

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

Direktor: Prof. Dr. M. Reincke

**Überwindung der zelladhäsionsvermittelten Chemo-
resistenz durch Hemmung des Mevalonat-
Signalweges beim Multiplen Myelom**

Dissertation

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

vorgelegt von
Meral Şimşek
aus München

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. G. Meinhardt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. C. Buske
PD Dr. med. R. Kammerer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter PD Dr. med. R. Schmidmaier

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Reiser

Tag der mündlichen Prüfung: 23.10.2008



*Gewidmet
Meiner lieben Familie*

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	7
1.1 Das Multiple Myelom – Klinik und pathophysiologische Grundlagen	7
1.2 Therapie des MM	11
1.3 Chemoresistenz- eine große Herausforderung in der MM-Therapie	13
2. Patienten, Materialien und Methoden	16
2.1 Zellkultur	16
2.1.1 Zelllinien	16
2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	16
2.1.3 Zellzahlbestimmung	17
2.1.4 Extrahierung von mononukleären Zellen	17
2.2 Zellvitalitätsmessungen	18
2.3 Durchflusszytometrische Analysen	18
2.3.1 Annexin/PI Apoptose Assay	18
2.3.2 Oberflächenmarkermessungen	21
2.3.3 Zytotoxizitäts-Assay unter Kokulturbedingungen	22
2.3.4 Durchführung und Auswertung der Kokulturveduche	23
2.4 Western Blotting	25
2.5 Statistik	29
3. Ergebnisse	30
3.1 Zelladhäsionsvermittelte Chemoresistenz (CAM-DR)	30
3.2 Antimyelomeffekt von Simvastatin	34
3.4 Bedeutung der Bisphosphonate in der Myelomtherapie	38
3.4.1 Zoledronsäure wirkt nicht toxisch in Myelomzellen	38
3.4.2 Bisphosphonate können die CAM-DR nicht inhibieren	41
3.4.3 Synergistische Wirkung von Simvastatin und Zoledronsäure	43
4. Diskussion	48
4.1. Zelladhäsionsvermittelte Chemoresistenz in Myelomzellen	48
4.2 Antimyelomeffekt von Simvastatin	51
4.3 Antimyelomeffekt von Bisphosphonaten	55
4.4 Synergistische Wirkung von Simvastatin und Zoledronsäure	59
5. Zusammenfassung	60
6. Literaturverzeichnis	62
7. Anhang	71
7.1 Verwendete Materialien und Methoden	71
7.2 Erklärung	75
7.3 Danksagungen	76
7.4 Lebenslauf	77

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 2.1: Das Annexin-PI Apoptose Assay	20
Abbildung 2.2 (qualitativ): Oberflächenmarkermessung (Baumann, 2006)	22
Abbildung 2.3: Monokultur aus Stromazellen versus NCI-H929/HS-5-Kokultur	24
Abbildung 2.4: Zytotoxizitäts-Assay unter Kokulturbedingungen	25
Abbildung 3.2: Resistenz gegen Bortezomib durch Adhäsion an Stromazellen	31
Abbildung 3.3a-c: Zeit- und dosisabhängige Zytotoxizität von Dexamethason in Myelomzellen	33
Abbildung 3.4: CAM-DR unter Dexamethason-Wirkung	34
Abbildung 3.5: Zeit- und dosisabhängige Hemmung der Zellproliferation durch Simvastatin	35
Abbildung 3.6a-c: Antimyelomeffekt von Simvastatin sowohl in der Mono- als auch in der Kokultur... ..	37
Abbildung 3.7: Western Blot Analyse der wichtigsten Signalmoleküle unter Simvastatinwirkung.....	38
Abbildung 3.8a-e: Fehlender Antimyelomeffekt von Zoledronsäure	41
Abbildung 3.9-3.11: Keine Abnahme der CAM-DR durch Zoledronsäure	43
Abbildung 3.12a-d: Synergistische Wirkung von Simvastatin und Zoledronsäure.....	47
Abbildung 4.1: GG-PP/Rho/Rho-Kinase-Signalweg	56

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: International Staging System (ISS).....	8
--	---

Teile der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden in internationalen peer-reviewed Zeitschriften veröffentlicht:

Schmidmaier R, Baumann P, **Simsek M**, Dayyani F, Emmerich B, Meinhardt G. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin overcomes cell adhesion mediated drug resistance in multiple myeloma by geranylgeranylation of Rho protein and activation of Rho kinase. *Blood* 2004; 104: 1825-1832. Impact Factor: 10.370 (2006)

Schmidmaier R, **Simsek M**, Baumann P, Emmerich B, Meinhardt G. Synergistic anti-myeloma effects of zoledronate and simvastatin. *Anti-Cancer Drugs* 2006; 17: 621-629. Impact Factor: 2.245 (2006)

1. Einleitung

1.1 Das Multiple Myelom – Klinik und pathophysiologische Grundlagen

Das Multiple Myelom (MM) ist eine maligne Entartung von Plasmazellen, die in der Regel aus einem Klon hervorgehen und das Knochenmark diffus oder multilokulär infiltrieren (Kasper *et al.*, 2005). Die Erkrankung zeichnet sich durch eine Akkumulation von Plasmazellen im Knochenmark aus, die monoklonale Immunglobuline (IgG, IgA, IgD) oder nur deren Leichtketten (κ , λ) sezernieren (Kasper *et al.*, 2005). Bei dem seltenen asekretorischen Myelom fehlt die Immunglobulinproduktion. Ein leukämischer Verlauf kommt sehr selten vor. Bislang konnte keine eindeutige Ätiologie beschrieben werden. Als Risikofaktoren werden genetische Einflüsse, ionisierende Strahlen, Immunschwäche und bestimmte Chemikalien diskutiert. Die Erkrankung tritt meist als generalisierter Knochenmarktumor auf, wobei man bei einem multizentrischen Befall von einem Multiplen Myelom oder Morbus Kahler und bei einem solitären Befall von einem solitären Plasmozytom spricht.

Die Häufigkeit der unterschiedlichen Immunglobulinisotypen beim Multiplen Myelom entspricht der physiologischen Verteilung: IgG tritt mit 53% am häufigsten auf, gefolgt von IgA mit etwa 25%, während IgD ca. 1% aller Myelome ausmacht (Kasper *et al.*, 2005). Leichtkettenmyelome sind unter den MM-Erkrankungen mit ca. 20% recht häufig vertreten (Kasper *et al.*, 2005). Das niedrige Molekulargewicht der Leichtketten (20-25kD) ist der Grund für ihre freie glomeruläre Durchgängigkeit. Beim Leichtkettenmyelom kommt es durch Einlagerung von Eiweißen zu Amyloidablagerungen. Eine Überlastung des renalen Filtrationsvermögens kann eine progrediente Nierenschädigung zur Folge haben. Diese für Myelom-Erkrankung typische Myelomniere kann letztendlich zur terminalen Niereninsuffizienz führen. Die Einführung der Diagnostik freier Leichtketten in Serum und Urin erleichtert heute die Verlaufskontrolle der seltenen asekretorischen Myelome (bei 3% der symptomatischen MM).

Das MM ist nach der WHO-Klassifikation ein niedrig-malignes B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom. Es macht bei Weißen etwa ein Prozent und bei Schwarzen zwei Prozent aller malignen Erkrankungen aus. Dies entspricht einem Anteil von 13 Prozent aller malignen hämatologischen Erkrankungen bei Weißen und von 33 Prozent bei Schwarzen (Kasper *et al.*, 2005). In Deutschland erkranken am Multiplen Myelom jährlich vier von 100.000 Menschen. Hierbei handelt es sich im Allgemeinen um eine

Krankheit des höheren Lebensalters, wobei Männer etwas häufiger als Frauen betroffen sind (Kasper *et al.*, 2005). Die Inzidenz des MM ist verglichen mit den Einwohnern der kaukasischen Region höher in der afrikanischen und niedriger in der asiatischen Bevölkerung (MMRF).

Vor rund 30 Jahren wurde das MM nach Salmon und Durie in drei Stadien eingeteilt, wobei einfache klinische Kriterien berücksichtigt wurden. Anhand von Werten für Hämoglobin, Kalzium, M-Protein und Ausmaß der Skelettbeteiligung wurde der Gesamtbefall des Körpers als gering, intermediär oder hoch eingestuft. Basierend auf der Nierenfunktion erfolgte eine weitere Unterteilung in A bei Serumkreatinin < 2 mg/dl und B bei Serumkreatinin > 2 mg/dl. Die Klassifikation nach Durie und Salmon ist klinisch noch gebräuchlich. Obwohl die Myelomparameter mit der Tumorzellmasse (Myelomzellen/m² Körperoberfläche) korrelieren, zeigen insbesondere Patienten, die in das Stadium III eingeteilt werden, bezüglich ihrer Prognose große Schwankungen. Außerdem sind die konventionellen radiologischen Diagnoseverfahren zur Erfassung der Knochenveränderungen nicht ausreichend. Formal ist die Stadieneinteilung nach Salmon und Durie durch das International Staging System ersetzt. Hierbei dienen β -2-Mikroglobulin (β 2M) und Albumin im Serum zur Abschätzung der Tumorlast und damit auch der Prognose. β 2M korreliert streng mit der Anzahl der B-Zellen bzw. Plasmazellen. Zudem ist β 2M bei Niereninsuffizienz erhöht. Albumin korreliert mit dem Allgemeinzustand des Patienten und der Lebersynthesestörung unter dem im Microenvironment des Knochenmarks synthetisierten Interleukin-6 (Greipp *et al.*, 2005). Das ISS wurde für die unbehandelten, symptomatischen MM-Patienten auf der Grundlage von über 10000 Patientendaten entwickelt (Greipp *et al.*, 2005).

Stadium	Parameter	Medianes Überleben
I	β 2M < 3,5 mg/l, Albumin \geq 35 g/l	62 Monate
II	β 2M < 3,5 mg/l, Albumin < 35 g/l 3,5 < β 2M < 5,5 mg/l	44 Monate
III	β 2M \geq 5,5 mg/l	29 Monate
*Nach Greipp JCO 2005		

β 2M: beta-2-Mikroglobulin

Tabelle 1: International Staging System (ISS)

Patienten mit niedrigem $\beta 2M$ ($< 3,5$ mg/l) und Albumin $< 3,5$ g/dl werden ins Stadium II klassifiziert. Sie gelten als eine Subgruppe mit erhöhtem Risiko (siehe Tabelle 1). Die Diagnose des MM stützt sich auf den Nachweis des monoklonalen M-Proteins im Serum und der Plasmazellvermehrung im Knochenmark. Als Screening-Verfahren spielt die Serum-/Urinelektrophorese nach wie vor eine große Rolle. Der Beweis bzw. Ausschluss einer monoklonalen Gammopathie erfolgt durch eine Immunfixation, die monoklonale Proteine ab 0,2 g/l detektieren kann. Eine monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz (MGUS) liegt vor, wenn ein monoklonales Protein (M-Protein) bis maximal 3 g/dl bei nur wenigen ($< 10\%$) Plasmazellen im Knochenmark und ohne Endorganschäden nachweisbar ist. Therapieindikation besteht beim symptomatischen Multiplen Myelom (sMM). Das Vorhandensein von Endorganschäden (ROTI = related organ or tissue impairment) wie Hyperkalzämie, Niereninsuffizienz, Anämie und Osteolysen kennzeichnet das symptomatische Multiple Myelom (International Myeloma Working Group (kurz: IMWG, 2003). Im Gegensatz dazu wird das asymptomatische (smouldering) Multiple Myelom (aMM) durch ein M-Protein > 3 g/dl und/oder eine Vermehrung der Plasmazellen im Knochenmark $> 10\%$ definiert (IMWG, 2003). Das aMM entspricht weitgehend dem Stadium I nach Salmon und Durie (Durie *et al.*, 1975; IMWG, 2003). Das symptomatische MM ist weitgehend identisch mit den Stadien II und III nach Durie und Salmon (Durie *et al.*, 1975; IMWG, 2003). Beim sMM sind keine Mindestangaben für das M-Protein und für klonale Plasmazellen im Knochenmark festgelegt (IMWG, 2003). Dennoch ist der Nachweis einer klonalen Plasmazellerkrankung durch Elektrophorese und Immunfixation aus Serum und/oder Urin notwendig (IMWG, 2003). Von der eigenen Gruppe des asekretorischen MM spricht man bei fehlendem Nachweis einer klonalen Plasmazellerkrankung durch Elektrophorese und Immunfixation aus Serum und/oder Urin bei gleichzeitigem Vorhandensein von ROTI und mehr als 10% Plasmazellen im Knochenmark (IMWG, 2003). Das Auftreten einer terminalen Niereninsuffizienz ist bei Patienten mit asekretoischem MM seltener als bei sekretorischen MM-Erkrankungen. Die Behandlung sowie das Ansprechen und das Gesamtüberleben sind allerdings bei beiden Formen ähnlich.

Bei Patienten mit neudiagnostiziertem symptomatischem MM kann anhand genetischer Abnormalitäten die Aggressivität der individuellen Myelomerkrankung abgeschätzt werden (Avet-Loiseau *et al.*, 2007). Die Bestimmung der genetischen Marker ist jedoch technisch aufwendig. Eine aktuelle multivariate Analyse ergab, dass ledig-

lich die Deletion del(17p) und die Translokation t(4;14) unabhängig sind. Die Deletion del(13q) erlaubt in der univariaten Analyse eine hochsignifikante Überlebensabschätzung, ist allerdings kein unabhängiger Parameter. Sie geht meist mit t(4;14) und del(17q) einher und hat ohne diese Veränderungen einen geringen prognostischen Wert. Hyperdiploidie, t(11;14) und t(6;14) scheinen mit einer guten Prognose verbunden zu sein. Im Rahmen von Studien wird zur Prognoseabschätzung die Bestimmung von t(4;14), t(14;16), del(17q) und del(13) empfohlen (Stewart *et al.*, 2007; Avet-Loiseau *et al.*, 2007). 25% der Patienten haben mindestens einen dieser zytogenetischen Risikofaktoren (Stewart *et al.*, 2007). Bei diesen genetischen Veränderungen ist die Ansprechrate auf die aktuellen Standardtherapien niedrig, sodass frühzeitig mit experimentellen Therapieansätzen begonnen werden sollte (Stewart *et al.*, 2007).

