

---

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. M. Reincke

**Molekulare Wirkmechanismen von Bendamustin  
beim Multiplen Myelom:  
Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose**

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

Vorgelegt von  
Leander Gaul

aus  
Daun  
2008

---

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Bertold Emmerich

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Ines Golly

Priv. Doz. Dr. med. Ralf Schmidmaier

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr.  
med. Ralf Schmidmaier

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.2008

---

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden publiziert in:

**Gaul L**, Mandl-Weber S, Baumann P, Emmerich B, Schmidmaier R. Bendamustin induces G2 cell cycle arrest and apoptosis in myeloma cells: the role of ATM-Chk2-Cdc25A and ATM-p53-p21-pathways. (2008), J Canc Res Clin Oncol., **134**(2), 145-53

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	7
<b>2.</b>	<b>Methoden und Zellkultur</b>	
2.1	Zellkultur	11
2.1.1	Zelllinien	11
2.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	11
2.1.3	Zellzahlbestimmung	12
2.2	Lichtmikroskopische Zellmorphologiebestimmung	12
2.2.1	Zytospin	12
2.2.2	Zellfärbung	13
2.2.3	Mikroskopie	13
2.3	Zellproliferationsmessung	13
2.4	Durchflusszytometrische Analysen	14
2.4.1	Apoptosemessung	14
2.4.2	Zellzyklusanalyse	15
2.5	Western Blot	16
2.5.1	Zellyse	16
2.5.2	Gelelektrophorese	17
2.5.3	Blotting	18
2.5.4	Nachweis spezifischer Proteine	18
2.5.5	Membranstripping	19
2.6	Statistik	20
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	
3.1	Bendamustin induziert Apoptose	21
3.1.1	Durchflusszytometrische Apoptosemessung	21

3.1.2	Inhibition von Zellwachstum	24
3.1.3	Aktivierung von Caspase 3	25
3.1.4.	Lichtmikroskopische Bestimmung von Apoptose	27
3.2	Bendamustin induziert einen G2-Zellzyklusarrest	28
3.3	Western Blot Analyse des G2-Checkpoints	32
3.3.1	Inhibition des MPF	32
3.3.2	Aktivierung des ATM-Chk2-Cdc25A-Signalwegs	33
3.3.3	Aktivierung des ATM-P53-P21-Signalwegs	35
3.4.	Synergismus mit dem P38-Inhibitor SB202190	37
3.4.1	SB 202190 potenziert Bendamustin-induzierte Apoptose	37
3.4.2.	SB 202190 hebt den Bendamustin-induzierten G2-Arrest auf	39
3.4.3	Aktivierung von P38 $\alpha$ MAPK durch Bendamustin	40
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>42</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>49</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturliste</b>	<b>51</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>62</b>
7.1	Materialien und Geräte	62
7.2	Danksagung	66
7.3	Lebenslauf	67
7.4.	Erklärung	69

## **Abbildungsverzeichnis**

- 1 Bendamustin
- 2 Bendamustin induziert Apoptose in der AnnexinV/PI-Messung
- 3 Toxizität von Bendamustin über die Zeit
- 4 Inhibition von Zellwachstum
- 5 Aktivierung von Caspase 3
- 6 Zellmorphologie in der Lichtmikroskopie
- 7 Zellzyklusanalyse
- 8 G2-Zellzyklusarrest
- 9 G2-Fraktion im zeitlichen Verlauf
- 10 Veränderungen der G2-Phase-Regulatoren
- 11 G2/M-Signalkaskaden
- 12 Aktivierung des ATM-Chk2-Cdc25A-Signalwegs
- 13 Aktivierung von P53 und P21
- 14 Regulation pro- und antiapoptotischer Signalwege
- 15 SB202190 potenziert Bendamustin-induzierte Apoptose
- 16 SB 202190 hebt den G2-Arrest auf
- 17 Aktivierung von P38
- 18 Aktivierte Signalkaskaden

## **Tabellenverzeichnis**

- 1 Western Blot-Gele
- 2 IC50-Werte

### **1. Einleitung**

Das Multiple Myelom ist ein B-Non-Hodkin-Lymphom mit Infiltration des Knochenmarks durch maligne entartete Plasmazellen.

Mit einem Anteil von 10% aller hämatologischen und ca. 1% aller Malignome insgesamt (Parkin et al., 2005) ist das Myelom eine häufige bösartige Erkrankung.

Die Inzidenz nimmt mit dem Alter zu und liegt in Mitteleuropa bei 4/100000, bezogen auf den deutschen Bevölkerungsdurchschnitt bei 3/100.000 (Lamerz R, 2002).

Häufige Symptome sind Knochenschmerzen, pathologische Frakturen, Anämie, Hyperkalziämie und Niereninsuffizienz.

Knochenläsionen in befallenen Skelettanteilen entstehen durch die lokale Expansion des Plasmazellklons und die Sekretion Osteoklasten aktivierender Faktoren. Auch die in 80% beobachtete, meist normochromnormozytäre Anämie ist Folge einer Verdrängung der Hämatopoese. Die Entwicklung eines sekundären Antikörpermangels resultiert in einer gesteigerten Infektanfälligkeit der Patienten, die Schädigung der Nierentubuli durch Leichtketten und die Hyperkalziämie in einer Niereninsuffizienz.

Die Diagnose des Multiplen Myeloms erfolgt anhand der diagnostischen Trias aus M-Gradient in Serum/Urin, >10% Plasmazellen im Knochenmark und dem Vorhandensein von Endorganschäden (International Myeloma Working Group 2003) in Abgrenzung zur MGUS (monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz mit <10% Plasmazellen und ohne Endorganschäden).

Eine Abschätzung der Prognose ist einheitlich mithilfe der Stadieneinteilung nach dem ISS (International Staging System) anhand der Serumwerte für Albumin und  $\beta$ 2-Mikroglobulin möglich (Greip et al., 2005). Zusätzlich ist der molekulargenetische Nachweis chromosomaler Aberrationen wie

z.B. Deletionen an Chromosomen 13(13q-) oder Translokationen t(4;14)/t(14;16) prognostisch entscheidend (Avet-Loiseau et al., 2002, Terpos et al., 2006).

Unbehandelt beträgt die mediane Überlebenszeit 17 Monate (Osgood EE, 1962).

Seit mehr als 40 Jahren steht mit dem Alkylanz Melphalan ein hochwirksames Medikament zur Verfügung. Melphalan in Kombination mit Prednison (MP) stellte als das „Alexanian-Schema“ lange Zeit den Goldstandard in der Therapie des Multiplen Myeloms dar. Hierunter ließ sich eine signifikante Verlängerung der medianen Überlebenszeit auf 62 (ISS I), 44 (ISS II) und 29 Monate (ISS III) erreichen. Alternativen zu diesem bewährten Schema wie Vincristin + Doxorubicin + Dexamethason (VAD) oder Vincristin + Mitoxantron-Dexamethason (VND) etc. zeigten keine Überlegenheit in klinischen Studien (Cavo et al., 2002, Myeloma trialists´, 1998).

Durch Ergebnisse intensiver Forschung wurden in den letzten Jahren eine Reihe neuer oder bereits bekannter Substanzen in das therapeutische Spektrum aufgenommen. Hierzu gehören der Proteasomeninhibitor Bortezomib und Immunmodulatoren wie Thalidomid und Lenalidomid, deren Wirksamkeit als Monotherapie nach Rezidiv oder Kombinationstherapie in klinischen Studien gezeigt wurde (Mateos et al., 2008, Palumbo et al., 2007, Richardson et al., 2005 u. 2006).

Für ältere Patienten ist eine konventionelle Chemotherapie mit Melphalan, Prednison und Thalidomid dem Standard MP-Schema überlegen (Palumbo et al., 2006, Facon et al., 2007).

Therapie der Wahl für junge Patienten < 65 Jahre ist eine Dosisescalation von Melphalan (HD-CT) mit autologer Stammzelltransplantation (ASCT) (Attal et al., 1996, Child et al., 2003, Feraud et al., 2005). Patienten, die

keine komplette Remission erreichen, profitieren von einer zweiten, intensivierte HD-CT mit ASCT.

Trotz dieser therapeutischen Fortschritte ist eine Heilung der Erkrankung nicht zu erreichen, nahezu alle Patienten versterben an den Folgen sich häufender Rezidive, die als Ausdruck zellulärer Resistenzmechanismen therapielimitierend sind.

Ziel der aktuellen Myelomforschung ist daher weiterhin die Suche nach neuen Substanzen und Kombinationsschemata zur Überwindung bzw. Verzögerung dieser Resistenzmechanismen.

1963 wurde das bifunktionelle Alkylanz Bendamustin in der ehemaligen Deutschen Demokratischen Republik synthetisiert. Ziel war es, die Wirkung der Alkylanzien sowie der Nukleosidanaloga in einer Substanz zu kombinieren (Ozewski et al., 1963). Bendamustin ist chemisch verwandt mit Chlorambucil und enthält, anders als die meisten anderen Substanzen, zwei funktionelle Gruppen: Die N-Lost-Gruppe als charakteristisches Merkmal der meisten Alkylanzien ist gekoppelt an einen, der Gruppe der Purinanaloga eigenen, Benzimidazolring (Abb. 1). Der Butanol-Hydrochlorid-Seitenkette verdankt die Substanz ihre Wasserlöslichkeit. Vermutet wird, dass die alkylierende Komponente die Wirkung der Substanz dominiert, über die Rolle des Benzimidazolringes herrscht weiterhin Unklarheit.

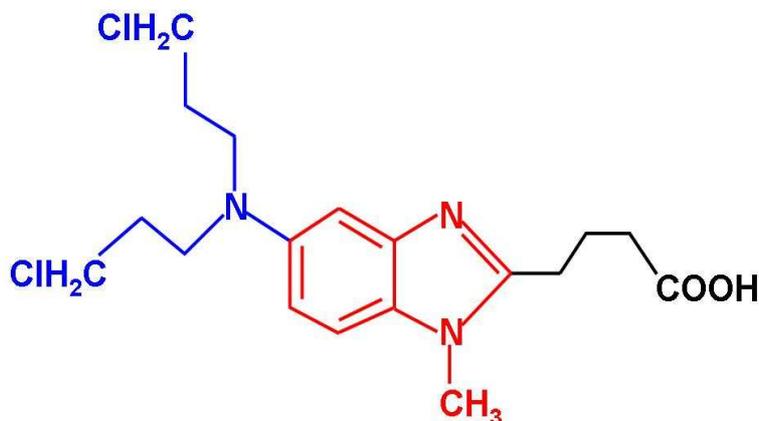
Seit 1972 war Bendamustin in der DDR unter dem Namen Cytostasan im Handel und ist derzeit zur Therapie des M. Hodgkin, vieler Non Hodgkin-Lymphome, z.B. der CLL, des Multiplen Myeloms sowie des Brustkrebs zugelassen. Seine klinische Effektivität hat Bendamustin in zahlreichen Phase I/II-Studien und einer aktuellen Phase III-Studie unter Beweis gestellt (Herold et al., 2006, Heider et al., 2001, Knop et al., 2005, Pönisch et al. 2006, von Minckwitz et al., 2001).

Dabei zeichnet sich die Substanz durch gute Wasserlöslichkeit und ein mildes Nebenwirkungsprofil aus. Interessante Daten belegen eine nur geringe Kreuzresistenz mit anderen Alkylanzien wie Melphalan, Cyclophosphamid, Cisplatin und Carmustin (Strumberg et al., 1999) und eine komplexere Interaktion mit der DNA als konventionelle Alkylanzien (Leoni et al., 2003 u. 2008).

Leider liegen trotz bereits überzeugender klinischer Studienergebnisse kaum experimentelle Ergebnisse zur Wirkungsweise von Bendamustin beim Multiplen Myelom vor.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Zytotoxizität Bendamustins auf Myelomzelllinien anhand eines Zellmodells zu charakterisieren.

Insbesondere galt es, Erkenntnisse über die in der Zelle involvierten Signalwege zu gewinnen und auf deren Basis Substanzen zur molekular gezielten Kombinationstherapie mit Bendamustin zu identifizieren und zu testen.



**Abb. 1 Bendamustin.** Dargestellt ist die chemisch-funktionelle Struktur Bendamustins. Die N-List-Gruppe als Merkmal der Alkylanzien ist blau, der Nukleosidanaloga-eigene Benzimidazolring rot hervorgehoben. Schwarz: Butanol-Hydrochlorid-Seitenkette

## **2. Methoden**

### **2.1 Zellkultur**

#### **2.1.1 Zelllinien**

Die Myelomzelllinien U266, OPM-2, NCI-H929 und RPMI-8226, sowie die Stromazelllinie HS-5 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% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Es wurde kein Streptomycin/Penicillin verwendet. Die Zellen wurden bis zu einer Dichte von etwa 5x10<sup>5</sup> Zellen/ml kultiviert; dann wurde die Kultur geteilt, ein Teil davon verworfen, und der andere Teil mit Medium auf eine Zellkonzentration von 20x10<sup>4</sup> Zellen/ml verdünnt und weiterkultiviert. Die Zellvitalität vor Beginn eines Experimentes wurde mikroskopisch mittels Trypanblaufärbung sichergestellt.

#### **2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Zu Beginn des Einfrierens wurde ein Einfriermedium hergestellt, welches aus 5ml RPMI1640, 3ml FCS und 2ml DMSO bestand. Dieses wurde bis zum Abfüllen in die Kryoröhrchen auf Eis gelagert. Für das Einfrieren von Zellen wurden 10<sup>7</sup> Zellen abzentrifugiert, zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 4,5ml Kulturmedium (RPMI1640 + 20% FCS) resuspendiert. In jedes der Kryoröhrchen wurden jeweils 0,9ml der Zelllösung und 0,9ml des Einfriermediums gegeben und sofort für 6 Stunden bei -20C° gelagert. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden bei -80C° und schließlich bei 196C° tief gefroren. Für das Auftauen der Zellen wur-

den die Kryoröhrchen aus dem Gefrierschrank genommen, 2 Minuten bei Raumtemperatur angewärmt und schließlich in 37C° warmes Kulturmedium überführt. Es folgten zwei Waschvorgänge mit Kulturmedium. Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml in Zellkulturflaschen überführt.

### **2.1.3 Zellzahlbestimmung**

Dafür wurden 50µl einer Zelllösung mit 50µl der Trypanblaulösung versetzt, mit Hilfe des Vortexgeräts gemischt, in Neubauer-Zählkammern gegeben und unter dem Mikroskop die Zellzahl pro ml ausgezählt.

## **2.2 Lichtmikroskopische Zellmorphologiebestimmung**

Zur optischen Charakterisierung der Zelllinien wurden diese mittels Zytopspin-Verfahren homogen auf Objektträger aufgetragen und anschließend nach Pappenheim angefärbt.

### **2.2.1. Zytospin**

Nach Kultivieren in 6-well plates über 48h entweder in Medium mit oder ohne Bendamustin folgte die Entnahme von je ca. 100 000 Zellen in Medium. Nach Abzentrifugation des Mediums wurden diese in 200µl kaltem PBS suspendiert. Die Objektträger wurden nun vorerst mit je 100µl Albumin pro Kammer bestückt und bei 1000 U/min für 10 min zentrifugiert, um dieses gleichmäßig zu verteilen. Nun wurden je 100µl der Zellsuspension in die Spin-Kammern pipettiert und erneut bei 1000 U/min für 5min zentrifugiert. Anschließend wurden die Objektträger für 15 min an der Luft getrocknet.

### **2.2.2. Zellfärbung**

Die für wenige Minuten an der Luft getrockneten Präparate wurden über 4 Minuten mit Methanol fixiert. Anschließend erfolgte die Färbung mit May-Grünwaldlösung. Nun wurden die Objektträger 2mal je 1 Minuten mit gepuffertem Aqua dest. (dH<sub>2</sub>O) überschichtet. Für weitere 15 Minuten erfolgte die Färbung in Giemsa-Lösung. Diese wurde letztendlich mit Aqua dest. abgespült und die Präparate an der Luft getrocknet.

### **2.2.3 Mikroskopie**

Die Objektträger wurden mit einem Öltropfen versehen und unter einem Zeiss-Axioplan Mikroskop bei 40-100-facher Vergrößerung mikroskopiert. Ein repräsentativer Bildausschnitt wurde ausgewählt und mittels ProgRes C10 plus-Kamerasystem fotografiert.

