

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt
der Ludwigs-Maximilian-Universität München
Direktor: Prof. Dr. M. Reincke

**Modulation des HMG-CoA-Reduktase/GG-
PP/Rho-Signalwegs zur Apoptoseinduktion in
adhärenten Myelomzellen**

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

vorgelegt von
Philipp Baumann

aus
München

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. G. Meinhardt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. Roscher
Prof. Dr. S. Bohlander

Mitbetreuung durch: Dr. R. Schmidmaier

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.2006

*Gewidmet
Meiner lieben Familie*

*Ich wünsche mir die Gelassenheit, das hinzunehmen,
was ich nicht ändern kann,
den Mut, das zu ändern, was ich ändern kann
und
die Weisheit, das eine vom anderen zu unterscheiden*

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|-----------|
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 2. METHODEN UND ZELLKULTUR | 4 |
| 2.1 Zellkultur | 4 |
| 2.1.1 Zelllinien | 4 |
| 2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen | 4 |
| 2.1.3 Zellzahlbestimmung | 5 |
| 2.1.4 Gewinnung mononukleärer Zellen für Knochenmarksstromakulturen | 5 |
| 2.2 Zellvitalitätsmessungen von hBMSC | 5 |
| 2.3 Durchflusszytometrische Analysen | 6 |
| 2.3.1 Annexin/PI Apoptose Assay | 6 |
| 2.3.2 Oberflächenmarkermessungen | 8 |
| 2.3.3 Zytotoxizitätsassay unter Kokulturbedingungen | 8 |
| 2.4 Western Blotting | 9 |
| 3. ERGEBNISSE | 14 |
| 3.1 Etablierung eines Zellmodels | 14 |
| 3.1.1 Chemosensitivität von HS-5-Zellen | 14 |
| 3.1.2 Chemosensitivität von | 15 |
| 3.1.3 Durchflusszytometrische Analyse der Kokulturexperimente | 18 |
| 3.1.4 Validität des Zellmodels | 19 |
| 3.2 Zelladhäsionsvermittelte Zytostatikaresistenz (CAM-DR) | 20 |
| 3.2.1 Auftreten von CAM-DR bei verschiedenen Zytostatika | 20 |
| 3.2.2 Auftreten von CAM-DR bei verschiedenen Myelomzelllinien | 22 |
| 3.2.3 CAM-DR ist abhängig von der Dauer der Kokultivierung | 23 |
| 3.2.4 Resistenz gegen Apoptoseinduktion bei Zytostatikabehandlung | 24 |
| 3.2.5 Rolle der Zytokine bei CAM-DR | 26 |
| 3.2.6 Expressionsmuster auf den Myelomzelllinien und der Stromazelllinie | 28 |
| 3.2.7 Änderung der Integrinexpression auf Myelom- und Stromazellen | 30 |
| 3.2.8 Rolle der Integreine bei CAM-DR | 32 |

| | | |
|--------------------------------|--|-----------|
| 3.2.9 | Modulation klassischer Signalwege in adhärenten Myelomzellen | 39 |
| 3.2.10 | Statinderivate vermindern CAM-DR | 43 |
| 3.2.11 | CAM-DR kommt über den HMG-CoA/GG-PP/Rhokinase- Signalweg zustande | 43 |
| 4. DISKUSSION | | 54 |
| 4.1 | Etablierung des Kokulturmodels | 54 |
| 4.2 | Zelladhäsionsvermittelte Chemoresistenz in Myelomzelllinien | 55 |
| 4.3 | Modulation klassischer Signalwege | 57 |
| 4.3 | Der GG-PP/Rho/Rhokinase-Signalweg | 60 |
| 5. ZUSAMMENFASSUNG | | 65 |
| 6. LITERATURVERZEICHNIS | | 67 |
| 7. ANHANG | | 74 |

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

Schmidmaier R, **Baumann P**, Simsek M, Dayyani F, Emmerich B, and Gerold Meinhardt: The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin overcomes cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma by geranylgeranylation of Rho protein and activation of Rho kinase.

Blood, 15 September 2004, Vol. 104, No. 6, pp. 1825-1832

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

| | | |
|------|---|----|
| 2.1 | Exemplarische Darstellung eines Annexin/PI Apoptose Assay | 7 |
| 2.2 | Exemplarische Darstellung einer Oberflächenmarkermessung | 8 |
| 3.1 | Chemosensitivität der Stromazelllinie HS-5 | 15 |
| 3.2 | Chemosensitivität von hBMSC | 17 |
| 3.3 | Darstellung des Zytotoxizitätsassay unter Kokulturbedingungen | 18 |
| 3.4 | Kokultur mit hBMSC führt zu Apoptosereduktion | 19 |
| 3.5 | Kokultur mit HS-5 führt zu Apoptosereduktion | 20 |
| 3.6 | CAM-DR ist nicht substanzspezifisch | 21 |
| 3.7 | CAM-DR ist nicht zelllinienspezifisch | 22 |
| 3.8 | CAM-DR ist abhängig von der Dauer der Kokultivierung | 24 |
| 3.9 | Adhärenz führt zur Reduktion der Apoptoseinduktion | 25 |
| 3.10 | Bedingung für CAM-DR ist direkter Zell-Zell-Kontakt | 27 |
| 3.11 | Konditioniertes Medium führt nicht zu einem antiapoptotischen Effekt | 28 |
| 3.12 | Modell der wichtigsten Integrininteraktionen | 30 |
| 3.13 | Melphalaninkubation führt zu einer erhöhten LFA-1-Expression | 31 |
| 3.14 | Zytostatika induzieren erhöhte Integrinexpression in HS-5-Stromazellen | 32 |
| 3.15 | Blockade vonLFA-1 und VLA-4 kann CAM-DR reduzieren | 33 |
| 3.16 | LFA703 kann CAM-DR teilweise verhindern | 34 |
| 3.17 | Inkubation mit Fibronektion oder (rh)-ICAM führt nicht zu CAM-DR | 36 |
| 3.18 | Bio5192 verhindert CAM-DR nicht | 37 |
| 3.19 | Abnahme von CAM-DR ist nicht auf eine verminderte Sekretion von IL-6 zurückzuführen | 38 |
| 3.20 | Blockade von LFA-1 und VLA-4 führt nicht zu einer signifikanten DeadhäSION | 39 |
| 3.21 | Western Blot Analyse der wichtigsten Signalmoleküle beim Myelom | 43 |
| 3.22 | Simvastatin verhindert CAM-DR | 44 |
| 3.23 | Lovastatin hemmt CAM-DR | 45 |
| 3.24 | Hemmung von CAM-DR durch Simvastatin basiert nicht auf | |

| | |
|--|----|
| einer Reduktion der Sekretion von IL-6 | 46 |
| 3.25 Reduktion von CAM-DR basiert nicht auf einer Änderung der Myelomzelladhärenz | 47 |
| 3.26 Der GG-PP/Rho/Rho-Kinase-Signalweg | 48 |
| 3.27 Simvastatin-induzierte Hemmung von CAM-DR wird durch GG-PP aufgehoben | 49 |
| 3.28 CAM-DR wird durch GGTase ausgelöst | 50 |
| 3.29 CAM-DR wird durch die Rho-Kinase aktiviert | 51 |
| 3.30 Hemmung des GG-PP/Rho/Rho-kinase-Signalwegs führt nicht zur Deadhäsion | 52 |
| 3.31 Simvastatin, GGTI-298 und Y-27632 führen nicht zu einer verminderten Integrinexpression | 53 |
| 4.1 Schema der Signaltransduktion von Tyrosinkinaserezeptoren | 58 |
| 4.2 Schema der Signaltransduktion von Integrinen | 60 |
| 4.3 Downstream Signalwege von RhoA | 63 |

TABELLENVERZEICHNIS

| | |
|---|----|
| 3.1 Grunderkrankungen der Patienten, welche Knochenmarksaspirat zu Verfügung gestellt haben | 16 |
| 3.2 Oberflächenantigene auf HS-5-Zellen und Myelomzelllinien | 29 |
| 3.3 PKC-Modulatoren in der HS-5 Kokultur | 40 |
| 3.4 Signalswegsmodulatoren in der HS-5-Kokultur | 41 |
| 3.5 Integrinmodulation durch Signalwegsmodulatoren | 42 |

1. EINLEITUNG

Das multiple Myelom ist ein aggressives B-Zell Non-Hodgkin-Lymphom mit Infiltration des Knochenmarks. Ursächlich sind maligne transformierte Plasmazellen, die die physiologische Blutbildung verdrängen und monoklonale Immunoglobuline oder deren Leichtkettenfragmente produzieren (Herold, 2005). Die Inzidenzrate der Erkrankung steigt mit dem Alter an und beträgt in der 8. Lebensdekade 45/100.000 für männliche und 25/100.000 für weibliche Kaukasier; bezogen auf den deutschen Bevölkerungsdurchschnitt liegt sie bei 3/100.000 (Lamerz R, 2002; Longo DL 1999). Mit Ausnahme der Plasmazelleukämie-Variante sind die Tumorzellen bei dieser Erkrankung überwiegend im Knochenmark lokalisiert; die Myelomzellen wie auch die nicht-malignen Plasmazellen sind auf Interaktionen mit dem Knochenmarkstroma angewiesen, denn dieses vermittelt den Myelomzellen Signale zum Zellwachstum und – überleben. Im Knochenmark adhärieren die Myelomzellen und fügen sich somit in das sog. „Microenvironment“ ein. Dieses besteht hauptsächlich aus den Knochenmarksstromazellen, welche eine Vielzahl von Zytokinen sezernieren, z.B. IL-6, IGF-1, SDF-1 und VEGF (Roecklein et al., 1995). Diese Zytokine fördern über die Signalwege wie JAK/STAT, Ras/Raf/MEK/ERK, PI₃K/Akt und NFκB Überleben, Proliferation und Migration der Tumorzellen (Bisping et al., 2005; Sanda et al., 2005). Außerdem exprimieren die Stromazellen auf der Oberfläche Adhäsionsmoleküle wie z.B. ICAM-1 und VCAM, an die die Myelomzellen binden können (Roecklein et al., 1995). Die Extrazellulärmatrix, welche Proteine wie Laminin, Vitronectin, Fibronectin und Kollagene umfasst, bietet ebenfalls Möglichkeiten zur Adhärenz für die Myelomzellen (Hazlehurst et al., 2001). Durch das im Knochenmark vorherrschende Zytokinmilieu und v.a. durch die Adhäsion der Myelomzellen im Microenvironment werden die Myelomzellen weniger chemosensibel, weshalb hier der Begriff *CAM-DR „Cell Adhesion Mediated Drug Resistance“* benutzt wird.

Der Tumor, seine Produkte und die Reaktion des Wirts führen zu Funktionsstörungen unterschiedlicher Organe und zu verschiedenen Symptomen. Häufigstes Symptom sind Knochenschmerzen, welche bei 70% der Patienten auftreten und v.a. in der Lendenwirbelsäule und in den Rippen lokalisiert sind.

Ursache für die Schmerzsymptomatik sind Knochenläsionen (Osteolysen), die aufgrund von Tumorzellproliferation und Osteoklastenaktivierung entstehen. Diese können zu pathologischen Frakturen und radikulären Symptomen führen. Zweithäufigstes klinisches Problem ist die erhöhte Infektanfälligkeit der Patienten, welches sich vor allem in fortgeschrittenen Stadien als lebensbedrohliche Sepsis manifestieren kann. Grundlage ist hier vor allem die funktionelle Hypogammaglobulinämie, welche aus einer verminderten Bildung und einem erhöhten Abbau vor allem der IgG-Antikörper resultiert. Das häufig auftretende Nierenversagen ist Folge vieler verschiedener Faktoren, allen voran die Hyperkalzämie als Produkt des Knochenabbaus. Auch glomeruläre Amyloidablagerungen können vor allem beim Leichtkettenmyelom die Ursache hierfür sein. Das vermehrt anfallende Paraprotein trägt ebenfalls zum Nierenversagen bei. Anfangs wird das Paraprotein in den Tubuli der Niere rückresorbiert, im Krankheitsverlauf kommt es zu einer Überladung der Tubuli mit Ausbildung eines Fanconi-Syndroms mit erhöhter Proteinausscheidung. Zusätzlich führt das Paraprotein zu einer Viskositätssteigerung und damit zu Blutgerinnungsstörungen. Bei 80% aller Patienten findet sich im Verlauf der Krankheit eine Anämie. Diese kann sich wegen des verdrängenden Wachstums der Myelomzellen, wegen eines Folat- und Vitamin-B12-Mangels oder wegen einer Hemmung der Hämatopoiese durch sezernierte Tumorprodukte entwickeln.

Aus klinischer Sicht bieten sich mehrere Therapieoptionen an: Die Standardtherapie besteht aus intermittierenden Zyklen von Cyclophosphamid oder Melphalan, jeweils in Kombination mit Prednison; dabei wird die Kombination aus Melphalan und Prednison am häufigsten eingesetzt. Mit dieser konventionellen Therapie leben nur 5% der Myelompatienten nach 10 Jahren nach Diagnosestellung (Kyle, 1983). Dieses Ergebnis konnte durch die Einführung der Hochdosischemotherapie mit Stammzelltransplantation verbessert werden. Jedoch können vor allem wegen der erhöhten Mortalität dieser Hochdosis-Melphalan-Gabe bei älteren Menschen nicht alle Patientengruppen der Hochdosischemotherapie zugeführt werden. Als dritte Möglichkeit stehen nun Bortezomib aus der Gruppe der Proteasominhibitoren und Thalidomid, für welches neben einer immunmodulatorischen Funktion eine Gefäßneubildungshemmung nachgewiesen werden konnte, zur Verfügung.

Alle drei Therapieoptionen führen aber letztendlich nicht zu einer Heilung des

Patienten. Nach Monaten bis Jahren der Therapie kommt es zur Ausbildung einer Resistenz gegen die Zytostatika. Die meisten Patienten sterben letztendlich an einer Infektion oder den Folgen einer Niereninsuffizienz.

Das Hauptproblem bei der zytostatischen Therapie des multiplen Myeloms sind von Anfang an gegen Chemotherapeutika resistente und resistent gewordene Myelomzellen. Dabei ist die sekundäre, erworbene Resistenz relativ gut erforscht. Grundlage hierfür sind die Herauf- oder Herabregulation von pro- oder antiapoptotischen Proteinen oder z.B. die vermehrte Expression von Multi-drug-resistance-Proteinen (MDR), welche als Effluxpumpen agieren und Zytostatika unspezifisch aus der Zelle herausbefördern, bevor diese wirken können. Die Ergebnisse aus der Erforschung der sekundären Chemoresistenz wurden bereits in klinisch-therapeutische Konzepte integriert. Dabei hatte jedoch z.B. eine Hemmung des MDR-Proteins mit Verapamil kaum einen Einfluss auf das Gesamtüberleben (Dalton et al., 1995).

Anders hingegen ist dies bei der primären Resistenz der Myelomzellen: Hierbei handelt es sich um Signale zwischen Myelomzellen und dem Mikroenvironment des Knochenmarks, welche die Myelomzellen zur Proliferation anregen und Apoptoseresistenz gegenüber Zytostatika induzieren. Dazu zählen Zytokine wie z.B. IL-6 oder IGF, jedoch ebenso die integrinvermittelte Chemoresistenz über ICAM-1 und VCAM. Die primäre Zytostatikaresistenz ist noch nie systematisch untersucht worden und konnte auch noch nicht in therapeutischen Konzepten gesondert berücksichtigt werden.

Ziel dieser Dissertation war es, die primäre Chemoresistenz von Myelomzellen systematisch zu untersuchen und mögliche Ziele für eine pharmakologische Interaktion zu finden. Durch geeignete Substanzen sollte die Resistenz der Myelomzellen in einem in-vitro Modell wieder voll hergestellt werden.

2. PATIENTEN, MATERIALIEN UND METHODEN

Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Materialien, Chemikalien und Geräte findet sich im Anhang, Kapitel 6.

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

Die Myelomzelllinien U266, OPM-2, NCI-H929 und RPMI-8226, sowie die Stromazelllinie HS-5 stammen von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DMSZ).

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

Es wurde kein Streptomycin/Penicillin verwendet. Die Zellen wurden bis zu einer Dichte von etwa 80x10⁴ Zellen/ml kultiviert; dann wurde die Kultur geteilt, ein Teil davon verworfen, und der andere Teil mit Medium auf eine Zellkonzentration von 20x10⁴ Zellen/ml verdünnt und weiterkultiviert. Die Zellvitalität vor Beginn eines Experimentes wurde sowohl mikroskopisch mittels Trypanblaufärbung sichergestellt.

2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zu Beginn des Einfrierens wurde ein Einfriermedium hergestellt, welches aus 5ml RPMI1640, 3ml FCS und 2ml DMSO bestand. Dieses wurde bis zum Abfüllen in die Kryoröhrchen auf Eis gelagert. Für das Einfrieren von Zellen wurden 10⁷ Zellen abzentrifugiert, zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 4,5ml Kulturmedium (RPMI1640 + 20% FCS) resuspendiert. In jedes der Kryoröhrchen wurden jeweils 0,9ml der Zelllösung und 0,9ml des Einfriermediums gegeben und sofort für 6 Stunden bei -20 C° gelagert. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden bei -80C° und schließlich bei 196C° tief gefroren.

Für das Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem Gefrierschrank genommen, 2 Minuten bei Raumtemperatur angewärmt und schließlich in 37 C° warmes Kulturmedium überführt. Es folgten zwei Waschvorgänge mit

Kulturmedium. Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von 20×10^4 Zellen in Zellkulturflaschen überführt.

2.1.3 Zellzahlbestimmung

Dafür wurden $50\mu\text{l}$ einer Zelllösung mit $50\mu\text{l}$ der Trypanblaulösung versetzt, gevortext und in Neubauer-Zählkammern gegeben und unter dem Mikroskop die Zellzahl pro ml festgestellt.

2.1.4 Gewinnung mononukleärer Zellen für Knochenmarksstromakulturen

Zur Isolierung von mononukleären Zellen aus Knochenmarksaspirat für Knochenmarksstromakulturen wurden jeweils 15 ml heparinisiertes Knochenmarksspirat von Patienten mit hämatologischen Erkrankungen benötigt. Die Patienten hatten nach Aufklärung durch einen Arzt die Zustimmung zur Verwendung des Materials für wissenschaftliche Zwecke gegeben. Ein positives Votum der Ethikkommission liegt vor. Die Aufreinigung der mononukleären Zellen erfolgte im Rahmen einer Dictezentrifugation, für welche Ficollhypaque® verwendet wurde. Dieses wurde auf Raumtemperatur erwärmt und 10 ml davon in ein 50ml Falcon Röhrchen gegeben. Das Aspirat wurde 1:1 mit PBS verdünnt und vorsichtig über das Ficollhypaque geschichtet. Das Falconrörchen wurde dann bei 755xg ohne Bremse für 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurde die Interphase („buffy coat“) abpipettiert, in ein neues Röhrchen gegeben und zweimal mit PBS gewaschen. Danach folgte die Resuspension in Kulturmedium. Die Konzentration der Zellen wurde bestimmt, auf eine Konzentration von $10^7/\text{ml}$ verdünnt und in 96 wellplates, 24 wellplates und 6 wellplates mindestens 3 Wochen und maximal 5 Wochen lang kultiviert, bis ein Monolayer aus hBMSC vorhanden war (Methode nach Lokhorst et al., 1994).

2.2 Zellvitalitätsmessungen mit hBMSC

In den Mitochondrien vitaler Zellen erfolgt die Umsetzung des roten Tetrazoliumsalzes WST-1 zu orange-gelbem Formazan. Die Orangefärbung und damit die Zunahme der optischen Dichte der Zellsuspension kann bei einer Wellenlänge von 450 – 630nm bestimmt werden. Da avitale Zellen den Farbstoff nicht umsetzen können, korreliert die Anzahl vitaler Zellen mit

Extinktionserhöhung bei 450nm, die gegen eine Referenzwellenlänge von 690nm im Multi-well-Photometer gemessen wurde.

Frisches, heparinisiertes Knochenmarkaspirat wurde ficolliert und wie in 2.1.4 beschrieben in 96 wellplates (200 μ l/well) geben. Die Zellen wurden mindestens drei Wochen und höchstens fünf Wochen lang bei 37°C bei 5%CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Es wurden nur Experimente mit 96-well-plates durchgeführt, bei denen die hBMSC über 80% der Wellfläche bedeckten. Die Reinheit der hBMSC wurde mikroskopisch sichergestellt. Nach zweitägiger Inkubation mit dem jeweiligen Zytostatikum wurde WST-1 im Verhältnis 1:10 (20 μ l) zugeben. Nach drei Stunden erfolgte die Analyse bei 450 gegen 630 nm im Photometer. Die Analyse beinhaltete eine Messung von Kontrollen (Färbung nicht behandelter Zellen) und Blanks (Färbung von Medium).

2.3 Durchflusszytometrische Analysen

2.3.1 AnnexinV/Propidiumjodid Apoptose Assay

In vitalen Zellen besteht eine ausgeprägte Asymmetrie der Zellmembran; Phosphatidylserin kommt in vitalen Zellen nur auf der Innenseite der Zellmembran vor. Zu Beginn von in Apoptose gehenden Zellen verliert die Membran ihre Asymmetrie und es kommt es zu einem „Flip-Flop“ der Membranlipide, d.h. Phosphatidylserin wird auch auf die Außenseite der Zellmembran verschoben. AnnexinV vermag an der Zelloberfläche an dieses Phosphatidylserin binden. Durch Koppelung von AnnexinV mit Flourescein-thioisocyanat (FITC), welches von einem Argonlaser bei einer Wellenlänge von 488nm angeregt werden kann, wird die Emmission des FITC-Moleküls bei einer Wellenlänge von 518nm im Durchflusszytometer gemessen.

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

Durch Kombination der beiden Färbungen können 2 Stadien des Zelluntergangs beschrieben werden (Abb. 2.1):

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

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

Binding Buffer: 10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4

140 mM NaCl

2,5 mM CaCl₂

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

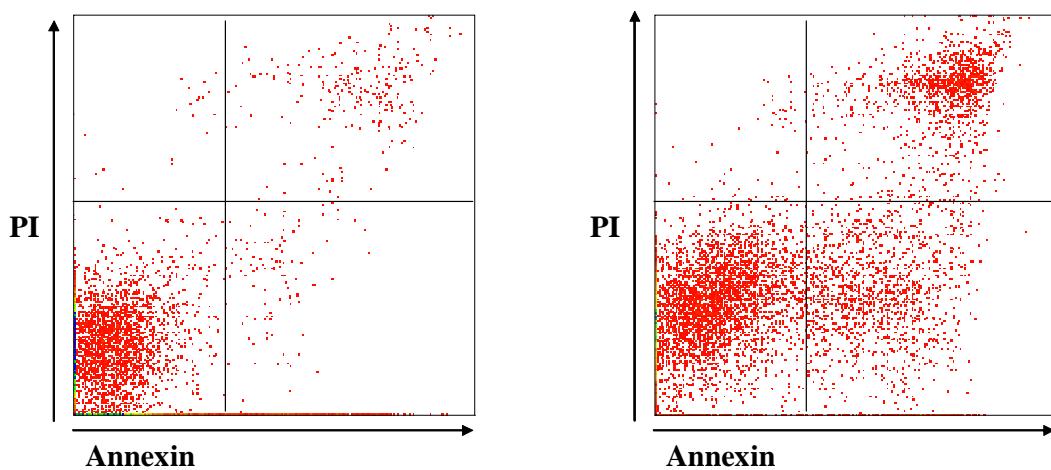


Abbildung 2.1: Das Annexin-PI Apoptose Assay. NCI-H929-Zellen nach 48-stündiger Kultur als Kontrolle (linkes Bild) oder Inkubation mit 30 µM Melphalan (rechtes Bild). Die Abbildung zeigt eine deutliche Verlagerung der Zellen vom Annexin/PI-negativen Bereich über den Annexinpositiven (frühe Apoptose) in den Annexin/PI-positiven Bereich (späte Apoptose). (Annexin-V-FITC = FL1, Propidiumjodid = FL3)

2.3.2 Analyse der Oberflächenexpression

Bei der Oberflächenmarkermessung werden Zellen mit einem monoklonalen Antikörper markiert, der seinerseits mit FITC (Flourescein-thiocyanat) oder PE (Phycoerythrin) markiert ist. Auf diese Weise kann mit dem Durchflusszytometer, welches die Farbintensität misst, auf die Oberflächenexpressionstärke eines Antigens auf der Zelloberfläche geschlossen werden.

4 – 5 x 10⁵ Zellen wurden bei 1500U/min, 8°C, 6 Minuten lang abzentrifugiert und nach Abschütteln des Überstandes zweimal mit kaltem PBS gewaschen und dann in 1ml kaltem PBS resuspendiert. 100 µl dieser Zelllösung wurden mit 10µl der Antikörperlösung für 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml kaltem PBS und nochmaligem zentrifugieren (1500 U/min, 6 min, 8°C) wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 400 µl PBS resuspendiert. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer.

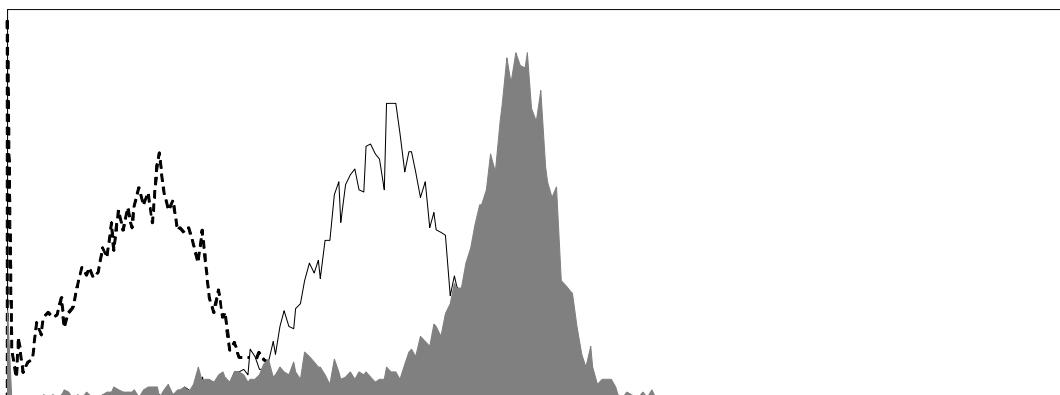


Abbildung 2.2: Oberflächenmarkermessung. Die Abbildung zeigt die relative Expressionsstärke von CD38 (durchgezogene Linie) und CD138 (grau hinterlegt) und die Isotypkontrolle (gestrichelt) der Myelomzelllinie OPM-2.

2.3.3 Zytotoxizitäts-Assay unter Kokulturbedingungen

Zu Beginn eines Kokulturexperiments mussten die HS-5-Stromazellen für das Experiment vorbereitet werden. Dafür wurden die HS-5 Zellen trypsinisiert: Aus der zu trypsinisierenden HS-5-Kultur wurde das überstehende Kulturmedium abgenommen und anschließend 5 ml der Trypsinlösung zugegeben und bei 37 Grad Celsius für 5 Minuten inkubiert und anschließend deren Ablösung vom Kulturflaschenboden im Mikroskop kontrolliert. Nach Zugabe von 20ml Medium (RPMI1640 + 20% FCS) wurden die Zellen bei 1500U/min, 8 Grad Celsius, 10

Minuten lang abzentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes zweimal mit PBS gewaschen, in Medium resuspendiert und die Zellkonzentration bestimmt. Danach wurden die Zellen mit Medium verdünnt, in einer Konzentration von 10^4 Zellen/well in die 6-wellplates transferiert und in 3ml Medium (RPMI 1640 + 20% FCS) resuspendiert. Für die Myelom-Knochenmarkstroma-Kokultur wurden die HS-5-Zellen so lange inkubiert, bis der Monolayer aus HS-5 Zellen 80% der Oberfläche des Wells bedeckte, mindestens jedoch 3 Tage (Methode nach Lokhorst et al., 1994).

Nach mindestens drei Tagen wurden pro Well Myelomzellen in einer Konzentration von $0,5 \times 10^5$ /ml hinzugeben. Nach einer halbstündigen Inkubationszeit wurde entweder mit einem Signalwegsmodulator eine Stunde lang vorinkubiert oder das Zytostatikum hinzugeben.

Nach zwei oder vier Tagen wurden die Zellen mittels pipettieren oder Cellscraper vom Boden der Wells gelöst und abgeerntet. Nach einer weiteren Zellzahlbestimmung und ggf. Verdünnung wurden $4 - 5 \times 10^5$ Zellen bei 1500U/min, 8 Grad Celsius, 6 Minuten lang abzentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes zwei mal mit kaltem PBS gewaschen und dann in 0,5ml kaltem PBS resuspendiert. 100 μ l dieser Zelllösung wurden mit 10 μ l der Antikörperlösung (CD38-FITC, CD38-PE oder CD138-FITC) für 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml kaltem PBS und nochmaliger Zentrifugation (1500 U/min, 6 min, 8 Grad Celsius) wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 100 μ l PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 10 μ l PI und 400 μ l PBS wurde die Zelllösung innerhalb einer Stunde im Coulter Epics-XL durchfluszytometrisch analysiert. Zur Analyse wurden die Kanäle FL1 (FITC – Antikörper) und FL3 (Propidiumjodid) verwendet.

