

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Auswirkungen einzelner und kombinierter Inhibition von GRP78
und p97 auf die Unfolded Protein Response beim
Multiplen Myelom

von Leonard Michael Glück

aus Berlin

München 2021

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

Angefertigt am Institut für Translationale Onkologie des
Universitätsklinikums Würzburg

Mentorin: Dr. rer. nat. Daniela Brännert

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Ralf Müller

Tag der Promotion: 06.02.2021

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	2
1.	Das Multiple Myelom.....	2
1.1.	Definition	2
1.2.	Forschungsgeschichte	2
1.3.	Epidemiologie	3
1.4.	Vorstufen.....	3
1.5.	Symptome	5
1.6.	Diagnostik	5
1.7.	Therapie	7
1.8.	Das Multiple Myelom in der Tiermedizin	8
2.	Das endoplasmatische Retikulum.....	9
2.1.	Unfolded Protein Response / ERAD / Proteasom.....	10
2.1.1.	UPR.....	10
2.1.2.	ERAD.....	11
2.1.1.	Proteasom.....	11
2.2.	GRP78.....	12
2.2.1.	Co-Chaperone	13
2.2.2.	Lokalisation.....	13
2.2.3.	Regulation des Kalziumhaushaltes	13
2.2.4.	Funktionen im ER-Stress	14
3.	ER-Stress Signaling Panel.....	14
3.1.	PERK	15
3.2.	eIF2 α	15
3.3.	ATF4	16
3.4.	IRE1 α	16
3.5.	XBP1	17
3.6.	SAPK / JNK	18
3.7.	P62 / SQSTM1	18
3.8.	Beclin-1	19
3.9.	LC3.....	19
3.10.	ATF6	20
3.11.	GRP94	20
3.12.	HSP72	21
4.	Die UPR im therapeutischen Kontext	21
4.1.	Bortezomib.....	21
4.2.	Carfilzomib	21
4.3.	Ixazomib.....	22

4.4.	Panobinostat	22
4.5.	CB-5083	23
4.6.	AR-12	24
4.7.	VER155008.....	26
4.8.	PAT-SM6	27
III.	ZIELSETZUNG	28
IV.	MATERIAL.....	30
1.	Zelllinien	30
1.1.	JJN3.....	30
1.2.	AMO1	30
1.3.	AMO1R65CAR	30
1.4.	AMO1R180IXA.....	30
2.	Durchflusszytometrie.....	31
3.	Elektroporation	31
4.	Zellkultur	32
5.	Zellyse und Proteinbestimmung	33
6.	SDS-PAGE / Western Blot und Entwicklung.....	34
7.	Primärantikörper.....	37
8.	Sekundärantikörper.....	38
9.	Zellzyklusmessung	38
10.	Alamar-Blau Messungen	38
11.	Pharmakologische Inhibitoren.....	38
12.	Software	39
V.	METHODEN	40
1.	Zellkultur	40
2.	Durchflusszytometrie.....	41
3.	Viabilitätsversuche - Einzelansätze	44
4.	Viabilitätsversuche - Kombinationsansätze.....	45
5.	Elektroporation	46
6.	Proteinanalyse	47
6.1.	Vorbereitung der Versuchsansätze.....	47
6.2.	Zellyse und Lowry-Test.....	48
6.3.	SDS-PAGE.....	49
6.4.	Western Blot	50

6.5.	Antikörper-Inkubation	51
6.6.	Entwicklung	51
7.	Metabolismusversuche	52
8.	Aufreinigung von Primärmaterial	54
9.	Zellzyklusanalyse	55
VI.	ERGEBNISSE	57
1.	GRP78 Expression in Primärmaterial	57
2.	AR-12 – GRP78-Inhibition	57
2.1.	Effekt von GRP78-Inhibition und PDK-1-Inhibition auf den Metabolismus	57
2.2.	Auswirkung von GRP78-Inhibition auf den Zellzyklus nach 24-stündiger Inkubation	59
2.3.	Auswirkungen der GRP78-Inhibition und PDK-1 Inhibition auf die Viabilität	60
2.4.	Auswirkung von AR-12 auf die UPR von Myelomzelllinien.....	62
2.5.	Auswirkung von AR-12 auf die UPR von Primärmaterial	65
3.	CB-5083 – p97-Inhibition	66
3.1.	Auswirkung von p97-Inhibition auf den Zellmetabolismus	66
3.2.	Effekt von p97-Inhibition auf den Zellzyklus	67
3.3.	Auswirkung von p97-Inhibition auf die Zellviabilität	69
3.4.	Auswirkung der p97-Inhibition auf die UPR	70
3.5.	Vergleich von p97-Inhibition bei gleichzeitigem GRP78- <i>Knockdown</i> und p97-Inhibition ohne GRP78- <i>Knockdown</i> auf die UPR	79
4.	Kombination von AR-12 und CB-5083	85
4.1.	Effekt von kombinierter p97-Inhibition und GRP78-Inhibition auf den Zellmetabolismus.. ..	85
4.2.	Auswirkung von kombinierter p97-Inhibition und GRP78-Inhibition auf die Zellviabilität.	86
4.3.	Auswirkung von einzelner und kombinierter Inhibition von GRP78 und p97 auf die Viabilität von Primärmaterial.....	89
5.	Vergleich mit weiteren UPR-induzierenden Substanzen	89
5.1.	Vergleich der Auswirkung von AR-12, PAT-SM6 und VER155008 auf die UPR von MM-Zelllinien.....	90
5.2.	Vergleich der Auswirkung von CB-5083, Carfilzomib und Panobinostat auf die UPR von Myelomzelllinien	92
VII.	DISKUSSION	95
1.	GRP78-Inhibition durch AR-12	95
1.1.	AR-12 induziert S-Phasen-Arrest in AMO1 Zellen.....	95
1.2.	AR-12 wirkt apoptotisch auf MM-Zelllinien.....	96
1.3.	AR-12 induziert Autophagie in MM Zellen	99

1.4.	AR-12 aktiviert den PERK-Signalweg und Autophagie in Primärmaterial	100
2.	P97-Inhibition durch CB-5083.....	101
2.1.	CB-5083 induziert G1-Phasen-Arrest in AMO1-Zelllinien.....	101
2.2.	CB-5083 induziert Autophagie in MM-Zelllinien	102
2.3.	CB-5083 induziert ER-Stress und Apoptose in MM-Zelllinien	102
3.	AR-12 und CB-5083 haben keinen synergistischen Effekt auf AMO1 und JJN3-Zellen	105
4.	AR-12 und CB-5083 haben einen synergistischen Effekt auf Primärmaterial	107
5.	CB-5083 induziert starkes ER-Stress Signaling im Vergleich mit Carfilzomib und Panobinostat	108
6.	AR-12, VER155008 und PAT-SM6 führen nicht zu starkem deutlichem ER-Stress Signaling.....	109
7.	Ausblick.....	110
VIII.	ZUSAMMENFASSUNG	112
IX.	SUMMARY	114
X.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	116
XI.	TABELLENVERZEICHNIS.....	118
XII.	LITERATURVERZEICHNIS.....	119
XIII.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	146
XIV.	DANKSAGUNG.....	148

I. EINLEITUNG

Krebserkrankungen stehen laut WHO-Statistik mit weltweit 9,6 Millionen jährlicher Todesfälle im Jahre 2018 an zweiter Stelle der Liste der häufigsten Todesursachen; etwa ein Sechstel aller Todesfälle weltweit sind auf Krebserkrankungen zurückzuführen (1). Davon machen allein hämatologische Neoplasien annähernd 10 % aus (2). Es existiert eine große Zahl hämatologischer Neoplasien, die hauptsächlich den beiden großen Gruppen der myeloischen und lymphatischen Neoplasien zugeordnet werden können (3, 4).

Das Multiple Myelom (MM), das den lymphatischen Neoplasien zugerechnet wird, stellt die zweithäufigste hämatologische Neoplasie dar; die Genese ist bislang nicht bekannt (5). Es handelt sich um eine bis heute unheilbare Erkrankung, die besonders ältere Menschen betrifft. Das MM ist charakterisiert durch die klonale Expansion von (malignen) Plasmazellen im Knochenmark und durch die erhöhte Bildung von monoklonalen Antikörpern, die sowohl vollständig als auch unvollständig vorliegen können. Durch die Therapie mit Proteasom-Inhibitoren, immunmodulierenden Substanzen und Histon-Deacetylase-Inhibitoren konnte die Überlebenszeit der Patienten in den letzten 15 Jahren deutlich verlängert werden (6). Durch die hohe klonale Heterogenität entstehen allerdings im Therapieverlauf Resistenzen gegen die eingesetzten Wirkstoffe, das MM rezidiert und wird final refraktär. Die Entwicklung neuer Wirkmechanismen in der Pharmakotherapie und der kombinierte Einsatz von Therapeutika sind deshalb notwendig.

Das endoplasmatische Retikulum von Myelomzellen ist aufgrund der hohen Proteinsyntheserate starkem Stress ausgesetzt und daher unter anderem von der *Unfolded Protein Response* (UPR) und der *ER-Associated Protein Degradation* (ERAD) zur Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase abhängig (7-9). Mit dem GRP78-Inhibitor AR-12 und dem p97-Inhibitor CB-5083 kann in diese beiden Anpassungsmechanismen eingegriffen werden.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Das Multiple Myelom

1.1. Definition

Das Myelom ist eine maligne Krebserkrankung des hämatopoetischen Systems. Die Erkrankung wird auch als Plasmozytom oder Morbus Kahler bezeichnet. Da das Myelom häufig an unterschiedlichen Stellen des Körpers auftritt, wird es meistens als Multiples Myelom (MM) bezeichnet. Der Terminus des Plasmozytoms beschreibt einen solitären Tumor aus Plasmazellen und sollte daher nicht äquivalent zu MM verwendet werden. Ursprung des MM sind einzelne, entartete B-Lymphozyten, deren monoklonale Abkömmlinge das Knochenmark infiltrieren und in großer Zahl komplette oder inkomplette Antikörper sowie deren Leichtketten (Bence-Jones-Proteine) produzieren und sezernieren. Trotz großer Fortschritte in den Bereichen Grundlagenforschung, Diagnostik und Therapie des MM, handelt es sich weiterhin um eine ursächlich nicht therapierbare Krebserkrankung (10).

1.2. Forschungsgeschichte

Die erste gut dokumentierte Fallbeschreibung des MM geht auf Samuel Solly zurück, der 1844 den Fall von Sarah Newbury veröffentlichte. Die 39-jährige Sarah Newbury klagte initial über Rückenschmerzen, entwickelte im Laufe der Krankheit eine Reihe weiterer Symptome wie Knochendeformationen sowie pathologische Frakturen und starb vier Jahre nach der Erstvorstellung (11). 1845 beschrieb Henry Bence Jones erstmals die nach ihm benannten Bence-Jones-Proteine (Leichtketten-Immunglobuline), die bei Vorliegen der Erkrankung im Urin ausgeschieden werden und pathognomonisch für das MM sind (12).

Der Begriff *Myelom* wurde 1873 durch v. Rustizky etabliert, der zu dieser Zeit an einem pathologischen Institut in Recklinghausen arbeitete (13). Die unterschiedlichen Klassen von Bence-Jones-Proteinen wurden 1956 von Korngold und Lipari entdeckt, nach denen die beiden Klassen (κ -kappa und λ -lambda) auch benannt wurden (14). 1962 gelang es Edelmann und Gally nachzuweisen, dass Bence-Jones-Proteine auf Antikörper produzierende B-Lymphozyten zurückzuführen sind, womit die Frage des Ursprungs gelöst war (15).

Therapeutische Meilensteine waren die Verwendung der Medikamentenkombination von Melphalan und Prednisolon (16), und der Beginn autologer Knochenmarkstransplantationen in Kombination mit Melphalan-Gabe in der 1980er Jahren (17, 18). In der jüngeren Vergangenheit bedeutete besonders der Beginn des therapeutischen Einsatzes von Thalidomid (1999), Lenalidomid (2002) und Bortezomib (2002) signifikante Erweiterungen der therapeutischen Möglichkeiten (19).

1.3. Epidemiologie

Am Multiplen Myelom sind im Jahr 2016 in Deutschland, gemäß einer Erhebung des Robert Koch-Institutes, 3910 Männer und 3000 Frauen neu erkrankt. Dem gegenüber standen 2243 Sterbefälle unter der männlichen Bevölkerung und 1987 Sterbefälle unter der weiblichen Bevölkerung, wobei die 5-Jahres Überlebensrate bei Frauen und Männern bei 49 % liegt (20). Neuerkrankungen vor dem 45. Lebensjahr sind mit ca. 2 % der Fälle äußerst selten (20). In Europa liegt das mittlere Patientenalter bei der Erstdiagnosestellung gemäß Deutscher Gesellschaft für Hämatologie und Medizinischer Onkologie (DGHO) für Männer bei 72 Jahren und für Frauen bei 74 Jahren (21). Der Median des Gesamtüberlebens (OS) ist in den letzten Jahrzehnten deutlich angestiegen. So lag im Zeitraum von 2001-2006 der OS-Median bei 4,6 Jahren und im Zeitraum von 2006-2010 bereits bei 6,1 Jahren (22). In neueren Kohortenuntersuchungen ist aufgrund der Entwicklung neuer Therapieansätze von einer weiteren Verbesserung des OS-Medians auszugehen.

Das Multiple Myelom ist mit einem Anteil von etwa 10 % die zweithäufigste hämatologische Neoplasie und macht etwa 1 % aller Krebserkrankungen aus (23, 24). Die Ätiologie des MM ist nicht abschließend geklärt. Verschiedene Risikofaktoren wie ionisierende Strahlung, Adipositas, chronische Infektionen oder Exposition gegenüber Pestiziden werden diskutiert, konnten aber noch nicht als Ursache nachgewiesen werden (25).

1.4. Vorstufen

Dem Multiplen Myelom gehen mehrere Stadien voraus. Diese können, müssen sich aber nicht zu einem MM manifestieren. Das früheste Stadium wird als *Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz* (MGUS) bezeichnet. In dieser Phase liegen keine klinischen Symptome vor, wohl aber erhöhte monoklonale

Immunglobulinspiegel, die durch erhöhte klonale Plasmazellproliferationen hervorgerufen werden (26). Nicht selten ist die Diagnose ein Zufallsbefund. Patienten mit MGUS haben ein jährlich um ca. 1 % steigendes Risiko des Übergangs zu einem klinisch manifesten MM (27). Da keine klinische Erkrankung vorliegt, sondern lediglich eine Auffälligkeit von Laborparametern, findet keine Therapie statt. Regelmäßige Kontrollen, insbesondere bei Neuauftreten klinischer Symptome, sind indiziert. Durch weitere genetische Aberrationen wird das zweite Stadium erreicht, das als *Smoldering Myeloma* (SMM) bezeichnet wird (28). Auch beim SMM liegen noch keine klinischen Symptome vor, das Risiko des Übergangs zum MM ist allerdings mit einem jährlichen Anstieg von ca. 10 % deutlich erhöht (27). Sowohl MGUS als auch SMM können noch nach weiteren Kriterien unterteilt werden (29). Das Multiple Myelom stellt die dritte Entwicklungsstufe dar. Es ist gekennzeichnet durch das Auftreten klinisch manifester Symptome und durch das Erfüllen der CRAB-Kriterien (Hyperkalzämie, Niereninsuffizienz, Anämie, Knochenläsionen) (30). Als Spätform des MM kann sich die sekundäre Plasmazell-Leukämie (sPCL) ausbilden. Sie ist gekennzeichnet durch das Vorkommen von mehr als 20 % klonaler Plasmazellen im peripheren Blut (31). MM-Patienten, die eine sPCL entwickeln, haben in der Regel bereits eine lange Krankheitsgeschichte mit einer Vielzahl von Medikamentenzyklen und deshalb in den meisten Fällen nur noch eine kurze mediane Überlebenszeit (32).

Es ist durch den aktuellen Forschungsstand ersichtlich, dass die Entwicklung eines Multiplen Myeloms nicht durch ein eindeutig identifizierbares Ereignis ausgelöst wird, sondern ein sich langsam entwickelnder Prozess ist. Plasmazellen gewinnen im Verlauf der Entwicklung des MM durch die fortdauernde Ansammlung von *genetic hits* an Malignität, was das MM zu einer genetisch hochkomplexen Erkrankung macht (28). *Genetic hits* sind genetische Aberrationen oder Mutationen, die den betroffenen Plasmazellen einen Selektionsvorteil verschaffen, zum Beispiel im Wachstumsverhalten. Die große intraklonale genetische Heterogenität ist auch ein wichtiger Grund für die Malignität der Erkrankung. Die Entwicklung der genetischen Heterogenität ist von Patient zu Patient unterschiedlich, da genetische Aberrationen nicht linear erworben werden und somit unberechenbar auftreten (28). Die damit verbundene Diversität der Subklone führt früher oder später zur Entwicklung und Verbreitung von Zellen, die gegen derzeit eingesetzte Therapeutika Resistenzen aufweisen. Initial gut auf Therapie ansprechende Patienten entwickeln rezidierte und/oder refraktäre

Multiple Myelome (RRMM), die final nicht mehr therapierbar sind und zum Tod der Patienten führen (33).

1.5. Symptome

Die Symptome der Patienten vor der Erstdiagnose sind häufig unspezifisch. Besonders Knochenschmerzen, Müdigkeit, Gewichtsverlust, Anämie und Nierenprobleme werden vor der Erstdiagnose als Vorstellungsgrund angegeben (34).

Diese Symptome sind durch das Verhalten der Myelomzellen zu erklären. Die fokale oder diffuse Infiltration des Knochenmarks bewirkt eine Hemmung der Blutbildung und führt über Osteoklastenaktivierung zu Osteoporose oder Osteolysen. Anämien können zudem durch Nierenschädigungen und damit verbundener reduzierter Erythropoietin-Produktion verursacht werden (35). Die Schädigung der Nieren kann sowohl auf eine Cast-Nephropathie als auch auf eine AL-Amyloidose zurückgeführt werden (36). Übersteigt die Menge der anfallenden monoklonalen Ig-Leichtketten die Rückresorptionskapazität der proximalen Nierentubuli, so werden diese mit dem Urin ausgeschieden und können als die bereits erwähnten Bence-Jones-Proteine labordiagnostisch nachgewiesen werden (37). Häufiger treten auch subfebrile Körpertemperaturen und rezidivierende Infekte auf, was auf eine Myelom-bedingte Leukopenie zurückgeführt werden kann (24).

1.6. Diagnostik

Neben einer gründlichen Anamnese und körperlichen Untersuchung hat besonders die Labordiagnostik für die Klassifizierung des MM eine tragende Rolle (siehe Tabelle 1). Daneben werden bildgebende Methoden, insbesondere die Computertomographie, zur Skelettdiagnostik verwendet. Molekulardiagnostik wird zunehmend verwendet, um die klonalen Entitäten zu bestimmen (24). Labordiagnostisch wichtig für die Diagnose und auch für die Entscheidung zur MM-Therapieeinleitung sind die CRAB und die SLiM Kriterien. CRAB (siehe Tabelle 2) steht hierbei für *Hyper-Calcaemia* (Hyperkalzämie), *Renal insufficiency* (Niereninsuffizienz), *Anemia* (Anämie) und *Bone lesions* (Knochenläsionen). SLiM ist ebenfalls ein Akronym und steht für *Sixty* (60 % monoklonale Plasmazellen im Knochenmark), *Light chain* (Verhältnis von involvierten zu nicht-involvierten Leichtketten ≥ 100), *MRT* (mehr als eine

mindestens 5 mm große, fokale Läsion in Abwesenheit einer Knochenläsion, diagnostiziert durch Magnetresonanztomographie). Die Erfüllung eines der genannten Kriterien in Verbindung mit einem Wert von mindestens 10 % klonaler Plasmazellen im Knochenmark ist bereits eine Indikation zur Therapieeinleitung (30, 38).

Tabelle 1: Darstellung der diagnostischen Möglichkeiten (39)

Laborparameter im Serum	
-	Differentialblutbild, Elektrolyte, Kreatinin, LDH, CRP, β_2 -Mikroglobulinämie
-	Plasmatische Gerinnung, Gesamtprotein, Albumin
-	Serumelektrophorese mit densitometrischer Bestimmung des M-Proteins
-	Quantitative Bestimmung der Immunglobuline (IgG, IgA, IgD)
-	Bestimmung der freien Leichtketten, Immunfixationselektrophorese
Laborparameter im Urin	
-	24 h-Sammelurin, Bestimmung der freien Leichtketten
-	Immunfixationselektrophorese, Albumin
Knochenmarksdiagnostik	
-	Zytologie und Histologie, zytogenetische Analyse (Chromosomenanalyse) zur Erfassung ungünstiger zytogenetischer Aberrationen
Bildgebende Diagnostik	
-	<i>low dose</i> Ganzkörper-Computertomographie
-	Unterstützend Magnetresonanztomographie, ggf. Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

Tabelle 2: Darstellung der CRAB-Kriterien (38)

Hyperkalzämie	Serumkalzium > 0,25 nmol/l über dem oberen physiologischen Grenzwert oder > 2,75 mmol/l
Niereninsuffizienz	Glomeruläre Filtrationsrate < 40 ml/min oder Serumkreatinin > 177 μ mol/l
Anämie	> 2,0 g/dl unter dem unteren physiologischen Grenzwert oder < 10 g/dl
Knochenläsionen	\geq 1 feststellbare Läsion

1.7. Therapie

Die Entscheidung zur Therapieeinleitung orientiert sich am Erkrankungsstadium. Eine Therapie wird bei vorliegendem MGUS nicht, bei bestehendem SMM nur in sehr seltenen Fällen begonnen (38). Dies ist beim SMM der Fall, sofern im Knochenmark mehr als 60 % Plasmazellen vorliegen, auch bei bisher nicht diagnostizierten Endorganschäden. Eine Therapie wird hier eingeleitet, weil etwa 95 % der Patienten aus dieser Gruppe innerhalb von zwei Jahren ein klinisch manifestes MM entwickeln (40).

Die Therapieansätze und Therapiemöglichkeiten unterscheiden sich grundsätzlich nach Alter, Körperkondition und Vorerkrankungen der Patienten. Außerdem werden unterschiedliche Regime angewandt, je nachdem ob es sich um eine Erstlinientherapie handelt oder ob bereits ein oder mehrere Rezidive der Erkrankung aufgetreten sind (41). Die Erstlinientherapie bei Patienten, die für eine autologe Stammzelltransplantation (ASZT) geeignet sind, beginnt mit einer Kombinationstherapie aus dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib und dem Steroid Dexamethason, auch in Kombination mit den Immunmodulatoren Thalidomid oder Lenalidomid oder dem Zytostatikum Cyclophosphamid (42). Im Anschluss wird eine Hochdosis-Chemotherapie mit Melphalan (100-200 mg/m²) durchgeführt und daraufhin die ASZT vorgenommen (43). Die Induktionstherapie und die Chemotherapie sollen die Tumorzelllast auf ein Minimum senken und das Knochenmark der Patienten zerstören. Die ASZT wird im Anschluss mit von den Patienten über eine Leukaphrese gewonnenen Stammzellen durchgeführt, die nach der Induktionstherapie entnommen wurden (44). Eine zweite ASZT im Anschluss kann für die Patienten von Nutzen sein, ist in Deutschland aktuell aber kein Standard (45). Eine Alternative zur ASZT stellt die allogene Stammzelltransplantation dar. Dabei werden den Patienten Stammzellen eines HLA (Humanes Leukozyten-Antigen) identischen Spenders transplantiert. Über den *Graft-versus-Myeloma* Effekt kann eine nachhaltige Remission erreicht werden, allerdings kann die Sterblichkeit bedingt durch den *Graft-versus-Host* Effekt bedeutend höher sein (46).

Nach erfolgter ASZT wird eine Erhaltungstherapie mit Bortezomib und / oder Lenalidomid durchgeführt, mit der eine Verlängerung der progressionsfreien Zeit erreicht werden kann (10, 47). Im Rahmen der Zweit- oder Drittlinientherapie nach Rezidiv kommen, neben bereits in der Erstlinientherapie verwendeten

Medikamenten, neuere Proteasom-Inhibitoren wie Carfilzomib oder Ixazomib, der Anti-CD-38 Antikörper Daratumumab oder der Anti-SLAMF7-Antikörper Elotuzumab zum Einsatz. Es sind unterschiedlichste Therapieregime möglich, die auf den einzelnen Patienten individuell angepasst werden können.

1.8. Das Multiple Myelom in der Tiermedizin

Das MM ist eine in der Tiermedizin präsente Erkrankung, dennoch ist die Studienlage nicht eindeutig und unvollständig. Meist handelt es sich um Studien mit sehr niedrigen Fallzahlen, Einzelfallberichte oder retrospektive Studien.

So variieren die angegebenen Prävalenzen bei Hunden zwischen 0,3 % bis 8 % aller hämatologischen Neoplasien (48-50). Einen weiteren Hinweis auf die Prävalenz des MM bei Hunden bietet die Analyse der Computertomographie-Daten der Tierklinik AniCura Aachen. Dabei wurden innerhalb von 13 Monaten 134 Hunde aufgrund von Rückenbeschwerden computertomographisch untersucht. 18 von 134 Hunden zeigten maligne Wirbeltumore, darunter neun Hunde, bei denen ein Myelom diagnostiziert wurde (51). Bei Katzen ist die Prävalenz geringer. Das MM macht hier ca. 1,9 % aller hämatopoetischen Neoplasien aus, ohne erkennbare Prädispositionen für Rasse oder Geschlecht (52). Auch bei Equiden wurde das MM mittlerweile nachgewiesen, wenn auch in sehr geringer Zahl (49). Ein wichtiger Grund für die relativ niedrigen Fallzahlen könnte dabei die für die Tiermedizin noch ungewohnten diagnostischen Methoden wie Serumelektrophorese oder PET sein. Damit geht die hohe Bandbreite und fehlende Spezifität der auftretenden Symptome des MM, fehlendes Wissen über die Erkrankung und Kosten der Diagnostik und Therapie einher (49).

Auch in der Tiermedizin ist das MM vornehmlich eine Erkrankung des älteren Lebewesens, genaue Ursachen wurden ebenfalls noch nicht nachgewiesen (50, 53). Beim Hund sind IgA und IgG Myelome etwa gleich verteilt, bei Katze und Pferd dominieren IgG Myelome (49) Das MM von Hund und Katze ähnelt dabei in Symptomatik und Diagnostik dem MM des Menschen. Lethargie, Übelkeit, Anämie, Hyperkalzämie, osteolytische Läsionen, Bence-Jones Proteinurie und Anämie werden ebenfalls beobachtet (48, 52).

Die Diagnostik kann sich auf Röntgenaufnahmen, Sonographien, Elektrophorese, Knochenmarksbiopsie und Blutbildanalyse erstrecken. Hunde werden üblicherweise mit Melphalan in Kombination mit Prednison oder Prednisolon

behandelt, bei dieser Therapie wurde eine mediane Überlebenszeit von 540 Tagen beobachtet (50). Therapieprotokolle mit L-Asparaginase, Vincristin, Prednison, Doxorubicin und Melphalan wurden ebenfalls erfolgreich verwendet (53). Die tiermedizinische Verwendung von immunmodulatorisch wirksamen Substanzen, Stammzelltransplantationen, Proteasom-Inhibitoren oder Antikörpertherapien wurden in der Literatur bislang noch nicht beschrieben.

Durch weitere Fortschritte in der Tiermedizin ist zu erwarten, dass auch das MM in der Tiermedizin stärker in den Fokus rückt. Da die Erkrankung von sehr ähnlicher Gestalt wie beim Menschen ist, treten auch in der Tiermedizin refraktäre oder resistente Myelome auf (48). Medizinischer Fortschritt aus der Humanmedizin gelangt häufig, wenn auch teilweise mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung, in die Tiermedizin und kommt der Gesundheit der Patienten zugute.

2. Das endoplasmatische Retikulum

Beim MM spielt das endoplasmatische Retikulum (ER) eine zentrale Rolle, da die Myelomzellen, bedingt durch die hohe Proteinsyntheserate, von der Funktion des ER abhängig sind (8).

Das endoplasmatische Retikulum ist eine perinukleäre Zellorganelle, die der Synthese und der Faltung von sekretorischen Proteinen und Membranproteinen dient. Diese machen ein Viertel der Zellproteine aus (54). Die Struktur des ER ähnelt einem weit verzweigten System aus Röhren und Zisternen, das von der Membran des ER umgeben wird (55).

Im ER finden post-translationale Modifikationen, oxidative Faltungen und Reifungsvorgänge statt. Außerdem ist das ER als intrazellulärer Kalziumspeicher wesentlich an Prozessen der Signaltransduktion beteiligt (56). Da diese Vorgänge fehleranfällig sind, bedarf es der Chaperone und ihrer Co-Faktoren. Chaperone sind Hilfsproteine und nicht dauerhafter Teil des Proteins, bei dessen Faltung sie Hilfestellung leisten (57). Im ER kommen hauptsächlich zwei Chaperonfamilien vor. Erstens die Lektinchaperone, namentlich Calnexin und Calreticulin, die im Allgemeinen unvollständig gefaltete, glykosylierte Proteine erkennen, und zweitens die GRP-Chaperone (58). Bei Letzteren sind hauptsächlich GRP78 (*Glucose-regulated Protein 78*) / BiP (*Binding immunoglobulin Protein*) aus der HSP70 Familie und GRP94 aus der HSP90 Familie maßgeblich (59). GRP78 kann

sowohl mit glykosylierten als auch mit nicht-glykosylierten Proteinen interagieren (60).

2.1. Unfolded Protein Response / ERAD / Proteasom

2.1.1. UPR

Stress durch fehl- oder nicht gefaltete Proteine im endoplasmatischen Retikulum ist ein hervorstechendes Merkmal von Zellen, die auf Sezernierung spezialisiert sind. Eine Imbalance der Proteinbildung und -degradation kann zu einer Akkumulation von nicht- oder fehlgefalteten Proteinen im ER führen, die als ER-Stress bezeichnet wird (60). Akuter ER-Stress wird durch die Aktivierung der *Unfolded Protein Response* (UPR) gedämpft (61). Es handelt sich bei der UPR daher um einen zellulären Anpassungsmechanismus, der sich als Antwort auf ER-Stress ergibt. ER-Stress kann beispielsweise durch eine veränderte intraluminale Kalziummenge, Infektionen, eine Störung der Proteinglykosylierung oder eine Expression fehlerhafter oder fehlgefalteter Proteine verursacht werden. Bei Auftreten von akutem ER-Stress stellt die UPR die Homöostase in Bezug auf Proteinbildung und -faltung wieder her (62). Die UPR bewirkt spezifisch durch eine verstärkte Chaperonsynthese und einer damit einhergehenden erhöhten Rate an Proteinfaltung im ER, durch die Inhibition des Großteils der Proteintranslation und durch die Stimulierung der ERAD eine Verringerung des ER-Stresses. Falls hohe ER-Stresszustände durch die UPR dauerhaft nicht reduziert werden können, setzt ultimativ ein durch Caspase-Aktivierung vermittelter Zelltod ein (63, 64).

Die UPR wird in Säugerzellen durch drei Signalwege vermittelt: erstens PERK (*Protein-kinase RNA-like Endoplasmic Reticulum Kinase*), zweitens IRE1 α (*Inositol-Requiring Enzyme 1*), und drittens ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*) (54). Diese Signalwege haben großen Einfluss auf eine Vielzahl von weiteren zellulären Anpassungsmechanismen. GRP78 nimmt in der UPR eine übergeordnete Stellung ein und übernimmt die Rolle als Master Regulator der UPR, da die GRP78-Bindung an die drei Haupteffektoren der UPR (PERK, IRE1 α und ATF6) die UPR inaktiviert und nach Dissoziation von GRP78 die UPR Signalwege induziert werden (65).

2.1.2. ERAD

Das ER-assoziierte Degradationssystem dient dem Abbau von sezernierenden Proteinen oder Proteinen der Plasmamembran, die ihre native Konformation terminal nicht erreichen (66). Neben der UPR trägt auch die ERAD zur Homöostase des ER bei (67). Aufgrund der Komplexität und der Anzahl beteiligter Proteine wird an dieser Stelle nur ein grober Überblick mit den wichtigsten zellulären Akteuren dargestellt.

Bei der Erkennung von ERAD Substraten spielen neben GRP78 auch das *ER degradation enhancing α -mannosidase like protein 1* (EDEM1) und *Osteosarcoma amplified 9* (OS9) eine wichtige Rolle (68-70). Sie transportieren Proteine über das Adapter-Membranprotein SeL1L (*sel-1 suppressor of lin-12-like*) zur Hrd1, einer E3-Ligase (68, 71). Durch die E3-Ligase wird das Substrat ubiquitiniert. Der Rücktransport des Substrates in das Zytosol wird durch die AAA-ATPase (ATPase assoziiert mit diversen zellulären Aktivitäten) VCP (*Valosin-containing-protein*) / p97 ATP-abhängig vermittelt (72). Nach dem Transport ins Zytosol erfolgt der Weitertransport zum Proteasom. Hier schließt sich durch Deubiquitinasen (DUBs) der Abbau der Ubiquitinreste und final der proteasomale Abbau der Substrate an (73).

2.1.1. Proteasom

Das Proteasom ist ein großer Proteinkomplex mit einer atomaren Masseneinheit von etwa 1700 kDa, der für die ATP-abhängige Degradation von intrazellulären Proteinen verantwortlich ist (74). Das Proteasom nimmt damit die Funktion eines Proteom-Modulators ein und degradiert eine große Anzahl regulatorischer, beschädigter oder fehlgefalteter Proteine (75). Das eukaryotische Proteasom besteht aus einer zentralen 20S Untereinheit und zwei 19S Untereinheiten (76). Die eigentliche Proteasefunktion obliegt der 20S Untereinheit. Die Erkennung, Bindung, Deubiquitinierung, Entfaltung und Transport der Substrate zur proteolytischen Kammer werden durch die 19S Untereinheiten übernommen (77).

Durch ihre hohe Proteinsyntheserate sind MM-Zellen stark abhängig vom Proteasom, um die Ansammlung von fehlgefalteten Proteinen zu begrenzen. Sie zeigen eine deutlich erhöhte Proteasomaktivität (78). Wenn die Proteasomfunktion eingeschränkt oder ausgelastet ist, kann die Bildung von Aggresomen eine zytoprotektive Wirkung entfalten. Bei Aggresomen handelt es sich um eine

Ansammlung von polyubiquitinierten Proteinen, die über einen durch Mikrotubuli vermittelten Transport in der Nähe des Nukleus gelagert werden (79).

2.2. GRP78

Wie bereits erwähnt gilt GRP78 als Master Regulator der UPR im ER. Darüber hinaus hat GRP78 aber noch weitere Funktionen, die für Zellhomöostase und Proliferation wichtig sind. GRP78 ist ein im endoplasmatischen Retikulum vorkommendes, ATP-abhängiges Chaperon und gehört zur HSP70-Familie (80). GRP78 besteht aus einer Nukleotid bindenden Domäne (NBD) und einer Substrat bindenden Domäne (SBD) (81). Die NBD am N-Terminus des Proteins bindet ATP und hydrolysiert es zu ADP, während die SB-Domäne am C-terminalen Ende hydrophobische Substrate binden kann. Die SBD besteht aus zwei Untereinheiten, SBD α und SBD β (82). Die NBD besteht ebenfalls aus 2 Untereinheiten, Lobus I und Lobus II, wobei weiterhin zwischen IA, IB, IIA und IIB unterschieden wird (83). Beide Domänen sind durch eine *Linker*-Domäne miteinander verbunden.

GRP78 erfährt zwei wesentliche Konformationsänderungen, wobei ein Zustand als offen, der andere Zustand als geschlossen bezeichnet wird (84). Offene Konformation bezeichnet den ATP-bindenden Zustand, geschlossen den ADP-bindenden Zustand. Die NBD besitzt nur eine schwache ATPase Aktivität, weshalb spontane Hydrolyse nicht vorkommt. Die SBD erkennt kurze, hydrophobe Aminosäuresequenzen von Proteinen. Die Bindung an das Substrat erhöht die ATP Hydrolyserate, woraufhin die Bindungstasche der SBD geschlossen und das Substrat eng gebunden wird (geschlossene Konformation) (85-87). Im geschlossenen Zustand rotieren die beiden Lobi der NBD aufeinander zu, während die SBD an der NBD bindet, wodurch eine relativ kompakte Struktur entsteht (83).

GRP78 Expression wird durch das Gen *HSPA5* reguliert, wobei eine Reihe von konservierten Promotorelementen wie eine CCAAT-Box, *cAMP responsive CRE like Elements* und ERSE (*ER Stress Response Elements*) im Gen verankert sind (88, 89). Anhand von Patientenproben wurde gezeigt, dass das HSPA5 Gen im Vergleich zu Proben von gesunden Spendern und ebenfalls von MGUS Patienten teilweise deutlich hochreguliert ist (90, 91). Daran bindende Transkriptionsfaktoren sind unter anderem ATF4, ATF6 und XBP-1(s) (92-94). Durch eine KDEL Domäne am C-terminalen Ende wird GRP78 am Verlassen des ER gehindert (95).

2.2.1. Co-Chaperone

GRP78 wird durch einige Co-Chaperone in seiner Funktion unterstützt. So interagiert GRP78 beispielsweise mit spezifischen, im ER lokalisierten DnaJ Chaperonen / HSP40, die eine ATP-abhängige Interaktion mit dem Substrat vermitteln und die ATPase Funktion der NBD stimulieren (60, 96-98).

2.2.2. Lokalisation

Im Regelfall ist GRP78 als endoplasmatisches Protein hauptsächlich im ER nachweisbar, auch wegen der oben beschriebenen KDEL-Domäne. GRP78 kann im Fall von Überexpression durch ER-Stress und der daraus resultierenden UPR Stimulation ebenfalls im Mitochondrium nachgewiesen werden (99). Hier ist es beispielsweise entscheidend an der Faltung von StAR (*Steroidogenic Acute Regulatory Protein*) beteiligt und somit integraler Bestandteil und Regulator der Steroidsynthese (100).

Eine Subpopulation von GRP78 kann auch als ER-Transmembranprotein vorkommen (101). Dieses als sGRP78 bezeichnete Kompartiment kommt auf der Zelloberfläche von malignen Zellen, wie beispielsweise Zellen des Glioblastoms oder Multiplen Myeloms, vor (102). Hohe Level an sGRP78 verstärken Proliferation, Migration und Apoptoseresistenz von Krebszellen über Co-Rezeptorfunktionen und Signalwegregulierungen (103, 104). Die sGRP78 Expression kann durch multiple ER-Stress Stimuli ausgelöst werden und betrifft sowohl chemoresistente als auch chemosensitive Krebszellen (103).

GRP78 kann außerdem im Zytoplasma nachgewiesen werden. Die Translokation in das Zytoplasma geschieht entweder ERAD-bedingt oder durch ER-Stress induzierte Apoptose verbunden mit veränderter ER Membranpermeabilität (105, 106).

2.2.3. Regulation des Kalziumhaushaltes

Wie bereits beschrieben ist das ER ein wichtiger zellulärer Kalzium-Speicherort. GRP78 ist für bis zu 25 % der Kalzium-Bindungskapazität im ER verantwortlich und wesentlich an der Kalzium-Homöostase des ER beteiligt (107). Außerdem ist GRP78 über das Co-Chaperon ERdj5 an der Regulation von SERCA2g Kalziumkanälen und damit ebenfalls an der Kalzium-Regulation im ER beteiligt (108).

2.2.4. Funktionen im ER-Stress

GRP78 ist ein hochkonserviertes Chaperon, das man sowohl in Säugetierzellen als auch in Hefen nachweisen kann (109). Das Protein ist in viele intrazelluläre Prozesse involviert. Dazu gehören unter anderem die Translokation neugebildeter Proteine durch die Membran des ER und die Förderung der Faltung und des Zusammenbaus von neugebildeten Proteinen durch das Erkennen von ungefalteten Polypeptiden (110). Außerdem werden Proteine durch GRP78 in einem Zustand erhalten, der eine weitere Faltung und Oligomerisierung möglich macht. GRP78 markiert fehl- oder nicht gefaltete Proteine für den Abbau im Proteasom, dient als Indikator für ER-Stress und kann die UPR aktivieren (111).

Über die Bindung von Caspase-7 im ER wirkt GRP78 anti-apoptotisch (101). GRP78 liegt in Bortezomib resistenten Myelomzellen im Vergleich zu Bortezomib sensitiven Myelomzellen deutlich erhöht vor (112). Besonders Proben von Patienten mit klinisch progressivem MM wiesen dabei erhöhte GRP78 Level auf (112).

3. ER-Stress Signaling Panel

Um ER-Stress Signaling sichtbar zu machen, können die an der Regulation der UPR beteiligten Proteine untersucht werden. Das in dieser Arbeit verwendete ER-Stress Signaling Panel bietet einen guten Überblick über die wichtigsten Aspekte der Signalwege, kann aber, aufgrund der Fülle an nachgeschalteten Proteinen, kein vollkommenes Abbild der UPR liefern (siehe Abbildung 1). GRP78 inhibiert im ungestressten Zustand als Master Regulator der UPR die drei Mediatorproteine PERK, IRE1 α und ATF6 (65). Nach Einsetzen von ER-Stress dissoziiert GRP78 und bindet an fehl- oder nicht gefaltete Proteine im ER. PERK dimerisiert, trans-autophosphoryliert und phosphoryliert im Anschluss eIF2 α an Position Ser51, was zu dessen Aktivierung führt (113). P-eIF2 α attenuiert die Translation der meisten Proteine, eine Ausnahme ist das CAP-abhängige ATF4, das als Transkriptionsfaktor wirkt und die Synthese von CHOP, Beclin und GADD34 verstärkt (114). ATF4 wirkt sowohl pro-autophagisch als auch pro-apoptotisch (115, 116). IRE1 α wird phosphoryliert und spleißt die XBP1 mRNA unkonventionell (im Zytosol), was als Transkriptionsfaktor die Synthese von ERAD-assoziierten Proteinen und GRP78 fördert (65). IRE1 α phosphoryliert außerdem SAPK an Position Thr183 / Tyr185, was Autophagie und Apoptose fördernd wirken kann (117). ATF6 transloziert in den Golgi-Apparat, wo die

luminale Domäne abgespalten wird. Das p50 Fragment erfährt eine weitere Translokation in den Nukleus und steigert dort die Transkription von XBP1 mRNA, GRP78, GRP94 und Calreticulin (118, 119).

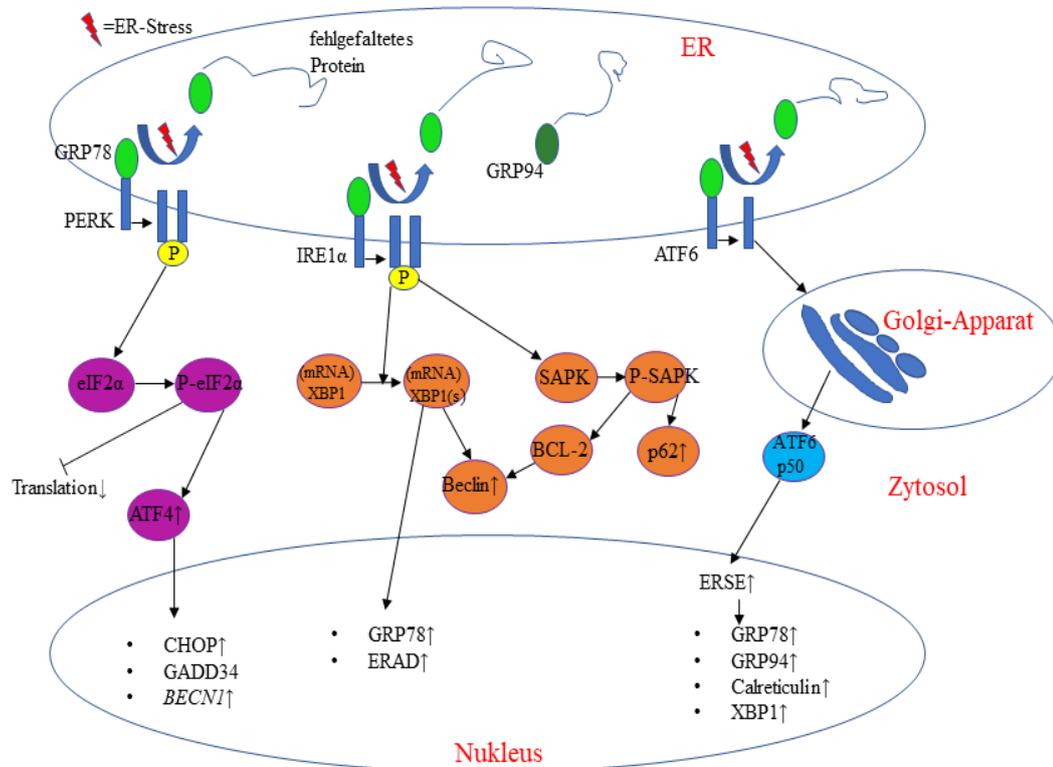


Abbildung 1: Schematische Übersicht der UPR

3.1. PERK

PERK besitzt eine luminale Domäne, die Ähnlichkeiten zu der von IRE1α aufweist sowie einen zytoplasmatischen Anteil, der die Protein-Kinase Domäne beinhaltet und die Effektor-domäne darstellt (120). Die luminale Domäne ist in Abwesenheit von ER-Stress durch die Bindung von GRP78 inaktiviert (65, 121). Nach luminaler Dissoziation von GRP78 findet eine Dimerisierung und eine trans-Autophosphorylierung von PERK statt, was zu einer Aktivierung der zytoplasmatischen Kinaseaktivität führt (122). In der Folge phosphoryliert PERK die α -Untereinheit des *eukaryotic Initiation Factors* (eIF2) an Serin51 (113). PERK spielt damit eine wichtige Rolle bei der Attenuierung der mRNA Translation (123).

3.2. eIF2 α

EIF2 α ist wichtiger Bestandteil bei der Bildung des Präinitiationskomplexes und damit bedeutender Regulator der Proteinsynthese im endoplasmatischen Retikulum (124). Es handelt sich um ein heterotrimeres, GTP-bindendes Protein, das gemeinsam mit Met-tRNA_i^{Met} und anderen Initiationsfaktoren an der 40S

Untereinheit des Ribosoms bindet und so den Prä-Initiationskomplex bildet (125). Der Prä-Initiationskomplex ist der erste Schritt der Translationsinitiation und elementar für die zelluläre Proteinsynthese.

EIF2 besteht aus drei Untereinheiten, eIF2 α , eIF2 β und eIF2 γ , wobei eIF2 α an die Met-tRNA_i^{Met} gebunden ist und eine regulatorische Funktion inne hat (126). Als Reaktion auf ER-Stress findet die Phosphorylierung von eIF2 α an Serin51 statt, sie ist damit ein Zeichen für einsetzenden ER-Stress. Durch die Phosphorylierung von eIF2 α wird die Translation der mRNAs der meisten zellulären Proteine gestoppt (114). Dieser Mechanismus führt zu einer verringerten Last an Proteinen im ER, da die Gesamtproteinsynthese abnimmt (116, 127). Interessanterweise wird die Translation einiger mRNAs allerdings durch die Phosphorylierung gesteigert, darunter auch ATF4.

3.3. ATF4

ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*) ist ein wichtiges regulatorisches Element der UPR, da es die Transkription von Schlüsselgenen zellulärer Anpassungsmechanismen steuert (127). Es wird durch die Phosphorylierung von eIF2 α aktiviert und ist damit von der Aktivierung durch PERK abhängig (128). Insbesondere CHOP (*C/EBP homologous protein*) und GADD34 (*Growth-Arrest and DNA-Damage-inducible-protein 34*) werden durch ATF4 hochreguliert. CHOP wirkt als pro-apoptotischer Transkriptionsfaktor und wird als Marker für Apoptose oder Zellzyklusarrest verwendet (116, 129). GADD34 ist an einem negativen Feedback-Mechanismus beteiligt, der durch Dephosphorylierung von eIF2 α zu einer Wiederaufnahme der Proteinsynthese führt und damit die Zelle für Apoptose sensitiviert (130, 131). Ebenfalls durch ATF4 hochreguliert wird das Gen *BECN1*, das Beclin-1 kodiert (115).

