllinien als Kontrolle abgebildet. Mittelwerte und Standardabweichungen werden gezeigt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse von 2 unabhängigen Experimenten. *p < 0.05 versus Kontrolle.

4 Diskussion

Die Behandlung des Multiplen Myeloms hat sich in den letzten zehn Jahren wesentlich gewandelt und verbessert. Langjährig galt die Kombination aus Melphalan und Prednison als Standardtherapie für das Multiple Myelom (Merchionne et al., 2007). Seit 1980 wurden durch die Hochdosistherapie und autologe Stammzelltransplantation (Raab et al., 2009) die Remissionsraten deutlich erhöht und in randomisierten Studien das Überleben gegenüber konventioneller Therapie deutlich gesteigert (Attal et al., 1996; Child et al., 2003).

Durch ein besseres Verständnis von Biologie und Genetik der Multiplen Myelomzellen haben über die letzten Jahre neue Medikamente mit andersartigen Wirkmechanismen Einzug in die Behandlung des Multiplen Myeloms gehalten. Mit der Einführung von Thalidomid, Lenalidomid und Bortezomib zeigten sich neue Aspekte in der Therapie (Rajkumar et al., 2005; Richardson et al., 2004; Richardson et al., 2005). Sie wurden lange Zeit als „Neue Substanzen“ bezeichnet, mittlerweile sind sie für den klinischen Gebrauch zugelassen. Werden diese Medikamente mit konventionellen Zytostatika wie Melphalan oder Cyclophosphamid und Kortikosteroiden kombiniert, können komplette Remissionen bei bis zu 30% der Patienten erreicht werden, was bisher nur mit Hochdosistherapie und Blutstammzelltransplantationen gelang (Cavo et al.; 2008; Facon et al., 2007; Rajkumar et al., 2007; Rosinol et al., 2007). Trotz dieser Fortschritte ist ein Langzeitüberleben auch nach autologer Stammzelltransplantation selten. Die allogene Stammzelltransplantation bringt die höchste Rate an Komplettremission in ca. 30% bis 40% der Fälle mit sich und sichert ein langjähriges Überleben (Bjorkstrand et al., 1996; Corradini et al., 2003; Koreth et al., 2009). Limitierende Faktoren sind die hohe therapiebedingte Morbidität und Mortalität. Erst durch die Einführung von dosisreduzierten Konditionierungsschemotherapien kann die allogene Stammzelltransplantation nun auch bei älteren Patienten mit geringerer Morbidität und Mortalität durchgeführt werden. Um ein möglichst langes krankheitsfreies Intervall zu sichern, ist die komplette Remission Voraussetzung (Kröger et al., 2007; Maloney et al., 2003).

Trotz der genannten Therapiefortschritte ist ein langfristig kurativer Ansatz bei vielen Myelompatienten bislang nicht möglich, weshalb weiter neue Substanzen entwickelt werden und verschiedene Kombinationschemotherapien Anwendung finden.

Bortezomib und die Immunmodulatoren werden zunehmend als Kombinationspartner mit innovativen Wirkstoffen eingesetzt, die aktuell Gegenstand von *in vitro*- und *in vivo*-Testungen sind und in klinischen Studien erprobt werden sollen. Diese neuen Sub-

stanzen sollen zu einer höheren Rate an Komplettremissionen führen und zu einer Verlängerung des Überlebens beitragen, weshalb in der vorliegenden Arbeit der neuartige Proteasominhibitor S-2209 charakterisiert wurde. Ziel der jeweils eingeleiteten Therapieschritte ist eine möglichst komplette Remission vor der Stammzelltransplantation oder bei Patienten, denen nur die alleinige Chemotherapie zur Verfügung steht, zu erreichen.

4.1 Proteasominhibitoren spielen eine wichtige Rolle in der Therapie des Multiplen Myeloms

Das Proteasom und damit der Proteinstoffwechsel der Zelle repräsentiert einen wichtigen Angriffspunkt in der Therapie des Multiplen Myeloms (Orlowski et al., 2008; Kanagasabay et al., 2007). Der proteasomale Abbau vieler Proteine, die an der Regulation von Zellzyklus und Zellwachstum beteiligt sind, wie zum Beispiel p21, p27 und p53, nimmt eine zentrale Rolle in der Entwicklung von Neoplasien sowie deren Progression ein (Zavrski et al., 2007; Bae et al., 1995; Loda et al., 1997). Maligne Zellen weisen zudem einen erhöhten Proteinstoffwechsel auf, weshalb die Hemmung des Proteasoms eine sehr attraktive Therapiestrategie zur Einleitung von Apoptose durch Akkumulation von Proteinen in der Zelle darstellt.

Bortezomib

Bislang ist das Borsäure-Analogon Bortezomib der einzige zugelassene Proteasominhibitor zur Behandlung von Patienten. Bortezomib hemmt das Proteasom reversibel.

Bortezomib ist in Kombination mit Melphalan und Prednison für die Therapie von Patienten mit bisher unbehandeltem Multiplem Myelom zugelassen, die für eine Hochdosis-Chemotherapie mit Knochenmarktransplantation nicht geeignet sind.

Bortezomib ist auch als Monotherapie für die Behandlung des progressiven Multiplen Myeloms bei Patienten zugelassen, die mindestens eine vorangehende Therapie durchlaufen haben oder sich bereits einer Knochenmarktransplantation unterzogen haben. Bortezomib kann bei Patienten mit Niereninsuffizienz unter engmaschiger Überwachung und gegebenenfalls in reduzierter Dosis angewendet werden (Palumbo et al., 2009; San Miguel et al., 2008).

Nebenwirkungen sind sehr häufig und limitieren den klinischen Einsatz, vor allem periphere Neuropathien, zyklische Thrombozytopenien, gastrointestinale Störungen und Reaktivierung des Varizella-zoster-Virus. Auch über pulmologische Komplikationen wie Pneumonitis, interstitielle Pneumonie oder ARDS wird berichtet. Bei akuter pulmonaler oder kardialer Erkrankung ist Bortezomib kontraindiziert.

In der Therapie des refraktären Multiplen Myeloms führt die Monotherapie mit Bortezomib zu einer Tumorreduktion bei einem Drittel aller Patienten, also zu einer Ansprechrate von 25% bis 30% (Richardson et al., 2003; Richardson et al., 2005).

In der APEX-Studie (Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions) konnten Richardson et al. 2007 im Vergleich zu Dexamethason für Bortezomib eine höhere Ansprechrate als auch eine signifikant verlängerte Remissionsdauer bei Rezidiv oder therapierefraktärem Myelom nachweisen. In dieser randomisierten Studie wurde Bortezomib bei 669 Patienten mit einer bis drei Vortherapien gegenüber hochdosiertem Dexamethason - einer Behandlungsalternative in diesem Stadium der Erkrankung - verglichen. Nach einem Jahr lebten noch 89% der mit Bortezomib behandelten Patienten und 72% der Patienten aus dem Dexamethason-Arm. Die Rate der Nebenwirkungen war bei beiden Wirkstoffen vergleichbar. Bortezomib zeigte in der APEX-Studie eine überlegene Wirksamkeit gegenüber hochdosiertem Dexamethason - insbesondere in der „Second Line“-Therapie.

Im Rahmen der VISTA-Studie konnte die Überlegenheit einer Kombinationstherapie mit Bortezomib/Melphalan/Prednison (VMP) gegenüber Melphalan/Prednison (MP) gezeigt werden. Die VISTA-Studie ist eine internationale, randomisierte Phase-III-Untersuchung (San Miguel et al., 2008; Mateos et al., 2010). Es wurden 682 Patienten ohne Vortherapie und ohne Option zur Stammzelltransplantation mit einem medianen Alter von 71 Jahren untersucht.

Die Kombination aus Bortezomib, Melphalan und Prednison erzielte mit 71% ein deutlich höheres Gesamtansprechen als die Therapie mit Melphalan und Prednison allein (35%). Zudem konnte VMP eine in diesem Patientenkollektiv bislang einzigartig hohe Rate an kompletten Remissionen von 30% versus 4% unter MP zeigen. Die progressionsfreie Zeit betrug unter VMP 24 versus 12,8 Monate unter MP. Diese Ergebnisse führten 2008 zu einer Zulassungserweiterung von Bortezomib in der Erstlinientherapie des Multiplen Myeloms in Kombination mit Melphalan bei Patienten, die nicht für eine Stammzelltransplantation in Frage kommen.

Die Kombination aus Bortezomib, Melphalan und Prednison zeigt auch nach einer medianen Nachverfolgungszeit von 36,7 Monaten einen Vorteil beim Dreijahresüberleben. VMP zeigt ein signifikant höheres Dreijahres-Überleben (68,5% vs. 54%) als die MP-Gruppe. Auch niereninsuffiziente Patienten profitieren und Bortezomib beeinflusst den Knochenstoffwechsel positiv (San Miguel et al., 2008; Dimopoulos et al., 2009).

Mateos et al. zeigten in einer aktuellen Phase-III-Studie im Rahmen der VISTA-Studie (Mateos et al., 2010) außerdem, mit welchen Kombinationspartnern Bortezomib die besten Therapieergebnisse erbringt, dem Alkylanz Melphalan oder dem Immunmodulator Thalidomid. In der randomisierten Studie wurde VMP mit der Kombination Bortezomib/Thalidomid/Prednison (VTP) verglichen. Eingeschlossen wurden 260 Patienten über 65 Jahre ohne Vortherapien. Nach 6 Zyklen einer Therapie mit VMP bzw. VTP erfolgte eine zweite Randomisierung und es wurde bis zu 3 Jahre lang eine Erhaltungstherapie mit Bortezomib/Prednison (VP) bzw. Bortezomib/Thalidomid (VT) durchgeführt. Das beste Ergebnis wurde erzielt, wenn die Patienten zunächst mit 6 Zyklen VMP, gefolgt von einer Erhaltungstherapie mit VT behandelt wurden. Hier zeigten sich komplette Remissionsraten von bis 40%. Die Therapie war gut verträglich, schwere Polyneuropathien traten bei weniger als 10% auf. Eine längere Nachbeobachtungszeit muss klären, ob das Gesamtüberleben durch eine Therapie mit 6x VMP und anschließender Erhaltungstherapie mit VT signifikant verbessert wird, bevor es als neuer Standard betrachtet werden kann.