2.4 Western Blotting

Der Western Blot wurde zum Nachweis eines Proteins in der Zelle herangezogen. In einem mehrschrittigen Verfahren wurden verschiedene Proteine mittels Chemoluminiszenz nachgewiesen.

Zellyse

10^7 Zellen wurden drei Tage lang in Anwesenheit oder Abwesenheit der Stromazelllinie HS-5 in Medium (RPMI 1640 + 20 % FCS) inkubiert und dann

geerntet. Die Myelomzellen in der Kokultur wurden mittels pipettieren von dem Monolayer der HS-5-Zellen abgetrennt. Die Reinheit der Myelomzellen wurde anschließend durch Anfärbung mit CD38-FITC-Antikörper durchflußzytometrisch bestimmt und lag über 80%. Die Zellen wurden bei 1500U/min, 8°C, 6 Minuten lang abzentrifugiert und nach Abschütteln des Überstandes zweimal mit kaltem PBS gewaschen und dann in 1ml kaltem PBS resuspendiert. Diese Zelllösung wurde nochmals im bei 2500U/min sechs Minuten lang abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend folgte die Zugabe von 100µl Zelllysepuffer:

- Zelllysepuffer:

Aqua dest (8,18ml), Tris (250µl, 1M, pH7,6), NaF(100µl, 1M), EDTA (200µl, 0,5M), Aprotinin (50µl, 2,1 mg/ml) Leupeptin (20µl, 5 mg/ml), PMSF (100µl, 100mM), Na₃VO₄ (100µl, 100mM).

Nach der Homogenisierung der Zellen im Homogenisator wurden 10µl NP-40 (10%) dazugeben und die Proben bei 4°C 15 Minuten geschwenkt.

Danach erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration. Hierfür wurde zu 2µl Proteinlösung 800µl Aqua dest. und 200µl eines Jod-Färbeagens (Bio-Rad®) zugegeben.. Die Proteinkonzentration wurde im Photometer gegen einen Nullwert bestimmt.

Gelelektrophorese

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

- Separating Gel (15%): 24% Aqua dest., 25% Tris 1,5M pH8,8, 49% Acrylamid (30%), 0,01% APS 10%, 0,0006% Temed.
- Separating Gel (12%): 35% Aqua dest., 25% Tris 1,5M pH8,8, 39% Acrylamid, 0,01% APS 10% , 0,0006% Temed.

Die Gelkammern wurden zu $\frac{3}{4}$ mit der jeweiligen Gellösung gefüllt und anschließend mit 500 μ l Isopropanol überschichtet und 30 Minuten stehen gelassen. Nach einer halben Stunde wurde das Isopropanol abgegossen und die Gelkammern viermal mit Aqua dest. gereinigt und getrocknet.

Danach erfolgte die Zugabe des Stacking Gels:

- 64% Aqua dest.; 27% Tris 1,5M pH8,8; 13,5% Acrylamid; 0,01% APS 10%; 0,0006% Temed.

Nach Zugabe des Stacking Gels wurde die Kämme bis zur Auspolymerisierung (45 Minuten) in die Kammern gesteckt. Die Gele wurden anschließend in die Elektrophoreseebehälter gestellt und diese mit Running buffer gefüllt. Nach Herausnahme der Kämme wurden die Geltaschen gründlich mit Running Buffer gespült und mit 20 μ l Proteinlösung bzw. 10 μ l Marker gefüllt. Die angelegte Spannung betrug, solange sich das Protein im Stacking Gel befand, 80V, nach Erreichen des Separation Gels wurde sie auf 100V erhöht.

Blotting

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

Zum Transfer der Proteine auf die Membranen wurden diese in Methanol 100%, ddH₂O, und Transferbuffer getränkt. Anschließend wurden die Gele auf die Membranen zwischen Filterpapiere und Schwämme gelegt, in die Transferbehälter gesetzt und bei 23V über 12 Stunden bei 8°C inkubiert.

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

Proteinnachweis

Der Proteinnachweis basiert auf einem mehrschrittigen Verfahren, bei dem ein Primärantikörper an das Protein auf der Membran bindet, ein Sekundärantikörper

wiederum an dem Primärantikörper bindet, welcher mit einer Peroxidase konjugiert ist und so mittels Chemoluminiszenz nachgewiesen werden kann.

Im Einzelnen wurden die Membranen zuerst luftgetrocknet. Um unspezifische Bindungen der spezifischen Antikörper zu Verringern wurden die Membranen 60 Minuten lang mit einer Magermilchpulverlösung (5g Magermilchpulver, aufgelöst in 100ml PBS-T (1l PBS und 0,5ml Tween20)) inkubiert, und anschließend viermal kurz mit PBST gespült. Daraufhin wurden die Membranen 10 Minuten lang mit PBST gewaschen.

- PBST-puffer:
NaCl 8 g
KCl 0,2 g
Na₂HPO₄ 1,44 g
KH₂PO₄ 0,24g
H₂O 1l

Der primäre Antikörper (Liste der verwendeten Antikörper siehe Anhang) wurde 1:1000 mit PBST verdünnt und 60 Minuten lange auf einem Schüttler mit den Membranen inkubiert. Anschließend wurden nicht gebundene Antikörper mit PBST (4-mal für jeweils 10 Minuten) abgewaschen.

Der sekundäre Antikörper wurde 1:2000 mit Blocking-Lösung verdünnt und für 60 Minuten auf dem Schüttler (10/min) auf die Membranen geben. Die Antikörper-Milchpulver-Lösung wurde mit PBST (siehe oben, wonach wieder viermal 10 Minuten lang) abgewaschen.

Anschließend wurden jeweils 3 ml der 2 ECL Lösungen auf die Membranen geben und nach kurzer Zeit die Chemoluminiszenz der Banden mit Röntgenfilmen festgehalten.

Membran-Stripping

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

- Stripping-Puffer:
Tris 7,56g
SDS 20 g

H₂O 1 l

Hierbei wurden die Membranen im Stripping Puffer 35 Minuten lang bei einer Wasserbadtemperatur von 57C° inkubiert und anschließend in insgesamt drei Waschvorgängen mit PBS-T gespült. Anschließend wurde der Proteinnachweis wie oben geschildert durchgeführt. und nach 2 Waschschritten mit 10 – 15% Milchpuffer geblockt.

2.5 Statistik

In den Abbildungen werden die Mittelwerte mit den Standardabweichungen gezeigt. Die deskriptive Statistik wurde mittels Excel ausgewertet und die statistische Signifikanz mit dem Kruskal-Wallis-Test berechnet.

P < 0.05 wurde als statistisch Signifikant angesehen.

3. ERGEBNISSE

Zur Untersuchung der primären Chemoresistenz beim Myelom musste ein Zellkulturmodell etabliert werden, welches die Verhältnisse des Microenvironments adäquat widerspiegelt. Ziel war es, ein Kokulturmmodell zu untersuchen, in welchem sowohl primäre Stromazellen als auch HS-5-Stromazellen mit Myelomzellen in Interaktion treten konnten und der Effekt von Zytostatika einerseits und die primäre Chemoresistenz andererseits greifbar wurden. Außerdem sollte sowohl die Zellkultur als auch die Auswertung am Durchflusszytometer einfach durchführbar sein.

Da bei dem oben beschriebenen Zellmodell auch die Stromazellen von den Zytostatika potentiell beeinflusst werden konnten, musste zu allererst untersucht werden, wie sensibel die Stromzelllinie HS-5 als auch die primären Stromazellen auf die Zytostatika reagieren. Damit sollten geeignete Zytostatikakonzentrationen gefunden werden, welche vor allem toxisch auf die Myelomzellen und weniger auf die Stromazellen wirken.

3.1 Etablierung eines Kokulturmmodells

3.1.1 Chemosensitivität von HS-5-Zellen

Für die Untersuchung der Chemosensibilität wurden die HS-5 Zellen vor Inkubation mit dem Chemotherapeutikum so lange kultiviert, bis der Boden der 6-well-plates zu 80% - 90% mit Zellen bedeckt war, mindestens jedoch 72 Stunden lang. Anschließend wurden die Zellen 48 Stunden lang mit dem Zytostatikum inkubiert, dann durch Pipettieren von den Zellkulturplatten abgelöst und mit Propidiumjodid gefärbt. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

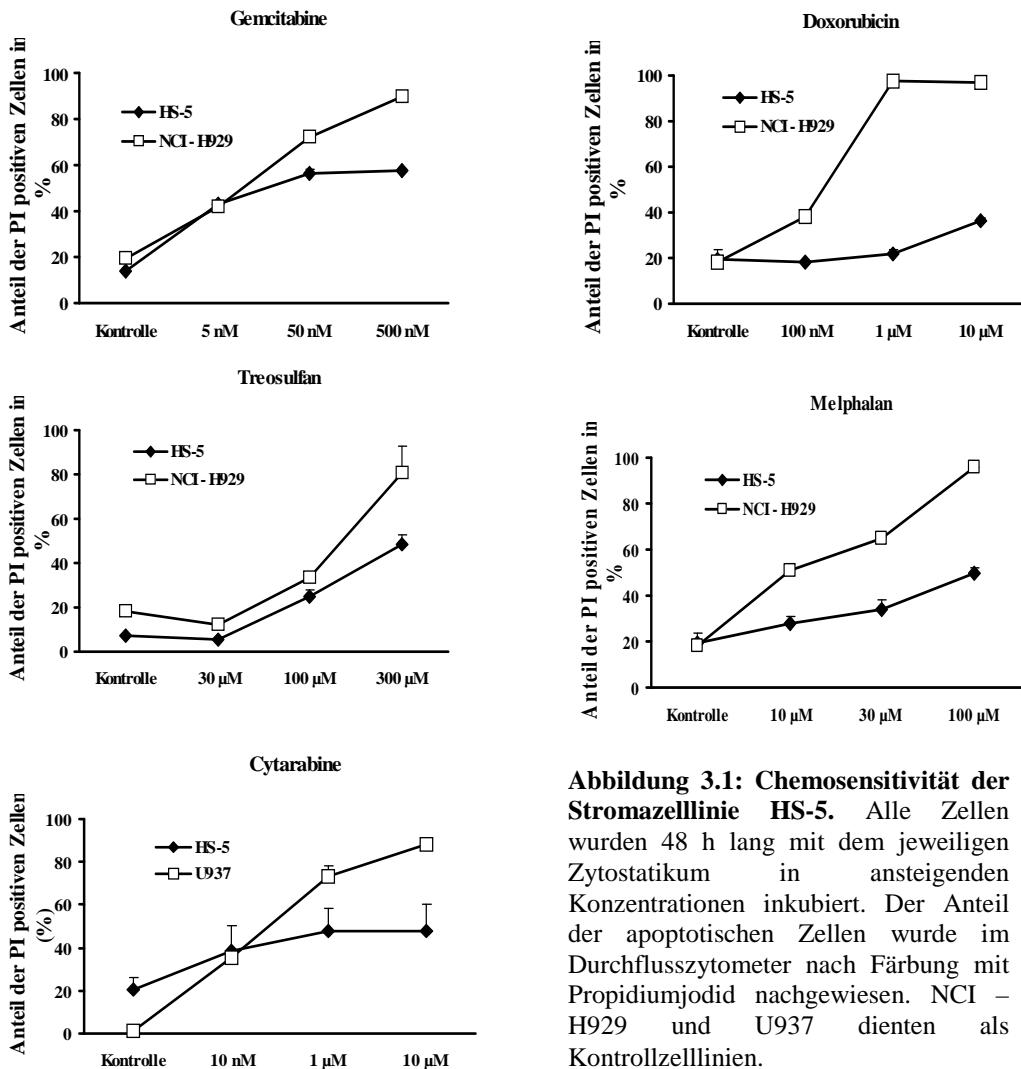


Abbildung 3.1: Chemosensitivität der Stromazelllinie HS-5. Alle Zellen wurden 48 h lang mit dem jeweiligen Zytostatikum in ansteigenden Konzentrationen inkubiert. Der Anteil der apoptotischen Zellen wurde im Durchflusszytometer nach Färbung mit Propidiumjodid nachgewiesen. NCI – H929 und U937 dienten als Kontrollzelllinien.

Abbildung 3.1 zeigt, dass HS-5 Stromazellen gegenüber den Zytostatika unempfindlicher sind als die Kontrollzelllinien NCI-H929 und U937. Die Alkylantien Melphalan und Treosulfan führen zu einem weitgehend linearem Anstieg der Apoptoseraten bei Dosisescalation, während es bei Doxorubicin, Cytarabin und Gemcitabin zu einer Plateaubildung der Apoptose kommt.

3.1.2 Chemosensitivität von primären Stromazellen (hBMSC)

Wie für die HS-5 Zellen sollte auch für primäre Stromazellen die Chemosensitivität bestimmt werden. Mononukleäre Zellen aus Knochenmarksaspiraten wurden in 96-well-plates solange kultiviert, bis 90% des Wellbodens mit Stromazellen bedeckt waren. Während der mehrwöchigen Kultur wurde regelmäßig alle sieben Tage das Medium gewechselt.

Tabelle 4.1 zeigt die Patientencharakteristika eingeschlossenen Patienten. Dabei handelte es sich überwiegend um Patienten mit multiplen Myelom.

| PATIENT NR. | ALTER/ GESCHLECHT | DIAGNOSE | BISHERIGE ZYTOSTATISCHE THERAPIE |
|-------------|----------------------|-------------------------|---|
| 1 | 75/ weiblich | Multiples Myelom | 3xVAD, 1xEC, 2xHD-Melphalan |
| 2 | 77/weiblich | MGUS | - |
| 3 | 51/weiblich | Multiples Myelom | 4x ID, 1xIEV, 2xHD-Melphalan |
| 4 | 29/weiblich | ALL | Induktionstherapie nach dem GMALL-Protokoll |
| 5 | 51/männlich | Multiples Myelom | 6xVAD |
| 6 | 50/männlich | Multiples Myelom | Keine |
| 7 | 51/männlich | Multiples Myelom | 6 x VAD |
| 8 | 51/männlich | Multiple s Myelom | z.Z. Diagnose |

Tabelle 3.1: Grunderkrankungen der Patienten, welche Knochenmarkaspirat zur Verfügung gestellt haben. VAD(Vincristine, Doxorubicine, Dexamethason), EC(Etoposid,Cyclophosphamid), HD-Melphalan (Hochdosis-Melphalan mit autolog. Stammzelltherapie), GMALL (Methotrexat, Cyclophosphamid, Dexamethason, Vincristin, Daunorubicin, Asparaginase, Cytarabin, 6-Mercaptourin)

Vor den Versuchen wurden durch Pipettieren und Spülen mit Medium die restlichen adhärenten Zellen von den hBMSC gelöst und entfernt. Die Inkubation mit dem jeweiligen Zytostatikum erfolgte über 48h im 96-well-Kulturgefäß. Die Zellvitalität wurde nach Zugabe von WST-1 und einem dreistündigem Inkubationsschritt photometrisch bestimmt.

Abbildung 3.2 zeigt, dass die hBMSC deutlich weniger sensibel auf Zytostatika reagieren als die Kontrollzelllinien NCI-H929 und U937. Analog zu den HS-5-Zellen fällt auf, dass vor allem die Alkylantien Melphalan und Treosulfan die Apoptoseraten von hBMSC durch Dosissteigerung linear steigern können. Bei Cytarabine, Doxorubicin und Gemcitabine dagegen kommt es zu Plateaubildung.

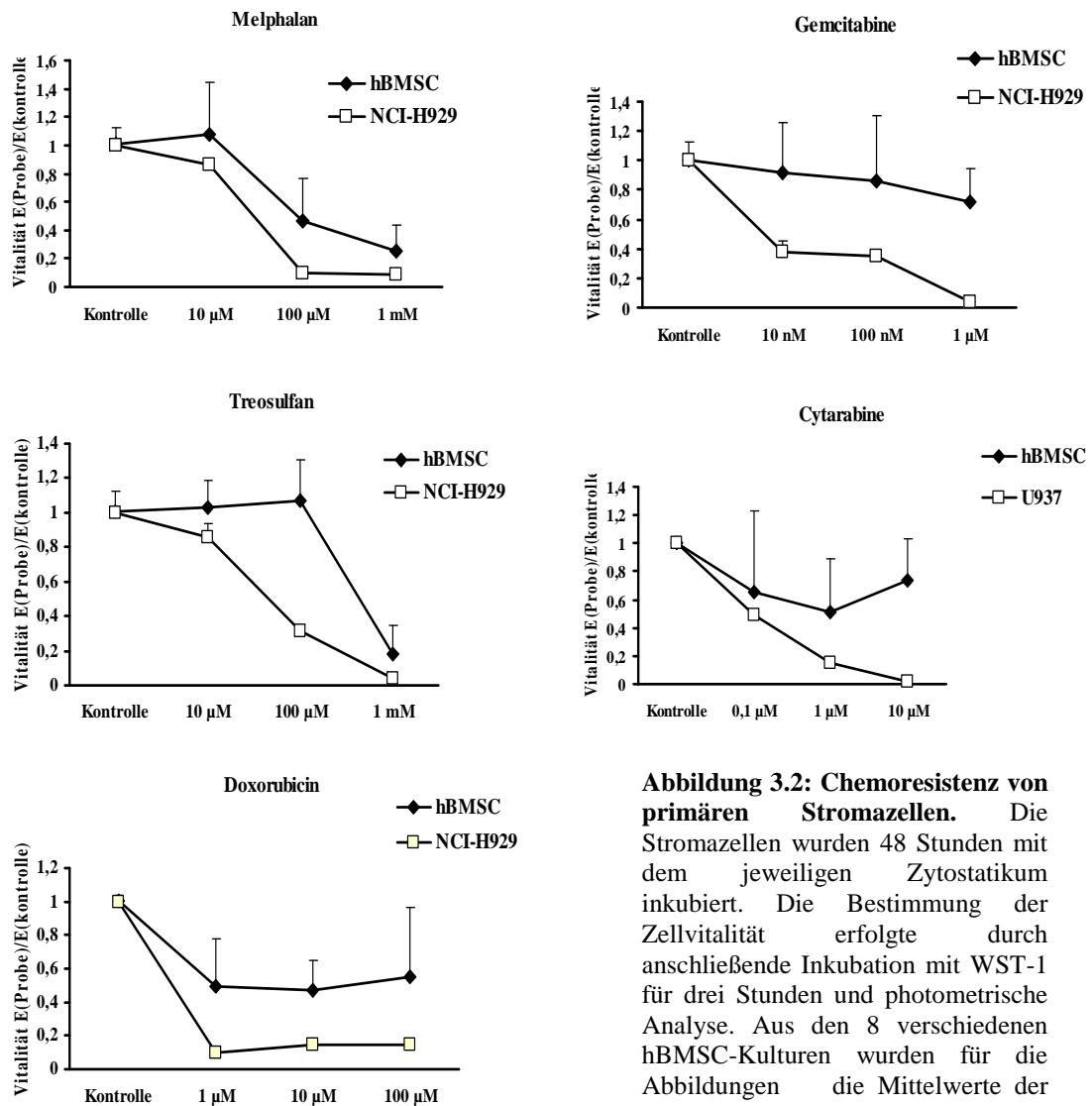


Abbildung 3.2: Chemoresistenz von primären Stromazellen. Die Stromzellen wurden 48 Stunden mit dem jeweiligen Zytostatikum inkubiert. Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte durch anschließende Inkubation mit WST-1 für drei Stunden und photometrische Analyse. Aus den 8 verschiedenen hBMSC-Kulturen wurden für die Abbildungen die Mittelwerte der Apoptoseraten verwendet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl die Stromzelllinie HS-5 als auch die primären Stromzellen resistenter für eine Zytostatikawirkung sind als Myelom- oder Leukämiezelllinien und somit für ein Kokulturmmodell geeignet sind, an dem primäre Chemoresistenz untersucht wird.

Zur weiteren Entwicklung des Kokulturmmodells wurden sowohl die Dauer der Kokultivierung, die verwendeten Zellkonzentrationen als auch die verwendeten Zytostatikakonzentrationen variiert und auf ein Optimum für die durchzuführenden Experimenten eingestellt. (Näheres unter 2.3.3 im Methodenteil)

3.1.3 Durchflusszytometrische Analyse der Kokulturexperimente

Nach dem Ansetzen einer Kokultur wurden die Zellen nach 48h oder 96h geerntet und wie im Methodenteil beschrieben für die durchflusszytometrische Analyse vorbereitet. Dabei wurden die Zellen mit Propidiumjodid gefärbt um späte, irreversible Apoptose zu detektieren. Außerdem erfolgte die Färbung mit einem FITC-konjugierten Antikörper, mit dem man beide Zelltypen im Durchflusszytometer voneinander trennen konnte. Dies war entweder CD38-FITC oder auch CD138-FITC, beides Marker, die auf Stromazellen nicht exprimiert werden. Bei der durchflusszytometrischen Analyse wurden dann die Zellen mittels mehrerer „Gates“ in CD38-(oder CD138)-positive- und negative Zellen eingeteilt.

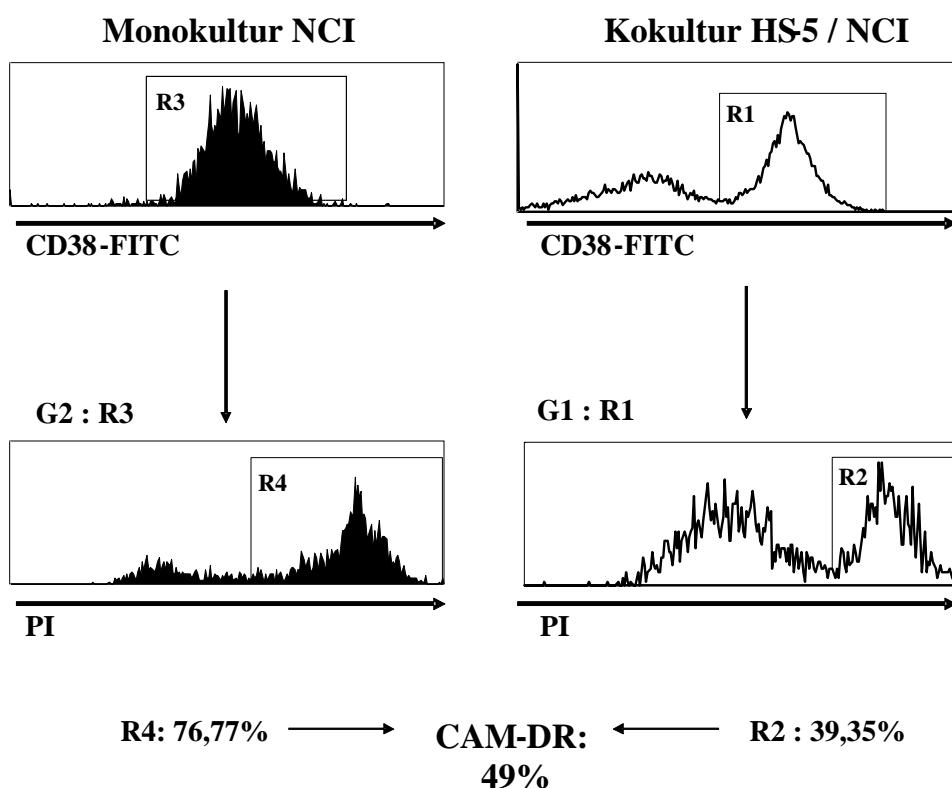


Abbildung 3.3 Zytotoxizitäts-Assay unter Kokulturbedingungen Die Abbildung zeigt den Verfahrensweg einer Kokulturmessung am EPICS Coulter XL. Die Zellauf trennung erfolgte durch eine Antikörpermarkierung, meist mit CD38-FITC. Durch das Setzen verschiedener „Gates“(z.B. R1, R2, R3 und R4, siehe Abbildung) können verschiedene Zellgruppen (CD38-negative oder – positive, PI-negative oder –positive) getrennt voneinander analysiert und quantifiziert werden. Im Zytotoxizitätsassay unter Kokulturbedingungen konnten die Apoptoseraten der CD38 -positiven Zellfraktion und selektiv deren PI-positivität bestimmt werden. Aus den bestimmten Werten errechnet sich dann CAM-DR:

$$(Apoptose d. Monokultur - Apoptose d. Kokultur) \times 100 / Apoptose d. Monokultur$$

Von der CD38-positiven Population konnte dann die PI-positivität und damit der Anteil apoptotischer Zellen bestimmt werden. Die Apoptoseraten der CD38-positiven Population der Mono- und Kokulturen wurde miteinander verglichen und der CAM-DR-Index bestimmt. Dieser Wert ergibt sich aus der prozentualen Abnahme der Apoptoserate in der Kokultur im Vergleich zur Monokultur und sagt aus, wie stark die Myelomzellen vor Apoptose geschützt werden.

3.1.4 Validität des Zellmodells

Da es sich bei den im Kokulturmödell verwendeten Stromazellen um eine Zelllinie handelt und nicht um primäre Stromazellen eines Patienten, musste gezeigt werden, dass sowohl die HS-5-Zellen als auch die hBMSCs den selben, in der oben vorgestellten durchflusszytometrischen Analyse nachweisbaren Effekt auf die Myelomzellen haben.

Primäre Stromazellen (hBMSC) wurden aus ficolliertem Knochenmarksaspirat gewonnen und so lange in 6-well-plates kultiviert, bis 80% - 90% des Kulturgefäßes mit Zellen bedeckt war, jedoch mindestens drei, maximal fünf Wochen. Dies gelang fast immer. Nach Zugabe von 2×10^5 /ml Myelomzellen und 30 μ M Melphalan wurde die Kokultur 48h inkubiert. Anschließend wurden die Myelomzellen durch pipettieren geerntet, mit CD38 – FITC und PI gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen und ausgewertet.

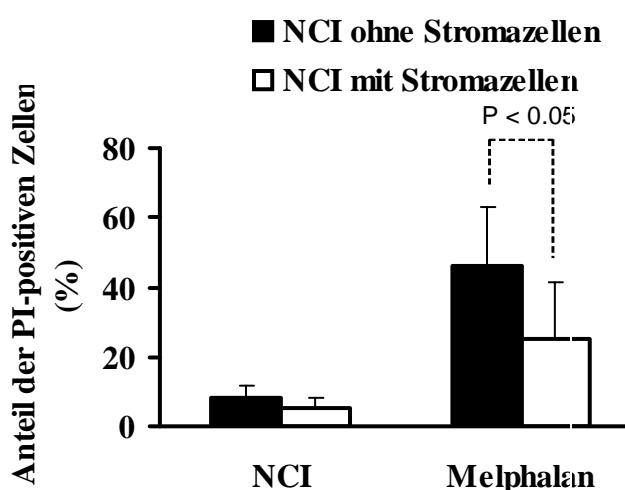


Abbildung 3.4 Kokultur mit primären Stromazellen führt zu Apoptosereduktion. NCI-H929 wurden über einen Zeitraum von 48h in An- oder Abwesenheit von primären Stromazellen mit 30 μ M Melphalan kultiviert. Nach Färbung mit CD38-FITC und PI wurde der Anteil der CD38- und PI-positiven Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Die Mittelwerte und hBMSCs stammen von 3 verschiedenen Experimenten und Patienten.

Abbildung 3.4 zeigt, dass in der Kokultur mit primären Knochenmarksstromazellen CAM-DR auftritt. Hier kommt es zu einer Inhibition des Zelltodes um 37%.

Ebenso wurde dasselbe Experiment mit gleicher Zell- und Zytostatikakonzentration, gleichen Inkubationszeiten und gleicher Auswertung mit HS-5-Zellen statt hBMSC durchgeführt. Dies führte wie bei den Experimenten mit hBMSC zu einer starken Apoptosereduktion um bis zu 50%.

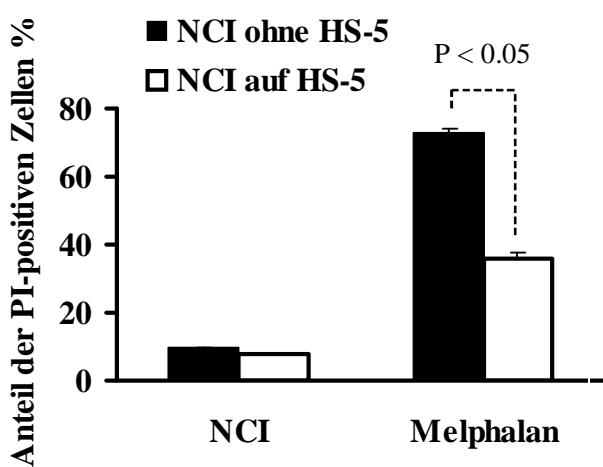


Abbildung 3.5: Kokultur mit HS-5-Stromazellen führt zu Apoptosereduktion. NCI-H929 wurden über einen Zeitraum von 48h in An- oder Abwesenheit von HS-5-Stromazellen mit 30 μ M Melphalan kultiviert. Nach Färbung mit CD38-FITC und PI wurde der Anteil der CD38- und PI-positiven Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Die Mittelwerte stammen von 3 verschiedenen Experimenten. Es wurden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung verwendet.

