

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

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Das Nucleosidanalogen Gemcitabin induziert
signifikant Apoptose beim Multiplen Myelom und
wirkt synergistisch mit dem Proteinkinase C-
Inhibitor Gö6976**

Dissertation

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

vorgelegt von
Gabriel Grün

aus
Heidelberg

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Ralf Schmidmaier

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Michael Fiegl
Prof. Dr. Michael Schleicher

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Philipp Baumann

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

Tag der mündlichen Prüfung: 17.03.2011

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden publiziert in:

Posterpräsentation / Kongressabstract:

Meinhardt G, Grün G, Dayyani F, Emmerich B, Schmidmaier R:

Gemcitabine is a potent inducer of apoptosis in multiple myeloma cells in vitro and has synergistic effects with modulators of protein kinase C.

Blood 102:933a, 2003

Wissenschaftliche Vollpublikation:

Baumann P, Armann J, Mandl-Weber S, Grün G, Oduncu F, Schmidmaier R:

Inhibitors of Protein Kinase C Sensitise Multiple Myeloma Cells to Common Genotoxic Drugs.

European Journal of Haematology 2008 Januar; 80(1):37-45

Meinen lieben Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1.EINLEITUNG	9
2.MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Zellkultur	18
2.1.1 Zelllinien	18
2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	18
2.1.3 Zellzahlbestimmung	19
2.2 Durchflußzytometrische Analysen	19
2.2.1 Annexin V-FITC/Propidium-Jodid Apoptose Assay	19
2.2.2 Durchflußzytometrische Analyse der Sub G1-DNA Fraktion	20
2.3 Statistiken	21
3.ERGEBNISSE	22
3.1 Gemcitabin induziert Apoptose in humanen Myelomzelllinien (NCI-H929, U266, OPM-2) und primären Myelomzellen von Patienten	22
3.1.1 Durchflusszytometrische Bestimmung von Zelltod und Apoptose mittels Annexin V-FITC /Propidium-Jodid-Färbung	22
3.1.2 Bestimmung der Sub-G1-Fraktion in der Zellzyklusanalyse	26
3.1.3 Primäre Myelomzellen	27
3.2 Kombination von Gemcitabin mit anderen Zytostatika	28
3.2.1 Dosisfindung für Treosulfan, Melphalan, und	29

	Doxorubicin	
3.2.2	Treosulfan, Melphalan und Busulfan wirken mit Gemcitabin nicht synergistisch bzgl. Apoptoseinduktion	32
3.2.3	Gemcitabin und Doxorubicin induzieren synergistisch Apoptose in Myelomzellen	36
3.3	Kombination von Gemcitabin mit Signalwegmodulatoren	37
3.3.1	Die spezifische Inhibition von Enzymen der Proteinkinase-C-Familie führt zu einer signifikanten Wirkungspotenzierung von Gemcitabin	38
3.3.2	Der PKC α / β ¹ - Inhibitor Gö6976 beeinflusst die Apoptoseinduktion von Doxorubicin, Treosulfan, Busulfan und Melphalan nicht	44
3.3.3	Modulation anderer typischer Signalwege des Myeloms führt zu keiner gesteigerten Apoptoseinduktion durch Gemcitabin	47
4.	DISKUSSION	50
4.1	Apoptoseinduktion durch Gemcitabin	50
4.2	Gemcitabin in Kombination mit anderen Chemotherapeutika	52
4.3	Modulation der wichtigsten Signalkaskaden des Multiplen Myeloms	55
5.	ZUSAMMENFASSUNG	59
6.	LITERATURVERZEICHNIS	61
7.	ANHANG	79

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- 3.1 Gemcitabin induziert Zelltod/Apoptose bei NCI-H929 Myelomzellen
- 3.2 Deutlich gesteigerte Apoptoseinduktion nach 96 Stunden Inkubation mit Gemcitabin in der Zelllinie U266
- 3.3 Leichte Steigerung der Apoptoserate nach 96 Stunden Inkubation mit Gemcitabin bei der Zelllinie OPM-2
- 3.4 Inkubationszeit-abhängige Zunahme der Apoptoserate unter Gemcitabin bei der Zelllinie NCI-H929
- 3.5 Gemcitabin führt zu einem deutlichen Anstieg der Sub-G1-Fraktion nach 96 Stunden bei der Zelllinie NCI-H929
- 3.6 Zellzyklusanalyse der Myelomzelllinie U266
- 3.7 Gemcitabin führt in einer Patientenprobe sowohl zu einem erheblichem Anstieg der Annexin V-FITC- und PI-positiven Zellen, als auch zu einem Anstieg der Sub-G1-Fraktion
- 3.8 Treosulfan induziert Apoptose in NCI-H929- und U266-Zellen
- 3.9 Melphalan induziert Apoptose in NCI-H929- und U266-Zellen
- 3.10 Doxorubicin induziert Apoptose in NCI-H929- und U266-Zellen
- 3.11 Busulfan induziert Apoptose in NCI-H929- und U266-Zellen
- 3.12 Treosulfan in Kombination mit Gemcitabin führt zu keiner Steigerung der Apoptoseinduktion

- 3.13 Melphalan hat keinen synergistischen Effekt in Kombination mit Gemcitabin
- 3.14 Busulfan und Gemcitabin haben keinen synergistischen Effekt bei NCI-H929- und U266-Zellen
- 3.15 Gemcitabin und Doxorubicin induzieren synergistische Apoptose in Myelomzellen
- 3.16 Selektive Inhibition der PKC α und PKC β^1 -Isoenzyme durch Gö6976 führt zu einer ausgeprägten Steigerung der Apoptoseinduktion durch Gemcitabin
- 3.17 Gö6976 wirkt nicht toxisch bei NCI-H929- und U266-Zelllinien
- 3.18 Der Tumorpromoter Ingenol führt zu einer Abnahme der Apoptoseinduktion durch Gemcitabin
- 3.19 Die PKC-Aktivatoren TPA und Bryostatin beeinflussen nicht die Wirkung von Gemcitabin
- 3.20 Die unspezifischen PKC-Inhibitoren RO 32-0432, GF 109203x potenzieren nicht die proapoptotische Wirkung von Gemcitabin
- 3.21 Der nicht-selektive PKC-Inhibitor Gö6983 führt zu keiner Steigerung der Apoptoseinduktion durch Gemcitabin
- 3.22 Selektive Inhibition von PKC α und PKC β^1 führt zu keiner Steigerung der Apoptoseinduktion durch Doxorubicin
- 3.23 PKC-Inhibition führt weder bei Treosulfan, noch bei Busulfan zu einer Steigerung der Apoptoseinduktion
- 3.24 Selektive Inhibition von PKC α und PKC β^1 führt zu keiner Steigerung der Apoptoseinduktion durch Melphalan

- 3.25 Inhibition des Janus-Kinase-Signalweges via AG 490 und Piceatannol führt zu keiner Steigerung der Apoptoseinduktion durch Gemcitabin

- 3.26 Inhibition der p38-MAP-Kinase führt zu einer Verminderung der Apoptoseinduktion durch Gemcitabin. Blockierung der p44/p42-MAP-Kinase führt zu keiner Steigerung der Apoptoseinduktion durch Gemcitabin

- 3.27 Modulation des PI3/AKT-Signalweg potenziert nicht die proapoptotische Wirkung von Gemcitabin

1.EINLEITUNG

Das Multiple Myelom ist eine klonale B-Zell-Neoplasie terminal differenzierter B-Lymphozyten (Plasmazellen). Diese malignen Zellen sind im Knochenmark lokalisiert und dort von der Interaktion mit dem Knochenmarkstroma abhängig. Das Multiple Myelom macht 1% aller malignen Erkrankungen und 10% aller hämatologischen Neoplasien aus (Dispenzieri A et al., 2005). Die mittlere, jährliche Inzidenzrate beträgt in Deutschland ca. 2,5/100.000 für Männer und 1,5/100.000 für Frauen. Die altersspezifische Inzidenzrate steigt stark mit fortschreitendem Alter und hat in der 8. Lebensdekade ihre höchsten Werte (Phekoo KJ et al., 2004).

Die Klinik des Multiplen Myeloms erklärt sich durch das expandierende Wachstum des Tumors im Knochenmark, der Bildung eines monoklonalen Immunglobulins, sowie der Reaktion des betroffenen Wirts. Häufig treten Knochenschmerzen bei den betroffenen Patienten auf. Diese sind oft in der Wirbelsäule lokalisiert und gehen zum Teil mit radikulären Beschwerden einher. Ursache der Schmerzsymptomatik sind osteoporotische Veränderungen, sowie Osteolysen, die zu pathologischen Frakturen führen können. Verantwortlich für diesen Prozess ist einerseits die Sekretion des Osteoklasten-aktivierenden-Faktors (OAF) durch die Myelomzellen, sowie die Verdrängung gesunden Gewebes durch den proliferierenden Tumor (Roodmann et al., 1997). Ein häufig auftretender limitierender Faktor ist die Entwicklung einer sekundären Niereninsuffizienz, die meist auf eine multifaktorielle Genese zurückzuführen ist. Die durch die Osteoklasten induzierte Knochenresorption führt sowohl zu einer Hyperkalzämie, als auch zu einer Hyperkalzurie mit Exsikkose und akutem Nierenversagen. Durch Überproduktion von leichten Ketten kann es zu einer Cast-Nephropathie kommen, bei der leichte Ig-Ketten in den Nierentubuli Zylinder bilden und so zu einer tubulären Dysfunktion führen. Bei der „Light Chain Deposition Disease“ lagern sich die leichten Ketten an die Basalmembran und können so einen Glomerulusschaden bewirken. Des Weiteren kann es durch Leichtketten-Ablagerung im Rahmen einer AL-Amyloidose zu Fibrillenbildung kommen, das mit einem nephrotischen Syndrom und chronischem

Nierenversagen einhergehen kann. Auch ist die Niere durch eine therapieinduzierte Hyperurikämie gefährdet. Diese Störungen betreffen meist als gemischtes Phänomen sowohl die glomerulären als auch die tubulären Funktionseinheiten und führen bei 50% der Patienten zu einer Niereninsuffizienz, sowie bei 10% zur Dialysepflicht. (Gladney SP et al., 2008). Eines der häufigsten klinischen Probleme stellt die zunehmende Infektanfälligkeit dar. Durch ein Antikörpermangelsyndrom, das bis zu 90% der Patienten betrifft, als auch durch eine bestehende Granulozytopenie, sowie eine beeinträchtigte Antigenreaktion, kann sich eine lebensbedrohliche Sepsis entwickeln. Durch die Markverdrängung der Myelomzellen kommt es zu einer gestörten Hämatopoese. Auch ein durch die Erkrankung induzierter Vitamin-B-12- und Folat-Mangel (Vlasveld LT et al., 2003) kann zusammen mit einem hohen Paraproteinspiegel den Grad der Anämie verstärken. Diese erhöhte Paraproteinkonzentration führt zusammen mit einer verstärkten Aggregation von Erythrozyten, dem sogenannten „Sludge-Phänomen“, zu einem Hyperviskositätssyndrom, das sich durch eine Verschlechterung der Kapillardurchblutung äußert. Gleichzeitig kann durch Komplexbildung von verschiedenen Gerinnungsfaktoren mit den Paraproteinen eine hämorrhagische Diathese entstehen, die durch eine gleichzeitig bestehende Thrombozytopenie verstärkt werden kann.

Die Tumorentstehung beim Multiplen Myelom beruht, wie allgemein auch bei anderen Neoplasien, auf einem Missverhältnis der zellulären Homöostase. Dabei sind Wachstum (Proliferation), Reifung und Zelltod (Apoptose) durch verschiedene molekulare Mechanismen fehlreguliert und verschaffen so der malignen Zelle einen Überlebensvorteil, sei es durch mangelhafte Differenzierung und übermäßige Proliferation oder etwa durch erhöhte Apoptoseresistenz.

Die Entwicklung der malignen B-Zellen hängt von der Gegenwart verschiedener Wachstumsfaktoren ab, die das Überleben, die Zellteilung und die Differenzierung der Multiplen Myelom-Zelle im Knochenmark beeinflussen und unterstützen.

Oberflächenmoleküle der Zellen und verschiedene Adhäsionsmoleküle spielen eine wichtige Rolle bei der Kommunikation mit dem Knochenmarkstroma. Eine Vielzahl von Zytokinen, wie z.B. Interleukin-6

(Gerlo S et al., 2008), Insulin-like Growth Factor (IGF) (Menu E et al., 2009) und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Pour L et al., 2009, Hideshima T et al., 2005), sichern so über transmembrane Signalwege das Überleben und die Ausbreitung der Myelom-Zellen.

Über Stimulierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren und den oben genannten Bindungsrezeptoren werden daraufhin mehrere nachgeschaltete intrazelluläre Signalwege aktiviert.

- Der JAK/STAT Signalweg: Rezeptorassoziierte zytoplasmatische Proteine, die Januskinasen, werden phosphoryliert. Diese Phosphotyrosine am Rezeptor stellen die Bindungsstelle für Src homology-2 (SH-2) dar, die Teil aller STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription) sind. Nach deren Bindung über ihre SH2-Domäne werden auch sie phosphoryliert. Dies führt zur Dimerisierung von zwei STAT-Molekülen, die so in den Zellkern translozieren, wo sie ihren Aufgaben als Transkriptionsfaktoren nachgehen und so wichtige Antiapoptoseproteine wie Bcl-XI und Mcl-1, aber auch wichtige Proliferationsschaltstellen wie cyclin D1 aktivieren (Catlett-Falcone R et al., 1999; Oshiro MM et al., 2001; Puthier D et al., 1999). In den Myelomzellen kommt dabei vor allem STAT 3 eine wichtige Rolle zu (Bharti AC et al., 2004).
- Der Ras/Raf/MEK/MAPK-Signalweg: Diese Kaskade verläuft über rezeptorgekoppelte G-Proteine, zu denen Ras (Rat Sarcoma) zählt. Durch phosphoryliertes Ras wird die Aktivierung einer Reihe von Stoffwechselkinasen generiert, zunächst Raf (Rat Fibrosarcoma). Aktiviertes Raf ist nun im Stande MEK und ERK (extracellular-signal-regulated kinase) zu phosphorylieren. ERK gehört zu den MAP (mitogen-aktiviert proteine)-Kinasen. Durch diese Proteinkinasen und verschiedene andere Transkriptionsfaktoren, wie zum Beispiel NF-kappa B und STAT erfolgt nun die Signalübertragung in den Zellkern. Die Hauptwirkung der Ras/Raf-Kaskade besteht in einer Proliferationssteigerung (Ogata A et al., 1997; Rowley M et al. 2002).
- PI3-Kinase/Akt-Signalweg: Wachstumsfaktoren, wie IL-6, VEGF oder IGF-I aktivieren über Oberflächerezeptoren die PI3 (Phosphatidylinositol 3-kinase) (Tu Y et al., 2000; Hideshima T et al.,

2001). Danach werden PIP2 und PIP3 generiert, die schließlich Akt durch Kinasen wie PDK 1,2 und mTORC2 phosphorylieren. Das aktivierte Akt hemmt nun die Apoptose unter anderem durch Phosphorylierung des Bad/Bcl-xL-Komplexes. Auch wird vermutet, dass MDM2, aktiviert durch Akt durch Hemmung von p53 Zielgenen antiapoptotisch wirkt (Abroun S et al., 2004). Ein Enzym, das diesem Mechanismus entgegenwirkt, ist der Tumorsuppressor PTEN. Auffallend in Myelomzellen ist die häufige Inaktivierung dieses Schutzmechanismus (Hyun T et al., 2000).

Besonderes Augenmerk gilt dem PKC-Signalweg: Die Proteinkinase C spielt eine wesentliche Rolle bei unterschiedlichen Signaltransduktionswegen der Zelldifferenzierung, der Zellproliferation, Zell zu Zell Interaktion, Sekretion, Gen Transkription, Apoptose und Zytostatika Resistenz (Nishizuka Y et al., 1992; Hoffmann P et al., 2001; Harnett MM et al., 2004; Shirato L et al., 1996; Ni H et al., 2003; Podar K et al., 2001). Die derzeit zwölf bekannten Isoenzyme dieser Familie von Serin-Threonin-Kinasen werden entsprechend ihrer strukturellen und biochemischen Eigenschaften in drei Gruppen unterteilt:

- Die sogenannten klassischen oder konventionellen calciumabhängigen Proteinkinasen C α , β I, β II und γ . Sie werden durch Diacylglycerol oder Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA) aktiviert.
- Die neuen, calciumunabhängigen Proteinkinasen (PKC ϵ , PKC δ und PKC η). Sie werden von Diacylglycerol aktiviert.
- Die atypische Isoenzyme PKC ζ , PKC λ I und PKC μ . Sie sind calciumunabhängig und reagieren nicht auf Diacylglycerol.

Die physiologische Aktivierung der klassischen und neuen PKCs erfolgt durch „second messenger“ wie IP3 (Inositoltrisphosphat) und DAG (Diacylglycerin), nachdem diese wiederum durch PLC (Phospholipase C) aktiviert wurden, welches zuvor von Wachstumsfaktoren oder ähnlichen Reizen stimuliert wurde. So erfahren die PKC Moleküle eine Zytosol-Membran-Translokation, die für den Aktivierungszustand bestimmend ist (Mackanos EA et al., 1991; Kemp BE et al., 1994). Die PKC Familie stellt eine heterogene Gruppe von

Proteinkinasen dar, deren Isoenzyme erhebliche Unterschiede im Hinblick auf zelluläres Verteilungsmuster, auf Gewebs- und Substratspezifität und auf die Abhängigkeit von Cofaktoren aufweisen (Nishizuka Y et al., 1989). Der genaue Wirkmechanismus und die ausschlaggebende Modulation der Signalwege sind weitgehend noch unklar (Berra E, 1995 et al.; Diaz-Meco MT et al., 1994; Schonwasser DC et al., 1998; Ueda Y et al., 1996). Neuere Studien haben gezeigt, dass die PKC PI3/AKT aktivieren kann (Graff JR et al., 2005; Bahlis NB et al., 2005). Diese Vielfältigkeit erklärt möglicherweise auch die unterschiedlichen, teils gegensätzlichen biologischen Wirkungen der PKC-Isoenzyme (Dekker LV et al., 1994). Bei verschiedenen Tumorformen wurde eine Beteiligung von PKC-Isoformen mit hemmender und modulierender Wirkung auf das Apoptoseverhalten bereits beschrieben. So wurden sie wiederholt in den Zusammenhang mit dem Fortschreiten von Malignomen gebracht wie Glioblastomen (da Rocha AB et al., 2002; Graff JR et al., 2005), Kolorektalen Carcinomen (Gokmen-Polar Y et al., 2001) und verschiedener hämatologischer Neoplasien (Ringshausen I et al., 2005; Meinhardt G et al., 2002; Schmidmaier R et al., 2004).

Zur Behandlung des Multiplen Myeloms gibt es unterschiedliche Therapiekonzepte. Eine entscheidende Therapieoption war die Einführung von Melphalan und Prednison 1969 durch Alexanian (Alexanian R et al., 1969). Mit dieser konventionellen Therapie beträgt das mediane Überleben etwa 3 Jahre. Nur ca. 5% der Patienten überleben länger als 10 Jahre nach Diagnosestellung (Kyle RA et al., 1983). Mit der Einführung der Melphalan-Hochdosistherapie konnten dann sogar komplette Remissionen von 20-30% erreicht werden (Selby PJ et al., 1987).

Mit der Einführung der autologen Knochenmarktransplantation konnte die Dauer der Zytopenie verkürzt werden. Durch die im transplantierten autologen Mark enthaltenen hämopoetischen Vorläufer- und Stammzellen konnte der Zeitraum der Myelosuppression von etwa 4 Wochen auf nur noch 2 bis 3 Wochen reduziert werden. So konnte die Mortalität auf unter 5 % gesenkt werden (Harousseau P et al., 1995). Heute wird meistens eine Blutstammzelltransplantation bevorzugt. Nach Mobilisierung der Stammzellen aus dem Knochenmark durch die Gabe eines hämopoetischen

Wachstumsfaktors, oft auch in Kombination mit einer Chemotherapie, werden diese aus der Blutbahn mittels Leukapherese gewonnen.

Eine dauerhafte komplette Remission durch eine Hochdosischemotherapie in Verbindung mit einer autologen Transplantation kann jedoch nur bei einem kleinen Anteil der Patienten erreicht werden. Durch eine allogene Stammzelltransplantation können sogar deutlich höhere Remissionsraten erzielt werden. Trotz erheblicher Risiken, wie schwerwiegenden Infektionen und der Graft-versus-Host-Erkrankung, stellt sie dennoch ein potentiell kuratives Therapiekonzept dar. Es hat sich gezeigt, dass bei diesem Verfahren bis zu 30 % der Patienten nach sechs Jahren krankheitsfrei bleiben. (Corradini P et al., 1999).

Seit der Einführung von Melphalan als Primärtherapie wurde auch eine Vielzahl von Polychemotherapie-Schemata untersucht und angewandt. Sie stellen im Wesentlichen unterschiedliche Kombinationen von Alkylanzien, Anthrazyklinen, Glukokortikoiden, Vincristin und Etoposid dar. Weit verbreitet war das VAD-Protokoll bestehend aus Vincristin, Adriamycin und Dexamethason. Gegenüber der Therapie mit Melphalan und Prednison, werden bei den meisten dieser Protokolle Ansprechraten um 60-70% angegeben bei zum Teil aber deutlich gesteigerter Toxizität. Dies führt zwar zu einer früheren Symptomkontrolle, eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens konnte jedoch in verschiedenen Untersuchungen nicht belegt werden. Es ließ sich also bei den bisherigen etablierten Polychemotherapie-Schemata kein Überlebensvorteil gegenüber der Melphalan/Prednison-Therapie nachweisen (Gregory J et al., 1992). Eine Alternative bietet das zunächst als Sedativum entwickelte Thalidomid. Studien zeigen, dass das hochgradig teratogene Medikament die Überlebenszeiten beim Multiplen Myelom deutlich verlängert (Laubach JP et al., 2009, Facon T et al. 2007). Abkömmlinge von Thalidomid, sogenannte IMiDs (immunmodulatorische Substanzen), vor allem Lenalidomid, zeigen ein ähnliches Wirkspektrum bei mildereren Nebenwirkungen und werden erfolgreich therapeutisch eingesetzt (RichardsonPG et al., 2009, Meijer E et al., 2009). Der Wirkungsmechanismus von Lenalidomid und Thalidomid beim Multiplen Myelom ist nicht genau bekannt. Als „Immunmodulatoren“ sollen die Substanzen die Aktivität des Immunsystem beeinflussen und dadurch die

Entwicklung von Tumorzellen blockieren, das Wachstum von Blutgefäßen verhindern und die Tumorabwehr des Organismus unterstützen (Kotla V et al., 2009). Seit 2004 ist auch der Proteasom-Inhibitor Bortezomib zur Therapie des Multiplen Myeloms zugelassen. Proteasom-Blockade soll in den malignen Zellen zur Hemmung des Zellwachstums und der Angiogenese führen. Melphalan und Prednison in Kombination mit Thalidomid, Lenalidomid und Bortezomib stellen neue therapeutische Ansatzpunkte dar (Venon MD et al., 2009). Auch zeigen neuere Phase-I-Studien vielversprechende Ansprechraten bei therapierefraktären Myelom-Patienten durch eine Kombination von Lenalidomid mit Bortezomib (Richardson PG et al., 2009). Durch Einführung dieser „neuen Substanzen“ in die klinische Praxis konnte das Gesamtüberleben um n 16 Monate verlängert werden (Kumar SK et al., 2008).

Zunehmende Bedeutung in der Behandlung des Multiplen Myeloms erlangt auch das 1963 in der ehemaligen Deutschen Demokratischen Republik synthetisierte bifunktionelle Alkylanz Bendamustin. Ziel war es damals, die antineoplastischen Eigenschaften der Alkylanzien sowie der Nukleosidanaloga in einer Substanz zu vereinen. So konnten komplette Remissionsraten durch den Einsatz von Bendamustin in Kombination mit Prednison bei Patienten mit neu diagnostiziertem Myelom erreicht werden (Pönisch W et al., 2006). Auch die Kombination von Bendamustin mit dem Statin Simvastatin bietet vielversprechende Therapieergebnisse bei ersten klinischen Untersuchungen (Schmidmaier R et al., 2007).

Antineoplastische Substanzen wirken hauptsächlich durch Induktion des programmierten Zelltodes oder über Stimulation der Zellen zur transienten oder terminalen Differenzierung und führen somit zur Hemmung der Proliferation. Eine herabgesetzte Sensivität gegenüber solchen Apoptose- und Differenzierungs-Stimuli ist allgemein charakteristisch für maligne Zellen. Diese Resistenzen können in unterschiedlichem Maße während einer zytostatischen Therapie entstehen oder sich verstärken. Auf molekularer Ebene sind verschiedene Mechanismen für eine solche Entwicklung verantwortlich. Die vermehrte Expression von „Multi-Drug-Resistance-Proteinen“, die als Efflux-Pumpen agieren und so die Zytostatika vor ihrem eigentlichen Wirkungsantritt wieder aus der Zelle hinausbefördern (van den

Heuvel-Eibrink MM et al., 2000), als auch die Herauf- und Herabregulierung verschiedenster pro- und antiapoptotischer Proteine können zu diesem Prozeß führen. Ebenso spielt hierbei die Interaktion der Myelomzellen mit ihrer Umgebung im Knochenmark (dem Microenvironment) eine tragende Rolle.

