

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. M. Reincke

**In vitro Studien zur Effektivität des neuen
Pan-Deacetylase-Inhibitors CR2408
beim Multiplen Myelom**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

An der medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Carmen Junghanns

aus

Duisburg

2013

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ralf Schmidmaier

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Hiddemann
Prof. Dr. Christoph Salat

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.2013

Meinen Eltern

IN VITRO STUDIEN ZUR EFFEKTIVITÄT DES NEUEN PAN-
DEACETYLASE-INHIBITORS CR2408 BEIM MULTIPLLEN MYELOM

1	Einleitung.....	1
2	Patienten, Material und Methoden.....	9
2.1	Zellkultur	9
2.1.1	Zelllinien	9
2.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	9
2.1.3	Zellzahlbestimmung	10
2.1.4	Primärmaterial von Patienten und Probanden.....	10
2.2	Zellproliferationsmessung	11
2.2.1	WST-1 – Assay / Zellviabilität.....	11
2.2.2	BrdU – Assay / Proliferation	12
2.3	Durchflusszytometrie	14
2.3.1	AnnexinV – FITC/PI – Assay	14
2.3.2	Zellzyklusanalyse und Bestimmung der SubG1 – Fraktion.....	16
2.4	Western Blotting	17
2.4.1	Zelllyse	17
2.4.2	Gelelektrophorese.....	18
2.4.3	Transferblot	19
2.4.4	Proteinnachweis	20
2.4.5	Membran-Stripping	20
2.4.6	Pufferlösungen	21
2.5	Statistik	22
3	Ergebnisse	23
3.1	Hemmung der Deacetylierung	23
3.2	Reduktion der Anzahl metabolisch aktiver Zellen	23
3.3	Apoptoseinduktion	24
3.3.1	Apoptose bei Myelomzelllinien	24
3.3.2	Apoptose bei primären Myelomzellen	25
3.3.3	Apoptose bei mononukleären Zellen des peripheren Blutes.....	26

3.3.4	Caspasenaktivierung.....	27
3.4	CR2408 hemmt die Proliferation von Myelomzelllinien	28
3.5	Zellzyklusarrest	30
3.6	CR2408 hemmt Cycline, Cdks und die Phosphorylierung von Rb	32
3.7	CR2408 fördert die Expression von Bim und pJNK und hemmt Bcl-XL, P70S6K, 4E-BP-1 und Akt	33
3.8	Hemmung des zytokinabhängigen Zellwachstums	35
3.9	Hemmung des Knochenmarkstromamedium-induzierten Zell-Wachstums	37
3.10	Zusammenwirken von CR2408 mit klassischen antineoplastischen Substanzen	39
3.10.1	Kombination von CR2408 mit Bortezomib	39
3.10.2	Kombination von CR2408 mit Doxorubicin.....	42
4	Diskussion.....	45
5	Zusammenfassung.....	49
6	Literaturverzeichnis	51
7	Abkürzungsverzeichnis.....	70
8	Abbildungsverzeichnis.....	72
9	Anhang.....	73
9.1	Verwendete Materialien und Geräte	73
9.1.1	Zellkultur.....	73
9.1.2	Zytostatika.....	74
9.1.3	Antikörper für die Westernblotanalyse	74
9.1.4	Enzyme.....	76
9.1.5	Chemikalien	76
9.1.6	Weitere Westernblot Artikel	77
9.1.7	Geräte	77
9.2	Eidesstattliche Versicherung	79
9.3	Danksagungen	80

Teile der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in einem wissenschaftlichen Journal veröffentlicht:

“The pan-histone deacetylase inhibitor CR2408 disrupts cell cycle progression, deminishes proliferation and causes apoptosis in multiple myeloma cells.” Baumann P., Junghanns C., Mandl-Weber S., Strobl S., Oduncu F., Schmidmaier R.: Br J Haematol. 2012 Mar; 156(5):633-642.

1 Einleitung

Das Multiple Myelom (MM) entsteht durch eine maligne Proliferation von klonalen Plasmazellen. Das Zusammenspiel des Tumors, seiner (Synthese-)Produkte und der Reaktion des Organismus resultiert in einer Vielzahl von Organschäden und Symptomen (LONGO ET AL., 2012). Die Erkrankung macht ca. 1% aller Krebserkrankungen und 10% der malignen hämatologischen Erkrankungen aus (RAJKUMAR ET AL., 2011). 20% der Todesfälle bei hämatologischen Erkrankungen und 2% der Todesfälle aller Krebserkrankungen werden durch das MM verursacht. Die Erkrankung geht (LANDGREN ET AL., 2009) aus einem asymptomatischen, prämaligen Stadium einer klonalen Plasmazell-Proliferation, dem MGUS (monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz), hervor. Das MGUS tritt in 1% der Bevölkerung über 50 Jahre und bis zu 10% der Bevölkerung über 75 Jahre auf (LONGO ET AL., 2012). Die Transformationsrate eines MGUS zum Multiplen Myelom beträgt etwa 1% pro Jahr (RAJKUMAR ET AL., 2011). Bei einem Zehntel der Patienten (LONGO ET AL., 2012) taucht eine Intermediärform auf, welche noch asymptomatisch, aber bereits fortgeschrittener als das MGUS ist. Diese wird SMM (Smoldering multiple myeloma) bzw. asymptomatisches MM genannt.

Die Inzidenz liegt weltweit bei ca. 4/100.000 jährlich und scheint mit der Ethnität zu variieren: sie ist in der farbigen Bevölkerung 2-3-mal häufiger als bei Weißen (KYLE ET AL., 2003). Andererseits scheint das Risiko bei Asiaten und Mexikanern geringer zu sein (WAXMAN ET AL., 2010). In Deutschland liegt die Inzidenz mit 3/100.000 (männlich: 1,7-2,8/100.000, weiblich: 1,3-1,7/100.000) etwas niedriger (LAMERZ ET AL., 2009). Bei Männern ist die Erkrankungsrate tendenziell höher als bei Frauen (1,4:1) (RAJKUMAR ET AL., 2011). Meist tritt die Erkrankung nach dem 40. Lebensjahr auf, das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 70 Jahren (LONGO ET AL., 2012). Bei Verwandten 1. Grades steigt das Risiko, selbst zu erkranken, um 3,7% (LYNCH ET AL., 2001).

Entgegen früherer Vermutungen, das MM entstehe im Knochenmark, wird heute davon ausgegangen, dass die Erkrankung ihren Ursprung im peripheren Lymphknoten nimmt und lediglich die entarteten Plasmazellen im Knochenmark akkumulieren (TRICOT 2000).

Labordiagnostisch fallen eine stark erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit, das vermehrte Gesamteiweiß, Antikörpermangelsyndrom, Hyperkalzämie und eine, meist normozytäre,

Anämie auf (RAJKUMAR ET AL., 2011, KYLE ET AL., 2003). Als Immunglobuline werden in den meisten Fällen IgG, seltener IgA, IgD oder inkomplette Ig (Leichtketten-/Bence-Jones-Proteine) sezerniert (KYLE ET AL., 2003).

Erste Zeichen der Erkrankung im noch symptomfreien Stadium sind eine Erhöhung der Blutsenkungsgeschwindigkeit oder ein M-Gradient in der Elektrophorese, die eher zufällig z.B. im Rahmen von Vorsorgeuntersuchungen auffallen (ABEDINPOUR ET AL., 2009). Normalerweise ist bei symptomatischen Patienten zum Zeitpunkt der Diagnosestellung das MM immer generalisiert. In fortgeschritteneren Stadien macht sich die Erkrankung durch Allgemeinsymptomatik wie Gewichtsverlust und Müdigkeit bemerkbar. Spezifische Symptome für das MM sind vor allem bedingt durch die Infiltration des Knochens (Schmerzen u.a. in Schädel, Rippen, Wirbel, Becken, Femur und Humerus) und, aufgrund der erhöhten Sezernierung von Leichtketten-Ig, durch die Schädigung innerer Organe, insbesondere der Niere (RAJKUMAR ET AL., 2011).

Früher erfolgte die Stadieneinteilung nach Durie und Salmon, wo vor allem die Tumorlast anhand von klinischen, labortechnischen und bildgebenden Verfahren beschrieben wurde (KYLE ET AL., 2009). Diese Einteilung wird zunehmend durch das ISS (International Staging System) ersetzt, in welchem nur anhand der Messung von Beta2-Microglobulin (β 2M) und Serum-Albumin eine sehr gute Prognoseabschätzung möglich ist (GREIPP ET AL., 2005).

Das Multiple Myelom unterscheidet sich von seinen Vorstadien SMM und MGUS durch das Vorhandensein von Krankheitszeichen. Anders als in der alten Salmon and Durie Einteilung ist demnach jedes symptomatische Multiple Myelom auch behandlungsbedürftig. Die genannten Vorstadien dagegen werden nur auf das Auftreten von Krankheitssymptomen hin überwacht (KYLE ET AL., 2004). Diese bestehen laut der International Myeloma Working Group (IMWG) beim Auftreten der sogenannten CRAB-Kriterien (Hyperkalzämie (C), Niereninsuffizienz (R), Anämie (A), Knochenbeteiligung (B)). Weitere Behandlungsindikationen sind das Vorliegen eines Hyperviskositätssyndroms, einer B-Symptomatik oder anderer Komplikationen, die durch Zurückdrängen der Myelom-Erkrankung gebessert werden können (Leitlinie 2010 der DGHO), wie zum Beispiel eine systemische Leichtketten-(AL-)Amyloidose (PALLADINI ET AL., 2004, MERLINI ET AL., 2003).

Liegt ein symptomatisches Multiples Myelom vor, dann ist die Behandlungsstrategie (konventionelle Chemotherapie versus Hochdosistherapie) festzulegen (HIDDEMANN ET AL.,

2010). Die Durchführung einer Hochdosistherapie im Vergleich zur Standarddosis zeigte in einigen Studien eine signifikante Verlängerung der Überlebenszeit (ATTAL ET AL., 1996, CHILD ET AL., 2003, PALUMBO ET AL. 2004), in anderen nur eine Verlängerung der progressionsfreien Zeit (BARLOGIE ET AL., 2006, BLADÉ ET AL., 2005, FERMAND ET AL., 2005). Grund für die Diskrepanz ist am ehesten die ungewöhnlich intensive Standardtherapie in den letztgenannten Studien. Für jüngere Patienten in gutem Allgemeinzustand ist daher die Hochdosischemotherapie mit autologer Blutstammzelltransplantation heute als Standardtherapie anzusehen (Leitlinie 2010 der DGHO). Für ältere Patienten mit deutlichen Komorbiditäten ist eine konventionell dosierte Therapie in Kombination mit einer „neuen Substanz“ im Sinne von MPT oder VMP als Therapiestandard anzusehen (PALUMBO ET AL., 2008, FACON ET AL., 2007, SAN MIGUEL ET AL., 2008).

Vor Einführung der Myelomtherapie im Jahr 1958 betrug die mediane Überlebenszeit der Patienten ca. 6 Monate; heute liegt sie bei über 5 Jahren im Stadium I nach ISS (GREIPP ET AL., 2005). Unter Melphalan, dem ersten Myelom-wirksamen Medikament, gab es kaum komplette Remissionen (CR) und es kam bei fast allen Patienten zu einem Rezidiv. Durch Einführung der Stammzelltransplantation konnten hohe CR-Raten erzielt und das Überleben verbessert werden. Auch die Erkenntnis über die Wirkung des Microenvironments im Knochenmarkstoma im Bezug auf die Chemoresistenz gegen Zytostatika (SHAIN ET AL., 2000) führte zu neuen Therapiemöglichkeiten: der Kontakt der MM-Zellen an die Stromazellen des Knochenmarks schützt diese vor Zytostatika-induzierter Apoptose (DAMIANO ET AL., 1999, SCHMIDMAIER ET AL., 2006). Außerdem spielen Wachstumsfaktoren, wie Stromal cell-derived factor (SDF)-1alpha, Interleukin 6 (IL-6), IGF-1 (insulin-like growth factor-1), VEGF (vascular endothelial growth factor) und andere für das Überleben der Tumorzellen im Knochenmark eine entscheidende Rolle (HIDESHIMA ET AL., 2002, KLEIN ET AL., 1995, BAUMANN ET AL., 2007, BAUMANN ET AL., 2008). Diese Feststellung sorgte dafür, dass sowohl bei der Therapie im Falle eines Rezidivs (KUMAR ET AL., 2008), als auch bei Patienten, die nicht für eine Transplantation geeignet waren, durch den Einsatz von Thalidomid, Lenalidomid (immunomodulatory drugs, IMiDs) und dem Proteasomeninhibitor Bortezomib eine Verbesserung der Prognose erzielt werden konnte (FACON ET AL., 2007). Anfang 2013 wurde in den USA als neuer Vertreter der IMiDs Pomalidomid zugelassen (SCHEY ET AL., 2004, LACY ET AL., 2009, STREETLY ET AL., 2008, RICHARDSON ET AL., 2012). Vielversprechende Resultate zeigt ebenfalls der zweite Proteasominhibitor Carfilzomib (PR –

171, Kyprolis®) (KUH N ET AL., 2007, SIEGEL ET AL., 2012) sowohl bei Erstbehandlung, als auch bei therapierefraktären Patienten.

Einen potenziell kurativen Ansatz zur Therapie des MM stellt die allogene Stammzelltransplantation (EINSELE ET AL., 2003, ROSINOL ET AL., 2008, BRUNO ET AL., 2009) dar. In einigen Studien war die Verbindung von Auto- mit Allografting gegenüber alleinigem Autografting bezüglich Langzeitüberleben und Rezidiv-freier Zeit überlegen (GIACCONE ET AL., 2011, BRUNO ET AL., 2007, BJÖRKSTRAND ET AL., 2011). Dieser Erkenntnis steht die Studie von KRISHNAN ET AL., 2011 gegenüber, die keine größere Effektivität dieser Therapie im Vergleich zur autologen Tandemtransplantation zeigte. Desweiteren ist diese Therapieoption mit einer erhöhten Mortalität behaftet (BJÖRKSTRAND ET AL., 1996, BRUNO ET AL., 2009), weshalb es fraglich bleibt, ob diese Behandlungsoption im Vergleich zur autologen Stammzelltransplantation vorteilhafter ist (LOKHORST ET AL., 2010, GUPTA ET AL. 2011, GAHRTON ET AL. 2001). Versuche, eine Therapie-abgängige Mortalität (TRM) durch T-Zell-Depletion zu reduzieren, brachten in der HOVON 24 MM Studie keinen gewünschten Erfolg (LOKHORST ET AL. 2003). Andererseits werden vielversprechende Ergebnisse nach dosisreduzierter (RIC) allogener Stammzelltransplantation, u.a. auch bei Therapie-refraktären Patienten (SHIMONI ET AL. 2010), beobachtet (MCSWEENEY ET AL., 2001, MALONEY ET AL., 2003, KRÖGER ET AL., 2002, BRUNO ET AL., 2009).

Trotz großer Fortschritte in der Behandlung des MM ist die Erkrankung zwar nicht mehr unheilbar, hat aber unter maximaler Therapie nur eine Langzeitüberlebensrate von 15% (MARTINEZ-LOPEZ ET AL., 2011). Im Therapieverlauf kommt es in der Regel zu Resistenzbildung gegenüber konventioneller und moderner Zytostatika. Zu den gefürchtetsten Komplikationen gehören Infektionen, Niereninsuffizienz, Anämie, pathologische Frakturen, Hyperkalzämie und neurologische Komplikationen (BLADÉ ET AL., 2007).

Ein neuer Ansatzpunkt zur Entwicklung von Therapien gegen das Multiple Myelom ist die Erforschung von epigenetischen Veränderungen bei Tumorzellen. Die Gesamtlänge der DNA einer menschlichen diploiden Zelle beträgt ca. 2 Meter ($6,4 \times 10^9$ bp auf 46 Chromosomen verteilt und 16569bp zirkulierende mitochondriale DNA). Zur Verpackung in der Zelle wird die DNA mit Proteinen zu stabilen Superstrukturen, welche das Chromatin ergeben, verbunden. Bei diesen Proteinen lassen sich Histon- und Nicht-Histon-Proteine unterscheiden. In Histonen sorgt der hohe Anteil an den positiv geladenen basischen Aminosäuren Arginin

und Lysin für eine Anlagerung an die negativ geladenen Phosphatgruppen des DNA-Rückrates. Es existieren 5 Klassen: H I, H IIA, H IIB, H III und H IV. Ein Histon-Oktamer besteht aus je zwei Molekülen H IIA, H IIB, H III und H IV und bildet zusammen mit 146bp von sich linkswindig um das Oktamer wickelnder DNA das Nukleosom (RASSOW ET AL., 2006, SHARMA ET AL., 2009). Epigenetische Veränderungen, wie Acetylierung, Methylierung, Ubiquitylierung oder Phosphorylierung des Nukleosoms an N-terminalen Aminosäuren der Histone eines Oktameres offerieren eine Regulierung der Chromatinstruktur. Somit können Genexpression, Replikation oder Zellteilung beeinflusst werden (RASSOW ET AL., 2006, SHARMA ET AL., 2009).

Bei der Entwicklung von malignen Erkrankungen sind sowohl genetische als auch epigenetische Faktoren von Bedeutung. Oft werden Veränderungen in der DNA-Methylierung und Modifikation von Histonen bei Tumoren entdeckt (VILLAR ET AL., 2004). Im Gegensatz zu irreversiblen genetischen Aberrationen ist es möglich, epigenetische Veränderungen zu revidieren und sogar wieder in den Normalzustand zu versetzen (YOO ET AL., 2006). Darum wird seit vielen Jahren vor allem an der DNA Methylierung, RNA-assoziiertem Silencing, Nukleosom Positionierung und Histon Modifikation geforscht (SHARMA ET AL., 2009).

Studien zur Tumorigenese zeigten unter anderem einen globalen Verlust an acetyliertem H4-Lysin 16 (H4K16a) und trimethyliertem H4-Lysin 20 (H4K20me3) (FRAGA ET AL., 2005). Dieser Verlust an Histon-Acetylierung, welcher durch HDAC (Histon-Deacetylasen) katalysiert wird, resultiert in der Repression von Genen (SHARMA ET AL., 2009). In der Tat werden in vielen Tumoren HDACs überexprimiert aufgefunden (YANG ET AL., 2005), z.B. HDAC1 beim Prostatakarzinom (HALKIDOU ET AL., 2004) oder HDAC2 bei Magen- und Kolonkarzinom (SONG ET AL., 2005, ZHU ET AL., 2004).

Die Hemmung von Histon-Deacetylasen ist daher auch beim Multiplen Myelom ein wichtiger Ansatzpunkt in der Erforschung von neuen Therapieansätzen geworden, wobei HDAC-Inhibitoren eine heterogene Substanzgruppe darstellen und bezüglich der Wirkungsweise zwischen den verschiedenen HDAC-Klassen unterschieden werden muss. Enzyme der Klasse I (HDAC 1,2,3,8) befinden sich im Nucleus und werden ubiquitär exprimiert, während Enzyme der Klasse Iia (HDAC 4,5,7,9) und Iib (6,10) im Nucleus und Cytoplasma, abhängig vom Gewebetyp, aufgefunden werden. HDAC11 ist nicht eindeutig klassifizierbar, darüber hinaus existieren Varianten der einzelnen Enzyme durch alternatives Splicing. Klasse III – Enzyme, welche NAD⁺-abhängige Deacetylasen beinhalten, wurden größtenteils erst in Hefe-

Zellen und in-vitro getestet (VILLAR ET AL., 2004).

HDAC1 und 2 sind bei der Exprimierung Zell-Zyklus-regulierender Gene, wie p21 involviert (GUI ET AL., 2004), HDAC3 interferiert mit nuklearen Hormon-Rezeptoren, welche am Silencing von Genen beteiligt sind (YANG ET AL., 2003), und spielt eine Transkriptions-unabhängige Rolle in der Mitose (LI ET AL., 2006). HDAC8 reguliert die Telomerase-Aktivität (LEE ET AL., 2006), siRNA, die HDAC8 anvisieren, demonstrierten anti-neoplastische Effekte (VANNINI ET AL., 2004), HDAC 7 spielt durch die Suppression der Nur77-abhängigen Apoptose in der clonalen Expansion von T-Zellen eine Rolle (DEQUIEDT ET AL., 2003), HDAC6 acetyliert Tubulin und Hsp90 und scheint daher ein wichtigerer Regulator der Protein-Faltung zu sein (BALI ET AL., 2005) (GALLINARI ET AL., 2007).

Unterschiede zwischen Expression, Ziel und Lokalisation, Gewebe oder Phase im Zellzyklus erklären möglicherweise, warum derselbe HDAC-Inhibitor verschiedene Effekte in unterschiedlichen biologischen Systemen bietet (VEDIN ET AL., 2003).

Die bedeutendsten Auswirkungen von HDAC-Inhibitoren bestehen in der transkriptionellen Aktivierung von Tumorsuppressorgenen (z.B. p21WAF1), Zellzyklusarrest der malignen Zellen und Apoptoseinduktion (VILLAR ET AL., 2004). Außerdem potenzieren sich verschiedene, in die Epigenetik eingreifende Substanzen (CAREW ET AL., 1999).

Die Wirkung der Histon-Deacetylase-Inhibitoren beschränkt sich nicht nur auf Histone, daher sollte korrekterweise von Deacetylase-Inhibitoren gesprochen werden. Die zusätzlichen Angriffspunkte sind ebenfalls mit antineoplastischen Effekten behaftet. (H)DAC-Inhibitoren acetylieren und destabilisieren Hsp90, ein Chaperon für verschiedene Onkoproteine, wie Akt und c-raf (MEHNERT ET AL., 2007, YU ET AL., 2002). Nach Acetylierung des Bax-Suppressors Ku70 wird das proapoptische Protein Bax in Mitochondrien abgegeben (COHEN ET AL., 2004, SUBRAMANIAN ET AL., 2005). Der Einsatz des HDAC-6 spezifischen Inhibitors Tubacin führt zu einer Akkumulation von acetyliertem α -Tubulin; die Kombination mit dem Proteasomeninhibitor Bortezomib bewirkt eine signifikante Akkumulation polyubiquitinerter Proteine (HIDESHIMA ET AL., 2005). Desweiteren induzieren (H)DAC-Inhibitoren eine Hochregulation von Inhibitoren der Angiogenese, wie p53 und von Hippel-Lindau, und vermindern die Expression angiogenese-induzierender Faktoren, wie VEGF und HIF-1 α (MEHNERT ET AL., 2007, KIM ET AL., 2001, KIM ET AL., 2007, RÖSSIG ET AL., 2002).

Für verschiedene (H)DAC-Inhibitoren, wie Trichostatin A (YOSHIMA ET AL., 1990), SAHA

1. Einleitung

(Suberoylanilide hydroxamic acid, später Vorinostat) (MITSIADES ET AL., 2004), Romidepsin (Depsipeptid) (KHAN ET AL., 2004), Belinostat (PXD101) (FENG ET AL., 2007), Valproat (NERI ET AL., 2008), Panobinostat (LBH589) (MAISO ET AL., 2006) und Resminostat (MANDL-WEBER ET AL., 2010) konnte bereits eine anti-Myelom-Aktivität nachgewiesen werden. Bei JNJ-26481585 (DELEU ET AL., 2009) und Valproat (in Kombination mit Thalidomid) (KITAZOE ET AL., 2008) zeigte sich zusätzlich eine positive Auswirkung auf die durch das MM mittels Osteoklastenaktivierung verursachte Zerstörung des Knochens. In Therapie-resistenten Fällen und Rezidiven bewies der (H)DAC-Inhibitor NVP-LAQ824 in vitro Wirkung (CATLEY ET AL., 2004). SAHA ist bereits durch die FDA zur Therapie des kutanen T-Zell-Lymphoms zugelassen worden.