Mit diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass HS-5-Zellen genauso wie primäre Stromazellen denselben antiapoptotischen Effekt in den Myelomzellen induzieren.

Somit bietet das HS-5-Kokulturmodell eine sehr gute und einfach durchführbare Möglichkeit, Interaktionen zwischen Stromazellen und Myelomzellen und damit CAM-DR zu untersuchen.

3.2 Zelladhäsions-vermittelte Chemoresistenz (CAM-DR)

Im folgenden Kapitel wird die zelladhäsionsvermittelte Chemoresistenz charakterisiert und versucht, die ihr zugrunde liegenden Mechanismen aufzudecken.

3.2.1 Auftreten von CAM-DR bei verschiedenen Zytostatika

Zuerst bestand die Frage, ob CAM-DR spezifisch nur bei einem Zytostatikum auftritt oder ob CAM-DR ein genereller Schutzmechanismus der Zelle ist, der bei

verschiedenen Zytostatika mit verschiedenen Wirkungsmechanismen beobachtet werden kann.

Für die Beantwortung dieser Frage wurden HS-5-Zellen solange in 6-well-plates vorinkubiert, bis 80% - 90% des Zellkulturgefäßes bedeckt waren, mindestens jedoch drei Tage lang. Anschließend wurden die NCI-H929 und das jeweilige Zytostatikum (Melphalan, Treosulfan, Doxorubicin oder Gemcitabine) dazugegeben. Die Messung und Auswertung erfolgte nach 48 Stunden durch Doppelfärbung mit CD38-FITC und PI im Durchflusszytometer.

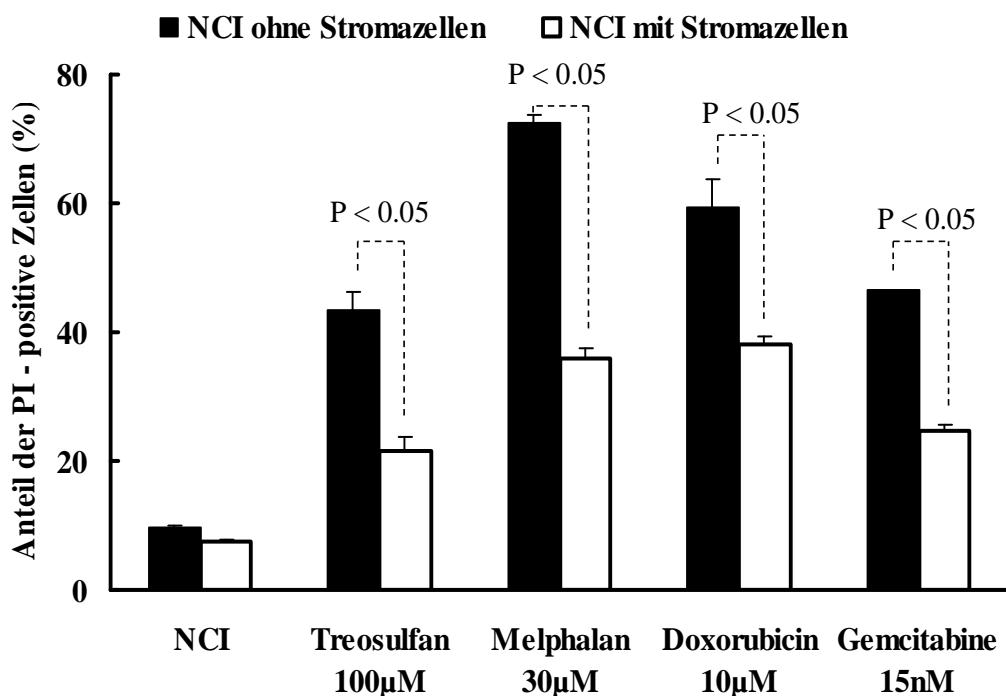


Abbildung 3.6: CAM-DR ist nicht substanzspezifisch. NCI-H929 wurden über 48h mit Melphalan 30 μ M, oder Treosulfan 100 μ M, oder Doxorubicine 10 μ M oder Gemcitabine 15nM oder nur Medium in An- oder Abwesenheit von HS-5-Stromazellen kultiviert. Die Bestimmung der PI-positiven Zellen erfolgte im Durchflusszytometer. Es wurden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung verwendet.

Sowohl bei dem wichtigsten Medikament für die Therapie des Plasmozytoms, Melphalan, wie auch bei Doxorubicin, Gemcitabine und Treosulfan, tritt eine deutliche Verminderung der Apoptose durch Kokultivierung auf Stromazellen auf. Die Konzentrationen der Chemotherapeutika führen bei den Versuchsansätzen ohne Stromazellen zu einer deutlichen Apoptoseinduktion, welche bei den Ansätzen mit Stromazellen stark vermindert ist (Melphalan: 57%, Treosulfan: 63%, Doxorubicin: 42% und Gemcitabine: 58%).

Hiermit wird deutlich, dass CAM-DR nicht spezifisch für ein Zytostatikum oder eine Gruppe von Zytostatika ist. Vielmehr handelt es sich hier um eine Resistenz gegenüber vielen verschiedenen toxischen Substanzen.

3.2.2 Auftreten von CAM -DR bei verschiedenen Myelomzelllinien

Da zunächst der antiapoptotische Effekt nur bei einer Myelomzelllinie gezeigt wurde, bestand die Frage, ob es sich bei CAM-DR um einen spezifischen Effekt der NCI-H929-Zellen oder einen allgemeinen Schutzmechanismus bei vielen Myelomzelllinien handelt.

Dafür wurden die HS-5 vorkultiviert und anschließend NCI-H929, OPM-2, RPMI-8226 und U266 und Melphalan 30 μ M zugegeben. Die Messung und Auswertung erfolgte nach 48 Stunden durch Doppelfärbung mit CD38-FITC und PI im Durchflusszytometer.

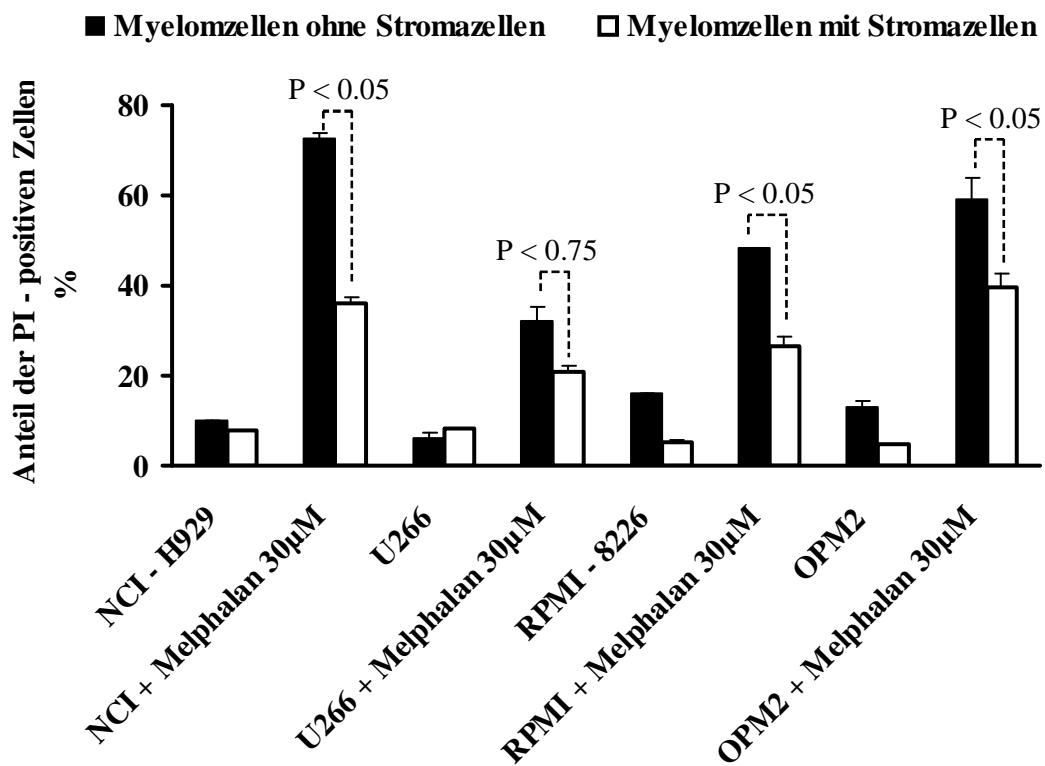


Abbildung 3.7 CAM-DR ist nicht zelllinienspezifisch. Die vier Myelomzelllinien wurden 48h lang in An- oder Abwesenheit von HS-5-Stromazellen mit 30 μ M Melphalan inkubiert. Die Myelomzellen wurden mit CD38-FITC oder CD138-FITC gefärbt und der Anteil der PI-positiven Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Es wurden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung verwendet.

Bei allen der vier Myelomzelllinien (NCI-H929, OPM-2, U266 und RPMI-8226) kommt es beim Standardmedikament Melphalan zum Auftreten von CAM-DR, wenn diese in Gegenwart von Stromazellen kultiviert werden. Am stärksten zeigt sich dieser Effekt bei den NCI-H929 mit 50% Apoptosereduktion. Auch bei den anderen Zelllinien (U266: 35%, RPMI-8226: 45%, OPM-2: 33%) ist der antiapoptotische Effekt stark ausgeprägt. Bei den U266- und RPMI- Zellen ist auch die Monokultur gegenüber dem Zytostatikum relativ resistent. Dies könnte daran liegen, dass U266-Zellen vollkommen und RPMI-Zellen teilweise bereits auf Plastik adhärieren.

3.2.3 CAM-DR ist abhängig von der Dauer der Kokultivierung

Der Kontakt von Myelomzellen mit den Stromazellen führt bei den Myelomzellen bei Zytostatikainkubation zu verminderten Apptoseraten. Folglich wurde der Frage nachgegangen, in wie weit die Dauer der Kokultivierung für das Überleben der Myelomzellen wichtig ist und ab wann dieses Signal zu keinem antiapoptotischen Effekt mehr führt.

Für dieses Experiment wurden NCI-H929 Zellen in 30 μ M melphalanhaltigem Medium insgesamt 48h lang kultiviert. Zu bestimmten Zeitpunkten (nach 12, 24 und 36 Stunden nach Beginn des Experiments) wurden die NCI-H929 aus der Monokultur für den Rest der 48h auf Stromazellen weiterkultiviert, also in eine Kokultur überführt. Die Messung und Auswertung erfolgte nach 48 Stunden durch Doppelfärbung mit CD38-FITC und PI im Durchflusszytometer.

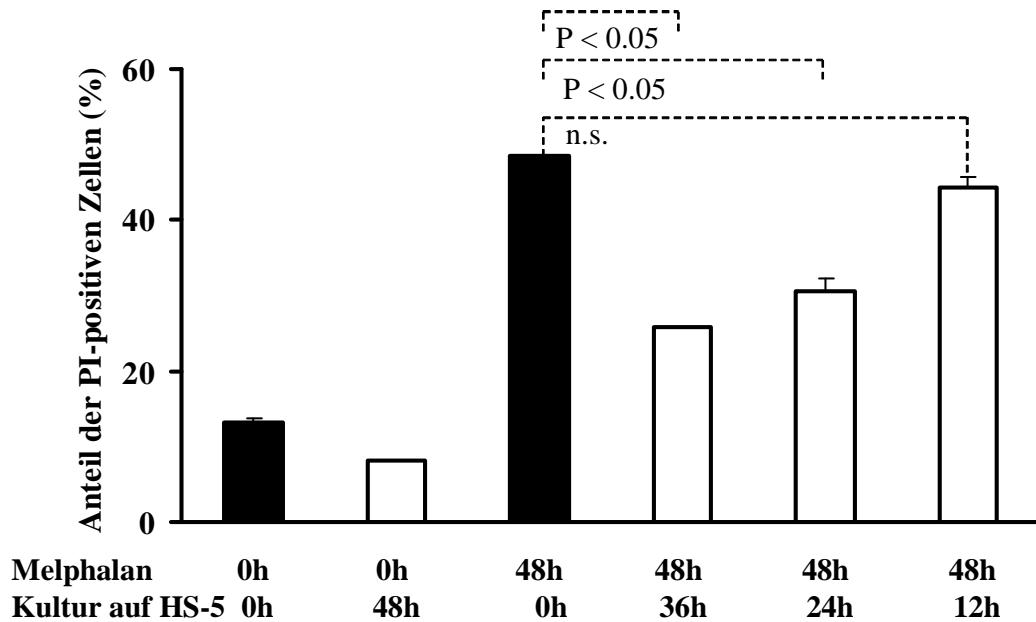


Abbildung 3.8: CAM-DR ist abhängig von der Dauer der Kokultivierung. NCI-H929 wurden über 48h mit 30 μ M Melphalan inkubiert und zu den angegebenen Zeitpunkten auf konfluente HS-5-Monolayer gegeben. Nach Doppelfärbung mit CD38-FITC und PI wurde der Anteil der nekrotischen Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Es wurden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung verwendet. „n.s.“ steht für „nicht signifikant“.

Wie Abbildung 3.8 zeigt, tritt CAM-DR auf, wenn die Myelomzellen 48, 36 und 24 Stunden auf Stromazellen kultiviert werden. Bei der Kokultivierung über 36 Stunden kommt es zu CAM-DR um 47%, über 24 Stunden zu CAM-DR um 37%. Bei nur 12-stündiger Kokultur mit Stromazellen ist fast kein antiapoptotischer Effekt mehr zu erkennen (9%).

3.2.4 Resistenz gegen Apoptoseinduktion bei Zytostatikabehandlung

Weiterhin wurde der Frage nachgegangen, durch welchen Mechanismus die Myelomzellen vor dem Zelltod gerettet werden.

Prinzipiell gibt es für eine Zelle zwei Möglichkeiten für einen Zelluntergang: Nekrose und Apoptose. Während es sich bei der Nekrose um einen passiven Vorgang handelt, bei dem die Zelle letztendlich untergeht und es zu einer Entzündungsreaktion kommen kann, stellt die Apoptose einen aktiven Vorgang dar, bei dem es zum „geordneten“ Zelluntergang über eine Signalkaskade kommt. Dabei ist im Frühstadium der Apoptose die Zellmembran zwar noch intakt, jedoch geht die Membranasymmetrie verloren. Dies wird daran deutlich, dass Phosphatidylserin, welches bei der vitalen Zelle nur auf der Innenseite der Membran vorkommt, auf die Außenseite gekehrt wird. Damit wird die Zelle

anfärbbar für Annexin – V, da dieses in geeignetem Puffermilieu an Phosphatidylserin binden kann. Bei weiter fortgeschritten Apoptose/Nekrose kann Annexin-V-FITC dann über Membrandefekte in das Innere der Zelle vordringen und von innen an das Phosphatidylserin der Plasmamembran binden. Diese wird so auch bei später Apoptose/Nekrose Annexin-V-FITC – positiv. Mit dem nächsten Experiment sollte die Frage beantwortet werden, ob die Interaktion der Myelomzellen mit den Stromazellen zu einer Hemmung der frühen Apoptose führt.

Dafür wurden die HS-5-Zellen vorkultiviert und NCI-H929 und Melphalan 5 μ M für 48h zugegeben. Die Auswertung erfolgte mittels CD38-PE und Annexin – FITC sowie CD38-FITC und PI im Durchflusszytometer.

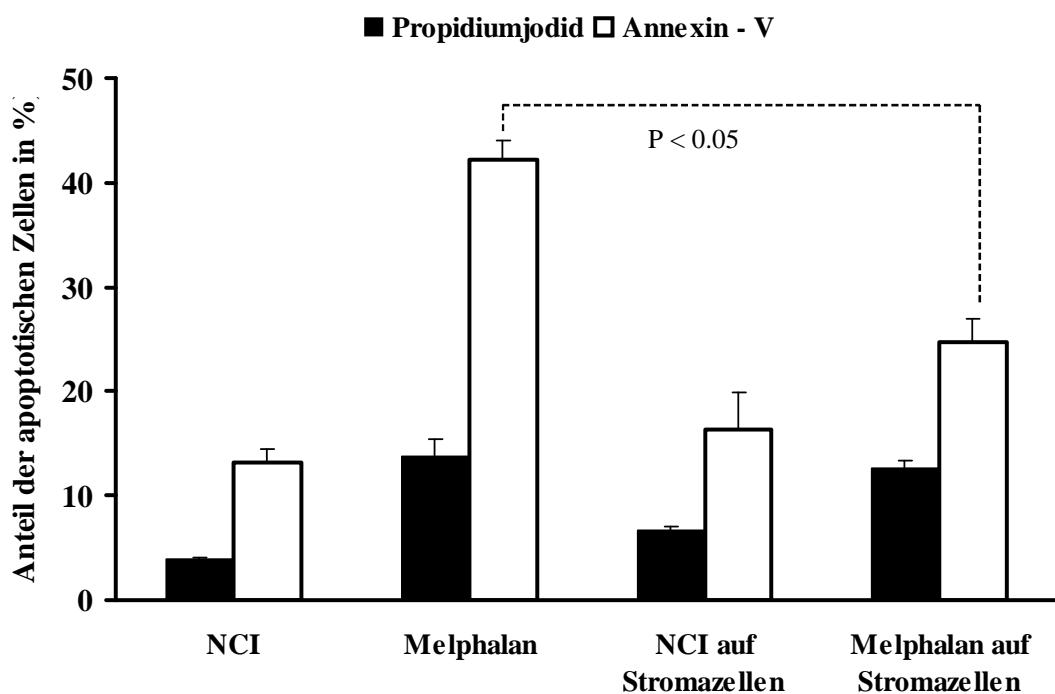


Abbildung 3.9: Adhärenz führt zur Reduktion der Apoptoseinduktion. NCI-H929 wurden über 48 Stunden in An- oder Abwesenheit eines konfluenter HS-5-monolayers mit Melphalan 5 μ M inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit CD38-PE gefärbt und der Anteil der apoptotischen Zellen mittels Annexin-V-FITC-Färbung im Durchflusszytometer bestimmt. Es wurden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung verwendet.

Stromazellen führen nicht nur zu einer Hemmung der späten (vgl. Abb. 3.6 und 3.7), sondern, wie hier gezeigt, auch zu einer Hemmung der frühen Apoptose um 41,5%, welche im Zellmodell mit 5 μ M Melphalan über 48 Stunden erreicht wird. Bei dieser Konzentration werden die Myelomzellen nur sehr gering PI – positiv, zeigen jedoch bereits Membransymmetrie als Frühstadium der Apoptose. Damit

wird klar, dass die der Stromazellinteraktion nachgeschalteten Mechanismen die Kaskade der Apoposeinduktion in den Myelomzellen hemmen.

3.2.5 Rolle der Cytokine bei CAM-DR

Bisher wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von Stromazellen in einer Kokultur, welche mit Zytostatika inkubiert wird, bei den Myelomzellen zu einer starken Apoptoseresistenz führt. Wie die Stromazellen die Signale übermitteln ist weiterhin unklar. Im Kokulturmodell gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten, wie Signale von Stromazellen an Myelomzellen geleitet werden können. Diese sind:

- Signaltransduktion durch lösliche Faktoren
- Signaltransduktion durch Integrine (Adhärenz)

Folglich musste die Rolle der Cytokine im Kokulturmodell erarbeitet werden.

HS-5-Zellen sezernieren viele Cytokine (Roecklein et al., 1995), wie z.B.:

- G – CSF
- GM – CSF
- M – CSF
- Makrophagen-inhibierendes-Protein-1-alpha
- SCF
- Leukämie inhibierender Faktor (LIF)
- Interleukin -11, -8, - 6, -1

Da Cytokine, allen vorangehend das Interleukin-6, in der Pathophysiologie des Multiplen Myeloms eine wichtige Rolle spielen, musste untersucht werden, ob CAM-DR auch besteht, wenn der direkte Zell-Zell-Kontakt der beiden Zelltypen aufgehoben ist.

Dafür wurden NCI-H929 auf einen vorinkubierten konfluenten HS-5-Monolayer gegeben und 5 µM Melphalan entweder direkt auf die Zellen oder in Inserts gegeben, welche den Zell-Zell-Kontakt aufheben, aber freien Stoffaustausch gewährleisten. Die Messung und Auswertung erfolgte nach 96 Stunden durch Doppelfärbung mit CD38-FITC und PI im Durchflusszytometer.

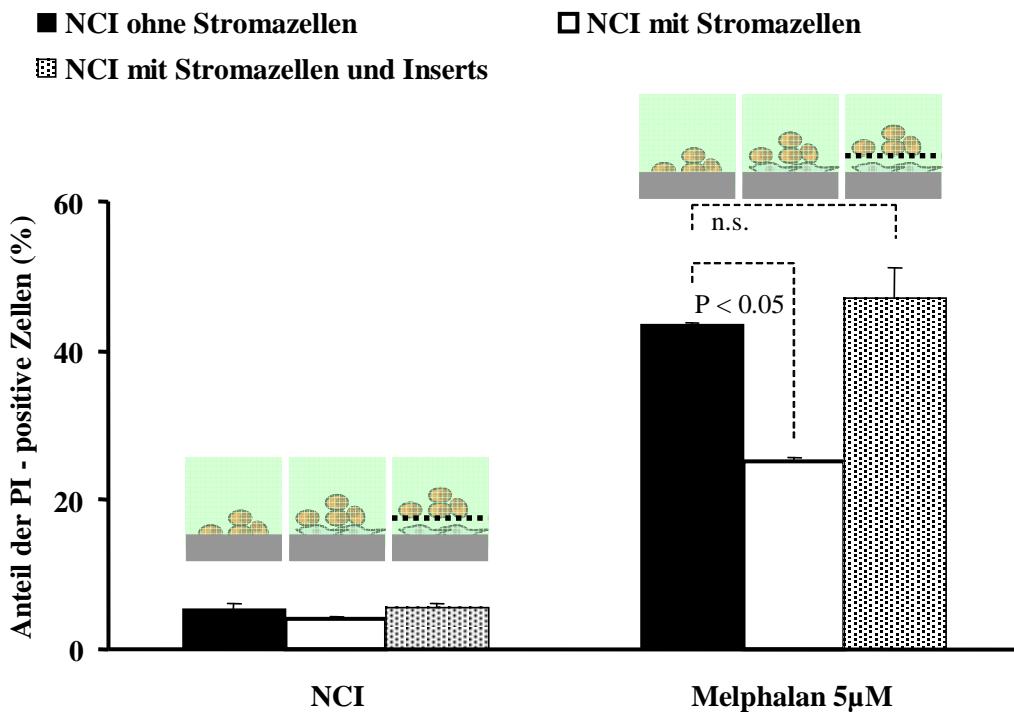


Abbildung 3.10: Bedingung für CAM-DR ist ein direkter Zell-Zell-Kontakt. NCI-H929 wurden über 96h mit Melphalan 5 μM in An- oder Abwesenheit von HS-5-Zellen kultiviert. Zusätzlich wurden NCI-H929 im selben Kulturgefäß wie HS-5-Zellen kultiviert. Der direkte Zell-Zell-Kontakt wurde hier durch ein Insert verhindert. Die ungehinderte Stoffdiffusion ist trotzdem gegeben. Anschließend wurden die Zellen mit CD38 und PI gefärbt und der apoptotischen Zellanteil im Durchflusszytometer bestimmt. Es wurden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung verwendet. „n.s.“ steht für „nicht signifikant“.

Aus Abbildung 3.10 wird ersichtlich, dass CAM-DR hier zum Tragen kommt, jedoch der Effekt der Stromazellen durch die Kulturgefäßeinsätze komplett aufgehoben werden kann. Demzufolge spielt der direkte Zell-Zell-Kontakt bei CAM-DR eine maßgebliche Rolle.

Wie mehrfach gezeigt wurde (Giuliani et al., 2004; Chaudan et al., 1995), ändert sich die Zytokinexpression von Stromazellen, wenn Myelomzellen an Stromazellen adhärieren. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob das sezernierte Cytokingemisch aus einer Stromazellkultur oder das Cytokingemisch aus einer Stroma-Myelomzell-Kokultur in Myelomzellen ohne Zell-Zell-Kontakt eine Apoptoseresistenz hervorrufen kann.

NCI-H929-Monokulturen wurden 48 Stunden lang mit 30 μM Melphalan und konditioniertem Medium inkubiert. Das konditionierte Medium bestand aus 50- oder 75-prozentigem HS-5-Medium aus einer einen Tag alten HS-5-Kultur. Das

konditionierte Medium aus einer HS-5/NCI-Kokultur war ebenfalls einen Tag alt und wurde in 50-, 75- und 100-prozentiger Konzentration zu den Myelomzellen zugeben.

Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit Annexin-V-FITC und PI gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen und ausgewertet.

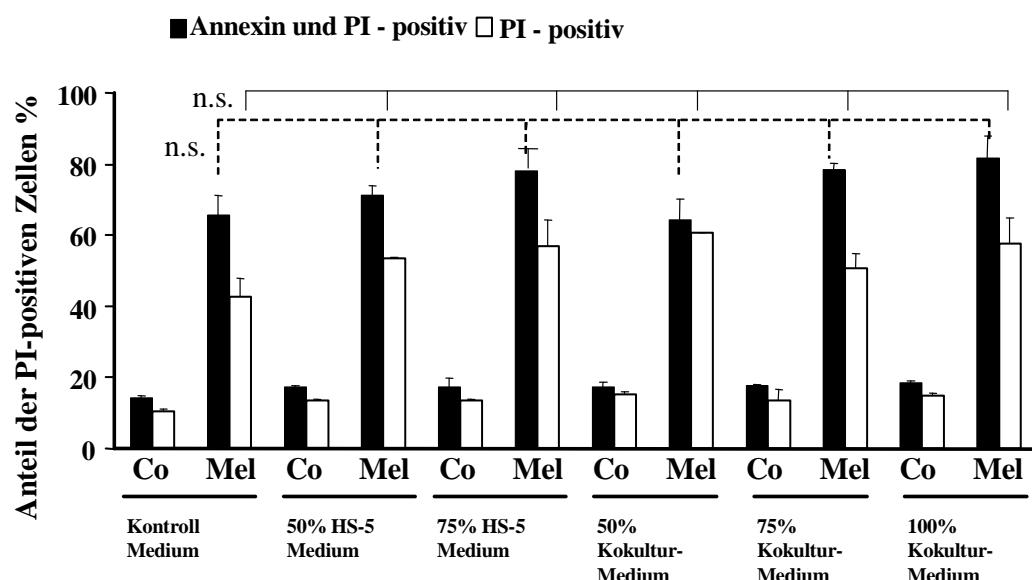


Abbildung 3.11: Konditioniertes Medium führt nicht zu einem antiapoptotischen Effekt. NCI-H929 wurden über 48h mit 30µM Melphalan inkubiert. Dabei wurde das Kulturmedium im angegebenen Verhältnis mit dem einer ein Tag alten HS-5-Kultur oder NCI/HS-5-Kokultur gemischt. Die Zellen wurden mit Annexin-V-FITC und Propidiumjodid gefärbt und der Anteil der Annexin/PI-positiven Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Es wurden jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichung verwendet. „n.s.“ steht für „nicht signifikant“.

Abbildung 3.11 zeigt, dass sowohl Medium aus einer HS-5-Kultur als auch aus einer NCI/HS-5-Kultur nicht zu einem antiapoptotischen Effekt bei zytostatisch behandelten Myelomzellen führen.

Aus den beiden letzten vorgestellten Experimenten muss geschlossen werden, dass der direkte Zell-Zell-Kontakt von Stroma- und Myelomzellen für das Auftreten von primärer Chemoresistenz unabdingbar ist.

3.2.6 Expressionsmuster auf den Myelomzelllinien und der Stromazelllinie

Wie in 3.2.5 gezeigt wurde, kann das Medium einer HS-5-Kultur und Medium einer Kokultur bei Myelomzellen keinen antiapoptotischen Effekt erzielen. Es

musste deshalb untersucht werden, welche Oberflächenantigene den Zell-Zell-Kontakt herstellen.