3.4. IRE1 α

IRE1 (*Inositol-Requiring Enzyme 1*) ist neben PERK der zweite Effektor und ebenfalls ein Mediatorprotein der UPR. IRE1 ist hochkonserviert und genauso wie PERK und ATF6 wird IRE1 durch die Interaktion mit GRP78 in seiner Funktion inhibiert. Dissoziiert GRP78, wird IRE1 aktiviert. Nach der Aktivierung findet eine Oligomerisierung (hier: Bildung von Dimeren) von IRE1-Molekülen statt, woraufhin eine trans-Autophosphorylierung an Serin724 durch ATP-Bindung folgt und das aktive P-IRE1 α vorliegt (132, 133). IRE1 liegt im Säuger genom als IRE1 α

und IRE1 β vor, wobei IRE1 β nur temporär und vor allem in Epithelzellen exprimiert wird (134, 135). IRE1 α besteht aus einer N-terminalen Sensordomäne, die sich im Lumen des ER befindet und fehlgefaltete Proteine detektieren kann, einem Transmembranabschnitt und einem im Zytosol befindlichen Abschnitt. Hier befinden sich unter anderem eine Serin / Threonin Kinase-Domäne und eine Endoribonuklease-Domäne (136, 137). Daneben bewirkt IRE1 α den Abbau bestimmter mRNAs durch IRE1 α abhängigen Zerfall, was die Proteinmenge im ER senkt und zur UPR beiträgt (RIDD - *Regulated IRE1 α dependent decay*) (133, 138). IRE1 α kann sowohl pro-apoptotisch als auch anti-apoptotisch wirken. Das Spleißen von XBP-1 wirkt dabei anti-apoptotisch, die Aktivierung der SAP-Kinasen pro-apoptotisch.

3.5. XBP1

X-Box binding Protein 1 (XBP1) ist ein Protein mit einer bZIP Domäne (*basic leucine zipper domain*) (139). Es wird benötigt für die Transkription von *Major Histocompatibility* Genen der Klasse 2 (MHC-II), ist notwendig für die Plasmazelldifferenzierung und für die Differenzierung von eosinophilen Granulozyten. Außerdem spielt es durch die Regulation der Endothelzellproliferation über Wachstumsfaktoren eine Rolle bei der Angiogenese und ist auch wichtiger Teil der UPR (140). Eine weitere wichtige Funktion von XBP1 ist die Beteiligung bei der Differenzierung von Plasmazellen, unter anderem durch die Induktion von Interleukin-6 (IL-6) Sekretion (141). XBP1(s) ist in Zusammenhang mit der UPR die gespleißte und gleichzeitig die biologisch aktive Form von XBP1 (142). Durch das Spleißen wird aus der XBP1 mRNA ein 26 bp (*basepair*) Fragment entfernt, was eine Verschiebung des Leserasters des mRNA Transkripts induziert. Die Translation dieses neuen Leserasters bewirkt die XBP1 Umwandlung zu einer gespleißten Form, die zusätzlich eine Transaktivierungsdomäne am C-terminalen Ende besitzt (141). Da das XBP1 Intron zu kurz ist, um die Translation zu blockieren, wird auch die ungespleißte Form, XBP1(u), translatiert (92). XBP1(u) bindet an XBP1(s) und inaktiviert dieses durch Markierung zur anschließenden proteasomalen Degradation. XBP1(u) fungiert als negativ regulierender Faktor von XBP1(s). Höhere Level von XBP-1(u) werden produziert, wenn IRE1 während der Erholung von ER-Stress inaktiviert wird (143). XBP1(s) wirkt in dieser Form als Transkriptionsfaktor und induziert die Synthese von ERAD-assoziierten Proteinen und ER-Chaperonen (144). Über

transkriptionelle Aktivierung von Beclin-1 ist XBP1(s) auch an der Induktion von Autophagie beteiligt (145).

Von Carrasco *et al.* konnte XBP1 in 50 % der Proben von an MGUS erkrankten Patienten überexprimiert nachgewiesen werden, bei an MM erkrankten Patienten sogar 70 %, wohingegen bei gesunden Spendern nicht nachweisbare oder nur sehr niedrige Expressionsraten nachgewiesen wurden (146). XBP1(s) wird in dieser Arbeit als Indiz für induzierten ER-Stress verwendet.

3.6. SAPK / JNK

Die *stress activated protein kinases* (SAPK) / c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK) gehören zur Familie der MAP-Kinasen (*Mitogen-activated protein kinases*) und regulieren Genexpression. Diese Regulation geschieht durch die Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie c-JUN oder ATF2 sowie durch die Regulation der mRNA-Stabilität (147-149). Darüber hinaus phosphoryliert Phospho-SAPK (P-SAPK Thr183 / Tyr185) das Protein BCL-2 und hebt damit dessen anti-apoptische Wirkung auf (150). SAPK / JNK wird seinerseits durch IRE1 α und die Mediatoren TRAF 2 (*TNF receptor-associated factor 2*), ASK1 (*Apoptosis signal-regulating kinase 1*) und MKK4 (*Mitogen activated protein kinase 4*) an Threonin183 und Tyrosin185 phosphoryliert (117, 151). Darüber hinaus kann JNK über die Aktivierung von p62 / SQSTM1 die zelluläre Autophagie stimulieren, was eine zytoprotektive Wirkung haben kann (152).

3.7. P62 / SQSTM1

P62 (Protein 62) / SQSTM 1 (*Sequestosome 1*) zeigt im ER-Stress Signaling Panel eine Autophagie-Induktion an. Das Protein besitzt am C-terminalen Ende eine UBA (*Ubiquitin-associated*) Domäne, mit der es K48- und K63-polyubiquitinierte Proteine über Ubiquitinmoleküle nicht-kovalent binden kann (153). Am N-terminalen Ende befindet sich eine PB1-Domäne, die p62 zu Oligomerisierung befähigt und durch die eine Interaktion mit Proteasomen ermöglicht wird (154). P62 dient als Transportvehikel von polyubiquitinierten Proteinen zum Proteasom (155). Außerdem kann p62 die Aggresomenformation beeinflussen und so zur Autophagie beitragen (156). Darüber hinaus bindet p62 über eine N-terminal-nahe Domäne an LC3A/B und rekrutiert Proteine zum Autophagosom zur lysosomalen Degradation (157). Im Falle der Autophagie-Induktion ist in der Regel von einer Abnahme der Western Blot Level von p62 auszugehen (158).

3.8. Beclin-1

Das für Beclin-1 kodierende Gen *BECN1* ist das erste Gen, für das eine Beteiligung bei der Vermittlung von Autophagie nachgewiesen werden konnte (159). Beclin-1 ist als Bestandteil des *vacuolar protein sorting-34* (VPS34) Komplexes an der Hochregulation der Autophagie beteiligt (160). Beclin-1 wird für die Autophagosomenbildung benötigt (161). Das Protein bildet einen Komplex mit Phosphoinositid-3-Kinasen der Klasse III (PI3K-III), die wesentlich an der Induktion der Autophagie beteiligt sind (162).

Über eine *BH3-like* Domäne interagiert Beclin-1 mit dem korrespondierenden Teil von BCL-2. BCL-2 ist ein anti-apoptotisch wirkendes Protein (163). BCL-2 inhibiert die Beclin-1 abhängige Autophagie (164). JNK1 vermittelt die Phosphorylierung von BCL2 und induziert damit die Dissoziation des Beclin-1-BCL2 Komplexes. Durch die folgende Heterodimerisierung von Beclin-1 mit ATG14 findet eine Aktivierung der Autophagie statt (165, 166). *5'AMP-activated protein kinase* (AMPK) vermittelt die Phosphorylierung von Beclin-1 an Serin93 und Serin96. Diese stellt einen weiteren Weg zur Aktivierung des pro-autophagischen Komplexes dar (167). Insgesamt ist Beclin-1 also auf verschiedenen Arten an autophagischen Prozessen beteiligt.

3.9. LC3

Ein weiterer relevanter Marker für Autophagie ist das *Light Chain Protein 3* (LC3), das in den Isoformen A, B und C auftreten kann. LC3 wird am C-terminalen Ende gespalten und lipidiert; es entsteht eine lösliche Form, LC3-I. LC3-I wiederum wird zu einer Membran-gebundenen Form modifiziert, LC3-II (168). LC3-I befindet sich im Zytoplasma, LC3-II ist in der Membran von Autophagosomen gebunden und spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung des Autophagosoms (169, 170). Autophagosomen fusionieren mit Lysosomen zu Autophagolysosomen und intralysosomale Proteine oder Organellen werden über lysosomale Hydrolasen degradiert (171). Der *Turnover* von LC3(A/B)-I zu LC3(A/B)-II gilt als ein wichtiger Marker für Autophagie (168). Es wird angenommen, dass der *Turnover* von LC3-I zu LC3-II über den PERK/eIF2 α Signalweg verstärkt wird (172).

3.10. ATF6

ATF 6 (*Activating Transcription Factor 6*) ist das dritte Mediatorprotein der UPR. Es handelt sich ebenfalls um ein Transmembranprotein des ER (173). Ebenso wie PERK und IRE1 α wird ATF6 durch die Bindung mit GRP78 inaktiviert (174). Dissoziiert GRP78, wird ATF6 aktiviert. Anders als PERK oder IRE1 α transloziert ATF6 allerdings zuerst mittels Vesikeltransport in den Golgi-Apparat (174, 175). Dort wird ATF6 durch Abspaltung seines N-terminalen Endes von der Membran durch eine S1- und eine S2-Protease aktiviert (176). Anschließend transloziert die zytosolische Domäne von ATF6 in den Zellkern und aktiviert die ERSE (*ER Stress response elements*) (177). Dieses p50-ATF6 Fragment ist im Zellkern nachweisbar (173).

Die durch ATF6 aktivierten ERSE sind notwendig für die Induktion der Bildung von GRP78, GRP94 und Calreticulin (118). Daneben verstärken die ERSE auch die Transkription von CHOP und XBP-1 (119). Die XBP1 mRNA muss auf ein signifikantes Level induziert werden, um die gespleißte Form von XBP1 in für Messungen ausreichender Menge zu erhalten (92). Insbesondere ein erhöhtes Level an GRP78 im ER konnte nach Überexprimierung von ATF6 nachgewiesen werden (173).

3.11. GRP94

Neben GRP78 ist vor allem GRP94 (*Glucose-regulated Protein 94*) als Chaperon im ER aktiv. Es wird durch das Gen *HSP90B* kodiert und gehört, wie GRP78, zur Superfamilie der *Heat-shock* Proteine (HSP), genauer zur HSP90 Familie (178). Ebenso wie GRP78 ist GRP94 hauptsächlich im ER zu finden und ist dort der einzige vorkommende Vertreter der HSP90 Familie (179, 180). Neben seiner Hauptfunktion als Chaperon ist GRP94 an der Regulierung des angeborenen und des erworbenen Immunsystems beteiligt (181). GRP94 ist wesentlich für die Prozessierung von Proteinen im ER, wie zum Beispiel dem *Insulin-like growth factor 2* (IGF-II), *Toll-like* Rezeptoren (TLR) und Integrinen verantwortlich (182). GRP94 ist außerdem durch Kalziumbindung an der Kalziumregulierung im ER beteiligt (183). Durch Interaktion mit OS9, ein Lektin-Chaperon, ist GRP94 auch für die Funktion der ERAD mitverantwortlich und wirkt anti-apoptotisch (68). GRP94 interagiert mit den zytosolischen Domänen von IRE1 und PERK und trägt mit dieser Assoziation zur Stabilität beider Proteine bei (184).

3.12. HSP72

Das *Heat-Shock* Protein 72 (HSP72) ist, wie auch GRP78, Teil der HSP70 Familie, wobei es vor allem im Zytosol und Nukleus vorgefunden wird (185). Es handelt sich um ein Chaperon, das über Interaktion mit Bax und durch Inhibierung von Vorstufen von Caspase-3 anti-apoptotisch wirkt (186). Die Inhibierung von HSP72 führt zu einer Caspase-vermittelten Apoptose. Darüber hinaus ist HSP72 ein Co-Chaperon für Chaperone der HSP90 Familie durch das Präsentieren von Zielproteinen, wie zum Beispiel CDK4 und C-Raf (187). Es wird in Myelomzellen häufig überexprimiert vorgefunden und ist aufgrund der Regulierung von zellulären Signalwegen und transkriptionellen Netzwerken ein mögliches therapeutisches Ziel (188-190). HSP72 interagiert gemeinsam mit HSC70 und ist im Zytoplasma an der Faltung von in Synthese befindlichen Proteinen und an der Markierung von Proteinen, die dem proteasomalen Abbau zugeführt werden sollen, beteiligt (180). Als Reaktion auf ER-Stress wird es stark exprimiert und kann somit auch als ER-Stress Marker dienen (185).

4. Die UPR im therapeutischen Kontext

Da Myelomzellen, die eine hohe Proteinsyntheserate besitzen, eine vollständig funktionierende UPR benötigen, um den anfallenden ER-Stress zu reduzieren, könnte die UPR und das ERAD ein lohnenswertes therapeutisches Ziel darstellen.

4.1. Bortezomib

Als erster Proteasom-Inhibitor wurde Bortezomib 2005 durch die U.S. amerikanische Food and Drug Administration (FDA) regulär zugelassen (191). Bortezomib wirkt als reversibler Inhibitor des 26S Proteasoms, wodurch der proteasomale Proteinabbau blockiert wird und Myelomzellen in Apoptose übergehen (192). Durch die Einführung von Bortezomib verlängerte sich die progressionsfreie Zeit der Patienten signifikant und es gehört mittlerweile zur Standardtherapie (193). Bortezomib vermittelt seine apoptotische Wirkung durch Induktion von ER-Stress, Inhibierung des NF- κ B Signalweges, anti-angiogenetische Effekte und Caspase-8 Aktivierung (194-196).

4.2. Carfilzomib

Carfilzomib ist ein Proteasom-Inhibitor der zweiten Generation und bindet ebenfalls an die 20S Untereinheit des 26S Proteasoms, im Unterschied zu Bortezomib allerdings irreversibel (197). Carfilzomib ist in den USA und der EU

im Zuge der Zweitlinientherapie zugelassen (198). In der ENDEAVOR-Studie wurde gezeigt, dass Carfilzomib und Dexamethason der Kombination aus Bortezomib und Dexamethason bei Patienten mit relapsierten oder refraktären MM deutlich überlegen war (199). Zugleich ist das Sicherheitsprofil von Carfilzomib besser. So ist das Auftreten peripherer Polyneuropathien durch Carfilzomib deutlich seltener als bei Bortezomib-basierten Therapieregimen (200).

4.3. Ixazomib

Bei Ixazomib handelt es sich ebenfalls um einen Proteasom-Inhibitor der zweiten Generation, hier ist eine orale Verabreichung möglich. Auch Ixazomib bindet an eine der Untereinheiten des 20S Proteasoms, wie bei Bortezomib ist diese Bindung reversibel (201). Durch veränderte Pharmakokinetik und Pharmakodynamik besitzt Ixazomib auch Wirksamkeit gegenüber soliden Tumoren und ist Gegenstand aktueller Forschung (202).

Die Tatsache, dass mittlerweile verschiedene Proteasom-Inhibitoren zugelassen sind, schafft insbesondere nach der Entstehung von Resistenzen neue Therapieoptionen sowie Therapiekombinationen (203).

4.4. Panobinostat

Das Medikament gehört zur Stoffgruppe der pan-Histon-Deacetylase-(HDAC) Inhibitoren (204). HDAC-Inhibitoren katalysieren die Deacetylierung von Histonen, wodurch die Chromatinstruktur weniger kompakt wird. Im Rahmen der PANORAMA-1 Studie zeigte sich die Wirksamkeit von Panobinostat als Teil einer Kombinationstherapie mit Bortezomib und Dexamethason (205). Seit 2015 ist Panobinostat in der EU in dieser Kombination zur Therapie von relapsierten / refraktären Myelomen zugelassen (204).

Als Reaktion auf die Inhibierung des 26S Proteasoms durch Bortezomib wurde kompensatorisch verstärkt die Bildung von Aggresomen beobachtet, was eine zytoprotektive Wirkung hat (206). HDAC6 spielt bei der Aggresomenbildung eine wichtige Rolle durch die Interaktion mit Dynein und polyubiquitinierten, fehlgefalteten Proteinen, wodurch der Transport zu den Aggresomen ermöglicht wird (207). Da die verstärkte Aggresomenbildung ein Resistenzmechanismus von Myelomzellen gegenüber Bortezomib ist, kann Panobinostat Bortezomib-resistente Myelome resensitivieren (208).

4.5. CB-5083

Die Inhibierung der AAA ATPase p97 / VCP ist ein relativ neuer Ansatz, mit dem man in die ERAD eingreift. CB-5083 hat bei der Inhibierung von p97 / VCP eine breite anti-tumorale Aktivität bewiesen, sowohl in soliden als auch in hämatologischen Tumormodellen (209, 210).

P97 / VCP ist ein hochkonserviertes Protein, das etwa 1 % der zellulären Proteine ausmacht (211). P97 besteht aus einer D1 Domäne, einer D2 Domäne und einer C-terminalen sowie einer N-terminalen Domäne, die bei der Substraterkennung und -bindung sowie bei der Bindung von Co-Faktoren involviert ist (212). P97 bildet einen hexameren Ring, bestehend aus sechs dieser gerade beschriebenen Anteile (213). Die ATPasen sind in der Lage, die durch Hydrolyse von ATP freiwerdende Energie für die strukturelle Remodellierung oder die Entfaltung von (poly-) ubiquitinierten Zielproteinen zu nutzen (214). Die D2 Domäne ist verantwortlich für den größten Teil der ATPase-Aktivität (215). Während der Bindung und Hydrolyse von ATP unterliegt das monohexamere p97 / VCP starken konformationellen Änderungen (216). Dabei interagiert p97 mit vielen Co-Faktoren, vor allem mit Proteinen, die eine UBX- (*Ubiquitin regulatory X*) Domäne besitzen und solche mit einer *UBX-like* Domäne. Diese binden an eine Stickstoffdomäne von p97. Ihre genaue Funktion ist unbekannt, es wird aber davon ausgegangen, dass sie p97 zu seinen spezifischen Substraten leiten (213). Dutzende weitere Co-Faktoren spielen sowohl bei der Bindung von fehl- oder nicht gefalteten Proteinen eine Rolle, als auch beim Transport durch die ER-Membran und dem Transport zum Proteasom, werden aber an dieser Stelle nicht weiter besprochen (217). Im Rahmen der ERAD ist p97 für den Transport von polyubiquitinierten oder fehlgefalteten Proteinen aus dem ER und hin zum Proteasom verantwortlich. Dort dissoziiert p97 und entlässt das Protein in das Proteasom (218). Eine Regulation der Aktivität von p97 findet wahrscheinlich durch eine Phosphorylierung an einem Serinrest durch AKT statt (219). Der Verlust der p97 Aktivität bewirkt eine Aktivierung der UPR in Form einer verstärkten Expression von GRP78 und CHOP, was ein Zeichen für induzierten ER-Stress ist (220). Daneben hat p97 weitere zelluläre Funktionen, wie zum Beispiel den erneuten Zusammenbau des Golgi-Apparates, die Verschmelzung der Kernmembran nach Abschluss der Mitose, und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und Autophagie (221, 222).

Durch die Blockade der Aktivität von p97 kann die Möglichkeit bestehen, besonders Krebszellen zu attackieren, die eine hohe Last an Proteinsynthese zu tragen haben. Durch eine Blockade der ERAD durch die Inhibition von p97 kommt es zur Ansammlung von fehl- oder nicht gefalteten Proteinen, was zur Aktivierung der UPR und ultimativ zur Induktion der Apoptose führt (223).

CB-5083 ist ein kleines Molekül, das als potenter D2-Domänen spezifischer Inhibitor wirkt und dabei eine hohe Spezifität für die ATPase von p97 an den Tag legt (224). Es wurde nachgewiesen, dass die Behandlung von HEKT293T (humane Nierenzelllinie) Zellen mit CB-5083 zu einer Akkumulation von TCR α -GFP führt. TCR α -GFP ist ein spezifisches Substrat, dass im Zuge der ERAD exprimiert wird. Dies spricht für eine direkte Blockade der Extraktion von Proteinen aus dem ER (224).

CB-5083 wurde bereits *in vitro* und *in vivo* untersucht. So wurde seine Wirksamkeit durch Gareau *et al.* *in vitro* an mehreren Zelllinien des caninen Lymphoms überprüft (225). Ebenso starteten in den USA im Jahr 2014 zwei *in vivo* Studien (*ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02243917 und NCT02223598*), die den Einfluss von CB-5083 auf rezidierte, refraktäre MM-Erkrankungen und auf solide Tumoren untersuchen.

4.6. AR-12

Durch die Rolle als Master Regulator der UPR und wichtiges ER-ständiges Chaperon stellt GRP78 ein interessantes Ziel für eine pharmakologische Einwirkung dar. AR-12, auch OSU-03012 genannt, ist ein Derivat von Celecoxib ohne COX-2 inhibitorische Wirkung (226). Die Cyclooxygenase 2 (COX-2), auch Prostaglandinsynthase-2 genannt, ist ein Enzym, das Arachidonsäure zu Prostaglandin H₂ synthetisiert. Die COX-2 Synthese findet, anders als das konstitutiv exprimierte COX-1, erst durch Induktion statt. Expressionsfördernd können Entzündungsmediatoren wie TNF α oder Interleukin 1 β , aber auch Onkogene, der Transkriptionsfaktor NF- κ B oder Wachstumsfaktoren sein (227, 228).

Celecoxib ist ein selektiver COX-2 Hemmer und gehört als nicht-steroidales Antiphlogistikum (229) zur Gruppe der Coxibe. Es ist seit mehr als 20 Jahren zur Behandlung von Osteoarthritis, rheumatoider Arthritis und Morbus Bechterew zugelassen (230). COX-2 ist beispielsweise in gesundem Gewebe der weiblichen

Brust nicht nachweisbar, in Tumorgewebe von Mammakarzinomen dagegen schon (231). Daneben ist Celecoxib ein schwacher Inhibitor von PDK-1 (232). Der Einsatz von Celecoxib in der Behandlung verschiedener Neoplasien ist Thema aktueller Forschungsarbeiten.

Im Folgenden wird etwas genauer auf den PI3K - PIP3 - PDK-1 - AKT Signalweg eingegangen. Es handelt sich hierbei um einen Signalweg, der das Überleben der Zelle fördert. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Signalweg im Multiplen Myelom aktiviert ist (233, 234). AKT wurde in MM-Zellen überexprimiert nachgewiesen (235). Der regulatorische Eingriff in diesen Signalweg kann daher ein vielversprechender Ansatz als Therapieoption des Multiplen Myeloms sein.

Das Protein *3-phosphoinositide-dependant kinase-1* (PDK-1) ist eine Kinase, die im aktivierten Zustand AKT an Threonin308 phosphoryliert und damit an der Aktivierung von AKT beteiligt ist (236). PDK-1 wird ihrerseits aktiviert durch die Bindung von *Phosphatidyl-3,4,5-triphosphate* (PIP3) an einer C-terminalen Domäne von PDK-1. PIP3 wird durch die Klasse 1 der Phosphatidylinositol 3-kinasen (PI3K) durch Phosphorylierung von *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate* (PIP2) generiert (237). PIP3 bewirkt eine Konformationsänderung von AKT und eine Translokation zur Plasmamembran, die dann PDK-1 die oben genannte Phosphorylierung an T308 ermöglicht (238). AKT ist eine Serin/Threonin Kinase, die Zellzyklusprogression, Überleben und Metabolismus durch Phosphorylierung einer Vielzahl von Substraten fördert (236). Eine negative Regulierung dieses Signalweges findet über PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) statt, dass PIP3 dephosphoryliert und damit inaktiviert (235). PTEN ist außerdem an der Inhibierung des MAP-Kinasen Signalweges beteiligt (239). PTEN wirkt dadurch als Tumorsuppressor und Mutationen von PTEN konnten in einer Vielzahl von Neoplasien nachgewiesen werden (240). Chang *et al.* wiesen nach, dass PTEN-Deletionen im MM in fortgeschrittenen Krankheitsstadien vorkommen, was gleichzeitig zu starker AKT Aktivierung führte (241). Möglicherweise könnten diese Patienten von einer Störung des AKT Signalweges durch AR-12 profitieren. Neben der Aktivierung von AKT durch PI3K/PDK-1 wurden weitere Signalwege nachgewiesen, die AKT aktivieren (242). AKT besitzt eine Vielzahl an zellulären Wirkungen. So wird die BCL-2 Expression hochreguliert, was einen anti-apoptischen Effekt hat (243). Ebenso aktiviert AKT durch Phosphorylierung den mTOR Komplex 1, der seinerseits an einer Vielzahl

an Signalwegen im Zusammenhang mit Wachstum, Überleben und Proliferation von Zellen durch Phosphorylierungen beteiligt ist (244).

Zhu *et al.* gelang es, die schwache inhibitorische Wirkung von Celecoxib auf PDK-1 (IC_{50} : 48 μ M) durch strukturelle Optimierung zu verstärken und damit AR-12 zu entwickeln (226). AR-12 inhibiert PDK-1 kompetitiv über ATP-Bindung im Bereich von 5 μ M bis 50 μ M und kann durch Inhibition des PDK-1/AKT Signalweges Apoptose induzieren (245, 246).

2009 begann die erste klinische Phase I Studie, in die Patienten mit soliden Tumoren und Lymphomen, die mindestens einmal vortherapiert waren, mit einbezogen wurden (*ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00978523*). Die Studie wurde 2012 planmäßig beendet.

Die initial durch Zhu *et al.* postulierte Wirkung durch PDK-1 Inhibition wurde in der Folge durch die Forschungsgruppe um Paul Dent teilweise relativiert und eine Wirkung durch verringerte Halbwertszeit von GRP78 von 24 h auf ca. 10 h, eine Verringerung der HSP90 Level und eine Erhöhung der HSP70 Level in Verbindung mit erhöhten PERK Werten postuliert (226, 245, 247). 2016 veröffentlichten Booth *et al.* Daten, die eine dramatische Reduzierung der GRP78, HSP70 und HSP90 Werte ca. 6 h nach AR-12 Gabe (0 - 3 μ M) mittels Immunfluoreszenzmessung zeigten (248).

Booth *et al.* berichteten über die Unterdrückung der Expression von GRP78 durch eine verringerte Stabilität des Proteins durch AR-12 bei humanen Glioblastomzellen, ein Einfluss auf die mRNA Stabilität wurde nicht festgestellt. AR-12 bindet außerdem kompetitiv an die ATPase Domäne der Nukleotidbindenden Domäne von GRP78 sowie HSP70 (249). Über PDK-1 Inhibition und direkte kompetitive Inhibition wirkt AR-12 außerdem als Inhibitor von *p21-Activated Kinases* (PAKs), die wiederum Regulatoren von Zellmotilität und Proliferation sind (250, 251).

4.7. VER155008

VER155008 ist durch seine inhibitorische Wirkung auf die intrinsische ATPase Aktivität von HSC70, HSP70 und in geringem Maße auch von GRP78 ein pan-HSP70 Inhibitor (252). VER155008 war bereits in einigen Studien Gegenstand der Forschung, auch in Kombination mit HSP90-Inhibitoren (186). VER155008 rief in den untersuchten Zelllinien konzentrationsabhängig Apoptose hervor und

zeigte besonders Apoptose induzierendes Potenzial bei Kombination mit einem HSP90-Inhibitor. Die Schwierigkeit einer wirksamen Inhibierung von HSC70 und HSP70 mit einem Wirkstoff liegt wahrscheinlich in geringfügig unterschiedlichen ATP-Bindungsstellen der beiden Proteine. VER155008 führte in einer weiteren Studie zur Induktion von Apoptose bei gleichzeitig vermehrtem Vorkommen von Pro-Caspase 3 und 9 sowie von Poly (ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP1) in Myelomzelllinien (188).

4.8. PAT-SM6

Bei PAT-SM6 handelt es sich um einen monoklonalen IgM-Antikörper, der über die Bindung von post-transkriptionell modifizierten sGRP78 auf der Oberfläche von Myelomzellen seine Wirkung entfaltet (253, 254). Der humane Antikörper IgM mAb PAT-SM6 wurde zuerst bei einem Patienten mit Magenkarzinom isoliert und als Teil der natürlichen Immunabwehr beschrieben. GRP78 wird nicht nur im ER von MM-Zellen vermehrt vorgefunden, sondern auch auf der Oberfläche von MM-Zellen überexprimiert (254). Es konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Expressierung von GRP78 in Krebszellen mit einer nachteiligen Prognose und einer erhöhten Wahrscheinlichkeit von Medikamentenresistenzen korreliert (54). Durch die gleichzeitige Bindung von oxidiertem LDL und GRP78 auf der Zelloberfläche, wird die Internalisierung von oxidiertem LDL in maligne Zellen bewirkt. Dies hat zu Folge, dass Cholesterol und Triglyceride intrazellulär abgelagert werden, was die Zelle zur Einleitung der Apoptose triggert und als Lipoptose bezeichnet wird (255). Außerdem wird das Komplementsystem über die moderate Aktivierung des Komplementproteins C1q aktiviert (256). Es konnte außerdem *in vitro* gezeigt werden, dass PAT-SM6 selektiv an GRP78 Oberflächmoleküle von CD138 positiven Myelomzellen bindet und die Apoptoserate sinifikant erhöht wurde. In PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) von gesunden Spendern, die mit PAT-SM6 behandelt wurden, trat kein zytotoxischer Effekt ein (254). Im Rahmen einer Phase-I Studie an zwölf Patienten mit progressiven Krankheitsverläufen konnte gezeigt werden, dass die Monotherapie mit PAT-SM6 bei 33,3 % der Studienteilnehmer das Voranschreiten der Erkankung stabilisiert wurde (257).

III. ZIELSETZUNG

Die *Unfolded Protein Response* ist ein hochgradig komplexer zellulärer Anpassungsmechanismus, von dem Myelomzellen verstärkt abhängig sind. Dabei stellt GRP78 ein potenziell bedeutsames Zielprotein dar, da es 3 nachgeschaltete Signalwege, nämlich den PERK, IRE1 α und ATF6-Weg, aktiviert. Weiterhin wird durch die Inhibierung von GRP78, aber auch von p97, die UPR stark beeinflusst. AR-12 wird in der Literatur als GRP78-Inhibitor beschrieben, diese inhibitorische Wirkung wurde bislang in MM-Zellen nicht untersucht. Auch die zeit- und konzentrationsabhängige Wirkung der p97-Inhibition durch CB-5083 auf die UPR ist bisher kaum erforscht. Ebenso wurde eine kombinierte Anwendung beider Inhibitoren in MM-Zellen bislang nicht beschrieben.

Ziel dieser Arbeit ist daher, die einzelne und kombinierte Wirkung von GRP78-Inhibition und p97-Inhibition an verschiedenen MM-Zelllinien und MM-Primärmaterial zu untersuchen.

Da GRP78 in der Literatur als überexprimiert beschrieben wird, soll zunächst die Expression in Primärzellen des Multiplen Myeloms untersucht werden, um GRP78 als potenzielles Zielprotein für eine Behandlung zu validieren.

Anschließend wird die Wirkung der Inhibitoren AR-12 und CB-5083 auf den Zellmetabolismus als indirekten Marker für Proliferationsfähigkeit und Viabilität untersucht. Ebenso werden mögliche Veränderungen des Zellzyklus analysiert und mit Hilfe des durchflusszytometrischen Annexin V/Propidiumjodid-Tests werden direkte Effekte auf die Zellviabilität herausgearbeitet. In einem zweiten Schritt werden diese Metabolismus- und Viabilitäts-Untersuchungen für Kombinationsuntersuchungen der beiden Inhibitoren durchgeführt.

Auf molekularbiologischer Ebene wird, mit Hilfe der gewonnenen Erkenntnisse, anschließend durch Western Blotting der Einfluss beider Inhibitoren auf die Proteinexpression der *Unfolded Protein Response* untersucht.

Zusätzlich wird untersucht, ob eine Kombination aus siRNA-vermitteltem Knockdown von GRP78 mit anschließender Behandlung des p97-Inhibitors CB-5083 zusätzliche, verstärkende Veränderungen in der Proteinexpression innerhalb der UPR ergeben.

Eine synergistische Wirkung von GRP78-Inhibition und p97-Inhibition ist denkbar. Sowohl p97 als auch GRP78 sind wichtige Bestandteile der zellulären Antwort auf ER-Stress und grundlegend an der Beseitigung fehl- oder nicht gefalteter Proteine beteiligt. Insbesondere durch die ebenfalls beschriebene HSP90-Inhibition von AR-12 könnte eine Kombination beider Inhibitoren vielversprechend sein, da HSP90 sowohl selbst als Chaperone fungieren, als auch in einem Komplex mit p97 vorliegen. Eine kompensatorische Aktivierung der UPR nach Blockade der ERAD durch p97-Inhibition wäre ebenfalls denkbar. Die Wirksamkeit einer zusätzlichen Störung der UPR durch Inhibition von GRP78 als Master Regulator der UPR könnte ein erfolgsversprechender Forschungsansatz sein.

Aus den gewonnenen Ergebnissen könnten sich neue therapeutische Ansätze zur Beeinflussung der Proteinhomöostase des Multiplen Myeloms ableiten lassen.

IV. MATERIAL

1. Zelllinien

1.1. JJN3

JJN3-Zellen wurden initial aus dem Knochenmark einer 57-jährigen, an MM erkrankten Frau gewonnen; sie sind Subklone der JJN1-Zelllinie. Es handelt sich um semi-adhärenzte Zellen mit einer Verdopplungszeit von 24-36 h. JJN3-Zellen besitzen eine Resistenz gegenüber Lenalidomid (258).

1.2. AMO1

AMO1-Zellen wurden aus dem Aszites einer 64-jährigen Frau entnommen und kultiviert (259). Es handelt sich um Suspensionszellen mit einer Verdopplungszeit von ca. 24 h.

1.3. AMO1R65CAR

Eine Carfilzomib-resistente Subzelllinie der AMO1-Zellen wurde durch Dr. Brännert generiert. Die Zellen wurden dafür mehrere Monate mit einer steigenden Konzentration von Carfilzomib inkubiert, beginnend bei der EC_{50} . Grundlage des Resistenzmechanismus ist die verstärkte Expression von ABCB1 Transportern, die Carfilzomib aus der Zelle ausschleusen, bevor ein Effekt induziert werden kann (260).

1.4. AMO1R180IXA

Eine Ixazomib-resistente Subzelllinie der AMO1-Zellen wurde ebenfalls durch Dr. Brännert generiert. Die Zellen wurden dafür über sechs bis acht Monate in Ixazomib-haltigen RPMI+ Medium inkubiert, wobei als Anfangskonzentration der EC_{50} -Wert verwendet wurde. Die Ixazomib-Konzentration im Medium wurde Schritt für Schritt erhöht (261). Brännert *et al.* fanden heraus, dass der Resistenzmechanismus auf einer Hochregulation von PSMB1 (*Proteasome subunit type-1*) und PSMB5 (*Proteasome subunit type-5*) beruht, die auch zu Kreuzresistenzen gegen Carfilzomib und Panobinostat führt.

2. Durchflusszytometrie

Tabelle 3: Durchflusszytometrie | Chemikalien

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Propidiumjodid	CN74.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
BD FACSTM Clean	340345	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD FACSTM Rinse Solution	340346	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD FACSTM Flow Sheath Fluid	342003	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CaCl ₂ 2H ₂ O	2382.0500	Merck, Darmstadt, Deutschland
FITC F7250	3326-32-7	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Annexin V: Protein wurde rekombinant hergestellt (nach *Logue et al.* (262))

Tabelle 4: Durchflusszytometrie | Lösungen

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Menge	Molarität
Propidiumjodid-Lösung	Propidiumjodid 1x PBS	0,00125 g 25 ml	1,87 µM
Annexin Binde-Puffer	V/PI HEPES NaCl CaCl ₂ NaOH HCl (20 %) H ₂ O	1,38 g 4,097 g 0,184 g <i>ad</i> pH 7,4 <i>ad</i> pH 7,4 <i>ad</i> 500 ml	10 mM 140 mM 2,5 mM - -
Annexin Färbelösung	V/PI Annexin V/PI Binde-Puffer Annexin V PF67 Propidiumjodid-Lösung	200 µl 1 µl 4 µl	

Tabelle 5: Durchflusszytometrie | Gerätschaft

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
BD FACS Calibur TM Flow Cytometer	Reference Nr.342975	BD Biosciences, Heidelberg, Germany

3. Elektroporation

Tabelle 6: Elektroporation | Gerätschaften und siRNA

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Gene-Pulser TM	1652076	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Elektroporationsküvette 2 mm	732-2920	VWR International, Radnor, USA
GRP78 siRNA	kundenspezifisch	Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA
GRP78 co-siRNA	452001	Invitrogen AG, Carlsbad, USA

GRP78 siRNA Sequenz:

- Sense: 5'-GGAGCGCAUUGAUACUAGAtt-3'
- Antisense: 5'-UCUAGUAUCAAAUGCGCUCCtt-3'

4. Zellkultur

Tabelle 7: Zellkultur | Chemikalien

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
RPMI-1640	R0883-500ML	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
FCS	F7524	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Streptomycin/Penicillin	P4333-100ML	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natrium-Pyruvat	S8636-100ML	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
L-Glutamin+	G7513-100ML	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypanblau	T6146	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Pancoll	P04-60500	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland

Tabelle 8: Zellkultur | Gerätschaften und Materialien

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Sicherheitswerkbank Hera Safe	51022790	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Neubauer Zählkammer improved	40442002	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim, Deutschland
CO ₂ -Inkubator Hera Cell 150 Heraeus	50047292	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Wasserbad	3001498	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Stereomikroskop Nikon Eclipse TS100	2CE-MTAH-8	Nikon Instruments Europe B.V., Amstelveen, Niederlande
Multifuge 3 S-R Heraeus	75004371	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
6 Well-Zellkulturplatte	92406	Techno Plastic Products AG, Trasadingen Schweiz
12 Well-Zellkulturplatte	92412	Techno Plastic Products AG, Trasadingen Schweiz
96 Well-Zellkulturplatte	92696	Techno Plastic Products AG, Trasadingen Schweiz
Zellkulturflasche 75 cm ²	90076	Techno Plastic Products AG, Trasadingen Schweiz
Zellkulturflasche 150 cm ²	90151	Techno Plastic Products AG, Trasadingen Schweiz
Zellkulturflasche 300 cm ²	90301	Techno Plastic Products AG, Trasadingen Schweiz
Kühlschrank Liebherr Profi Line	-	Liebherr-International S.A., Bulle, Schweiz
MACS Stand Multi	130-042-202	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Large Cell Column Säule	130-098-463	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
MACS Smart Strainer 100 µl	NN-2332R	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
Kanüle Neolus	130-090-753	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland
MACS Mix Tube Rotator	130-090-753	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland

Zellschaber S	99002	Techno Plastic Products AG, Trasadingen Schweiz
Elektronische Pipettierhilfe Accu-Jet Pro	263	Brand GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland
Serologische Pipette 5 ml	760180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Serologische Pipette 10 ml	607180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Serologische Pipette 25 ml	606180	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Flow Cytometry Röhren	55.1579	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland
CellStar Tubes 15 ml – 15 ml Reaktionsgefäß	188271	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Cellstar Tubes 50 ml – 50 ml Reaktionsgefäß	227261	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

5. Zellyse und Proteinbestimmung

Tabelle 9: Zellyse und Proteinbestimmung | Chemikalien

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
HEPES	SLBQ6562V	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
MgCl ₂	TA674335 804	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
EDTA >99 %	8040.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
EGTA	E4378-100G	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
PMSF	P-7626	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Pefabloc SC	A154.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
DTT	6908.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Aprotinin	A162.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NP-40/TERGITOL™	9127.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Na-O-Vanadat	450243	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	65525	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DC™ Protein Assay Reagent A	500-0113	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
DC™ Protein Assay Reagent B	500-0114	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
DC™ Protein Assay Reagent S	500-0115	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Tabelle 10: Zellyse und Proteinbestimmung | Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Gewicht/Volumen	Molarität
2x Lysepuffer	HEPES (1 M)	800 µl	40 mM
	NaCl (5 M)	280 µl	700 mM
	MgCl ₂ (1 M)	40 µl	2 mM
	EDTA (0,5 M)	40 µl	1 mM
	EGTA (0,5 M)	8 µl	0,2 mM

	H ₂ O	<i>ad</i> 20 ml
1x Lysepuffer	2x Lysepuffer	500 µl
	PMSF (100 mM)	10 µl
	Pefabloc (10 mg/ml)	10 µl
	DTT (100 mM)	5 µl
	Aprotinin (1 mg/ml)	1 µl
	NP-40 (10 %)/TERGITOL	100 µl
	H ₂ O	364 µl
	2x Laemmli Probenpuffer	Tris pH 6,8 (1 M)
	Glycerol (100 %)	2 ml
	SDS (4 %)	4 ml
	Bromphenolblau (0,01 %)	140 µl
	H ₂ O	1,95 ml
	β-Mercaptoethanol	Frisch zugegeben

Tabelle 11: Zellyse und Proteinbestimmung | Gerätschaften

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Gelplatte Spacer-Plate	#1653310	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Gelplatte Short-Plate	#1653308	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Heizblock Eppendorf Thermomixer compact	T1317-1EA	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Feinwaage Sartorius handy M160	-	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Microplate Reader Model 680	1681000	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Magnetrührer Hotplate Model L-81	81000	Labinco BV, Breda, Niederlande
Waage Scout Pro	10162802	Ohaus Europe GmbH, Nänikon, Schweiz
pH Meter HI 991001	-	HANNA Instruments Inc., Rumänien
Vortex Genie 2	G560E	Scientific Industries™, Bohemia, USA

6. SDS-PAGE / Western Blot und Entwicklung

Tabelle 12: SDS-PAGE, Western Blot, Entwicklung | Chemikalien

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Rotiphorese-Gel-30	3029.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ammoniumperoxodisulfat APS	959.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	2367.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
SDS ultra pure	2326.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
TRIS Pufferan > 99,3 %	AE15.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Glycin PUFFERAN > 99 %	3908.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	9127.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
NaCl Natriumchlorid > 99,8 %	9265.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
BSA Fraktion V > 98 %	T844.2	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol > 99 %	4227.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
H ₂ O ₂ 30 %	1.07209.0250	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Ponceau S	1405.0100	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
HCl 20 %	4326.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natronlauge 1 mol/l	K021.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 70 % vergällt	T913.3	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 96 % vergällt	T171.4	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Methanol > 99,8 %	32213-2.5L-M	Sigma-Aldrich, CO, Steinheim, Deutschland
PageRuler™ Unstained Ladder	26614	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Luminol > 95 %	4203.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
p-Cumarsäure	C9008-10G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Magermilchpulver	-	TSI GmbH & Co. KG, Zeven, Deutschland
Developer G153 A	HT536	Agfa NV, Mortsel, Belgien
Developer G153 B	HT536	Agfa NV, Mortsel, Belgien
Rapid Fixer G354	2828Q	Agfa NV, Mortsel, Belgien

Tabelle 13: SDS-PAGE, Western Blot | Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung	Gewicht/Volumen	Molarität
10x TGS-Puffer	Tris-Base	30 g	0,24 mol
	Glycin	142 g	1,92 mol
	SDS	5 g	0,017 mol
	H ₂ O	ad 1.000 ml	
1x TGS-Puffer	10x TGS-Puffer	100 ml	
	H ₂ O	ad 1.000 ml	
Transferpuffer	Tris-Base	5,82 g	48 mM
	Glycin	2,93 g	39 mM
	SDS-Lösung (10 %)	3,75 ml	1,3 mM
	Methanol	200 ml	
	H ₂ O	ad 1.000 ml	
10x TBS	Tris-Base	24,2 g	0,2 mol
	NaCl	80 g	1,37 mol
	H ₂ O	ad 1.000 ml	
	HCl (20 %)	ad pH 7,6	
1x TBST	10x TBS	100 ml	
	H ₂ O	ad 1.000 ml	
	Tween 20	1 ml	
Stripping-Puffer	Glycin	1,5 g	200 mM
	SDS-Lösung (10 %)	10 ml	3,5 mM
	H ₂ O	ad 1.000 ml	
	HCl (20 %)	ad pH= 2,2	
	Tween 20		

Tabelle 14: SDS-PAGE, Western Blot, Entwicklung | Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Gewicht/Volumen
SDS (10 %)	SDS H ₂ O dest.	30 g ad 300 ml
Tris pH 8,8 (1 M)	Tris-Base H ₂ O dest. HCl (20 %)	12,114 g ad 100 ml ad pH 8,8
Tris pH 8,8 (100 mM)	Tris pH 8,8 (1 M) H ₂ O dest.	10 ml 90 ml
Tris pH 6,8 (1 M)	Tris-Base H ₂ O dest. HCl (20 %)	12,114 g ad 100 ml ad pH 6,8
APS-Lösung	APS H ₂ O	1 g ad 10 ml
Ponceau-Rot-Lösung	Ponceau S Essigsäure (100 %) H ₂ O	0,5 g 25 ml ad 500 ml
ECL-Reagenz	Tris pH 8,8 (100 mM) Luminol P-Cumarsäure H ₂ O ₂	10 ml 100 µl 20 µl 3 µl

Tabelle 15: SDS-PAGE | Polyacrylamidgele

Bezeichnung	Zusammensetzung	Gewicht/Volumen
10 % Trenngel (für 2 Gele)	Rotiphorese-Gel-30 Tris-HCL pH 8,8 (1 M) H ₂ O dest. SDS (10 %) APS (10 %) TEMED	3,3 ml 3,8 ml 2,9 ml 100 µl 100 µl 5 µl
15 % Trenngel (für 2 Gele)	Rotiphorese-Gel-30 Tris-HCL pH 8,8 (1 M) H ₂ O dest. SDS (10 %) APS (10 %) TEMED	5 ml 3,8 ml 1,2 ml 100 µl 100 µl 5 µl
5 % Sammelgel (für 2 Gele)	Rotiphorese-Gel-30 Tris-HCL pH 6,8 (1 M) H ₂ O dest. SDS (10 %) APS (10 %) TEMED	0,83 ml 0,58 ml 3,50 ml 75 µl 75 µl 2,5 µl

Tabelle 16: SDS-PAGE, Western Blot, Entwicklung | Gerätschaften

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Mini PROTEAN Casting Stand	1653303	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Mini-PROTEAN 3 Cell	1653301	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell	1703940	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
PowerPac™ HC	1645050	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Eppendorf Centrifuge 5415 R	5425000.278	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Schüttler Labor RT Duomax 1030	Heidolph 543-32205-00	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Deutschland
Schüttler Labor 4 °C Shaker DRS-12	neoLab 7-0030	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland

Chromatographiepapier 195 g/cm ²	GB46	GE Healthcare Life Sciences, Amersham, Großbritannien
Nitrocellulose-Blotting Membran	10600002	GE Healthcare Life Sciences, Amersham, Großbritannien
Pipettenspitzen 1.000 µl	732032	Brand GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen 200 µl	732028	Brand GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen kristall	732024	Brand GmbH & CO KG, Wertheim, Deutschland
Gelplatte Spacer-Plate	#1653310	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Gelplatte Short-Plate	#1653308	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Fujifilm Medical X-Ray Film	4741019289	Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan
Medical X-Ray Film CX-BL+	0413	Agfa NV, Mortsel, Belgien
Entwicklergerät AGFA Curix 60	9462/106	Agfa NV, Mortsel, Belgien
Röntgenkassetten Hypercassette TM	13643	Amersham Bioscience UK Limited, Little Chalfont, Großbritannien

7. Primärantikörper

Tabelle 17: Western Blot, Entwicklung | Primärantikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Sek.- Antikörper	Bestell- nummer	Hersteller
BiP/GRP78	1:1.000 in 5 % Milchpulver	Rabbit	#3183	Cell Signaling Technology, Cambridge, Großbritannien
PERK	1:1.000 in 5 % BSA	Rabbit	#5683	Cell Signaling Technology, Cambridge, Großbritannien
HSP72	1:1.000 in 5 % Milchpulver	Mouse	ADI- SPA-810	Enzo Life Sciences, Villeurbanne, Frankreich
ATF4	1:1.000 in 5 % BSA	Rabbit	#1981	Cell Signaling Technology, Cambridge, Großbritannien
peIF α	1:1.000 in 5 % BSA	Rabbit	#3398	Cell Signaling Technology, Cambridge, Großbritannien
eIF2 α	1:1.000 in 5 % BSA	Rabbit	#5324	Cell Signaling Technology, Cambridge, Großbritannien
p62	1:2.000 in 5 % BSA	Mouse	PM045	Medical&Biological Laboratories Co., Ltd., Woburn, USA
pIRE1 α	1:1.000 in 5 % BSA	Rabbit	Ab12494 5	Abcam, Cambridge, Großbritannien
IRE1 α	1:1.000 in 5 % BSA	Rabbit	#3294	Cell Signaling Technology, Cambridge, Großbritannien
pSAPK (Thr183/Tyr185)	1:500 in 5 % Milchpulver	Mouse	#9255	Cell Signaling Technology, Cambridge, Großbritannien
SAPK	1:1.000 in 5 % BSA	Rabbit	#9252	Cell Signaling Technology, Cambridge, Großbritannien
pBeclin(Ser91)	1:500 in 5 % BSA	Rabbit	#14717	Cell Signaling Technology, Cambridge, Großbritannien
Beclin	1:1.000 in 5 % BSA	Mouse	#J2918	Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, USA
LC3A/B	1:1.000 in 5 % BSA	Rabbit	#12741	Cell Signaling Technology, Cambridge, Großbritannien
XBP1(s)	1:1.000 in 5 % Milchpulver	Rabbit	#12782	Cell Signaling Technology, Cambridge, Großbritannien
ATF6	1:1.000 in 5 % BSA	Rabbit	ab83504	Abcam, Cambridge, Großbritannien

β -Actin	1:10.000 in 5 % Milchpulver	Mouse	A5376	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
GRP94	1:1.000 in 5 % Milchpulver	Rabbit	#20292	Cell Signaling Technology, Cambridge, Großbritannien

8. Sekundärantikörper

Tabelle 18: Western Blot, Entwicklung | Sekundärantikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Bestellnummer	Hersteller
Anti-Mouse	1:20.000 in 5 % Milch	131596	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Anti-Rabbit	1:20.000 in 5 % Milch	109899	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA

9. Zellzyklusmessung

Tabelle 19: Zellzyklusmessungen | Chemikalien

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
RNase A	#EN0531	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

10. Alamar-Blau Messungen

Tabelle 20: Alamar-Blau | Chemikalien

Bezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
Resazurin	R7017-5G	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

11. Pharmakologische Inhibitoren

Tabelle 21: Pharmakologische Inhibitoren

Bezeichnung	Konzentration	Artikelnummer	Hersteller
AR-12	10 mM	S1106	Selleckchem Chemicals LCC, Houston, USA
CB-5083	10 mM	S8101	Selleckchem Chemicals LCC, Houston, USA
VER155008	50 mM	3803	Tocris Bioscience, Wiesbaden-Nordenstedt, Deutschland
Carfilzomib	20 mM	S2853	Selleckchem Chemicals LCC, Houston, USA
Panobinostat	10 mM	S1030	Selleckchem Chemicals LCC, Houston, USA
PAT-SM6	3,49 mg/ml	-	Patrys Limited, Melbourne, Australien
Dimethylsulfoxid DMSO	-	5179.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Solvens Control	50 mM Tris 100 mM Arginin <i>ad</i> pH 7,4	-	-
-----------------	--	---	---

12. Software

Tabelle 22: Software

Programmname	Version	Hersteller
Adobe Photoshop	CS5	Adobe Inc., San Jose, USA
BD Cellquest™ Pro		Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes USA
Canvas X	X 2019	Canvas GFX, Boston, USA
FlowJo	8.8.7	FlowJo LCC, Oregon, USA
Microsoft Excel	2010	Microsoft Corporation, Redmont, USA
Microsoft Editor	-	Microsoft Corporation, Redmont, USA
Microsoft PowerPoint	2010	Microsoft Corporation, Redmont, USA
Microsoft Word	2010	Microsoft Corporation, Redmont, USA
Microplate Manager	V521	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
PRISM	8.3.0	Graphpad Software Inc., San Diego, USA

V. METHODEN

1. Zellkultur

Für diese Arbeit wurden JJN3, AMO1, AMO1R65CAR und AMO1R180IXA-Zellen verwendet. Die Zellen wurden für die Dauer der Versuche in 75 ml oder 250 ml Zellkulturflaschen gehalten und in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphärengehalt kultiviert. Eine mittlere Zellzahl von 2-5x10⁵ Zellen pro ml Medium wurde dabei angestrebt. Als Medium wurde Sigma-RPMI-1640 verwendet. Dem Medium wurde 10 % (= 50 ml) FCS (fetales Kälberserum) zugesetzt, wodurch den Zellen wichtige Wachstumsfaktoren zur Verfügung gestellt wurden. L-Glutamin und Natrium-Pyruvat wurden zusätzlich in jeweils 1 % Endkonzentration (= jeweils 5 ml) hinzugegeben. L-Glutamin dient vor allem als Energie- und Stickstoffquelle für Zellen mit hoher Teilungsgeschwindigkeit, wohingegen Natrium-Pyruvat als zusätzliche Kohlenstoffquelle substituiert wird. Die ebenfalls zugesetzten 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin sollten durch ihre kombinierte Wirkung gegen grampositive und gramnegative Bakterien eine mögliche bakterielle Kontamination verhindern. Damit ergab sich das als RPMI+ bezeichnete Zellmedium. Die verwendeten Zellkulturen wurden mit negativen Ergebnissen auf Kontaminationen mit *Mycoplasma spp.* mittels PCR untersucht. Etwa alle drei Monate wurden die verwendeten Zelllinien neu aus dem institutseigenen Vorrat aufgetaut (*working bank*). Diese wurden in flüssigem Stickstoff gelagert. Nicht verwendetes Medium wurde bei 4 °C gelagert.