Aufgrund der vielversprechenden Wirkung der in die Epigenetik eingreifenden Substanzen und der immer noch unbefriedigenden Langzeitüberlebensrate (MARTINEZ-LOPEZ ET AL., 2011) ist es wichtig, weitere, noch potentere, DAC-Inhibitoren zu entwickeln.

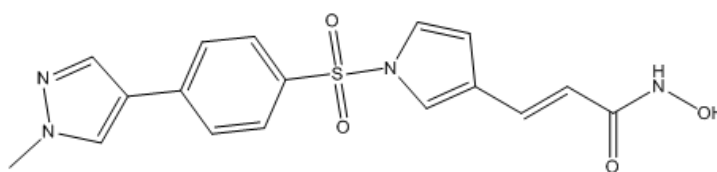


Abbildung 1-1: Strukturformel von CR2408

Die vorliegende experimentelle Arbeit befasst sich in vitro mit Wirkungen von CR2408 (Abbildung 1-1), einem neuen, direkten pan-(H)DAC-Inhibitor, der alle bekannten elf Zink-abhängigen Histon-Deacetylasen der HDAC Klassen I, II und IV, inhibiert und dessen IC50 zwischen 12nM (HDAC 6) und 520nM (HDAC 8) liegt (BAUMANN ET AL., 2011). Die Selektivität von CR2408 im Bezug auf HDAC-Isoenzyme wurde anhand von Vorexperimenten mit HDAC Enzymen ermittelt. CR2408 inhibiert Dosis-abhängig alle getesteten HDACs in nanomolaren Konzentrationen (HDAC1 27nM, HDAC2 76nM, HDAC3 28nM, HDAC4 151nM, HDAC5 51nM, HDAC6 13nM, HDAC7 360nM, HDAC8 522nM, HDAC9 92nM, HDAC10 77nM und HDAC11 56nM) (BAUMANN ET AL., 2011). Die IC50 Werte der neuen Substanz wurden mit den Werten des älteren (H)DAC-Inhibitors SAHA

1. Einleitung

(Vorinostat) verglichen, dabei zeigte CR2408 eine deutlich höhere Potenz (Abbildung 1-2, BAUMANN ET AL., 2011).

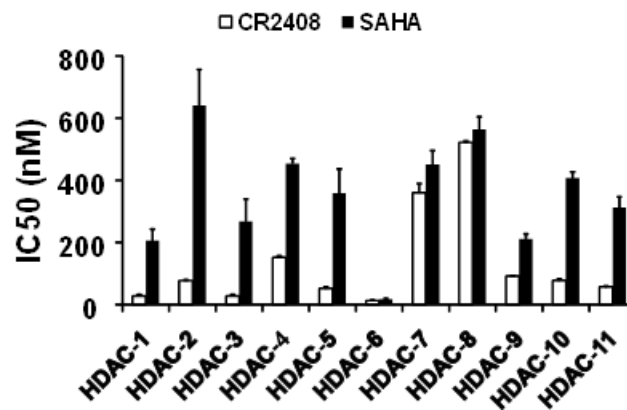


Abbildung 1-2: Vergleich der IC₅₀ Werte des neuen (H)DAC-Inhibitors CR2408 mit den Werten von SAHA zur Inhibition der Histondeacetylasen 1-11 (aus BAUMANN ET AL., 2011)

Die zunehmende Bedeutung der epigenetischen Therapie in der Onkologie und speziell auch beim Multiplen Myelom, sowie die deutlich höhere Potenz der Substanz CR2408 im Vergleich zum klassischen SAHA, waren die Rationale zur präklinischen Evaluation von CR2408. Es sollte in vitro an verschiedenen Myelomzelllinien die Wirkung von CR2408 auf Wachstum, Apoptose, Proliferation, Zellzyklus und Expression von Signalmolekülen untersucht werden. Zudem sollte nach Synergismen mit klassischen Zytostatika bzw. Proteasominhibitoren gesucht werden, um mögliche klinische Einsatzmöglichkeiten der Substanz beschreiben zu können.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

Die verwendeten Myelomzelllinien NCI-H929, OPM-2, U266 und RPMI-8226 stammen von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). Sie wurden von am Multiplen Myelom erkrankten Patienten zwischen 1966 und 1982 an verschiedenen Kliniken gewonnen und besitzen unterschiedliche morphologische und immunologische Eigenschaften. Die Zellen werden in RPMI-1640-Medium mit 10-prozentigem Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS) bei 37°C, 5% CO₂ und 95-100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. FCS wird vorher eine halbe Stunde lang im Wasserbad bei 56°C hitzeinaktiviert. Es erfolgt keine Zugabe von Streptomycin/Penicillin. Die Zellen werden bis zu einer Dichte von etwa $80 \cdot 10^4$ Zellen/ml kultiviert. Anschließend wird die Kultur geteilt, ein Teil verworfen und der andere Teil mit Medium auf eine Zellkonzentration von $20 \cdot 10^4$ Zellen/ml verdünnt und weiterkultiviert. Zur Sicherstellung der Zellviabilität wird vor Beginn eines Experiments mikroskopisch eine Trypanblaufärbung der Zellen vorgenommen.

Die Stromazelllinie HS – 5 stammt von der „American Type Culture Collection“ (ATCC) in Manassas (USA). Sie zeichnet sich durch Produktion von Granulozyten Kolonie-stimulierendem Factor (G-CSF), Granulozyten-Macrophagen-CSF (GM-CSF), Macrophagen-CSF (M-CSF), Kit ligand (KL), Macrophagen-Inhibierendem Protein-1 alpha, Interleukin-1 alpha (IL-1alpha), IL-1beta, IL-1RA, IL-6, IL-8, IL-11, und dem Leukaemia inhibitory factor (LIF) aus. Ihre Beschaffenheit unterstützt die Proliferation von hämatopoetischen Stammzellen.

2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zuerst wird ein Einfriermedium hergestellt, (5ml RPMI-1640-Medium, 3ml FCS und 2ml DMSO) und bis zur weiteren Verwendung in Kryoröhrchen auf Eis gelagert. Anschließend

werden 10^7 Zellen abzentrifugiert, zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in 4,5ml Kulturmedium (RPMI-1640-Medium + 20% FCS) resuspendiert. 0,9ml der Zellsuspension werden mit 0,9ml des Einfriermediums in die Kryoröhrchen gegeben, und sofort für 6 Stunden bei -20°C gelagert. Daraufhin werden die Zellen für 24 Stunden bei -80°C und schließlich bei -196°C tiefgefroren. Um die Zellen aufzutauen, werden sie zuerst für 2 Minuten bei Raumtemperatur aufgewärmt und dann in 37°C warmes Kulturmedium überführt. Nach zwei Waschvorgängen mit Kulturmedium werden die Zellen in einer Dichte von $20 \cdot 10^4$ Zellen/ml in Zellkulturflaschen überführt.

2.1.3 Zellzahlbestimmung

Vor Beginn eines Experiments werden $30\mu\text{l}$ der Zellsuspension mit $30\mu\text{l}$ Trypanblaulösung vermischt, gevortext und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Danach wird mikroskopisch die Anzahl der vitalen Zellen pro ml bestimmt: tote Zellen färben sich, im Gegensatz zu vitalen Zellen, blau an, da sie aufgrund ihrer durchlässigen Membran Trypanblau aufnehmen. Auf diese Weise können sie unter dem Mikroskop von gesunden Zellen unterschieden und bei der Zellzahlbestimmung ausgeklammert werden.

2.1.4 Primärmaterial von Patienten und Probanden

Einige Versuche werden, zusätzlich zu Zellen der DSMZ, mit frischen mononukleären Zellen aus dem Knochenmark (BMMCs: bone marrowmononuclear cells) von Myelompatienten durchgeführt. Dafür werden 5ml heparinisiertes Knochenmarkaspirat verwendet. Liegt peripheres Blut von Patienten oder Probanden (PBMCs: peripheral blood mononuclear cells) vor, werden 15ml EDTA-Blut angewendet. Patienten und Probanden haben zuvor ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung des Materials für wissenschaftliche Zwecke nach Aufklärung durch einen Arzt gegeben. Ein positives Votum der Ethikkommission liegt vor.

Die Trennung der mononukleären Zellen im Knochenmarkaspirat erfolgt durch Dichtegradienten-Zentrifugation, für welche Ficollhpaque (ein synthetisch hergestelltes Polysaccharid aus Saccharose und Epichlorhydrin) verwendet wird. Lymphozyten und Monozyten, bzw. ihre Vorstufen sammeln sich entsprechend ihrer spezifischen Dichte bei Zentrifugation in der Interphase zwischen Überstand (Plasma) und Ficollhpaque an.

Das Patientenblut wird in 50ml-Falcon-Röhrchen gegeben und mit PBS auf 20ml aufgefüllt. Nachfolgend werden 20ml Ficollhpaque in ein zweites 50ml-Röhrchen gegeben und das Patientenmaterial vorsichtig auf dem Ficoll aufgetragen. Der „Blow-out“-Mechanismus der Pipette wird ausgestellt und die Pipette am Rand des Röhrchens aufgesetzt, um ein Vermischen der Phasen zu verhindern. Im Anschluss werden die Zellen im Falconröhrchen bei 1500 U/min für 30 Minuten ohne Bremse bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die verschiedenen Bestandteile des Blutes schichten sich dabei wie folgt: Erythrozyten, Granulozyten und tote Zellen sammeln sich am tiefsten Punkt des Röhrchens. Zwischen dem aufliegenden Ficollhpaque und dem an oberster Stelle befindlichem Plasma liegt die Interphase mit mononukleären Zellen. Ein Großteil des Plasmas wird entfernt, um leichter an die Interphase zu gelangen, welche für nachfolgende Versuche abpipettiert wird. Alle anderen Schichten werden verworfen.

2.2 Zellproliferationsmessung

2.2.1 WST-1 – Assay / Zellviabilität

In diesem Assay wird zur Bestimmung metabolisch aktiver Zellen das hellrote Tetrazolium Salz WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]-1,3-Benzendisulfonat) eingesetzt, welches durch das mitochondriale Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase-System zu dem gelbfarbenen Formazan reduziert wird (Abbildung 2-1). Eine Zu- oder Abnahme der Anzahl viabler Zellen führt zu einer Veränderung der Menge an mitochondrialen Enzymen. Da Formazan eine höhere optische Dichte besitzt als das Tetrazolium Salz Wst-1, kann mithilfe eines Fotometers quantitativ anhand der Umwandlung von Wst-1 in Formazan eine Aussage über die Anzahl metabolisch aktiver Zellen getroffen werden.

In einem 2ml Ansatz werden zunächst $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml mit ansteigenden Konzentrationen der zu untersuchenden Substanz für einen Zeitverlauf von 48 und 96 Stunden inkubiert. Angesetzt sind dabei je $8 \times 100 \mu\text{l}$ einer Konzentration in einer 96er Wellplatte. Ein bis vier Stunden vor der Messung werden pro Well je $10 \mu\text{l}$ Wst-1 hinzugegeben. Die Messung erfolgt bei 450nm und einer Referenzwellenlänge von 690nm.

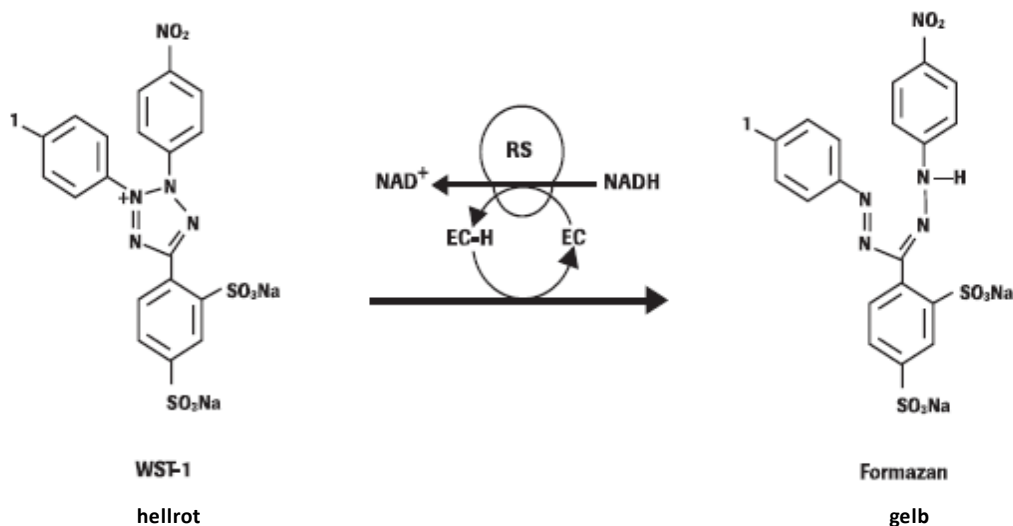


Abbildung 2-1: Spaltung des Tetrazolium Salzes WST-1 (4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]-1,3-Benzendisulfonat) zu Formazan. (EC-H/EC = Elektronen-Kopplungs-Reagenz; RS = Mitochondriales Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System). Entnommen aus *roche-applied-science.com*, *cytotoxicity products*

2.2.2 BrdU – Assay / Proliferation

Bromdesoxyuridin (BrdU), das chemische Analogon des Nucleosids Thymidin bzw. Desoxyuridin (siehe Abbildung 2-2), kann während der S-Phase der Zellteilung in phosphorylierter Form anstelle von Desoxythymidin in die neu herzustellende DNA eingebaut werden. So ist es möglich, mithilfe von spezifischen Antikörpern gegen BrdU eine bereits stattgefundene DNA-Replikation nachzuweisen und somit die Zellproliferation quantitativ zu messen.

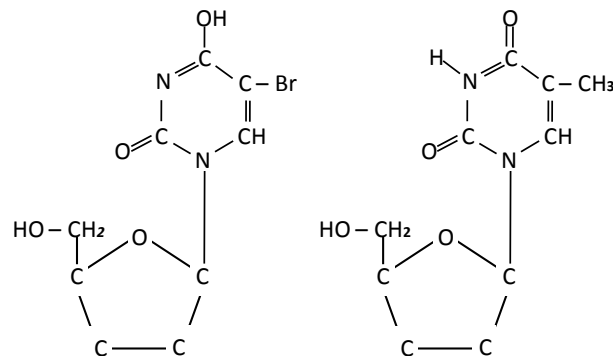


Abbildung 2-2: Vergleich BrdU (links) mit Thymidin (rechts)

Die Versuche werden mit dem Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) kit der Firma Roche durchgeführt. Mit einer Ausgangskonzentration von $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml werden die Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen jeweils als 8-fach-Ansatz in 96er Wellplatten kultiviert, wobei pro Well 100µl eingesetzt werden. Fakultativ wird zusätzlich bei einer der Zelllinien ein Background Controller Ansatz (ohne spätere Zugabe von BrdU) angesetzt. Letzterer dient dem Nachweis von unspezifischer Bindung des Anti-BrdU-Antikörpers an Zellen in Abwesenheit von BrdU (in diesem sollte ein Absorptionskoeffizient von 0,1 nicht überschritten werden). Sechzehn Stunden vor der weiteren Bearbeitung des Ansatzes wird BrdU im Verhältnis 1:10 zugesetzt.

Am nächsten Tag werden die Zellen in den Platten bei 1800rpm für 10 Minuten abzentrifugiert, die Überstände entfernt und anschließend für eine Stunde bei 60°C im Brutschrank getrocknet. Danach wird durch Hinzufügen von je 200µl FixDenat/Well in einem Schritt sowohl eine Fixierung der Zellen, als auch die Denaturierung der DNA vorgenommen. Die Denaturierung der DNA verbessert die Zugänglichkeit des inkorporierten BrdU. Es folgt eine Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Im nächsten Schritt soll der BrdU-Antikörper eingebracht werden. Dafür wird kurz vor Ende der Inkubationszeit eine Anti-BrdU-POD Arbeitslösung vorbereitet. Es handelt sich dabei um ein stabilisiertes Lyophilisat (Gefriertrocknung), in dem sich ein monoklonaler Antikörper (Fab Fragment) konjugiert mit Peroxidase (POD) befindet. Für die Arbeitslösung wird zunächst Anti-BrdU-POD in 1ml destilliertem Wasser gelöst, gründlich gemischt und zu je 100µl aliquotiert. Pro 96er Wellplatte benötigt man dann jeweils 100µl der Lösung, welche wiederum in Verhältnis 1:100 (hier also 9,9ml) mit Verdünnungslösung vermischt wird. Vor der Zugabe von je 100µl

der anti-BrdU-POD Arbeitslösung pro Well wird das FixDenat vollständig auf Zellstoff ausgeklopft. Es folgt eine weitere Inkubation von 90 Minuten bei Raumtemperatur. Nach der Inkubation folgt die Herstellung eines Waschpuffers, wobei pro Platte je 10ml Waschpuffer (PBS) mit 90ml Aqua dest. verdünnt werden. Die Arbeitslösung wird vollständig entfernt und die Zellen 3 Mal mit jeweils 200 μ l des Waschpuffers gewaschen.

Nach Entfernung des Waschpuffers erfolgt eine Zugabe von 100 μ l Substrat (TMB=Tetramethyl-benzidine) pro Well und im Anschluss eine erneute Inkubation bei Raumtemperatur, die zwischen 5 und 30 Minuten dauern kann. Das Ende der Inkubation ist an der Farbveränderung der Zellen erkennbar, die nun ins Blaue tendieren sollte. Je besser die Zellen das über die Nacht hinzugefügte BrdU in die DNA einbauen konnten, desto eher ist eine Blaufärbung zu beobachten. Die Inkubation wird mithilfe von 30 μ l 1M Schwefelsäure/Well gestoppt, wobei die Platte zum Mischen ca. 1 Minute lang angetippt wird. Die Messung der Proliferation erfolgt bei 450nm am ELISA-Reader mit einem Referenzfilter von 690nm.

2.3 Durchflusszytometrie

2.3.1 AnnexinV – FITC/PI – Assay

Während der Apoptose kommt es zu charakteristischen morphologischen Veränderungen der Zelle. Diese beginnen mit dem Verlust der für vitale Zellen typischen Zellmembranasymmetrie, gefolgt vom Untergang der Membranintegrität, der Kondensation von Zytoplasma und Nukleus, und der internukleosomalen Spaltung der DNA. Mit Aufhebung der Membranasymmetrie in der frühen Phase der Apoptose erfolgt auch eine Translokation des Phospholipids Phosphatidylserin (PS) von der inneren zur äußeren Membranseite, welches von Makrophagenrezeptoren erkannt wird.

AnnexinV ist ein Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität für PS. Für die Beurteilung in der Durchflusszytometrie kann AnnexinV mit Fluorochromen, z.B. FITC, welches von einem Argon-Laser bei einer Wellenlänge von 488nm angeregt wird, konjugiert werden. Da Zellen, die sich in einer späteren Phase der Apoptose oder Nekrose befinden, ebenfalls PS exprimieren, wird zusätzlich der Farbstoff Propidium Iodid (PI) verwendet, der

2. Patienten, Material und Methoden

an die DNA binden kann, um zwischen früh- und spätapoptotischen bzw. nekrotischen Zellen unterscheiden zu können. Ist der Asymmetrieverlust bereits erfolgt, die Membranintegrität jedoch noch erhalten, sind die Zellen PI negativ und FITC Annexin V positiv. Mit fortschreitendem Zelluntergang werden die Zellen PI positiv und Annexin positiv. Vitale Zellen sind sowohl Annexin, als auch PI negativ (Abbildung 2-3).

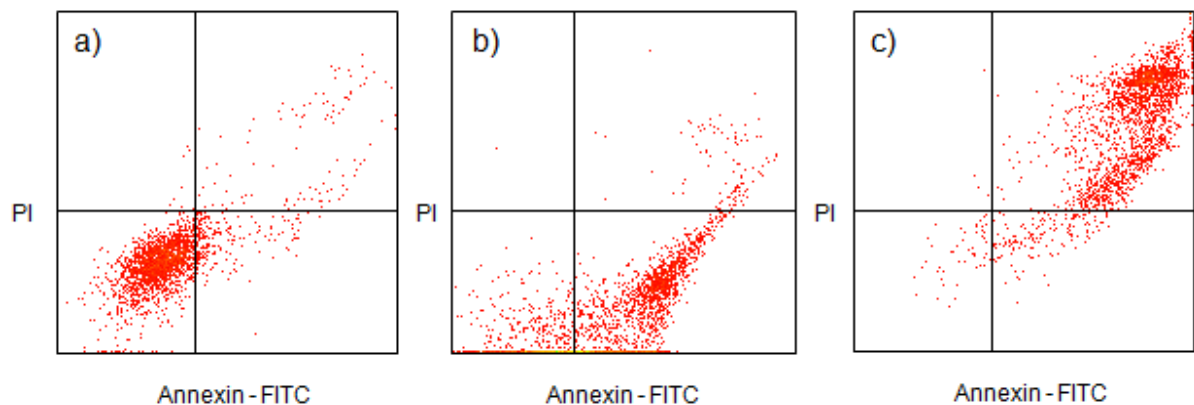


Abbildung 2-3: Durchflusszytometrische Bestimmung von gesunden Zellen (links), Zellen in der frühen Apoptosephase (Mitte) und in der späten Apoptosephase (rechts)

Bei dieser Methode werden in einem 4-fach Ansatz jeweils 2ml, in denen ca. $1,2 \cdot 10^5$ Zellen/ml enthalten sind, mit ansteigenden Konzentrationen der zu testenden Substanz in einem 24er Wellplatte für 48 Stunden inkubiert. Die Ansätze werden dann in FACS-Tubes überführt, die enthaltenen Zellen mit 1800rpm bei 4°C für 8 Minuten abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Danach werden die Zellen mit 1ml eisgekühltem PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wird wieder verworfen und die Zellen mit $100\mu\text{l}$ Binding Buffer versetzt, gefolgt von $5\mu\text{l}$ Annexin. Der Binding Buffer besteht aus 10mM Hapes/NaOH, pH 7,4; 140mM NaCl und 2,5 mM CaCl_2 und wird vor Versuchsbeginn im Verhältnis 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Während der 15 Minuten dauernden Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wird die PI-Lösung vorbereitet, indem eine ausreichende Menge 20fach mit PBS verdünnt wird. Pro FACS-Tube werden jeweils $10\mu\text{l}$ der hergestellten PI-Lösung benötigt.

Nach Zugabe von weiteren 400µl Binding Buffer erfolgt die Analyse am Durchflusszytometer, wobei die Kanäle FL1 (Annexin V-FITC) und FL3 (Propidiumiodid) am Epics Coulter XL Durchflusszytometer verwendet werden.

