

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

Direktor: Prof. Dr. M. Reincke

**Die Proteinkinase C-Inhibitoren Enzastaurin und GÖ6976 wirken
synergistisch mit den genotoxischen Zytostatika Melphalan und
Doxorubicin beim Multiplen Myelom.**

Dissertation

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

vorgelegt von

Jakob Peter Armann

aus

Würzburg

2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichtersteller: PD. Dr.med. Ralf Schmidmaier

Mitberichtersteller: Priv. Doz. Dr. Harald Mückter
Prof. Dr. Martin Dreyling

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2009

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG & FRAGESTELLUNG	1
2. MATERIALIEN & METHODEN	5
2.1. Zellkultur	5
2.1.1. Zelllinien	5
2.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen	5
2.1.3. Zellzahlbestimmung	5
2.1.4. Gewinnung von primären Plasmazellen	6
2.1.5. Gewinnung von mononukleären Zellen für Knochenmarksstromakulturen	6
2.1.6. Kokultur von Stroma- und Plasmazellen	7
2.2. Zellvitalitätsmessungen	7
2.2.1. WST1-Assay	7
2.2.2. Isobologram Analyse	7
2.3. Durchflusszytometrische Analysen	8
2.3.1. Annexin/PI-Apoptose-Assay	8
2.3.2. Analyse der Oberflächenexpression	9
2.3.3. Zytotoxizitäts-Assay unter Kokulturbedingungen	9
2.3.4. Zytotoxizitäts-Assay bei primären Plasmazellen	10
2.4. Western Blotting	10
2.4.1. Zelllyse	10
2.4.2. Gelelektrophorese	11
2.4.3. Blotting	12
2.4.4. Proteinnachweiß	12
2.4.5. Membran-Stripping	13
2.5. GÖ6976 und Enzastaurin	13
2.6. Statistiken	14

3. ERGEBNISSE	15
3.1. Proteinkinase-C-Inhibitoren verstärken die Zytotoxizität von Alkylanzien und Anthrazyklinen	16
3.1.1. Zellproliferationsmessung bei Koinkubation von Melphalan und GÖ6976	16
3.1.2. Zellproliferationsmessung bei Koinkubation von Doxorubicin und GÖ6976	17
3.1.3. Zellproliferationsmessung bei Koinkubation von Doxorubicin und Enzastaurin	17
3.1.4. Zellproliferationsmessung bei Koinkubation von Melphalan und Enzastaurin	18
3.1.5. Enzastaurin und GÖ6976 in Kombination mit Melphalan und Doxorubicin hemmen die Zellproliferation synergistisch	19
3.2. Proteinkinase-C-Inhibitoren verstärken die Apoptoseinduktion von Alkylanzien und Anthrazyklinen	20
3.2.1. Apoptose-Assays bei Koinkubation von Melphalan und GÖ6976	20
3.2.2. Apoptose-Assays bei Koinkubation von Melphalan und Enzastaurin	22
3.2.3. Apoptose-Assays bei Monokultur von primären Plasmazellen	23
3.3. PKC-Inhibitoren verringern die Cell Adhesion mediated Drug Resistance gegenüber Alkylanzien	24
3.4. Proteinkinase-C-Inhibition führt zu einem Anstieg von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$	26
3.4.1. Verstärkte Apoptoseinduktion durch Kombination eines IK-Kinase-Inhibitors und Melphalan kann durch Aktivierung der PKC nicht reduziert werden	26
3.4.2. Darstellung der wichtigen Signalwege beim Multiplen Myelom	30

4. DISKUSSION	34
5. ZUSAMMENFASSUNG	38
6. LITERATURVERZEICHNIS	40
7. ANHANG	50
7.1. Verwendete Materialien und Methoden	50
7.1.1. Zellkultur	50
7.1.2. Zytostatika	50
7.1.3. Inhibitoren und Aktivatoren	51
7.1.4. Antikörper für die Oberflächenmessungen	51
7.1.5. Antikörper für die Western-Blot-Analyse	51
7.1.5.1. Primärantikörper	51
7.1.5.2. Sekundärantikörper	52
7.1.6. Enzyme	52
7.1.7. Kits	52
7.1.8. Chemikalien	53
7.1.9. Sonstige Artikel für den Western Blot	54
7.1.10. Geräte	54
7.2. Eigenständigkeitserklärung	56
7.3. Danksagungen	57
7.4. Lebenslauf	58

Die wesentlichen Teile der vorliegenden Arbeit wurden in einer allgemein anerkannten, internationalen, peer-reviewed Wissenschaftszeitschrift veröffentlicht:

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

Impact Factor: 2,237

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

2.1. Strukturformel von GÖ6976	13
2.2. Strukturformel von Enzastaurin	14
3.1. Zellproliferation nach Koinkubation von Melphalan und GÖ6976	16
3.2. Zellproliferation nach Koinkubation von Doxorubicin und GÖ6976	17
3.3. Zellproliferation nach Koinkubation von Doxorubicin und Enzastaurin	17
3.4. Zellproliferation nach Koinkubation von Melphalan und Enzastaurin	18
3.5. Synergistische Proliferationshemmung durch PKC-Inhibitoren und Alkylanzien und Anthrazykline	19
3.6. Die Koinkubation von Melphalan und GÖ6976 führt zu einer höheren Apoptoserate als die alleinige Inkubation mit Melphalan	21
3.7. Die Koinkubation von Melphalan und GÖ6976 führt zu einer höheren Apoptoserate als die alleinige Inkubation mit Melphalan	21
3.8. Die Koinkubation von Melphalan und Enzastaurin führt zu einer höheren Apoptoserate als die alleinige Inkubation mit Melphalan	22
3.9. Die Koinkubation von Melphalan und Enzastaurin führt zu einer höheren Apoptoserate als die alleinige Inkubation mit Melphalan	22
3.10. Die Koinkubation von Melphalan und GÖ6976 oder Enzastaurin führt zu einer höheren Apoptoserate als die alleinige Inkubation mit Melphalan	23

3.11. GÖ6976 und Enzastaurin reduzieren die CAM-DR	25
3.12. GÖ6976 und Enzastaurin reduzieren die CAM-DR	25
3.13. Koinkubation von Melphalan und dem IK-Kinase-Inhibitor führt zu einer deutlichen Erhöhung der Apoptoserate gegenüber der alleinigen Inkubation mit Melphalan	27
3.14. PMA hat sein Wirkoikum bei Gabe 12h nach Melphalangabe	28
3.15. IK-Kinase-Inhibitor hebt die durch PMA vermittelte Verminderung der Melphalanwirkung auf	29
3.16. IK-Kinase-Inhibitor hebt die durch PMA vermittelte Verminderung der Melphalanwirkung auf	29
3.17. Western-Blot-Analyse der wichtigen Signalwegmoleküle beim Multiplen Myelom	31
3.18. Western-Blot-Analyse der wichtigen Signalwegmoleküle beim Multiplen Myelom	32
3.19. Western-Blot-Analyse der gespaltenen Caspase3 und der wichtigen Signalwegmoleküle zur Freisetzung von NF- κ B beim Multiplen Myelom	33
4.1. Vereinfachte Darstellung der Aktivierung von NF- κ B durch die Proteinkinase C	35

1. Einleitung & Fragestellung

Das Multiple Myelom ist eine maligne Erkrankung, bei der es zu einer unkontrollierten klonalen Proliferation von Plasmazellen im Knochenmark kommt. Diese führt zu einer Zerstörung des Knochens, Verdrängung der physiologischen Blutbildung und zu einer Überproduktion von Immunglobulinen (Cavo et al. 2008). Das Multiple Myelom macht etwa 1% aller Malignome und 13% aller hämatologischen Malignome aus. Die Inzidenzrate der Erkrankung steigt mit dem Alter an. Das mittlere Alter der betroffenen Männer beträgt 62 Jahre, das der betroffenen Frauen 61 Jahre. Die Inzidenz zwischen 1973 und 1999 lag bei 5,6 Fällen auf 100.000 Menschen aller Ethnien (Ries et al., 2002). Mit Ausnahme der Plasmazelleukämie und der Extramedullärmanifestation der Weichteile sind die Tumorzellen beim Multiplen Myelom überwiegend im Knochenmark lokalisiert. Unbehandelt versterben die Patienten nach durchschnittlich sechs Monaten.

Der Tumor, seine Produkte und die Reaktion des Wirts führen zu Funktionsstörungen unterschiedlicher Organe und zu typischen Symptomen. Häufigstes Symptom sind Knochenschmerzen, welche bei 70% der Patienten auftreten und vor allem in der Lendenwirbelsäule und in den Rippen lokalisiert sind. Ursache für die Schmerzsymptomatik sind Knochenläsionen (Osteolysen), die aufgrund von Tumorzellproliferation und Osteoklastenaktivierung entstehen. Diese können zu pathologischen Frakturen führen. Zweithäufigstes klinisches Problem ist die erhöhte Infektanfälligkeit der Patienten, welche sich vor allem in fortgeschrittenen Stadien als lebensbedrohliche Sepsis manifestieren kann. Grundlage ist hier vor allem die funktionelle Hypogammaglobulinämie, welche aus einer verminderten Bildung und einem erhöhten Abbau vor allem der IgG-Antikörper resultiert. Das häufig auftretende Nierenversagen ist Folge vieler verschiedener Faktoren, allen voran der Cast-Nephropathie verursacht durch das vermehrt anfallende Paraprotein. Auch glomeruläre Amyloidablagerungen können vor allem beim Leichtkettenmyelom die Ursache hierfür sein. Zusätzlich kann das Paraprotein zu einer Viskositätssteigerung und damit zu einem klinischen Hyperviskositätssyndrom führen. Bei 80% aller Patienten findet sich im Verlauf der Krankheit eine Anämie. Diese kann sich wegen des verdrängenden Wachstums der

Myelomzellen oder wegen einer Hemmung der Hämatopoese durch sezernierte Tumorprodukte entwickeln.

Aus klinischer Sicht bieten sich mehrere Therapieoptionen an: Die Standardtherapie bei Jüngeren besteht aus einer Induktionschemotherapie, gefolgt von einer Tandem-Hochdosis-Chemotherapie mit Melphalan, ermöglicht durch die autologe Stammzelltransplantation. Bei älteren Patienten bestehen die aktiveren Therapien aus intermittierenden Zyklen von Melphalan in Kombination mit Prednison und Thalidomid oder Bortezomib bzw. Lenalidomid in Kombination mit Dexamethason (Attal et Harrousseau 2009).

Durch die vor 40 Jahren eingeführte konventionelle Chemotherapie mit Melphalan und Prednison konnte das mittlere Überleben auf drei Jahre gesteigert werden (Barlogie et al., 1984). Diese Ergebnisse konnten durch Einführung der Hochdosistherapie mit autologer Stammzelltransplantation verbessert werden, jedoch kann diese Therapie nicht bei allen Patienten angewendet werden, da unter der Hochdosis-Melphalan-Therapie bei älteren, morbideren Menschen die Mortalität erhöht ist. Durch die Stammzelltransplantation können mittlere Überlebenszeiten von 5,5 Jahren erreicht werden (Jantunen et al., 2006) und auch nach erneuter Stammzelltransplantation werden erneut nur 5,5 Jahre mittlere Überlebenszeit erreicht (Elice et al., 2006). Als weitere Möglichkeit stehen auch Bortezomib aus der Gruppe der Proteasomeninhibitoren und Thalidomid und Lenalidomid aus der Gruppe der Immunomodulatory Drugs (IMiDs) zur Verfügung. Des Weiteren kann eine Hochdosistherapie mit anschließender allogener Stammzelltransplantation durchgeführt werden, bei der die Gefahr der Transplantatkontamination entfällt und sich ein günstiger immunologischer Therapieeffekt durch die Graft-versus-Myelom Reaktion zeigt. Allerdings steht dieses Verfahren aufgrund der hohen Frühmortalität fast ausschließlich für jüngere Patienten (< 55 Jahre) zur Verfügung (Bruno et al. 2009)

Letztendlich führt jedoch keine dieser Therapieoptionen zur Heilung. Nach Monaten bis Jahren kommt es zur Ausbildung einer Resistenz gegen die Zytostatika (Gregory et al., 1992; Femand et al., 1998; Attal et al., 2001), und nach einem Progress der Grunderkrankung versterben die meisten Patienten an einer Infektion oder den Folgen einer Niereninsuffizienz.

Im Knochenmark haften die Myelomzellen an Stromazellen über die Expression von β 1-Integrinen an, vor allem VLA-4 und VLA-5 (Jensen et al., 1993). Die Bindung an die Stromazellen resultiert in einer Hochregulation von Zytokinen wie Interleukin-1a, Interleukin-6, Insulin-Like-Growth-Factor (Georgii-Hemming et al., 1996; Mitsiades et al., 2004), und Vascular-Endothelial-Growth-Factor (Gupta et al., 2001), die Signalkaskaden für Wachstum, Überleben und Zytostatikaresistenz induzieren, wie Janus-Kinase-Signal-Transducer und Activator-of-Transcription (JAK-STAT), Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3'-Kinase)/AKT und Mitogen-Activated-Protein-Kinase (MAPK) (Chauhan et al., 1995, 1996). Die Extrazellulärmatrix, welche Proteine wie Laminin, Vitronektin, Fibronektin und Kollagene umfasst, bietet ebenfalls Möglichkeiten der Adhärenz für Myelomzellen (Hazlehurst et al., 2001). Die Bindung der Tumorzellen über β 1-Integrine an die Extrazellulärmatrix führt zu einer vermehrten Resistenz gegenüber zytotoxischen Substanzen wie Doxorubicin und Melphalan (Damiano et al., 1999). Außerdem führt sie zu einem Schutz gegen zytostatikainduzierte Apoptose und erhöht die Nuclear-Factor-Kappa-B (NF- κ B)-abhängige Transkription (Urashima et al., 1996).

NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der verschiedene Überlebensfaktoren und antiapoptotische Faktoren wie Bcl-2, Bcl-XL und Bfl-1/A1 hochreguliert (Glasgow et al., 2001). Insgesamt werden die Myelomzellen durch das im Knochenmark vorherrschende Zytokinmilieu und die Adhärenz im Microenvironment weniger chemosensibel und die antiapoptotisch wirksame Signalkaskade über NF- κ B wird hochreguliert.

An der malignen Transformation der Myelomzellen sind intrinsische Überlebensmechanismen der Zellen beteiligt und die Resistenz gegenüber zytostatikainduzierter Apoptose, eingeschlossen der Hochregulation der antiapoptotisch wirkenden Proteine Bcl-2, Bcl-XL und Mcl-1 (Derenne et al., 2002), sowie die Aktivierung des Wachstums- und Überlebensfaktors NF- κ B, sowie AKT über den MAPK- und PI3-Signalweg. Chemotherapie selbst induziert auch Zytostatikaresistenz durch NF- κ B-Aktivierung (Wang et al., 1999, Ravi and Bedi, 2004, Baumann et al. 2008). Zusammenfassend stellt die vermehrte Aktivierung von

NF- κ B in Myelomzellen ein großes Problem bei der Behandlung der Erkrankung dar.

Die Proteinkinase C (PKC) stellt einen weiteren wichtigen Faktor für Zellwachstum, Proliferation, Überleben, Genexpression, Differenzierung und Migration dar (Meinhardt et al. 2002; Schmidmaier et al. 2004; Harnett et al. 2005; Shirato et al. 1996; Ni et al. 2003; Podar et al. 2001). Die PKC-Familie besteht aus elf Isoenzymen, die in drei Subgruppen eingeteilt werden können, konventionelle PKC (cPKC), neue PKC (nPKC) und atypische PKC (aPKC). Die Expression ist zellspezifisch und die Isoformen haben spezifische Funktionen (Nishizuka 1989). Für das Kolonkarzinom, das Glioblastom, das Prostatakarzinom, die chronische myeloische Leukämie und die chronische lymphatische Leukämie konnte eine Induktion der Apoptose durch Modulation der PKC-Isoenzyme gezeigt werden (Meinhardt et al. 2002; Schmidmaier et al. 2004; Graff et al. 2005; Ringhausen et al. 2006). Die genauen Mechanismen, durch die eine PKC-Modulation die intrazellulären Signalwege und Zellfunktionen beeinflusst, konnten bisher noch nicht im Detail aufgeklärt werden (Berra et al. 1995; Diaz-Meco et al. 1994; Schonwasser et al. 1998; Ueda et al. 1996).

Es konnte gezeigt werden, dass PKC in Myelomzellen exprimiert wird und eine Inhibition dieser Enzyme Apoptose induziert (Ni et al., 2003; Rizvi et al. 2006; Podar et al. 2006). Außerdem wurde gezeigt, dass Vascular-Endothelial-Growth-Factor (VEGF)-induzierte Myelomzellmigration zu einer Aktivierung von PKC führt (Podar et al. 2001). Dies legt eine wichtige Rolle von PKC in der Pathophysiologie des multiplen Myeloms nahe. Die Wirkung einer Hemmung dieses Signalweges in Kombination mit Zytostatika wurde bisher allerdings kaum untersucht.

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit ist, ob die Hemmung verschiedener PKC-Isoenzyme durch spezifische Inhibitoren die Wirkung genotoxischer Substanzen in Bezug auf Wachstum, Zelltod und Apoptose verstärken kann. Des Weiteren wird untersucht, ob diese Substanzen auch zu einer Abschwächung der primären Chemoresistenz der Myelomzellen führen.

2. Materialien & Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Zelllinien

Die Myelomzelllinien U266, OPM-2, RPMI-8226 und NCI-H929 stammen von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ).

Die Stromazelllinie HS-5 stammt von der American Tissue and Culture Collection (ATCC).

Die Zellen werden in RPMI-1640 mit 10% Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS) kultiviert, welches zuvor bei 56°C eine Stunde inaktiviert wurde, bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit, ohne Zugabe von Penicillin oder Streptomycin. Die Zellen werden bis zu einer Zellkonzentration von 8,0x10⁵/ml kultiviert und dann geteilt, und mit einer Konzentration von 2,0x10⁵/ml Zellen weiter kultiviert. Die Zellvitalität vor Beginn eines Experimentes wird mikroskopisch mittels Trypanblaufärbung sichergestellt.

2.1.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen.