In diesem Sinne wurden die wichtigsten Oberflächenantigene bezüglich des Kokulturmodells auf den Stromazellen und den Myelomzellen bestimmt.

| | HS-5 | NCI – H929 | OPM-2 | U266 | RPMI-8226 |
|--------------|--------------|-------------------|---------------|---------------|------------------|
| CD54 | +++ (202) | ++ (2,7) | + | +++ (12,3) | +++ (25,8) |
| CD56 | - (1,0) | +++ (13,8) | +++ (30) | - (1,0) | + |
| CD49a | n.d. | ++ (2,0) | - (1,0) | - (1,0) | - (1,0) |
| CD49d | n.d. | +++ (21) | +++ (8,6) | + | ++ (2,0) |
| CD49e | n.d. | ++ (3,3) | ++ (2,0) | - (1,0) | + |
| CD126 | - (1,0) | +++ (3,4) | ++ (2,4) | ++ (2,5) | ++ (1,9) |
| CD106 | ++ (2,5) | - (1,0) | - (1,0) | - (1,0) | + |
| CD11a | ++ (2,0) | + | + | + | ++ (2,3) |
| CD38 | - (1,0) | +++ (7,34) | +++ (6,9) | - (1,0) | +++ (17,1) |
| CD138 | ++ (2,8) | +++ (3,9) | +++ (20,5) | +++ (16,8) | +++ (27,7) |
| CD114 | - (1,0) | +++ (20,1) | +++ (14,3) | +++ (5,6) | +++ (4,6) |

Tabelle 3.2: Oberflächenantigene auf der Stromazelllinie HS-5 und den Myelomzelllinien NCI-H929, OPM-2, U266 und RPMI-8226. 4 – 5 x 10⁵ Zellen wurden bei 1500U/min, 8°C, 6 Minuten lang abzentrifugiert und nach Abschütten des Überstandes zwei mal mit kaltem PBS gewaschen und dann in 1ml kaltem PBS resuspendiert. 100 µl dieser Zelllösung wurden mit 10µl der Antikörperlösung für 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml kaltem PBS und nochmaligem Zentrifugieren (1500 U/min, 6 min, 8°C) wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 400 µl PBS resuspendiert. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer. Die in Klammern angegebene Expressionsstärke wurde berechnet und durch den Index angeben. Index = Expression des Antigens / Expression der Isotypkontrolle. Bei Indices zwischen 1.0 und 1.1 wurde das Antigen als „nicht exprimiert“ (-), zwischen 1.2 und 1.9 als „exprimiert“ (+), zwischen 2.0 und 2.9 als „stark exprimiert“ (++) und ab 3.0 als „sehr stark exprimiert“ (+++) gewertet. „N.d.“ = nicht bestimmt

Auf beiden Zelltypen waren Integrine stark exprimiert, sodass eine Adhäsion möglich und sehr wahrscheinlich ist. Auch besaßen die Myelomzellen auf ihrer

Oberfläche Rezeptoren für Cytokine (CD126 und CD114), weshalb der Mechanismus von CAM-DR auch bei den von den HS-5 Zellen sezernierten Stoffen hätte liegen können. Dies ist jedoch in 3.2.5 ausgeschlossen worden.

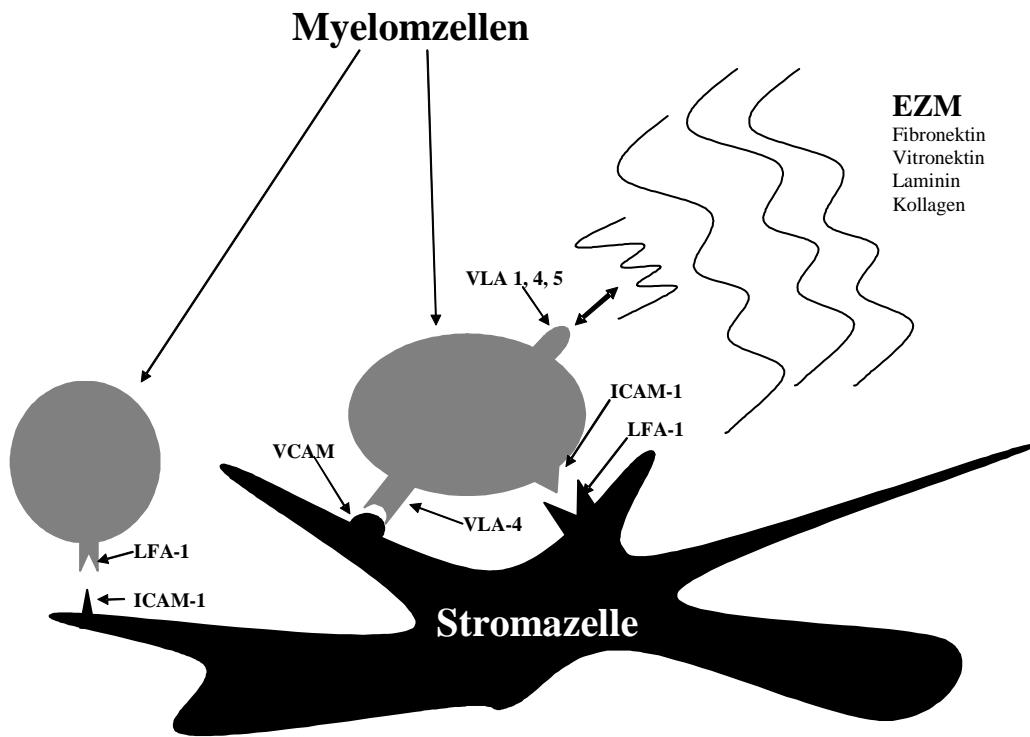
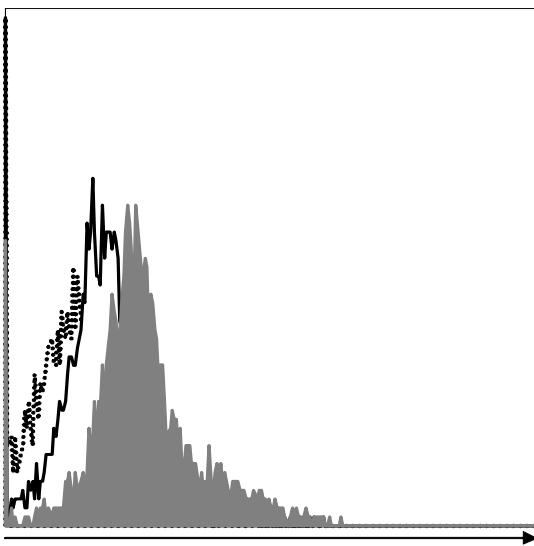


Abbildung 3.12: Modell der wichtigsten im Knochenmark vorkommenden Integrininteraktionen zwischen Stromazellen, EZM (Extrazellulärmatrix) und Myelomzellen.

3.2.7 Änderung der Integrinexpression auf Myelom- und Stromazellen

Damiano et al. haben auf chemoresistenten Myelomzelllinien eine Erhöhung der Integreine gegenüber der nicht veränderten Zelllinie nachgewiesen.

Deshalb wurde der Vermutung nachgegangen, ob sich auch bei einer kurzfristigen Zytostatikaexposition über 48h die Expressionsstärke der Integreine VLA-4 und ICAM-1 ändert. Dafür wurden NCI-H929 48h lang mit Melphalan 20 µM inkubiert, mit LFA-1-FITC oder VLA4-FITC-Antikörpern markiert und im Durchflusszytometer analysiert.



LFA-1-FITC log

Abbildung 3.13: Kurzfristige Inkubation mit Melphalan führt zu einer erhöhten LFA-1-Expression.
NCI-H929 wurden über 48h in der An- oder Abwesenheit von 20 μ M Melphalan kultiviert und anschließend mit PI und LFA-1-Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer ausgewertet. Es wird nur die LFA-1-Expressionsstärke der PI-negativen Zellen angezeigt. Die gestrichelte Linie entspricht der Isotypkontrolle, die durchgezogene Linie der LFA-1-kontrolle, die grau hinterlegte Fläche der mit Melphalan stimulierten LFA-1-Expression

Abbildung 3.13 zeigt die Zunahme der Expressionsstärke von LFA-1 auf den Myelomzellen. Diese wurde in mehreren voneinander unabhängigen Experimenten nachgewiesen. Die Expressionsstärke von VLA-4 nahm in denselben Experimenten weder ab noch zu.

Des Weiteren stellte sich die Frage, ob Myelomzellen, welche ohne Zytostatika mit HS-5 kokultiviert wurden, ebenfalls veränderte Integrinexpressionen aufweisen.

Dafür wurden OPM-2 für 48h mit HS-5 kokultiviert und anschließend mit CD138-PE und VLA-4- oder LFA-1-FITC gefärbt. Die Expressionsstärke wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Es konnte dabei jedoch keine Änderung der Integrinexpression festgestellt werden.

Da die Expressionsstärke von Integrinen auf den Myelomzellen bereits nach kurzer Inkubationszeit signifikant ansteigt, wurde weiterhin untersucht, ob dies auch für die Bindungspartner VCAM und ICAM-1 auf den HS-5-Zellen der Fall ist.

Um dies zu untersuchen, wurden HS-5-Zellen über 48 Stunden mit 10 μ M Treosulfan und 5 μ M Melphalan inkubiert und anschließend mit PI und VCAM-FITC oder ICAM-1-FITC gefärbt.

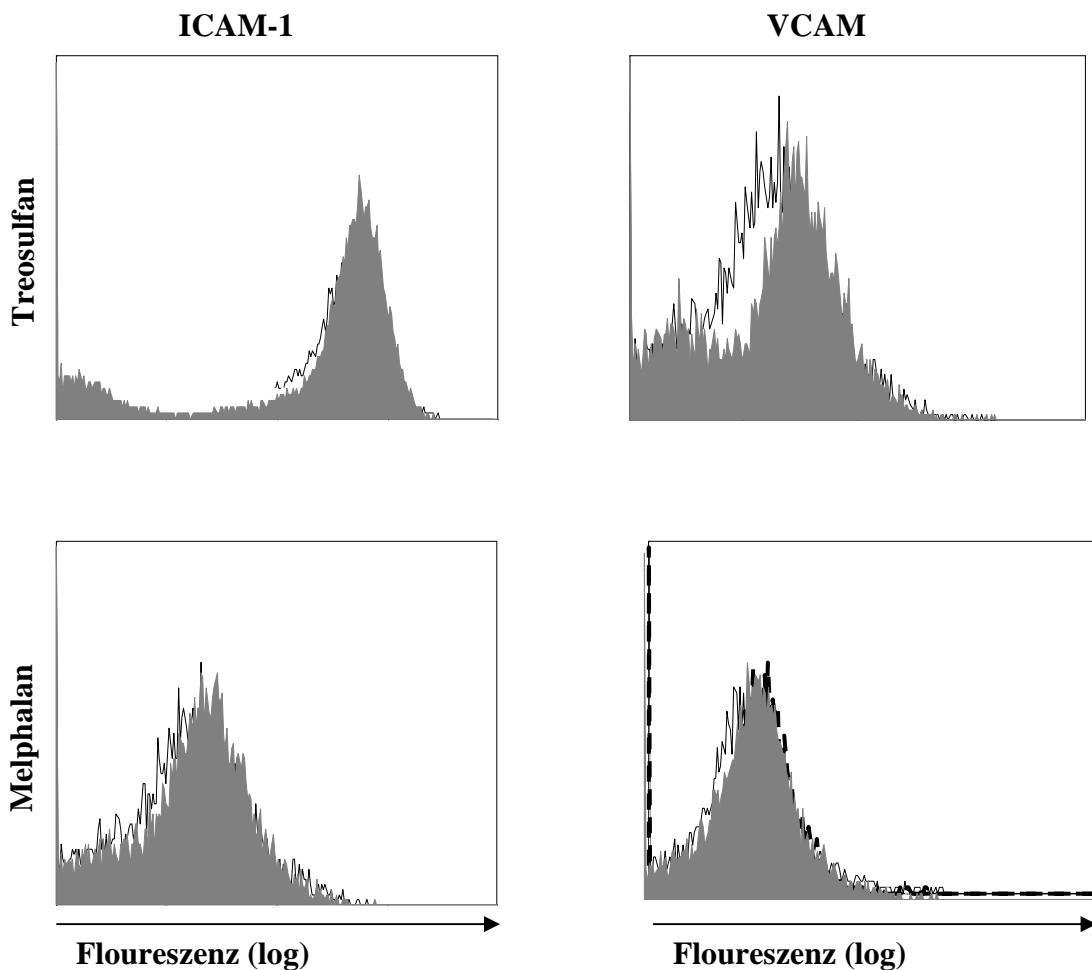


Abbildung 3.14: Zytostatika induzieren erhöhte Integrinexpression in HS-5-Stromazellen. HS-5 Zellen wurden über 48h mit entweder 5 μ M Melphalan oder 10 μ M Treosulfan inkubiert und anschließend die Expressionsstärke von ICAM-1 und VCAM der PI-negativen Zellen am Durchflusszytometer ermittelt.

Wie Abbildung 3.14 zeigt, kommt es auch bei den HS-5-Zellen nach kurzer Inkubationszeit und sehr niedriger Zytostatikakonzentration zu einer leichten Expressionsverstärkung der Integreine VCAM und ICAM-1.

Durch die erhöhte Expression der Integreine nach Zytostatikainkubation sowohl auf den Stromazellen als auch auf den Myelomzellen wird eine Adhäsion der Tumorzellen und damit eine verminderte Ansprechraten der Myelomzellen auf Zytostatika wahrscheinlicher.

3.2.8 Die Rolle der Integreine bei CAM-DR

Die im obigen Teil beschriebenen Cytokinversuche zeigen, dass CAM-DR durch direkten Zell-Zell-Kontakt begründet sein muss. Dieser Zell-Zell-Kontakt wird durch Integreine ermöglicht, welche in der Zellmembran verankert sind und durch

Bindung an einen Partner über intrazelluläre Domänen Signale an das Zytoplasma und den Zellkern weiter geben können. Um zu zeigen, dass bestimmte Integrine bei CAM-DR eine Rolle spielen, wurden in einem Kokulturversuch blockierende Antikörper verwendet um die Integrinfunktion zu hemmen.

NCI-H929 wurden mit 10 µg/ml des monoklonalen Antikörpers Anti-VLA-4 (very late antigen-4) oder mit 10 µg/ml des monoklonalen Antikörpers LFA-1 (leukocyte function antigen-1) oder mit 10µg/ml von beiden Antikörpern 15 Minuten lang inkubiert und schließlich auf die einen konfluenten Monolayer der HS-5-Stromazellen gegeben. Nach Zugabe von Melphalan 30µM wurden die Kokulturen 48 Stunden lang inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit CD38 – FITC und PI gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen und ausgewertet.

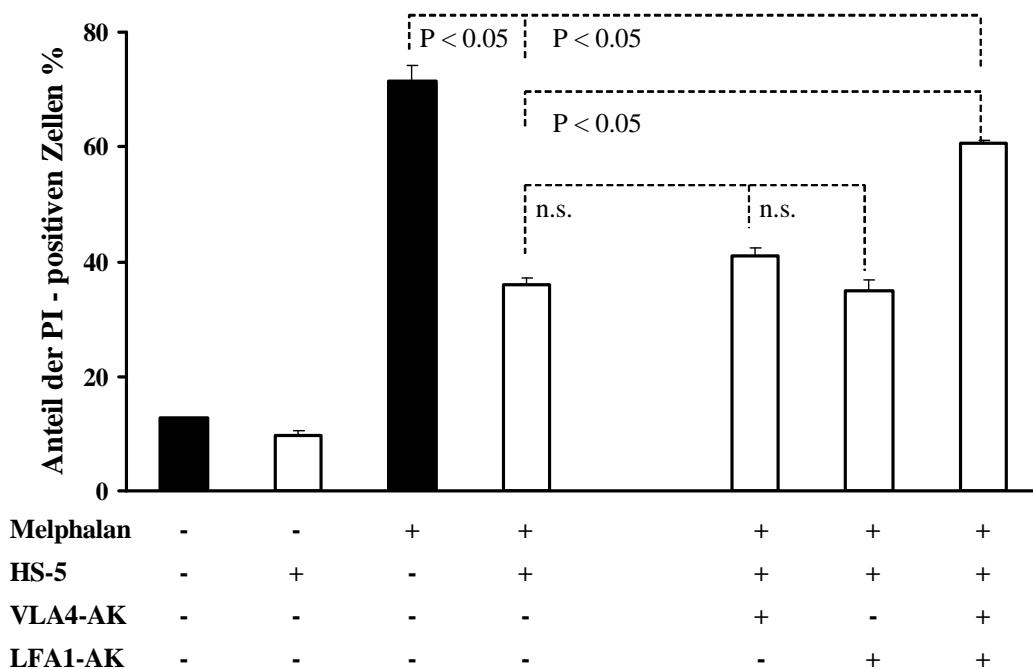


Abbildung 3.15: Blockierung der LFA-1 und VLA-4-Integrine kann CAM-DR reduzieren. NCI-H929 wurden über 48h in An- oder Abwesenheit mit 30µM Melphalan inkubiert. Die blockierende Antikörper VLA-4 und LFA-1 (jeweils 4 µg/ml) wurden wie in der Abbildung gezeigt zu Beginn der Kultur in das Kulturgefäß zugegeben. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde nach Doppelfärbung mit CD38-FITC und PI im Durchflusszytometer bestimmt. Für die Abbildung wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung verwendet. „n.s.“ steht für „nicht signifikant“.

Abbildung 3.15 zeigt, dass es im Kokulturversuch zu einem starken antiapoptotischen Effekt von 50% kommt, welcher durch Anti-LFA1-Antikörper nicht aufgehoben werden kann. Durch alleinige Koinkubation mit dem VLA4-Antikörper zeigt sich eine leichte Erniedrigung des antiapoptotischen Effekts von 50% auf 32%. Durch die Kombination beider Antikörper ist eine starke, jedoch mit einer Senkung der CAM-DR auf 15% keine völlige Aufhebung von CAM-DR möglich.

LFA703, ein Statinderivat, welches nicht antagonistisch auf die Aktivität der HMG-CoA-Reduktase wirkt (Weitz-Schmidt et al., 2001), besitzt eine hemmende Wirkung auf das LFA-1-Integrin, indem es die bindende Tasche des LFA-1-Moleküls blockiert, sodass das LFA-1 den natürlichen Bindungspartner ICAM-1 nicht mehr binden kann. Bezuglich der Integrinblockierung hat LFA-1 damit die Funktion eines LFA-1-spezifischen Antikörpers. Auf diesem Hintergrund wurde diese Substanz im Kokulturversuch verwendet.

Dazu wurden NCI-H929 auf den konfluenten HS-5-Zellen in 30 μ M melphalanhaltigem Medium nach Zugabe der Substanzen LFA703 insgesamt 48 Stunden lang kultiviert. Die Auswertung erfolgte mittels Doppelfärbung mit CD38-FITC und PI im Durchflusszytometer. LFA703 bewirkt dabei eine Reduktion von CAM-DR um ca. 30%.

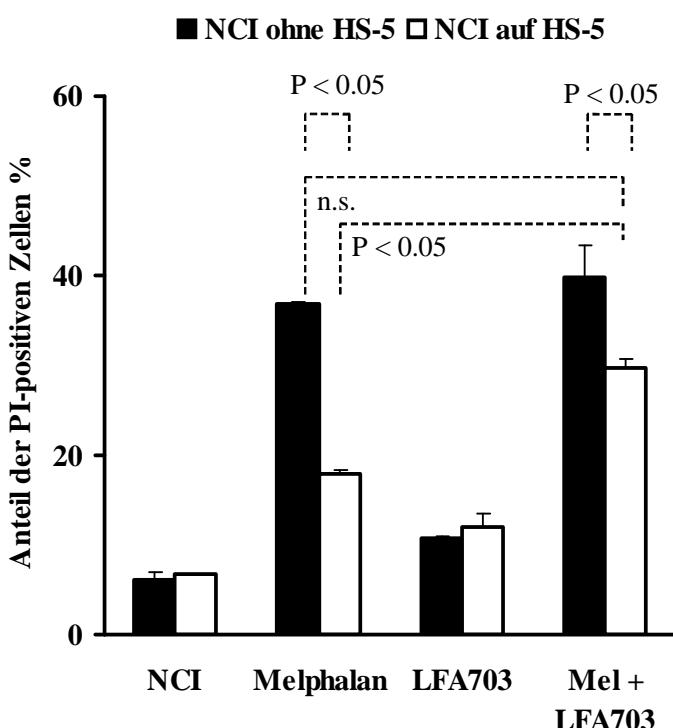
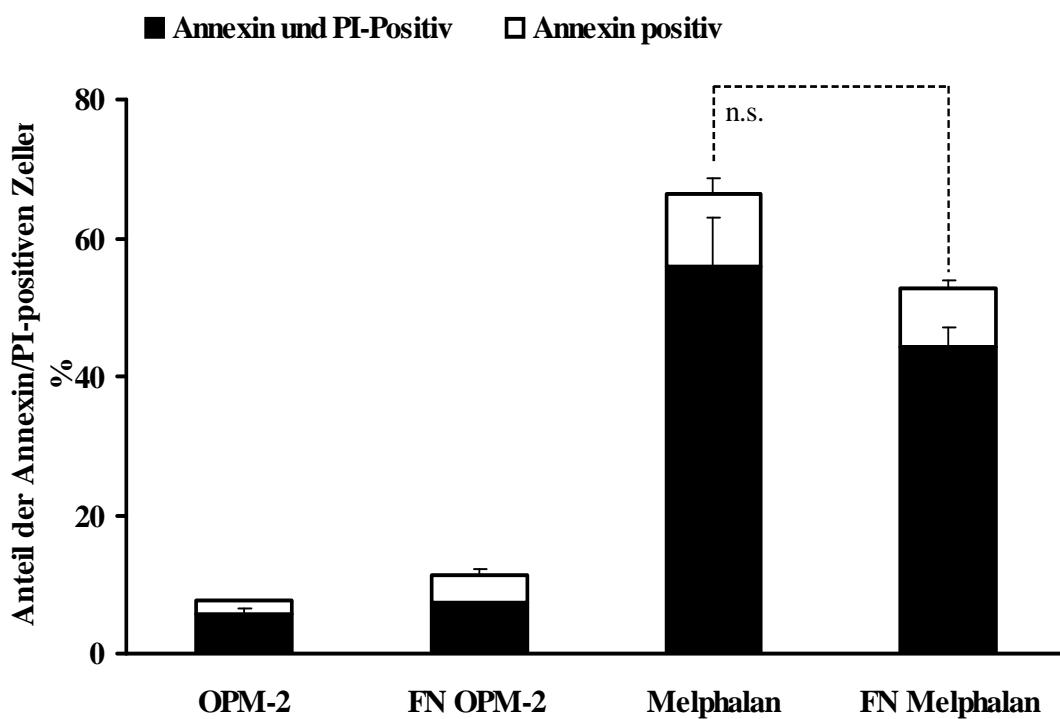


Abbildung 3.16: LFA703 reduziert CAM-DR. NCI-H929 wurden in der An- oder Abwesenheit von HS-5-Zellen für 48h mit 20 μ M Melphalan kultiviert. Zusätzlich wurde LFA703 (3 μ M) in das Medium zugegeben. Der Anteil der nekrotischen Zellen wurde nach CD38-FITC- und PI-Färbung im Durchflusszytometer festgestellt. Für die Abbildung wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung verwendet. „n.s.“ steht für „nicht signifikant“.

LFA703 führte im Kokulturexperiment zu einer Reduktion von CAM-DR von 51% auf 26%, also auf die Hälfte (Abbildung 3.16).

Um weitere Erkenntnis über die Funktion der Integrine VLA-4 und LFA-1 bezüglich CAM-DR zu erlangen, wurde in zwei getrennten Versuchen gezielt der VLA4-Rezeptor mit Fibronectin und der LFA-1-Rezeptor mit rekombinantem humanem (rh)-ICAM-1 stimuliert.

Im Einzelnen wurden NCI-H929 oder OPM-2-Zellen in An – oder Abwesenheit von entweder Fibronectin oder rekombinaten humanem (rh-) ICAM über einen Zeitraum von 48 Stunden mit Melphalan 30 μ M kultiviert.



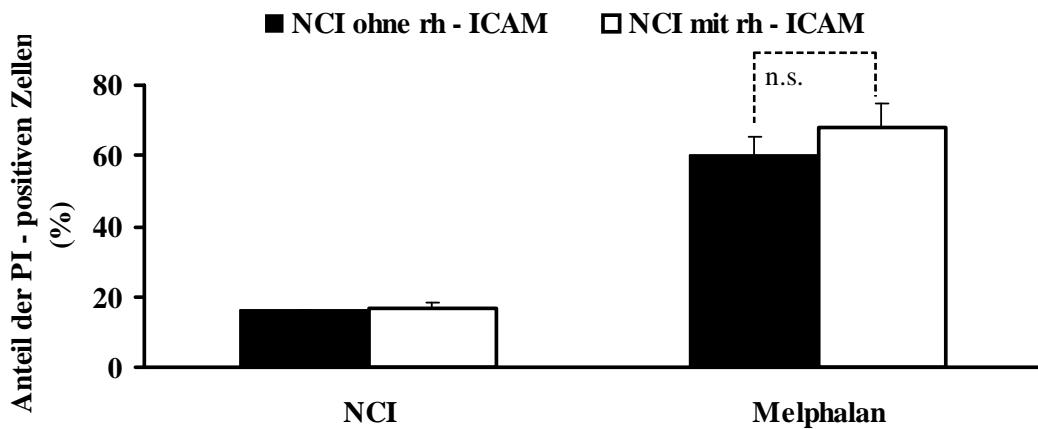


Abbildung 3.17: Inkubation mit Fibronektion oder (rh) - ICAM führt nicht zu CAM-DR
OPM-2 oder NCI-H929 wurden 48h lang in An- oder Abwesenheit von Fibronektion oder (rh)-ICAM in melphalanhaltigem Medium ($30\mu\text{M}$) inkubiert. Es folgte eine Färbung mit Annexin-V-FITC/PI oder PI. Der Anteil der nekrotischen Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Für die Abbildung wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung verwendet. „n.s.“ steht für „nicht signifikant“.

Es kommt bei dem Versuch mit Fibronektin zu keinem signifikanten Unterschied zwischen den mit Fibronektin stimulierten Zellen und den Kontrollen. Jedoch zeigt sich der Trend, dass stimulierte Zellen weniger chemosensitiv sind als nicht stimulierte Zellen. Auch im Versuch mit (rh)-ICAM kam es zu keinem signifikanten Unterschied der Apoptoseraten (Abbildung 3.17).

Bio 5192, eine Substanz, die z.Z. in der Erforschung der Multiplen Sklerose zur Hemmung der Leukozytenmigration verwendet wird, ist ein hoch spezifischer VLA4-Inhibitor und wurde deshalb zur Hemmung der VLA-4-Funktion im NCI-HS-5-Zellmodell benutzt (Leone et al., 2003).

Bio5192 $1\mu\text{M}$ wurde in der Kokultur zusammen mit Melphalan $30\mu\text{M}$ für 48h zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit CD38-FITC und PI gefärbt und im Durchflusszytometer ausgewertet.

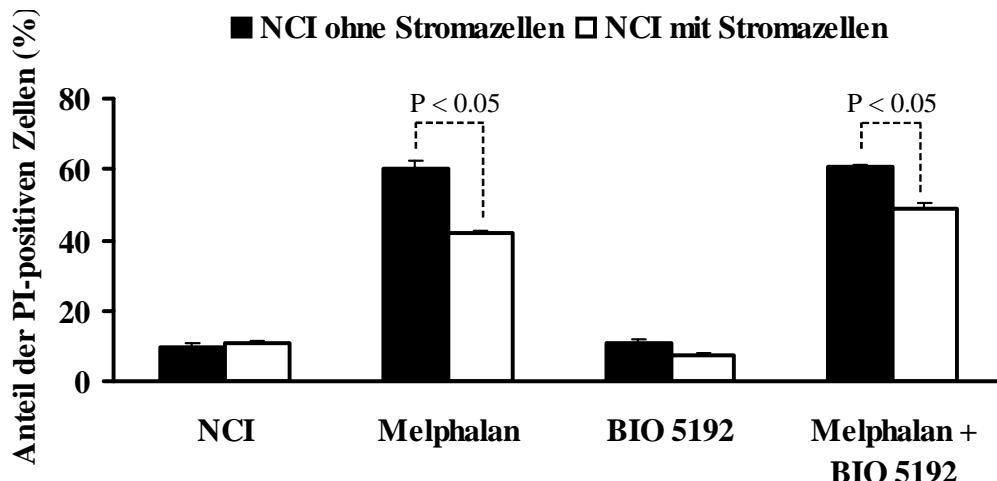


Abbildung 3.18: Bio5192 verhindert CAM-DR nicht. NCI-H929 wurden in An- oder Abwesenheit von einem konfluenten HS-5-Monolayer über 48h mit Melphalan 30 μ und Bio5192 1 μ M inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit CD38FITC und PI gefärbt und im Durchflusszytometer der PI-positive Anteil der Zellen bestimmt. Für die Abbildung wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung verwendet.

In Abbildung 3.18 wird deutlich, dass der VLA-4-Inhibitor BIO5192 CAM-DR von 30% auf 18% nur teilweise senken kann. Die Substanz führt auch nicht zu einer signifikanten Deadhäsion der Myelomzellen.

Es wurde in 3.2.5 ausgeschlossen, dass das Auftreten von CAM-DR auf die Zytokinwirkung zurückzuführen ist. Trotzdem wurde weiterhin untersucht, ob die Hemmung von CAM-DR durch VLA-4 und LFA-1-Antikörper mit einer Veränderung der Interleukin-6-Sekretion assoziiert ist.