Palumbo et al. (Palumbo et al., 2010) konnten aktuell ebenfalls zeigen, dass eine Kombinationstherapie bestehend aus Bortezomib, Lenalidomid oder Thalidomid und Dexamethason, Doxorubicin oder Melphalan einen signifikanten Überlebensvorteil und eine bessere Ansprechrate als die Hochdosischemotherapie mit Melphalan bewirkt, auch bei Hochrisikopatienten mit nachgewiesenen Chromosomenaberrationen oder p53-Deletion (Mateos et al., 2006; Palumbo et al., 2008; Palumbo et al., 2007).

Neben Bortezomib wurden in den letzten Jahren weitere Proteasominhibitoren entwickelt, um ein günstigeres Nebenwirkungsprofil und einen Überlebensvorteil zu erreichen.

Carfilzomib

Carfilzomib ist ein selektiver Proteasominhibitor der 2. Generation, welcher zu den Epoxyketonen zählt und das Proteasom irreversibel hemmt. Carfilzomib hat bereits vielversprechende Ergebnisse in der Behandlung des Multiplen Myeloms innerhalb klinischer Studien erbracht. Aktuell wird die Carfilzomib-Monotherapie in mehreren Phase 1- und Phase 2-Studien bei Patienten mit refraktärem Multiplem Myelom und einer bis drei Vortherapien (Alkylanzien, Stammzelltransplantation, Immunmodulatoren, Anthrazykline, Bortezomib) untersucht. Ergebnisse dieser Studien und eine Zulassung zum klinischen Einsatz werden Ende 2010 erwartet.

In der aktuellen klinischen Studie werden 2 Patientengruppen mit therapierefraktärem Multiplem Myelom evaluiert, 73 Patienten, die bislang nicht mit Bortezomib behandelt wurden und 33 Patienten nach einer Vorbehandlung mit Bortezomib (Dick et al., 2010; O'Connor et al., 2009, Parlati et al., 2009).

54 Patienten ohne Vortherapie mit Bortezomib zeigten unter Carfilzomib eine Ansprechrate von 46% bei einer Dosis von 20 mg/m². Bei einer Dosiserhöhung auf 27 mg/m² zeigten weitere 19 Patienten eine Ansprechrate von 53%.

33 Patienten mit Bortezomib in der Vorbehandlung zeigten eine Ansprechrate von 18%.

Mehr als 20% der Patienten konnten die vorgesehenen 12 Zyklen Carfilzomib in der gewählten Dosierung ohne schwerwiegendere Nebenwirkungen beenden.

Diese ersten Ergebnisse zeigen, dass Patienten, die unter den bislang zugelassenen Zytostatika ein Rezidiv erleiden oder therapierefraktär sind, von einer Therapie mit Carfilzomib profitieren können. Des Weiteren lässt die geringe Inzidenz von Neuropathien und den meist geringen und gut behandelbaren Nebenwirkungen darauf schließen, dass eine Dosissteigerung bis 27mg/m² möglich ist, auch bei ausgeprägter Komorbidität mit Niereninsuffizienz.

Die Therapie mit Carfilzomib wurde auch nach längerer Verabreichung in diesen ersten Studien gut vertragen. Bei weniger als 5% der behandelten Patienten kam es zu Nebenwirkungen wie Erschöpfungszustände, Pneumonien, Neutropenie, Lymphozytopenie und Anämie. Periphere Neuropathien traten sehr selten auf.

Carfilzomib zeigte also als Monotherapie in den bislang dargelegten Daten einen zytotoxischen Effekt in Multiplen Myelomzellen unabhängig von vorhergehenden Kombinationstherapien. Diese Studie unterstützt den weiteren Einsatz von Carfilzomib. Die Langzeit-Überlebens-Raten von Patienten, die keine weiteren Therapieoptionen haben, könnten hierdurch verbessert werden. Es besteht gerade für diese Patientengruppe die Notwendigkeit, innovative Substanzen zu entwickeln, die das Überleben verlängern (<http://www.onyx-pharm.com/view.cfm/632/Carfilzomib>; <http://www.medicalnewstoday.com/articles/152127.php>; 02.05.2010).

Carfilzomib hat auch in Kombination eine bemerkenswerte Wirkung gezeigt, wie in einer weiteren aktuellen Studie gezeigt werden soll (http://www.multiplesmyelom.ch/downloads/myelom_bulletin_jan_2010.pdf). Hier wurde die Kombination von Carfilzomib mit Lenalidomid und niedrig dosiertem Dexamethason untersucht. Innerhalb dieser Phase-I-Studie sollten die am besten verträgliche Dosierung und An-

sprechraten bei Patienten mit einer bis drei vorangegangenen unterschiedlichen Therapien evaluiert werden. Anhand der ersten ausgewerteten Patientenverläufe zeigte sich, dass selbst die volle Dosierung von Lenalidomid (25mg an 21 von 28 Behandlungstagen) zusammen mit 20 mg/m² Carfilzomib noch keine inakzeptablen Nebenwirkungen verursachte. Entsprechend werden derzeit noch höhere Dosierungen von Carfilzomib untersucht. Jedoch konnte bereits in der bisherigen Konzentration eine eindruckliche Ansprechrate erzielt werden (partielle Remission: 55%). Im Gegensatz zu Bortezomib scheint dieser Proteasominhibitor deutlich weniger Nervenschädigungen zu verursachen. Aufgrund der ermutigenden Ergebnisse ist nun eine große Phase-III-Studie dieser Wirkstoffkombination für 2010 geplant, die auch in Deutschland durchgeführt wird.

S-2209

Aufgrund des bislang viel versprechenden Einsatzes von Proteasominhibitoren wurde in der vorliegenden Arbeit der neuartige Proteasominhibitor S-2209 charakterisiert. S-2209 ist im Gegensatz zu Bortezomib kein Borsäure-Analogon und im Gegensatz zu Carfilzomib kein Epoxyketon, sondern ein Semicarbazon, welches die 20S-Einheit des Proteasoms irreversibel hemmt.

S-2209 führt in hohem Maße zu Zellwachstumsarrest in Multiplen Myelomzellen in Zellkultur, sowohl in Myelomzelllinien als auch in primären Myelomzellen von betroffenen Patienten. Außerdem induziert S-2209 bereits in Konzentrationen zwischen 100nM und 600nM Apoptose in den behandelten Zellen. Als Zeichen der Aktivierung der Apoptosekaskade konnte eine Spaltung der Caspasen-3, -8 und -9 gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Apoptoseweg durch S-2209 aktiviert wird.

Bislang sind toxische Begleiterscheinungen wie Neuropathien und Neutropenien sowie Thrombozytopenien limitierende Faktoren beim Einsatz der Proteasominhibitoren. Auch in hohen Konzentrationen zeigt S-2209 keine Zytotoxizität in mononukleären Zellen von gesunden Personen. Dies deutet auf eine gewisse zelluläre und biologische Spezifität der Substanz hin und lässt auf ein günstiges Nebenwirkungsprofil hoffen, welches in weiteren Studien evaluiert werden muss. Im Tiermodell zeigten sich keine auffallenden Toxizitäten unter S-2209. Auch in steigenden Konzentrationen kam es nicht zu einer Beeinträchtigung des Allgemeinzustands oder zu einem Gewichtsverlust der Tiere. Laborchemisch zeigten sich keine Hinweise auf eine ausgeprägte toxische Wirkung von S-2209 in der kurzfristigen Anwendung. Die Nierenretentionsparameter und Leberenzyme wiesen keine relevanten Veränderungen auf. Es liegen jedoch noch

keine Daten zu langfristigen Nebenwirkungen vor. Dies sollte Gegenstand weiterführender Studien sein, um die zu erwartende Toxizität vor klinischem Einsatz von S-2209 weiter einschätzen zu können.

Nebenwirkungen wie eine periphere Neuropathie, gastrointestinale Symptome, Thrombozytopenie und Neutropenie führen häufig zu einem Abbruch der Behandlung mit Bortezomib (Badros et al., 2007). Substanzen mit anderer chemischer Struktur und verändertem biologischem Verhalten können zu einer veränderten Toxizität führen. Aufgrund der irreversiblen Hemmung des Proteasoms durch S-2209 ist gerade auch bei nicht regenerierbaren Geweben, wie zum Beispiel Nervenzellen, eine dauerhafte Schädigung zu bedenken und vor einem klinischen Einsatz im Tiermodell weiter zu evaluieren. Für Carfilzomib, welches das Proteasom ebenfalls irreversibel hemmt, sind jedoch deutlich weniger Neuropathien beschrieben als für den reversiblen Proteasominhibitor Bortezomib. Diesbezüglich lassen sich für S-2209 noch keine Aussagen treffen.

Da S-2209 das Proteasom irreversibel und damit langfristig hemmt, ist außerdem von einer effektiveren Apoptose-Induktion in Myelomzellen auszugehen, gerade auch, da diese Zellen einen besonders hohen Proteinstoffwechsel aufzeigen und es durch den fehlenden proteasomalen Abbau rasch zu einer Stress-induzierten Zellantwort und letztlich Zelltod kommt (Chauhan et al., 2005; Dalton et al., 2004).

S-2209 hemmt *in vivo* die 20S-Einheit des Proteasoms in gering höherem Ausmaß als Bortezomib. Die irreversible Hemmung der 20S-Einheit führt wohl auch zu der effektiven Proteasominhibition bereits im nanomolaren Bereich.

Dieser Wirkmechanismus lässt auf eine ähnlich gute klinische Wirksamkeit von S-2209 wie von Carfilzomib schließen mit möglicherweise vergleichbar günstigem Nebenwirkungsprofil, weshalb weitere Testungen mit S-2209 geplant sind.

4.2 Der Transkriptionsfaktor NFκB wirkt antiapoptotisch und wird durch Proteasominhibitoren gehemmt

Die Ansprechrate des Tumors kann durch die Kombination von zytotoxischen Substanzen, wie zum Beispiel Dexamethason mit klassischen Zytostatika wie Melphalan und Doxorubicin oder mit Bortezomib deutlich erhöht werden. Hierbei spielt der Transkriptionsfaktor NFκB und die durch ihn vermittelte antiapoptotische Zellantwort in der Myelomzelle eine wichtige Rolle.