Wurden die Zellen nicht benötigt, so fand alle zwei bis drei Tage durch Entnahme von zellhaltigem Medium und Zugabe von zellfreiem Medium eine Verdünnung auf die angestrebte Zellkonzentration statt. Dazu wurde mit Hilfe einer elektronischen Pipette das Medium mit den darin enthaltenen Zellen jeweils gut durchmischt und an der Flaschenwand anhaftende Zellen abgelöst. Dies diente ebenfalls der Minimierung von mehrzelligen Aggregaten, die eine nachfolgende Zellzählung erschwert hätten. Anschließend wurden 20 µl entnommen und in ein Well einer 96-Well Zellkulturplatte vorgelegt. Danach wurden hierzu 20 µl einer Trypanblau-Lösung (Verdünnung 1:20) hinzugegeben und gründlich gemischt. Hiervon wurden 20 µl entnommen und in eine vorbereitete Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter dem Lichtmikroskop wurden anschließend die farblosen,

morphologisch intakten Zellen ausgezählt. Die Anzahl der gezählten Zellen wurde mit dem Faktor zwei multipliziert, da es sich um eine 1:1 Verdünnung mit Trypanblau handelte und anschließend mit dem Faktor 1×10^4 multipliziert, wodurch die Zellzahl pro ml Medium errechnet werden konnten. Trypanblau ist ein Vitalfarbstoff, der von vitalen Zellen mittels Pumpen wieder nach außen befördert wird. Folglich färbt Trypanblau nur apoptotische und nekrotische Zellen an. Anschließend wurde den Zellkulturflaschen eine entsprechende Menge zellhaltigen Mediums entnommen, wobei das verbrauchte Medium im Zuge der Vorbereitung zur Aussaat entfernt und durch frisches Medium ersetzt wurde. Zellen der JN3-Zelllinie mussten vor dem Zählen zusätzlich mit einem sterilen Zellschaber von der Innenseite der Zellkulturflasche vorsichtig abgelöst werden, da es sich um semi-adhärenente Zellen handelte. Im Anschluss konnte mit ihnen in gleicher Weise verfahren werden wie mit den restlichen Zelllinien (Suspensionszellen).

2. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie erlaubt die singuläre Untersuchung und Charakterisierung der Größe, relativen Granularität und Fluoreszenzintensität von Zellen einer Sammelprobe durch die kombinierte Nutzung von Optik und Elektronik. Dadurch können bestimmte Zelleigenschaften in kurzer Zeit auf Einzelzellebene und Ebene der Zellpopulation analysiert werden. Insgesamt ist die Durchflusszytometrie sehr facettenreich und komplex, es wird sich daher vor allem auf die in dieser Arbeit angewandten Teilbereiche beschränkt und die Technik dahinter kurz erklärt.

Die Zellen werden durch das Gerät angesaugt und gelangen in einen laminaren Flüssigkeitsstrom, wobei die Zellen durch Druckunterschiede vereinzelt werden. In einer Kammer werden die Partikel einzeln mit dem Licht zweier Laser (Wellenlänge 488 nm und 630 nm) bestrahlt (263). Das dabei gebrochene Licht kann als erste Analysemethode der Probe durch Messung der Vorwärtsstreuung und der Seitwärtsstreuung verwendet werden. Die Vorwärtsstreuung (*Forward-Scatter*, FSC) verhält sich proportional zur Größe eines Partikels, da das Licht, das parallel der Partikelfließrichtung gelenkt wird, durch die einzelnen Partikel auf seiner Oberfläche gebrochen wird. Die Seitwärtsstreuung (*Side-Scatter*, SSC) misst in einem Winkel von 90° zur Quelle des Lichts die Streuung, die beim Auftreffen des Lichtstrahls auf intrazelluläre Strukturen

entsteht. Die Seitwärtsstreuung ist proportional zur Granularität der Zelle (siehe Abbildung 2).

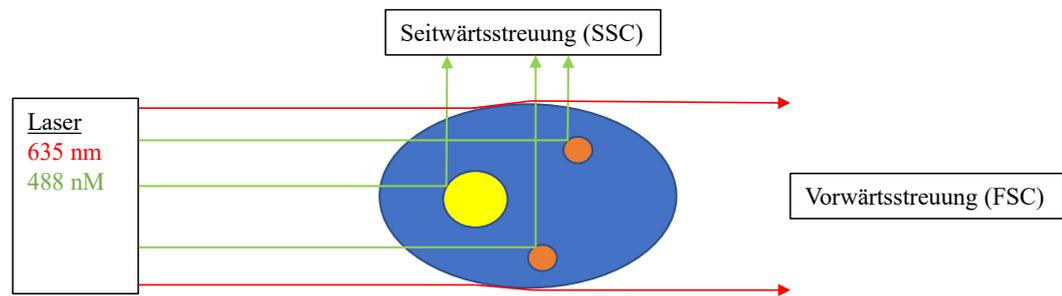


Abbildung 2: Schematische Abbildung von FSC und SSC (vereinfacht)

Da Zellen mit dem FSC und SSC nur grob voneinander unterschieden werden können, wurde in dieser Arbeit zusätzlich mit Farbstoffen gearbeitet. Dabei wurde die Durchflusszytometrie, auch FACS (*Fluorescence activated cell scanning*) genannt, verwendet. Als Farbstoffe wurden Propidiumjodid (Absorptionsmaximum 550 nm, Emissionsmaximum 650 nm) und Annexin V verwendet, das an den Farbstoff PromoFluor-647P, NHS ester konjugiert ist, (Exzitationsmaximum 650 nm, Emissionsmaximum 665 nm).

Annexin V ist ein Ca^{2+} -abhängiges Protein mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin-Reste. Diese Phosphatidylserin-Reste werden im Verlauf der frühen Apoptose von der Innenseite der zellulären Plasmamembran auf die Außenseite der Membran transloziert (264).

Propidiumjodid ist ein Farbstoff, der selektiv die DNA von Zellen anfärbt. Das Eindringen von Propidiumjodid in die Zelle ist allerdings erst nach Beschädigung der Plasmamembran möglich. Annexin V und Propidiumjodid negative Zellen besitzen eine intakte Plasmamembran und sind als lebendig einzustufen. Ist eine Zelle Annexin V positiv und gleichzeitig Propidiumjodid negativ, befindet sie sich im Stadium der frühen Apoptose, da sich bereits Phosphatidylserin-Reste auf der Außenseite der Plasmamembran befinden, die Membran an sich aber noch eine vollständige strukturelle Integrität aufweist. Im Falle eines Annexin V und Propidiumjodid positiven Ergebnis, ist von einem späteren Stadium des Zelltodes auszugehen (späte Apoptose oder bereits vollständiger Zelltod). In diesem Fall lässt sich allerdings nicht differenzieren, ob dem Zelltod Nekrose oder Apoptose vorausgegangen ist. Zur Durchführung der FACS-Messung wurden die Proben in den Wells der 96 Well-Zellkulturplatten kurz resuspendiert und gemischt.

Anschließend wurden die Proben jeweils in ein mit 2-3 ml mit 1x PBS gefülltes Durchflusszytometrie-Röhrchen überführt und bei Raumtemperatur bei 293 g für 5 min zentrifugiert. Während der Zentrifugation wurde die Farbstofflösung vorbereitet. Diese bestand aus 200 µl Puffer, 4 µl Propidiumjodid und 1 µl Annexin V, die in ein 15 ml Reaktionsgefäß pipettiert wurden. Das 1x PBS wurde anschließend verworfen und pro Durchflusszytometrie-Röhrchen wurden 200 µl Färbelösung hinzugegeben. Unter Lichtausschluss fand anschließend eine 15-minütige Inkubation statt. Die zu messende Probe wurde vor der Messung kurz erneut durchmischt und anschließend mit dem Gerät „FACS Calibur“ unter Verwendung der Software „BD CellQuest™ Pro“ gemessen. Es wurden dabei pro Versuch durch das Gerät 2×10^3 Zellen gezählt. Die gewonnen Rohdaten wurden danach mit Hilfe der Software „FlowJo“ (Version 8.8.7) ausgewertet. Es wurde von jeder Messung ein Dot-Plot erstellt (Abbildung 3). Nachdem mittels *Gating* die prozentuale Viabilität über die Annexin V / Propidiumjodid-negative Zellpopulation relativ zur DMSO-Kontrolle berechnet wurde, fand der Übertrag dieser Werte in das Programm „Microsoft Excel“ statt. Mit Hilfe des Programmes „GraphPad PRISM“ (Version 8.3.0) wurden die Viabilitätskurven erzeugt.

errechnet. Die berechnete Menge wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 293 g für 5 min zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand vorsichtig abgekippt und mit frischem, angewärmtem RPMI-Medium ersetzt. In jedes für die Überlebenskurven verwendete Well wurden 100 µl RPMI möglichst luftblasenfrei vorgelegt. In 100 µl befanden sich jeweils 1×10^4 Zellen. Die Zellkulturplatten wurden 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphärengehalt im Inkubator vor-inkubiert. Das Pipettierschema ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt. Die verwendeten Inhibitoren wurden in aufsteigender Konzentration in 1,5 ml Reaktionsgefäßen in RPMI-Medium gelöst, durch kurzes Vortexen gleichmäßig durchmischt und anschließend zugegeben. Für jeden Ansatz wurde eine doppelte DMSO-Kontrolle angelegt.

Nach 72-stündiger Inkubation erfolgte für jeden Ansatz die durchflusszytometrische Auswertung unter Anfärbung mit Annexin V / PI und Auswertung, wie in V.2. beschrieben. Die EC₅₀ und EC₂₅-Werte wurden durch Ablesen der Werte der X-Achse (Inhibitorkonzentration) und Y-Achse (Viabilität in Vergleich zur DMSO-Kontrolle in %) ermittelt.

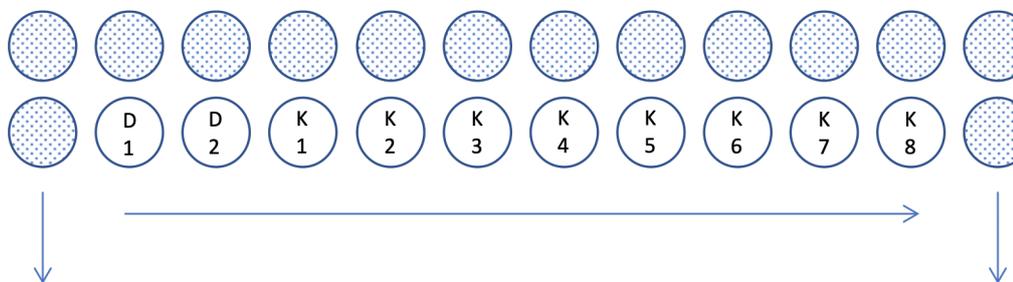


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Versuchsansatzes in einer 96 Well-Zellkulturplatte

Ausgegraut: 1x PBS Ring; D1/D2: DMSO-Kontrolle 1 und 2; K1-K8: Aufsteigende Inhibitorkonzentration, z.B. AR-12 0,5 µM (K1), 1 µM (K2), 2 µM (K3), 3 µM (K4), 4 µM (K5), 5 µM (K6), 6 µM (K7), 7,5 µM (K8).

4. Viabilitätsversuche – Kombinationsansätze

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob die Kombination der beiden Inhibitoren zu additiven Effekten in Hinblick auf die Viabilität der untersuchten Zelllinien führt, wurden Kombinationsversuche durchgeführt. Es wurden dabei für den Inhibitor CB-5083 der für die jeweilige Zelllinie ermittelte EC₂₅-Wert und für den Inhibitor AR-12 der EC₄₀-Wert verwendet. Für die JJN3, AMO1 und AMO1R65CAR-Zellen

wurden jeweils zwei verschiedene Konzentrationen von CB-5083 verwendet, für die Zelllinie AMO1R180IXA nur eine Konzentration. Auszählen und Aussäen der Zellen fanden äquivalent zu der Beschreibung in V.1. bis V.3. statt. Jeweils zwei Negativkontrollen wurden angelegt. Danach wurden den ausgesäten Zellen die Inhibitoren erst einzeln und dann kombiniert zugegeben. Das weitere Vorgehen erfolgte wie in V.2. bzw. V.3. beschrieben.

5. Elektroporation

Mittels Elektroporation wurde in dieser Arbeit die Expression von GRP78 herunterreguliert. Dies wurde durch den Einsatz einer GRP78 spezifischen siRNA erreicht. SiRNAs sind kurze, doppelsträngige RNA Moleküle, die eine komplementäre Sequenz zur mRNA eines bestimmten Gens besitzen. Durch kurzzeitiges Anlegen eines elektrischen Feldes wird die Permeabilität der Zellmembran temporär erhöht, siRNA gelangt in die Zelle (265).

Für Kontroll- und Versuchsansatz wurden jeweils 1×10^7 Zellen verwendet, die entsprechend der Beschreibung aus V.1. und V.3. gezählt wurden. Die Zellen wurden für 5 min bei 293 g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgekippt und das Zellpellet in 9,5 ml RPMIp (pur – ohne Zusätze) gewaschen. Im Anschluss erfolgte wieder eine Zentrifugation für 5 min bei 293 g.

Der *Stock* (300 μ M) der siRNA und der co-siRNA wurde auf Eis aufgetaut. Für beide wurde eine 3 μ M Endkonzentration bei 2 μ l entnommener *Stocklösung* eingestellt. Die Zellen wurden in 750 μ l RPMIp aufgenommen, wovon je 200 μ l in vorbereitete 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt wurden, in die jeweils siRNA und co-siRNA vorgelegt wurden waren. Nach Durchmischung der Suspension erfolgte das Überführen in die 2 mm Elektroporationsküvetten (200 μ l Volumen). Für die Elektroporation wurde das Gerät „Gene Pulser II“ verwendet. Die Küvette wurde eingesetzt und bei einer Kapazität von 960 μ F eine Spannung von 170 Volt für 4 Sekunden angelegt (266). Es wurden unmittelbar 500 μ l RPMIp hinzugegeben, nach kurzem Resuspendieren entnommen und in ein vorbereitetes 15 ml Reaktionsgefäß mit 3 ml vorgewärmten RPMIp überführt. Bis zum Abschluss aller Elektroporationen wurden bereits elektroporierte Ansätze bei Raumtemperatur gelagert. Im Anschluss wurden die Ansätze bei 5 % CO₂-Atmosphärengehalt und 37 °C für 15 min mit leicht geöffnetem Deckel in den 15 ml Reaktionsgefäßen inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mit jeweils 35 ml RPMI+ (inklusive der

genannten Zusätze) in Zellkulturflaschen überführt und unter konstanten Bedingungen für weitere 72 h weiter inkubiert. Nach 72 h wurden die Zellen für die jeweiligen Versuche weiterverwendet. Das Vorgehen entsprach der Beschreibung in V.1. und V.6.

Die 2 mm Elektroporationsküvetten wurden umgehend mit 1x PBS und 70 % Ethanol gewaschen, auf Zellstoff ausgeklopft und luftgetrocknet.

6. Proteinanalyse

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit war die Untersuchung der zellulären Auswirkungen beider Inhibitoren auf der Ebene des endoplasmatischen Retikulums von verschiedenen MM-Zelllinien und des durch die Inhibitoren ausgelösten ER-Stress Signalings. Die von den Inhibitoren bewirkte Dynamik der Proteinexpression und damit der messbaren zellulären Proteinmengen eines vorher definierten ER-Stress Signaling Panels wurde molekularbiologisch untersucht.

6.1. Vorbereitung der Versuchsansätze

Die verwendeten Zelllinien wurden, wie in V.1.-V.3. beschrieben, behandelt, für jede Zelllinie wurde die aktuelle Zellzahl pro ml ermittelt. Da für das Western Blotting eine ausreichende Proteinkonzentration notwendig war, wurde mit $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Bedingung gearbeitet. Diese $1,5 \times 10^6$ Zellen wurden pro Well in 4 ml RPMI-Medium auf einer 6-Well Zellkulturplatte ausgesät und anschließend für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphärengehalt im Inkubator vor-inkubiert. Die Inhibitorkonzentrationen wurden für das veränderte Gesamtvolumen errechnet und in aufsteigender Konzentration zu den vor-inkubierten Zellen gegeben. Je Ansatz wurde eine Negativkontrolle angesetzt. Anschließend wurden die Zellen für die gewünschte Zeit bei den oben genannten Bedingungen im Inkubator gelagert. Jeder Ansatz wurde anschließend geerntet, in ein auf Eis gelagertes 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 293 g für 5 min zentrifugiert. Der anfallende Überstand wurde vorsichtig verworfen, das entstandene Zellpellet mit 1 ml gekühltem 1x PBS resuspendiert, in ein gekühltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend erneut bei 293 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Absaugvorrichtung vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet für mindestens 8 h bei -80 °C gelagert.

6.2. Zellyse und Lowry-Test

Die Proben wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen für 20 min auf Eis mit vorher frisch hergestelltem 1x Lyse-Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einer auf 4 °C gekühlten Zentrifuge für 10 min bei 16,1 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert.

Für die Messung der Proteinkonzentration wurde der 1951 von Oliver H. Lowry entwickelte und nach ihm benannte Lowry-Test verwendet, der durch den Hersteller modifiziert wurde, um Zeit bei der Konzentrationsbestimmung einzusparen (267). Der Test beruht auf zwei Reaktionen. Im ersten Schritt findet eine Biuretreaktion durch die Bildung eines blauvioletten Farbstoffkomplexes zwischen Kupfer(II)-Ionen und Peptidbindungen in einer alkalischen Lösung statt. Diese Peptidbindungen reduzieren in einem zweiten Schritt die Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen, die wiederum die gelbliche Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz zu Heteropolymolybdänblau in einer determinierten Zeitspanne reduzieren. Im Anschluss wird die Absorption von Molybdänblau photometrisch gemessen. Je mehr Protein und damit Peptidbindungen sich in der Probe befinden, desto deutlicher ist der blaue Farbumschlag, da mehr Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz reduziert wird.

Es wurde eine aufsteigende BSA-Standardreihe zur Kalibrierung der Proteinkonzentrationsbestimmung und Erstellung einer Eichgeraden angesetzt. Ausgehend von der BSA-Konzentration 10 mg/ml wurden fünf 1:1 Verdünnungen mit H₂O vorgenommen, wodurch 6 Konzentration (10 mg/ml, 5 mg/ml, 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml, 0,625 mg/ml und 0,312 mg/ml) erzeugt wurden.

In Wells einer 96-Well Zellkulturplatte wurde zuerst je 5 µl 2x Lysepuffer pipettiert, die zur Bestimmung des Nullwertes dienen. In die daran anschließenden Wells wurden jeweils doppelt die in ihren Konzentrationen aufsteigenden BSA-Lösungen vorgelegt. In jedes Well, das im Anschluss für Proteinbestimmungen verwendet werden sollte, wurden 2,5 µl H₂O vorgelegt und danach mit je 2,5 µl Proben-Lysat ergänzt. Außerdem wurde aus den Substanzen „DC Protein Assay Reagent A“ (1 ml) und „DC Protein Assay Reagent S“ (25 µl) in einem 5 ml Reaktionsgefäß eine Mischung hergestellt, aus der jeweils 25 µl in alle für die Proteinbestimmung bereits verwendeten Wells hinzugefügt wurden. Abschließend wurden je Well 200 µl der Substanz „DC Protein Assay Reagent S“ möglichst luftblasenfrei zugegeben. Sofern Luftblasen entstanden, wurden diese

durch kurze Exposition der Zellkulturplatte über offener Flamme entfernt. Die Zellkulturplatte wurde nun 10 min im Dunkeln gelagert, es fanden währenddessen die beiden oben beschriebenen Reaktionsschritte statt. Mit dem Gerät „Bio-Rad Microplate Reader“ wurde im Anschluss mit einer Wellenlänge von 655 nm photometrisch die Absorption sämtlicher Proben gemessen. Unter Zuhilfenahme der Eichgeraden, die durch die BSA-Standardwerte gebildet wurde, errechnete das Programm „Microplate Reader“ die Proteinkonzentration der einzelnen Proben selbstständig. Die errechneten Proteinkonzentrationen wurden in ein vorbereitetes Dokument des Programmes „Microsoft Excel“ eingetragen. Für jede Tasche des Gels sollte eine Proteinmenge von 25 µg verwendet werden. Mit destilliertem H₂O wurde auf eine Menge von jeweils 12 µl aufgefüllt, 1 % β-Mercaptoethanol und 12 µl 2x Tris-Glycin Puffer wurden ebenfalls in das 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Für jede Probe wurden die Mengen so berechnet, dass jeweils sechs bis acht Ansätze im SDS-PAGE möglich waren. Anschließend wurden alle Reaktionsgefäße für 5 min bei 95 °C in einem Heizblock aufgeköcht. Die Proben wurden bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

6.3. SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) dient zur Auftrennung der isolierten Proteine nach Ihrer Molekülmasse. Durch kurzes Aufkochen werden die Proteine denaturiert, ihre Sekundär- und Tertiärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrückenbindungen aufgelöst. Das negativ geladene Natriumdodecylsulfat überdeckt durch die Bindung mit den Proteinen deren Eigenladung. Zusätzlich löst es Disulfidbrückenbindungen. Die negativ geladenen Proteine durchlaufen in vertikaler Orientierung zuerst das Sammelgel und anschließend das Trenngel, und zwar in Richtung Anode. Das Sammelgel ist dabei grobporiger und besitzt einen niedrigeren pH-Wert. Die Laufgeschwindigkeit der Proteine im Polyacrylamidgel ist abhängig von ihrer Kettenlänge – kürzere und leichtere Proteine durchlaufen das Gel schneller als längere und schwere Proteine (268). Diese sind daher näher am unteren Rand des Gels zu finden.

Es wurden entweder 10 % oder 15 % Agarose-haltige Trenngele für die Versuche verwendet, das Sammelgel war in beiden Fällen 5 % Agarose-haltig. Gele wurden mindestens einen Tag vor Verwendung gegossen, um eine vollständige Polymerisierung zu gewährleisten.

Die Gele wurden mit den Glasplatten in den Fixierrahmen eingesetzt, dieser wurde wiederum im Puffertank befestigt. Anschließend wurde der Fixierrahmen und der Puffertank bis zur Markierung mit 1x TGS-Puffer gefüllt. 6 µl des Markers „PageRuler™ Unstained Protein Ladder“ wurden jeweils in die Sammelgel-Tasche vor der ersten Probe pipettiert. Diese Proteinleiter diente als Markierung der Proteingrößen und zur Orientierung auf der Nitrocellulose-Membran nach dem Western Blotting. Danach wurden jeweils vorsichtig 25 µg der Probe in einem Volumen von 12 µl in die nachfolgenden Taschen pipettiert. Es wurde anschließend eine Spannung von 100 Volt für ca. 20 min angelegt. Nach Übergang der Laufmittelfront aus dem Sammelgel in das Trenngel wurde die Spannung auf ca. 160 Volt erhöht und für eine Stunde angelegt.

6.4. Western Blot

Der Western Blot dient zur Übertragung der aufgetrennten Proteine von einer Trägermatrix auf eine Membran zu weiteren Prozessierung der Proben. Es wird ein elektrisches Feld senkrecht zur Trägermatrix angelegt. Die in der Trägermatrix gebundenen Proteine wandern entlang des elektrischen Feldes in Richtung Anode und gelangen so auf die an die Trägermatrix direkt angelegte Membran.

In dieser Arbeit wurde die *Semi-Dry* Western Blotting Methode verwendet. Der 1x TGS-Puffer wurde verworfen, das Sammelgel mit einem Spatel vollständig vom Trenngel entfernt und das Trenngel anschließend in Transfer-Puffer überführt. Auf der mit Platin beschichteten Titanium-Basisplatte des Gerätes „Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell“, die als anodischer Teil diente, wurden drei mit Transfer-Puffer getränkte, zugeschnittene Lagen Whatman-Papier platziert. Darauf wurde ein ebenfalls in Transfer-Puffer getränkter, zugeschnittener Abschnitt einer Nitrocellulose-Membran gelegt, auf die vorsichtig und passgenau das Trenngel angelegt wurde. Luftblasen zwischen Nitrocellulose-Membran und Trenngel wurden mit einem ebenfalls in Transfer-Puffer getränkten Glasspatel entfernt. Darüber wurden drei in Transfer-Puffer getränkte, zugeschnittene Lagen Whatman-Papier platziert. Im Anschluss wurde aus diesem Sandwich überflüssiger Transfer-Puffer mit Hilfe eines Glasspatels entfernt. Abschließend wurde die Kathodenplatte über den Sandwiches befestigt und die Sicherheitshülle platziert. Bei 10 % Polyacrylamidgelen wurde für 45 min eine Spannung von 15 Volt angelegt, bei 15 % Gelen wurden 15 Volt für 35 min angelegt. Es wurden pro Gerät maximal zwei Blotting Vorgänge gleichzeitig durchgeführt.

6.5. Antikörper-Inkubation

Nach Abschluss des Blotting-Vorganges wurde die Nitrozellulosemembran angefärbt, die restlichen Komponenten des Western Blots verworfen und die Geräte gereinigt. Die Anfärbung der Membran erfolgte mit dem Farbstoff Ponceau S. Dazu wurde die Membran für eine Minute in der Farblösung geschwenkt. Ponceau S bindet dabei reversibel an positiv geladene Aminogruppen der gebundenen Proteine. Die Anfärbung erlaubte eine erste, grobe Kontrolle, ob die einzelnen Ansätze mit der ungefähr gleichen Menge an Proteinen beladen waren. Falls während dem Blotten Luftblasen zwischen Nitrocellulose-Membranen und Polyacrylamid-Gel bestanden, wurden an diesen Stellen keine Proteine auf die Nitrocellulose-Membran übertragen. Auch diese Abschnitte konnten durch das Anfärben sichtbar gemacht werden und wurden entsprechend nicht weiterverwendet. Die Banden der Proteinleiter wurden vorsichtig mit Bleistift markiert und beschriftet.

Die Membran wurde anschließend auf dem Linearschüttler „Heidolph Duomax 1030“ bei Raumtemperatur in 3 % fettarmer Milch mit 1x TBST für 60 min inkubiert. Dies diente zur Blockierung von freien, unspezifischen Proteinbindungsstellen, die zu falsch-positiven Ergebnissen bei der Signalentwicklung geführt hätten. Im Anschluss wurde die Membran dreimal für 5 min in 1x TBST bei Raumtemperatur auf dem Linearschüttler gewaschen. Nun erfolgte das passgenaue Zuschneiden der Membran mittels Skalpell anhand der vorher markierten Banden der Proteinleiter.

Abschließend erfolgte die Inkubation der in Streifen geschnittenen Membran mit 3 ml des entsprechenden Primärantikörpers auf dem Linearschüttler „NeoLab-Shaker-DRS-12“ über Nacht bei 4 °C.

6.6. Entwicklung

Die Primärantikörper wurden mittels Pipette entfernt und wieder bei -20 °C gelagert. Es folgten drei Waschschrte in 1x TBST für je 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte eine 1-stündige Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit *goat-anti-rabbit* oder *goat-anti-mouse* Sekundärantikörper (je nach Primärantikörper), die in der Verdünnung 1:20.000 in 5 % Magermilchpulver mit 1x TBST angesetzt wurden. Erneut wurden drei Waschschrte in 1x TBST für je 5 min bei Raumtemperatur vorgenommen.

Das Prinzip der ECL (*Enhanced Chemiluminescence*) beruht auf der Kopplung des Sekundärantikörpers mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase. Dieses Enzym katalysiert die Oxidation von Luminol, was zu einer Lichtemission bei einer Wellenlänge von 428 nm führt (269). Das Lichtsignal trifft auf den Röntgenfilm und führt an dieser Stelle zu einer Belichtung der Folie. Da der Sekundärantikörper an dem vorher hinzugegebenen Primärantikörper gebunden ist, der seinerseits am Zielantigen gebunden ist, wird die Folie nur an dieser Stelle belichtet. Es entsteht das typische Bandensignal.

Zur Sichtbarmachung der Banden wurden die Membranabschnitte mit frisch angesetztem ECL-Reagenz für ungefähr eine Minute vollständig bedeckt. Die Membranabschnitte wurden dann in Röntgenfilm-Kassetten unter Klarsichtfolie platziert.

Die weiteren Schritte erfolgten in einer Dunkelkammer unter Lichtausschluss. Zugeschnittene Röntgenfilme wurden in den Kassetten oberhalb der Klarsichtfolie und über den Membranstreifen platziert. Die Belichtungsdauer für die Versuche war dabei abhängig von den verwendeten Primärantikörpern und lag zwischen einer halben Sekunde und mehreren Stunden. Es wurden Erfahrungswerte von Dr. Brännert und eigene Erfahrungswerte genutzt. Nach Entwicklung der Filme mit dem Gerät „AGFA Curix 60“ wurden die Membranstreifen, falls keine unmittelbar weitere Nutzung notwendig war, für 5 min bei Raumtemperatur mit 1x TBST gewaschen und anschließend bei -20 °C gelagert. Andernfalls wurden die Membranstreifen für mindestens 4 h bzw. über Nacht in Stripping-Puffer bei 4 °C auf dem Linearschüttler inkubiert und anschließend wieder mit Primärantikörpern inkubiert.

7. Metabolismusversuche

Die Alamar-Blau Versuche wurden in dieser Arbeit verwendet, um die Effekte von AR-12 und CB-5083 auf den Metabolismus der Zelllinien in Einzel- und Kombinationsansätzen zu untersuchen.

Alamar-Blau, auch Resazurin genannt, ist ein blauer Farbstoff, der als Redoxindikator dient. Resazurin ist für Zellen nicht toxisch und wird durch Stoffwechselprodukte zum rosafarbenen Resorufin reduziert. Nach einiger Zeit findet eine weitere Reduktion statt und es entsteht das farblose Dihydroresorufin (270). Der Farbumschlag von Resazurin zu Resofurin kann photometrisch

gemessen werden und für die Evaluierung von Zellproliferation und -metabolismus genutzt werden. Ansätze mit Alamar-Blau bieten gute Zeit-Wirkungs-Messungen, sind hochsensitiv und linear, benötigen keine Zelllyse, sind nicht toxisch und daher für Mensch und Umwelt ungefährlich (271).

Bei Versuchen mit Alamar-Blau sind Positiv- und Negativkontrollen notwendig, weil auch der Farbstoff eine reduzierte Proliferation bewirken kann. Dies kann beispielsweise durch die Bildung von ROS (*Reactive Oxygen Species*) geschehen (272).

Es wurden je Well 1×10^4 Zellen für jede Zelllinie ausgesät. Das Vorgehen erfolgte wie in V.1.-V.3. beschrieben. Es wurden je Zelllinie Triplets angesetzt, wobei Ansatz 1 zur durchflusszytometrischen Analyse verwendet wurde und Ansatz 2 und 3 im Rahmen der Alamar-Blau Versuche weiter prozessiert wurden (siehe Abbildung 5). Für die Alamar-Blau Versuche wurden neben einer DMSO-Kontrolle ebenfalls sechs Blank Kontrollen je 96-Well Zellkulturplatte angelegt. Die Blank Kontrollen bestanden aus 200 μ l RPMI+. Die Inkubation und Verdünnung der Inhibitoren in Einzel- und Kombinationsversuchen erfolgten wie in V.3. und V.4. beschrieben. Die Zellkulturplatten wurden anschließend 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphärengehalt inkubiert.

Jeweils ein Ansatz pro Zelllinie wurde durchflusszytometrisch ausgewertet, wie in V.2. beschrieben. Es wurden 20 μ l Alamar-Blau in jedes Well des Versuchsansatzes pipettiert. Ausgenommen hiervon waren 3 Blank-Kontrollen. Die Zellkulturplatte wurde im Anschluss etwa 4 h unter Lichtausschluss bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphärengehalt inkubiert. Nachdem die DMSO-Kontrollen deutlich sichtbar einen lilafarbenen Farbumschlag erreichten, wurden die Ansätze mit dem Gerät „Bio-Rad Microplate Reader“ weiter untersucht. Mit dem Gerät wurde mit einer Wellenlänge von 570 nm und 600 nm photometrisch die Absorption sämtlicher Proben untersucht. Die Rohdaten wurden in das Programm „Microsoft Editor“ überführt und anschließend mit dem Programm „Microsoft Excel“ weiter ausgewertet. „GraphPad PRISM“ wurde zur Erstellung der Metabolismuskurven verwendet.

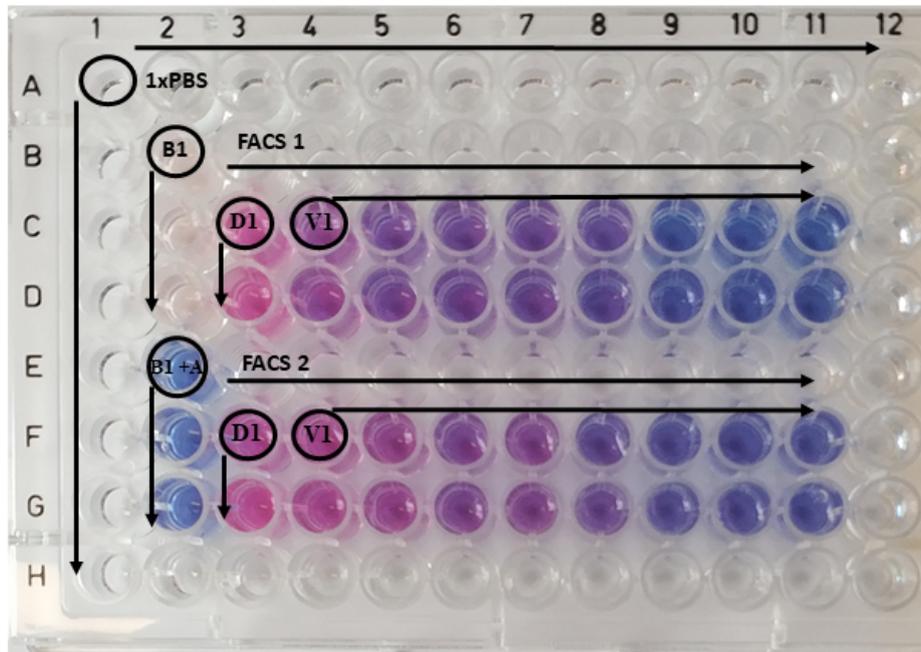


Abbildung 5: Beispielbild eines Alamar-Blau Versuches auf einer 96-Well Zellkulturplatte

B1: Blank 1

B1+A: Blank 1 + Alamar-Blau

FACS 1: FACS-Ansatz 1

FACS 2: FACS-Ansatz 2

D1: DMSO-Kontrolle 1

V1: Versuch 1 mit aufsteigender Konzentration AR-12 (0,5 μ M-7 μ M) von links nach rechts

8. Aufreinigung von Primärmaterial

Primärmaterial wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Auswirkungen auf die Viabilität der Inhibitoren AR-12 und CB-5083 bei einzelner und kombinierter Anwendung auf humane Myelomzellen zu untersuchen. Das Probenmaterial wurde durch das onkologische Zentrum des Universitätsklinikums Würzburg gewonnen und freundlicherweise für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt. Es handelte sich dabei um Knochenmarksbiopsien, die aus den Hüftknochen der Spender gewonnen wurden. Alle Patientenproben wurden unmittelbar nach der Anlieferung durch einen Kurierdienst anonymisiert und weiter prozessiert.

Zu Beginn wurden mit Hilfe eines 70 μ M Siebes Koagel aus dem Primärmaterial entfernt. In einem 50 ml Reaktionsgefäß wurden 20 ml Ficoll-Paque vorgelegt. Darauf wurde das Primärmaterial vorsichtig aufgeschichtet, eine Vermischung der Phasen wurde dabei vermieden. Das Reaktionsgefäß wurde nun 25 min bei 2.350 g (ohne Bremse) zentrifugiert. Die Zentrifugation führt zu einer Aufteilung der Probenbestandteile, da Zellen mit hoher Dichte (Erythrozyten, Granulozyten) das Ficoll-Paque durchwandern, während Zellen mit geringer Dichte

(Mononukleäre Zellen) sich im Interphasering zwischen Ficoll-Paque und Plasmaschicht sammeln. Der Interphasering wurde anschließend vorsichtig abgenommen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, das im nächsten Schritt mit 1x PBS auf 50 ml aufgefüllt wurde. Das Reaktionsgefäß wurde für 10 min bei 2.350 g zentrifugiert, der Überstand wurde im Anschluss abgenommen. Die Probe wurde in einem 15 ml Reaktionsgefäß in 10 ml MACS-Puffer aufgenommen und weitere 5 min bei 2.350 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt, das Zellpellet mit 200 µl MACS-Puffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, in das bereits 20 µl CD138 *Beads* vorgelegt wurden. Anschließend wurde die Probe 15 min bei 4 °C in dem Gerät „MACSmix Tube Rotator“ inkubiert. Die „Large Cell Column Säulen“ wurden in dem Gerät „MACS Stand multi“ befestigt und 1 ml auf die Säule gegeben. Die Probe wurde mit 1 ml MACS-Puffer durchmischt und auf die Säule aufgetragen. Die Säule wurde anschließend mit 2 ml eiskaltem MACS-Puffer gewaschen. Die Säule wurde über einem beschrifteten 1,5 ml Reaktionsgefäß platziert und die Probe mit 2 ml RPMI_p in das Reaktionsgefäß überführt. Die in der Probe enthaltene Zellzahl konnte anschließend gezählt werden und für die weiteren Ansätze prozessiert werden. Das weitere Vorgehen entsprach der Beschreibung in V.1. – V.6. Die Zellen wurden auf Stroma-Zellplatten ausgesät.

9. Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusanalyse wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung der Auswirkungen von AR-12 und CB-5083 auf den Zellzyklus der verwendeten Zelllinien durchgeführt. Die Zellzyklusanalyse mittels Propidiumjodid beruht auf der Tatsache, dass sich der Chromosomensatz einer Zelle während der Progression im Zellzyklus verändert. Während der G1-Phase liegt ein einfacher Chromosomensatz vor, am Ende der S-Phase ein Doppelter und während der G2/M-Phase ebenfalls ein doppelter Chromosomensatz. Die Sub-G1-Phase ist durch apoptotische Zellen mit fragmentierten Zellkernen gekennzeichnet. Es wird Ethanol zugesetzt, um die Zellen zu fixieren und die Zellmembranen zu permeabilisieren. Außerdem verhindert die tröpfchenweise Zugabe des Ethanols die Verklumpung der Zellen. Propidiumjodid interkaliert mit RNA und DNA, weswegen durch RNase vorhandene RNA fragmentiert wird. Nach Inkubation mit Propidiumjodid kann der Versuch mittels Durchflusszytometrie untersucht werden.

Für jede Versuchsbedingung wurden 3×10^5 Zellen in 1 ml RPMI+ entsprechend der Beschreibung in V.1. - V.3. ausgesät, die jeweiligen Inhibitorkonzentrationen addiert und die Ansätze bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphärengehalt für 24 h inkubiert. Die Zellen wurden in 15 ml Reaktionsgefäßen geerntet und 5 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen in 1 ml kaltem 1x PBS resuspendiert und 5 min bei 293 g zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde 3x wiederholt. Anschließend wurde das Zellpellet tröpfchenweise mit 1 ml eiskaltem 70 % Ethanol versetzt. Das 15 ml Reaktionsgefäß wurde währenddessen mit dem Gerät „Vortex-Genie 2“ geschüttelt. Daraufhin wurden die 15 ml Reaktionsgefäße bei 4 °C über Nacht gelagert. Im Anschluss wurden die Ansätze für 5 min bei 850 g zentrifugiert und der Überstand mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt. Die Pellets wurden in 1 ml 1x PBS resuspendiert und 15 min bei 850 g zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder mit einer Pasteurpipette abgesaugt. RNase A (*Stock*: 10 mg/ml) wurde 1:200 mit 1x PBS versetzt. Die Versuchsansätze wurden in Durchflusszytometrie-Röhrchen überführt, jeweils mit 50 µl RNase A versetzt und bei 37 °C und 5 % CO₂-Atmosphärengehalt 60 min inkubiert. Anschließend wurde in jedes Durchflusszytometrie-Röhrchen 250 µl Propidiumjodid dazugegeben und die Ansätze für 4 h bei 4 °C und 5 % CO₂-Atmosphärengehalt inkubiert. Das weitere Vorgehen erfolgte wie in V.2. beschrieben. Für die durchflusszytometrische Messung wurden pro Versuch 1×10^4 Zellen gezählt.

VI. ERGEBNISSE

1. GRP78 Expression in Primärmaterial

Die Expression von GRP78 und GRP94 in Primärmaterial von zehn an MM erkrankten Patienten wurde mit der Expression von GRP78 und GRP94 in PBMCs von drei gesunden Spendern mittels Western Blot verglichen (Abbildung 6). In MM-Zellen von neun der zehn Patienten war visuell im Vergleich mit den PBMCs der gesunden Spender eine deutlich erhöhte Expression sowohl von GRP78 als auch von GRP94 zu erkennen. Lediglich eine Probe der zehn Patienten (MM 8) wies vergleichbare Mengen an GRP78 und GRP94 auf. Allerdings war anhand der β -Actin Ladekontrolle zu erkennen, dass in diesem Fall eine deutlich geringere Gesamtproteinmenge vorlag als bei den Proben der gesunden Spender.

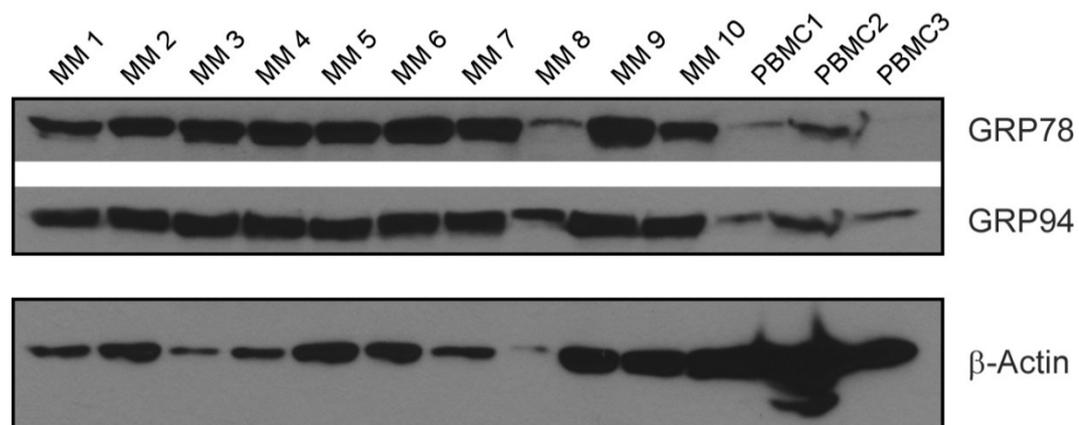


Abbildung 6: Expression von GRP78 und GRP94 in verschiedenen Primärmaterialproben und PBMC von gesunden Spendern

Aus Primärmaterial von zehn verschiedenen Patienten wurden Myelomzellen isoliert. Ebenso wurden PBMCs von drei verschiedenen, gesunden Spendern isoliert. Bei neun der erkrankten Patienten ist eine deutlich erhöhte Proteinmenge von GRP78 und GRP94 im Vergleich mit PBMCs von gesunden Spendern zu sehen. β -Actin diente zur Kontrolle der in den Proben enthaltenen Proteinmengen.

2. AR-12 – GRP78-Inhibition

2.1. Effekt von GRP78-Inhibition und PDK-1-Inhibition auf den Metabolismus

Um metabolische Auswirkungen von AR-12 als indirekten Marker für Proliferations- und Viabilitätsveränderungen zu untersuchen, wurden die Zelllinien zunächst für 72 h mit verschiedenen AR-12 Konzentrationen behandelt. Anschließend wurden mit Hilfe des Alamar-Blau Ansatzes Effekte auf den

Metabolismus untersucht. Dabei ergab sich für alle Zelllinien eine besonders starke Absenkung des Zellstoffwechsels bei AR-12 Konzentrationen zwischen 0 und 1 μM sowie zwischen 4 μM und 5 μM (Abbildung 7). Der Zellstoffwechsel aller Zelllinien fiel im Bereich von 1 μM bis 4 μM Konzentration dagegen annähernd negativ linear ab. Die Reduzierung der Zellstoffwechsel der JJN3 und AMO1-Zelllinien war im Konzentrationsbereich von 1 μM bis 4 μM daher verlangsamt. Der Metabolismus der JJN3 und AMO1R180IXA-Zellen wurde durch AR-12 bis zu einer 4 μM Konzentration im Vergleich mit AMO1 und AMO1R65CAR-Zellen weniger stark reduziert (AMO1R180IXA: 40 % vs. JJN3: 42 %, vs. AMO1: 31 %, vs. AMO1R65CAR: 31 %). Ab dem Einsetzen der PDK-1 inhibierenden Konzentration (5 μM – 50 μM) war ein uniformes Absinken der Stoffwechselaktivitäten aller Zelllinien zu erkennen.