Dafür wurden eine NCI-H929-Kokultur über 48h mit jeweils 5 μ g/ml der inhibierenden Antikörper VLA-4-AK und LFA-1-AK und 3 μ M LFA703 inkubiert. Die Zellen in den Kulturgefäßen wurden anschließend abzentrifugiert. In Kooperation mit dem Institut für Klinische Chemie in Großhadern, München, wurde die Konzentration des im Medium vorhandenen IL-6 mittels ELISA bestimmt.

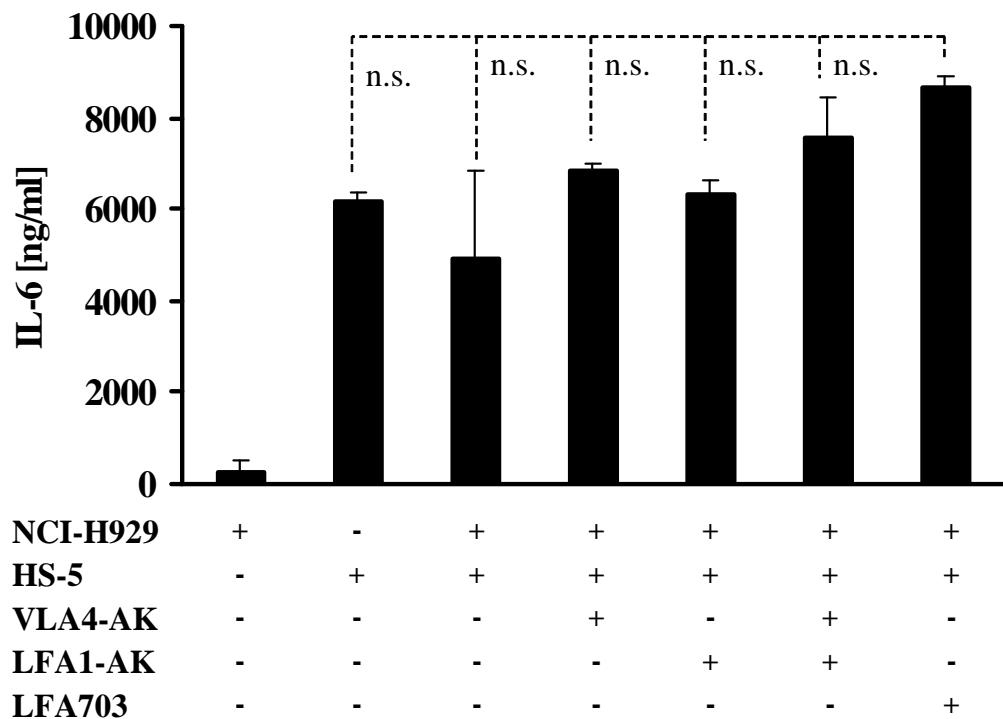


Abbildung 3.19: Abnahme der CAM-DR ist nicht auf den Rückgang von IL-6 zurückzuführen. NCI-H929 und HS-5 wurden über 48h in An- oder Abwesenheit von 5 µg/ml LFA-1-AK / VLA4-AK oder 3 µM LFA703 koinkubiert. Nach 48h wurde das Medium von den Zellen durch Zentrifugation getrennt und schließlich die IL-6-Konzentration im Kulturmedium im Institut für Klinische Chemie in Grosshadern (LMU) bestimmt. Für die Abbildung wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung verwendet. „n.s.“ steht für „nicht signifikant“.

Wie Abbildung 3.19 zeigt, kommt es zu keinen signifikanten Unterschieden in der Interleukin-6-Sekretion. Die Verminderung von CAM-DR durch VLA4/LFA1 und LFA703 basiert also nicht auf einer Änderung der Interleukin-6-Sekretion.

Schließlich wurde der Frage nachgegangen, ob eine Deadhäsion der Myelomzellen vom Stromamonolayer der Grund für die Verminderung der CAM-DR ist.

Dafür wurde derselbe Versuchsaufbau wie zur IL-6-Bestimmung gewählt. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 48h wurden nur die in Suspension vorliegenden Zellen abpipettiert und einem WST-1-Assay zugeführt.

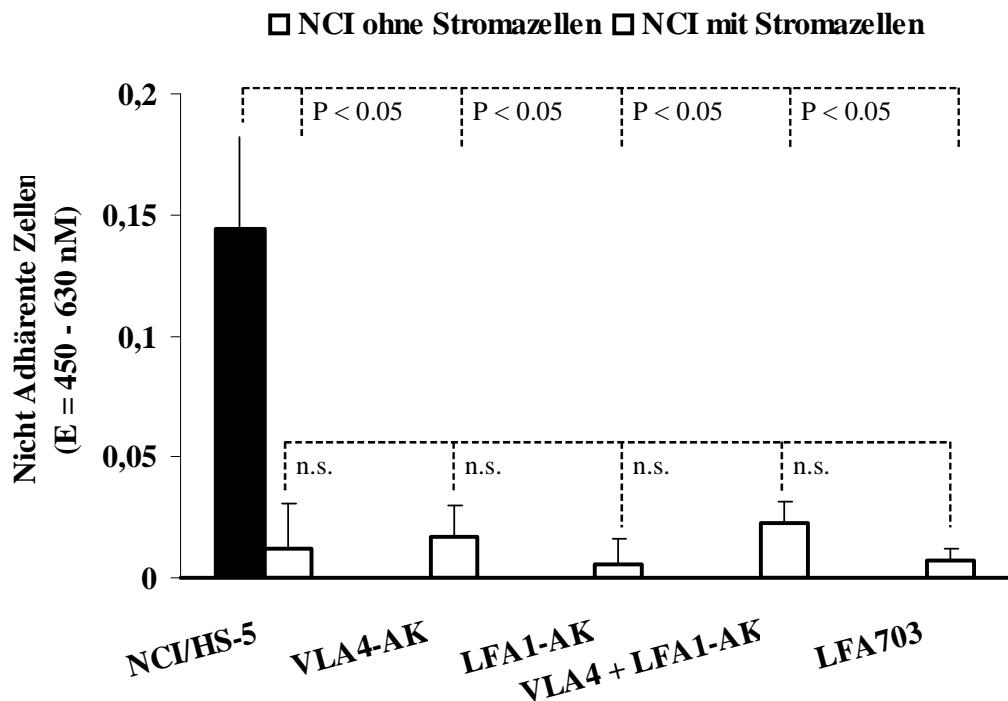


Abbildung 3.20: Blockierung der Antigene VLA-4 und LFA-1 führt nicht zu einer signifikanten Deadhäson. NCI-H929 Zellen wurden auf einem konfluenten Monolayer 48h lang in An- oder Abwesenheit von Integrinblockierenden Antikörpern oder Substanzen inkubiert (VLA-4-AK und LFA-1-AK 5 µg/ml, LFA703 3 µM). Die Zahl der lebenden Zellen im Überstand wurde durch eine WST-1-Messung bestimmt. Für die Abbildung wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung verwendet. „n.s.“ steht für „nicht signifikant“.

Abbildung 3.20 zeigt, dass die Blockade von VLA-4 und LFA-1 bei kokultivierten Myelomzellen nicht zu einer Änderung der Adhäsion der Myelomzellen führt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Hemmung der Integrine VLA-4 und LFA-1 nur begrenzt CAM-DR aufheben, die IL-6 Sekretion von Stromazellen nicht alterieren und auch nicht zu einer starken Deadhäson im Kokulturmmodell führen.

3.2.9 Modulation klassischer Signalwege in adhärenten Myelomzellen

Zell-Zell-Kontakt von Myelomzellen an HS-5-Zellen führt zu einer verminderten Chemosensitivität bei den Myelomzellen. Dieser Effekt wird durch Integrine vermittelt, welche durch Kontakt zum Bindungspartner an das Zytoplasma

signalisieren. Jedoch hat sich gezeigt, dass die alleinige Blockade der Integrine VLA-4 und LFA-1 CAM-DR nicht vollkommen aufheben kann. Um weitere Informationen über den Mechanismus von CAM-DR zu bekommen, wurden Experimente durchgeführt, bei welchen die wichtigsten Signalwege durch verschiedene Substanzen moduliert wurden. Dabei wurden die möglichen Signale gehemmt, welche von Rezeptortyrosinkinasen und/oder Integrinen ausgehen können. Auf diesem Hintergrund wurde zuerst untersucht, ob Proteinkinase C - Modulatoren im Kokulturexperiment die Fähigkeit besitzen, CAM-DR aufzuheben. Dafür wurden U266 oder NCI-H929 in An- oder Abwesenheit von HS-5-Zellen inkubiert und mit verschiedenen Zytostatika und PKC-Signalwegsmodulatoren über 48 Stunden kultiviert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen geerntet, mit CD138-FITC oder CD38-FITC und PI gefärbt und am Durchflusszytometer gemessen.

| NCI-H929 | - | GÖ6976 (400nM) | GÖ6983 (400nM) | GF109203X (2μM) | Bryostat. (50nM) |
|------------------------------|------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Treosulfan (100μM) | 50,3 | 43,5 | 54,3 | 27,0 | 23,7 |
| Melphalan (30μM) | 50,3 | 42,6 | 41,3 | 31,8 | 35,5 |
| Doxorubicin (10μM) | 35,8 | 41,2 | 38,3 | 22,9 | 28,5 |
| Gemcitabin (15nM) | 46,8 | 44,1 | 39,1 | 39,2 | 33,2 |

| U266 | - | GÖ6976 (400NM) | GÖ6983 (400NM) | GF109203X (2μM) | Bryostatin (50NM) |
|------------------------------|------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| Treosulfan (100μM) | 48,7 | 43,4 | 45,7 | 34,2 | 35,1 |
| Melphalan (30μM) | 34,2 | 23,4 | 43,0 | 34,7 | 24,8 |
| Doxorubicin (10μM) | 30,8 | 24,8 | 39,9 | 37,0 | 50,0 |
| Gemcitabin (15nM) | 24,1 | 18,9 | 35,0 | 37,1 | 15,5 |

Tabelle 3.3: PKC-Modulatoren in der HS-5-Kokultur. U266 oder NCI-H929 wurden in der An- oder Abwesenheit von HS-5-Zellen inkubiert und mit verschiedenen Zytostatika und PKC-Signalwegsmodulatoren über 48 Stunden kultiviert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen geerntet, mit CD138-FITC oder CD38-FITC und PI gefärbt und am Durchflusszytometer gemessen. Die angegebenen Werte geben die prozentuale Differenz der Apoptoseraten zwischen Monokultur und Kokultur an. (Bryostat. = Bryostatin)

Ergebnisse

Es kommt durch die Modulation der Proteinkinase C im Kokultursystem nicht zu einer Verminderung der CAM-DR. (Tabelle 3.3)

Zusätzlich zu diesen Experimenten wurde mit weiteren Modulatoren untersucht, welche Signalwege für CAM-DR maßgeblich sind. Als Modulatoren wurden dabei jene verwendet, deren Relevanz im obigen Teil dargestellt wurde:

- G-CSF : stimuliert die Stammzellmobilisation.
- AG490 / Piceatannol : Janus-Kinase-Inhibitoren
- PD98059 : ein MEK-Inhibitor.
- Ro 32-0432 : ein Proteinkinase C Inhibitor,
- Ly249002 : ein Inhibitor der PI3-kinase.

Für diese Experimente wurden NCI-H929 in der An- oder Abwesenheit von HS-5-Zellen inkubiert und mit Melphalan 5 μ M und PKC-Signalwegsmodulatoren über 48 Stunden kultiviert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen geerntet, mit CD38-FITC und PI gefärbt und am Durchflusszytometer gemessen.

| Melphalan 5 μ M | G-CSF 200ng /ml + Mel. | AG490 10 μ M + Mel. | Ly 249002 10 μ M + Mel. | Ro 32- 0432 2 μ M + Mel. | Piceatannol 5 μ M + Mel. | PD 98059 50 μ M + Mel. |
|------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| 41% | 41% | 38% | 36% | 36% | 49% | 24% |

Tabelle 3.4: Signalwegsmodulatoren in der HS-5-Kokultur. NCI-H929 wurden in der An- oder Abwesenheit von HS-5-Zellen inkubiert und mit Melphalan 5 μ M und PKC-Signalwegsmodulatoren über 48 Stunden kultiviert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen geerntet, mit CD38-FITC und PI gefärbt und am Durchflusszytometer gemessen. Die angegebenen Werte geben die prozentuale Differenz der Apoptoseraten zwischen Monokultur und Kokultur an.

Bis auf den MEK-Inhibitor PD98059 hat kein Signalwegsmodulator die Fähigkeit, CAM-DR zu vermindern, der Unterschied in den Apoptoseraten war jedoch statistisch nicht signifikant.

Des Weiteren wurde der Frage nachgegangen, ob bestimmte Signalwegsmodulatoren die Fähigkeit haben, die Expressionsstärke der Integrine VLA-4 und LFA-1 auf den Myelomzellen zu vermindern.

Dafür wurden NCI-H929 in An- oder Abwesenheit der in der Tabelle angegebenen Modulatoren über 48h kultiviert und dann mit VLA4-FITC oder LFA-1-FITC-Antikörpern gefärbt. Die Expressionsstärke wurde am Durchflusszytometer bestimmt.

| NCI-H929 | Keiner | PD 98059 (50µM) | LY 249002 (10µM) | TPA (5NM) | Piceatannol (5µM) | Ro 32-0432 (2µM) |
|-----------------|---------------|------------------------|-------------------------|----------------------|--------------------------|-------------------------|
| LFA-1 | - (5,23) | 26,18% (3,86) | 32,30% (3,54) | 9,43% (4,74) | 1% (5,19) | 8,40% (4,79) |
| VLA-4 | - (73,6) | 18,4% (60,05) | 17,8% (60,50) | 7,28% (68,24) | 1% (72,97) | 7,29% (68,24) |

Tabelle 3.5. : Signalwegsmodulatoren verringern die Integrinexpressionsstärke. NCI-H929 wurden in An- oder Abwesenheit der angegebenen Signalwegsmodulatoren über 48 h inkubiert, anschließend mit VLA4- oder LFA-1-FITC gefärbt und schließlich am Durchflusszytometer gemessen. Für die Analyse der Expressionsstärke wurden nur die Zellen verwendet, welche im FSC/SSC-Gate als lebend identifiziert werden konnten. Der in Prozent angegebene Wert drückt die Abnahme des Expressionsstärke der behandelten Probe im Vergleich zur Kontrolle aus. Die in Klammern angegebene Expressionsstärke wurde berechnet und durch den Index angeben. *Index = Expression des Antigens / Expression der Isotypkontrolle.*

Durch die Kokinkubation v.a. mit PD98059, welches die MEK-Kinase hemmt, oder Ly249002, welches die PI3-Kinase hemmt, kann die Integrinexpression von VLA4 und LFA1 bis zu 30% gesenkt werden. Dabei scheint generell das LFA-1-Antigen in der Expression variabler reguliert zu sein als VLA4. Da jedoch CAM-DR durch Ly249002 kaum und durch PD98059 nur leicht gehemmt wird, muss angenommen werden, dass die Integrinexpression auf der Oberfläche nicht linear mit der Stärke von CAM-DR zusammenhängt.

Um weitere Informationen über den Mechanismus von CAM-DR zu gewinnen, wurden Western Blots gemacht, um zu bestimmen, ob bestimmte Zellproteine nach der Bindung der Myelomzelle vermehrt oder vermindert exprimiert wird. Nachgewiesen wurden wichtigste Proteine bezüglich Apoptose, Differenzierung und Proliferation. NCI-H929 wurden auf HS-5-Zellen kultiviert. Nach 72 Stunden wurden alle Zellen verworfen, die sich in Lösung befanden. Adhärente Myelomzellen wurden durch vorsichtiges Pipettieren geerntet und die Reinheit der

Myelomzellen durchflusszytometrisch mittels Färbung mit CD38-FITC bestimmt. Die Western Blot Analyse wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt.

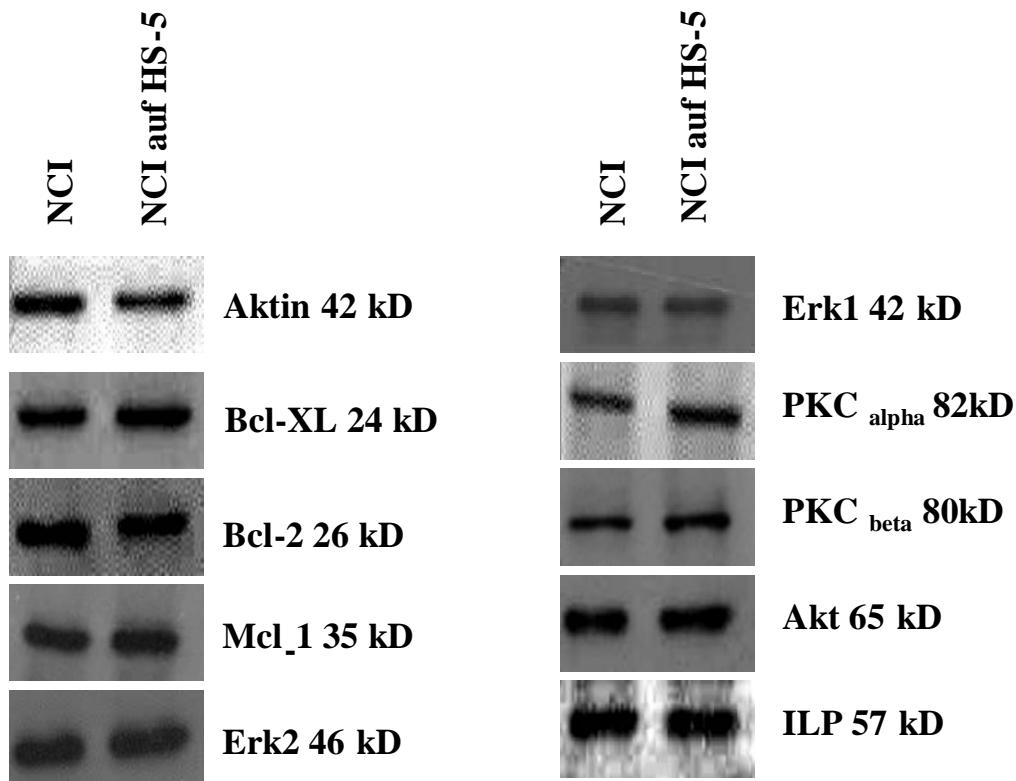


Abbildung 3.21: Western Blot Analyse der wichtigsten Signalwegsmoleküle beim Multiplen Myelom. NCI-H929 wurden über 72h auf einem HS-5-Monolayer kultiviert und anschließend wie in 4.6 beschrieben der Western Blot Analyse zugeführt.

Keines der bestimmten Proteine wurde durch Kokultur auf HS-5 Zellen vermehrt oder vermindert exprimiert (Abbildung 3.21). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in der Gruppe der verwendeten Signalwegsmodulatoren nur PD98059 CAM-DR vermindert hat.

3.2.10 Statinderivate vermindern CAM-DR

Es wurde bereits gezeigt, dass Statine eine integrinmodulatorische Funktion besitzen (Rezaie-Majd et al., 2003). Darüber hinaus wirken Statine toxisch auf Myelomzellen (Van de Donk et al., 2002). Außerdem zeigte sich, dass chemoresistente Myelomzellen eine erhöhte Aktivität der HMG-CoA-Reduktase besitzen (Hazlehurst et al., 2003).

Auf diesem Hintergrund wurde Simvastatin in Kombination mit Melphalan auf die Fähigkeit untersucht, CAM-DR zu vermindern. NCI-H929 wurden über 48

Stunden in An- oder Abwesenheit eines konfluenten HS-5-Monolayers mit Melphalan 30 μ M und Simvastatin 1 μ M inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit CD38-FITC und PI gefärbt und der nekrotische Anteil der Zellen im Durchflusszytometer bestimmt.

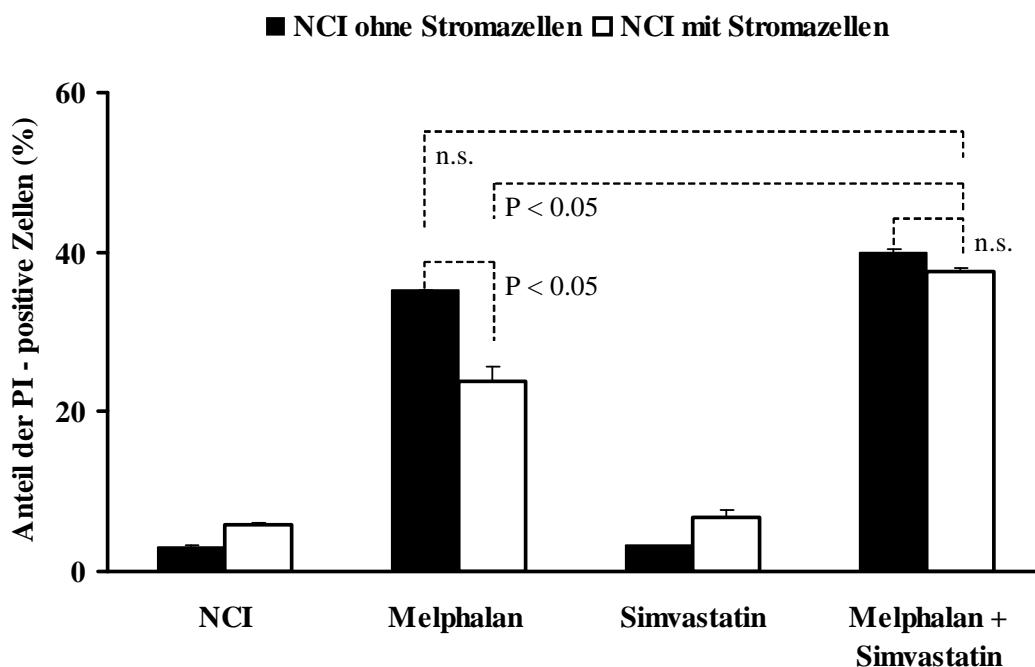


Abbildung 3.22: Der HMG-CoA-Reduktasehemmer Simvastatin verhindert CAM-DR. NCI-H929 wurden über 48 Stunden in An- oder Abwesenheit eines konfluenten HS-5-Monolayers mit Melphalan 30 μ M und Simvastatin 1 μ M inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit CD38-FITC und PI gefärbt und der nekrotische Anteil der Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Für die Abbildung wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung verwendet. „n.s.“ steht für „nicht signifikant“.

Es kommt in der Kokultur nach Simvastatin- und Melphalaninkubation zu einer starken Hemmung der CAM-DR von 32% auf 6% (Abbildung 3.22).

Um zu untersuchen ob dieser Effekt ein substanzspezifischer Effekt des Simvastatins ist, wurde das oben gezeigte Experiment mit Lovastatin, einem anderen Statinderivat, wiederholt.

Hierfür wurden beim selben Versuchsaufbau und denselben Konzentrationen statt Simvastatin nun Lovastatin 1 μ M in die Mono- und Kokultur gegeben.

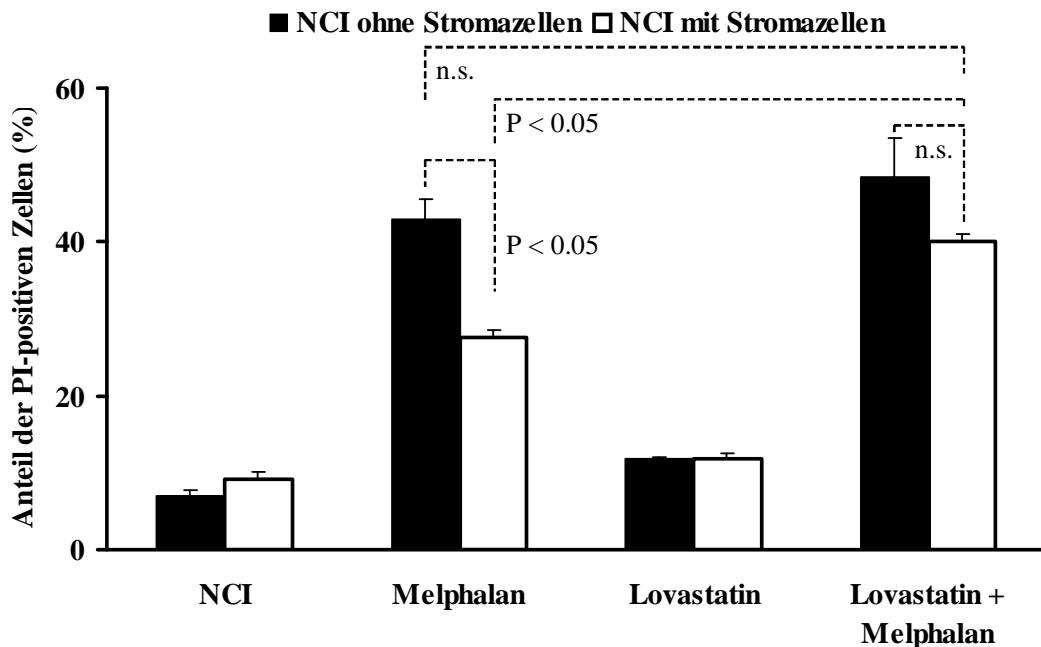


Abbildung 3.23: Lovastatin verhindert CAM-DR. NCI-H929 wurden über 48 Stunden in An- oder Abwesenheit eines konfluenten HS-5-Monolayers mit Melphalan 20 μ M und Lovastatin 1 μ M inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit CD38-FITC und PI gefärbt und der nekrotische Anteil der Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Für die Abbildung wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung verwendet. „n.s.“ steht für „nicht signifikant“.

Abbildung 3.23 zeigt eine deutliche Abnahme von CAM-DR durch Lovastatin von 49% auf 17%.

Es handelt sich also bei der Verringerung der CAM-DR durch Statine nicht um einen substanzspezifischen Effekt des Simvastatins, sondern einen allgemeinen Effekt, der auftritt, wenn die HMG-CoA-Reduktase in adhärenten Myelomzellen gehemmt wird. Da sich Simvastatin in Bezug auf die Hemmung der CAM-DR als potenter als Lovastatin erwiesen hat, wurde in den weiteren Experimenten Simvastatin verwendet.

Um weiterhin auszuschließen, dass Simvastatin über eine Änderung des Zytokinmilieus wirkt, wurden kokultivierte NCI-H929 mit Simvastatin 10 μ M für 48 Stunden inkubiert. Die Zellen in den Kulturgefäßen wurden anschließend abzentrifugiert. In Kooperation mit dem Institut für Klinische Chemie in Großhadern, München, wurde die Konzentration des im Medium vorhandenen IL-6 mittels ELISA bestimmt.

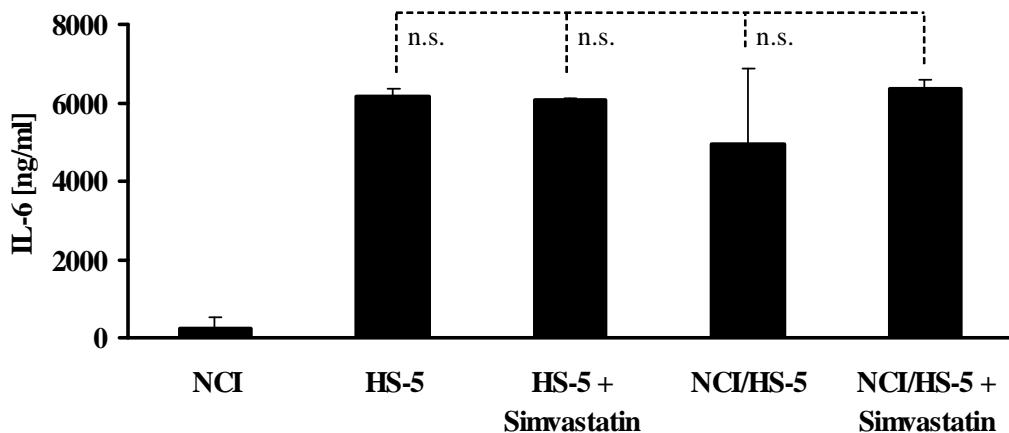


Abbildung 3.24: Die Verhinderung von CAM-DR durch Simvastatin basiert nicht auf einer Reduktion der IL-6 Sekretion. NCI-H929 und HS-5 wurden nach Zugabe von $10\mu\text{M}$ Simvastatin über 48 Stunden koinkubiert. Die IL-6 Konzentration wurde im Institut für Klinische Chemie in der Universitätsklinik Grosshadern (LMU) durch ELISA bestimmt. Für die Abbildung wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung verwendet. „n.s.“ steht für „nicht signifikant“.

Abbildung 3.24 zeigt, dass sich die Menge an Interleukin-6 durch die Inkubation mit Simvastatin sowohl in der Monokultur also auch in der Kokultur nicht ändert.

Da bereits gezeigt wurde, dass Statine sowohl die Integrinexpression von Leukozyten beeinflussen als auch die Funktion der Integrine verändern können, wurde untersucht, ob sich NCI-H929 unter Kokulturbedingungen während Simvastatininkubation von Stromazellen ablösen.