Zum Einfrieren wird Einfriermedium hergestellt, welches aus 5ml RPMI-1640, 3ml FCS und 2ml DMSO besteht. Dieses wird bis zur Abfüllung in Kryoröhrchen auf Eis gelagert. Für das Einfrieren werden 2x10⁶ Zellen abzentrifugiert zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 0,9ml Medium (RPMI-1640 + 10% FCS) resuspendiert. Diese werden dann mit 0,9ml Einfriermedium in ein Kryoröhrchen pipettiert und sofort für 6h bei -20°C tiefgefroren, anschließend für 24h bei -80°C und danach in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

Für das Auftauen wird ein Kryoröhrchen zwei Minuten bei Raumtemperatur gelagert und anschließend der Inhalt in 37°C warmes Medium (RPMI-1640 + 10% FCS) überführt und zweimal in Medium gewaschen. Danach werden die Zellen in einer Konzentration von 2,0x10⁵ kultiviert.

2.1.3. Zellzahlbestimmung

Hierfür werden 50µl einer Zelllösung mit 50µl Trypanblau versetzt und gevortext. Anschließend wird die Zellzahl pro Milliliter unter dem Mikroskop in einer Neubauer-Zählkammer festgestellt.

2.1.4. Gewinnung von primären Plasmazellen.

Zur Isolierung von primären Plasmazellen werden jeweils 15ml heparinisiertes Knochenmarksaspirat von Patienten mit einem Multiplen Myelom oder 15ml heparinisiertes Vollblut von Patienten mit einer Plasmazelleukämie benötigt. Die Patienten hatten nach Aufklärung durch einen Arzt ihr Einverständnis zur Verwendung des Materials für wissenschaftliche Zwecke erklärt. Ein positives Votum der Ethikkommission liegt vor. Die Aufreinigung der Plasmazellen erfolgt durch eine Dichtezentrifugation mittels eines Polysaccharids aus Saccharose und Epichlorhydrin (Ficoll-Paque). Dieses wird auf Raumtemperatur erwärmt und es werden 10ml davon in ein 50ml Falcon-Röhrchen gegeben. Das Aspirat bzw. Vollblut wird 1:1 mit PBS verdünnt und vorsichtig darüber geschichtet. Anschließend wird es eine halbe Stunde bei 755xg und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Danach wird die Interphase („buffy coat“) abpipettiert und in ein neues Röhrchen gegeben, zweimal mit PBS gewaschen und in Medium (RPMI-1640 + 10% FCS) resuspendiert.

2.1.5. Gewinnung von mononukleären Zellen für Knochenmarksstromakulturen.

Zur Isolierung von mononukleären Zellen werden jeweils 15ml heparinisiertes Knochenmarksaspirat benötigt. Die Patienten hatten nach Aufklärung durch einen Arzt Ihr Einverständnis zur Verwendung des Materials für wissenschaftliche Zwecke erklärt. Ein positives Votum der Ethikkommission liegt vor. Die Aufreinigung der mononukleären Zellen erfolgt durch eine Dichtezentrifugation mittels Ficoll-Paque. Dieses wird auf Raumtemperatur erwärmt und es werden 10ml davon in ein 50ml Falcon Röhrchen gegeben. Das Aspirat bzw. Vollblut wird 1:1 mit PBS verdünnt und vorsichtig darüber geschichtet. Anschließend wird es eine halbe Stunde bei 755xg und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Danach wird die Interphase („buffy coat“) abpipettiert und in ein neues Röhrchen gegeben, zweimal mit PBS gewaschen und in Medium (RPMI-1640 + 10% FCS) resuspendiert. Die Konzentration wird bestimmt und auf 10^7 /ml verdünnt und in Zellkulturflaschen für mindestens drei, maximal fünf Wochen kultiviert, bis ein Monolayer von hBMSC vorhanden ist. Dieser wird mittels Zugabe von 5ml Trypsin abgelöst, die Zellen werden zweimal in Medium gewaschen und danach in einer Konzentration von

10^5 /ml auf Wellplates aufgetragen und eine Woche kultiviert, bis erneut ein Monolayer entstanden ist.

2.1.6. Kokultur von Stroma- und Plasmazellen

Primäre Stromazellen werden in einer Konzentration von 10^5 /ml bzw. HS-5 in einer Konzentration von 10^7 /ml auf Wellplates aufgetragen und eine Woche in Medium (RPMI-1640 + 10% FCS) kultiviert, bis ein Monolayer entstanden ist. Daraufhin wird das Medium abpipettiert und es werden 5×10^5 Myelomzellen (primäre oder Zelllinie) in 4ml Medium in die beschichteten Wells gegeben. Diese werden dann für 48h mit entsprechenden Substanzen inkubiert und danach werden die Zellen mittels Cellscaper gelöst und analysiert. Zu Vergleichszwecken wird immer ein Ansatz mit und ein Ansatz ohne Stromazellen gleichzeitig angesetzt.

2.2. Zellvitalitätsmessung

2.2.1. WST1-Assay

In den Mitochondrien vitaler Zellen wird das rote Tetrazoliumsalz WST1 in das orange-gelbe Formazan umgesetzt. Die Orangefärbung kann bei einer Wellenlänge von 450-630nm bestimmt werden. Da avitale Zellen WST1 nicht umsetzen korreliert die Extinktionserhöhung bei 450nm gegen eine Referenzwellenlänge von 690nm, die im Multi-Well-Photometer gemessen wird, mit der Anzahl der vitalen Zellen.

5×10^5 Zellen einer Zelllinie werden in 4ml Medium (RPMI-1640 + 10% FCS) in je ein Well einer 6-Well-Platte pipettiert und mit entsprechenden Substanzen inkubiert (Melphalan, Doxorubicin, GÖ6976, Enzastaurin). Nach 48h werden je Well acht 100µl Proben in eine 96-Well-Platte übertragen und mit jeweils 10µl WST1 versetzt. Nach zwei Stunden erfolgt die Messung im Multi-Well-Photometer. Die Analyse beinhaltet eine Messung von Kontrollen (nicht behandelte Zellen) und Blanks (Färbung von Medium).

2.2.2. Isobologram Analyse

Eine Isobologramm Analyse wurde mittels der Calcosyn Software (Biosoft, Ferguson, Cambridge, UK) durchgeführt. Ein Combination Index (CI) kleiner 0,9 lässt auf einen synergistischen Effekt schließen, während Werte zwischen 0,9 und 1,1 auf additive Effekte schließen lassen.

2.3. Durchflusszytometrische Analysen

2.3.1. AnnexinV/Propidiumjodid-Apoptose-Assay

In vitalen Zellen besteht eine Asymmetrie der Zellmembran. So kommt Phosphatidylserin bei vitalen Zellen nur in der Innenseite der Membran vor. Zu Beginn der Apoptose verliert die Zelle die Fähigkeit, diese Asymmetrie aufrecht zu erhalten, so dass Phosphatidylserin auch in die äußere Membran gelangt. Annexin-V kann an der Außenseite der Membran an Phosphatidylserin binden und mittels Bindung an Fluoresceinisothiocyanat (FITC), nach Anregung durch einen Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488nm, im Durchflusszytometer gemessen bei einer Wellenlänge von 518nm werden.

Verliert die Zelle im weiteren Verlauf der Apoptose auch noch ihre Membranintegrität, so kann Propidiumjodid (PI), ein DNA-Farbstoff, durch die Membran permeieren und sich an die DNA anlagern. Wird PI mit einem Argonlaser bei 488nm angeregt, wird Licht der Wellenlänge 617nm emittiert und kann im Durchflusszytometer gemessen werden.

Durch die Kombination der beiden Färbungen können zwei Stadien des Zelluntergangs beschrieben werden.

Stadium 1: Zellen in der frühen Apoptose – Annexin-Vpositiv/PInegativ

Stadium 2: Zellen in der späten Apoptose – Annexin-Vpositiv/PIpositiv

Es werden 5×10^5 Zellen bei 4°C und 1500U/min 5min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, und dann in AnnexinV-Binding-Buffer gelöst, in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml.

Binding Buffer: 10 mM Hapes/NaOH, pH 7,4
 140 mM NaCl
 2,5 mM CaCl₂

Nach dem Transfer von 100µl der Zellsuspension in ein FACS-Röhrchen (Sarstedt) werden 5µl AnnexinV-FITC und 10µl PI zugegeben und dann 15 Minuten im Dunklen inkubiert. Danach werden weitere 300µl Binding Buffer zugefügt und die Probe innerhalb einer Stunde analysiert. Die Analyse erfolgt im Epics Coulter XL

Durchflusszytometer unter Verwendung der Kanäle FL1 (AnnexinV-FITC) und FL3 (PI).

2.3.2 Analyse der Oberflächenexpression

Zur Oberflächenexpressionsanalyse werden die Zellen mit einem monoklonalen Antikörper markiert, der entweder an Fluoresceinisothiocyanat (FITC) oder an Phycoerythrin (PE) gebunden ist. So kann mit dem Durchflusszytometer die Farbintensität gemessen werden und somit die Oberflächenexpressionsstärke bestimmter Antigene bestimmt werden.

Es werden 5×10^5 Zellen bei 4°C und $1.500\text{U}/\text{min}$ 5min abzentrifugiert, der Überstand verworfen, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und dann in eiskaltem PBS gelöst, in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml. $100\mu\text{l}$ der Zellsuspension werden in ein FACS-Röhrchen (Sarstedt) transferiert und $10\mu\text{l}$ Antikörperlösung zugegeben und dann zehn Minuten im Dunklen inkubiert. Anschließend werden die Zellen nach Zugabe von 2ml eiskaltem PBS erneut bei 4°C und $1500\text{U}/\text{min}$ 5min zentrifugiert und danach in $400\mu\text{l}$ PBS gelöst. Die Analyse erfolgt innerhalb von einer Stunde im Epics Coulter XL-Durchflusszytometer unter Verwendung der Kanäle FL1 (AK-FITC) und FL (AK-PE).

2.3.3. Zytotoxizitäts-Assay unter Kokulturbedingungen

Um bei Kokulturen zwischen den Stroma- und den Plasmazellen unterscheiden zu können, werden die Zellen bei 4°C und $1.500\text{U}/\text{min}$ 5min zentrifugiert, der Überstand verworfen, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, und dann in eiskaltem PBS gelöst, in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml. $100\mu\text{l}$ der Zellsuspension werden in ein FACS-Röhrchen (Sarstedt) transferiert und $10\mu\text{l}$ Antikörperlösung (CD 138 bei primären Plasmazellen U266 und OPM-2, CD 38 bei RPMI-8226 und NCI-H929) zugegeben und dann zehn Minuten im Dunklen inkubiert. Anschließend werden die Zellen nach Zugabe von 2ml eiskaltem PBS erneut bei 4°C und $1500\text{U}/\text{min}$ 5min zentrifugiert und danach im $100\mu\text{l}$ Binding Buffer gelöst. Nach Zugabe von $5\mu\text{l}$ AnnexinV-FITC und weiteren 15 Minuten Inkubation im Dunklen werden $300\mu\text{l}$ Binding Buffer zugeben. Die Analyse erfolgt innerhalb von einer Stunde im Epics Coulter XL-Durchflusszytometer unter Verwendung der Kanäle FL1 (AnnexinV-FITC) und FL2 (AK-PE).

2.3.4. Zytotoxizitäts-Assay bei primären Plasmazellen

Um primäre Plasmazellen von den übrigen weißen Blutzellen unterscheiden zu können, werden die Zellen bei 4°C und 1.500U/min 5min zentrifugiert, der Überstand verworfen, zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und dann in eiskaltem PBS gelöst, in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml. 100µl der Zellsuspension werden in ein FACS-Röhrchen (Sarstedt) transferiert und 10µl CD-138 Antikörperlösung zugegeben und dann 10 Minuten im Dunklen inkubiert. Anschließend werden die Zellen nach Zugabe von 2ml eiskaltem PBS erneut bei 4°C und 1.500U/min 5min zentrifugiert und danach im 100µl Binding Buffer gelöst. Nach Zugabe von 5µl AnnexinV-FITC und weiteren 15 Minuten Inkubation im Dunklen werden 300µl Binding Buffer zugeben. Die Analyse erfolgt innerhalb von einer Stunde im Epics Coulter XL-Durchflusszytometer unter Verwendung der Kanäle FL1 (AnnexinV-FITC) und FL2 (AK-PE).

2.4. Western Blotting

Der Western Blot wird zum Nachweis eines Proteins in der Zelle herangezogen. In einem mehrschrittigen Verfahren werden verschiedene Proteine mittels Chemolumineszenz nachgewiesen.

2.4.1. Zelllyse

$4,0 \times 10^6$ Zellen werden 4h, 12h oder 48h mit Melphalan und/oder einem Proteinkinase-C-Inhibitor (GÖ6976 oder Enzastaurin) inkubiert und anschließend bei 4°C und 1.500U/min sechs Minuten zentrifugiert und danach zweimal in eiskaltem PBS gewaschen und in 1ml PBS gelöst, erneut bei 4°C und 2.500U/min sechs Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und 100µl Zelllysepuffer hinzugegeben.

Zelllysepuffer:

Aqua dest (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), Na₃VO₄ (100µl, 100mM).

Nachdem die Zellen eine halbe Stunde auf Eis gelagert wurden, erfolgt die Zugabe von 10µl NP40 (10%) und die Proben wurden 15 Minuten bei 4°C geschwenkt. Anschließend werden die Proben 15 Minuten bei 4°C 13.000U/min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig in neue Eppendorf-Cups übertragen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt durch Zugabe von 800µl Aqua dest. und 200µl Jod-Färbereagenz zu 2µl Proteinlösung und anschließender Messung im Photometer gegen einen Nullwert.

2.4.2. Gelelektrophorese

Im Anschluss werden die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben durch Zugabe von Lysepuffer einander angeglichen. Die Proteinlösung wird mit Loading Buffer im Verhältnis 1:4 verdünnt und bei 95°C für fünf Minuten erhitzt, anschließend bei 6.000U/min zwei Minuten lang abzentrifugiert und auf Polyacrylamidgele (15% Acrylamid) aufgetragen

Seperating Gel (15%): 2,95ml Aqua dest., 3,15ml Tris 1,5M pH8,8, 6,15ml Acrylamid (30%), 125µl APS 10%, 7,5µl Temed.

Die Gelkammern werden zu drei Vierteln mit der Gellösung gefüllt und anschließend mit 500µl Isopropanol überschichtet und 30 Minuten stehen gelassen. Nach der Wartezeit wird das Isopropanol abgegossen und die Gelkammern viermal mit Aqua dest. gereinigt und getrocknet.

Danach erfolgt die Zugabe des Stacking-Gels.

2,25ml Aqua dest.; 950µl Tris 1,5M pH8,8; 62µl Acrylamid (30%); 62µl APS 10%; 6,5µl Temed.

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

Spannung betrug, solange sich das Protein im Stacking-Gel befand, 80V, nach Erreichen des Separation-Gels wurde sie auf 100V erhöht.

2.4.3. Blotting

Die nun nach dem Gewicht aufgetrennten Proteine werden auf PVDF-Membranen übertragen. Hierfür werden die Membranen in Methanol, Aqua dest. und Transfer Puffer getränkt, anschließend auf das Gel zwischen je zwei Filterpapiere und Schwämme gelegt, in den Transferbehälter gestellt und bei 4°C und 23V 12h inkubiert.

Transfer-puffer: 30,28g Tris-HCl
144,13g Glycin
1580,0g Methanol
Aqua dest. auf 10,0L auffüllen

2.4.4. Proteinnachweis

Der Proteinnachweis basiert auf einem mehrschrittigen Verfahren, bei dem ein Primärantikörper an das 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. Zunächst werden die Membranen an der Luft zwei Stunden getrocknet, um die Proteinbindung zu erhöhen. Danach werden sie eine Stunde in Blocking Solution (5g Magermilchpulver in 100ml TBST (1L TBS + 0,5ml Tween20)) inkubiert und anschließend 4x zehn Minuten in TBST gewaschen.

TBS: 2,42 g Tris
8,0 g NaCl
1,0 Liter Aqua dest.
mit Salzsäure auf pH 7,4 eingestellt

Der primäre Antikörper wird 1:1.000 mit TBST verdünnt und 24h auf einem Schüttler inkubiert, anschließend werden die Membranen 4x zehn Minuten in TBST gewaschen. Der sekundäre Antikörper wird 1:2.000 mit Blocking Solution verdünnt und eine Stunde auf einem Schüttler inkubiert, danach werden die Membranen

erneut gewaschen. Anschließend werden je 3ml der zwei ECL-Lösungen auf die Membranen gegeben und die Chemolumineszenz der Proteinbanden kurze Zeit später auf einem Röntgenfilm festgehalten.

2.4.5. Membran Stripping

Die gebundenen Antikörper können wieder von den Membranen entfernt werden, so dass es möglich ist, mehrere Antikörper-Overlays pro Membran durchzuführen. Hierfür werden die Membranen 30 Minuten in 57°C warmer Stripping-Solution, der pro 100ml 960µl Mercaptoethanol zugesetzt werden, inkubiert und danach 4x zehn Minuten in TBST gewaschen. Anschließend erfolgt das Blocken in Blocking Solution und der Proteinnachweis wie oben geschildert.

Stripping-Puffer: Tris 7,56g
SDS 20 g
H₂O 1L

2.5. GÖ6976 und Enzastaurin

GÖ6976 ist ein Methyl- und Cyanoalkyl-substituiertes nicht glycosidisches Indolocarbazol, das die PKC α mit einer IC₅₀ von 2,3nM und die PKC β mit einer IC₅₀ von 6,2nM kompetitiv hemmt (Martiny-Baron et al., 1993).

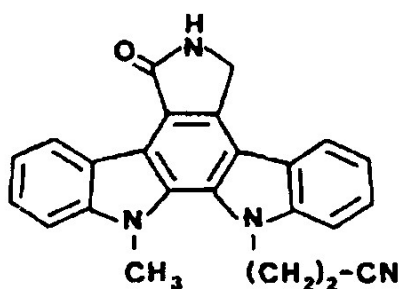


Abbildung 2.1.: Strukturformel von GÖ6976

Enzastaurin (früher LY317615 HC1) ist ein azyklisches Bisindolylmaleimid, das die PKC β selektiv mit einer IC₅₀ von 0,006 M kompetitiv hemmt. Enzastaurin wurde bereits in Studien in oraler Gabe Menschen verabreicht und wurde in Dosen bis zu 700mg/Tag gut vertragen (Pearce et Miller, 2005).