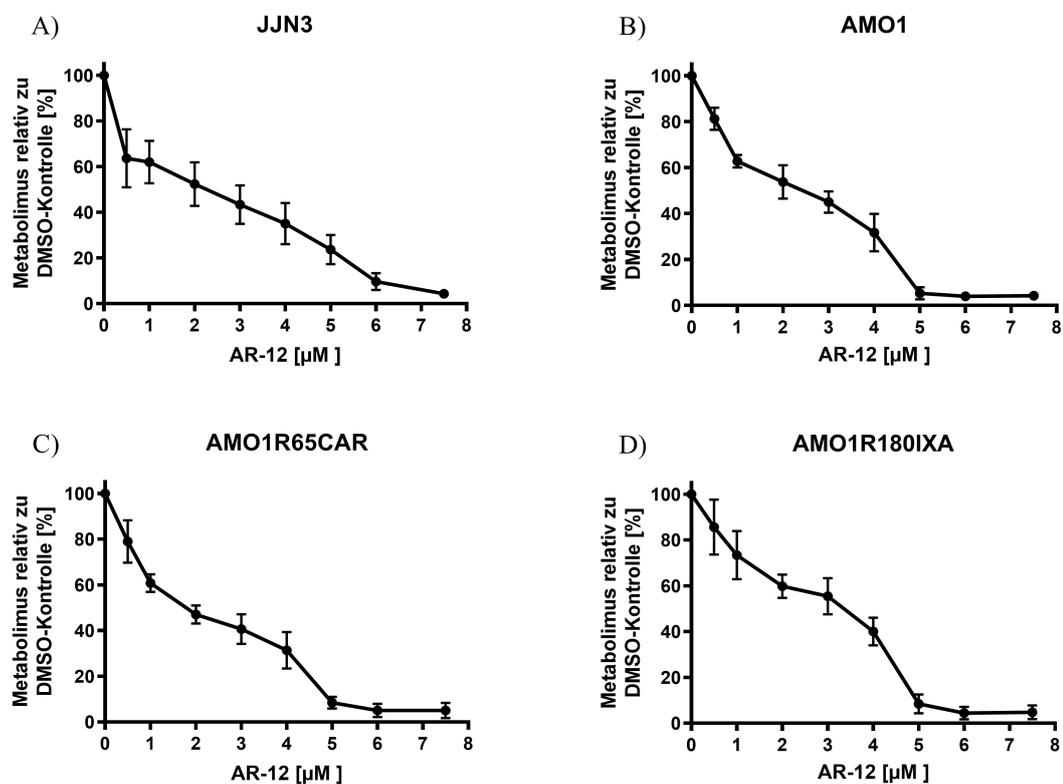


Abbildung 7: Effekt von GRP78-Inhibition und PDK-1-Inhibition auf den Metabolismus von JJN3 und AMO1-Zelllinien

Zellen der JJN3 (A), AMO1 (B), AMO1R65CAR (C) und AMO1R180IXA (D) -Zellen wurden 72 h in Einzelansätzen in aufsteigender Konzentration mit AR-12 inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe von Alamar-Blau Färbung der Zellmetabolismus im Vergleich zur DMSO-Kontrolle gemessen.

$n \geq 3$

2.2. Auswirkung von GRP78-Inhibition auf den Zellzyklus nach 24-stündiger Inkubation

Um Ursachen für die antiproliferativen Eigenschaften von AR-12 zu untersuchen, wurden die verwendeten Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit einer 3 μ M AR-12 Konzentration, die spezifisch für GRP78-Inhibierung sein soll, behandelt. Anschließend wurde eine durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse durchgeführt. DMSO diente als Lösungsmittelkontrolle.

Die JJN3-Zellen zeigten nach 24-stündiger Inkubation mit 3 μ M AR-12 einen leichten Anstieg von Zellen in der G₀, G₁- und S-Phase, wohingegen sich 16 % weniger Zellen in der G₂/M Phase im Vergleich mit der DMSO-Kontrolle befanden (siehe Tabelle 23).

Für die AMO1 und AMO1R65CAR-Zellen ergab sich jeweils ein ähnliches Ergebnis. Nach 24 stündiger AR-12 Inkubation befanden sich mehr Zellen in der S-Phase verglichen mit der Negativkontrolle (AMO1: 15,1 %, AMO1R65CAR: 8,8 %), während Anteile der Zellen in der G₁-Phase annähernd gleich verteilt waren. In beiden Zelllinien war der Anteil der Zellen in der G₂/M-Phase ca. 15 % geringer.

Die AMO1R180IXA-Zellen wiesen nach 24-stündiger AR-12 Inkubation 10 % mehr Zellen in der S-Phase auf als in der Negativkontrolle, während der Anteil in der G₁-Phase 13 % verringert war. G₀ und G₂/M-Phasen waren etwa gleich verteilt. Insgesamt war der Anteil von AMO1R180IXA-Zellen in der G₁-Phase im Vergleich zu den AMO1 und AMO1R65CAR-Zellen in der DMSO-Kontrolle ca. 15 % höher.

Nach 24-stündiger Inkubation trat ein partieller S-Phasen Arrest auf - bei den AMO1-Zelllinien deutlicher als bei den JJN3 Zellen. Ein Anstieg der G₁-Phase war allerdings nur bei den JJN3 Zellen erkennbar, während die Abnahme der G₂/M-Phase in allen Zelllinien auftrat, wenn auch unterschiedlich deutlich (siehe Abbildung 8 und Tabelle 23).

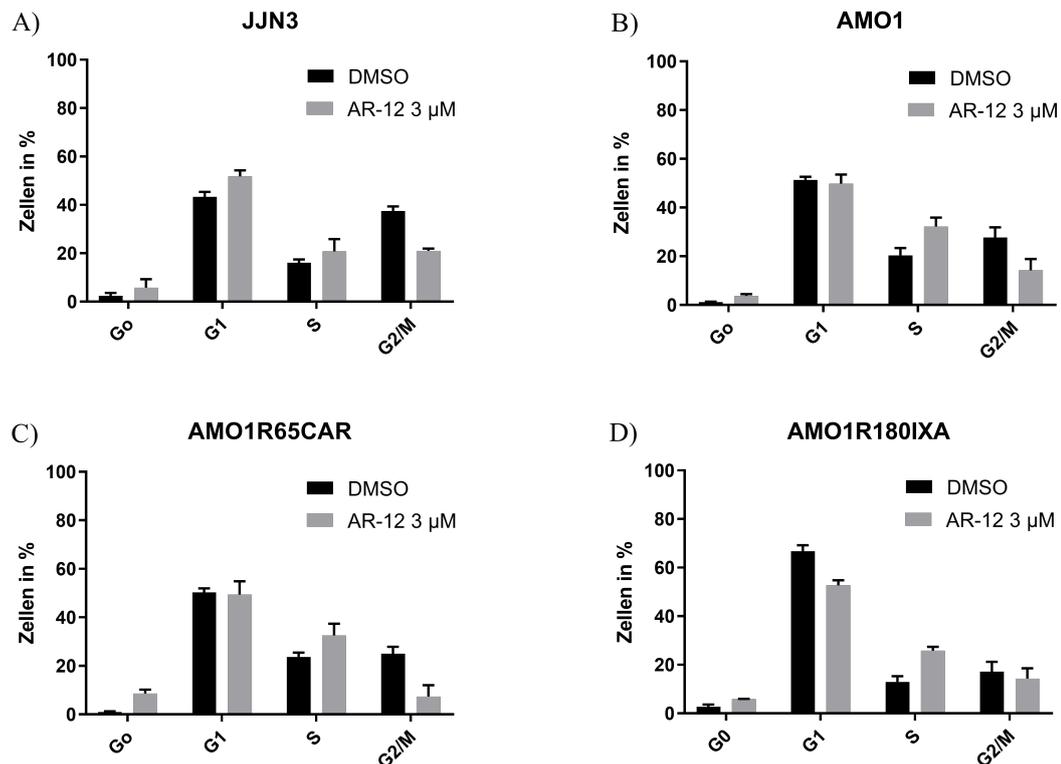


Abbildung 8: Effekt von 24-stündiger GRP78-Inhibition durch AR-12 auf den Zellzyklus von JYN3 und AMO1-Zelllinien

JYN3 (A), AMO1 (B), AMO1R65CAR (C) und AMO1R180IXA (D) -Zellen wurden 24 h mit AR-12 (3 µM) und DMSO als Lösungsmittelkontrolle inkubiert. Anschließend wurde der Anteil der Zellzyklusabschnitte der Versuchsgruppen mit den Kontrollansätzen verglichen.

In allen Zelllinien ist nach 24 h ein teilweiser Arrest in der S-Phase ersichtlich, während der Anteil in der G2/M Phase durchweg sank.

n ≥ 3

Tabelle 23: Verteilung der Zellzyklus-Phasen nach 24-stündiger Inkubation mit AR-12

		G0	G1	S	G2/M
JYN3	DMSO	2,4 %	43,3 %	16,2 %	37,4 %
	AR-12 3 µM	5,8 %	51,8 %	20,8 %	21,1 %
AMO1	DMSO	1,2 %	51,8 %	20,4 %	26,9 %
	AR-12 3 µM	4,3 %	46,3 %	35,6 %	13,4 %
AMO1R65CAR	DMSO	1,0 %	50,3 %	23,7 %	25 %
	AR-12 3 µM	8,6 %	49,3 %	32,5 %	7,3 %
AMO1R180IXA	DMSO	2,7 %	66,7 %	12,9 %	17,1 %
	AR-12 3 µM	5,8 %	52,7 %	25,8 %	14,6 %

2.3. Auswirkungen der GRP78-Inhibition und PDK-1 Inhibition auf die Viabilität

Für die Klärung der Frage, ob AR-12 apoptotische Effekte auf die Myelomzelllinien hat, wurde nach 72-stündiger Inkubation mit verschiedenen AR-12 Konzentrationen eine durchflusszytometrische Viabilitätsbestimmung mittels Annexin V/ Propidiumjodid Assay durchgeführt (Abbildung 9). Dabei zeigte sich bei allen Zelllinien und einer Konzentration von bis zu 0,5 µM kaum

eine Viabilitätsreduktion im Vergleich zur Negativkontrolle, während die Alamar-Blau Messungen hier bereits ein Absinken des Stoffwechsels von jeweils etwa 20 % ergaben (Abbildung 7).

Die Viabilitätsmessung für die JN3-Zelllinie resultierte bis zu einer Konzentration von 4 μM in einer negativ linearen Kurve. Zwischen 4 μM und 5 μM Konzentration sank die Viabilität stark ab, ab 6 μM Konzentration sank sie rapide auf 0 %.

AMO1 und AMO1R65CAR-Zellen zeigten zwischen 0,5 μM und 2 μM Konzentration einen starken Abfall der Viabilität um jeweils 38 % (AMO1) bzw. 44 % (AMO1R65CAR). Zwischen 2 μM und 4 μM Konzentration fand kein weiteres Absinken der Viabilität statt, die Kurve nahm ein Plateau an. Die AMO1R65CAR-Zellen reagierten sogar mit einem geringen Anstieg der Viabilität. Ab 5 μM AR-12 Konzentration sank die Viabilität in beiden Zelllinien von 55 % (AMO1) und 57 % (AMO1R65CAR) auf nahezu 0 % ab.

Für die AMO1R180IXA-Zellen ergab sich eine negativ lineare Kurve zwischen 0,5 μM und 4 μM , ohne die bei den AMO1 und AMO1R65CAR-Zellen beobachtete Plateaubildung. Ab 5 μM Konzentration sank auch hier die Viabilität auf nahezu 0 % ab.

Es konnte gezeigt werden, dass keine der gewählten Zelllinien eine nennenswerte Resistenz gegen AR-12 im Vergleich zu den anderen Zelllinien aufwies, da zwischen AMO1-Zelllinie und den resistenten Abkömmlingen kaum Unterschiede bestanden.

In allen Zelllinien induzierte AR-12 nach 72-stündiger Inkubation dosisabhängig den Zelltod. Ab 5 μM Konzentration war in keiner Zelllinie noch signifikante Viabilität vorhanden.

Nach Vergleich der Metabolismusergebnisse mit den Viabilitätsmessungen wurde festgestellt werden, dass der Zellstoffwechsel durch AR-12 deutlich vor dem Einsetzen des Zelltodes reduziert wurde. Bei ähnlicher Dynamik stellten sich trotzdem Unterschiede, besonders im Bereich bis zu einer AR-12 Konzentration von 4 μM heraus.

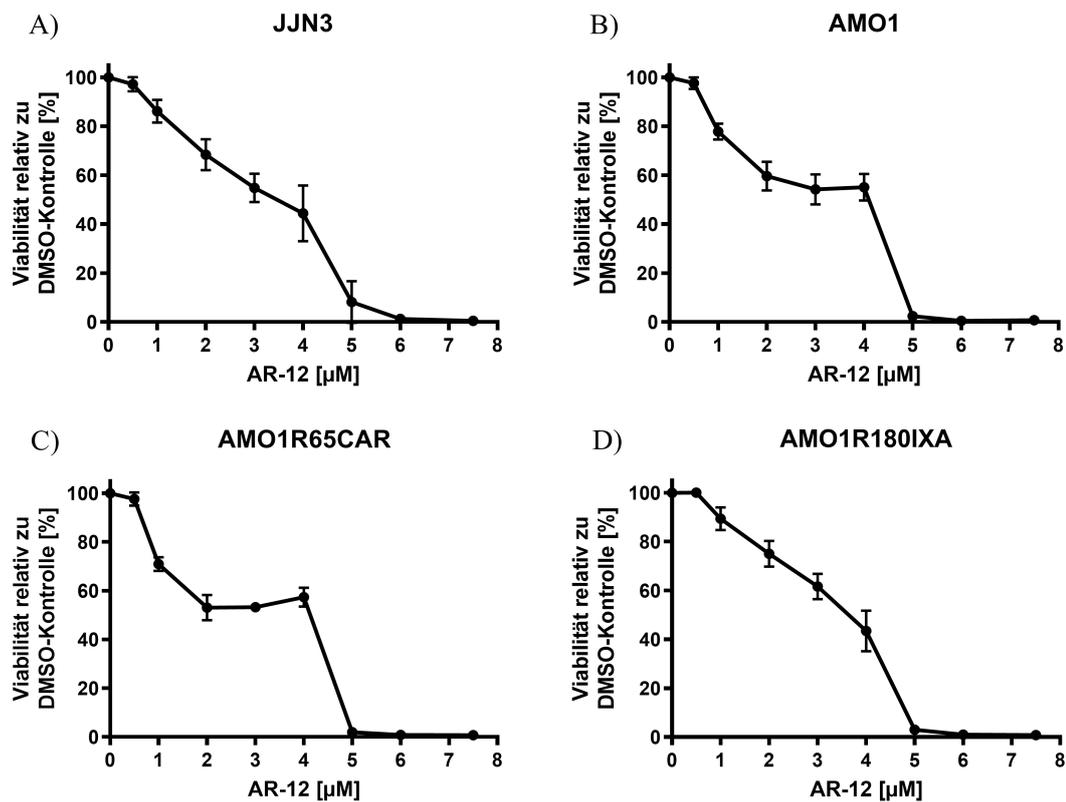


Abbildung 9: Effekt von GRP78-Inhibition und PDK-1-Inhibition auf die Viabilität von JJN3 und AMO1-Zelllinien

JJN3 (A), AMO1 (B), AMO1R65CAR (C) und AMO1R180IXA (D) -Zellen wurden 72 h in Einzelsätsen in aufsteigender Konzentration mit CB-5083 inkubiert. Anschließend wurde eine durchflusszytometrische Messung durchgeführt und das Ergebnis relativ zur jeweiligen Kontrollprobe gesetzt.

Die JJN3-Zellen reagierten am insensitivesten, die AMO1R180IXA-Zellen hingegen am empfindlichsten. Die AMO1 und AMO1R65CAR-Zellen zeigten einen zueinander sehr ähnlichen Kurvenverlauf.

n ≥ 3

2.4. Auswirkung von AR-12 auf die UPR von Myelomzelllinien

Zur Analyse der Wirkung von AR-12 auf das ER-Stress Signaling Panel wurde für alle Zelllinien eine 3 µM Konzentration gewählt, was ungefähr dem EC₆₀-Wert entsprach und bei dem AR-12 inhibiert werden sollte.

Für JJN3, AMO1, AMO1R65CAR und AMO1R180IXA-Zellen konnte bei den untersuchten Zeitpunkten keine sichtbare Abnahme von GRP78 nachgewiesen werden, was in Abbildung 10 zu sehen ist. GRP94 nahm durch die Inkubation mit AR-12 weder zu noch ab. Die AMO1, AMO1R65CAR und AMO1R180IXA-Zellen zeigten nach 4 h eine leichte Abnahme der PERK Bande und nach 8 h eine Zunahme der Bande, was für eine Aktivierung des PERK-Signalweges spricht. Eine nennenswerte Phosphorylierung von eIF2α an Position Ser51 wurde allerdings nur bei AMO1R65CAR-Zellen nachgewiesen. Eine

Aktivierung des nachgeschalteten ATF4 konnte nur für die JJN3-Zelllinie nach 4 h festgestellt werden.

In allen Zelllinien kam es zu einer geringfügigen Aktivierung von IRE1 α , was sich durch die leichte Zunahme der Bandenintensität der P-IRE1 α (Ser724) Banden zeigte. SAPK wurde dadurch bei keiner Zelllinie nennenswert an den Stellen Thr183/Tyr185 phosphoryliert, was zur schwachen IRE1 α Aktivierung passt. Die Zunahme der Intensität der LC3A/B-II Bande deutet in allen Zelllinien auf eine Induktion von Autophagie hin. Auf eine Induktion von Autophagie weist zusätzlich der Rückgang der Proteinmenge von p62 nach 4-stündiger Inkubation hin. Diese p62-Abnahme war bei allen untersuchten Zelllinien nachweisbar, wobei die AMOR180IXA-Zellen die schwächste Abnahme aufwiesen.

Die Gesamtproteinmenge von ATF6 nahm in allen Zelllinien deutlich ab, eine deutliche Änderung der geclavten Form von ATF6 war allerdings nicht nachweisbar. Der ATF6 Signalweg wurde durch AR-12 zu den untersuchten Zeitpunkten nicht aktiviert. Die Proteinmenge von HSP72 wurde durch AR-12 ebenfalls nicht beeinflusst, es zeigten sich allerdings Unterschiede in der Nachweisbarkeit des Proteins zwischen den Zelllinien. Generell ist HSP72 in AMO1-Zellen und den beiden Subzelllinien schwach bis nicht exprimiert, es erfolgte durch AR-12 keine Expressionsinduktion. JJN3-Zellen zeigten im Vergleich die höchste Menge von HSP72.

Die gleichmäßige Intensität der β -Actin Banden diente als Nachweis für eine gleichmäßige Proteinmenge innerhalb der Versuchsansätze für jede Zelllinie.

Zusammengefasst führt AR-12 in 3 μ M Konzentration zu einer teilweisen, wenn auch nicht starken Aktivierung der UPR. Zwar wurden PERK und IRE1 α teilweise aktiviert vorgefunden, diese Aktivierung fiel allerdings nicht stark aus und die jeweils nachgeschalteten Proteinsignalwege wurden nicht nennenswert aktiviert. ATF6 wurde durch AR-12 Inkubation nicht wirksam aktiviert. Wie bereits beschrieben wurde keine GRRP78 und GRP94 inhibierende Wirkung mittels Western Blot nachgewiesen.

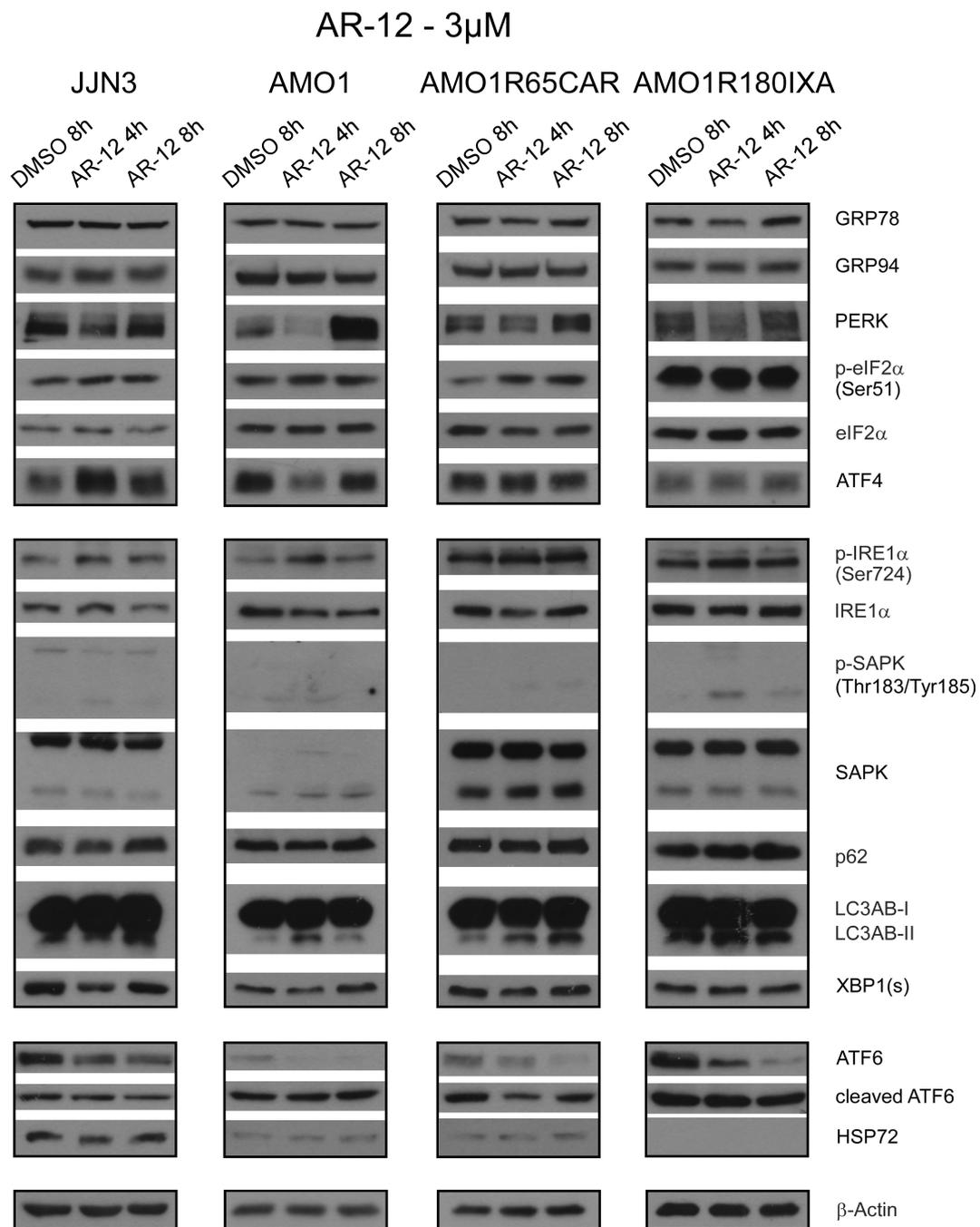


Abbildung 10: Auswirkung von GRP78-Inhibition auf die UPR von Myelomzelllinien

Zellen der verwendeten Zelllinien wurden 4 h und 8 h mit 3 μ M AR-12 sowie DMSO als Lösungsmittelkontrolle inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet. Nach mehreren Schritten wurde die Proteinmenge des jeweiligen Ansatzes mittels Photodetektion sichtbar gemacht. Einen mittels Western Bot erkennbaren Einfluss auf die GRP78-Proteinmenge konnte bei keiner Zelllinie nachgewiesen werden, ebenso wenig auf GRP94. Der PERK-Signalweg wurde nach 8 h besonders bei AMO1 und AMO1R65CAR-Zellen aktiviert. LC3AB-II und p62-Veränderungen sprechen für leichte Autophagieinduktion. Zwar wurden für das Gesamt-ATF6 verringerte Proteinmengen in den AR-12 Ansätzen vorgefunden, das gecleavte ATF6 zeigte dabei aber jeweils keine Veränderung. β -Actin als Ladekontrolle lag mit gleichmäßiger Bandenintensität vor.

n= 3

2.5. Auswirkung von AR-12 auf die UPR von Primärmaterial

Das durch AR-12 induzierte ER-Stress Signaling wurde ebenfalls in Primärmaterial von MM-Patienten untersucht. Aufgrund der schwankenden und größtenteils eher niedrigen isolierbaren MM-Zellzahlen, wurden lediglich die wichtigsten Surrogatmarker des Panels untersucht (siehe Abbildung 11).

Die Proteinmenge von GRP78 wurde durch AR-12 Inkubation in beiden Proben nicht reduziert vorgefunden, die GRP78 Banden waren dagegen im Vergleich zu den DMSO-Kontrollen sogar leicht verstärkt. Zwar wurde PERK nur in der Probe MM9 verstärkt exprimiert vorgefunden, eIF2 α lag allerdings in beiden Proben an Position Ser51 verstärkt phosphoryliert und damit aktiviert vor. Ebenso lag ATF4 nach der 4-stündigen AR-12 Inkubation in beiden Proben verstärkt vor. LC3AB-I wurde in der MM6-Probe reduziert detektiert, in der MM9-Probe fand dies nicht statt. LC3AB-II war dagegen in beiden Proben bei AR-12 Inkubation verstärkt nachweisbar.



Abbildung 11: Auswirkung von AR-12 auf die UPR von Primärmaterial zweier MM-Patienten

Myelomzellen zweier Patienten wurden mittels CD138 *Beads* aus Primärmaterialproben isoliert. Anschließend erfolgte eine 4-stündige Behandlung mit 3 μ M AR-12, DMSO wurde als Lösungsmittelkontrolle verwendet. Nach mehreren Schritten wurden die Proteine des ER-Stress Signaling Panels mittels Photodetektion sichtbar gemacht.

Eine reduzierte Proteinmenge von GRP78 nach AR-12 Inkubation wurde nicht beobachtet. Es fand eine teilweise Aktivierung des PERK Signalweges statt, was sich besonders durch ATF4-Bandenzunahme äußerte. In beiden Ansätzen wurde außerdem die als Autophagiemarker fungierende Zunahme der LC3AB-II Bande festgestellt.

3. CB-5083 – p97-Inhibition

3.1. Auswirkung von p97-Inhibition auf den Zellmetabolismus

Die metabolischen Auswirkungen von p97-Inhibition durch CB-5083 wurden untersucht, indem die Zelllinien für 72 h mit verschiedenen CB-5083 Konzentrationen behandelt wurden. Der Alamar-Blau *Assay* wurde anschließend verwendet, um den Effekt auf den Metabolismus zu untersuchen. Die p97-Inhibition hatte bei den JJN3-Zellen eine annähernd umgekehrt sigmoidale Kurve zur Folge, auch wenn der Metabolismus bei einer 100 nM CB-5083 Konzentration bereits auf 87 % abfiel. Eine Absenkung des Stoffwechsels um 25 % war bei einer 136 nM Konzentration zu beobachten (siehe Abbildung 12 und Tabelle 24).

Der Stoffwechsel der AMO1-Zellen fiel im Vergleich zu AMO1R65CAR-Zellen bei 100 nM CB-5083 Konzentration stärker ab (71,5 % vs. 88,3 %). Bis zu einer 300 nM CB-5083 Konzentration zeigte sich eine linear abfallende Kurve, ab 300 nM verlief die Kurve negativ exponentiell. Die Metabolismuskurve der AMO1R65CAR-Zellen hatte einen umgekehrt sigmoidalen Verlauf. Der Kurvenverlauf der AMO1R180IXA-Zellen ähnelte der Kurve der AMO1-Zelllinie, war aber insgesamt nach links verschoben (100 nM: 63,8 %). Der Metabolismus der AMO1R180IXA-Zellen reagierte damit am sensitivsten auf die Inkubation mit CB-5083, während der Metabolismus der JJN3 und AMO1R65CAR-Zelllinien erst bei annähernd der doppelten Konzentration um 25 % reduziert wurde.

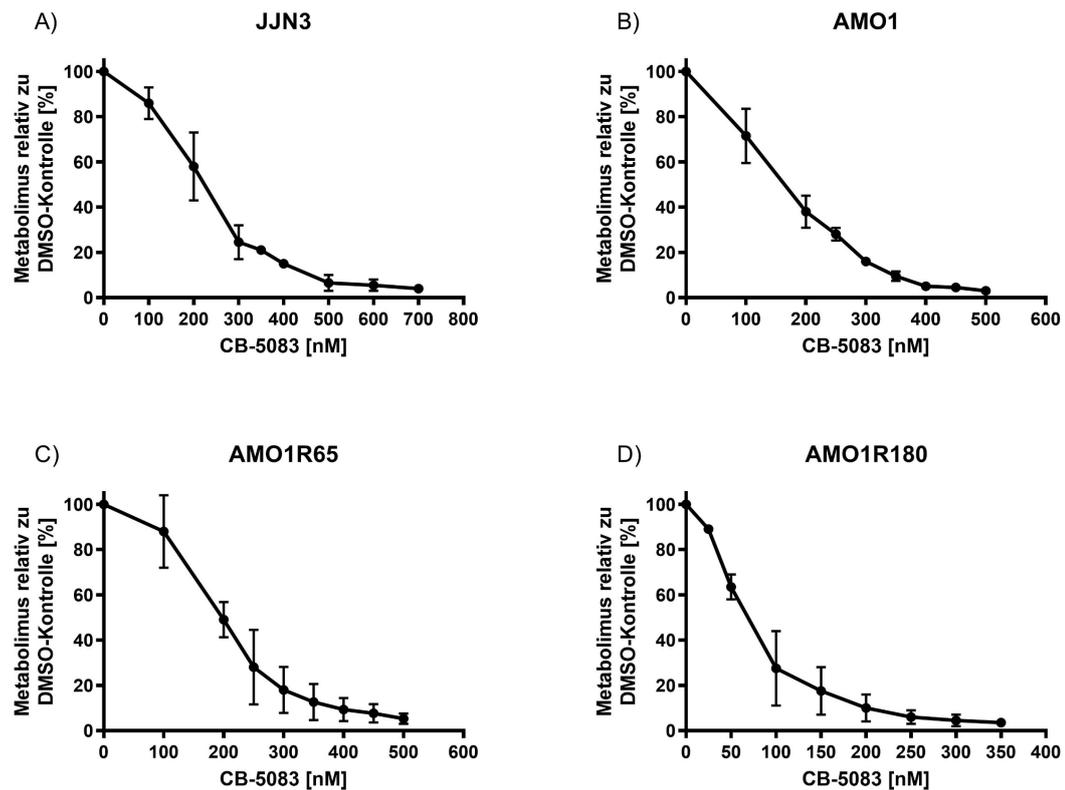


Abbildung 12: Konzentrationsabhängige Auswirkungen von p97-Inhibition durch CB-5083 auf den Zellmetabolismus

JJN3 (A), AMO1 (B), AMO1R65CAR (C) und AMO1R180IXA (D) -Zellen wurden 72 h in Einzelsätzen in aufsteigender Konzentration mit CB-5083 inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe von Alamar-Blau Färbung der Zellmetabolismus im Vergleich mit der DMSO Kontrolle gemessen.

Für die JJN3 und AMO1R65CAR-Zellen ergab sich annähernd eine umgekehrt sigmoide Kurve, für AMO1 und AMO1R180IXA Zellen bei niedrigeren Konzentrationen eine lineare Abnahme. $n \geq 3$

Tabelle 24: Tabellarische Analyse von Daten aus Abbildung 14

	Metabolismus bei 100 nM Konzentration	Reduktion des Metabolismus um 25 %
JJN3	87,0 %	139,1 nM
AMO1	71,5 %	74,2 nM
AMO1R65CAR	88,3 %	127,0 nM
AMO1R180IXA	64,5 %	69,3 nM

3.2. Effekt von p97-Inhibition auf den Zellzyklus

Die durchflusztymetrische Zellzyklusanalyse wurde angewandt, um antiproliferative Eigenschaften der p97-Inhibition durch CB-5083 zu untersuchen. Dazu wurden die Zellen 24 h mit CB-5083 behandelt. DMSO diente auch hier als Lösungsmittelkontrolle (Abbildung 13 und Tabelle 25).

Die JJN3-Zellen befanden sich nach CB-5083-Gabe deutlich vermehrt in der G0-Phase (18,6 % vs. 2,9 % in der Kontrolle). Der Anteil der Zellen in der G1 und

der S-Phase war kaum verändert, der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase reduziert (33,9 % DMSO Kontrolle vs. 23,7 % CB-5083).

Für die AMO1, AMO1R65CAR und AMO1R180IXA-Zellen ergab sich ein ähnliches Bild. Ein Anstieg der Zellen in der G0-Phase fand nur sehr gering statt, wohingegen der Anteil der G1-Phase durch CB-5083 deutlich zunahm (AMO1: 76,5 % vs. 54,8 %, AMO1R65CAR: 79,8 % vs. 51,2 %, AMO1R180IXA: 79,8 % vs. 66,9 %, jeweils bezogen auf die Kontrollansätze). In allen drei Zelllinien nahm der Anteil der S-Phase zwischen 6,8 % (AMO1R180IXA) und 12,2 % (AMO1R65CAR) ab. Gleichzeitig nahm auch der Anteil der G2/M-Phase zwischen 10,9 % (AMO1R180IXA) und 16,6 % (AMO1R65CAR) durch CB-5083 Inkubation ab.

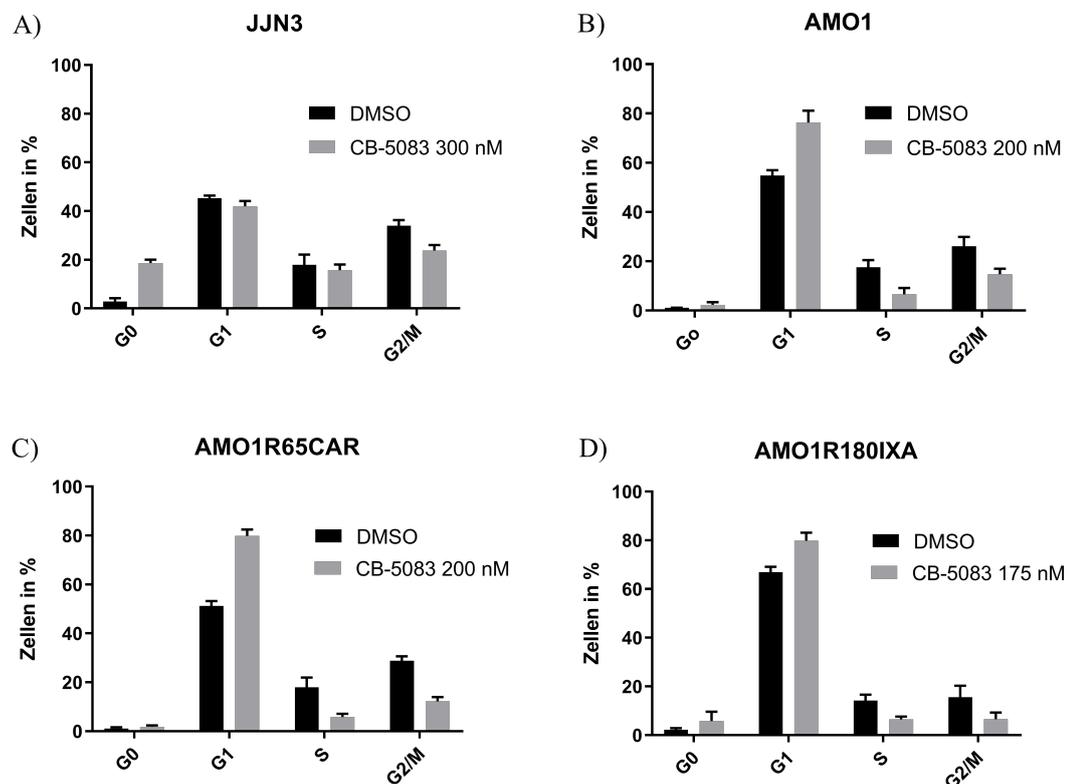


Abbildung 13: Effekt von p97-Inhibition durch CB-5083 auf den Zellzyklus

JJN3 (A), AMO1 (B), AMO1R65CAR (C) und AMO1R180IXA (D) -Zellen wurden 24 h mit CB-5083 und DMSO als Lösungsmittelkontrolle inkubiert. Anschließend wurde der Anteil der Zellzyklusabschnitte der Versuchsgruppen mit den Kontrollansätzen verglichen.

Die JJN3-Zelllinie zeigte einen partiellen G0-Phasen Arrest bei leichter Abnahme der G2/M-Phase. Die AMO1, AMO1R65CAR und AMO1R180IXA-Zellen wiesen einen G1-Phasen Arrest auf, bei deutlicher Reduktion der S und G2/M-Phasen sowie unveränderter G0-Phase.

n ≥ 3

Tabelle 25: Einfluss von CB-5083 auf die Verteilung der Zellzyklusphasen

		G0	G1	S	G2/M
JJN3	DMSO	2,9 %	45,3 %	17,9 %	34,0 %
	CB 300 nM	18,6 %	41,9 %	15,7 %	23,8 %
AMO1	DMSO	1,0 %	54,8 %	17,5 %	26,1 %
	CB 200 nM	2,3 %	76,3 %	6,5 %	14,7 %
AMO1R65CAR	DMSO	1,2 %	51,2 %	18,0 %	28,8 %
	CB 200 nM	1,8 %	79,8 %	5,8 %	12,2 %
AMO1R180IXA	DMSO	2,3 %	66,2 %	13,4 %	17,0 %
	CB 175 nM	6,1 %	79,8 %	6,6 %	6,1 %

3.3. Auswirkung von p97-Inhibition auf die Zellviabilität

Die Überlebenskurven ergaben für alle untersuchten Zelllinien umgekehrt sigmoidale Kurven (siehe Abbildung 14). Die Überlebenskurve der JJN3-Zelllinie war dabei etwas nach rechts, die Kurve der AMO1R180IXA-Zellen etwas nach links verschoben. Die Kurven von AMO1 und AMO1R65CAR-Zellen ähnelten sich stark, beide Zelllinien reagierten damit in etwa gleich sensitiv, während sich die AMO1R180IXA-Zellen als sensitiver erwiesen. Die Ergebnisse der Stoffwechselfmessungen deckten sich mit denen der Viabilitätsmessungen insoweit, dass JJN3-Zellen am unempfindlichsten und AMO1R180IXA-Zellen am empfindlichsten auf p97-Inhibition reagierten. Die stärkere Sensitivität der AMO1-Zellen im Bereich von 100 nM Konzentration verglichen mit AMO1R65CAR-Zellen bestätigte sich nicht, die Kurven beider Zelllinien verliefen hier nun fast identisch.

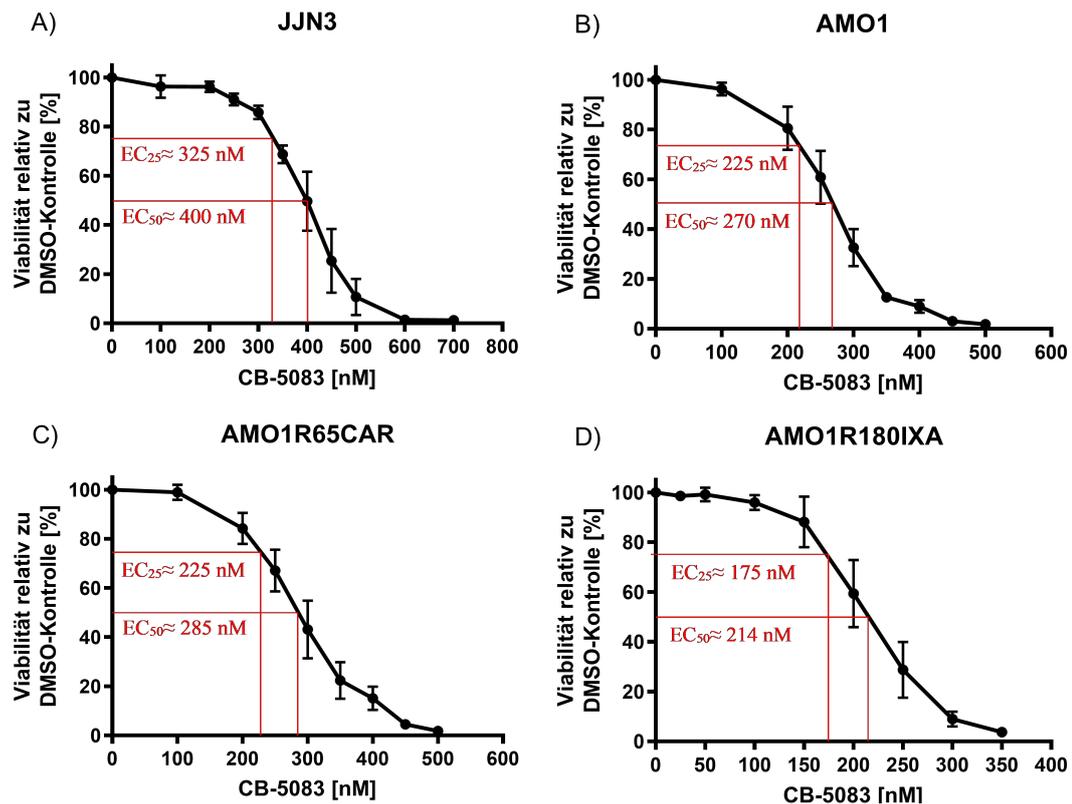


Abbildung 14: Effekt von p97-Inhibition durch CB-5083 auf die Viabilität

JJN3 (A), AMO1 (B), AMO1R65CAR (C) und AMO1R180IXA (D) -Zellen wurden 72 h in Einzelansätzen in aufsteigender Konzentration mit CB-5083 inkubiert. Anschließend wurde eine durchflusszytometrische Messung durchgeführt und das Ergebnis relativ zur jeweiligen Kontrollprobe gesetzt.

Die jeweiligen EC₂₅-Werte und EC₅₀-Werte wurden graphisch hervorgehoben. Die JJN3-Zellen reagierten am insensitivsten, die AMO1R180IXA-Zellen hingegen am empfindlichsten. Die AMO1 und AMO1R65CAR-Zellen zeigten einen zueinander sehr ähnlichen Kurvenverlauf. n ≥ 3

3.4. Auswirkung der p97-Inhibition auf die UPR

JJN3-Zellen

In Abbildung 15 ist die zeitabhängige Veränderung der Signale des ER-Stress Signaling Panels für drei verschiedene CB-5083 Konzentration (0,2 µM, 0,5 µM und 1 µM) nach der Inkubation mit JJN3-Zellen zu sehen. Die Proteinmenge von GRP78 nahm besonders bei einer Konzentration von 0,5 µM und 1 µM zeitabhängig deutlich zu. Bei einer CB-5083 Konzentration von 1 µM lag GRP78 nach 8 h am stärksten exprimiert vor.

Der PERK Signalweg wurde durch CB-5083 induziert, besonders stark wieder bei 1 µM CB-5083-Konzentration. Ebenfalls bei dieser Konzentration war ein erhöhtes Level von p-eIF2α (Ser51) sichtbar, gleichzeitig nahm eIF2α zu. P-eIF2α aktivierte

ATF4 nach 2 bis 8-stündiger Inkubation, wobei hier wieder die 1 μ M Konzentration nach 4 h bzw. 8 h die stärksten Proteinbanden erzeugte.

Auch der IRE1 α -Signalweg wurde durch CB-5083 bei allen verwendeten Konzentrationen aktiviert. Die stärkste Phosphorylierung von IRE1 α an Ser724 fand bereits nach 30-minütiger Inkubation statt und sank in der Folge ab, nach 8 h befand sich das Signal fast wieder auf dem Level der DMSO-Kontrolle. Wie bei IRE1 α war die stärkste Aktivierung bei der höchsten verwendeten Konzentration erkennbar. Die IRE1 α -Proteinmenge nahm ebenfalls zeitabhängig im Verhältnis zur Kontrolle zu. Die P-SAPK-Bande (Thr183/Tyr185, 46 kDa und 54 kDa – ein Marker der Apoptoseinduktion) war nur bei 0,2 μ M und 0,5 μ M Konzentration zu erkennen. Beclin wurde zwischen 1 und 4-stündiger CB-5083 Inkubation verstärkt an Ser93 phosphoryliert vorgefunden (P-Beclin), wobei alle drei CB-5083 Konzentrationen ähnlich starke Veränderungen bewirkten. Nach 8 h entsprachen die P-Beclin Banden wieder denen der jeweiligen Kontrollen. Das Signal von Beclin war identisch in der zeitlichen Veränderung und Intensität. Die p62-Banden nahmen nach 1 h bis 2 h deutlich ab, nach 8-stündiger Inkubation entsprach die Proteinmenge wieder der DMSO-Kontrolle. Dieser Effekt war bei allen CB-5083 Konzentrationen zu beobachten. Eine Zunahme der LC3A/B-II Bande erfolgte besonders stark nach 1 bzw. 2-stündiger Inkubation, wenn auch eine Abnahme der LC3A/B-I Bande nicht nachgewiesen werden konnte. Besonders bei einer Konzentration von 1 μ M war diese Dynamik vorhanden. Die Signale von Beclin, p62 und LC3A/B weisen auf eine deutliche Aktivierung der Autophagie, besonders im Bereich von 1 bis 2-stündiger Inkubation mit anschließend absinkendem Niveau hin.

XBP1(s) wurde zeitabhängig in ansteigender Menge vorgefunden, das stärkste Signal lieferten die 8 h Werte. Dies erfolgte bei allen verwendeten Konzentrationen in gleicher Weise.

Der dritte Mediatorweg der UPR -ATF6- war ebenfalls aktiviert, da sowohl eine erhöhte Gesamtmenge von ATF6 als auch eine erhöhte Menge von *cleaved* ATF6 nachgewiesen wurde. Auch hier war eine zeitliche Dynamik gut zu erkennen, die Proteinmenge nahm bis zum 4 h Wert kontinuierlich zu und sank zwischen 4 h und 8 h wieder deutlich ab.

Das als Ladekontrolle verwendete Protein β -Actin lag in allen Ansätzen in ungefähr gleicher Menge vor.

Zusammenfassend war das Ergebnis, dass CB-5083 alle drei Signalwege der UPR von JN3-Zellen aktivierte, insbesondere GRP78 lag deutlich erhöht vor. Das Signaling deutet außerdem auf Aktivierung von Autophagie hin.