Im Einzelnen wurden dazu für 48h NCI-H929 mit HS-5-Zellen koinkubiert und Simvastatin $10\mu\text{M}$ zugegeben. Danach wurde das Medium der Kulturgefäße abpipettiert und durch ein WST-1-assay die Vitalität der Zellen bestimmt.

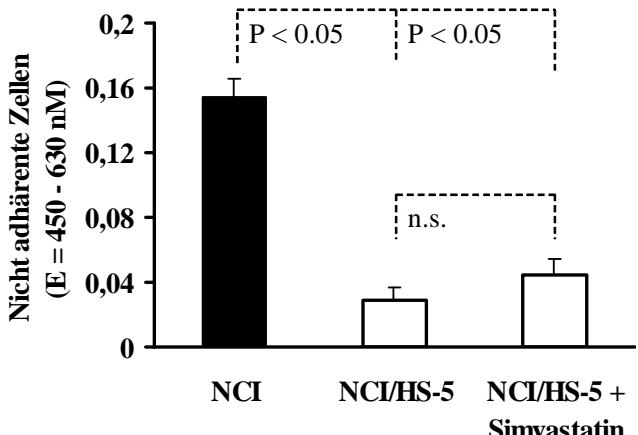


Abbildung 3.25:
Reduktion von CAM-DR basiert nicht auf einer Änderung der Myelomzelladhärenz.
NCI-H929 wurden in An- oder Abwesenheit von HS-5-Zellen mit/ohne Simvastatin 10 μ M inkubiert. Nach 48h wurden die lebenden Zellen in Suspension durch ein WST-1-Assay bestimmt. Für die Abbildung wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung verwendet. „n.s.“ steht für „nicht signifikant“.

Simvastatin führt trotz seiner integrinmodulierenden Eigenschaften bezüglich Expression und Funktion im NCI-H929/HS-5-Kokulturmödell nicht zu einer signifikant erhöhten Deadhäsion der Myelomzellen (Abbildung 3.25).

Abschliessend kann festgehalten werden, dass Simvastatin und die verwandte Substanz Lovastatin unter Kokulturbedingungen bei Zytostatikaexposition zu einer Erniedrigung der CAM-DR führen. Diese Erniedrigung ist statistisch signifikant und weder durch eine Deadhäsion von Stromazellen noch eine Änderung der IL-6-Konzentration erklärbar.

3.2.11 Der HMG-CoA/GG-PP/Rho/Rho-kinase-Signalweg vermittelt CAM-DR

Da Simvastatin sich als potenteste Substanz zur Erniedrigung von CAM-DR herausgestellt hat, wurde der Frage nachgegangen, welche Moleküle und welche Signalwege für die primäre Zytostatikaresistenz eine Rolle spielen.

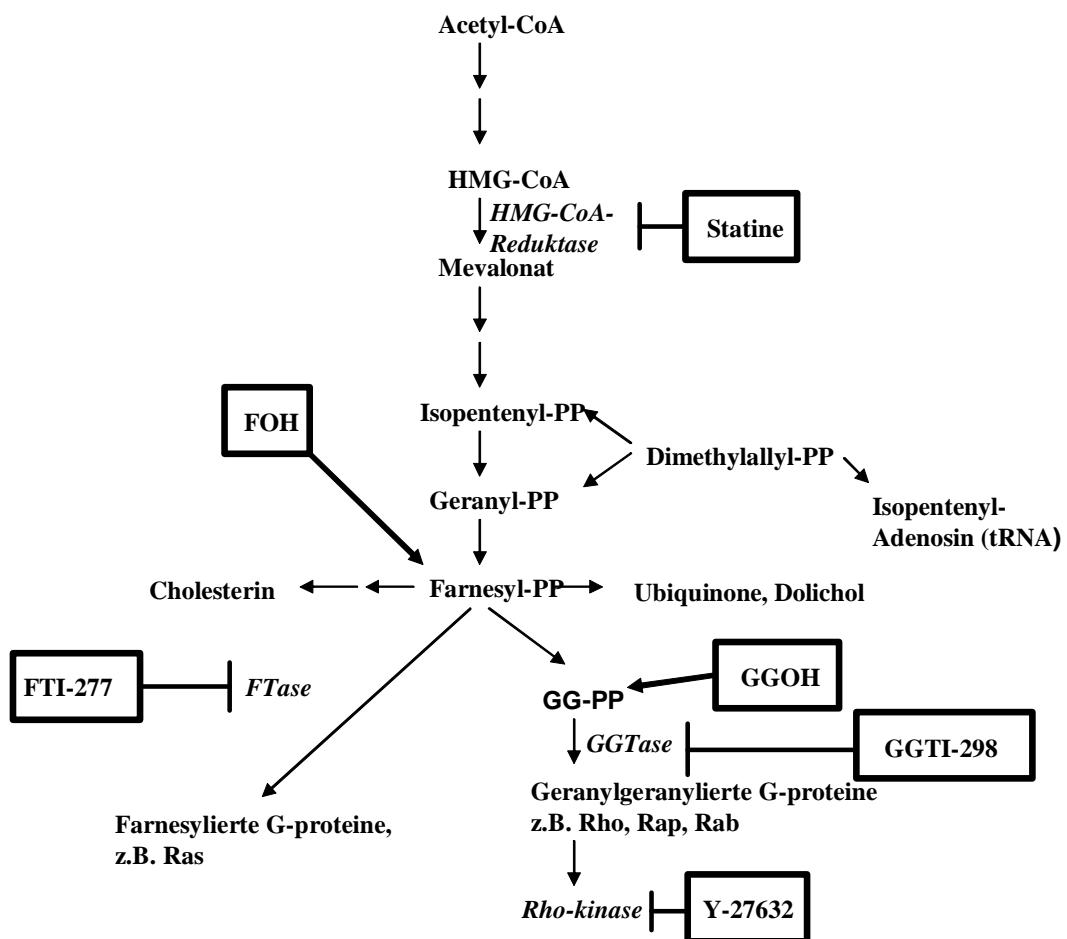


Abbildung 3.26 Der GG-PP/Rho/Rho-Kinase-Signalweg. Die Grafik zeigt den Syntheseweg des Cholesterols mit den Möglichkeiten, einzugreifen. Statine hemmen die HMG-CoA-Reduktase, FOH und GGOH sind die Vorformen von Farnesylpyrophosphat und Geranylgeraniolpyrophosphat, da sie in der Zelle phosphoryliert werden. FTI-277 hemmt die Farnesyltransferase, welche wichtig in Ras-Kaskade ist. GGTI-298 hemmt die Geranylgeranioltransferase, welche u.a. die Modifizierung von kleinen G Proteinen hemmt. Y-27632 ist ein Rho-kinase Inhibitor.

Abbildung 3.26 zeigt den Syntheseweg des Cholesterins. Neben den Produkten Dolichol, Cholesterin, und Ubiquinon werden nur Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeraniolpyrophosphat (GGPP) für Modifikationen an Signalwegsproteinen verwendet. Während die Farnesylierung für die Ras-Kaskade von Bedeutung ist, ist die Geranylgeranylierung wichtig für die Modifikation von u.a. kleinen G Proteinen wie z.B. Rho, Rab und Rap. Rho wiederum stellt das Substrat für die Rho-Kinase dar.

Um feststellen zu können ob die oben dargestellten Signalwege für CAM-DR von Bedeutung sind, wurden NCI-H929 für 48h in Anwesenheit oder Abwesenheit von HS-5-Zellen mit Mephalan 20 μ M und Simvastatin 1 μ M inkubiert. Zusätzlich wurde entweder GGOH 10 μ M oder FOH 10 μ M, zugegeben. Dabei sind GGOH oder FOH Substanzen, welche in den Zellen zu GGPP oder FPP phosphoryliert werden. Die anschließend mit PI und CD38-FITC gefärbten Zellen wurden im Durchflusszytometer ausgewertet.

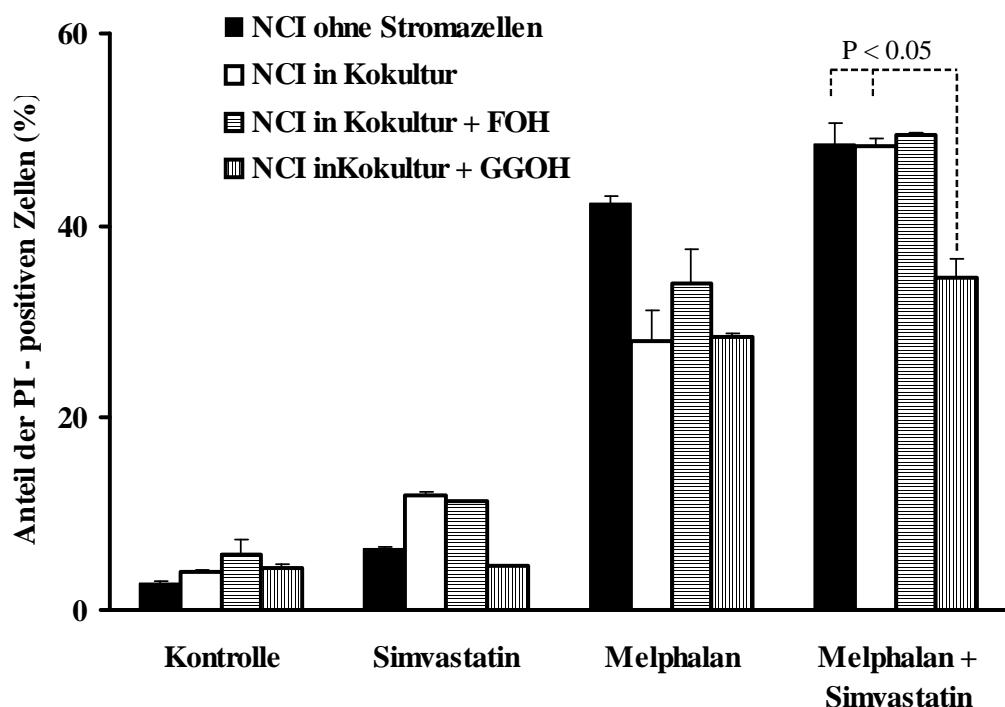


Abbildung 3.27: Simvastatin-induzierte Hemmung von CAM-DR wird durch GG-PP aufgehoben. NCI-H929 wurden über 48h in An- oder Abwesenheit eines konfluenten HS-5-Monolayers kultiviert. Wie dargestellt wurden Simvastatin 1 μ M, Melphalan 20 μ M, GGOH 10 μ M und FOH 10 μ M zugegeben. Nach 48h wurde am Durchflusszytometer auf CD38-positive Zellen gegated und der Anteil der PI-positiven Zellen bestimmt. Für die Abbildung wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung verwendet. „n.s.“ steht für „nicht signifikant“.

Abbildung 3.27 zeigt noch einmal die CAM-DR, also das verminderte Ansprechen adhärenter Zellen auf ein Zytostatikum, welche hier 33% beträgt. Durch Simvastatin kann CAM-DR hier auf 0% gesenkt werden. Nur GGOH, nicht FOH, kann die durch Simvastatin verursachte Verminderung der CAM-DR von 0% auf 16% rückgängig machen. Dies zeigt, dass GGOH, welches in der vitalen

Zelle zu GG-PP phosphoryliert wird, das für CAM-DR verantwortliche Stoffwechselprodukt sein muss.

Um sichergehen zu können, dass GGOH zum Signalweg von CAM-DR gehört, wurde diesmal in einem Kokulturversuch CAM-DR nicht durch Simvastatin, sondern durch GGTI-298 und FTI-277 gehemmt. Beide Stoffe hemmen Transferasen, welche für die Modifizierung posttranslationaler Proteine verantwortlich sind.

Dafür wurden NCI-H929 über 48 Stunden in An- oder Abwesenheit eines konfluenten HS-5-Monolayers mit Melphalan 20 μ M und GGTI-298 5 μ M oder FTI-277 2,5 μ M inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit CD38-FITC und PI gefärbt und der nekrotische Anteil der Zellen im Durchflusszytometer bestimmt.

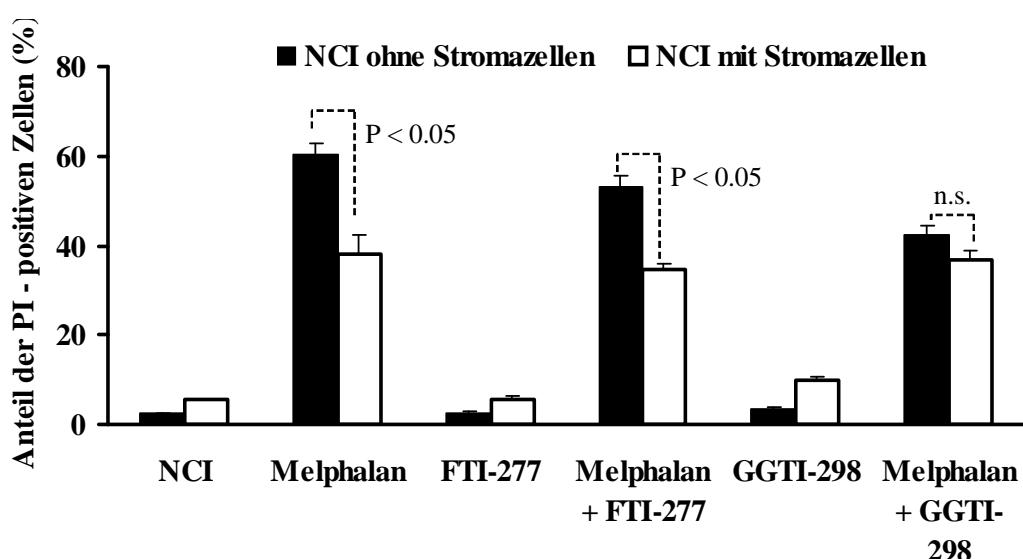


Abbildung 3.28: CAM-DR wird durch GGTase ausgelöst. NCI-H929 wurden 48h lang in der An- oder Abwesenheit von HS-5-Stromzellen kultiviert. Simvastatin 1 μ M, Melphalan 20 μ M, FTI-277 2,5 μ M (Farnesyltransferaseinhibitor) und GGTI 5 μ M (Geranylgeranioltransferaseinhibitor) wurden wie angegeben vor der Kultur zugegeben. Nach 48h wurden die Zellen mit CD38-FITC und PI gefärbt und der Anteil der toten Zellen am Durchflusszytometer bestimmt. Für die Abbildung wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung verwendet. „n.s.“ steht für „nicht signifikant“.

Wie durch Abbildung 3.28 gezeigt werden kann, vermag nur GGTI-298 CAM-DR zu erniedrigen. So sind auf 37% der auf HS-5 adhärenten NCI-H929, 35% FTI-277-behandelten NCI-H929, jedoch nur 13% der mit GGTI-298 behandelten Zellen weniger apoptotisch als die NCI-H929-Monokulturen, was am ehesten einer Simvastatininkubation entspricht.

Diese Daten zeigen, dass GGTI-298 CAM-DR verhindern kann, und GG-PP teil des für CAM-DR relevanten Signalwegs ist.

Viele verschiedene Proteine werden durch die GGTase und FTase verändert. Wichtige, von der FTase modifizierte Proteine sind z.B Ras, welches direkt in den Ras/Raf/MEK/MAPK-Signalweg mündet. Von der GGTase werden v.a. kleine G Proteine modifiziert, z.B. Rho, Rap, Rab und Ran. Da die Relevanz von GG-PP bereits nachgewiesen wurde, stellte sich nun die Frage, ob ein Rho-Kinase-Inhibitor wie Y-27632 einen ähnlichen Effekt auf die CAM-DR hat wie Simvastatin.

Dafür wurden NCI-H929 auf einen vorinkubierten konfluenten HS-5-Monolayer geben mit 20 µM Melphalan, 1µM Simvastatin oder 20µM Y27632 über 48h inkubiert. Die Messung und Auswertung erfolgte nach 48 Stunden durch Doppelfärbung mit CD38-FITC und PI im Durchflusszytometer.

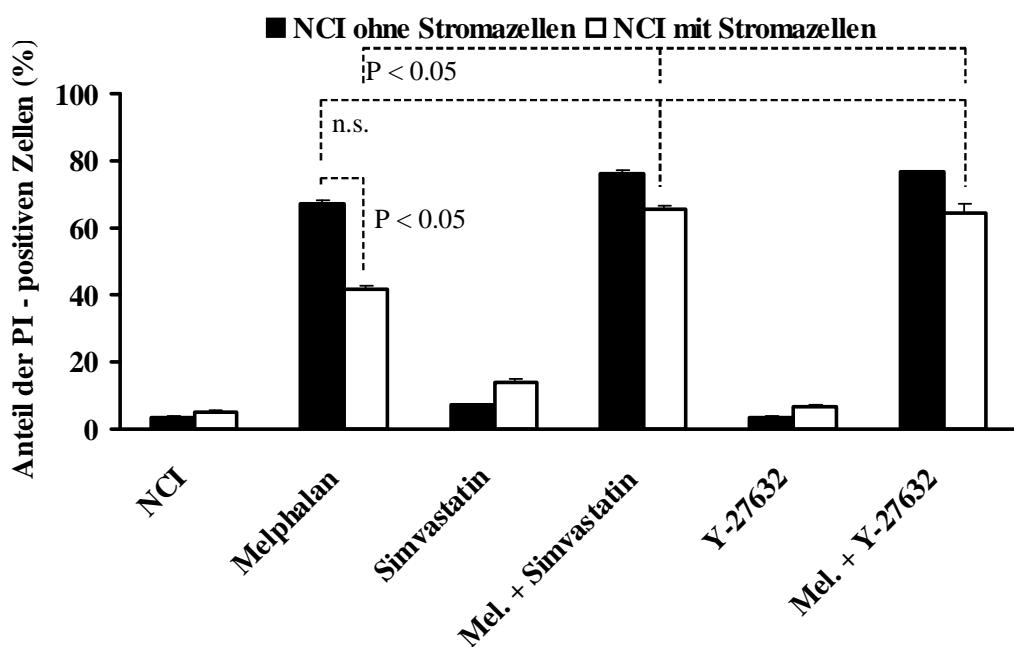


Abbildung 3.29: CAM-DR wird durch die Rho-Kinase aktiviert. Den kokultivierten NCI-H929 und HS-5-Zellen wurden 20 µM Melphalan, 1µM Simvastatin und 20µM Y-27632 zugegeben. Die Auswertung fand nach Doppelfärbung mit CD38-FITC und PI im Durchflusszytometer statt. Für die Abbildung wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung verwendet. „n.s.“ steht für „nicht signifikant“.

Wie Abbildung 3.29 zeigt, kommt es bei den mit Y-27632 inkubierten Zellen wie bei Simvastatin zu einer starken Erniedrigung er CAM-DR. Adhärente NCI-H929 gehen

um 39% weniger in Apoptose, bei Simvastatininkubation sind es 14%, bei Y-27632 15%. Dies legt nahe, dass beide Substanzen im selben Signalweg eingreifen.

Da Rho und die Rho-kinase bei Zellmigration und Zelladhäsion eine wichtige Rolle spielen, wurde ein Zelladhäsionsassay für diese beiden Substanzen wiederholt. Im Einzelnen wurden dazu für 48h NCI-H929 mit HS-5-Zellen koinkubiert und GGTI-298 5 μ M oder Y-27632 zugegeben. Danach wurde das Medium der Kulturgefäße abpipettiert und durch ein WST-1-Assay die Vitalität der Zellen bestimmt.

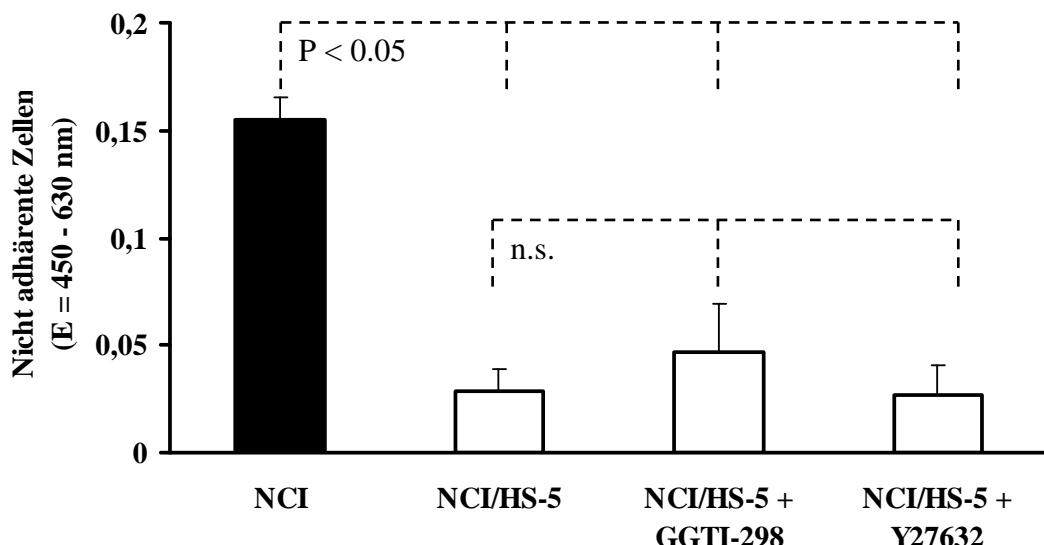


Abbildung 3.30: Hemmung des GG-PP/Rho/Rho-kinase-Signalwegs führt nicht zur DeadhäSION. Zu den NCI-H929, die in An- oder Abwesenheit von HS-5-Zellen kultiviert worden sind, wurde GGTI-298 5 μ M oder Y-27632 20 μ M zugegeben. Nicht adhäsente Zellen wurden durch Abpipettieren aus dem Kulturgefäß gewonnen und die Vitalität der Lebenden Zellen in einem WST-1-Assay bestimmt. Für die Abbildung wurden die Mittelwerte und die Standardabweichung verwendet. „n.s.“ steht für „nicht signifikant“.

GGTI-298 oder Y-27632 führen im NCI-H929/HS-5-Kokulturmödell nicht zu einer signifikant erhöhten Deadhäsion der Myelomzellen, was wiederum zeigt, dass die Myelomzelldeadhäsion nicht der tragende Mechanismus bei der Verringerung von CAM-DR durch Simvastatin ist (Abbildung 3.30).

Da bereits dargestellte Ergebnisse gezeigt haben, dass Simvastatin Expression und Funktion der Integrine auf Leukozyten verändern kann, wurden NCI-H929 für 48h mit 1 μ M Simvastatin oder 5 μ M GGTI-298 oder 20 μ M Y-27632 inkubiert und anschließend die Expression von VLA-4, LFA-1 und CD126 am Durchflusszytometer durch Oberflächenfärbung bestimmt.

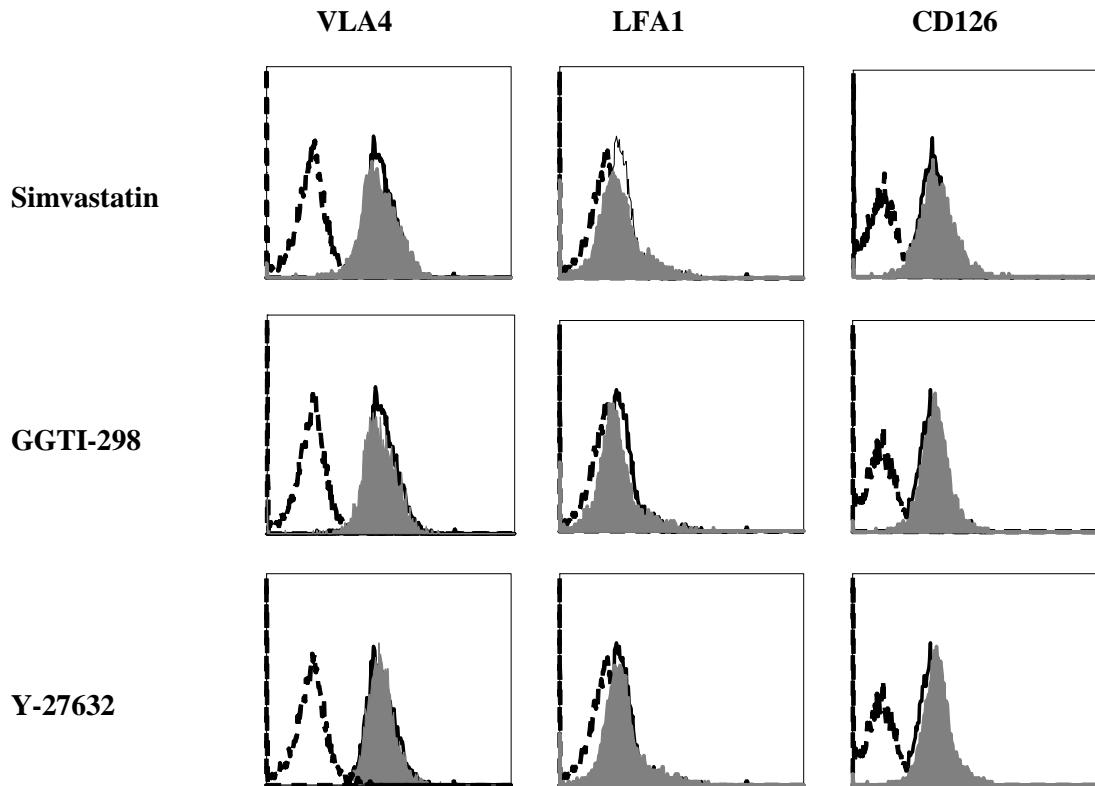


Abbildung 3.31: Simvastatin, GGTI-298 und Y-27632 führen nicht zu einer Änderung der Integrinexpression. NCI-H929 wurden über 48 Stunden mit oder ohne Simvastatin 1 μ M, GGTI-298 5 μ M oder Y-27632 20 μ M inkubiert, anschließend mit Antikörpern gefärbt und schließlich die Integrinexpression im Durchflusszytometer bestimmt. Die gestrichelte Linie zeigt die Isotypkontrolle mit IgG1, die durchgezogene Linie die unbehandelte Kontrolle und die grau hinterlegte Fläche die behandelte Probe.

Wie Abbildung 3.31 zeigt, kommt es bei den mit Simvastatin behandelten Zellen zu einer leichten Expressionsabnahme der Integrine, welche sicherlich nicht die 100%-ige Verminderung der CAM-DR erklären kann.

Da jedoch die Inkubation mit Y-27632 nicht eine Minderexpression der Integrine nach sich zieht, ist eine Regulation der Integrine durch den GG-PP/Rho/Rho-kinase-Signalweg nicht wahrscheinlich.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der GG-PP/Rho/Rho-kinase-Signalweg für CAM-DR von großer Bedeutung ist. CAM-DR kann in diesem Zellmodell durch Simvastatin vollkommen gehemmt werden.

4. DISKUSSION

4.1 Etablierung des Kokulturmmodells

Ziel dieser Dissertation war es, die primäre Chemoresistenz beim multiplen Myelom zu untersuchen. Dafür war die Etablierung eines Zellmodells notwendig, welches die Verhältnisse *in vivo* berücksichtigt und zudem die leichte Durchführung der für die Erforschung der primären Chemoresistenz benötigten Experimente garantiert. Die meist verwendeten Kokultur-Systeme mit primären Stromazellen haben den Nachteil, dass für die Generierung des Stromazelllayers bis zu 8 Wochen vergehen, bevor eine Kokultur mit den Myelomzellen möglich ist (Dankbar et al., 2000). Im Gegensatz dazu sind HS-5-Stromazellen mit einer Zellverdopplungszeit von ca. 3 Tagen eine hochproliferative Zelllinie, bei welcher die Zellzahl innerhalb von Tagen auf die benötigte Menge expandiert werden kann und dementsprechend schnell für ein Kokulturexperiment in ausreichender Menge verfügbar ist. Da es sich bei den HS-5 Zellen um eine proliferierende Zelllinie handelt, musste zuallererst ausgeschlossen werden, dass HS-5 vergleichbar sensibel auf gängige Zytostatika reagieren. Alle fünf getesteten Zytostatika konnten in den HS-5-Zellen Apoptose auslösen, jedoch lag die Chemosensitivität deutlich unter derjenigen der Myelomzellen, so dass prinzipiell die protektive Funktion der Stromazellen gewährleistet blieb. Interessanterweise zeigte sich, dass bei den HS-5-Zellen - wie auch bei den primären Stromazellen - nur die Zytostatika aus der Gruppe der Alkylantien einen dosisabhängigen Anstieg der Apoptoseraten erzielen konnten. Bei Gemcitabin, Cytarabin und Doxorubicin kam es trotz Dosisescalation zu keiner weiteren Steigerung des Apoptose. Die humanen BMSC von 8 Patienten reagierten interessanterweise weniger sensibel auf Zytostatika als HS-5-Zellen, was möglicherweise mit der langsameren Proliferation dieser primären BMSC in Verbindung gebracht werden kann.