Beim Multiplen Myelom sind viele Risiko- und auslösende Stressfaktoren wie Virusinfektionen, Bestrahlung, Chemotherapie, Antigene, Wachstumsfaktoren und zelluläre

Adhäsion an Stromazellen des Knochenmarks bekannt, welche vollständig oder teilweise ihren Wirkmechanismus über die Aktivierung von NFκB vermitteln (Dalton et al., 2004). NFκB ist ein Transkriptionsfaktor, bildet einen Komplex mit IκB im Zytoplasma und liegt so als inhierte Form vor (Alkalay et al., 1995; Scherer et al., 1995; Spencer et al., 1999; Haas et al., 1998). Im Zellkern moduliert er die Transkription, die eine Rolle bei der Regulation des Zellzyklus, Zellüberlebens, Proliferation und Vermittlung der Resistenz gegenüber Medikamenten spielt und sie maßgeblich beeinflusst. Indem der Abbau von IκB im Proteasom gehemmt wird, wird das durch NFκB vermittelte Wachstum der Tumorzellen und deren Medikamentenresistenz verhindert.

Für S-2209 konnte in verschiedenen Experimenten gezeigt werden, dass es den Abbau von IκB hemmt. Somit verhindert S-2209 die Aktivierung von NFκB. Dies bedeutet, dass die antiapoptotischen Mechanismen in der entarteten Zelle gehemmt werden und somit deren Proliferation und Überleben. Daher ist die Hemmung von NFκB ebenfalls als einer der wichtigen Wirkungsmechanismen von Proteasominhibitoren in Multiplen Myelomzellen und anderen malignen Erkrankungen (Hideshima et al., 2002) anzusehen.

In vorhergehenden Publikationen konnte gezeigt werden, dass NFκB bei alleiniger Therapie mit Melphalan und Doxorubicin aktiviert wird (Baumann et al., 2007). Dies deutet darauf hin, dass es in Myelomzellen zu einer Aktivierung eines intrinsischen Rescue-Mechanismus kommt, welcher letztlich den induzierten Zelltod in der Myelomzelle verhindert. Auch dieser Mechanismus wird durch NFκB reguliert.

Die gleichzeitige Inkubation von Myelomzellen mit Melphalan oder Doxorubicin und einem Inhibitor des NFκB-Signaltransduktionsweges verhindert folglich den Anstieg der NFκB-Aktivität, welcher durch das klassische Zytostatikum vermittelt wird.

Letztlich kommt es durch die Kombination der Substanzen zu einer erhöhten Apoptoserate und wohl auch zu einer Reduktion der Medikamenten-Resistenz. Dies konnte auch in der vorliegenden Arbeit für S-2209 gezeigt werden. In Kombination mit Melphalan oder Doxorubicin führt S-2209 zu einer höheren Apoptoserate als die jeweilige Monotherapie. Dies spricht für ein synergistisches Zusammenwirken der verschiedenen Substanzen an unterschiedlichen Angriffspunkten der Zellen. Dies könnte im klinischen Einsatz bedeuten, dass Chemoresistenz verhindert werden oder zumindest erst zu einem späteren Zeitpunkt im Krankheitsverlauf auftreten kann. Auch diese Ergebnisse sprechen für weiterführende Studien mit S-2209 in Kombination mit klassischen Zytostatika. Das Nebenwirkungsprofil kann durch Chemotherapeutika mit unterschiedlichen

Angriffspunkten deutlich günstiger ausfallen. Dies könnte die Remissionsrate, das Überleben und die Lebensqualität der Patienten verbessern.

Wenngleich die Hemmung der NF κ B-Aktivierung bisher als ein relevanter Wirkmechanismus von Bortezomib galt (McConkey, 2009), lässt sich die Zytotoxizität von Bortezomib nicht durch diesen Mechanismus allein erklären. Aktuelle Arbeiten zeigen dabei, dass Bortezomib in Myelomzelllinien und in Myelomzellen von Patienten konzentrationsabhängig die I κ B α -Expression herunterreguliert und somit die NF κ B-Aktivität steigert. Durch die Aktivierung von IKK β -Kinasen führt Bortezomib zur Phosphorylierung und zum nicht proteasomalen Abbau von I κ B α . Bortezomib zeigt einen zytotoxischen Effekt, selbst wenn NF κ B aktiviert wurde (Hideshima et al., 2009), d.h. andere Wirkmechanismen sind ebenfalls für den beobachteten zytotoxischen Effekt von Bortezomib verantwortlich, die jedoch bislang nicht ausreichend untersucht sind. Ähnliche Wirkungsweisen sind auch für S-2209 zu erwarten, weshalb weitere Experimente zur Aufklärung der verschiedenen Wirkungsmechanismen von S-2209 erfolgen sollten.

Edwards et al. zeigten aktuell erneut die Relevanz des Knochenmarks-Microenvironments für das klinische Ansprechen auf Bortezomib auf, dabei wurde die Proteasom-Aktivität und die Sensitivität von Myelomzellen gegenüber Bortezomib (u.a. Proteasominhibitoren) vor und nach *in vivo* Propagierung im Knochenmark von Mäusen analysiert. Nach deren *in vivo* Wachstum wiesen Myelomzellen eine deutlich höhere Proteasomaktivität und höhere Sensitivität nach *in vitro* Exposition gegenüber steigenden Konzentrationen von Bortezomib auf; d.h. geringere Konzentrationen waren ausreichend, um die Proliferation von aus dem Knochenmark isolierten Myelomzellen zu inhibieren (Edwards et al., 2009). Weitere Experimente zum Einfluss von S-2209 auf das Knochenmarkmilieu und die Stromazellen sollten daher stattfinden.

Einige Studien konnten außerdem zeigen, dass Zytokine und Wachstumsfaktoren wie IGF-1 das Zellwachstum der Plasmazellen stimulieren und zu Proliferation und Zellüberleben führen. S-2209 kann den wachstumsstimulierenden Effekten von Zytokinen entgegenwirken und führt hierdurch ebenfalls zu Zellwachstumsarrest.

4.3 S-2209 führt zu einer Stress-induzierten Zellantwort und beeinflusst die Regulation des Zellzyklus

In den bisherigen Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von S-2209 konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit S-2209 die Aktivierung der drei wesentlichen Signalwege JAK/STAT3, PI3K/AKT/mTor und ERK/MAPK nicht beeinflusst.

Im Gegensatz hierzu wurde mehrfach gezeigt, dass Bortezomib zu einer vermehrten Phosphorylierung von AKT in Myelomzellen führt (Hideshima et al., 2006; Hideshima et al., 2007). Dies legt nahe, dass S-2209 auf andere Weise wirkt als Bortezomib.

Der proteasomale Abbau reguliert die Proteinexpression von Proteinen, welche an der Regulation des Zellzyklus beteiligt sind (p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, Cycline), sowie von Onkogenen (p53, IκB) (Scheffner et al., 1993; Kisselev et al., 2001). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte auch für den Proteasominhibitor S-2209 gezeigt werden, dass er zu einer erhöhten Expression von p53 in den Myelomzelllinien führt.

Das Protein p53 ist in vielen entarteten Zellen in erhöhter Menge messbar, aber in ausdifferenzierten Zellen der G0-Phase des Zell-Zyklus zumeist nicht nachweisbar.

Bei vielen Neoplasien ist das für p53 kodierende Gen mutiert, weshalb es eine besondere medizinische Bedeutung hat. p53 wurde auch als „Tumorsuppressor-Gen“ beschrieben.

Es reguliert als Transkriptionsfaktor den Zellzyklus, die Induktion des programmierten Zelltods oder die Reparatur der DNA. Aufgrund dieser Eigenschaft wird p53 in der Literatur als „Wächter des Genoms“ bezeichnet (Lane et al., 1992). Der Verlust der p53-Funktion spielt daher eine kritische Rolle bei der Entstehung von Neoplasien (Alsafadi et al., 2009).

Die Akkumulation von p53 hat viele Folgen. So werden einerseits DNA-Reparatur-Mechanismen in Gang gesetzt, andererseits der Zellzyklus unterbrochen, da p53 die Produktion von p21 induziert. Ist die DNA-Synthese abgeschlossen, sinkt der p53-Spiegel wieder, p21 wird nicht mehr transkribiert und der Zellzyklus wird fortgeführt.

Wird p53 jedoch zu stark angehäuft, wie dies durch S-2209 in der Zelle induziert wird, kommen weitere Faktoren hinzu und p53 aktiviert Gene der Bcl2-Familie, insbesondere BAX, welche über Caspasen-Aktivierung zu Apoptose führen.

p53 ist außerdem nötig, um das Zellwachstum zu kontrollieren. Die Mutation von p53 führt zur Proliferation und Entartung der Zellen. Durch Induktion von p53 führt S-2209 zu Zellwachstumsarrest und im Verlauf zu Zelltod.

Die Perturbation der mitochondrialen pro- und antiapoptotischen Proteine stellt ebenfalls einen weiteren Wirkungsmechanismus der Proteasominhibitoren dar. Pei et al (Pei et al., 2003) und andere Autoren (Kisselev et al., 2001) konnten zeigen, dass die Behandlung von Myelomzellen mit Bortezomib, neben einer Zunahme der Expression der proapoptotischen mitochondrialen Proteine wie Bax und Bid, auch einen Anstieg der

antiapoptotischen Proteine wie Bcl-2, Mcl-1, XIAP und Bcl-XL zur Folge hat. S-2209 führt nicht zu einem Anstieg, sondern zu einem Abfall der Expression des antiapoptotischen Proteins Mcl-1. So hemmt es also die zelleigenen Mechanismen, die das Überleben der Zelle sichern. Auf BAX und Bid zeigt sich hingegen kein Einfluss durch S-2209, es wirkt also nicht proapoptotisch über diesen Signalweg. Die verminderte Expression von Mcl-1 könnte ebenfalls in einer Kombinationstherapie von S-2209 und konventionellen Zytostatika zu einer geringeren zytostatikavermittelten Therapieresistenz führen, da die antiapoptotischen Rescue-Mechanismen der Zelle durch S-2209 gehemmt zu werden scheinen. Hierfür sollten nach weiterer Evaluation erste klinische Studien durchgeführt werden.

Schließlich konnte auch gezeigt werden, dass es unter der Gabe von Bortezomib und den durch Bortezomib vermittelten Zelltod zu einer Aktivierung von JNK kommt, welche auf Apoptoseinduktion durch ungefaltete Proteine beruht (Davenport et al., 2007). Andere Autoren vermuten den Grund der erhöhten JNK-Aktivierung in einer direkten mitochondrialen Schädigung, die zur Aktivierung führt (Tournier et al., 2000; Chauhan et al., 2003). Vor diesem Hintergrund wurde im Western Blot der Status der Phosphorylierung von JNK bei Myelomzellen untersucht, welche mit S-2209 behandelt worden waren. Eine Zunahme der Phosphorylierung von JNK wurde beobachtet. Dies spricht für die Induktion einer Stress-vermittelten Zellantwort durch S-2209 ähnlich wie durch Bortezomib.