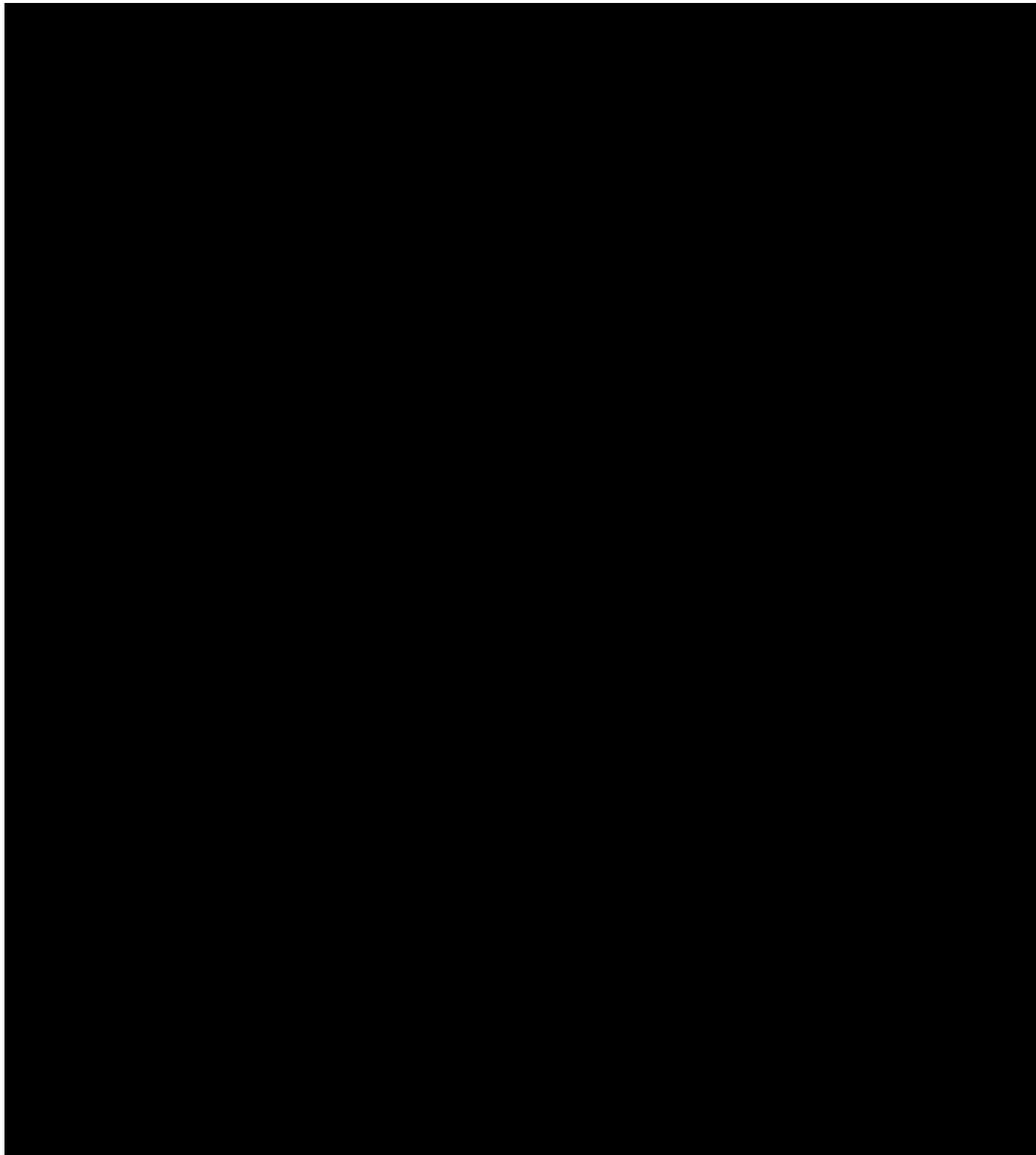


Abbildung 15: Zeitabhängige Effekte von p97-Inhibition durch CB-5083 auf die UPR in JN3-Zellen

JN3-Zellen wurden mit drei verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors CB-5083 (0,2 μM , 0,5 μM und 1 μM) für 30 min bis 8 h inkubiert. Die DMSO-Kontrolle wurde 8 h inkubiert. Nach mehreren Schritten wurde die Proteinmenge des jeweiligen Ansatzes mittels Photodetektion sichtbar gemacht.

Alle drei Mediatorwege der UPR wurden durch CB-5083 aktiviert. Beclin, p62 und LC3A/B als Marker für Autophagie lagen besonders nach ein bis zwei Stunden in erhöhter (P-Beclin, Beclin und LC3A/B) bzw. verminderter (p62) Menge vor, was für eine frühzeitige Aktivierung der Autophagie spricht. β -Actin als Ladekontrolle lag mit gleichmäßiger Bandenintensität vor.
n= 3

AMO1-Zellen

In Abbildung 16 ist die zeitliche Dynamik der Proteinmengen des ER-Stress Signaling Panels bei drei unterschiedlichen CB-5083-Konzentrationen abgebildet.

Auch in der AMO1-Zelllinie nahm die Menge an GRP78 bis zu einem Maximum nach 4 h bzw. 8 h kontinuierlich zu. Bei der höchsten verwendeten Konzentration war die stärkste Dynamik und Zunahme zu beobachten.

Der PERK-Signalweg wurde durch CB-5083 aktiviert. Eine Augmentierung der Aktivierung konnte besonders im Bereich von 1 bis 4-stündiger Inkubation nachgewiesen werden, auch hier besonders deutlich bei einer 1 μM Konzentration. Das P-eIF2 α -Signal (Ser51) war nach 8 h und bei 1 μM Konzentration am stärksten, während das Signal für das unphosphorylierte Protein eIF2 α kaum eine Veränderung erfuhr. Die Proteinmenge von ATF4 war nach 4 bzw. 8-stündiger Inkubation am höchsten. Anders als bei den JN3-Zellen schien die Stärke der ATF4-Aktivierung konzentrationsunabhängig zu sein.

Auch der zweite Haupteffektor der UPR, IRE1 α , wurde untersucht. Das Signal der an Serin724 phosphorylierten Form von IRE1 α zeigte nach 30 min eine starke Zunahme und nahm in der Folge wieder ab, wobei es nach 8-stündiger CB-5083-Inkubation kaum noch nachweisbar war. Die Gesamtmenge an IRE1 α nahm im Gegensatz dazu kontinuierlich zu. P-SAPK (Thr183/Tyr185) wies eine überaus starke Bandenzunahme nach 8 h bei einer Konzentration von 0,5 μM und 1 μM auf, während die Zunahme bei einer Konzentration von 0,2 μM vergleichsweise gering ausfiel. Ebenfalls nach 8 h nahm die Proteinmenge der SAPK deutlich ab. Die höchste Proteinmenge der an Serin93 phosphorylierten Form von Beclin (P-Beclin), sowie Beclin selbst, waren zwischen 30 min und 4 h nach Inkubationsbeginn nachweisbar. Nach 8 h entsprachen die Bandenintensitäten wieder der DMSO-Kontrolle. Die Bandenintensität von p62 nahm besonders bei einer Konzentration von 1 μM nach 2 h deutlich ab. Die Konversion von LC3AB-I zu LC3AB-II fand besonders stark nach 4 h statt. Wie auch bei der JN3-Zelllinie trat dieser Effekt besonders bei den beiden höheren Konzentrationen ein.

Die Gesamtmenge von ATF6 sowie der aktiven Form (*cleaved* ATF6) nahmen im Verlauf bis zum 4 h Wert zu. In beiden Fällen und bei allen Konzentrationen war nach 8-stündiger CB-5083-Inkubation deutlich weniger Protein als in den

Kontrollansätzen nachweisbar, was dafürsprach, dass der ATF6-Signalweg dann kaum noch aktiviert vorlag.

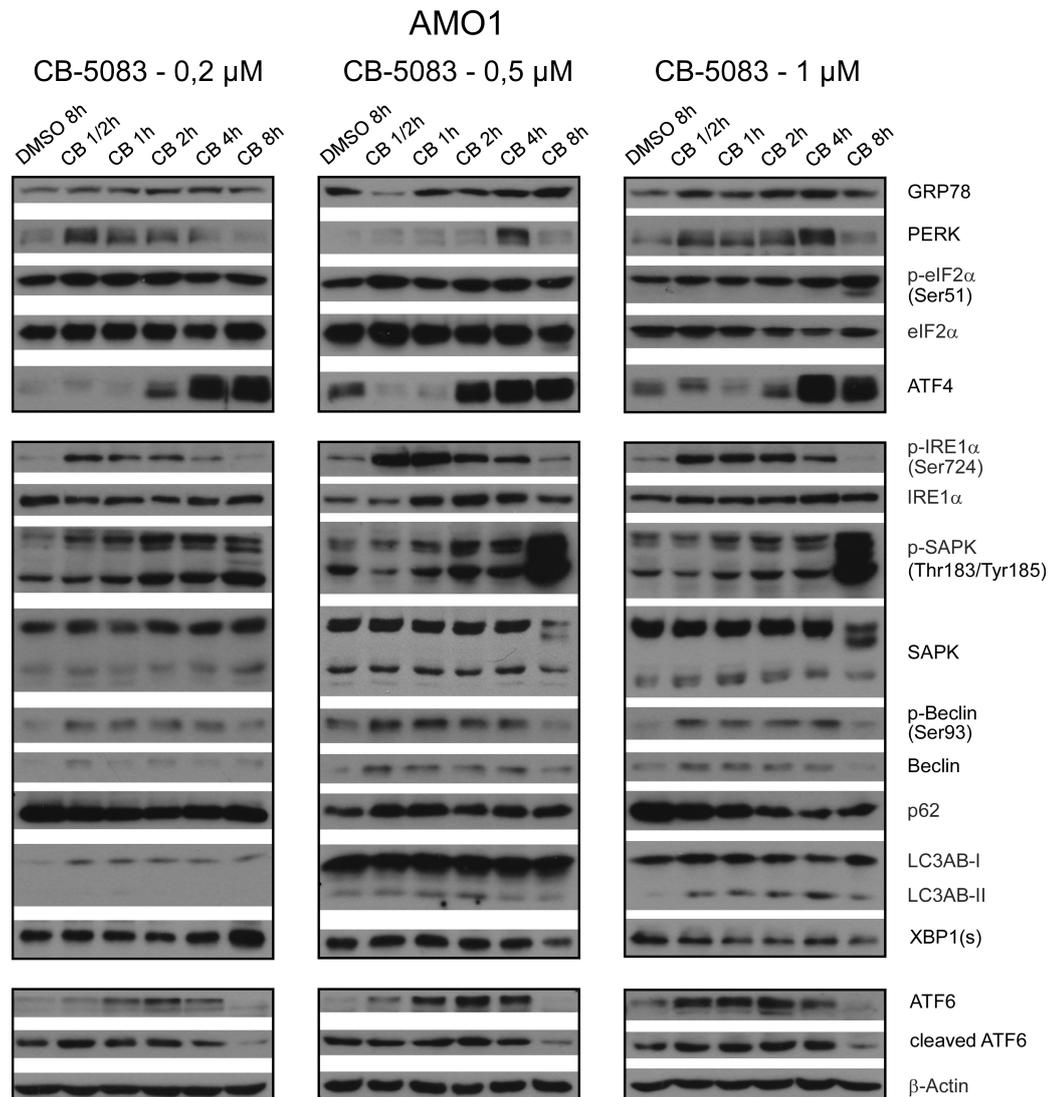


Abbildung 16: Zeitabhängige Effekte von p97-Inhibition durch CB-5083 auf die UPR in AMO1-Zellen

Zellen der AMO1-Zelllinie wurden mit CB-5083 (0,2 μ M, 0,5 μ M und 1 μ M) für 30 min bis 8 h inkubiert. Die DMSO-Kontrolle wurde 8 h inkubiert. Nach mehreren Schritten wurde die Proteinmenge des jeweiligen Ansatzes mittels Photodetektion sichtbar gemacht. Es fand eine starke Induktion der UPR durch CB-5083 in den AMO1-Zellen statt.

Die drei Mediatorproteine PERK, IRE1 α und ATF6 sowie deren nachgeschaltete Signalwege wurden zeitabhängig aktiviert. Autophagie wurde aktiviert, da die Bandenintensität von P-Beclin (Ser93) und LC3A/B-II zunahm und die Menge an p62 abnahm. Die sehr starke Phosphorylierung der SAPK an Threonin183 und Tyrosin185 spricht für eine Induktion der Apoptose nach 8 h. β -Actin als Ladekontrolle lag mit gleichmäßiger Bandenintensität vor.

n=3

AMO1R65CAR-Zellen

Da die AMO1R65CAR-Zelllinie eine gegen den Proteasom-Inhibitor Carfilzomib resistente Subzelllinie der AMO1-Zelllinie ist und die resistente Zelllinie mit den gleichen Konzentrationen CB-5083 für die gleiche Dauer inkubiert wurde, werden die Ergebnisse aus Abbildung 17 nur besprochen, sofern es sich um Abweichungen der für Abbildung 16 erhobenen und beschriebenen Ergebnisse handelt.

Die Gesamtproteinmenge von IRE1 α nahm etwas stärker zu, als es bei den AMO1-Zellen der Fall war, während sich das Level der Phosphorylierung von IRE1 α an Ser724 nicht erhöhte. Die Abnahme der p62-Proteinbande war weniger deutlich zu erkennen, insbesondere bei einer Konzentration von 1 μ M. Bei gleichzeitiger Phosphorylierung der SAPK (Thr183/Tyr185) und damit verbundenem stärkeren Signal der P-SAPK nach 8-stündiger Inkubation sank die Gesamtproteinmenge der SAPK trotzdem nicht deutlich.

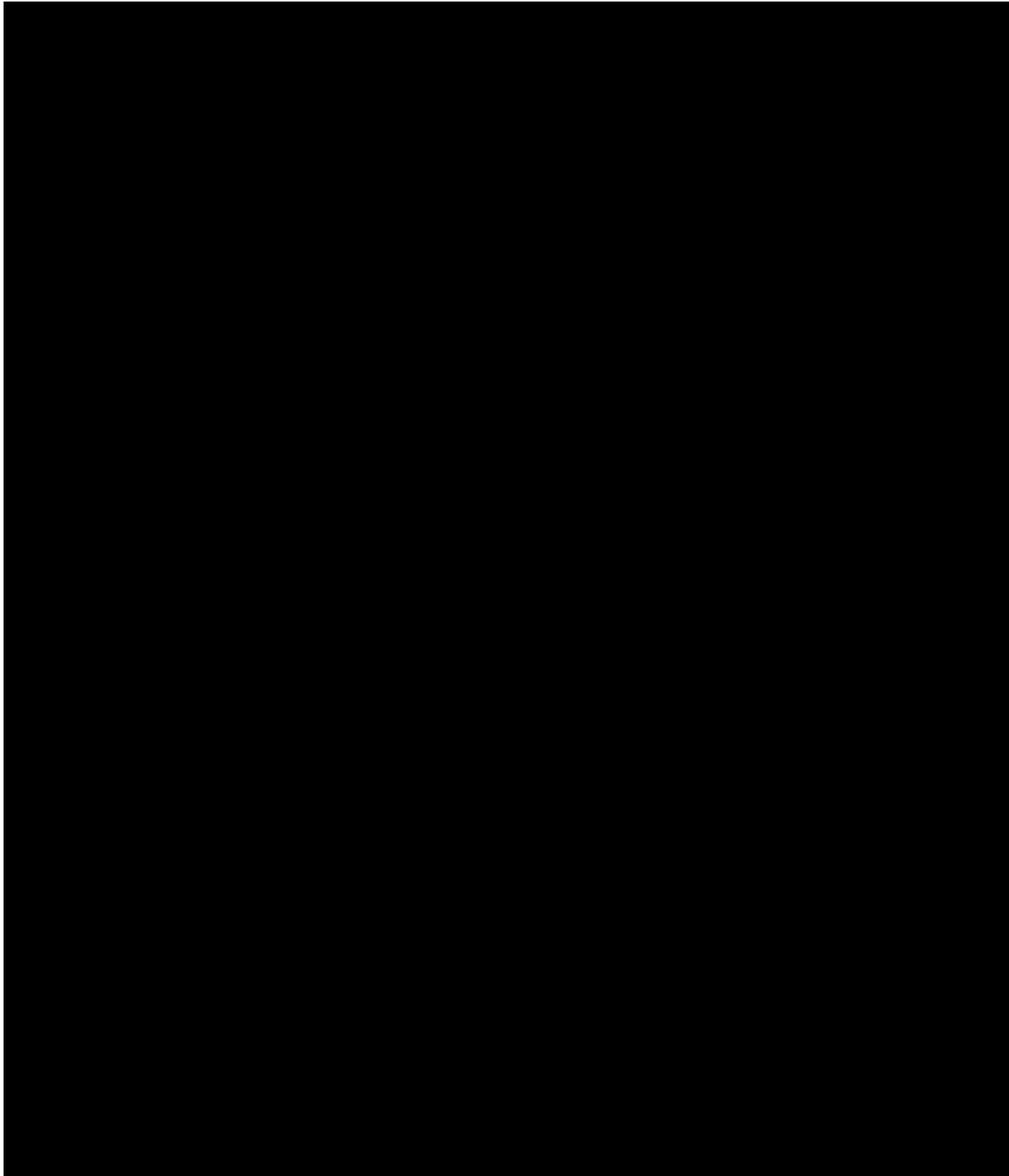


Abbildung 17: Zeitabhängige Effekte von p97-Inhibition durch CB-5083 auf die UPR in AMO1R65CAR-Zellen

AMO1R65CAR-Zellen wurden mit CB-5083 (0,2 μ M, 0,5 μ M und 1 μ M) für 30 min bis 8 h inkubiert. Die DMSO-Kontrolle wurde 8 h inkubiert. Die Proteinmenge der Ansätze wurden mittels Western-Blotting und Photodetektion sichtbar gemacht.

Es fand eine starke Induktion der UPR durch CB-5083 in den AMO1R65CAR-Zellen statt. Die drei Mediatorproteine PERK, IRE1 α und ATF6 sowie deren nachgeschaltete Signalwege wurden zeitabhängig aktiviert. Autophagie wurde aktiviert, da die Bandenintensität von P-Beclin und LC3AB-II zunimmt. Anders als bei der AMO1-Zelllinie konnte p62 nicht in deutlich verringerter Menge nachgewiesen werden. Die starke Phosphorylierung der SAPK an Threonin183 und Tyrosin185 spricht für eine Induktion der Apoptose nach 8 Stunden.

β -Actin als Ladekontrolle lag mit gleichmäßiger Bandenintensität vor.

n= 3

AMO1R180IXA-Zellen

Die AMO1R180IXA-Zelllinie ist eine Subzelllinie der AMO1-Zelllinie und weist grundsätzlich vergleichbare Ergebnisse in den Signaling-Veränderungen (Abbildung 18) auf wie die AMO1-Zelllinie (Abbildung 16) und AMO1R65CAR-Zelllinie (Abbildung 17). Daher werden im Folgenden nur Unterschiede zu den Subzelllinien beschrieben.

P-eIF2 α (Ser51) wies nach 8-stündiger Inkubation im Vergleich zum Kontrollansatz eine deutlich stärkere Zunahme der zweiten Bande auf, als es bei den AMO1 und AMO1R65CAR-Zellen der Fall war. Die Proteinmenge von ATF4 fiel sowohl bei 0,5 μ M Konzentration als auch bei einer Konzentration von 1 μ M nach 8 h abrupt ab, während die Bande einer Konzentration von 0,2 μ M noch verstärkt detektiert wurde.

Die Phosphorylierung der SAPK (Thr183/Tyr185) fand bei der AMO1R180IXA-Zelllinie sowohl bei den Kontrollansätzen als auch bei bis zu 4-stündiger Inkubationsdauer deutlich stärker statt, als bei AMO1 und AMO1R65CAR-Zellen zu beobachten. Wie auch bei diesen Zelllinien war die mit Abstand höchste Proteinmenge der P-SAPK bei den 8 h Werten zu detektieren. Der Anstieg dieser Phosphorylierung fand bei 0,5 μ M und 1 μ M Konzentration am deutlichsten statt. Wie auch bei den AMO1-Zellen resultierte diese Phosphorylierung der SAPK in einer reduzierten Bandenintensität der SAPK.

Das als Ladekontrolle verwendete Protein β -Actin war für alle Ansätze in etwa gleich verteilt, was eine gleichmäßige Proteinbeladung der Gele nachwies.

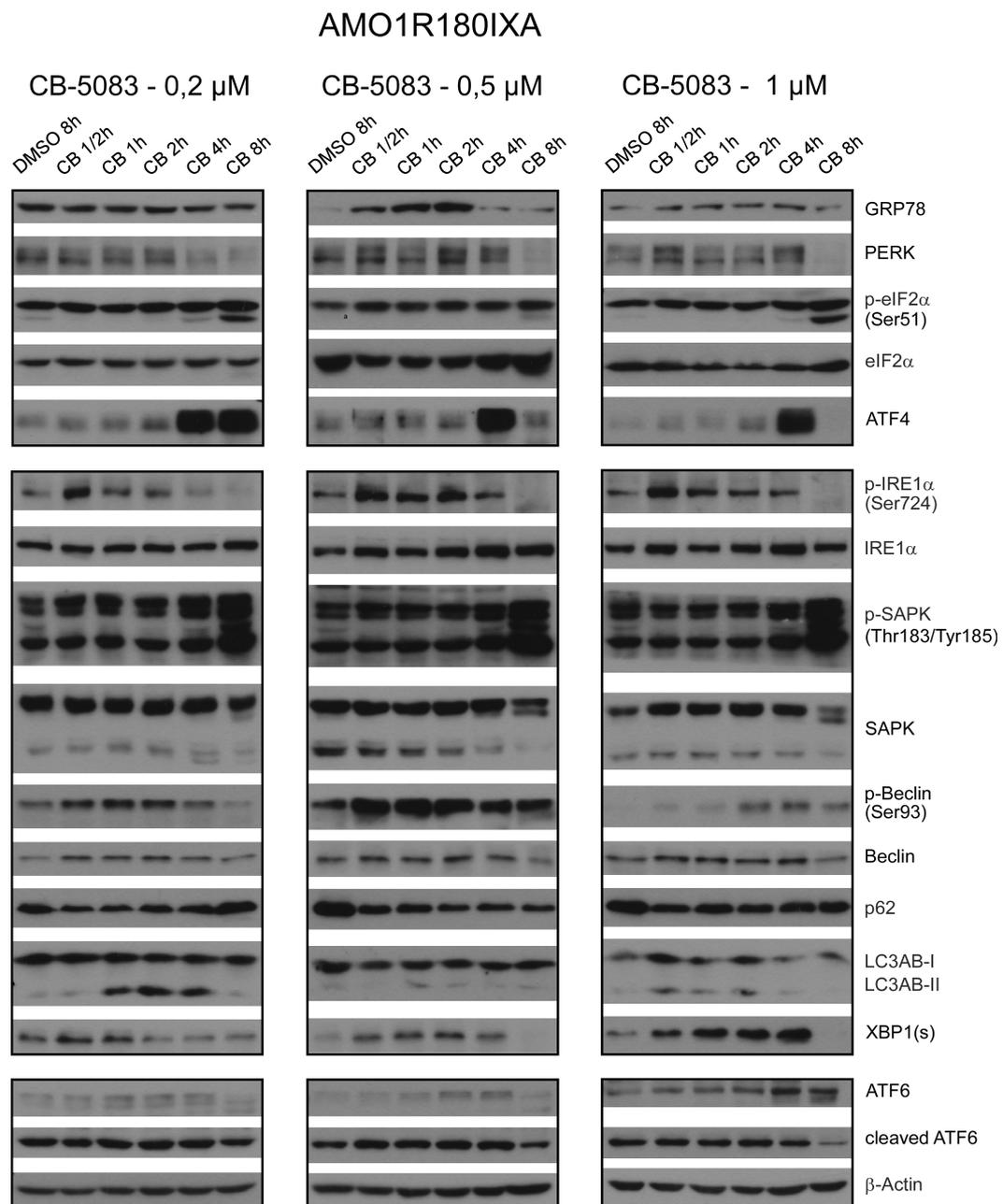


Abbildung 18: Zeitabhängige Effekte von p97-Inhibition durch CB-5083 auf die UPR in AMO1R180IXA-Zellen

Zellen der AMO1-Zelllinie wurden mit CB-5083 (0,2 μ M, 0,5 μ M und 1 μ M) für 30 min bis 8 h inkubiert. Die DMSO-Kontrolle wurde 8 h inkubiert. Die Proteinmenge der Ansätze wurden mittels Western Blotting und sichtbar gemacht.

Es fand auch in den AMO1R180IXA-Zellen eine starke Induktion der UPR durch CB-5083 statt. Die drei Mediatorproteine PERK, IRE1 α und ATF6 sowie deren nachgeschaltete Signalwege wurden zeit- und konzentrationsabhängig aktiviert.

β -Actin als Ladekontrolle lag mit gleichmäßiger Bandenintensität vor.

n= 3

3.5. Vergleich von p97-Inhibition bei gleichzeitigem GRP78-Knockdown und p97-Inhibition ohne GRP78-Knockdown auf die UPR

Es wurde GRP78-siRNA verwendet, um die Expression von GRP78 temporär zu blockieren (GRP78⁻-Ansatz). Als Kontrolle wurde co-siRNA verwendet, die keine Auswirkung auf die GRP78-Expression hatte (GRP78⁺-Ansatz). Der *Knockdown* von GRP78 bewirkte in den Zellen eine starke Stressreaktion. Diese zelluläre Stressreaktion ermöglichte es, die Stärke des durch CB-5083 ausgelösten ER-Stress Signalings auf GRP78-kompetente Zellen mit GRP78-defizienten Kontrollgruppen zu vergleichen. Gleichzeitig konnte die zelluläre Stressantwort auf die drastische Reduktion von GRP78, eines der wichtigsten ER-Chaperone, analysiert werden.

JJN3-Zellen

Anhand der kaum erkennbaren Banden im Bereich des GRP78-siRNA-Ansatzes und der deutlich zu erkennenden und ansteigenden GRP78-Banden im Bereich der co-siRNA, war der Erfolg der Transfektion und des *Knockdowns* sichtbar (Abbildung 19, (A)). Ein starker Anstieg der GRP94-Expression als Folge des *Knockdowns* von GRP78 konnte nachgewiesen werden. Die Addition von CB-5083 hatte auf GRP94 bei den GRP78⁺-Zellen keinen weiteren augmentierenden Einfluss. Der Anstieg von GRP94 weist auf eine kompensatorische Gegenregulation der JJN3-Zellen nach GRP78-*Knockdown* hin.

Ebenso stieg die Gesamtproteinmenge von PERK in den GRP78⁺-Ansätzen im Vergleich zu den GRP78⁻-Ansätzen deutlicher an, da bereits die DMSO-Kontrolle der GRP78⁻-Zellen eine starke PERK-Bande aufwies. Die Bandenintensität von P-eIF2 α (Ser51) war ebenfalls bei den GRP78⁺-Zellen höher, eine vermehrte Phosphorylierung an Ser51 der CB-5083-Ansätze im Vergleich zur DMSO-Kontrolle war allerdings nicht zu erkennen. Bereits in der DMSO-Kontrolle der GRP78⁺-Zellen lag eine erhöhte Menge ATF4 vor, die bei Inkubation mit CB-5083 (wie bei den GRP78⁻-Zellen) deutlich gesteigert wurde. Insgesamt scheint ATF4 in den GRP78-defizienten JJN3-Zellen basal weniger stark aktiviert zu sein als in den AMO1-Zellen, da eine Steigerung von ATF4 durch CB-5083 hier noch sichtbar war.

Die Gesamtproteinmenge des wichtigen UPR-Mediators IRE1 α wurde durch den *Knockdown* von GRP78 im Vergleich zur GRP78⁺-Gruppe deutlich erhöht. Allerdings fand fast keine Phosphorylierung an Ser724 und damit Aktivierung von IRE1 α statt, erkennbar an der geringen P-IRE1 α -Proteinmenge. Eine

Phosphorylierung der SAPK (Thr183/Tyr185) in den GRP78⁻-Zellen fand durch p97-Inhibition daher kaum statt, während nach 8-stündiger CB-5083-Inkubation in den GRP78⁺-Ansätzen eine geringe Phosphorylierung zu sehen war (46 kDa-Bande). Die Gesamtproteinmenge von LC3AB war im GRP78⁻-Ansatz deutlich höher als im GRP78⁺-Ansatz. Anders als im GRP78⁺-Ansatz waren veränderte Mengen an LC3AB-II im GRP78⁻-Ansatz nicht zu detektieren, da bereits in der DMSO-Kontrolle eine sehr starke Bande auftrat. Sowohl in der DMSO-Kontrolle als auch in den mit CB-5083 inkubierten Ansätzen war bei den GRP78⁻-Zellen eine höhere Menge zu beobachten als im Ansatz mit GRP78-co-siRNA.

In den GRP78-defizienten Ansätzen waren kaum Banden für ATF6 nachweisbar, während das geclavte ATF6 eindeutig vorlag. CB-5083 führte allerdings nicht zu einer verstärkten Expression. HSP72 war nach dem GRP78-*Knockdown* insgesamt etwas weniger stark exprimiert als in den Vergleichsansätzen ohne *Knockdown*.

Das als Ladekontrolle verwendete Protein β -Actin war für alle Ansätze in etwa gleich verteilt.

AMO1-Zellen

Der GRP78-*Knockdown* war erfolgreich, was sich an der wesentlich geringeren Proteinmenge von GRP78 im GRP78⁻-Ansatz zeigte (siehe Abbildung 19, (B)). Wie auch bei der JJN3-Zelllinie war die GPR94-Proteinmenge im GRP78⁻-Ansatz deutlich höher als im GRP78⁺-Ansatz, was auf eine kompensatorische Gegenregulation aufgrund der Abwesenheit von GRP78 hinweist.

PERK war bereits in der DMSO-Kontrolle vermehrt vorhanden. Die Bandenintensität nahm nach 2-stündiger p97-Inhibition im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zu, wenn auch bereits in der Kontrolle eine deutliche PERK-Aktivierung nachweisbar war. Im GRP78⁻-Ansatz war insgesamt weniger PERK nachweisbar (auch in der DMSO-Kontrolle), das stärkste PERK Signal lieferte der 2 h Wert. Dies war ein Hinweis auf verstärkten ER-Stress, hervorgerufen durch den *Knockdown* und durch das Fehlen von GRP78. Der Transkriptionsfaktor eIF2 α wurde an Ser51 kaum phosphoryliert, was an den schwachen Western Blot-Signalen zu erkennen war. Es fand durch Inkubation mit CB-5083 nur eine geringe Steigerung dieser Phosphorylierung im Vergleich zu DMSO-Kontrolle statt. Die stärkste Bande trat nach 8-stündiger Inkubation auf.

ATF4 konnte im GRP78⁻-Ansatz bereits in der DMSO-Kontrolle detektiert werden, ohne dass nach Inkubation mit CB-5083 eine deutliche Steigerung sichtbar gemacht werden konnte, was, wie auch das PERK-Signal, für verstärkten, *Knockdown*-bedingten ER-Stress spricht.

Obwohl die Gesamtproteinmenge von IRE1 α im GRP78⁻-Ansatz höher war als im GRP78⁺-Ansatz, fand kaum eine Phosphorylierung an Ser724 statt. Die detektierbare P-SAPK-Bande (Thr183/Tyr185) für die 8-stündige Inkubation mit CB-5083 war deutlich weniger stark als in der GRP78⁺-Kontrollgruppe zu diesem Zeitpunkt. Für P-Beclin (Ser93), Beclin und p62 ergaben sich zwischen den Ansätzen kaum Unterschiede. LC3AB zeigte in der Kontrollgruppe die bereits in Abbildung 16 beschriebenen Veränderungen, während das Proteinlevel von LC3AB-I und II in den GRP78 defizienten Ansätzen insgesamt deutlich höher als im GRP78 kompetenten Ansatz war. Das stärkste LC3AB-II Signal lieferte aber in beiden Gruppen der 2 h Wert. Das XBP1(s) Level der GRP78⁻-Ansätze war deutlich höher als in den Vergleichsansätzen, erbrachte aber keine Unterschiede zwischen DMSO-Kontrolle und CB-5083, was für starken ER-Stress bei Abwesenheit von GRP78 spricht, der durch CB-5083 nicht augmentiert werden kann.

Die ungespaltene Form des dritten UPR Effektors, ATF6, war im GRP78⁻-Ansatz nur in sehr geringer Menge nachweisbar, während die gecleavte Form bereits in der DMSO-Kontrolle ein starkes Signal erzeugte. Ebenso wurde HSP72 zwar in der GRP78-exprimierenden Kontrollgruppe konstant nachgewiesen, bei den GRP78-AMO1-Zellen konnte das Protein weder in der DMSO-Kontrolle noch in den CB-5083 Ansätzen nachgewiesen werden.

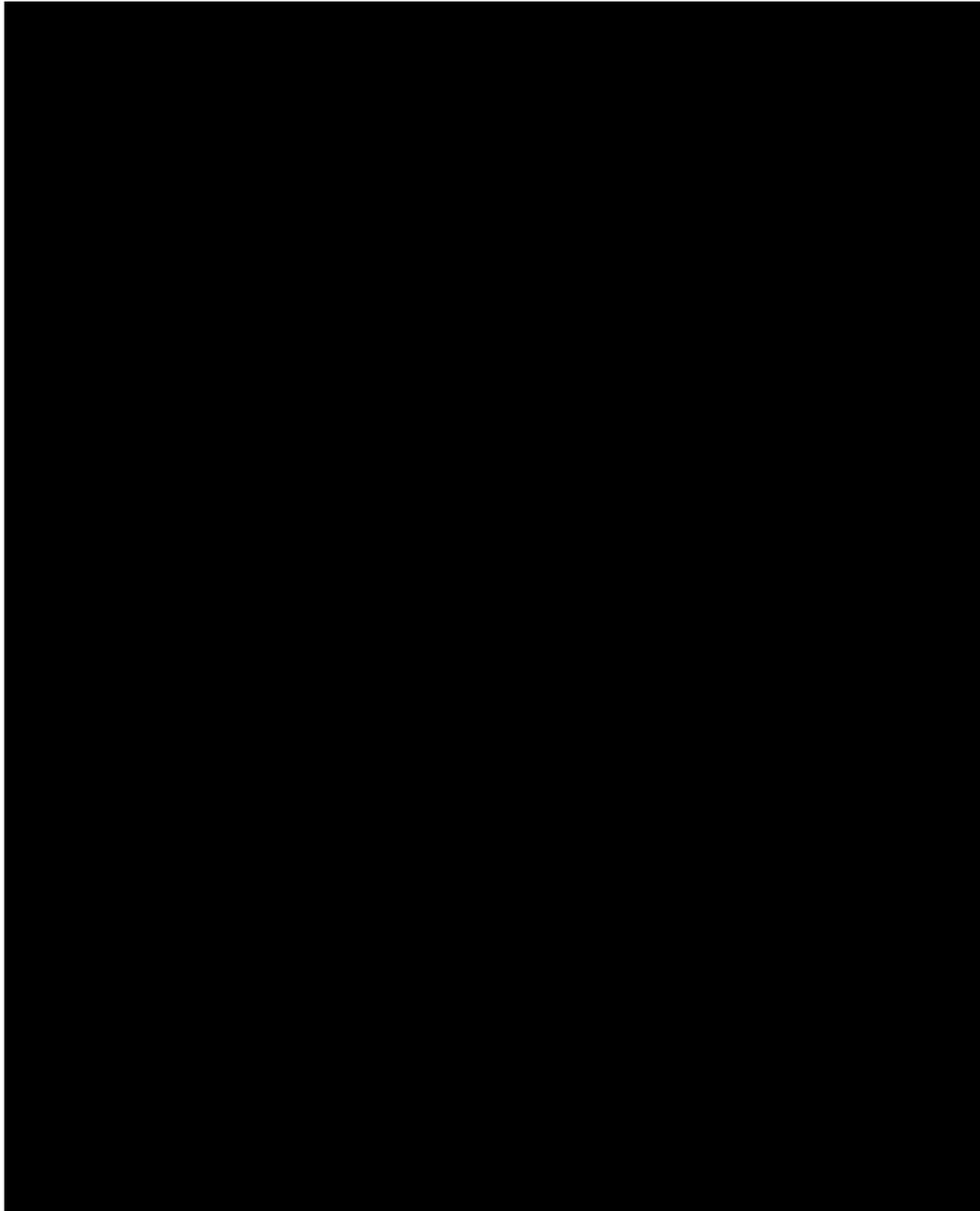


Abbildung 19: Zeitabhängige Effekte von CB-5083 auf die Proteinmenge des verwendeten ER-Stress Signaling Panels bei GRP78⁻ und GRP78⁺ JJN3 und AMO1-Zellen

JJN3 (A) und AMO1 (B) -Zellen wurden entweder mit co-siRNA oder GRP78-siRNA transfiziert. 72 h nach Elektroporation wurden die Zellen ausgesät und zeitabhängig mit 1 μ M CB-5083 inkubiert.

Die Induktion der UPR war in allen Ansätzen sehr deutlich. PERK wurde in den GRP78-defizienten Zellen beider Zelllinien verstärkt vorgefunden, ATF6 lag inaktiv kaum vor, die geclavte Form erzeugte starke Bandensignale. IRE1 α wurde nach *Knockdown* von GRP78 bei den JJN3-Zellen deutlich weniger stark an Ser74 phosphoryliert, während die AMO1-Zellen ein umgekehrtes Ergebnis aufwiesen. Hier war im GRP78-defizienten Ansatz insgesamt mehr P-IRE1 α (Ser724) nachweisbar. GRP94 wurde in beiden GRP78-defizienten Zelllinien deutlich stärker detektiert.

Das als Ladekontrolle verwendete Protein β -Actin war in allen Ansätzen annähernd gleich verteilt.
n= 1

AMO1R65CAR-Zellen

Da es sich bei den AMO1R65CAR-Zellen, wie bereits erwähnt, ebenfalls um ein Derivat der AMO1-Zelllinie handelte, werden an dieser Stelle für die Abbildung 20 (A) die Ergebnisse besprochen, die von den Ergebnissen für die AMO1-Zelllinie der Abbildung 19 (B) abweichen.

PERK lag im Kontrollansatz stärker vor als im GRP78⁻-Ansatz. EIF2 α wurde zeitabhängig an Ser51 phosphoryliert und wies in beiden Gruppen nach 8-stündiger p97-Inhibition die jeweils stärkste Bande auf. Insgesamt war das Niveau der eIF2 α -Phosphorylierung in den GRP78⁻-Zellen geringer als in den GRP78-kompetenten Zellen.

Anders als bei den AMO1 und AMO1R180IXA-Zelllinien konnte HSP72 weder in der Kontrolle noch in den *Knockdown*-Zellen detektiert werden.

AMO1R180IXA-Zellen

Da es sich bei den AMO1R180IXA auch um ein Derivat der AMO1-Zelllinie handelt, werden an dieser Stelle für Abbildung 20 (B) die Ergebnisse besprochen, die von den Ergebnissen der AMO1-Zelllinie (Abbildung 19, (B)) abweichen.

P-eIF2 α (Ser51) lag in den GRP78⁻-Zellen zwar auch auf geringerem Niveau als in den GRP78-kompetenten Zellen vor, es fand allerdings nach 8-stündiger CB-5083-Inkubation eine deutliche Signalverstärkung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle statt.

Das Level an P-SAPK (Thr183/Tyr185) war im GRP78⁻-Ansatz insgesamt erhöht, wenn auch die Phosphorylierung nach 8-stündiger Inkubation im Vergleich zur DMSO-Kontrolle bei den GRP78⁻-Zellen geringer ausfiel.

Die Signalreduktion von HSP72 fiel zwischen GRP78⁻-Zellen und der co-siRNA Vergleichsgruppe geringer aus, das Protein war hier im Vergleich zu den AMO1-Zellen noch nachweisbar, allerdings ohne Veränderungen durch p97-Inhibition.

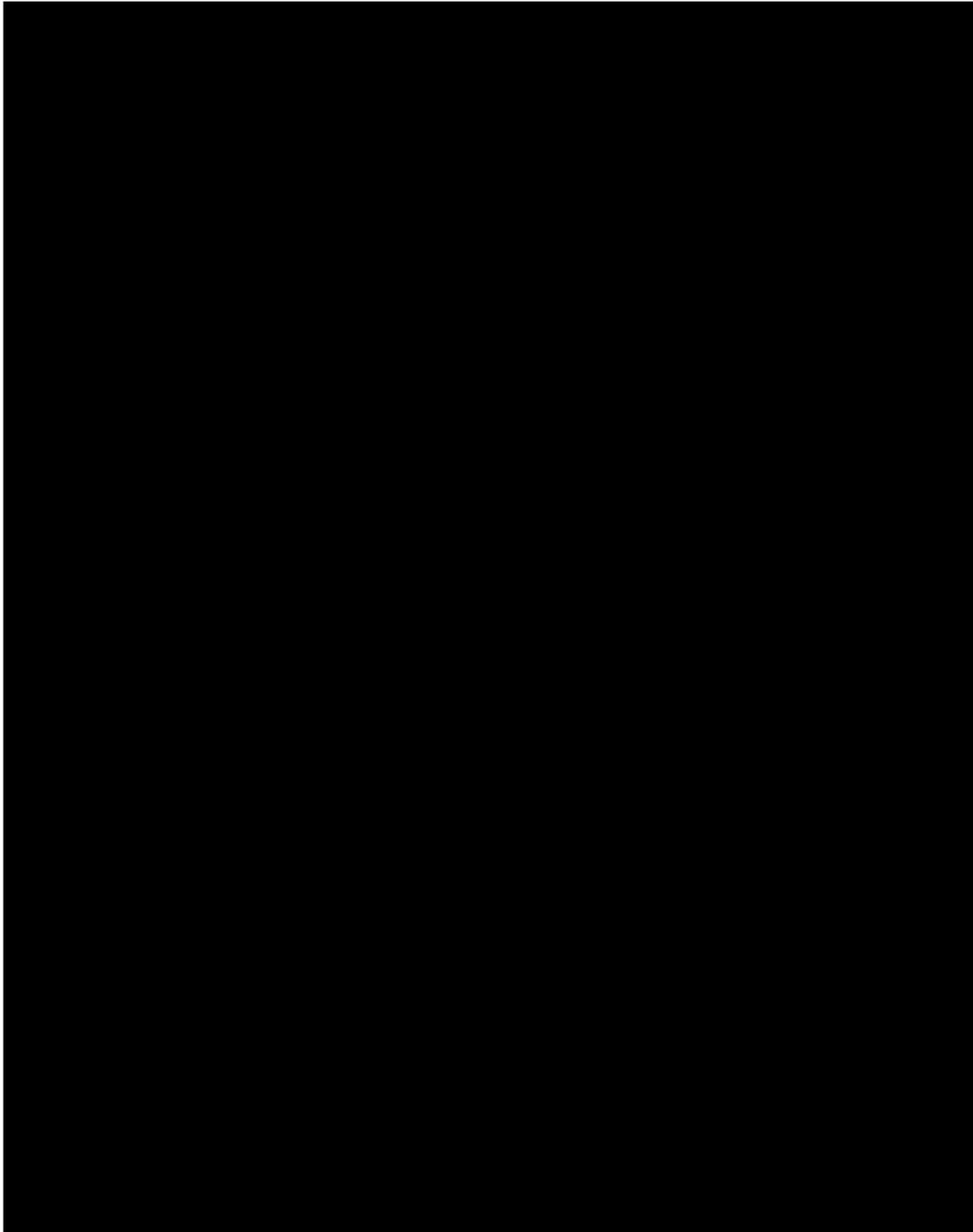


Abbildung 20: Zeitabhängige Effekte von CB-5083 auf die Proteinmenge des verwendeten ER-Stress Signaling Panels bei GRP78- und GRP78⁺ AMO1R65CAR und AMO1R180IXA-Zellen

Zellen der AMO1R65CAR (A) und AMO1R180IXA (B)-Zelllinien wurden entweder mit GRP78 co-siRNA oder GRP78-siRNA transfiziert. 72 h nach Elektroporation wurden die Zellen ausgesät, mit 1 μ M CB-5083 inkubiert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet.

Die Induktion der UPR war deutlich zu sehen. PERK wurde in den GRP78-defizienten AMO1R65CAR und AMO1R180IXA-Zellen insgesamt reduziert vorgefunden. ATF6 ließ sich in seiner gelceavten Form stark nachweisen. In beiden Zelllinien wurde IRE1 α deutlich weniger stark an Ser724 phosphoryliert als in den Kontrollansätzen. GRP94 wurde in beiden GRP78-defizienten Zelllinien deutlich stärker detektiert.

Das als Ladekontrolle verwendete Protein β -Actin war in allen Ansätzen annähernd gleich verteilt.
n= 1

4. Kombination von AR-12 und CB-5083

4.1. Effekt von kombinierter p97-Inhibition und GRP78-Inhibition auf den Zellmetabolismus

Die gemessenen Stoffwechselwerte für die einzelne und kombinierte Inkubation der MM-Zelllinien mit AR-12 und CB-5083 sind in Abbildung 21 veranschaulicht.

Bei Inkubation mit 3 μ M AR-12 sank der Metabolismus der JJN3-Zellen relativ zur DMSO-Kontrolle auf 47,3 %. CB-5083 reduzierte den Metabolismus bei 300 nM Konzentration auf 36 %, bei 325 nM Konzentration auf 26 %. Die kombinierte Inkubation mit 3 μ M AR-12 und 300 nM CB-5083 bewirkte eine Reduktion um 76,3 % auf 23,3 % Restmetabolismus. Bei Inkubation mit 3 μ M AR-12 und 325 nM CB-5083 reduzierte sich der Zellstoffwechsel um 82 % auf einen Restwert von 18 %.

Die Messungen für AMO1 und AMO1R65CAR-Zellen ergaben untereinander recht ähnliche Ergebnisse. AR-12 führte in 3 μ M Konzentration zu einer Reduktion auf 55,6 %, CB-5083 in 200 nM Konzentration auf 42,5 % und bei 225 nM auf 39 %. Kombiniert wurde der Metabolismus auf 35 % und 35,5 % gesenkt. AR-12 reduzierte den Metabolismus der AMO1R65CAR-Zellen auf 35 %, CB-5083 in 200 nM Konzentration auf 42,8 % sowie 42 % in 225 nM Konzentration. Kombiniert ergaben sich 33,5 % und 35 % Reststoffwechsel. Der Stoffwechsel der AMO1R180IXA wurde durch AR-12 in 3 μ M Konzentration auf 61,3 % gesenkt, durch CB-5083 in 175 nM Konzentration auf 66,3 % und bei Kombination beider Inhibitoren mit diesen Konzentrationen auf 55,0 %.

Es ergibt sich die Schlussfolgerung, dass eine kombinierte Anwendung beider Inhibitoren in keiner Zelllinie zu additiven Effekten im Hinblick auf den Zellmetabolismus führt. Lediglich bei den JJN3-Zellen tritt eine sichtbare Reduktion durch Kombination zu Tage, die allerdings keinen additiven Effekt darstellt.

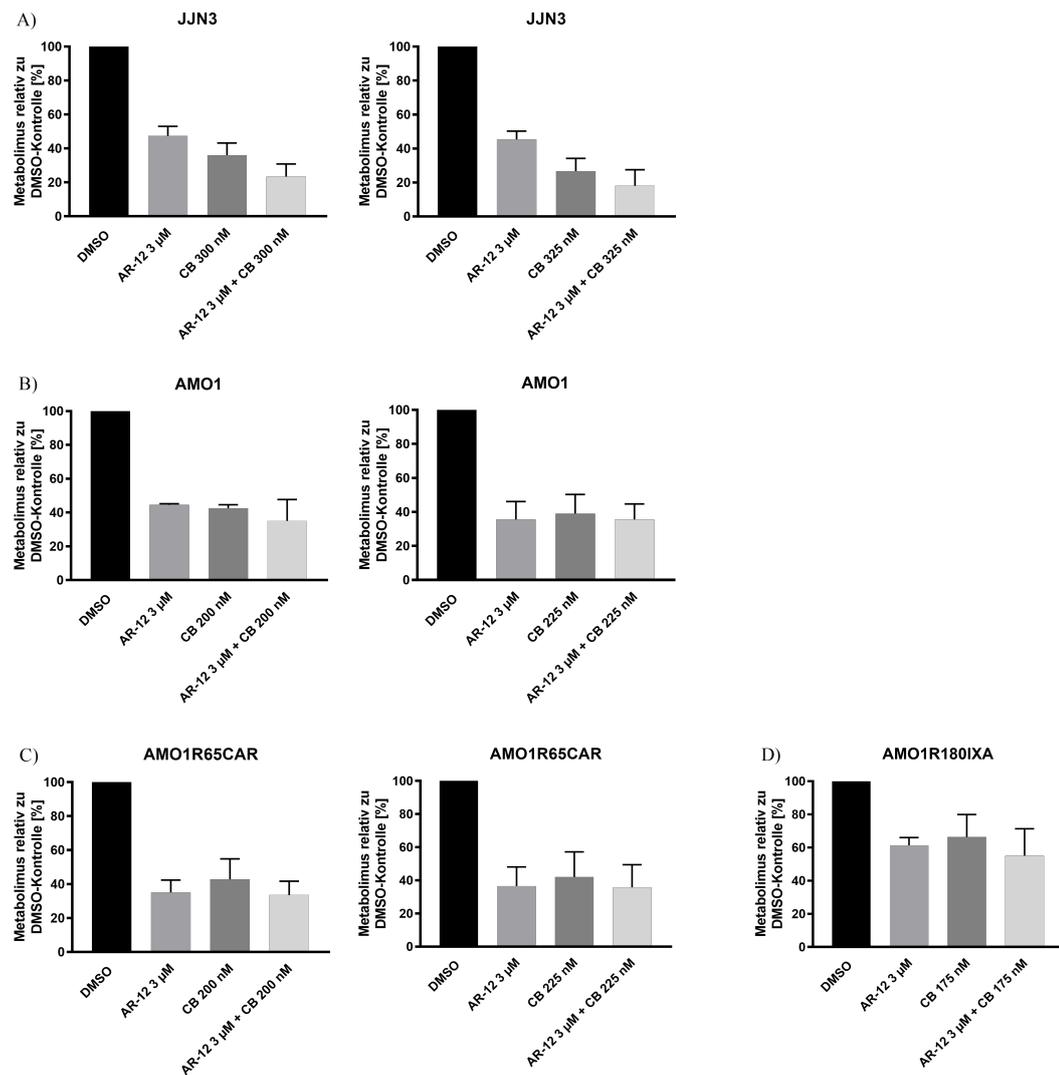


Abbildung 21: Effekte von AR-12 und CB-5083 bei einzelner und kombinierter Anwendung auf den Metabolismus der untersuchten Zelllinien

JJJ3 (A), AMO1 (B), AMO1R65CAR (C) und AMO1R180IXA (D) -Zellen wurden 72 h in Einzel- und Kombinationsansätzen in aufsteigender Konzentration mit AR-12 und CB-5083 inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe von Alamar-Blau-Färbung der Zellmetabolismus im Vergleich mit der DMSO-Kontrolle gemessen.

n= 3

4.2. Auswirkung von kombinierter p97-Inhibition und GRP78-Inhibition auf die Zellviabilität

Die Inhibition von p97 führte, wie bereits in Abbildung 15 - Abbildung 18 veranschaulicht, zu deutlichem ER-Stress Signaling und kompensatorisch zu verstärkter GRP78-Expression, während AR-12 die Stabilität von GRP78 reduzieren sollte. Die Hypothese, dass eine kombinierte Anwendung beider Substanzen zu einem additiven Effekt führen kann, wurde daher ebenfalls durchflusszytometrisch überprüft.