2.3.2 Zellzyklusanalyse und Bestimmung der SubG1 – Fraktion

Der Zellzyklus reguliert den Ablauf zwischen Zellteilungen und dient einer identischen Verdopplung der genetischen Information einer Zelle, sowie der Verteilung dieser Information auf zwei Tochterzellen. Er besteht aus 4 Phasen: G1-Phase (Wachstum), S-Phase (DNA-Replikation), G2-Phase (zur Vorbereitung der Mitose) und M-Phase (Mitose). Nach Abschluss der Mitose können einige Zellen in einen Ruhezustand eintreten (G0-Phase). Eine Fehlregulation dieses Ablaufes führt möglicherweise zur Entartung von Zellen oder (im günstigeren Fall) zum Zelltod. Um dies zu vermeiden, befinden sich im Zellzyklus an verschiedenen Orten Restriktionspunkte: in der späten G1-Phase, am Ende der G2-Phase und in der Metaphase. Je nach Position des Restriktionspunktes werden bestimmte Entscheidungen über das weitere Schicksal der Zelle gefällt: in der G1-Phase wird geprüft, ob alle Voraussetzungen (beispielsweise Größe, Ernährungsbedingungen, Wachstumsfaktoren, antimitogene Signale) vorhanden sind, dass sich die Zelle überhaupt teilen kann bzw. soll. In der G2-Phase stehen Umweltbedingungen und die vollständige DNA-Replikation im Vordergrund. Der Restriktionspunkt in der Metaphase überprüft die sachgerechte Anheftung aller Chromosomen an die Mikrotubuli des Spindelapparates vor der Verteilung auf beide Zellhälften. Außerdem sorgen zusätzliche DNA-Schadens-Kontrollpunkte für eine Reparatur möglicher Schäden der DNA (RASSOW ET AL., 2006).

Mithilfe der Zellzyklusanalyse soll überprüft werden, ob durch CR2408 der Zellzyklus der Myelomzellen an den beschriebenen Kontrollpunkten arretiert werden kann.

Anhand von charakteristischen Veränderungen der Zell- und Membranmorphologie kann Apoptose gemessen werden (siehe 2.3.1). Während der Apoptose kommt es auch zur schrittweisen Verminderung des DNA-Gehaltes der Zelle durch Kondensation von Nukleus und Zytoplasma, Zerlegung der DNA in definierte Stücke von durchschnittlich 200 bp durch Endonukleasen und anschließende Fragmentation der Zelle in Membranvesikel (Apoptosekörper), welche von Makrophagen phagozytiert werden (KERR ET AL., 1972, RASSOW ET AL., 2006). Die Quantifizierung des DNA-Gehaltes, mithilfe der Anfärbung mit

Propidiumiodid, erlaubt eine Detektion von Zellen, die eine verminderte Menge an DNA enthalten, sich also in der SubG1-Phase befinden.

Die MM Zellen werden in einem 4-fach Ansatz, mit 4ml x ca. $1,2 \cdot 10^5$ Zellen/ml, in 6er Wellplatten für 48 Stunden mit aufsteigenden Konzentrationen der Substanz versetzt. Die Ansätze werden in FACS-Tubes überführt und die Zellen für 6 Minuten bei 4°C und 1500rpm zentrifugiert, der Überstand danach verworfen. Anschließend werden die Zellen in 1ml 70prozentigem eisgekühlten Ethanol fixiert und für 1 Stunde bei -20°C inkubiert. Nach der Fixierung werden die Zellen noch zweimal abzentrifugiert und mit eiskaltem PBS gewaschen. Es folgt eine Zugabe von 40µl PI (1mg/ml) zum Anfärben der DNA. Anschließend werden 25µl RNase A – Lösung zugegeben, um die RNA zu eliminieren und zu verhindern, dass diese ebenfalls von PI angefärbt werden könnte. Nun werden die Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wird der Ansatz durch Gaze in frische Tubes pipettiert, um die Verklumpung von Zellen zu reduzieren, und bis zur Messung am Durchflusszytometer auf Eis gestellt.

2.4 Western Blotting

Der Westernblot ist eine Methode zur Darstellung von Proteinen. Dabei werden die behandelten Zellen lysiert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf einen geeigneten Träger übertragen („Blotting“). Monoklonale Antikörper dienen mittels Chemolumineszenz der Identifikation einzelner Proteine.

2.4.1 Zellyse

$40-60 \cdot 10^5$ Zellen/ml werden in einem 30ml Ansatz in 75cm^3 Flaschen mit zunehmenden Konzentrationen oder mit der gleichen Konzentration für ansteigende Zeitspannen inkubiert. Es folgt eine Überführung der Ansätze in 50ml Flacons und Abzentrifugation der Zellen mit 2000rpm für 8 Minuten bei 8°C, ein Waschschriff mit 3-4ml eiskaltem PBS und eine erneute Zentrifugation für 6 Minuten bei 1500rpm und 8°C. Der Überstand wird dekantiert und die Zellen erneut, nach Zugabe von 1ml PBS und Überführung in 1,5ml Eppendorfgefäße, für 6 Minuten bei 4°C und 2500rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird diesmal genau mittels Pipette abgehoben.

2. Patienten, Material und Methoden

Nun erfolgt eine Zugabe von 100µl Lysepuffer zur Zellyse bei 30-minütiger Inkubation der Eppendorfgefäße auf Eis.

Lysepuffer für 10ml:

Aqua dest. 8.18ml, Tris (1M, pH 7.6) 250µl, NaF (1M) 100µl, EDTA (0.5M) 200µl, Aprotinin (2.1mg/ml) 50µl, Leupeptin (5mg/ml) 20µl, PMSF (100mM) 100µl, Na₃VO₄ (100mM) 100µl

Am Ende der Inkubation werden die Zellen mit 10µl 10% verdünntem NP40 versetzt, um die Zytoplasmamembran weiter aufzulösen. Der Ansatz wird für 15 Minuten geschwenkt und anschließend bei 13.000rpm und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Die Überstände werden in frische 1,5ml Eppendorfgefäße überführt und der Proteingehalt mittels Photometrie im Bradford-Test gegen einen Nullwert bestimmt. Für die Bestimmung des Proteingehaltes werden zu 2µl Proteinlösung 800µl aqua dest und 200µl eines Jod-Färbeagens (Bio-Rad®) zugegeben. Nach 5 Minuten erfolgt die Messung bei 595nm anhand einer Standardkurve am Eppendorf BioPhotometer.

2.4.2 Gelelektrophorese

Die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben unterscheiden sich, daher werden sie durch Zugabe von Lysepuffer einander angeglichen. Vorbereitet werden insgesamt 100µl je Ansatz, bestehend aus: jeweils 50µl Proteinlösung (Protein und Lysepuffer) und 50µl Loading Buffer. Der Ansatz wird für 5 Minuten bei 95°C erhitzt und im Anschluss mit 6000 U/min für 2 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Es folgt die Beladung von je 10µl des Ansatzes und 7µl des Markers (Kaleidoscope-precision plus protein standard-Biorad) auf vorbereitete Taschen im Trenngel. Je nach Größe der gesuchten Proteine wird ein 12- oder 15prozentiges Trenngel vorbereitet.

Trenngel (für 4 Gele:)

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

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

Die Gelplatten werden zu 75 Prozent mit der jeweiligen Gellösung gefüllt und mit Isopropanol überschichtet, sodass ein glatter Abschluss entsteht. Die Polymerisation benötigt ca. 30 Minuten, danach wird das Isopropanol abgekippt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen.

Sammelgel (für 4 Gele):

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

Nachdem das Sammelgel gegossen wurde, können Kämme als „Taschenschablone“ eingefügt werden. Erneut folgt eine Polymerisation für 30 Minuten. Anschließend werden die Gele in mit Elektrophoresepuffer gefüllte Behälter gestellt, die Kämme entfernt, die Taschen gespült und mit jeweils 10µl der Proteinlösung bzw. 7µl des Markers beladen. Anfänglich wird die Elektrophorese bei 80V gestartet, nach Erreichen des Trenngels kann die angelegte Spannung auf 100-150V erhöht werden.

2.4.3 Transferblot

Für den Transferblot werden pro Elektrophorese-Gel vier PVDF-Membranen und acht Filterpapiere zurechtgeschnitten. Die Membranen werden für 15 Sekunden in 100% Methanol, zwei Minuten in Wasser und zusammen mit den Schwämmen und Filterpapieren für zwei Minuten in Transferpuffer geschwenkt. Sobald anhand des Markers die komplette Aufteilung der Proteine festgestellt wird, kann die Elektrophorese gestoppt werden. Im Anschluss wird das Trenngel vom Sammelgel befreit, luftblasenfrei auf die PVDF-Membranen zwischen Filterpapier und Schwämmen angebracht und in mit Transferpuffer gefüllte Behälter gefüllt. Der Transfer erfolgt über Nacht bei 24V im Kühlraum.

2.4.4 Proteinnachweis

Der Proteinnachweis erfolgt mithilfe von zwei aneinander gekoppelten Schritten: ein Primärantikörper bindet an das Protein auf der Membran. An diesen bindet wiederum ein mit einer Peroxidase konjugierter Sekundärantikörper, welcher sich mittels Chemolumineszenz nachweisen lässt. Nach dem Transferblot werden die Membranen für 30 Minuten luftgetrocknet und anschließend mit jeweils 15ml einer Magermilchpulverlösung (M-TBS-T) für 1 Stunde bei 40 Mot1/min auf einem Schüttler inkubiert. Unspezifische Bindungen der Antikörper werden so verhindert. Es folgen vier Waschschrte bei 70 Mot1/min für jeweils acht Minuten und eine Verdünnung der primären Antikörper im Verhältnis 1:1000 mit TBST-Puffer. Es werden jeweils 10ml des Antikörpers auf die Membranen gegeben. Je nach Anweisung des Herstellers der Antikörper erfolgt die Inkubation über Nacht bei 40 Mot1/min im Kühlraum oder für drei bis vier Stunden bei Raumtemperatur. Danach werden die Membranen viermal mit TBS-T-Puffer bei 70Mot1/min gewaschen, um so die nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Auch der sekundäre Antikörper wird verdünnt, diesmal im Verhältnis 1:2000 mit M-TBS-T-Puffer. Wieder werden jeweils 10ml des Antikörpers hinzugegeben. Nach Inkubation über eine Stunde bei 40 Mot1/min werden die Membranen erneut viermal mit TBS-T-Puffer bei 70 Mot1/min gewaschen und im Anschluss 5ml der ECL-Lösung pro Membran hinzupipettiert. Die Chemolumineszenz der Banden kann jetzt nach unterschiedlichen Expositionszeiten auf Röntgenfilm festgehalten werden.

2.4.5 Membran-Stripping

Die hergestellten Membranen können noch ein- bis zweimal für den Nachweis anderer Proteine (gilt nur für nicht phosphorylierte Proteine) wiederverwendet werden. Vorher werden sie von den Antikörpern befreit. Dazu wird eine Mischung aus 100ml Stripping-Lösung und 960µl Mercaptoethanol verwendet, welche für 30 Minuten bei 50°C im Wasserbad geschwenkt wird. Im Anschluss erfolgen vier Waschschrte bei 70 Mot1/min für jeweils 8 Minuten. Der Proteinnachweis wird erneut wie oben beschrieben (Kapitel 2.4.4) durchgeführt.

2.4.6 Pufferlösungen

Lysepuffer (für 10ml)

Aqua dest. 8.18ml, Tris (1M, pH 7.6) 250µl, NaF (1M) 100µl, EDTA (0.5M) 200µl, Aprotinin (2.1mg/ml) 50µl, Leupeptin (5mg/ml) 20µl, PMSF (100mM) 100µl, Na₃VO₄ (100mM) 100µl

Elektrophoresepuffer (10x, pH 8.3)

Tris 151.4g, Glycin 720.65g, Natriumdodecylsulfat 50g, auf 5 l gereinigtes Wasser, pH 8.3 mit HCl einzustellen

Transfer-Puffer

Tris 30.28g, Glycin 144.13g, Methanol 1580ml, auf 10l gereinigtes Wasser

TBS (10x, pH 7.6)

Tris 121g, Natriumchlorid 400g, auf 5l gereinigtes Wasser, pH 7.6 mit HCl einzustellen

TBS-T-Puffer

100ml TBS, 900ml Aqua dest., 500µl Tween20

M-TBS-T

10g Magermilchpulver, 200ml TBS-T-Puffer

Solution A

200ml 0.1M TRIS-HCl (pH 8.6), 0.05g Luminol Sodium Salt

Solution B

0.011g para-Hydroxycoumarinsäure gelöst in 10ml DMSO

ECL-Lösung

10ml Solution A, 3µl H₂O₂, 1 ml Solution B

Stripping-Lösung

7.56g Tris, 20g SDS, pH 6.7, vor der Anwendung: Zugabe von β-Mercaptoethanol

2.5 Statistik

Die Abbildungen zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen von repräsentativen Experimenten. Die deskriptive Statistik wurde mittels Excel ausgewertet. Zum Vergleich verschiedener Gruppen wurde der Wilcoxon Test (SPSS 17.0 für Windows®) verwendet, wobei p-Werte < 0.05 als statistisch signifikant angesehen wurden.

Die Analyse eines möglichen Synergismus von CR2408 mit anderen Substanzgruppen erfolgte mittels Calcosyn Software® (Biosoft, Cambridge, UK). Zu diesem Zweck wurde eine Isobologram Analyse durchgeführt: ein Kombinations-Index (CI) kleiner 0,9 lässt auf einen synergistischen Effekt schließen, während Werte zwischen 0,9 und 1,1 auf additive Effekte hinweisen.

3 Ergebnisse

3.1 Hemmung der Deacetylierung

Um zu zeigen, dass CR2408 Histon-Deacetylasen inhibiert und so das Gleichgewicht aus Acetylasen und Deacetylasen stört, wurden für einen Western Blot je 30ml mit $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml der Zelllinie OPM-2 über einen Zeitverlauf von 12h, 24h und 36h mit $1 \mu\text{M}$ CR2408 inkubiert und nach 36h auf die Expression von Anti-Acetylhiston-4 im Vergleich zur Kontrolle untersucht. Dabei zeigte sich zeitabhängig eine vermehrte Acetylierung von Histon4 (Abbildung 3-1).

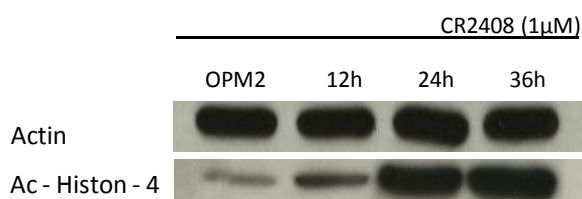


Abbildung 3-1: CR2408 induziert eine vermehrte Acetylierung von Histon4 in der Myelomzelllinie OPM-2.

3.2 Reduktion der Anzahl metabolisch aktiver Zellen

Zur Erueierung des Effektes von CR2408 auf das Zellwachstum wurde die Anzahl metabolisch aktiver Zellen der Myelomzelllinien NCI-H929, OPM-2, RPMI-8226 und U266 nach Zugabe von CR2408 im Zeitverlauf untersucht. Dazu wurden $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml der Zelllinien mit ansteigenden Konzentrationen von CR2408 für je 48 und 96h inkubiert. Anschließend konnte im WST-1 – Assay die Anzahl metabolisch aktiver Zellen bestimmt werden. Die Auswertung zeigte, dass die Zellviabilität bereits bei einer Inkubation mit 500nM bei allen Zelllinien fast komplett inhibiert wurde. Der IC50 war zwischen 100nM und 250nM für alle Zelllinien, wobei sich bei NCI-H929 die stärkste Inhibition zeigte. Abbildung 3-2 zeigt den Verlauf des Zellwachstums über 96 Stunden.

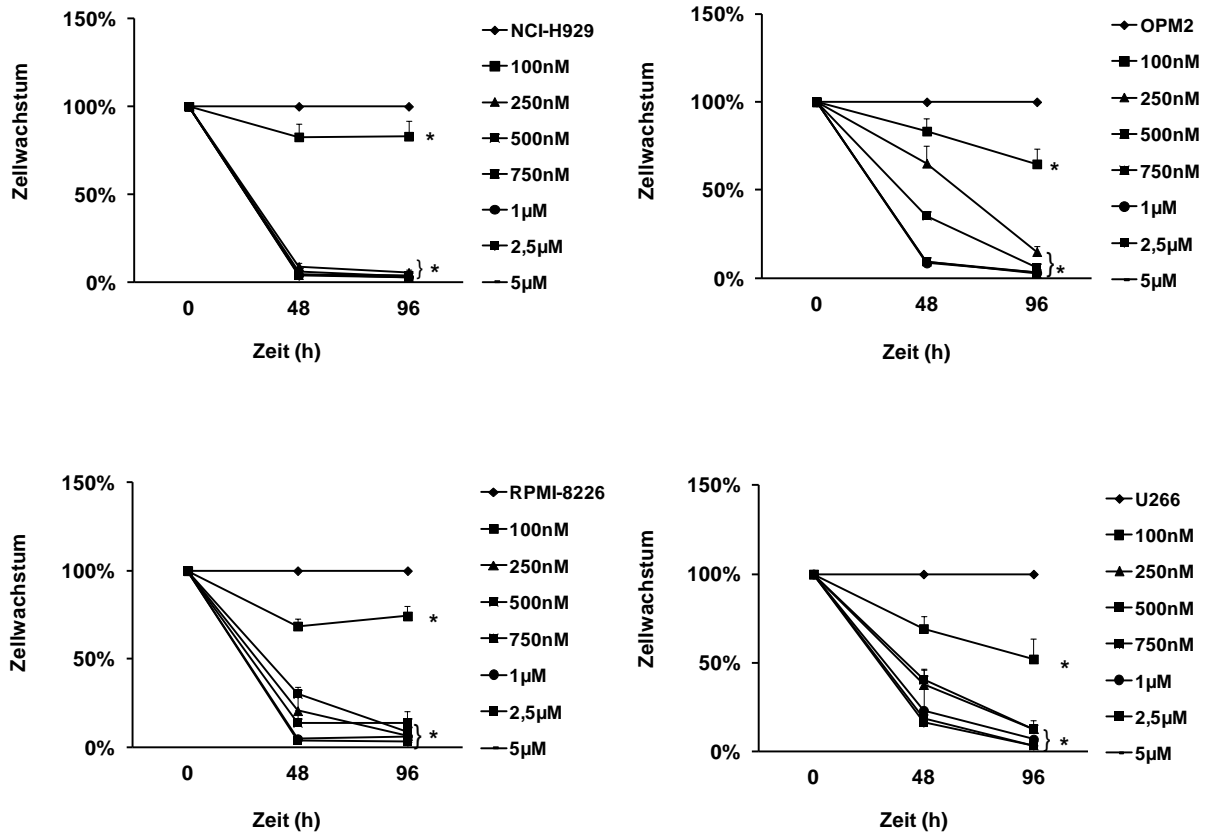


Abbildung 3-2: CR2408 inhibiert das Zellwachstum der Myelomzelllinien NCI-H929 (oben links), OPM-2 (oben rechts), RPMI-8226 (unten links) und U266 (unten rechts). * $p < 0.05$ versus Kontrolle.

3.3 Apoptoseinduktion

3.3.1 Apoptose bei Myelomzelllinien

Anhand des WST-1-Assays (siehe Kapitel 3.2) wurde demonstriert, dass das Zellwachstum der Myelomzelllinien durch CR2408 gehemmt wird. Um herauszufinden, ob dieses verminderte Zellwachstum durch Apoptoseinduktion zustande kam, wurden $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml der Myelomzelllinien NCI-H929, OPM-2, RPMI-8226 und U266 mit ansteigenden Konzentrationen von CR2408 für je 48h inkubiert. Die Auswertung erfolgte nach Behandlung mit Propidium Iodid und FITC AnnexinV am Durchflusszytometer, wobei eine starke

3. Ergebnisse

Induktion von Apoptose in allen Zelllinien bereits bei geringen Konzentrationen von CR2408 auftrat. Nach Inkubation mit 750nM waren 80% der NCI-H929, 75% der OPM-2, 82% der RPMI-8226 und 24% der U266 Myelomzelllinien AnnexinV – FITC positiv. Abbildung 3-3 zeigt den Anstieg von sich in früher und später Apoptose befindlichen Zelllinien nach Inkubation über 48h.

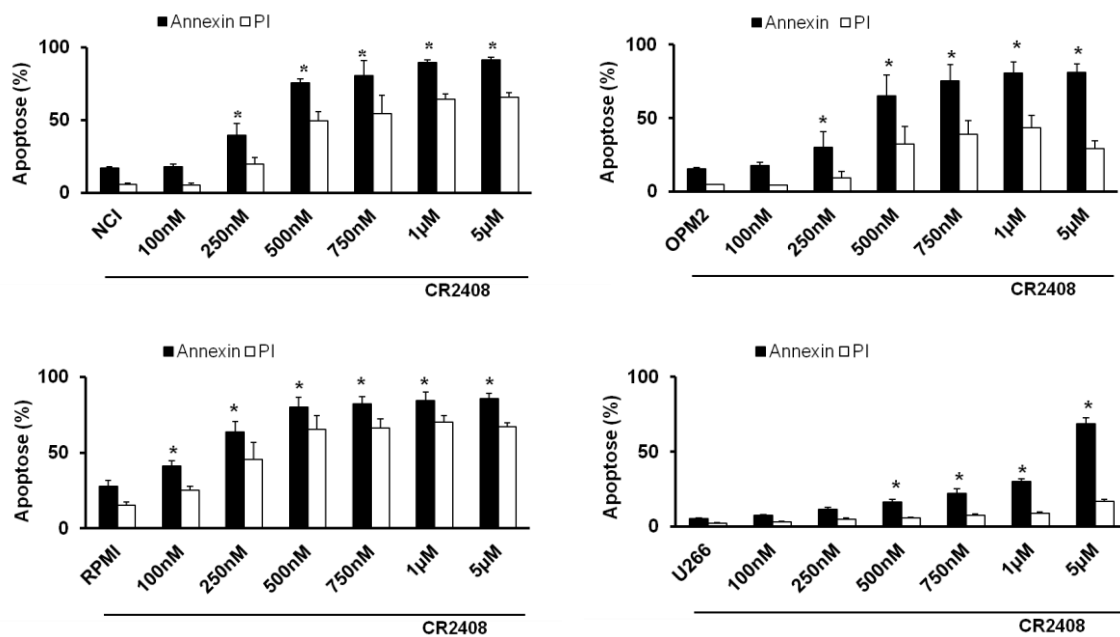


Abbildung 3-3: CR2408 induziert Apoptose in den Myelomzelllinien NCI-H929 (oben links), OPM-2 (oben rechts), RPMI-8226 (unten links) und U266 (unten rechts). * $p < 0.05$ versus Kontrolle.

3.3.2 Apoptose bei primären Myelomzellen

Zusätzlich zu den Myelomzelllinien wurden Knochenmarksaspirate von fünf am Multiplen Myelom erkrankten Patienten getestet. Mit je $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml pro Ansatz wurden die durch Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnenen Myelomzellen mit aufsteigenden Konzentrationen von CR2408 für 48h inkubiert, mit AnnexinV – FITC und Propidium Iodid behandelt und am Durchflusszytometer ausgewertet. Bei einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ wurde bis zu 70% Apoptose erreicht. In Abbildung 3-4 ist der Anstieg von sich in früher und später Apoptose befindlichen primären Myelomzellen nach Inkubation über 48h dargestellt.