Insgesamt konnte für S-2209 gezeigt werden, dass es Zellwachstumsarrest und Apoptose in Myelomzellen induziert, teils über ähnliche Mechanismen wie Bortezomib und Carfilzomib, teils über noch unbekannte Signaltransduktionswege. Unter den Proteasominhibitoren weist Carfilzomib ein wohl günstigeres Kurzzeitnebenwirkungsprofil auf trotz der irreversiblen Hemmung des Proteasoms. In ersten Untersuchungen zeigte S-2209 bislang keine schwerwiegenden Toxizitäten nach kurzzeitiger Anwendung und könnte daher in der klinischen Anwendung ebenfalls ein gut verträglicher Proteasominhibitor sein. In Kombination mit klassischen Zytostatika zeigt S-2209 einen stärkeren zytotoxischen Effekt als die jeweilige Monotherapie. Dies ist von außerordentlicher klinischer Relevanz, da in zahlreichen Studien belegt werden konnte, dass durch eine Kombinationstherapie Nebenwirkungen deutlich reduziert, komplette Remissionsraten deutlich erhöht und somit das Langzeitüberleben deutlich verlängert werden kann. Aufgrund der vielversprechenden *in vitro*-Ergebnisse der Kombinationstherapien mit Melphalan und Doxorubicin, sollten weitere Untersuchungen in Kombination mit Lenalidomid, Thalidomid, Dexamethason u.a. sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durchgeführt wer-

den. Auch erste Anwendungen innerhalb klinischer Studien bei therapierefraktären Patienten sind nach einer weiteren Evaluation von S-2209 Konsequenz dieser ersten Charakterisierung.

5 Zusammenfassung

Das Multiple Myelom ist in den meisten Fällen eine unheilbare Erkrankung und neue Therapieansätze sind Gegenstand wissenschaftlicher Forschung. Trotz Standardtherapie mit Hochdosis-Melphalan und nachfolgender autologer Stammzelltherapie kommt es bei fast allen Patienten zu einem Rezidiv. Langzeitüberleben wird zunehmend nach allogener Stammzelltransplantation beschrieben. Eine Kombinationstherapie mit Bortezomib ist bei etwa einem Drittel der behandelten Patienten wirksam, aber häufig mit einer ausgeprägten Neurotoxizität verbunden. Auch das Epoxyketon Carfilzomib zeigt erste gute Erfolge im klinischen Einsatz.

Mit S-2209 konnte ein neuer vielversprechender Proteasominhibitor charakterisiert werden, der die Chymotrypsin-Aktivität des Proteasoms schon in einer im nanomolaren Bereich liegenden Konzentration hemmt.

In vitro zeigt S-2209 bereits in niedriger Dosierung eine vergleichbare Apoptoseinduktion und Zellwachstumsarrest in Multiplen Myelomzellen wie Bortezomib, wohingegen eine Toxizität auf periphere mononukleäre Blutzellen von gesunden Kontrollpersonen erst in sehr hohen Konzentrationen nachweisbar war. Auch in primären Myelomzellen von verschiedenen Myelompatienten wird signifikant Apoptose induziert. Im kombinierten Einsatz mit anderen konventionellen Zytostatika, die zur Behandlung des Multiplen Myeloms eingesetzt werden, zeigt S-2209 eine gesteigerte Wirksamkeit. In weiteren Experimenten konnten auch der Wirkungsmechanismus und der Einfluss auf die Signaltransduktion des neuen Proteasominhibitors dargelegt werden. Neben Proteasominhibition und Hemmung von NFκB führt S-2209 zu einer verminderten Expression von antiapoptotischen Proteinen sowie zu einer Stress-induzierten Zellantwort in Myelomzellen. Gleichzeitig antagonisiert S-2209 den wachstumsstimulierenden Effekt von Zytokinen und Wachstumsfaktoren.

Zytokine und Wachstumsfaktoren spielen eine wichtige Rolle im Milieu des Knochenmarks und vermitteln Zelladhäsion und Proliferation. Indem S-2209 den stimulierenden Effekt hemmt, kann das ungebremste Zellwachstum der Tumorzellen verhindert werden und hierdurch möglicherweise auch die Stromazell-vermittelte Chemoresistenz überwunden werden.

Bei der ersten Evaluierung der Toxizität *in vivo* führt die Substanz nach kurzzeitiger Anwendung nicht zu nennenswerten Nebenwirkungen.

Die statistisch signifikante Wirkung von S-2209 *in vitro* und *in vivo* zusammen mit dem günstigen Toxizitätsprofil im Rattenmodell spricht für einen therapeutischen Einsatz von S-2209 und sollte innerhalb von klinischen Studien untersucht werden.

Ziel ist es, Mono- oder Kombinationstherapien zu entwickeln, die eine höhere Remissionsrate erreichen, als dies bisher mit den zugelassenen Chemotherapien möglich ist. Eine komplette Remission vor Stammzelltransplantation führt zu einer Verlängerung des Langzeitüberlebens. Auch zur Erhaltungstherapie sind Proteasominhibitoren bereits erfolgreich in Studien eingesetzt worden und zeigten ebenfalls einen positiven Einfluss auf das krankheitsfreie Überleben. S-2209 kann also in Kombination oder als Einzelsubstanz eine neue wirkungsvolle Option in der Behandlung des Multiplen Myeloms werden.

Anhang 1: Verwendete Materialien und Methoden

1. Zellkultur

Kurzbezeichnung	Bestell-Nr.	Hersteller
RPMI – 1640	E12 – 702F	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, D
PBS	14040 – 091	Dto.
FCS	16170 – 078	Dto.
Flask 75 cm ²	353.136	BD Biosciences, Heidelberg, D
Flask 25 cm ²	353.014	BD Biosciences, Heidelberg, D
Flask 175 cm ²	353.118	BD Biosciences, Heidelberg, D
96-Well-Plates	353.872	Dto.
6-Well-plates	353.453	Dto.
24-Well-plates	353.495	Dto.
Kryoröhrchen	1148 33	<i>Brand GMBH,</i> Wertheim
Kulturgefäßeinsätze	353092	<i>BD Falcon,</i> Bed- ford, USA

2. Reagenzien für Durchflusszytometrie und Zellvitalitätsmessung

Reagenz	Firma
Annexin V-FITC	Caltag Laboratories, Hamburg, D
sodium orthovanadate	Dto.
phenylmethylsulfonyl fluoride	Dto.
3,3-dihexyloxycarbocyanine iodide (DiOC6)	Dto.
propidium iodide	Calbiochem, Schwalbach, D
WST-1	Roche, Penzberg, D

3. Zytostatika

Name	Bestellnummer	Firma
Melphalan	M2011	<i>Sigma-Aldrich,</i> Tauf- kirchen, D
Bortezomib	Velcade®	
Doxorubicin	Adriblastin®	<i>Pharmacia,</i> Erlan- gen, D
S-2209	-	4SC, München, D

4. Antikörper für MACS-Analyse

CD138 MACS Beads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
------------------	--

5. Antikörper für Oberflächenmessung

Antikörper	Klon	Bestellnummer	Firma
CD138-FITC	MI15	347214	Pharmingen, Heidelberg, D

6. Antikörper für die Western Blot Analyse

6.1 Primärantikörper

Antikörper	Klon	Bestellnummer	Firma
Bcl-2	4C11	Sc-578	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Bcl-X S/L	A20	Sc-7122	dto.
Bax	N20	Sc-493	dto.
Mcl-1	S19	Sc-819	dto.
Stat3	H190	Sc-7179	dto.
Erk1	C16	Sc-93	dto.
Erk2	C14	Sc-154	dto.
Bad	C20	Sc-943	dto.
Akt	D17	Sc-7126	dto.
PI3-kinase (p85 α)	Z8	Sc-423	dto.
ILP	N18	Sc-8790	dto.
p53	D01	Sc-81168	dto.
Cleaved Caspase-8	H385	Sc-22180	dto.
Cleaved Caspase-9	H331	Sc-22182	dto.
Caspase-8	H134	Sc-7890	dto.
Caspase-9	H83	Sc-7885	dto.
Caspase-3	H277	Sc-7148	dto.
p70S6k	Polyclonal	Sc-230	dto.
p-P70S6k	Polyclonal	Sc-230	dto.
P-Stat3	Polyclonal	Sc-21876	dto.

Anhang 1: Materialien und Methoden

Erk	C14	Sc-154	dto.
P-Erk	Polyclonal	Sc-16982	dto.
Akt	H136	sc-8312	dto.
P-Akt	Polyclonal	Sc-7985-R	dto.
IκB	C15	Sc-203	dto.
P-IκB	Polyclonal	Sc-7977	dto.
Cleaved Caspase 3	N19	Sc-1226	dto.o.
pJNK	G7	Sc-6254	dto.
JNK	D2	Sc-7345	dto.
Aktin	I19	Sc-1616	dto.