Diese vorbereitenden Experimente haben gezeigt, dass Kokulturmessungen mit HS-5-Zellen und Myelomzellen durchführbar sind, da sich die Apoptoseraten der HS-5-Zellen von der der Myelomzellen deutlich abhebt und nicht zuletzt wegen der großen Zahl der von den HS-5-Zellen sezernierten Cytokine eine *in-vivo*-Situation nachgestellt werden kann (Roecklein et al., 1995). Für die Auswertung wurde das Zellgemisch mit konjugierten CD38-Antikörpern gefärbt und so die

Myelomzellen im Zellgemisch für die Durchflusszytometrie markiert. Schließlich wurde die Apoptoserate der Myelomzellen bestimmt. Die im HS-5-Zellmodell gewonnenen Ergebnisse gleichen den Ergebnissen aus einer hBMSC-Kokultur und zeigen die Gültigkeit der in der HS-5-Kokultur gewonnenen Ergebnisse an.

4.2. Zelladhäsionsvermittelte Chemoresistenz in Myelomzellen

Zelladhäsionsvermittelte Chemoresistenz wird als wichtigste Ursache der primären Chemoresistenz beim multiplen Myelom als auch bei vielen anderen Tumoren angesehen (Hazlehurst et al., 2003). Für deren Analyse wurden zuerst Experimente mit Myelomzellen durchgeführt, welche auf Fibronectin- und (rh)-ICAM-beschichteten Zellkulturgefäßen kultiviert und Zytostatika ausgesetzt wurden. Dabei stellt VLA-4 den Bindungspartner für Fibronectin, LFA-1 den Bindungspartner für (rh)-ICAM dar. Für alle verwendeten Myelomzelllinien wurde das Vorhandensein von VLA-4 und LFA-1 nachgewiesen. Im Gegensatz zu den Forschungsarbeiten von Damiano et al. konnte jedoch in unseren Experimenten Fibronectin und das daran bindende Integrin VLA-4 nicht als alleiniger Faktor für CAM-DR identifiziert werden (Damiano et al., 1999). Es kristallisierte sich zwar ein Trend heraus, dass Fibronectin CAM-DR ermöglicht; die Verminderung der Apoptoseraten war jedoch nicht statistisch signifikant. Auch das rekombinante rh-ICAM, welches an LFA-1 auf den Myelomzellen bindet, trug kaum zur Chemoresistenz bei. Der Grund hierfür mag bei der möglichen fehlenden Aktivierung des LFA-1-Rezeptors durch (rh)-ICAM liegen. Da jedoch auf den Myelom- und Stromazellen die Integrine ICAM und LFA-1 bei Inkubation mit einem Zytostatikum vermehrt auf der Zelloberfläche exprimiert werden, wird es wahrscheinlicher, dass es zur Adhäsion der Myelomzellen an die Stromazellen kommt. Insofern könnte die ICAM/LFA-1-Interaktion indirekt zu CAM-DR beitragen.

Versuche mit Fibronectin und rh-ICAM können nicht die in-vivo Situation repräsentieren, da sie jeweils nur einen im Microenvironment des Knochenmarks vorkommenden Bindungspartner für Myelomzellen repräsentieren. Im Microenvironment stehen aber viele Integrinbindungspartner für die Myelomzellen zur Verfügung, zusätzlich sind die Myelomzellen einem

Interleukinmilieu aus z.B. IL-3 und IL-6 ausgesetzt, was ebenfalls im Zellmodell mit rh-ICAM und Fibronectin nicht berücksichtigt wurde (Dalton et al., 2003).

Aus diesem Grund wurde ein Kokulturmodell mit HS-5-Stromazellen und Myelomzelllinien etabliert. In diesem Modell wurden mehrere verschiedene Zytostatika getestet: Doxorubicin und Melphalan sind die zwei wichtigsten Zytostatika in der Behandlung des multiplen Myeloms. Für Treosulfan und Gemcitabine wurde die apoptoseinduzierende Wirkung auf Myelomzellen von Meinhardt et al. nachgewiesen (Meinhardt et al., 2003). Bei allen vier Substanzen reduzierte die CAM-DR den Zytostatika-induzierten Zelltod um bis zu 63%. Dieses Ergebnis korreliert mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, welche als Zytostatikum Mitoxantrone aus der Gruppe der Anthrachinone verwendet haben (Nefedova et al., 2003). Diese Substanz gehört jedoch nicht zur Standardtherapie der Patienten mit Multiplen Myelom. Der antiapoptotische Effekt von CAM-DR kommt auch bei Dexamethason und der im Jahre 2004 neu zugelassenen Substanz Bortezomib zum tragen, wie Schmidmaier et al. gezeigt haben (Schmidmaier et al., 2004). Des Weiteren wurden vier Myelomzelllinien in diesem Kokultursystem getestet. Bei allen vier kommt es zu einer starken Apoptoseminderung, wenn die Myelomzellen in Anwesenheit von HS-5-Zellen oder primären BMSC mit Zytostatika inkubiert werden. Interessanterweise ist die Verminderung der Apoptose bei der Zelllinie U266 geringer ausgeprägt. Die Zellen dieser Zelllinie sind bereits in der normalen Kultur auf Plastik adhärent ist. Außerdem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass frühe Apoptose (Annexin-positiv) wie auch späte Apoptose (Propidiumjodid-positiv) durch Kontakt mit BMSC verhindert werden kann. Daran wird deutlich, dass CAM-DR über eine Hemmung von Apoptose und nicht von Nekrose zu stande kommt.

Lösliche Faktoren, wie z.B. Interleukin-6, werden auch als Resistenzfaktoren angesehen, tragen aber nicht in dem Maße zur Chemoresistenz bei wie es bei CAM-DR der Fall ist (Klein et al., 1995; Chatterjee et al., 2002). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem hier vorgestellten Modell in den Versuchen mit Kultureinsätzen und mit konditioniertem Medium bestätigt. Folglich ist der direkte Zell-Zell-Kontakt entscheidend für die Entstehung von CAM-DR beim multiplen Myelom.

Damiano et al. haben bereits gezeigt, dass resistente Myelomzelllinien vermehrt die relevanten Integrine LFA-1 und VLA-4 exprimieren (Damiano et al., 1999). In

der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass sich die Expression des LFA-1-Antigens auf den Myelomzellen bereits nach kurzer Inkubation mit Zytostatika verstärkt; die des VLA-4 blieb unverändert. Die korrespondierenden Adhäsionsmoleküle auf den Stromazellen werden ebenfalls nach nur 48-stündiger Zytostatikainkubation vermehrt exprimiert. Trotz dieser Ergebnisse haben Kokulturexperimente mit blockierenden LFA-1- und VLA-4-Antikörpern nicht zu einer vollkommenen Reduktion der CAM-DR geführt, was vermuten lässt, dass andere Mechanismen für CAM-DR verantwortlich sind. Dementsprechend ist die nur partielle Inhibition von CAM-DR durch den funktionellen VLA-4-Rezeptorblocker BIO5192 ein weiterer Beleg. Dieser Rezeptorantagonist wird derzeit zur Erforschung der Multiplen Sklerose und anderen inflammatorischen Erkrankungen in präklinischen Studien verwendet (Theien et al., 2003).

Die Interaktion zwischen LFA-1 und ICAM-1 kann durch den selektiven LFA-1-Blocker LFA703 verhindert werden. Diese Substanz ist ein Derivat der Statine, welches die Fähigkeit zur Hemmung der HMG-CoA-Reduktase verloren hat, jedoch $\alpha_L\beta_2$ und damit LFA-1 blockiert (Weitz-Schmidt et al., 2001). In den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten konnte diese Substanz im Kokulturversuch CAM-DR zu einem geringen Teil verhindern.

4.3 Modulation der klassischen Signalwege

Es hat sich gezeigt, dass die alleinige Blockade der Integrine VLA-4 und LFA-1 CAM-DR nicht vollkommen aufheben kann. Um weitere Informationen über den Mechanismus von CAM-DR zu bekommen, wurden Experimente durchgeführt, bei denen die wichtigsten, beim Plasmozytom bekannten Signalwege durch verschiedene Substanzen moduliert wurden. Dabei wurden die möglichen Signale gehemmt, welche von Rezeptortyrosinkinasen und/oder Integrinen ausgehen können. In den nachfolgenden Abbildungen werden diese ersichtlich:

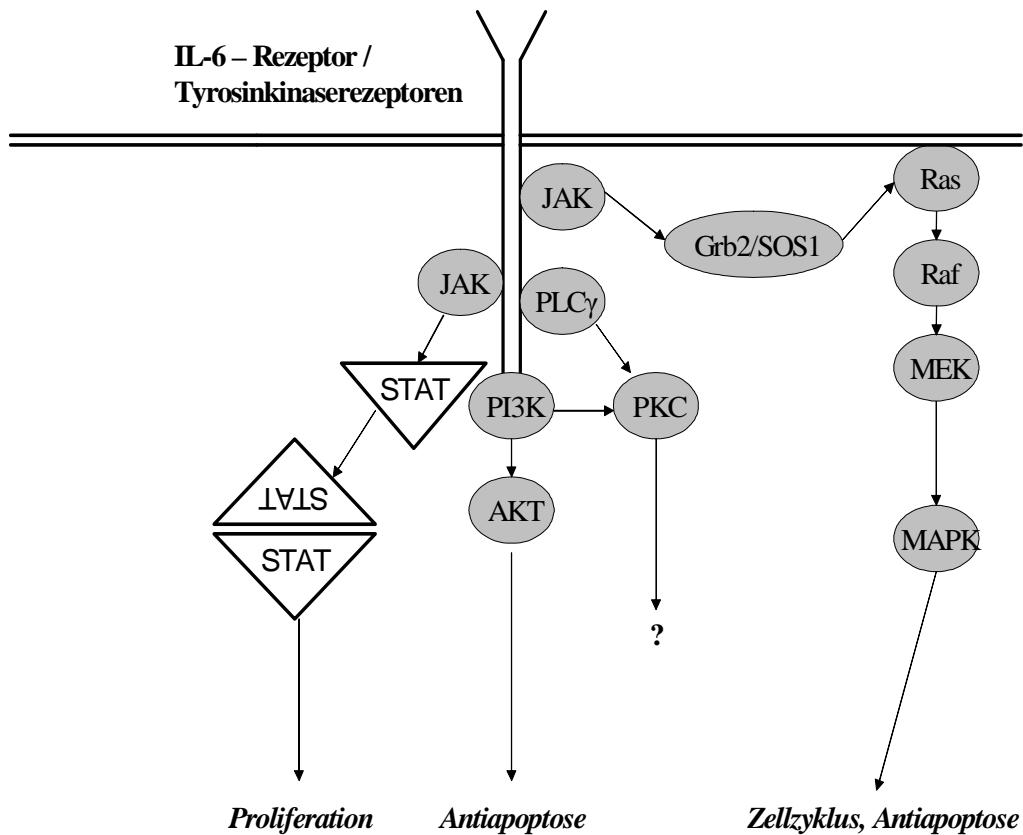


Abbildung 4.1: Vereinfachtes Schema der Tyrosinkinaserezeptoren und deren Signaltransduktion. Prinzipiell lassen sich vier wichtige Signalwege am Tyrosinkinaserezeptor finden. Der JAK/STAT-Signalweg, der PI₃-Kinase-Signalweg, der PLC γ /PKC-Signalweg und v.a. der Ras/Raf/MEK/MAPK-Signalweg.

Sowohl bei den von den Integrinen als auch den Tyrosinkinaserezeptoren ausgehenden Signalen können die wichtigsten Signalwege identifiziert werden.

Dies sind v.a.:

- Der JAK/STAT-Signalweg: Durch die Dimerisierung des Rezeptors kommt es zur Phosphorylierung von JAK, welches wiederum am Rezeptor die Bindungsstelle für Src homology-2 (SH-2) des STAT phosphoryliert. Dies führt zur Dimerisation von zwei STAT-Molekülen, welche so in den Zellkern translozieren und als Transkriptionsfaktoren wirken können.
- Der PI₃-Kinase/Akt-Signalweg: Viele Oberflächenrezeptoren generieren via second messenger eine Aktivierung der PI₃-Kinase, welche in der Signalkaskade proximal von Akt liegt. Die PI₃-Kinase, welche auch

integrin gebunden durch FAK aktiviert werden kann, generiert PIP2 und PIP3, welches an Akt bindet. PIP2 und PIP3 aktivieren ebenfalls die Phosphoinositide-Dependent Kinase PDK, welche wiederum Akt phosphoryliert. Das aktivierte Akt hemmt zum einen Apoptose durch Phosphorylierung des Bad/Bcl-xL-Komplexes, wodurch es zu einer Dissoziation von Bad und Bcl-xL und damit zur Antiapoptose kommt. Zum anderen aktiviert Akt IKK- α , welches zur Aktivierung von NF- κ B und damit zu einer Verhinderung der Apoptoseinduktion führt.

- Der PLC γ /PKC Signalweg: Über second messenger oder β_2 -Integrine wird die Phospholipase C γ aktiviert, sodass es zu einer Konzentrationssteigerung von DAG und Ca^{2+} kommt. Dadurch werden die Isoenzyme der PKC aktiviert (Kanner et al., 1993). Die Proteinkinase C hat vielfältigste Funktionen in der Zelle und wirkt oft kommunizierend zwischen den einzelnen Signalwegen, so ist die PKC α z.B. Bindeglied in der Signaltransduktion bei der VEGF-induzierten Migration von Myelomzellen auf Fibronectin (Podar et al., 2002). Interessanterweise wurde auch gezeigt, dass die PKC bei der Aktivierung der Integrine eine Rolle spielen (Kanner et al., 1997).
- Der Ras/Raf/MEK/MAPK-Signalweg kann ebenfalls sowohl von den Wachstumsrezeptoren als auch den Integrinen aktiviert werden. Dabei werden je nach Stimulus verschiedene Adaptorproteine (Shc, Grb2, etc) benötigt, welche den Rezeptor bzw. das Integrin an einen „Guanin-exchange-factor“ (GEF's: Sos, C3G) binden, um Ras zu aktivieren bzw. eine Translokation zur Zellmembran zu bewirken. Dort bindet Ras an Raf, beide zusammen aktivieren MEK. Die Hauptwirkung der Ras/Raf-Kaskade zeichnet sich durch eine Proliferationssteigerung aus.

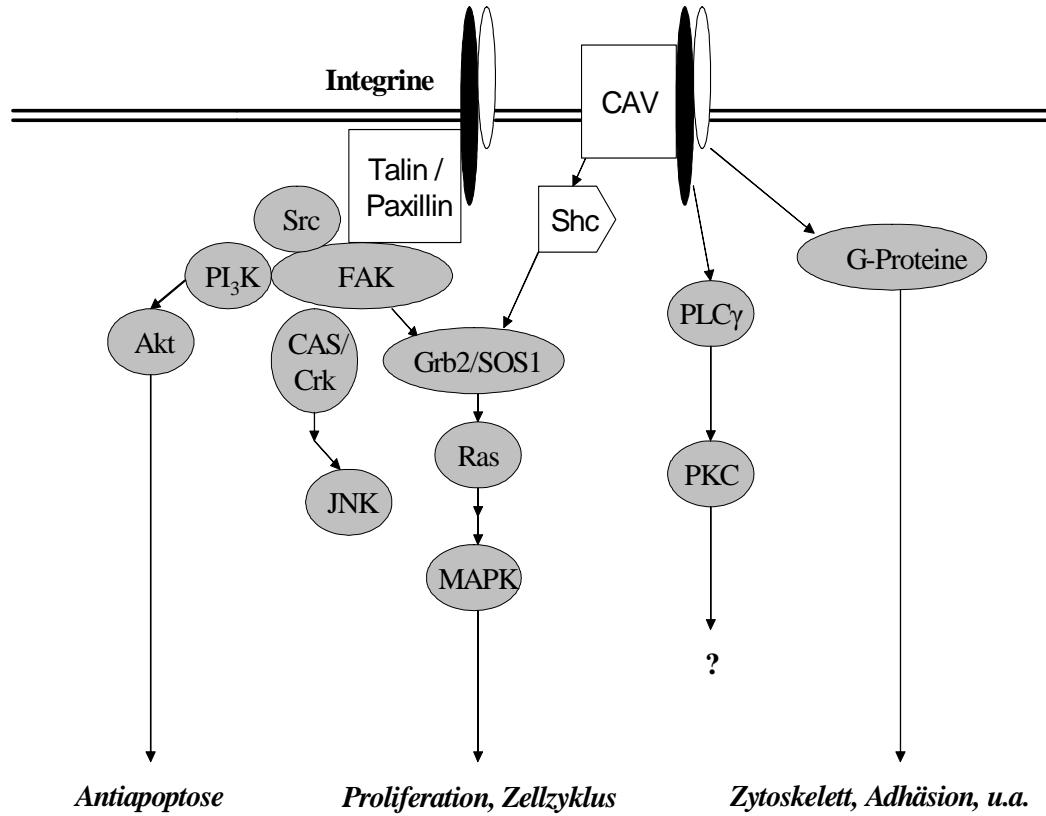


Abbildung 4.2 Schema der Integrinsignaltransduktion.

Die Ras/Raf – Kaskade kann sowohl über die FAK (*Focal adhesion Kinase*) als auch über CAV aktiviert werden. Weitere Signalwege beziehen die PI₃-kinase/Akt(PKB) und die kleinen G-Proteine, welche mannigfaltige Funktionen wie cytoskelettale Organisation, Adhäsion und Proliferation regulieren, mit ein (Juliano et al., 2002)

Auf diesem theoretischen Hintergrund wurde zuerst untersucht, ob die verschiedenen Signalwegsmodulatoren im Kokulturexperiment die Fähigkeit besitzen, CAM-DR aufzuheben.

Unsere Experimente zeigten, dass bis auf PD98059, ein MEK-Inhibitor, keine der Substanzen CAM-DR vermindern kann. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen aus der Western Blot Analyse, welche gezeigt haben, dass trotz Adhäsion der Myelomzellen auf den Stromazellen viele Signalwegsproteine nicht verstärkt oder vermindert exprimiert werden.

4.4 Der GG-PP/Rho/Rho-kinase-Signalweg

Hazlehurst et al. haben erst kürzlich vorgestellt, dass sowohl de novo als auch erworbende Chemoresistenz mit einer erhöhten Expression der HMG-CoA-

Reduktase einhergeht (Hazlehurst et al., 2003). Außerdem ist bekannt, dass Statine in inflammatorische Prozesse eingreifen können und auf deren Verlauf mildernd wirken. So wurde gezeigt, dass Statine die Oberflächenexpression von Integrinen auf Monozyten erniedrigen, welche die Entzündung in atherosklerotisch veränderten Gefäßen auslösen (Rezaie-Majd et al. 2003). In den hier gezeigten Experimenten konnten Statine die Integrinexpression auf Myelomzellen nur begrenzt herabregulieren. Trotzdem musste auf diesem Hintergrund die Rolle der HMG-CoA-Reduktase bei der zelladhäsionsvermittelten Chemosensitivität weiter untersucht werden.

Statinen sind Substanzen, welche die HMG-CoA-Reduktase kompetitiv hemmen. Die gängigsten Medikamente auf dem Markt sind Atorvastatin, Lovastatin, Simvastatin, Pravastatin und Fluvastatin. Dabei vollzieht die HMG-CoA-Reduktase den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Biosynthese des Cholesterols. Heute werden Statine weltweit zur Therapie der Hypercholesterinämie eingesetzt. Neben der Senkung des Serumcholesterins häufen sich die Hinweise, dass Statine neben z.B. der Prophylaxe von kardiovaskulären Ereignissen noch bei anderen Erkrankungen nützlich sein könnten, wie z.B. Alzheimer (Simons et al., 2001) und Osteoporose (Coons et al., 2002). Außerdem induzieren Statine in Tumorzellen sowohl *in vitro* als auch in Tiermodellen Apoptose. So haben DeNoyelle et al. gezeigt, dass Cerivastatin das Wachstum von Tumorzellen von Brustkrebszelllinien stoppen kann (DeNovelle et al., 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Statine in *in vitro* Experimenten in Zellen von Melanomen (Felezko et al., 2002), Schilddrüsenkarzinomen (Li et al., 2002), Kolonkarzinomen (Agarwal et al., 2002), und in der akuter lymphatischer Leukämie (Park et al., 1999) Apoptose induzieren können. Außerdem waren Metastasierung (Kusama et al., 2002) und Angioneogenese (Park et al., 2002) in Tierversuchen in der Statingruppe im Vergleich zu Plazebo Gruppe vermindert. Auch wurde gezeigt, dass Statine in Myelomzelllinien Apoptose induzieren können (Van de Donk et al., 2002; Van de Donk 2003). Auf diesem Hintergrund wurden die Statine Simvastatin und Lovastatin in nicht-toxischen Konzentrationen zusammen mit den entsprechenden Zytostatika zu den Kulturen zugegeben. Dies führte zu einer vollkommenen Reduktion der CAM-DR. Dieses Ausmaß der Reduktion der CAM-DR wurde bei ähnlich aufgebauten

Experimenten mit den Signalwegsmodulatoren, welche JAK/STAT, MEK, PI₃-Kinase und PKC modulierten, nicht erreicht.

Im Licht anderer Arbeiten, bei welchen die Cholesterolsynthese auf der Ebene der Mevalonatkinase gehemmt wird, erscheinen die hier vorgestellten Ergebnisse passend und plausibel (Gordon et al., 2002; Toyata et al., 2003). Darüber hinaus blockieren Statine weitere Signalwege (Van de Donk et al., 2003). Die der HMG-CoA-Reduktase nachgestellten Synthesemoleküle Farnesiol und Geranylgeraniol werden in der Zelle pyrophosphoryliert und dienen anschließend der posttranslationalen Modifikation von sog. kleinen G Proteinen. Bei Ihnen handelt es sich um monomeriche Proteine mit einer molekularen Masse von 20-30 kDa. In verschiedenen eukaryotischen Zellen sind bis heute in etwa 100 dieser kleinen G Proteine (engl.: *small G-proteins*) bekannt. Diese Superfamilie kann in 5 Untergruppen eingeteilt werden: Die Ras-, Rho-, Rab-, Sar1/Arf-, und Ran-Familie. Dabei wird Ras farnesyliert, Rho jedoch geranylgeranyliert. Erst nach der dieser Modifikation können G Proteine ihre Funktion ausüben. Aufgrund ihrer GTP-hydrolysierenden Eigenschaft haben sie die Funktion einer biologischen Uhr, welche Funktionen einer Zelle an- und abschalten können. Die Funktion der einzelnen Untergruppen reicht von der Änderung der Genexpression über Vesikeltransport bis hin zur zytoskelettalen Reorganisation in einer Zelle.

Interessanterweise sind in vielen Tumoren die kleinen G Proteine überexprimiert, was den Verdacht aufkommen lässt, dass die in der Tumorgenese eine wichtige Rolle spielen (Benitah et al., 2003). Es wurde gezeigt, dass Rho Proteine in Fibroblasten von Integrinen aktiviert werden (Bourdoulous et al., 1998) und weiterhin für den Eintritt der Fibroblasten in die S-Phase im Zellzyklus sowohl eine Ras als auch RhoA-aktivierung vorliegen muss (Danen et al., 2000). Ihre Rolle im Zellzyklus wurde noch genauer charakterisiert: Durch die Hemmung von p21WAF1, p27KIP1 und p16Ink4 (Olson et al., 1998), Hyperphosphorylierung von Rb (Bourdoulous et al., 1998) und Hochregulation der CyclinD1-Expression (Welsh et al., 2001) wird eine erhöhte Proliferationsrate in Fibroblasten erreicht. Neben dem wachstumsstimulierenden Eigenschaften der G-Proteine führt v.a. in Epithelzellen die Aktivierung von RhoA zu einer Aktivierung von NFκB. NFκB erhöht die CyclinD1-transskription, führt ebenfalls zur Hyperphosphorylierung von Rb und wirkt antiapoptotisch (Hideshima et al., 2002; Landowski et al., 2003).

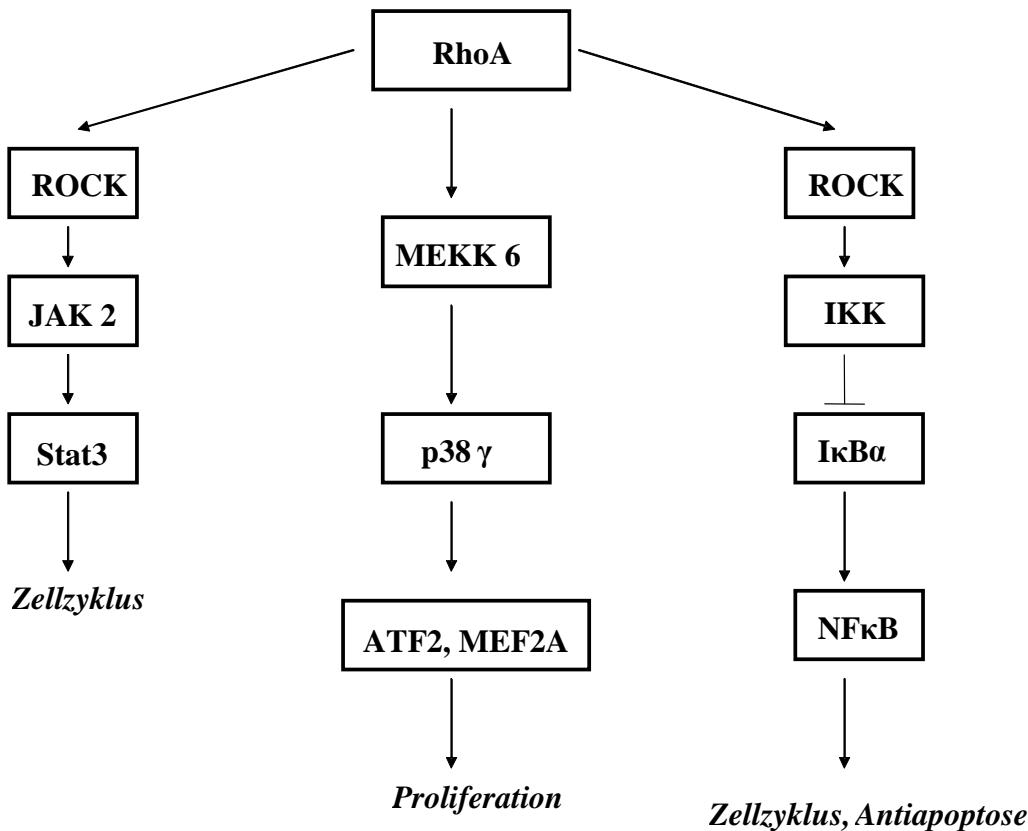


Abbildung 4.3 : Downstream Signalwege von RhoA in verschiedenen Tumorentitäten

(Benitah et al., 2004)

Nachdem Statine CAM-DR in den Kokulturexperimenten fast vollkommen verhindern konnten, wurden die beiden der HMG-CoA-Reduktase nachgeschalteten Signalwege selektiv mit FOH (entspricht Farnesylpyrophosphat), GGOH (entspricht Geranylgeraniolpyrophosphat), FTI-277 und GGTI-298 modifiziert. In allen damit durchgeföhrten Experimenten erwiesen sich GGTI-298 und GGOH als relevant für die Modifikation von CAM-DR. Im Gegensatz dazu spielten FTI-277 und FOH keine Rolle. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von zwei Arbeitsgruppen, welche die Hemmung der Geranylgeranylierung in Lymphomzellen und Myelomzellen als wichtigen Apoptoseinduktor identifiziert haben (Van de Donk et al., 2002, 2003). In diesen Publikationen wird gezeigt, dass es zur Apoptoseinduktion kommt, weil die Konzentration des antiapoptotischen Proteins Mcl-1 erniedrigt wird.

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden Statindosierungen verwendet, welche nicht toxisch wirken. Auch konnte in den kokultivierten Myelomzellen keine Änderung der Mcl-1-Konzentration entdeckt werden. Im Hinblick auf die Ergebnisse der Experimente mit GGOH und GGTI erschien die Geranylgeranylierung als Signalweg für CAM-DR. Wie oben beschrieben werden v.a. Rho und Rab geranylgeranyliert. Effektoren von Rho sind Proteine wie z.B. ROCK, PKN, Citron/CitronKinase, Rhotekin, Rhophilin, mDia1/2, PLD und PIP₅-kinase. Dabei wird der Rho-Kinase eine Rolle in der Aktinreorganisation, Zelladhäsion, Transkriptionsregulation, Transformation und Metastasierung zugesprochen (Aznar et al., 2004). Ishizaki et al. haben gezeigt, dass durch die Hemmung der Rho-kinase in Fibroblasten der Zellzyklus stark verlangsamt werden kann und die Zellen länger im Stadium der G₁-S-Phase bleiben, also Einfluss auf den Zellzyklus haben (Ishizaki et al., 2000). Auf diesem Hintergrund wurde Y-27632 im hier vorgestellten Kokulturmodell untersucht. Y-27632 führte wie Simvastatin zu einer Verhinderung von CAM-DR und stellte die Chemosensitivität der Myelomzellen wieder her, ohne dabei auf die Integrinexpression oder die Zelladhäsion Einfluss zu nehmen.