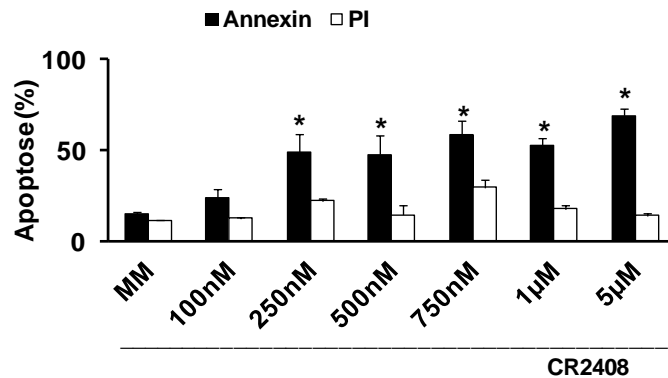


Abbildung 3-4: CR2408 induziert Apoptose in primären Myelomzellen. * $p < 0.05$ versus Kontrolle.

3.3.3 Apoptose bei mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Bei der ausgeprägten Toxizität von CR2408 auf Myelomzellen besteht die Möglichkeit, dass es sich um einen generellen und unspezifischen Effekt handelt. Daher wurden als Kontrolle mononukleäre Zellen des peripheren Blutes untersucht. Nach 48h Inkubation mit CR2408 in aufsteigender Konzentration bei je $2 \cdot 10^5$ Zellen/ml pro Ansatz von PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) zweier Probanden wurde lediglich ein Anstieg von +11% AnnexinV – FITC positiven Zellen bei 500nM oder höheren Konzentrationen festgestellt. So konnte gezeigt werden, dass CR2408 nur in geringem Ausmaß Apoptose bei mononukleären Zellen gesunder Probanden induziert (Abbildung 3-5).

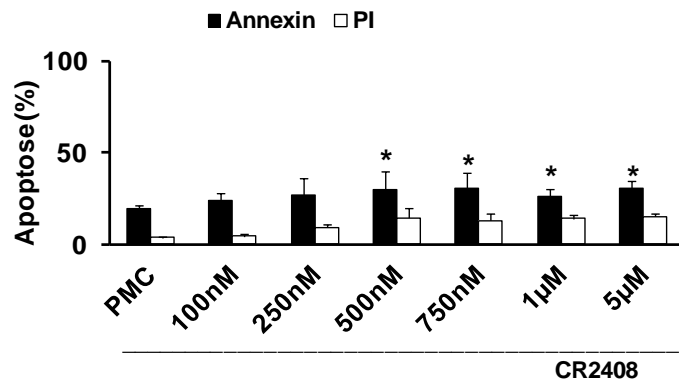


Abbildung 3-5: CR2408 induziert in geringem Maße Apoptose bei mononukleären Zellen (PMCs) gesunder Probanden. * $p < 0.05$ versus Kontrolle.

3.3.4 Caspasenaktivierung

KITAZOE ET AL. (2008) fanden heraus, dass Valproat in der Myelomzelllinie RPMI-2886 Apoptose Caspasen-abhängig und Caspasen-unabhängig induziert. DELEU ET AL. (2009) zeigten eine Caspasenaktivierung durch JNJ-26481585 in den Zelllinien 5T33MMvt und STR-10. Die Versuche 3.3.1 und 3.3.2 zeigen bereits, dass auch CR2408 Apoptose induziert. Um zu überprüfen, ob diese Apoptoseinduktion ebenfalls Caspasen-abhängig ist, wurden Western Blots an ca. 30ml mit $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml NCI-H929 und OPM-2 Zelllinien mit jeweils 100nM, 500nM und 1µM für 28h bzw. 36h durchgeführt und auf die Caspasen 3, 8 und 9 untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Auftreten aller drei Caspasen reduziert und ihre Spaltprodukte deutlich sichtbar wurden (Abbildung 3-6).

3. Ergebnisse

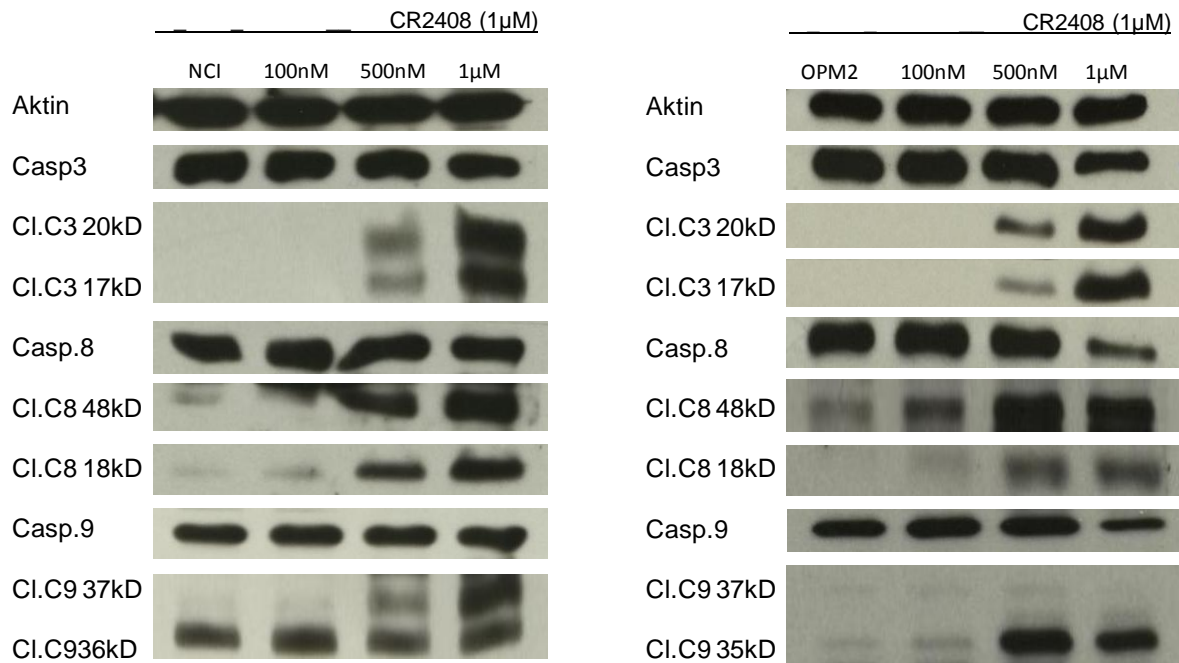


Abbildung 3-6: CR2408 aktiviert Caspasen in den Myelomzelllinien NCI (links) und OPM2 (rechts).

3.4 CR2408 hemmt die Proliferation von Myelomzelllinien

In vitro Versuche mit dem (H)DAC-Inhibitor Resminostat ließen eine deutliche Hemmung der Proliferation von Myelomzelllinien erkennen (MANDL-WEBER ET AL., 2010). Die vorliegende Arbeit zeigte im WST-1 – Assay (Kapitel 3.2), dass CR2408 das Wachstum von Myelomzelllinien vermindert. Daher sollte in diesem Versuch überprüft werden, ob das inhibierte Zellwachstum allein durch Induktion von Apoptose (Kapitel 3.3) oder auch zusätzlich durch eine Hemmung der Proliferation, wie bei z.B. Resminostat, verursacht wird. Zu diesem Zweck wurde an den Zelllinien OPM-2, RPMI-8226 und U266 der BrdU-Einbau in die DNA während der Mitose getestet. $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml pro Ansatz wurden mit CR2408 in aufsteigender Konzentration für 48h inkubiert. Über Nacht wurde BrdU hinzugegeben und am nächsten Tag die Proliferation der Zellen mittels BrdU – Assay gemessen. Die Auswertung (Abbildung 3-7) zeigte bereits eine signifikante Proliferationshemmung ab 100nM in der Zelllinie U266, ab 500nM in RPMI-8226 und 750nM in OPM-2.

3. Ergebnisse

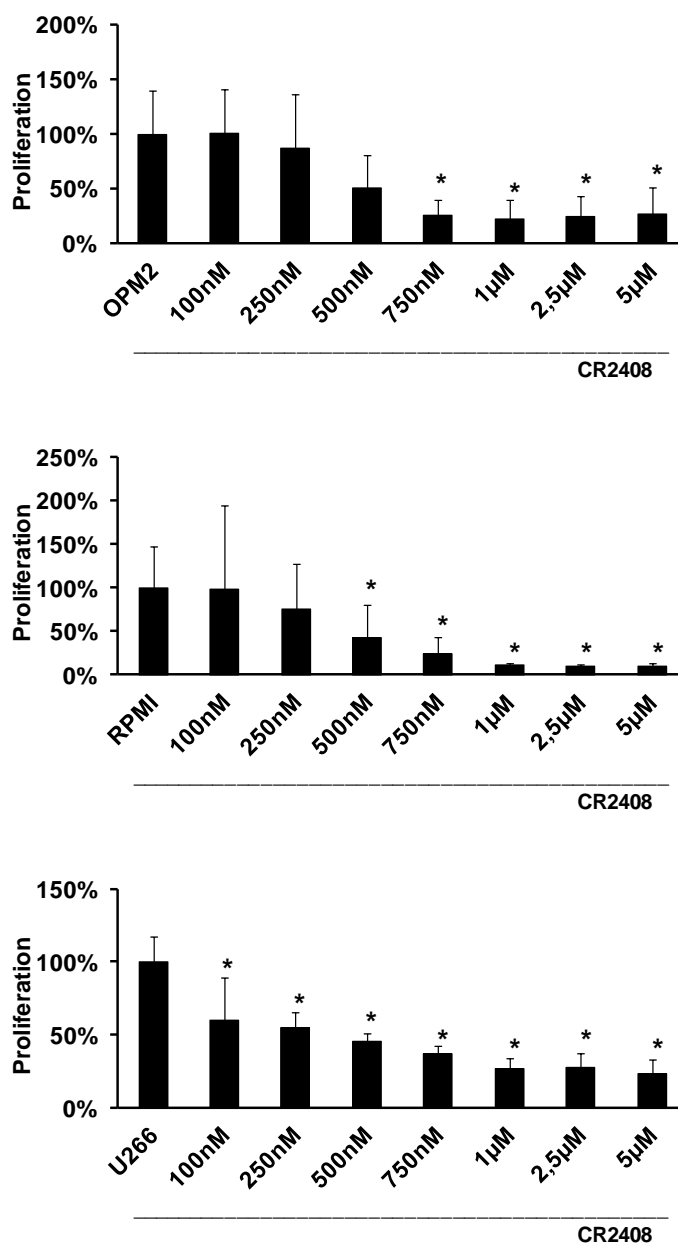


Abbildung 3-7: CR2408 hemmt die Proliferation der Myelomzelllinien OPM-2 (oben), RPMI-8226(Mitte) und U266 (unten). * $p < 0.05$ versus Kontrolle.

3.5 Zellzyklusarrest

Die Behandlung mit dem (H)DAC-Inhibitor Valproat erzeugte in Mausversuchen einen Anstieg der sich in der G1-Phase befindenden Zellen und eine Verminderung von der sich in der G2/M- und S-Phase befindlichen Zellen, was auf eine Modellierung bzw. Arretierung des Zellzyklus von Myelomzellen *in vivo* schließen lässt (NERI ET AL., 2008). Dies führte zu der Fragestellung, ob und an welchem (Kontroll-)Punkt des Zellzyklus eine mögliche Arretierung durch CR2408 stattfindet.

Für diesen Versuch wurden $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml der Zelllinien NCI-H929, OPM-2, RPMI-8226 und U266 mit jeweils 750nM und 5 μ M CR2408 für 48h inkubiert. Daraufhin wurde durch Propidiumiodid die DNA der Myelomzellen angefärbt und im Durchflusszytometer quantifiziert. Hierbei ließ sich mit steigender Konzentration von CR2408 die größte Veränderung in Form einer zunehmenden Akkumulation von Zellfragmenten in der SubG1Phase feststellen (Abbildung 3-8). Der Anteil der Zellen, welcher in dieser Phase detektiert werden konnte, erhöhte sich von 23% auf 65%, 3% auf 24%, 5% auf 35% und 2% auf 17% bei jeweils NCI-H929, OPM-2, RPMI-8226 und U266. Desweiteren verringerte sich der Anteil der sich in der Synthesephase befindenden Zellen von 31% auf 15%, 32% auf 10%, 32% auf 18% und 21% auf 12% bei jeweils NCI-H929, OPM-2, RPMI-8226 und U266. Die Verteilung in den anderen Phasen des Zellzyklus blieb weitestgehend konstant. Dies lässt darauf schließen, dass bei CR2408 vor allem eine Induktion von Apoptose im Vordergrund steht.

3. Ergebnisse

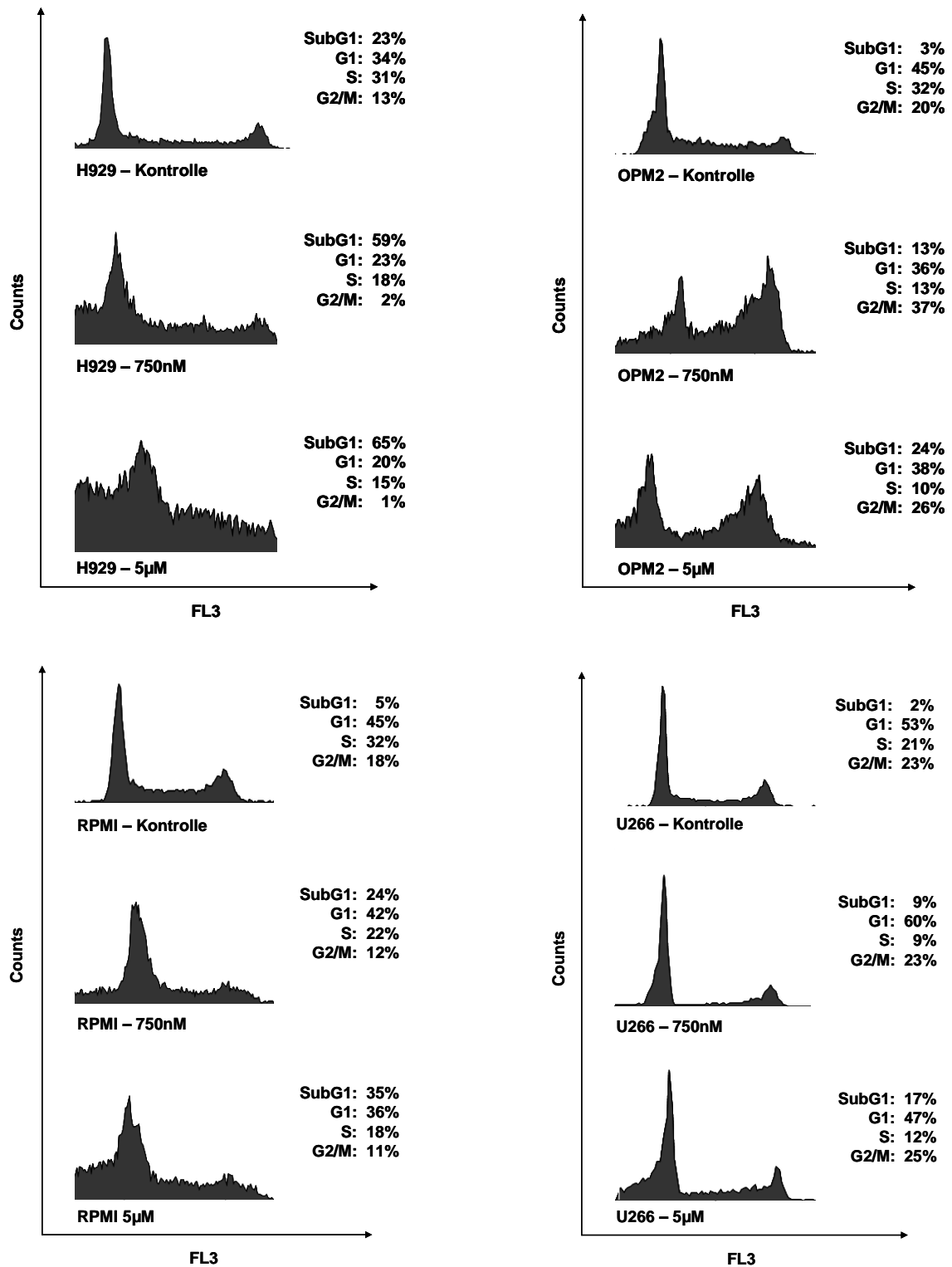


Abbildung 3-8: CR2408 induziert einen Zellzyklusarrest(Apoptose) in den Myelomzelllinien NCI-H929 (oben links), OPM-2 (oben rechts), RPMI-8226 (unten links) und U266 (unten rechts).

3.6 CR2408 hemmt Cycline, Cdks und die Phosphorylierung von Rb

Cycline spielen durch die Aktivierung von Cdks (Cyclin-abhängigen Kinasen) eine wichtige Rolle in der Förderung von Zellzyklusübergängen. Cdk2 verbindet sich mit den Cyclinen A, D und E und kontrolliert den G1-/S-Phase-Übergang. p21 ist ein potenter Cdk2-Inhibitor und kann die Phosphorylierung (und damit die Inaktivierung) des Tumorsuppressorgens Rb durch Cyclin-Cdk-Komplexe unterbinden (Santa-Cruz Biotechnology: p21 (C-19): sc-397). Das Onkogen Cdc25a fördert die Überleitung der G1- zur S-Phase, sowie eine verfrühte Aktivierung von Cyclin E-Cdk2 und Cyclin A-Cdk2. Cdc25c begünstigt den Übergang der G2- zur M-Phase (BLOMBERG ET AL., 1999).

Verschiedene Deacetylase-Inhibitoren supprimieren die Expression von Cdc25a (MANDL-WEBER ET AL., 2010, MITSIADES ET AL., 2004, MAISO ET AL., 2006), verschiedener Cycline, insbesondere Cyclin D (MANDL-WEBER ET AL., 2010, MITSIADES ET AL., 2004, NERI ET AL., 2008), Cdks, u.a. Cdk4 (MANDL-WEBER ET AL., 2010, MITSIADES ET AL., 2004) und pRb (MANDL-WEBER ET AL., 2010). Desweiteren konnte eine Induktion von p21 (MANDL-WEBER ET AL., 2010, MITSIADES ET AL., 2004, FENG ET AL., 2007, NERI ET AL., 2008) und p53 (MITSIADES ET AL., 2004) nachgewiesen werden.

In Kapitel 3.5 wurde gezeigt, dass CR2408 einen Zellzyklusarrest in der SubG1-Phase induziert. Daraufhin wurden Westernblots mit der Zelllinie OPM-2 angefertigt, um noch genauer zu untersuchen, in wie weit den Zellzyklus beeinflussende Proteine durch CR2408 supprimiert bzw. vermehrt exprimiert werden. Es zeigte sich eine verminderte Expression von Cdc25a, Rb, pRb und p21. Wie bei Resminostat war die Expression von p53 ebenfalls reduziert. Eine gering verminderte Expression konnte auch bei Cyclin D1, Cyclin E, Cdc25c, Cdk4 und Cdk6 beobachtet werden (Abbildung 3-9).

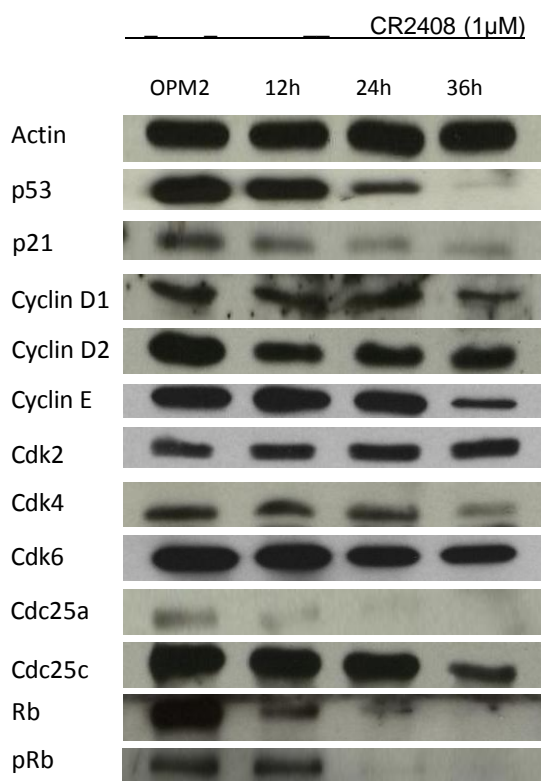


Abbildung 3-9: CR2408 hemmt Cycline, Cdks und die Phosphorylierung von Rb.

3.7 CR2408 fördert die Expression von Bim und pJNK und hemmt Bcl-XL, P70S6K, 4E-BP-1 und Akt

Die vorhergehenden Versuche haben gezeigt, dass CR2408 das Zellwachstum von Multiplen Myelomzellen inhibiert und ihre Apoptose fördert. Hier wurde der Effekt des (H)DAC-Inhibitors auf verschiedene, Apoptose-regulierende, Signalwege untersucht. OPM-2 Zellen wurden über 12h, 24h und 36h mit je 1μmol/l CR2408 inkubiert. Danach wurden sowohl die Proteine des Akt-Signalweges, als auch pro- und anti-apoptotische mitochondriale Proteine im Westernblot dargestellt (Abbildung 3-10).

Die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-XL war im Vergleich zur Kontrolle deutlich vermindert, wohingegen die Expression des proapoptotischen Proteins Bim gestiegen war. Bcl-2, Mcl-1 und Bax blieben unverändert.

3. Ergebnisse

Der (H)DAC-Inhibitor Scriptaid mindert das Überleben von Gliomzellen durch Aktivierung von JNK (Sharma ET AL., 2010). CR2408 induzierte die Phosphorylierung (und damit Aktivierung) von JNK. Außerdem kam es zu einem Abfall des Phosphorylierungszustandes von P70S6K und 4E-BP-1 und die Expression von Akt (Proteinkinase B) war deutlich vermindert. Dies legt nahe, dass CR2408 innerhalb der Signalkaskade zur Aktivierung von Akt, welches bei multiplen Myelomzellen häufig erhöht aktiviert vorliegt (HSU ET AL., 2001), inhibierend wirkt. Ältere (H)DAC-Inhibitoren wie Valproat oder Trichostatin hemmen die Signalkaskade von NfkappaB in Myeloblasten bei AML und MDS (FABRE ET AL., 2008). Deshalb wurde zusätzlich die Expression der Transkriptionsfaktoren Ikb und pIkb untersucht, jedoch ohne Veränderung im Zeitverlauf.