### **2.3 Zellproliferationsmessung**

In den Mitochondrien vitaler Zellen erfolgt die Umsetzung des roten Tetrazoliumsalzes WST-1 zu orange-gelbem Formazan. Die Orangefärbung und damit die Zunahme der optischen Dichte der Zellsuspension kann bei einer Wellenlänge von 420-480nm im Photometer bestimmt werden. Da avitale Zellen den Farbstoff nicht umsetzen können, korreliert die Anzahl vitaler Zellen mit einer Extinktionserhöhung bei 450nm. Die Zellen wurden nach Zugabe von Bendamustin in einer Zelldichte von  $1 \times 10^4$ /ml in 96-Microwellplatten im 6-fach Ansatz kultiviert. Die Inkubationszeit betrug unter Standardbedingungen im Brutschrank 24, 48 und 72h. Es wurde 10µl des WST-1 pro well pipettiert und die Zellen wiederum für 2h inkubiert, anschließend erfolgte die Analyse bei 450 gegen 630 nm in einem Multiwell-Photometer.

Die Analyse beinhaltete eine Messung von Kontrollen (Färbung nicht behandelte Zellen) und Blanks (Färbung von Medium).

### **2.4 Durchflusszytometrische Analysen**

#### **2.4.1 Apoptosemessung**

In vitalen Zellen besteht eine ausgeprägte Asymmetrie der Zellmembran. Phosphatidylserin kommt in vitalen Zellen nur auf der Innenseite der Zellmembran vor. Zu Beginn der Apoptose verliert die Zellmembran ihre Asymmetrie und es kommt es zu einem „Flip-Flop“ der Membranlipide, d.h. Phosphatidylserin wird auch auf die Außenseite der Zellmembran verschoben. AnnexinV vermag an der Zelloberfläche an dieses Phosphatidylserin zu binden. Durch Koppelung von AnnexinV mit Fluorescein-thioisocyanat (FITC), welches von einem Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488nm angeregt werden kann, wird die Emission des FITC-Moleküls bei einer Wellenlänge von 518nm im Durchflusszytometer gemessen. Verliert die Zelle des Weiteren die Membranintegrität, so kann Propidiumjodid (PI), ein DNA-Farbstoff, die Zellmembran durchdringen und sich an DNA anlagern. PI ist im Gegensatz zu FITC ein nach optischer Laseranregung nicht grün sondern rot fluoreszierender Farbstoff. PI wird bei 488nm angeregt und emittiert bei 617nm. Durch Kombination der beiden Färbungen können 2 Stadien des Zelluntergangs beschrieben werden : 1. Frühe Apoptose: die Zellen sind AnnexinV positiv und PI negativ, 2. Späte Apoptose: die Zellen sind sowohl für AnnexinV als auch für PI positiv. Im Einzelnen wurden  $10^6$  Zellen bei 1500U/min, 8°C, 6 Minuten lang zentrifugiert, nach Abschütten des Überstandes zweimal mit kaltem PBS gewaschen und dann in Annexin

Binding Buffer gelöst, um eine finale Zellkonzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml zu erhalten.

Binding Buffer: -10 mM Hepes/NaOH, pH 7,4

-140 mM NaCl

-2,5 mM  $\text{CaCl}_2$

Nach dem Transfer von 100  $\mu\text{l}$  in ein neues Zytometerröhrchen (Sarstaedt) wurden 5  $\mu\text{l}$  Annexin-FITC und 10  $\mu\text{l}$  PI (Propidiumjodid) hinzu gegeben und bei Raumtemperatur im Dunkeln für 15 min inkubiert. Nach Zugabe von 400 $\mu\text{l}$  Binding Buffer wurde die Analyse innerhalb einer Stunde durchgeführt. Zur Analyse wurden die Kanäle FL1 (Annexin – FITC) und FL3 (Propidiumjodid) im Epics Coulter XL Durchflusszytometer verwendet.

### **2.4.2 Zellzyklusanalyse**

Es wurden  $10^6$  Zellen bei 1500 U/min für 6 Minuten zentrifugiert, das Medium verworfen und die Zellen in 1ml 70% Ethanol suspendiert. Anschließend lagerten wir die Röhrchen zur Fixierung bei  $2-6^\circ\text{C}$  im Kühlschrank über Nacht. Am nächsten Morgen wurde das Ethanol abzentrifugiert und verworfen, die Zellen darauf 2 mal mit je 1 ml eiskaltem PBS gewaschen und in 1 ml resuspendiert. Nun erfolgte die Zugabe von 25 $\mu\text{l}$  RNase A (10mg/ml stock) sowie 40 $\mu\text{l}$  PI (1mg/ml stock) und die Lagerung unter Lichtschutz für 30 Minuten. 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.

### 2.5 Western Blot

#### **Zellyse**

$10^7$  Zellen wurden 48h in Medium (RPMI 1640 + 20 % FCS) inkubiert und dann entsprechend ihrer Adhäsion an den Kulturflaschen geerntet. Die Zellsuspension wurde bei 1500U/min, 8°C, 6 Minuten lang zentrifugiert, nach Abschütten des Überstandes zweimal mit kaltem PBS gewaschen und dann in 1ml kaltem PBS resuspendiert. Diese Zelllösung wurde nochmals bei 2500U/min 6 Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend folgte die Zugabe von 100µl Zellysepuffer:

Zellysepuffer: dH<sub>2</sub>O (8,18ml), Tris (250µl, 1M, pH7,6), NaF(100µl, 1M), EDTA (200µl, 0,5M), Aprotinin (50µl, 2,1 mg/ml) Leupeptin (20µl, 5 mg/ml), PMSF (100µl, 100mM), Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (100µl, 100mM).

Nach der Homogenisierung der Zellen im Homogenisator wurden 10µl NP-40 10% (IGEPAL-CA 630) dazugeben und die Proben bei 4°C 15 Minuten geschwenkt. Danach erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration. Hierfür wurde zu 2µl Proteinlösung 800µl dH<sub>2</sub>O und 200µl eines Jod-Färbeagens (Bio-Rad®) zugegeben. Die Proteinkonzentration wurde im Photometer gegen einen Nullwert bestimmt.

### Gelelektrophorese

Im Anschluß wurden die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben durch Zugabe von Lysepuffer einander angeglichen. Die Proteinlösung wurde mit Loading Buffer im Verhältnis 1:4 verdünnt und bei 95°C für fünf Minuten erhitzt, anschließend bei 6000 U/min zwei Minuten lang abzentrifugiert und auf Polyacrylamidgele (12% und 15% Acrylamid) aufgetragen:

Gel [%]	8	10	12	15
dH <sub>2</sub> O [ml]	6	5,2	4,3	3
Tris 1,5M pH8,8 [ml]	3,15	3,15	3,15	3,15
Acrylamid [ml]	3,3	4,15	5	6,3
10% APS [µl]	125	125	125	125
Temed [µl]	7,5	7,5	7,5	7,5

**Tab.1 Western Blot-Gele**

Die Gelkammern wurden zu  $\frac{3}{4}$  mit der jeweiligen Gellösung gefüllt, anschließend mit 500µl Isopropanol überschichtet und 30 Minuten stehen gelassen. Nach einer halben Stunde wurde das Isopropanol abgegossen und die Gelkammern viermal mit Aqua dest. gereinigt und getrocknet. Danach erfolgte die Zugabe des Stacking Gels:

- 6,4ml dH<sub>2</sub>O, 2,7ml Tris 1,5M pH8,8; 1,35ml Acrylamid; 125µl APS 10%; 12,5µl Temed.

Nach Zugabe des Stacking Gels wurde die Kämme bis zur Polymerisierung (45 Minuten) in die Kammern gesteckt. Die Gele wurden anschließend in die Elektrophoresebehälter gestellt und diese mit Running Buffer gefüllt. Nach Entfernung der Kämme wurden die Geltaschen gründlich mit Running Buffer gespült und mit 20µl Proteinlösung bzw. 10µl Marker gefüllt.

Die angelegte Spannung betrug, solange sich das Protein im Stacking Gel befand, 100V, nach Erreichen des Separation Gels wurde sie auf 150V erhöht.

### **Blotting**

Die nun nach dem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine wurden auf PVDF-Membranen übertragen.

Zum Transfer der Proteine auf die Membranen wurden diese in Methanol 100%, ddH<sub>2</sub>O (doppelt destilliert), und Transfer Buffer getränkt. Anschließend wurden die Gele auf die Membranen zwischen Filterpapiere und Schwämme gelegt, in die Transferbehälter gesetzt und bei 23V über 12 Stunden bei 8°C inkubiert.

- Transfer Buffer: 25 mM Tris-HCl  
192 mM Glycin  
0,037 % (w/v) SDS  
20% (v/v) Methanol

### **Nachweis spezifischer Proteine**

Der Nachweis spezifischer Proteine basiert auf einem mehrschrittigen Verfahren, bei dem ein Primärantikörper an das entsprechende Protein auf der Membran bindet, ein Sekundärantikörper wiederum an dem Primärantikörper bindet, welcher mit einer Peroxidase konjugiert ist und so mittels Chemolumineszenz nachgewiesen werden kann. Im Einzelnen wurden die Membranen zuerst luftgetrocknet. Um unspezifische Bindungen der spezifischen Antikörper zu verringern, wurden die Membranen 60 Minuten lang mit einer Magermilchpulverlösung (5g Magermilchpulver, aufgelöst in 100ml PBST (1l PBS und 0,5ml Tween20)) inkubiert, und anschließend

viermal kurz mit PBST gespült. Daraufhin wurden die Membranen 10 Minuten lang mit PBST gewaschen.

PBS-Puffer: NaCl 8 g

KCl 0,2 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24g

H<sub>2</sub>O 1l

Der primäre Antikörper (Liste der verwendeten Antikörper siehe Anhang) wurde 1:1000 mit PBST verdünnt und 60 Minuten lang auf einem Schüttler mit den Membranen inkubiert. Anschließend wurden nicht gebundene Antikörper mit PBST (4-mal für jeweils 10 Minuten) abgewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde 1:2000 mit Blocking-Lösung verdünnt und für 60 Minuten auf dem Schüttler (10/min) auf die Membranen geben. Die Antikörper-Milchpulver-Lösung wurde mit PBST (siehe oben, wonach wieder viermal 10 Minuten lang) abgewaschen. Anschließend wurden jeweils 3 ml der 2 ECL Lösungen auf die Membranen geben und nach kurzer Zeit die Chemolumineszenz der Banden mit Röntgenfilmen festgehalten. Für den Nachweis der entsprechenden Phosphoantikörper benutzten wir statt PBS, welches durch die enthaltenen PO<sub>4</sub>-Gruppen zu Interferenzen führen würde, TBS.

TBS-Puffer: NaCl 8 g

Tris 2,42 g

H<sub>2</sub>O 1l

### **Membran-Stripping**

Die Antikörper wurden mittels Stripping-Puffer von der Membran entfernt, so dass mehrere Antikörper-Overlays mit jeder Membran durchgeführt werden konnten.

Stripping-Puffer: Tris 7,56g

SDS 20 g

H<sub>2</sub>O 1 l

Hierbei wurden die Membranen im Stripping Puffer sowie 5% Mecoethanol 35 Minuten lang bei einer Wasserbadtemperatur von 57°C inkubiert und anschließend in insgesamt drei Waschvorgängen mit PBS-T gespült und nach 2 Waschschritten mit 10 – 15% Milchpuffer geblockt.

Anschließend wurde der Nachweis spezifischer Proteine wie oben geschildert durchgeführt.

### **2.6 Statistik**

In den Abbildungen werden die Mittelwerte mit den Standardabweichungen gezeigt. Die deskriptive Statistik wurde mittels Excel ausgewertet und die statistische Signifikanz mit dem Kruskal-Wallis-Test berechnet.  $P < 0.05$  wurde als statistisch Signifikant angesehen.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Bendamustin induziert Apoptose**

##### **3.1.1 Durchflusszytometrische Apoptosemessung**

Erstes Ziel dieser Arbeit war es, experimentelle Daten zu der Zytotoxizität Bendamustins auf die vier Myelomzelllinien NCI-H929, OPM-2, RPMI-8226 und U266 zu erheben. Entsprechende Daten bezüglich der IC<sub>50</sub> der Substanz existieren bislang nur für die CLL (Schwänen et al 2002), nicht jedoch für das Multiple Myelom. Auf Versuche mit primären Patientenzellen verzichteten wir bewusst, da die klinische Praxis und Wirksamkeit von Bendamustin bereits in zahlreichen Studien belegt ist.

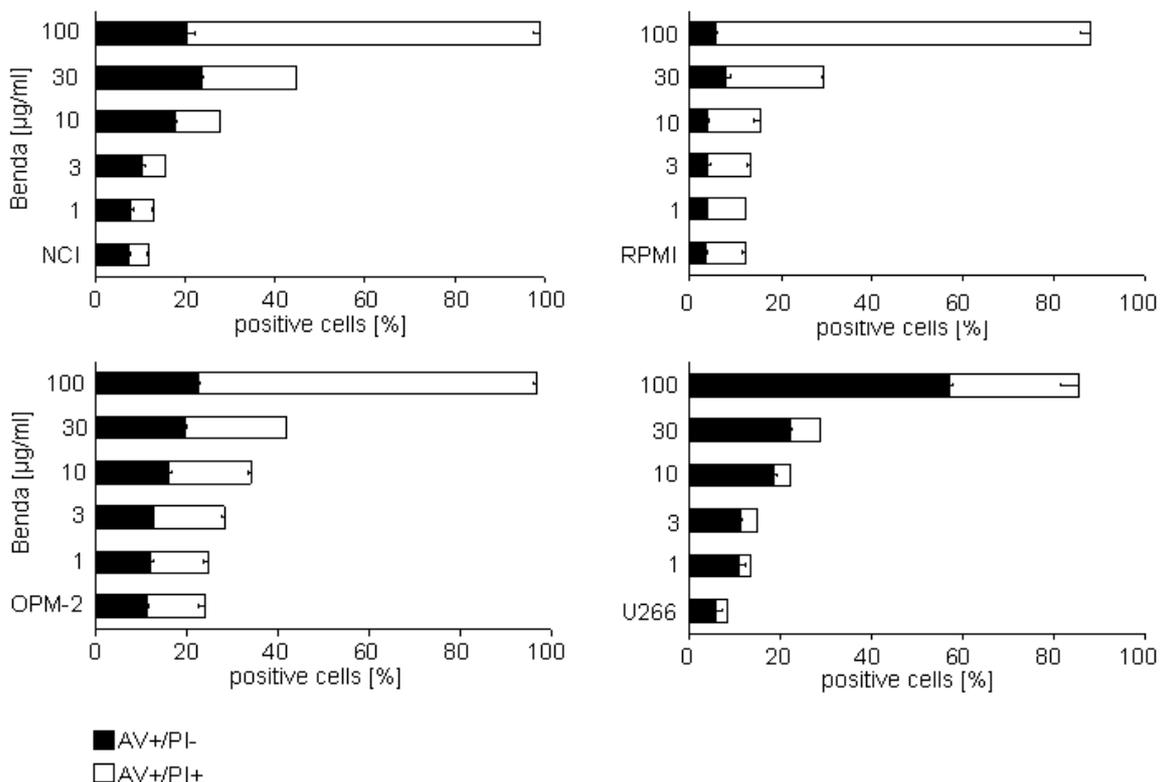
Es wurden die 4 Zelllinien in einer Konzentration von  $0,5 \times 10^5$  Zellen/ml in 6-well Platten kultiviert. Bendamustin wurde entsprechend seiner guten Wasserlöslichkeit in Aqua ad iniectabilia als 2,5 µg/ml Lösung hergestellt und in die Zellsuspension pipettiert. Hier sei erwähnt, dass Aqua ad iniectabilia im Vergleich zu Lösungsmitteln lipophiler Substanzen (z.B. Ethanol, DMSO) keinerlei Eigentoxizität besitzt, somit die Gefahr falsch niedriger IC<sub>50</sub>-Werte als gering zu erachten ist. In Anlehnung an unsere laboreigenen Experimente mit Melphalan wurde eine Inkubationszeit von 48h gewählt, jedoch auch Parallelversuche mit 24h und 72h durchgeführt. Die Zielkonzentrationen betragen 1, 3, 10, 30, 100 µg/ml.