Diese Arbeit zeigt, dass der HMG-CoA-Reduktase/GG-PP/Rho/Rho-kinase-Signalweg für CAM-DR verantwortlich ist. Dieser Signalweg kann durch Statine, Hemmer der Geranylgeranioltransferase und der Rho-Kinase geblockt werden. Da Statine bereits heute weltweit zur Senkung der Hypercholesterinämie Anwendung finden und zusätzlich hier gezeigt wurde, dass nur minimale Konzentrationen der Statine ausreichen um CAM-DR zu hemmen, sollte unbedingt eine klinische Evaluation der Statine in Kombination mit Zytostatika bei Patienten mit multiplen Myelom erfolgen. Da CAM-DR nicht nur beim Myelom eine Rolle zu spielen scheint, wären weitere Experimente mit Zellen anderer Tumorentitäten mit Sicherheit lohnenswert.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das multiple Myelom ist eine Erkrankung, bei der terminal differenzierte Plasmazellen das Knochenmark infiltrieren, wodurch das typische klinische Bild eines Myelompatienten zustande kommt. In den letzten Jahren haben sich die Hinweise gehäuft, dass die Bindung der Myelomzellen im Knochenmark an Stromazellen die Chemosensitivität der Myelomzellen vermindert und somit zur „de-novo drug resistance“ beiträgt.

Das primäre Ziel dieser Arbeit war es, ein Zellmodell zu entwerfen, mit welchem die Untersuchung der Interaktionen von Stromazelle und Myelomzelle und damit der zelladhäsionsabhängigen Zytostatikaresistenz (CAM-DR) möglich ist. Darüber hinaus sollte diese Zytostatikaresistenz charakterisiert und mögliche molekulare Therapietargets identifiziert werden, welche eine Verhinderung von CAM-DR ermöglichen.

Da das etablierte Kokulturmodell auf einer Kultur mit der Stromazelllinie HS-5 beruhte, wurde diese zuerst bezüglich der Oberflächenmarker und des Apoptoseverhaltens charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass sich primäre Stromazellen aus Knochenmarksspiralen und die Stromazelllinie HS-5 zwar in ihrer Chemosensibilität unterscheiden, sie prinzipiell jedoch gleich reagieren. Beide lösen bei einer direkten Kokultur mit Myelomzellen im selben Maße CAM-DR in den Myelomzellen aus. Die anschließende Charakterisierung von CAM-DR bewies, dass CAM-DR nicht zelllinienspezifisch und nicht zytostatikaspezifisch ist. HS-5-Zellen verhinderten nicht nur die Entstehung von später sondern auch von früher Apoptose. Es zeigte sich, dass das Ausmaß von CAM-DR maßgeblich von der Dauer der Kokultivierung abhängt.

Des Weiteren stellte sich heraus, dass in diesem Zellmodell die von den HS-5-Zellen sezernierten Zytokine keinen Einfluss auf die Apoptoseinduktion hatten. Konsequenterweise wurden die Oberflächenantigene auf den Myelomzellen und den Stromazellen quantifiziert und teilweise deren Alteration nach einer Inkubation mit Zytostatika festgestellt. Sowohl eine Blockade der wichtigsten

Integrine VLA-4 und LFA-1 als die Modulation der wichtigsten Signalwege konnte CAM-DR zwar teilweise, aber nicht vollkommen verhindern.

Allein Vertreter der Statine, Simvastatin und Lovastatin, konnten CAM-DR drastisch reduzieren. Wie weiterhin gezeigt werden konnte, lag dies nicht an einer verminderten Expression von Oberflächenintegrinen, einer verminderten Zytokinsekretion der Stromazellen oder einer verstärkten Deadhäsin der Myelomzellen von den Stromazellen, sondern an der Hemmung der Geranylgeraniolpyrophosphatsynthese. Wir wiesen nach, daß Statine in der Kokultur über die Hemmung des HMG-CoA-Reduktase/GG-PP/Rho/Rho-kinase-Signalwegs wirken. Dies wurde in weiteren Experimenten, in denen selektiv die Geranylgeranioltransferase mittels GGTI-298 und die Rho-Kinase mit Y-27632 gehemmt wurden, bestätigt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können als Grundlage für einen potentiellen Einsatz von Statinen in der Therapie des multiplen Myeloms dienen, denn bezüglich des dargestellten Signalwegs wirken die Statine bereits im subtoxischen Bereich. Die weitere Erforschung von CAM-DR und deren assoziierte Signalwege bei anderen Tumorentitäten sowie die Evaluation der klinischen Relevanz der Gabe von Statinen zur Blockade von CAM-DR ergeben sich als wichtige nächste Schritte als Konsequenz der vorliegenden Arbeit.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aznar S, Valeron PF, Espina C, Lacal, JC: Rho GTPases: potential candidates for anticancer therapy; *Cancer letters* 2004;206;181-191
2. Agarwal B, Halms B, Feoktistov AS, et al. Mechanism of lovastatin-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *Carcinogenesis*. 2002; 23 521-528
3. Benitah SA, Espina C, Valeron PF, Lacal JC: Rho GTPases in human carcinogenesis: a tale of excess. *Rev. Oncol.* 2003; 5; 70-78
4. Benitah SA, Valeron PF, van Aelst L, Marshall CJ, Lacal JC: Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation: *Biochimica et Biophysica Acta* 2004; 1705; 121-132
5. Bisping G, Kropff M, Wenning D, Dreyer B, Bessonov S, Hilberg F, Roth GJ, Munzert G, Stefanic M, Stelljes M, Scheffold C, Muller-Tidow C, Liebisch P, Lang N, Tchinda J, Serve HL, Mesters RM, Berdel WE, Kienast J. Targeting receptor kinases by a novel indolinone derivative in multiple myeloma: abrogation of stroma-derived interleukin-6 secretion and induction of apoptosis in cytogenetically defined subgroups. *Blood*. 2005 Nov 8
6. Bourdoulous S, Orend G, Mackenna DA, Pasqualini R, and Rouslahti E: Fibronectin Matrix Regulates activation of Rho and cdc42 GTPases and Cell Cycle Progression. *Journal of Cell Biology* 1998;143,1,267-276
7. Chatterjee M, Hönenmann D, Lentzsch S, Bommert K, Sers C, Hermann P, Mathas S, Dörken B, and Bargou R: in the Presence of bone marrow stromal cells multiple myeloma cells become independant of the IL-6/gp130/STAT3 pathway; *Blood* 2002; 100; 9; 3311-3318

8. Chauhan D, Uchiyama H, Urashima M, Yamamoto K, Anderson KC: Regulation of interleukin 6 in multiple myeloma and bone marrow stromal cells. *Stem Cells*. 1995 Aug;13 Suppl 2:35-9
9. Coons JC. HMG-CoA reductase inhibtores in osteoporosis management. *Ann Pharmacother*. 2002, 36, 326-30
10. Dalton WS, Crowley JJ, Salmon SS, Grogan TM, Laufman LR, Weiss GR, Bonnet JD. A phase III randomized study of oral verapamil as a chemosensitizer to reverse drug resistance in patients with refractory myeloma. A Southwest Oncology Group study. *Cancer*. 1995 Feb 1;75(3):815-20.
11. Dalton WS. The tumor microenvironment: focus on myeloma. *Cancer treatment reviews* 2003; 29(Suppl.1); 11 - 19
12. Damiano SJ, Cress AE, Hazlehurst LA, Shtil AA, Dalton WS: Cell Adhesion Mediated Drug Resistance (CAM-DR): Role of Integrins and Resistance to Apoptosis in Human Myeloma Cell Lines; *Blood* 1999; 93 ; 5;1658 – 1667
13. Danen EHJ, Sonneveld P, Sonnenberg A, Yamada KM; Dual stimulation of ras/mitogen-activated protein kinase and rhoA by cell adhesion to fibronectin supports growth factor-stimulated cell cycle progression. *Journal of Cell Biology* 2000; 151;7;1413-1422
14. Berno Dankbar, Teresa Padró, Regine Leo, Birgit Feldmann, Martin Kropff, Rolf M. Mesters, Hubert Serve, Wolfgang E. Berdel, and Joachim Kienast: Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma; *Blood*. 2000 Apr 15; 95(8):2630-6.

15. DeNoyelle C, Vasse M, Korner M; Cerivastatin, an inhibitor of HMG-CoA-reductase inhibits the signaling pathways involved in the invasivness and metastatic properties of hightly invasive breast cancer cell lines: an in vitro study. *Carcinogenesis* 2001; 22; 1139-48
16. Felezko W, Mlynarczuk I, Olszewska D, Lovastatin potentiates antitumor activity of doxorubicine in murine melanoma via an apoptosis-dependent mechanism *Int J Cancer* 2002; 100; 111-118
17. Gordon S, Helfrich MH, Sati HIA, et al. Pamidronate causes apoptosis of plasma cells in vivo in patients with multiple myeloma. *British Journal of Haematology* 2002; 119:475-483
18. Giuliani N, Colla S, Morandi F, Rizzoli V: The RANK/RANK ligand system is involved in interleukin-6 and interleukin-11 up-regulation by human myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Haematologica*. 2004 Sep;89(9):1118-23
19. Hazlehurst LA, Dalton WS: Mechanisms associated with cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR) in hematopoietic malignancies; *Cancer and Metastasis Reviews* 2001; 20; 43-50
20. Hazlehurst LA, Enkemann SA, Beam CA: Genotypic and phenotypic comparisons of de novo and acquired melphalan resistance in an isogenic multiple myeloma cell line model; *Cancer Research* 2003; 63; 7900-7906
21. Hazlehurst LA, Landowski TH, Dalton WS, Role of the tumor microenvironment in mediating de novo resistance to drugs and physiological mediators of cell death. *Oncogene* 2003 Oct 20;22 (47):7396-402
22. Herold G: Herold - Innere Medizin;2005; S. 68

23. Hideshima T, Chauhan D, Richardson P and Anderson KC: NF κ B as a therapeutic Target in Multiple Myeloma; *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277; 19; 16639-16647
24. Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, and Narumiya S: Pharmacological Properties of Y-27632, a specific inhibitor of Rho-associated kinases. *Molecular Pharmacology* 2000. 57; 976-983
25. Juliano RL: Signal Transduction By Cell Adhesion Receptors and the Cytoskeleton; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2002; 42; 283-323
26. Kanner BS, Grosmaire LS, Ledbetter JA, Damle NK: β 2-integrin LFA-1 signaling through Phospholipase C γ 1 activation. *Journal of Immunology* 1993; 90; 7099-7103
27. Kolanus W, Seed B. Integrins and inside-out signal transduction: converging signals from PKC and PIP3; *Current Opinion in Cell Biology* 1997; 9;725-731
28. Klein B: Cytokine, Cytokine Receptor, Transduction Signals and oncogenes in Human Multiple Myeloma; *Seminars in Haematology* 1995 ; 32 ;1 ;4-19
29. Kusama T, Mukai M, Iwasaki T et al. 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme. A reductase inhibitor reduce human pancreatic cancer cell invasion and metastasis. *Gastroenterology* 2002;122:308-317
30. Kyle RA: Long-term survival in multiple myeloma. *N Eng J Med*; 1983; 308:314-316
31. Lamerz R: Epidemiologie des Multiplen Myelom: *Tumorzentrum München Manual Multiples Myelom*, 2. Auflage, 2002, S. 10-11

32. Landowski TH, Olashaw NE, Agrawal D, Dalton WS. Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) is associated with activation of NF- κ B (RelB/p50) in myeloma cells. *Oncogene*. 2003 Apr 24;22 (16):2417-21
33. Leone DR, Giza K, Gill A, Dolinski BM, Yang W, Perper S, Scott DM, Lee WC, Cornebise M, Wortham K, Nickerson-Nutter C, Chen LL, LePage D, Spell JC, Whalley ET, Petter RC, Adams SP, Lobb RR, Pepinsky RB: An assessment of the mechanistic differences between two integrin alpha 4 beta 1 inhibitors, the monoclonal antibody TA-2 and the small molecule BIO5192, in rat experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;305(3); 1150-1162
34. Li X, Liu L, Tupper JC, et al. Inhibition of protein geranylgeranylation and RhoA/RhoA-kinase pathway induces apoptosis in human endothelial cells. *J Biol Chem*. 2002; 277 :15309-15316
35. Lokhorst HM, Lamme T, de Smet M, et al. Primary tumor cells of myeloma patients induce interleukin-6 secretion in long-term bone marrow cultures. *Blood*. 1994 84:2269-2277
36. Longo DL: Erkrankungen der Plasmazellen. *Harrison`s Innere Medizin*, 14. Auflage; 1999; S.854 – 856.
37. Meinhardt G.; Dayyani F.; Jahrsdörfer B.; Baumgart J.; Emmerich B.; Schmidmaier R.: Treosulfan is an effective inducer of cell death in myeloma cell lines and primary myeloma cells from patients; *British Journal of Haematology* 2003; 122; 6; 892-899
38. Nefedova Y, Landowsky TH, Dalton WS: Bone marrow stromal derived factors and direct cell contact contribute to de novo drug resistance of myeloma cells by distinct mechanisms. *Leukemia*. 2003 Jun;17(6):1175-82

39. Olson MF, Paterson HF, Marshall CJ: Signals from ras and rho GTPases interact to regulate expression of p21WAF/CIP1; *Nature* 1998, 394; 295-299
40. Park HJ, Kong D, Iruela-Arispe L, Begley U, Tang D, Galper JB. 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase inhibitors interfere with angiogenesis by inhibiting the geranylgeranylation of RhoA. *Circ Res* 2002; 91:143-150
41. Park WH, LeeYY Kim ES, et al. Lovastatin-induced inhibition of HL-60 cell proliferation via cell cycle arrest and apoptosis. *Anticancer Research* 1999;19:3133-3140
42. Podar K, Anderson KC: VEGF induced Migration of MM cells is Associated with beta1 integrin and PIP3kinase dependent PKC α Activation. *J Biol Chem.* 2002 Mar 8;277(10):7875-81
43. Rezaie-Majd A, Prager GW, Bucek RA, Schernthaner GH, Maca T, Kress HG, Valent P, Binder BR, Minar Erich, Maghestanian M; Simvastatin Reduces the Expression of Adhesion Molecules in Circulating Monocytes From Hypercholesterolemic Patients; *Vascular Biology* 2003; 23; 397 – 403
44. Roecklein BA, Torok-Storb B. Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes. *Blood.* 1995 Feb 15;85(4):997-1005
45. Sanda T, Iida S, Ogura H, Asamitsu K, Murata T, Bacon KB, Ueda R, Okamoto T. Growth inhibition of multiple myeloma cells by a novel IkappaB kinase inhibitor. *Clin Cancer Res.* 2005 Mar 1;11(5):1974-82.
46. Schmidmaier R, Baumann P, Simsek M, Dayyani F, Emmerich B, and Meinhardt G: The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin overcomes cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma by

- geranylgeranylation of Rho protein and activation of Rho kinase. *Blood*, 15 September 2004, Vol. 104, No. 6, pp. 1825-1832
47. Simons M, Keller P, Dichgans J, Schul JB; Cholesterol and Alzheimer`s disease: is there a link? *Neurology* 2001; 57: 1089-93
48. Theien BE, Vanderlugt CL, Nickerson-Nutter C, Cornebise M, Scott DM, Perper SJ, Whalley ET, Miller SD. Differential effects of treatment with a small-molecule VLA-4 antagonist before and after onset of relapsing EAE. *Blood*. 2003 Dec 15;102(13):4464-71. Epub 2003 Aug 21.
49. Toyataka Iguchi, Yoshitaka Miyakawa, Kaori Yamamoto, Masahiro Kizaki, Yasuo Ikeda Nitrogen-containing bisphosphonates induce S-phase cell cycle arrest and apoptosis of myeloma cells by activating MAPK pathway and inhibiting mevalonate pathway. *Cellular Signaling* 2003; 15: 719-727
50. Van de Donk NW, Kamphius MM, Lokhorst HM, BLoem AC: The cholesterol lowering drug lovastatin induces cell death in myeloma plasma cells. *Leukemia* 2002 16:1362-1371
51. Van de Donk NW, Kamphius MMJ, van Kessel B, Lokhorst HM, BLoem AC: Inhibition of geranylgeranylation induces apoptosis in myeloma plasma by reducing Mcl-1 protein levels. *Blood* 2003;102:3354-3362
52. Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, Kamata T, Kallen J, Bruns C, Cottens S, Takada Y, Hommel U: Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site: *Nature Med* 2001; 7(6); 687-692
53. Welsh CF, Roovers K, Villanueva J, Liu Y, Schwartz MA, Assosian RK: Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho. *Nature Cell Biology* 2001; 3; 950-957

7. ANHANG

7.1 Verwendete Materialien und Methoden

7.1.1 Zellkultur

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

7.1.2 Zytostatika

| Name | Bestellnummer | Firma |
|-------------|---------------|--------------------------------|
| Melphalan | M2011 | <i>Sigma</i> , Taufkirchen, D |
| Treosulfan | Ovostat® | <i>Medac</i> , Hamburg, D |
| Doxorubicin | Adriblastin® | <i>Pharmacia</i> , Erlangen, D |
| Gemcitabine | Gemzar® | <i>Lilly</i> , Homburg, D |
| Cytarabine | Alexan® | <i>Mack</i> , Jllertissen, D |

7.1.3 Inhibitoren und Aktivatoren

| Name | Bestellnummer | Firma |
|-------------|---------------|-----------------------------------|
| Bryostatin | ST-103 | <i>Biomol</i> , Butler Pike, USA |
| UO-126 | 662005 | <i>Calbiochem</i> , Schwalbach, D |
| AG490 | 658407 | dto. |
| Piceatannol | 527948 | dto. |
| Gö76 | EI-269 | <i>Biomol</i> , Butler Pike, USA |
| Gö83 | EI-296 | dto. |
| GF109203X | EI-246 | dto. |
| G-CSF | Filgrastim® | <i>Amgen</i> , München, D |
| Ly249002 | 440204 | <i>Calbiochem</i> , Schwalbach, D |
| MG132 | 474790 | dto. |
| Ro 32-0432 | EI-284 | <i>Biomol</i> , Butler Pike, USA |
| PD98059 | 513000 | <i>Calbiochem</i> , Schwalbach, D |
| LFA703 | - | <i>Novartis</i> , Basel, CH |
| Simvastatin | 567021 | <i>Calbiochem</i> , Schwalbach, D |
| Lovastatin | 438186 | dto. |
| GGOH | G2378 | <i>Sigma</i> , Taufkirchen, D |
| FOH | 46191 | <i>Fluka</i> , Buchs, CH |
| FTI-277 | 344555 | <i>Calbiochem</i> , Schwalbach, D |
| GGTI-298 | 345883 | dto. |
| Y-27632 | 688001 | dto. |

7.1.4 Antikörper für Oberflächenmessungen

| <i>Antikörper</i> | <i>Klon</i> | <i>Bestellnummer</i> | <i>Firma</i> |
|-------------------|-------------|----------------------|-------------------------------------|
| CD54-FITC | 84H10 | IM0726 | <i>Beckman Coulter</i> , Krefeld, D |
| CD49a-PE | SR84 | 559594 | <i>Pharmingen</i> , Heidelberg, D |
| CD49d-FITC | HP2/1 | IM1404 | <i>Beckman Coulter</i> , Krefeld, D |
| CD49e-FITC | SAM1 | IM0771 | dto. |
| CD126α-PE | M91 | IM1979 | dto. |
| CD106-FITC | 51-10C9 | 551146 | <i>Pharmingen</i> , Heidelberg, D |
| CD11a-FITC | 25.3 | IM0860 | <i>Beckman Coulter</i> , Krefeld, D |
| CD38-FITC | T16 | IM0775 | dto. |
| CD138-FITC | MI15 | 347214 | <i>Pharmingen</i> , Heidelberg, D |
| CD38-PE | T16 | IM1832 | <i>Beckman Coulter</i> , Krefeld, D |
| D114-PE | LMM741 | 554538 | dto. |
| IgG1-PE | 679.1Mc7 | IM0670 | <i>Beckman Coulter</i> , Krefeld, D |
| IgG1-FITC | 679.1Mc7 | IM0639 | dto. |

7.1.5 Antikörper für die Western Blot Analyse

7.1.5.1 Primärantikörper

| <i>Antikörper</i> | <i>Klon</i> | <i>Bestellnummer</i> | <i>Firma</i> |
|-------------------|-------------|----------------------|--|
| Bcl-2 | 4C11 | Sc-578 | <i>SantaCruz Biotechnology</i> , California, USA |
| Bcl-XL | A20 | Sc-7122 | dto. |
| Bax | N20 | Sc-493 | dto. |
| Mcl-1 | S19 | Sc-819 | dto. |
| Stat3 | H190 | Sc-7179 | dto. |
| Erk1 | C16 | Sc-93 | dto. |
| Erk2 | C14 | Sc-154 | dto. |
| PKC α | C20 | Sc-208 | dto. |
| PKC β | C16 | Sc-209 | dto. |
| PKC δ | C20 | Sc-937 | dto. |
| Aktin | I19 | Sc-1616 | dto. |

| | | | |
|----------------------|-----|---------|------|
| Bad | C20 | Sc-943 | dto. |
| Akt | D17 | Sc-7126 | dto. |
| PI3-kinase (p85α) | Z8 | Sc-423 | dto. |
| ILP | N18 | Sc-8790 | dto. |
| IAP-1 | H83 | sc-7943 | dto. |
| IAP-2 | F20 | sc-1957 | dto. |

7.1.5.2 Sekundärantikörper

| <i>Antikörper</i> | <i>Bestellnummer</i> | <i>Firma</i> |
|------------------------|----------------------|---|
| Anti-Maus, HRP | NA 931 | <i>Amersham Biosciences, Uppsala, S</i> |
| Anti-Ziege, HRP | P0449 | <i>DAKO Cytomation, Glostrup, DK</i> |
| Anti-Kaninchen, HRP | NA 9340 | <i>Amersham Biosciences, Uppsala, S</i> |

7.1.6 Enzyme

| <i>Enzym</i> | <i>Bestellnummer</i> | <i>Firma</i> |
|--------------|----------------------|-------------------------------|
| Trypsin-EDTA | T3924 | <i>Sigma</i> , Taufkirchen, D |

7.1.7 Kits

| <i>Kit</i> | <i>Bestellnummer</i> | <i>Firma</i> |
|------------------------------|----------------------|--|
| ECL | RPN2106 | <i>Amersham</i> , Little Chalfont, UK |
| Annexin-FITC Apoptosekit | 65874X | <i>BD Pharmingen</i> , Heidelberg, D |
| WST-1 Proliferationskit | 1644807 | <i>Roche Diagnostics</i> , Penzberg, D |
| Bio-Rad, Marker | 161-0373 | <i>Bio-Rad Labs</i> , München, D |
| Bio-RAD Proteinfärbeagens | 500-0006 | <i>Bio-RAD</i> , München, D |

7.1.8 Chemikalien

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

7.1.9 Sonstige Artikel für den Western Blot

| <i>Artikel</i> | <i>Bestellnummer</i> | <i>Firma</i> |
|---------------------------------------|----------------------|---|
| Kamm, 10 wells, 1mm | 165-3359 | <i>Biorad</i> , München, D |
| Spacer Plates | 165-3311 | dto. |
| Schwämme, 8 x 11cm | 170-3933 | dto. |
| SDS-PAGE Standards, broad range | 161-0318 | dto. |
| Immobilon-P PVDF Membran | IPVH00010 | <i>Millipore</i> , Schwalbach, D |
| Hyperfilm ECL | RPN2103 | <i>Amersham Biosciences</i> , Uppsala, S |
| NaCl | S7581 | <i>Mallinckrodt</i> , Hazelwood, USA |
| NaF | S1504 | <i>Sigma</i> , Taufkirchen, Deutschland |

| | | |
|---|-------------|--|
| Na ₃ VO ₄ | S6508 | dto. |
| Na ₄ P ₂ O ₇ | S6422 | dto. |
| Tris, pH 7,5 1M | 351-006-100 | <i>Quality Biological, Inc.</i> Gaithersburg, USA |

7.1.10 Geräte

| <i>Gerät</i> | <i>Bestellnummer</i> | <i>Firma</i> |
|------------------------|--------------------------------------|---|
| Durchflusszytometer | Epics CL System II Version 3.0 | <i>Coulter Electronics</i> , Miami, USA |
| Elektrophoreseset | Ready Gel Cell | <i>Bio-rad</i> , München, D |
| Homogenisator | BBI-8530742 | <i>Sartorius</i> , Göttingen, D |
| Power Pac | 165-5050 | <i>Bio-rad</i> , München, D |
| BioFuge | 75005181 | <i>Heraeus instruments</i> , Osterode, D |
| Biophotometer | - | <i>Eppendorf</i> , Hamburg, D |
| Cell scraper | 353.086 | <i>Sarstaedt</i> , Nümbrecht, D |
| Neubauer Zählkammer | - | <i>Sarstaedt</i> , Nümbrecht, D |
| Brutschrank | Serie II 3110 | <i>Forma Scientific</i> , |
| Zentrifuge | Sigma 4K15 | <i>Sigma</i> , Taufkirchen, Deutschland |
| ELISA Reader | Multiscan | <i>Thermo Lab Systems</i> , Sorvaajankatu, FIN |

7.2 Danksagung

Danken möchte ich ...

- Prof. Dr. med. Bertold Emmerich, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, die Arbeit im Forschungslabor durchzuführen.
- PD Dr. Gerold Meinhardt für die Übernahme der Doktorvaterschaft, die hervorragende Betreuung und die Ermöglichung der Arbeit.
- Dr. Ralf Schmidmaier für lehrreiche wissenschaftliche Diskussionen, für die Stelle als stud. Hilfraft und die Aufmunterung während dieser Arbeit.
- Franziska Pöss, Christoph Hackl und Hans Kern für geduldiges Zuhören während meinen endlosen Monologen über diese Arbeit

7.3. Erklärung

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

München, den 6.03.06

(Philipp Baumann)

7.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Philipp Baumann
Geburtsdatum: 26.5.1979
Geburtsort: München

Schulbildung

1990 - 1995 Gymnasium Penzberg
1995 - 1996 Auslandjahr an der Felsted School, Essex,
Großbritannien
1998 Erhalt der allg. Hochschulreife am Gymnasium
Penzberg. Ausgezeichnet mit dem Preis für
hervorragende Leistungen im Fach Chemie.

Arbeitserfahrung

1998 - 1999 Zivildienstleistender als Rettungssanitäter an der
Rettungswache Penzberg
März 2000 Stud. Hilfskraft am Institut für Humangenetik (LMU)
März 2001 Praktikum am Institut für Biochemie (LMU)
März 2002 Famulatur am Klinikum Rechts der Isar in der 3. Med.
Abteilung (Hämato-onkologie)
April 2002 Beginn der Dissertation an der LMU im Labor für
molekulare Hämatologie/Onkologie unter Prof. Dr.
Emmerich und PD Dr. Meinhartd.
März 2003 Famulatur am Klinikum Rechts der Isar in der 2. Med.
Abteilung (Gastroenterologie)
Sept. 2003 Famulatur am Universitätshospital in Nairobi, Kenia im
Bereich Viszeralchirurgie und Gynäkologie
2004 - 2005 Praktisches Jahr mit Auslandaufenthalten in Colombo (Sri
Lanka) und Marseille (Frankreich).
Wahlfach: Pädiatrie

Hochschulbildung

- 1998 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilian-Universität
- 2001 Ärztliche Vorprüfung
Wechsel an die TU München
- 2002 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 2004 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 2005 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Publikation

- Schmidmaier R, **Baumann P**, Simsek M, Dayyani F, Emmerich B, Meinhardt G. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin overcomes cell adhesion-mediated drug resistance in multiple myeloma by geranylgeranylation of Rho protein and activation of Rho kinase. *Blood*. 2004 Sep 15;104(6):1825-32. Epub 2004 May 25

Abstracts

- Schmidmaier R, Mörsdorf K, **Baumann P**, Emmerich B, Meinhardt G Adhesion molecules that mediate drug resistance in multiple myeloma are upregulated after chemotherapy – selection of multidrug resistant myeloma cells in vivo. *Blood* 104 (2004): #4866
- Schmidmaier R, **Baumann P**, Dayyani F, Emmerich B, Meinhardt G. Cell adhesion mediated drug resistance is mediated by cell-cell interaction independent of soluble factors. *Blood*. 102 (2003): #1608

Dateiname: Baumann_Philipp.doc
Verzeichnis: E:
Vorlage: C:\Dokumente und
Einstellungen\pBaumann\Anwendungsdaten\Microsoft\Vorlagen\Normal.dot
Titel: Modulation des HMG-CoA-Reduktase/GG-PP/Rho-Signalwegs
zur Apoptoseinduktion in adhärenten Myelomzellen
Thema:
Autor: Baumann Philipp
Stichwörter: Myeloma, BMSC
Kommentar:
Erstelldatum: 17.02.2007 12:31:00
Änderung Nummer: 2
Letztes Speicherdatum: 17.02.2007 12:31:00
Zuletzt gespeichert von: bArT sImPsOn
Letztes Druckdatum: 19.02.2007 20:08:00
Nach letztem vollständigen Druck
Anzahl Seiten: 92
Anzahl Wörter: 18.109 (ca.)
Anzahl Zeichen: 114.090 (ca.)