Die Analyse dieser Mechanismen ist von grundlegender Bedeutung für die Weiterentwicklung in der Behandlung des Multiplen Myeloms. Ziel dieser Dissertation ist es, *in vitro* an verschiedenen Myelom-Zelllinien nach neuen Therapieoptionen zu suchen. Gerade die Kombination von Zytostatika, die im Bereich hämatologischer Erkrankungen noch nicht in Routine eingesetzt werden, mit schon etablierten Chemotherapeutika ist dabei von großem Interesse. Möglicher Kandidat für solche Therapien ist das Nucleosid-Analogon Gemcitabin. In Deutschland ist Gemcitabin zugelassen für die Behandlung von Gallengangskarzinomen, Mammakarzinomen, des Pankreaskarzinoms, des Urothelkarzinoms der Blase, des Ovarialkarzinoms und für die Therapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (Strimpakos A et al. 2008, Iaffaioli RV et al. 2007, Lorusso D et al., 2006). Im hämatologischen Formenkreis wird es bisher nur bei Hodgkin-Lymphomen erfolgreich klinisch angewendet (Validire P et al., 2008). Verschiedene *in vitro* Untersuchungen zeigen ebenfalls erfolgversprechende Resultate bei unterschiedlichen hämatologischen Neoplasien (Kim KH et al., 2009, Savage DG et al., 2000).

Durch spezielle Transporterproteine, den Nucleosidtransporterproteinen *es*, *ei*, *cit*, *cib*, *cif*, *cs* und *cs* (Mackey JR et al., 1998) wird Gemcitabin in die Zelle aufgenommen. Gemcitabin ist ein „Prodrug“ und wird nach der Aufnahme in die Zelle durch die Deoxycytidinkinase zu den aktiven Formen Monophosphat, Diphosphat und Triphosphat verstoffwechselt (Heinemann V et al., 1988). Der antiproliferative Effekt Gemcitabins erfolgt hauptsächlich durch die Eingliederung der Triphosphatform als falsche Nucleinsäure in die DNS (Ghandi V et al., 1990). Dort konkurriert es mit dem physiologisch vorkommenden Cytidin. Zu einem kleineren Anteil wird der apoptotische Effekt aber auch durch einen Einbau des Triphosphat in die RNS hervorgerufen (Huang P et al., 1991, Ruiz van Haperen VW et al., 1996). Durch eine Beeinflussung der Deoxycytidinkinaseaktivität und Hemmung der

Deoxycytidinmonophosphat-Deaminase kommt es zu einer Potenzierung der Wirkung und zu einer verlangsamten Verstoffwechslung Gemcitabins (Heinemann V et al. 1992).

Nach dem heutigen Kenntnisstand gestaltet sich die kurative Therapie des Multiplen Myeloms mit allen bisher bekannten Therapieoptionen äußerst schwierig. So ist Gemcitabin, noch kaum bei hämatologischen Neoplasien eingesetzt, ein vielversprechendes Ziel eingehender Untersuchungen. Insbesondere wurde diese Substanz bisher beim Multiplen Myelom präklinisch und klinisch kaum evaluiert.

Ein wichtiges Ziel dieser Dissertation ist es deshalb, durch in-vitro Untersuchungen Ansätze für neue Therapieoptionen bei der Behandlung des Multiplen Myeloms zu finden. Gesucht wird ein Chemotherapeutikum, das schon in geringen Konzentrationen einen hohen spezifischen zytotoxischen Effekt auf Myelomzellen aufweist. In einem Zellkulturmodell mit verschiedenen Myelom-Zelllinien soll die zytostatische Potenz von Gemcitabin beim Multiplen Myelom erforscht werden. Auch soll Gemcitabin alleine und in Kombination mit den Alkylanzien Melphalan, Treosulfan und Busulfan, als auch mit dem Anthracyclin Doxorubicin untersucht werden. Gerade die synergistische Kombination von Zytostatika, die im Bereich hämatologischer Erkrankungen noch nicht routiniert eingesetzt werden, mit schon etablierten Chemotherapeutika ist von großem Interesse.

Des Weiteren sollen unterschiedliche Modulatoren der typischen, für Wachstum, Überleben und Zytostatikaresistenz verantwortlichen Myelomsignalwege, wie Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK-STAT), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase), Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) und die PKC.-Isoenzyme in ihrer Wirkung auf die Zelllinie NCI-H929 alleine und in Kombination mit Gemcitabin untersucht werden um so auf neue Therapieoptionen schließen zu können.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

Die Myelomzelllinien NCI-H929, U266 und OPM-2 stammen von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DMSZ).

Die Zellen wurden in RPMI-1640 mit 20-prozentigem Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS), welches zuvor bei 56 Grad Celsius über eine Stunde inaktiviert wurde, bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Es wurde kein Streptomycin/Penicillin verwendet. Die Zellen wurden bis zu einer Dichte von etwa 80×10^4 Zellen/ml kultiviert; dann wurde die Kultur geteilt, ein Teil davon verworfen, und der andere Teil mit Medium auf eine Zellkonzentration von 20×10^4 Zellen/ml verdünnt und weiterkultiviert. Die Zellvitalität vor Beginn eines Experimentes wurde sowohl mikroskopisch als auch mittels Trypanblaufärbung sichergestellt.

2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zu Beginn des Einfrierens wurde ein Einfriermedium hergestellt, welches aus 5ml RPMI-1640, 3ml FCS und 2ml DMSO bestand. Dieses wurde bis zum Abfüllen in die Kryoröhrchen auf Eis gelagert. Für das Einfrieren von Zellen wurden 10^7 Zellen abzentrifugiert, zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 4,5 ml Kulturmedium (RPMI-1640 + 20% FCS) resuspendiert. In jedes der Kryoröhrchen wurden jeweils 0,9 ml des Einfriermediums 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° tief gefroren. Für das Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem Gefrierschrank genommen, zwei Minuten bei Raumtemperatur angewärmt und schließlich in 37 C° warmes Kulturmedium überführt. Es folgten zwei Waschvorgänge mit Kulturmedium. Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von 20×10^4 Zellen in Zellkulturflaschen überführt.

2.1.3 Zellzahlbestimmung

Dafür wurden 50µl einer Zelllösung mit 50µl der Trypanblaulösung versetzt, gevortext und in Neubauer-Zählkammern gegeben und unter dem Mikroskop die Zellzahl pro ml festgestellt. Die Gesamtzellkonzentration wurde folgendermaßen berechnet:

$$\begin{aligned} & \text{Zahl der gezählten Zellen} / (\text{Zahl der ausgezählten Kammern} \times 2) \\ & = \text{Zellen} \times 10^4 / \text{ml} \end{aligned}$$

2.2 Durchflußzytometrische Analysen

2.2.1 Annexin/Propidium Jodid Apoptose Assay

In vitalen Zellen besteht eine ausgeprägte Asymmetrie der Zellmembran; Phosphatidylserin kommt in vitalen Zellen nur auf der Innenseite der Zellmembran vor. Wenn Zellen in Apoptose gehen verliert die Membran ihre Asymmetrie und es kommt zu einer Änderung der Position der Membranlipide. Phosphatidylserin wird auf die Außenseite der Zellmembran verschoben. Die Annexinmessung basiert auf der Erfassung der Zellen, welche Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran besitzen. Annexin bindet an dieses Phosphatidylserin und kann, wenn es in gekoppelter Form mit Fluorescein-thioisocyanat (FITC) verwendet wird, von einem Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488nm angeregt werden. Daraufhin emittiert das FITC-Molekül bei einer Wellenlänge von 518nm, was im Durchflußzytometer gemessen und verarbeitet werden kann.

Verliert die Zelle des Weiteren die Membranintegrität, so kann PI, ein DNA-Farbstoff die Zellmembran permeieren und sich an die DNA anlagern. PI ist im Gegensatz zu FITC ein nach optischer Laseranregung ein rot und nicht grün fluoreszierender Farbstoff. PI wird bei 488nm angeregt und emittiert bei 617 nm.

Durch Kombination der beiden Färbungen können 2 Stadien des Zelluntergangs beschrieben werden:

- Frühe Apoptose: die Zellen sind Annexin positiv und PI negativ
- Späte Apoptose: die Zellen sind sowohl für Annexin als auch für PI positiv

Im Einzelnen wurden 10^6 Zellen bei 1500U/min , 8°C 6 Minuten abzentrifugiert und nach Abschütten des Überstandes zweimal mit kaltem PBS gewaschen und dann in Annexin Binding Buffer gelöst um eine Zellkonzentration von 2×10^6 Zellen /ml zu erhalten.

Binding Buffer: 10mM HEPES/NaOH, pH 7,4, 140mM NaCl, 2,5mM CaCl_2

Nach dem Transfer von 100 μl in ein FACS-Röhrchen (Sarstedt) wurden 5 μl Annexin-FITC und 10 μl PI (Propidiumjodid) hinzu gegeben und bei Raumtemperatur im Dunkeln für 15 min inkubiert. Nach Zugabe von 400 μl Binding Buffer wurde die Analyse innerhalb einer Stunde durchgeführt. Zur Analyse wurden die Kanäle X=1 (Annexin-FITC) und X=3 (Propidiumjodid) im Epics Coulter Durchflußzytometer verwendet.

2.2.2 Durchflußzytometrische Analyse der Sub G1- DNA Fraktion

Mittels Durchflußzytometrie erfolgte die Ermittlung des Anteils an fragmentierter DNS apoptotischer Zellen durch Analyse von fixierten, propidiumjodidgefärbten Zellen in Hinblick auf die Sub-G1-Fraktion. Diese Fraktion stellt die durch Endonukleasen fragmentierte DNA dar, welche ebenso charakteristisch für apoptotische Zellen ist.

Je Probe wurden 10^6 Zellen in ein FACS-Röhrchen eingefüllt und das Kulturmedium bei 1600 upm 6 min abzentrifugiert und verworfen. Die Zellen wurden in 1ml kaltem 70% Ethanol resuspendiert und zur Fixation über Nacht bei 4°C oder 1h bei -20°C aufbewahrt. Nach 6 min Abzentrifugieren bei 1600 upm wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 1ml kaltem PBS resuspendiert. Es wurden 25 μl RNase A (0,5mg/ml) sowie 40 μl Propidiumjodid (1mg/ml) jeder Probe hinzugefügt und die Proben bei Raumtemperatur im Dunkeln 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellsuspension mittels Pipette durch Micropore Netzfolie gefiltert und die Proben sofort auf Eis gelagert. Die Analyse am Durchflußzytometer begannen wir nach spätestens 15 Minuten. Durch die Zugabe von RNase wird die in der Zelle vorhandene RNA enzymatisch in kleine Fragmente zerlegt. DNA ist in der Lage, PI zu binden und somit durch ein positives Signal im Zytometer mit dem Signal der DNA zu interferieren. Da die RNA jedoch in kleinen Fragmenten vorliegt, kann beim Messen durch Setzen eines geeigneten Gates eine Interferenz vermieden werden.

2.3 Statistiken

In den Abbildungen werden die Mittelwerte mit den Standardabweichungen gezeigt. Die Ergebnisse wurden in mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten bestätigt. Die deskriptive Statistik wurde mittels Excel ausgewertet und die statistische Signifikanz mit dem Tukey-Test mit SPSS berechnet. $P < 0.05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Gemcitabin induziert Apoptose in Myelomzelllinien (NCI-H929, U266, OPM-2) und primären Myelomzellen von Patienten

An den drei Myelomzelllinien NCI-H929, U266 und OPM-2 wurde Apoptose und Zelltod unter Gemcitabin-Exposition in Abhängigkeit von Dosis und Zeit untersucht.

3.1.1 Durchflusszytometrische Bestimmung von Zelltod und Apoptose mittels Annexin V-FITC /Propidium-Jodid-Färbung

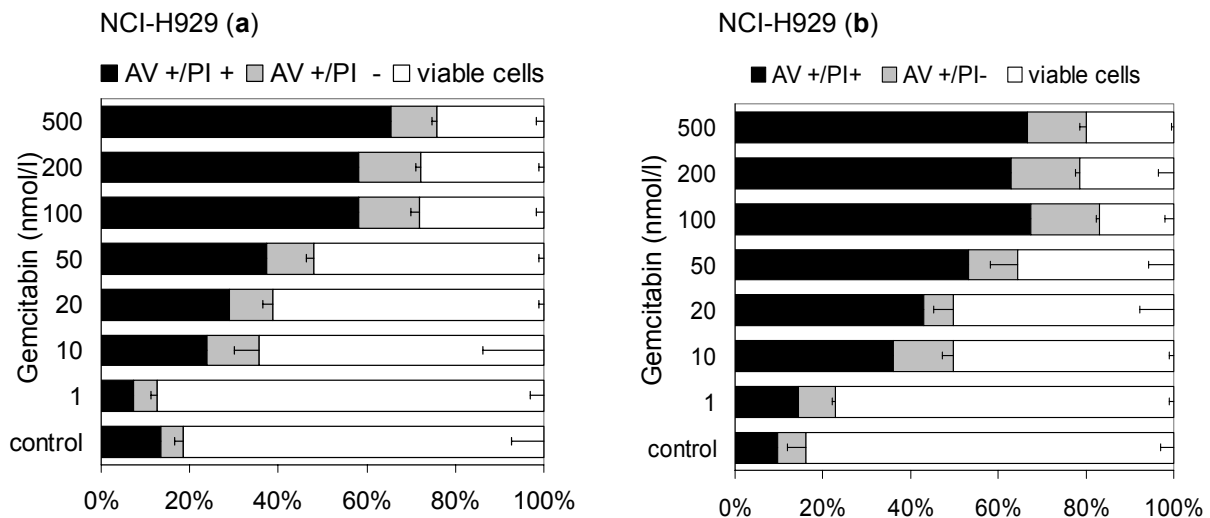


Abbildung 3.1 a+b: Gemcitabin induziert Zelltod/Apoptose bei NCI-H929 Myelomzellen

Die Zelllinie NCI-H929 wurde über 48 Stunden (a) bzw. 96 Stunden (b) jeweils mit 1nM, 10nM, 20nM, 50nM, 100nM, 200nM und 500nM Gemcitabin inkubiert. Nach Färbung der Zellen mit Annexin V-FITC und PI wurde der Anteil früh (AV+/PI-)- und spätapoptotischer (AV+/PI+) Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

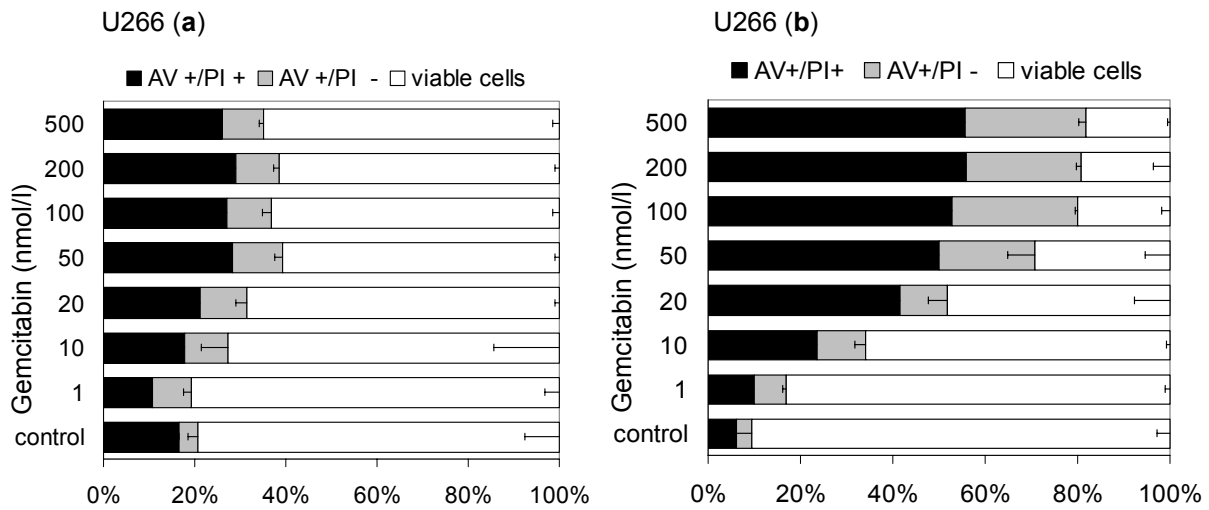


Abbildung 3.2 a+b: Deutlich gesteigerte Apoptoseinduktion nach 96 Stunden Inkubation mit Gemcitabin in der Zelllinie U266

U266-Zellen wurden 48 Stunden (a) und 96 Stunden (b) mit ansteigenden Gemcitabin-Konzentrationen inkubiert. Nach Annexin V-FITC/PI-Färbung erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der apoptotischen Zellen.

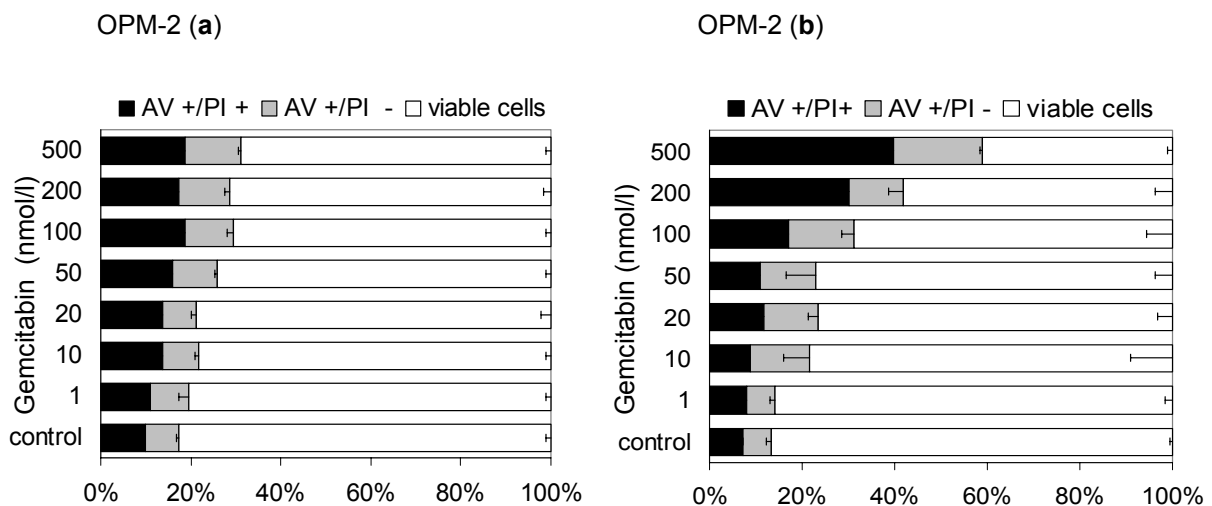


Abbildung 3.3 a+b: Leichte Steigerung der Apoptoserate nach 96 Stunden Inkubation mit Gemcitabin bei der Zelllinie OPM-2

OPM-2-Zellen wurden 48 Stunden (a) und 96 Stunden (b) mit ansteigenden Gemcitabin-Konzentrationen behandelt. Es folgte die Bestimmung der früh (AV+/PI-) und spätapoptotischen (AV+/PI+) Zellen mittels Durchflusszytometrie

Die Abbildungen 3.1 bis 3.3 zeigen, daß Gemcitabin bei den drei verwendeten Zelllinien NCI-H929, U266 und OPM-2 zeit- und konzentrationsabhängig Apoptose induziert. Dies wurde durch Färben der Zellen mit Annexin V-FITC und Propidiumjodid (PI) nach der jeweiligen gewünschten Zeit durchflusszytometrisch gemessen. PI ist ein Nukleinsäurefarbstoff, der nur bei erhöhter Membranpermeabilität, wie sie für die Spätphase der Apoptose charakteristisch ist, in die Zellen eindringt. Die Frühphase der Apoptose lässt sich dagegen durch eine spezifische Färbung mit Annexin verdeutlichen. In dieser Phase verschiebt sich Phosphatidylserin nach Aufhebung der Membranasymmetrie auf die Außenseite der Zellmembran und geht dort nach Färbung Bindungen mit Annexin ein.

In den oben aufgeführten Diagrammen zeigt sich nach der gewählten Inkubationszeit von 48 Stunden ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Apoptoserate bei den NCI-H929-Zellen, während es bei den anderen beiden Zelllinien schon nach einem geringen Konzentrationsanstieg bei etwa 20 nM zu einer Plateaubildung mit mäßiger Apoptoseinduktion kommt.

Nach 96 Stunden war bei den nicht adhärennten NCI-H929-Zellen eine maximale Apoptoseinduktion zwischen einer Gemcitabinkonzentration von 20nM und 30nM zu erkennen. Ab diesen Konzentrationen kam es bei ca. 80% der apoptotischen Zellen zu einer Plateauphase, die auch bei deutlich höheren Dosierungen nicht überschritten wurde. Ähnliche Werte waren bei den adhärennten, IL-6 abhängigen U266-Zellen zu beobachten. Allein die nicht adhärennten, im Bereich des FGFR3-Gens mutierten OPM-2-Zellen, zeigten sich unter Gemcitabin-Exposition deutlich weniger sensibel, mit max. 60% apoptotischer Zellen bei einer Konzentration von 200nM des Zytostatikums

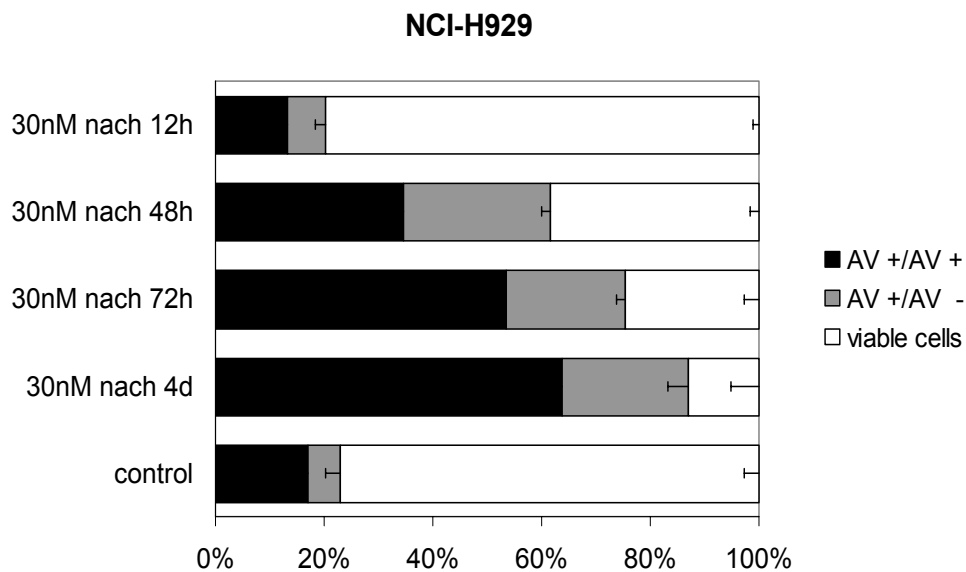


Abbildung 3.4: Inkubationszeit-abhängige Zunahme der Apoptoserate unter Gemcitabin bei der Zelllinie NCI-H929

NCI-H929-Zellen wurden mit einer Konzentration von 30nM Gemcitabin inkubiert. Nach 12, 48, 72 und 96 Stunden erfolgte im Rahmen eines Auswaschversuches die Bestimmung der Annexin V-FITC- und PI-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie.

Bei dem in Abbildung 3.4 dargestellten Auswaschversuch sollte gezeigt werden, wann Gemcitabin seinen maximalen apoptotischen Effekt entfaltet. NCI-H929-Zellen wurden hierzu mit einer Konzentration von 30nM inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden nun die Annexin V-FITC- und PI-positiven Zellen gemessen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es nach einer Exposition von 48h Stunden und länger zu einem starken Anstieg des zytotoxischen Verhaltens von Gemcitabin, mit einer Wirkungssteigerung bis 96 Stunden kommt.

3.1.2 Bestimmung der Sub-G1-Fraktion in der Zellzyklusanalyse

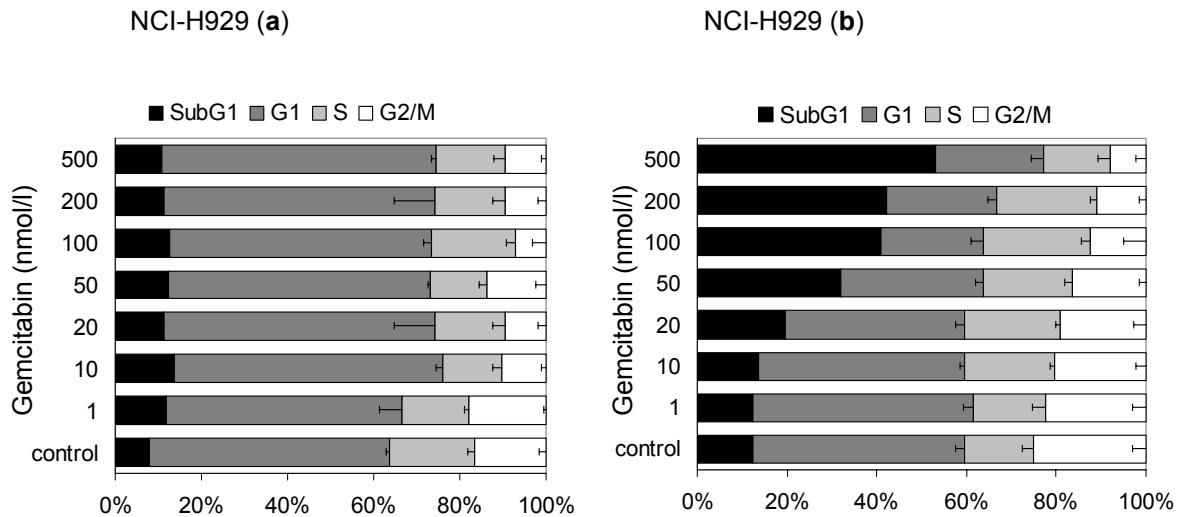


Abbildung 3.5 a+b: Gemcitabin führt zu einem deutlichen Anstieg der Sub-G1-Fraktion nach 96 Stunden in der Zelllinie NCI-H929

Die Myelomzelllinie NCI-H929 wurde über 48 Stunden (a) und 96 Stunden (b) mit steigenden Gemcitabin-Konzentrationen inkubiert. Darauf erfolgte eine Zellzyklusanalyse im Durchflusszytometer.