Das Multiple Myelom manifestiert sich in erster Linie im Knochenmark, andere Organe sind in der Regel nicht befallen. Das Knochenmark besteht hauptsächlich aus Knochenmarkstromazellen. In den 60er und 70er Jahren gelang es A. J. Friedenstein zum ersten Mal aus Knochenmarksproben Stromazellen zu extrahieren, die er als eine eigene zelluläre Entität erkannte (Friedenstein *et al.*, 1966; Friedenstein *et al.*, 1976). In Zellkultur wachsen sie adhärent und weisen einen charakteristischen fibroblastoiden Phänotyp auf. Durch ihre starke Plastikadhärenz ließen sie sich einfach isolieren und in der Kultur innerhalb eines Zeitraums von mehreren Wochen bis Monaten für primäre Zellen ungewöhnlich schnell expandieren. Auf diese Art und Weise sind bis zu 38 Populationsverdopplungen und eine resultierende Expansion um das $1,2 \times 10^9$ -fache möglich (Friedenstein *et al.*, 1966; Friedenstein *et al.*, 1976). Knochenmarkstromazellen sind neben der Produktion und Freisetzung löslicher Faktoren auch an der Bildung von wichtigen Bestandteilen der Extrazellulärmatrix wie zum Beispiel unterschiedlicher Kollagenarten und Fibronectin beteiligt. Knochenmarkstromazellen zeichnen sich ebenso wie die hämatopoetischen Stammzellen durch ihre Eigenschaft aus, nach intravenöser-Injektion in ihr ursprüngliches Körperkompartiment einzuwandern („Homing“).

Die wesentlichen klinischen Symptome gehen auf die Knochenmarkinfiltration zurück. Kennzeichnend für das Multiple Myelom sind osteolytische Knochenläsionen mit erhöhtem Frakturrisiko, nicht selten auch im Bereich der Wirbelsäule mit daraus resultierenden neurologischen Komplikationen. Die Lokalisation der Erkrankung im Knochenmark bedingt hauptsächlich zytokinvermittelt eine Aktivierung der Oste-

oklasten mit daraus resultierender Knochendestruktion (Kasper *et al.*, 2005). In den konventionellen Röntgenaufnahmen können sich diese Läsionen als osteolytische Knochenherde insbesondere des Achsenskeletts und des Schädels darstellen. Die Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen knochenbauendem und knochenabbauendem System zugunsten der Knochendestruktion kann Ursache hyperkalzämischer Krisen sein. Das verdrängende Wachstum der Myelomzellen verursacht häufig eine Störung der Hämatopoese. Dies führt initial zur Anämie. In fortgeschrittenen Stadien kann auch eine Panzytopenie mit dem entsprechenden Beschwerdebild einer Gerinnungsstörung und Abwehrschwäche des Immunsystems entstehen. Das häufig vorhandene Antikörpermangelsyndrom mit erhöhter Infektanfälligkeit geht auf eine exzessive Produktion funktionsuntüchtiger monoklonaler Immunglobuline zurück. Dieser Vorgang kann neben einer erhöhten Proteinausscheidung infolge einer Überladung der Nierentubuli ein Hyperviskositätssyndrom zur Folge haben. Dadurch wird die oft ohnehin bestehende Niereninsuffizienz verschlechtert. Die Haupttodesursache bei den Myelompatienten sind Infektionen und Nierenversagen.

1.2 Therapie des MM

Ohne Therapie beträgt die mediane Überlebenszeit des Multiplen Myeloms 17 Monate, die durch den Einsatz der Kombinationschemotherapie mit Melphalan und Prednisolon (Alexanian-Schema) deutlich verlängert werden konnte (Osgood *et al.*, 1960; Alexanian *et al.*, 1972). Das Alexanian-Schema bildete lange Zeit den Goldstandard der Myelomtherapie, über Jahrzehnte war eine weitere Optimierung des Therapieergebnisses durch Einführung anderer Polychemotherapieregime nicht möglich (Gregory *et al.*, 1992; Myeloma Trialists' Collaborative Group, 1998). Erst durch Dosisintensivierung von Melphalan mit anschließender autologer Stammzelltransplantation konnte eine weitere Verlängerung des Gesamtüberlebens und eine Erhöhung der Anzahl kompletter Remissionen erreicht werden (Attal *et al.*, 1996; Palumbo *et al.*, 2004). Die Rezidivrate nach einer Hochdosischemotherapie mit autologer Stammzelltransplantation ist allerdings hoch. Die allogene Stammzelltransplantation bietet einzig Heilungschancen, wenngleich die therapieassoziierte Mortalität (15-44%) hoch ist und nur junge Patienten in gutem Allgemeinzustand mit ungünstigen prognostischen Faktoren für diese Therapie in Frage kommen (Russell *et al.*, 1997).

Bei älteren Patienten ist nach aktueller Studienlage die Kombination von Melphalan, Prednison und Thalidomid (MPT) allen anderen Therapien, insbesondere dem Alexanian-Schema (MP) und dem intermediär dosierten Melphalan (100 mg/m²) mit autologer Stammzelltransplantation überlegen (Palumbo *et al.*, 2004; Facon *et al.*, 2007; Palumbo *et al.*, 2006). Thalidomid, ein initial als Sedativum eingeführtes Medikament, wurde in den frühen 60er Jahren aufgrund seiner Teratogenität vom Markt genommen und ist derzeit in Deutschland nicht zugelassen. Es weist ein breites Wirkungsspektrum auf, worunter unter anderem Hemmung von Wachstumsfaktoren, der Angiogenese sowie die Anregung von bestimmten Abwehrzellen des Körpers fallen. Abkömmlinge von Thalidomid, sogenannte IMiDs (immunmodulatorische Substanzen, z.B. Lenalidomid), zeigen einen ähnlichen Wirkungsmechanismus. Die vielversprechenden Phase-II-Daten für die neuen Substanzen Lenalidomid und Bortezomib werden in Kombination mit MP in randomisierter Studie untersucht (Mateos *et al.*, 2006; Palumbo *et al.*, 2007). Lassen sich die Phase-II-Daten bestätigen, könnten diese Kombinationen MPT ablösen. Bei jüngeren Patienten hat sich die Hochdosischemotherapie mit Melphalan und anschließender autologer Stammzelltransplantation bewährt. Sechs große randomisierte Studien bestätigen die Überlegenheit der Hochdosis-Melphalan-Therapie gegenüber einer konventionell dosierten Therapie (Attal *et al.*, 1996; Palumbo *et al.*, 2004; Child *et al.*, 2003; Barlogie *et al.*, 2006; Bladé *et al.*, 2005; Femand *et al.*, 2005). Lediglich in den Studien, bei denen die Kontrollgruppe bis 18 Monate mit intensiven Polychemotherapie-Regimen behandelt wurde, war kein signifikanter Unterschied zu verzeichnen. Zwei Metaanalysen zeigen, dass durch die Hochdosistherapie ein um 14 Monate längeres TWIST-Intervall (time without symptoms of disease or toxicity of treatment) erreicht werden kann (Lévy *et al.*, 2005; Koreth *et al.*, 2007).

Neben der zytoreduktiven Chemotherapie weisen Supportivmaßnahmen im Rahmen der Myelomtherapie einen großen Stellenwert auf. Bestrahlung lokaler Manifestationen durch Weichteil- bzw. Knochenaffektion stellt eine sehr effektive palliative Therapieoption dar. Interdisziplinäre Zusammenarbeit mit Neurochirurgen und Orthopäden ist vornehmlich bei stabilitätsgefährdenden Osteolysen geboten. Seit der Einführung von Bisphosphonaten zur Prophylaxe und Therapie von Knochendestruktionen konnten in umfassenden Phase III-Studien durch intravenöse Applikation von Pamidronat oder Zoledronsäure skelettassoziierte Komplikationen reduziert werden (Berenson, 2005). Bisphosphonate sind synthetisch hergestellte Pyrophosphate, die

spezifisch die Osteoklasten-Aktivität inhibieren. Sie zeichnen sich durch ihre hohe Affinität zur Knochenoberfläche, insbesondere im Bereich der so genannten Resorptionslakunen aus. Dadurch hemmen sie die fortwährende Knochenzerstörung und verbessern die Knochenheilung und Wiederherstellung der Knochendichte und -stärke. Bei Osteolysen/Osteopenie werden sie in der MM-Behandlung als Begleittherapie empfohlen.

1.3 Chemoresistenz- eine große Herausforderung in der MM-Therapie

Nach dem heutigen Kenntnisstand und mit den derzeit zur Verfügung stehenden Therapiemöglichkeiten ist eine Heilung des MM nicht möglich. Trotz bemerkenswerter Fortschritte auf dem Gebiet der Myelomtherapie mit Dosisintensivierung und neueren, vielversprechenden Substanzen ist vor allem die entstehende Therapieresistenz ein ungelöstes Problem. Welche Mechanismen hierbei eine Rolle spielen, ist derzeit unklar. Nicht-maligne Plasmazellen wie auch Myelomzellen finden nur im Knochenmark ein geeignetes Milieu für Überleben, Wachstum und Antikörperproduktion (Hideshima *et al.*, 2004). Das Knochenmarkstroma vermittelt den Myelomzellen sowie den gesunden Plasmazellen Signale zum Zellwachstum und –überleben. Das sogenannte Knochenmarkmikroenvironment besteht hauptsächlich aus den Knochenmarkstromazellen. Die Stromazellen exprimieren auf ihrer Oberfläche Adhäsionsmoleküle, an die die Myelomzellen binden können (Baumann, 2006). Durch die Adhäsion der Myelomzellen im Microenvironment sinkt die Chemosensibilität der Myelomzellen. Diesen Effekt der Apoptoseminderung durch einen direkten Zellkontakt nennt man zelladhäsionsbedingte Chemoresistenz, CAM-DR, cell adhesion mediated drug resistance (Damiano *et al.*, 1999). Das Verständnis der CAM-DR und die Möglichkeiten, diese zu reduzieren, sind die zentralen Themen der vorliegenden Arbeit.

Die Untersuchung des Resistenzverhaltens unter den Bedingungen, die am Ort der hauptsächlichsten Krankheitsmanifestation vorherrschen, verspricht entscheidende Erkenntnisse über die Ätiologie der primären Chemoresistenz. Bei der „primären Chemoresistenz“ handelt es sich um Signale zwischen Myelomzellen und dem Knochenmarkmikroenvironment, die Myelomzellproliferation unterstützen und zur Apoptoseresistenz gegenüber Zytostatika führen. Bislang liegen keine eingehenden Untersuchungen der Umgebungsbedingungen vor, die nähere Aufschlüsse über die

primäre Resistenz zeigen könnten. Ziel dieser Dissertation war es, ein Verfahren einzuführen, welches die *in vivo* Verhältnisse in der Umgebung von Myelomzellen weitgehend widerspiegelt. Das Augenmerk galt dabei insbesondere der Interaktion zwischen Myelomzellen und Stromazellen im Knochenmark, die bei der Entstehung der primären Resistenz eine wichtige Rolle spielt. In der vorliegenden Arbeit bildet die Etablierung des Kokulturmodells, in dem Myelomzellen und Knochenmarkstromazellen direkt interagieren können, den ersten Schritt zum Verständnis der primären Chemoresistenz.

Im Gegensatz zur primären Resistenz ist die sekundäre, erworbene Resistenz besser erforscht. Hierbei wird durch Herauf- oder Herabregulation von pro- oder antiapoptischen Proteinen oder durch z.B. die vermehrte Expression von Multi-drug-resistance-Proteinen (MDR), die als Effluxpumpen Zytostatika unspezifisch aus der Zelle transportieren, Chemoresistenz induziert. Bisherige Bemühungen, die Entwicklung der sogenannten sekundären Resistenz zu minimieren, haben in der Praxis größtenteils fehlgeschlagen. Hier sei auf die Arbeit von Sonneveld und seiner Mitarbeiter hingewiesen, die im Rahmen einer Phase II/III-Studie gezeigt haben, dass die Inhibition der sogenannten Multi-Drug-Resistenz-Proteine im Hinblick auf eine Verlängerung der Lebenserwartung, auf die Ansprechrate sowie die progressionsfreie Überlebensrate keine Vorteile verschafft (Sonneveld *et al.*, 2001).

Wachstumsfaktoren wie das Interleukin IL-6 und Insulin-Growth-Faktor1 IGF-1 (Mitsiades *et al.*, 2002; Mitsiades *et al.*, 2004), Interaktionen mit Knochenmarkstromazellen und bestimmte intrazelluläre Signalwege wirken bei der Entstehung und Aufrechterhaltung dieser malignen Erkrankung entscheidend mit. Nicht zuletzt führt die Wechselwirkung von Myelomzellen und Stromazellen zur vermehrten Expression von Zytokinen wie VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), wodurch die Angiogenese angeregt und die Proliferation der Myelomzellen und ihr Überleben unterstützt wird (Podar *et al.*, 2001). Aus diesem Grund ist man bemüht, in die beteiligten Signaltransduktionswege einzugreifen und Stimuli der Mikroumgebung so zu modifizieren, dass die Myelomzellen in ihrem natürlichen Knochenmarkmilieu dem zytotoxischen Effekt von Chemotherapeutika nicht entgehen können.

Bei der Entstehung der primären Resistenz scheint der Mevalonatsignalweg eine große Rolle zu spielen. Im Mevalonatsignalweg wird Mevalonsäure aus Acetyl-Coenzym A synthetisiert. Acetyl-Coenzym A, kurz Acetyl-CoA, ist ein „aktivierter“ Essigsäurerest (CH₃CO-), der an die SH-Gruppe des Cysteamin-Anteils von Coenzym

A gebunden ist. Hierbei treten zwei aktivierte Essigsäure-Moleküle zu Acetoacetyl-CoA zusammen. Ein drittes Acetyl-CoA wird als Verzweigung ankondensiert. Das Produkt, ein Glutarsäure-Derivat, heisst 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA). Mevalonsäure wird aus cytosolischen HMG-CoA unter der Katalyse der HMG-CoA-Reduktase gebildet. Die Abkürzung HMG-CoA-Reduktase steht für 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase oder β -Hydroxy- β -Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase. Im Cytoplasma führt der Weg über die Mevalonsäure zu den Isoprenoiden. In der Literatur wird beschrieben, dass in adhärenenten, de novo resistenten Zellen die HMG-CoA-Reduktase hoch reguliert wird (Hazlehurst *et al.*, 2003).