6.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Bestellnummer	Firma
Anti-Maus	HRP NA 931	<i>Amersham Biosciences, Uppsala, S</i>
Anti-Ziege	HRP P0449	<i>DAKO Cytomation, Glostrup, DK</i>
Anti-Kaninchen	HRP NA 9340	<i>Amersham Biosciences, Uppsala, S</i>

7. Enzyme für Western Blot

Enzym	Bestellnummer	Firma
Trypsin-EDTA	T3924	<i>Sigma, Taufkirchen, D</i>

8. Kits für Western Blot

Kit	Bestellnummer	Firma
ECL	RPN2106	<i>Amersham, Little Chalfont, UK</i>
Bio-Rad, Marker	161-0373	<i>Bio-Rad Labs, München, D</i>
Bio-RAD Proteinfärbeagens	500-0006	<i>Bio-RAD, München, D</i>

9. Chemikalien für Western Blot

Substanz	Bestellnummer	Firma
PMSF	93482	<i>Sigma</i> , Taufkirchen, D
Leupeptin	L2884	dto.
EDTA	351-027-100	<i>Quality Biological, Inc.</i> Gaithersburg, USA
Aprotinin	A6279	<i>Sigma</i> , Taufkirchen, D
Tween 20	P7949	<i>Sigma</i> , Taufkirchen, D
Acrylamid 30%(v/v)	161-0158	<i>Biorad</i> , München, D
APS	161-0700	dto.
Temed	161-0800	dto.
NP-40	74385	<i>Sigma</i> , Taufkirchen, D
Na ₃ VO ₄	S6508	dto.
Tris, pH 7,5 1M	351-006-100	<i>Quality Biological, Inc.</i> Gaithersburg, USA

10. Sonstige Artikel für Western Blot

Artikel	Bestellnummer	Firma
Kamm, 10 wells, 1mm	165-3359	<i>Biorad</i> , München, D
Spacer Plates	165-3311	dto.
Schwämme, 8 x 11 cm	170-3933	dto.
SDS-PAGE Standards, broad Range	161-0318	dto.
Immobilon-P PVDF Membran	IPVH00010	<i>Millipore</i> , Schwalbach, D
Hyperfilm ECL	RPN2103	<i>Amersham Biosciences</i> , Uppsala, S
NaCl	S7581	<i>Mallinckrodt</i> , Hazelwood, USA
NaF	S1504	<i>Sigma</i> , Taufkirchen, Deutschland

Anhang 2: Geräte

Gerät	Bestellnummer	Firma
Durchflusszytometer	Epics CL System II Version 3.0	<i>Coulter Electronics</i> , Miami, USA
Elektrophoreseset	Ready Gel Cell	<i>Bio-rad</i> , München, D
Power Pac	165-5050	<i>Bio-rad</i> , München, D
BioFuge	75005181	<i>Haraeus instruments</i> , Os- terode, D
Biophotometer	-	<i>Eppendorf</i> , Hamburg, D
Cell scraper	353.086	<i>Sarstaedt</i> , Nümbrecht, D
Neubauer Zählkammer	-	<i>Sarstaedt</i> , Nümbrecht, D
Brutschrank	Serie II 3110	<i>Forma Scientific</i>
Zentrifuge	Sigma 4K15	<i>Sigma</i> , Taufkirchen, D
ELISA Reader	Multiscan	<i>Thermo Lab Systems</i> , Sorvaajankatu, FIN

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Klassische Signaltransduktionswege zur Regulation von Apoptose, Zell-Zyklus und Zell-Adhäsion.....	3
Abbildung 2: Aufbau des Proteasoms.....	11
Abbildung 3: Signaltransduktionsweg von NFκappaB.....	15
Abbildung 4: Der Proteasominhibitor S-2209.....	16
Abbildung 5: Das Annexin V - Propidiumjodid - Apoptose Assay.....	24
Abbildung 6: S-2209 wirkt als Proteasominhibitor.....	33
Abbildung 7: S-2209 hemmt die 20S-Einheit des Proteasoms in gering höherem Ausmaß als Bortezomib.....	34
Abbildung 8: S-2209 führt zu einer Zunahme von p-IκBα und ist als Proteasominhibitor wirksam.....	35
Abbildung 9: S-2209 hemmt die NFκB-Aktivität.....	36
Abbildung 10: S-2209 inhibiert das Zellwachstum.....	37
Abbildung 11a, b: S-2209 hemmt Zellwachstum nach Stimulation mit IGF-1 und Zytokinen.....	39
Abbildung 12a, b, c, d: S-2209 induziert Apoptose in Myelomzellen, Annexin-V-FITC/Propidiumjodid Durchflusszytometrie.....	41
Abbildung 13a, b: S-2209 induziert Apoptose. DiOC6/Propidiumjodid-Protokoll.....	42
Abbildung 14: S-2209 induziert Apoptose und führt zu einer Spaltung von Caspase-3, -8 und -9.....	43
Abbildung 15: S-2209 induziert Apoptose in primären Myelomzellen.....	44
Abbildung 16: S-2209 induziert keine Apoptose in mononukleären Zellen des peripheren Blutes.....	45
Abbildung 17a, b: S-2209 zeigt ein günstiges Toxizitätsprofil <i>in vivo</i>	47
Abbildung 18: S-2209 beeinflusst die Signaltransduktionswege von ERK, AKT, P70S6k oder STAT3 nicht.....	48
Abbildung 19: S-2209 reduziert die Expression von Mcl-1.....	49
Abbildung 20: S-2209 führt zu einer vermehrten Expression von p53.....	49
Abbildung 21: S-2209 führt zu einer vermehrten Phosphorylierung der JNK.....	50
Abbildung 22 a, b: S-2209 zeigte eine gesteigerte Wirksamkeit in Kombination mit klassischen Zytostatika der Myelom-Therapie.....	52

Abkürzungsverzeichnis

ALAT	Alanin-Aminotransferase
ALP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BMMC	bone marrow mononuclear cells
CAM-DR	„Cell Adhesion Mediated Drug Resistance“
CD	cluster of differentiation
CSPD	Disodium 3- (4 -methoxyspiro {1 ,2 – dioxetane – 3 , 2' - (5' - Chloro) Tricyclo [3.3.1.13,7] Decan} – 4 -yl) Phenylphosphat
ddH ₂ O	Double Distilled H ₂ O
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECL-Lösung	enhanced chemiluminescence-Lösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA-Reader	enzyme linked immunosorbent assay-Reader
ERK	extracellular signal-regulated proteinkinase
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
HS-5	Stammzelllinie
ICAM-1	Inter-Cellular Adhesion Molecule 1
IGF-1	insulin-like growth factor-1
IL	Interleukin
I κ B	I κ appaB-Kinase
JAK	Janus-Kinase
JAK/STAT	Janus-Kinase / Signal Transducers and Activators of Transcription
KCl	Kaliumchlorid

Abkürzungsverzeichnis

MAP	mitogen-activated-proteinkinase
M-CSF	macrophage-colony-stimulating factor
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
Mg	Magnesium
MGUS	Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz
ml	Milliliter
Mot1/min	Drehzahl des Motors beim Schüttler
M-Phase	Mitosephase
M-TBS-T	Magermilchpulver - TRIS buffered saline - Tween20
mTOR	mammalian target of rapamycin
n.s.	nicht signifikant
Na ₃ VO ₄	Sodium orthovanadate
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form v. NAD ⁺)
NaF	Natriumfluorid/ Sodiumfluorid
NFκB	Nuclear-Factor-kappa-B
nM	nanomolar
NP-40	Nonidet P-40
OPM-2	Myelomzelllinie
P70S6K	p70-ribosomal S6 kinase
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PBST	phosphate buffered saline + Tween 20
PKC-1	3-phosphoinositide-dependant protein kinase-1
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumjodid
PI3K/Akt	Phosphoinositid-3-Kinase/Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS341	Bortezomib
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raf	rapidly growing fibrosarcoma / rat fibrosarcoma
Ras	rat sarcoma
RFU	relative Fluoreszenz-Units
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI-1640	Zellkulturmedium („Roswell Park Memorial Institute“ – 1640)

RPMI	Myelomzelllinie
SDF-1	stromal-derived factor-1
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SEAP	sekretierte alkalische Phosphatase
S-Phase	Synthesephase
STAT	signal transducers and activators of transcription
TBS	TRIS buffered saline
TBS-T	TRIS buffered saline-Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
U266	Myelomzelllinie
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
WST-1	water soluble tetrazolium-1

Literaturverzeichnis

Adams J. Preclinical and clinical evaluation of proteasome inhibitor PS-341 for the treatment of cancer. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2002; 6: 493-500.

Adams Julian. The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nature Reviews Cancer*. May 2004; 4: 349-360.

Adams J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treatment Review*. 2003; 29: 3-9.

Alexander D D, Mink P J, Adami H, Cole P, Mandel J S, Oken M M and Trichopoulos D. Multiple myeloma: A review of the epidemiologic literature. *International Journal of Cancer*. 2007; 120: 40–61.

Alexanian R., Bergsagel D.E., Migliore P.J., Vaughn W.K., Howe C.D. Melphalan therapy for plasma cell myeloma. *Blood*. 1968; 31: 1-10.

Alsafadi S, Tourpin S, André F, Vassal G, Ahomadegbe JC. P53 family: at the crossroads in cancer therapy. *Current Medicinal Chemistry*. 2009; 16 (32): 4328-4344.

Alkalay I, Yaron A, Hatzubai A, Orian A, Ciechanover A, Ben-Neriah Y. Stimulation-dependent I kappa B alpha phosphorylation marks the NF-kappa B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. Nov 7 1995; 92 (23): 10599-603.

Altun Mikael, Galardy Paul J., Shringarpure Reshma, Hideshima Teru, LeBlanc Richard, Anderson Kenneth C., Ploegh Hidde L., and Kessler Benedikt M.: Effects of PS-341 on the Activity and Composition of Proteasomes in Multiple Myeloma Cells, *Cancer Research*. September 1 2005; 65 (17):7896-7901 and induction of apoptosis in cytogenetically defined subgroups. *Blood*.

Attal M., Harousseau J.L: Randomized trial experience of the Intergroup Francophone du Myelome. *Seminars in Hematology*. 2001; 38: 226-230.

Attal M., Harousseau J.L.: The role of high-dose therapy with autologous stem cell support in the era of novel agents. *Seminars in Hematology*. 2009; 46: 127-132.

Attal M, Harousseau JL, Facon T et al. Single versus double autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2003; 349: 2495-2502.

Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*. 1996; 335: 91-97.

Badros A, Goloubeva O, Dalal JS, Can I, Thompson J, Rapoport AP, Heyman M, Akpek G, Fenton RG. Neurotoxicity of bortezomib therapy in multiple myeloma: a single-center experience and review of the literature. *Cancer*. 2007 Sep 1; 110 (5): 1042-9.

Bae I, Fan S, Bhatia K, Kohn KW, Fornace AJ Jr, O'Connor PM. Relationships between G1 arrest and stability of the p53 and p21Cip1/Waf1 proteins following gamma-irradiation of human lymphoma cells. *Cancer Research*. 1995 Jun 1; 55 (11): 2387-93.

Baeuerle P.A., Baichwal V.R.. NF-kappa B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Advances in Immunology*. 1997; 65: 111-137.

Barlogie B, Jagannath S, Desikan KR et al. Total therapy with tandem transplants for newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 1999; 93: 55-65.

Baumann P., Mandl-Weber S., Emmerich B., Straka C., Schmidmaier R.: Activation of adenosine monophosphate activated protein kinase inhibits growth of multiple myeloma cells. *Experimental Cell Research*. 2007 Oct 1; 313 (16): 3592-603.