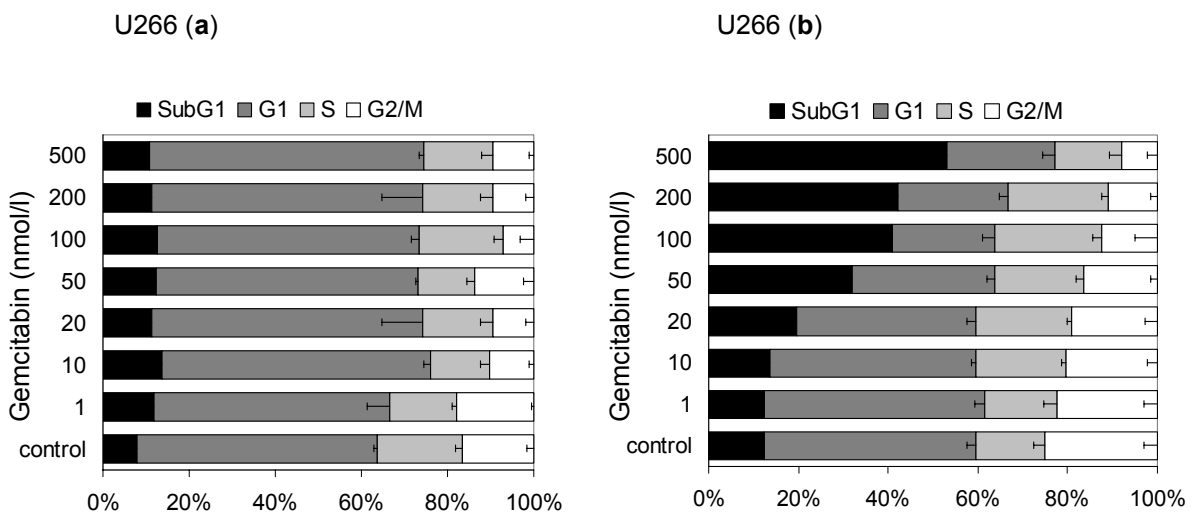


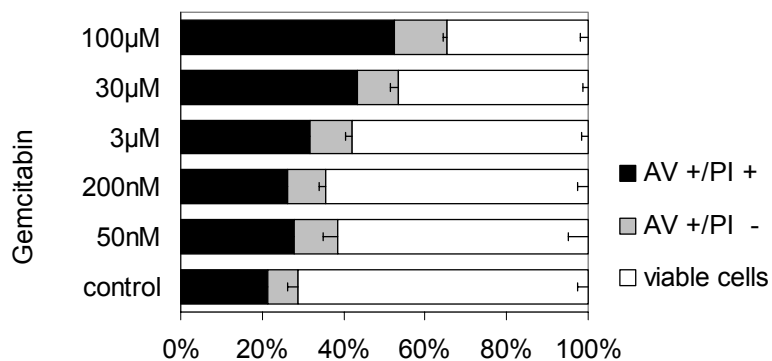
Abbildung 3.6 a+b: Zellzyklusanalyse der Myelomzelllinie U266 nach 48 und 96 Stunden

U266 -Zellen wurden 48 (a) und 96 (b) Stunden mit aufsteigenden Gemcitabin-Konzentrationen behandelt. Es erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus mit Bestimmung der Sub-G1-Fraktion.

Als zweite Methode der Apoptosemessung wurde die Quantifizierung der SubG1-Fraktion in der Zellzyklusanalyse verwendet. Nach 48h war bei beiden Zelllinien nur ein verhaltener Anstieg der Sub-G1-Fraktion zu beobachten. In beiden Abbildungen erkennt man jedoch nach 96 Stunden Inkubationszeit eine deutliche Zunahme der apoptotischen Zellen anhand ihrer Sub-G1-Fraktion. Bei den NCI-H929-Zellen ist ein Maximum an Schädigung von ca. 60% ab einer Konzentration von 70nM zu sehen. Weniger sensibel verhalten sich die U266-Zellen mit Maximalwerten von ca. 40% ab einer Konzentration des Chemotherapeutikums von 100nM.

3.1.3 Primäre Myelomzellen von einem Patienten

Annexin (a)



Sub-G1 (b)

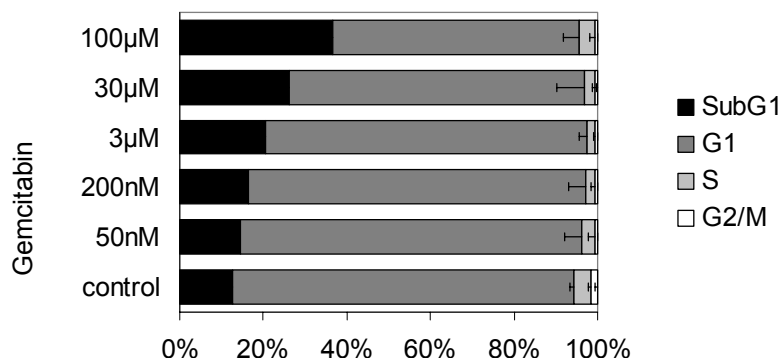


Abbildung 3.7 a+b: Gemcitabin führt in einer Patientenprobe sowohl zu einem erheblichem Anstieg der Annexin V-FITC- und PI-positiven Zellen, als auch zu einem Anstieg der Sub-G1-Fraktion

Das Knochenaspirat eines Patienten wurde über vier Tage mit 50nM, 200nM, 3µM, 30µM und 100µM Gemcitabin inkubiert. Im Durchflusszytometer wurden sowohl die Annexin V-FITC- und PI-positiven Zellen (a), als auch die sub-G1-Fraktion (b) bestimmt.

Bei diesem Versuch wurde eine aus Knochenmarksaspirat gewonnene Patientenprobe mit über 90%iger Plasmazellinfiltration mit aufsteigenden Konzentrationen von Gemcitabin inkubiert. Die Dosierungen wurden höher als bei den bisher verwendeten Zelllinien gewählt. Auch bei der Patientenprobe war ein klarer Anstieg der apoptotischen Zellen festzustellen. Nach zwei Tagen konnten ca. 65% avitale Zellen gemessen werden. Auch bei der Bestimmung der mit den apoptotischen Zellen korrelierenden Sub-G1-Fraktion konnte ein massiver Anstieg der apoptotischen Zellen erfasst werden.

3.2 Kombination von Gemcitabin mit anderen Zytostatika

Mit der Einführung verschiedener Polychemotherapie-Schemata in der Therapie des Multiplen Myeloms haben sich die Ansprechraten deutlich gesteigert. Um eine mögliche Toxizität gering zu halten und eine Steigerung der Apoptoserate herbeizuführen, soll nun untersucht werden, ob es schon bei niedrigen Dosierungen von verschiedenen Zytostatika in Kombination mit Gemcitabin zu deutlichen synergistischen Effekten kommt. Die Apoptose wurde hierbei durchflusszytometrisch nach Inkubation der Zellen sowohl mit den Alkylanzien Melphalan, Treosulfan und Busulfan, als auch mit dem Anthracyclin Doxorubicin, einzeln und in Kombination mit Gemcitabin, bestimmt.

3.2.1 Dosisfindung für Treosulfan, Melphalan, und Doxorubicin bei den Myelom-Zelllinien NCI-H929 und U266

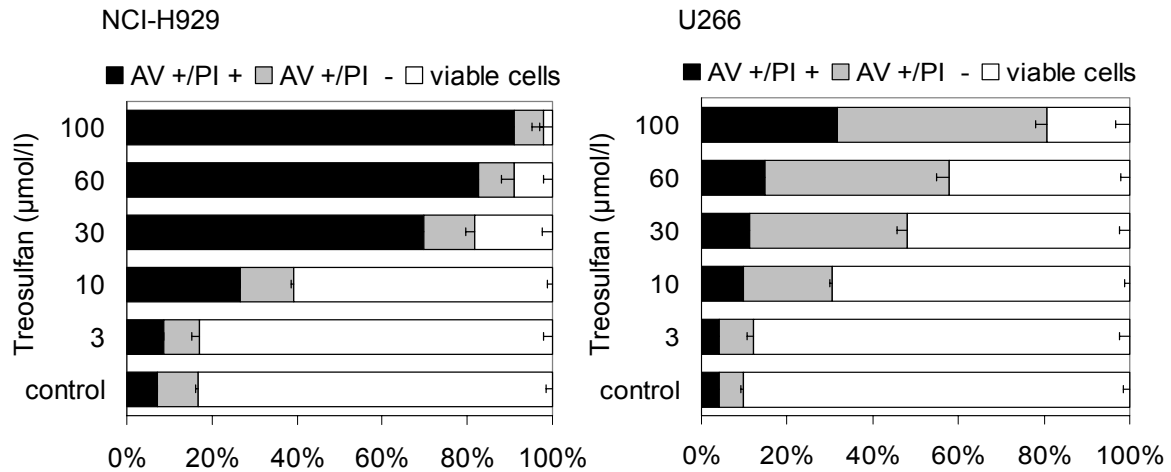


Abbildung 3.8: Treosulfan induziert Apoptose in NCI-H929- und U266-Zellen

NCI-H929- und U266-Zellen wurden mit aufsteigenden Treosulfan-Konzentrationen inkubiert. Nach 96 Stunden erfolgte die durchflusszytometrische Messung der Annexin V-FITC/PI-Fraktion.

Nach einer Inkubationszeit von 96 Stunden konnte bei den Zelllinien NCI-H929 und U266 eine deutliche Zunahme der apoptotischen Zellen gemessen werden.

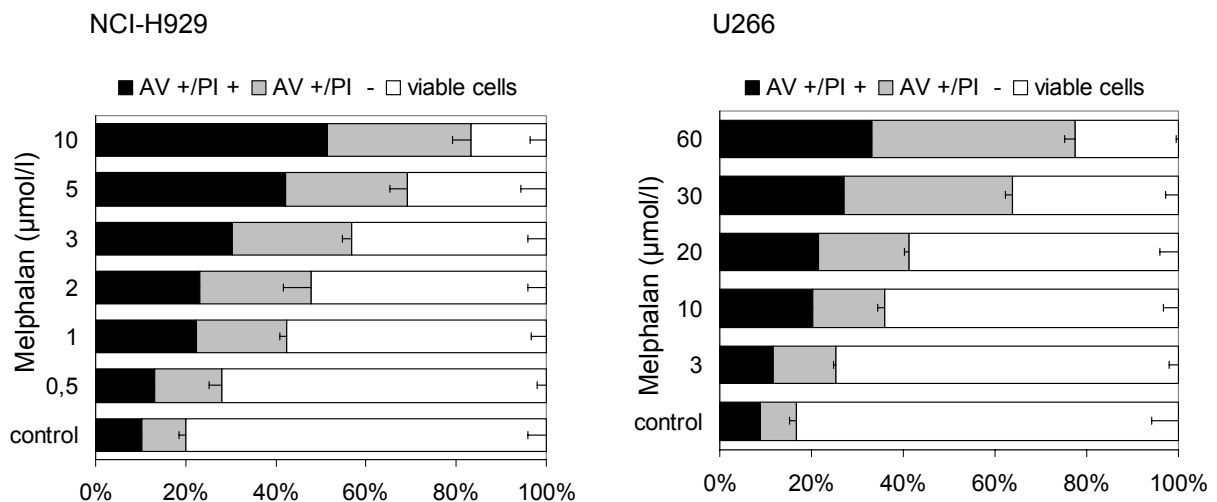


Abbildung 3.9: Melphalan induziert Apoptose in NCI-H929- und U266-Zellen

Nach 96 Stunden Behandlung mit aufsteigenden Melphalan-Konzentrationen wurden NCI-H929 und U266 mittels FACS-Analyse auf ihren Anteil Annexin V-FITC- und PI-positiven Zellen untersucht

Mit ansteigenden Melphalankonzentrationen zeigte sich bei beiden Zelllinien eine zunehmende Apoptoseinduktion. Dabei sind bei den NCI-H929-Zellen geringere Konzentrationen des Agens notwendig als bei den Zellen der Linie U266. Bei ersteren sind schon ca. 80% der Zellen bei einer Konzentration von 10µM apoptotisch, während zweitere für ein ähnliches Verhalten eine Konzentration von 60µM des Chemotherapeutikums benötigen

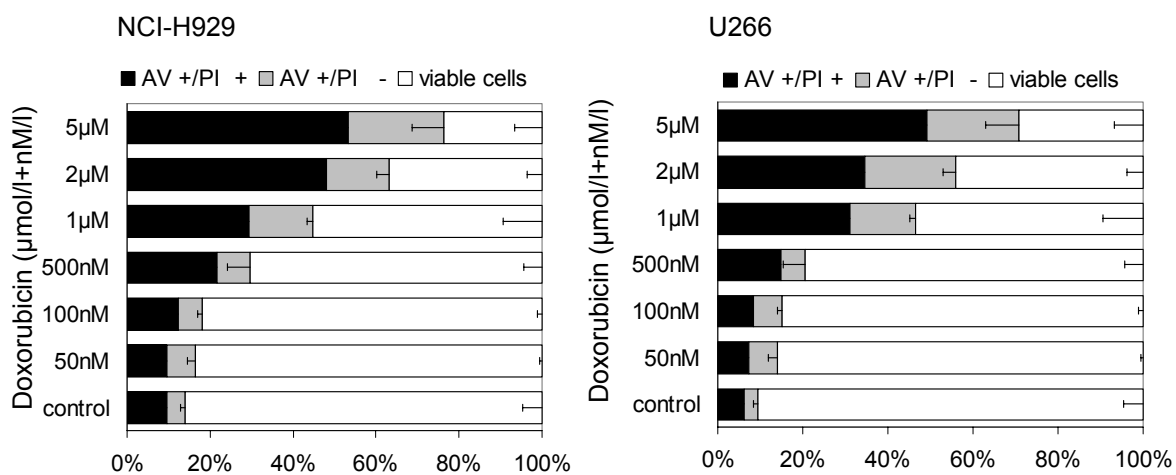


Abbildung 3.10: Doxorubicin induziert Apoptose in NCI-H929- und U266-Zellen

NCI-H929- und U266-Zellen wurden vier Tage mit aufsteigenden Doxorubicin-Konzentrationen inkubiert. Es folgte die Bestimmung der früh- und spätapoptotischen Zellen mittels Durchflußzytometrie.

Als nächstes wurde die Apoptoseinduktion durch das Anthracyclin Doxorubicin nach einer Inkubationszeit von vier Tagen bei den Zelllinien NCI-H929 und U266 untersucht. In Abbildung 3.10 zeigt sich hierbei eine kontinuierliche Zunahme der Apoptoserate bei beiden Zelllinien, mit einem Maximalwert von ca. 70-80% bei einer Konzentration von 5µM.

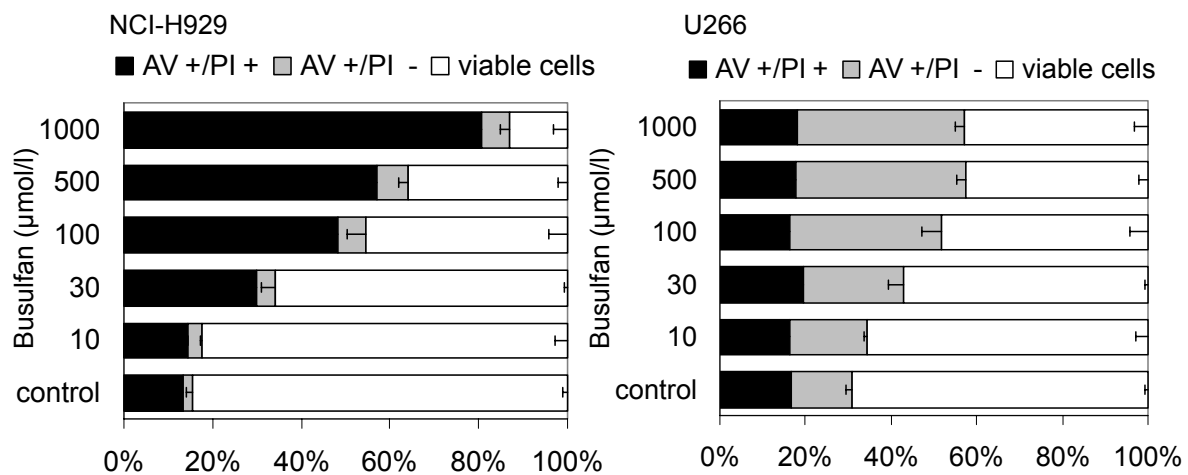


Abbildung 3.11: Busulfan induziert Apoptose in NCI-H929- und U266-Zellen

NCI-H929- und U266-Zellen wurden vier Tage mit aufsteigenden Busulfan-Konzentrationen inkubiert. Es folgte die Bestimmung der früh- und spätapoptotischen Zellen mittels Durchflußzytometrie.

Zuletzt wurde bei beiden Zelllinien die Apoptoseinduktion durch Busulfan untersucht. Die NCI-H929-Zellen zeigten eine deutliche Zunahme der früh- und spätapoptotischen Zellen bei kontinuierlicher Steigerung der Busulfankonzentrationen. Die U266-Zellen zeigte sich weniger sensibel mit maximal ca. 60 % apoptotischer Zellen ab einer Konzentration von 500µM Busulfan.

In den folgenden Versuchen wurden die zuvor einzeln getesteten Zytostatika mit Gemcitabin kombiniert. Dabei wurden jeweils gering toxische Dosierungen der einzelnen Chemotherapeutika mit einer niedrigen Dosierung von 5nM und 10nM Gemcitabine koinkubiert. So sollten möglichst hohe additive oder synergistische Wirkmechanismen aufgezeigt werden. Für Treosulfan wurden Konzentrationen von 3µM und 10µM gewählt. Für Melphalan wurden bei den NCI-H929-Zellen Konzentrationen von 0,5µM und 1µM gewählt, bei den weniger sensiblen U266-Zellen Konzentrationen von 3µM und 10µM. Für Busulfan wurde bei beiden Zelllinien eine gering toxische Dosierung von 30µM verwendet, für Doxorubicin Konzentrationen von jeweils 0,5µM und 1µM.

3.2.2 Treosulfan, Melphalan und Busulfan wirken mit Gemcitabin nicht synergistisch bzgl. Apoptoseinduktion

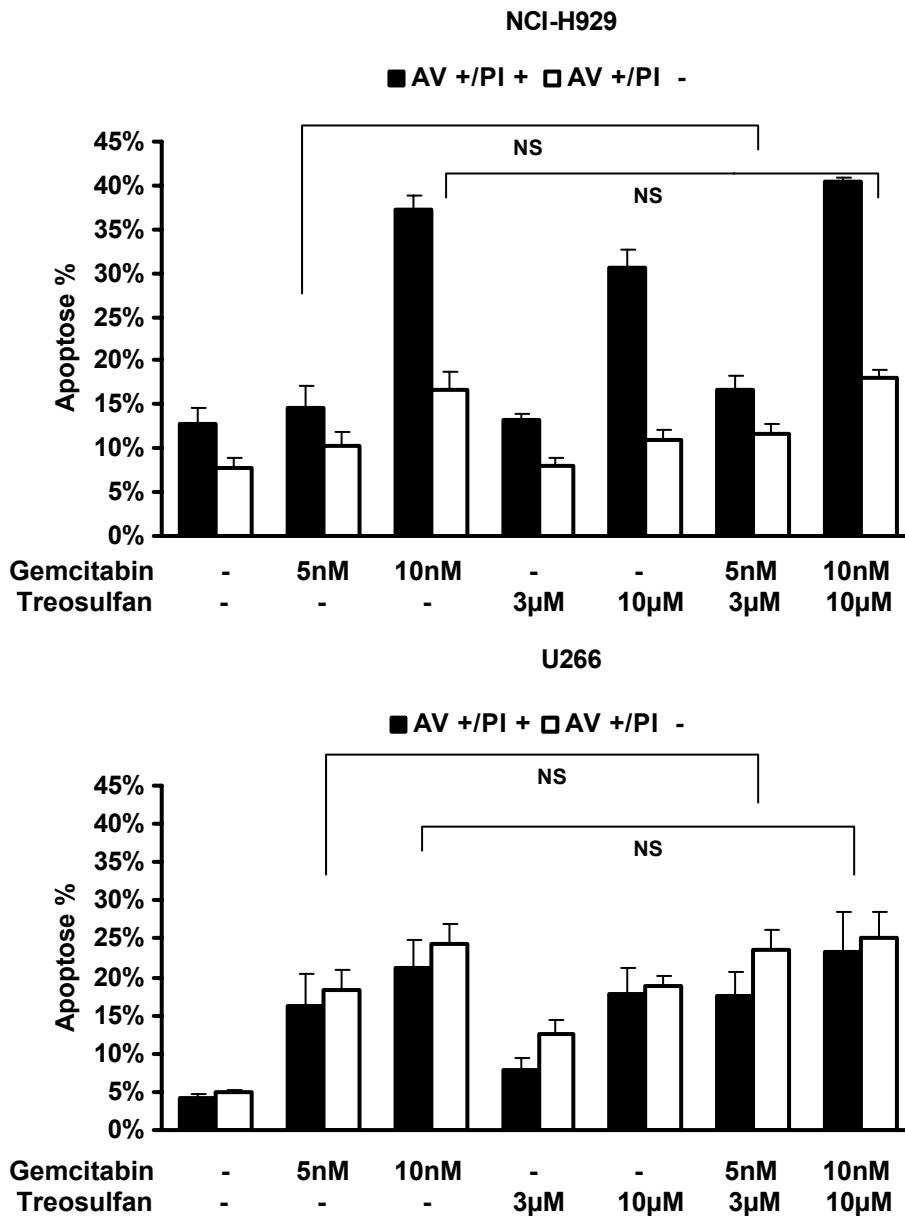


Abbildung 3.12: Treosulfan in Kombination mit Gemcitabin führt zu keiner Steigerung der Apoptoseinduktion

Die Myelomzelllinien NCI-H929 und U266 wurden mit steigenden Konzentrationen von Treosulfan und Gemcitabin 96 Stunden inkubiert. Zusätzlich wurden die Kombinationen beider Zytostatika untersucht. Nach vier Tagen folgte die Bestimmung der Annexin V-FITC/PI-positiven Zellen mittels Durchflusszytometrie.

Die Berechnung der Combination Indices (CI) zeigte, dass die Kombination von Treosulfan mit Gemcitabin mit einem CI-Wert von 1,626 bei den NCI-H929-Zellen und 1,455 bei den U266-Zellen weder zu einem additiven (CI 1,1 – 0,9) noch zu einem synergistischen (CI < 0,9) Effekt führt.

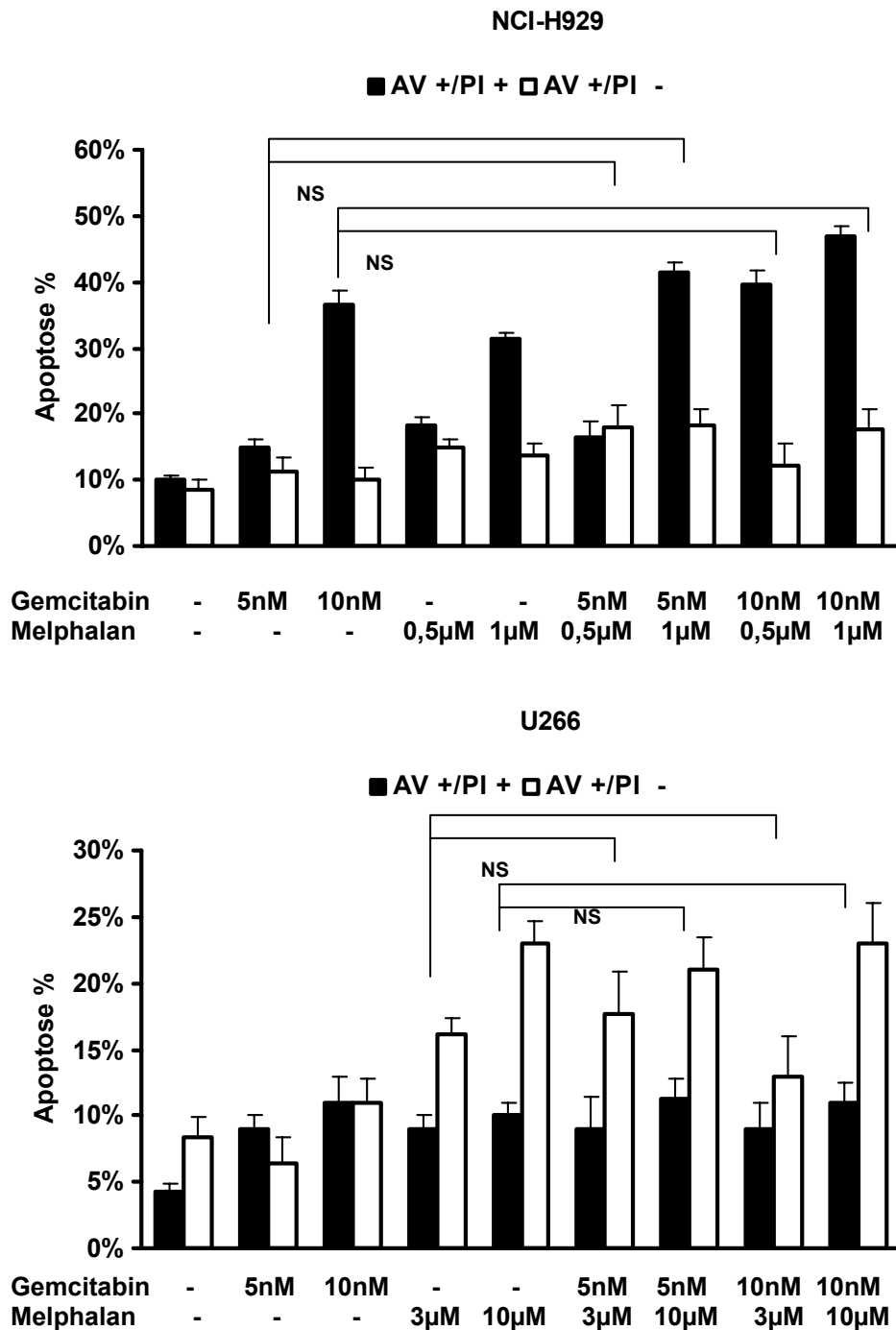


Abbildung 3.13: Melphalan hat keinen synergistischen Effekt in Kombination mit Gemcitabin

NCI-H929- und U266-Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen von Melphalan und Gemcitabin alleine und in Kombination behandelt. Nach 96 Stunden erfolgte die Bestimmung der nekrotischen Zellen mittels FACS-Analyse.