Bisphosphonate hemmen den Mevalonatsignalweg. Sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* aber auch in murinen Versuchsmodellen lässt sich dieser Substanzgruppe eine direkte Antitumoraktivität zuschreiben (Berenson *et al.*, 1998; Dhodapkar *et al.*, 1998). Die publizierten Daten ermöglichen allerdings hinsichtlich der klinischen Relevanz der direkten Antitumoraktivität keine eindeutige Aussage und die gezeigten klinischen Effekte sind nur minimal. Um klinisch relevante Antimyelomaktivität zu erzielen, erhöhte man die Pamidronatdosis, eine Vorgehensweise, die an den damit einhergehenden Nebenwirkungen dieser Substanz scheiterte und nicht zum Erfolg führte. Die Hypothese einer Intensivierung der Antimyelomwirkung durch Kombination von Bisphosphonaten mit anderen Inhibitoren des Mevalonatsignalweges wurde in der vorliegenden Arbeit evaluiert.

2. Patienten, Materialien und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

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

RPMI-1640 mit 20-prozentigem Zusatz von fetalem Kälberserum (FCS), welches zuvor bei 56 °C über eine Stunde inaktiviert wurde, diente als Zellkulturmedium. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Antibiotika wie Streptomycin/Penicillin wurden nicht verwendet. Bei einer Zelldichte von etwa 8×10^5 Zellen/ml wurde ein Teil der Suspension in den Kulturflaschen verworfen, während der andere Teil mit Medium auf eine Konzentration von ca. 2×10^5 Zellen/ml verdünnt und weiterkultiviert wurde. Die Zellvitalität vor Beginn eines Experimentes wurde sowohl mikroskopisch als auch mittels Trypanblaufärbung sichergestellt.

2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Einfriermedium, welches zur Aufbewahrung der Zellen bei tiefen Temperaturen diente, setzte sich aus 5 ml RPMI1640, 3 ml FCS und 2 ml DMSO zusammen. Während der Vorbereitungsphase bis zum Abfüllen in die Kryoröhrchen wurde das Einfriermedium auf Eis gelagert. Zunächst wurden 10^7 Zellen abzentrifugiert, zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in 4,5 ml Kulturmedium (RPMI1640 + 20% FCS) resuspendiert. In jedes der Kryoröhrchen wurde jeweils 0,9 ml der Zelllösung und 0,9 ml des Einfriermediums gegeben und sofort für 6 Stunden bei -20 °C gelagert. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden bei -80 °C und schließlich bei -196 °C tief gefroren.

Zum Auftauen der Zellen im Gefrierschrank wurden diese vorerst 2 Minuten bei Raumtemperatur angewärmt und in 37 °C warmes Kulturmedium überführt. Nachfolgend wurden die Zellen zweimal mit Kulturmedium gewaschen und in einer Dichte von 20×10^4 Zellen in Zellkulturflaschen gegeben.

2.1.3 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 50 µl einer Zelllösung mit 50 µl der Trypanblaulösung vermischt und in Neubauer-Zählkammern gegeben. Mikroskopisch ermittelte man die Zellzahl pro ml. Berechnet wurde die Gesamtzellkonzentration gemäß folgender Formel:

$$\frac{2 * 10^4 * \text{Zahl der gezählten Zellen}}{\text{Zahl der ausgezählten Kammern}} = \text{Zellen / ml}$$

2.1.4 Extrahierung von mononukleären Zellen

Zur Gewinnung von primären Stromazellen wurden jeweils 15 ml heparinisiertes Knochenmarkspirat von Patienten mit hämatologischen Erkrankungen extrahiert.*

Ficollhpaque wurde auf Raumtemperatur erwärmt und davon 10 ml in ein Falcon-Röhrchen (50 ml) gegeben. Die Aufreinigung der mononukleären Zellen erfolgte mittels Dichtezentrifugation. Nach einer Verdünnung des Aspirats mit PBS in einem Verhältnis von 1:1 wurde die Lösung vorsichtig über das Ficollhpaque geschichtet. Das Falconröhrchen wurde anschließend bei 1500 rpm ohne Bremse für 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Interphase wurde abpipettiert, in ein neues Röhrchen überführt und zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurde diese im Kulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zelldichte bestimmt, auf eine Konzentration von 10^7 /ml verdünnt. Es wurde jeweils 100 µl Zelllösung, d.h. $1 * 10^6$ Zellen pro Platte, in eine Fläche der 96-wellplates pipettiert. Auf die 24-wellplates wurde 500µl ($5 * 10^6$ Zellen pro Platte) und auf die 6-wellplates je 1 ml Zelllösung ($1 * 10^7$ Zellen pro Platte) verteilt. Diese wurden über eine Zeit von drei bis fünf Wochen kultiviert, bis sich ein Monolayer aus hBMSC (human bone marrow stromal cells) bildete (Methode nach Lokhorst *et al.*, 1994).

*Nach Aufklärung durch einen Arzt, stimmten die Patienten der Verwendung des Materials für wissenschaftliche Zwecke zu. Ein positives Votum der Ethikkommission lag ebenfalls vor.

2.2 Zellvitalitätsmessungen

Im Gegensatz zu den avitalen Zellen wird das rote Tetrazoliumsalz WST-1 in den Mitochondrien vitaler Zellen zu orange-gelbem Formazan umgesetzt. Dadurch kommt es zu einer Zunahme der optischen Dichte der Zellsuspension, die bei einer Wellenlänge von 450-630 nm bestimmt werden kann. Die Anzahl der vitalen Zellen korreliert mit Extinktionserhöhung bei 450 nm, die im Multi-Well-Photometer gegen eine Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen wird.

NCI-H929-Zellen wurden mit Simvastatin der Konzentrationen 1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM und 100 μM behandelt und 0 bis 3 Tage lang in 96-Well-Kulturplatten bei 37 °C, 5% CO₂ und 90-prozentiger Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Reinheit der Zellen wurde im Mikroskop sichergestellt. Anschließend wurde WST-1 im Verhältnis von 1:10 (20 μl) hinzugegeben. Nach drei Stunden erfolgte die Analyse bei 450-630 nm im Photometer. Als Referenz diente hierbei die Extinktionsbestimmung der Kontrollsuspension (Färbung nicht behandelter Zellen) und des sog. Blanks (Färbung von Medium).

2.3 Durchflusszytometrische Analysen

2.3.1 Annexin/PI Apoptose Assay

Apoptose wurde ursprünglich als eine besondere Form des Zelltods mit charakteristischen morphologischen Veränderungen definiert. Die Zellmorphologie stellt heute noch den Goldstandard bei der Apoptosebestimmung dar. Vitale Zellen zeichnen sich durch eine charakteristische Asymmetrie ihrer Zellmembran aus. Kennzeichnend ist das Vorkommen von Phosphatidylserin auf der Innenseite der Membran. Der programmierte Zelltod wird durch einen Verlust der Membranasymmetrie eingeleitet, wobei Phosphatidylserin auf die Außenseite verschoben wird („Flip-Flop“ der Membranlipide). Durch die spezifische Bindung von Annexin an das Membranlipid wird bei einer Wellenlänge von 488 nm das an Annexin gekoppelte Fluoresceinthioisocyanat (FITC) von einem Argonlaser angeregt. Die Emission des FITC-Moleküls wird bei einer Wellenlänge von 518 nm im Durchflusszytometer erfasst (497-530 nm grün). Bricht die Membranintegrität zusammen, so kann Propidiumiodid die Zellmembran durchdringen und sich als ein DNA-Farbstoff an die Desoxyribonukleinsäure der Zelle anla-

gern. Während FITC nach optischer Laseranregung grün fluoresziert, ist Propidiumjodid ein rot fluoreszierender Farbstoff. PI wird bei 488 nm angeregt und emittiert bei 617 nm (595-620 nm rötlich-orange).

Bei einer kombinierten Anwendung beider Farbstoffe können zwei Stadien des Apoptosevorgangs unterschieden werden:

- Frühe Apoptose: Die Zellen sind Annexin positiv und PI negativ.
- Späte Apoptose: Die Zellen sind sowohl für Annexin als auch für PI positiv.

Zur Bestimmung des Apoptoseanteils wurden die Zellen bei 1500 U/min und einer Temperatur von 8 °C 6 Minuten lang zentrifugiert. Nach Abschütten des Überstandes wurden diese zweimal mit kaltem „Annexin-PBS“ gewaschen.

Annexin-PBS:

- 8 g NaCl
- 0,2 g KCl
- 1,44 g Na₂HPO₄
- 0,24 g KH₂PO₄
- 1 l H₂O
- pH 7,2

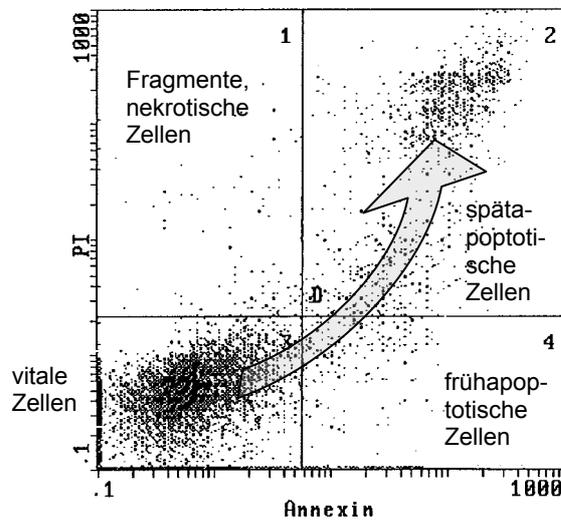
Die Resuspension auf eine Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml erfolgte im „Annexin-Binding-Buffer“.

Annexin-Binding-Buffer:

- 10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4
- 140 mM NaCl
- 2,5 mM CaCl₂

Je 100 µl der Zellsuspensionen wurde in neue Röhrchen (Sarstaedt) überführt und mit 5 µl Annexin-FITC und 10 µl PI (Propidiumjodid) aus einer Vorratslösung der Konzentration 1 mg/ml versetzt. Die Röhrchen mit den Zellsuspensionen wurden bei Raumtemperatur im Dunkeln für 15 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl Binding Buffer wurde die Analyse innerhalb einer Stunde durchgeführt. Hierbei wurden die Kanäle

FL1 (Annexin-V-FITC) und FL3 (Propidiumjodid) im Epics Coulter XL Durchflusszytometer verwendet.



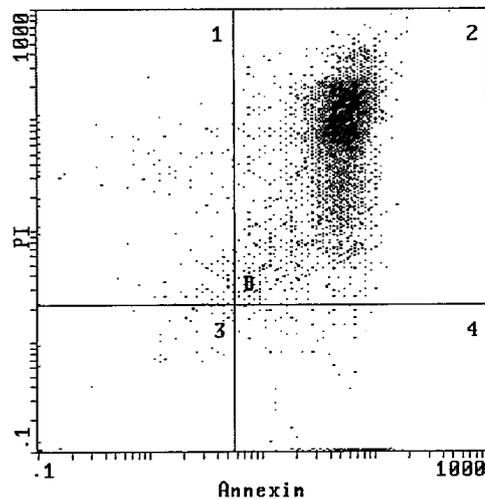
Durch den Pfeil wird der physiologische Übergang von vitalen Zellen in apoptotische Zellen, entsprechend dem physiologischen Zell-Turnover veranschaulicht.

D1: 2,66%

D2: 21,0%

D3: 67,6%

D4: 8,77%



in vitro Bortezomib-Wirkung bringt den Großteil der Zellen in komplette Apoptose

D1: 4,12%

D2: 89,4%

D3: 1,54%

D4: 4,93%

Abbildung 2.1: Das Annexin-PI Apoptose Assay

Abgebildet sind unbehandelte Zellen (oben) und Zellen nach Bortezomib-Behandlung (4 nM) nach einer Inkubationsdauer von 48 Stunden (unten). Dargestellt sind vier Zellfraktionen: vitale Zellen (D3), frühapoptotische Zellen (D4), spätapoptotische Zellen (D2) und Zellen mit Membran-Breakdown und Kernfragmentation (D1). (Annexin-V-FITC im Kanal FL1, Propidiumjodid im Kanal FL-3)

Die Abbildung 2.1 stellt eine durchflusszytometrische Analyse einer NCI-H929-Zellsuspension dar. Im oberen Diagramm sind unbehandelte Zellen abgebildet, während im unteren Bild Zellen nach einer Behandlung mit Bortezomib 4 nM und einer Inkubationsdauer von 48 Stunden wiedergegeben sind. Mit Hilfe des Annexin-V-Assays kann Apoptose spezifisch detektiert werden: Die Doppelfärbung mit Annexin-FITC und Propidiumiodid ermöglicht die Darstellung der vier Zellfraktionen: lebende, nicht-apoptotische Zellen (D3), frühapoptotische Zellen (D4), spätapoptotische Zellen (D2) und Zellen mit Membran-Breakdown und Kernfragmentation (D1). Die erste Abbildung zeigt in der unbehandelten Kontrolle den physiologischen Übergang der vitalen Zellen in der Fraktion D3 in apoptotische Zellen (D2), entsprechend dem physiologischen Zell-Turnover. Die *in vitro* Bortezomib-Zugabe (unteres Bild) bringt den Großteil der Zellen in komplette Apoptose (Zellfraktion D2).

Neben Fluoroisothiocyanat (FITC) können in der durchflusszytometrischen Analyse andere Fluorochrome wie Phycoerythrin (PE) eingesetzt werden. Nach einer optischen Laseranregung fluoresziert PE orange (575 nm).

2.3.2 Oberflächenmarkermessungen

Zur durchflusszytometrischen Darstellung von Myelomzellen gegenüber primären Stromazellen oder HS-5-Stromazellen machte man sich das unterschiedliche Expressionsprofil von Oberflächenmarkern auf den jeweiligen Zelllinien zunutze. Hierzu wurden die Myelomzellen mit einem monoklonalen Antikörper markiert, der seinerseits mit FITC (Flourescein-thiocyanat) gekoppelt war. Auf diese Weise konnte mit dem Durchflusszytometer, welches die Farbintensität misst, auf die Oberflächenexpressionsstärke eines Antigens geschlossen werden.

Zunächst wurden die Zellen von den Platten entfernt und bei 1500 U/min und einer Temperatur von 8 °C 6 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dann folgte ein zweimaliger Waschschrift mit kaltem PBS. Danach wurden die Zellen in 1 ml kaltem PBS resuspendiert. Die Zelllösung (100 µl) wurde mit 10 µl der Antikörperlösung vermischt und für 15 Minuten im Dunkeln aufbewahrt. Nach Zugabe von PBS (400 µl) wurden die Zellen im Durchflusszytometer gemessen.