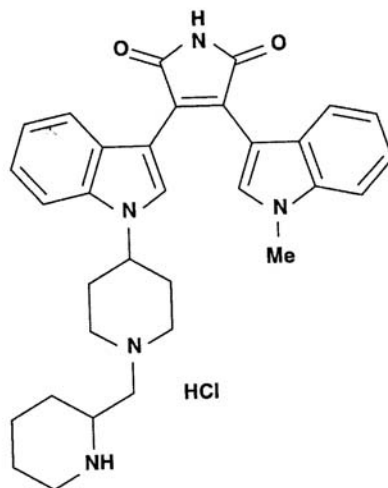


Abbildung 2.2.: Strukturformel von Enzastaurin

2.6 Statistiken

In den Abbildungen werden die Mittelwerte mit den Standardabweichungen gezeigt. Die Ergebnisse wurden in mindestens zwei unabhängig von einander 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

Alkylanzien wie Melphalan und Anthrazykline wie Doxorubicin sind die Basiszytostatikagruppen in der Therapie des Multiplen Myeloms, wobei Melphalan als das wirksamste Zytostatikum gilt. Geklärt werden soll die Frage, ob das Ansprechen der Myelomzellen auf diese Zytostatika durch bestimmte Signalwegmodulatoren verstärkt werden kann. Falls die Verstärkung nicht möglich ist, sollte die Zytostatika-Dosis zumindest verringert werden können. Hierfür musste zunächst eine Substanz gefunden werden, die zwar in therapeutischer Dosis an sich nicht toxisch auf die Zellen wirkt, die andererseits bei Anwesenheit von Zytostatika deren Wirkung erhöht. Um auszuschließen, dass es sich bei den beobachteten Effekten um substanzspezifische Effekte oder um Effekte handelt, die durch spezifische Wechselwirkung der Substanz mit der Chemotherapie und/oder Zelllinie herrühren, wurden zwei unterschiedliche Proteinkinase-C-Inhibitoren – GÖ6976 und Enzastaurin – und zwei unterschiedliche Zytostatika – Melphalan und Doxorubicin – und vier verschiedene Zelllinien – U266, OPM-2, RPMI-8226, NCI-H929 – sowie primäre Patientenzellen verwendet. Der proteinkinase-C α β -spezifische Inhibitor GÖ6976 ist bereits seit längerem Gegenstand der Forschung. Es konnte gezeigt werden, dass er in hohen Konzentrationen bei verschiedenen Malignomen – auch beim Multiplen Myelom – Apoptose induziert. Allerdings wurde bisher nicht untersucht, ob er in Konzentrationen, in denen er noch keine Apoptose auslöst, bereits Effekte auf die Wirkung eines Zytostatikums besitzt. Auch für den proteinkinase-C β -spezifischen Inhibitor Enzastaurin (früher LY317615 HC1) konnten ähnliche Effekte für das Kolonkarzinom und das Glioblastom nachgewiesen werden. Allerdings wurden auch hier keine Koinkubationen mit Zytostatika untersucht. Auch die Anwendung von Enzastaurin beim Multiplen Myelom wurde bisher nicht umfassend untersucht. Enzastaurin ist im Gegensatz zu GÖ6976 zur oralen Gabe geeignet.

3.1. Proteinkinase-C-Inhibitoren verstärken die Zytotoxizität von Alkylanzien und Anthrazyklinen

Zur Klärung der Frage, ob die Kombination eines Proteinkinase-C-Inhibitors mit einem Zytostatikum synergistische Effekte in der Therapie zeigt wurde zunächst eine Zellproliferationsmessung durchgeführt. Dafür wurde jede Zellreihe mit Melphalan oder Doxorubicin und dem proteinkinase-C $\alpha\beta$ -spezifischen Inhibitor GÖ6976 oder dem proteinkinase-C β -spezifischem Inhibitor Enzastaurin über 48 inkubiert, wobei der Proteinkinase-C-Inhibitor eine Stunde vor dem Zytostatikum auf die Zellen gegeben wurde. Die Analyse erfolgte mittels WST1-Assay, wobei die Proliferation der unbehandelten Zellen gleich 100% gesetzt wurde.

3.1.1 Zellproliferationsmessung bei Koinkubation von Melphalan und GÖ6976

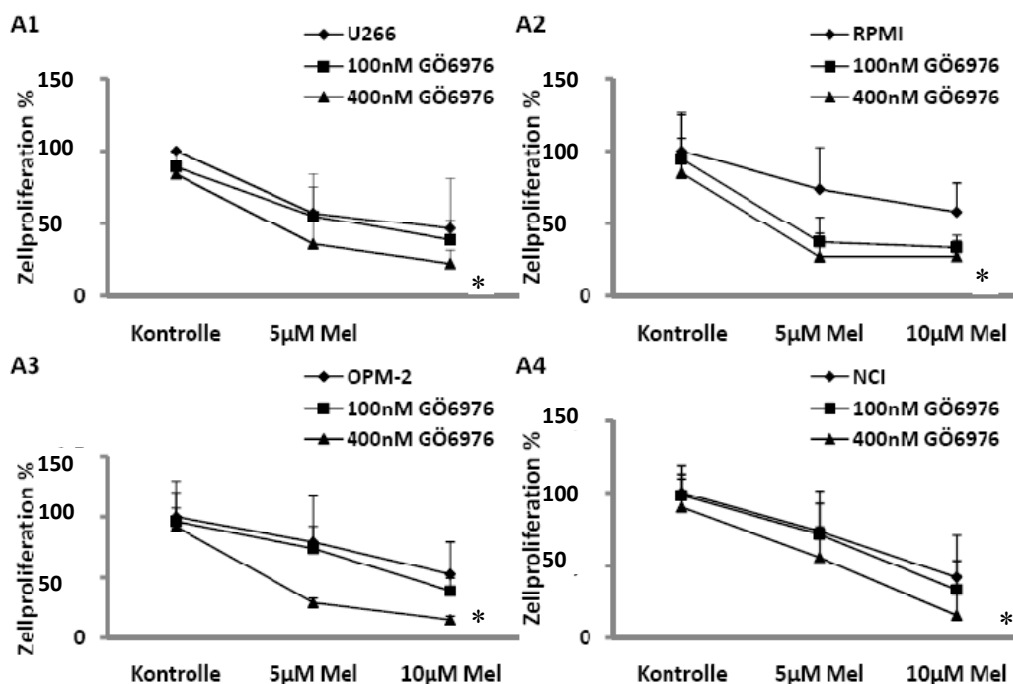


Abbildung 3.1.: Zellproliferation nach Koinkubation von Melphalan und GÖ6976. Alle Zellen wurden 48h mit Melphalan inkubiert, GÖ6976 wurde eine Stunde vorinkubiert. Als Referenzwert gilt die im Photometer gemessene Extinktion der unbehandelten Zellen. * P < 0,05 vs. Kontrolle

3.1.2. Zellvitalitätsmessungen bei Koinkubation von Doxorubicin und GÖ6976

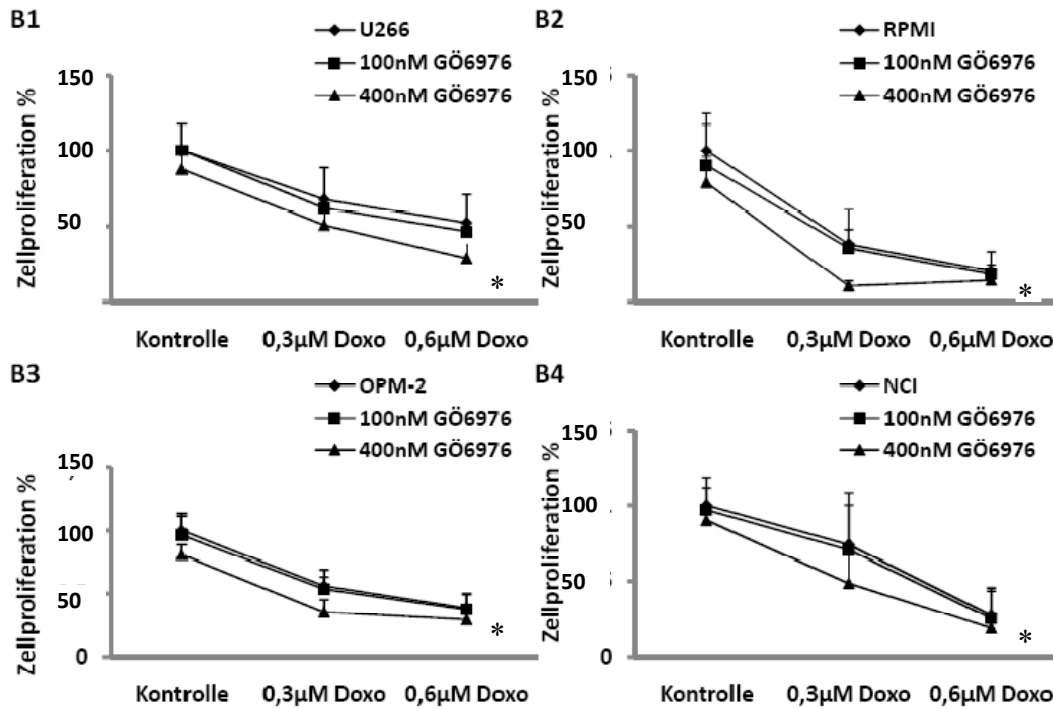


Abbildung 3.2.: Zellproliferation nach Koinkubation von Doxorubicin und GÖ6976. Alle Zellen wurden 48h mit Doxorubicin inkubiert, GÖ6976 wurde eine Stunde vorinkubiert. Als Referenzwert gilt die im Photometer gemessene Extinktion der unbehandelten Zellen. * P < 0,05 vs. Kontrolle

3.1.3. Zellvitalitätsmessung bei Koinkubation von Doxorubicin und Enzastaurin

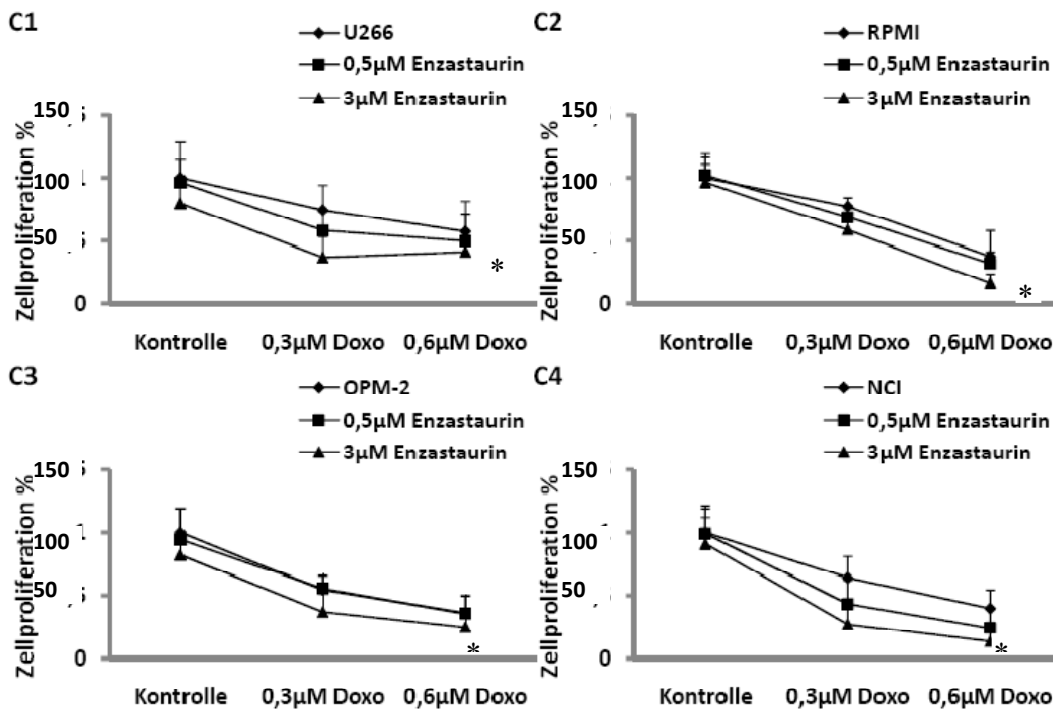
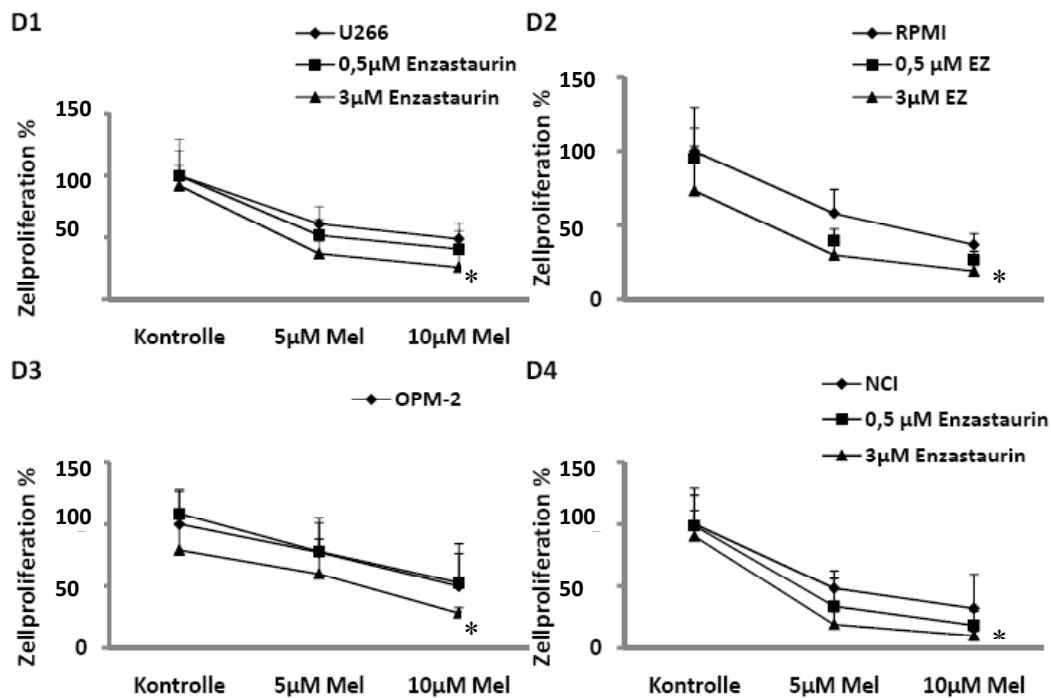


Abbildung 3.3.: Zellproliferation nach Koinkubation von Doxorubicin und Enzastaurin. Alle Zellen wurden 48h mit Doxorubicin inkubiert, Enzastaurin wurde eine Stunde vorinkubiert. Als Referenzwert gilt die im Photometer gemessene Extinktion der unbehandelten Zellen. * P < 0,05 vs. Kontrolle

3.1.4 Zellvitalitätsmessung bei Koinkubation von Melphalan und Enzastaurin



Abbildung

3.4.: Zellproliferation nach Koinkubation von Melphalan und Enzastaurin. Alle Zellen wurden 48h mit Melphalan inkubiert, Enzastaurin wurde eine Stunde vorinkubiert. Als Referenzwert gilt die im Photometer gemessene Extinktion der unbehandelten Zellen. * $P < 0,05$ vs. Kontrolle

Die Inkubation der Zelllinien mit Melphalan oder Doxorubicin - in der jeweils höheren Konzentration führt zu einer Reduktion der Proliferation der Zellen auf etwa 50% der Kontrollgruppe. In Kombination mit einem Proteinkinase-C-Inhibitor wird eine Reduktion der Proliferation auf Werte zwischen 10% und 30% verglichen mit der Kontrollgruppe erreicht. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Koinkubation eines Proteinkinase-C-Inhibitors mit einem Zytostatikum die Zellvitalität mehr beeinträchtigt, als die alleinige Inkubation mit dem Zytostatikum. Außerdem beeinträchtigen die Proteinkinase-C-Inhibitoren alleine die Zellvitalität kaum. Dieses Ergebnis ist unabhängig davon, welche Zelllinie, welches Zytostatikum und welcher Proteinkinase-C-Inhibitor verwendet wird. Die Tatsache, dass bestimmte Zelllinien bei gleicher Konzentration des Zytostatikums unterschiedlich große Abnahmen in der Zellvitalität zeigen, lässt sich mit der unterschiedlichen natürlichen Resistenz der Zellen gegenüber den Zytostatika erklären. Ob die Abnahme der Zellvitalität allerdings durch Apoptose bestimmt ist, oder durch eine

Ergebnisse

verminderte Vermehrung der Zellen, kann mit dem WST1-Assay alleine nicht geklärt werden.

3.1.5. Enzastaurin und GÖ6976 in Kombination mit Melphalan und Doxorubicin hemmen die Zellproliferation synergistisch.

U266	Proliferation %	CI	RPMI	Proliferation %	CI
M 5 +G 100	0,55	0,67	M 5 +G 100	0,37	0,23
M 5 + G 400	0,36	0,41	M 5 + G 400	0,27	0,16
M 10 + G 100	0,39	0,88	M 10 + G 100	0,33	0,37
M 10 + G 400	0,19	0,48	M 10 + G 400	0,27	0,28
M 5 + EZ 0,5	0,52	0,59	M 5 + EZ 0,5	0,40	0,56
M 5 + EZ 3	0,37	0,52	M 5 + EZ 3	0,30	0,43
M 10 + EZ 0,5	0,41	0,83	M 10 + EZ 0,5	0,27	0,69
M10 + EZ 3	0,20	0,33	M10 + EZ 3	0,15	0,39
D 0,3 + G100	0,62	0,92	D 0,3 + G100	0,36	0,85
D 0,3 + G400	0,51	1,20	D 0,3 + G400	0,12	0,09
D 0,6 + G100	0,47	0,80	D 0,6 + G100	0,18	0,37
D 0,6 + G400	0,27	0,37	D 0,6 + G400	0,12	0,17
D 0,3 + EZ 0,5	0,58	0,53	D 0,3 + EZ 0,5	0,69	0,91
D 0,3 + EZ 3	0,36	0,25	D 0,3 + EZ 3	0,59	1,31
D 0,6 + EZ 0,5	0,50	0,81	D 0,6 + EZ 0,5	0,32	1,28
D 0,6 + EZ 3	0,29	0,36	D 0,6 + EZ 3	0,16	0,95
OPM-2	Proliferation %	CI	NCI	Proliferation %	CI
M 5 +G 100	0,37	0,23	M 5 +G 100	0,72	0,80
M 5 + G 400	0,27	0,16	M 5 + G 400	0,56	0,63
M 10 + G 100	0,27	0,30	M 10 + G 100	0,33	0,63
M 10 + G 400	0,33	0,37	M 10 + G 400	0,05	0,18
M 5 + EZ 3	0,60	1,49	M 5 + EZ 0,5	0,38	0,52
M10 + EZ 3	0,28	1,36	M 5 + EZ 3	0,19	0,25
D 0,3 + G100	0,53	0,95	M 10 + EZ 0,5	0,10	0,19
D 0,3 + G400	0,35	0,51	M10 + EZ 3	0,10	0,22
D 0,6 + G100	0,37	0,96	D 0,3 + G100	0,71	0,40
D 0,6 + G400	0,25	0,50	D 0,3 + G400	0,48	0,59
D 0,3 + EZ 0,5	0,55	1,04	D 0,6 + G100	0,25	0,19
D 0,3 + EZ 3	0,37	1,03	D 0,6 + G400	0,10	0,35
D 0,6 + EZ 0,5	0,35	0,49	D 0,3 + EZ 0,5	0,43	0,59
D 0,6 + EZ 3	0,16	0,36	D 0,3 + EZ 3	0,27	0,47
			D 0,6 + EZ 0,5	0,24	0,70
			D 0,6 + EZ 3	0,07	0,28

Abbildung 3.5.: Synergistische Proliferationshemmung durch PKC-Inhibitoren und Alkylanzien und Anthrazykline. Myelomzellen wurden mit GÖ6976 (100nM oder 400nM) oder Enzastaurin (0,5µM oder 3µM) inkubiert. Nach einer Stunde erfolgte die Zugabe von Melphalan (5µM oder 10µM) oder Doxorubicin (0,3µM oder 0,6µM) und die Zellen wurden für weitere 48h inkubiert. Danach wurde die Zellproliferation mittels WST-1 Assay bestimmt. Die Ergebnisse der Experimente, die in Abb. 3.1 – 3.4. gezeigt werden, wurden mittels Calcsyn Software analysiert. CI bezeichnet den Combination Index. CI 1,1 – 0,9 lässt auf additive Effekte schließen, während CI < 0,9 auf synergistische Effekte schließen lässt.