Auch die Kombination von Gemcitabin mit Melphalan führte nach 96 Stunden Inkubationszeit in beiden Zelllinien zu keiner signifikanten Erhöhung der früh-

und spätapoptotischen Zellen. Die Berechnung der Combination Indices (CI) zeigte mit einem CI-Wert von 2,0 bei den NCI-H929-Zellen und einem CI-Wert von 2,104 bei den U266-Zellen (additiver Effekt CI 1,1-0,9, synergistischer Effekt $CI < 0,9$) weder synergistische noch additive Effekte.

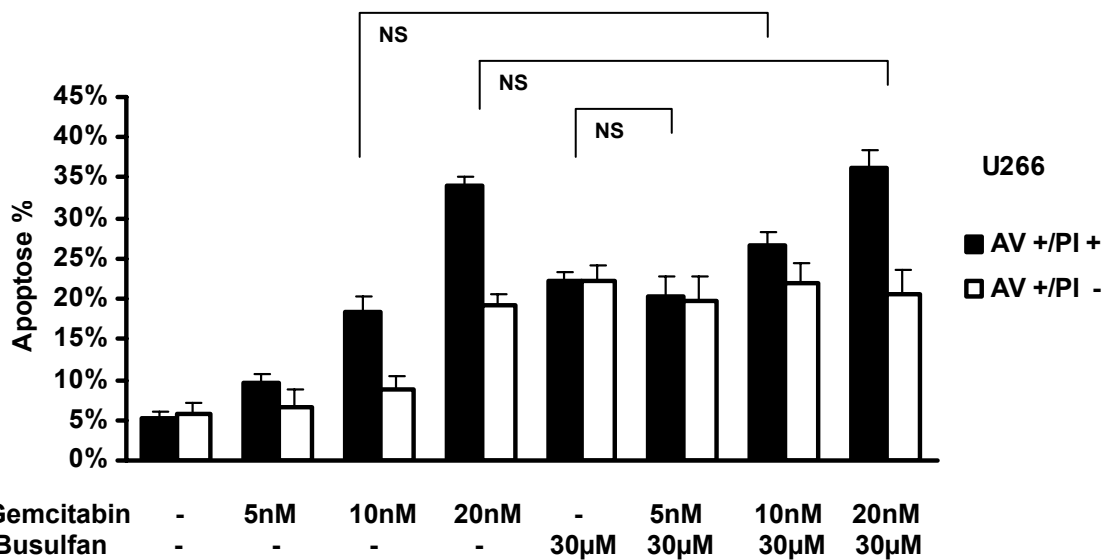
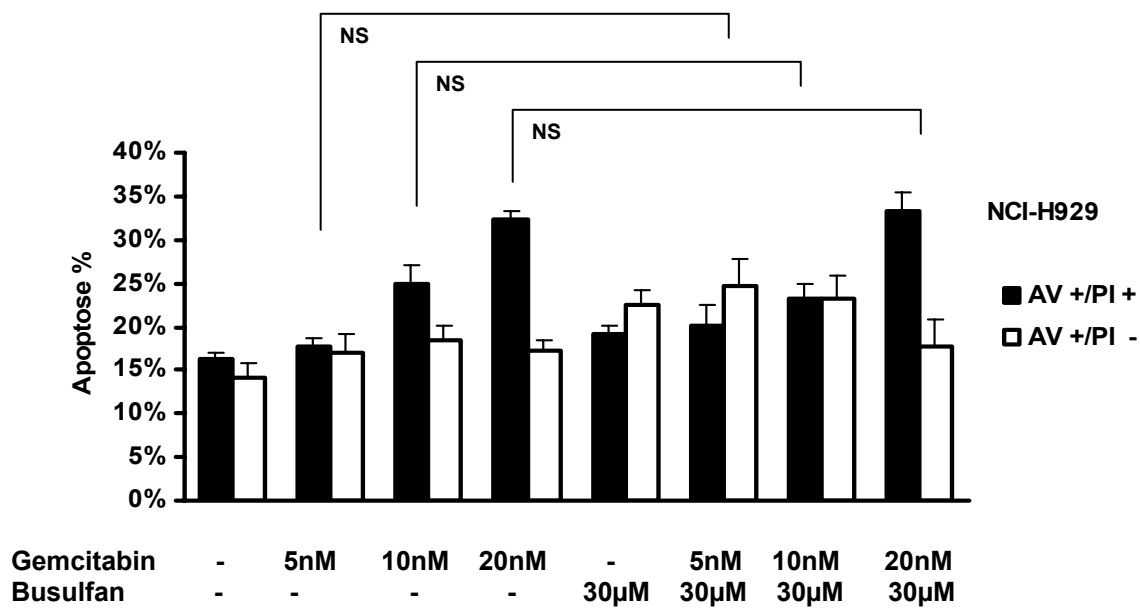


Abbildung 3.14: Busulfan und Gemcitabin haben keinen additiven oder synergistischen Effekt bei NCI-H929- und U266-Zellen

Beide Zelllinien wurden 96 Stunden mit ansteigenden Konzentrationen von Busulfan und Gemcitabin inkubiert. Ebenfalls wurden Kombinationen beider Chemotherapeutika untersucht. Nach Färbung der Zellen mit Annexin V-FITC und PI wurde der Anteil früh- und spätapoptotischer Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt

Wie in Abbildung 3.14 zu sehen, konnte nach 96 Stunden Inkubationszeit mit Gemcitabin und Busulfan bei den gewählten niedrigen Dosierungen ebenfalls keine Steigerung des Apoptose-Effektes erzielt werden.

3.2.3 Gemcitabin und Doxorubicin induzieren synergistisch Apoptose in Myelomzellen

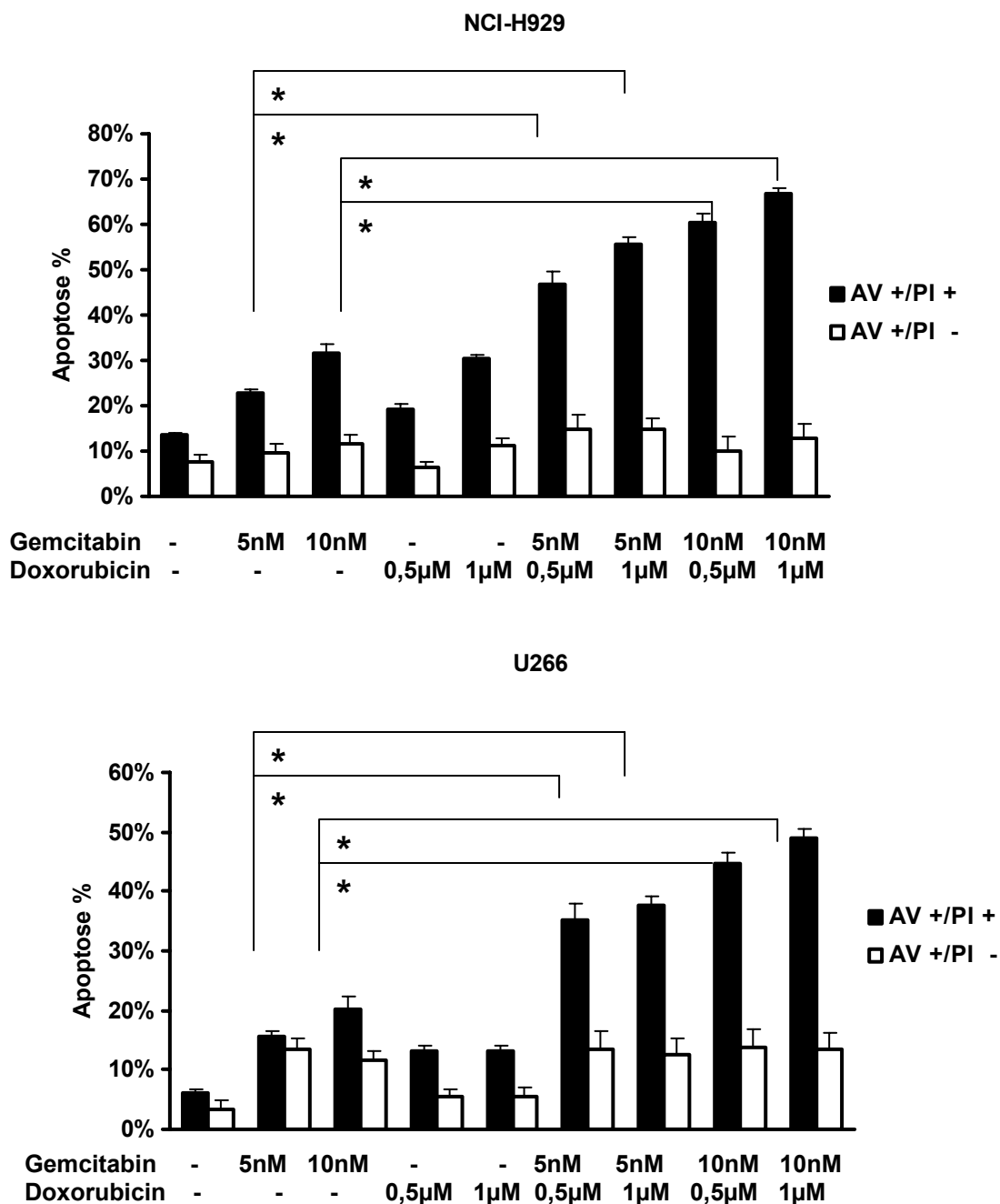


Abbildung 3.15: Gemcitabin und Doxorubicin induzieren synergistische Apoptose in Myelomzellen

NCI-H929 und U266-Zellen wurden 96 Stunden mit ansteigenden Konzentrationen von Doxorubicin und Gemcitabin alleine und in Kombination inkubiert. Es folgte die Messung der apoptotischen Zellen im Durchflusszytometer. * $P < 0,05$

NCI-H929			
Gemc (nM)	Doxo (μM)	FA	CI
5	0,5	0,47	0,407
10	1	0,67	0,275

U266			
Gemc (nM)	Doxo (μM)	FA	CI
5	0,5	0,35	0,071
10	1	0,49	0,032

Im Gegensatz zu den zuvor untersuchten Chemotherapeutikakombinationen, konnte bei dieser Testreihe mit der Kombination aus Doxorubicin und Gemcitabin ein deutlich signifikanter synergistischer Effekt nachgewiesen werden. CI-Werte von 0,1-0,3 sprechen für einen starken Synergismus, Werte von 0,3-0,7 für einen Synergismus, 0,7-0,85 für einen moderaten Synergismus und CI-Werte zwischen 0,85 und 0,9 für einen schwachen Synergismus.

3.3 Kombination von Gemcitabin mit Signalwegmodulatoren

Es sollten unterschiedliche Modulatoren der typischen, für Wachstum, Überleben und Zytostatikaresistenz verantwortlichen Myelomsignalwege, wie Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK-STAT), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) und Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) in ihrer Wirkung auf die Zelllinie NCI-H929 alleine und in Kombination mit Gemcitabin erfasst werden. Von besonderem Interesse waren hierbei ihr eigener zytotoxischer Effekt und eine mögliche Steigerung der Apoptoseinduktion durch Gemcitabin.

3.3.1 Die spezifische Inhibition von Enzymen der Proteinkinase-C-Familie führt zu einer signifikanten Wirkungspotenzierung von Gemcitabin

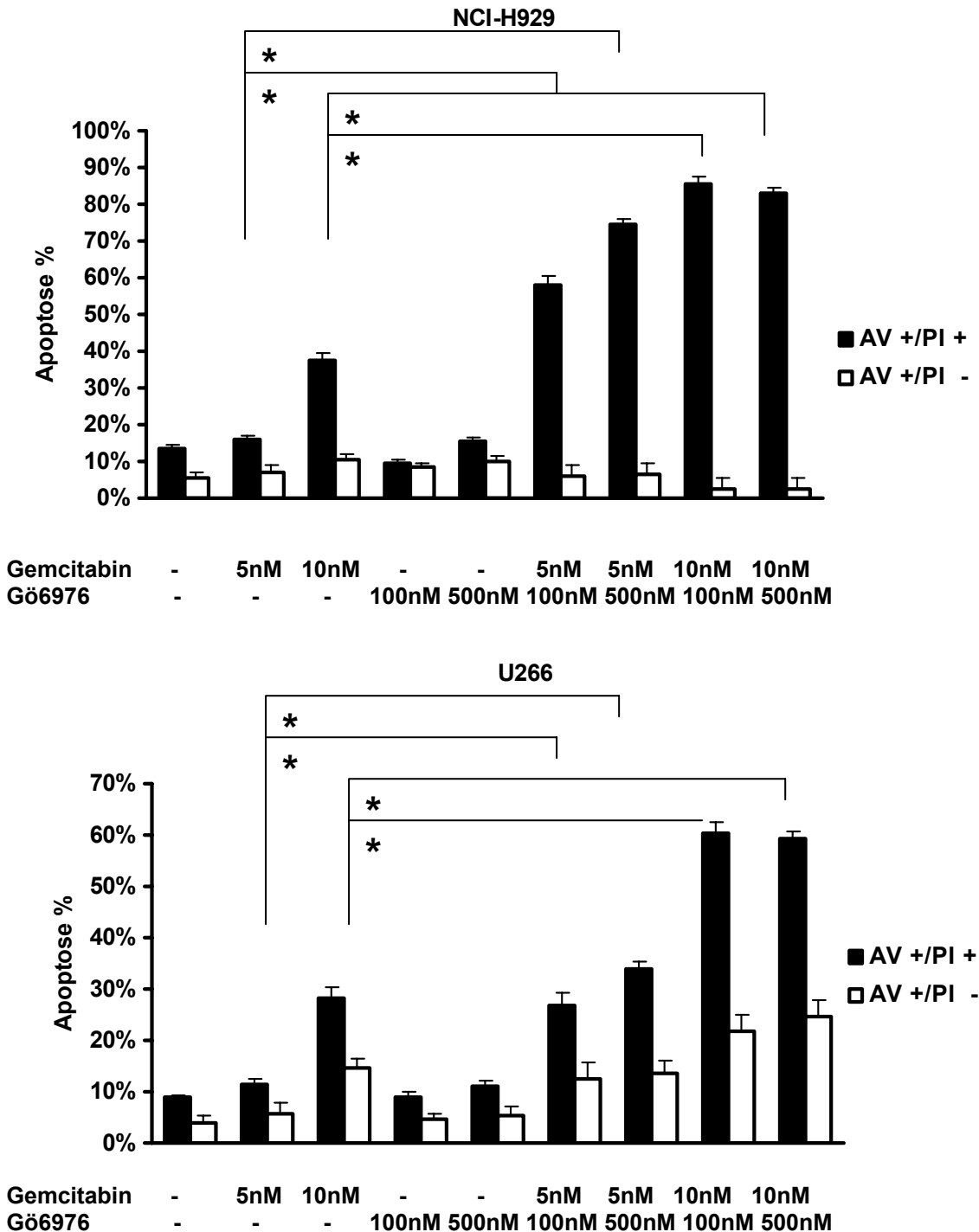


Abbildung 3.16: Selektive Inhibition der PKC α und PKC β^1 -Isoenzyme durch Gö6976 führt zu einer ausgeprägten Steigerung der Apoptoseinduktion durch Gemcitabin

Die Myelomzelllinien NCI-H929 und U266 wurden über 96 Stunden mit ansteigenden Konzentrationen des PKC α und PKC β^1 -Inhibitors Gö6976 inkubiert. Auch erfolgte eine Koinkubation mit 5 nM Gemcitabin. Darauf wurden die Annexin V-FITC/PI-apoptotischen Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. * P < 0,05

NCI-H929			
Gemc (nM)	Gö6976 (nM)	FA	CI
5	100	0,58	0,296
10	500	0,83	0,272

U266			
Gemc (nM)	Gö6976 (nM)	FA	CI
5	100	0,27	0,515
10	500	0,59	0,453

Gö6976 ist ein selektiver Inhibitor der PKC α und PKC β ¹-Isoenzyme. Diese gehören mit den β ²- und γ -Gruppen zum klassischen Formenkreis. Die in Abbildung 3.16 dargestellten Konzentrationen von 100nM und 500nM Gö6976 führten bei den behandelten NCI-H929- und U266 Zellen zu keinem wesentlichen zytotoxischem Effekt. Erstaunlicherweise erreichten diese Dosierungen in Kombination mit nur 5nM Gemcitabin einen ausgeprägten Anstieg der Apoptoseinduktion. Die NCI-H929-Zelllinie reagierte hierbei besonders sensibel mit Untergang fast aller lebenden Zellen bei einer Konzentration von 5nM Gemcitabin mit 100nM Gö6976. CI-Werte von 0,1-0,3 sprechen für einen starken Synergismus, Werte von 0,3-0,7 für einen Synergismus, 0,7-0,85 für einen moderaten Synergismus und CI-Werte zwischen 0,85 und 0,9 für einen schwachen Synergismus. Diese bemerkenswerten Ergebnisse sollen nun in den folgenden Versuchsreihen genauer untersucht werden

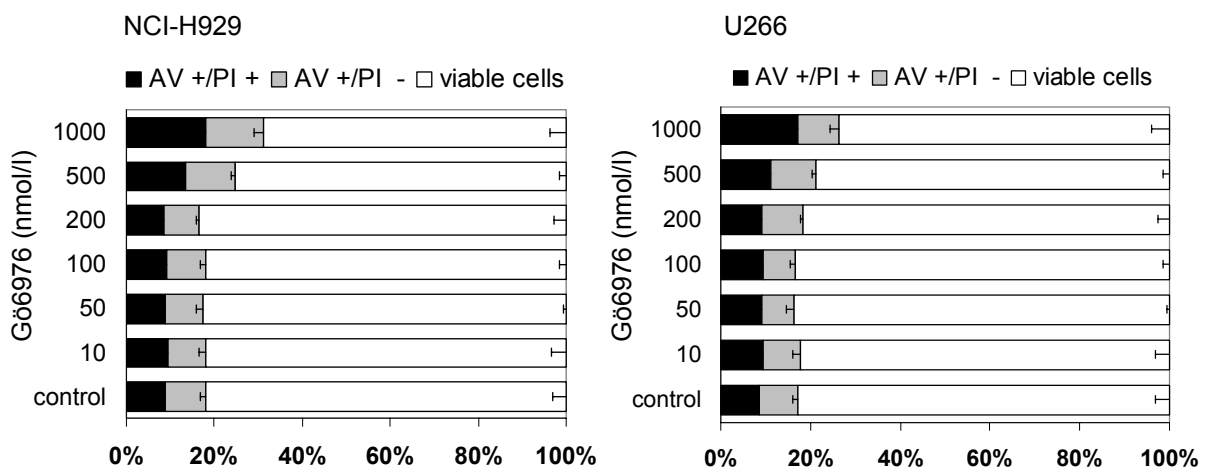


Abbildung 3.17: Gö6976 wirkt nicht toxisch in NCI-H929- und U266-Zelllinien

NCI-H929- und U266-Zellen wurden vier Tage mit ansteigenden Konzentrationen des Inhibitors Gö6976 inkubiert. Danach wurden mittels Durchflusszytometrie die Annexin V-FITC/PI-positiven Zellen gemessen.

Als nächstes sollte die Ausprägung der möglichen Eigentoxizität von Gö6976 auf die beiden besagten Zelllinien untersucht werden. Wie in Abbildung 3.17 gut zu

erkennen ist, hatte der PKC-Inhibitor Gö6976 in den gewählten Konzentrationen von 10nM bis 1000nM keinen wesentlichen eigentoxischen Effekt. Nur bei der höchsten Dosierung von 1µM des Modulators war ein milder zytotoxischer Effekt zu beobachten.

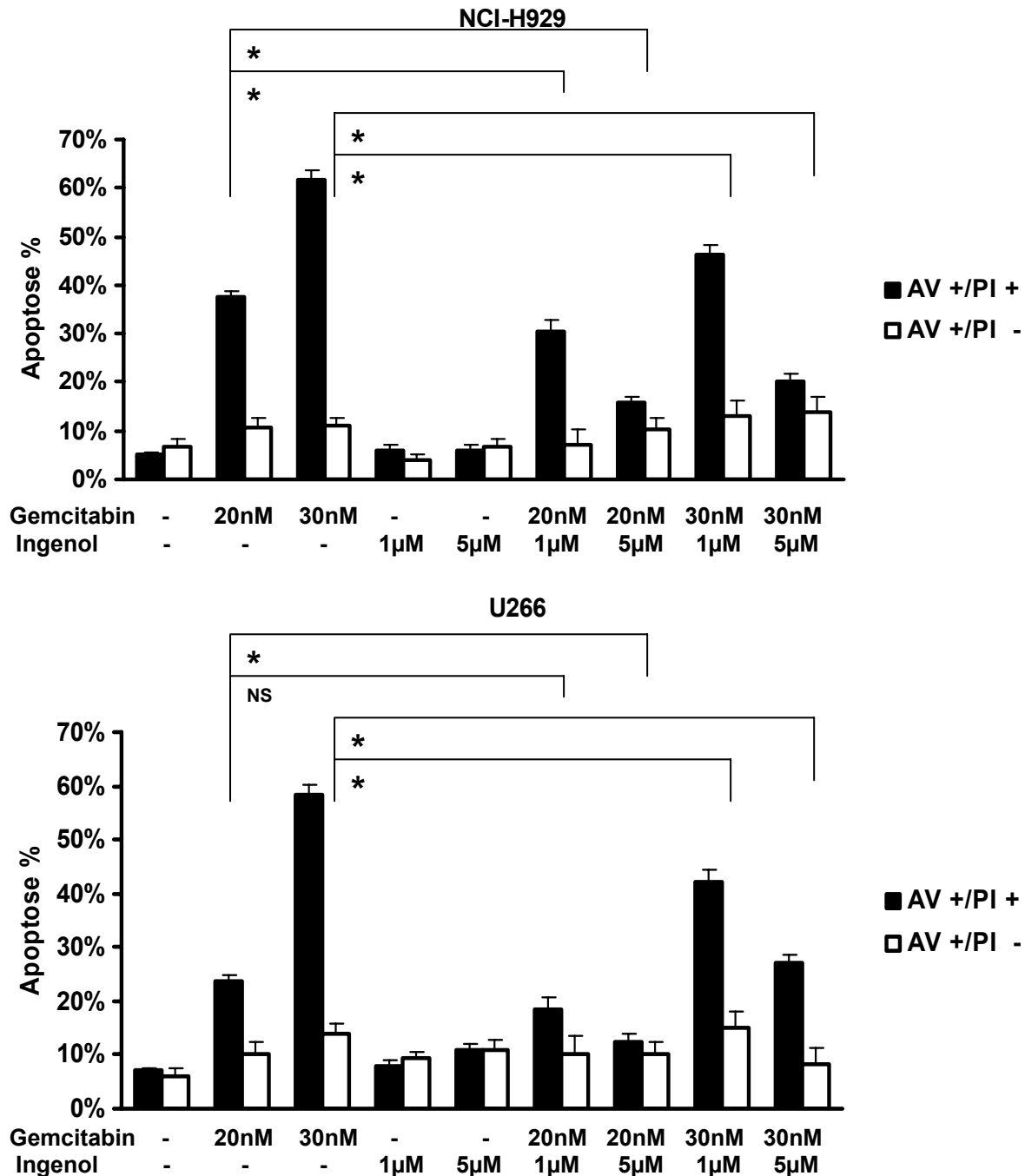


Abbildung 3.18: Der Tumorpromoter Ingenol führt zu einer Abnahme der Apoptoseinduktion durch Gemcitabin

NCI-H929- und U266-Zellen wurden 96 Stunden mit 20nM und 30nM Gemcitabin behandelt. Zusätzlich wurden sie mit 1µM und 5µM Ingenol das die Proteinkinase C- α - und die Proteinkinase C- δ -Aktivität aktiviert, alleine und in Kombination mit Gemcitabin inkubiert. Es

folgte die Bestimmung der apoptotischen Zellen mittels Annexin V-FITC/PI-Färbung im Durchflusszytometer. * P < 0,05

Ingenol 3,20-Dibenzoat ist ein Tumorpromotor, der die Proteinkinasen C α und δ aktiviert. Folgerichtig erkennt man in Abbildung 4.1 eine Abnahme der apoptotischen Potenz von Gemcitabin, die in Kombination mit Ingenol auf eine PKC-Aktivitätszunahme zurückzuführen ist. So wurde die Wirkung von 30nM Gemcitabin bei beiden Zelllinien durch eine Konzentration von 5 μ M Ingenol nahezu halbiert.