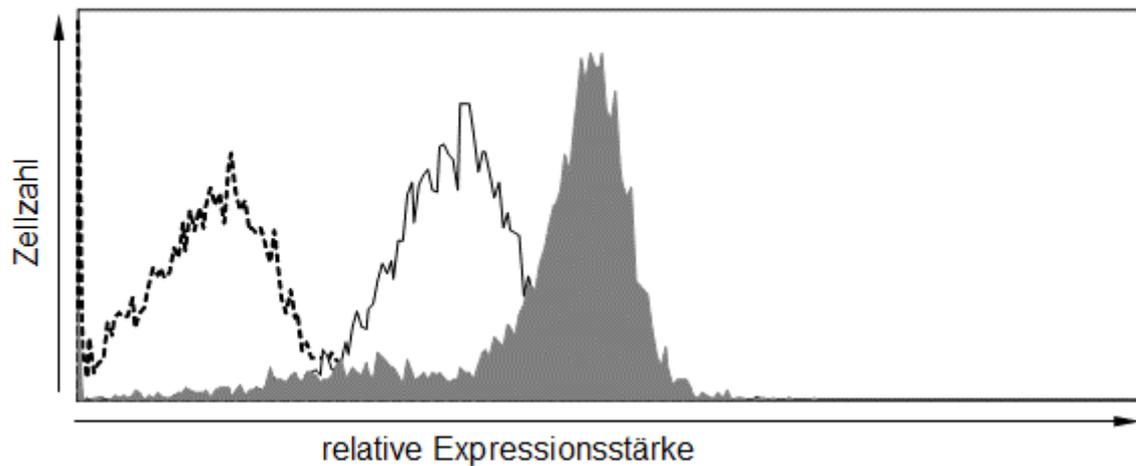


Abbildung 2.2 (qualitativ): Oberflächenmarkermessung (Baumann, 2006)

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

Zur Vorbereitung des Kokultorexperimentes wurden die HS-Stromazellen folgendermaßen prozessiert: Aus der zu trypsinierenden HS-5-Kultur wurde das überstehende Kulturmedium abgenommen. Anschließend wurde 5 ml der Trypsinlösung zugegeben. Danach stellte man die Lösung für 5 Minuten in den Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C. Im Mikroskop wurde die Ablösung der HS-5 Stromazellen vom Kulturflaschenboden kontrolliert. Nach Zugabe von 20 ml Medium (RPMI1640 + 20% FCS) wurden die Zellen bei 1500 U/min und 8 °C 10 Minuten lang abzentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen im Medium resuspendiert und die Zellkonzentration bestimmt. Danach wurden die Zellen mit Medium so verdünnt, dass pro Kulturplatte eine Zellmenge von 10^4 Zellen in 3 ml Lösung (RPMI 1640 + 20% FCS) vorlag. Diese wurden solange inkubiert, bis der Monolayer aus HS-5-Zellen 80% des Plattenbodens bedeckte, mindestens jedoch drei Tage (Methode nach Lokhorst *et al.*, 1994).

Nach drei Tagen wurden Myelomzellen in einer Konzentration von $1,5 \times 10^5$ /ml auf die Platten verteilt. Diese Mischung aus Stroma- und Myelomzellen wurde nachfolgend mit den jeweiligen Zytostatika behandelt. Nach einer bestimmten Inkubationsdauer wurden die Zellen durch vorsichtiges Pipettieren oder mittels Cellscrapper vom Boden der Platten gelöst und abgeerntet. Die Beschaffenheit der Auflagelamellen erlaubte,

eine mechanische Schädigung der Zellen durch die Cellscrapers so minimal wie möglich zu halten. Die Zellen wurden bei 1500 U/min und 8 °C 6 Minuten lang zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstands zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in 0,5 ml kaltem PBS resuspendiert. Zur Detektierung der späten Apoptose mittels Durchflusszytometer wurden die Zellen mit Propidiumjodid gefärbt. Außerdem erfolgte die Färbung mit einem FITC-konjugierten Antikörper (10 µl), mit dem man beide Zelltypen im Durchflusszytometer voneinander trennen konnte. Dies war entweder CD38-FITC oder CD138-FITC, beides Marker, die auf Stromazellen nicht exprimiert werden. Da die FITC-konjugierten Antikörper sowie das Propidiumjodid lichtempfindlich sind, wurde die Zelllösung 15 Minuten lang im Dunkeln inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl PBS wurde die Zelllösung innerhalb einer Stunde im Coulter Epics-XL durchflusszytometrisch gemessen. Zur Analyse wurden die Kanäle FL1 (FITC-Antikörper) und FL3 (Propidiumjodid) verwendet.

2.3.4 Durchführung und Auswertung der Kokulturversuche

Stromazellen wurden in 6-well-plates solange angezchtet, bis jeweils ein 80-90 %iger Monolayer den Boden der Platten bedeckte. Anschließend wurden diese mit Myelomzellsuspensionen in einer Zelldichte von $1,5 \times 10^5$ kokultiviert und mit den jeweiligen Substanzgruppen in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Die Abbildung 2.3 zeigt zum einen eine adhärenente Stromazellkultur (linkes Bild). Im rechten Bild ist ein etabliertes Modell einer Stromazell-/Myelomzellkokultur dargestellt, die die Verhältnisse in der Mikroumgebung des Knochenmarks wiedergibt.

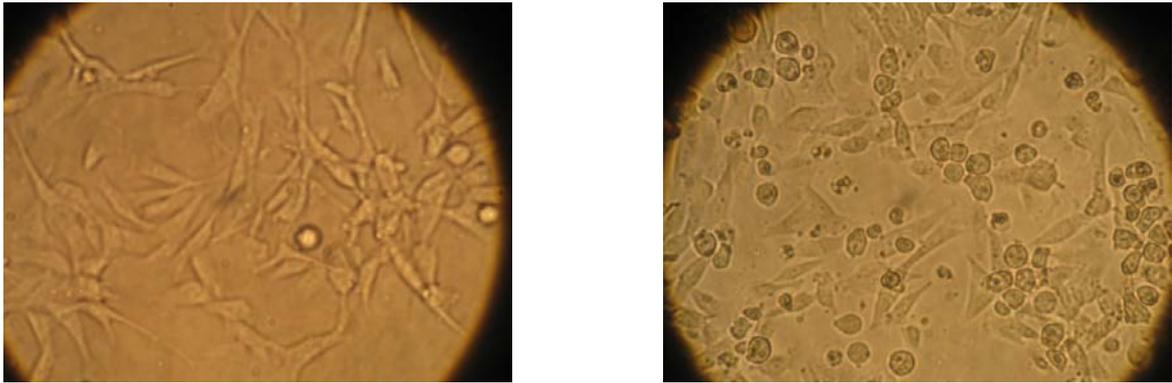


Abbildung 2.3: Monokultur aus Stromazellen versus NCI-H929/HS-5-Kokultur

Adhärenente HS-5 Stromazellen zeichnen sich durch ihren fibroblastoiden Phänotyp aus. Ihre Fortsätze bedecken den Plattenboden fast vollständig (linkes Bild). Das rechte Bild zeigt eine HS-5/NCI-H929 Kokultur. Myelomzellen adhäreren an den HS-5 Stromazell-Monolayer, wodurch sie resistent gegenüber den gängigen Chemotherapeutika des MM werden (CAM-DR).

Nach erfolgter Bebrütung wurden die Zellen in der Monokultur oder der Kokultur geerntet und für die durchflusszytometrische Analyse vorbereitet. Mit Propidiumiodid, wurde die Spätapoptose detektiert. Zugleich wurden FITC-konjugierte Antikörper (CD38-FITC oder CD138-FITC) eingesetzt, die auf Myelomzellen, nicht aber auf Stromazellen exprimiert werden. Bei der durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen mittels mehrerer „Gates“ in CD38- oder CD138- positive und negative Zellen eingeteilt. Von der CD38 oder CD138- positiven Population konnte dann die PI-Positivität und damit der Anteil apoptotischer Zellen bestimmt werden. Die Abbildung 2.4 zeigt exemplarisch ein Histogramm einer Kokultur. Das „Gate D“ gibt die CD38-positiven Myelomzellen wieder, deren Apoptoseanteil im rechten Diagramm bestimmt wird („Gate I“). Aus den gemessenen Werten errechnet sich dann CAM-DR:

$$\frac{(\text{Apoptose der Monokultur} - \text{Apoptose der Kokultur}) * 100}{\text{Apoptose der Monokultur}} = \text{CAM-DR [\%]}$$

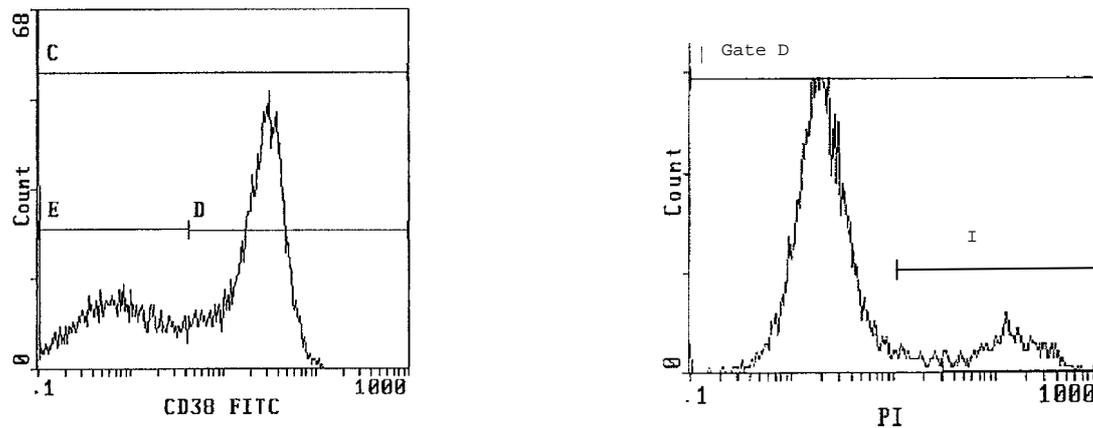


Abbildung 2.4: Zytotoxizitäts-Assay unter Kokulturbedingungen

Die Abbildung zeigt exemplarisch ein Histogramm einer Kokultur. Das „Gate D“ gibt die CD38-positiven Myelomzellen wieder, deren Apoptoseanteil im rechten Diagramm bestimmt wird („Gate I“). Aus den gemessenen Werten errechnet sich dann CAM-DR.

2.4 Western Blotting

Der Western Blot wurde zum Nachweis eines Proteins in der Zelle eingesetzt. In einigen Arbeitsschritten wurden Zellen so prozessiert, dass verschiedene Proteine mittels Chemolumineszenz dargestellt werden konnten.

Zellyse

Zellen wurden in Kulturflaschen in einer Dichte von etwa $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml angezchtet und mit Simvastatin der Konzentrationen $0,3 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$, $3 \mu\text{M}$ 72 Stunden lang im Medium (RPMI 1640 + 20 % FCS) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 1500 U/min und 8°C 6 Minuten lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet. Die Zellen wurden dann zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in 1 ml kaltem PBS resuspendiert. Die Zellyse wurde erneut in der Zentrifuge bei 2500 U/min 6 Minuten lang abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgte der Zusatz von 100 μl Zellysepuffer:

- Zellysepuffer:

Aqua dest (8,18 ml), Tris (250 μ l, 1 M, pH 7,6), NaF(100 μ l, 1M), EDTA (200 μ l, 0,5 M), Aprotinin (50 μ l, 2,1 mg/ml) Leupeptin (20 μ l, 5 mg/ml), PMSF (100 μ l, 100 mM), Na₃VO₄ (100 μ l, 100 mM).

Die Homogenisierung der Zellen erfolgte im so genannten Homogenisator. Danach wurde 10 μ l NP-40 (10 %) hinzugegeben und die Proben bei 4 °C 15 Minuten lang geschwenkt.

Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration. Hierfür wurde zu 2 μ l Proteinlösung 800 μ l Aqua dest. (*Braun*, Meisungen, Deutschland) und 200 μ l des Bio-RAD Färbeagens beigefügt. Die Proteinkonzentration wurde im BioPhotometer gegen einen Nullwert bestimmt.

Gelelektrophorese

Die Angleichung der Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben erfolgte durch Zugabe von Lysepuffer. Die Proteinlösungen wurden mit Loading Buffer (Gel Loading Solution, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) im Verhältnis 1:4 verdünnt und bei 95 °C für fünf Minuten erhitzt. Nachfolgend wurden die Proben bei 6000U/min zwei Minuten lang abzentrifugiert und auf Polyacrylamidgele (12 % und 15 % Acrylamid) aufgetragen:

- Separating Gel (15 %): 24 % Aqua dest., 25 % Tris 1,5 M pH 8,8 (Apotheke Klinikum Innenstadt, München, D), 49 % Acrylamid (30 %), 0,01 % APS 10 %, 0,0006 % Temed.
- Separating Gel (12 %): 35 % Aqua dest., 25 % Tris 1,5 M pH 8,8, 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 beschichtet. Nach einer halben Stunde wurde das Isopropanol abgegossen und die Gelkammern je viermal mit Aqua dest. gereinigt und getrocknet. Danach wurde das ‚Stacking-Gel‘ hinzugegeben:

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

Anschließend wurden die Kämme bis zur Auspolymerisierung in die Kammern gesteckt. Die Gele wurden in die Elektrophoresebehälter gestellt und diese mit Running buffer gefüllt. Nach ca. 45 Minuten wurden die Kämme herausgenommen und die Geltaschen gründlich mit Running Buffer gespült. Diese wurden anschließend mit 20 µl Proteinlösung gefüllt. Als Referenz wurde 10 µl Marker eingesetzt. Initial wurde eine Spannung von 80 V angelegt. Nach Erreichen des Separation-Gels wurde diese auf 100 V gestellt.

Blotting

Die nach dem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine wurden auf PVDF-Membranen (Millipore, Eschborn) transferiert. Dazu 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 23 V über 12 Stunden bei 8 °C inkubiert.