Baumann P., Mandl-Weber S., Oduncu F., Schmidmaier R.: Alkylating agents induce activation of NFkappaB in multiple myeloma cells. *Leukemia Research*. 2008 Jul; 32 (7): 1144-7.

Bisping G, Kropff M, Wenning D, Dreyer B, Bessonov S, Hilberg F, Roth GJ, Muntzert G, Stafnic M, Stelljes M, Scheffold C, Muller-Tidow C, Liebisch P, Lang N, Tchinda J, Serve HL, Mesters RM, Berdel WE, Kienast J. Targeting receptor kinases by a novel indolinone derivative in multiple myeloma: abrogation of stroma-derived interleukin-6 secretion and induction of apoptosis in cytogenetically defined subgroups. *Blood*. 2005 Nov 8; 106: 2627-2632.

Bjorkstrand BB, Ljungman P, Svensson H, Hermans J, Alegre A, Apperley J, Blade J, Carlson K, Cavo M, Ferrant A, Goldstone AH, de Laurenzi A, Majolino I, Marcus R, Prentice HG, Remes K, Samson D, Sureda A, Verdonck LF, Volin L, Gahrton G. Allogeneic bone marrow transplantation versus autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: a retrospective case-matched study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*. 1996 Dec 15; 88 (12): 4711-18.

Boyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 1968; 21: 77-89.

Brodts P., Samani A., Navab R. Inhibition of the type I insulin-like growth factor receptor expression and signaling: novel strategies for antimetastatic therapy. *Biochemical Pharmacology*. 2000 Oct 15; 60 (8): 1101-7.

Bruno B., Giaccone L., Sorasio R., Boccadoro M.: Role of allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma. *Seminars in Hematology* 2009; 46: 158-165 .

Bruno B, Rotta M, Patriarca F, Mordini N, Allione B, Carnevale Schianca F, Giaccone L, Omedè P, Sorasio R, Glarin M, Falco P, Ambrosini MT, Bringhen S, Mattei D, Massala M, Palumbo A, Aglietta M, Levis A, Gallamini A, Fanin R, Storb R, Ciccone G, Boccadoro M. A comparison of allografting with autografting for newly diagnosed multiple myeloma patients. *New England Journal of Medicine*. 2007; 356: 1110-1120.

Burger Angelika M., Seth Arun K. The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: Therapeutic implications. *European Journal of Cancer*. 2004; 40: 2217–2229.

Cavo M., Attal M., Gertz M.A., Giralt S., Ludwig H., Morgan G.J., Anderson K.C. The current landscape of multiple myeloma treatment. *Leukemia Research*. 2008; 32: S1-S24.

Chang, L. and Karin, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001; 410: 37-40.

Chang H, Trieu Y, Qi X, Xu W, Stewart KA, Reece D. Bortezomib therapy response is independent of cytogenetic abnormalities in relapsed/refractory multiple myeloma. *Leuk Res*. 2007 Jun;31(6):779-82.

Chauhan D, Li G, Hideshima T, Podar K, Mitsiades C, Mitsiades N, Munshi N, Kharbanda S, Anderson KC. JNK-dependent release of mitochondrial protein, Smac, during apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2003 May 16; 278 (20): 17593-6.

Chauhan Dharminder, Hideshima Teru, Mitsiades Constantine, Richardson Paul, and Anderson Kenneth C.: Proteasome inhibitor therapy in multiple myeloma. *Molecular Cancer Therapeutics*. April 2005; 4 (4): 686-692.

Child JA, Morgan GJ, Davies FE et al. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2003; 348: 1875-1883.

Corradini P, Cavo M, Lokhorst H, Martinelli G, Terragna C, Majolino I, Valagussa P, Boccadoro M, Samson D, Bacigalupo A, Russell N, Montefusco V, Voena C, Gahrton G; Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Molecular remission after myeloablative allogeneic stem cell transplantation predicts a better relapse-free survival in patients with multiple myeloma. *Blood*. 2003 Sep 1; 102 (5): 1927-9.

Dalton William S. The Proteasome. *Seminars in Oncology*. 2004; 31(suppl 16): 3-9.

Dalton WS, Hazlehurst L, Shain K, Landowski T, Alsina M. Targeting the bone marrow microenvironment in hematologic malignancies. *Seminars in Hematology*. 2004 Apr; 41 (2 Suppl 4): 1-5.

Dalton WS. The proteasome. *Seminars in Oncology*. 2004 Dec 31; (6 Suppl 16): 3-9; discussion 33.

Damiano S.J., Cress A.E., Hazlehurst L.A., Shtil A.A., Dalton W.S. Cell Adhesion Mediated Drug Resistance (CAM-DR): Role of Integrins and Resistance to Apoptosis in Human Myeloma Cell Lines. *Blood*. 1999; 93: 1658 – 1667.

Davenport EL, Moore HE, Dunlop AS, Sharp SY, Workman P, Morgan GJ, Davies FE. Heat shock protein inhibition is associated with activation of the unfolded protein response pathway in myeloma plasma cells. *Blood*. 2007 Oct 1; 110 (7): 2641-9.

Derenne S., Monia B., Dean N.M., Taylor J.K., Rapp M.J., Harousseau J.L., Bataille R., Amiot M. Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein in human myeloma cells. *Blood*. 2002; 100: 194-199.

Dick LR, Fleming PE. Building on bortezomib: second-generation proteasome inhibitors as anti-cancer therapy. *Drug Discovery Today*. 2010 Mar 15; 5-6: 243-9. Epub 2010 Jan 29.

Dimopoulos MA, Richardson PG, Schlag R, Khuageva NK, Shpilberg O, Kastritis E, Kropff M, Petrucci MT, Delforge M, Alexeeva J, Schots R, Masszi T, Mateos MV, Deraedt W, Liu K, Cakana A, van de Velde H, San Miguel JF. VMP (Bortezomib, Melphalan, and Prednisone) is active and well tolerated in newly diagnosed patients with multiple myeloma with moderately impaired renal function, and results in reversal of renal impairment: cohort analysis of the phase III VISTA study. *Journal of Clinical Oncology*. 2009 Dec 20; 27 (36): 6086-93. Epub 2009 Oct 26.

Edwards CM, Lwin ST, Fowler JA, Oyajobi BO, Zhuang J, Bates AL, Mundy GR. Myeloma cells exhibit an increase in proteasome activity and an enhanced response to proteasome inhibition in the bone marrow microenvironment in vivo. *American Journal of Hematology*. 2009 May; 84(5): 268-72.

Elice F., Raimondi R., Tosetto A., D'Emilio A., Di Bona E., Piccin A., Rodeghiero F.: Prolonged overall survival with second on-demand autologous transplant in multiple myeloma. *American Journal of Hematology*. 2006; 81: 426-431.

Facon T, Mary JY, Hulin C, Benboubker L, Attal M, Pegourie B, Renaud M, Harousseau JL, Guillemin G, Chaletteix C, Dib M, Voillat L, Maisonneuve H, Troncy J, Dorvaux V, Monconduit M, Martin C, Casassus P, Jaubert J, Jardel H, Doyen C, Kolb B, Anglaret B, Grosbois B, Yakoub-Agha I, Mathiot C, Avet-Loiseau H; Inter-groupe Francophone du Myélome. Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial. *Lancet*. 2007 Oct 6; 370 (9594): 1209-18.

Ferland J.P., Ravaut P., Chevret S., Divine M., Leblond V., Belanger C., Macro M., Pertuiset E., Dreyfus F., Mariette X., Boccacio C., Brocquet J.C.: High-dose therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple mye-

loma: up-front or rescue treatment? Results of a multicenter sequential randomized clinical trial. *Blood*. 1998; 92, 3131-3136.

Fonseca R. Strategies for risk-adapted therapy in myeloma. *American Society of Hematology Education Program*. 2007. 304-10.

Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 2009;23:2210-2221.

Glasmacher A, Hahn C, Hoffmann F, Naumann R, Goldschmidt H, von Lilienfeld-Toal M, Orlopp K, Schmidt-Wolf I, Gorschluter M. A systematic review of phase-II trials of thalidomide monotherapy in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *British Journal of Haematology*. 2006 Mar; 132 (5): 584-93.

Gregory WM, Richards MA, Malpas JS. Combination chemotherapy versus melphalan and prednisolone in the treatment of multiple myeloma: an overview of published trials. *Journal of Clinical Oncology*. 1992 Feb; 10 (2): 334-42.

Greipp PR, San Miguel J, Durie BG et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005;23:3412-20.

Groll, M., Koguchi, Y., Huber, R. & Kohno, J. Crystal structure of the 20 S proteasome: TMC-95A complex: a non-covalent proteasome inhibitor. *Journal of Molecular Biology*. 2001; 311: 543-548.

Guédat Philippe, Colland Frédéric. Patented small molecule inhibitors in the ubiquitin proteasome system. *BMC Biochemistry*. 2007; 8 (Suppl 1): S14.

Haas M, Page S, Page M, Neumann FJ, Marx N, Adam M, Ziegler-Heitbrock HW, Neumeier D, Brand K. Effect of proteasome inhibitors on monocytic I κ B α and - β depletion, NF- κ B activation, and cytokine production. *Journal of Leukocyte Biology*. 1998 Mar; 63 (3): 395-404.

Hallek Michael, Bergsagel P. Leif, and Anderson Kenneth C. Multiple Myeloma: Increasing Evidence for a Multistep Transformation Process. *Blood*. 1998 January 1; 91 (1): 3-21.

Harousseau JL, Mathiot C, Atal M, et al. Bortezomib/Dexamethasone versus VAD as Induction prior to autologous stem cell transplantation (ASCT) in previously untreated multiple myeloma (MM). Updated data from IFM 2005/01 trial. *J Clin Oncol* 2008;26(Part 1):455S.

Harousseau J. L. and Moreau P. Autologous hematopoietic stem-cell transplantation for multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2009; 360 (25): 2645-54.

Hideshima T, Anderson KC. Molecular mechanisms of novel therapeutic approaches for multiple myeloma. *Nature Reviews Cancer*. 2002 Dec; 2 (12): 927-37.

Hideshima T, Catley L, Raje N, Chauhan D, Podar K, Mitsiades C, Tai YT, Vallet S, Kiziltepe T, Ocio E, Ikeda H, Okawa Y, Hideshima H, Munshi NC, Yasui H, Richardson PG, Anderson KC. Inhibition of Akt induces significant downregulation of survivin and cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *British Journal of Haematology*. 2007 Sep; 138 (6): 783-91.