Die Berechnung der Combination Indices (CI) mittels Calcosyn Software zeigte, dass die Kombination von Proteinkinase-C-Inhibitoren mit zytotoxischen Substanzen hauptsächlich zu einer synergistischen ($CI < 0,9$) Proliferationshemmung führt und nicht nur auf einem additiven Effekt ($CI 1,1 - 0,9$) beruht. Dieses Ergebnis konnte an allen vier Zelllinien beobachtet werden.

3.2. Proteinkinase-C-Inhibitoren verstärken die Apoptoseinduktion von Alkylanzien und Anthrazyklinen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Kombination eines PKC-Inhibitors mit einem Alkylanz oder Anthrazyklin auf die Proliferation synergistisch wirken. Für die Therapie ist es aber entscheidend, ob diese Kombination die Apoptoserate erhöhen kann. Um zu zeigen, dass durch die Koinkubation die Apoptoserate steigt und nicht alleine eine Proliferationshemmung vorliegt und um die Ergebnisse der Zellproliferationsmessungen zu validieren wurden nun verschiedene Apoptose-Assays im Durchflusszytometer durchgeführt. Hierbei wurden nun die Zellen auf das Vorhandensein von Phosphatidylserin in der äußeren Membran oder auf die verloren gegangene Membranintegrität - beides Zeichen der Apoptoseinduktion - untersucht. Da sich bei den WST-1 Assays keine grundlegenden Unterschiede zwischen den Zelllinien oder den Zytostatika gezeigt haben, werden für die nachfolgenden Apoptose-Assays nur noch die Zelllinien U266 und OPM-2, sowie das wirksamere Zytostatikum, Melphalan verwendet.

3.2.1 Apoptose-Assays bei Koinkubation von Melphalan und GÖ6976

Für das Apoptose-Assay wurden die Zellen 48h mit Melphalan und GÖ6976 oder Enzastaurin inkubiert. Der Proteinkinase-C-Inhibitor wurde eine Stunde vorinkubiert. Anschließend wurden die Myelomzellen durch Pipettieren geerntet, mit AnnexinV-FITC und PI gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen.

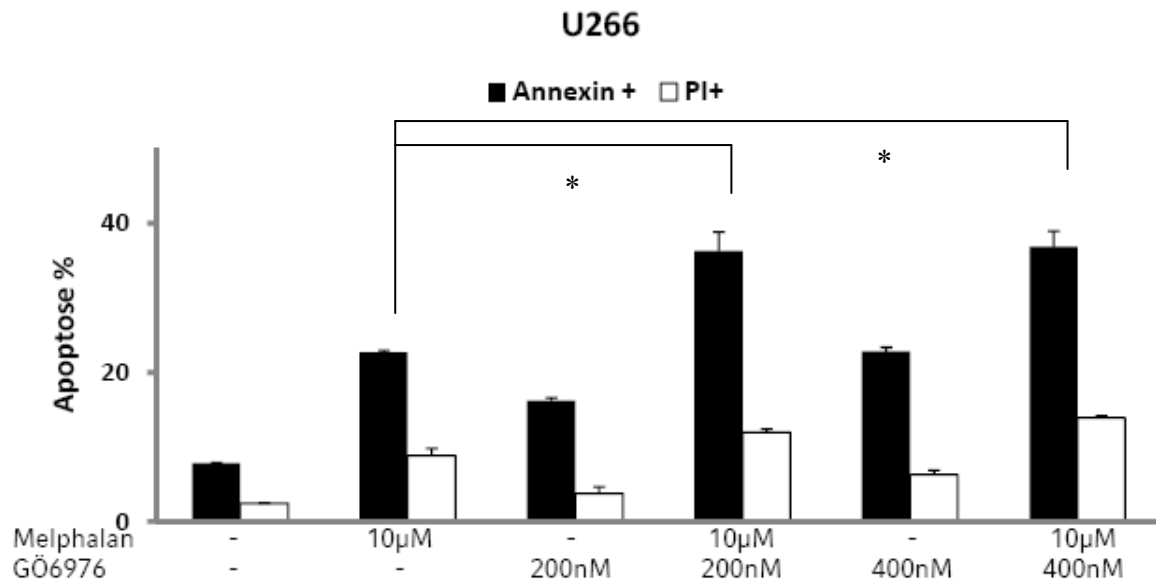


Abbildung 3.6.: Die Koinkubation von Melphalan und GÖ6976 führt zu einer höheren Apoptoserate als die alleinige Inkubation mit Melphalan. U266 werden mit 10µM Melphalan über 48h inkubiert, GÖ6976 wird in steigender Konzentration eine Stunde vor Chemotherapiezugabe zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit AnnexinV-FITC und PI erfolgt die Messung im Durchflußzytometer. Dieses Ergebnis konnte in mehreren unabhängigen Experimenten entsprechend gezeigt werden. * P < 0,05 vs. Kontrolle

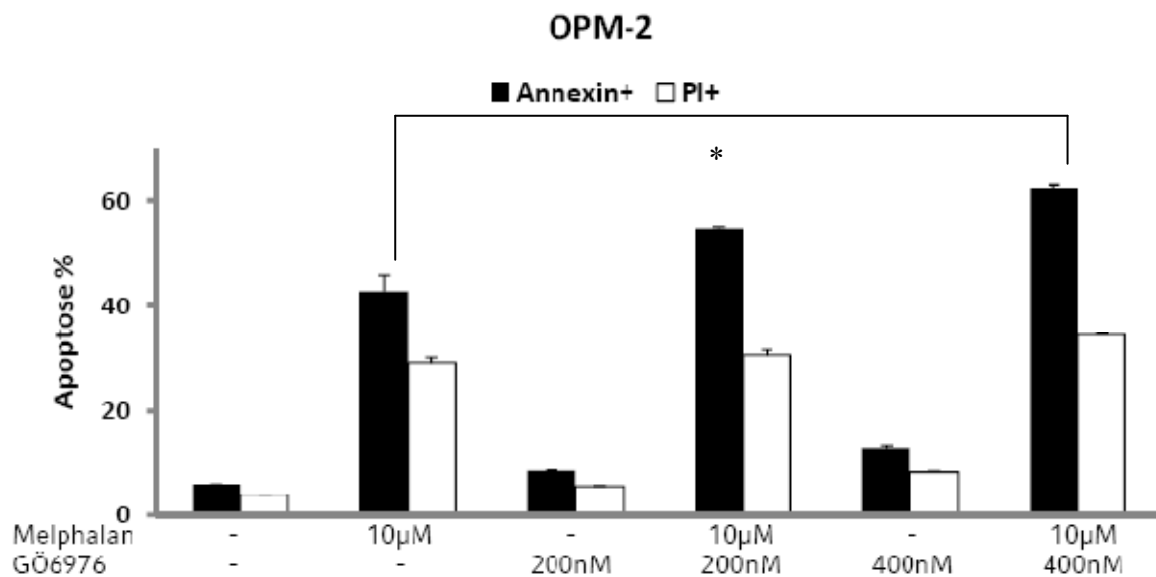


Abbildung 3.7.: Die Koinkubation von Melphalan und GÖ6976 führt zu einer höheren Apoptoserate als die alleinige Inkubation mit Melphalan. U266 werden mit 10µM Melphalan über 48h inkubiert, GÖ6976 wird in steigender Konzentration eine Stunde vor Chemotherapiezugabe zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit AnnexinV-FITC und PI erfolgt die Messung im Durchflußzytometer. Dieses Ergebnis konnte in mehreren unabhängigen Experimenten entsprechend gezeigt werden. * P < 0,05 vs. Kontrolle

Die Kombination von Melphalan mit GÖ6976, führt zu einer Steigerung der Annexin+-Zellen – also der apoptotischen Zellen – um etwa 20% verglichen mit der Apoptoserate bei Melphalan-Monoinkubation. In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Kombination eines Zytostatikums und eines Proteinkinase-C-

Inhibitor zu deutlich höheren Apoptoseraten führt, als die alleinige Behandlung mit dem Zytostatikum, ohne dass der eingesetzten Proteinkinase-C-Inhibitoren GÖ6976 eine ausgeprägte Eigentoxizität besitzt.

3.2.2 Apoptose-Assays bei Koinkubation von Melphalan und Enzastaurin

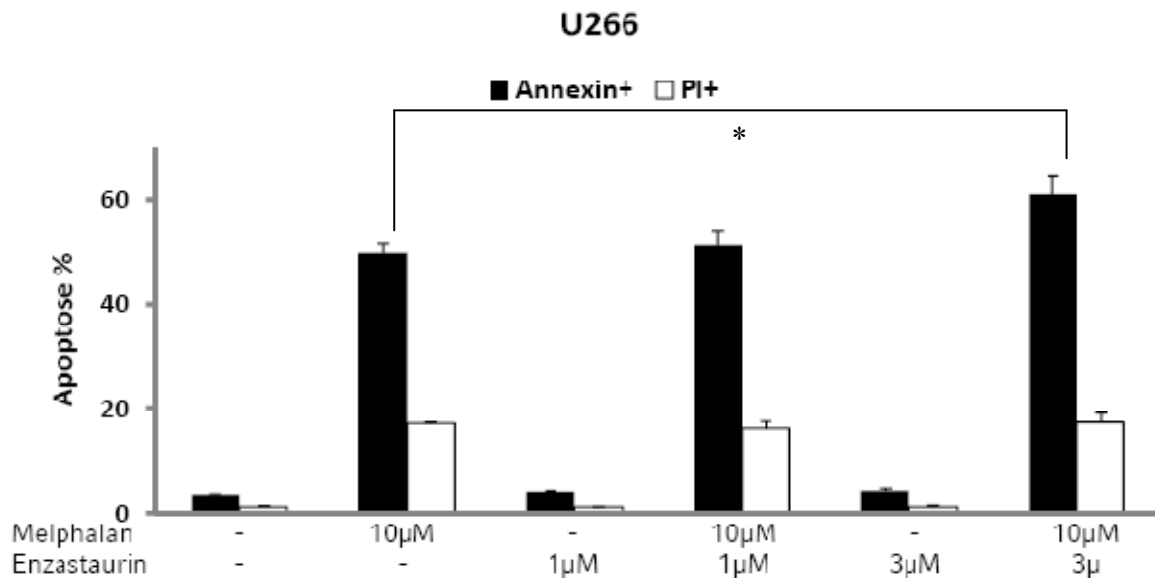


Abbildung 3.8: Die Koinkubation von Melphalan und Enzastaurin führt zu einer höheren Apoptoserate als die alleinige Inkubation mit Melphalan. U266 werden mit 10µM Melphalan über 48h inkubiert, GÖ6976 oder Enzastaurin wird in steigender Konzentration eine Stunde vor Chemotherapiezugabe zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit AnnexinV-FITC und PI erfolgt die Messung im Durchflußzytometer. Dieses Ergebnis konnte in mehreren unabhängigen Experimenten entsprechend gezeigt werden. * P < 0,05 vs. Kontrolle

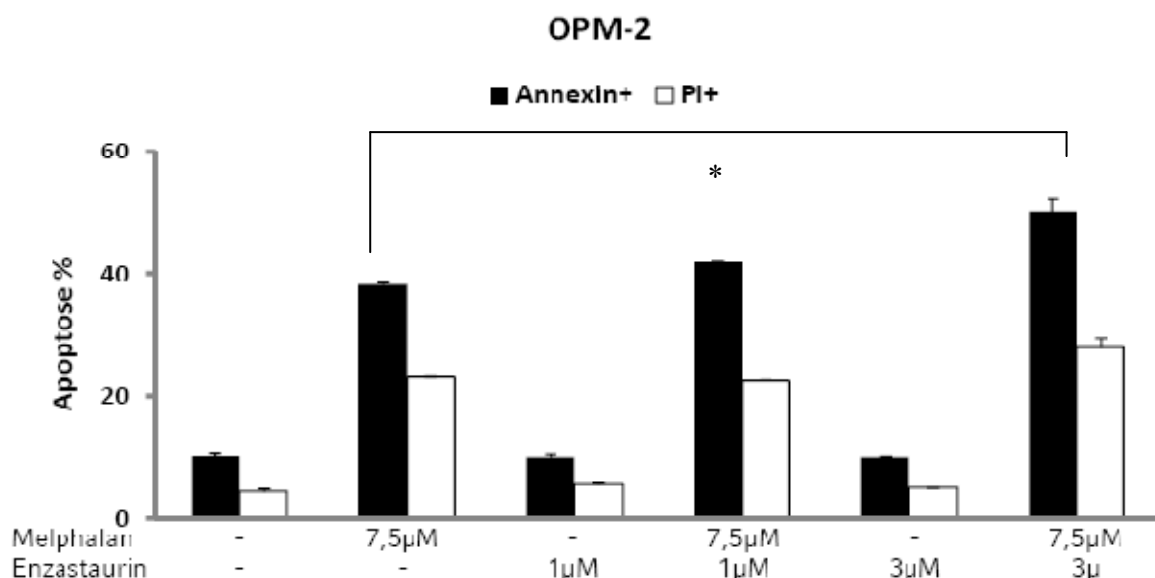


Abbildung 3.9: Die Koinkubation von Melphalan und Enzastaurin führt zu einer höheren Apoptoserate als die alleinige Inkubation mit Melphalan. U266 werden mit 7,5µM Melphalan über 48h inkubiert, Enzastaurin wird in steigender Konzentration eine Stunde vor Chemotherapiezugabe zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit AnnexinV-FITC und PI erfolgt die Messung im Durchflußzytometer. Dieses Ergebnis konnte in mehreren unabhängigen Experimenten entsprechend gezeigt werden. * P < 0,05 vs. Kontrolle

Auch bei der Kombination von Melphalan und Enzastaurin zeigt sich ein Anstieg der Apoptoserate um etwa 20% verglichen mit der Apoptoserate bei Melphalan-Monoinkubation, ohne dass der Proteinkinase-C-Inhibitoren alleine einen ausgeprägten Anstieg der Apoptoserate bewirkt.

3.2.3. Apoptose-Assays bei Monokultur von primären Plasmazellen

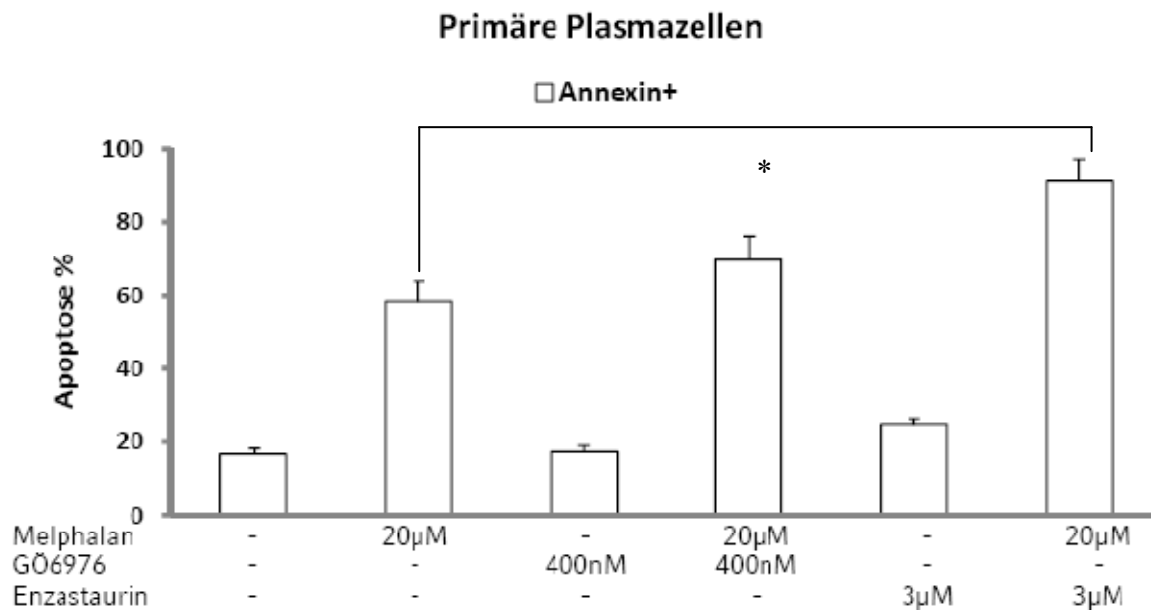


Abbildung 3.10.: Die Koinkubation von Melphalan und GÖ6976 oder Enzastaurin führt zu einer höheren Apoptoserate als die alleinige Inkubation mit Melphalan. U266 werden mit 20µM Melphalan über 48h inkubiert, GÖ6976 oder Enzastaurin wird eine Stunde vor Chemotherapiezugabe zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit AnnexinV-FITC und CD138-PE erfolgt die Messung im Durchflusszytometer. Dieses Ergebnis konnte in mehreren unabhängigen Experimenten entsprechend gezeigt werden. * P < 0,05 vs. Kontrolle

Auch bei von Patienten gewonnen Myelomzellen zeigt die Kombination von Melphalan mit GÖ6976 oder Enzastaurin einen Anstieg der Apoptoserate, bei Melphalan/GÖ6976 Kombination etwa um 10%, Melphalan/Enzastaurin Kombination etwa um 20% - verglichen mit der Monotherapie. Wiederum konnte kaum Eigentoxizität der Proteinkinase-C-Inhibitoren festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit dem proteinkinase- $\alpha\beta$ -spezifischen Inhibitor GÖ6976 und dem proteinkinase-C β -spezifischen Inhibitor Enzastaurin zwei Substanzen gefunden wurden, die an sich keine oder nur sehr geringe Eigentoxizität besitzen, aber zusammen mit Melphalan deren Wirkung signifikant erhöhen können. Dieser Effekt konnte unabhängig von der Myelomzelllinie und an von Patienten gewonnenen primären Plasmazellen beobachtet werden.