Transferpuffer:

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

Proteinnachweis

Der Proteinnachweis basiert auf einem Verfahren, das aus mehreren Arbeitsschritten besteht: Primärantikörper binden an das Protein auf der Membran. Die auf diese Weise markierten Proteine werden nun anhand von Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern mittels Chemolumineszenz nachgewiesen.

Im Einzelnen wurden die Membranen zunächst luftgetrocknet. Um unspezifische Bindungen der spezifischen Antikörper zu verringern, wurden die Membranen geblockt, d.h. 60 Minuten lang in einer Magermilchpulverlösung bestehend aus 5 g Magermilchpulver, die in 100 ml PBST (1l PBS und 0,5 ml Tween20) aufgelöst wurde, eingelegt 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 0,24 g
- H₂O 1 l

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

Der sekundäre Antikörper wurde im Verhältnis 1:2000 mit Blocking-Lösung verdünnt und auf die Membranen gegeben, die für 60 Minuten auf den Schüttler (10/min) gestellt wurden. Die Antikörper-Milchpulver-Lösung wurde danach mit PBST ausgespült. Anschließend wurden jeweils 3 ml der 2 ECL Lösungen auf die Membranen gegeben. Nach kurzer Zeit wurde die Chemolumineszenz der Banden auf Röntgenfilme abgebildet.

Membran-Stripping

Die Antikörper können mittels Stripping-Puffer von der Membran entfernt werden, so dass andere Antikörper-Overlays auf die Membranen aufgetragen werden können.

Stripping-Puffer:

- Tris 7,56 g
- SDS 20 g
- H₂O 1 l

Hierbei wurden die Membranen im Stripping-Puffer 35 Minuten lang bei einer Wasserbadtemperatur von 57 °C eingeweicht und anschließend in insgesamt drei Waschvorgängen mit PBST gewaschen. Um unspezifische Bindungen der spezifischen Antikörper zu verringern, wurden die Membranen 60 Minuten lang mit Magermilchpulverlösung geblockt und anschließend viermal kurz mit PBST gespült. Der Proteinachweis erfolgte gemäß obiger Beschreibung.

2.5 Statistik

In den Abbildungen werden die Mittelwerte mit den Standardabweichungen gezeigt. Die deskriptive Statistik wurde mittels Excel ausgewertet. Die Statistische Signifikanz wurde 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, das die Verhältnisse des Knochenmarkmicroenvironment entsprechend wiedergibt. Das Knochenmarkmilieu besteht größtenteils aus Knochenmarkstromazellen und extrazellulären Matrixproteinen. Um die Verhältnisse im Knochenmark nachzustellen, wurden Myelomzellen und Stromazellen kokultiviert, wobei sowohl primäre Stromazellen als auch HS-5-Stromazellen mit Myelomzellen in Interaktion treten konnten. Der Effekt von Zytostatika sowie die primäre Chemoresistenz wurden dadurch greifbar.

3.1 Zelladhäsionsvermittelte Chemoresistenz (CAM-DR)

Zur Dosisfindung und Bestimmung der Chemosensitivität der Myelomzelllinie NCI-H929 wurde diese mit Bortezomib der Konzentrationen 1 nM bis 5 nM behandelt.

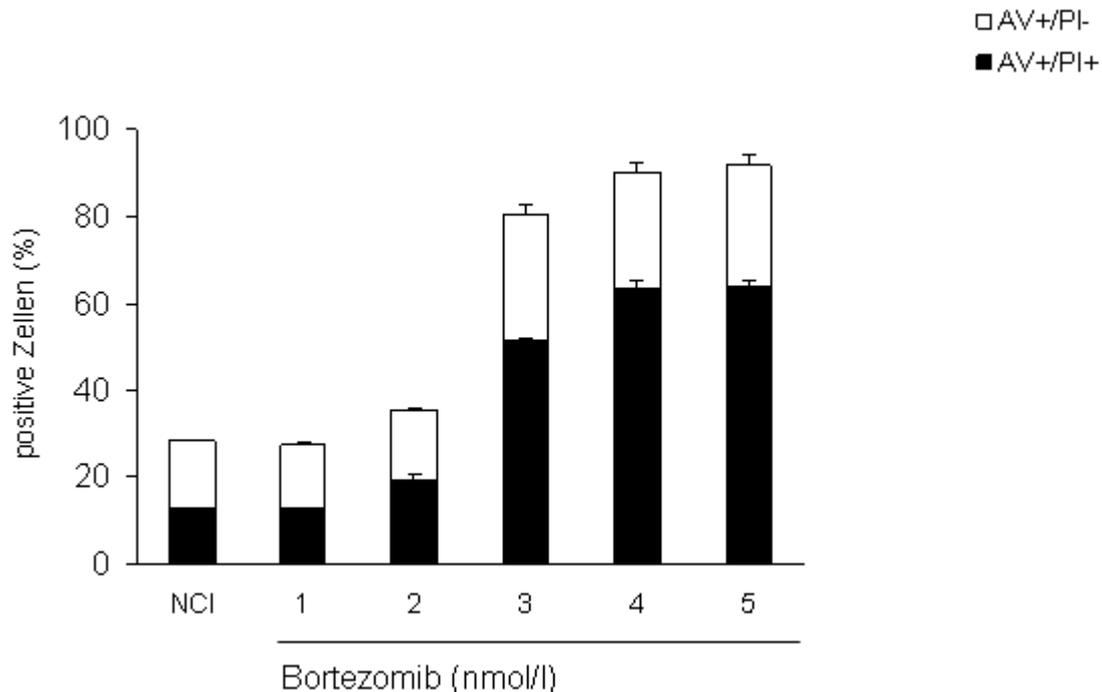


Abbildung 3.1: Dosisfindung für Bortezomib

Myelomzellsuspensionen in Kulturplatten wurden mit Bortezomib (1 nM, 2 nM, 3 nM, 4 nM, 5 nM) inkubiert. Nach 48h wurden die Zellen mit Annexin V/PI gefärbt und der Anteil apoptotischer Zellen im Durchflusszytometer bestimmt.

Die Abbildung 3.1 zeigt, dass die maximale Toxizität von Bortezomib bei einer Dosis von 4 nM erreicht wird. Eine Inkubationsdauer von 48 Stunden und eine Substanzkonzentration von 4 nM dienten somit in den folgenden Versuchen mit Bortezomib als Grundlage.

Zur Validierung des Kokulturmodells mit der HS-5-Stromazelllinie musste zugleich gezeigt werden, dass die Myelomzellen nach Kokultivierung mit primären Knochenmarkstromazellen ein mit der HS-5-Kokultur vergleichbares Apoptoseverhalten aufweisen. HS-5-Stromazellen und NCI-H929-Zellen wurden mit ansteigender Bortezomib-Konzentration (1 nM-4 nM) inkubiert. Analog zum HS-5/NCI-H929 Kokulturmodell wurden NCI-H929-Zellen und humane Knochenmarkstromazellen (hBMSC) mit gleichen Inkubationszeiten, Zytostatikakonzentrationen und gleicher Messmethode kultiviert (Abbildung 3.2). Zur Kontrolle wurde zeitgleich eine NCI-H929-Monokultur angelegt.

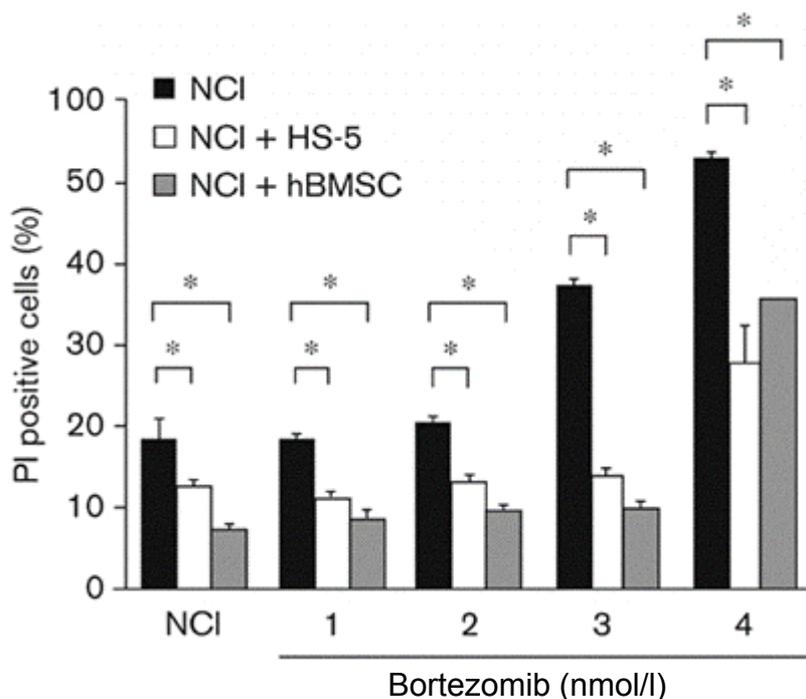


Abbildung 3.2: Resistenz gegen Bortezomib durch Adhäsion an Stromazellen

NCI-H929- Myelomzellen wurden in An- oder Abwesenheit von HS-5-Zellen oder primären Stromazellen mit Bortezomib steigender Konzentration (1 nM, 2 nM, 3 nM und 4 nM) kokultiviert. Nach 48 Stunden wurden die Myelomzellen mittels CD38-FITC getrennt, die Messung der PI-Positivität erfolgte im Durchflusszytometer. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

*) statistisch signifikant ($P < 0,05$)

Abbildung 3.2 zeigt einen statistisch signifikanten Apoptose-Schutz gegenüber Bortezomib in der NCI-H929/HS-5-Kokultur. Auch in der NCI-H929/hBMSC-Kokultur sind die Myelomzellen analog resistent gegenüber Bortezomib. HS-5-Zellen genauso wie

primäre Stromazellen induzieren einen quantitativ vergleichbaren antiapoptotischen Effekt in den Myelomzellen. Das HS-5-Kokulturmodell bietet somit eine sehr gute und einfach durchführbare Möglichkeit, Interaktionen zwischen Stromazellen und Myelomzellen und damit CAM-DR zu untersuchen.

Dexamethason findet zusammen mit weiteren Medikamenten in der Myelomtherapie eine breite Anwendung. In der Literatur sind die Angaben zur *in vitro* Toxizität von Steroiden widersprüchlich. Zur Untersuchung eines eventuellen Antimyelomeffektes wurden NCI-H929 Zellen mit Dexamethason der Konzentrationen 0,1 μM , 0,3 μM , 1 μM , 3 μM , 10 μM unterschiedlich lang kultiviert. Anschließend wurde der Apoptoseanteil mittels Annexin V- und PI-Färbung durchflusszytometrisch ermittelt.

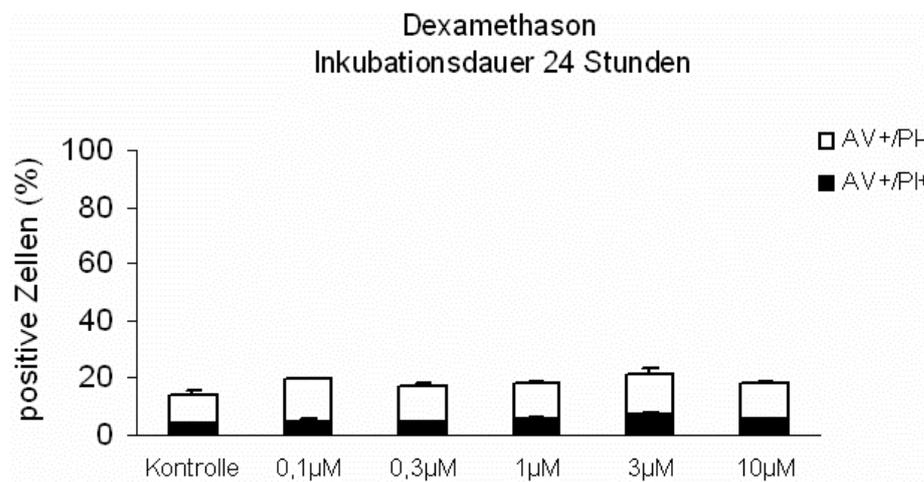


Abbildung 3.3a

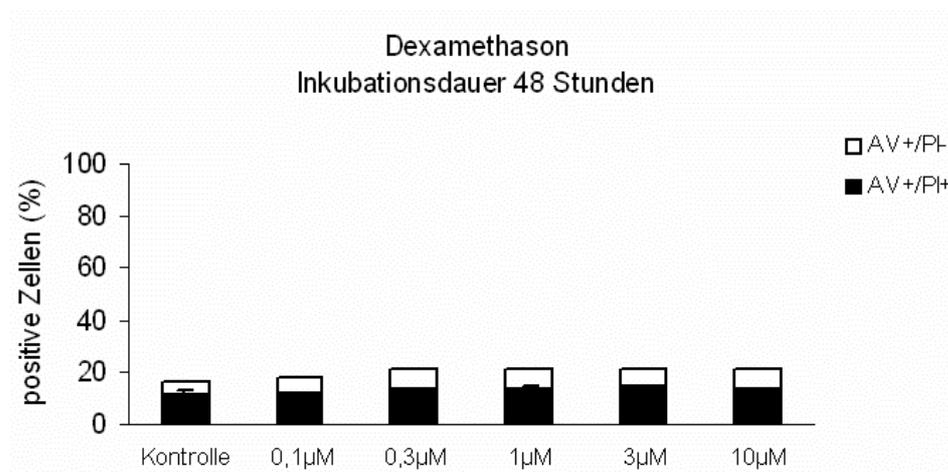


Abbildung 3.3b

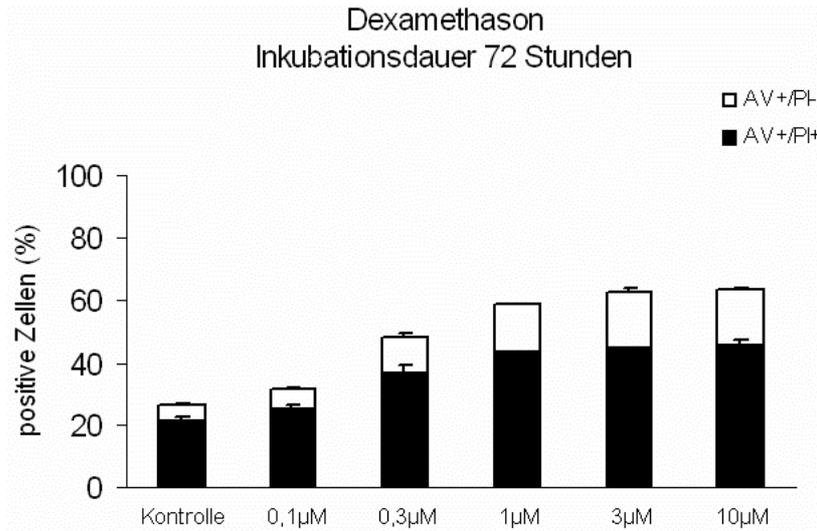


Abbildung 3.3c

Abbildung 3.3a-c: Zeit- und dosisabhängige Zytotoxizität von Dexamethason in Myelomzellen

NCI-H929 wurden unterschiedlich lang mit ansteigender Dexamethason-Konzentration inkubiert. Nach einer Färbung mit Annexin V und PI wurde der Anteil früh- und spätapoptotischer Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

Während die Zellen nach einer Inkubationszeit von 24 oder 48 Stunden noch vital sind, sterben nach 72 Stunden konzentrationsabhängig zunehmend NCI-H929 ab.