Das Zellmedium wurde in regelmäßigen Abständen auf Farbumschlag kontrolliert und die Zellvitalität lichtmikroskopisch beurteilt. Nach entsprechender Inkubationszeit wurden die Zellen je nach Adhärenz an dem Boden der Kulturschalen mit der Pipette durch mehrmaligen Spülen, bzw. unter Zuhilfenahme des Zellscrapers geerntet. Anschließend erfolgte die Be-

## Ergebnisse

stimmung der Apoptose am FACS mittels AnnexinV (AV) und Propidium Iodid (PI).

Phosphatidylserin kommt in der vitalen Zelle ausschließlich an der inneren Seite der Zellmembran vor. Wird in der Zelle die Apoptose eingeleitet, so wechselt Phosphatidylserin bereits in der Frühphase auf die Außenseite der Zellmembran, wo es als Bindungspartner für AnnexinV zugänglich ist. Erst im weiteren Verlauf kann sich auch PI durch Verlust der Zellmembranintegrität an die DNA anlagern. Somit repräsentieren beide Apoptosemarker zeitlich unterschiedliche Apoptosestadien.



**Abb. 2 Bendamustin induziert Apoptose in der AnnexinV/PI-Apoptosemessung.** Die 4 Zelllinien NCI-H929 (NCI), OPM-2, RPMI-8226 (RPMI) und U266 wurden über 48 mit Bendamustin (Benda) 1, 3, 10, 30, 100µg/ml inkubiert. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch. Der Prozentsatz der Zellen in der frühen (AV+/PI-) und späten (AV+/PI+) Apoptose wurde bestimmt.

Eine frühe Apoptose (AnnexinV+/PI-) von bis zu 30% der Zellen war bereits in niedrigen Konzentrationen von 10µg/ml Bendamustin zu beobachten. Die Zelllinien unterschieden sich geringfügig in ihrem Ansprechen, NCI-H929-Zellen zeichneten sich durch eine besondere Sensitivität auf Bendamustin aus, während bei U266 ein langsamerer Anstieg der Apoptose zu verzeichnen war. Auch befanden sich ca. 70% der U-266 selbst bei maximalen Konzentrationen noch in der frühen Apoptose, während die 3 restlichen Zelllinien bereits eine Mehrzahl an PI positiven Zellen, als Zeichen der späten Apoptose, aufwiesen. Keine der getesteten 4 Zelllinien zeigte jedoch eine ausgeprägte Resistenz gegen die Substanz (Abb.2).

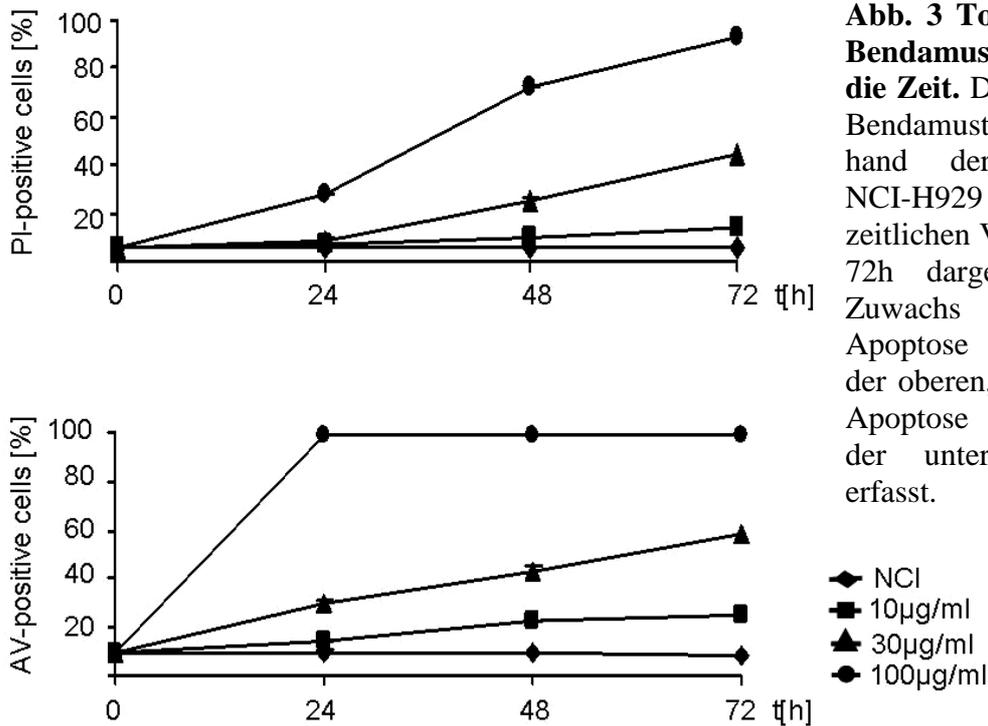
Die IC50-Werte (Tab. 2) errechneten sich durch Interpolieren aus der jeweiligen Toxizitätskurve und sind damit Näherungswerte. Zu ihrer genauen Bestimmung wurden im Bereich der IC50 die Apoptose (AnnexinV) in Schritten von 10µg/ml bestimmt, woraus sich ein annähernd linearer Kurvenabschnitt ergibt.

Zelllinie	IC-50 Wert (µg/ml)
NCI-H929	30
OPM-2	60
RPMI-8226	35
U266	65

**Tab. 2 IC-50-Werte**

Im Weiteren galt es, die Toxizität Bendamustins über die Zeit zu erfassen. Hierzu inkubierten wir die beiden Zelllinien NCI-H929 und OPM-2 mit der Substanz in den entsprechenden Konzentrationen von 1-100µg/ml, gemessen wurde die Apoptose nach 24h, 48h und 72h.

Es bestand ein linearer Zusammenhang zwischen Toxizität und Inkubationszeit. Einzig bei der maximalen Versuchskonzentration von 100 µg/ml befanden sich nahezu sämtliche Zellen bereits nach 24h in der Apoptose.



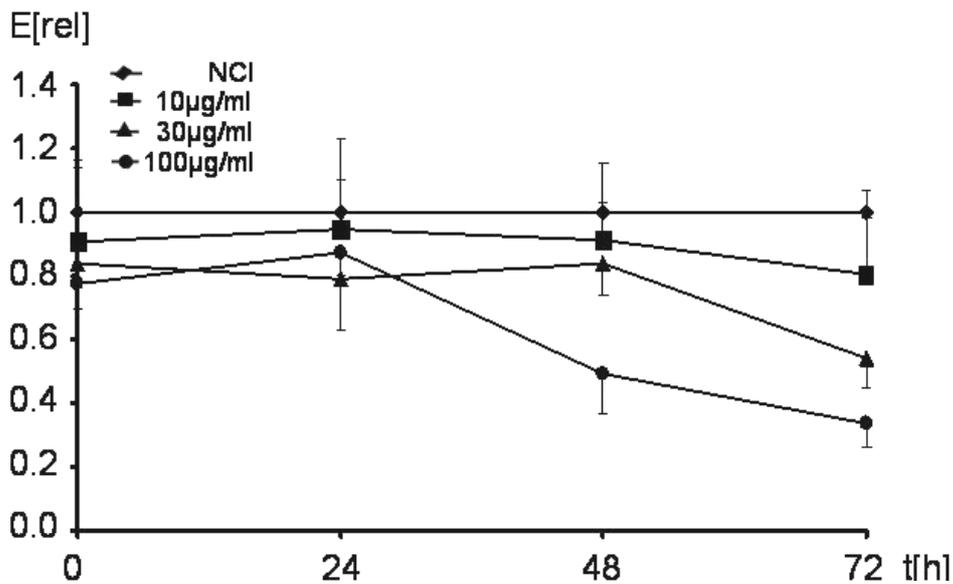
**Abb. 3 Toxizität von Bendamustin über die Zeit.** Die Toxizität Bendamustins ist anhand der Zelllinie NCI-H929 (NCI) im zeitlichen Verlauf über 72h dargestellt: der Zuwachs der späten Apoptose (PI+) ist in der oberen, der frühen Apoptose (AV+) in der unteren Grafik erfasst.

### 3.1.2 Inhibition von Zellwachstum

Von besonderem Interesse war weiterhin die Klärung der Frage, ob Bendamustin in geringeren Konzentrationen das Zellwachstum hemmt, ohne bereits apoptotische Pathways zu aktivieren. Hierzu wurden die Zelllinien NCI-H929 und OPM-2 in 96-Well-Platten in den Konzentrationen 1, 3, 10, 30, und 100 µg/ml Bendamustin inkubiert. Nach 0, 24, 48, und 72 Stunden erfolgte die Inkubation mit WST-1-Reagenz für 2 Stunden sowie die anschließende Bestimmung der Extinktion als Korrelat des Umsatzes ans Reagenz mittels ELISA-Reader. In niedrigen Konzentrationen von 1 und 3 µg/ml war keine Proliferationsinhibition zu beobachten, der zeitliche Verlauf entsprach dem Verlauf der Kontrollmessung. Ab 10 µg/ml aufwärts

war eine deutliche Abnahme der Extinktion sichtbar (Abb. 4), diese widerspiegelt den Verlauf der Apoptose aus Abschnitt 3.1.

Zusammengefasst zeigte sich zwar ein Minderumsatz an WST-Reagenz, diesem zugrunde lag jedoch die durch die Apoptose bedingte Abnahme der Zellzahl.



**Abb. 4 Inhibition von Zellwachstum.** Die photometrische Extinktion (E) als Korrelat für den Umsatz an WST-Reagenz ist anhand der Zelllinie NCI-H929 über 72 h gezeigt. Die Extinktion der Kontrolle (NCI) wurde gleich 1 E[rel] gesetzt. Die Konzentrationen 1/3 µg/ml wurden wegen Überlagerung mit der Kontrollkurve nicht dargestellt.

### 3.1.3 Aktivierung von Caspase 3

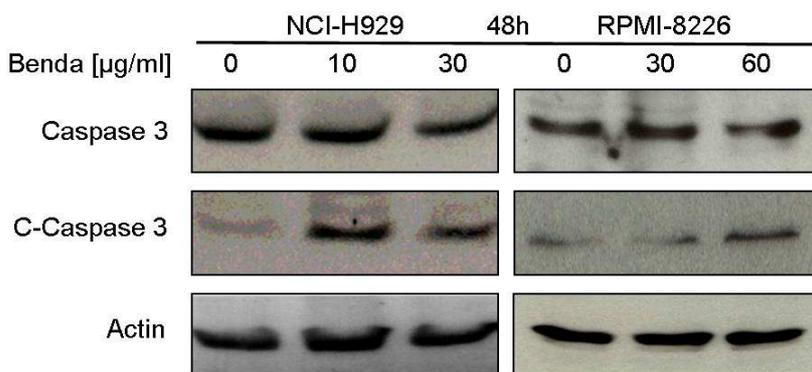
Die Anzahl der proapoptotischen Signalwege in der Zelle ist groß und deren Kommunikation untereinander komplex. Die Endstrecke der meisten dieser Signalwege wird jedoch durch Aktivierung der Caspasen vermittelt. Hierbei spielt Caspase 3 eine essentielle Rolle. Ihre Aktivierung geschieht durch eine Spaltung des Ausgangsmoleküls von 31/33 kD in kleinere akti-

ve Untereinheiten (17 und 11 kD). Diese Untereinheiten, die so genannte Cleaved Caspase, lassen sich im Immuno Blot durch spezifische Antikörper detektieren.

NCI-H929 und RPMI-8226 Zellen wurden in 30ml Kulturmedium und einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen mit 10/30 $\mu$ g/ml und 30/60 $\mu$ g/ml Bendamustin über 48h inkubiert. Nach Ernten der Zellen führten wir einen Western-Blot durch. Wir benutzten spezifische Antikörper gegen Caspase 3 und Cleaved-Caspase 3, als Kontrolle wählten wir einen Aktinantikörper.

Die Auswahl der Konzentrationen berücksichtigte mehrere Faktoren. Zum einen mussten sie hoch genug gewählt sein, um einen ausreichenden Anteil apoptotischer Zellen zu erhalten. Zum anderen jedoch war eine große Menge an Zellen und Protein zur Detektion nötig, was die Auswahl zu hoher Konzentrationen unmöglich machte.

Aus Abbildung 5 ist ersichtlich, dass es bei zunehmender Konzentration zu einer Abnahme an Caspase 3 bei gleichzeitig steigender Menge an Cleaved-Caspase 3 als Zeichen der Aktivierung kam.



**Abb. 5 Aktivierung von Caspase 3.** NCI-H929 und RPMI-8226-Zellen wurden über 48 Stunden in Serum oder Bendamustin 10/30 bzw 30/60  $\mu$ g/ml inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis von

bzw aktivierter Caspase 3 anhand spezifischer Antikörper im Western blot. Der Cleaved-Caspase Antikörper (C-Caspase3) bindet an die größere 17kD Untereinheiten, der Caspase 3 Antikörper nur an das inaktive 31kD Molekül.

### 3.1.4 Lichtmikroskopische Bestimmung von Apoptose

Ein besonderes Augenmerk galt der Frage, ob die durch Bendamustin induzierten Apoptose über eine initiale „überstürzte“ Mitose der Zellen eingeleitet wird.

In der Literatur wird dieser Mechanismus mit dem Begriff der „Mitotischen Katastrophe“ bezeichnet und ist als Ursache einer durch verschiedene Chemotherapeutika ausgelösten Apoptose beschrieben worden. Hierbei kommt es vorübergehend zu einer vermehrten überstürzten Mitose der Zellen mit Aktivierung des Spindelapparates. Aufgrund dieses überstürzten Eintritts der Zellen in die Mitose mit fehlerhafter DNA wird als Resultat intrazellulärer Erkennungsmechanismen die Apoptose eingeleitet.

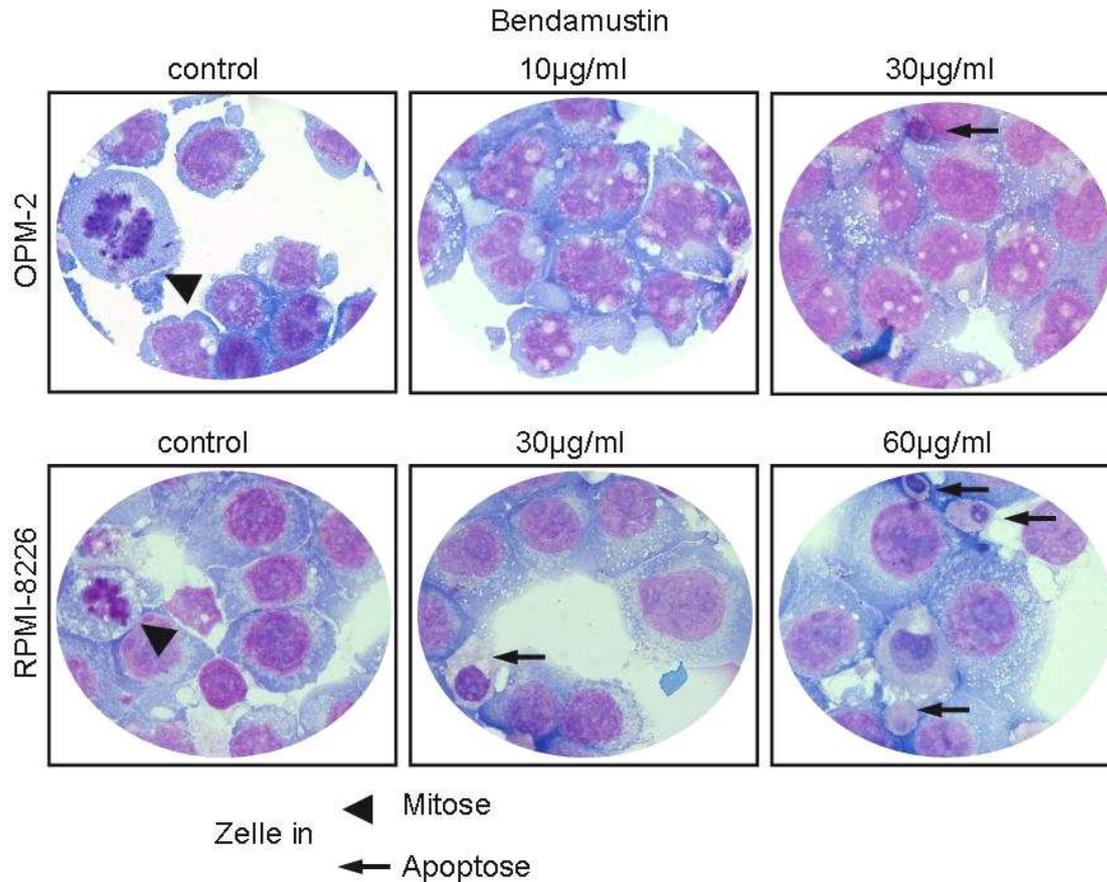
Um diese Frage zu klären, wurden die beiden durch ihre interzellulär homogene Morphologie geeignetsten Zelllinien RPMI-8226 und OPM-2 entweder ohne oder mit 30/60 (RPMI-8226) und 10/30 (OPM-2)  $\mu\text{g/ml}$  Bendamustin inkubiert, nach 48h geerntet, und mithilfe des Zytospin-Verfahrens homogen auf Objektträger aufgetragen.