Die Viabilitätsmessungen der JJN3, AMO1, AMO1R65CAR und AMO1R180IXA-Zellen ergaben nach kombinierter Behandlung mit AR-12 und CB-5083 vergleichbare Ergebnisse (siehe Abbildung 22).

Die JJN3-Zelllinie erfuhr durch AR-12 einen Viabilitätsverlust auf 68,2 % Restviabilität, bei 300 nM und 325 nM CB-5083 auf 82,8 % sowie 78,5 % (siehe Abbildung 22). Die Kombination von AR-12 und CB-5083 erbrachte im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle 58,2 % bzw. 55,1 % Restviabilität.

Die Viabilität der AMO1-Zelllinie wurde durch 3 μ M AR-12 auf 58,2 % und durch 200 nM bzw. 225 nM CB-5083 auf 88 % sowie 81,7 % gesenkt, die kombinierte Anwendung reduzierte die Viabilität auf 60,4 % bzw. 54,8 %. Die AMO1R65CAR-Zellen wurden durch 3 μ M AR-12 auf eine Restviabilität von 56,1 %, durch 200 nM und 225 nM CB5053 auf 82,1 % sowie 75,2 % reduziert. Die kombinierte Anwendung ergab 65,2 % und 65,0 % Viabilität im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. AR-12 reduzierte die Viabilität der AMO1R180IXA-Zellen in 3 μ M Konzentration auf 58,0 %, CB-5083 bei 175 nM auf 78,3 % und die Kombination beider Inhibitoren reduzierte sie auf 57,1 %.

Die kombinierte Anwendung beider Inhibitoren wirkte in keiner Zelllinie additiv. Dies deckt sich weitestgehend mit den Ergebnissen der Metabolismus-Messungen, die ebenfalls keinen additiven Effekt von CB-5083 und AR-12 belegen konnten (Abbildung 21).

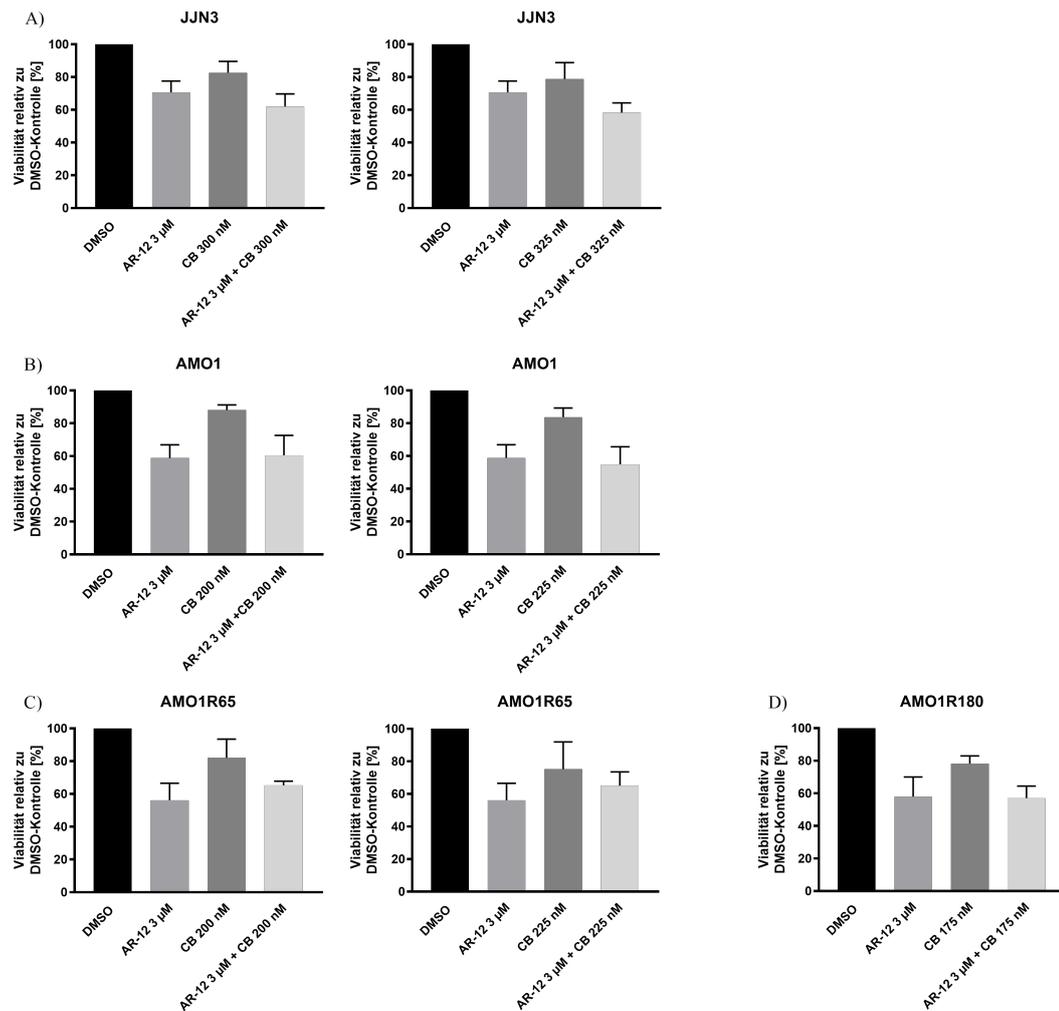


Abbildung 22: Effekte von AR-12 und CB-5083 in einzelner und kombinierter Anwendung auf die Viabilität der verwendeten Zelllinien

JJJ3 (A), AMO1 (B), AMO1R65CAR (C) und AMO1R180IXA (D) -Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen AR-12 und CB-5083 in Einzel- oder Kombinationsansätzen für 72 h inkubiert. Nach Analyse mittels Durchflusszytometrie wurden die Graphen erstellt.

In keiner der Zelllinien trat ein additiver Effekt bei Kombination beider Inhibitoren auf. n= 3

Tabelle 26: Restviabilitäten der untersuchten Zelllinien nach einzelner und kombinierter Inkubation mit AR-12 und CB-5083

	AR-12	CB-5083 (1)	Kombination (1)	CB-5083 (2)	Kombination (2)
JJJ3	68,2 %	82,8 %	58,2 %	78,5 %	55,1 %
AMO1	58,2 %	88,1 %	60,4 %	81,7 %	54,8 %
AMO1R65CAR	56,1 %	82,1 %	65,2 %	75,2 %	65,0 %
AMO1R180IXA	58,0 %	78,3 %	57,1 %	-	-

Die verwendeten Konzentrationen der Ansätze sind Abbildung 22 zu entnehmen.

4.3. Auswirkung von einzelner und kombinierter Inhibition von GRP78 und p97 auf die Viabilität von Primärmaterial

Die Auswirkungen der beiden Inhibitoren AR-12 und CB-5083 auf die Viabilität wurden an den isolierten MM-Zellen von insgesamt zehn Patientenproben einzeln und in kombinierten Ansätzen untersucht (Abbildung 23). AR-12 reduzierte die Viabilität dabei durchschnittlich um 21 % auf 79 % Restviabilität bei 3 μ M Konzentration, während CB-5083 bei 300 nM Konzentration die Viabilität um 22 % auf 78 % Restviabilität senkte. Anders als in den Zelllinien-basierten Untersuchungen senkte die Kombination beider Inhibitoren mit diesen Konzentrationen die Viabilität um 64 % auf 36 % Restviabilität. Eine Kombination der beiden Inhibitoren hatte in den zehn untersuchten Primärmaterialien einen synergistischen Effekt, während in den getesteten Zelllinien weder ein additiver noch synergistischer Effekt beobachtet wurde.

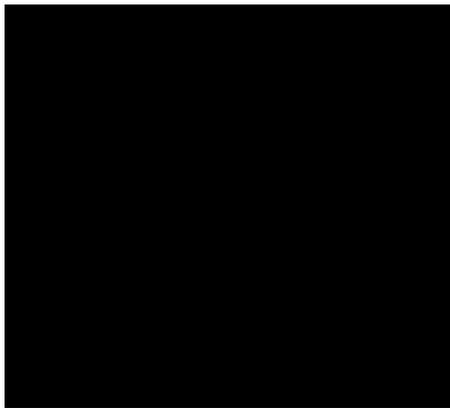


Abbildung 23: Effekte von AR-12 und CB-5083 in einzelner und kombinierter Anwendung auf primäre MM-Zellen

Knochenmarkspunktionen von zehn unterschiedlichen Patienten wurden aufgereinigt, sodass die CD138+ MM-Zellen isoliert wurden. Es folgte eine 72-stündige Inkubation mit AR-12 und CB-5083, jeweils einzeln und in Kombination. Die Ergebnisse wurden mittels Durchflusszytometrie ausgewertet.

3 μ M AR-12 und 300 nM CB-5083 reduzierten bei Einzelinkubation die Viabilität um 21 % bzw. 22 %. Anders als in den untersuchten MM-Zelllinien war bei kombinierter Anwendung ein synergistischer Effekt zu beobachten, da die Viabilität im Mittel um 64 % gesenkt wurde. n= 10

5. Vergleich mit weiteren UPR-induzierenden Substanzen

Die Auswirkungen auf das ER-Stress Signaling Panel der untersuchten Zelllinien wurde zwischen sechs verschiedenen Substanzen (CB-5083, AR-12, Carfilzomib, Panobinostat, PAT-SM6 und VER155008) mit unterschiedlichen Wirkmechanismen verglichen. Carfilzomib (Proteasom-Inhibitor) und

Panobinostat (HDAC-Inhibitor) gehören zum Standardrepertoire der Therapie des MM. VER155008 (HSP72-Inhibitor) und PAT-SM6 (sGRP78-Antikörper) haben keine klinische Zulassung für eine Therapie von Patienten. Für VER155008 und PAT-SM6 wurden zeitabhängige Inkubationsversuche jeweils für eine Zelllinie durchgeführt. In Abbildung 24 wurden die Zeitpunkte mit den stärksten ER-Stress Signalen verwendet. Für die verwendeten Zeitpunkte und Konzentrationen von Carfilzomib und Panobinostat wurde auf Erfahrungswerte von Dr. Brünnert zurückgegriffen.

5.1. Vergleich der Auswirkung von AR-12, PAT-SM6 und VER155008 auf die UPR von MM-Zelllinien

AR-12 bewirkte in keiner Zelllinie eine Reduktion der GRP78-Bande (siehe Abbildung 24). VER155008 und PAT-SM6 reduzierten die GRP78-Gesamtproteinmenge der AMO1R180IXA-Zellen geringfügig. PAT-SM6 reduzierte GRP78 zusätzlich bei JJN3 und AMO1-Zellen. Zu einer geringfügig verstärkten Phosphorylierung von eIF2 α (Ser51) kam es durch VER155008 Inkubation in allen Zelllinien. PAT-SM6 hatte in keiner Zelllinie einen Effekt auf die Phosphorylierung von eIF2 α (Ser51). Das ATF4-Level war nach VER155008 Inkubation in JJN3, AMO1 und AMO1R65CAR-Zellen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle und AR-12-Ansatz erhöht. PAT-SM6 hatte weder auf PERK noch auf eIF2 α einen sichtbaren Einfluss, steigerte aber in AMO1R65CAR und AMO1R180IXA-Zellen die ATF4-Proteinmenge sichtbar.

IRE1 α wurde durch VER155008-Inkubation im Vergleich zur DMSO-Kontrolle und AR-12 in den JJN3-Zellen verstärkt an Ser724 phosphoryliert. P-SAPK (Thr183/Tyr185) war in den VER155008 Ansätzen schwach augmentiert vorzufinden, wenn auch dieses Ergebnis bei den AMO1R65CAR-Zellen umgekehrt war. Die Proteinmenge von p62 erfuhr durch keinen der verwendeten Wirkstoffe eine Veränderung. Ein Spleißen von XBP1 wurde durch VER155008 bei JJN3 und AMO1R180IXA-Zellen, im Vergleich zur DMSO-Kontrolle und AR-12, verstärkt induziert. LC3AB-I wurde bei den AMO1-Zelllinien in dem mit AR-12 inkubierten Ansatz am stärksten reduziert, wobei teilweise eine leichte LC3AB-II Bande sichtbar wurde. PAT-SM6-Inkubation hatte in allen Zelllinien verstärkte P-IRE1 α -Banden im Vergleich zur DMSO-Kontrolle zur Folge, allerdings lag P-IRE1 α (Ser724) auch in der Lösungsmittelkontrolle verstärkt vor. Für SAPK, p62, LC3 und XBP1(s) wurden keine Veränderungen durch PAT-SM6 festgestellt.

Deutlich Unterschiede der Gesamtproteinmenge von ATF6 und der aktivierten Form von ATF6 zwischen den Substanzen wurden nicht festgestellt.

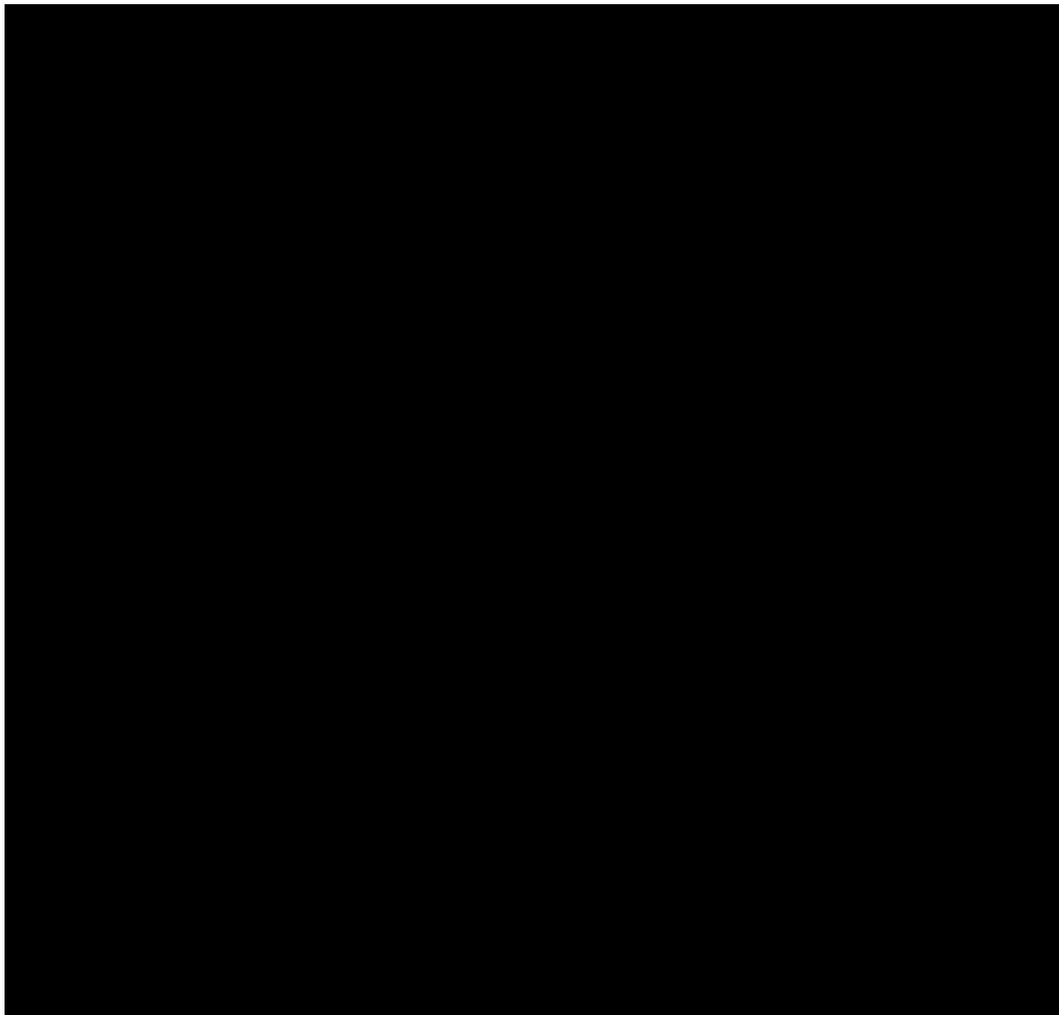


Abbildung 24: Effekte von AR-12, VER155008 und PAT-SM6 auf die Proteinmenge des verwendeten ER-Stress Signaling Panels

JJN3, AMO1, AMO1R65CAR und AMO1R180IXA-Zellen wurden für 72 h mit AR-12, VER155008 und PAT-SM6 in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die Ansätze wurden geerntet, lysiert und die Ergebnisse mittels Western Blot und Photodetektion sichtbar gemacht.

Keine der verwendeten Substanzen reduzierte die GRP78-Proteinmenge deutlich sichtbar. VER155008 aktivierte den PERK-Signalweg stärker als AR-12 und PAT-SM6. P-IRE1 α (Ser724) wurde nur durch VER155008 und nur bei den JJN3-Zellen verstärkt detektiert. Die Konversion von LC3 wurde durch AR-12-Inkubation am deutlichsten ausgelöst. ATF6 mit seiner aktivierten Form wurde durch keine Substanz verstärkt induziert.

Das als Ladekontrolle verwendete Protein β -Actin war in allen Ansätzen annähernd gleich verteilt.
n= 2

5.2. Vergleich der Auswirkung von CB-5083, Carfilzomib und Panobinostat auf die UPR von Myelomzelllinien

Weder Carfilzomib noch Panobinostat bewirkten erkennbare Veränderungen der GRP78- und GRP94-Proteinmengen in einer der Zelllinien (siehe Abbildung 25).

PERK wurde im Vergleich zur DMSO-Kontrolle durch 1 μ M CB-5083 in allen Zelllinien verstärkt vorgefunden. Carfilzomib bewirkte in JJN3 und AMO1-Zellen eine verstärkte Aktivität, die gegen Carfilzomib resistenten AMO1R65CAR-Zellen wiesen eine im Vergleich zur Kontrolle schwächere Bande auf. Panobinostat induzierte nur in AMO1-Zellen eine verstärkte PERK-Bande. Nichtsdestotrotz wurde eIF2 α durch Panobinostat, ebenso wie durch CB-5083, in allen Zelllinien verstärkt an Ser51 phosphoryliert und dadurch aktiviert. Carfilzomib bewirkte dagegen keinerlei Phosphorylierung. Die ATF4-Proteinbande nahm am stärksten nach CB-5083-Inkubation zu. Trotz geringer Zunahme der eIF2 α -Phosphorylierung nach Carfilzomib-Gabe lag ATF4 in allen Zelllinien verstärkt vor. Dahingegen war eine Zunahme der ATF4 Bande durch Panobinostat nur in der AMO1R180IXA-Zelllinie zu beobachten.

CB-5083 führte als einziger Inhibitor in allen Zelllinien zu einer deutlich verstärkten Phosphorylierung von IRE1 α (Ser724) und zu einer Zunahme der IRE1 α -Gesamtproteinmenge. Eine starke Phosphorylierung der SAPK (Thr183/Tyr185) bei gleichzeitiger Abnahme der Bandenintensität der SAPK bewirkte ebenfalls nur CB-5083, allerdings nicht bei den AMO1R65CAR-Zellen. Die p62-Proteinbande wurde durch CB-5083 am deutlichsten reduziert. Auch Panobinostat und Carfilzomib führten zu Abnahmen der p62-Proteinbanden, jedoch in schwächerem Ausmaß. Eine Reduktion der LC3AB-I Bande erfolgte am deutlichsten nach CB-5083-Inkubation. Die LC3AB-II Bande nach CB-5083 Inkubation konnte nicht detektiert werden. Die XBP1(s)-Proteinmenge wurde durch CB-5083 in Vergleich zur Kontrolle verstärkt nachgewiesen, in den Carfilzomib und Panobinostat Ansätzen wurden keine deutlichen Anstiege festgestellt.

Die Bandenintensität von ATF6 war bei den AMO1R180IXA-Zellen generell schwach. Bei den AMO1 und AMO1R65CAR-Zellen führte CB-5083 zu einem Anstieg der Bandenintensität von ATF6. Die aktivierte Form von ATF6 wurde nach

CB-5083-Inkubation stärker detektiert als nach Inkubation mit Carfilzomib und Panobinostat, wo eher eine Ab- als Zunahme der Bande sichtbar wurde.

CB-5083 hatte keine Auswirkung auf die Proteinmenge von HSP72, während Carfilzomib und Panobinostat in allen Zelllinien (sehr schwach bei AMO1R180IXA-Zellen) zu erhöhten Proteinnengen von HSP72 im Vergleich zu den DMSO-Kontrollen führten.

Zusammenfassend aktivierte der p97-Inhibitor CB-5083 den PERK Signalweg unabhängig von der Zelllinie am stärksten, während der Proteasom-Inhibitor Carfilzomib und der HDAC-Inhibitor Panobinostat dies nur mit Einschränkungen bewirkten. Weiterhin war auch die Induktion des IRE1 α -Signalwegs zelllinienunabhängig nur nach p97-Inhibierung zu sehen. Auch eine Autophagieinduktion wurde in den Zelllinien am stärksten durch CB-5083 bewirkt, während Panobinostat und Carfilzomib dies zelllinienabhängig nur partiell erreichten.

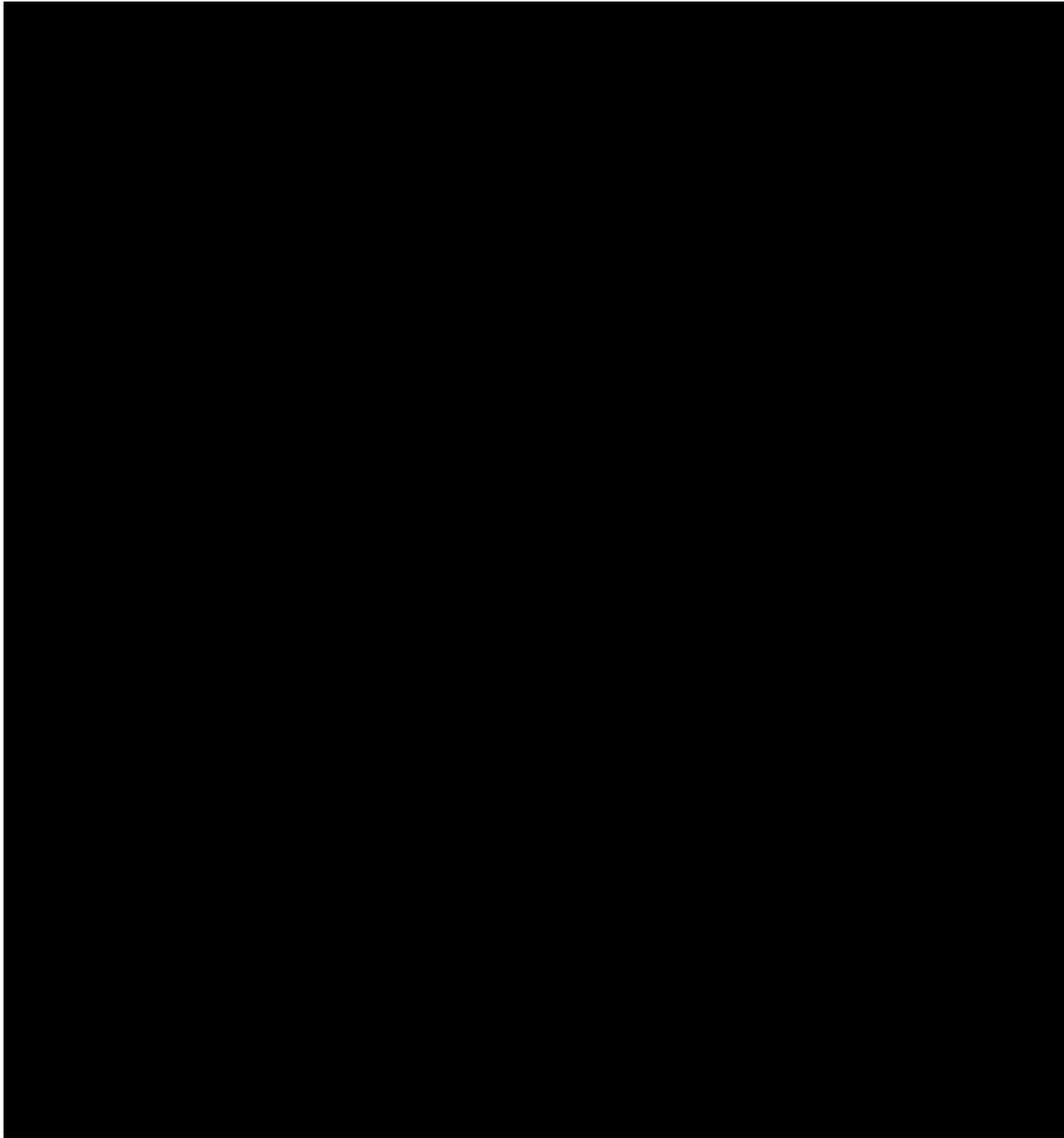


Abbildung 25: Effekte von CB-5083, Carfilzomib und Panobinostat auf das ER-Stress Signaling Panel

Zellen der JJN3, AMO1, AMO1R65CAR und AMO1R180IXA-Zelllinien wurden für 72 h mit den Inhibitoren und DMSO als Lösungsmittelkontrolle inkubiert. Die Ansätze wurden geerntet, lysiert und die Ergebnisse mittels Western Blot und Photodetektion sichtbar gemacht.

Carfilzomib und Panobinostat hatten keine Auswirkung auf die Proteinmengen von GRP78 und GRP94. CB-5083 aktivierte den PERK-Signalweg am deutlichsten, wenn auch Panobinostat ebenfalls vermehrt zu eIF2 α (Ser51) Phosphorylierung führte. Auch der IRE1 α -Signalweg wurde durch CB-5083 am deutlichsten aktiviert, insbesondere die P-SAPK- (Thr183/Tyr185) Bande. P62 Reduktion war nach CB-5083 und Panobinostat-Inkubation sichtbar, bei den AMO1R65CAR-Zellen auch nach Carfilzomib-Inkubation.

n= 2

VII. DISKUSSION

1. GRP78-Inhibition durch AR-12

Zu Beginn dieser Forschungsarbeit wurde mittels Western Blot das hohe Expressionslevel von GRP78 in Primärmaterial von zehn verschiedenen MM-Patienten nachgewiesen. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen mehrerer Untersuchungen zur GRP78-Expression im Multiplen Myelom (254, 274). Durch die Stellung als zentral regulierender Parameter der UPR in Verbindung mit verstärktem Vorkommen in MM-Zellen wurde damit noch einmal die interessante therapeutische Möglichkeit der GRP78-Inhibition hervorgehoben. Ebenfalls wurde damit noch einmal die Relevanz von GRP78 im MM herausgearbeitet, wie bereits in der Literaturübersicht dargestellt.

1.1. AR-12 induziert S-Phasen-Arrest in AMO1 Zellen

Die Wirkung der mutmaßlichen GRP78-Inhibition durch AR-12 auf den Zellzyklus wurde mittels 24-stündiger Inkubation untersucht. Für die AMO1-Zelllinien wurde ein (partieller) S-Phasen-Arrest bei deutlicher Abnahme der G2/M-Phasen festgestellt. Zellen in S-Phasen-Arrest sind nicht in der Lage zur DNA-Replikation, es resultierte die hier beobachtete Abnahme von G2/M-Phase als die erwartbare Folge. Zu erwarten gewesen wäre auch ein Anstieg der G1-Phase, der hier aber nicht festgestellt werden konnte. Während bei den JJN3-Zellen der S-Phasen-Arrest nicht ausgeprägt war, traf dies auf die Zunahme der G1-Phase sowie auf die Abnahme der G2/M-Phasen allerdings zu. Der S-Phasen-Arrest durch AR-12 wurde bereits bei Neuroblastomzellen beschrieben (275, 276). Ein S-Phasen-Arrest bei einer AR-12 Konzentration von 2 μ M konnte außerdem bei Plattenepithelkarzinomzellen nachgewiesen werden (277). Zhang *et al.* untersuchten an Zellen der U266-Zelllinie (Multiples Myelom) die Auswirkungen von 24-stündiger AR-12-Inkubation. Bei 2,5 μ M Konzentration wurden keine Veränderungen festgestellt, bei 10 μ M Konzentration trat ein G2/M-Phasen-Arrest auf (246). Allerdings haben U266-Zellen mit 55 Stunden Verdopplungszeit einen deutlich längeren Zellzyklus als AMO1-Zellen (278). Ebenso ist davon auszugehen, dass der Wirkmechanismus von AR-12 bei 3 μ M und 10 μ M Konzentration voneinander abweichen. Durch diese beiden Faktoren könnten die unterschiedlichen Ergebnisse hervorgerufen worden sein. Den Effekt von AR-12

auf den Zellzyklus attribuierten Zhang *et al.* mit der Inhibition von Cyclin A und B und diskutierten zusätzlich mögliche Effekte des MAPK-Signalweges. Außerdem wurde eine Herunterregulation von Cyclin D1 festgestellt (246). Weitere Forschung ist an dieser Stelle notwendig, um auf molekularbiologischer Ebene die Ursachen der Zellzyklusverschiebungen herauszuarbeiten.

Anschließend wurde der Effekt von AR-12 auf den Zellmetabolismus von vier MM-Zelllinien untersucht. Die dabei verwendete 3 μ M Konzentration soll gemäß Veröffentlichungen aus der Forschungsgruppe um Paul Dent zu einer verringerten Stabilität des Chaperons führen (245, 247, 279). Die von dieser Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchungen wurden vor allem an humanen Glioblastomzellen (GBM-Glioblastoma multiforme) durchgeführt. Western Blot basierte Untersuchungen der Auswirkungen von GRP78 auf die UPR von Myelom-Zelllinien liegen bislang nicht vor. Eine Überexpression von GRP78 soll protektiv gegen GRP78-abhängige PERK-Aktivierung, Autophagie-Induktion und Zelluntergang wirken (247).

1.2. AR-12 wirkt apoptotisch auf MM-Zelllinien

In durchflusszytometrischen Messungen wurde die pro-apoptotische Wirkung von AR-12 bestätigt, die bereits von Zhang *et al.* beschrieben wurde (246). Deutliche Unterschiede bei der Betrachtung von Carfilzomib- und Ixazomib-resistenten AMO1-Zellen im Vergleich mit der parenteralen AMO1-Zelllinie ergaben sich dabei nicht.

Brünnert *et al.* konnten zeigen, dass gegen Ixazomib resistente AMO1R180IXA-Zellen durch eine starke Überexpression von PSMB1, PSMB2 und PSMB5 gekennzeichnet sind (261). Diese proteasomalen Untereinheiten sind zur Bildung des 20S Proteasoms notwendig. PSMB5 Überexpression und Mutationen als Folge von Proteasom-Inhibitor-Behandlung mit Bortezomib konnten außerdem in MM-Primärmaterialproben nachgewiesen werden (280). In MM-Zelllinien konnten außerdem sowohl für Bortezomib-Resistenz als auch für Ixazomib-Resistenz Mutationen in PSMB5 nachgewiesen werden (261, 281). Die AMO1R180IXA-Zellen weisen aufgrund einer strukturellen Ähnlichkeit zwischen Ixazomib und Bortezomib eine Kreuzresistenz gegen Bortezomib auf.

Der Resistenzmechanismus der AMO1R65CAR-Zellen gegenüber Carfilzomib beruht hingegen auf einer sehr starken Überexpression von ABCB1-Transportern (*ATP-binding cassette β -1*), auch bekannt als MDR1 (*Multi Drug Resistance*

protein 1) (260). Es handelt sich um eine ATP-abhängige Efflux-Pumpe, die für das zelluläre Ausschleusen von einer Vielzahl von Substanzen verantwortlich ist, darunter Carfilzomib (282, 283).

Zwischen einer AR-12-Konzentration von 0 μM und 5 μM verliefen Metabolismus- und Viabilitätskurven zwischen den Zelllinien vergleichbar, wobei der Metabolismus durch die jeweilige AR-12 Konzentration zwischen 10 % und 25 % stärker reduziert wurde als die Viabilität. Das frühere Absinken der Metabolismuswerte im Vergleich mit den Viabilitäten war zu erwarten. Vor allem die JN3 und AMO1R180IXA-Zellen wiesen einen negativ linearen Kurvenverlauf in dieser Konzentrationsspanne auf. Ein solches Ergebnis könnte hinweisend sein, dass AR-12 in diesem Konzentrationsbereich bei Myelomzellen über hauptsächlich einen Wirkmechanismus aktiv ist. Möglicherweise könnte im Konzentrationsbereich zwischen 0,5 μM und 2 μM auch die Affinität für und Inhibierung von HSP70-1A für einen stärkeren Abfall der Viabilität der Zellen verantwortlich gewesen sein (249). Interessant war, dass ab einer AR-12 Konzentration von 5 μM sowohl Metabolismus als auch Viabilität uniform rapide abfiel. Dies wurde wahrscheinlich durch die ab 5 μM Konzentration einsetzende PDK-1-inhibitorische Wirkung bedingt, die in der Literatur beschrieben wurde (245, 246). In Anbetracht dessen scheint, sofern AR-12 GRP78 inhibiert, die apoptotische Wirkung dieser GRP78-Inhibierung nicht besonders stark zu sein. Zwischen einer Konzentration von 2 μM bis 5 μM wurden nur Viabilitätsreduktionen zwischen 10 % und 40 % erreicht. Diese Zahlen wurden nach persönlicher Kommunikation mit Dr. Brännert auch nach durchflusszytometrischen Messungen von MM-Zellen bestätigt, in denen vorher ein GRP78-siRNA-basierter *Knockdown* von GRP78 vorgenommen wurde. Diese Ergebnisse unterstützen aber insgesamt die Hypothese, dass AR-12 konzentrationsabhängig unterschiedliche Wirkmechanismen besitzen könnte und dass eine alleinige Inhibition von GRP78 nicht ausreichen könnte. Wahrscheinlicher wäre eine ausreichende Wirkung wohl durch eine pan-HSP70- und pan-HSP90-Inhibition.

Für alle weiteren Untersuchungen im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde eine subletale Dosis von AR-12 (3 μM) auf dieser Grundlage verwendet. Da die Viabilität bei allen Zelllinien hier in etwa gleich hoch war, konnte die 3 μM Konzentration für alle Linien verwendet werden.

Western Blots wurden für alle Zelllinien angefertigt, es wurde jeweils für 4 h und 8 h inkubiert. Es wurde das innerhalb der Forschungsgruppe durch Dr. Brünner etablierte ER-Stress Signaling Panel verwendet.

Bei einer AR-12-Konzentration von 3 μM konnte in keiner Zelllinie und zu keinem Zeitpunkt durch Western Blotting ein erkennbares und reproduzierbares Absinken der GRP78-Proteinmenge festgestellt werden. Es fand eine bis zu 24-stündige AR-12-Inkubation statt. Ebenso wurde weder eine GRP94 Reduktion noch eine Hochregulation (was zu erwarten gewesen wäre) bei gleichzeitiger Hochregulation von HSP72 festgestellt, wie von Park *et al.* mittels Western Blotting nach AR-12-Inkubation (6 h) angegeben (245). Für HSP72 ergaben sich vielmehr keinerlei Veränderungen der Proteinmenge. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass nur Messungen zu zwei Zeitpunkten durchgeführt wurden. Trotz dieser Ergebnisse wurde PERK in allen Zelllinien aktiviert vorgefunden. Die *downstream* davon liegenden Effektoren eIF2 α und ATF4 wiesen eine schwache Aktivierung auf, was bei anderer Entität (GBM) ebenfalls beschrieben wurde (284). Ähnlich verhielt sich der IRE1 α -Signalweg. Es fand in allen Zelllinien eine geringgradige Phosphorylierung von IRE1 α an Position Ser724 statt, eine *downstream* davon liegende Phosphorylierung der SAPK/JNK oder erhöhte XBP1(s) Mengen lagen nicht vor. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass beide Signalwege durch AR-12 nur schwach aktiviert wurden, wobei der PERK-Signalweg etwas stärker aktiviert wurde. Der dritte Effektor der UPR, ATF6, konnte in seiner aktivierten, gespalteten Form nicht nachgewiesen werden.

Der durch AR-12 in 3 μM Konzentration hervorgerufene ER-Stress ist daher als mäßig einzustufen, er hat eine Zell-protective Funktion. Dies ist der Fall, wenn der ER-Stress weder sehr stark noch länger anhaltend vorliegt. Es ist möglich, dass AR-12 auf die Halbwertszeit von GRP78 in Myelomzellen einen negativen Einfluss hat. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse deuten allerdings darauf hin, dass diese Wirkung im MM bestenfalls als schwach einzuschätzen ist, da ein Nachweis mittels Western Blot nicht erbracht werden konnte. Dies passt zu den Ergebnissen von Bhattacharjee *et al.*, die mittels computergestützter Analysen zu dem Schluss kamen, dass AR-12, im Vergleich zu EGCG, durch nicht sehr spezifische Bindung und die anschließende Konformationsänderung von GRP78 ein weniger geeigneter Inhibitor ist (249). Trotzdem wurde in dieser Forschungsarbeit konstatiert, dass AR-12 grundsätzlich durchaus an GRP78 bindet. Bei einer wirksamen und

deutlichen Reduzierung der Proteinstabilität von GRP78 wäre als Ergebnis in den Western Blots allerdings ein deutliches ER-Stress Signal in allen drei Effektorwegen der UPR zu erwarten gewesen, da GRP78 als Master Regulator der UPR die Signalwege bei Vorliegen von ER-Stress und der verbundenen Dissoziation aktiviert. Zu beachten sind auch die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Paul Dent in Zusammenhang mit GRP78-Überexpression und AR-12 Wirksamkeit. Es wurde beschrieben, dass Überexpression von GRP78 die Wirkung von AR-12 neutralisiert (284). Da MM-Zellen, wie bereits mehrfach beschrieben, einem erhöhten Maß an ER-Stress ausgesetzt sind, wird GRP78 in erhöhtem Maße exprimiert (285). Es wäre denkbar, dass die Überexpression von GRP78 stark genug ist, um die GRP78-reduzierende Wirkung von AR-12 zu neutralisieren oder zumindest zu verringern. Um eine mögliche Reduzierung des GRP78-Levels durch AR-12 zu untersuchen, könnten außerdem weitere Untersuchungsmethoden wie Genexpressionsanalysen oder Immunhistochemie verwendet werden. Besonders die Immunhistochemie war in den Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe um Paul Dent eine häufig verwendete Methode. Das Western Blotting liefert zudem nur Informationen zu definierten Zeitpunkten. Es ist daher möglich, dass kurz andauernde Änderungen im Signaling übersehen werden können. Auch könnte untersucht werden, ob die kombinierte Inkubation des Phosphodiesterase-5-Inhibitors Sildenafil (*Viagra*) und AR-12 eine im Western Blot nachweisbare GRP78-Reduktion in MM-Zellen bewirkt. Zu diesem Ergebnis kamen Booth *et al.* nach Kombinationsversuchen an GBM-Zellen (286). Es bedarf folglich weiterer Forschung, um die zugrundeliegenden Mechanismen der pharmakologischen Wirkung von AR-12 zu verstehen.

Zu Beginn des Projektes war geplant, die antitumoröse Wirkung von AR-12 ebenfalls im Tiermodell Maus zu untersuchen. Nachdem die geringe Auswirkung auf das ER-Stress Signaling Panel und insbesondere auf die GRP78-Level anhand der Zelllinienversuche sowie anhand des Primärmaterials festgestellt wurden, kam die Tierversuchsreihe für diese Forschungsarbeit nicht mehr in Frage.

1.3. AR-12 induziert Autophagie in MM Zellen

Die mittels Western Blotting gewonnenen Ergebnisse (Abbildung 10) weisen auf eine Autophagie-Induktion bei einer Konzentration von 3 μM hin. Diese fällt allerdings nach 4 und 8-stündiger Inkubation nicht stark aus, besonders im Vergleich mit den für CB-5083 gewonnenen Ergebnissen. Die stärksten pro-

autophagischen Signale wurden durch Nachweis der LC3AB-II Bande erzielt. Dieser Effekt von AR-12 wurde von Park *et al.* an Glioblastom- und Kolonkarzinomzelllinien ebenfalls nachgewiesen, unter anderem verbunden mit nur schwacher eIF2 α -Phosphorylierung bei gleichzeitiger PERK-Aktivierung (245). Außerdem wiesen Yacoub *et al.* mittels Fluoreszenzmikroskopie an humanen Kolonkarzinom- und Glioblastomzellen (1 μ M Konzentration, 3 bis 6-stündige Inkubation) eine LC3-Vakuolisierung nach (245, 247). Eine p62-Reduktion durch Bindung an ubiquitinierte Proteine wurde nur in geringem Maße beobachtet. Als problematisch erwies sich allerdings auch die Handhabung der Photodetektion, da hier bereits sehr kurze Belichtungszeiten trotz stärkerer Verdünnung des Primärantikörpers und mehrlagiger Filmfolien starke Signale erzielten. Daneben wäre eine zeitliche Dynamik von p62 denkbar, die außerhalb der verwendeten Inkubationszeiträume liegen.

1.4. AR-12 aktiviert den PERK-Signalweg und Autophagie in Primärmaterial

In Abbildung 9 wurde die Auswirkung von AR-12 auf die UPR von MM-Primärzellen untersucht. Der PERK-Signalweg wurde, wie auch in den MM-Zelllinien, durch AR-12 aktiviert, dies war besonders an der verstärkten ATF4 Expression zu erkennen. Auch die GRP78-Banden wurden in beiden Proben nicht reduziert detektiert, was dafürspricht, dass AR-12 auch hier nicht als GRP78-Inhibitor durch eine Verringerung der Halbwertszeit über eine Reduzierung der Proteinstabilität wirkt. Wie auch in den MM-Zelllinien war im Primärmaterial durch den verstärkten Nachweis der LC3AB-II Bande in beiden Proben eine Aktivierung der Autophagie nachweisbar. Die Auswirkungen einer AR-12 Inkubation auf die UPR ähnelten sich stark zwischen Zelllinien auf der einen Seite und Primärmaterial auf der anderen Seite. Problematisch in Zusammenhang mit diesen Erkenntnissen ist die Anzahl der Proben. Aufgrund einer deutlich höheren benötigten Zellzahl für Western Blot Ansätze im Vergleich mit durchflusszytometrischen Messungen, konnten für diese Arbeit lediglich Proben von zwei MM-Patienten herangezogen werden. Dies begründete auch das nur eingeschränkt untersuchbare UPR-Stress Signaling Panel. Dieser Aspekt kann allerdings auch wieder zu einem gewissen Grad relativiert werden, da in diesem Fall die Proteine untersucht wurden, die in den Zelllinien-Versuchen die deutlichsten Ergebnisse ergaben. Weitere Untersuchungen an Primärmaterial sind

notwendig, um diese ersten Ergebnisse zu bestätigen. In der Literatur konnten durch den Autor keine weiteren ER-Stress Signaling Versuche mit MM-Primärmaterial gefunden werden.

2. P97-Inhibition durch CB-5083

2.1. CB-5083 induziert G1-Phasen-Arrest in AMO1-Zelllinien

Die Inhibition von p97 durch 24-stündige Inkubation mit CB-5083 führte bei allen AMO1-Zelllinien zu einem G1-Phasen Arrest bei gleichzeitig deutlich reduzierten S- und G2/M-Phasen. Diese Wirkung auf den Zellzyklus wurde durch Bastola *et al.* bereits in Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen (287). Dabei wurden Versuchsansätze mit bis zu 24-stündiger Inkubation durchgeführt. Der G1-Phasen Arrest wurde auf Akkumulation der Zellzyklus regulierenden Proteine p27, Cyclin D1 und Cyclin E zurückgeführt, die Substrate des Ubiquitin-Proteasom-Systems sind. Cycline bilden Komplexe mit CDKs (*cyclin-dependant kinases*) und sind so wesentlich an der Progression aus der G1-Phase in die S-Phase beteiligt (288). Anders stellte sich das Ergebnis für die JN3-Zelllinie dar, denn hier induzierte CB-5083 einen verstärkten Übergang in die sub-G1-Phase. Dieses Ergebnis sprach für eine verstärkte Apoptoserate der JN3-Zellen. Ähnliche Resultate erhielten Gugliotta *et al.* nach 12-stündiger-Inkubation von 1 μ M CB-5083 mit ALL-Zellen (123). Dieses Ergebnis war unerwartet, da für die JN3-Zellen die Phosphorylierung der SAPK (Abbildung 13) kaum nachgewiesen werden konnte. Möglicherweise war dies auch durch Anwendungsprobleme mit dem Antikörper für P-SAPK (Thr183/Tyr185) verbunden, da auch bei langen Belichtungszeiten teilweise keinerlei Signale erzielt werden konnten. Ebenso könnte das P-SAPK-Signal zu einem anderen Messzeitpunkt möglicherweise besser detektiert werden. Außerdem könnte die Ursache für die abweichenden Ergebnisse der AMO1- und JN3-Zellen durch Unterschiede in der Länge des Zellzyklus begründet sein (AMO1: ~24h *versus* JN3: ~24h-36h). Eine Untersuchung der Zellzyklus-regulierenden Proteine wäre notwendig, um die zellulären Ursachen für die Zellzyklusverschiebungen näher zu untersuchen, insbesondere Cycline und ihre Cyclin-abhängigen Kinasen.

2.2. CB-5083 induziert Autophagie in MM-Zelllinien

Anhand der zeit- und konzentrationsabhängigen CB-5083-Inkubationen wurde gezeigt, dass Autophagie in Myelomzellen dynamisch aktiviert wird. Der zeitliche Höhepunkt lag im Bereich von 1 bis 2-stündiger Inkubation. Nach 8-stündiger Inkubation befanden sich die P-Beclin- (Ser93), LC3AB-II- und p62-Banden wieder annähernd auf Kontrollniveau. Ein Erklärungsansatz hierfür wäre, dass ER-Stress durch p97-Inhibition bereits nach kurzer Inkubationszeit sehr stark ausgelöst wird. In diesem Zeitraum wirken die ER-Stress Signalwege protektiv, da die verstärkte Autophagie überlebensfördernd ist. Diese These wird beispielsweise durch die hohen P-IRE1 α - (Ser724) Werte nach 30-minütiger Inkubation gestützt. Als Reaktion auf schnell und stark einsetzenden ER-Stress und auf die Akkumulation fehl- oder nicht gefalteter Proteine wird Autophagie induziert, um den einsetzenden ER-Stress zu reduzieren (222, 289). Ein möglicher Erklärungsansatz für das Absinken der Autophagiemarker annähernd auf den Basalwert nach 8-stündiger Inkubation, könnte das Überwiegen pro-apoptotischer Signale sein, die letztlich fatalen ER-Stress auslösen. Dabei handelt es sich um ER-Stress, der entweder länger anhaltend oder initial sehr stark ist. Die bei niedrigerem ER-Stress Level protektiv wirkenden Signale verändern sich in diesem Fall pro-apoptotisch (290). Hinweisend dafür ist bei den AMO1-Zelllinien insbesondere die starke Phosphorylierung von SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) nach 8-stündiger Inkubation. Das zeigt, dass der durch CB-5083 induzierte ER-Stress auf die Myelomzellen erheblich ist. Eine Fehlerquelle für die Interpretation könnte der Betrachtungszeitraum des ER-Stress Panels sein. Über acht Stunden hinaus reichende Inkubationsversuche zur Auswertung mittels Western Blotting und Photodetektion wurden nicht durchgeführt.