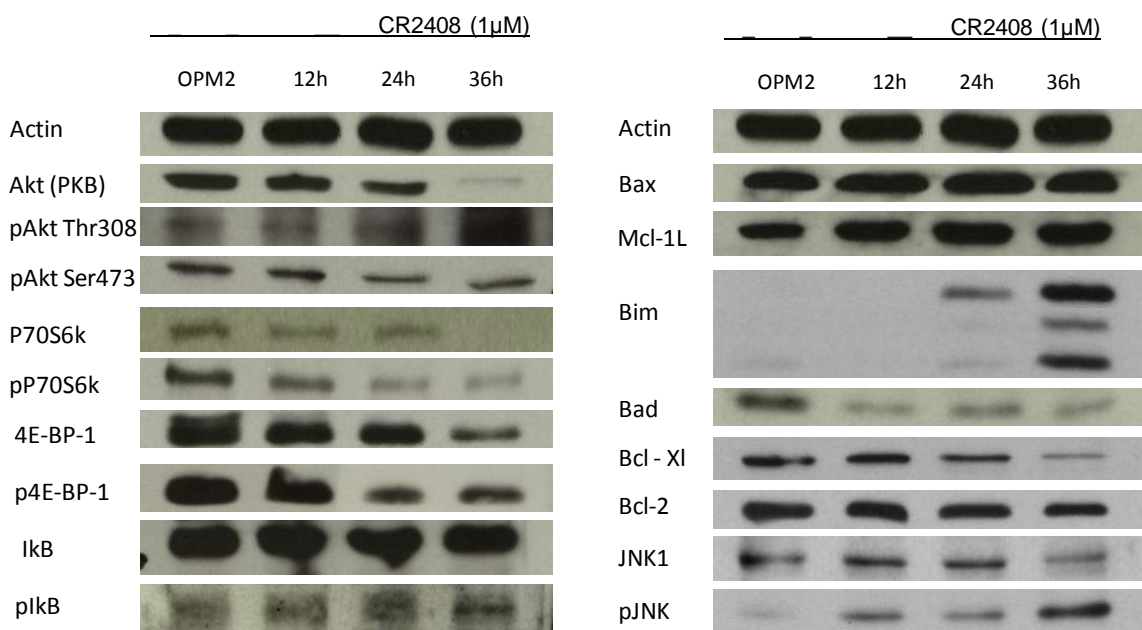


Abbildung 3-10: CR2408 fördert die Expression von Bim und pJNK und hemmt Bcl-XL, P70S6K, 4E-BP-1 und Akt.

3.8 Hemmung des zytokinabhängigen Zellwachstums

Multiple Myelomzellen werden im Microenvironment des Knochenmarks von verschiedenen Wachstumsfaktoren, wie Interleukin 6, IGF-1 und Adhäsionsfaktoren stimuliert. Um eine mögliche Inhibition des zytokinabhängigen Zellwachstums durch CR2408 zu untersuchen, wurden je $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml der Myelomzelllinien OPM2, RPMI-8226, und U266 mit jeweils 500nM CR2408, 15ng/ml IL6 und 100ng/ml IGF-1 allein, sowie jeweils IL6 und IGF-1 zusammen mit CR2408, über 48h inkubiert und das Zellwachstum durch die Zytokine bzw. die Hemmung dieses Wachstums im Vergleich zur Kontrolle mittels WST-1 gemessen. In allen Zelllinien kam es erst zu einer Zunahme der Zellviabilität (Abbildung 3-11). Bei IL-6 um 54%, 45% und 9% und bei IGF-1 um 54%, 54% und 30% in OPM2, RPMI-8226 bzw. U266 Zelllinien. Die Koinkubation mit CR2408 sorgte jedoch für einen Abfall des Zellwachstums um 85%, 41% und 31% bei IL-6 und 80%, 67% und 27% bei IGF-1, in OPM2, RPMI-8226 bzw. U266 Zelllinien.

3. Ergebnisse

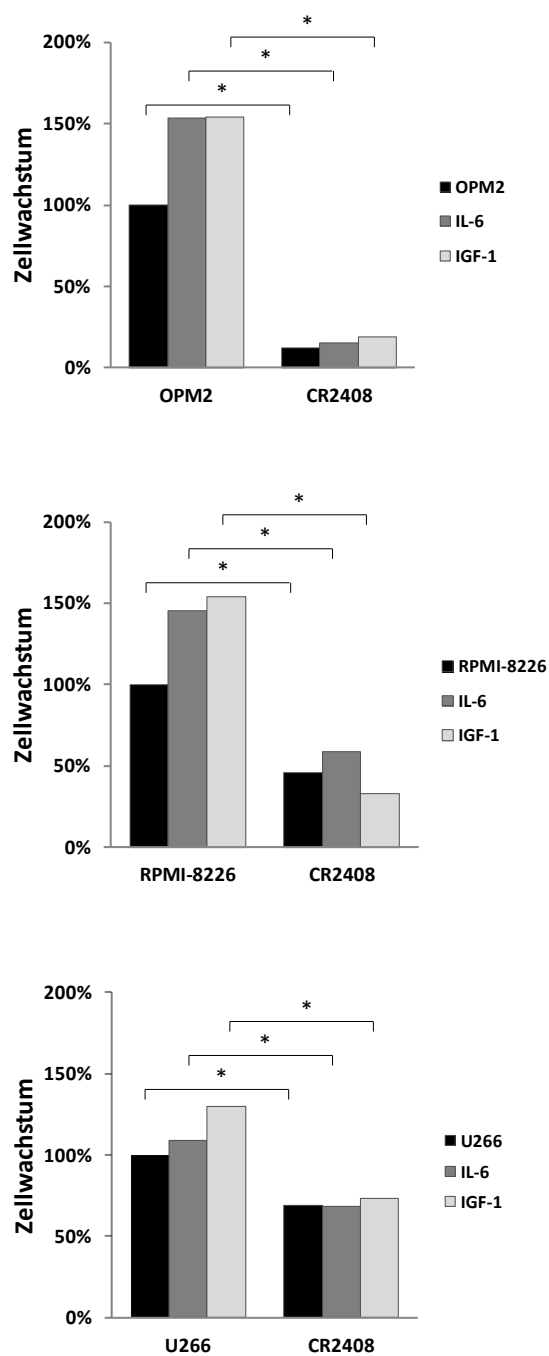


Abbildung 3-11: CR2408 hemmt das zytokinabhängige Zellwachstum in den Zelllinien OPM-2(oben), RPMI-8226(Mitte) und U266(unten). * $p < 0.05$ versus Kontrolle.

3.9 Hemmung des Knochenmarkstromamedium-induzierten Zellwachstums

Durch Zelloberflächenrezeptoren, wie z.B. Integrine oder Cadherine, werden Interaktionen zwischen Knochenmarkstroma- und Myelomzellen, bzw. ihrer extrazellulären Matrix vermittelt. Diese Interaktion führt zu vermehrtem Wachstum, Überleben und Resistenz gegen Chemotherapeutika (RAAB ET AL., 2009). Es konnte bereits demonstriert werden, dass CR2408 das durch Zytokine und andere Wachstumsfaktoren vermittelte Zellwachstum inhibiert. Um zusätzlich die Stimulation durch das Microenvironment des Knochenmarks zu rekonstruieren, wurden die Myelomzelllinien OPM2 und RPMI-8226 in HS-5 Medium, welches die Proliferation von hämatopoetischen Stammzellen unterstützt, inkubiert. Je $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml der Myelomzelllinien OPM2 und RPMI-8226 wurden dafür jeweils in 100% RPMI-1640-Medium mit FCS oder 75 Prozent RPMI-1640-Medium ohne FCS mit 25% HS-5 Medium für 48h inkubiert und mittels WST-1 – Assay ausgewertet.

Der Versuch verdeutlichte ebenfalls eine merkliche Stimulation durch die im Stromazellmedium enthaltenen Wachstumsfaktoren (Abbildung 3-12). In OPM2-Zellen stieg das Zellwachstum um 65%, RPMI-8226 zeigten einen Anstieg um 24%. Bei der Zugabe von CR2408 kam es sowohl in den mit FCS-Medium, als auch mit HS-5 Stroma inkubierten Zellen zu einem Abfall des Zellwachstums (OPM2: 2% bzw. 66%, RPMI-8226: 90% bzw. 92% nach 250nM und 750nM CR2408 in FCS Medium; OPM2: 35% bzw. 76%, RPMI-8226: 33% bzw. 75% nach 250nM und 750nM CR2408 in HS-5 Medium).

3. Ergebnisse

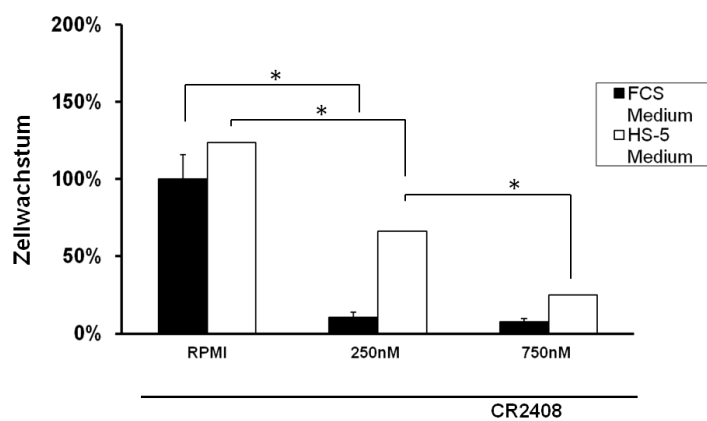
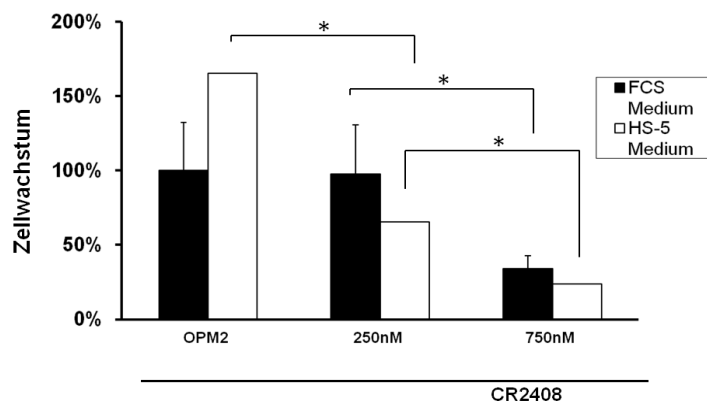


Abbildung 3-12: CR2408 hemmt das Knochenmarkstromamedium-induzierte Zellwachstum in den Zelllinien OPM-2(oben) und RPMI-8226(unten). * $P < 0.05$ versus Kontrolle.

3.10 Zusammenwirken von CR2408 mit klassischen antineoplastischen Substanzen

3.10.1 Kombination von CR2408 mit Bortezomib

Der Proteasomeninhibitor Bortezomib (Velcade) inhibiert die Proliferation von Myelomzellen, induziert ihre Apoptose und wirkt selbst in therapierefraktären Fällen (HIDESHIMA ET AL., 2001, 2003). Die Kombination von (H)DAC-Inhibitoren, wie z.B. Vorinostat, mit Bortezomib erbrachte in verschiedenen Studien eine verstärkte anti-Myelom Aktivität (BADROS ET AL., 2009, PEI XY ET AL., 2004). Die Hemmung der Osteoklastenaktivität, und damit die Knochendestruktion als Folge der Erkrankung, konnte durch Kombination von (H)DAC-Inhibitoren mit Bortezomib ebenfalls potenziert werden (FENG ET AL., 2007).

Um einen möglichen Synergismus von CR2408 mit Bortezomib zu überprüfen, wurden Zellwachstumsmessungen mit $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml der Zelllinien NCI-H929, RPMI-8226 und U266 mit jeweils 100nM und 500nM CR2408, 2nM und 4nM Bortezomib oder der Kombination aus beiden Substanzen über 48h inkubiert und das Zellwachstum mittels WST-1 – Assay bestimmt (Abbildung 3-13). Die Ermittlung von additiven, bzw. synergistischen Effekten erfolgte mit der Software Calcosyn® (Biosoft, Cambridge, UK) (Abbildung 3-14). Es zeigte sich bei der Zelllinie NCI-H929 ein synergistischer Effekt bei der Kombination einer niedrigen Konzentration von CR2408 mit einer hohen Konzentration von Bortezomib, bei RPMI-8226 jeweils bei Kombination niedriger und hoher Konzentrationen der beiden Substanzen und bei U266 ein Synergismus bei Kombination aller Varianten.

3. Ergebnisse

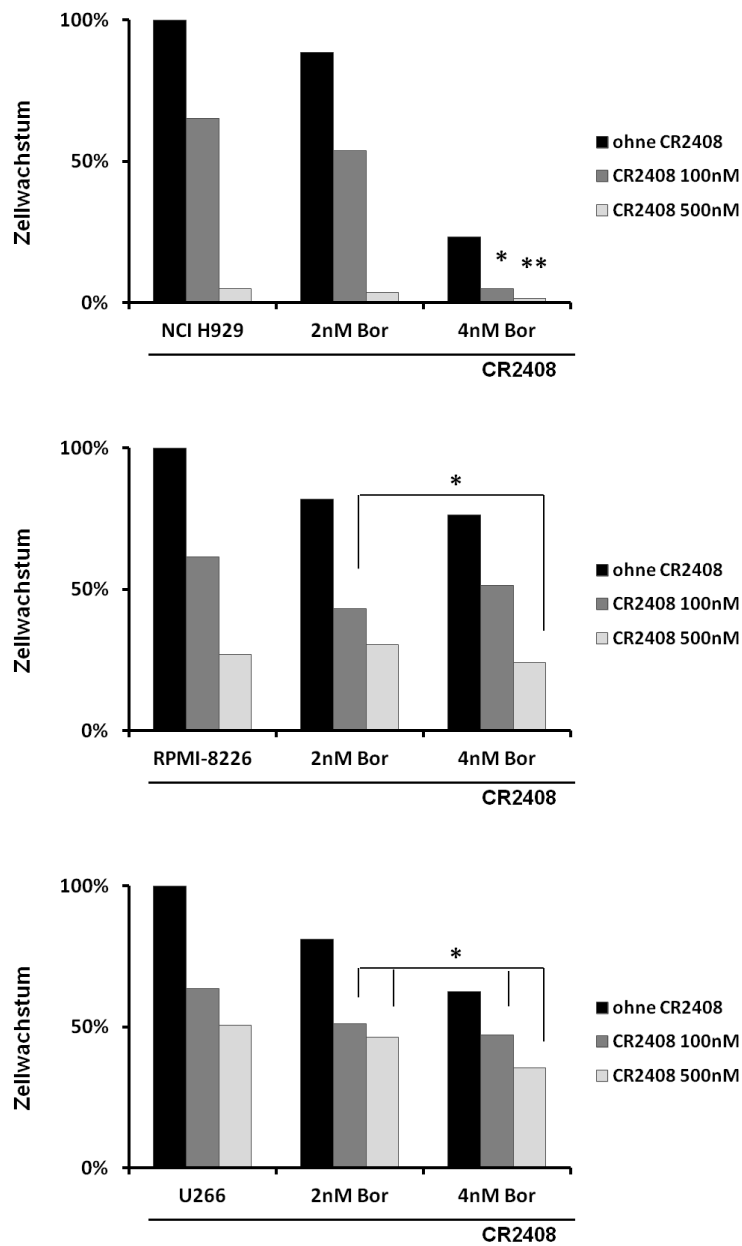


Abbildung 3-13: CR2408 wirkt synergistisch bzw. additiv mit Bortezomib bei den Zelllinien NCI-H929 (oben), RPMI-8226 (Mitte) und U266 (unten). *CI < 0,9 = synergistischer Effekt, **CI 0,9 - 1,1 = additiver Effekt.

3. Ergebnisse

NCI CR2408	Bortezomib	Fa	CI
100nM	2nM	0,53669041	1,474
100nM	4nM	0,04836839	0,880 *
500nM	2nM	0,03660759	1,90
500nM	4nM	0,01374855	1,071 **
RPMI CR2408	Bortezomib	Fa	CI
100nM	2nM	0,43266325	0,470 *
100nM	4nM	0,51254763	19,600
500nM	2nM	0,30403364	59,927
500nM	4nM	0,24057286	0,853 *
U266 CR2408	Bortezomib	Fa	CI
100nM	2nM	0,51036379	0,567 *
100nM	4nM	0,47250423	0,770 *
500nM	2nM	0,46214044	0,897 *
500nM	4nM	0,35427242	0,596 *

Abbildung 3-14: Tabelle zum Synergismusversuch mit Bortezomib. *CI < 0,9 = synergistischer Effekt, **CI 0,9 - 1,1 = additiver Effekt.

3.10.2 Kombination von CR2408 mit Doxorubicin

Die Kombination von Bortezomib mit dem Anthrazyklin Doxorubicin im Vergleich zur alleinigen Therapie mit Bortezomib verlängert das progressionsfreie Überleben bei Myelompatienten (ORLOWSKI ET AL., 2007). Synergismusversuche von CR2408 mit Bortezomib zeigten bereits synergistische Effekte bei einigen Zelllinien. Daher wurden zusätzlich Zellwachstumsmessungen bei Koinkubation von CR2408 und Doxorubicin durchgeführt. $1,5 \cdot 10^5$ Zellen/ml der Zelllinien NCI-H929, OPM2, RPMI-8226 und U266 wurden mit jeweils 100nM und 500nM CR2408, 0,3 μ M und 0,6 μ M Doxorubicin oder der Kombination von beiden Substanzen über 48h inkubiert und das Zellwachstum wieder mittels WST-1 – Assay bestimmt (Abbildung 3-15). Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit der Software Calcsyn® (Abbildung 3-16). Bei gleichzeitiger Inkubation von CR2408 und Doxorubicin ergab die Analyse der Messwerte, dass diese Kombination in manchen Konzentrationen additive, in anderen synergistische Wirkung auf die Hemmung des Zellwachstums der Myelomzelllinien hat. Bei den Zelllinien OPM-2 und U266 zeigte die Kombinationen der beiden Substanzen sowohl bei niedriger, als auch hoher Dosierung einen synergistischen Effekt, bei NCI-H929 und RPMI-8226 treten bei der Kombination von niedrigen Konzentrationen der beiden Substanzen ein synergistischer Effekt auf, bei Kombination von hohen Konzentrationen ein additiver Effekt.

3. Ergebnisse

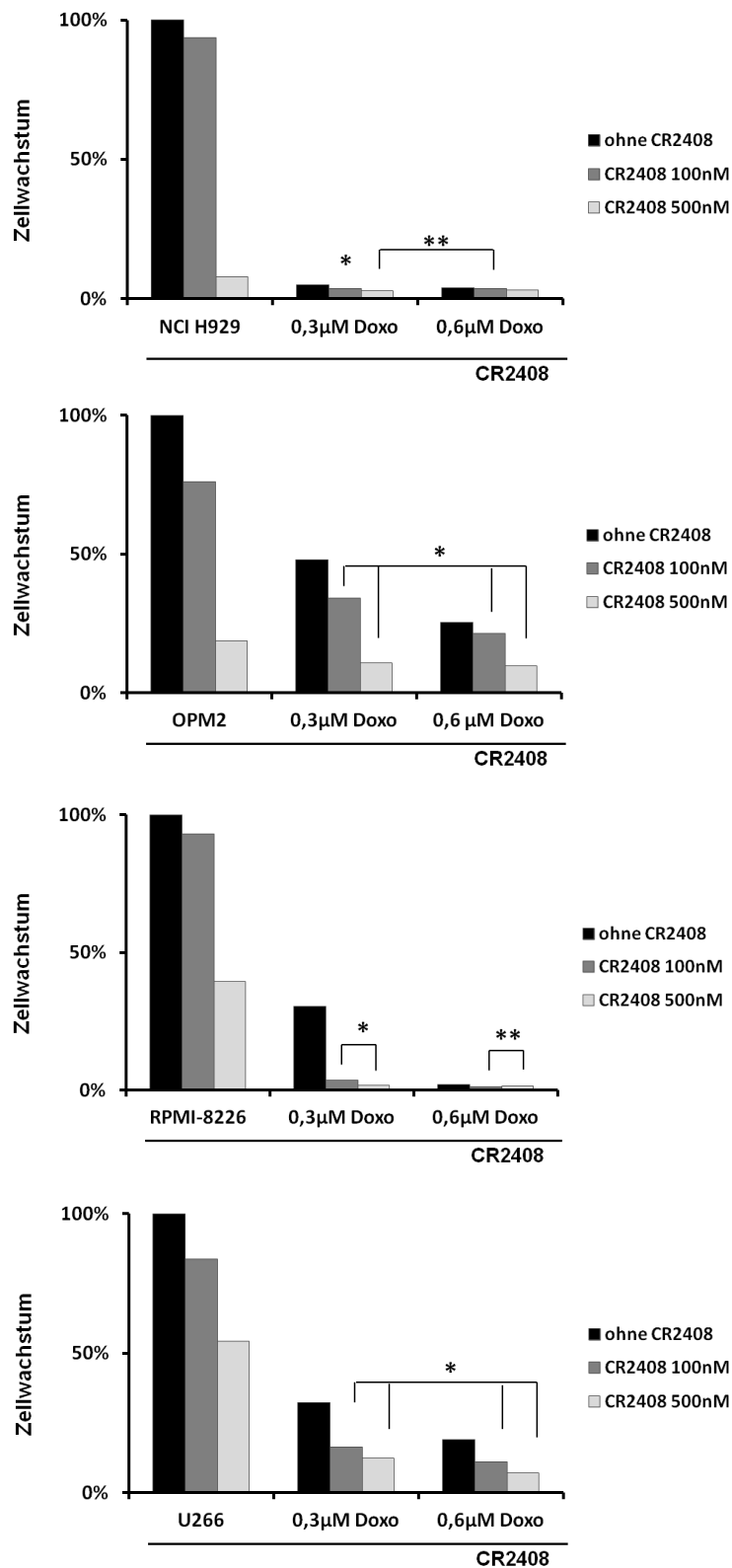


Abbildung 3-15: CR2408 wirkt synergistisch bzw. additiv mit Doxorubicin bei den Zelllinien NCI-H929 (oben), OPM-2 (Mitte oben), RPMI-8226 (Mitte unten) und U266 (unten). *CI < 0,9 = synergistischer Effekt, **CI 0,9 - 1,1 = additiver Effekt.

3. Ergebnisse

NCI CR2408	Doxorubicin	Fa	CI
100nM	0,3µM	0,03554658	0,562 *
100nM	0,6µM	0,03554658	0,968 **
500nM	0,3µM	0,02828437	0,950 **
500nM	0,6µM	0,0305777	1,297
OPM2 CR2408	Doxorubicin	Fa	CI
100nM	0,3µM	0,34034653	0,564 *
100nM	0,6µM	0,2134901	0,806 *
500nM	0,3µM	0,10798267	0,683 *
500nM	0,6µM	0,09715347	0,806 *
RPMI CR2408	Doxorubicin	Fa	CI
100nM	0,3µM	0,03660041	0,625 *
100nM	0,6µM	0,01165182	0,920 **
500nM	0,3µM	0,01740918	0,636 *
500nM	0,6µM	0,0138451	1,0625 **
U266 CR2408	Doxorubicin	Fa	CI
100nM	0,3µM	0,16425362	0,446 *
100nM	0,6µM	0,111333	0,552 *
500nM	0,3µM	0,1240639	0,401 *
500nM	0,6µM	0,07114329	0,379 *

Abbildung 3-16: Werte zum Synergismusversuch mit Doxorubicin. *CI <0,9 = synergistischer Effekt, **CI 0,9 - 1,1 = additiver Effekt.