Als Zellfärbung wählten wir unsere Standard-Färbung für Knochenmarkausstriche, die Pappenheim-Färbung.

Das Augenmerk der lichtmikroskopischen Diagnostik galt der Anzahl mitotischer Figuren (Pfeilköpfe) und der Anzahl apoptotischer Zellkörper (lange Pfeile, Abb. 6).

Wir verzeichneten eine unter steigenden Konzentrationen abnehmende Anzahl in Mitose befindlicher Zellen bei einer Zunahme apoptotischer Zellkörper. Gleichzeitig zeigte sich eine deutliche Zunahme der intrazellulären Granula.

Lichtmikroskopisch bestand somit bei nachgewiesener Apoptose der Zellen kein morphologischer Hinweis auf eine stattfindende „Mitotische Katastrophe“.



**Abb. 6: Zellmorphologie in der Lichtmikroskopie.** Eine Anzahl von  $10^5$  Zellen wurde mittels Zytospinverfahren auf Objektträger aufgetragen und repräsentative Abschnitte nach Pappenheimfärbung fotografiert. Zellen in Mitose sind durch Pfeilspitze, apoptotische Zellkörper durch lange Pfeile gekennzeichnet.

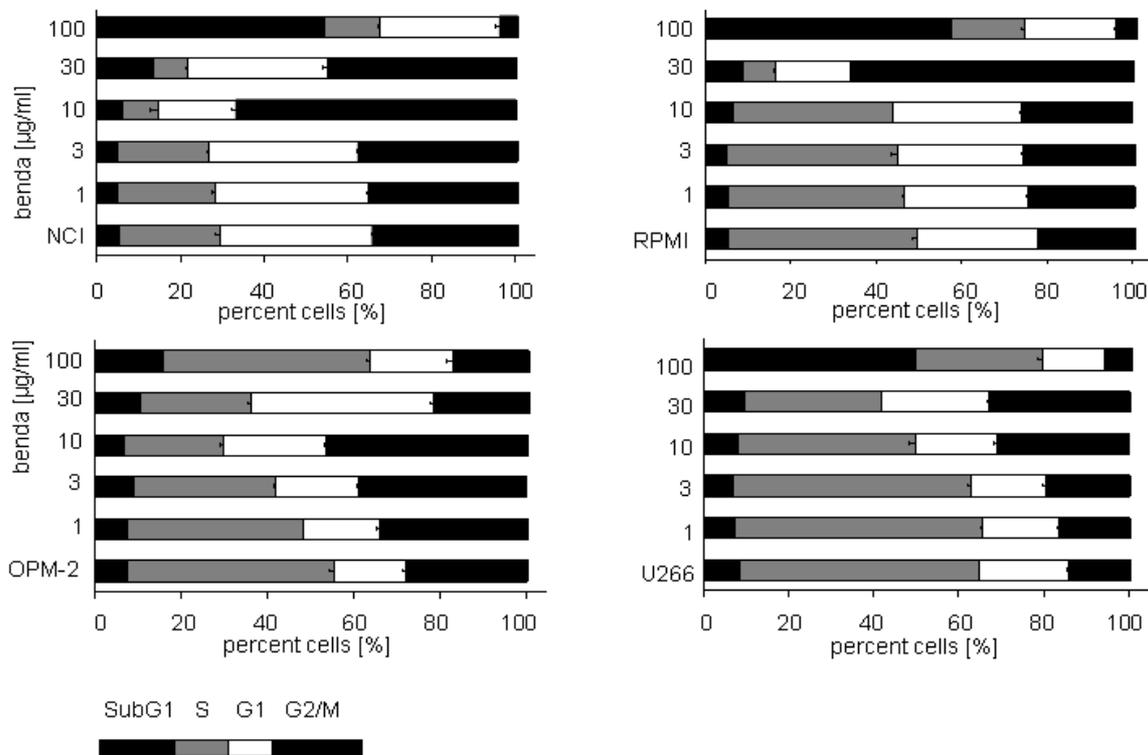
### 3.2 Bendamustin induziert einen G2/M-Zellzyklusarrest

Die Interaktion der meisten Alkylanzien mit der DNA der Zelle geschieht durch die Ausbildung unphysiologischer Doppel- bzw. Einzelstrangbindungen, die zu einem Synthesestop der DNA führen. Ursache hierfür ist eine Alkylierung der Basen. Die Wechselwirkung Bendamustins mit der DNA beruht aufgrund seiner alkylanzientypischen N-Lost Seitenkette auf dem gleichen Prinzip. Dennoch konnte gezeigt werden, dass die durch

Bendamustin erzeugten Verknüpfungen der DNA-Stränge stabiler sind und ihre Entfernung durch zelluläre Reparaturmechanismen langsamer stattfindet als die anderer Substanzen (Strumberg et al., 1996).

Die Reparaturmechanismen der Zelle spielen sich in 2 Zellzyklusphasen ab, der G1 und der G2-Phase. Da wir die Wirkung der Substanz auf diese zellulären Checkpoints als wahrscheinlichen Wirkmechanismus vermuteten, führten wir für alle vier Zelllinien eine Zellzyklusanalyse durch.

Hierzu wurden die Myelomzellen entsprechend der Versuchsbedingungen zur Apoptosebestimmung mit Konzentrationen von 1-100µg/ml Bendamustin über 48 Stunden behandelt. Anschließend ernteten wir die Zellen, inkubierten diese, wie im Methodenteil beschrieben, mit RNase und Propidium Iodid. Die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer.

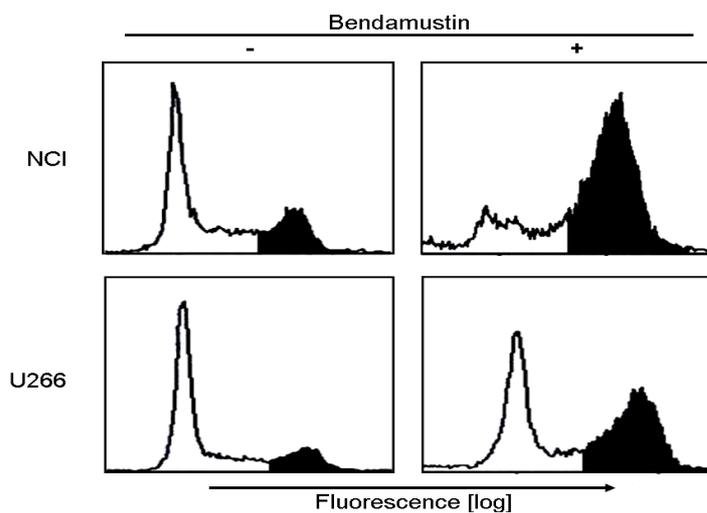


**Abb. 7 Zellzyklusanalyse der 4 Myelomzelllinien.** Die 4 Myelomzelllinien wurden in Konzentrationen von 1-100µg/ml Bendamustin über 48h inkubiert und eine Zellzyklusanalyse am Durchflusszytometer durchgeführt.

Alle 4 Zelllinien zeigten mit ansteigenden Konzentrationen eine wachsende SubG1-Fraktion als Zeichen der Apoptose. Zusätzlich fiel auf, dass sich bei submaximalen Dosen von 10-30µg/ml ein großer Anteil der Zellen in der G2-Phase akkumulierte, ein so genannter G2-Arrest. Der Zuwachs an Zellen in der G2/M-Phase war bei den Zelllinien NCI-H929 und RPMI-8226 am deutlichsten ausgeprägt (32% für NCI und 43% für RPMI) und für alle Zelllinien statistisch signifikant [P=0,006 (NCI), 0,006(RPMI), 0,005(U-266)].

Durch höhere Dosen des Medikaments wurde dieser G2-Arrest überwunden und die Zellen fielen in die SubG1-Fraktion (Abb. 7), die Fraktion der apoptotischen Zellen.

In Abbildung 8 sind die Veränderung in der Zellzyklusanalyse anhand Zytometer-Darstellung der beiden Zelllinien NCI-H929 und U266 gezeigt.



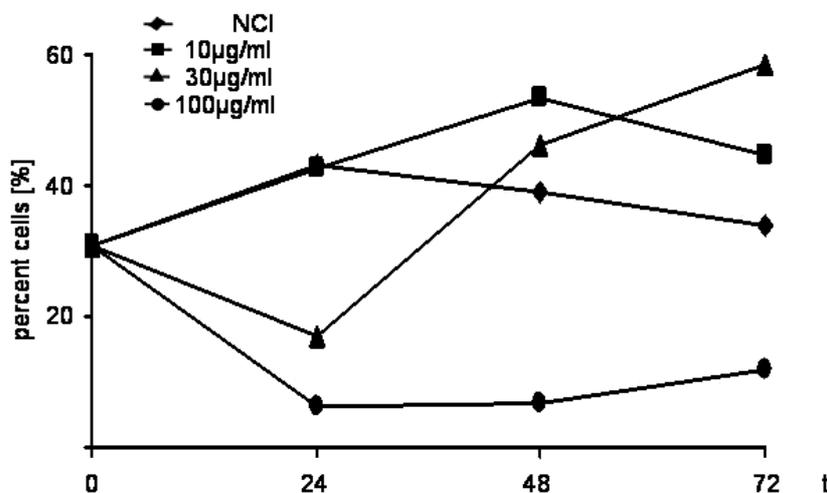
**Abb. 8 G2-Zellzyklusarrest.** Für die beiden Zelllinien NCI-H929 und U-266 sind die Zellzyklusverschiebungen unter Behandlung mit Bendamustin 30µg/ml (+) gegen die Kontrolle (-) dargestellt. Schwarz unterlegt ist die Population in der G2/M-Phase befindlicher Zellen mit hohem DNA-Gehalt. Die Kurve entsteht durch Messung der PI-

Fluoreszenz DNA-haltiger Zellen am Durchflusszytometer. Zellen in G1-Phase mit nach der Mitose niedrigem DNA-Anteil und damit niedriger PI-Emission befinden sich in der Darstellung am linken Fensterrand. Anschließend nach rechts aufsteigend die Zellen in S-(Synthese-)Phase und G2-M-Phase.

Es war nun wichtig, die Entwicklung des G2-Arrests unter verschiedenen Konzentrationen im zeitlichen Verlauf darzustellen, um herauszufinden, zu welchem Zeitpunkt und bei welcher Konzentration die sich im Zellzyklus abspielenden Veränderungen am größten waren.

Diese Entwicklung der G2-Population ist in Abbildung 9 anhand der Zelllinie NCI-H929 illustriert.

Während die G2-Fraktion unter 10µg/ml Bendamustin im zeitlichen Verlauf bei 48h ihren maximalen Zuwachs hatte, stieg sie unter 30µg/ml konstant an. Aus diesen Ergebnissen schlussfolgerten wir, dass somit zur weiteren Erforschung der intrazellulären Signalwege Veränderungen wichtiger G2-Phase-Regulatorenzyme am deutlichsten bei einer Inkubationszeit von 48 Stunden und Konzentrationen von 10 und 30µg/ml zu erwarten wären. Bei Konzentrationen unter 3 µg/ml kam es zu keinem messbaren G2-Arrest, während 100µg/ml durch die hohe Anzahl apoptotischer Zellen als Konzentration ausschied.



**Abb. 9 G2-Fraktion im zeitlich Verlauf.**

NCI-H929 wurden mit Bendamustin in den Konzentrationen 10/30/100 µg/ml inkubiert. Die Zellzyklusanalyse erfolgte nach 0, 24, 48 und 72 Stunden. In der Graphik ist die Anzahl in der G2-Phase befindlicher Zellen gegen die Zeit aufgetragen.

### 3.3 Western Blot Analyse des G2-Checkpoints

#### 3.3.1 Inhibition des MPF

Entsprechend der Analysen unserer Zellzyklusmessungen induzierte Bendamustin einen G2-Arrest bei allen 4 getesteten Zelllinien.

Weitere Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen dieser Zyklusverschiebung waren jedoch aus der Zellzyklusanalyse nicht zu gewinnen. Um diesen auf den Grund zu gehen, wurden Veränderungen der intrazellulären Expression und Aktivität der an der Regulation der beiden Checkpoints G1 und G2 beteiligten Enzyme mittels Western Blot untersucht.

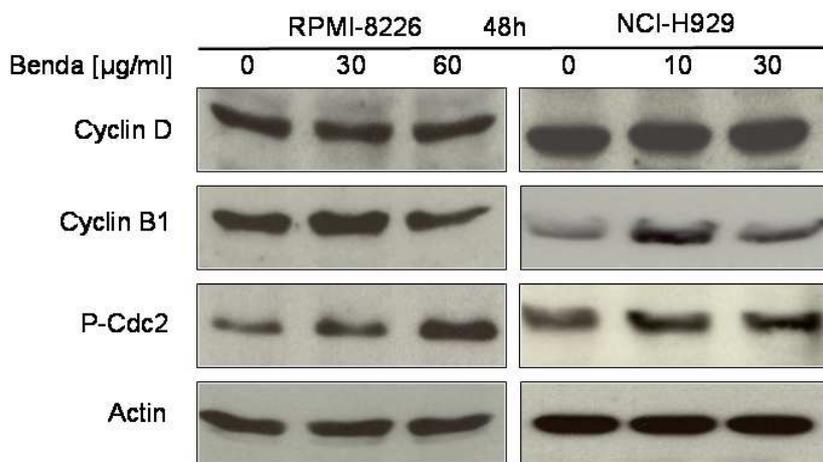
Es wurden die Konzentrationen 10/30 µg/ml für NCI-H929 und 30/60 µg/ml für RPMI-8226 gewählt, da diese durch die maximale Ausprägung des G2-Arrests am ehesten nachweisbare Proteinregulationen zu erwarten ließen. Die Inkubationszeit betrug entsprechend der Vorversuche 48 Stunden. Wir inkubierten die Blot-Membranen mit primären Antikörpern gegen Cyclin D, Cyclin E, cdk2 (G1-Phase), Cyclin B und Cyclin A sowie cdk1 (G2-Phase). Actin diente als Kontrollantikörper für eine gleiche Proteinbeladung der Banden. Die Cycline der G1-Phase wie auch cdk2 erfuhren keine Veränderung ihrer Expression (Cyclin D exemplarisch in Abb. 8 dargestellt). Im Gegensatz dazu war Cyclin B als stärkere Bande bei 10 µg/ml (NCI) und 30 µg/ml (RPMI-8226) sichtbar. Diese Ergebnisse bestätigten die in den SubG1-Messungen beobachteten G2-Phaseveränderungen.

Cyclin B liegt in aktiver Form als Komplex mit der Kinase Cdc2 (Cdk1), dem MPF (Mitosis-promoting Factor), vor und ist zentraler Regulator für die Progression von der G2- zur M-Phase des Zellzyklus. Es wird während der G2-Phase synthetisiert und akkumuliert vor der Mitose im Zellkern. Die erhöhte Expression von Cyclin B ist jedoch primär nicht gleichzustel-

len mit Aktivierung. Denn in der späten G2-Phase arretierte Zellen behalten die Menge des zuvor vermehrt produzierten Cyclin B bei. Die Aktivität des Komplexes hingegen wird maßgeblich durch die Phosphorylierung der Cdc2-Kinase reguliert. Eine Phosphorylierung bewirkt in diesem Zusammenhang eine Inaktivierung.