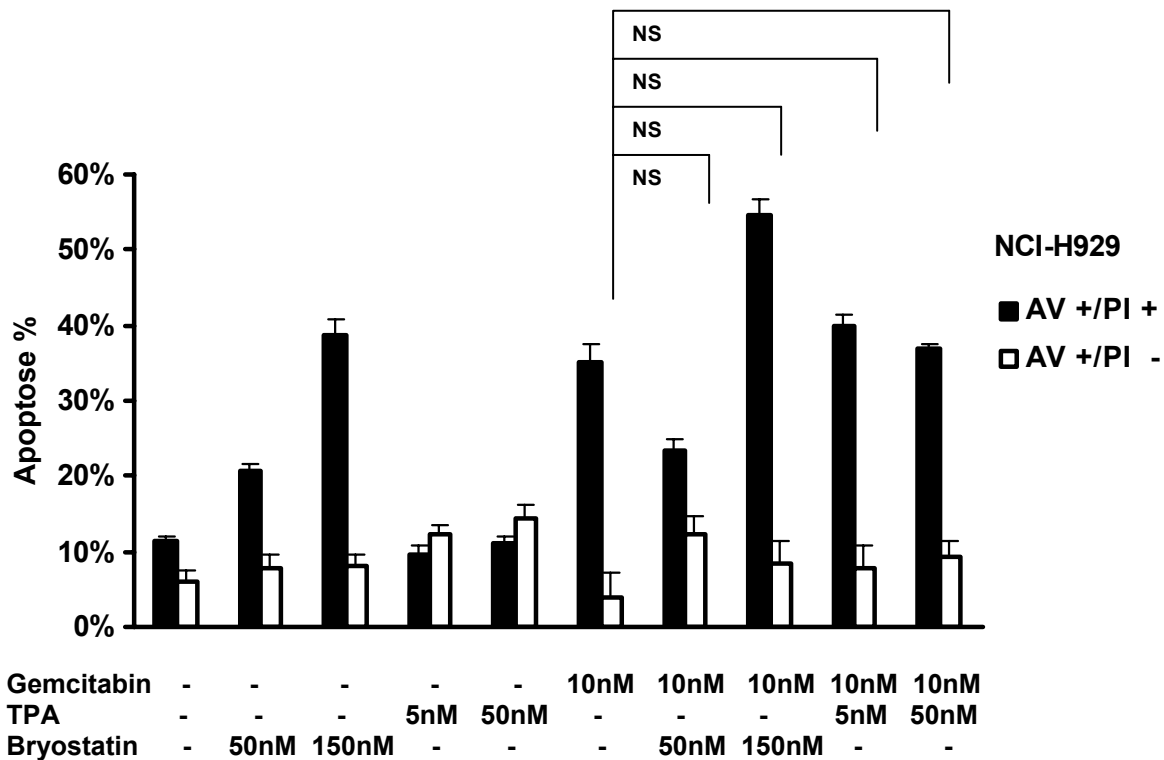


Abbildung 3.19: Die PKC-Aktivatoren TPA und Bryostatin beeinflussen nicht die Wirkung von Gemcitabine

NCI-H929-Zellen wurden mit 10nM Gemcitabin alleine und in Kombination mit ansteigenden Konzentrationen von TPA und Bryostatin über vier Tage inkubiert. Danach wurden die früh- und spätapoptotischen Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Bryostatin ist im nano-molaren Bereich ein potenter Aktivator vor allem von PKC- δ , θ und η (Kazanietz M et al., 1994). In vitro Testungen ergaben synergistische zytotoxische Effekte in Kombination mit anderen

Chemotherapeutika (Mohanty S et al., 2005, Wang S et al., 2003). In Kombination mit Gemcitabin konnte, wie in Abbildung 3.19 ersichtlich, nur eine geringe additive Wirkung bei einer Konzentration von 150nM erzielt werden. Bryostatatin hatte dabei eine hohe Eigentoxizität, die sogar die Wirkung von 10nM Gemcitabin mit fast 50% apoptotischer Zellen überstieg. Auch TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat) ist ein bekannter Aktivator der Proteinkinase C α und δ . Sein Effekt beruht auf der strukturellen Ähnlichkeit mit Diacylglycerol. In den in Abbildung 3.19 gewählten Dosierungen hat TPA eine eher geringe zellschädigende Wirkung. In Kombination mit 10nM Gemcitabin ist auch hier keine signifikante Steigerung des apoptotischen Effektes nachzuweisen.

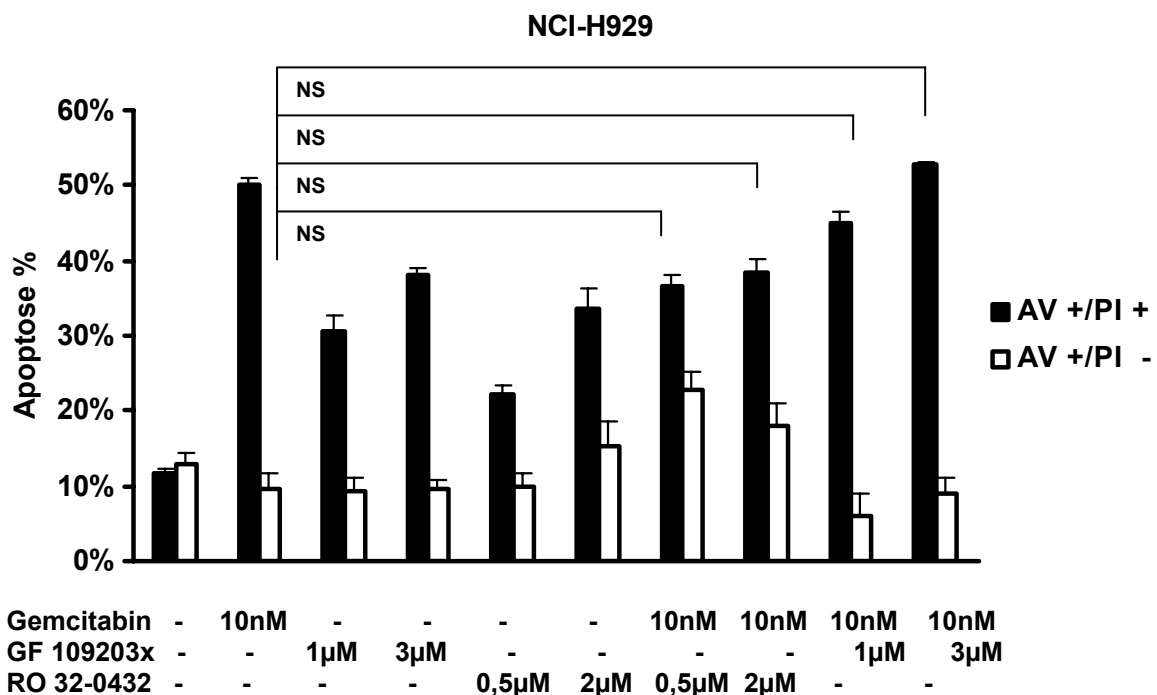


Abbildung 3.20: Die unspezifischen PKC-Inhibitoren RO 32-0432, GF 109203x potenzieren nicht die proapoptotische Wirkung von Gemcitabin

Die Myelomzelllinie NCI-H929 wurde 96 Stunden mit 10nM Gemcitabin behandelt. Zusätzlich erfolgte eine Koinkubation mit ansteigenden Konzentrationen von RO 32-0432 und GF 109203x. Es folgte die Bestimmung der apoptotischen Zellen durch Annexin V-FITC/PI-Färbung.

Des Weiteren sollte der Proteinkinase C-Signalweg durch weitere Inhibitoren gehemmt werden. Dafür wurden die beiden unspezifischen PKC-Inhibitoren RO32-0432 und GF109203x in Kombination mit Gemcitabin untersucht. In

Abbildung 3.20 konnte so gezeigt werden, dass beide Inhibitoren koinkubiert zu keiner Zunahme der zytotoxischen Potenz von Gemcitabin führen.

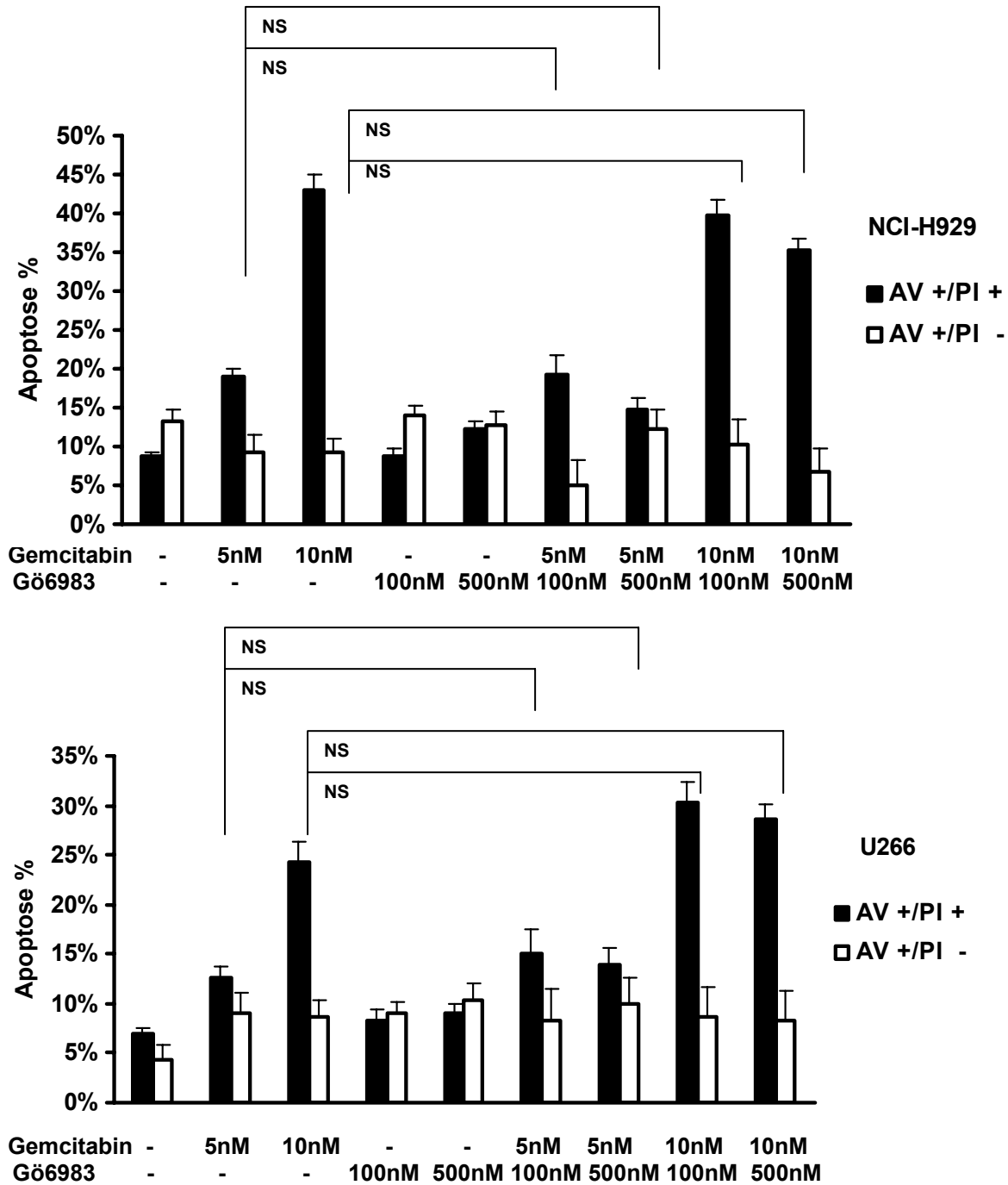
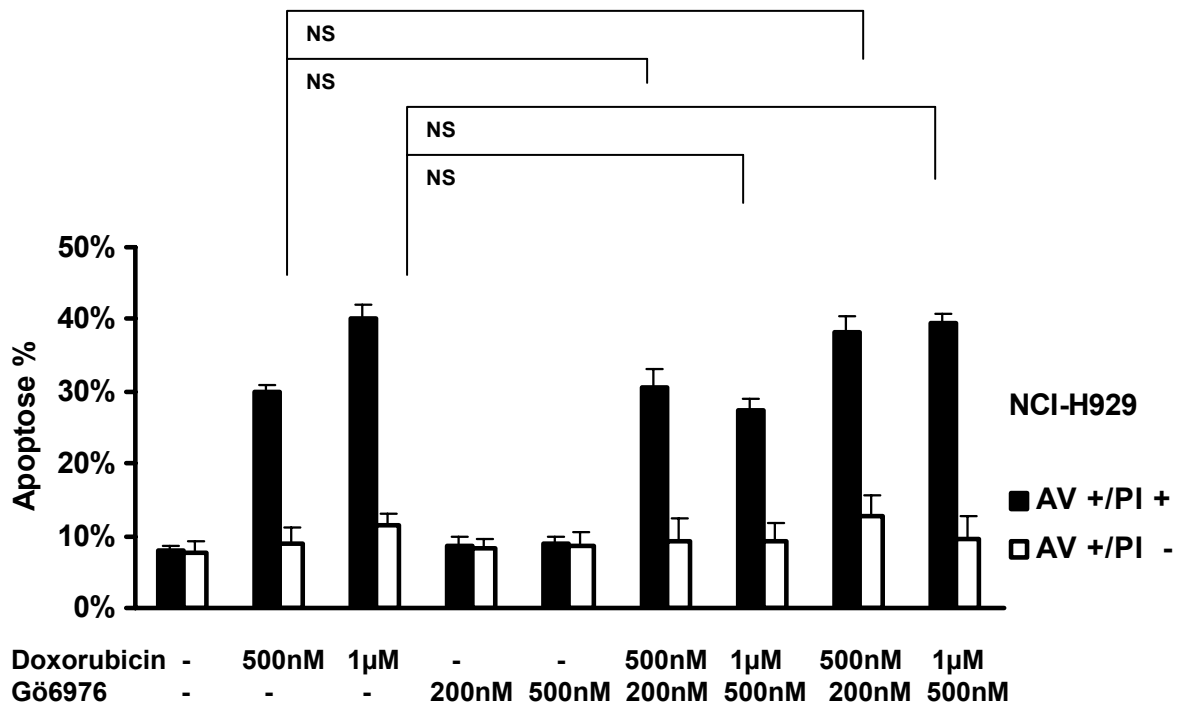


Abbildung 3.21: Der nicht-selektive PKC-Inhibitor Gö6983 führt zu keiner Steigerung der Apoptoseinduktion durch Gemcitabin

NCI-H929- und U266-Zellen wurden 96 Stunden mit Konzentrationen von 100nM und 500nM Gö6983 alleine und in Kombination mit 5nM und 10nM Gemcitabin behandelt. Mittels Annexinfärbung wurden die apototischen Zellen im Durchflußzytometer quantifiziert.

Auch der in Abbildung 3.21 dargestellte Versuch zeigt zwar, dass der nicht selektive Proteinkinase C-Inhibitor Gö6983 keine wesentliche Eigentoxizität besitzt, in Kombination mit Gemcitabin kam es aber auch bei beiden Zelllinien zu keiner Verstärkung des apoptotischen Effektes. Die Berechnung der Combination Indices (CI) mittels Calcosyn Software zeigte mit einem CI-Wert von 1,223 bei den NCI-H929 und einem Wert von 1,115 bei den U266-Zellen (additiver Effekt CI 1,1-0,9, synergistischer Effekt $CI < 0,9$) weder synergistische noch additive Effekte.

3.3.2 Der PKC α/β^1 -Inhibitor Gö6976 beeinflusst die Apoptoseinduktion von Doxorubicin, Treosulfan, Busulfan, und Melphalan nicht.



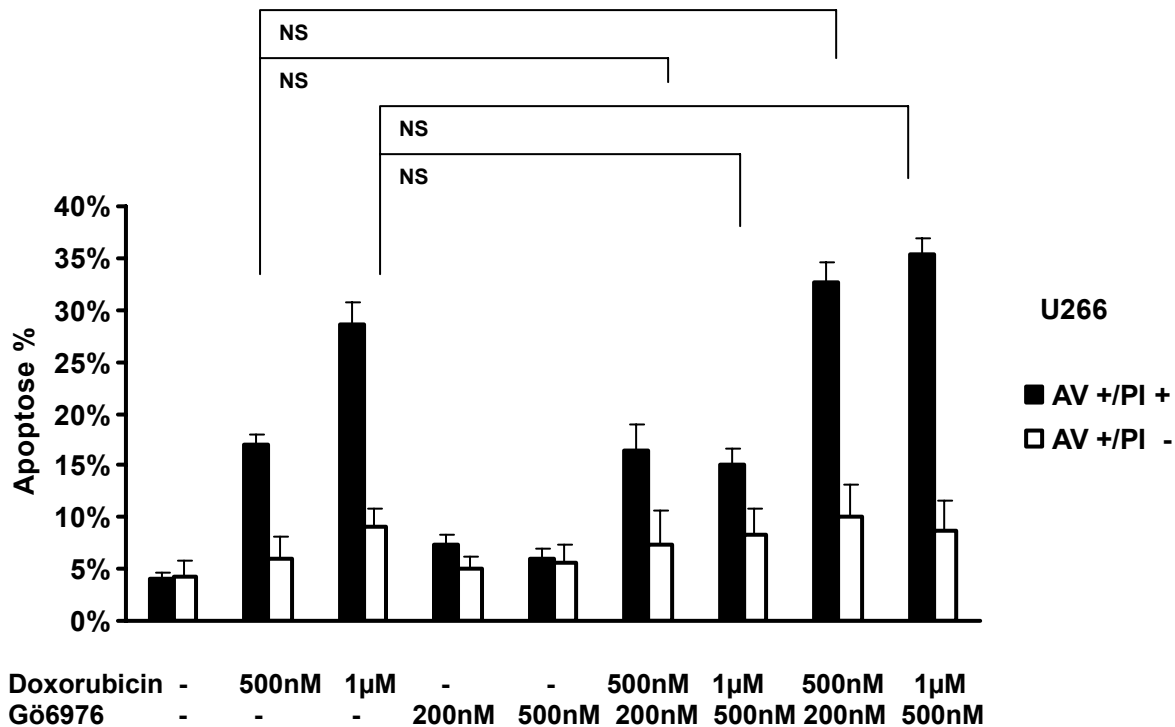


Abbildung 3.22: Selektive Inhibition von PKC α und PKC β führt zu keiner Erhöhung des zytotoxischen Effektes von Doxorubicin

NCI-H929- und U266-Zellen wurden 96 Stunden mit ansteigenden Konzentrationen von Doxorubicin und Konzentrationen von 200nM und 500nM Gö6976 behandelt. Darauf folgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Annexin V-FITC/-PI-positiven Zellen.

Nun sollten die bei hämatologischen Neoplasien eher konventionellen Zytostatika in ihrer Wirkung mit Gö6976 untersucht werden. Bei der in Abbildung 3.22 dargestellten Versuchsreihe wurde zunächst Doxorubicin zusammen mit Gö6976 behandelt. Zu erkennen ist der schon zuvor beschriebene apoptotische Effekt bei geringen Konzentrationen bis zu 1µM. In Kombination mit eher hohen Gö6976-Dosierungen bis zu 500nM kam es bei dieser Testreihe, verglichen mit der Gemcitabin-Testung, zu keinerlei additiven Effekten. Die Berechnung der Combination Indices (CI) zeigte, mit einem CI-Wert von 1.168 bei den NCI-H929-Zellen und einem CI-Wert von 1,46 bei den U266-Zellen (additiver Effekt CI 1.1-0,9, synergistischer Effekt CI<0,9) weder synergistische noch additive Effekte.

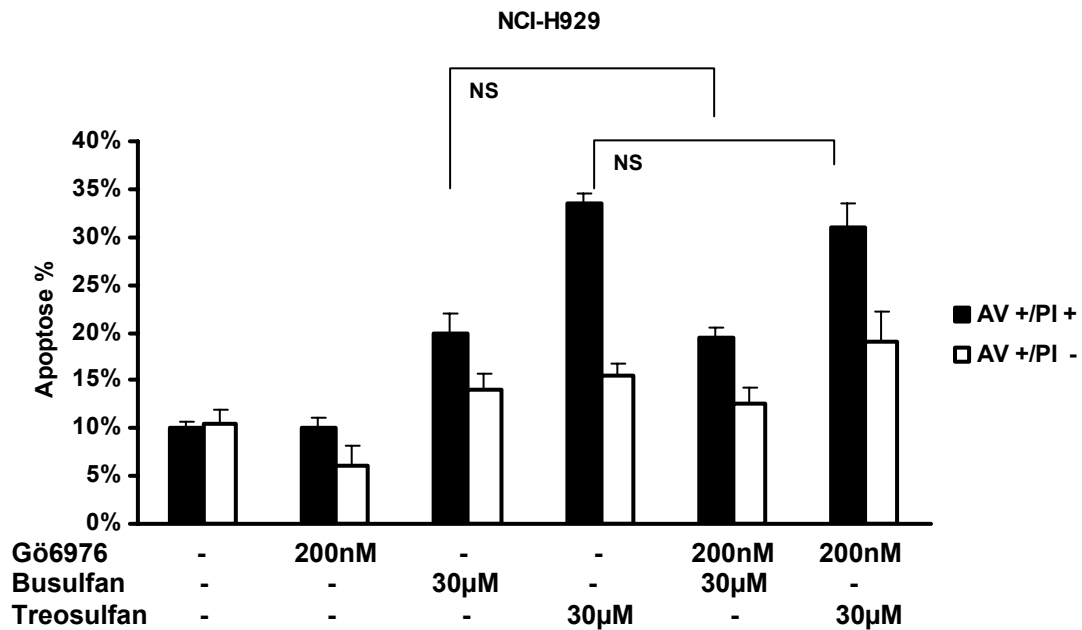


Abbildung 3.23: PKC-Inhibition führt weder bei Treosulfan, noch bei Busulfan zu einer Steigerung der Apoptoseinduktion

NCI-H929 Zellen wurden über vier Tage mit 30µM Busulfan und Treosulfan inkubiert. Zusätzlich erfolgte eine Koinkubation mit 200nM Gö6976 über 96 Stunden. Es erfolgte jeweils die Bestimmung der früh- und spätapoptotischen Zellen mittels Durchflusszytometrie.

Auch bei der Behandlung der NCI-H929-Zellen mit den beiden Chemotherapeutika Treosulfan und Busulfan, jeweils zusammen mit 200nM Gö6976, konnte keine Verbesserung der zytotoxischen Potenz erreicht werden.

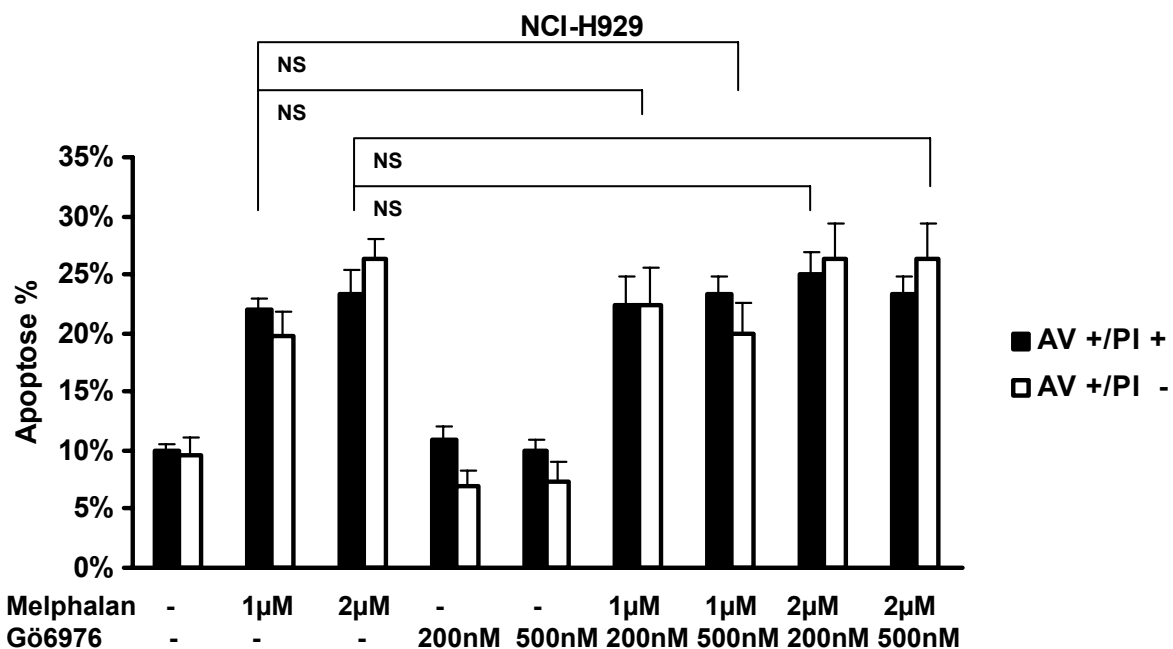


Abbildung 3.24: Selektive Inhibition von PKC α und PKC β^1 führt zu keiner Erhöhung des zytotoxischen Effektes von Melphalan

NCI-H929-Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen von Melphalan und Gö6976 über 96 Stunden koinkubiert. Es erfolgte jeweils die Bestimmung der früh- und spätapoptotischen Zellen mittels Durchflusszytometrie.