4 Diskussion

Es besteht zunehmend Evidenz, dass (H)DAC-Inhibitoren vielversprechende neue Angriffspunkte in der Myelomtherapie bieten (CATLEY ET AL., 2003, MAISO ET AL., 2006, KAISER ET AL., 2006). Vorinostat (SAHA), eine der ersten Substanzen dieser Klasse, welche in Kombinationstherapien integriert wurde, zeigte nur eine limitierte Effizienz (RICHARDSON ET AL., 2008). Ziel in der Weiterentwicklung dieser Substanzklasse ist es daher unter anderem, potentere (H)DAC-Inhibitoren zu finden: CR2408 hat deutlich niedrigere IC₅₀-Werte, als SAHA (Abbildung 1-2).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Effektivität des neuen pan-Inhibitors CR2408 auf Myelomzellen *in vitro* getestet. In humanen Tumorzellen wird häufig eine Hypoacetylierung von Histon4 gefunden, was auf die erhöhte Aktivität von Histon-Deacetylasen in diesen Zellen hinweist (FRAGA ET AL., 2005). Diese Arbeit zeigte im Westernblot, dass CR2408 eine Deacetylierung von Histon4 in Myelomzelllinien hemmt.

KITAZOE ET AL., 2008 und DELEU ET AL., 2009 fanden heraus, dass Valproat und JNJ-26481585 durch Caspasenaktivierung Apoptose in Myelomzelllinien induzieren. Auch mit CR2408 konnte dies erzielt werden: die Caspasen 3, 8, 9 wurden durch proteolytische Spaltung aktiviert, was sowohl intrinsische als auch extrinsische Signalwege der Apoptosenaktivierung bei Wirkmechanismen von CR2408 nahelegt. Allerdings konnte der pan-Caspase Inhibitor z-VAD-fmk MM Zellen nicht vor einer durch den (H)DAC-Inhibitor SAHA induzierten Apoptose schützen. Dies lässt vermuten, dass SAHA-induzierte Apoptose bei Multiplen Myelomzellen auch Caspasen-unabhängig induzierbar ist (MITSIADES ET AL., 2003). Andererseits scheint die Rolle von Caspasen in der (H)DAC Inhibitoren-induzierten Apoptose Entität-abhängig zu sein: laut AMIN ET AL., 2001 ist die bei der akuten Promyelozyten-Leukämie (APL)-Zellen auftretenden Apoptose Caspasen-abhängig, während RUEFLI ET AL., 2001 demonstrierten, dass SAHA eine Caspasen-unabhängige Apoptose in der akuten T-Zell-Leukämie auslöst. Die Wichtigkeit der Caspasenaktivierung bleibt daher fraglich (CATLEY ET AL., 2003, BOLDEN ET AL., 2006, FENG ET AL., 2008).

Die Hemmung des Zellwachstums durch CR2408 war zumindest teilweise, wie im BrdU-Versuch veranschaulicht, durch eine Inhibition der Zellproliferation bedingt. Der Zellzyklusarrest wird durch eine Inhibition der Phosphorylierung von Rb (Retinoblastom-

Gen) veranlasst (EWEN 1994), pRB ist wiederum das Substrat der Cyclin D-abhängigen Kinasen Cdk4 und Cdk6 (ROUSSEL 1999). Die Analyse der Zellzyklus-beeinflussenden Proteine in Westernblot-Versuchen mit CR2408 ergab eine starke „Downregulation“ von Cdc25a, eine moderate Repression von Cyclin D1 und Cdk4 und eine verminderte Phosphorylierung von Rb, die einen G0/G1-Phasen Arrest induzieren sollte, wie es bei anderen (H)DAC Inhibitoren (MITSIADES ET AL., 2003, CATLEY ET AL., 2003, NERI ET AL., 2008, DELEU ET AL., 2009) erzielt wurde. Nach Inkubation von Myelomzelllinien mit CR2408 war in der Zellzyklusanalyse jedoch kein G0/G1-Phasen Arrest sichtbar, sondern eine deutliche Akkumulation von Zellfragmenten bereits in der SubG1-Phase. Daher ist anzunehmen, dass bei CR2408 hauptsächlich eine Induktion von Apoptose im Vordergrund steht.

Das von LANE 1992 als „Wächter des Genoms“ beschriebene Protein p53 ist ein entscheidender Transkriptionsfaktor für die Kontrolle des Zellzyklus, welcher durch DNA-Schäden aktiviert wird. Während der (H)DAC-Inhibitor SAHA zu einer Akkumulation der Tumorsuppressorgene p21 und p53 führte (MITSIADES ET AL., 2003), zeigte die Inkubation mit CR2408 das Gegenteil: die Expression dieser Proteine war im Zeitverlauf vermindert. Zusammen mit der Erkenntnis, dass CR2408 nicht zu einer für (H)DAC-Inhibitoren charakteristischen Arretierung des Zellzyklus in der G0/G1-Phase führt, zeigte die Verminderung der Expression von Tumorsuppressorgenen eine Abgrenzung dieser Substanz von anderen (H)DAC-Inhibitoren.

Die vorliegende Arbeit veranschaulicht eine Dysregulation von pro- und anti-apoptotischen mitochondrialen Proteinen in MM-Zellen. Die Expression der proapoptotischen Proteine pJNK (Janus-Kinase) und Bim in Myelomzelllinien war nach Inkubation mit CR2408 deutlich erhöht, während die des anti-apoptotischen Proteins Bcl-Xl vermindert war. Bei Bcl-2, Mcl-1 und Bax war keine Veränderung zu sehen. Da eine Phosphorylierung von JNK zu einer Bax-induzierten Apoptose führt (LEI ET AL., 2003), wurde die Expression von Bax in Myelomzelllinien nach Inkubation mit CR2408 untersucht, es zeigte sich jedoch keine Veränderung. Im Vergleich dazu führte der (H)DAC Inhibitor Resminostat zu einer vermehrten Expression von Bax (MANDL-WEBER ET AL., 2010) und KD5170 zu einem Anstieg von mitochondrial gebundenem Bax, gepaart mit einer Erniedrigung von im Zytosol vorliegendem Bax Protein Level (FENG ET AL., 2008). Andere Autoren berichteten jedoch über abweichende Ergebnisse bei Versuchen mit dieser Substanzklasse: die Behandlung von

4. Diskussion

MM-Zellen mit AR-42 verursachte keine Veränderung der Expression von Bax, Bcl-2 oder Bim (ZHANG ET AL., 2010). Auch Valproat verursachte weder eine Veränderung der Expression von antiapoptotischen (Bcl-2, Bcl-Xl, Mcl-1), noch vom proapoptotischen Protein Bax (KITAZOE ET AL., 2008). Eine Koinkubation mit Bortezomib brachte der Substanz PXD101 ebenfalls keine Veränderung in der Expression von Bax (FENG ET AL., 2007). KHAN ET AL., 2004 berichteten sogar über eine paradoxe Verminderung dieses Proteins bei Versuchen mit Depsipeptid. Folglich scheint die Induktion von Bax kein Hauptmechanismus und nicht charakterisierend für die Substanzklasse der (H)DAC Inhibitoren zu sein und es kann vermutet werden, dass die (H)DAC-Inhibitoren ihrerseits bezüglich der Modulation mitochondrialer Proteine eine heterogene Substanzklasse sind.

Im Gegensatz dazu verhält sich CR2408 in der Hochregulation von pJNK ähnlich wie die (H)DAC-Inhibitoren Vorinostat bei diffus großzelligen B-Zell-Lymphomen (DASMAHAPATRA ET AL., 2010) und Scriptaid bei Gliomzellen (SHARMA ET AL., 2010).

Für die Entstehung von Resistenzbildung und Proliferation von MM Zellen ist der PI3K/Akt/mTOR Signalweg von entscheidender Bedeutung (ZÖLLINGER ET AL., 2008, SARBASSOV ET AL., 2005). mTORC1 reguliert die Initiation von Translationen über zwei bestimmte Signalwege, welche die ribosomale P70 S6 Kinase (P70S6K) und Proteine, die den eukaryotischen Translationsinitiations Faktor 4E (eIF4E) binden (4E-BPs), beinhalten. Im ersten Signalweg phosphoryliert und aktiviert mTORC1 direkt P70S6K, im zweiten Weg phosphoryliert mTORC1 das Protein 4E-BP1, was die Dissoziation von eIF4E bewirkt. Dadurch kann eIF4E die cap-abhängige RNA-Translation stimulieren. Bei Abwesenheit von mTORC1 verbindet sich 4EBP1 fest mit eIF4E, um es vor der Bindung an 5-capped mRNA zu bewahren. Der mTORC2 reguliert die Kinase Akt durch Phosphorylierung von Serin473 (GUPTA ET AL., 2009). Die WesternBlot Experimente dieser Arbeit haben gezeigt, dass CR2408 signifikant die Phosphorylierung von 4E-BP1 und P70S6k vermindert. Dies war nur minimal bei der Expression von Akt im Zeitverlauf zu beobachten. Die Expression von pAktSerin473 war ebenfalls nur tendenziell vermindert. Ähnliche Ergebnisse konnten in der Vergangenheit auch bei anderen (H)DAC-Inhibitoren festgestellt werden: Resminostat interferiert mit der Signalkaskade zur Aktivierung von Akt (MANDL-WEBER ET AL., 2010). Daher ist anzunehmen, dass CR2408 ebenfalls Apoptose über den Akt-Signalweg induziert. Passend zu diesen Ergebnissen zeigte sich, dass CR2408 sowohl das zytokinabhängige, als auch das Knochenmarkstromamedium-induzierte Wachstum von Myelomzelllinien hemmt.

4. Diskussion

In klinischen Studien bei Patienten mit fortgeschrittenem Multiplem Myelom konnte der (H)DAC-Inhibitor Vorinostat nur einen limitierten Effekt erzielen (RICHARDSON ET AL., 2008, GALLI ET AL., 2009). Die Potenz dieser Substanz konnte jedoch deutlich durch Kombination mit Bortezomib (MAZUMDER ET AL., 2010, BADROS ET AL., 2009) oder Lenalidomid und Dexamethason (RICHARDSON ET AL., 2010) gesteigert werden. Die Kombination der (H)DAC-Inhibitoren PXD101 (FENG ET AL., 2007), KD5170 (FENG ET AL., 2008), JNJ-26481585 (DELEU ET AL., 2009), SAHA und NaB (Sodium Butyrat) (PEI ET AL., 2004) erbrachte ähnliche Ergebnisse. Synergistische Effekte wurden bei der Kombination der Substanz NVP-LAQ824 (CATLEY ET AL., 2003) mit Dexamethason beobachtet. Außerdem zeigt die Kombinationstherapie anderer Chemotherapeutika gegen das MM mit Doxorubicin Wirkung (ORLOWSKI ET AL 2007). In dieser Arbeit wurden bei der Kombination von CR2408 mit Bortezomib und Doxorubicin sowohl additive, als auch synergistische Effekte beobachtet.

Die Empfindlichkeit von nicht-neoplastischen Zellen gegenüber CR2408 im Vergleich zu MM Zellen wurde am peripheren Blut gesunder Probanden geprüft. Es wurde lediglich ein Anstieg von +11% an apoptotischen Zellen bei 500nM oder höheren Konzentrationen festgestellt. So konnte gezeigt werden, dass CR2408 als zytotoxische Substanz nur in geringem Ausmaß Apoptose bei nicht-neoplastischen Zellen induziert.

Die Versuche bestätigen, dass der neue, kompetitive pan-(H)DAC-Inhibitor CR2408 das Zellwachstum von Myelomzelllinien und primären MM-Zellen inhibiert und ihre Apoptose induziert. Einige der beobachteten Veränderungen in der intrazellulären Signal-Transduktion sind vergleichbar mit denen anderer vorher getesteter Substanzen dieser Klasse, während andere Ergebnisse sich deutlich unterscheiden. Die Modulation der Expression von CyclinD1, Cdc25a und Cdk4 konnte gezeigt werden, einhergehend mit der Hypophosphorylierung von Rb. Außerdem kam es zu einem Abfall des Phosphorylierungszustandes von P70S6K und 4E-BP-1 und die Expression von Akt war deutlich vermindert. Dies legt nahe, dass CR2408 mit der Signalkaskade zur Aktivierung von Akt interferiert. Desweiteren wurde die Expression des proapoptotischen Proteins Bim gefördert und die der antiapoptotischen Proteine Bad und Bcl-xL unterdrückt. Allein ist die Substanz bereits in niedrigen Konzentrationen wirksam. Die Kombination mit Doxorubicin und Bortezomib bewirkt synergistische Effekte.

Diese Arbeit zeigt einen vielversprechenden Therapieansatz in der Behandlung des Myeloms und gibt Anlass zu weiteren präklinischen und klinischen Studien mit CR2408, um die Therapie und Prognose der Myelompatienten zu verbessern.

5 Zusammenfassung

Das Multiple Myelom ist ein B-Zell NHL (Non-Hodgkin-Lymphom), welches das Knochenmark durch Antikörper-bildende Plasmazellen infiltriert und mit einer Zerstörung des Knochens und der Verdrängung der normalen Blutbildung einhergeht. Trotz neuer Ansätze in der Therapie, wie die Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation, Immunmodulation und Proteasomeninhibition, ist die Erkrankung nach wie vor in den häufigsten Fällen unheilbar. Im Laufe der Behandlung kommt es meist zu Therapieresistenz und Rezidiven.

Die Veränderungen der Epigenetik und Modulation dieser Veränderungen bieten seit einigen Jahren neue Therapieoptionen in der Onkologie im Allgemeinen und beim Multiplen Myelom im Speziellen. DNA Methylierung, RNA-assoziiertes Silencing, Nukleosom Positionierung und Histon Modifikation führen zur Reaktivierung von Tumorsuppressorgenen und der Induktion von Zellzyklusarrest und gezielter Apoptose der malignen Zellen.

CR2408 ist ein neuer, direkter und sehr potenter pan-(H)DAC-Inhibitor, der alle elf signifikanten Histon-Deacetylasen inhibiert. In dieser Arbeit wurde dargelegt, dass CR2408 das Wachstum der Myelomzelllinien NCI-H929, OPM-2, RPMI-8226 und U266, sowie primärer Myelomzellen erkrankter Patienten zeit- und konzentrationsabhängig hemmt. Im nanomolarem Bereich kam es zur Apoptoseinduktion in Myelomzelllinien und Patientenzellen. Bei gesunden Zellen wurde nur bis zu elf Prozent Apoptose induziert. Außerdem konnte die Proliferation von Myelomzelllinien gehemmt und ein Zellzyklusarrest noch vor der G1-Phase beobachtet werden. CR2408 führte zu einer Hemmung des IGF-1 und IL-6-abhängigen Zellwachstums und zu einer Verminderung des durch das Microenvironment des Knochenmarks vermittelten Zellwachstums. Die Koinkubation von CR2408 mit dem Proteasomeninhibitor Bortezomib und dem Anthrazyklin Doxorubicin erbrachte teils additive, teils synergistische Effekte. In WesternBlot-Versuchen war eine Caspasenaktivierung, eine Reduktion von Cdc25a, Rb, pRb, p53 und p21 und eine geringe Reduktion bei Cyclin D1, Cyclin E, Cdc25c, Cdk4 und Cdk6 zu beobachten. Desweiteren kam es zu einer Verminderung der Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-XL und einem Anstieg des proapoptotischen Proteins Bim. Die Expression von Bcl-2 blieb unbeeinflusst. Zudem induzierte CR2408 die Phosphorylierung von JNK und eine Dephosphorylierung von P70S6K

5. Zusammenfassung

und 4E-BP-1. Die Expression von Akt war deutlich vermindert.

Bereits mehrere (H)DAC-Inhibitoren, wie Trichostatin A, SAHA, Romidepsin, Belinostat, Valproat, Panobinostat und Resminostat befinden sich in klinischer Erprobung, zeigen jedoch eine variable, als Monosubstanz noch nicht zufriedenstellende, Effektivität in der Behandlung des MM.

CR2408 zeigte sich *in vitro* deutlich potenter als SAHA. Die Ergebnisse dieser Arbeit sind daher Grundlage für weitere *in vitro* und *in vivo* Studien mit CR2408 als einen der möglichen Kandidaten für die therapeutische Basis des Multiplen Myeloms.

6 Literaturverzeichnis

ABEDINPOUR ET AL., 2009

Abedinpour F., Fischer N.: Manual Multiples Myelom des Tumorzentrum München. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge (Kapitel: Klinik). 3. Auflage. München: W. Zuckschwerdt Verlag 2009.

AMIN ET AL., 2001

Amin H.M., Saeed S., Alkan S.: Histone deacetylase inhibitors induce caspase-dependent apoptosis and downregulation of daxx in acute promyelocytic leukaemia with t(15;17). *Br J Haematol.* 2001; 115:287-297.

BADROS ET AL., 2009

Badros A., Burger A.M., Philip S., Niesvizky R., Kolla S.S., Goloubeva O., Harris C., Zwiebel J., Wright J.J., Espinoza-Delgado I., Baer M.R., Holleran J.L., Egorin M.J., Grant S.: Phase I study of vorinostat in combination with bortezomib for relapsed and refractory multiple myeloma. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:5250-5257.

BALI ET AL., 2005

Bali P., Pranpat M., Bradner J., Balasis M., Fiskus W., Guo F., Rocha K., Kumaraswamy S., Boyapalle S., Atadja P., Seto E., Bhalla K.: Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem.* 2005 Jul 22; 280(29):26729-34.

BARLOGIE ET AL., 2006

Barlogie B., Kyle R.A., Anderson K.C., Greipp P.R., Lazarus H.M., Hurd D.D., McCoy J., Moore D.F. Jr., Dakhil S.R., Lanier K.S., Chapman R.A., Cromer J.N., Salmon S.E., Durie B., Crowley J.C.: Standard chemotherapy compared with high-dose chemoradiotherapy for multiple myeloma: final results of phase III US Intergroup Trial S9321. *J Clin Oncol.* 2006 Feb 20; 24(6):929-36.

BAUMANN ET AL., 2007

Baumann P., Mandl-Weber S., Emmerich B., Straka C., Schmidmaier R.: Activation of adenosine monophosphate activated protein kinase inhibits growth of multiple myeloma cells. *Experimental Cell Research.* 2007 Oct1; 313(16):3592-3603.

6. Literaturverzeichnis

BAUMANN ET AL., 2008

Baumann P., Mandl-Weber S., Oduncu F., Schmidmaier R.: Alkylating agents induce activation of NFkappaB in multiple myeloma cells. *Leukemia Research*. 2008 Jul; 32(7):1144-1147.

BJÖRKSTRAND ET AL., 1996

Björkstrand B.B., Ljungman P., Svensson H., Hermans J., Alegre A., Apperley J., Bladé J., Carlson K., Cavo M., Ferrant A., Goldstone A.H., de Laurenti A., Majolino I., Marcus R., Prentice H.G., Remes K., Samson D., Sureda A., Verdonck L.F., Volin L., Gahrton G.: Allogeneic bone marrow transplantation versus autologous stem cell transplantation in multiple myeloma: a retrospective case-matched study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*. 1996 Dec 15; 88(12):4711-4718.

BJÖRKSTRAND ET AL., 2011

Björkstrand B., Iacobelli S., Hegenbart U., Gruber A., Greinix H., Volin L., Narni F., Musto P., Beksac M., Bosi A., Milone G., Corradini P., Goldschmidt H., de Witte T., Morris C., Niederwieser D., Gahrton G.: Tandem autologous/reduced-intensity conditioning allogeneic stem-cell transplantation versus autologous transplantation in myeloma: long-term follow-up. *J Clin Oncol*. 2011 Aug 1; 29(22):3016-3022. doi: 10.1200/JCO.2010.32.7312.

BLADÉ ET AL., 2005

Bladé J., Rosiñol L., Sureda A., Ribera J.M., Díaz-Mediavilla J., García-Laraña J., Mateos M.V., Palomera L., Fernández-Calvo J., Martí J.M., Giraldo P., Carbonell F., Callís M., Trujillo J., Gardella S., Moro M.J., Barez A., Soler A., Font L., Fontanillas M., San Miguel J.: Programa para el Estudio de la Terapéutica en Hemopatía Maligna (PETHEMA): High-dose therapy intensification compared with continued standard chemotherapy in multiple myeloma patients responding to the initial chemotherapy: long-term results from a prospective randomized trial from the Spanish cooperative group PETHEMA. *Blood*. 2005 Dec 1; 106(12):3755-3759.

BLADÉ ET AL., 2007

Bladé J., Rosiñol L.: Complications of multiple Myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2007 Dec; 21(6):1231-1246, xi.

BLOMBERG ET AL., 1999

Blomberg I., Hoffmann I.: Ectopic Expression of Cdc25A Accelerates the G1/S Transition and Leads to Premature Activation of Cyclin E- and Cyclin A-Dependent Kinases. *Mol Cell Biol*. 1999 September; 19(9): 6183–6194.

6. Literaturverzeichnis

BOLDEN ET AL., 2006

Bolden J.E., Peart M.J., Johnstone R.W.: Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5:769-784.

BRUNO ET AL., 2007

Bruno B., Rotta M., Patriarca F., Mordini N., Allione B., Carnevale-Schianca F., Giaccone L., Sorasio R., Omedè P., Baldi I., Bringhen S., Massaia M., Aglietta M., Levis A., Gallamini A., Fanin R., Palumbo A., Storb R., Ciccone G., Boccadoro M.: A comparison of allografting with autografting for newly-diagnosed myeloma. *N Engl J Med* 2007; 356(11):1110-1120.

BRUNO ET AL., 2009

Bruno B., Giaccone L., Sorasio R., Boccadoro M.: Role of allogeneic stem cell transplantation in multiple myeloma. *Seminars in Hematology.* 2009 Apr; 46(2):158-165

CATLEY ET AL., 2003

Catley L., Weisberg E., Tai YT., Atadja P., Remiszewski S., Hideshima T., Mitsiades N., Shringarpure R., LeBlanc R., Chauhan D., Munshi N.C., Schlossman R., Richardson P., Griffin J., Anderson K.C.: NVP-LAQ824 is a potent novel histone deacetylase inhibitor with significant activity against multiple myeloma. *Blood.* 2003; 102:2615-2622.

COHEN ET AL., 2004

Cohen H.Y., Lavu S., Bitterman K.J., Hekking B., Imahiyerobo T.A., Miller C., Frye R., Ploegh H., Kessler B.M., Sinclair D.A.: Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell.* 2004 Mar 12; 13(5):627-638.

DAMIANO ET AL., 1999

Damiano J.S., 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.

DASMAHAPATRA ET AL., 2010

Dasmahapatra G., Lembersky D., Kramer L., Fisher R.I., Friedberg J., Dent P., Grant S.: The pan-HDAC inhibitor vorinostat potentiates the activity of the proteasome inhibitor carfilzomib in human DLBCL cells in vitro and in vivo. *Blood.* 2010; 115:4478-4487.

DELEU ET AL., 2009

Deleu S., Lemaire M., Arts J., Menu E., Van Valckenborgh E., King P., Vande Broek I., De

6. Literaturverzeichnis

Raeve H., Van Camp B., Croucher P., Vanderkerken K.: The effects of JNJ-26481585, a novel hydroxamate-based histone deacetylase inhibitor, on the development of multiple myeloma in the 5T2MM and 5T33MM murine models. *Leukemia*. 2009 Oct; 23(10):1894-1903.

DELEU ET AL., 2009

Deleu S., Lemaire M., Arts J., Menu E., Van Valckenborgh E., Vande Broek I., De Raeve H., Coulton L., Van Camp B., Croucher P., Vanderkerken K.: Bortezomib alone or in combination with the histone deacetylase inhibitor JNJ-26481585: effect on myeloma bone disease in the 5T2MM murine model of myeloma. *Cancer Res*. 2009; 69:5307-5311.