Wir inkubierten somit die Membranen mit einem spezifischen Phosphoantikörper gegen P-Ser15 Cdc2. Mit steigenden Konzentrationen gelang ein vermehrter Nachweis des phosphorylierten Cdc2 (Abb. 10).

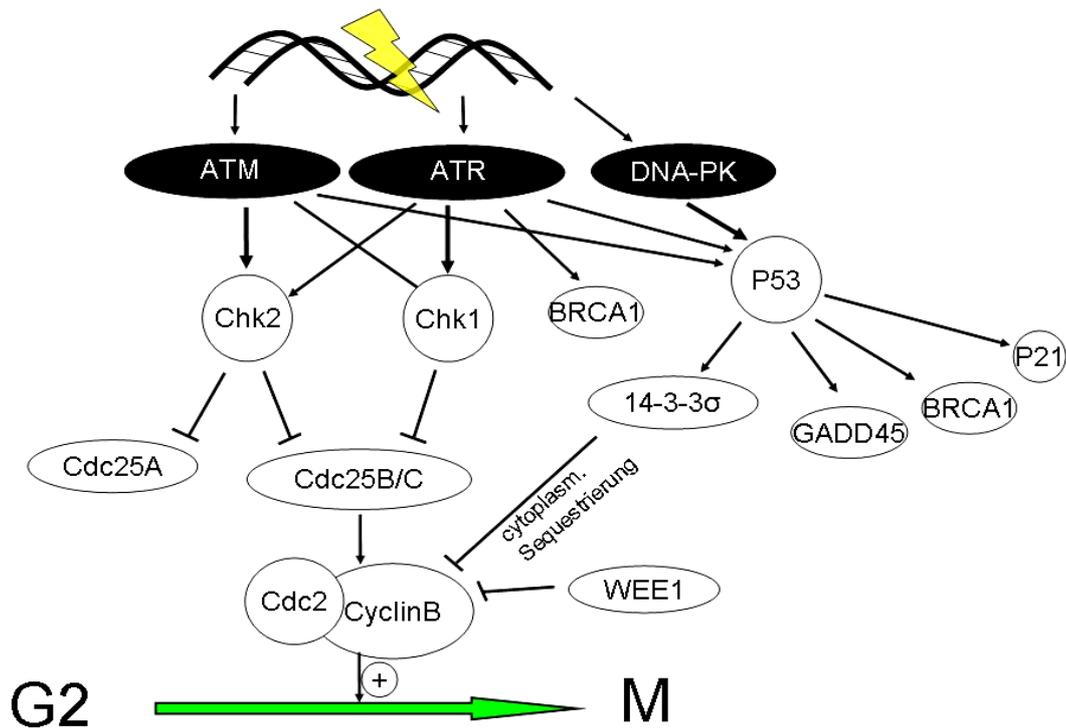
Hieraus folgt, dass trotz quantitativ erhöhter Mengen an intrazellulären Cyclin B der Komplex durch inhibitorische Phosphorylierung inaktiviert wurde.



**Abb. 10 Veränderungen der G2-Phase-Regulatoren.** Nach Inkubation mit Bendamustin in dargestellten Konzentrationen wurden die Cycline D und B1 sowie die phosphorylierte Form von Cdc2 im Western Blot nachgewiesen. Actin diente als Kontrolle.

### 3.3.2 Aktivierung des ATM-Chk2-Cdc25A-Signalwegs

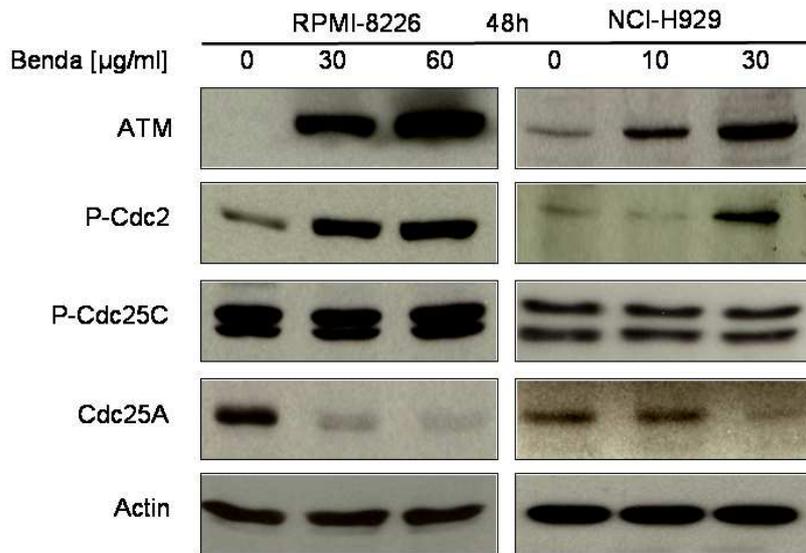
Der Cdc2/Cyclin B-Komplex ist Endpunkt einer Vielzahl auf ihn einwirkender intrazellulärer Signalwege. Die Komplexität bekannter Kaskaden ist vereinfacht in Abbildung 11 dargestellt, genauer wird in der Diskussion darauf eingegangen.



**Abb. 11 G2/M-Signalkaskaden.**

Um die Rolle dieser Signalkaskaden zu untersuchen, benutzten wir Antikörper gegen die Phospho-Isoenzyme ATM, ATR, Chk1, Chk2, Cdc25C sowie reguläre Antikörper gegen Chk1, Chk2, Cdc25B, Cdc25A und 14-3-3σ. ATM wurde als Folge der DNA-Schädigung durch Phosphorylierung an Ser1981 aktiviert. Während Chk1 und Chk2 quantitativ nicht nachweisbar waren, so wurde doch Chk2 (Thr 68), nicht jedoch Chk1, als Substrat von ATM ebenfalls aktiviert. ATR und Chk1 waren nicht involviert. Interessanterweise blieb auch Cdc25C, dessen enzymatische Aktivität durch inhibitorische Phosphorylierung an Tyr162 durch sowohl Chk1 und Chk2, als auch direkt durch ATM und ATR gesteuert wird, unverändert (Abb.

12). Im Gegensatz dazu konnten wir zeigen, dass die Menge an Cdc25A mit zunehmender ATM und Chk2-Aktivierung vermindert wird. Dies entspricht einer proteolytischen Degradierung der Phosphatase.



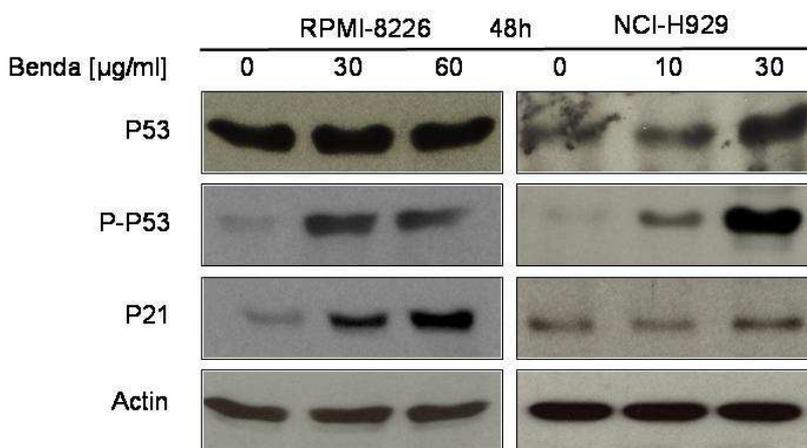
**Abb. 12 Aktivierung des ATM-Signalwegs.** Nach Behandlung der beiden Zelllinien NCI-H929 und RPMI-8226 mit Bendamustin wurden die Western-Blot-Membranen mit Antikörper gegen P-ATM, P-Chk2, P-Cdc25C, Cdc25 A und Actin inkubiert.

### 3.3.3 Aktivierung des ATM-P53-P21-Signalwegs

P53 spielt eine zentrale Rolle in der Vermittlung von Apoptose wie auch von Zellzyklusarrest und wird durch eine Vielzahl von Stimuli induziert. Wir untersuchten die Auswirkung von Bendamustin auf den Aktivitätsstatus und die intrazelluläre Expression von P53 mithilfe P53 sowie P-P53 (Ser15) Antikörper.

Hier zeigte sich, dass in NCI-H929, nicht jedoch in RPMI-8226, P53 vermehrt exprimiert wurde. In beiden Zelllinien war eine starke Aktivierung zu registrieren. Ser15 ist Bindungs- und Phosphorylierungsstelle für

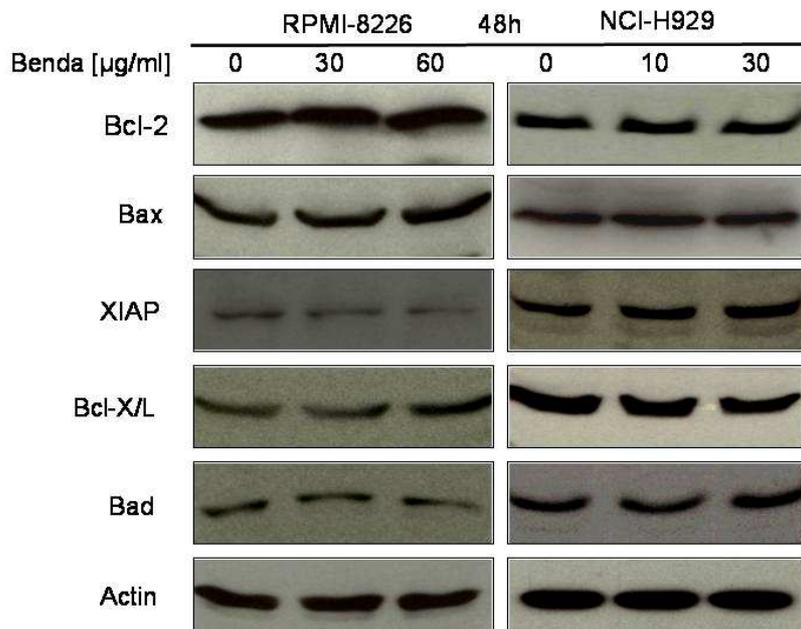
ATM im Molekül. Somit lag eine direkte Aktivierung von P53 durch ATM als ein wichtiger Aktivierungsmechanismus vor. P53 steuert über die Transkription seiner Zielgene die Synthese einer Vielzahl von Proteinen. So inhibiert P53 z.B. über eine Expression von P21 den MPF. Western Blotting zeigte in NCI-H929 wie auch RPMI-8226 Zellen nach Bendamustingabe eine Zunahme des P21 Proteinlevels in den Zellen (Abb. 13).



**Abb. 13 P53 und P21.** Die Expression von P53 und P21 sowie die P53 Aktivität wurde mit spezifischen Antikörpern im Western Blot nachgewiesen.

P53 ist somit über die vermehrte P21-Synthese an dem durch Bendamustin hervorgerufenen G2-Arrest beteiligt. 14-3-3s als weiteres Substrat von P53 zeigt keine Veränderung (nicht dargestellt).

Um die Beteiligung weiterer pro- und antiapoptotischen Pathways an der Apoptoseinduktion durch Bendamustin zu untersuchen, inkubierten wir die Zellmembranen zusätzlich mit Antikörpern gegen Bcl-2, Bcl-XL, BAD, BAX und XIAP. Die Proteinspiegel sämtlicher genannter Proteine blieben jedoch unter Bendamustinbehandlung unverändert (Abb. 14).



**Abb. 14** Regulation pro- und antiapoptotischer Signalwege.

Wichtige Proteine der Bcl- und IAP-Familie wurden mit spezifischen Antikörpern im Western Blot detektiert. Proapoptotisch: Bad, Bax. Antiapoptotisch: Bcl-2, Bcl-XL, XIAP.

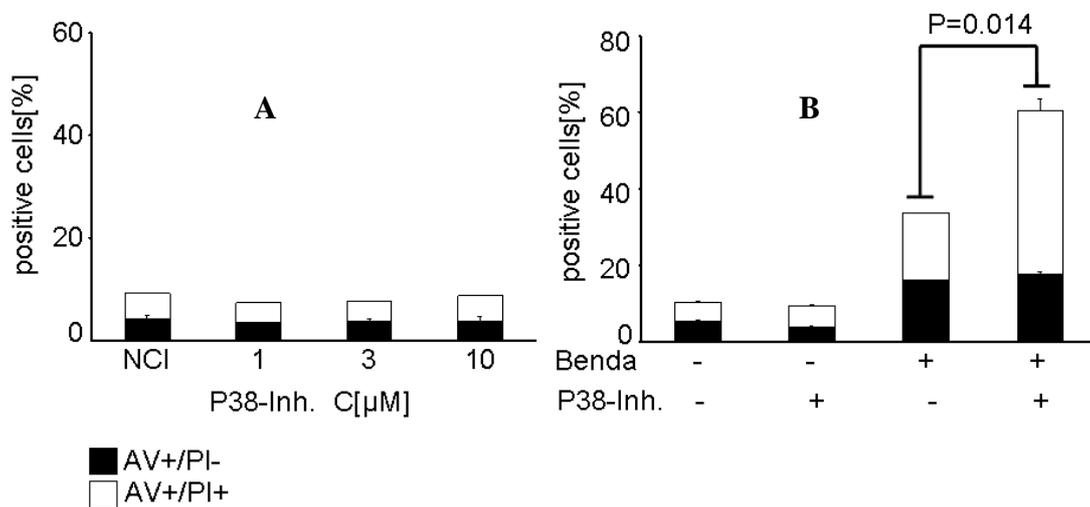
### 3.4 Synergismus mit dem P38 $\alpha$ -MAPK-Inhibitor SB202190

#### 3.4.1 SB 202190 potenziert Bendamustin-induzierte Apoptose

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Kombinationspartner zur therapeutischen Wirkungssteigerung von Bendamustin zu finden. Es schien viel versprechend, niedermolekulare Inhibitoren wichtiger Zielproteine der entschlüsselten Signalkaskaden einzusetzen. Vor diesem Hintergrund koinkubierten wir die Zellen mit Bendamustin und dem Methylxantinabkömmling Caffein. Für Caffein wurde eine Inhibition der Moleküle ATM, ATR, Chk1, und Chk2 sowie eine Aktivierung von Cdc2 nachgewiesen. Die Effekte Caffeins auf Apoptose sind der Literatur nach widersprüchlich sowie stark abhängig von der betreffenden Zelllinie (Bode et al., 2006, He et al., 2003, Sarkaria et al., 1999, Fingert et al., 1986). Wir inkubierten die Zellen

eine halbe Stunde vor Zugabe von Bendamustin mit Caffein 0,03-10 $\mu$ M und gaben anschließend Bendamustin in Konzentrationen von 10-30 $\mu$ g/ml hinzu. Es war weder ein pro- noch antiapoptotischer Effekt zu beobachten. Des weiteren testen wir einen spezifischen Chk2-Inhibitor sowie die beiden Cdc2-Inhibitoren Roscovitine und Olomoucine. Keiner der genannten Inhibitoren war in der Lage, die Toxizität von Bendamustin signifikant zu steigern.

Im übrigen richteten wir unser Augenmerk auf die Familie der MAP-Kinasen. Im besonderen für MAPK $\alpha$  sind in der Literatur interessante Effekte, wenn auch sehr zelltypabhängig, auf Apoptose und Zellzyklus vorbeschrieben. Wir inkubierten unsere Zelllinien mit dem MAPK $\alpha$ -Inhibitor SB212090 in Konzentrationen von 3-10 $\mu$ M. In diesen Konzentrationen war der Inhibitor selbst nicht toxisch (Abb. 15).