2.3. CB-5083 induziert ER-Stress und Apoptose in MM-Zelllinien

In dieser Forschungsarbeit wurde der Effekt der p97-Inhibition auf die UPR der JLN3 und AMO1-Zelllinien untersucht. Es wurden zeit- (30 min bis 8 h) und konzentrationsabhängige (0,2 μ M, 0,5 μ M und 1 μ M) Inkubationsversuche durchgeführt. Das stärkste ER-Stress Signaling wurde bei einer Konzentration von 1 μ M CB-5083 festgestellt. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Western Blot-basierten Versuche die 1 μ M Konzentration verwendet. Neben der starken Aktivierung aller drei ER-Stress Haupteffektoren und nachfolgender Signalwege (PERK-eIF2 α -ATF4, IRE1 α -XBP1(s)-SAPK-Beclin, ATF6-GRP78) war vor

allem die Hochregulation von GRP78 deutlich erkennbar. Die Wirkung von CB-5083 auf Teile des ER-Stress Panels wurde bereits von Anderson *et al.* und Le Moigne *et al.* an MM-Zellen untersucht (209, 224). Die zeitliche Dynamik des ER-Stress und insbesondere der Autophagie-Induktion wurden in dieser Arbeit nach Kenntnis des Autors für MM-Zellen erstmalig dargestellt. Ebenso wurde bislang die Aktivierung und mögliche Beteiligung der SAPK/JNK an der Apoptose nicht untersucht. Die starke Phosphorylierung der SAPK (Ser183/Tyr185) in den AMO1-Zelllinien könnte für eine Apoptose-Induktion nach 8-stündiger Inkubation sprechen. Über eine Phosphorylierung von c-jun kann die Transkription von pro-apoptotisch wirkenden Proteinen induziert werden (291). Außerdem wird dieses pro-apoptotische Signal über die Phosphorylierung von BCL-2 und *BH3-only* Proteinen vermittelt (290). SAPK/JNK hat allerdings eine bidirektionale Rolle inne, da es Autophagie und auch Apoptose induzieren kann. Aufgrund der starken Phosphorylierung von SAPK/JNK nach 8-stündiger Inkubation bei gleichzeitigem Rückgang der Autophagiemarker (LC3, p62 und Beclin) nach 8 h wäre hier aber die pro-apoptotische Wirkung der SAPK der wahrscheinlichere Fall. Gut zu erkennen war, dass die SAPK/JNK-Aktivierung durch CB-5083 wahrscheinlich IRE1 α abhängig ist, da im GRP78⁻-Ansatz bei reduziertem P-IRE1 α -Level auch das P-SAPK-Signal reduziert vorlag.

Außerdem relevant für die Apoptoseinduktion könnte der PERK-eIF2 α -ATF4 Signalweg sein, da ATF4 die Expression von CHOP verstärkt, was pro-apoptotisch wirksam ist (292). Die ATF4 Induktion war nach 4 h bereits stark vorhanden, nach 8-stündiger Inkubation war eine weitere Signalverstärkung zu erkennen (Abbildung 15 - Abbildung 18). ATF4 verstärkt bei länger andauerndem ER-Stress die Expression von *C/EBP homologous protein* (273) (292). Die Beteiligung von CHOP bei der Induktion von Apoptose durch CB-5083 wurde bereits durch Gugliotta *et al.* an Leukämiezellen demonstriert (123). Das durch CB-5083 induzierte ER-Stress Signaling deutet daraufhin, dass bereits nach kurzer Inkubationsdauer starker ER-Stress induziert wird. Durch die schnelle Induktion der Autophagie wirkt dieser anfänglich zellprotektiv. Besonders die starken P-SAPK-Signale sowie die ATF4 Aktivierung nach 8-stündiger Inkubation, in Verbindung mit dem Rückgang der Autophagie zu diesem Zeitpunkt, weisen auf fatalen proteotoxischen Stress hin. Dies war eingeschränkt bereits bei einer Konzentration von 0,2 μ M zu sehen, deutlich stärker bereits bei einer Konzentration von 0,5 μ M Konzentration und am deutlichsten bei der höchsten Konzentration

(1 μ M). Diesen proteotoxischen ER-Stress wiesen bereits Brännert *et al.* nach (261).

Zu den beobachteten Veränderungen von ATF6 muss kritisch angemerkt werden, dass zwar der Hersteller des Antikörpers die 70 kDa Bande als spezifische Bande für das *cleaved* ATF6, also die gespaltene, aktivierte Form des Proteins angibt, Dr. Brännert diese Spezifität in eigenen ATF6-*Knockdown*-Versuchen aber nur eingeschränkt bestätigen konnte. Die 100 kDa Bande erwies sich auch in diesen Versuchen als spezifische Bande für das Gesamt-ATF6. Nichtsdestotrotz erschien die 70 kDa Bande bei den Versuchen in dieser Arbeit als eine für die Aktivierung von ATF6 spezifische Bande, ohne dass aber eigene *Knockdown*-Versuche durchgeführt wurden.

Um die Auswirkung von p97-Inhibition bei gleichzeitiger GRP78-Defizienz zu untersuchen, wurden siRNA vermittelte *Knockdown*-Versuche durchgeführt. Als Konsequenz des *Knockdowns* war in allen Zellen eine kompensatorische Gegenregulation durch starke Expression des Chaperons GRP94 als Antwort auf den verursachten ER-Stress zu beobachten. Interessanterweise hatte CB-5083 auf die Proteinmenge von GRP94 in GRP78-defizienten Zellen keinen zusätzlichen Effekt. Das bedeutet, dass allein der *Knockdown* von GRP78 zu ER-Stress in erheblichem Ausmaß geführt hat, der durch p97-Inhibition in diesem Fall nicht weiter gesteigert werden konnte. Ebenso hatte CB-5083 keinen Effekt auf GRP94 in den GRP78-kompetenten Zellen. XBP1(s) wurde in den Kontrollansätzen der *Knockdown*-Gruppe sehr deutlich nachgewiesen, CB-5083-Inkubation konnte keine weitere Steigerung bewirken. Obwohl IRE1 α kaum in phosphorylierter Form vorlag, wurde die gespleißte und biologisch aktive Form von XBP1, XBP1(s), sehr deutlich nachgewiesen. Aktiviertes, also phosphoryliertes IRE1 α (Ser724), ist mittels Endoribonukleasefunktion verantwortlich für das Spleißen von XBP1 (92, 293). Möglicherweise reichte in diesem Fall auch eine geringe Menge P-IRE1 α aus, um XBP1 in hohem Maß zu spleißen und zu aktivieren. Bislang ist in Zusammenhang mit ER-Stress Signaling kein anderer Effektor des XBP1-Spleißens bekannt als P-IRE1 α . Der starke Nachweis von XBP1(s) bereits in der DMSO-Kontrolle zeigte, dass allein der GRP78-*Knockdown* wieder zu starkem ER-Stress führte, CB-5083 konnte auch hier zu keiner besonderen Steigerung führen.

Anhand des *Knockdowns* von GRP78 mittels siRNA wurde der Effekt eines (stark) reduzierten GRP78-Levels auf das ER-Stress Panel sichtbar gemacht. Bei gleicher Wirkweise von AR-12, also der Reduktion von GRP78, wäre ein ähnliches ER-Stress Signaling zumindest erwartbar gewesen. Zu berücksichtigen dabei ist, dass der siRNA-vermittelte GRP78-*Knockdown* eine ausgesprochen deutliche GRP78-Reduktion bewirkte. Die Signale von PERK, LC3, ATF6 und eingeschränkt auch ATF4 zeigten hier Ähnlichkeiten zwischen siRNA-*Knockdown* und AR-12-Inkubation. Ganz im Unterschied zu AR-12 führte der siRNA-vermittelte *Knockdown* allerdings zu einer tatsächlichen GRP78 Reduktion.

Es muss an dieser Stelle kritisch angemerkt werden, dass die Anzahl der GRP78-*Knockdowns* pro Zelllinie bei $n=1$ lag. Damit bestand eine Diskrepanz zu der geforderten Zahl von $n=3$ voneinander unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen. Die Resultate der co-siRNA-Ansätze waren mit diesen Ergebnissen deckungsgleich. Darüber hinaus waren auch die Ergebnisse zwischen den verschiedenen Zelllinien, sowohl in den zeit- und konzentrationsabhängigen CB-5083-Inkubationsversuchen, als auch zwischen den *Knockdown*-Ergebnissen des ER-Stress Signalings der vier Zelllinien ähnlich.

3. AR-12 und CB-5083 haben keinen synergistischen Effekt auf AMO1 und JJN3-Zellen

Eine synergistische Wirkung von GRP78-Inhibition und p97-Inhibition war zu Beginn des Projektes denkbar. Sowohl p97 als auch GRP78 sind wichtige Bestandteile der zellulären Reaktion auf ER-Stress und grundlegend an der Beseitigung fehl- oder nicht gefalteter Proteine beteiligt. Insbesondere durch die ebenfalls beschriebene HSP90-inhibitorische Wirkung von AR-12 war eine Kombination beider Inhibitoren interessant, da HSP90 sowohl selbst als Chaperon fungieren, als auch in einem Komplex mit p97 vorliegen kann (294). Es wird ein Komplex mit HSF1 (*Heat Shock Factor 1*) und HDAC6 gebildet. HSF1 wird nach Akkumulation fehl- oder nicht gefalteter Proteine freigesetzt und ist an der Syntheseinduktion von Proteinen der HSP-Familie beteiligt, was das Überleben maligner Zellen fördert (294, 295). Außerdem sind sowohl GRP78 als Marker für auszuschleusende Proteine als auch p97 als Effektor des Ausschleusens aus dem ER ganz wesentlich an der ERAD beteiligt (296). Eine kompensatorische Aktivierung der UPR nach Blockade der ERAD durch p97-Inhibition wäre

ebenfalls denkbar, insbesondere, da die GRP78-Expression nach p97-Inhibition deutlich gesteigert vorlag (Abbildung 15 - Abbildung 18). Die Wirksamkeit einer zusätzlichen Störung der UPR durch Inhibition von GRP78 als Master Regulator der UPR als erfolgsversprechender Ansatz lag daher nahe. Die Kombination der beiden Inhibitoren in MM-Zelllinien wurde nach aktuellem Kenntnisstand des Autors in dieser Forschungsarbeit erstmalig untersucht.

Bereits in den Untersuchungen des Zellmetabolismus konnte kein synergistischer Effekt durch die gleichzeitige Inkubation mit beiden Inhibitoren im Vergleich zu Einzelinkubationsansätzen nachgewiesen werden. Lediglich die JN3-Zelllinie reagierte mit einer etwas stärkeren Absenkung des Metabolismus im Kombinationsansatz im Vergleich mit den Einzelansätzen, ansonsten konnte kein Synergismus beider Inhibitoren festgestellt werden. Diese Ergebnisse wurden durch die FACS Analysen bestätigt, die Viabilität wurde nur für die JN3-Zelllinie in Kombination geringgradig stärker reduziert. Aber auch bei der JN3-Zelllinie konnte durch eine kombinierte Zugabe beider Inhibitoren die Viabilität der Zellen nicht um einen Betrag reduziert werden, der die Summe der Viabilitätsreduktionen bei singulärer Gabe eines Inhibitors überstieg. Diese negativen Ergebnisse in Verbindung mit den ungünstigen Western Blot Ergebnissen einer AR-12 Einzelinkubation führten dazu, dass eine Analyse der ER-Stress Signalwege mittels Western Blot für die Inhibitorenkombination nicht durchgeführt wurde. Daneben spielte auch das schwache ER-Stress Signaling durch AR-12 und insbesondere der nicht feststellbare Effekt auf GRP78 eine Rolle bei der Entscheidung. Die fehlende kombinatorische Wirkung auf die MM-Zelllinien könnte mit der Wirkweise von AR-12 zusammenhängen. Wie bereits beschrieben, konnte mittels Western Blotting keine inhibitorische Wirkung von 3 μ M AR-12 auf GRP78 und GRP94 nachgewiesen werden. Eine Inhibition beider Chaperone war allerdings als Bestandteil einer synergistischen Wirkung bei simultaner p97-Inhibition zu sehen. Die Ergebnisse der hier untersuchten Kombination von AR-12 und CB-5083 im Zellkulturmodell können als negativer prädiktiver Faktor für weitere Untersuchungen dieser Inhibitorkombination anhand von Primärmaterial oder im Tiermodell gewertet werden. Dies betrifft spezifisch die Kombination von CB-5083 und AR-12 als Inhibitoren, nicht aber die Kombination beider Wirkmechanismen an sich. Wohl wäre die kombinierte Inhibition von GRP78 (sowie GRP94) und p97 weiterhin ein interessanter Ansatzpunkt und möglicherweise Inhalt nachfolgender

Forschungsarbeiten. CB-5083 scheint ein geeigneter p97-Inhibitor für diese zukünftigen Versuche. Die starke kompensatorische Gegenregulation von GRP94 nach *Knockdown* von GRP78 lässt zudem vermuten, dass ein pan-HSP-Inhibitor erfolgversprechendere Ergebnisse hervorrufen könnte (188). Die Ergebnisse von Gugliotta *et al.* könnten diese Theorie allerdings in Frage stellen. Ein *Knockdown* von GRP78 in Kombination mit CB-5083 in murinen B-Zellen führte hier nicht zu einer zusätzlichen Viabilitätsreduktion in den GRP78-defizienten Zellen (123).

4. AR-12 und CB-5083 haben einen synergistischen Effekt auf Primärmaterial

Im Gegensatz zu den Zelllinien basierten Ergebnissen hatte eine kombinierte Anwendung von AR-12 und CB-5083 auf zehn Primärmaterial-Proben einen synergistischen Effekt (siehe Abbildung 23). Die CB-5083-Konzentration von 300 nM war mit einer durchschnittlichen Senkung der Viabilität um 21 % vergleichbar wirksam wie bei den JJN3-Zellen. AR-12 in 3 μ M Konzentration senkte die Viabilität durchschnittlich auf 78 %, was etwa 20 % geringer war als in den MM-Zelllinien. Trotzdem führte die kombinierte Anwendung zu einer Viabilitätsreduktion auf 22 %. Dies entsprach einem synergistischen Effekt, da der Effekt der kombinierten Inkubation stärker als additiv wirkte.

Unterschiedliche Effekte einer kombinierten Anwendung könnten mit einem unterschiedlichen genetischen Hintergrund von MM-Zelllinien auf der einen und MM-Primärmaterial auf der anderen Seite zusammenhängen. Der klinische Hintergrund der Primärmaterialproben war nicht bekannt. Damit war auch nicht bekannt, ob es sich beispielsweise um Patienten vor oder nach Erst-, Zweit- oder Drittlinientherapie handelte. Durch *genetic hits* kann eine große genetische Heterogenität zwischen klinischen MM-Erkrankungen untereinander und zu MM-Zelllinien entstehen.

Die fehlende GRP78-inhibitorische Wirkung von AR-12 wurde sowohl in MM-Zelllinien als auch in Primärmaterial festgestellt. Dies ist insofern von Bedeutung, als dass es auch in den Primärmaterialproben zeigt, dass GRP78 bei einer Konzentration von 3 μ M wahrscheinlich nicht das hauptsächliche pharmakologische Ziel ist.

5. CB-5083 induziert starkes ER-Stress Signaling im Vergleich mit Carfilzomib und Panobinostat

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass CB-5083 die UPR in MM-Zelllinien stärker aktiviert als der Proteasom-Inhibitor Carfilzomib und der HDAC-Inhibitor Panobinostat. Besonders der IRE1 α -Signalweg wurde durch Carfilzomib und Panobinostat kaum aktiviert. Dabei ist zu berücksichtigen, dass Zellen, die Resistenzen gegen Proteasom-Inhibitoren entwickelt haben, in diesem Fall AMO1R65CAR und AMO1R180IXA, einen reduziert aktivierten IRE1 α -Signalweg aufweisen (297, 298). Eine JNK-Aktivierung ist zwar in der Literatur für Carfilzomib beschrieben, konnte aber in dieser Forschungsarbeit nicht nachvollzogen werden (299). Andererseits wurde ebenfalls eine HSP72-induzierende Wirkung durch Proteasom-Inhibitoren beschrieben, die auch in dieser Arbeit bei drei der vier untersuchten Zelllinien beobachtet wurde (300). HSP72 wird eine SAPK-inaktivierende Funktion zugeschrieben. Die Induktion von Autophagie (Abnahme der Signale von p62 und LC3AB-I) konnte für CB-5083 nachgewiesen werden, während Panobinostat und Carfilzomib hier im Vergleich kaum Autophagie induzierten. Diese Autophagieinduktion wurde in der Literatur für Carfilzomib in MM-Zellen beschrieben, allerdings nach zwei- bis dreitägiger Inkubation (301). Carfilzomib-induzierte Autophagie wurde als ATF4 abhängig beschrieben, eine ATF4 Aktivierung konnte auch hier nachgewiesen werden (302, 303). CB-5083 scheint die UPR in MM-Zelllinien im Vergleich zu Carfilzomib und Panobinostat stärker zu aktivieren, insbesondere die Induktion von Autophagie scheint deutlich verstärkt.

Zu berücksichtigen ist, dass Autophagie ein sehr komplexer zellulärer Vorgang ist, der sowohl protektive als auch zellschädigende Folgen haben kann. Die Messung von Autophagie(-induktion) ist komplex und die hier verwendeten Methoden lediglich ein kleiner Teil der zur Verfügung stehenden Untersuchungsvarianten. Weitere Forschungsarbeit ist daher nötig, um die hier gewonnenen Ergebnisse zu bestätigen, insbesondere unter Verwendung unterschiedlicher Methodik.

6. AR-12, VER155008 und PAT-SM6 führen nicht zu starkem deutlichem ER-Stress Signaling

Die Ergebnisse der AR-12 Inkubation waren mit den Einzelansätzen aus Abbildung 10 vergleichbar.

Der HSP70- und HSC70-Inhibitor VER155008 soll auch an das ER-ständige GRP78 binden, da die Chaperone Teil der HSP70-Familie sind (252). Die GRP78-inhibitorische Wirkung konnte in der AMO1R180IXA-Zelllinie geringgradig nachgewiesen werden, sonst ergaben sich für GRP78 und GRP94 keine Unterschiede. Offensichtlich war der Zeitpunkt der PERK Messung nicht optimal, da eIF2 α und ATF4 in allen Zelllinien aktiviert vorlagen. Somit lässt sich für VER155008 konstatieren, dass eine Aktivierung des PERK-Signalweges höchstwahrscheinlich stattfand. In Schilddrüsen-Karzinomzellen erhielten Kim *et al.* nach 72-stündiger Inkubation einen Anstieg der GRP78 mRNA. Die ebenfalls beschriebene GRP78-augmentierende sowie GRP94-diminuierende Wirkung von VER155008 konnte nicht nachvollzogen werden (187). Der IRE1 α Signalweg wurde durch VER155008 bei den JJN3-Zelllinien aktiviert, was durch verstärkte P-IRE1- und XBP1(s)-Banden ersichtlich war. Diese Aktivierung von IRE1 α und XBP1(s) durch VER155008 wurden bereits in humanen Monozyten demonstriert (304). Die AMO1-Zelllinien wurden hingegen nicht beeinflusst.

Der monoklonale Antikörper PAT-SM6 führte bei drei der vier Zelllinien zu leichten Rückgängen im GRP78 Signal. Der Antikörper bindet, wie bereits beschrieben an sGRP78, wird internalisiert und vermittelt über gestörte Lipidhomöostase (Akkumulation von Triglyceriden und Cholesterol) Apoptose (256, 305). Insgesamt lieferte PAT-SM6 kaum Hinweise auf ER-Stress und dadurch auf eine aktivierte UPR. Eingeschränkt wird dieses Ergebnis durch die Methodik des Western Blottings an sich, da in diesem Fall nur zu einem Zeitpunkt für PAT-SM6 Daten erhoben wurden. Außerdem beeinflusste möglicherweise das Alter des Antikörpers die gewonnenen Ergebnisse. Grundsätzlich sollten die hier verwendeten Zelllinien zur Untersuchung des Antikörpers geeignet sein, da die hier verwendeten Zelllinien klinisch fortgeschrittene MM-Erkrankungen repräsentieren, mit entsprechender sGRP78-Präsenz (254). Es ist allerdings auch denkbar, dass bei Arbeit mit anderen MM-Zelllinien, wie beispielsweise MM1.S oder INA6, positive Ergebnisse produziert wurden wären. Hier liegt die spezielle Herausforderung der

hohen genetischen Vielfalt einzelner MM-Zelllinien und insbesondere auch der klinischen Verläufe. Eine immer weiter auf die Bedürfnisse des einzelnen Patienten und patientenspezifische Mutationen ist für die Zukunft denkbar. Keiner der drei Inhibitoren bewirkte in den Western Blots ein klares ER-Stress Signal.

Bei dieser Doktorarbeit handelt es sich um Zellkultur- und Primärmaterial basierte Grundlagenforschung. Anhand von MM-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass das GRP78-inhibitorische Potenzial von AR-12 gering ist und zellprotektiv scheint, CB-5083 bereits in nM Konzentrationen starken und fatalen proteotoxischen Stress auslöst und dass eine Kombination beider Wirkstoffe die Apoptose der Zellen nicht verstärkt induziert. Insgesamt ist jedoch zu berücksichtigen, dass die komplexen Zusammenhänge und multiplen Faktoren von Myelomerkrankungen im Körper kaum mit den isolierten Bedingungen von Myelomzelllinien im Labor zu vergleichen sind (306). Daher bedarf es weiterer Forschung, um die hier erlangten Ergebnisse zu bestätigen und klinisch nutzen zu können.

7. Ausblick

In den letzten zwanzig Jahren wurden enorme Fortschritte in der Therapie des Multiplen Myeloms gemacht, die mit einer deutlichen Verlängerung der durchschnittlichen Lebenserwartung der Patienten einhergingen. Aufgrund der Tumorbilogie, besonders im Hinblick auf die hohe genetische Heterogenität der Zellklone, ist eine kurative Therapie des Multiplen Myeloms weiterhin nicht in Sicht. Umso wichtiger ist die Entwicklung neuer Therapieansätze, um die Situation der Patienten weiter zu verbessern. Die Suche nach möglichen synergistischen Effekten vorhandener Wirkstoffe und die Entwicklung neuer Therapieansätze haben daher einen hohen Stellenwert.

Der 2004 bekannt gewordene und als GRP78-Inhibitor beschriebene Wirkstoff AR-12 wurde in den letzten Jahren besonders im Bereich viraler Erkrankungen weiter untersucht (307-309). In der onkologischen Forschung fand AR-12 seit 2018 kaum Beachtung, wobei der Wirkstoff auch hier nicht als GRP78-Inhibitor beschrieben wurde, sondern als PDK-1-Inhibitor (310). Da GRP78 als Master Regulator der UPR aufgrund der hohen Proteinsyntheserate der Zellen, verbunden mit entstehendem ER-Stress Signaling, ein therapeutisch attraktives Ziel darstellt, wäre weitere Forschung und die Suche nach einem wirksamen Inhibitor wünschenswert.

Da sich im Verlauf der MM-Therapie durch Selektion früher oder später erworbene Resistenzen gegen Wirkmechanismen ausbilden, werden dringend neue Strategien zur Überwindung oder zumindest Kompensation dieser Problematik benötigt. Die Inhibition von p97 ist ein bislang klinisch noch nicht verwendeter Wirkmechanismus und deshalb besonders in diesen Fällen ein möglicherweise sehr wertvolles Mittel der Wahl. CB-5083 wurde, wie bereits erwähnt, 2014 in einer klinischen Phase-I-Studie verwendet. Die Studie wurde 2017 aufgrund unerwarteter Nebenwirkungen (Visuseinschränkungen) beendet (311, 312). Falls eine Weiterentwicklung des Wirkstoffes Erfolg hat, könnte die p97-Inhibition zukünftig ein neuer Bestandteil der Therapie des Multiplen Myeloms werden. Möglich könnten auch angepasste, niedrigere Dosierungen des Wirkstoffes sein, um die unerwünschten Nebenwirkungen zu reduzieren oder zu eliminieren. Auch die therapeutische Anwendung für andere Indikationen ist für CB-5083 denkbar.

Teile der Ergebnisse dieser Forschungsarbeit wurden im Rahmen der Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie im Jahr 2019 in Berlin von Frau Dr. Brännert in Form eines Posters präsentiert (313).

VIII. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss zweier pharmakologischer Inhibitoren (AR-12 und CB-5083) auf verschiedene Zelllinien sowie Primärmaterial des Multiplen Myeloms untersucht.

Durch Messungen des Zellmetabolismus mit Hilfe von Alamar-Blau Versuchen wurde die antiproliferative Wirkung der beiden Inhibitoren festgestellt. Anschließend wurden in durchflusszytometrischen Versuchen die Effekte beider Inhibitoren auf den Zellzyklus untersucht. AR-12 induzierte einen S-Phasen Arrest, wohingegen CB-5083 einen G1-Phasen Arrest bewirkte. Die apoptotische Wirkung beider Inhibitoren wurde ebenfalls durchflusszytometrisch festgestellt. CB-5083 erwies sich bereits bei mittleren nanomolaren Konzentrationen nach 72 Stunden als potenter Apoptose-Induktor, während AR-12 dies erst bei einstellig mikromolaren Konzentrationen bewirkte.

In molekularbiologischen Untersuchungen mit Hilfe von Western Blotting wurde der Einfluss beider Inhibitoren auf die UPR der Myelomzelllinien betrachtet. AR-12 bewirkte keine deutliche Induktion der UPR. Insbesondere eine GPR78-Inhibition, die AR-12 in der Literatur bei anderen Entitäten zugeschrieben wurde, konnte nicht bestätigt werden. Dies stellt protektiven ER-Stress dar. CB-5083 aktivierte alle drei Hauptsignalwege der UPR stark. Bereits nach kurzer Inkubationszeit und bei dreistellig nanomolaren Konzentrationen erfolgte eine deutliche Aktivierung der UPR, was im Gegensatz zu AR-12 fatalen proteotoxischen Stress darstellt. Beide Inhibitoren induzierten Autophagie, die p97-Inhibition durch CB-5083 bewirkte dies im Vergleich sehr viel deutlicher.

Außerdem wurde siRNA vermittelt ein *Knockdown* von GRP78 vorgenommen und die Wirkung von CB-5083 auf das ER-Stress Panel untersucht. Der *Knockdown* alleine verursachte ebenfalls protektiven ER-Stress, CB-5083 konnte hier keine wesentliche Steigerung bewirken.

Die kombinierte Wirkung beider Inhibitoren wurde in durchflusszytometrischen Messungen untersucht. Es wurde festgestellt, dass durch eine Kombination von CB-5083 und AR-12 kein synergistischer Effekt auf die untersuchten Zelllinien erzeugt werden konnte. Als potenzielle Ursache konnte die mittels Western Blot nicht nachzuweisende Inhibition von GRP78 durch AR-12 ausgemacht werden. Im

Gegensatz dazu führte diese Kombination nach Inkubation von Primärmaterial zu einem synergistischen Effekt.

AR-12 hat sich in dieser Forschungsarbeit nicht als potenter GRP78-Inhibitor erwiesen. Sowohl die Auswirkungen auf das ER-Stress Signaling als auch das apoptotische Potenzial einer GRP78-Inhibition im MM erschienen gering. Es ist darüber hinaus naheliegend, dass eine pan-HSP70-Inhibition kombiniert mit einer pan-HSP90-Inhibition deutlich mehr Potenzial für eine klinische Erprobung mit sich bringt. CB-5083 dagegen induzierte durch p97-Inhibition effizient Autophagie, Apoptose und fatales ER-Stress Signaling. Dieser Wirkmechanismus erscheint durch die Ergebnisse der *in vitro* Versuche als vielversprechend für weitere Untersuchungen.

IX. SUMMARY

The present study examined the effects of two pharmacological inhibitors (AR-12 and CB-5083) on four different multiple myeloma cell lines and on primary myeloma cells.

First, both inhibitors showed antiproliferative effects against myeloma cell lines, which was discovered measuring cell metabolism using alamar blue assays. Then, flow cytometry was used to examine effects of both inhibitors on the cell cycle of myeloma cell lines. AR-12 induced a G1-phase arrest. Apoptotic effects were then visualized by flow cytometry. CB-5083 proved to be a potent inducer of apoptosis at medium nM concentrations after 72 h of incubation while AR-12 induced apoptosis in the lower μM range of concentration. There was no cross resistance discovered for proteasome inhibitor resistant cell lines against any of the inhibitors.

Furthermore, the effects of both inhibitors with their respective mechanisms of action regarding the UPR were examined by using Western Blots. AR-12 was not able to induce the UPR in a pronounced way. Especially the inhibition of GRP78 – which was the supposed mechanism of action – could not be verified using multiple myeloma cell lines. This stands for protective ER stress. CB-5083 activated all three signal branches of the UPR in a dose- and time-dependent manner and resulted in fatal proteotoxic ER stress. Concentrations in the medium nM range induced UPR clearly, while best results were received using 1 μM of CB-5083. Both inhibitors induced autophagy, although CB-5083 was a more potent and lucid inducer. CB-5083 proved to be a potent inducer of apoptosis at medium nM concentrations after 72 h incubation while AR-12 induced apoptosis in the lower μM range of concentration.

To study the effects regarding ER stress, GRP78 was knocked down by using specific siRNA and then adding CB-5083. Knocking down GRP78 alone induced ER stress signaling. CB-5083 incubation did not increase ER stress signaling clearly.

Again, flow cytometry was used, this time to examine combined incubation of AR-12 and CB-5083. There were no synergistic effects on myeloma cell lines for this drug combination. The lack of GRP78-inhibitoric potential of AR-12 in

myeloma cell lines and in primary material, which was discovered earlier using Western Blots, could be the potential cause in this case.

In the present study, AR-12 could not be verified as a potent GRP78 inhibitor. The effects on ER stress signaling as well as the apoptotic potential of GRP78 inhibition in multiple myeloma cells seemed to be low. It sounds likely that a pan-HSP70 and pan-HSP90 inhibition could be more promising in clinical trials. Through p97 inhibition, CB-5083 induced autophagy, apoptosis and fatal ER stress signaling efficiently. Based on the *in vitro* experiments, this mechanism of action seems to be promising for further studies.

X. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Übersicht der UPR.....	15
Abbildung 2: Schematische Abbildung von FSC und SSC (vereinfacht)	42
Abbildung 3: Visualisierung der angewandten <i>Gating</i> -Strategie	44
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Versuchsansatzes in einer 96 Well- Zellkulturplatte.....	45
Abbildung 5: Beispielbild eines Alamar-Blau Versuches auf einer 96-Well Zellkulturplatte.....	54
Abbildung 6: Expression von GRP78 und GRP94 in verschiedenen Primärmaterialproben und PBMC von gesunden Spendern	57
Abbildung 7: Effekt von GRP78-Inhibition und PDK-1-Inhibition auf den Metabolismus von JJN3 und AMO1-Zelllinien.....	58
Abbildung 8: Effekt von 24-stündiger GRP78-Inhibition durch AR-12 auf den Zellzyklus von JJN3 und AMO1-Zelllinien.....	60
Abbildung 9: Effekt von GRP78-Inhibition und PDK-1-Inhibition auf die Viabilität von JJN3 und AMO1-Zelllinien	62
Abbildung 10: Auswirkung von GRP78-Inhibition auf die UPR von Myelomzelllinien	64
Abbildung 11: Auswirkung von AR-12 auf die UPR von Primärmaterial zweier MM-Patienten	65
Abbildung 12: Konzentrationsabhängige Auswirkungen von p97-Inhibition durch CB-5083 auf den Zellmetabolismus.....	67
Abbildung 13: Effekt von p97-Inhibition durch CB-5083 auf den Zellzyklus.....	68
Abbildung 14: Effekt von p97-Inhibition durch CB-5083 auf die Viabilität	70
Abbildung 15: Zeitabhängige Effekte von p97-Inhibition durch CB-5083 auf die UPR in JJN3-Zellen	72
Abbildung 16: Zeitabhängige Effekte von p97-Inhibition durch CB-5083 auf die UPR in AMO1-Zellen	74
Abbildung 17: Zeitabhängige Effekte von p97-Inhibition durch CB-5083 auf die UPR in AMO1R65CAR-Zellen	76
Abbildung 18: Zeitabhängige Effekte von p97-Inhibition durch CB-5083 auf die UPR in AMO1R180IXA-Zellen	78

Abbildung 19: Zeitabhängige Effekte von CB-5083 auf die Proteinmenge des verwendeten ER-Stress Signaling Panels bei GRP78 ⁻ und GRP78 ⁺ JN3 und AMO1-Zellen	82
Abbildung 20: Zeitabhängige Effekte von CB-5083 auf die Proteinmenge des verwendeten ER-Stress Signaling Panels bei GRP78 ⁻ und GRP78 ⁺ AMO1R65CAR und AMO1R180IXA- Zellen	84
Abbildung 21: Effekte von AR-12 und CB-5083 bei einzelner und kombinierter Anwendung auf den Metabolismus der untersuchten Zelllinien...	86
Abbildung 22: Effekte von AR-12 und CB-5083 in einzelner und kombinierter Anwendung auf die Viabilität der verwendeten Zelllinien	88
Abbildung 23: Effekte von AR-12 und CB-5083 in einzelner und kombinierter Anwendung auf primäre MM-Zellen	89
Abbildung 24: Effekte von AR-12, VER155008 und PAT-SM6 auf die Proteinmenge des verwendeten ER-Stress Signaling Panels	91
Abbildung 25: Effekte von CB-5083, Carfilzomib und Panobinostat auf das ER-Stress Signaling Panel	94

XI. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Darstellung der diagnostischen Möglichkeiten	6
Tabelle 2: Darstellung der CRAB-Kriterien	6
Tabelle 3: Durchflusszytometrie Chemikalien	31
Tabelle 4: Durchflusszytometrie Lösungen	31
Tabelle 5: Durchflusszytometrie Gerätschaft	31
Tabelle 6: Elektroporation Gerätschaften und siRNA	31
Tabelle 7: Zellkultur Chemikalien	32
Tabelle 8: Zellkultur Gerätschaften und Materialien	32
Tabelle 9: Zelllyse und Proteinbestimmung Chemikalien	33
Tabelle 10: Zelllyse und Proteinbestimmung Puffer	33
Tabelle 11: Zelllyse und Proteinbestimmung Gerätschaften	34
Tabelle 12: SDS-PAGE, Western Blot, Entwicklung Chemikalien	34
Tabelle 13: SDS-PAGE, Western Blot Puffer	35
Tabelle 14: SDS-PAGE, Western Blot, Entwicklung Lösungen	36
Tabelle 15: SDS-PAGE Polyacrylamidgele	36
Tabelle 16: SDS-PAGE, Western Blot, Entwicklung Gerätschaften	36
Tabelle 17: Western Blot, Entwicklung Primärantikörper	37
Tabelle 18: Western Blot, Entwicklung Sekundärantikörper	38
Tabelle 19: Zellzyklusmessungen Chemikalien	38
Tabelle 20: Alamar-Blau Chemikalien	38
Tabelle 21: Pharmakologische Inhibitoren	38
Tabelle 22: Software	39
Tabelle 23: Verteilung der Zellzyklus-Phasen nach 24-stündiger Inkubation mit AR-12	60
Tabelle 24: Tabellarische Analyse von Daten aus Abbildung 14	67
Tabelle 25: Einfluss von CB-5083 auf die Verteilung der Zellzyklusphasen	69
Tabelle 26: Restviabilitäten der untersuchten Zelllinien nach einzelner und kombinierter Inkubation mit AR-12 und CB-5083	88

XII. LITERATURVERZEICHNIS

1. WHO. Cancer 2018 [Available from: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/cancer>].
2. Elidrissi Errahhali M, Elidrissi Errahhali M, Boulouiz R, Ouarzane M, Bellaoui M. Distribution and features of hematological malignancies in Eastern Morocco: a retrospective multicenter study over 5 years. *BMC Cancer*. 2016;16:159.
3. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-90.
4. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-405.
5. Kazandjian D. Multiple myeloma epidemiology and survival: A unique malignancy. *Semin Oncol*. 2016;43(6):676-81.
6. Kumar SK, Rajkumar SV, Dispenzieri A, Lacy MQ, Hayman SR, Buadi FK, et al. Improved survival in multiple myeloma and the impact of novel therapies. *Blood*. 2008;111(5):2516-20.
7. Waszczuk-Gajda A, Feliksbrodt-Bratosiewicz M, Krol M, Snarski E, Drozd-Sokolowska J, Biecek P, et al. Influence of Clonal Plasma Cell Contamination of Peripheral Blood Stem Cell Autografts on Progression and Survival in Multiple Myeloma Patients After Autologous Peripheral Blood Stem Cell Transplantation in Long-term Observation. *Transplant Proc*. 2018;50(7):2202-11.
8. Nikesitch N, Lee JM, Ling S, Roberts TL. Endoplasmic reticulum stress in the development of multiple myeloma and drug resistance. *Clinical & translational immunology*. 2018;7(1):e1007.
9. Auner HW, Moody AM, Ward TH, Kraus M, Milan E, May P, et al. Combined inhibition of p97 and the proteasome causes lethal disruption of the secretory apparatus in multiple myeloma cells. *PLoS One*. 2013;8(9):e74415.
10. Gerecke C, Fuhrmann S, Striffler S, Schmidt-Hieber M, Einsele H, Knop S. The Diagnosis and Treatment of Multiple Myeloma. *Dtsch Arztebl Int*. 2016;113(27-28):470-6.
11. Solly S. Remarks on the pathology of mollities ossium; with cases. *Med Chir Trans*. 1844;27:435-98.8.

12. Jones HB. On a New Substance Occurring in the Urine of a Patient with Mollities Ossium. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 1848;138:55-62.
13. v. Rustizky J. Multiples Myelom. *Deutsche Zeitschrift für Chirurgie*. 1873;3(1):162-72.
14. Korngold L, Lipari R. Multiple-myeloma proteins. III. The antigenic relationship of Bence Jones proteins to normal gammaglobulin and multiple-myeloma serum proteins. *Cancer*. 1956;9(2):262-72.
15. Edelman GM, Gally JA. The nature of Bence-Jones proteins. Chemical similarities to polypeptide chains of myeloma globulins and normal gammaglobulins. *J Exp Med*. 1962;116:207-27.
16. Alexanian R, Haut A, Khan AU, Lane M, McKelvey EM, Migliore PJ, et al. Treatment for multiple myeloma. Combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *JAMA*. 1969;208(9):1680-5.
17. McElwain TJ, Powles RL. High-dose intravenous melphalan for plasma-cell leukaemia and myeloma. *Lancet*. 1983;2(8354):822-4.
18. Barlogie B, Alexanian R, Dicke KA, Zagars G, Spitzer G, Jagannath S, et al. High-dose chemoradiotherapy and autologous bone marrow transplantation for resistant multiple myeloma. *Blood*. 1987;70(3):869-72.
19. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *Blood*. 2008;111(6):2962-72.
20. Robert-Koch-Institut. Krebs in Deutschland 2019 [Available from: https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2019/krebs_in_deutschland_2019.pdf;jsessionid=6433A90D7AD77B312BF57A3AABE831E7.2_cid298?__blob=publicationFile].
21. Onkologie DGfHuM. Stellungnahme zur Nutzenbewertung des G-BA von Arzneimitteln gemäß § 35a SGB V - Daratumumab 2019 [Available from: <https://www.dgho.de/publikationen/stellungnahmen/fruehe-nutzenbewertung/daratumumab/daratumumab-dgho-dsmm-gmmg-stellungnahme-20190123.pdf>].
22. Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, Gertz MA, Buadi FK, Pandey S, et al. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia*. 2014;28(5):1122-8.
23. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2012;62(1):10-29.

24. Kehrer M, Koob S, Strauss A, Wirtz DC, Schmolders J. [Multiple Myeloma - Current Status in Diagnostic Testing and Therapy]. *Z Orthop Unfall*. 2017;155(5):575-86.
25. Dhodapkar MV. MGUS to myeloma: a mysterious gammopathy of underexplored significance. *Blood*. 2016;128(23):2599-606.
26. Zingone A, Kuehl WM. Pathogenesis of monoclonal gammopathy of undetermined significance and progression to multiple myeloma. *Semin Hematol*. 2011;48(1):4-12.
27. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF, et al. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med*. 2002;346(8):564-9.
28. Prideaux SM, Conway O'Brien E, Chevassut TJ. The genetic architecture of multiple myeloma. *Adv Hematol*. 2014;2014:864058.
29. Korde N, Kristinsson SY, Landgren O. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) and smoldering multiple myeloma (SMM): novel biological insights and development of early treatment strategies. *Blood*. 2011;117(21):5573-81.
30. Rajkumar SV. Updated Diagnostic Criteria and Staging System for Multiple Myeloma. American Society of Clinical Oncology educational book American Society of Clinical Oncology Annual Meeting. 2016;35:e418-23.
31. Kyle RA, Maldonado JE, Bayrd ED. Plasma cell leukemia. Report on 17 cases. *Arch Intern Med*. 1974;133(5):813-8.
32. Gundesen MT, Lund T, Moeller HEH, Abildgaard N. Plasma Cell Leukemia: Definition, Presentation, and Treatment. *Curr Oncol Rep*. 2019;21(1):8.
33. Chim CS, Kumar SK, Orlowski RZ, Cook G, Richardson PG, Gertz MA, et al. Management of relapsed and refractory multiple myeloma: novel agents, antibodies, immunotherapies and beyond. *Leukemia*. 2018;32(2):252-62.
34. Kyle RA, Gertz MA, Witzig TE, Lust JA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Mayo Clin Proc*. 2003;78(1):21-33.
35. Beguin Y, Yerna M, Loo M, Weber M, Fillet G. Erythropoiesis in multiple myeloma: defective red cell production due to inappropriate erythropoietin production. *Br J Haematol*. 1992;82(4):648-53.
36. Heher EC, Rennke HG, Laubach JP, Richardson PG. Kidney disease and multiple myeloma. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2013;8(11):2007-17.

37. Graziani M, Merlini G, Petrini C. Guidelines for the analysis of Bence Jones protein. *Clin Chem Lab Med.* 2003;41(3):338-46.
38. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 2014;15(12):e538-48.
39. Gerecke C, Fuhrmann S, Striffler S, Schmidt-Hieber M, Einsele H, Knop S. The Diagnosis and Treatment of Multiple Myeloma. *Dtsch Arztebl Int.* 2016;113(27-28):470-6.
40. Rajkumar SV, Larson D, Kyle RA. Diagnosis of smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2011;365(5):474-5.
41. Rajkumar SV, Kumar S. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2016;91(1):101-19.
42. Einsele H. Algorithmus zur Primärtherapie beim multiplen Myelom. *Der Onkologe.* 2018;24(8):578-83.
43. Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, et al. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Francais du Myelome. *N Engl J Med.* 1996;335(2):91-7.
44. Al Hamed R, Bazarbachi AH, Malard F, Harousseau JL, Mohty M. Current status of autologous stem cell transplantation for multiple myeloma. *Blood Cancer J.* 2019;9(4):44.
45. Cavo M, Petrucci M, Di Raimondo F, Zamagni E, Gamberi B, Crippa C, et al. Upfront Single Versus Double Autologous Stem Cell Transplantation for Newly Diagnosed Multiple Myeloma: An Intergroup, Multicenter, Phase III Study of the European Myeloma Network (EMN02/HO95 MM Trial). *Blood.* 2016;128:991-.
46. Dhakal B, Vesole DH, Hari PN. Allogeneic stem cell transplantation for multiple myeloma: is there a future? *Bone Marrow Transplant.* 2016;51(4):492-500.
47. Facon T. Maintenance therapy for multiple myeloma in the era of novel agents. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2015;2015:279-85.
48. Fernandez R, Chon E. Comparison of two melphalan protocols and evaluation of outcome and prognostic factors in multiple myeloma in dogs. *J Vet Intern Med.* 2018;32(3):1060-9.
49. Muñoz A, Riber C, Satué K, Trigo P, Gomez-Diez M, Castejo FM. Multiple Myeloma in Horses, Dogs and Cats: A Comparative Review Focused on Clinical Signs and Pathogenesis. 2013.

50. Matus RE, Leifer CE, MacEwen EG, Hurvitz AI. Prognostic factors for multiple myeloma in the dog. *J Am Vet Med Assoc.* 1986;188(11):1288-92.
51. Aachen A. Computertomographie: Maligne Wirbeltumore: Anicura Aachen; [Available from: https://www.anicura.de/globalassets/de/aachen/pdfs/anicura_aachen_computertomographie-maligne-wirbeltumore.pdf.
52. Patel RT, Caceres A, French AF, McManus PM. Multiple myeloma in 16 cats: a retrospective study. *Vet Clin Pathol.* 2005;34(4):341-52.
53. Seelig DM, Perry JA, Avery AC, Avery PR. Monoclonal gammopathy without hyperglobulinemia in 2 dogs with IgA secretory neoplasms. *Vet Clin Pathol.* 2010;39(4):447-53.
54. Lee AS. GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res.* 2007;67(8):3496-9.
55. Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(1):79-94.
56. Reddish FN, Miller CL, Gorkhali R, Yang JJ. Calcium Dynamics Mediated by the Endoplasmic/Sarcoplasmic Reticulum and Related Diseases. *Int J Mol Sci.* 2017;18(5).
57. Buchner J. Molecular chaperones and protein quality control: an introduction to the JBC Reviews thematic series. *The Journal of biological chemistry.* 2019;294(6):2074-5.
58. Braakman I, Hebert DN. Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(5):a013201.
59. Argon Y, Simen BB. GRP94, an ER chaperone with protein and peptide binding properties. *Semin Cell Dev Biol.* 1999;10(5):495-505.
60. Pobre KFR, Poet GJ, Hendershot LM. The endoplasmic reticulum (ER) chaperone BiP is a master regulator of ER functions: Getting by with a little help from ERdj friends. *J Biol Chem.* 2019;294(6):2098-108.
61. Vekaria PH, Home T, Weir S, Schoenen FJ, Rao R. Targeting p97 to Disrupt Protein Homeostasis in Cancer. *Front Oncol.* 2016;6(181).
62. Wang M, Kaufman RJ. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human disease. *Nature.* 2016;529:326.
63. Hitomi J, Katayama T, Taniguchi M, Honda A, Imaizumi K, Tohyama M. Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12. *Neurosci Lett.* 2004;357(2):127-30.

64. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature*. 2000;403(6765):98-103.
65. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol*. 2000;2(6):326-32.
66. Nishikawa S, Brodsky JL, Nakatsukasa K. Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *J Biochem*. 2005;137(5):551-5.
67. Qi L, Tsai B, Arvan P. New Insights into the Physiological Role of Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation. *Trends Cell Biol*. 2017;27(6):430-40.
68. Christianson JC, Shaler TA, Tyler RE, Kopito RR. OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nat Cell Biol*. 2008;10(3):272-82.
69. Plemper RK, Bohmler S, Bordallo J, Sommer T, Wolf DH. Mutant analysis links the translocon and BiP to retrograde protein transport for ER degradation. *Nature*. 1997;388(6645):891-5.
70. Oda Y, Hosokawa N, Wada I, Nagata K. EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. *Science*. 2003;299(5611):1394-7.
71. Gardner RG, Swarbrick GM, Bays NW, Cronin SR, Wilhovsky S, Seelig L, et al. Endoplasmic reticulum degradation requires lumen to cytosol signaling. Transmembrane control of Hrd1p by Hrd3p. *J Cell Biol*. 2000;151(1):69-82.
72. Bar-Nun S. The role of p97/Cdc48p in endoplasmic reticulum-associated degradation: from the immune system to yeast. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005;300:95-125.
73. Sowa ME, Bennett EJ, Gygi SP, Harper JW. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell*. 2009;138(2):389-403.
74. Bard JAM, Goodall EA, Greene ER, Jonsson E, Dong KC, Martin A. Structure and Function of the 26S Proteasome. *Annu Rev Biochem*. 2018;87:697-724.
75. Goldberg AL. Functions of the proteasome: from protein degradation and immune surveillance to cancer therapy. *Biochem Soc Trans*. 2007;35(Pt 1):12-7.
76. Hendil KB, Kriegenburg F, Tanaka K, Murata S, Lauridsen AM, Johnsen AH, et al. The 20S proteasome as an assembly platform for the 19S regulatory complex. *J Mol Biol*. 2009;394(2):320-8.