Wie in der obigen Abbildung zu erkennen, kam es auch bei der Kombination von Gö6976 mit dem Zytostatikum Melphalan zu keinem synergistischen Effekt. Die Berechnung der Combination Indices (CI) zeigte, mit einem CI-Wert von 1,212 (additiver Effekt CI 1,1-0,9, synergistischer Effekt CI < 0,9) weder synergistische noch additive Effekte.

3.3.3 Modulation anderer typischer Signalwege des Myeloms führt zu keiner gesteigerten Apoptoseinduktion durch Gemcitabin

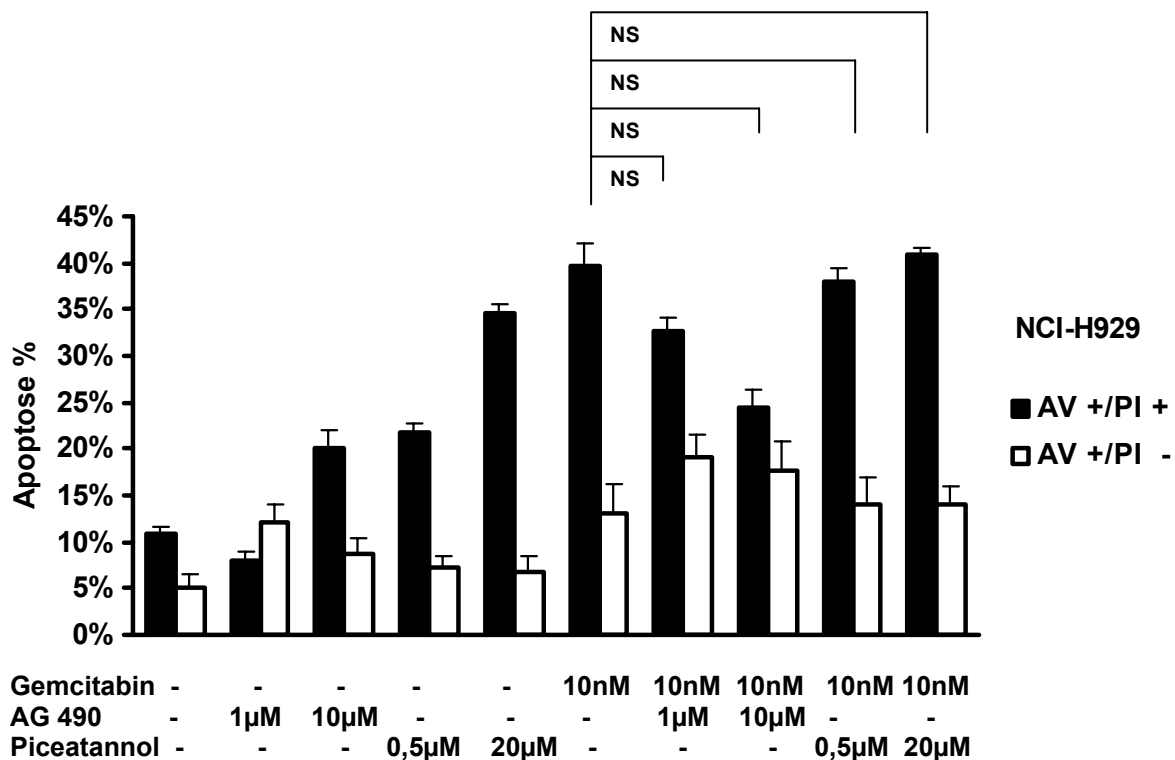


Abbildung 3.25: Inhibition des Janus-Kinase-Signalweges via AG 490 und Piceatannol führt zu keiner Steigerung der Apoptoseinduktion durch Gemcitabin

NCI-H929-Zellen wurden 96 Stunden mit den Janus-Kinase-Inhibitoren AG490 und Piceatannol jeweils alleine und in Kombination mit Gemcitabin in ansteigenden Konzentrationen inkubiert. Darauf folgte die Messung der apoptotischen Zellen mittels Annexin V-FITC/PI-Messung im Durchflusszytometer.

Sowohl der spezifische JAK2-Inhibitor AG490, als auch der JAK1/STAT3-Inhibitor Piceatannol wiesen in den gewählten Dosierungen eine Eigentoxizität bei den verwendeten NCI-H929-Zellen auf. In Kombination mit Gemcitabin kam es hingegen zu keiner Steigerung der zytotoxischen Potenz. Bei steigender Konzentration von Piceatannol war sogar eine Verminderung der nekrotischen Zellen bei der Messung im Durchflusszytometer zu bemerken.

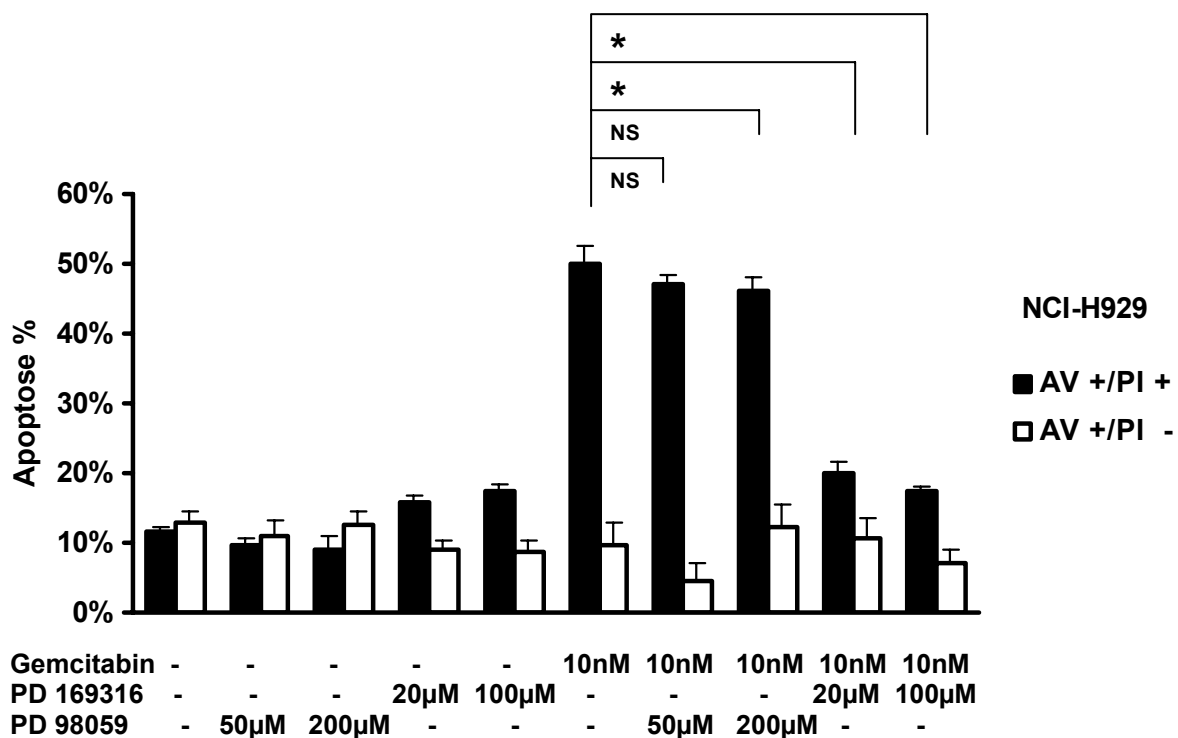


Abbildung 3.26: Inhibition der p38-MAP-Kinase führt zu einer Verminderung der Apoptoseinduktion durch Gemcitabin. Blockierung der p44/p42-MAP-Kinase führt zu keiner Steigerung der Apoptoseinduktion durch Gemcitabin

NCI-H929-Zellen wurden vier Tage mit 20µM und 100µM PD 169316, des weitern mit 50µM und 200µM PD 98059 jeweils alleine und in Kombination mit 10nM Gemcitabin inkubiert. Daraufhin erfolgte die Bestimmung früh- und spätapoptotischer Zellen im Durchflusszytometer. * P < 0,05

Bei der in Abbildung 3.26 aufgeführten Testreihe wurden zwei Inhibitoren des MAP-Kinase-Signalwegs alleine und in Kombination mit Gemcitabin untersucht. Auch der mehrstufige MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg ist bedeutend an der Regulierung von Zelldifferenzierung, Wachstum und Apoptose beteiligt. PD169316 ist ein spezifischer Inhibitor der p38-MAP-Kinase, PD98059 dagegen ein spezifischer Inhibitor der höher geschalteten p44/p42-MAP-Kinase.

Auffallend ist, dass es schon bei einer Konzentration von 20µM des kaum Eigentoxizität besitzenden P169316 zu einer merklichen Verminderung der zytotoxischen Potenz von Gemcitabin kam. Die höher geschaltete Blockierung der p44/p42-MAP-Kinase hat dagegen offensichtlich keine Auswirkung auf die Wirksamkeit von Gemcitabin.

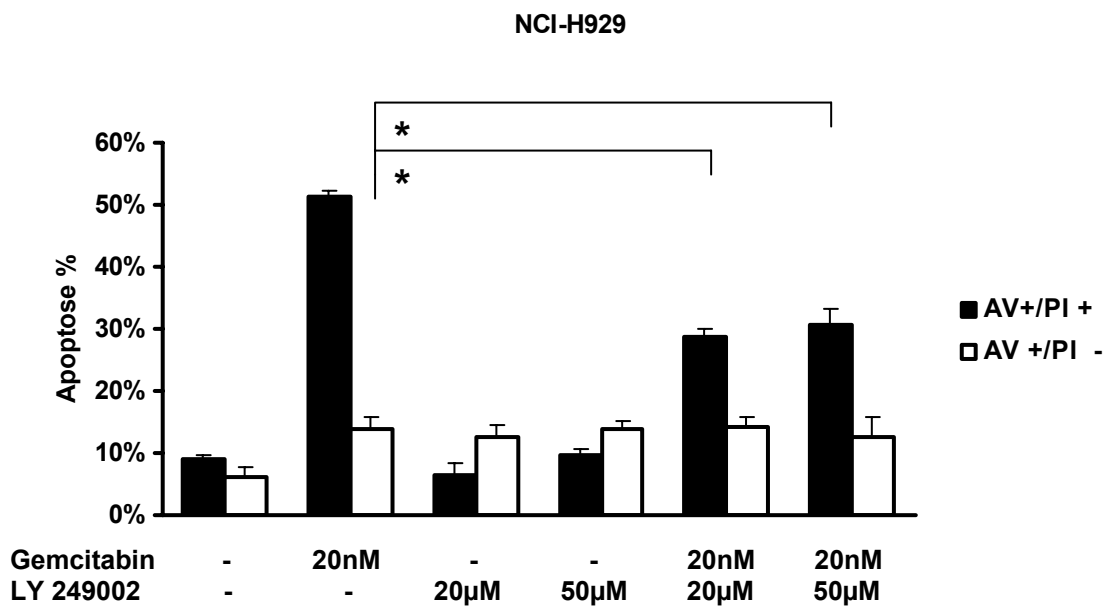


Abbildung 3.27: Modulation des PI3/AKT-Signalweg potenziert nicht die proapoptotische Wirkung von Gemcitabin

Die Myelomzelllinie NCI-H929 wurde über 96 Stunden mit einer Konzentration von 20nM Gemcitabin und ansteigenden Konzentrationen des PI3-Kinase-Inhibitors LY 249002 behandelt. Im Durchflusszytometer wurden die Annexin-/PI-positiven Zellen gemessen.

* P < 0,05

Eine weitere wichtige Signalkaskade, die den Zellzyklus in erheblichem Maße reguliert, ist der PI3/AKT-Signalweg. Diesem Signaltransduktionsweg werden unter anderem auch wesentliche antiapoptotische Effekte zugeschrieben. So ist dementsprechend auch in Abbildung 3.27 durch Blockierung dieses Pfades eine deutliche Verminderung der Wirkung von Gemcitabin auf die behandelten NCI-H929-Zellen zu erkennen.

4. DISKUSSION

4.1 Apoptoseinduktion durch Gemcitabin

Bisher wird Gemcitabin hauptsächlich bei gastro-enterologischen (Michael M, 1997, Rivera F, 2009), gynäkologischen (Seidmann et al., 2001, Laessig D et al., 2007), pulmonalen (Leow Ch et al., 2005; Manegold C et al., 2004) und urologischen (El Karak et al., 2007; Moore MJ et al., 1997) malignen Erkrankungen eingesetzt. Im hämatologischen Formenkreis wird es bereits erfolgreich bei Hodgkin Lymphomen klinisch angewendet (Validire P et al., 2008).

Nach dem heutigen Kenntnisstand gestaltet sich die kurative Therapie des Multiplen Myeloms mit allen bisher bekannten Therapieoptionen äußerst schwierig. So ist das klinisch gut verträgliche Gemcitabin, beim Multiplen Myelom bisher präklinisch und klinisch kaum evaluiert, von besonderem Interesse. Dementsprechend sollte zunächst die Apoptoseinduktion von Gemcitabin an beispielhaft drei verschiedenen humanen Myelomzelllinien NCI-H929, OPM-2 und U266 eingehend getestet werden. Eine erste Untersuchung der Wirkung von Gemcitabin auf verschiedene Myelomzelllinien wurde bereits 1996 durch Gruber et al. vorgenommen. Dabei wurde die Apoptoseinduktion durch Gemcitabin an den Zelllinien U266, OPM-2, IM9, RPMI8226, HL60 und HS Sultan untersucht (Gruber J et al., 1996). Die Zellen wurden über 24 Stunden mit hohen Gemcitabinkonzentrationen von 10 μ M und 100 μ M inkubiert und danach die SubG1-Fraktion mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Die Prozentzahl der gemessenen avitalen Zellen war bei beiden Konzentrationen in etwa gleich (OPM-2 ca.50%, U266 ca.70%). Vergleichbare Ergebnisse wurden in dieser Arbeit bei deutlich geringeren Konzentrationen (500nM) bei einer Inkubationszeit von 96 Stunden erzielt. In neueren Studien wurden deutlich niedrigere Gemcitabinkonzentrationen verwendet. MM1.S-Zellen wurden über 24 Stunden mit 100nM Gemcitabine inkubiert (Nabhan C et al., 2002). Auch Krett et al. untersuchte die Apoptoseinduktion von Gemcitabin an den Myelom-Zelllinien MM1.S, MM1.R, U266 und RPMI-8226 nach einer

Inkubationszeit von 72 Stunden mit Konzentrationen zwischen 20nM und 100nM (Krett N et al., 2004). Es konnte jedoch hier gezeigt werden, dass nach einer Verlängerung der Inkubationszeit auf 96 Stunden die Apoptoseinduktion durch Gemcitabin wesentlich erhöht werden kann. Besonders sensibel reagieren hierbei die eher selten untersuchten NCI-H929-Zellen mit ca. 80% apoptotischen Zellen ab einer Konzentration von 100nM Gemcitabin, was durch unsere eigene Arbeitsgruppe bestätigt werden konnte (Schmidmaier R et al., 2006). Um ähnliche Apoptoseraten bei in vitro-Untersuchungen in gynäkologischen (Zupi G et al., 2005), gastroenterologischen (Arlt A et al., 2003) und pulmologischen (Chun-Ming T et al., 1996) Bereichen zu erzielen, sind oft weitaus höhere Gemcitabinkonzentrationen notwendig. Jia et al. untersuchten mittels MTT-Test die In-vitro-Toxizität an verschiedenen humanen Osteosarkom-Zelllinien. Dabei reduzierte Gemcitabin das Wachstum und induzierte Apoptose bei den Zelllinien MG-63, SAOS-2 und SAOS-LM-7 (Jia SF et al., 2002). Nach 48 Stunden lagen die IC-50-Werte zwischen 2µM und 9µM. Eine längere Inkubationszeit wurde nicht untersucht. Mit deutlich niedrigeren Konzentrationen im nanomolaren Bereich konnte bei den in dieser Dissertation untersuchten humanen Myelomzelllinien nach 48 Stunden eine vergleichbare Apoptoseinduktion gemessen werden. In einer Arbeit von Hernandez et al. wurde die Gemcitabinaktivität an sechs Ovarialkarzinom-Zelllinien (SiHa, CaLo, InB1, HeLa, C33A, Kaski) untersucht. Nach 48 Stunden Inkubationszeit wurde die Apoptoseinduktion durch Gemcitabin bestimmt. Hierbei waren Gemcitabinkonzentrationen zwischen 0,11µM und 203µM zu einer 50%-igen Wachstumshemmung notwendig. Auch hier wurden keine längeren Inkubationszeiten untersucht. In dieser Arbeit reagierten die untersuchten Myelomzelllinien deutlich sensibler. Nach 48 Stunden fanden sich bei der Zelllinie NCI-H929 ca. 50% apoptotische Zellen bei einer Konzentration von nur 50nM. Bei Pace et al. wurden verschiedene nicht kleinzellige Lungenkarzinom-Zelllinien auf ihre Sensibilität gegenüber Gemcitabin untersucht. Die Zelllinien NCI-CorL23 und NCI-Colo699 wurden mit und ohne 0,5µM, 0,05µM und 0,005µM Gemcitabin über 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Nach 24 und 48 Stunden wurde keine signifikante Wachstumshemmung gemessen, auch wurde durch die geringen

Dosierungen von 5nM und 50nM keine Apoptose induziert. Erst nach 72 Stunden zeigte sich eine Apoptoseinduktion von ca. 25% bei den NCI-Colo699-Zellen und ca. 40% bei den NCI-CorL23-Zellen (Pace E et al., 2000). Auch hier zeigten sich im Vergleich dazu, die in dieser Arbeit untersuchten Myelomzelllinien NCI-H929, U299 und OPM-2 deutlich sensibler. Mit wesentlich niedrigeren Konzentrationen im nanomolaren Bereich konnten, bei den in dieser Dissertation untersuchten humanen Myelomzelllinien, schon nach 48 Stunden eine deutlich höhere Apoptoseinduktion bestimmt werden, was auf eine mögliche gute Ansprechbarkeit des Multiplen Myeloms auf dieses Agens hinweist und durch mehrere klinische Versuche bestätigt werden konnte (Leleu X et al., 2004; Weick JK et al., 2002; Offidani MA et al., 2002).

In dieser Arbeit wurde erstmals die zeit- und dosisabhängige Wirkung von Gemcitabin an den drei Myelomzelllinien NCI-H929, U266 und OPM-2 systematisch evaluiert. Insgesamt wies Gemcitabin eine ausgeprägte wachstumshemmende Wirkung bei allen 3 Zelllinien auf. Durch eine verlängerte Inkubation der Zellen von 96 Stunden konnte die Apoptoseinduktion durch Gemcitabin erheblich gesteigert werden. Auch konnte die dafür benötigte Konzentration von Gemcitabin deutlich reduziert werden. Gemcitabin sollte daher in weiteren präklinischen und klinischen Versuchen untersucht werden.

4.2 Gemcitabin in Kombination mit anderen Chemotherapeutika

Vierzig Jahre nach Einführung des Alexanian-Schemas wurden in der Therapie des Multiplen Myeloms eine Vielzahl von Polychemotherapieregimen untersucht und angewendet. Die beschriebenen VAD- und COP-Behandlungsprotokolle führen im Wesentlichen zu keiner signifikanten Verbesserung des Überlebens. Erfolge wurden durch das Alkylanz Bendamustin zusammen in der Kombination mit Prednison (BP-Protokoll) erzielt (Pönisch W et al., 2006). Bei leicht gesteigerter Toxizität kommt es zu einer verlängerten Zeit bis zur Progression, häufiger werden

auch komplette Remissionen beschrieben. Auch das vor 50 Jahren wegen seiner Teratogenität aus dem Handel genommene Seditativum Thalidomid, welches durch seine vielschichtigen Wirkmechanismen, wie zum Beispiel Antiangiogenese und Immunmodulation imponiert (Stirling D et al., 2001), führt in Kombination mit Melphalan und Prednison im Rahmen des MPT-Protokolles, vor allem bei älteren Patienten, zu einer Verbesserung der Behandlungsoptionen (Palumbo A et al., 2007) und wurde daher wieder zugelassen.

So sollte in dieser Dissertation Gemcitabin in Kombination mit anderen Zytostatika auf mögliche synergistische Effekte untersucht werden. Zunächst erfolgte die Dosisfindung für Treosulfan, Melphalan, Busulfan und Doxorubicin bei den Zelllinien NCI-H929 und U266. Wie schon in unserem Labor eingehend untersucht, führt das Alkylanz Treosulfan, welches bisher erfolgreich in der klinischen Therapie von Ovarialkarzinomen eingesetzt wurde (Breitbach GP et al., 2002), zu einer markanten Apoptoseinduktion bei verschiedenen Myelomzelllinien (Meinhardt G et al., 2003). Diese Ergebnisse konnten in dieser Arbeit bestätigt werden. Ein Hauptanwendungsgebiet von Busulfan ist die Konditionierungsbehandlung vor Stammzelltransplantation (Kim JG et al., 2007). Auch bei der Therapie der chronisch myeloischen Leukämie wurde es erfolgreich eingesetzt (Fausel C et al., 2007). Inkubation der Leukämiezelllinien HL-60 (Duraj J et al., 2006) und K562 (Lerga A et al., 1999) mit Konzentrationen von 100µM bis 500µM Busulfan über 24 bzw. 48 Stunden gingen mit einem deutlichen Anstieg der avitalen Zellen einher. Durch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 96 Stunden konnten in der vorliegenden Arbeit bei den verwendeten Myelomzelllinien NCI-H929 und U266, unter gleichen Konzentrationen, deutlich höhere Apotoseraten erzielt werden. Die zytotoxische Potenz von Melphalan und Doxorubicin wurde schon in verschiedenen Arbeiten untersucht. In vitro-Versuche konnten eine deutliche Apoptoseinduktion beider Chemotherapeutika bei den Myelomzelllinien RPMI-8226 und INA6 nachweisen (Dai Y et al., 2002; Hideshima T et al., 2006). Bei weitgehend gleicher Inkubationszeit (72 Stunden versus 96 Stunden) konnten unter gleichen Konzentrationen bei den Zelllinien U266 und NCI-H929 in dieser Arbeit vergleichbare Apotoseraten (nach 72 Stunden Inkubation mit 2µM Doxorubicin ca.60% avitale Zellen bei

RPMI-8226, nach 96 Stunden Inkubation mit 2 μ M Doxorubicin ca.70% avitale Zellen bei NCI-H929) erzielt werden.

Es wurden Myelomzellen mit Gemcitabin in Kombination mit Melphalan, Treosulfan, Busulfan und Doxorubicin inkubiert. Über die Kombination von Gemcitabin mit Melphalan ist in der Literatur bisher wenig beschrieben. In vitro-Untersuchungen an Bronchialkarzinomzelllinien (Jensen PB et al., 1997) und an Kolonkarzinomzelllinien (Van Putte BP et al., 2005) zeigten bei hohen Gemcitabindosierungen im millimolaren Bereich nur bei CC531-Kolonkarzinomzellen einen synergistischen Effekt. Im hämatologischen Bereich weisen neuere Phase-1-Untersuchungen bei Patienten mit Hodgkin- und Non-Hodgkin-Lymphomen auf eine sinnvolle Kombination beider Medikamente als Bestandteil neuer Chemotherapieregime hin (Nieto Y et al., 2007). Unter dieser Kombination konnte in der vorliegenden Arbeit bei den untersuchten Zelllinien NCI-H929 und U266 weder ein synergistischer noch ein additiver Effekt nachgewiesen werden. Ein breites Anwendungsgebiet der Kombination von Gemcitabin mit Treosulfan findet sich in der Behandlung des Malignen Melanoms (Atzpodien J et al., 2008; Schmittel A et al., 2006). Auch existieren erfolgreiche Phase-2-Studien bei Patienten mit Glioblastomen (Wick W et al., 2002). Es finden sich keine Untersuchungen über speziell diese Kombination bei hämatologischen Neoplasien. Auch unter dieser Kombination konnte in der vorliegenden Arbeit bei den untersuchten Zelllinien NCI-H929 und U266 weder ein synergistischer noch ein additiver Effekt nachgewiesen werden. Busulfan, ein Alkylsulfonat wie Treosulfan, wird ebenfalls in Kombination mit Gemcitabin und Cisplatin erfolgreich bei der Therapie des Melanoms eingesetzt (Atzpodien J et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit führt die Kombination von Busulfan mit Gemcitabin bei den oben genannten Zelllinien ebenfalls zu keinem synergistischen Effekt. Mehrere Phase-2-Studien sprechen für eine erfolgreiche Anwendung der Kombination aus Gemcitabin und Doxorubicin bei gynäkologischen Tumoren (Julka PK et al., 2008; El Serafi MM et al., 2006). Im hämatologischen Bereich weisen Phase-1-Studien mit einer Kombination von Gemcitabin, Doxorubicin und Vinorelbin auf eine gute Ansprechbarkeit bei der Therapie des Hodgkin-Lymphoms hin (Bartlett NL et al., 2007). In vitro-Untersuchungen an der Leukämiezelllinie U937 zeigen bei der Kombination

von Gemcitabine mit einem IC50-Wert von ca. 10nM und Doxorubicin mit einem IC50-Wert von ca. 75nM einen deutlichen synergistischen Effekt (Shanks RH et al., 2005). Bei ähnlichen Konzentrationen der beiden Chemotherapeutika (Gemcitabin IC50 ca. 50nM; Doxorubicin IC50 ca. 500nM) konnte nach einer Inkubationszeit von 96 Stunden bei den hier untersuchten Myelomzelllinien NCI-H929 und U266 ebenfalls ein deutlich synergistischer Effekt nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass die Kombination von Doxorubicin mit Gemcitabine zu einer synergistischen Zytotoxizität bei Myelomzellen führt. Dies ist von besonderer Bedeutung und ein substanzspezifischer Effekt, da die Kombination mit Alkylanzien keine Steigerung der Potenz zeigte.