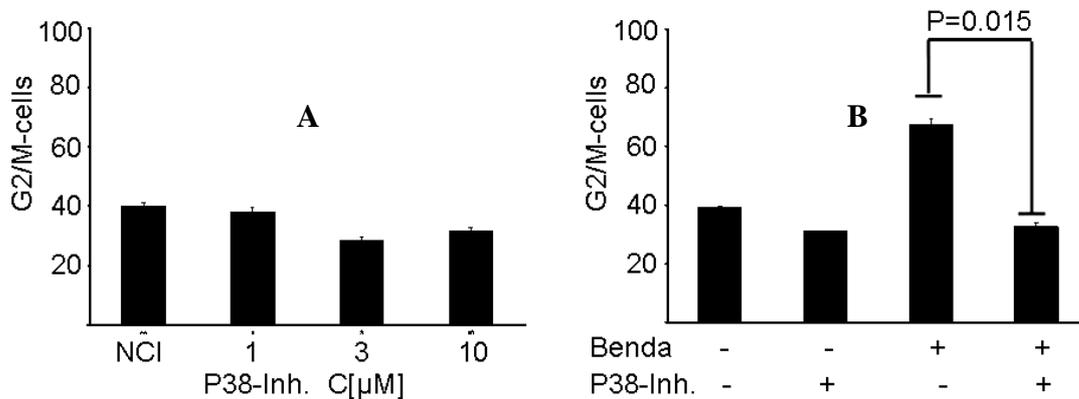
**Abb. 15 SB202190 potenziert Bendamustin-induzierte Apoptose.** **A** NCI-H929 (NCI) wurden mit 1/3/10 $\mu$ M P38-Inhibitor über 48h inkubiert. Anschließend wurde die Apoptose mit Annexin/PI bestimmt. **B** Behandlung von NCI-Zellen mit Medium, 10 $\mu$ M P38-Inhibitor, 30 $\mu$ g/ml Bendamustin, sowie mit Bendamustin plus Inhibitor (30 Minuten Vorinkubationszeit) und anschließende Apoptosebestimmung.

Darauf erfolgte die Zugabe von Bendamustin 30µg/ml bei einer Inkubationszeit von 48h. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Apoptose mittels AnnexinV/PI am Durchflusszytometer bestimmt. Aus Abbildung 15 wird deutlich, dass der Inhibitor im Synergismusversuch in der Lage war, die apoptotische Potenz von Bendamustin signifikant zu erhöhen. Bei 30 µg/ml Bendamustin und 10µM SB202190 betrug dieser Apoptosezuwachs für NCI-H929 Zellen ca. 100%.

Der synergistische Effekt zeigte eine maximale Ausprägung bei den beiden Zelllinien NCI-H929 und RPMI-8226. Dieses waren rückblickend interessanterweise die beiden Zelllinien mit dem deutlichsten G2-Arrest unter Bendamustintherapie.

### **3.4.2 SB 202190 hebt den Bendamustin-induzierten G2-Arrest vollständig auf**

In Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der P38-MAPK einen G2-Arrest induziert. Wir folgerten somit im Umkehrschluss, dass eine Inhibition der Kinase in der Lage sein müsse, einen G2-Arrest zu unterbrechen. Zur Klärung der Frage, inwieweit diese Hypothese für den für Bendamustin beschriebenen G2-Arrest gilt, führten wir erst eine Zellzyklusanalyse mit dem Inhibitor alleine sowie im Synergismusversuch mit Bendamustin durch. Es wurde deutlich, dass der Inhibitor zu keiner signifikanten Reduktion der G2-Fraktion nicht vorbehandelter Zellen führte. Bei Koinkubation mit beiden Substanzen erwirkte der P38-Inhibitor SB202190 eine komplette Aufhebung der durch Bendamustin hervorgerufenen Zellzyklusveränderungen (Abb. 16).

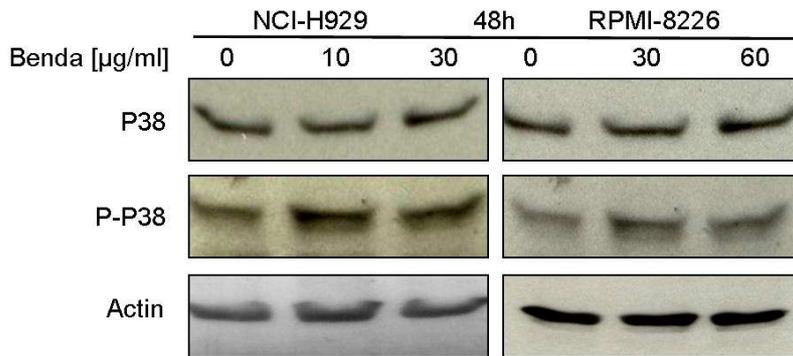


**Abb. 16 SB202190 hebt den G2-Arrest auf.** **A** Zellzyklusanalyse von NCI-H929 Zellen nach Behandlung mit P38-Inhibitor und **B** nach Behandlung mit Medium (NCI), P38-Inhibitor, Bendamustin sowie Koninkubation von Inhibitor und Bendamustin. Dargestellt ist die G2-Fraktion der Zellen.

### 3.4.3 Aktivierung von P38 $\alpha$ MAPK durch Bendamustin

Zusammengefasst zeigten die Ergebnisse der Synergismusexperimente in Apoptose- und Zellzyklusanalyse eine Wirkungsverstärkung Bendamustins durch den Inhibitor sowie eine Aufhebung der Zyklusveränderungen.

Hieraus folgerten wir, dass es einen Zusammenhang zwischen der Aktivität von P38 und der durch Bendamustin hervorgerufenen Zellzyklusveränderungen geben könne. Diese Vermutung wurde durch die Tatsache gestützt, dass bei den beiden Zelllinien NCI-H929 und RPMI-8226 sowohl der induzierte G2-Arrest als auch der synergistische Effekt am deutlichsten zu Tage traten. Zur Klärung dieser Zusammenhänge untersuchten wir die Expression und Aktivität von P38 in der Zelle entsprechend unserer Vorversuche im Western Blot (Abb. 17).



**Abb. 17 Aktivierung von P38.** Die Expression und Aktivität von P38 nach Inkubation mit Bendamustin wurden mit regulären und Phosphoantikörpern (Tyr 182) im Western Blot nachgewiesen.

P38 wurde in beiden Zelllinien exprimiert, durch Behandlung mit Bendamustin konnte keine quantitativen Veränderungen des Proteinspiegels beobachtet werden.

Aktivitätsmessungen mit Phospho-Antikörpern zeigten jedoch eine Aktivierung der Kinase durch Phosphorylierung an Tyrosin 182.

#### **4. Diskussion**

Obwohl Bendamustin aktuell eine breite klinische Evaluation unterläuft und seine Effektivität in der Therapie des Multiplen Myeloms unter Beweis gestellt hat (Pönisch et al., 2006), so besteht doch ein Mangel an Wissen über seine intrazelluläre Wirkungsweise. Es liegen bisher fast keinerlei publizierte experimentelle Daten hierzu vor (Schwänen et al., 2002). Diese sind jedoch besonders angesichts der Entwicklung zukünftiger Kombinationsregime unbedingt von Nöten, wenn sich die Suche nach potenten Kombinationspartnern nicht in zeitlich und finanziell frustranen Zufallsschlägen auflösen soll.

Alkylanzien und Purinanaloga stellen eine große Gruppe unter den derzeit gängigen Chemotherapeutika. Ihre Wirkweise ist im wesentlichen durch die Induktion der Ausbildung unphysiologischer Kreuzverknüpfungen zwischen den DNA-Doppel- bzw. Einzelsträngen charakterisiert. Diese entstehenden Verknüpfungen aktivieren die zellulären Reparaturmechanismen und erhöhen damit die Vulnerabilität der Zelle in den beiden zellulären Reparatur-Checkpoints G1 und G2. Das Resultat ist entweder die erfolgreiche Behebung der Schäden oder, zum Schutz des Erbguts, die Einleitung der Apoptose, des programmierten Zelltods. Für viele zytotoxischen Medikamente ist eine Interaktion mit den Mechanismen dieser Checkpoint-Regulation und dem Resultat des Proliferationsstops nachgewiesen worden (Damia et al., 2004, Bozko et al., 2005). In diesem Zusammenhang kann der Versuch der Zelle, die Schäden an der DNA über einen Zellzyklusarrest und Aktivierung der Reparaturmechanismen zu bewältigen, als Chemoresistenz interpretiert werden.

Meist sind jedoch die induzierten Schäden zu groß und das Bewältigungspotential der Zelle, besonders zeitlich angesichts der im Tumorgewebe

vorherrschenden Proliferationsgeschwindigkeit, zu klein. Bei Überschreiten einer bestimmten Schwelle folgt letztendlich die Einleitung der Apoptose.

Diese Arbeit zeigte in den untersuchten Myelomzelllinien eine Apoptoseinduktion durch Bendamustin bei IC<sub>50</sub> Werten zwischen 35 und 65 µg/ml. Außerdem wurde ein ausgeprägter G<sub>2</sub>-Arrest in Konzentrationen von 10-30 µg/ml beobachtet.

Die Progression der Zelle von G<sub>2</sub> zu M wird durch den MPF (Mitosis Promoting Factor), einen Komplex von Cdc2 und CyclinB reguliert (Nurse, 1990). Seine Aktivierung ist ein Resultat unzähliger Signalwege, welche die Vielzahl der während der Zellzyklusprogression einwirkenden Stimuli vermitteln, und seine Inhibition im Besonderen ein Charakteristikum des G<sub>2</sub>-Arrests. Western Blot-Analysen der zellulären Checkpointenzyme zeigten eine Inhibition des MPF über die inhibitorische Phosphorylierung an Tyr15 des Cdc2. Einhergehend eine erhöhte Expression des Cyclin B, die jedoch nur bei NCI-H929 Zellen deutlich ausgeprägt und, im Gegensatz zu der Cdc2-Inhibition, bei höheren Konzentrationen rückläufig war. Dieses Phänomen kann damit zu erklären sein, dass die Zellen, die in der späten G<sub>2</sub>-Phase arretieren, noch immer die erhöhten, während der G<sub>2</sub>-Phase synthetisierten Mengen an Cyclin B enthalten. Eine alleinige quantitativ erhöhte Menge an Cyclin B ohne enzymatische Aktivierung jedoch ist nicht mitoseprogressionswirksam.

Doch welche Signalkaskade ist verantwortlich für die beobachtete Inhibition des MPF und damit einhergehenden G<sub>2</sub>-Arrest?

Die Proteinkinasen ATM (Ataxia-telangiectasia mutated kinase) und ATR (Ataxia-telangiectasia and Rad3-related kinase), die beide eine große Ähnlichkeit zur Gruppe der PI3 Kinasen aufweisen, wurden als primäre Mediatoren einer DNA-Schädigung identifiziert (Abraham 2001).

Mutationen im ATM-Gen resultieren in der Manifestation der Erkrankung Ataxia teleangiectasia. Diese zeichnet sich klinisch durch multiplen Gefäßmissbildungen im ZNS, immunologischen Defekten und einem erhöhten Malignomrisiko sowie molekularbiologisch einer fehlenden Zellzyklusarrestfunktion nach Einwirkung ionisierender Strahlung aus.

ATM und ATR sind sehr große Moleküle mit einem Molekulargewicht von über 300 kD.

ATM ist in der Lage Chk2 zu phosphorylieren und somit zu aktivieren (Matsuoka et al., 1998, Chaturvedi et al., 1999, Falk et al., 2001) während ATR sein Substrat Chk1 phosphoryliert (Liu et al., 2000). Unabhängig davon kann ATM das „Tumorsuppressor-Protein“ P53 an verschiedenen Aminosäuren phosphorylieren (Canman et al., 1998, Turenne et al., 2001, Miyakoda et al., 2002). Die Stärke der ATM-Aktivierung konnte mit dem Grad der DNA-Strangbrüche korreliert werden (Buscemi et al., 2004).

Für ATR und Chk1 wurde eine Aktivierung durch UV-geschädigte DNA nachgewiesen (Tibbetts et al., 1999, O'Driscoll et al., 2003), ferner vermitteln sie einen durch das Purinanalogon Thioguanin ausgelösten G2-Arrest (Yan et al., 2004, Yamane et al., 2004), während ATM-Aktivierung mit Doppelstrangbrüchen durch ionisierende Strahlung (IR) oder radiomimetische Substanzen, nicht jedoch durch UV oder Alkylanzien, in Verbindung gebracht wurde (Canman et al., 1998).

Die beiden Checkpointkinasen Chk1 und Chk2 inaktivieren einerseits Cdc25C durch Phosphorylierung an Tyr162 (Chaturvedi et al., 1999, Sanchez et al., 1997) während sie andererseits direkt eine P53-Aktivierung über eine Ser18 oder Ser20-Phosphorylierung erwirken können (Hirao et al., 2000, Shieh et al., 2000). Im Gegensatz hierzu deutet eine Phosphorylierung an Ser15 auf eine Aktivierung durch ATM und ATR hin. Das inhi-

bierte Cdc25C ist nun nicht mehr in der Lage, eine Zellzyklusprogression durch Aktivierung des MPF herbeizuführen, das Resultat ist ein G2-Arrest. Das aktivierte P53 wiederum nimmt im gleichen Sinne Einfluss auf den MPF, dies geschieht jedoch durch vermehrte Expression von P21 oder 14-3-3 $\sigma$ , und nimmt eine zentrale Rolle in der Steuerung der Apoptose durch seine komplexe Rolle als Transkriptionsfaktor ein.

Die Experimente ergaben, dass Bendamustin zu einer Aktivierung von ATM, nicht jedoch von ATR führt und dieses Ereignis wurde durch den Nachweis einer Chk2-Aktivierung bestätigt.

Da diese Ergebnisse im Widerspruch zu Studien stehen, die ATM keine Rolle in der Wirkungsweise der Alkylanzien zusprechen, ist eine komplexere Interaktion Bendamustins mit der DNA als Folge zweier aktiver Gruppen im gleichen Molekül zu vermuten.

Aus der Tatsache, dass in den Western Blot- Analysen weder eine vermehrte Expression noch eine Veränderung an dem Phosphorylierungsstatus von Cdc25C zu beobachten war, folgt, dass das Chk2-Signal nicht über Cdc25C weitergeleitet wird. Anders verhält es sich mit Cdc25A. Als Aktivatorenzym von Cdc2 und Cdk2 steuert es die G1/S und die G2/M-Progression und ist Baustein in UV, IR und Chemotherapeutika-induzierten intrazellulären Signaltransduktionskaskaden (Busino et al., 2004, Agner et al., 2005, Mailand et al., 2000).

Die Zugabe von Bendamustin führte in den Experimenten zu einem Verschwinden der Cdc25A-Bande im Western Blot, was aufgrund dessen aktivierenden Funktion auf den MPF eine Inhibition desselben bedeutet. Dem Verschwinden der Cdc25A-Bande liegt pathophysiologisch eine proteolytischen Degradation des Moleküls als Folge der Aktivierung durch Chk2 zugrunde.

Ein weiterer durch Bendamustin stimulierter Signalweg beinhaltet P53. Dieses wurde durch ATM an Ser15 phosphoryliert und in NCI-H929-Zellen vermehrt exprimiert. Eine inhibitorische Wirkung von P53 auf den MPF wurde durch eine vermehrte Synthese des Cdc-2-inhibitors P21 vermittelt.

Die klinische Wirksamkeit Bendamustins wurde durch die Ergebnisse der Apoptosemessung und Zellzyklusanalyse bestätigt und pathophysiologisch erforscht.

Die Prognose der Erkrankung unter einer Monotherapie wird in der klinischen Realität durch die Entwicklung einer Chemoresistenz und der damit verbundenen Rezidivproblematik bestimmt. Vor diesem Hintergrund hat der beobachtete G2-Arrest als Versuch der Tumorzellen, der Apoptose durch entsprechende Reparaturmechanismen zu entgehen, durchaus Bedeutung für die Entwicklung von Resistenzen gegen Bendamustin.

Wichtiges klinisches Ziel dieser Arbeit war daher die Suche nach Substanzen zu gezielter, effektiver Kombinationstherapie.

In Anbetracht der o.g. Bedeutung der Zellzyklusverschiebungen schien es erfolgsversprechend, niedermolekulare Inhibitoren der an den entschlüsselten Kaskaden beteiligten Enzyme einzusetzen.