Hideshima T, Catley L, Yasui H, Ishitsuka K, Raje N, Mitsiades C, Podar K, Munshi NC, Chauhan D, Richardson PG, Anderson KC. Perifosine, an oral bioactive novel alkylphospholipid, inhibits Akt and induces in vitro and in vivo cytotoxicity in human multiple myeloma cells. *Blood*. 2006 May 15; 107 (10): 4053-62. Epub 2006 Jan 17.

Hideshima T, Ikeda H, Chauhan D, Okawa Y, Raje N, Podar K, Mitsiades C, Munshi NC, Richardson PG, Carrasco RD, Anderson KC. Bortezomib induces canonical nuclear factor-kappaB activation in multiple myeloma cells. *Blood*. 2009 Jul 30; 114 (5): 1046-52. Epub 2009 May 12.

Hideshima T, Richardson P, Chauhan D, Palombella VJ, Elliott PJ, Adams J, Anderson KC. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Research*. 2001 Apr 1; 61 (7): 3071-6.

<http://www.onyx-pharm.com/view.cfm/632/Carfilzomib>; 02.05.2010.

<http://www.medicalnewstoday.com/articles/152127.php>; 02.05.2010.

http://www.multiples-myelom.ch/downloads/myelom_bulletin_jan_2010.pdf; 02.05.2010.

International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 2003;121:749-57.

Jantunen E., Kuittinen T., Penttilä K., Lehtonen P., Mahlamäki E., Nousiainen T.: High-dose melphalan (200mg/m²) supported by autologous stem cell transplantation is safe and effective in elderly (> 65 years) myeloma patients: comparison with younger patients treated on the same protocol. *Bone Marrow Transplantation*. 2006; 37: 917-922.

Jurczyszyn A., Skotnicki AB. Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in neoplastic diseases, Zastosowanie inhibitorów proteasomów w chorobach nowotworowych, *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2006; 15 (2): 309-320.

Kanagasabay P, Morgan GJ, Davies FE. Proteasome inhibition and multiple myeloma. *Current Opinion in Investigational Drugs*. 2007 Jun; 8 (6): 447-51.

Kisselev AF, Goldberg AL. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates. *Chemical Biology*. 2001 Aug; 8 (8): 739-58.

Koegl M. et al. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*. 1999; 96: 635-644.

Koreth J, Alyea EP, Murphy WJ, Welniak LA. Proteasome inhibition and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a review. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2009 Dec; 15 (12): 1502-12.

Kretz-Remy, C., Munsch, B. & Arrigo, A.P. NF-kappa B-dependent transcriptional activation during heat shock recovery. Thermolability of the NF-kappaB.Ikappa B complex. *Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276: 43723-43733.

Kröger N. How to harness the graft-versus-myeloma effect and target molecular remission after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*. 2007; 21 (9): 1851-1858.

Kuehl, W. M. and P. L. Bergsagel. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nature Reviews Cancer*. 2002; 2 (3): 175-87.

Kyle RA. Long-term survival in multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*. 1983; 308: 314-316.

Kyle R.A., Gertz M.A., Witzig T.E., Lust J.A., Lacy M.Q., Dispenzieri A., Fonseca R., Rajkumar S.V., Offord J.R., Larson D.R., Plevak M.E., Therneau T.M., Greipp P.R.: Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clinical Proceedings*. 2003 Jan; 78 (1): 21-33.

Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992 Jul 2; 358 (6381): 15-6.

Lamerz R.; Hallek M.; Gassel W.D.. *Manual Multiples Myelom 2002*, Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München.

Leban J, Blisse M, Krauss B, Rath S, Baumgartner R, Seifert MH. Proteasome inhibition by peptide-semicarbazones. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. 2008 Apr 15; 16 (8): 4579-88.

Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nature Medicine*. 1997 Feb; 3 (2): 231-4.

Ludwig, H., Pohl, G., Osterborg, A. Anemia in multiple myeloma. *Clinical Advances in Hematology and Oncology*. 2004; 2 (4): 233-41.

Ma MH, Yang HH, Parker K, Manyak S, Friedman JM, Altamirano C, Wu ZQ, Borad MJ, Frantzen M, Roussos E, Neeser J, Mikail A, Adams J, Sjak-Shie N, Vescio RA, Berenson JR. The proteasome inhibitor PS-341 markedly enhances sensitivity of multiple myeloma tumor cells to chemotherapeutic agents. *Clinical Cancer Research*. 2003 Mar; 9 (3): 1136-44.

Maloney DG, Molina AJ, Sahebi F, Stockerl-Goldstein KE, Sandmaier BM, Bensinger W, Storer B, Hegenbart U, Somlo G, Chauncey T, Bruno B, Appelbaum FR, Blume KG, Forman SJ, McSweeney P, Storb R. Allografting with nonmyeloablative conditioning following cytoreductive autografts for the treatment of patients with multiple myeloma. *Blood*. 2003 Nov 1; 102 (9): 3447-54. Epub 2003 Jul 10.

Mateos MV, Hernandez JM, Hernandez MT, Gutierrez NC, Palomera L, Fuertes M, Diaz-Mediavilla J, Lahuerta JJ, de la Rubia J, Terol MJ, Sureda A, Bargay J, Ribas P, de Arriba F, Alegre A, Oriol A, Carrera D, Garcia-Larana J, Garcia-Sanz R, Blade J, Prosper F, Mateo G, Esseltine DL, van de Velde H, Miguel JF. Bortezomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: results of a multicenter phase 1/2 study. *Blood*. 2006 Oct 1; 108 (7): 2165-72.

Mateos María-Victoria, Hernández José M., Hernández Miguel T., Gutiérrez Norma C., Palomera Luis, Fuertes Marta, Garcia-Sanchez Pedro, Lahuerta Juan J., de la Rubia Javier, Terol María-José, Sureda Ana, Bargay Joan, Ribas Paz, Alegre Adrian, de Arriba Felipe, Oriol Albert, Carrera Dolores, García-Laraña José, García-Sanz Ramón, Bladé Joan, Prósper Felipe, Mateo Gemma, Esseltine Dixie-Lee, van de Velde Helgi, San Miguel Jesús F. Bortezomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: updated time-to-events results and prognostic factors for time to progression. *Haematologica*, Vol 93, Issue 4, 560-565.

Mateos MV, Richardson PG, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, Spicka I, Petrucci MT, Palumbo A, Samoilova OS, Dmoszynska A, Abdulkadyrov KM, Schots R, Jiang B, Esseltine DL, Liu K, Cakana A, van de Velde H, San Miguel JF. Bortezomib plus melphalan and prednisone compared with melphalan and prednisone in previously untreated multiple myeloma: updated follow-up and impact of subsequent therapy in the phase III VISTA trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2010 May 1; 28 (13): 2259-66. Epub 2010 Apr 5.

McCubrey James A., Steelman Linda S., Abrams Steven L., Lee John T., Chang Fumin, Bertrand Fred E., Navolanic Patrick M., Terrian David M., Franklin Richard A., D'Assoro Antonio B., Salisbury Jeffrey L., Mazarino Maria Clorinda, Stivala Franca and Libra Massimo. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Advances in Enzyme Regulation*. 2006; 46 (1) : 249-279.

Merchionne F, Perosa F, Dammacco F. New therapies in multiple myeloma. *Clinical and Experimental Medicine*. 2007 Sep; 7 (3): 83-97. Epub 2007 Oct 3.

Myeloma Trialists' Collaborative Group. Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6,633 patients from 27 randomized trials. *Journal of Clinical Oncology*. 1998 Dec; 16 (12): 3832-42.

Nakanishi C, Toi M. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*. 2005 Apr; 5 (4): 297-309.

Navas TA, Nguyen AN, Hideshima T, Reddy M, Ma JY, Haghazari E, Henson M, Stebbins EG, Kerr I, O'Young G, Kapoun AM, Chakravarty S, Mavunkel B, Perumattam J, Luedtke G, Dugar S, Medicherla S, Protter AA, Schreiner GF, Anderson KC, Higgins LS. Inhibition of p38alpha MAPK enhances proteasome inhibitor-induced apoptosis of myeloma cells by modulating Hsp27, Bcl-X(L), Mcl-1 and p53 levels in vitro and inhibits tumor growth in vivo. *Leukemia*. 2006 Jun; 20 (6): 1017-27.

Orlowski RZ, Kuhn DJ. Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. *Clinical Cancer Research*. 2008 Mar 15; 14 (6): 1649-57.

O'Connor OA, Stewart AK, Vallone M, Molineaux CJ, Kunkel LA, Gerecitano JF, Orlowski RZ. A phase 1 dose escalation study of the safety and pharmacokinetics of the novel proteasome inhibitor carfilzomib (PR-171) in patients with hematologic malignancies. *Clinical Cancer Research*. 2009 Nov 15; 15 (22): 7085-91. Epub 2009 Nov 10.

Palumbo A, Ambrosini MT, Benevolo G, Pregno P, Pescosta N, Callea V, Cangialosi C, Caravita T, Morabito F, Musto P, Bringhen S, Falco P, Avonto I, Cavallo F, Boccadoro M; Italian Multiple Myeloma Network; Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto. Bortezomib, melphalan, prednisone, and thalidomide for relapsed multiple myeloma. *Blood*. 2007 Apr 1; 109 (7): 2767-72.

Palumbo A, Bringhen S, Petrucci MT et al. Intermediate-dose melphalan improves survival of myeloma patients aged 50 to 70: results of a randomized controlled trial. *Blood*. 2004; 104: 3052-3057.

Palumbo A, Gay F, Bringhen S, Falcone A, Pescosta N, Callea V, Caravita T, Morabito F, Magarotto V, Ruggeri M, Avonto I, Musto P, Cascavilla N, Bruno B, Boccadoro M. Bortezomib, doxorubicin and dexamethasone in advanced multiple myeloma. *Annals of Oncology*. 2008 Mar 6.

Palumbo Antonio et Gay Francesca. How to treat elderly patients with multiple myeloma: combination of therapy or sequencing. *Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2009; 566-77.

Palumbo A, Miguel JS, Sonneveld P, Moreau P, Drach J, Morgan G, Einsele H. Lenalidomide: A new therapy for multiple myeloma. *Cancer Treatment Reviews*. 2008 Jan 28.

Palumbo Antonio and Rajkumar S. Vincent. Multiple myeloma: chemotherapy or transplantation in the era of new drugs. *European Journal of Haematology*. 2010; 84 (5): 379–390. Published Online: March 23, 2010.