4.3 Modulation der wichtigsten Signalkaskaden des Multiplen Myeloms

Um weitere Informationen über die von Gemcitabin benutzten Signalwege und deren Beeinflussung zu erhalten, wurde die experimentelle Modulation der wichtigsten Signaltransduktionskaskaden des Multiplen Myeloms durchgeführt. Es wurden verschiedene Aktivatoren und Inhibitoren auf ihre Wirkung an der Zelllinie NCI-H929 getestet. Entscheidend waren dabei ihre jeweilige spezifische Eigentoxizität und ihre mögliche Potenzierung des Apoptoseverhaltens von Gemcitabin.

Durch Modulation des JAK/STAT-Signalweges mittels des JAK2/STAT3-Inhibitors AG490 in einer Dosierung von 10µM konnte an U266-Myelom-Zellen eine synergistische Wirkung in Kombination mit Fludarabin, Cisplatin, Doxorubicin und Vinblastin nachgewiesen werden. Auch zeigte sich eine Steigerung der apoptotischen Potenz der vier genannten Chemotherapeutika durch Koinkubation mit dem JAK1/STAT3-Inhibitors Piceatannol in einer Dosierung von 50µM bei der Non-Hodgkin-Lymphom-Zelllinie 2F7 (Alas S et al., 2003). In dieser Arbeit konnte hingegen keine Steigerung der zytotoxischen Potenz von Gemcitabin durch Kombination mit den beiden JAK/STAT-Inhibitoren bei der Myelom-Zelllinie NCI-H929 belegt werden.

An verschiedenen Pankreaskarzinom-Zelllinien konnte eine Wirksteigerung Gemcitabins in Kombination mit dem p44/p42-MAP-Kinase-Inhibitor PD98059 beobachtet werden (Axelson J et al., 2005). In-vitro-Untersuchungen im hämatologischen Formenkreis zeigten eine signifikante Steigerung der Apoptoseinduktion durch das Taxan Docetaxel, wenn die zu untersuchenden FDC-P1-Leukämiezellen in einer Kombination aus Docetaxel und dem spezifischen p44/p42-MAP-Kinase-Inhibitor PD169316 inkubiert wurden (Demidenko ZN et al., 2005). In dieser Dissertation zeigte sich keine Beeinflussung der Wirksamkeit von Gemcitabine durch eine Inhibition der p44/p42-MAP-Kinase.

Auch die Inhibition des PI3/AKT-Signalweges ist ein wichtiges therapeutisches Angriffsziel beim Multiplen Myelom (Harvey RD et al., 2007). Diesem Signaltransduktionsweg werden unter anderem auch wesentliche antiapoptotische Effekte zugeschrieben. Durch die Blockierung dieses Pfades durch den Inhibitor LY 249002 konnte in dieser Arbeit eine deutliche Verminderung der Wirkung von Gemcitabin auf die behandelten NCI-H929-Zellen nachgewiesen werden.

Eine synergistische Wirkung der PKC-Modulatoren Bryostatin und TPA in Kombination mit verschiedenen antineoplastischen Substanzen wurde in der Literatur beschrieben. Unsere Arbeitsgruppe konnte eine Potenzierung des apoptotischen Effekts von Treosulfan durch Koinkubation sowohl mit Bryostatin, als auch mit TPA an verschiedenen AML-Zelllinien nachweisen (Schmidmaier R et al., 2004). Untersuchungen an der Leukämie-Zelllinie U937 zeigten eine Steigerung der Wirkung von Arabinosyl-Cytosin (Ara-C), nachdem es mit Bryostatin kombiniert wurde (Wang S et al., 2003). Auch in vitro-Untersuchungen von Gemcitabin in Kombination mit TPA und Bryostatin bei nicht-hämatologischen Krankheitsbildern finden sich. So wurden drei verschiedene Brustkrebs-Zelllinien mit Gemcitabin und Bryostatin in einer Dosierung von 200nM koinkubiert, das zu einem deutlichen synergistischen Effekt führte (Ali S et al., 2003). Auch eine Koinkubation der Ovarialkarzinom-Zelllinie BG-1 mit Gemcitabin und TPA in einer Dosierung von 10nM führte nach 24 Stunden Inkubationszeit zu einer erheblichen Wirksteigerung durch Gemcitabin (Cartee L et al., 1998). Bei den hier untersuchten NCI-H929-

Zellen konnte unter diesen Kombinationen weder ein additiver noch ein synergistischer Effekt festgestellt werden.

Auch über die Kombination der PKC-Inhibitoren GF 109203x und RO 32-0432 mit verschiedenen antineoplastischen Substanzen finden sich Berichte in der Literatur. So reagierten ehemals Doxorubicin- und Vincristin-resistente HLA-60-Leukemiezellen nach Koinkubation mit GF 109203x wieder sensibel auf Apoptosestimuli der beiden Chemotherapeutika (Gekeler V et al., 95). Auch konnte an verschiedenen CML-Zelllinien eine Wirkverstärkung des Purinnukleosidanalogen Acadesin durch gleichzeitige Inkubation sowohl mit RO 32-0432, als auch mit GF 109203x aufgezeigt werden (Robert G et al., 2009). An den hier untersuchten NCI-H929-zellen führen beide Inhibitoren koinkubiert zu keiner Zunahme der zytotoxischen Potenz von Gemcitabin.

Durch den Einsatz des spezifischen PKC α und β^1 -Inhibitor Gö6976 konnte schließlich die zytotoxische Potenz von Gemcitabin erheblich gesteigert werden. Bei Gö6976 handelt es sich um ein methyl- und cyanoalkyl-substituiertes, nicht glycosidisches Indolcarbazon, das die PKC α mit einer IC₅₀ von 2,3nM und die PKC β mit einer IC₅₀ von 6,2 nM kompetitiv hemmt (Martiny-Baron et al., 1993). So vermindert Gö6976 die Zellproliferation von Interleukin-6 abhängigen Zellen (Iankow I et al., 2002). Auch konnte nachgewiesen werden, dass bei U266-Zellen die durch Interferon-Alpha vermittelte Apoptoseinduktion verstärkt werden kann (Kanetaka Y et al., 2008). Konzentrationen von 100nM und 200nM Gö6976 zeigen bei den behandelten NCI-H929-Zellen keinen wesentlichen zellschädigenden Effekt. Erstaunlicherweise führen diese Dosierungen in Kombination mit nur 10nM Gemcitabin zu einem ausgeprägten Anstieg der Apoptoseinduktion. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es durch eine Ingenol-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase C zu einem Wirkungsverlust von Gemcitabin kommt. Von großer Bedeutung ist hierbei, dass bereits Konzentrationen, die alleine noch nicht Apoptose auslösen, den PKC-Signalweg blocken können und so Zytostatika besser wirken lassen. Die Ergebnisse dieser Arbeit (Baumann P et al., 2008) führten auch zu weiteren in vitro-Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an den Myelomzelllinien NCI-H929, RPMI-8226, U266 und OPM-2, bei denen gezeigt werden konnte, dass auch die zytotoxische Potenz der Chemotherapeutika Melphalan und Doxorubicin durch eine

Koinkubation mit 200nM und 400nM Gö6976 deutlich verstärkt werden konnte.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen vielversprechende Therapieoptionen durch die Kombination von Proteinkinase-C-Inhibitoren mit zytotoxischen Substanzen in der Behandlung des Multiplen Myeloms auf. Gerade die Behandlung mit Gemcitabin, einem in der Myelom-Therapie noch nicht eingesetztem Chemotherapeutikum, ist hierbei von besonderem Interesse.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Multiple Myelom ist eine maligne Knochenmarkserkrankung, die trotz enormen therapeutischen Fortschritten und einer signifikanten Lebensverlängerung in den meisten Fällen nicht heilbar ist und nach medianen fünf Jahren zum Tode führt. Das verbesserte Verständnis der Pathophysiologie hat zur Entwicklung von zielgerichteten Therapeutika (targeted therapies) wie Thalidomid, Lenalidomid und Bortezomib geführt. Die Wirksamkeit dieser Substanzen in Monotherapie ist vergleichsweise gering, wohingegen in Kombination mit klassischen Zytostatika wie Melphalan, Cyclophosphamid oder Doxorubicin Ansprechraten zu erreichen sind, die mit denen einer Hochdosischemotherapie vergleichbar sind. Das Spektrum klassischer Zytostatika in der Behandlung des Multiplen Myeloms ist sehr begrenzt. Ziel dieser Dissertation war es, die etablierte und zugelassene Substanz Gemcitabin, die breite Verwendung bei soliden Neoplasien findet, auf seine Wirksamkeit beim Multiplen Myelom zu untersuchen und mögliche „molecular targeted“ Kombinationspartner in vitro zu identifizieren.

Gemcitabin führt in den Zelllinien NCI-H929, U266 und OPM-2 schon im nanomolaren Bereich nach einer Inkubationszeit von 96 Stunden zu einer ausgeprägten Apoptoseinduktion. Gemcitabin wurde sowohl mit den Alkylanzien Melphalan, Treosulfan und Busulfan, als auch mit dem Anthracyclin Doxorubicin kombiniert. Nur durch die Kombination von Gemcitabin mit Doxorubicin konnte ein deutlicher synergistischer Effekt nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden unterschiedliche Modulatoren der typischen, für Wachstum, Überleben und Zytostatikaresistenz verantwortlichen Myelomsignalwege, wie Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription (JAK-STAT), Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase), Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) und die PKC-Isoenzyme, in ihrer Wirkung auf die Zelllinie NCI-H929 alleine und in Kombination mit Gemcitabin überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass die spezifische Inhibition der Proteinkinase-C-Familie zu einer deutlichen

synergistischen Wirkungspotenzierung von Gemcitabin führt. Durch selektive Inhibition der PKC α und PKC β^1 -Isoenzyme mittels Gö6976 konnte die Apoptoseinduktion von nur niedrigen Gemcitabinkonzentrationen signifikant gesteigert werden. Die dafür benötigten Gö6976-Konzentrationen bewegten sich im subtoxischen Bereich.

Diese präklinischen Ergebnisse weisen auf vielversprechende Therapieoptionen durch den Einsatz von Gemcitabin beim Multiplen Myelom, insbesondere in Kombination mit dem Proteinkinase-C-Inhibitor Gö6976 oder Doxorubicin, hin.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Abroun Saeid, Ishikawa Hideaki , Tsuyama Naohiro, Liu Shangqin , Fu-Jun Li, Ken-ichiro Otsuyama, Xu Zheng, Masanori Obata, and Michio M. Kawano Receptor synergy of interleukin-6 (IL-6) and insulin-like growth factor-I in myeloma cells that highly express IL-6 receptor α ; *Blood*, 15 March 2004, Vol. 103, No. 6, pp. 2291-2298

Alas S, Bonavida B. Inhibition of constitutive STAT3 activity sensitizes resistant non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma to chemotherapeutic drug-mediated apoptosis. *Clin Cancer Res.* 2003 Jan;9(1):316-26.

Alexanian R, Haut A, Khan AU, Lane M, McKelvey EM, Migliore PJ, Stuckey WJ Jr, Wilson HE. Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens *JAMA.* 1969 Jun 2; 208(9):1680-5

Ali S, Aranha O, Li Y, Pettit GR, Sarkar FH, Philip PA. Sensitization of human breast cancer cells to gemcitabine by the protein kinase C modulator bryostatin 1. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2003 Sep;52(3):235-46.

Arlt Alexander, Andre Gehrz, Susanne Mürköster, Jens Vorndamm, Marie-Luise Kruse, Ulrich R Fölsch and Heiner Schäfer, Role of NF- κ B and Akt/PI3K in the resistance of pancreatic carcinoma cell lines against gemcitabine-induced cell death. *Oncogene* 2003 22, 3243–3251

Atzpodien J, Terfloth K, Fluck M, Reitz M. Cisplatin, gemcitabine and treosulfan is effective in chemotherapy-pretreated relapsed stage IV uveal melanoma patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008 Sep;62(4):685-8. Epub 2007 Dec 15

Axelsson J, Lindell M, Hörlin K, Ohlsson B. Inhibition of different intracellular signal cascades in human pancreatic cancer cells. *Pancreatology*. 2005;5(2-3):251-8.

Bahlis N.B., Miao Y., Koc O.N., Lee K., Boise L.H., Gerson S.L.: N-Benzolstaurosporine (PKC412) inhibits AKT kinase inducing apoptosis in multiple myeloma cells. *Leukemia and Lymphoma* 2005; 46(6), 899-908

Bartlett NL, Niedzwiecki D, Johnson JL, Friedberg JW, Johnson KB, van Besien K, Zelenetz AD, Cheson BD, Canellos GP; Cancer Leukemia Group B. Gemcitabine, vinorelbine, and pegylated liposomal doxorubicin (GVD), a salvage regimen in relapsed Hodgkin's lymphoma: CALGB 59804. *Ann Oncol*. 2007 Jun;18(6):1071-9

Baumann P, Armann J, Mandl-Weber S, Grün G, Oduncu F, Schmidmaier R. Inhibitors of protein kinase C sensitise multiple myeloma cells to common genotoxic drugs. *Eur J Haematol*. 2008 Jan;80(1):37-45

Berra E, Diaz-Meco MT, Lozano J, Frutos S, Municio MM, Sanchez P, Sanz L, Moscat J. Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C zeta. *EMBO J* 1995;14:6157-63.

Bharti AC, Shishodia S, Reuben JM, Weber D, Alexanian R, Raj-Vadhan S, Estrov Z, Talpaz M, and Aggarwal BB; Nuclear factor-kappaB and STAT3 are constitutively active in CD138+ cells derived from multiple myeloma patients, and suppression of these transcription factors leads to apoptosis. *Blood*, 15 April 2004, Vol. 103, No. 8, pp. 3175-3184

Breitbach GP, Meden H, Schmid H, Kühn W, Sass G, Schach S, Schmidt-Rohde P, Bastert G; GTOC Study Group. Treosulfan in the treatment of advanced ovarian cancer: a randomised co-operative multicentre phase III-study. *Anticancer Res*. 2002 Sep-Oct;22(5):2923-

Catlett-Falcone R, Landowski T, Oshiro M, Turkson J, A. Levitzki, R. Savino, G. Ciliberto, L. Moscinski, J. Fernández-Luna, G. Nuñez. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, Jg. 1999 (10), Heft 1, S. 105-15

Cartee L, Kucera GL, Nixon JB. The effects of gemcitabine and TPA on PKC signaling in BG-1 human ovarian cancer cells. *Oncol Res.* 1998;10(7):371-7.

Chng WJ, Gonzalez-Paz N, Price-Troska T, Jacobus S, Rajkumar SV, Oken MM, Kyle RA, Henderson KJ, Van Wier S, Greipp P, Van Ness B, Fonseca R. Clinical and biological significance of RAS mutations in multiple myeloma. *Blood.* 2008 Sep 15;112(6):2439-49. Epub 2008 Jul 9.

Chun-Ming Tsai, Kuo-Ting Chang, Jeou-Yuan Chen, Yuh-Min Chen, Mei-Hui Chen, and Reury-Perng Perng, Cytotoxic Effects of Gemcitabine-containing Regimens against Human Non-Small Cell Lung Cancer Cell Lines Which Express Different Levels of p185, *Cancer research* , Jg. 1996 (56) , Heft 4 , S. 794-801

Collin R, Greaves M, Preston FE. Potential value of vintristine-adriamycin-dexamethasone combination chemotherapy (VAD) in refractory and rapidly progressive myeloma. *Eur J Haematol.* 1987 Sep;39(3):203-8.

Corradini P, Voena C, Tarella C, Astolfi M, Ladetto M, Palumbo A, Van Lint MT, Bacigalupo A, Santoro A, Musso M, Majolino I, Boccadoro M, Pileri A. Molecular and clinical remissions in multiple myeloma: role of autologous and allogeneic transplantation of hematopoietic cells. *J Clin Oncol.* 1999 Jan;17(1):208-15.

Da Rocha A.B., mans D.R., Regner A., Schwartsmann G.: Targeting protein kinase C: new therapeutic opportunities against high-grade malignant gliomas *Oncologist* 2002; 7, 17-33

Dai Y, Landowski TH, Rosen ST, Dent P, Grant S. Combined treatment with the checkpoint abrogator UCN-01 and MEK1/2 inhibitors potently induces apoptosis in drug-sensitive and -resistant myeloma cells through an IL-6-independent mechanism. *Blood*, 1 November 2002, Vol. 100, No. 9, pp. 3333-3343

Dekker LV, Parker PJ. Proteinkinase C--a question of specificity. *Trends in biochemical sciences*, Jg. 1994 (19), Heft 2, S. 73-7

Demidenko ZN, Halicka D, Kunicki J, McCubrey JA, Darzynkiewicz Z, Blagosklonny MV. Selective killing of adriamycin-resistant (G2 checkpoint-deficient and MRP1-expressing) cancer cells by docetaxel. *Cancer Res.* 2005 May 15;65(10):4401-7.

Diaz-Meco MT, Lozano J, Municio MM, Berra E, Frutos S, Sanz L, Moscat J. Evidence for the in vitro and in vivo interaction of Ras with protein kinase C zeta. *J Biol Chem* 1994;269:31706-10

Dispenzieri A, Kyle RA. Multiple myeloma: clinical features and indications for therapy. *Best Practice & Research Clinical Haematology* [1521-6926] , Jg. 2005 (18) , Heft 4 , S. 553-68

Duraj J, Bodo J, Sulikova M, Rauko P, Sedlak J. Diverse resveratrol sensitization to apoptosis induced by anticancer drugs in sensitive and resistant leukemia cells. *Neoplasma.* 2006;53(5):384-92.

El Karak F, Flechon A. Gemcitabine in bladder cancer. *Expert Opin Pharmacother.* 2007 Dec;8(18):3251-6

El Serafi MM, El Khodary AI, El Zawahry HR, Mansour OM, Gaballa HE. Gemcitabine plus doxorubicin as first-line treatment in advanced or metastatic breast cancer (MBC), a phase II study. *J Egypt Natl Canc Inst.* 2006 Sep;18(3):209-15.

Erlichman C. Novel chemotherapeutic agents in clinical development. *Curr Opin Oncol.* 1991 Dec;3(6):1037-42.

Facon, Prof Thierry MD, Jean Yves Mary PhD , Cyrille Hulin MD , Lotfi Benboubker MD , Prof Michel Attal MD , Brigitte Pegourie MD, Marc Renaud MD , Prof Lean Luc Harousseau MD, Gaëlle Guillerme MD, Carine Chaletteix MD , Mamoun Dib MD , Laurent Voillat MD, 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, *The Lancet*, Volume 370, Issue 9594, Pages 1209 - 1218, 6 October 2007

Fausel C, Targeted chronic myeloid leukemia therapy: seeking a cure. *J Manag Care Pharm*. 2007 Oct;13(8 Suppl A):8-12

Gekeler V, Boer R, Ise W, Sanders KH, Schächtele C, Beck J. The specific bisindolylmaleimide PKC-inhibitor GF 109203X efficiently modulates MRP-associated multiple drug resistance. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995 Jan 5;206(1):119-26

Gerlo S, Haegeman G, Vanden Berghe W. Transcriptional regulation of autocrine IL-6 expression in multiple myeloma cells. *Cell Signal*. 2008 Aug;20(8):1489-96. Epub 2008 Apr 14

Ghandi V, Plunkett W. Modulatory activity of 2', 2'-difluorodeoxycytidine on the phosphorylation and cytotoxicity of arbinosyl nucleosides. *Cancer Res*. 1990; 50: 3675-3686

Gladney SP, Lonial S, Kaufman JL. Multiple myeloma presenting with advanced renal failure: a case report and new treatment options. *Clinical lymphoma & myeloma*, Jg. 2008 (8), Heft 1, S. 52-4

Gokemen-Polar Y., Murray N.R., Velasco M.A., Gatalica Z., Fields A.P.: Elevated protein kinase C α II is an early promotive event in colon carcinogenesis. *Cancer Res*. 2001; 61, 1375-1381

Ringshausen I, Oelsner M, Weick K, Bogner C, Peschel C, Decker T. Mechanisms of apoptosis-induction by rottlerin: therapeutic implications for B-CLL. *Leukemia* 2006; 20:514–20.

Graff JR, McNulty AM, Hanna KR, et al. The protein kinase C beta-selective inhibitor, Enzastaurin (LY317615.HCl), suppresses signaling through the AKT pathway, induces apoptosis, and suppresses growth of human colon cancer and glioblastoma xenografts. *Cancer Res* 2005;65:7462–9.

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

Gruber J, Geisen F, Sgonc R, Egle A, Villunger A, Boeck G, Konwalinka G, Greil R. 2',2'-Difluorodeoxycytidine (gemcitabine) induces apoptosis in myeloma cell lines resistant to steroids and 2-chlorodeoxyadenosine (2-CdA). *Stem Cells*. 1996 May;14(3):351-62

Harnett MM, Katz E, Ford CA. Differential signalling during B-cell maturation. *Immunol Lett* 2005; 98:33–44 Epub, 30 November 2004.

Harvey RD, Lonial S. PI3 kinase/AKT pathway as a therapeutic target in multiple myeloma. *Future Oncol*. 2007 Dec;3(6):639-47

Heinemann V, Hertel LW, Grindey GB et al. Comparison of the cellular pharmacokinetics and toxicity of 2',2'-difluorodeoxycytidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine. *Cancer Res*. 1988, 48:4024-4031

Heinemann V, Xu YT, Chubb S et al. Cellular elimination of 2',2'-difluorodeoxycytidine 5' triphosphat : a mechanism of self-potentiation. *Cancer Res*. 1992; 52:533-539

Hernández P, Olivera P, Dueñas-Gonzalez A, Pérez-Pastenes MA, Zárate A, Maldonado V, Meléndez-Zajgla J., Gemcitabine activity in cervical cancer cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2001 Dec;48(6):488-92.

Hertel, L. W., Boder, G. B., Kroin, J. S., Rinzel, S. M., Poore, G. A., Todd, G. C. & Grindey, G. B. Evaluation of the antitumor activity of gemcitabine (2'2'-difluoro-2'-deoxycytidine). *Cancer Res* (1990). 50: 4417–4422.

Hideshima T, Nakamura N, Chauhan D, Anderson KC, Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. 20 September 2001, Volume 20, Number 42, Pages 5991-6000

Hideshima T, Neri P, Tassone P, Yasui H, Ishitsuka K, Raje N, Chauhan D, Podar K, Mitsiades C, Dang L, Munshi N, Richardson P, Schenkein D, Anderson KC. MLN120B, a Novel I κ BKinase B Inhibitor, Blocks Multiple Myeloma Cell Growth *In vitro* and *In vivo*. *Clin Cancer Res*. 2006 Oct 1;12(19):5887-94.

Hideshima T, Podar K, Chauhan D, Anderson KC. Cytokines and signal transduction, *Best Practice & Research Clinical Haematology* [1521-6926] , Jg. 2005 (18) , Heft 4 , S. 509-24

Hoffmann J.: Modulation of protein kinase C in antitumor treatment. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology* 2001; 142, 1-96

Huang P, Chubb S, Hertel LW et al. Action of 2', 2'-difluorodeoxycytidine on DNA synthesis. *Cancer Res*. 1991; 51: 6110-6117

Hyun Teresa, Yam Alan, Pece Salvatore , Xie Xiaozhen, Jie Zhang, Toru Miki, J. Silvio Gutkind, and Weiqun Li Loss of PTEN expression leading to high Akt activation in human multiple myelomas; *Blood*, 15 November 2000, Vol. 96, No. 10, pp. 3560-3568

Iaffaioli RV, Milano A, Caponigro F. Therapy of metastatic bladder carcinoma. *Ann Oncol*. 2007 Jun;18 Suppl 6:vi153-6.

Iankov I, Praskova M, Kalenderova S, Tencheva Z, Mitov I, Mitev V. The effect of chemical blockade of PKC with Go6976 and Go6983 on proliferation and MAPK activity in IL-6-dependent plasmacytoma cells. *Leuk Res* 2002; 26:363–8.

Jensen PB, Holm B, Sorensen M, Christensen IJ, Sehested M. In vitro cross-resistance and collateral sensitivity in seven resistant small-cell lung cancer

cell lines: preclinical identification of suitable drug partners to taxotere, taxol, topotecan and gemcitabin. *Br J Cancer*. 1997;75(6):869-77.

Jia SF, Worth LL, Densmore CL, Xu B, Zhou Z, Kleinerman ES. Eradication of osteosarcoma lung metastases following intranasal interleukin-12 gene therapy using a nonviral polyethylenimine vector. *Cancer Gene Ther*. 2002 Mar;9(3):260-6.