Eine Hemmung der Cdc2 mit den beiden Inhibitoren olomoucine und roscovitine im Synergismusversuch (Koinkubation mit Bendamustin) zeigte jedoch keinen pro- oder antiapoptotischen Effekt, was bedeutet, dass eine Inhibition des MPF alleine nicht in der Lage ist, die Inhibition durch Bendamustin weiterhin zu verstärken. Als Ursachen kann sowohl eine zu schwache Wirkung der Inhibitoren als auch die relativ viel stärkere Wirkung der beiden von Bendamustin aktivierten Signalwege in Frage kommen. Gleiches Resultat erbrachten Versuche mit einem selektiven Chk2-

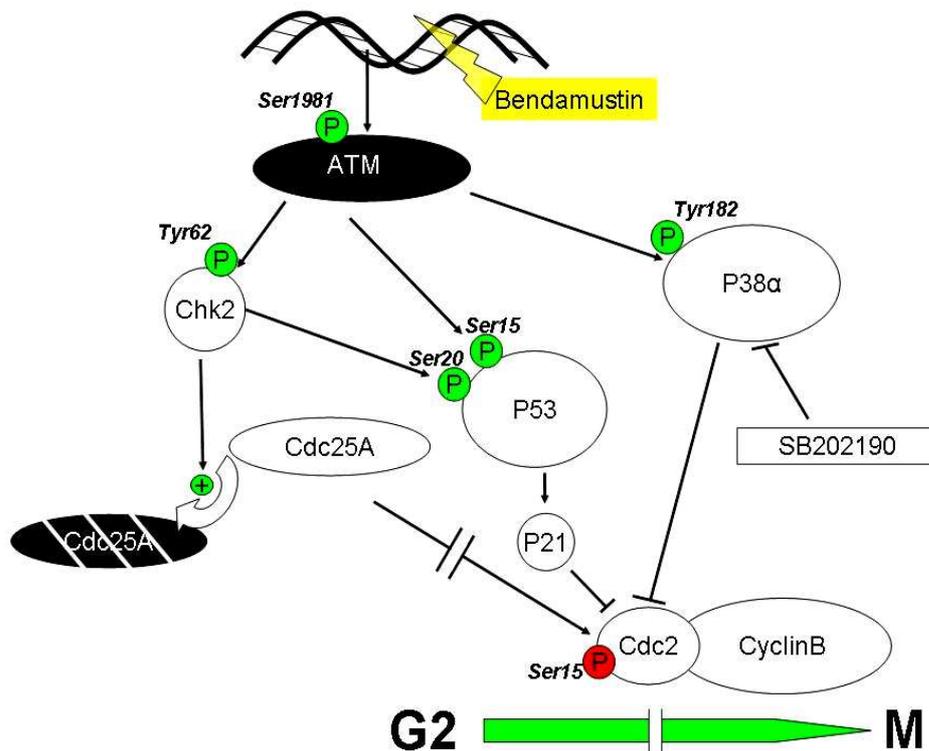
Inhibitor, sowie mit Caffeine, welches allenfalls widersprüchliche, nicht signifikante Ergebnisse lieferte.

Positive Ergebnisse lieferten Versuche mit einem selektiven P38-MAPK Inhibitor. Im Synergismusversuch unter Co-Inkubation mit dem MAPK $\alpha$ -Inhibitor SB202190 gelang es, die apoptotische Potenz Bendamustins um bis zu 100% zu steigern und den in der Zellzyklusanalyse beobachteten G2-Arrest komplett aufzuheben. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass P38 in den Zellen exprimiert und unter Bendamustin aktiviert wird.

Es ist bekannt, dass eine P38-Aktivierung einen G2-Arrest bewirkt (Bulavin et al., 2001, Garner et al. 2002, Hirose et al., 2003, Pedraza-Alva et al. 2006). In Bezug auf das Multiple Myelom verstärkt die Inhibition des Enzyms die zytotoxische Wirkung des Proteasomeninhibitors Bortezomib (Hideshima et al., 2004, Navas et al., 2006). Außerdem ist zu erwarten, dass P38-Inhibitoren mit dem Ziel des Knochenmarkstromas, welches eine große pathophysiologische Rolle in dem Erkrankungsprozess spielt, eine viel versprechende Option der zukünftigen Kombinationsregime darstellen werden (Hideshima et al., 2003, Nguyen et al., 2006, Wang et al., 2006).

In Zusammenschau unserer Ergebnisse mit der in der Literatur beschriebenen Funktion des Enzyms folgerten wir, dass der P38-Signalweg in der Zelle als Reaktion auf die induzierten DNA-Schäden aktiviert wird. Dies geschieht mit dem Ziel, einen G2-Arrest zu initiieren und somit durch DNA-Reparatur die Integrität und Vitalität der Zelle zu sichern. Da der Inhibitor in der Lage war, den durch Bendamustin ausgelösten G2-Arrest komplett zu durchbrechen kann somit der synergistische apoptotische Effekt dadurch erklärt werden, dass die Zellen mit noch defekter DNA gezwungen werden, von G2 in die Mitose überzutreten, und bedingt durch die vorhandenen Schäden an DNA und synthetisierten Proteinen die Apoptose einzuleiten.

Diese Erkenntnisse zeigen neue Möglichkeiten einer vielversprechenden Wirkungsverstärkung des bifunktionellen Alkylanz Bendamustin auf: Eine gezielte Hemmung des P38-Signalwegs durch niedermolekulare Inhibitoren der P38 $\alpha$ -MAPK.



**Abb. 18 Aktivierte Signalkaskaden.** Grüne Phosphorylierungssymbole (P) bedeuten eine Aktivierung durch Phosphorylierung, rote Symbole eine Inhibition.

### **Zusammenfassung**

Das Multiple Myelom ist eine maligne hämatologische Erkrankung terminal differenzierter Plasmazellen und wird zur Klasse der Non-Hodgkin-Lymphome gezählt.

Eine Heilung ist aufgrund der im Therapieverlauf auftretenden Chemoresistenz trotz moderner Therapieregime bis zum heutigen Tag nicht möglich. Diese Tatsache bedingt die Notwendigkeit zur Suche nach neuen Substanzen und besserem Verständnis der molekularbiologischen Wirkungsweise bekannter Zytostatika.

Das bifunktionelle Alkylanz Bendamustin hat seine klinische Effektivität und Gleichwertigkeit zu dem Standard Melphalan in einer aktuellen Phase III-Studien gezeigt. Die zugrunde liegenden intrazellulären Wirkungsmechanismen sind weitestgehend unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Bendamustin Apoptose in den 4 Myelomzelllinien NCI-H929, OPM-2, RPMI-8226 und U266 mit IC<sub>50</sub>-Werten von 35-65 µg/ml sowie Aktivierung von Caspase 3 auslöst. In der Zellwachstumsmessung bestand kein Hinweis auf eine antiproliferative Wirkung niedriger Konzentrationen.

Des Weiteren induzierte Bendamustin einen statistisch signifikanten G<sub>2</sub>-Zellzyklusarrest in allen Zelllinien. Diesem lag molekularbiologisch eine Inhibition des Cdc2/CyclinB-Komplexes (MPF) über eine Aktivierung des ATM-Chk2-Cdc25A-Pathways zugrunde. Darüber hinaus wurde eine direkte Aktivierung von P53 durch ATM und in Folge dessen eine vermehrte P21-Synthese nachgewiesen.

Weiterhin induzierte Bendamustin eine Aktivierung von P38 $\alpha$ -MAPK.

SB-212090, ein Inhibitor des Enzyms zeigte einen deutlichen positiv synergistischen Effekt: in subtoxischen Dosen wurde die zytotoxische Wirkung Bendamustins um bis zu 100% gesteigert, der G<sub>2</sub>-Arrest komplett

revidiert. Diese Ergebnisse sind die Grundlage einer molekular gezielten Kombinationstherapie niedermolekularer P38-MAPK-Inhibitoren mit Bendamustin.

**Literaturliste**

1. Abraham R T. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. (2001), *Genes Dev.*, **15**, 2177-96.
2. Agner J, Falck J, Lukas J, Bartek J. Differential impact of diverse anti-cancer chemotherapeutics on the Cdc25A-degradation checkpoint pathway. (2005), *Exp Cell Res.*, **302**, 162-69.
3. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, Casassus P, Maisonneuve H, Facon T, Ifrah N, Payen C, Bataille R. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. (1996), *N Engl J Med.*, **335**, 91-97.
4. Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B, Magrangeas F, Rapp MJ, Harousseau JL, Minvielle S, Bataille R; Intergroupe Francophone du Myélome. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. (2002), *Blood*, **99**(6), 2185-91
5. Bode AM, Dong Z. The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer. (2006), *Cancer Lett.*, **247**, 26-39
6. Bozko P, Sabisz M, Larsen AK, Skladanowski A. Cross-talk between DNA damage and cell survival checkpoints during G2 and mitosis: pharmacologic implications. (2005), *Mol Cancer Ther.*, **4**, 2016-25.
7. Bulavin DV, Higashimoto Y, Popoff IJ, Gaarde WA, Basrur V, Potapova O, Appella E, Fornace AJ. Jr. Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires P38 kinase. (2001), *Nature*, **411**, 102-107

8. Buscemi G, Perego P, Carenini N, Nakanishi M, Chessa L, Chen J, Khanna K, Delia D. Activation of ATM and Chk2 kinases in relation to the amount of DNA strand breaks. (2004), *Oncogene*, **23**, 7691-700.
9. Busino L, Chiesa M, Draetta GF, Donzelli M. Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. (2004) *Oncogene*, **23**, 2050-56.
10. Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB, Siliciano JD. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. (1998), *Science*, **281**, 1677-79.
11. Cavo M, Benni M, Ronconi S, Fiacchini M, Gozzetti A, Zamagni E, Cellini C, Tosi P, Baccarani M, Tura S; Writing Committee of the "Bologna 90" Clinical Trial. Melphalan-prednisone versus alternating combination VAD/MP or VND/MP as primary therapy for multiple myeloma: final analysis of a randomized clinical study. (2002), *Haematologica*, **87**(9), 934-42.
12. Chaturvedi P, Eng WK, Zhu Y, Mattern MR, Mishra R, Hurle MR, Zhang X, Annan RS, Lu Q, Faucette LF, Scott GF, Li X, Carr SA, Johnson RK, Winkler JD, Zhou BB. Mammalian Chk2 is a downstream effector of the ATM-dependent DNA damage checkpoint pathway. (1999), *Oncogene*, **18**, 4047-54.
13. Child JA, Morgan GJ, Davies FE, Owen RG, Bell SE, Hawkins K, Brown J, Drayson MT, Selby PJ. Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. (2003), *N Engl J Med.*, **8**, 348, 1875-83.
14. Damia G, Brogginini M. Cell cycle checkpoint proteins and cellular response to treatment by anticancer agents. (2004), *Cell cycle*, **3**, 46-50.

15. Facon T, Mary JY, Hulin C, Benboubker L, Attal M, Pegourie B, Renaud M, Harousseau JL, Guillermin G, Chaletteix C, Dib M, Voillat L, Maisonneuve H, Troncy J, Dorvaux V, Monconduit M, Martin C, Casassus P, Jaubert J, Jardel H, Doyen C, Kolb B, Anglaret B, Grosbois B, Yakoub-Agha I, Mathiot C, Avet-Loiseau H; Intergroupe Francophone du Myélome. Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial. (2007), *Lancet*, **370**(9594), 1209-18.
16. Falk J, Mailand N, Syljuasen RG, Bartek J, Lukas J. The ATM-Chk2-cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. (2001), *Nature*, **410**, 842-47.
17. Fermand JP, Katsahian S, Divine M, Leblond V, Dreyfuß F, Marco M, Arnulf B, Royer B, Mariette X, Pertuiset E, Belanger C, Janvier M, Chevret S, Brouet JC, Ravaud P; Group Myelome-Autogreffe. High-dose therapy and autologous blood stem-cell transplantation compared with conventional treatment in myeloma patients aged 55 to 65 years: long-term results of a randomized control trial from the Group Myelome-Autogreffe. (2005), *J Clin Oncol.*, **23**(36), 9227-33. Epub 2005 Nov 7.
18. Fingert HJ, Chang JD, Pardee AB. Cytotoxic, cell cycle, and chromosomal effects of methylxanthines in human tumor cells treated with alkylating agents. (1986), *Cancer Res.*, **46**, 2463-7.
19. Garner AP, Weston CR, Todd DE, Balmanno K, Cook SJ. Delta MEKK3:ER\* activation induces a p38 alpha/beta 2-dependent cell cycle arrest at the G2 checkpoint. (2002), *Oncogene*, **21**, 8089-104.

20. Greip PR, San Miguel J, Durie BGM et al (*International Myeloma Working Group*). 2005. International Staging System for multiple myeloma. *J Clin Oncol*, **23**, 3412-3420.
21. He Z, Ma WY, Hashimoto , Bode AM, Yang CS, Dong Z. Induction of apoptosis by caffeine is mediated by the p53, Bax, and caspase 3 pathways. (2003), *Cancer Res.*, **63**, 4396-401.
22. Heider A, Niederle N. Efficacy and toxicity of bendamustine in patients with relapsed low-grade Non Hodgkin's lymphomas. (2001), *Anticancer Drugs*, **12**, 725-9.
23. Herold M, Schulze A, Niederwieser D, Franke A, Fricke HJ, Richter P, Freund M, Ismer B, Dachzelt K, Boewer C, Schirmer V, Weniger J, Pasold R, Winkelmann C, Klinkenstein C, Schulze M, Arzberger H, Bremer K, Hahnfeld S, Schwarzer A, Muller C, Muller C; for the East German Study Group Hematology and Oncology (OSHO). Bendamustine, vincristine and prednisone (BOP) versus cyclophosphamide, vincristine and prednisone (COP) in advanced indolent non-Hodgkin's lymphoma and mantle cell lymphoma: results of a randomised phase 3 trial (OSHO# 19). (2006), *J. Cancer Res Clin Oncol.*, **132**, 105-12.
24. Hideshima T, Akiyama M, Hayashi T, Richardson P, Schlossman R, Chauhan D, Anderson KC. Targeting p38 MAPK inhibits multiple myeloma cell growth in the bone marrow milieu. (2003), *Blood*, **101**, 703-5. Epub 2002 Sep 5.
25. Hideshima T, Podar K, Chauhan D, Ishitsuka K, Mitsiades C, Tai YT, Hamasaki M, Raje N, Hideshima H, Schreiner G, Nguyen AN, Navas T, Munshi NC, Richardson PG, Higgins LS, Anderson KC. P38 MAPK inhibition enhances PS-341 (bortezomib)-induced cytotoxicity against multiple myeloma cells. *Oncogene*. (2004), **18**, 23, 8766-76.

26. Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, Liu D, Elledge SJ, Mak TW. DNA-damage induced activation of P53 by the checkpoint kinase Chk2. (2000). *Science*, **287**, 1824-27.
27. Hirose Y, Katayama M, Stokoe D, Haas-Kogan DA, Berger MS, Pieper RO. The P38 mitogen-activated protein kinase pathway links the DNA mismatch repair system to the G2 checkpoint and to resistance to chemotherapeutic DNA-methylating agents. (2003), *Mol Cell Biol.*, **23**, 8306-15.
28. Knop S, Straka C, Haen M, Schwedes R, Hebart H, Einsele H. The efficacy and toxicity of bendamustine in recurrent multiple myeloma after high-dose chemotherapy. (2005), *Haematologica*, **90**, 1287-88.
29. Lamerz R: Epidemiologie des Multiplen Myelom: Tumorzentrum München Manual Multiples Myelom, 2. Auflage, 2002, S. 10-11
30. Leoni L, Bailey B, Reifert J, Niemeyer C, Bendall H, Dauffenbach L, Kerfoot C. SDX-105(Bendamustine), a clinically active antineoplastic agent possesses a unique mechanism of action. (2003), *Blood*, **102**(11), 534-II
31. Leoni LM, Bailey B, Reifert J, Bendall HH, Zeller RW, Corbeil J, Elliott G, Niemeyer CC. Bendamustine (Treanda) displays a distinct pattern of cytotoxicity and unique mechanistic features compared with other alkylating agents. (2008), *Clin Cancer Res.*, **14**(1), 309-17.
32. Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoka S, Cortez D, Tamai K, Luo G, Carattini-Rivera S, DeMayo F, Bradley A, Donehower LA, Elledge SJ. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G2/M DNA damage checkpoint. (2000), *Genes Dev.*, **14**, 1448-59.
33. Mailand N, Falck J, Lukas C, Syljuåsen RG, Welcker M, Bartek J, Lukas J. Rapid Destruction of Human Cdc25A in Response to DNA Damage. (2000), *Science*, **288**, 1425-29.