3.3 PKC-Inhibitoren verringern die Cell Adhesion mediated Drug Resistance gegenüber Alkylanzien

In den letzten Jahren hat sich immer stärker gezeigt, dass die so genannte primäre Drug Resistance ein besonderes Problem bei der Behandlung des Multiplen Myeloms darstellt und dass Substanzen, die die Adhäsion der Myelomzellen an Knochenmarkstromazellen und Extrazellulärmatrix verringern können, ein zunehmend erfolgversprechendes Konzept in der Therapie darstellen (Schmidmaier, Baumann et al, 2004)

Die Cell Adhesion mediated Drug Resistance (CAM-DR), die durch Zell-zu-Zell-Kontakte zwischen Myelom- und Stromazellen entsteht, ist eine wichtige Form dieser primären Resistenz, da sie durch das natürliche Microenvironment der Myelomzellen im Knochenmark entsteht. Im Folgenden soll nun untersucht werden, ob die Proteinkinase-C-Inhibitoren GÖ6976 und Enzastaurin auch in der Lage sind, die CAM-DR zu schwächen.

Um dieses Microenviroment unter Laborbedingungen in der Zellkultur zu studieren, konnte mittels der Stromazelllinie HS-5 ein Modell für das Bone Marrow Microenviroment etabliert werden (Schmidmaier et al. 2004). Dafür wurden Wellplates mit einem Monolayer HS-5 beschichtet und die Myelomzelllinie mit den entsprechenden Substanzen über 48h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Cellscaper geerntet und nach Färbung mit AnnexinV-FITC und CD138-PE im Durchflusszytometer analysiert. Des Weiteren wurden Versuche mit primären Stromazellen durchgeführt. Auch hier wurden Wellplates mit einem Monolayer Stromazellen beschichtet und die Myelomzellen über 48h inkubiert und mittels Cellscaper geerntet, allerdings konnte aufgrund der geringen Zahl der Stromazellen auf eine Färbung mit einem plasmazellspezifischem Marker verzichtet werden. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer.

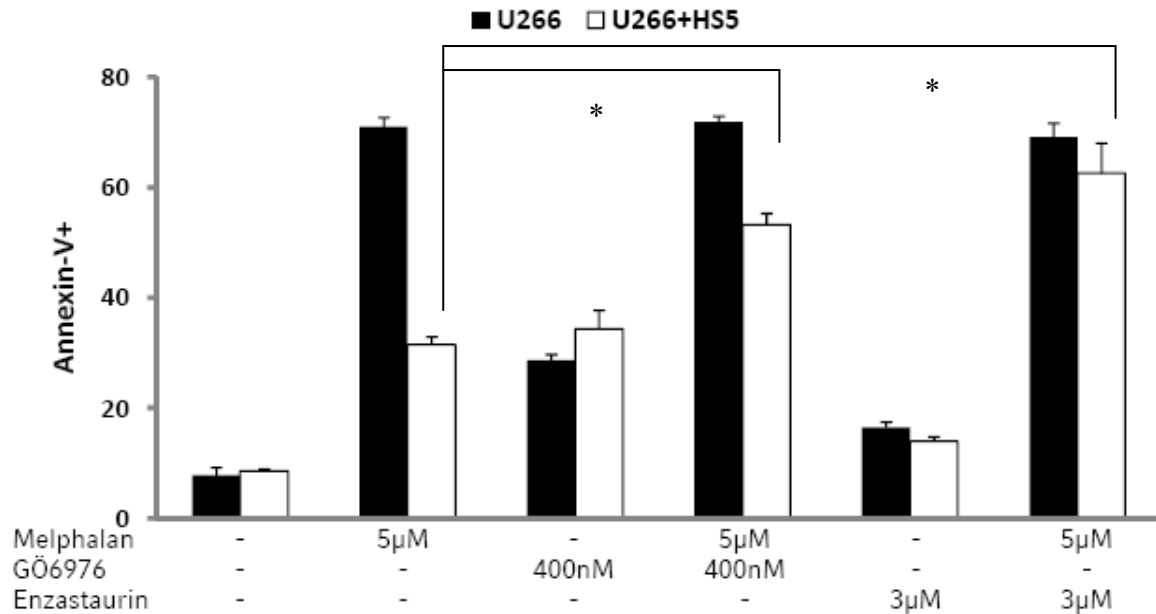


Abbildung 3.11.: GÖ6976 und Enzastaurin reduzieren die CAM-DR. U266 werden mit 5µM Melphalan über 48h auf HS-5 beschichteten Wellplates inkubiert, GÖ6976 oder Enzastaurin werden eine Stunde vor Melphalanzugabe zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit AnnexinV-FITC und CD138-PE erfolgt die Analyse im Durchflußzytometer. * P < 0,05 vs. Kontrolle

Der Anteil der apoptotischen Zellen (– PI+ –) steigt bei Zugabe von GÖ6976 auf etwa 50% und bei Zugabe von Enzastaurin auf etwa 65% verglichen mit etwa 30% apoptotischen Zellen bei Monoinkubation mit Melphalan.

Es zeigt sich deutlich, dass sowohl GÖ6976 als auch Enzastaurin die CAM-DR deutlich reduzieren und den Anteil der apoptotischen Zellen in der Kokultur beinahe um 100% erhöhen können.

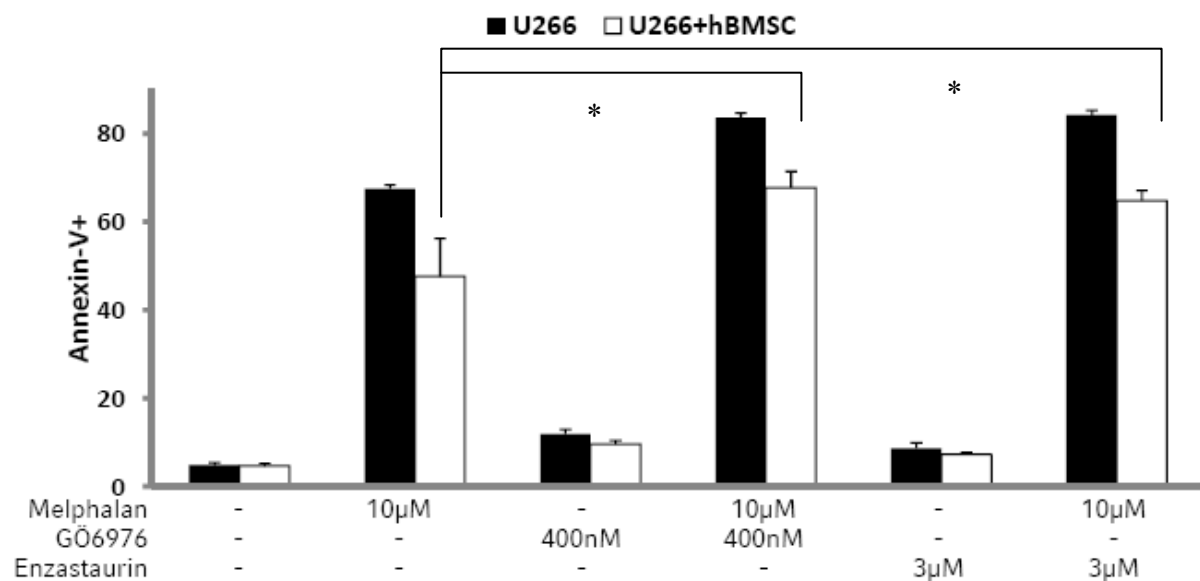


Abbildung 3.12 GÖ6976 und Enzastaurin reduzieren die CAM-DR. U266 werden mit 10µM Melphalan über 48h auf hBMSC beschichteten Wellplates inkubiert, GÖ6976 oder Enzastaurin werden eine Stunde vor Melphalanzugabe zu den Zellen gegeben. Nach Färbung mit AnnexinV-FITC erfolgt die Analyse im Durchflußzytometer.

Auch bei der Kokultur von U266 Myelomzellen mit primären Knochenmarkstromazellen steigt die Anteil der apoptotischen Zellen um etwa 20% bei der Kombination eines Proteinkinase-C-Inhibitors mit Melphalan verglichen mit der Monoinkubation von Melphalan.

Die CAM-DR durch primäre Knochemarkstromazellen kann durch die PKC-Inhibitoren also auch deutlich vermindert werden.

3.4. Proteinkinase-C-Inhibition führt zu einem Anstieg von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$

Bisher konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der Proteinkinase C zu einer Verstärkung zytotoxischer Substanzen in Bezug auf Wachstum, Zelltod und Apoptose führt. Außerdem führt eine PKC-Inhibition zu einer Verminderung der primären Chemoresistenz in Myelomzellen. Im Folgenden wird gezeigt, dass eine Hemmung der Proteinkinase C zu einem Anstieg von $\text{I}\kappa\text{B}$ und einem Abfall von phosphoryliertem $\text{I}\kappa\text{B}$ in Myelomzellen führt. Dies lässt darauf schließen, dass eine PKC-Inhibition eine verminderte Freisetzung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ zu Folge hat und dadurch der Aktivierung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ durch zytotoxische Substanzen entgegenwirkt.

3.4.1. Verstärkte Apoptoseinduktion durch Kombination eines IK-Kinase-Inhibitors und Melphalan kann durch Aktivierung der PKC nicht reduziert werden.

Zunächst soll gezeigt werden, dass eine Hemmung der IK-Kinase, deren Aktivierung eine direkte Freisetzung von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ zur Folge hat, ähnliche Ergebnisse erzielt, wie die Hemmung der Proteinkinase C. Hierfür wurden Myelomzellen über 48h mit Melphalan inkubiert, wobei eine Stunde vor Melphalanzugabe die IK-Kinase-Inhibitor-Zugabe erfolgte. Die Zellen wurden durch Pipettieren geerntet. Nach Färbung mit AnnexinV-FITC und PI erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer.

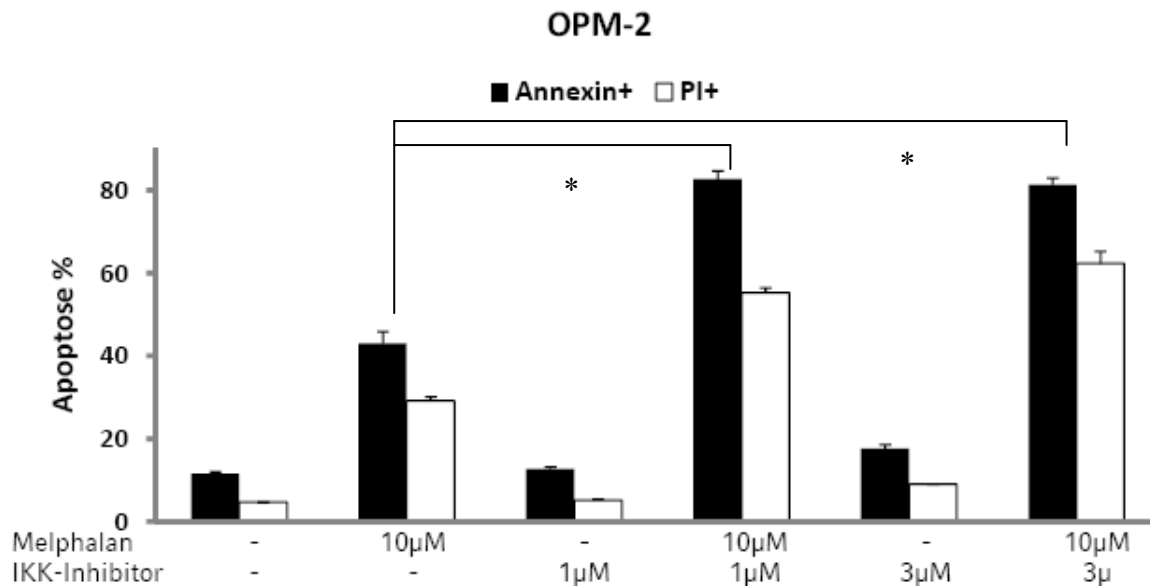


Abbildung 3.13.: Kokubation von Melphalan und dem IK-Kinase-Inhibitor führt zu einer deutlichen Erhöhung der Apoptoserate gegenüber der alleinigen Inkubation mit Melphalan. OPM-2 werden mit 10µM Melphalan über 48h inkubiert, der IK-Kinase-Inhibitor wird eine Stunde vor Melphalanzugabe zugegeben. Nach Färbung mit AnnexinV-FITC und PI erfolgt die Analyse im Durchflusszytometer. * P < 0,05 vs. Kontrolle

Es zeigt sich, dass die Kombination eines IK-Kinase Inhibitors mit Melphalan den Anteil der präapoptotischen Zellen (– Annexin+ –) etwa von 40% auf 80% erhöht und den Anteil der apoptotischen Zellen (– PI+ –) etwa von 30% auf 60% erhöht, verglichen mit der Monoinkubation mit Melphalan. Die Apoptoserate kann also verdoppelt werden.

Durch Hemmung der IK-Kinase erhält man also qualitativ die gleichen Ergebnisse wie durch die Hemmung der Proteinkinase C. Um aber zu belegen, dass die IK-Kinase in der Signalkaskade auf die Proteinkinase C folgt, wurde in einem weiteren Versuch gezeigt, dass eine durch **Aktivierung** der Proteinkinase C vermittelte Verminderung der Melphalanwirkung durch die Hemmung der IK-Kinase verhindert werden kann. Zunächst aber wurde der optimale Zeitpunkt der Zugabe des Proteinkinase-C-Aktivators Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) ermittelt, um eine möglichst deutliche Verminderung der Melphalanwirkung zu erhalten.

Dafür wurden Myelomzellen 48h mit Melphalan inkubiert und in einem Zeitraum von 48h vor Melphalangabe und 36h nach Melphalangabe alle 12h PMA hinzugefügt. Die Zellen wurden durch Pipettieren geerntet. Nach Färbung mit AnnexinV-FITC und PI, erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer.

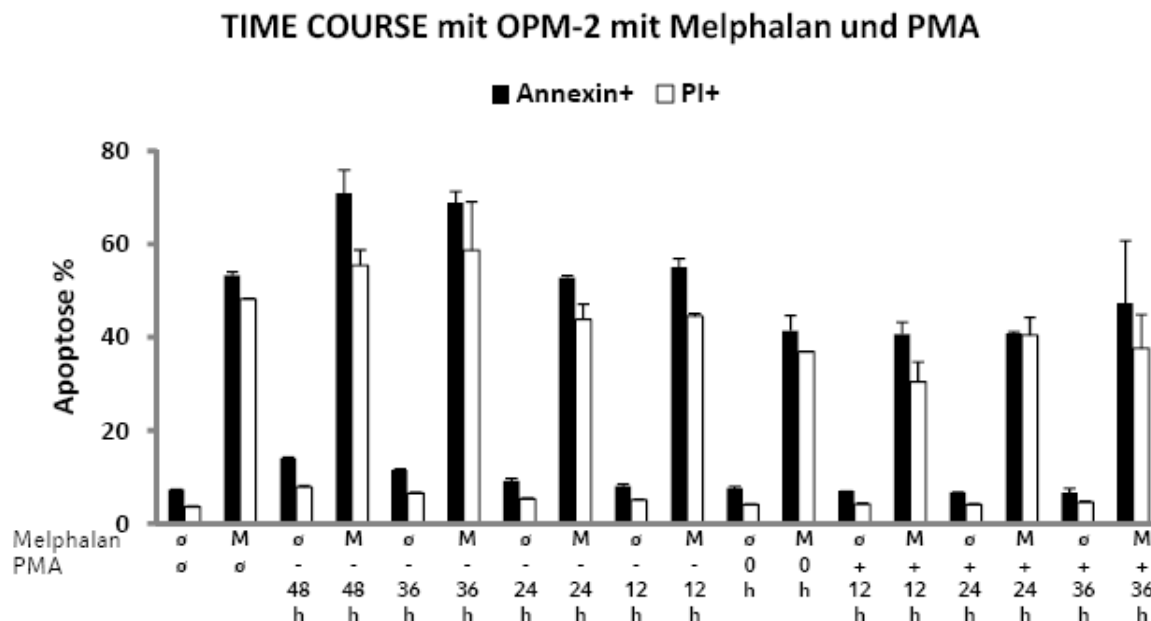


Abbildung 3.14.: PMA hat sein Wirkoptimum bei Gabe 12h nach Melphalangabe. OPM-2 werden mit 10 μ M Melphalan über 48h inkubiert, PMA in der Zeit zwischen 48h vor und 36 nach Melphalangabe alle 12h zugegeben. Nach Färbung mit AnnexinV-FITC und PI erfolgt die Analyse im Durchflusszytometer

Der Wellenförmige Verlauf der PMA-Wirkung zeigt, dass bei zu früher Gabe des Aktivators die Proteinkinase C nicht mehr reagieren kann, wenn die Melphalanwirkung einsetzt. Somit wirkt eine zu frühe Aktivierung der Proteinkinase C als Hemmung, da die Moleküle ihre Möglichkeit, andere Proteine zu phosphorylieren, bereits eingebüßt haben und sich noch nicht regeneriert haben. Eine zu späte Zugabe von PMA führt zu keiner Verminderung der Melphalanwirkung mehr, da die Wirkung dann bereits vor der PMA-Zugabe eintritt. Da nun klar war, dass PMA sein Wirkoptimum bei einer Gabe 12h nach der Melphalangabe besitzt, konnte der nächste Versuch entsprechend durchgeführt werden. Hierfür wurden Myelomzellen 48h mit Melphalan inkubiert, die IK-Kinase Gabe erfolgte eine Stunde vor der Melphalangabe und die PMA-Gabe 12h danach. Die Zellen wurden durch Pipettieren geerntet. Nach Färbung mit AnnexinV-FITC und PI bei Zelllinien oder AnnexinV-FITC und CD138-PE bei primären Plasmazellen erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer.