Julka PK, Chacko RT, Nag S, Parshad R, Nair A, Oh DS, Hu Z, Koppiker CB, Nair S, Dawar R, Dhindsa N, Miller ID, Ma D, Lin B, Awasthy B, Perou CM. A phase II study of sequential neoadjuvant gemcitabine plus doxorubicin followed by gemcitabine plus cisplatin in patients with operable breast cancer: prediction of response using molecular profiling. *Br J Cancer*. 2008 Apr 22;98(8):1327-35.

Kanetaka Y, Hayashida M, Hoshika A, Yanase N, Mizuguchi J. Interferon-alpha induces transient upregulation of c-FLIP through NF-kappaB activation. *Exp Cell Res*. 2008 Jan 15;314(2):246-54

Kanner BS, Grosmaire LS, Ledbetter JA, Damle NK: β 2-integrin LFA-1 signaling through Phospholipase C.1 activation. *Journal of Immunology* 1993; 90; 7099-7103

Kazanietz MG, Areces LB, Bahador A, Mischak H, Goodnight J, Mushinski JF, Blumberg PM. Characterization of ligand and substrate specificity for the calcium-dependent and calcium-independent protein kinase C isozymes. *Mol Pharmacol*. 1993 Aug; 44(2):298-307.

Kazanietz MG, Lewin NE, Gao F, Pettit GR, Blumberg PM. Binding of [26-3H]bryostatin 1 and analogs to calcium-dependent and calcium-independent protein kinase C isozymes. *Molecular Pharmacology* August 1994 vol. 46 no. 2 374-379

Kemp BE, Parker MW, Hu S, Tiganis T, House C. Substrate and pseudosubstrate interactions with protein kinases: determinants of specificity. *Trends in biochemical sciences*, Jg. 1994 (19), Heft 11, S. 440-4

Kim JG, Sohn SK, Chae YS, Yang DH, Lee JJ, Kim HJ, Shin HJ, Jung JS, Kim WS, Kim DH, Suh C, Kim SJ, Eom HS, Bae SH. Multicenter study of intravenous busulfan, cyclophosphamide, and etoposide (i.v. Bu/Cy/E) as conditioning regimen for autologous stem cell transplantation in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Bone Marrow Transplant*. 2007 Nov; 40(10):919-24. Epub 2007 Sep 10.

Kim KH, Joo YD, Sohn CH, Shin HJ, Chung JS, Cho GJ, Shin SH, Kim YS, Lee WS. Gemcitabine, etoposide, cisplatin, and dexamethasone in patients with refractory or relapsed non-Hodgkin's lymphoma. *Korean J Intern Med*. 2009 Mar;24(1):37-42.

Kotla V, Goel S, Nischal S, Heuck C, Vivek K, Das B, Verma A, Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. *J Hematol Oncol*. 2009 Aug 12;2:36

Krett NL, Ayres M, Nabhan C, Ma C, Nowak B, Nawrocki S, Rosen ST, Gandhi V. In vitro assessment of nucleoside analogs in multiple myeloma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2004 Aug;54(2):113-21. Epub 2004 May 4.

Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK, Zeldenrust SR, Dingli D, Russell SJ, Lust JA, Greipp PR, Kyle RA, Gertz MA. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood*. 2008 Mar 1;111(5):2516-20. Epub 2007 Nov 1.

Kyle RA. Long-term survival in multiple myeloma. *N Engl J Med*. 1983 Feb 10; 308(6):3-14.

Laessig D, Stemmler HJ, Vehling-Kaiser U, Fasching PA, Melchert F, Kolbl H, Gemcitabine and carboplatin in intensively pretreated patients with metastatic breast cancer. *Oncology*. 2007; 73 (5-6):407-14.

Laubach JP, Mahindra A, Mitsiades CS, Schlossman R, Munshi NC, Ghobrial IM, Carreau N, Hideshima T, Anderson KC, Richardson PG. The use of novel agents in the treatment of relapsed and refractory multiple myeloma.

Leukemia. 2009 Sep 10.

Leleu X, Troncy J, Bouafia F, Michallet M, Facon T, Dumontet C. Evaluation of gemcitabine in relapsed or refractory multiple myeloma. *Haematologica*. 2004 Nov;89(11):ELT15

Leow Ch, Liam CK, Gemcitabine and carboplatin in the treatment of locally advanced and metastatic non-small cell lung cancer, *Respirology* , Jg. 2005 (10) , Heft 5 , S. 629-35

Lerga A, Richard C, Delgado MD, Canelles M, Frade P, Cuadrado MA, Apoptosis and mitotic arrest are two independent effects of the protein phosphatases inhibitor okadaic acid in K562 leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;260:256-64.

Lorusso D, Di Stefano A, Fanfani F, Scambia G. Role of gemcitabine in ovarian cancer treatment. *Ann Oncol*. 2006 May;17 Suppl 5:v188-94.

Mackanos EA, Pettit GR, Ramsdell JS, Bryostatins selectively regulate protein kinase C-mediated effects on GH4 cell proliferation, *The Journal of biological chemistry*, Jg. 1991 (266), Heft 17, S. 11205-12

Mackey JR, Mani RS, Seiner M et al. Nucleoside transporters are required for Gemcitabine influx and manifestation of toxicity in cancer cell lines. *Cancer Res* 1998; 58: 4349-4357

Manegold C, Gemcitabine (Gemzar) in non-small cell lung cancer, *Expert Review of Anticancer Therapy*, Jg. 2004 (4) , Heft 3 , S. 345-60

Martiny-Baron G., Kazanietz M.G., Mischak H., Blumberg P.M., Kochs G., Hug H., Marme D., Schächtele C.: Selective Inhibition of Protein Kinase C Isoenzymes by the indolocarbazole GÖ 6976. *The Journal of Biological Chemistry* 1993; 268(13), 9194-9197

Meijer E, Sonneveld P. Hematology: Lenalidomide plus dexamethasone is effective in multiple myeloma. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009 May;6(5):247-8.

Meinhardt G, Dayyani F, Jahrsdörfer B, Baumgart J, Emmerich B, Schmidmaier R. Treosulfan is an effective inducer of cell death in myeloma cell lines and primary myeloma cells from patients. *Br J Haematol*. 2003 Sep; 122(6):892-9.

Meinhardt G, Eppinger E, Schmidmaier R. Effect of novel modulators of protein kinase C activity upon chemotherapy-induced differentiation and apoptosis in myeloid leukemic cells. *Anticancer Drugs* 2002; 13:725–33.

Menu E, van Valckenborgh E, van Camp B, Vanderkerken K. The role of the insulin-like growth factor 1 receptor axis in multiple myeloma *Arch Physiol Biochem*. 2009 May;115(2):49-57

Michael,M., Moore,M., Clinical experience with gemcitabine in pancreatic carcinoma. *Oncology (Williston Park)* 1997 Nov; 11(11):1615-22; discussion 1622, 1625-7

Mohanty S, Huang J, Basu A. Enhancement of cisplatin sensitivity of cisplatin-resistant human cervical carcinoma cells by bryostatin 1. *Clin Cancer Res*. 2005 Sep 15;11(18):6730-7.

Moore MJ, Tannock IF, Ernst DS, Huan S, Murray N. Gemcitabine: a promising new agent in the treatment of advanced urothelial cancer *J Clin Oncol*. 1997 Dec; 15(12):3441-5.

Moreau P, Fiere D, Bezwoda WR, Facon T, Attal M, Laporte JP, Colombat P, Haak HL, Monconduit M, Lockhorst H, Girault D, Harousseau JL. Prospective randomized placebo-controlled study of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor without stem-cell transplantation after high-dose melphalan in patients with multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 1997 Feb;15(2):660-6.

Moreau P, Misbahi R, Milpied N, Morineau N, Mahé B, Vigier M, Rapp MJ, Bataille R, Harousseau JL. Long-term results (12 years) of high-dose therapy in 127 patients with de novo multiple myeloma. *Leukemia*. 2002 Sep;16(9):1838-43.

Nabhan C, Gajria D, Krett NL, Gandhi V, Ghias K, Rosen ST. Caspase activation is required for gemcitabine activity in multiple myeloma cell lines. *Mol Cancer Ther*. 2002 Nov;1(13):1221-7

Nieto Y, Aldaz A, Rifón J, Pérez-Calvo J, Zafra A, Zufia L, Viúdez A, Viteri S, Aramendía JM, Aristu J, Centeno C, Moreno M, Sayar O, Hernández M. Phase I and pharmacokinetic study of gemcitabine administered at fixed-dose rate, combined with docetaxel/melphalan/carboplatin, with autologous hematopoietic progenitor-cell support, in patients with advanced refractory tumors. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007 Nov;13(11):1324-37. Epub 2007 Sep 7.

Ni H, Ergin M, Tibudan SS, Denning MF, Izban KF, Alkan S. Protein kinase C-delta is commonly expressed in multiple myeloma cells and its downregulation by rottlerin causes apoptosis. *Br J Haematol* 2003; 121: 849–56.

Nishizuka Y, Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C, *Science*, Jg. 1992 (258), Heft 5082, S. 607-14

Nishizuka Y. The Albert Lasker medical awards. The family of protein kinase C for signal transduction. *JAMA* 1989;262:1826–33.

Offidani MA, Corvatta L, Marconi M, Malerba L, Olivieri A, Rupoli F, Alesiani F, Leoni P Gemcitabine alone or in combination with cisplatin in relapsed or refractory multiplemyeloma. *Leuk Lymphoma* 2002,43:1273–1279

Ogata A, Chauhan D, Teoh G, Treon SP, Urashima M, Schlossman RL and Anderson KC ;IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade, *The journal of immunology* , Jg. 1997 (159) , Heft 5 , S. 2212-21

Oshiro MM, Landowski TH, Catlett-Falcone R, Hazlehurst LA, Mei Huang, Richard Jove and William S. Dalton. Inhibition of JAK kinase activity enhances Fas-mediated apoptosis but reduces cytotoxic activity of topoisomerase II inhibitors in U266 myeloma cells. *Clinical Cancer Research* Vol. 7, 4262-4271, December 2001

Pace E, Melis M, Siena L, Bucchieri F, Vignola AM, Profita M, Gjomarkaj M, Bonsignore G. Effects of gemcitabine on cell proliferation and apoptosis in non-small-cell lung cancer (NSCLC) cell lines. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2000;46(6):467-76.

Palumbo A, Falco P, Corradini P, Falcone A, Di Raimondo F, Giuliani N, Crippa C, Ciccone G, Omedè P, Ambrosini MT, Gay F, Bringhen S, Musto P, Foà R, Knight R, Zeldis JB, Boccadoro M, Petrucci MT; GIMEMA--Italian Multiple Myeloma Net-work. Melphalan, prednisone, and lenalidomide treatment for newly diagnosed myeloma: a report from the GIMEMA--Italian Multiple Myeloma Network. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 4459-4465

Phekoo KJ, Schey SA, Richards MA, Bevan DH, Bell S, Gillett D, Møller H; Consultant Haematologists, South Thames Haematology Specialist Committee; A population study to define the incidence and survival of multiple myeloma in a National Health Service Region in UK. *British journal of haematology*, Jg. 2004 (127), Heft 3, S. 299-304

Podar K, Tai YT, Davies FE, et al. Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood* 2001; 98:428–35.

Podar K, Tai YT, Lin BK, Narsimhan RP, Sattler M, Kijima T, Salgia R, Gupta D, Chauhan D, Anderson KC. Vascular endothelial growth factor-induced migration of multiple myeloma cells is associated with beta 1 integrin and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent PKC alpha activation. *J Biol Chem* 2002; 277:7875–81 [Epub, 20 December 2001].

Poenisch W, Mitrou PS, Merkle K, Herold M, Assmann M, Wilhelm G, Dachsel K, Richter P, Schirmer V, Schulze A, Subert R, Harksel B, Grobe N, Stelzer E, Schulze M, Bittrich A, Freund M, Pasold R, Friedrich T, Helbig W, Niederwieser D. Treatment of Bendamustine and Prednisolone in patients with newly diagnosed multiple myeloma results in superior complete response rate, prolonged time to treatment failure and improved quality of life compared to treatment with Melphalan and Prednisone- a randomised phase 3 study of the East German Study group of Hematology and Oncology (OSHO). (2006), J.

Pour L, Svachova H, Adam Z, Almasi M, Buresova L, Buchler T, Kovarova L, Nemecek P, Penka M, Vorlicek J, Hajek R. Levels of angiogenic factors in patients with multiple myeloma correlate with treatment response. *Ann Hematol.* 2009 Sep 26

Puthier D, Bataille R, Amiot M; L-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK / STAT rather than ras / MAP kinase pathway; *European journal of immunology*, Jg. 1999 (29) , Heft 12 , S. 3945-50

Richardson P, Jagannath S, Hussein M, Berenson J, Singhal S, Irwin D, Williams SF, Bensinger W, Badros AZ, Vescio R, Kenvin L, Yu Z, Olesnyckyj M, Zeldis J, Knight R, Anderson KC. Safety and efficacy of single-agent lenalidomide in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. 2009 Jul 23;114(4):772-8. Epub 2009 May 26

Richardson PG, Weller E, Jagannath S, Avigan DE, Alsina M, Schlossman RL, Mazumder A, Munshi NC, Ghobrial IM, Doss D, Warren DL, Lunde LE, McKenney M, Delaney C, Mitsiades CS, Hideshima T, Dalton W, Knight R, Esseltine DL, Anderson KC. Multicenter, Phase I, Dose-Escalation Trial of Lenalidomide Plus Bortezomib for Relapsed and Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *J Clin Oncol.* 2009 Sep 28

Rivera F, Lopez-Tarruella S, Vega-Villegas MA, Salcedo M, Treatment of advanced pancreatic cancer: From gemcitabine single agent to combinations and targeted therapy. *Cancer Treat Rev.* Jan, 6. 2009 [0305-7372]

Rizvi MA, Ghias K, Davies KM, Ma C, Weinberg F, Munshi HG, Krett NL, Rosen ST. Enzastaurin (LY317615), a protein kinase C β inhibitor, inhibits the AKT pathway and induces apoptosis in multiple myeloma cell *Mol Cancer Ther* 2006; 5:1783–9.

Robert G, Ben Sahra I, Puissant A, Colosetti P, Belhacene N, Gounon P, Hofman P, Bost F, Cassuto JP, Auberger P. Acadesine kills chronic myelogenous leukemia (CML) cells through PKC-dependent induction of autophagic cell death. *PLoS One*. 2009 Nov 18;4(11):e7889

Roodman GD. Mechanisms of bone lesions in multiple myeloma and lymphoma; *Cancer*, Jg. 1997 (80), Heft 8 Suppl, S. 1557-63

Rowley M and Van Ness B, Activation of N-ras and K-ras induced by interleukin-6 in a myeloma cell line: implications for disease progression and therapeutic response. December 2002, Volume 21, Number 57, Pages 8769-8775

Ruiz van Haperen VW, Veerman G, Vermorken JB et al. Regulation of phosphorylation of deoxycytidine and 29,29-difluorodeoxycytidine (gemcitabine); effects of cytidine 59-triphosphate and uridine 59-triphosphate in relation to chemosensitivity for 29,29-difluorodeoxycytidine. *Biochem Pharmacol* 1996; 51: 911–918

Russell NH, Mifflin G, Stainer C, McQuaker JG, Bienz N, Haynes AP, Bessell EM. Allogeneic bone marrow transplant for multiple myeloma. *Blood*. 1997; 89: 2610-2611

Sagawa M, Nakazato T, Uchida H, Ikeda Y, Kizaki M. Cantharidin induces apoptosis of human multiple myeloma cells via inhibition of the JAK/STAT pathway. *Cancer Sci*. 2008 Sep;99(9):1820-6. Epub 2008 Jun 9.

Savage DG, Rule SA, Tighe M, Garrett TJ, Oster MW, Lee RT, Ruiz J, Heitjan D, Keohan ML, Flamm M, Johnson SA. Gemcitabine for relapsed or resistant lymphoma. *Ann Oncol*. 2000 May;11(5):595-7

Schmidmaier R, Baumann P, Emmerich B, Meinhardt G. Evaluation of chemosensitivity of human bone marrow stromal cells--differences between common chemotherapeutic drugs. *Anticancer Res.* 2006 Jan-Feb;26(1A):347-50.

Schmidmaier R, Oellerich M, Baumgart J, Emmerich B, Meinhardt G. Treosulfan-induced apoptosis in acute myeloid leukemia cells is accompanied by translocation of protein kinase C delta and enhanced by bryostatin-1. *Exp Hematol* 2004; 32:76-86.

Schmittel A, Schmidt-Hieber M, Martus P, Bechrakis NE, Schuster R, Siehl JM, Foerster MH, Thiel E, Keilholz U. A randomized phase II trial of gemcitabine plus treosulfan versus treosulfan alone in patients with metastatic uveal melanoma. *Ann Oncol.* 2006 Dec;17(12):1826-9

Schonwasser DC, Marais RM, Marshall CJ, Parker PJ. Activation of the mitogen-activated protein kinase/ extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol Cell Biol* 1998; 18:790-8.

Seidman AD, Gemcitabine as single-agent therapy in the management of advanced breast cancer, *Oncology* [0890-9091], Jg. 2001 (15), Heft 2 Suppl 3, S. 11-4

Selby PJ, McElwain TJ, Nandi AC, Perren TJ, Powles RL, Tillyer CR, Osborne RJ, Slevin ML, Malpas JS. Multiple myeloma treated with high dose intravenous melphalan. *Br J Haematol.* 1987 May;66(1):55-62.

Shanks RH, Rizzieri DA, Flowers JL, Colvin OM, Adams DJ. Preclinical evaluation of gemcitabine combination regimens for application in acute myeloid leukaemia. *Clin Cancer Res.* 2005 Jun 1;11(11):4225-33.

Shirato L, Otsuki T, Yamada O, Namba M, Nakajima H, Nozawa Y, Ueki A, Yawata Y. Down regulation of protein kinase C during growth enhancement induced by interleukin-6 on a human myeloma cell line, KMS-11. *Cancer Lett* 1996;107:131-6.

Song L, Li Y, Sun YX, Yu M, Shen BF. IL-6 inhibits apoptosis of human myeloma cell line XG-7 through activation of JAK/STAT pathway and up-regulation of Mcl-1. *ai zheng* [1000-467X], Jg. 2002 (21), Heft 2, S. 113-6

Stirling D, Thalidomide: a novel template for anticancer drugs, *Seminars in oncology*, Jg. 2001 (28), Heft 6, S. 602-6

Strimpakos A, Saif MW, Syrigos KN. Pancreatic cancer: from molecular pathogenesis to targeted therapy. *Cancer Metastasis Rev.* 2008 Sep;27(3):495-522.

Thabard W, Collette M, Bataille R, Amiot M. Protein kinase C delta and isoenzymes control the shedding of the interleukin 6 receptor alpha in myeloma cells. *Biochem J* 2001; 358:193–200.

Tu Yiping, Gardner Agnes and Lichtenstein Alan, The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase pathway in multiple myeloma plasma cells: roles in cytokine-dependent survival and proliferative responses. *Cancer Research* 60, 6763-6770, December 1, 2000

Ueda Y, Hirai S, Osada S, Suzuki A, Mizuno K, Ohno S. Protein kinase C activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *J Biol Chem* 1996; 271:23512–9.

Validire P, Ferme C, Brice P, Divine M, Gabarre J, Bouabdallah K, Fitoussi O, Chaoui D, Pacquement H, A multicenter study of gemcitabine-containing regimen in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma patients. *Anti-cancer drugs*, Jg. 2008 (19), Heft 3, S. 309-15

Van den Heuvel-Eibrink MM, Sonneveld P, Pieters R. The prognostic significance of membrane transport-associated multidrug resistance (MDR) proteins in leukemia. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2000 Mar;38(3):94-110.

Van Putte BP, Hendriks JM, Romijn S, Pauwels B, Vermorken JB, Van Schil PE. Combination chemotherapy with gemcitabine with isolated lung perfusion

for the treatment of pulmonary metastases. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005 Jul;130(1):125-30.

Venon MD, Roccaro AM, Gay J, Moreau AS, Dulery R, Facon T, Ghobrial IM, Leleu X. Front line treatment of elderly multiple myeloma in the era of novel agents. *Biologics.* 2009;3:99-109. Epub 2009 Jul 13

Vlasveld LT, Low cobalamin (vitamin B12) levels in multiple myeloma: a retrospective study. *Neth J Me.* 2003 Aug; 61(8):249-52.

Wang S, Wang Z, Grant S. Bryostatins 1 and UCN-01 potentiate 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells through disparate mechanisms. *Mol Pharmacol.* 2003 Jan;63(1):232-42.

Weick JK, Crowley JJ, Hussein MA, Moore DF, Barlogie B The evaluation of gemcitabine in resistant or relapsing multiple myeloma, phase II: a Southwest Oncology Group study. *Invest New Drugs* 2002, 20:117–121

Wick W, Hermisson M, Kortmann RD, Küker WM, Duffner F, Dichgans J, Bamberg M, Weller M. Neoadjuvant gemcitabine/treosulfan chemotherapy for newly diagnosed glioblastoma: a phase II study. *J Neurooncol.* 2002 Sep;59(2):151-5.

Zupi Gabriella, Marco Scarsella, Carmen D'Angelo, Annamaria Biroccio, Giancarlo Paoletti, Massimo Lopez and Carlo Leonetti Potentiation of the antitumoral activity of gemcitabine and paclitaxel in combination on human breast cancer cells, *Cancer biology & therapy*, Jg. 2005 (4) , Heft 8 , S. 866-71

7. ANHANG

7.1 Verwendete Materialien und Methoden

7.1.1 Zellkultur

Kurzbezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
RPMI – 1640	E12 – 702F	<i>Gibco Invitrogen, Karlsruhe</i>
PBS	14040 – 091	<i>Gibco Invitrogen, Karlsruhe</i>
FCS	16170 – 078	<i>Gibco Invitrogen, Karlsruhe</i>
Flask 75 cm ²	353.136	<i>BDBiosciences, Heidelberg</i>
96-Well-Plates	353.872	<i>BDBiosciences, Heidelberg</i>
6-Well-plates	353.453	<i>BDBiosciences, Heidelberg</i>
Trypanblaulösung	15250-061	<i>Gibco Invitrogen, Karlsruhe</i>
Kryoröhrchen	1148 33	<i>Brand GMBH, Wertheim</i>
Kulturgefäßeinsätze	353092	<i>BD Falcon, Bedford, USA</i>

7.1.2 Zytostatika

Name	Bestellnummer	Hersteller
Gemcitabine	Gemzar®	<i>Lilly, Homburg, D</i>
Melphalan	M2011	<i>Sigma, Taufkirchen, D</i>
Treosulfan	Ovostat®	<i>Medac, Hamburg, D</i>
Doxorubicin	Adriblastin®	<i>Pharmacia, Erlangen, D</i>
Busulfan	M3021	<i>Sigma, Taufkirchen, D</i>

7.1.3 Inhibitoren und Aktivatoren

Kurzbezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
Gö76	EI-269	<i>Biomol</i> , Butler Pike, USA
Gö83	EI-296	<i>Biomol</i> , Butler Pike, USA
Bryostatin	ST-103	<i>Biomol</i> , Butler Pike, USA
Ingenol	MFCD07784504	<i>Sigma-Aldrich</i> ,,St-Louis,USA
TPA	PE160-0005	<i>Biomol</i> , Butler Pike, USA
GF 109203x	EI-246	<i>Biomol</i> , Butler Pike, USA
RO 32-0432	EI-284	<i>Biomol</i> , Butler Pike, USA
AG490	658407	<i>Calbiochem</i> ,Schwalbach,D
Piceatannol	527948	<i>Calbiochem</i> ,Schwalbach,D
PD98059	513000	<i>Calbiochem</i> ,Schwalbach,D
PD 169316	342300	<i>Calbiochem</i> ,Schwalbach,D
Ly249002	440204	<i>Calbiochem</i> ,Schwalbach,D

7.1.4 Kits

Kit	Bestellnummer	Firma
Annexin-FITC Apoptosekit	65874X	<i>BD Pharmingen</i> , Heidelberg, D

7.1.5 Chemikalien

Substanz	Bestellnummer	Firma
Propidiumjodid	P4170	<i>Biomol</i> ,Hamburg,D

7.1.6 Geräte

Gerät	Bestellnummer	Hersteller
Durchflusszytometer	Epics CL System II Version 3.0	<i>Coulter Electronics</i> , Miami, USA
BioFuge	75005181	<i>Haraeus instruments</i> , Osterode, 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> , Waltham, USA

7.2 Erklärung

Hiermit bestätige ich, Gabriel Grün, bei der Anfertigung der vorliegenden Dissertation keine anderen Quellen als die angegeben verwendet zu haben.

München, den 11.01.11 _____
(Gabriel Grün)

7.3 Danksagungen

Danken möchte ich Priv. Doz. Dr. med. Gerold Meinhardt für die Übernahme der Doktorvaterschaft, die hervorragende Betreuung und die Ermöglichung dieser Arbeit.

Ich möchte Herrn Priv. Doz. Dr. med. Ralf Schmidmaier ganz herzlich für die freundliche Übernahme der Doktorvaterschaft von Herrn Priv. Doz. Dr. med. Gerold Meinhardt danken. Ihm gilt mein ganz besonderer Dank für die intensive Betreuung, die hervorragenden Hilfestellungen und das großartige Engagement zu jeder Zeit.

Danken möchte ich auch Frau Dr. Sonja Mandl-Weber für die Unterstützung bei der Auswertung der Statistik.

Und ganz besonders meinen lieben Eltern für die stetige Unterstützung.