Nachfolgend wurde die Frage aufgegriffen, ob CAM-DR ein ebenfalls auf Dexamethason übertragbares Phänomen ist. NCI-H929-Zellen wurden gemäß dem Kokulturmolell mit ansteigender Dexamethason-Konzentration versetzt. Nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden wurde der Anteil apoptotischer Myelomzellen bestimmt. Abbildung 3.4 zeigt, dass bei einer Behandlung der NCI-H929-Zellen mit Dexamethason in der Kokultur eine starke Apoptose-Minderung entsteht; bei 1 µmol beträgt die CAM-DR mehr als 60%.

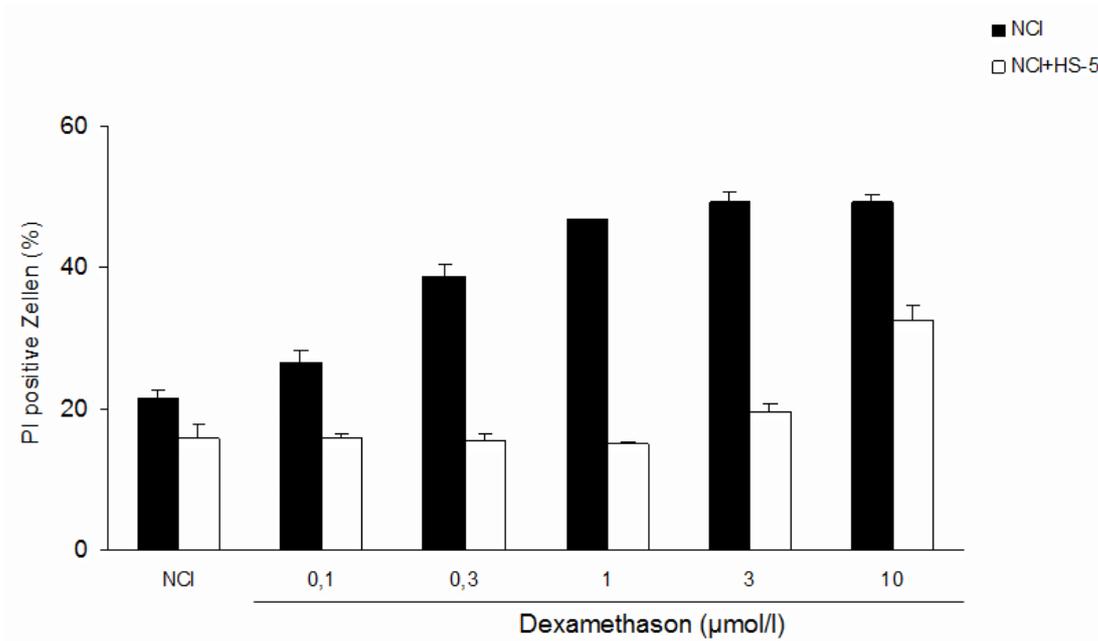


Abbildung 3.4: CAM-DR unter Dexamethason-Wirkung

NCI-H929-Zellen wurden mit ansteigender Dexamethason-Konzentration in An- oder Abwesenheit von HS-5-Stromazellen inkubiert. Nach einer Doppelfärbung mit CD38- FITC und PI wurde die Apoptose-rate durchflusszytometrisch bestimmt.

Durch Zelladhäsion wird eine starke primäre Chemoresistenz der Myelomzellen hervorgerufen.

3.2 Antimyelomeffekt von Simvastatin

Der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor, Simvastatin, induziert bei den Myelomzellen Apoptose und wirkt antiproliferativ. Aus der Abbildung 3.5 geht hervor, dass Simvastatin bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen (1 $\mu\text{mol/l}$) die Myelomzellproliferation statistisch signifikant inhibiert.

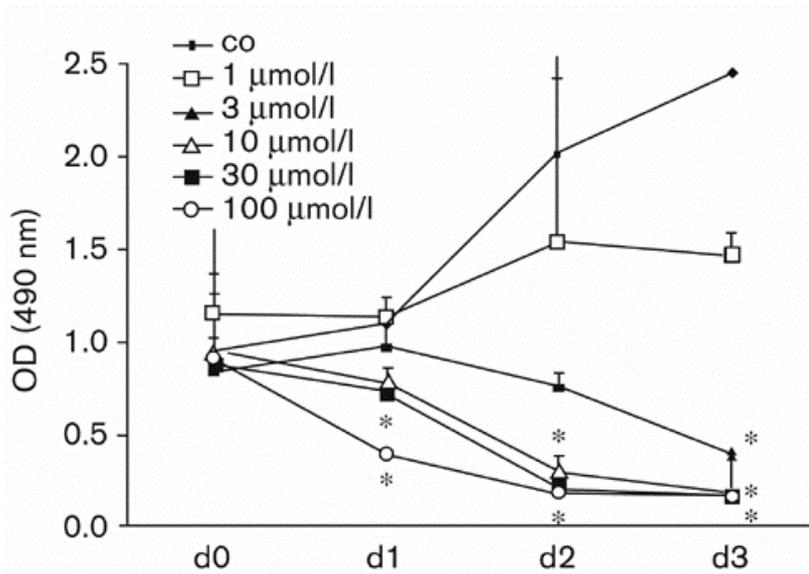


Abbildung 3.5: Zeit- und dosisabhängige Hemmung der Zellproliferation durch Simvastatin

NCI-H929-Zellen wurden mit Simvastatin in ansteigender Konzentration inkubiert. Nach 0 (d0), 1 (d1), 2 (d2), 3 (d3) Tagen wurde die Zellvitalität mittels WST-1-Färbung (wasserlösliches Tetrazolium-Salz-1-Assay) photometrisch verifiziert. Die optische Dichte (optical density, OD) wurde bei einer Wellenlänge von 490 nm bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

*) statistisch signifikant ($P < 0,05$)

Die Abbildungen 3.6a-c zeigen, dass Simvastatin sogar in Gegenwart von Knochenmarkstromazellen bei allen angewandten Myelomzelllinien (NCI-H929, OPM2, RPMI-8226) Apoptose induziert. Simvastatin wirkt somit ungeachtet der CAM-DR in der Myelomzell/Knochenmarkstromazell-Kokultur proapoptotisch. Überraschenderweise wurde wiederholt bei den NCI-H929-Zellen in der Kokultur eine im Vergleich zur Monokultur höhere Apoptoserate beobachtet. In den übrigen Myelomzelllinien war dieser Effekt entweder nur gering ausgeprägt oder gar nicht vorhanden.

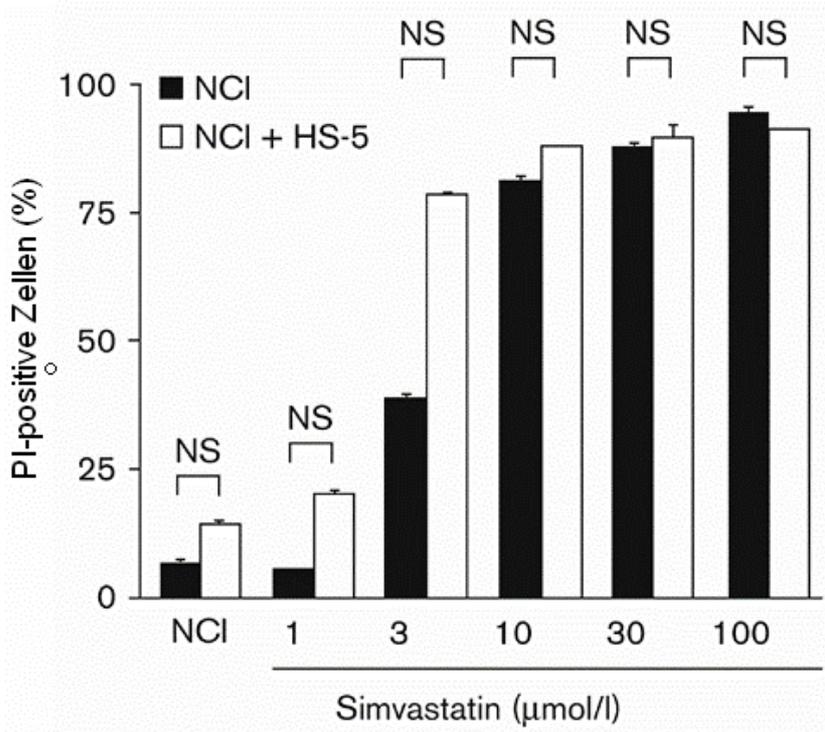


Abbildung 3.6a

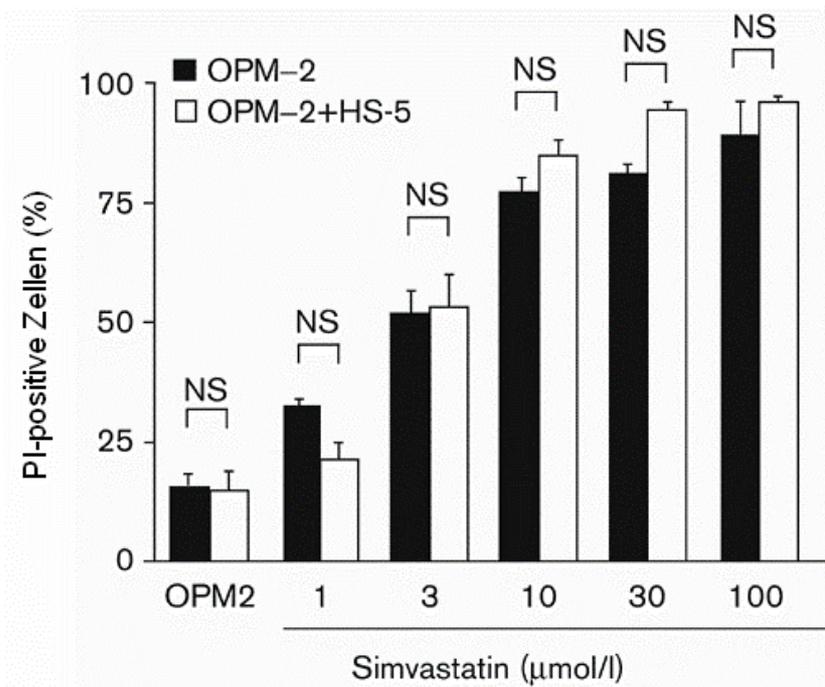


Abbildung 3.6b

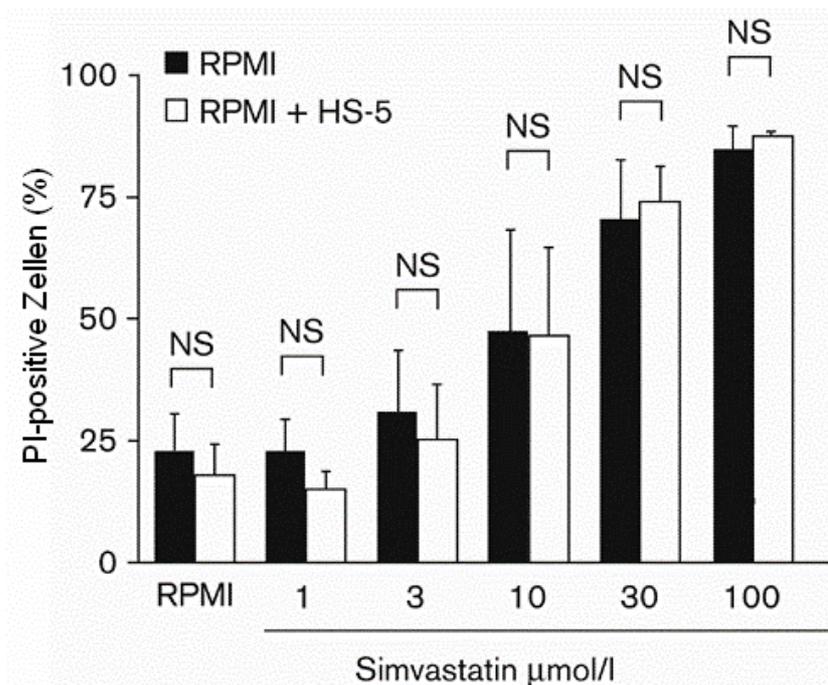


Abbildung 3.6c

Abbildung 3.6a-c: Antimyelomeffekt von Simvastatin sowohl in der Mono- als auch in der Ko-kultur

NCI-H929- (NCI), OPM-2- und RPMI-8226- (RPMI) Myelomzellen wurden mit ansteigender Simvastatin-Konzentration in An- oder Abwesenheit von HS-5-Stromazellen 3 Tage lang inkubiert. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde nach Doppelfärbung mit CD38-FITC und PI im Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von je zwei unabhängigen Versuchen.

NS: nicht-signifikant

Simvastatin führt in der Monokultur zur Apoptose und überwindet darüber hinaus im Gegensatz zu Bortezomib und Dexamethason die primäre, zelladhäsionsvermittelte Chemoresistenz.

Zur Bestimmung, ob unter Simvastatin-Wirkung bestimmte Zellproteine differenziell exprimiert werden, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Zellen der Myelomzelllinie NCI-H929 wurden in vitro mit Simvastatin der Konzentrationen 0,3 μM , 1 μM und 3 μM 72 Stunden lang inkubiert.