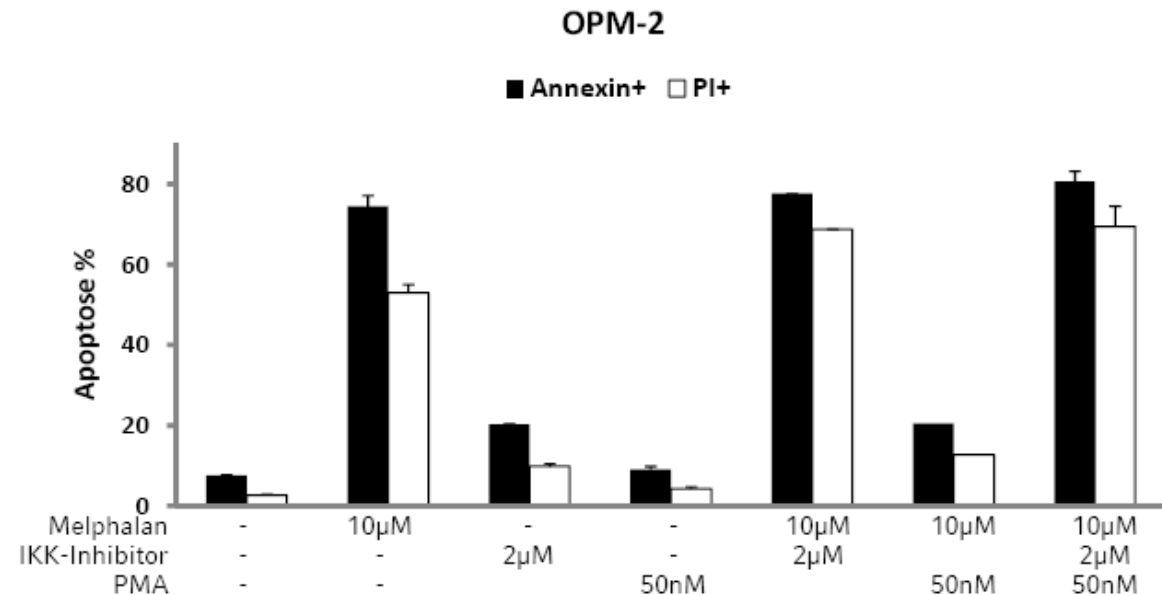


Abbildung 3.15.: IK-Kinase-Inhibitor hebt die durch PMA vermittelte Verminderung der Melphalanwirkung auf. OPM-2 werden mit 10µM Melphalan über 48h inkubiert, IK-Kinase-Inhibitor wird eine Stunde vorinkubiert, PMA wird 12h nach Melphalangabe zugegeben.

Die Kombination von PMA mit Melphalan führt zu einer Verminderung des Anteils an apoptotischen Zellen auf etwa ein Viertel verglichen mit der Monoinkubation von Melphalan, während die Kombination eines IK-Kinase-Inhibitors mit Melphalan – wie bereits gezeigt - zu einem Anstieg der apoptotischen Zellen um 10%-20% führt. Dieser synergistische Effekt eines IK-Kinase-Inhibitors und Melphalans kann allerdings durch die Aktivierung der Proteinkinase C durch PMA nicht vermindert werden.

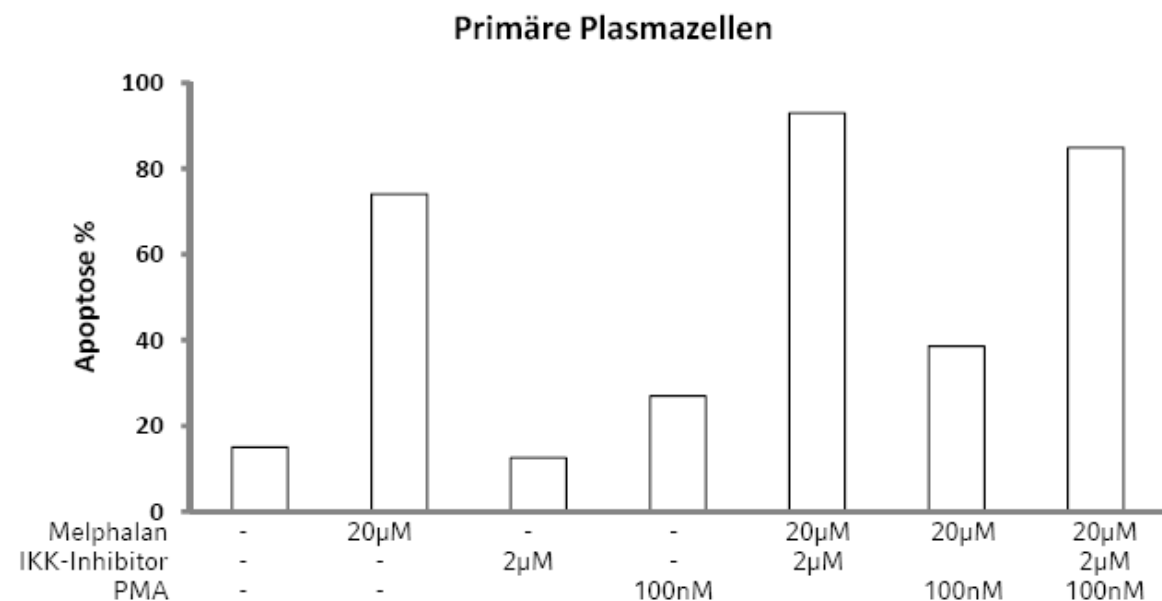


Abbildung 3.16.: IK-Kinase-Inhibitor hebt die durch PMA vermittelte Verminderung der Melphalanwirkung auf. Primäre Plasmazellen werden mit 20µM Melphalan über 48h inkubiert, IK-Kinase-Inhibitor wird eine Stunde vorinkubiert, PMA wird 12h nach Melphalangabe zugegeben.

Wie im vorherigen Experiment an OPM-2 Myelomzellen zeigt sich auch bei primären Plasmazellen ein durch Aktivierung der Proteinkinase C nicht reversibler Anstieg der Apoptoserate um etwa 20% bei Kombination eines IK-Kinase-Inhibitors mit Melphalan. Dagegen halbiert die Aktivierung der Proteinkinase C durch PMA alleine die durch Melphalan induzierte Apoptoserate.

Es zeigt sich, dass der IK-Kinase-Inhibitor die durch die Aktivierung der Proteinkinase C induzierte verminderte Melphalanwirkung aufhebt. Die IK-Kinase muss also weiter hinten als die Proteinkinase C in der Signalkaskade bei der Aktivierung von NF- κ B liegen.

3.4.2. Darstellung der wichtigen Signalwege im Multiplen Myelom

Um weitere Erkenntnisse über die Wirkung der Proteinkinase-C-Inhibitoren zu erlangen, und um die bisher gewonnenen zu bestätigen, wurden nun Western Blots durchgeführt. Dabei wurde bestimmt, ob spezifische Zellproteine nach Inkubation der Myelomzellen mit Enzastaurin und/oder Melphalan vermehrt oder vermindert exprimiert werden oder ob bestimmte Proteine mehr oder weniger aktiviert – also phosphoryliert – vorliegen. Nachgewiesen wurden die Proteine der wichtigen Signalkaskaden bezüglich Proliferation, Differenzierung und Apoptose beim Multiplen Myelom unter besonderer Berücksichtigung der PKC/AKT/NF- κ B Kaskade. Für die Western Blots wurde die Myelomzelllinie U266 mit Enzastaurin und/oder Melphalan inkubiert. Nach 24 oder 48 erfolgte Die Analyse wie im Methodenteil beschrieben.

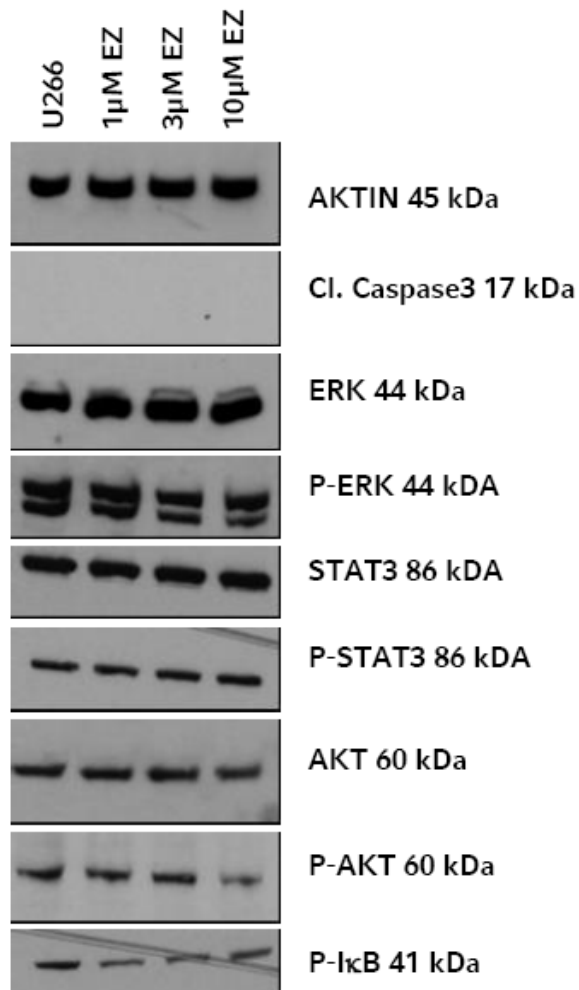


Abbildung 3.17.: Western-Blot-Analyse der wichtigen Signalwegmoleküle beim Multiplen Myelom. U266 wurden vier Stunden mit 1 μM, 3 μM oder 10 μM Enzastaurin inkubiert und anschließend der Western-Blot-Analyse zugeführt.

Sowohl ERK, als ein Vertreter der Mitogen aktivierten Kinase (MAP-Kinase), als auch STAT3 zeigen keine vermehrte oder verminderte Expression, so dass kein Hinweis auf eine vermehrte oder verminderte Aktivierung vorliegt, da keine Änderung der jeweiligen phosphorylierten Enzymform zu beobachten ist. Allerdings liegen AKT und IκB bei steigender Enzastaurinkonzentration in weniger phosphorylierten Formen vor als in der Kontrolle. Enzastaurin hemmt also die Phosphorylierung von IκB. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Freisetzung von NF-κB durch Enzastaurin vermindert wird. Es zeigt sich weiterhin, dass Enzastaurin in der gewählten Konzentration alleine keine Apoptose auslöst, da die gespaltene Caspase3 überhaupt nicht nachgewiesen werden kann.

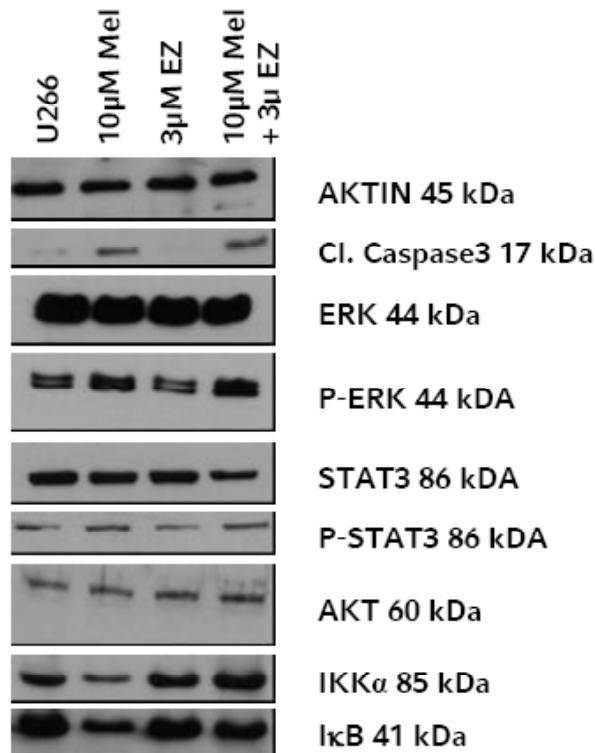


Abbildung 3.18.: Western-Blot-Analyse der wichtigen Signalwegmoleküle beim Multiplen Myelom. U266 wurden zwölf Stunden mit Melphalan, Enzastaurin oder beidem inkubiert. Die Zugabe von Enzastaurin erfolgte eine Stunde vor Melphalanzugabe. Anschließend wurden die Zellen der Western-Blot-Analyse zugeführt.

Auch nach zwölf Stunden Inkubationszeit zeigt sich keine Expression der gespaltenen Caspase3 bei alleiniger Exposition gegenüber Enzastaurin. Eine Exposition gegenüber Melphalan alleine bewirkt eine Verringerung von IKK α und I κ B, was auf eine Aktivierung von NF- κ B schließen lässt, sowie eine verstärkte Phosphorylierung von ERK. Durch eine Kombination von Melphalan und Enzastaurin lässt sich die durch Melphalan bewirkte verminderte Expression von IKK α und I κ B aufheben. Enzastaurin hemmt also die durch Melphalan induzierte NF- κ B Freisetzung. Der Effekt von Melphalan auf die phosphorylierte Form von ERK wird jedoch nicht durch Enzastaurin beeinflusst. Ein Effekt der Kombination von Melphalan und Enzastaurin auf AKT oder STAT3 lässt sich nicht nachweisen.

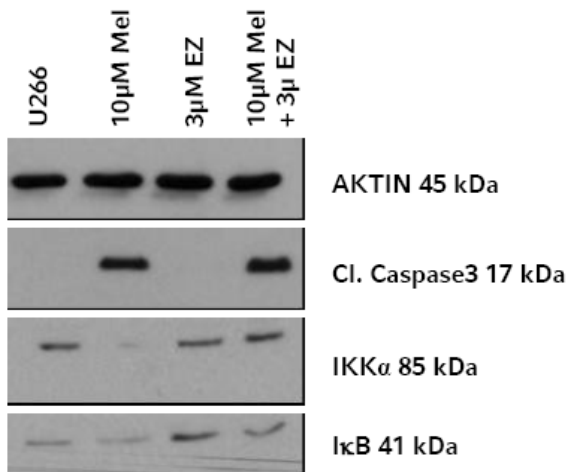


Abbildung 3.19.: Western-Blot-Analyse der gespaltenen Caspase3 und der wichtigen Signalwegmoleküle zur Freisetzung von NF-κB beim Multiplen Myelom. U266 wurden 48 Stunden mit Melphalan, Enzastaurin oder beidem inkubiert. Enzastaurin wurde eine Stunde vor Melphalan zugegeben. Anschließend wurden die Zellen der Western-Blot-Analyse zugeführt.

Auch nach 48 Stunden Inkubationszeit wirkt Enzastaurin in den verwendeten Konzentrationen nicht apoptotisch. Es zeigt sich weiterhin, dass Enzastaurin die durch Melphalan bewirkte NF-κB Freisetzung behindert.

4. Diskussion

In der Therapie des Multiplen Myeloms wird Melphalan hauptsächlich für die Hochdosis-Therapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation genutzt. Anthrazykline werden häufig mit Corticosteroiden zur Induktionstherapie oder mit Ifosfamid oder Etoposid zur Stammzellmobilisation genutzt (Spender et al. 2004). In dieser Arbeit wurden die beiden erwähnten Zytostatika mit zwei verschiedenen Proteinkinase-C-Inhibitoren kombiniert. GÖ6976 ist ein selektiver Inhibitor der Proteinkinase-C, der PKC α und PKC β , nicht jedoch PKC ϵ , PKC ζ oder PKC δ inhibiert (Martiny-Baron et al. 1993). Für diese Substanz konnte gezeigt werden, dass sie die IL6-abhängige Proliferation von Myelomzellen hemmt (Iankov et al. 2002). Enzastaurin ist ein neuer oral verfügbarer selektiver Inhibitor der Proteinkinase-C β (Graff et al. 2005). Die Substanz wurde bereits in mehreren Phase I Studien bei fortgeschrittenen Malignomen (Rademaker-Lakhai et al. 2007, Carducci et al. 2006) sowie in einer Phase 2 Studie beim diffus großzelligen B-Zell Lymphom (Robertson et al. 2007) untersucht. Enzastaurin wurde dabei bei oraler Gabe gut vertragen und es konnten Plasmaspiegel erreicht werden, die mit denen in den hier vorgelegten Experimenten vergleichbar sind. Die ProteinkinaseC (PKC) spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellwachstums (Hoffmann, 2001). Die PKC-Familie besteht aus elf Isoformen der Serin/Threonin-Proteinkinasen, die eine Schlüsselrolle in transmembranösen Signaltransduktionswegen spielen. Diese Signalwege sind in eine Vielzahl von Funktionen eingebunden, wie Zellwachstum und -differenzierung, sowie Zell-zu-Zell-Interaktion, Sekretion, Gentranskription, Apoptose und Zytostatikaresistenz. Die elf Isoenzyme der PKC können in drei Gruppen aufgeteilt werden. Die konventionellen PKCs (α, β, γ) sind Ca²⁺-abhängig und werden durch Diacylglycerol oder Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) aktiviert. Die neuen PKCs ($\delta, \epsilon, \eta, \theta, \mu$) werden von Diacylglycerol aktiviert sind aber Ca²⁺-unabhängig. Die atypischen PKCs (ζ, ι) schließlich sind Ca²⁺-unabhängig und reagieren nicht auf Diacylglycerol (Gschwendt, 1999).

Die PKC-Aktivierung trägt zu Tumorzellüberleben und -wachstum bei und wurde wiederholt mit dem Fortschreiten von Malignomen wie B-Zell-Lymphomen (Shipp et al., 2002), Glioblastomen (da Rocha et al., 2002) und kolorektalen Karzinomen

(Gokmen-Polar et al., 2001) in Zusammenhang gebracht. So tritt die gesteigerte PKC β Expression bei Patienten mit diffus großzelligem B-Zell-Lymphom mit verminderten Überlebenszeiten auf (Shipp et al., 2002). Neuere Studien haben gezeigt, dass die PKC PI3/AKT aktivieren kann (Graff et al., 2005, Bahlis et al., 2005). AKT wiederum beeinflusst den NF- κ B-Signalweg über die Regulation der I κ B-Kinase-alpha (IKK α) (Hill et al., 2002).