Parlati F, Lee SJ, Aujay M, Suzuki E, Levitsky K, Lorens JB, Micklem DR, Ruurs P, Sylvain C, Lu Y, Shenk KD, Bennett MK. Carfilzomib can induce tumor cell death through selective inhibition of the chymotrypsin-like activity of the proteasome. *Blood*. 2009 Oct 15; 114 (16): 3439-47.

Pei XY, Dai Y, Grant S. The proteasome inhibitor bortezomib promotes mitochondrial injury and apoptosis induced by the small molecule Bcl-2 inhibitor HA14-1 in multiple myeloma cells. *Leukemia*. 2003 Oct; 17 (10): 2036-45.

Pickart,C.M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry*. 2001; 70: 503-533.

Pineda-Roman M, Zangari M, van Rhee F, Anaissie E, Szymonifka J, Hoering A, Petty N, Crowley J, Shaughnessy J, Epstein J, Barlogie B. VTD combination therapy with bortezomib-thalidomide-dexamethasone is highly effective in advanced and refractory multiple myeloma. *Leukemia*. 2008 Jul;22(7):1419-27.

Piva R, Belardo G, Santoro MG. NF-kappaB: a stress-regulated switch for cell survival. *Antioxidants and Redox Signalling*. 2006 Mar-Apr; 8 (3-4): 478-86.

Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple myeloma. *Lancet*. 2009 Jul 25; 374 (9686): 324-39. Epub 2009 Jun 21.

Ravi R., Bedi A.: NF-κB in cancer – a friend turned foe. *Drug Resist*. 2004; Update 7: 53-67.

Rajkumar S.V., Kyle R.A., Connor R.F.: Clinical features, laboratory manifestations, and diagnosis of multiple myeloma. Uptodate version 17.3 (www.uptodate.com) 2009.

Rajkumar SV, Blood E, Vesole D, Fonseca R, Greipp PR; Eastern Cooperative Oncology Group. Phase III clinical trial of thalidomide plus dexamethasone compared with dexamethasone alone in newly diagnosed multiple myeloma: a clinical trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2006 Jan 20; 24 (3): 431-6. Epub 2005 Dec 19.

Rajkumar SV, Jacobus S, Callander N. Phase III trial of lenalidomide plus high-dose dexamethasone versus lenalidomide plus low-dose dexamethasone in newly diagnosed multiple myeloma (E4A03): A trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2007; 25: 447s (suppl; abstr LBA8025).

Reidlinger,J., Pike,A.M., Savory,P.J., Murray,R.Z. & Rivett,A.J. Catalytic properties of 26 S and 20 S proteasomes and radiolabeling of MB1, LMP7, and C7 subunits associated with trypsin-like and chymotrypsin-like activities. *Journal of Biological Chemistry*. 1997; 272: 24899-24905.

Renard, P. et al. Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NFκappaB. *Nucleic Acids Research*. 2001; 29: E21.

Richardson P, Anderson K. Immunomodulatory analogs of thalidomide: an emerging new therapy in myeloma. *Journal of Clinical Oncology*. 2004; 22 (16): 3212-3214.

Richardson PG, Barlogie B, Berenson J, Singhal S, Jagannath S, Irwin D, Rajkumar SV, Srkalovic G, Alsina M, Alexanian R, Siegel D, Orlowski RZ, Kuter D, Limentani SA, Lee S, Hideshima T, Esseltine DL, Kauffman M, Adams J, Schenkein DP, Anderson KC. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2003 Jun 26; 348 (26): 2609-17.

Richardson Paul, Mitsiades Constantine, Schlossman Robert, Ghobrial Irene, Hideshima Teru, Chauhan Dharminder, Munshi Nikhil and Anderson Kenneth. The Treatment of Relapsed and Refractory Multiple Myeloma. *Hematology*. 2007; (1): 317.

Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, Harousseau JL, Ben-Yehuda D, Lonial S, Goldschmidt H, Reece D, San-Miguel JF, Blade J, Boccadoro M, Cavenagh J, Dalton WS, Boral AL, Esseltine DL, Porter JB, Schenkein D, Anderson KC; Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions (APEX) Investigators. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2005 Jun 16; 352 (24): 2487-98.

Ries L.A.G, Eisner M.P., Kosary C.L., Hankey B.F., Miller B.A., Clegg L., Mariotto A., Feuer E.J., Edwards B.K. 1975-2002 SEER Cancer Statistics Review. National Cancer Institute, Bethesda. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2002.

Roecklein BA, Torok-Storb B. Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes. *Blood*. 1995 Feb 15; 85 (4): 997-1005.

Rolfe, M., Chiu, M.I. & Pagano, M. The ubiquitin-mediated proteolytic pathway as a therapeutic area. *Journal of Molecular Medicine*. 1997; 75: 5-17.

Rosinol L, Oriol A, Mateos M. Final results of a phase II PETHEMA trial of alternating bortezomib and dexamethasone as induction regimen prior autologous stem cell transplantation (ASCT) in younger patients with multiple myeloma (MM): Efficacy and clinical implications of tumor response. *Journal of Clinical Oncology*. 2007; 25: 447s (suppl; abstr 8024).

Sagaster V, Ludwig H, Kaufmann H, Odelga V, Zojer N, Ackermann J, Kuenburg E, Wieser R, Zielinski D and Drach J. Bortezomib in relapsed multiple myeloma: response rates and duration of response are independent of a chromosome 13q-deletion. *Leukemia* (2007) 21, 164–168.

Sanda T, Iida S, Ogura H, Asamitsu K, Murata T, Bacon KB, Ueda R, Okamoto T. Growth inhibition of multiple myeloma cells by a novel I κ B kinase inhibitor. *Clinical Cancer Research*. 2005 Mar 1; 11 (5): 1974-82.

San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, Spicka I, Petrucci MT, Palumbo A, Samoilova OS, Dmoszynska A, Abdulkadyrov KM, Schots R, Jiang B, Mateos MV, Anderson KC, Esseltine DL, Liu K, Cakana A, van de Velde H, Richardson PG; VISTA Trial Investigators. Bortezomib plus mel-

phalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*. 2008 Aug 28; 359 (9): 906-17.

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. 1993 Nov 5; 75 (3): 495-505.

Scherer DC, Brockman JA, Chen Z, Maniatis T, Ballard DW. Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1995 Nov 21; 92 (24): 11259-63.

Schmidmaier R, Baumann P, Simsek M, Dayyani F, Emmerich B, Meinhardt G. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin overcomes cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma by geranylgeranylation of Rho protein and activation of Rho kinase. *Blood*. 2004 Sep 15; 104 (6): 1825-32. Epub 2004 May 25.

Schmidmaier R., Mörsdorf K., Baumann P., Emmerich B., Meinhardt G.: Evidence for cell adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma cells in vivo. *International Journal of Biological Markers*. 2006 Oct-Dec; 21 (4): 218-22.

Shaughnessy JD, Zhou Y, Haessler J, van Rhee F, Anaissie E, Nair B, Waheed S, Alsayed Y, Epstein J, Crowley J, Barlogie B. TP53 deletion is not an adverse feature in multiple myeloma treated with total therapy 3. *Br J Haematol*. 2009 Nov;147(3):347-51.

Singhal S, Mehta J, Desikan R, Ayers D, Roberson P, Eddlemon P, Munshi N, Anaissie E, Wilson C, Dhodapkar M, Zeddis J, Barlogie B. Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*. 1999 Nov 18; 341 (21): 1565-71. Erratum in: *New England Journal of Medicine* 2000 Feb 3; 342 (5): 364.

Spencer E, Jiang J, Chen ZJ. Signal-induced ubiquitination of IkappaBalpha by the F-box protein Slimb/beta-TrCP. *Genes and Development*. 1999 Feb 1; 13 (3): 284-94.

Sunwoo, J.B. et al. Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2001; 7: 1419-1428.

Tanoue T and Nishida E. Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal*. 2003; 15: 455-462.

Tergaonkar V, Pando M, Vafa O, Wahl G, Verma I. p53 stabilization is decreased upon NFkappaB activation: a role for NFkappaB in acquisition of resistance to chemotherapy. *Cancer Cell*. 2002 Jun; 1 (5): 493-503.

Thomas SK, Richards TA, Weber DM. Lenalidomide in multiple myeloma. *Best Practice and Research Clinical Haematology*. 2007 Dec; 20 (4): 717-35.

Tournier C, Hess P, Yang DD, Xu J, Turner TK, Nimnual A, Bar-Sagi D, Jones SN, Flavell RA, Davis RJ. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*. 2000 May 5; 288 (5467): 870-4.

Urashima M., Ogata A., Chauhan D., Hatziyanni M., Vidriales M.B., Dederá D.A., Schlossmann R.L., Anderson K.C.: Transforming growth factor-beta1: differential effects on multiple myeloma versus normal B cells. *Blood*. 1996; 87: 1928-1938.

Yamamoto, Y. & Gaynor, R.B. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *Journal of Clinical Investigation*. 2001; 107: 135-142.

Zavrski I, Jakob C, Kaiser M, Fleissner C, Heider U, Sezer O. Molecular and clinical aspects of proteasome inhibition in the treatment of cancer. *Recent Results in Cancer Research*. 2007; 176: 165-76.

Danksagung

Danken möchte ich ...

Prof. Dr. med. Bertold Emmerich und PD Dr. Dr. Fuat Oduncu, dass sie mir die Möglichkeit gegeben haben, die Arbeit im Forschungslabor durchzuführen.

PD Dr. med. Ralf Schmidmaier für die Übernahme der Doktorvaterschaft, die hervorragende Betreuung und die Ermöglichung der Arbeit.

Dr. med. Philipp Baumann für die hervorragende Betreuung, Motivation und rasche Durchführung dieser Arbeit.

Dr. rer. nat. Sonja Mandl-Weber, Dr. med. Hilke Hagemeyer und Dr. med. Jakob Armann für die tägliche Unterstützung, Einweisung in die Labortätigkeit, die abendliche Zerstreuung und Aufmunterung und ihre Freundschaft.

Meiner Familie für die andauernde Unterstützung und Ermutigung.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Karin Anne Lydia Müller, dass ich die vorliegende Dissertation ohne fremde Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen angefertigt habe und dass die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen hat.

Alle Ausführungen, die sinngemäß oder wörtlich übernommen wurden, sind als solche gekennzeichnet.

Ort, Datum

Unterschrift