DEQUIEDT ET AL., 2003

Dequiedt F., Kasler H., Fischle W., Kiermer V., Weinstein M., Herndier B.G., Verdin E.: HDAC7, a thymus-specific class II histone deacetylase, regulates Nur77 transcription and TCR-mediated apoptosis. *Immunity*. 2003 May;18(5):687-98.

EINSELE ET AL., 2003

Einsele H., Schäfer H.J., Hebart H., Bader P., Meisner C., Plasswilm L., Liebisch P., Bamberg M., Faul C., Kanz L.: Follow-up of patients with progressive multiple myeloma undergoing allografts after reduced-intensity conditioning. *Br J Haematol*. 2003 May; 121(3):411-418.

EWEN 1994

Ewen M.E.: The cell cycle and the retinoblastoma protein family. *Cancer Metastasis Rev*. 1994 Mar; 13(1):45-66.

FABRE ET AL., 2009

Fabre C., Grosjean J., Tailer M.; Boehrer S., Adès L., Perfettini J., de Botton S., Fenaux P., Kroemer G.: A novel effect of DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors: NFkappaB inhibition in malignant myeloblasts. *Cell Cycle*. 2008; 7:2139-2145.

FACON ET AL., 2007

Facon T., Mary J.Y., Hulin C., Benboubker L., Attal M., Pegourie B., Renaud M., Harousseau J.L., Guillemin G., Chateaux C., Dib M., Voillat L., Maisonneuve H., Troncy J., Dorvaux V., Monconduit M., Martin C., Casassus P., Jaubert J., Jardel H., Doyen C., Kolb B., Anglaret B., Grosbois B., Yakoub-Agha I., Mathiot C., Avet-Loiseau H.; Intergroupe Francophone du Myélome: Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial. *Lancet*. 2007 Oct 6; 370(9594):1209-1218.

6. Literaturverzeichnis

FENG ET AL., 2007

Feng R., Oton A., Mapara M.Y., Anderson G., Belani C., Lentzsch S.: The histone deacetylase inhibitor, PXD101, potentiates bortezomib-induced anti-multiple myeloma effect by induction of oxidative stress and DNA damage. *Br J Haematol.* 2007; 139:385-397.

FENG ET AL., 2008

Feng R., Ma H., Hassig C.A., Payne J.E., Smith N.D., Mapara M.Y., Hager J.H., Lentzsch S.: KD5170, a novel mercaptoketone-based histone deacetylase inhibitor, exerts antimyeloma effects by DNA damage and mitochondrial signaling. *Mol Cancer Ther.* 2008; 7:1494-1505.

FERMAND ET AL., 2005

Ferland J.P., Katsahian S., Divine M., Leblond V., Dreyfus F., Macro M., Arnulf B., Royer B., Mariette X., Pertuiset E., Belanger C., Janvier M., Chevret S., Brouet J.C., Ravaud P.; Group Myelome-Autogreffe: High-dose therapy and autologous blood stem-cell transplantation compared with conventional treatment in myeloma patients aged 55 to 65 years: long-term results of a randomized control trial from the Group Myelome-Autogreffe. *J Clin Oncol.* 2005 Dec 20; 23(36):9227-9233.

FRAGA ET AL., 2005

Fraga M.F., Ballestar E., Villar-Garea A., Boix-Chornet M., Espada J., Schotta G., Bonaldi T., Haydon C., Ropero S., Petrie K., Iyer N.G., Pérez-Rosado A., Calvo E., Lopez J.A., Cano A., Calasanz M.J., Colomer D., Piris M.A., Ahn N., Imhof A., Caldas C., Jenuwein T., Esteller M.: Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet.* 2005 Apr; 37(4):391-400.

GAHRTON ET AL., 2001

Gahrton G., Svensson H., Cavo M., Apperly J., Bacigalupo A., Björkstrand B., Bladé J., Cornelissen J., de Laurenti A., Facon T., Ljungman P., Michallet M., Niederwieser D., Powles R., Reiffers J., Russell N.H., Samson D., Schaefer U.W., Schattenberg A., Tura S., Verdonck L.F., Vernant J.P., Willemze R., Volin L.; European Group for Blood and Marrow Transplantation: Progress in allogeneic bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma: a comparison between transplants performed 1983--93 and 1994--8 at European Group for Blood and Marrow Transplantation centres. *Br J Haematol.* 2001 Apr; 113(1):209-16.

GALLI ET AL., 2010

Galli M., Salmoiraghi S., Golay J., Gozzini A., Crippa C., Pescosta N., Rambaldi A.: A phase II

6. Literaturverzeichnis

multiple dose clinical trial of histone deacetylase inhibitor ITF2357 in patients with relapsed or progressive multiple myeloma. *Ann Hematol.* 2010 Feb; 89(2):185-190.

GALLINARI ET AL., 2007

Gallinari P., Di Marco S., Jones P., Pallaoro M., Steinkühler C.: HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Res.* 2007 Mar;17(3):195-211.

GIACCONE ET AL., 2011

Giaccone L., Storer B., Patriarca F., Rotta M., Sorasio R., Allione B., Carnevale-Schianca F., Festuccia M., Brunello L., Omedè P., Bringham S., Aglietta M., Levis A., Mordini N., Gallamini A., Fanin R., Massaia M., Palumbo A., Ciccone G., Storb R., Gooley T.A., Boccadoro M., Bruno B.: Long-term follow-up of a comparison of nonmyeloablative allografting with autografting for newly diagnosed myeloma. *Blood.* 2011 Jun 16; 117(24):6721-6727.

GIU ET AL, 2004

Gui C.Y., Ngo L., Xu W.S., Richon V.M., Marks P.A.: Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Feb 3; 101(5):1241-6.

GREIPP ET AL., 2005

Greipp P.R., San Miguel J., Durie B.G.M., Crowley J.J., Barlogie B., Bladé J., Boccadoro M., Child J.A., Avet-Loiseau H., Kyle R.A., Lahuerta J.J., Ludwig H., Morgan G., Powles R., Shimizu K., Shustik C., Sonneveld P., Tosi P., Turesson I., Westin J. (International Myeloma Working Group): International Staging System for multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005; 23, 3412-3420.

GUPTA ET AL., 2009

Gupta M., Ansell S.M., Novak A.J., Kumar S., Kaufmann S.H., Witzig T.E.: Inhibition of histone deacetylase overcomes rapamycin-mediated resistance in diffuse large B cell lymphoma by inhibiting Akt signaling through mTORC2. *Blood.* 2009; 114:2926-2935.

GUPTA ET AL., 2011

Gupta A., Kumar L.: Evolving role of high dose stem cell therapy in multiple myeloma. *In dian J Med Paediatr Oncol.* 2011 Jan;32(1):17-24.

6. Literaturverzeichnis

HALKIDOU ET AL., 2004

Halkidou K., Gaughan L., Cook S., Leung H.Y., Neal D.E., Robson CN.: Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate*. 2004 May 1; 59(2):177-189.

HIDDEMANN ET AL., 2010

Hiddemann W., Bartram C.: *Die Onkologie*. 2. Auflage, Heidelberg: Springer Medizin Verlag 2010. ISBN: 978-3-540-79724-1

HIDESHIMA ET AL., 2001

Hideshima T., Richardson P., Chauhan D., Palombella V., Elliott P., Adams J., Anderson K.: The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 2001; 61:3071-3076.

HIDESHIMA ET AL., 2002

Hideshima T., Chauhan D., Hayashi T., Podar K., Akiyama M., Gupta D., Richardson P., Munshi N., Anderson KC. The Biological Sequelae of Stromal Cell-derived Factor-1 in Multiple Myeloma. *Mol Cancer Ther* 2002; 1:539-544.

HIDESHIMA ET AL., 2003

Hideshima T., Mitsiades C., Akiyama M., Hayashi T., Chauhan D., Richardson P., Schlossman R., Podar K, Munshi N., Mitsiades N., Anderson K. Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood* 2003:1530-1534.

HIDESHIMA ET AL., 2005

Hideshima T., Bradner J.E., Wong J., Chauhan D., Richardson P., Schreiber S.L., Anderson K.C.: Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jun 14; 102(24):8567-8572.

HSU ET AL., 2001

Hsu J.H., Shi Y., Krajewski S., Renner S., Fisher M., Reed J.C., Franke T.S., Lichtenstein A.: The Akt kinase is activated in multiple myeloma cells. *Blood* 2001, 98: 2853-2855.

KAISER ET AL., 2006

Kaiser M., Zavrski I., Sterz J., Jakob C., Fleissner C., Kloetzel P.M., Sezer O., Heider U.: The effects of the histone deacetylase inhibitor valproic acid on cell cycle, growth suppression and

6. Literaturverzeichnis

apoptosis in multiple myeloma. *Haematologica*. 2006; 91:248-251.

KERR ET AL., 1972

Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972 Aug; 26(4):239-257.

KHAN ET AL., 2004

Khan S.B., Maududi T., Barton K., Ayers J., Alkan S.: Analysis of histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228), effect on multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2004; 125:156-161.

KIM ET AL., 2001

Kim M.S., Kwon H.J., Lee Y.M., Baek J.H., Jang J.E., Lee S.W., Moon E.J., Kim H.S., Lee S.K., Chung H.Y., Kim C.W., Kim K.W.: Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med*. 2001 Apr; 7(4):437-443.

KIM ET AL., 2007

Kim S.H., Jeong J.W., Park J.A., Lee J.W., Seo J.H., Jung B.K., Bae M.K., Kim K.W.: Regulation of the HIF-1alpha stability by histone deacetylases. *Oncol Rep*. 2007 Mar; 17(3):647-651.

KITAZOE ET AL., 2008

Kitazoe K., Abe M., Hiasa M., Oda A., Amou H., Harada T., Nakano A., Takeuchi K., Hashimoto T., Ozaki S., Matsumoto T.: Valproic acid exerts anti-tumor as well as anti-angiogenic effects on myeloma. *Int J Hematol*. 2009; 89:45-57.

KLEIN ET AL., 1995

Klein B., Zhang XG., Lu ZY, Bataille R.: Interleukin-6 in human multiple myeloma. *Blood*. 1995; 85:863-872.

KLIMEK ET AL., 2008

Klimek V.M., Fircanis S., Maslak P., Guernah I., Baum M., Wu N., Panageas K., Wright J.J., Pandolfi P.P., Nimer S.D.: Tolerability, Pharmacodynamics, and Pharmacokinetics Studies of Depsipeptide (Romidepsin) in Patients with Acute Myelogenous Leukemia or Advanced Myelodysplastic Syndromes. *Clin Cancer Res* 2008; 14:826-832.

KRÜGER ET AL., 2002

Kröger N., Schwerdtfeger R., Kiehl M., Sayer H.G., Renges H., Zabelina T., Fehse B., Tögel F.,

6. Literaturverzeichnis

Wittkowsky G., Kuse R., Zander A.R.: Autologous stem cell transplantation followed by a dose-reduced allograft induces high complete remission rate in multiple myeloma. *Blood*. 2002 Aug 1; 100(3):755-60.

KUHN ET AL., 2007

Kuhn D.J., Chen Q., Voorhees P.M., Strader J.S., Shenk K.D., Sun C.M., Demo S.D., Bennett M.K., van Leeuwen F.W., Chanan-Khan A.A., Orlowski R.Z.: Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood*. 2007 Nov 1; 110(9):3281-3290.

KUMAR ET AL., 2008

Kumar S.K., Rajkumar S.V., Dispenzieri A., Lacy M.Q., Hayman S.R., Buadi F.K., Zeldenrust S.R., Dingli D., Russell S.J., Lust J.A., Greipp P.R., Kyle R.A., Gertz M.A.: Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood* 2008 Mar 1; 111(5):2516-2520.

KUMAR ET AL., 2009

Kumar S., Giral S., Stadtmauer E.A., Harousseau J.L., Palumbo A., Bensinger W., Comenzo R.L., Lentzsch S., Munshi N., Niesvizky R., San Miguel J., Ludwig H., Bergsagel L., Blade J., Lonial S., Anderson K.C., Tosi P., Sonneveld P., Sezer O., Vesole D., Cavo M., Einsele H., Richardson P.G., Durie B.G., Rajkumar S.V.; International Myeloma Working Group: Mobilization in myeloma revisited: IMWG consensus perspectives on stem cell collection following initial therapy with thalidomide-, lenalidomide-, or bortezomib-containing regimens. *Blood*. 2009 Aug 27; 114(9):1729-1735. doi: 10.1182/blood-2009-04-205013.

KYLE ET AL., 2003

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

KYLE ET AL., 2004

Kyle R.A., Rajkumar S.V.: Multiple myeloma. *N Engl J Med* 2004; 351:1860.

KYLE ET AL., 2009

Kyle R.A., Rajkumar S.V.: Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia*. 2009; 23(1): 3–9. doi:10.1038/leu.2008.291.

6. Literaturverzeichnis

LACY ET AL., 2009

Lacy M.Q., Hayman S.R., Gertz M.A., Dispenzieri A., Buadi F., Kumar S., Greipp P.R., Lust J.A., Russell S.J., Dingli D., Kyle R.A., Fonseca R., Bergsagel P.L., Roy V., Mikhael J.R., Stewart A.K., Laumann K., Allred J.B., Mandrekar S.J., Rajkumar S.V.: Pomalidomide (CC4047) plus low-dose dexamethasone as therapy for relapsed multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2009 Oct 20; 27(30):5008-5014. doi: 10.1200/JCO.2009.23.6802.

LAMERZ 2009

Lamerz R.: *Manual Multiples Myelom des Tumorzentrums München. Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge (Kapitel: Epidemiologie).* 3. Auflage. München: W. Zuckschwerdt Verlag 2009.

LANDGREN ET AL., 2009

Landgren O., Kyle R.A., Pfeiffer R.M., Katzmann J.A., Caporaso N.E., Hayes R.B., Dispenzieri A., Kumar S., Clark R.J., Baris D., Hoover R., Rajkumar S.V.: Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood.* 2009 May 28; 113(22):5412-5417.

LANE 1992

Lane D.P.: Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992; 358:15-6.

LEE ET AL., 2006

Lee H., Sengupta N., Villagra A., Rezai-Zadeh N., Seto E.: Histone deacetylase 8 safeguards the human ever-shorter telomeres 1B (hEST1B) protein from ubiquitin-mediated degradation. *Mol Cell Biol.* 2006 Jul; 26(14):5259-69.

LEI ET AL., 2003

Lei, K., Davis, R.J.: JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 2003; 100:2432–2437.

LI ET AL., 2006

Li Y., Kao G.D., Garcia B.A., Shabanowitz J., Hunt D.F., Qin J., Phelan C., Lazar M.A.: A novel histone deacetylase pathway regulates mitosis by modulating Aurora B kinase activity. *Genes Dev.* 2006 Sep 15; 20(18):2566-79.

6. Literaturverzeichnis

LOKHORST ET AL., 2003

Lokhorst H.M., Segeren C.M., Verdonck L.F., van der Holt B., Raymakers R., van Oers M.H., Barge R.M., Schouten H.C., Westveer P.H., Steijaert M.M., Cornelissen J.J., Sonneveld P.; Dutch-Belgian Hemato-Oncology Cooperative Group: Partially T-cell-depleted allogeneic stem-cell transplantation for first-line treatment of multiple myeloma: a prospective evaluation of patients treated in the phase III study HOVON 24 MM. *J Clin Oncol.* 2003 May 1; 21(9):1728-33.

LOKHORST ET AL., 2010

Lokhorst H., Einsele H., Vesole D., Bruno B., San Miguel J., Pérez-Simon J.A., Kröger N., Moreau P., Gahrton G., Gasparetto C., Giralt S., Bensinger W.; International Myeloma Working Group: International Myeloma Working Group consensus statement regarding the current status of allogeneic stem-cell transplantation for multiple myeloma. *J Clin Oncol.* 2010 Oct 10; 28(29):4521-4530.

LONGO ET AL., 2012

Longo D.L., Fauci A.S., Kasper D.L., Hauser S.L., Jameson J.L., Loscalzo J.: *Harrison's Principles of Internal Medicine.* 18. Auflage, USA: McGraw-Hill Professional 2012. ISBN: 978-0-07-163244-7.

LUDWIG ET AL., 2006

Ludwig H., Schmoll H-J.: *Kompodium Internistische Onkologie Standards in Diagnostik und Therapie. Teil II: Therapiekonzepte maligner Tumoren.* Springer. 2006 <http://www.springer.com/978-3-540-20657-6>.

LYNCH ET AL., 2001

Lynch H.T., Sanger W.G., Pirruccello S., Quinn-Laquer B., Weisenburger D.D.: Familial multiple myeloma: a family study and review of the literature. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:1479.

MAISO ET AL., 2006

Maiso P., Carvajal-Vergara X., Ocio EM., Lopez-Perez R., Mateo G., Gutierrez N., Atadja P., Pandiella A., San Miguel J.F.: The histone deacetylase inhibitor LBH589 is a potent antimyeloma agent that overcomes drug resistance. *Cancer Res.* 2006; 66:5781-5789.

MALONEY ET AL., 2003

Maloney D.G., Molina A.J., Sahebi F., Stockerl-Goldstein K.E., Sandmaier B.M., Bensinger

6. Literaturverzeichnis

W., Storer B., Hegenbart U., Somlo G., Chauncey T., Bruno B., Appelbaum F.R., Blume K.G., Forman S.J., McSweeney P., Storb R.: Allografting with nonmyeloablative conditioning following cytoreductive autografts for the treatment of patients with multiple myeloma. *Blood*. 2003 Nov 1; 102(9):3447-54.

MANDL-WEBER ET AL., 2010

Mandl-Weber S., Meinel F.G., Jankowsky R., Oduncu F., Schmidmaier R., Baumann P.: The novel inhibitor of histone deacetylase resminostat (RAS2410) inhibits proliferation and induces apoptosis in multiple myeloma (MM) cells. *Br J Haematol*. 2010; 149:518-528.

MARTINEZ-LOPEZ ET AL., 2011

Martinez-Lopez J., Blade J., Mateos MV., Grande C., Alegre A., García-Laraña J., Sureda A., de la Rubia J., Conde E., Martinez R., de Arriba F., Viguria M.C., Besalduch J., Cabrera R., Gonzalez-San Miguel J.D., Guzman-Zamudio J.L., Gomez del Castillo M.C., Moraleda J.M., García-Ruiz J.C., San Miguel J., Lahuerta J.J.: Long-term prognostic significance of response in multiple myeloma after stem cell transplantation. *Blood*. 2011 Jul 21; 118(3):529-34. doi: 10.1182/blood-2011-01-332320.

MAZUMDER ET AL., 2010

Mazumder A., Vesole DH., Jagannath S.: Vorinostat plus bortezomib for the treatment of relapsed/refractory multiple myeloma: a case series illustrating utility in clinical practice. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2010 Apr 1; 10(2):149-151.

MCSWEENEY ET AL., 2001

McSweeney P.A., Niederwieser D., Shizuru J.A., Sandmaier B.M., Molina A.J., Maloney D.G., Chauncey T.R., Gooley T.A., Hegenbart U., Nash R.A., Radich J., Wagner J.L., Minor S., Appelbaum F.R., Bensinger W.I., Bryant E., Flowers M.E., Georges G.E., Grumet F.C., Kiem H.P., Torok-Storb B., Yu C., Blume K.G., Storb R.F.: Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood*. 2001 Jun 1; 97(11):3390-400.

MEHNERT ET AL., 2007

Mehnert J.M., Kelly W.K.: Histone deacetylase inhibitors: biology and mechanism of action. *Cancer J*. 2007 Jan-Feb; 13(1):23-29.

MERLINI ET AL., 2003

Merlini G., Bellotti V.: Molecular Mechanisms of Amyloidosis. *N Engl J Med* 2003; 349:583-

596.

MITSIADES ET AL., 2003

Mitsiades N., Mitsiades C.S., Richardson P.G., McMullan C., Poulaki V., Fanourakis G., Schlossman R., Chauhan D., Munshi N.C., Hideshima T., Richon V.M., Marks P.A., Anderson K.C.: Molecular sequelae of histone deacetylase inhibition in human malignant B cells. *Blood*. 2003; 101:4055-4062.

MITSIADES ET AL., 2004

Mitsiades C.S., Mitsiades N.S., McMullan C.J., Poulaki V., Shringarpure R., Hideshima T., Akiyama M., Chauhan D., Munshi N., Gu X., Bailey C., Joseph M., Libermann T.A., Richon V.M., Marks P.A., Anderson K.C.: Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101:540-545.

NERI ET AL., 2008

Neri P., Tagliaferri P., Di Martino MT., Calimeri T., Amodio N., Bulotta A., Ventura M., Eramo P.O., Viscomi C., Arbitrio M., Rossi M., Caraglia M., Munshi N.C., Anderson K.C., Tassone P.: In vivo anti-myeloma activity and modulation of gene expression profile induced by valproic acid, a histone deacetylase inhibitor. *Br J Haematol*. 2008; 143:520-531.

ORLOWSKI ET AL., 2007

Orlowski R., Nagler A., Sonneveld P., Bladé J., Hajek R., Spencer A., San Miguel J., Robak T., Dmoszynska A., Horvath N., Spicka I., Sutherland H., Suvorov A., Zhuang S., Parekh T., Xiu L., Yuan Z., Rackoff W., Harousseau J.-L.: Randomized Phase III Study of Pegylated Liposomal Doxorubicin Plus Bortezomib Compared With Bortezomib alone in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma: Combination Therapy Improves Time to Progression. *J Clin Oncol* 25:3892-3901.

PALLADINI ET AL., 2004

Palladini G., Perfetti V., Obici L., Caccialanza R., Semino A., Adami F., Cavallero G., Rustichelli R., Virga G., Merlini G.: Association of melphalan and high-dose dexamethasone is effective and well tolerated in patients with AL (primary) amyloidosis who are ineligible for stem cell transplantation. *Blood*. 2004 Apr 15; 103(8):2936-2938.

6. Literaturverzeichnis

PALUMBO ET AL., 2004

Palumbo A., Bringhen S., Petrucci M.T., Musto P., Rossini F., Nunzi M., Lauta V.M., Bergonzi C., Barbui A., Caravita T., Capaldi A., Pregno P., Guglielmelli T., Grasso M., Callea V., Bertola A., Cavallo F., Falco P., Rus C., Massaia M., Mandelli F., Carella A.M., Pogliani E., Liberati A.M., Dammacco F., Ciccone G., Boccadoro M.: Intermediate-dose melphalan improves survival of myeloma patients aged 50 to 70: results of a randomized controlled trial. *Blood*. 2004 Nov 15; 104(10):3052-3057.

PALUMBO ET AL., 2008

Palumbo A., Bringhen S., Liberati A.M., Caravita T., Falcone A., Callea V., Montanaro M., Ria R., Capaldi A., Zambello R., Benevolo G., Derudas D., Dore F., Cavallo F., Gay F., Falco P., Ciccone G., Musto P., Cavo M., Boccadoro M.: Oral melphalan, prednisone, and thalidomide in elderly patients with multiple myeloma: updated results of a randomized controlled trial. *Blood*. 2008 Oct 15; 112(8):3107-3114. doi: 10.1182/blood-2008-04-149427.