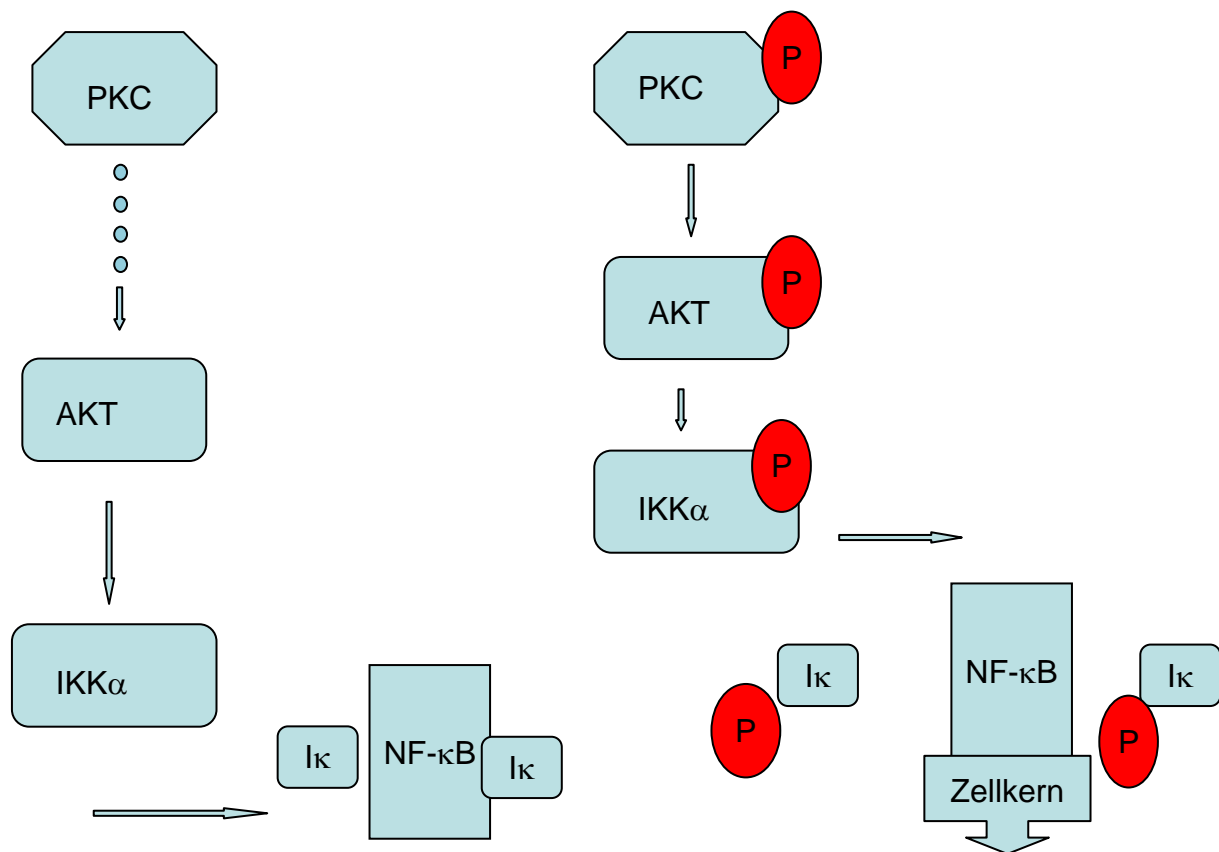


Abbildung 4.1.: Vereinfachte Darstellung der Aktivierung von NF- κ B durch die ProteinkinaseC. Die Phosphorylierung der PKC führt zu deren Aktivierung und zur Phosphorylierung von AKT und IKK α , die letztlich I κ B phosphoryliert, wodurch NF- κ B frei wird und in den Zellkern diffundieren kann.

Der Effekt von Enzastaurin auf Myelomzellen wurde in letzter Zeit untersucht (Rizvi et al. 2006, Podar et al. 2007). Es zeigte sich, dass die Substanz in der Lage ist Apoptose in Myelomzellen auszulösen. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigte Enzastaurin alleine in den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen nur minimale Zytotoxizität. Dies könnte mit Unterschieden in der Durchführung der Experimente zusammenhängen. Zum einen waren die Inkubationszeiten in den hier vorgelegten Experimenten kürzer (4h-48h vs. 72h). Zum anderen wurde für die Versuche in dieser Arbeit Zellkulturmedium mit einem höheren Anteil von fetalem

Kälberserum (FCS) benutzt (10% vs. 1%), da dies eher den physiologischen Gegebenheiten entspricht. Da Enzastaurin eine hohe Bindungsaffinität zu Proteinen hat, ist es sehr wahrscheinlich, dass der höhere Anteil an fetalem Kälberserum den Effekt von Enzastaurin in dieser Arbeit reduziert hat.

Wenn jedoch die zytotoxischen Substanzen Melphalan und Doxorubin mit den Proteinkinase-C-Inhibitoren GÖ6976 und Enzastaurin kombiniert wurden, zeigten sich synergistische Effekte in Bezug auf die Zellproliferation. In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Zytotoxizität durch Apoptoseinduktion hervorgerufen wurde.

Da die primäre Chemoresistenz von Myelomzellen durch Adhäsion an Knochenmarksstromazellen und extrazellulär Matrix hervorgerufen wird (Urashima et al. 1997), wurden die Myelomzellen mit Zellen der Stromazelllinie HS-5 oder primären Knochenmarksstromazellen (hBMSC) inkubiert und die Apoptose-Assays wiederholt. Dabei zeigt sich eine Verminderung des protektiven Effekts von Knochenmarksstromazellen auf Myelomzellen. Weiterhin wurden diese zwei Effekte der Proteinkinase-C-Inhibitoren – synergistische Apoptoseinduktion und Verminderung der primären Chemoresistenz – auch an primären Myelomzellen, die aus Knochenmarkspiraten gewonnen wurden, untersucht. Dabei konnten vergleichbare Ergebnisse zu den Versuchen mit Zelllinien beobachtet werden.

Schließlich sollte der zugrunde liegende Mechanismus für den synergistischen Effekt von zytotoxischen Substanzen und Proteinkinase-C-Inhibitoren weiter untersucht werden. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der in seiner Wirkung durch Bindung an I κ B inhibiert wird. Es gibt verschiedene Signalwege, die zu einer Phosphorylierung und folgendem Abbau von I κ B und dadurch Freisetzung von NF- κ B führen (Hideshima et al- 2000). Beim Multiplen Myelom führt die Aktivierung von NF- κ B zu Chemoresistenz und Modulation des Bone-Marrow-Microenviroment, das die Proliferation der Myelomzellen unterstützt (Hideshima et al 2002, Chauhan et al. 1996). Die Annahme, dass Enzastaurin in Myelomzellen die Aktivierung von NF- κ B vermindert, konnte durch die Ergebnisse eines NoShift-NF- κ B-Binding-Assays bestätigt werden (Baumann et al. 2008). Hier zeigte sich eine verminderte Bindung von NF- κ B an die DNA nach Inkubation der Myelomzellen mit Enzastaurin. Es konnte gezeigt werden, dass Paclitaxel, Vincristin, Vinblastin, Daunorubicin und Doxorubicin zu einem Abbau von I κ B und Aktivierung von NF- κ B in A459-

Adenokarzinom-Zellen führt (Das et White 1997). Deshalb wurde untersucht, ob Melphalan die Phosphorylierung und dadurch den Abbau von I κ B in Myelomzellen induziert. Die Ergebnisse der Western Blots zeigen, dass Melphalan die Phosphorylierung und den konsequenten Abbau von I κ B deutlich induziert. Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass Enzastaurin zu einer Inhibition des AKT Signalweges führt (Rizvi et al. 2006, Querfeld et al. 2006) und dass AKT zu einer Aktivierung von NF- κ B führt (Ouyang et al. 2006, Inoue et al. 2005, Taylor et al. 2004, Ferry et al. 2002). Daher wurde untersucht, ob Enzastaurin die Phosphorylierung von I κ B verhindert. Die Ergebnisse der hier gezeigten Versuche zeigen eine Inhibition der Phosphorylierung von I κ B und legen damit eine Inaktivierung von NF- κ B nahe.

Schlussendlich wurden Melphalan und Enzastaurin kombiniert. Melphalan alleine reduziert I κ B und erhöht die phosphorylierte Form von I κ B, was einer Aktivierung von NF- κ B entspricht. Enzastaurin dagegen führte zu einem Anstieg von I κ B und einer Verminderung der phosphorylierten Form von I κ B. Bei der Kombination beider Substanzen zeigten sich praktisch keine Änderung der I κ B- und der phosphorylierten I κ B-Level.

Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass zytotoxische Substanzen wie Melphalan und Doxorubicin zu einer Aktivierung von NF- κ B, also einer antiapoptotischen Signalkaskade, führen, wahrscheinlich im Sinne eines cell rescue Versuches, was aus onkologischer Sicht einer Chemoresistenz entspricht. Die Exposition von Myelomzellen mit Proteinkinase-C-Inhibitoren vermindert diese Aktivierung und verstärkt somit die Wirkung der Zytostatika.

5. Zusammenfassung

Das Multiple Myelom ist ein aggressives Non-Hodgkin-Lymphom der B-Zell-Reihe, bei dem maligne transformierte Plasmazellen das Knochenmark infiltrieren und typischerweise Immunglobuline sezernieren, wodurch das klinische Krankheitsbild mit Osteolysen, pathologischen Frakturen, Hyperkalzämie, Knochenschmerzen, Nierenschädigung, Hyperviskositätssyndrom und hämatopoetischer Insuffizienz ausgelöst wird. Trotz immenser Fortschritte im Verständnis der Pathophysiologie und darauf basierend der Einführung neuer Therapieprinzipien (Bsp. autologe Blutstammzelltransplantation, Proteasominhibition, immunmodulatorische Substanzen) mit ausgeprägter Verlängerung des medianen Gesamtüberlebens auf etwa 5 Jahre ist die Krankheit weiterhin nicht heilbar. In den letzten Jahren hat sich gezeigt, dass in den Myelomzellen bestimmte intrazelluläre Signalkaskaden, die antiapoptotische und proliferative Wirkung haben, per se übermäßig aktiviert sind, aber auch durch Zytostatika aktiviert werden und sich dadurch die Wirkung von Substanzen wie Melphalan abschwächt. Die Protein-Kinase-C-Familie (PKC) ist an der komplexen Regulation von Zellwachstum, Zellteilung, Überleben, Genexpression, Differenzierung und Adhäsionen wesentlich beteiligt. PKC-Inhibitoren wurden in Kombination mit zytotoxischen Substanzen bei verschiedenen Tumorentitäten präklinisch erfolgreich getestet und die oral verfügbare Substanz Enzastaurin ist bereits in klinischer Phase-II-Prüfung bei B-Zell-Lymphomen und anderen Tumorentitäten. Beim Multiplen Myelom gab es nur wenige Arbeiten, die den Einfluss von PKC-Inhibitoren insbesondere in Kombination mit Zytostatika untersucht hatten.

Fragestellung der vorgelegten Arbeit war, ob die Hemmung verschiedener PKC-Isoenzyme durch spezifische Inhibitoren (z.B. Enzastaurin, GÖ6976) die Antitumorwirkung zytotoxischer Substanzen wie Melphalan in Bezug auf Wachstum, Zelltod und Apoptose verstärkt werden kann.

Enzastaurin und GÖ6976 verstärken Melphalan- und Doxorubicin-induzierten Zelltod und Apoptose bereits in subtoxischen Dosen. Die Proliferation der vier getesteten Zelllinien NCI-H929, OPM-2, RPMI-8226 und U266 wird synergistisch

gehemmt. Auch bei primären Myelomzellen von Patienten kommt es zur überadditiven Induktion von Apoptose. Des Weiteren vermindern die beiden Proteinkinase-C-Inhibitoren die primäre Chemoresistenz, die durch die Adhäsion der Myelomzellen an Knochenmarkstromazellen und Extrazellulärmatrix entsteht. Schließlich konnte gezeigt werden, dass die getesteten Zytostatika zur Phosphorylierung von I κ B und damit zur Degradation von I κ B führen, was einer Aktivierung von NF- κ B entspricht. Enzastaurin dagegen führte zu einer verminderten Phosphorylierung von I κ B und zur Hemmung der Melphalan-induzierten I κ B-Phosphorylierung und -Degradation. Dies kann die Melphalan-induzierte Chemoresistenz erklären.

Enzastaurin wurde in einer klinischen Phase I Studie gut vertragen und es konnten Plasmaspiegel von 1-2 μ M (Oh et al. 2008, Camidge et al. 2008) erreicht werden, die mit den Spiegeln in unseren Experimenten vergleichbar sind. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bilden eine Rationale zum Einsatz der Kombination von Proteinkinase-C-Inhibitoren mit genotoxischen Substanzen in der Therapie des Multiplen Myeloms, da sie bereits in subtoxischen Konzentrationen den Akt/I κ B/NF- κ B modulieren und dadurch mit Standardzytostatika beim Multiplen Myelom synergistisch wirken.

6. Literaturverzeichnis

1. Attal M., Harousseau J.L.: Randomized trial experience of the Intergroup Francophone du Myelome. *Semin. Hematol.* 2001; 38, 226-230
2. Attal M., Harousseau J.L.: The role of high-dose therapy with autologous stem cell support in the era of novel agents. *Seminars in Hematology* 2009; 46; 127-132
3. Bahlis N.B., Miao Y., Koc O.N., Lee K., Boise L.H., Gerson S.L.: N-Benzolstauroporine (PKC412) inhibits AKT kinase inducing apoptosis in multiple myeloma cells. *Leukemia and Lymphoma* 2005; 46(6), 899-908
4. Barlogie B., Smith L., Alexanian R.: Effective treatment of advanced multiple myeloma refractory to alkylating agents. *N. Engl. J. Med.* 1984; 310, 1353-1356
5. Barragan M., Campas C., Bellosillo B., Gil J.: Protein kinases in the regulation of apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2003; 44, 1865-1870
6. 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; 80; 37-45
7. Baumann P., Mandl-Weber S., Oduncu F., Schmidmaier R.: Alkylating agents induce activation of NFkappaB in multiple myeloma cells. *Leukemia Research* 2008; 32; 114-1147
8. Berenson JR., MA HM., Vesico R.: The Role of Nuclear Factor-kappaB in the Biology and Treatment of multiple Myeloma. *Seminars in Oncology* 2001; 28, 626-633

9. Berra E., Diaz-Meco M.T., Lozano J. Frutos S., Municio M.M., Sanchez P., Sanz L., Moscat J.: Evidenz for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C zeta. *EMBO J.* 1995; 14, 6157-6163
10. Bruno B., Giaccone L., Sorasio R., Boccadoro M.: Role of allogenic stem cell transplantation in multiple myeloma. *Seminars in Hematology* 2009; 46; 158-165
11. Camidge DR, Gail Eckhardt S, Gore L, O'Bryant CL, Leong S, Basche M, Holden SN, Musib L, Baldwin J, Darstein C, Thornton D, Finn RS, Britten CD. A phase I safety, tolerability, and pharmacokinetic study of enzastaurin combined with capecitabine in patients with advanced solid tumors. *Anticancer Drugs.* 2008; 19; 77-84
12. Carducci MA, Musib L, Kies MS, Pili R, Truong M, Brahmer JR, Cole P, Sullivan R, Riddle J, Schmidt J, Enas N, Sinha V, Thornton DE, Herbst RS. Phase I dose escalation and pharmacokinetic study of enzastaurin, an oral protein kinase C beta inhibitor, in patients with advanced cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2006; 24; 4092-9
13. Cavo M., Attal M., Gertz M.A., Giral S., Ludwig H., Morgan G.J., Anderson K.C.: The current landscape of multiple myeloma treatment. *Leukemia Research* 2008; 32; S1-S24
14. Chauhan D., Uchiyama H., Akbarali Y., Urashima M., Yamamoto K., Libermann T.A., Anderson K.C.: Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood* 1996; 87, 1104-1112
15. Chauhan D., Uchiyama H., Urashima M., Yamamoto K., Anderson K.C.: Regulation of interleukin 6 in multiple myeloma and bone marrow stromal cells. *Stem Cells.* 1995 Aug; 13 Suppl 2:35-9

16. Da Rocha A.B., Mans D.R., Regner A., Schwartzmann G.: Targeting protein kinase C: new therapeutic opportunities against high-grade malignant gliomas? *Oncologist* 2002; 7, 17-33
17. Damiano S.J., Cress A.E., Hazlehurst L.A., Shtil A.A., Dalton W.S.: Cell Adhesion Mediated Drug Resistance (CAM-DR): Role of Integrins and Resistance to Apoptosis in Human Myeloma Cell Lines. *Blood* 1999; 93, 1658 – 1667
18. Das K.C., White C.W.: Activation of NF κ B by antineoplastic agents *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272; 14914-14920
19. Derenne S., Monia B., Dean N.M., Taylor J.K., Rapp M.J., Harouseau J.L., Bataille R., Amiot M.: Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein in human myeloma cells. *Blood* 2002; 100, 194-199
20. Diaz-Meco M.T., Lozano J., Municio M.M., 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, 31706-31710
21. Elice F., Raimondi R., Tosetto A., D'Emilio A., Di Bona E., Piccin A., Rodeghiero F.: Prolonged overall survival with second on-demand autologous transplant in multiple myeloma. *Am. J. Hematol* 2006; 81, 426-431
22. Femand J.P., Ravaud P., Chevret S., Divine M., Leblond V., Belanger C., Macro M., Pertuiset E., Dreyfus F., Mariette X., Boccacio C., Broouet J.C.: High-dose therapy and autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma: up-front or rescue treatment? Results of a multicenter sequential randomized clinical trial. *Blood* 1998; 92, 3131-3136

23. Ferry S., Matsuda M., Yoshinda H., Hirata M.: Inositol hexakisphosphate blocks tumor cell growth by activating apoptotic machinery as well as by inhibiting the Akt/NF κ B-mediated cell survival pathway *Carcinogenesis* 2002; 23; 2031-2041
24. G-Amlak M., Uddin S., Mahmud D., Damacela I., Lavelle D., Ahmed M, van Besien K., Wickrema A.: Regulation of myeloma cell growth through AKT/Gsk3/forkhead signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 297, 760-764
25. Georgi-Hemming P., Wiklund H.J., Ljunggren O., Nilsson K., Insulin-like growth factor I is a growth and survival factor in human multiple myeloma cell lines. *Blood* 1996; 88, 2250-2258
26. Glasgow J.N., Qiu J., Rassin D., Grafe M., Wood T., Perez-Pol J.R.: Transcriptional regulation of the Bcl-X gene by NF-kappaB is an element of hypoxic responses in the rat brain. *Neurochem. Res.* 2001; 26, 647
27. Gokemen-Polar Y., Murray N.R., Velasco M.A., Gatalica Z., Fields A.P.: Elevated protein kinase C II is an early promotive event in colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 2001; 61, 1375-1381
- Graff J.R., McNulty A.M., Hanna K.R., Konicel B.W., Lynch R.L., Bailey S.N., Banks C., Capen A., Goode R., Lewis J.E., Sams L., Huss K.L., Campbell R.M., Iversen P.W., Neubauer B.L., Brown T.J., Musib L., Geeganage S., Thornton D.: The Protein Kinase C -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(16); 754-765
28. Gregory W.M., Richards M.A., Malpas J.S.: Combined chemotherapy versus melphalan and prednisolone for treatment of myelomatosis. *Lancet* 1992; 339, 1353-1354