34. Maity A, Hwang A, Janss A, Phillips P, McKenna WG, Muschel RJ. Delayed cyclin B1 expression during the G2 arrest following DNA damage. (1996), *Oncogene*, **13**(8), 1647-57.
35. Mateos MV, Hernández JM, Hernández MT, Gutiérrez NC, Palomera L, Fuertes M, Garcia-Sanchez P, Lahuerta JJ, de la Rubia J, Terol MJ, Sureda A, Bargay J, Ribas P, Alegre A, de Arriba F, Oriol A, Carrera D, García-Laraña J, García-Sanz R, Bladé J, Prósper F, Mateo G, Esseltine DL, van de Velde H, San Miguel JF. Bortezomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: updated time-to-events results and prognostic factors for time to progression. (2008), *Haematologica*, **93**(4), 560-5. Epub 2008 Mar 5.
36. Matsuoka S, Huang M, Elledge SJ. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. (1998), *Science*, **282**, 1893-97.
37. Miyakoda M, Suzuki K, Kodama S, Watanabe M. Activation of ATM and phosphorylation of p53 by heat shock. (2002), *Oncogene*, **21**(7), 1090-6.
38. Myeloma Trialists' Collaborative Group. Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6,633 patients from 27 randomized trials. (1998), *J Clin Oncol.*, **16**, 3832-42.
39. Navas TA, Nguyen AN, Hideshima T, Reddy M, Ma JY, Haghazari E, Henson M, Stebbins EG, Kerr I, O'Young G, Kapoun AM, Chakravarty S, Mavunkel B, Perumattam J, Luedtke G, Dugar S, Medicherla S, Protter AA, Schreiner GF, Anderson KC, Higgins LS. Inhibition of p38alpha MAPK enhances proteasome inhibitor-induced apoptosis of myeloma cells by modulating Hsp27, Bcl-X(L), Mcl-1 and p53 levels in vitro and inhibits tumor growth in vivo. (2006), *Leukemia*, **20**(6), 1017-27.

40. Nguyen AN, Stebbins EG, Henson M, O'Young G, Choi SJ, Quon D, Damm D, Reddy M, Ma JY, Haghazari E, Kapoun AM, Medicherla S, Protter A, Schreiner GF, Kurihara N, Anderson J, Roodman GD, Navas TA, Higgins LS. Normalizing the bone marrow microenvironment with p38 inhibitor reduces multiple myeloma cell proliferation and adhesion and suppresses osteoclast formation. (2006), *Exp Cell Res.* **312**(10), 1909-23. Epub 2006 Apr 4.
41. Nurse P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. (1990), *Nature*, **344**(6266), 503-08.
42. O'Driscoll M, Ruiz-Perez VL, Woods CG, Jeggo PA, Goodship JA. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. (2003), *Nat Genet.*, **33**(4), 497-501. Epub 2003 Mar 17.
43. Osgood EE. The survival time of patients with plasmocytic myeloma. (1960), *Cancer Chemother Rep.*, **9**, 1-10.
44. Ozewski W, Krebs D. W-(bis-( $\beta$ -chloroethyl)-amino-benzimidazolyl)-(2)-propionic or butyric acids as potential cytostatic agents. (1963), *J Prakt Chem.*, **20**, 178-86.
45. Palumbo A, Bringhen S, Caravita T, Merla E, Capparella V, Callea V, Cangialosi C, Grasso M, Rossini F, Galli M, Catalano L, Zamagni E, Petrucci MT, De Stefano V, Ceccarelli M, Ambrosini MT, Avonto I, Falco P, Ciccone G, Liberati AM, Musto P, Boccadoro M; Italian Multiple Myeloma Network, GIMEMA. Oral melphalan and prednisone chemotherapy plus thalidomide compared with melphalan and prednisone alone in elderly patients with multiple myeloma: randomised controlled trial. (2006), *Lancet*, **11**, 367(9513), 825-31.
46. Palumbo A, Ambrosini MT, Benevolo G, Pugno P, Pescosta N, Callea V, Cangialosi C, Caravita T, Morabito F, Musto P, Bringhen S, Falco

- P, Avonto I, Cavallo F, Boccadoro M; Italian Multiple Myeloma Network; Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto. Bortezomib, melphalan, prednisone, and thalidomide for relapsed multiple myeloma. (2007), *Blood*, **109**(7), 2767-72.
- 47.** 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 Network. Melphalan, prednisone, and lenalidomide treatment for newly diagnosed myeloma: a report from the GIMEMA--Italian Multiple Myeloma Network. (2007), *J Clin Oncol.*, **25**(28):4459-65. Epub 2007 Sep 4.
- 48.** Parkin M, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics 2002. (2005), *CA Cancer J ClinD.* **55**(2), 74-108.
- 49.** Pedraza-Alva G, Koulunis M, Charland C, Thornton T, Clements JL, Schlissel MS, Rincon M. Activation of p38 MAP kinase by DNA double-strand breaks in V(D)J recombination induces a G2/M cell cycle checkpoint. (2006), *EMBO J.*, **25**(4), 763-73. Epub 2006 Feb 2.
- 50.** Pönisch W, Mitrou PS, Merkle K, Herold M, Assmann M, Wilhelm G, Dachselt 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. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **132**(4), 205-12.

51. Richardson PG, Sonneveld P, Schuster MW, Irwin D, Stadtmauer EA, Facon T, Harousseau JL, Ben-Yehuda D, Lonial S, Goldschmidt H, Reece D, San-Miguel JF, Blade J, Boccadoro M, Cavenagh J, Dalton WS, Boral AL, Esseltine DL, Porter JB, Schenkein D, Anderson KC; Assessment of Proteasome Inhibition for Extending Remissions (APEX) Investigators. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. (2005) *N Engl J Med.*, **352**, 2487-98.
52. Richardson PG, Blood E, Mitsiades CS, Jagannath S, Zeldenrust SR, Alsina M, Schlossman RL, Rajkumar SV, Desikan KR, Hideshima T, Munshi NC, Kelly-Colson K, Doss D, McKenney ML, Gorelik S, Warren D, Freeman A, Rich R, Wu A, Olesnyckyj M, Wride K, Dalton WS, Zeldis J, Knight R, Weller E, Anderson KC. A randomized phase 2 study of lenalidomide therapy for patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. (2006), *Blood*, **108**(10), 3458-64. Epub 2006 Jul 13.
53. Sanchez Y, Wong C, Thoma RS, Richman R, Wu Z, Piwnicka-Worms H, Elledge SJ. Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. (1997), *Science*, **277**(5331), 1497-501.
54. Sarkaria JN, Busby EC, Tibbets RS, Roos P, Taya Y, Karnitz LM, Abraham RT. Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. (1999). *Cancer Res.*, **59**, 4375-82.
55. Schwänen C, Hecker T, Hubinger G, Wolfle M, Rittgen W, Bergmann L, Karakas T. In vitro evaluation of bendamustine induced apoptosis in B-chronic lymphocytic leukemia. (2002), *Leukemia*, **16**(10), 2096-105.

- 56.** Shieh SY, Ahn J, Tamai K, Taya Y, Prives C. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. (2000), *Genes Dev.*, **14**(3), 289-300.
- 57.** Strumberg D, Harstrick A, Doll K, Hoffmann B, Seeber S. Bendamustine hydrochloride activity against doxorubicin-resistant human breast carcinoma cell lines. *Anticancer Drugs.* (1996), **7**(4), 415-21.
- 58.** Terpos E, Eleutherakis-Papaiakovou V, Dimopoulos MA. Clinical implications of chromosomal abnormalities in multiple myeloma. (2006), *Leuk Lymphoma*, **47**(5), 803-14.
- 59.** Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh SY, Taya Y, Prives C, Abraham RT. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. (1999), *Genes Dev.*, **13**(2), 152-7.
- 60.** Turenne GA, Paul P, Laflair L, Price BD. Activation of p53 transcriptional activity requires ATM's kinase domain and multiple N-terminal serine residues of p53. (2001), *Oncogene*, **20**(37), 5100-10.
- 61.** von Minckwitz G, Chernozemsky I, Sirakova L, Chilingirov P, Souchon R, Marschner N, Kleeberg U, Tsekov C, Fritze D, Thomssen C, Stuart N, Vermorken JB, Loibl S, Merkle Kh, Kaufmann M. Bendamustine prolongs progression-free survival in metastatic breast cancer (MBC): a phase III prospective, randomized, multicenter trial of bendamustine hydrochloride, methotrexate and 5-fluorouracil (BMF) versus cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil (CMF) as first-line treatment of MBC. (2005), *Anticancer Drugs*, **16**(8),871-77.
- 62.** Wang S, Yang J, Qian J, Wezeman M, Kwak LW, Yi Q. Tumor evasion of the immune system: inhibiting p38 MAPK signaling restores the function of dendritic cells in multiple myeloma. (2006), *Blood*, **15**(6),2432-39, Epub 2005 Nov 15.

- 63.** Yamane K, Taylor K, Kinsella TJ. Mismatch repair-mediated G2/M arrest by 6-thioguanine involves the ATR-Chk1 pathway. (2004), *Biochem Biophys Res Commun.*, **318**(1), 297-302
- 64.** Yan T, Desai AB, Jacobberger JW, Sramkoski RM, Loh T, Kinsella TJ. CHK1 and CHK2 are differentially involved in mismatch repair-mediated 6-thioguanine-induced cell cycle checkpoint responses. (2004), *Mol. Cancer Ther.*, **3**(9), 1147-57.

## 7. Anhang

### 7.1. Materialien und Geräte

#### Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller	Best.-Nr.
RPMI-1640	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe	E12-702F
FCS	Dto.	14040-091
PBS	Dto.	16170 – 078
50ml Flask	BD Biosciences, Heidelberg	353108
6-well-plates	Dto.	353.453
96-well-plates	Dto.	353.872
Trypitanblau	Gibco-Invitrogen, Karlsruhe	15250-061
Kryoröhrchen	Brand GmbH, Wertheim	1148 33

#### Inhibitoren

Caffein	Sigma, Taufkirchen, D	C0750
Olomoucine	Biomol, Hamburg, D	CC-200
Roscovitine	Dto.	CC-205
Chk-2-Inhibitor	Calbiochem	220486
SB202190	Upstate, NY, US	19-134

#### Western Blot-Antikörper

Primärantikörper	Hersteller	Best.-Nr.
14-3-3 $\sigma$	Santa Cruz	Sc-7683
Actin	Dto.	Sc-1616
ATM-P Ser1981	Cell Signaling	4526
ATR-P	Dto.	2853
Bad	Santa Cruz	Sc-943

## Anhang

Bax	Santa Cruz	Sc-493
Bcl-2	Dto.	Sc-509
Bcl-X S/L	Dto.	Sc-1041
Caspase3	Dto.	Sc-1226
Cdc2 p34	Dto.	Sc-954
Cdc25A	Dto.	Sc-7389
Cdc25B	Dto.	Sc-5619
Cdc25C	Dto.	Sc-13138
Cdc25C-P Ser 216	Dto.	Sc-12354
Cdc2-P Tyr 15	Dto.	Sc-7989
Chk1	Cell Signaling	2345
Chk1-P Ser 345	Dto.	2341
Chk2	Dto.	2662
Chk2-P Thr 68	Dto.	2661
Cleaved-Caspase3	Dto.	9661
Cyclin A	Santa Cruz	Sc-751
Cyclin B1	Dto.	Sc-752
Cyclin D1	Dto.	Sc-753
Cyclin E	Dto.	Sc-481
P21	Dto.	Sc-397
P38	Dto.	Sc-7149
P38-P Tyr 182	Dto.	Sc-7975-R
P53	Dto.	Sc-6243
P53-P Ser 15	Cell Signaling	9284
WEE 1	Santa Cruz	Sc-5285
XIAP	Cell Signaling	2042
P21-P Ser 146	Santa Cruz	Sc-12902

Sekundärantikörper	Hersteller	Best.-Nr.
Anti-Mouse	Santa-Cruz	Sc-2005

## Anhang

---

Anti-Rabbit	Dako	P0217
Anti-Goat	Santa Cruz	Sc-2768

### Western-Blot-Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Best.-Nr.
ECL-Solution	Amersham, Little Chalfont, Uk	RPN 2106
Kaleid. Standart	Bio-Rad, München, D	161-0375
EDTA	Quality Biological, Inc. Gaithersburg, USA	351-027-100
PMSF	Sigma, Taufkirchen, D	93482
TWEEN 20	Dto.	P7949
Aprotinin	Dto.	A6279
APS	Bio Rad, München, D	161-0700
Temed	Dto.	161-0800
NP-40/IGEPAL-630	Sigma, Taufkirchen, D	I3021
Acrylamid 30%	Bio Rad, München, D	161-0158
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen, D	L2884
Sample Buffer, 2x	Dto.	S3401

### Apoptose- und WST-Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller	Best.-Nr.
WST-1	Roche, Mannheim, D	11644807001
Propidium Iodid	Sigma, Taufkirchen, D	P4170
AnnexinV	Caltag, Carlsbad, USA	L11384
AV-Binding Buffer	BD, Biosciences, Heidelberg	556454

Geräte

Bezeichnung	Hersteller	Best.-Nr.
Bio Fuge	Haraeus instruments, Osterode, D	75005181
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg, D	-
Brutschrank	Forma Scientific,	Serie II 3110
Durchflusszytometer	Coulter Electronics, Miami, USA	Epics CL System II Version 3.0
Elektrophoreseset		
ELISA Reader	Thermo Lab Systems, Sorvaajankatu, FIN	Multiscan
Homogenisator	Sartorius, Göttingen, D	BBI-8530742
Neubauer Zählkammer	Sarstaedt, Nümbrecht, D	
Power Pac	Bio-rad, München, D	165-5050

## **7.2. Danksagung**

Ich möchte Prof. Dr. med. Bertold Emmerich für die freundliche Übernahme meiner Doktorvaterschaft und die Bereitstellung seines Labors für meine Experimente danken.

Ganz besonders Priv. Doz. Dr. med. Ralf Schmidmaier für die intensive Betreuung und unverzichtbare Hilfe zu jeder Zeit.

Priv. Doz. Dr. med. Gerold Meinhardt für manch wichtigen Tip, und meinen hilfsbereiten Kollegen Sonja, Philipp und Meral.

Und letztlich meiner lieben Familie als Triebkraft zur Vollendung dieser Arbeit..

### 7.3. Lebenslauf

#### **Zur Person:**

Name: Gaul, Leander  
Wohnort: Prof.-Küntscher-Str.16  
82418 Murnau a. Staffelsee  
Geburtstag.: 08.08.1980  
Geburtsort: Daun/Eifel  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

#### **Schulbildung:**

1985-88: Grundschule Mehren  
1989-99: Geschwister-Scholl-Gymnasium Daun  
Juli 99: Abitur

#### **Zivildienst:**

09/99-10/2000: Krankenpflegehelfer am Dialysezentrum Daun

#### **Berufsausbildung:**

10/2000-08/2002: Vorklinisches Studium / LMU München  
08/2002: Ärztl. Vorprüfung  
08/2002-03/2006: Klinisches Studium / LMU München  
08/2003: 1.Staatsexamen  
08/05-04/06: Forschungssemester  
04/2006: 2.Staatsexamen  
04/2007: 3.Staatsexamen  
Seit 08/2007: Assistenzarzt an der BG-Unfallklinik Murnau

**Studienbegleitende Tätigkeiten:**

Famulaturen:

- 02-03/2003: Innere Medizin, KH 3.Orden  
02-03/2004: Unfallchirurgie u. Allgemein Chirurgie, KH 3.Orden  
03-04/2005: Hämatologie, Klinikum Innenstadt  
08-09/2005: Pneumologie, Praxis Dr. Kouliakis, Athen

PJ-Tertiale:

- 04-08/2006: Neurologie, Neurologische Klinik Großhadern  
08-11/2006: Chirurgie, KH Harlaching  
11/2006-03/2007: Innere Medizin, Gastroenterologie, KH Neuperlach

Nebentätigkeiten:

- 2000-2002 Stations-Nachtwache im Klinikum RDI (München)  
2002- 2007 student. Nachtdienst,  
Institut für Transfusionsmedizin des BRK (München)

Zusatzqualifikationen: Schein für Diagnostik der Leukämien  
Sonografie Grund- und Aufbaukurs

**Sonstiges:**

Fremdsprachen: Englisch, Französisch, Latein, Griechisch

#### **7.4. Erklärung**

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

Murnau, den 21.06.08

---

(Leander Gaul)