PEI ET AL., 2004

Pei X.Y., Dai Y., Grant S.: Synergistic induction of oxidative injury and apoptosis in human multiple myeloma cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitors. *Clin Cancer Res*. 2004; 10:3839-3852.

PRINCE ET AL., 2009

Prince H.M., Bishton M.J., Harrison S.J.: Clinical studies of histone deacetylase inhibitors. *Clin Cancer Res* 2009; 15:3958-3969.

QIAN ET AL., 2004

Qian D.Z., Wang X., Kachhapa S.K., Kato Y., Wei Y., Zhang L., Atadja P., Pili R.: The histone deacetylase inhibitor NVP-LAQ824 inhibits angiogenesis and has a greater antitumor effect in combination with the vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222584. *Cancer Res*. 2004 Sep 15; 64(18):6626-6634.

RAAB ET AL., 2009

Raab M.S., Podar K., Breitkreutz I., Richardson P.G., Anderson K.C.: Multiple myeloma. *Lancet*. 2009; 374:324-339.

RAJKUMAR ET AL., 2011

Rajkumar S.V., Kyle R.A., Connor R.F.: Pathobiology of multiple myeloma. Uptodate version 19.2 (www.uptodate.com) 2011.

6. Literaturverzeichnis

RASSOW ET AL., 2006

Rassow J., Hauser K., Netzer R., Deutzmann R.: *Duale Reihe Biochemie*, 1. Auflage. Stuttgart: Thieme 2006. ISBN 3-13-125351-7.

RICHARDSON ET AL., 2008

Richardson P., Mitsiades C., Colson K., Reilly E., McBride L., Chiao J., Sun L., Ricker J., Rizvi S., Oerth C., Atkins B., Fearen I., Anderson K., Siegel D.: Phase I trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in patients with advanced multiple myeloma. *Leuk Lymphoma*. 2008; 49:502-507.

RICHARDSON ET AL., 2010

Richardson P.G., Weber D.M., Mitsiades C.S., Dimopoulos M.A., Harousseau, Howe J., Graef T., Byrne C., Anderson K.C., Siegel D.S. Phase I study of combined vorinostat (V), lenalidomide (L), and dexamethasone (D) in patients (pts) with relapsed or refractory multiple myeloma (MM). (Abstract #8031) *American Society of Hematology Annual Meeting Abstracts*. 46th annual meeting. 2010, Seite 70.

RICHARDSON ET AL., 2012

Richardson P.G., Siegel D., Baz R., Kelley S.L., Munshi N.C., Laubach J., Sullivan D., Alsina M., Schlossman R., Ghobrial I.M., Doss D., Loughney N., McBride L., Bilotti E., Anand P., Nardelli L., Wear S., Larkins G., Chen M., Zaki M., Jacques C., Anderson K.C.: Phase I study of pomalidomide MTD, safety and efficacy in patients with refractory multiple myeloma who have received lenalidomide and bortezomib. *Blood*. 2013 Mar 14; 121(11):1961-1967.

RÖSSIG ET AL., 2002

Rössig L., Li H., Fisslthaler B., Urbich C., Fleming I., Förstermann U., Zeiher A.M., Dimmeler S.: Inhibitors of histone deacetylation downregulate the expression of endothelial nitric oxide synthase and compromise endothelial cell function in vasorelaxation and angiogenesis. *Circ Res*. 2002 Nov 1; 91(9):837-844.

ROSINOL ET AL., 2008

Rosiñol L., Pérez-Simón J.A., Sureda A., de la Rubia J., de Arriba F., Lahuerta J.J., González J.D., Díaz-Mediavilla J., Hernández B., García-Frade J., Carrera D., León A., Hernández M., Abellán P.F., Bergua J.M., San Miguel J., Bladé J.: A prospective PETHEMA study of tandem autologous transplantation versus autograft followed by reduced-intensity conditioning allogeneic transplantation in newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*. 2008 Nov 1; 112(9):3591-3. doi: 10.1182/blood-2008-02-141598.

ROUSSEL 1999

Roussel M.F.: The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene*. 1999; 18:5311-5317.

RUEFLI ET AL., 2001

Ruefli A.A., Ausserlechner M.J., Bernhard D., Sutton V.R., Tainton K.M., Kofler R., Smyth M.J., Johnstone R.W.: The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98:10833-10838.

SAN MIGUEL ET AL., 2008

San Miguel J.F., Schlag R., Khuageva N.K., Dimopoulos M.A., Shpilberg O., Kropff M., Spicka I., Petrucci M.T., Palumbo A., Samoilova O.S., Dmoszynska A., Abdulkadyrov K.M., Schots R., Jiang B., Mateos M.V., Anderson K.C., Esseltine D.L., Liu K., Cakana A., van de Velde H., Richardson P.G.: Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2008 Aug 28; 359(9):906-917.

SARBASSOV ET AL., 2005

Sarbassov D.D., Ali S.M., Sabatini D.M.: Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol*. 2005; 17:596-603.

SAVAGE ET AL., 1982

Savage D.G., Lindenbaum J., Garret T.J.: Biphasic pattern of bacterial infection in multiple myeloma. *Ann Intern Med*. 1982 Jan; 96(1):47-50.

SCHEY ET AL., 2004

Schey S.A., Fields P., Bartlett J.B., Clarke I.A., Ashan G., Knight R.D., Streetly M., Dalglish A.G.: Phase I study of an immunomodulatory thalidomide analog, CC-4047, in relapsed or refractory multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2004 Aug 15; 22(16):3269-3276.

SHAIN ET AL., 2000

Shain K.H., Landowski T.H., Dalton W.S.: The tumor microenvironment as a determinant of cancer cell survival: a possible mechanism for de novo drug resistance. *Current Opinion in Oncology* 2000 Nov; 12(6):557-563.

6. Literaturverzeichnis

SHARMA ET AL., 2009

Sharma S., Kelly T.K., Jones P.A.: Epigenetics in Cancer. *Carcinogenesis* 2010 Jan; 31(1):27-36.

SHARMA ET AL., 2010

Sharma V., Koul N., Joseph C., Dixit D., Ghosh S., Sen E.: HDAC inhibitor, scriptaid, induces glioma cell apoptosis through JNK-activation and inhibitors telomerase activity. *J Cell Mol Med.* 2010 Aug; 14(8):2151-2161.

SHIMONI ET AL. 2010

Shimoni A., Hardan I., Ayuk F., Schilling G., Atanackovic D., Zeller W., Yerushalmi R., Zander A.R., Kroger N., Nagler A.: Allogenic hematopoietic stem-cell transplantation with reduced-intensity conditioning in patients with refractory and recurrent multiple myeloma: long-term follow-up. *Cancer.* 2010 Aug 1; 116(15):3621-30.

SIEGEL ET AL., 2012

Siegel D.S., Martin T., Wang M., Vij R., Jakubowiak A.J., Lonial S., Trudel S., Kukreti V., Bahlis N., Alsina M., Chanan-Khan A., Buadi F., Reu F.J., Somlo G., Zonder J., Song K., Stewart A.K., Stadtmauer E., Kunkel L., Wear S., Wong A.F., Orlowski R.Z., Jagannath S.: A phase 2 study of single-agent carfilzomib (PX-171-003-A1) in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood.* 2012 Oct 4; 120(14):2817-2825. doi: 10.1182/blood-2012-05-425934.

SONG ET AL., 2005

Song J., Noh J.H., Lee J.H., Eun J.W., Ahn Y.M., Kim S.Y., Lee S.H., Park W.S., Yoo N.J., Lee J.Y., Nam S.W.: Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS.* 2005 Apr; 113(4):264-268.

STREETLY ET AL., 2008

Streetly M.J., Gyertson K., Daniel Y., Zeldis J.B., Kazmi M., Schey S.A.: Alternate day pomalidomide retains anti-myeloma effect with reduced adverse events and evidence of in vivo immunomodulation. *Br J Haematol.* 2008 Apr; 141(1):41-51.

SUBRAMANIAN ET AL., 2005

Subramanian C., Opiari A.W., Bian X., Castle V.P., Kwok R.P.: Ku70 acetylation mediates neuroblastoma cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Mar 29; 102(13):4842-4847.

6. Literaturverzeichnis

TRICOT 2000

Tricot G.: New insights into role of microenvironment in multiple myeloma. *Lancet*. 2000 Jan; 355:248.

VEDIN ET AL., 2003

Verdin E., Dequiedt F., Kasler H.G.: Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet* 2003;19:286–93.

YANG ET AL., 2003

Yang X.J., Seto E.: Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression. *Curr Opin Genet Dev*. 2003 Apr;13(2):143-53.

YANG ET AL., 2004

Yang X-J.: The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic Acids Res*. 2004 Feb 11; 32(3):959-976.

YOO ET AL., 2006

Yoo C.B., Jones P.A.: Epigenetic therapy of cancer: past, present, future. *Nat Rev Drug Discov*. 2006 Jan; 5(1):37-50.

YOSHIDA ET AL., 1990

Yoshida M., Masako K., Akita M., Beppu T.: Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by Trichostatin A. *The journal of biological chemistry*. 1990: Vol. 265, No. 28, Issue of October 5, PI, 17174-17179.

VANINNI ET AL., 2004

Vannini A., Volpari C., Filocamo G., Casavola E.C., Brunetti M., Renzoni D., Chakravarty P., Paolini C., De Francesco R., Gallinari P., Steinkühler C., Di Marco S.: Crystal structure of a eukaryotic zinc-dependent histone deacetylase, human HDAC8, complexed with a hydroxamic acid inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Oct 19; 101(42):15064-9.

VILLAR ET AL., 2004

Villar A., Esteller M.: Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents. *Int. J. Cancer*: 112, 171–178 (2004).

WAXMAN ET AL., 2010

Waxman A.J., Mink P.J., Devesa S.S., Anderson W.F., Weiss B.M., Kristinsson S.Y., McGlynn K.A., Landgren O.: Racial disparities in incidence and outcome in multiple myeloma: a

6. Literaturverzeichnis

population-based study. *Blood* 2010; 116:5501.

YANG ET AL., 2003

Yang X.J., Seto E.: Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression. *Curr Opin Genet Dev.* 2003 Apr; 13(2):143-53.

YU ET AL., 2002

Yu X., Guo Z.S., Marcu M.G., Neckers L., Nguyen D.M., Chen G.A., Schrupp D.S.: Modulation of p53, ErbB1, ErbB2, and Raf-1 expression in lung cancer cells by depsipeptide FR901228. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Apr 3; 94(7):504-513.

ZHANG ET AL., 2010

Zhang S., Suvannasankha A., Crean C.D., White V.L., Chen C.S., Farag S.S.: The novel histone deacetylase inhibitor, AR-42, inhibits gp130/Stat3 pathway and induces apoptosis and cell cycle arrest in multiple myeloma cells. *Int J Cancer.* 2010.

ZHU ET AL., 2004

Zhu P., Martin E., Mengwasser J., Schlag P., Janssen K.P., Göttlicher M.: Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2004 May; 5(5):455-63.

ZÖLLINGER ET AL., 2008

Zöllinger A., Stuhmer T., Chatterjee M., Gattenlohner S., Haralambieva E., Muller-Hermelink H.K., Andrulis M., Greiner A., Wesemeier C., Rath J.C., Einsele H., Bargou R.C.: Combined functional and molecular analysis of tumor cell signaling defines 2 distinct myeloma subgroups: Akt-dependent and Akt-independent multiple myeloma. *Blood.* 2008; 112:3403-3411.

7 Abkürzungsverzeichnis

4E-BP-1	4E-binding protein-1
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata
ATCC	American type culture collection
Bad	Bcl-2-associated death promoter
BAX	Bcl-2 associated X-Protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-XL	B-cell lymphoma-extra large
Bim	B-cell lymphoma 2 interacting mediator of cell death
BMMC	bone marrow mononuclear cells
Cdc	cell division cycle
Cdk	cyclin-dependent kinase
CI	Kombinations-Index
CR	complete remission
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EC/EC-H:	elektronenbindender Reaktionspartner in der Atmungskette
ECL-Lösung	enhanced chemiluminescence-Lösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA-Reader	enzyme linked immunosorbent assay-Reader
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
IGF 1	insulin-like growth factor 1
I κ B	I-kappa-B
IL-6	Interleukin-6
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
Mcl-1	myeloid cell leukemia sequence 1

7. Abkürzungsverzeichnis

M-CSF	macrophage-colony-stimulating factor
MGUS	monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz
Mot1/min	Drehzahl des Motors beim Schüttler
M-Phase	Mitosephase
M-TBS-T	Magermilchpulver - TRIS buffered saline - Tween20
mTOR	mammalian target of rapamycin
Na ₃ VO ₄	Sodium orthovanadate
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NaF	Natriumfluorid/ Sodiumfluorid
NP-40	Nonidet P-40
P70S6K	p70-ribosomal S6 kinase
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3 Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Raf	rapidly growing fibrosarcoma / rat fibrosarcoma
Rb	Retinoblastom-Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Rounds per Minute
RPMI-1640	Zellkulturmedium („Roswell Park Memorial Institute“ – 1640)
RS	mitochondriales Succinat-Tetrazolium-Reduktase-System
SDF-1	stromal-derived factor-1
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis
S-Phase	Synthesephase
TBS	TRIS buffered saline
TBS-T	TRIS buffered saline-Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	vascular endothelial growth factor
WST-1	water soluble tetrazolium-1

8 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1-1: Strukturformel von CR2408	7
Abbildung 1-2: Vergleich der IC50 Werte des neuen (H)DAC-Inhibitors CR2408 mit den Werten von SAHA zur Inhibition der Histondeacetylasen 1-11	8
Abbildung 2-1: Spaltung des Tetrazolium Salzes WST-1 zu Formazan.....	12
Abbildung 2-2: Vergleich BrdU mit Thymidin.....	13
Abbildung 2-3: Durchflusszytometrische Bestimmung von gesunden Zellen, Zellen in der frühen Apoptosephase und in der späten Apoptosephase	15
Abbildung 3-1: CR2408 induziert eine vermehrte Acetylierung von Histon4.....	23
Abbildung 3-2: CR2408 inhibiert das Zellwachstum der Myelomzelllinien NCI-H929, OPM-2, RPMI-8226 und U266.....	24
Abbildung 3-3: CR2408 induziert Apoptose in den Myelomzelllinien NCI-H929, OPM-2, RPMI-8226 und U266	25
Abbildung 3-4: CR2408 induziert Apoptose in primären Myelomzellen	26
Abbildung 3-5: CR2408 induziert in geringem Maße Apoptose bei mononukleären Zellen (PMCs) gesunder Probanden.....	27
Abbildung 3-6: CR2408 aktiviert Caspasen in den Myelomzelllinien NCI und OPM2.....	28
Abbildung 3-7: CR2408 hemmt die Proliferation der Myelomzelllinien OPM-2, RPMI-8226 und U266	29
Abbildung 3-8: CR2408 induziert einen Zellzyklusarrest (Apoptose) in den Myelomzelllinien NCI-H929, OPM-2, RPMI-8226 und U266.....	31
Abbildung 3-9: CR2408 hemmt Cycline, Cdks und die Phosphorylierung von Rb	33
Abbildung 3-10: CR2408 fördert die Expression von Bim und pJNK und hemmt Bcl-XL, P70S6K, 4E-BP-1 und Akt.....	34
Abbildung 3-11: CR2408 hemmt das zytokinabhängige Zellwachstum.....	36
Abbildung 3-12: CR2408 hemmt das Knochenmarkstromamedium-induzierte Zellwachstum in den Zelllinien OPM-2 und RPMI-8226.....	38
Abbildung 3-13: CR2408 wirkt synergistisch bzw. additiv mit Bortezomib.....	40
Abbildung 3-14: Tabelle zum Synergismusversuch mit Bortezomib	41
Abbildung 3-15: CR2408 wirkt synergistisch bzw. additiv mit Doxorubicin.....	43
Abbildung 3-16: Werte zum Synergismusversuch mit Doxorubicin.....	44

9 Anhang

9.1 Verwendete Materialien und Geräte

9.1.1 Zellkultur

Kurzbezeichnung	Bestellnummer	Hersteller
NCI-H929	ACC 163	DSMZ, Braunschweig, D
OPM2	ACC 50	DSMZ, Braunschweig, D
RPMI – 8226	ACC 402	DSMZ, Braunschweig, D
U266	ACC 9	DSMZ, Braunschweig, D
HS-5	CRL-11882	ATCC, Manassas, USA
RPMI – 1640	BE12 – 702F	Lonza, Basel, CH
PBS	20012-068	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, D
FCS	16170 – 078	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, D
Flask 25 cm ²	353.014	BD Falcon, Heidelberg, D
Flask 75 cm ²	353.136	BD Falcon, Heidelberg, D
Flask 175 cm ²	353.118	BD Falcon, Heidelberg, D
Pipette 2ml	86.1252.001	Sarstaedt, Nümbrecht, D
Pipette 5ml	86.1253.001	Sarstaedt, Nümbrecht, D
Pipette 10ml	86.1254.001	Sarstaedt, Nümbrecht, D
Pipette 25ml	86.1685.001	Sarstaedt, Nümbrecht, D
Pipetus-Akku	-	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Cell Scraper 25cm	353.086	BD Falcon, Heidelberg, D
Cell Scraper 40cm	353.087	BD Falcon, Heidelberg, D
Trypanblaulösung	15250-061	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, D
Neubauer Zählkammer	-	Sarstaedt, Nümbrecht, D
Röhrchen 15ml	62.554.502	Sarstedt, Nümbrecht, D
Röhrchen 50ml	62.547.254	Sarstedt, Nümbrecht, D

9. Anhang

6-well-plates	353.453	BD Falcon, Heidelberg, D
24-well-plates	353.047	BD Falcon, Heidelberg, D
96-well-plates	CLS 3596	Corning Costar, Corning, USA

9.1.2 Zytostatika

Name	Bestellnummer	Firma
Velcade (Bortezomib)	-	Janssen Cilag, Neuss, D
Doxorubicin	42D011	Pharmacia, Erlangen, D

9.1.3 Antikörper für die Westernblotanalyse

9.1.3.1 Primärantikörper

Antikörper	Bestellnummer	Firma
4EBP1	#9452	CellSignaling, Frankfurt/Main, D
Akt	sc-8312	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Aktin	sc-1616	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Anti-Acetylhiston-4	#2591s	CellSignaling, Frankfurt/Main, D
Bad	sc-943	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Bax	sc-493	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Bcl-2	#B46620	CellSignaling, Frankfurt/Main, D
Bcl-XL	#2762	CellSignaling, Frankfurt/Main, D
Bim	sc-11425	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Caspase 3	sc-1226	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Cleaved Caspase 3	#9661	CellSignaling, Frankfurt/Main, D
Caspase 8	#9746	CellSignaling, Frankfurt/Main, D
Caspase 9	#9502	CellSignaling, Frankfurt/Main, D

9. Anhang

Cdc25A	sc-7389	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Cdc25C	sc-13138	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Cdk2	sc-163	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Cdk4	sc-749	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Cdk6	sc-177	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Cyclin D1	sc-753	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Cyclin D2	sc-754	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Cyclin E	sc-481	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
JNK1	sc-1658	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
Mcl-1	sc-819	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
p21/waf1	sc-397	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
p53	sc-6243	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
p4EBP1	#9455	CellSignaling, Frankfurt/Main, D
P70S6K	#9202	CellSignaling, Frankfurt/Main, D
pP70S6K	#9202S	CellSignaling, Frankfurt/Main, D
pAkt (Threonin)	sc-16646R	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
pAkt (Serin)	sc-7985	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
pJNK	sc-6254	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
pRb	sc-7986	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D

9. Anhang

Rb	sc-102	SantaCruz Biotechnology, Heidelberg, D
----	--------	---

9.1.3.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Bestellnummer	Firma
Schwein Anti-Kaninchen Ig/ HRP	P0217	Dako , Carpinteria, USA
Kaninchen Anti-Ziege Ig/ HRP	P0449	Dako, Carpinteria, USA
Kaninchen Anti-Maus Ig/ HRP	P0161	Dako, Carpinteria, USA

9.1.4 Enzyme

Enzym	Bestellnummer	Firma
Trypsin- EDTA	T3924	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
RNase A	10 109 169 001	Roche, Mannheim, D

9.1.5 Chemikalien

Substanz	Bestellnummer	Firma
ECL	RPN2106	Amersham, Little Chalfont, UK
AnnexinV-FITC	AnnexinV01-3	Invitrogen, Karlsruhe, D
WST-1	11644807001	Roche, Penzberg, D
Marker: Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards	161-0375EDU	Bio-Rad, München, D
Bio-Rad Protein Assay DyenReagent Concentrate	500-0006	Bio-Rad, München, D
Propidiumiodid	537059	Calbiochem/ Merck, Darmstadt, D
Ficoll Paque	17-1440-03	Amersham, Little Chalfont, UK
PMSF	93482	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Leupeptin	L2884	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
EDTA	351-027-100	Quality Biological, Inc.

9. Anhang

		Gaithersburg, USA
Aprotinin	A6279	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Tween 20	P7949	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Acrylamid/Bis (30% (37.5:1))	161-0158	Bio-Rad, München, D
APS	161-0700	Bio-Rad, München, D
TEMED	161-0800	Bio-Rad, München, D
NP-40	74385	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D

9.1.6 Weitere Westernblot Artikel

Artikel	Bestellnummer	Firma
Mini-PROTEAN-Comb, 10 wells, 1mm	165-3359	Bio-Rad, München, D
Spacer Plates	165-3311	Bio-Rad, München, D
Schwämme, 8 x 11cm	170-3933	Bio-Rad, München, D
SDS-PAGE Standards, broad range	161-0318	Bio-Rad, München, D
Immobilon-P PVDF Membran	IPVH00010	Millipore, Schwalbach, D
Kodak Biomax XAR- 5.165.1454 Film	F5513	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
NaCl	S7581	Mallinckrodt, Hazelwood, USA
NaF	S1504	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Na ₃ VO ₄	S6508	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Tris, pH 7,5 1M	351-006-100	Quality Biological, Inc. Gaithersburg, USA

9.1.7 Geräte

Gerät	Bestellnummer/Bezeichnung	Firma
Durchflusszytometer	Epics CL System II, Version 3.0	BeckmanCoulter, Miami, USA
Elektrophoreseset	Ready Gel Cell	Bio-Rad, München, D

9. Anhang

Power Pac	164-5050	Bio-Rad, München, D
BioFuge	75005181	Heraeus instruments, Osterode, D
Biophotometer	-	Eppendorf, Hamburg, D
Brutschrank	Serie II 3110	Forma Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge	Sigma-Aldrich 4K1	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Zentrifuge	Rotina 46R	Hettich GmbH &Co.KG, Tuttlingen, D
Elisa Reader	Mithras	Berthold, Bad Wildbad, D

9.2 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

In vitro Studien zur Effektivität des neuen Pan-Deacetylase-Inhibitors CR2408 beim Multiplen Myelom

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 18.03.2013

Carmen Junghanns

9.3 Danksagungen

Ich möchte Prof. Dr. med. Ralf Schmidmaier für die freundliche Übernahme der Doktorvaterschaft danken,

Dr. med. Philipp Baumann für die gute Betreuung,

Laura Schneider, Felix Meinel und Hilke Hagemeyer für die unendlich wertvolle und geduldige Hilfestellung bei zahlreichen Versuchen,

Sebastian Maisenbacher für die großartige Unterstützung in so vielen Aspekten.