Die wichtigsten antiapoptotischen Onkoproteine der Bcl-2- Familie, Bcl-2, Bcl-xL, BAD, BAG-1, Mcl-1 (myeloid cell leukaemia-1) und Mitglieder der Apoptoseinhibitoren c-IAP1 (inhibitor of apoptosis protein-1) und Survivin wurden neben dem proapoptotischen Enzym Bax bestimmt.

Unter Simvastatin kommt es, mit Ausnahme des antiapoptotischen Enzyms BAD, zu einem Anstieg der apoptosehemmenden Regulatorproteine Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL

(Abb. 3.7) und IAP-1. BAD wird vermindert exprimiert. Survivin und BAG-1 weisen keine Veränderungen auf. Das Apoptoseenzym BAX wird hoch reguliert.

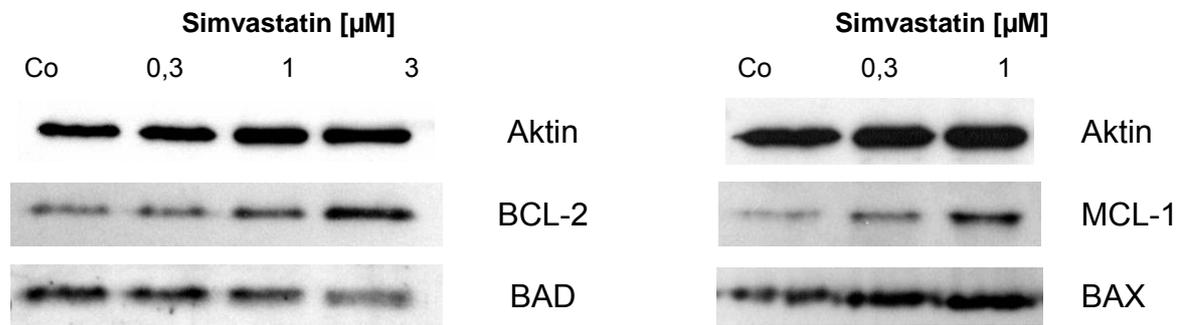


Abbildung 3.7: Western Blot Analyse der wichtigsten Signalmoleküle unter Simvastatinwirkung

Simvastatin führt zu einer Erhöhung der Expression von BCL-2, MCL-1, während die Expression von BAD vermindert wird. BAX, ein proapoptisches Protein, wird vermehrt exprimiert. NCI-H929-Zellen wurden neben einer unbehandelten Kontrolle mit Simvastatin der Konzentrationen 0,3, 1 und 3 μM behandelt. Nach einer Inkubationsdauer von 72 Stunden wurden die Proteine aus den Zellen extrahiert und die wichtigsten Apoptose-Signalmoleküle der Western-Blot-Analyse zugeführt. Zum Nachweis der gleichmäßigen Proteinbeladung diente eine Aktin-Kontrolle. Die Messdaten für Bcl-xL, IAP-1, Survivin und BAG-1 sind nicht aufgeführt.

3.4 Bedeutung der Bisphosphonate in der Myelomtherapie

3.4.1 Zoledronsäure wirkt nicht toxisch in Myelomzellen

Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde Zoledronsäure in ansteigenden Konzentrationen mit den humanen Myelomzelllinien NCI-H929, OPM-2 und U266 über 48 Stunden inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer ausgewertet. Dabei diente 100 μM als maximale Konzentration. Der tatsächlich erreichbare Serum-peak-Spiegel von Zoledronsäure ist niedrig. Beim Menschen sind Konzentrationen im Mikromolar-Bereich nicht möglich. Auch für das Knochenmark sind Konzentrationen dieser Größenordnung möglicherweise zu hoch. Die Abbildungen 3.8a-c zeigen, dass Zoledronsäure unter diesen Versuchsbedingungen keine Zytotoxizität aufweist. Um eine Substanzklassenspezifität in der Wirkungsweise auszuschließen, wurden Experimente mit Bisphosphonaten der 1. und 2. Generation (Clodronsäure, Pamidronat) entsprechend den Versuchen mit Zoledronsäure durchgeführt. Die Ergebnisse, dargestellt in den Abbildungen 3.8d und e, lassen keine Antimyelom-Aktivität erkennen. Um die komplex-strukturierte Umgebungbedingungen des Knochenmarks wieder-

zugeben, wurden die Versuche mit Clodronsäure in Anwesenheit von HS-5 Stromazellen wiederholt. Auch hierbei konnte keine proapoptotische Wirkung von Clodronsäure (Abb. 3.8e) beobachtet werden. Hieraus lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass die eingesetzten Substanzen in dem von uns benutzten *in vitro* Modell unter den gegebenen Bedingungen keine Apoptose induzieren.

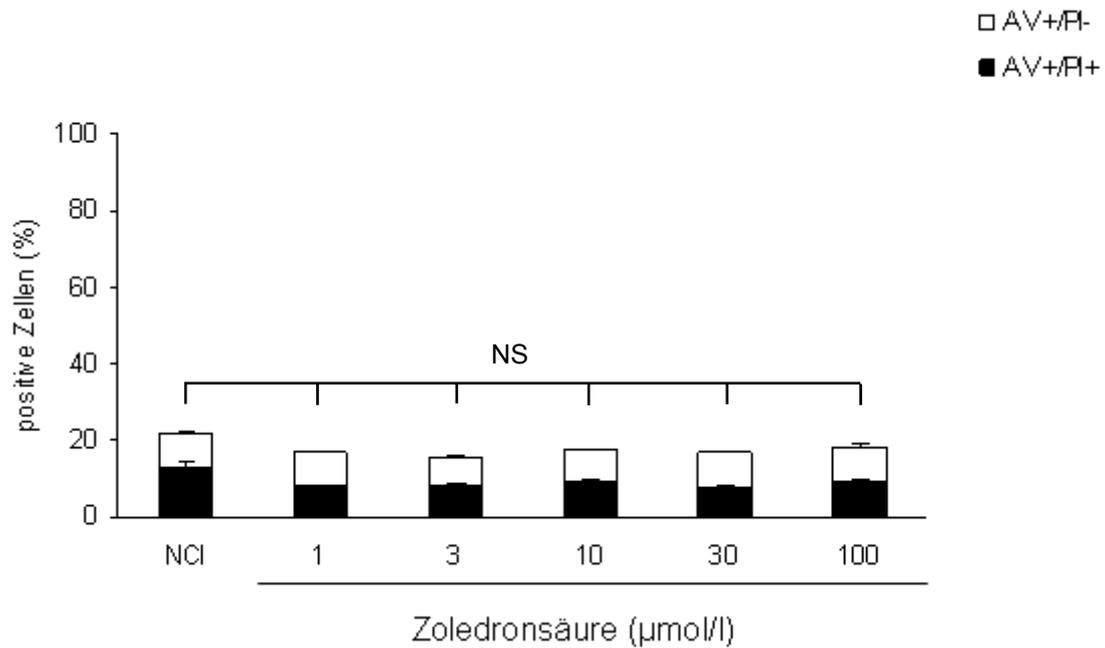


Abbildung 3.8a

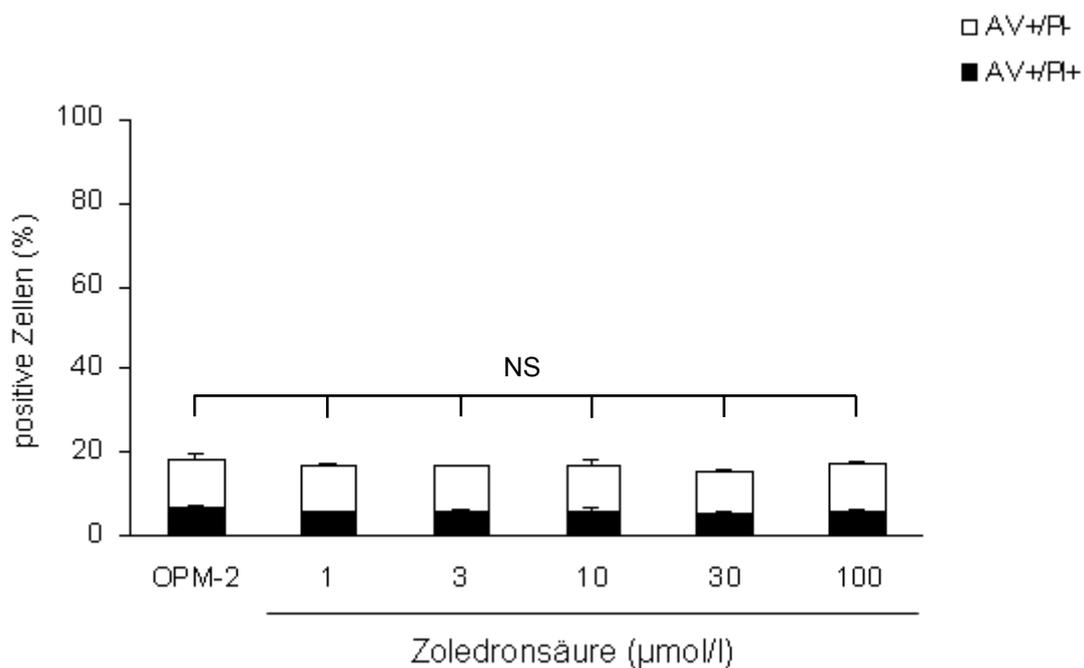


Abbildung 3.8b

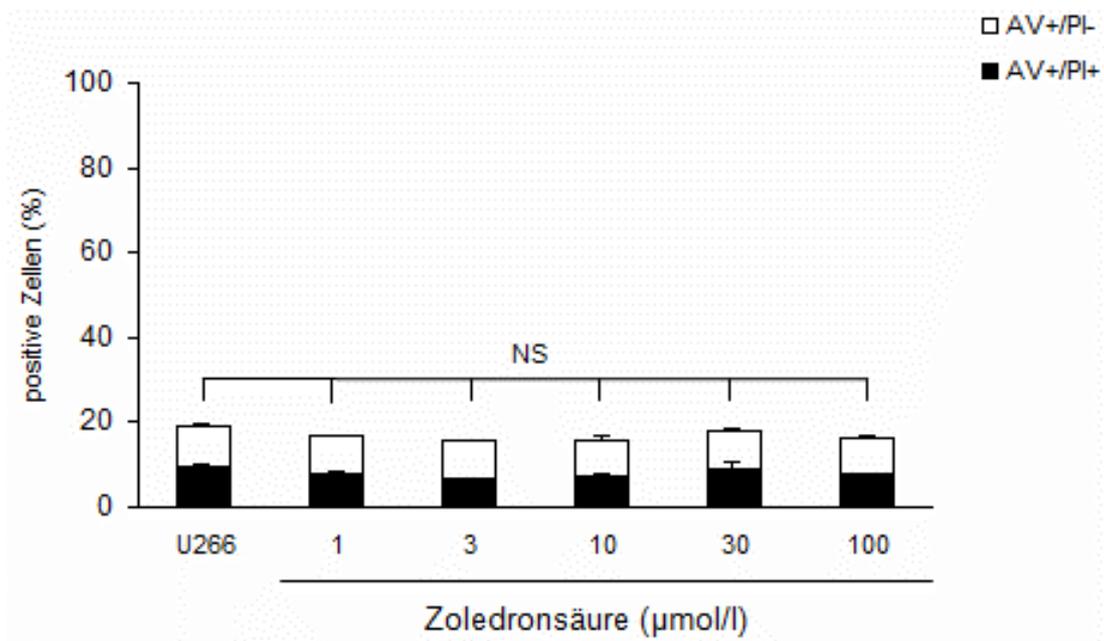


Abbildung 3.8c

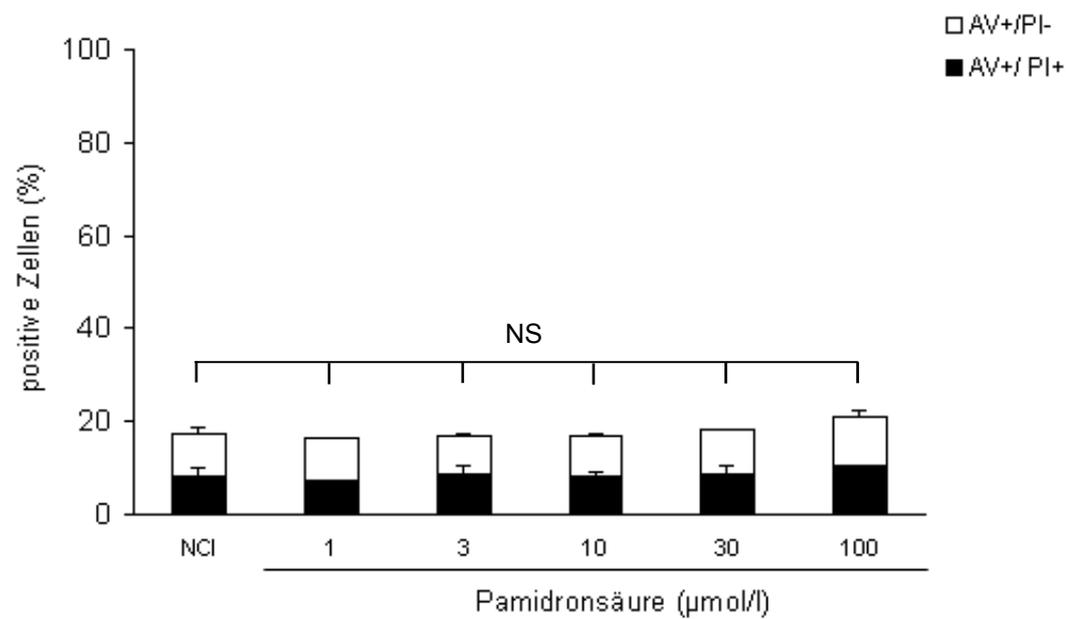


Abbildung 3.8d

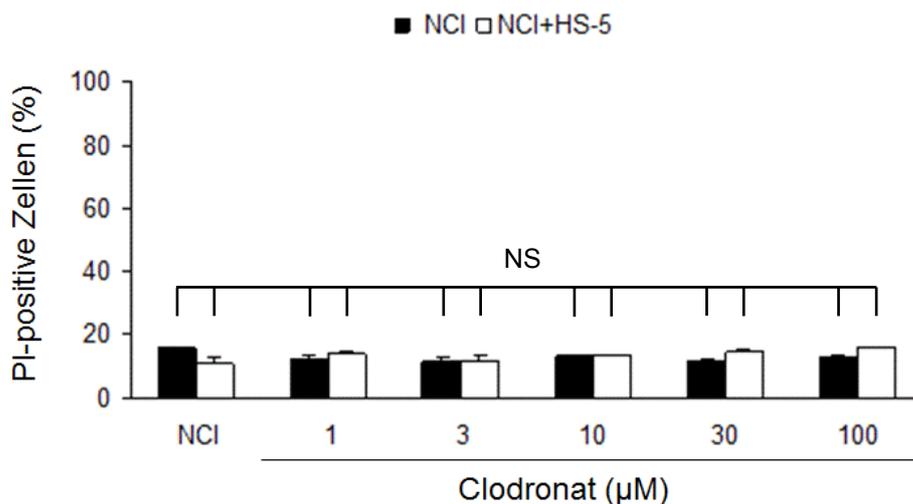


Abbildung 3.8e

Abbildung 3.8a-e: Fehlender Antimyelomeffekt von Zoledronsäure

Humane MM-Zellen der Linien NCI-H929, OPM-2 und U266 wurden mit ansteigender Zoledronsäure-Konzentration behandelt. Nach einer Inkubationsdauer von 48h wurde mittels AnnexinV/PI-Färbung durchflusszytometrisch die Frühphase der Apoptose und Zelltod bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. a) Zoledronat-Wirkung auf NCI-H929. b) Zoledronat-Wirkung auf OPM-2. c) Zoledronat-Wirkung auf U266. d) Pamidronat-Wirkung auf NCI-H929. e) Clodronat-Wirkung auf NCI-H929 in An- und Abwesenheit von HS-5-Knochenmarkstromazellen.