77. Livneh I, Cohen-Kaplan V, Cohen-Rosenzweig C, Avni N, Ciechanover A. The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death. *Cell Res.* 2016;26(8):869-85.
78. Edwards CM, Lwin ST, Fowler JA, Oyajobi BO, Zhuang J, Bates AL, et al. Myeloma cells exhibit an increase in proteasome activity and an enhanced response to proteasome inhibition in the bone marrow microenvironment in vivo. *Am J Hematol.* 2009;84(5):268-72.
79. Garcia-Mata R, Gao YS, Sztul E. Hassles with taking out the garbage: aggravating aggregates. *Traffic (Copenhagen, Denmark).* 2002;3(6):388-96.
80. Haas IG. BiP (GRP78), an essential hsp70 resident protein in the endoplasmic reticulum. *Experientia.* 1994;50(11-12):1012-20.
81. Yang J, Nune M, Zong Y, Zhou L, Liu Q. Close and Allosteric Opening of the Polypeptide-Binding Site in a Human Hsp70 Chaperone BiP. *Structure.* 2015;23(12):2191-203.
82. Blond-Elguindi S, Cwirla SE, Dower WJ, Lipshutz RJ, Sprang SR, Sambrook JF, et al. Affinity panning of a library of peptides displayed on bacteriophages reveals the binding specificity of BiP. *Cell.* 1993;75(4):717-28.
83. Miyata Y, Badolato M, Neamati N. HSPA5. In: Choi S, editor. *Encyclopedia of Signaling Molecules.* Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 2429-51.
84. Gurusinghe KRDSNS, Mishra A, Mishra S. Glucose-regulated protein 78 substrate-binding domain alters its conformation upon EGCG inhibitor binding to nucleotide-binding domain: Molecular dynamics studies. *Sci Rep.* 2018;8(1):5487-.
85. Qi R, Sarbeng EB, Liu Q, Le KQ, Xu X, Xu H, et al. Allosteric opening of the polypeptide-binding site when an Hsp70 binds ATP. *Nat Struct Mol Biol.* 2013;20(7):900-7.
86. Kityk R, Kopp J, Sinning I, Mayer MP. Structure and dynamics of the ATP-bound open conformation of Hsp70 chaperones. *Mol Cell.* 2012;48(6):863-74.
87. Bertelsen EB, Chang L, Gestwicki JE, Zuiderweg ER. Solution conformation of wild-type E. coli Hsp70 (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(21):8471-6.
88. Resendez E, Jr., Wooden SK, Lee AS. Identification of highly conserved regulatory domains and protein-binding sites in the promoters of the rat and human genes encoding the stress-inducible 78-kilodalton glucose-regulated protein. *Mol Cell Biol.* 1988;8(10):4579-84.

89. Alexandre S, Nakaki T, Vanhamme L, Lee AS. A binding site for the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-response element-binding protein as a regulatory element in the grp78 promoter. *Mol Endocrinol.* 1991;5(12):1862-72.
90. Cultrara CN, Kozuch SD, Ramasundaram P, Heller CJ, Shah S, Beck AE, et al. GRP78 modulates cell adhesion markers in prostate Cancer and multiple myeloma cell lines. *BMC Cancer.* 2018;18(1):1263-.
91. Abdel Malek MA, Jagannathan S, Malek E, Sayed DM, Elgammal SA, Abd El-Azeem HG, et al. Molecular chaperone GRP78 enhances aggresome delivery to autophagosomes to promote drug resistance in multiple myeloma. *Oncotarget.* 2015;6(5):3098-110.
92. Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* 2001;107(7):881-91.
93. Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6alpha and 6beta that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol.* 2001;21(4):1239-48.
94. Luo S, Baumeister P, Yang S, Abcouwer SF, Lee AS. Induction of Grp78/BiP by translational block: activation of the Grp78 promoter by ATF4 through and upstream ATF/CRE site independent of the endoplasmic reticulum stress elements. *J Biol Chem.* 2003;278(39):37375-85.
95. Munro S, Pelham HR. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. *Cell.* 1987;48(5):899-907.
96. Shen Y, Meunier L, Hendershot LM. Identification and characterization of a novel endoplasmic reticulum (ER) DnaJ homologue, which stimulates ATPase activity of BiP in vitro and is induced by ER stress. *J Biol Chem.* 2002;277(18):15947-56.
97. Fritz JM, Dong M, Apsley KS, Martin EP, Na CL, Sitaraman S, et al. Deficiency of the BiP cochaperone ERdj4 causes constitutive endoplasmic reticulum stress and metabolic defects. *Mol Biol Cell.* 2014;25(4):431-40.
98. Shen Y, Hendershot LM. ERdj3, a stress-inducible endoplasmic reticulum DnaJ homologue, serves as a cofactor for BiP's interactions with unfolded substrates. *Mol Biol Cell.* 2005;16(1):40-50.
99. Sun FC, Wei S, Li CW, Chang YS, Chao CC, Lai YK. Localization of GRP78 to mitochondria under the unfolded protein response. *Biochem J.* 2006;396(1):31-9.

100. Prasad M, Pawlak KJ, Burak WE, Perry EE, Marshall B, Whittal RM, et al. Mitochondrial metabolic regulation by GRP78. *Sci Adv.* 2017;3(2):e1602038-e.
101. Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J Biol Chem.* 2003;278(23):20915-24.
102. Kang BR, Yang S-H, Chung B-R, Kim W, Kim Y. Cell surface GRP78 as a biomarker and target for suppressing glioma cells. *Sci Rep.* 2016;6:34922.
103. Zhang XX, Li HD, Zhao S, Zhao L, Song HJ, Wang G, et al. The cell surface GRP78 facilitates the invasion of hepatocellular carcinoma cells. *BioMed research international.* 2013;2013:917296.
104. Misra UK, Payne S, Pizzo SV. Ligation of prostate cancer cell surface GRP78 activates a proproliferative and antiapoptotic feedback loop: a role for secreted prostate-specific antigen. *J Biol Chem.* 2011;286(2):1248-59.
105. Wang X, Olberding KE, White C, Li C. Bcl-2 proteins regulate ER membrane permeability to luminal proteins during ER stress-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* 2011;18(1):38-47.
106. Duriez M, Rossignol JM, Sitterlin D. The hepatitis B virus precore protein is retrotransported from endoplasmic reticulum (ER) to cytosol through the ER-associated degradation pathway. *J Biol Chem.* 2008;283(47):32352-60.
107. Lievremont JP, Rizzuto R, Hendershot L, Meldolesi J. BiP, a major chaperone protein of the endoplasmic reticulum lumen, plays a direct and important role in the storage of the rapidly exchanging pool of Ca²⁺. *J Biol Chem.* 1997;272(49):30873-9.
108. Ushioda R, Miyamoto A, Inoue M, Watanabe S, Okumura M, Maegawa KI, et al. Redox-assisted regulation of Ca²⁺ homeostasis in the endoplasmic reticulum by disulfide reductase ERdj5. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(41):E6055-e63.
109. Ni M, Lee AS. ER chaperones in mammalian development and human diseases. *FEBS Lett.* 2007;581(19):3641-51.
110. Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J. The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature.* 1988;332(6163):462-4.
111. Li J, Lee AS. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Curr Mol Med.* 2006;6(1):45-54.

112. Adomako A, Calvo V, Biran N, Osman K, Chari A, Paton JC, et al. Identification of markers that functionally define a quiescent multiple myeloma cell sub-population surviving bortezomib treatment. *BMC Cancer*. 2015;15:444.
113. Prostko CR, Brostrom MA, Malara EM, Brostrom CO. Phosphorylation of eukaryotic initiation factor (eIF) 2 alpha and inhibition of eIF-2B in GH3 pituitary cells by perturbants of early protein processing that induce GRP78. *J Biol Chem*. 1992;267(24):16751-4.
114. Park S, Lim Y, Lee D, Elvira R, Lee J-M, Lee MR, et al. Modulation of Protein Synthesis by eIF2 α Phosphorylation Protects Cell from Heat Stress-Mediated Apoptosis. *Cells*. 2018;7(12):254.
115. Luhr M, Torgersen ML, Szalai P, Hashim A, Brech A, Staerk J, et al. The kinase PERK and the transcription factor ATF4 play distinct and essential roles in autophagy resulting from tunicamycin-induced ER stress. *J Biol Chem*. 2019;294(20):8197-217.
116. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell*. 2000;6(5):1099-108.
117. Nishitoh H, Saitoh M, Mochida Y, Takeda K, Nakano H, Rothe M, et al. ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol Cell*. 1998;2(3):389-95.
118. Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem*. 1998;273(50):33741-9.
119. Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, et al. ATF6 Activated by Proteolysis Binds in the Presence of NF-Y (CBF) Directly to the *cis*-Acting Element Responsible for the Mammalian Unfolded Protein Response. *Mol Cell Biol*. 2000;20(18):6755-67.
120. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 1999;397(6716):271-4.
121. Carrara M, Prischi F, Nowak PR, Ali MM. Crystal structures reveal transient PERK luminal domain tetramerization in endoplasmic reticulum stress signaling. *EMBO J*. 2015;34(11):1589-600.
122. Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell*. 2000;5(5):897-904.

123. Gugliotta G, Sudo M, Cao Q, Lin DC, Sun H, Takao S, et al. Valosin-Containing Protein/p97 as a Novel Therapeutic Target in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Neoplasia* (New York, NY). 2017;19(10):750-61.
124. Fernández IS, Bai XC, Hussain T, Kelley AC, Lorsch JR, Ramakrishnan V, et al. Molecular architecture of a eukaryotic translational initiation complex. *Science*. 2013;342(6160):1240585.
125. Gordiyenko Y, Llacer JL, Ramakrishnan V. Structural basis for the inhibition of translation through eIF2alpha phosphorylation. *Nature communications*. 2019;10(1):2640.
126. Llacer JL, Hussain T, Marler L, Aitken CE, Thakur A, Lorsch JR, et al. Conformational Differences between Open and Closed States of the Eukaryotic Translation Initiation Complex. *Mol Cell*. 2015;59(3):399-412.
127. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calton M, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*. 2003;11(3):619-33.
128. Luo B, Lin Y, Jiang S, Huang L, Yao H, Zhuang Q, et al. Endoplasmic reticulum stress eIF2alpha-ATF4 pathway-mediated cyclooxygenase-2 induction regulates cadmium-induced autophagy in kidney. *Cell Death Dis*. 2016;7(6):e2251.
129. Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ*. 2004;11(4):381-9.
130. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev*. 2004;18(24):3066-77.
131. Ma Y, Hendershot LM. Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem*. 2003;278(37):34864-73.
132. Korennykh AV, Egea PF, Korostelev AA, Finer-Moore J, Zhang C, Shokat KM, et al. The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. *Nature*. 2009;457(7230):687-93.
133. Hollien J, Lin JH, Li H, Stevens N, Walter P, Weissman JS. Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *The Journal of cell biology*. 2009;186(3):323-31.
134. Bertolotti A, Wang X, Novoa I, Jungreis R, Schlessinger K, Cho JH, et al. Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1beta-deficient mice. *J Clin Invest*. 2001;107(5):585-93.

135. Martino MB, Jones L, Brighton B, Ehre C, Abdulah L, Davis CW, et al. The ER stress transducer IRE1beta is required for airway epithelial mucin production. *Mucosal Immunol.* 2013;6(3):639-54.
136. Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M, Ron D. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J.* 1998;17(19):5708-17.
137. Tirasophon W, Welihinda AA, Kaufman RJ. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev.* 1998;12(12):1812-24.
138. Wu H, Ng BSH, Thibault G. Endoplasmic reticulum stress response in yeast and humans. *Biosci Rep.* 2014;34(4):e00118.
139. Chen S, Chen J, Hua X, Sun Y, Cui R, Sha J, et al. The emerging role of XBP1 in cancer. *Biomed Pharmacother.* 2020;127:110069.
140. He Y, Sun S, Sha H, Liu Z, Yang L, Xue Z, et al. Emerging roles for XBP1, a sUPeR transcription factor. *Gene Expr.* 2010;15(1):13-25.
141. Iwakoshi NN, Lee AH, Vallabhajosyula P, Otipoby KL, Rajewsky K, Glimcher LH. Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. *Nat Immunol.* 2003;4(4):321-9.
142. Wang FM, Chen YJ, Ouyang HJ. Regulation of unfolded protein response modulator XBP1s by acetylation and deacetylation. *Biochem J.* 2011;433(1):245-52.
143. Yoshida H, Oku M, Suzuki M, Mori K. pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *The Journal of cell biology.* 2006;172(4):565-75.
144. Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev Cell.* 2003;4(2):265-71.
145. Margariti A, Li H, Chen T, Martin D, Vizcay-Barrena G, Alam S, et al. XBP1 mRNA splicing triggers an autophagic response in endothelial cells through BECLIN-1 transcriptional activation. *J Biol Chem.* 2013;288(2):859-72.
146. Carrasco DR, Sukhdeo K, Protopopova M, Sinha R, Enos M, Carrasco DE, et al. The differentiation and stress response factor XBP-1 drives multiple myeloma pathogenesis. *Cancer Cell.* 2007;11(4):349-60.

147. Sanchez I, Hughes RT, Mayer BJ, Yee K, Woodgett JR, Avruch J, et al. Role of SAPK/ERK kinase-1 in the stress-activated pathway regulating transcription factor c-Jun. *Nature*. 1994;372(6508):794-8.
148. Chen CY, Del Gatto-Konczak F, Wu Z, Karin M. Stabilization of interleukin-2 mRNA by the c-Jun NH2-terminal kinase pathway. *Science*. 1998;280(5371):1945-9.
149. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res*. 2002;12(1):9-18.
150. Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol*. 1999;19(12):8469-78.
151. Zhu X, Zhang J, Sun H, Jiang C, Dong Y, Shan Q, et al. Ubiquitination of inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) by the E3 ligase CHIP mediates the IRE1/TRAF2/JNK pathway. *J Biol Chem*. 2014;289(44):30567-77.
152. Puissant A, Robert G, Fenouille N, Luciano F, Cassuto JP, Raynaud S, et al. Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression and AMPK activation. *Cancer Res*. 2010;70(3):1042-52.
153. Vadlamudi RK, Joung I, Strominger JL, Shin J. p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem*. 1996;271(34):20235-7.
154. Myeku N, Figueiredo-Pereira ME. Dynamics of the degradation of ubiquitinated proteins by proteasomes and autophagy: association with sequestosome 1/p62. *J Biol Chem*. 2011;286(25):22426-40.
155. Seibenhener ML, Babu JR, Geetha T, Wong HC, Krishna NR, Wooten MW. Sequestosome 1/p62 Is a Polyubiquitin Chain Binding Protein Involved in Ubiquitin Proteasome Degradation. *Mol Cell Biol*. 2004;24(18):8055-68.
156. Zhou L, Wang H, Chen D, Gao F, Ying Z, Wang G. p62/sequestosome 1 regulates aggresome formation of pathogenic ataxin-3 with expanded polyglutamine. *Int J Mol Sci*. 2014;15(9):14997-5010.
157. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*. 2007;282(33):24131-45.
158. Bjorkoy G, Lamark T, Pankiv S, Overvatn A, Brech A, Johansen T. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol*. 2009;452:181-97.

159. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*. 1999;402(6762):672-6.
160. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*. 2004;6(4):463-77.
161. Glover K, Li Y, Mukhopadhyay S, Leuthner Z, Chakravarthy S, Colbert CL, et al. Structural transitions in conserved, ordered Beclin 1 domains essential to regulating autophagy. *J Biol Chem*. 2017;292(39):16235-48.
162. Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell*. 2008;19(12):5360-72.
163. Walensky LD. BCL-2 in the crosshairs: tipping the balance of life and death. *Cell Death Differ*. 2006;13(8):1339-50.
164. Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, et al. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J*. 2007;26(10):2527-39.
165. Song X, Zhu S, Chen P, Hou W, Wen Q, Liu J, et al. AMPK-Mediated BECN1 Phosphorylation Promotes Ferroptosis by Directly Blocking System Xc(-) Activity. *Curr Biol*. 2018;28(15):2388-99.e5.
166. Tang D, Kang R, Livesey KM, Cheh CW, Farkas A, Loughran P, et al. Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J Cell Biol*. 2010;190(5):881-92.
167. Kim J, Kim YC, Fang C, Russell RC, Kim JH, Fan W, et al. Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell*. 2013;152(1-2):290-303.
168. Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, Kominami E. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy. *Autophagy*. 2005;1(2):84-91.
169. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J*. 2000;19(21):5720-8.
170. Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci*. 2004;117(Pt 13):2805-12.
171. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and Autophagy. *Methods Mol Biol*. 2008;445:77-88.

172. Kouroku Y, Fujita E, Tanida I, Ueno T, Isoai A, Kumagai H, et al. ER stress (PERK/eIF2 α phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ.* 2007;14(2):230-9.
173. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell.* 1999;10(11):3787-99.
174. Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Dev Cell.* 2002;3(1):99-111.
175. Schindler AJ, Schekman R. In vitro reconstitution of ER-stress induced ATF6 transport in COPII vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(42):17775-80.
176. Chen X, Shen J, Prywes R. The luminal domain of ATF6 senses endoplasmic reticulum (ER) stress and causes translocation of ATF6 from the ER to the Golgi. *J Biol Chem.* 2002;277(15):13045-52.
177. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, et al. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell.* 2000;6(6):1355-64.
178. Lee AS. Glucose-regulated proteins in cancer: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer.* 2014;14(4):263-76.
179. Kang HS, Welch WJ. Characterization and purification of the 94-kDa glucose-regulated protein. *J Biol Chem.* 1991;266(9):5643-9.
180. Zhang L, Fok JH, Davies FE. Heat shock proteins in multiple myeloma. *Oncotarget.* 2014;5(5):1132-48.
181. Marzec M, Eletto D, Argon Y. GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1823(3):774-87.
182. Ostrovsky O, Ahmed NT, Argon Y. The chaperone activity of GRP94 toward insulin-like growth factor II is necessary for the stress response to serum deprivation. *Mol Biol Cell.* 2009;20(6):1855-64.
183. Koch G, Smith M, Macer D, Webster P, Mortara R. Endoplasmic reticulum contains a common, abundant calcium-binding glycoprotein, endoplasmin. *J Cell Sci.* 1986;86:217-32.

184. Marcu MG, Doyle M, Bertolotti A, Ron D, Hendershot L, Neckers L. Heat shock protein 90 modulates the unfolded protein response by stabilizing IRE1 α . *Mol Cell Biol.* 2002;22(24):8506-13.
185. Evans CG, Chang L, Gestwicki JE. Heat shock protein 70 (hsp70) as an emerging drug target. *J Med Chem.* 2010;53(12):4585-602.
186. Davenport EL, Zeisig A, Aronson LI, Moore HE, Hockley S, Gonzalez D, et al. Targeting heat shock protein 72 enhances Hsp90 inhibitor-induced apoptosis in myeloma. *Leukemia.* 2010;24(10):1804-7.
187. Zhang L, Fok JJ, Mirabella F, Aronson LI, Fryer RA, Workman P, et al. Hsp70 inhibition induces myeloma cell death via the intracellular accumulation of immunoglobulin and the generation of proteotoxic stress. *Cancer Lett.* 2013;339(1):49-59.
188. Chatterjee M, Andrulis M, Stühmer T, Müller E, Hofmann C, Steinbrunn T, et al. The PI3K/Akt signaling pathway regulates the expression of Hsp70, which critically contributes to Hsp90-chaperone function and tumor cell survival in multiple myeloma. *Haematologica.* 2013;98(7):1132-41.
189. Brünnert D, Langer C, Zimmermann L, Bargou RC, Burchardt M, Chatterjee M, et al. The heat shock protein 70 inhibitor VER155008 suppresses the expression of HSP27, HOP and HSP90 β and the androgen receptor, induces apoptosis, and attenuates prostate cancer cell growth. *J Cell Biochem.* 2020;121(1):407-17.
190. Richter K, Haslbeck M, Buchner J. The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell.* 2010;40(2):253-66.
191. Kane RC, Farrell AT, Sridhara R, Pazdur R. United States Food and Drug Administration approval summary: bortezomib for the treatment of progressive multiple myeloma after one prior therapy. *Clin Cancer Res.* 2006;12(10):2955-60.
192. Pei XY, Dai Y, Grant S. The proteasome inhibitor bortezomib promotes mitochondrial injury and apoptosis induced by the small molecule Bcl-2 inhibitor HA14-1 in multiple myeloma cells. *Leukemia.* 2003;17(10):2036-45.
193. Chen D, Frezza M, Schmitt S, Kanwar J, Dou QP. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets.* 2011;11(3):239-53.
194. Lauricella M, Emanuele S, D'Anneo A, Calvaruso G, Vassallo B, Carlisi D, et al. JNK and AP-1 mediate apoptosis induced by bortezomib in HepG2 cells via FasL/caspase-8 and mitochondria-dependent pathways. *Apoptosis.* 2006;11(4):607-25.

195. Ri M. Endoplasmic-reticulum stress pathway-associated mechanisms of action of proteasome inhibitors in multiple myeloma. *Int J Hematol.* 2016;104(3):273-80.
196. Hideshima T, Richardson PG, Anderson KC. Mechanism of action of proteasome inhibitors and deacetylase inhibitors and the biological basis of synergy in multiple myeloma. *Mol Cancer Ther.* 2011;10(11):2034-42.
197. Demo SD, Kirk CJ, Aujay MA, Buchholz TJ, Dajee M, Ho MN, et al. Antitumor activity of PR-171, a novel irreversible inhibitor of the proteasome. *Cancer Res.* 2007;67(13):6383-91.
198. Groen K, van de Donk N, Stege C, Zweegman S, Nijhof IS. Carfilzomib for relapsed and refractory multiple myeloma. *Cancer Manag Res.* 2019;11:2663-75.
199. Dimopoulos MA, Moreau P, Palumbo A, Joshua D, Pour L, Hajek R, et al. Carfilzomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): a randomised, phase 3, open-label, multicentre study. *Lancet Oncol.* 2016;17(1):27-38.
200. Mushtaq A, Kapoor V, Latif A, Iftikhar A, Zahid U, McBride A, et al. Efficacy and toxicity profile of carfilzomib based regimens for treatment of multiple myeloma: A systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2018;125:1-11.
201. Kupperman E, Lee EC, Cao Y, Bannerman B, Fitzgerald M, Berger A, et al. Evaluation of the proteasome inhibitor MLN9708 in preclinical models of human cancer. *Cancer Res.* 2010;70(5):1970-80.
202. Augello G, Modica M, Azzolina A, Puleio R, Cassata G, Emma MR, et al. Preclinical evaluation of antitumor activity of the proteasome inhibitor MLN2238 (ixazomib) in hepatocellular carcinoma cells. *Cell Death Dis.* 2018;9(2):28.
203. Hungria VTM, Crusoe EQ, Bittencourt RI, Maiolino A, Magalhaes RJP, Sobrinho JDN, et al. New proteasome inhibitors in the treatment of multiple myeloma. *Hematology, transfusion and cell therapy.* 2019;41(1):76-83.
204. Tzogani K, van Hennik P, Walsh I, De Graeff P, Folin A, Sjoberg J, et al. EMA Review of Panobinostat (Farydak) for the Treatment of Adult Patients with Relapsed and/or Refractory Multiple Myeloma. *Oncologist.* 2018;23(5):631-6.
205. San-Miguel JF, Hungria VT, Yoon SS, Beksac M, Dimopoulos MA, Elghandour A, et al. Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2014;15(11):1195-206.
206. Catley L, Weisberg E, Kiziltepe T, Tai YT, Hideshima T, Neri P, et al. Aggresome induction by proteasome inhibitor bortezomib and alpha-tubulin

hyperacetylation by tubulin deacetylase (TDAC) inhibitor LBH589 are synergistic in myeloma cells. *Blood*. 2006;108(10):3441-9.

207. Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao TP. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell*. 2003;115(6):727-38.

208. Richardson PG, Schlossman RL, Alsina M, Weber DM, Coutre SE, Gasparetto C, et al. PANORAMA 2: panobinostat in combination with bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed and bortezomib-refractory myeloma. *Blood*. 2013;122(14):2331-7.

209. Le Moigne R, Aftab BT, Djakovic S, Dhimolea E, Valle E, Murnane M, et al. The p97 Inhibitor CB-5083 Is a Unique Disrupter of Protein Homeostasis in Models of Multiple Myeloma. *Mol Cancer Ther*. 2017;16(11):2375-86.

210. Yedidi RS, Wendler P, Enenkel C. AAA-ATPases in Protein Degradation. *Frontiers in molecular biosciences*. 2017;4:42.

211. Wang Q, Song C, Li CC. Molecular perspectives on p97-VCP: progress in understanding its structure and diverse biological functions. *J Struct Biol*. 2004;146(1-2):44-57.

212. DeLaBarre B, Brunger AT. Complete structure of p97/valosin-containing protein reveals communication between nucleotide domains. *Nat Struct Biol*. 2003;10(10):856-63.

213. Schubert C, Buchberger A. UBX domain proteins: major regulators of the AAA ATPase Cdc48/p97. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(15):2360-71.

214. Erzberger JP, Berger JM. Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2006;35:93-114.

215. Song C, Wang Q, Li CC. ATPase activity of p97-valosin-containing protein (VCP). D2 mediates the major enzyme activity, and D1 contributes to the heat-induced activity. *J Biol Chem*. 2003;278(6):3648-55.

216. Magnaghi P, D'Alessio R, Valsasina B, Avanzi N, Rizzi S, Asa D, et al. Covalent and allosteric inhibitors of the ATPase VCP/p97 induce cancer cell death. *Nat Chem Biol*. 2013;9:548.

217. Raasi S, Wolf DH. Ubiquitin receptors and ERAD: a network of pathways to the proteasome. *Semin Cell Dev Biol*. 2007;18(6):780-91.

218. Bodnar N, Rapoport T. Toward an understanding of the Cdc48/p97 ATPase. *F1000Research*. 2017;6:1318.

219. Klein JB, Barati MT, Wu R, Gozal D, Sachleben LR, Jr., Kausar H, et al. Akt-mediated valosin-containing protein 97 phosphorylation regulates its association with ubiquitinated proteins. *J Biol Chem.* 2005;280(36):31870-81.
220. Shah PP, Beverly LJ. Regulation of VCP/p97 demonstrates the critical balance between cell death and epithelial-mesenchymal transition (EMT) downstream of ER stress. *Oncotarget.* 2015;6(19):17725-37.
221. Wang X, Bai E, Zhou H, Sha S, Miao H, Qin Y, et al. Discovery of a new class of valosine containing protein (VCP/P97) inhibitors for the treatment of non-small cell lung cancer. *Bioorg Med Chem.* 2019;27(3):533-44.
222. Meyer H, Bug M, Bremer S. Emerging functions of the VCP/p97 AAA-ATPase in the ubiquitin system. *Nat Cell Biol.* 2012;14(2):117-23.
223. Zhou HJ, Wang J, Yao B, Wong S, Djakovic S, Kumar B, et al. Discovery of a First-in-Class, Potent, Selective, and Orally Bioavailable Inhibitor of the p97 AAA ATPase (CB-5083). *J Med Chem.* 2015;58(24):9480-97.
224. Anderson DJ, Le Moigne R, Djakovic S, Kumar B, Rice J, Wong S, et al. Targeting the AAA ATPase p97 as an Approach to Treat Cancer through Disruption of Protein Homeostasis. *Cancer Cell.* 2015;28(5):653-65.
225. Gareau A, Rico C, Boerboom D, Nadeau ME. In vitro efficacy of a first-generation valosin-containing protein inhibitor (CB-5083) against canine lymphoma. *Vet Comp Oncol.* 2018;16(3):311-7.
226. Zhu J, Huang JW, Tseng PH, Yang YT, Fowble J, Shiau CW, et al. From the cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib to a novel class of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 inhibitors. *Cancer Res.* 2004;64(12):4309-18.
227. Seibert K, Masferrer JL. Role of inducible cyclooxygenase (COX-2) in inflammation. *Receptor.* 1994;4(1):17-23.
228. Shi G, Li D, Fu J, Sun Y, Li Y, Qu R, et al. Upregulation of cyclooxygenase-2 is associated with activation of the alternative nuclear factor kappa B signaling pathway in colonic adenocarcinoma. *American journal of translational research.* 2015;7(9):1612-20.
229. Khadem-Ansari MH, Asoudeh M, Gheshlaghi HFK, Nozari S, Zarringol M, Maroufi NF, et al. Copper and zinc in stage I multiple myeloma: relation with ceruloplasmin, lipid peroxidation, and superoxide dismutase activity. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2018;37(3).
230. Gong L, Thorn CF, Bertagnolli MM, Grosser T, Altman RB, Klein TE. Celecoxib pathways: pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacogenet Genomics.* 2012;22(4):310-8.

231. Li J, Hao Q, Cao W, Vadgama JV, Wu Y. Celecoxib in breast cancer prevention and therapy. *Cancer Manag Res.* 2018;10:4653-67.
232. Arico S, Pattingre S, Bauvy C, Gane P, Barbat A, Codogno P, et al. Celecoxib induces apoptosis by inhibiting 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 activity in the human colon cancer HT-29 cell line. *J Biol Chem.* 2002;277(31):27613-21.
233. Zollinger A, Stühmer T, Chatterjee M, Gattenlohner S, Haralambieva E, Müller-Hermelink HK, et al. Combined functional and molecular analysis of tumor cell signaling defines 2 distinct myeloma subgroups: Akt-dependent and Akt-independent multiple myeloma. *Blood.* 2008;112(8):3403-11.
234. Tu Y, Gardner A, Lichtenstein A. The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase pathway in multiple myeloma plasma cells: roles in cytokine-dependent survival and proliferative responses. *Cancer Res.* 2000;60(23):6763-70.
235. Hyun T, Yam A, Pece S, Xie X, Zhang J, Miki T, et al. Loss of PTEN expression leading to high Akt activation in human multiple myelomas. *Blood.* 2000;96(10):3560-8.
236. Carnero A. The PKB/AKT pathway in cancer. *Curr Pharm Des.* 2010;16(1):34-44.
237. Engelman JA, Luo J, Cantley LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature reviews Genetics.* 2006;7(8):606-19.
238. Dieterle AM, Bohler P, Keppeler H, Alers S, Berleth N, Driessen S, et al. PDK1 controls upstream PI3K expression and PIP3 generation. *Oncogene.* 2014;33(23):3043-53.
239. Ebbesen SH, Scaltriti M, Bialucha CU, Morse N, Kasthuber ER, Wen HY, et al. Pten loss promotes MAPK pathway dependency in HER2/neu breast carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(11):3030-5.
240. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* 1997;275(5308):1943-7.
241. Chang H, Qi XY, Claudio J, Zhuang L, Patterson B, Stewart AK. Analysis of PTEN deletions and mutations in multiple myeloma. *Leuk Res.* 2006;30(3):262-5.
242. Mahajan K, Mahajan NP. PI3K-independent AKT activation in cancers: a treasure trove for novel therapeutics. *J Cell Physiol.* 2012;227(9):3178-84.

243. Pugazhenth S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA, Boxer LM, Heasley LE, et al. Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem.* 2000;275(15):10761-6.
244. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007;129(7):1261-74.
245. Park MA, Yacoub A, Rahmani M, Zhang G, Hart L, Hagan MP, et al. OSU-03012 stimulates PKR-like endoplasmic reticulum-dependent increases in 70-kDa heat shock protein expression, attenuating its lethal actions in transformed cells. *Mol Pharmacol.* 2008;73(4):1168-84.
246. Zhang S, Suvannasankha A, Crean CD, White VL, Johnson A, Chen CS, et al. OSU-03012, a novel celecoxib derivative, is cytotoxic to myeloma cells and acts through multiple mechanisms. *Clin Cancer Res.* 2007;13(16):4750-8.
247. Booth L, Cazanave SC, Hamed HA, Yacoub A, Ogretmen B, Chen CS, et al. OSU-03012 suppresses GRP78/BiP expression that causes PERK-dependent increases in tumor cell killing. *Cancer Biol Ther.* 2012;13(4):224-36.
248. Booth L, Shuch B, Albers T, Roberts JL, Tavallai M, Proniuk S, et al. Multi-kinase inhibitors can associate with heat shock proteins through their NH₂-termini by which they suppress chaperone function. *Oncotarget.* 2016;7(11):12975-96.
249. Bhattacharjee R, Devi A, Mishra S. Molecular docking and molecular dynamics studies reveal structural basis of inhibition and selectivity of inhibitors EGCG and OSU-03012 toward glucose regulated protein-78 (GRP78) overexpressed in glioblastoma. *J Mol Model.* 2015;21(10):272.
250. Porchia LM, Guerra M, Wang YC, Zhang Y, Espinosa AV, Shinohara M, et al. 2-amino-N-{4-[5-(2-phenanthrenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]-phenyl} acetamide (OSU-03012), a celecoxib derivative, directly targets p21-activated kinase. *Mol Pharmacol.* 2007;72(5):1124-31.
251. King CC, Gardiner EM, Zenke FT, Bohl BP, Newton AC, Hemmings BA, et al. p21-activated kinase (PAK1) is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1). *J Biol Chem.* 2000;275(52):41201-9.
252. Massey AJ, Williamson DS, Browne H, Murray JB, Dokurno P, Shaw T, et al. A novel, small molecule inhibitor of Hsc70/Hsp70 potentiates Hsp90 inhibitor induced apoptosis in HCT116 colon carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2010;66(3):535-45.
253. Rasche L, Menoret E, Dubljevic V, Menu E, Vanderkerken K, Lapa C, et al. A GRP78-Directed Monoclonal Antibody Recaptures Response in Refractory Multiple Myeloma with Extramedullary Involvement. *Clin Cancer Res.* 2016;22(17):4341-9.

254. Rasche L, Duell J, Morgner C, Chatterjee M, Hensel F, Rosenwald A, et al. The natural human IgM antibody PAT-SM6 induces apoptosis in primary human multiple myeloma cells by targeting heat shock protein GRP78. *PLoS One*. 2013;8(5):e63414.
255. Pohle T, Brandlein S, Ruoff N, Muller-Hermelink HK, Vollmers HP. Lipoptosis: tumor-specific cell death by antibody-induced intracellular lipid accumulation. *Cancer Res*. 2004;64(11):3900-6.
256. Brändlein S, Rauschert N, Rasche L, Dreykluft A, Hensel F, Conzelmann E, et al. The human IgM antibody SAM-6 induces tumor-specific apoptosis with oxidized low-density lipoprotein. *Mol Cancer Ther*. 2007;6(1):326-33.
257. Rasche L, Duell J, Castro IC, Dubljevic V, Chatterjee M, Knop S, et al. GRP78-directed immunotherapy in relapsed or refractory multiple myeloma - results from a phase 1 trial with the monoclonal immunoglobulin M antibody PAT-SM6. *Haematologica*. 2015;100(3):377-84.
258. Zhu YX, Shi CX, Bruins LA, Wang X, Riggs DL, Porter B, et al. Identification of lenalidomide resistance pathways in myeloma and targeted resensitization using cereblon replacement, inhibition of STAT3 or targeting of IRF4. *Blood Cancer J*. 2019;9(2):19.
259. Shimizu S, Takiguchi T, Fukutoku M, Yoshioka R, Hirose Y, Fukuhara S, et al. Establishment of a CD4-positive plasmacytoma cell line (AMO1). *Leukemia*. 1993;7(2):274-80.
260. Besse A, Stolze SC, Rasche L, Weinhold N, Morgan GJ, Kraus M, et al. Carfilzomib resistance due to ABCB1/MDR1 overexpression is overcome by nelfinavir and lopinavir in multiple myeloma. *Leukemia*. 2018;32(2):391-401.
261. Brünnert D, Kraus M, Stühmer T, Kirner S, Heiden R, Goyal P, et al. Novel cell line models to study mechanisms and overcoming strategies of proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. *Biochimica et biophysica acta Molecular basis of disease*. 2019.
262. Logue SE, Elgendy M, Martin SJ. Expression, purification and use of recombinant annexin V for the detection of apoptotic cells. *Nat Protoc*. 2009;4(9):1383-95.
263. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol*. 2017;37(2):163-76.
264. van Engeland M, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. *Cytometry*. 1996;24(2):131-9.
265. Tsong TY. Electroporation of cell membranes. *Biophys J*. 1991;60(2):297-306.

266. Steinbrunn T, Chatterjee M, Bargou RC, Stühmer T. Efficient transient transfection of human multiple myeloma cells by electroporation--an appraisal. *PLoS One*. 2014;9(6):e97443.
267. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265-75.
268. Smith BJ. SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Methods Mol Biol*. 1984;1:41-55.
269. Ghosh R, Gilda JE, Gomes AV. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. Expert review of proteomics. 2014;11(5):549-60.
270. O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem*. 2000;267(17):5421-6.
271. Rampersad SN. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel, Switzerland)*. 2012;12(9):12347-60.
272. Erikstein BS, Hagland HR, Nikolaisen J, Kulawiec M, Singh KK, Gjertsen BT, et al. Cellular stress induced by resazurin leads to autophagy and cell death via production of reactive oxygen species and mitochondrial impairment. *J Cell Biochem*. 2010;111(3):574-84.
273. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016;12(1):1-222.
274. Steiner N, Borjan B, Hajek R, Johrer K, Gobel G, Willenbacher W, et al. Expression and release of glucose-regulated protein-78 (GRP78) in multiple myeloma. *Oncotarget*. 2017;8(34):56243-54.
275. Johnsen J, Segerstrom L, Baryawno N, Sveinbjornson B, Kogner P. A novel celecoxib derivate, OSU03012, induces caspase-dependent cytotoxicity and cell cycle arrest in neuroblastoma. *Cancer Res*. 2008;68(9 Supplement):2314-.
276. Segerstrom L, Baryawno N, Sveinbjornsson B, Wickstrom M, Elfman L, Kogner P, et al. Effects of small molecule inhibitors of PI3K/Akt/mTOR signaling on neuroblastoma growth in vitro and in vivo. *Int J Cancer*. 2011;129(12):2958-65.
277. Ding H, Han C, Guo D, Wang D, Chen CS, D'Ambrosio SM. OSU03012 activates Erk1/2 and Cdks leading to the accumulation of cells in the S-phase and apoptosis. *Int J Cancer*. 2008;123(12):2923-30.

278. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. U-266 2020 [Available from: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-9>].
279. Booth L, Roberts JL, Cruickshanks N, Grant S, Poklepovic A, Dent P. Regulation of OSU-03012 toxicity by ER stress proteins and ER stress-inducing drugs. *Mol Cancer Ther.* 2014;13(10):2384-98.
280. Shuqing L, Jianmin Y, Chongmei H, Hui C, Wang J. Upregulated expression of the PSMB5 gene may contribute to drug resistance in patient with multiple myeloma when treated with bortezomib-based regimen. *Exp Hematol.* 2011;39(12):1117-8.
281. Lü S, Yang J, Song X, Gong S, Zhou H, Guo L, et al. Point mutation of the proteasome beta5 subunit gene is an important mechanism of bortezomib resistance in bortezomib-selected variants of Jurkat T cell lymphoblastic lymphoma/leukemia line. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;326(2):423-31.
282. Nigam SK. What do drug transporters really do? *Nature reviews Drug discovery.* 2015;14(1):29-44.
283. Mealey KL. Canine ABCB1 and macrocyclic lactones: heartworm prevention and pharmacogenetics. *Vet Parasitol.* 2008;158(3):215-22.
284. Booth L, Roberts JL, Tavallai M, Nourbakhsh A, Chuckalovcak J, Carter J, et al. OSU-03012 and Viagra Treatment Inhibits the Activity of Multiple Chaperone Proteins and Disrupts the Blood-Brain Barrier: Implications for Anti-Cancer Therapies. *J Cell Physiol.* 2015;230(8):1982-98.
285. Rasche L, Menoret E, Dubljevic V, Menu E, Vanderkerken K, Lapa C, et al. A GRP78-Directed Monoclonal Antibody Recaptures Response in Refractory Multiple Myeloma with Extramedullary Involvement. *Clin Cancer Res.* 2016;22(17):4341-9.
286. Booth L, Roberts JL, Cash DR, Tavallai S, Jean S, Fidanza A, et al. GRP78/BiP/HSPA5/Dna K is a universal therapeutic target for human disease. *J Cell Physiol.* 2015;230(7):1661-76.
287. Bastola P, Neums L, Schoenen FJ, Chien J. VCP inhibitors induce endoplasmic reticulum stress, cause cell cycle arrest, trigger caspase-mediated cell death and synergistically kill ovarian cancer cells in combination with Salubrinal. *Mol Oncol.* 2016;10(10):1559-74.
288. Park M, Krause MW. Regulation of postembryonic G(1) cell cycle progression in *Caenorhabditis elegans* by a cyclin D/CDK-like complex. *Development.* 1999;126(21):4849-60.
289. Ju JS, Fuentealba RA, Miller SE, Jackson E, Piwnicka-Worms D, Baloh RH, et al. Valosin-containing protein (VCP) is required for autophagy and is disrupted in VCP disease. *J Cell Biol.* 2009;187(6):875-88.

290. Gorman AM, Healy SJ, Jäger R, Samali A. Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis. *Pharmacol Ther.* 2012;134(3):306-16.
291. Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene.* 2008;27(48):6245-51.
292. Rozpedek W, Pytel D, Mucha B, Leszczynska H, Diehl JA, Majsterek I. The Role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. *Curr Mol Med.* 2016;16(6):533-44.
293. Wu R, Zhang QH, Lu YJ, Ren K, Yi GH. Involvement of the IRE1 α -XBP1 pathway and XBP1s-dependent transcriptional reprogramming in metabolic diseases. *DNA Cell Biol.* 2015;34(1):6-18.
294. Boyault C, Zhang Y, Fritah S, Caron C, Gilquin B, Kwon SH, et al. HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates. *Genes Dev.* 2007;21(17):2172-81.
295. Ganguly S, Home T, Yacoub A, Kambhampati S, Shi H, Dandawate P, et al. Targeting HSF1 disrupts HSP90 chaperone function in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget.* 2015;6(31):31767-79.
296. Kocaturk NM, Gozuacik D. Crosstalk Between Mammalian Autophagy and the Ubiquitin-Proteasome System. *Frontiers in cell and developmental biology.* 2018;6:128.
297. Leung-Hagesteijn C, Erdmann N, Cheung G, Keats JJ, Stewart AK, Reece DE, et al. Xbp1s-negative tumor B cells and pre-plasmablasts mediate therapeutic proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. *Cancer Cell.* 2013;24(3):289-304.
298. Soriano GP, Besse L, Li N, Kraus M, Besse A, Meeuwenoord N, et al. Proteasome inhibitor-adapted myeloma cells are largely independent from proteasome activity and show complex proteomic changes, in particular in redox and energy metabolism. *Leukemia.* 2016;30(11):2198-207.
299. Kuhn DJ, Chen Q, Voorhees PM, Strader JS, Shenk KD, Sun CM, et al. Potent activity of carfilzomib, a novel, irreversible inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, against preclinical models of multiple myeloma. *Blood.* 2007;110(9):3281-90.
300. Meriin AB, Gabai VL, Yaglom J, Shifrin VI, Sherman MY. Proteasome inhibitors activate stress kinases and induce Hsp72. Diverse effects on apoptosis. *J Biol Chem.* 1998;273(11):6373-9.
301. Rosebeck S, Alonge MM, Kandarpa M, Mayampurath A, Volchenboum SL, Jasiolec J, et al. Synergistic Myeloma Cell Death via Novel Intracellular Activation of Caspase-10-Dependent Apoptosis by Carfilzomib and Selinexor. *Mol Cancer Ther.* 2016;15(1):60-71.

302. Lamothe B, Wierda WG, Keating MJ, Gandhi V. Carfilzomib Triggers Cell Death in Chronic Lymphocytic Leukemia by Inducing Proapoptotic and Endoplasmic Reticulum Stress Responses. *Clin Cancer Res.* 2016;22(18):4712-26.
303. Zang Y, Thomas SM, Chan ET, Kirk CJ, Freilino ML, DeLancey HM, et al. Carfilzomib and ONX 0912 inhibit cell survival and tumor growth of head and neck cancer and their activities are enhanced by suppression of Mcl-1 or autophagy. *Clin Cancer Res.* 2012;18(20):5639-49.
304. Diwaker D, Mishra KP, Ganju L. Effect of modulation of unfolded protein response pathway on dengue virus infection. *Acta biochimica et biophysica Sinica.* 2015;47(12):960-8.
305. Rauschert N, Brändlein S, Holzinger E, Hensel F, Müller-Hermelink HK, Vollmers HP. A new tumor-specific variant of GRP78 as target for antibody-based therapy. *Lab Invest.* 2008;88(4):375-86.
306. Sarin V, Yu K, Ferguson ID, Gugliemini O, Nix MA, Hann B, et al. Evaluating the efficacy of multiple myeloma cell lines as models for patient tumors via transcriptomic correlation analysis. *Leukemia.* 2020.
307. Chan JF, Zhu Z, Chu H, Yuan S, Chik KK, Chan CC, et al. The celecoxib derivative kinase inhibitor AR-12 (OSU-03012) inhibits Zika virus via down-regulation of the PI3K/Akt pathway and protects Zika virus-infected A129 mice: A host-targeting treatment strategy. *Antiviral Res.* 2018;160:38-47.
308. Koselny K, Green J, Favazzo L, Glazier VE, DiDone L, Ransford S, et al. Antitumor/Antifungal Celecoxib Derivative AR-12 is a Non-Nucleoside Inhibitor of the ANL-Family Adenylating Enzyme Acetyl CoA Synthetase. *ACS infectious diseases.* 2016;2(4):268-80.
309. Mohr EL, McMullan LK, Lo MK, Spengler JR, Bergeron É, Albariño CG, et al. Inhibitors of cellular kinases with broad-spectrum antiviral activity for hemorrhagic fever viruses. *Antiviral Res.* 2015;120:40-7.
310. Ma X, Jin L, Lei X, Tong J, Wang R. MicroRNA-363-3p inhibits cell proliferation and induces apoptosis in retinoblastoma cells via the Akt/mTOR signaling pathway by targeting PIK3CA. *Oncol Rep.* 2020;43(5):1365-74.
311. Tang WK, Odzorig T, Jin W, Xia D. Structural Basis of p97 Inhibition by the Site-Selective Anticancer Compound CB-5083. *Mol Pharmacol.* 2019;95(3):286-93.
312. Ron Leuty. Can Viagra help revive this biotech company? 2018 [Available from: <https://www.bizjournals.com/sanfrancisco/news/2018/05/31/can-viagra-help-revive-cleave-biosciences-biotech.html>].
313. Brünnert D, Dürbeck L, Glück L., Stühmer T., Steinbrunn T., Kirner S., Schraud H., Bargou R. C., Chatterjee M. Targeting protein homeostasis regulation

in multiple myeloma (MM): role of ER stress-induced unfolded protein response (UPR). DGHO; 2018.

XIII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATF4	<i>Activating transcription factor 4</i>
ATF6	<i>Activating transcription factor 6</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
DMSO	Dimethylsulfoxid
CHOP	<i>CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein</i>
eIF2 α	<i>eukaryotic initiation factor 2α</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>Endoplasmatic Reticulum Associated Degradation</i>
ERSE	<i>ER Stress Response Elements</i>
FSC	<i>Forward-Scatter</i>
g	Relative Zentrifugalkraft
GADD34	<i>Growth Arrest and DNA damage-inducible protein 34</i>
GRP78/BiP	<i>Glucose Regulated Protein 78/Binding immunoglobulin protein</i>
GRP94	<i>Glucose Regulated Protein 94</i>
h	Stunde(n)
HDAC	Histon de-acetylase
HSP70	<i>Heat-shock Protein 70</i>
HSP90	<i>Heat-shock Protein 90</i>
IRE1 α	<i>Inositol requiring Enzyme 1 A</i>
IMiD	<i>Immunomodulatory immune Drug</i>
kDa	Kilodalton
LC3A/B	<i>Light Chain 3 A/B</i>
M	Molar
mg	Milligramm
MGUS	<i>Monoclonal gammopathy of undetermined significance</i>
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PERK	<i>Protein-Kinase-RNA-like endoplasmatic reticulum kinase</i>
PI	Propidiumjodid
p62	Protein 62
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>

SAPK/JNK	<i>Stress-activated Protein Kinase/cJUN NH2-Terminal Kinase</i>
SDS PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
siRNA	<i>small interfering Ribonucleic acid</i>
SSC	<i>Side-Scatter</i>
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
VCP	<i>Valosin-containing protein</i>
XBP-1	<i>X-Box binding-protein-1</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

XIV. DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ralf Bargou und Herrn Dr. Manik Chatterjee für die Möglichkeit bedanken, in dieser Arbeitsgruppe forschen zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hermann Ammer für die Übernahme, Durchsicht und Einreichung der Doktorarbeit an der Tierärztlichen Fakultät.

Frau Dr. Daniela Brännert möchte ich für die hervorragende Einarbeitung und Betreuung während der gesamten Doktorarbeit danken. Außerdem möchte ich mich besonders für die vielen konstruktiven Gespräche bedanken, die maßgeblich zum Gelingen der Doktorarbeit beigetragen haben.

Bei den Mitarbeitern der AG Chatterjee möchte ich mich für die schöne Arbeitsatmosphäre bedanken. Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle bei Dr. Umair Munawar und Stefanie Kirner, für die fundierte Einarbeitung in die Laborarbeit und dafür, dass sie mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen. Für die gemeinsame Zeit vor und während des experimentellen Teils der Arbeit danke ich Theresa Demler von Herzen. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Niklas Bürgener, Pina Geißler und Valentina Glück für das hervorragende Korrekturlesen bedanken.

Bei Kerstin Ackermann, Dr. Niklas Bürgener, Eva Daldrup, Pina Geißler, Farina Kerneck und Sirkka Mang möchte ich mich für die unvergessliche Zeit während des Studiums in München bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich in jeder Lebenslage unterstützt hat und die mir das Studium und die Doktorarbeit ermöglichen konnte. Vielen Dank für das große Vertrauen, das Ihr in mich habt!

Für die unermüdlich positive Art, die Unterstützung, Motivation und die gemeinsame Zeit gilt mein ganz besonderer Dank Pina Geißler.