29. Gschwendt M.: Protein kinase C delta. *European Journal of Biochemistry* 1999; 259, 555-564
30. Gupta D., Treon S.P., Shima Y., Hideshima T., Podar K., Tai Y.T., et al.: Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia* 2001; 15, 1959-1961
31. Harnett M.M., Katz E., Ford C.A.: Differential signalling during B-cell maturation. *Immunol. Lett.* 2005; 98, 33-44
32. Hazlehurst L.A., Dalton W.S.: Mechanisms associated with cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) in hematopoietic malignancies. *Cancer and Metastasis Reviews* 2001; 20; 43-50
33. Hideshima T., Chauhan D., Richardson P., et al.: NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277; 16639-16647
34. Hideshima T., Chauhan D., Shima Y., et al.: Thalidomid and its analogs overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy *Blood* 2000; 96; 2943-2950
35. Hill M., Hemmings B.: Inhibition of protein kinase B/AKT. Implications for cancer therapy. *Pharmacol Therapeut.* 2002; 93, 243-251
36. Hoffmann J.: Modulation of protein kinase C in antitumor treatment. *Reviews of Physiology Biochemistry and Pharmacology* 2001; 142, 1-96
37. Iankov I., Praskova M., Kalenderova S., Tencheva Z., Mitov I., Mitev V.: The effect of chemical blockade of PKC with Go6983 on proliferation and MAPK activity in IL6-dependent plasmacytoma cells *Leukemia Research* 2002; 26; 363-368

38. Inoue R., Matsuki N.A., Jing G., Kanematsu T., Abe K., Hirata M.: The inhibitory effect of alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate on the PI3K-Akt-NF κ B pathway in osteosarcoma cells *British Journal of Pharmacology* 2005; 146; 633-641
39. Jantunen E., Kuittinen T., Penttilä K., Lehtonen P., Mahlamäki E., Nousiainen T.: High-dose melphalan (200mg/m²) supported by autologous stem cell transplantation is safe and effective in elderly (> 65 years) myeloma patients: comparison with younger patients treated on the same protocol. *Bone Marrow Transplantation* 2006; 37, 917-922
40. Jensen G.S., Belch A.R., Mant M.J., Ruether B.A., Yacsyshyn B.R., Pilarski L.M.: Expression of multiple beta 1 integrins on circulating monoclonal B cells in patients with multiple myeloma. *Am. J. Hematol.* 1993; 43, 29-36.
41. 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
42. Landowski TH., Olashaw NE., Agrawal D., Dalton WS.: Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) is associated with activation of NF-kappaB (RelB/p50) in myeloma cells. *Oncogene* 2003; 22, 2417-21
43. 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
44. 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, 725-733

45. Mitsiades C.S., Mitsiades N.S., McMullan C.J., Poulaki V., Shringarpure R., Akiyama M., et al.: Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies and solid tumors. *Cancer Cell* 2004; 5, 221-230.
46. Ni H., Ergin M., Tibudan S.S., Denning M.F., Izban K.F., 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, 849-856
47. Nishizuka Y.: The Albert Lasker Medical Awards. The family of protein kinase C for signal transduction. *JAMA* 1989; 262, 1826-1833
48. Oh Y, Herbst RS, Burris H, Cleverly A, Musib L, Lahn M, Bepler G. Enzastaurin, an oral serine/threonine kinase inhibitor, as second- or third-line therapy of non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2008; 26; 1135-41
49. Ouyang W., Li J., Ma Q., Huang C.: Essential roles of PI-3K/AKT/IKKbeta/NFkappaB pathway in cyclin D1 induction by arsenite in JB6 C141 cells *Carcinogenesis* 2006; 27; 864-873
50. Pearce H.L., Miller M.A.: The evolution of cancer research and drug discovery at Lilly Research Laboratories. *Advan. Enzyme Regul.* 2005; 45, 229-255
51. Podar K, Anderson KC: VEGF induced Migration of MM cells is Associated with beta1 integrin and PIP3kinase dependent PKCa Activation. *J Biol Chem*. 2002 Mar 8;277(10):7875-7881
52. Podar K., Raab MS., Zhang J.: Targeting PKC in multiple myeloma: in vitro and in vivo effects of the novel, orally available small molecule inhibitor enzastaurin (LY317615.HCL) *Blood* 2007; 109; 1669-1677

53. Podar K., Tai Y.T., Davies F.E., Ientch S., Sattler M., Hideshima T., Lin B.K., Gupta D., Shima Y., Chauhan D., Mitsiades C., Raje N., Richardson P., Anderson K.C.: Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood* 2001; 98, 428-435
54. Podar K., Tai Y.T., Lin B.K., Narsimhan R.P., Sattler M., Kijima T., Salgia R., Gupta D., Chauhan D., Anderson K.C.: 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, 7875-7881
55. Querfeld C., Rizvi MA., Kuzel TM., Guitart J., Rademaker A., Sabharwal SS., Krett NL., Rosen ST.: The selective protein kinase C beta inhibitor enzastaurin induces apoptosis in cutaneous T-cell lymphoma cell lines through the AKT pathway *Journal of Investigative Dermatology* 2006; 126; 1641-1647
56. Rademaker-Lakhai JM, Beerepoot LV, Mehra N, Radema SA, van Maanen R, Vermaat JS, Witteveen EO, Visseren-Grul CM, Musib L, Enas N, van Hal G, Beijnen JH, Schellens JH, Voest EE. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the oral protein kinase C beta-inhibitor enzastaurin in combination with gemcitabine and cisplatin in patients with advanced cancer. *Clinical Cancer Research.* 2007; 13; 4474-81
57. Ravi R., Bedi A.: NF- κ B in cancer – a friend turned foe. *Drug Resist* 2004; Update 7, 53-67
58. Ries L.A.G, Eisner M.P., Kosary C.L., Hankey B.F., Miller B.A., Clegg L., Mariotto A., Feuer E.J., Edwards B.K.: 1975-2002 *SEER Cancer Statistics Review*. National Cancer Institute, Bethesda, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2002/.

59. Ringhausen 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, 7462-7469
60. Rizvi MA., Ghias K., Davies KM., Ma, C., Weinberg F., Munshi HG., Krett NL., Rosen ST.: Enzastaurin (LY317615), a protein kinase C beta inhibitor, inhibits the AKT pathway and induces apoptosis in multiple myeloma cell lines *Molecular Cancer Therapeutics* 2006; 5; 1783-1789
61. Robertson MJ, Kahl BS, Vose JM, de Vos S, Laughlin M, Flynn PJ, Rowland K, Cruz JC, Goldberg SL, Musib L, Darstein C, Enas N, Kutok JL, Aster JC, Neuberg D, Savage KJ, LaCasce A, Thornton D, Slapak CA, Shipp MA. Phase II study of enzastaurin, a protein kinase C beta inhibitor, in patients with relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2007; 25; 1741-6
62. Schmidmaier R., Baumann P., Simsek M., Dayyani F., Emmerich B., Meinhardt G.: The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin overcomes cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma by geranylgeranylation of Rho protein and activation of Rho Kinase. *Blood* 2004; 104(6), 1825-1832
63. Schmidmaier R., Baumann P.: ANTI-ADHESION evolves to a promising therapeutic concept in Oncology. *Curr Med Chem*. 2008;15, 978-990
64. 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

65. Schonwasser D.C., Marais R.M., Marshall C.J., Parker P.J.: Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel and atypical protein kinase C isoforms. *Mol. Cell Biol.* 1998; 18, 790-198
66. Shipp M.A, Ross K.N., Tamayo P.: Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat. Med.* 2002; 8,68-74
67. 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, 131-136
68. Sliva D.: Signaling pathways responsible for cancer cell invasion as targets for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 2004; 4, 327-336
69. Spencer A., Seldon M., Deveridge S., Cobcroft R., Cull G., Marlton P., Enno A., Gill D.: Induction with oral chemotherapy (CID) followed by early autologous stem cell transplantation for de novo multiple myeloma patients. *The Hematology Journal* 2004; 5; 216-221
70. Taylor JM., Crack PJ., Gould JA., Ali U., Hertzog PJ., Ianello RC.: Akt phosphorylation and NF κ B activation are counterregulated under conditions of oxidative stress *Experimental Cell Research* 2004; 300; 463-475
71. 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, 23512-23519
72. Urashima M., Chen BP., Chen S., et al.: The development of a model for the homing of multiple myeloma cells to human bone marrow *Blood* 1997; 90;

73. Urashima M., Ogata A., Chauhan D., Hatziyanni M., Vidriales M.B., Dederica D.A., Schlossmann R.L., Anderson K.C.: Transforming growth factor-beta1: differential effects on multiple myeloma versus normal B cells. *Blood* 1996; 87, 1928-1938
74. Wang C.Y., Cusack Jr. J.C., Liu R., Baldwin Jr. A.S.: Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat. Med.* 1999; 5, 412-417

7. ANHANG

7.1. Verwendete Materialien und Methoden

7.1.1. Zellkultur

Kurzbezeichnung	Bestell-Nr.	Hersteller
RPMI – 1640	E12 – 702F	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, D
PBS	14040 – 091	Dto
FCS	16170 – 078	Dto.
Flask 75 cm ²	353.136	BD Biosciences, Heidelberg, D
Flask 25 cm ²	353.014	BD Biosciences, Heidelberg, D
Flask 175 cm ²	353.118	BD Biosciences, Heidelberg, D
96-Well-Plates	353.872	Dto.
6-Well-plates	353.453	Dto.
24-Well-plates	353.495	Dto.

12-Well-plates	353.043	Dto.
Trypanblaulösung	15250-061	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, D
Kryoröhrchen	1148 33	Brand GMBH, Wertheim, D
Cell Scraper 40cm	353.087	BD Biosciences, Heidelberg, D
Cell Scraper 25cm	353.086	Dto.
Röhre 15ml	62.554.502	Sarstedt, Nümbrecht, D
Röhre 50ml	62.547.254	Dto.

7.1.2. Zytostatika

Name	Bestellnummer	Firma
Melphalan	M2011	Sigma, Taufkirchen, D
Doxorubicin	42D011	Pharmacia, Erlangen, D

7.1.3. Inhibitoren und Aktivatoren

Name	Bestellnummer	Firma
Gö76	EI-269	Biomol, Butler Pike, USA
PMA	PE160-0005	Biomol, Butler Pike, USA
Enzastaurin (LY190SB0)	QA507G	Eli Lilly and Company, Indianapolis, USA

7.1.4. Antikörper für die Oberflächenmessungen

Antikörper	Klon	Bestellnummer	Firma
CD38-FITC	T16	IM0775	Beckman Coulter, Krefeld, D
CD138-FITC	MI15	347214	Pharmingen, Heidelberg, D
CD38-PE	T16	IM1832	Beckman Coulter, Krefeld, D

7.1.5. Antikörper für die Western Blot Analyse

7.1.5.1. Primärantikörper

Antikörper	Klon	Bestellnummer	Firma
Stat3	H190	Sc-7179	SantaCruz Biotechnology, California, USA
P-Stat3	Polyclonal	Sc-21876	SantaCruz Biotechnology, California, USA
Erk	C14	Sc-154	SantaCruz Biotechnology, California, USA
P-Erk	Polyclonal	Sc-16982	SantaCruz Biotechnology, California, USA
Akt	H136	sc-8312	SantaCruz Biotechnology, California, USA

P-Akt	Polyclonal	Sc-7985-R	SantaCruz Biotechnology, California, USA
IKK α	M280	Sc-7182	SantaCruz Biotechnology, California, USA
I κ B	C15	Sc-203	SantaCruz Biotechnology, California, USA
P-I κ B	Polyclonal	Sc-7977	SantaCruz Biotechnology, California, USA
Cleaved Caspase 3	N19	Sc-1226	SantaCruz Biotechnology, California, USA
Aktin	I19	Sc-1616	SantaCruz Biotechnology, California, USA

7.1.5.2. Sekundärantikörper

Antikörper	Bestellnummer	Firma
Anti-Maus, HRP	NA 931	Amersham Biosciences, Uppsala, S
Anti-Kaninchen, HRP	NA 9340	Amersham Biosciences, Uppsala, S
Anti-Ratte, HRP	Sc-2768	SantaCruz Biotechnology, California, USA

7.1.6. Enzyme

Enzym	Bestellnummer	Firma
Trypsin-EDTA	T3924	Sigma, Taufkirchen, D

7.1.7. Kits

Kit	Bestellnummer	Firma
ECL	RPN2106	Amersham, Little

		Chalfont, UK
Annexin-FITC Apoptosekit	65874X	BD Pharmingen, Heidelberg, D
WST-1 Proliferationskit	1644807	Roche Diagnostics, Penzberg, D
Bio-Rad, Marker	161-0373	Bio-Rad Labs, München, D
Bio-RAD Proteinfärbeagens	500-0006	Bio-RAD, München, D

7.1.8. Chemikalien

Substanz	Bestellnummer	Firma
Propidiumjodid	P4170	Biomol, Hamburg, D
Ficoll Paque	17-1440-03	Amersham Biosciences, Uppsala, S
PMSF	93482	Sigma, Taufkirchen, D
Leupeptin	L2884	Sigma, Taufkirchen, D
EDTA	351-027-100	Quality Biological , Inc. Gaithersburg, USA
Aprotinin	A6279	Sigma, Taufkirchen, D
Tween 20	P7949	Sigma, Taufkirchen, D
Acrylamid 30%(v/v)	161-0158	Biorad, München, D
APS	161-0700	Biorad, München, D
Temed	161-0800	Biorad, München, D
NP-40	74385	Sigma, Taufkirchen, D

7.1.9. Sonstige Artikel für den Western Blot

Artikel	Bestellnummer	Firma
Kamm, 10 wells, 1mm	165-3359	Biorad, München, D
Spacer Plates	165-3311	Biorad, München, D
Schwämme, 8 x 11cm	170-3933	Biorad, München, D
SDS-PAGE Standards, broad range	161-0318	Biorad, München, D
Immobilon-P PVDF Membran	IPVH00010	Millipore, Schwalbach, D
Hyperfilm ECL	RPN2103	Amersham Biosciences, Uppsala, S
NaCl	S7581	Mallinckrodt, Hazelwood, USA
NaF	S1504	Sigma, Taufkirchen, D
Na ₃ V04	S6508	Sigma, Taufkirchen, D
Na ₄ P207	S6422	Sigma, Taufkirchen, D
Tris, pH 7,5 1M	351-006-100	Quality Biological, Inc. Gaithersburg, USA

7.1.10. Geräte

Gerät	Bestellnummer	Firma
Durchflusszytometer	Epics CL System II Version 3.0	Coulter Electronics, Miami, USA
Elektrophoreseset	Ready Gel Cell	Bio-rad, München, D
Homogenisator	BBI-8530742	Sartorius, Göttingen, D
Power Pac	165-5050	Bio-rad, München, D
BioFuge	75005181	Heraeus instruments, Osterode, D
Biophotometer	-	Eppendorf, Hamburg, D

Anhang _____

Cell scraper	353.086	Sarstaedt, Nümbrecht, D
Neubauer Zählkammer	-	Sarstaedt, Nümbrecht, D
Brutschrank	Serie II 3110	Forma Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge	Sigma 4K15	Sigma, Taufkirchen, D
ELISA Reader	Multiscan	Thermo Lab Systems, Sorvaajankatu, FIN

7.2. Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, Jakob Peter Armann, die vorliegenden Dissertation eigenständig verfasst zu haben und keine anderen Quellen als die angegeben verwendet zu haben.

München, den 28.07.2009

(Jakob Armann)

7.3. Danksagungen

Danken möchte ich

PD. Dr. Ralf Schmidmaier, dass er mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen hat und die Doktorvaterschaft übernommen hat

Dr. Philipp Baumann für die hervorragende Betreuung und die Ermöglichung dieser Arbeit

Dr. Sonja Mandl-Weber, Karin Müller, Hilke Hagemeier für tatkräftige Unterstützung im Labor und viele lehrreiche Diskussionen

Dennis Ballwieser für Nachhilfe in Orthographie und Stil

Tobias Engler für Hilfe beim Layout

7.4. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name:	Jakob Peter Armann
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdatum	07.12.1982
Geburtsort	Würzburg

Ausbildung

19/06/2009	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung – bestanden mit der Note „sehr gut“
10/2008 - 01/2009	PJ Tertial Pädiatrie im Dr. von Haunerschen Kinderspital
07/2008 - 10/2008	PJ Tertial Chirurgie in der Kinderchirurgischen Klinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
05/2008 - 06/2008	PJ Tertial Innere an den University of Chicago Hospitals - Pritzker School of Medicine Chicago/Illinois/USA – Gefördert durch die Harvard-Munich Alliance
02/2008 - 04/2008	PJ Tertial Innere in der Medizinischen Poliklinik Innenstadt - Klinikum der LMU
07/2007 - 02/2008	Forschungsaufenthalt am Seattle Biomedical Research Institute in Seattle/Washington/USA
08/2005 - 06/2007	Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe Multiples Myelom der Abteilung für Hämatologie und Onkologie der Medizinischen Klinik Innenstadt - Klinikum der LMU
Seit 04/2005	Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität München
03/2005	Physikumsprüfung an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
04/2003 - 04/2005	Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
10/2002 - 03/2003	Wehrdienst: Einsatz im Bundeswehrkrankenhaus in Berlin
06/2002 - 09/2002	Wehrdienst: Grund- und Fachausbildung im Sanitätsausbildungszentrum Süd in Feldkirchen
06/2002	Abitur am Uhland-Gymnasium Tübingen
1993 - 2002	Uhland-Gymnasium Tübingen
1989 - 1993	Grundschule Tübingen-Pfrondorf

Publikationen

Baumann P, Armann J, Mandl-Weber S, Grün G, Oduncu F, Schmidmaier.
**Inhibitors of protein kinase C sensitise multiple myeloma cells to
common genotoxic drugs.**

Eur J Haematol. 2008 Jan;80(1):37-45. Epub 2007 Nov 19.

Noah Sather, Jakob Armann, Lance K. Ching, Angeliki Mavrantoni, George
Sellhorn, Zachary Caldwell, Xuesong Yu, Blake Wood, Steve Self, Spyros
Kalams, and Leonidas Stamatatos

**Factors Associated with the Development of Cross-Reactive
Neutralizing Antibodies during HIV-1 Infection**

J. Virol. 2008 : JVI.02036-08v1