NS: nicht-signifikant

3.4.2. Bisphosphonate können die CAM-DR nicht inhibieren

Bisphosphonate als Einzelsubstanz können im *in vitro* Versuchsmodell keine Apoptose induzieren. Im nächsten Versuchsschritt wurde untersucht, ob Bisphosphonate die CAM-DR beeinflussen. Myelomzellen wurden zusammen mit Knochenmarkstromazellen mit Zoledronsäure 100 µM und Bortezomib bzw. Melphalan behandelt. Nach 48 Stunden wurde der Apoptoseanteil ermittelt. Die Abbildungen 3.9 und 3.10 zeigen, dass Zoledronsäure weder nach Behandlung mit Bortezomib noch mit Melphalan eine Abnahme der CAM-DR zur Folge hat.

Zur Überprüfung, ob dieses Phänomen spezifisch für Zoledronsäure ist, wurde anschließend Clodronsäure getestet. Clodronsäure wurde in Kombination mit Melphalan auf Myelomzellen in Gegenwart oder Abwesenheit von HS-5-Stromazellen gegeben. Nach 48 Stunden wurde der Apoptoseanteil bestimmt. Aus der Abbildung 3.11 geht hervor, dass Clodronsäure unter den vorliegenden Versuchsbedingungen keine Auswirkung auf CAM-DR hat. Bemerkenswert ist, dass die Apoptoserate bei einer Kombination von Zoledronsäure und Melphalan sowohl in der Mono- als auch in der Ko-

kultur im Vergleich zu einer reinen Behandlung mit Melphalan statistisch signifikant höher ist (siehe Abbildung 3.10). Dieses Phänomen ist jedoch bei der Kombination Zoledronsäure/Bortezomib nicht zu beobachten.

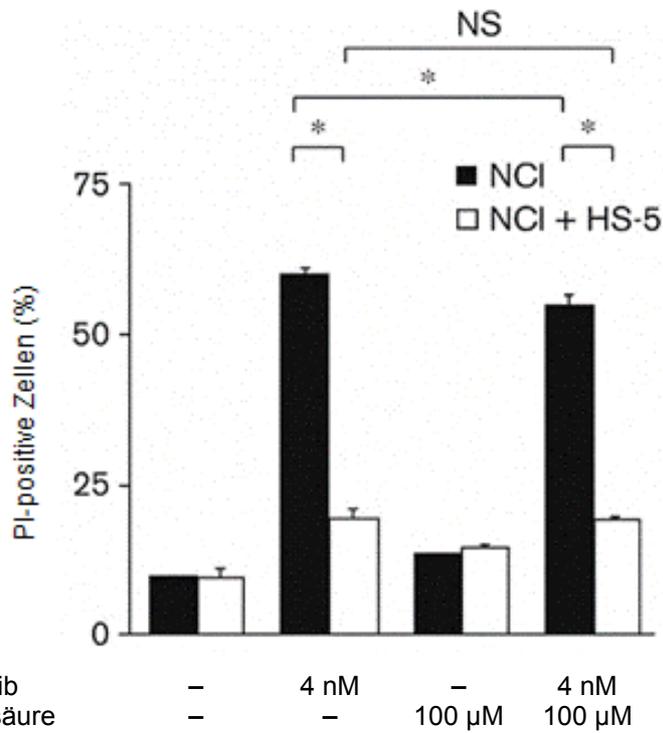


Abbildung 3.9

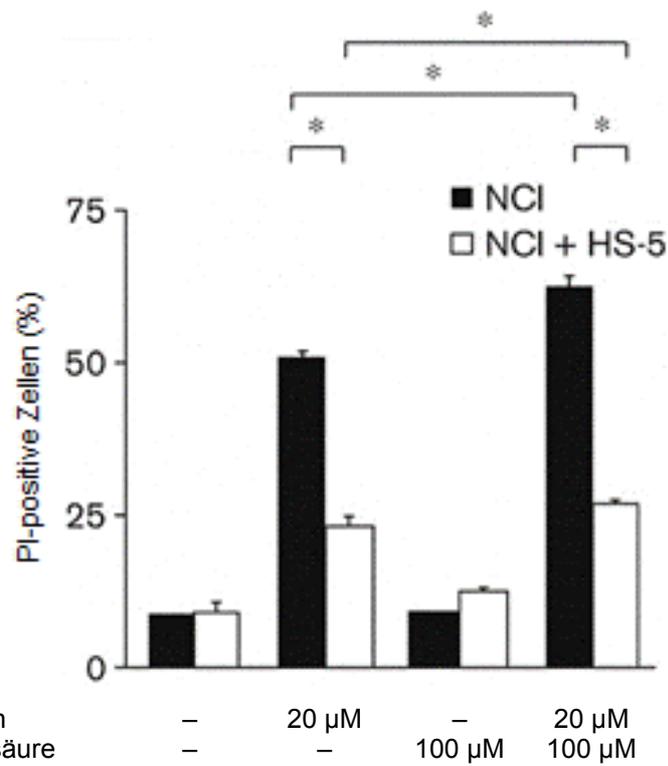


Abbildung 3.10

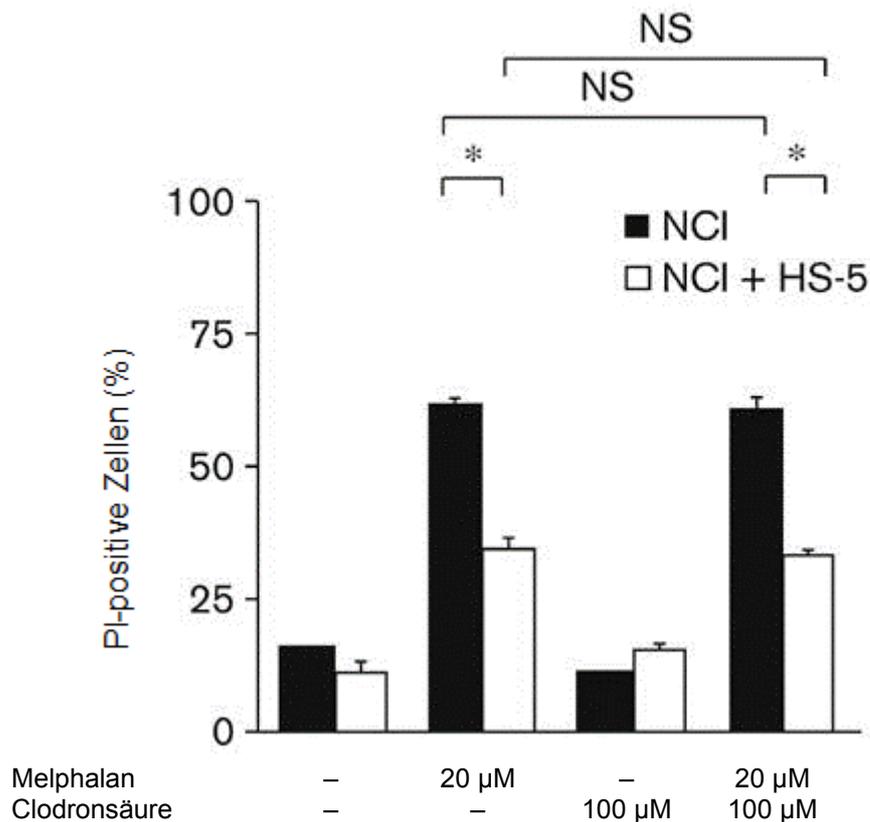


Abbildung 3.11:

Abbildung 3.9-3.11: Keine Abnahme der CAM-DR durch Zoledronsäure

NCI-H929 wurden in An- oder Abwesenheit von HS-5-Zellen mit Melphalan 20 μ M, Bortezomib 4 nM, Zoledronsäure (100 μ M) und Clodronsäure behandelt. Die Trennung der Myelomzellen erfolgte mit CD38-FITC, der Anteil der PI positiven Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten. 3.9: Zoledronsäure kann die Bortezomib-Resistenz nicht überwinden. 3.10: Zoledronsäure kann die Melphalan-Resistenz nicht überwinden. 3.11: Clodronat kann die Melphalan-Resistenz nicht überwinden.

*) statistisch signifikant ($P < 0,05$); NS: nicht-signifikant

3.4.3 Synergistische Wirkung von Simvastatin und Zoledronsäure

Statine und Bisphosphonate hemmen den Mevalonatsignalweg an unterschiedlichen Stellen. Die Kenntnis über den Wirkmechanismus dieser Substanzen wirft die Frage nach einer eventuell vorhandenen Wirkungsintensivierung durch eine Kombination von Zoledronsäure und Simvastatin auf. Es galt in den *in vitro* Versuchsmodellen nach Substanzkonzentrationen zu suchen, die bei einer kombinierten Applikation erfolgreich eingesetzt werden können. Im nächsten Versuchsschritt wurde die Antimyelomwirkung von Simvastatin in Kombination mit Zoledronsäure in der Monokultur sowie in der Kokultur untersucht.

Zunächst wurden NCI-H929-Zellen mit Simvastatin (1 μM) und Zoledronsäure (100 μM) versetzt. Die Abbildung 3.12a zeigt, dass Simvastatin und Zoledronsäure in Konzentrationen, die auf Myelomzellen nicht toxisch wirken, bei einer kombinierten Verabreichung derselben zu einer signifikanten Apoptoserate von etwa 50% führen. Darüber hinaus zeigt die Abbildung 3.12b einen synergistisch-proapoptotischen Effekt von Simvastatin und Zoledronsäure selbst in Gegenwart von HS-5 Knochenmarkstromazellen. Auffällig ist erneut, dass in der Kokultur ein im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen statistisch signifikant höherer Apoptoseanteil der Myelomzellen unter Simvastatin-Wirkung vorhanden ist, nicht jedoch im Vergleich zu den Zellen in der Monokultur.

Zum Nachweis einer ausreichenden Zelladhäsion in der Kokultur, die zu einem entsprechenden Schutz gegenüber der toxischen Wirkung von Bortezomib führt, wurden die Zellen mit Bortezomib behandelt. Die Abbildung 3.12c zeigt, dass in der Kokultur bei einer reinen Behandlung mit Bortezomib (4 nM) eine deutlich erkennbare CAM-DR vorliegt, was für eine funktionell gute Zelladhäsion zwischen Myelomzellen und HS-5 Stromazellen spricht (Abb. 3.12c). Von entscheidender Relevanz ist in diesem Zusammenhang die synergistische Wirkung von Simvastatin und Zoledronsäure im Hinblick auf Aufhebung der CAM-DR: Bortezomib induziert bei NCI-H929-Myelomzellen Apoptose. Die Antimyelomwirkung von Bortezomib ist allerdings in Gegenwart von HS-5-Stromazellen fast vollständig aufgehoben. Zoledronsäure allein ist nicht in der Lage, die Chemoresistenz zu überwinden, Simvastatin hingegen stellt die Zytotoxizität von Bortezomib in der Kokultur fast wieder her. Von entscheidender Bedeutung ist die komplette Aufhebung der adhäsionsvermittelten Chemoresistenz bei einer Kombination aus allen drei Substanzen (Abb 3.12d).

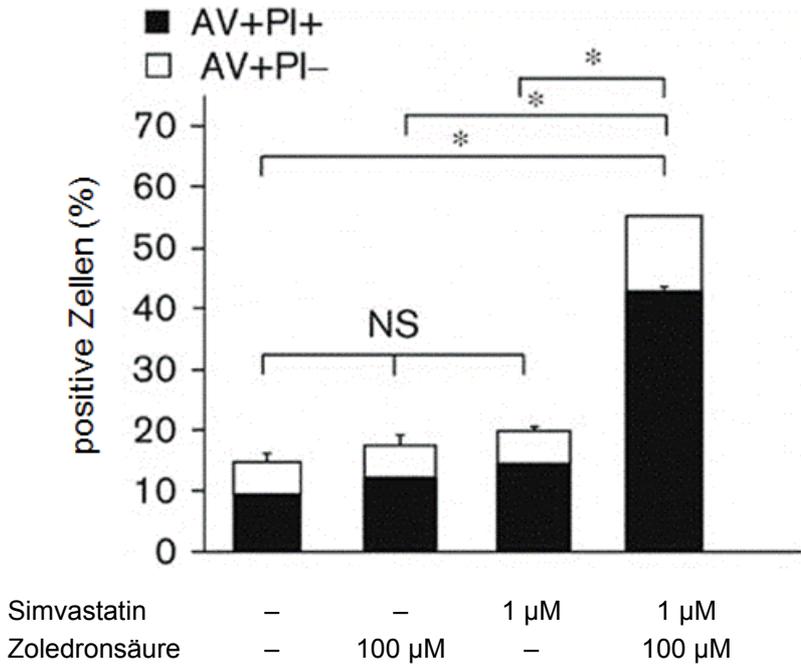


Abbildung 3.12a

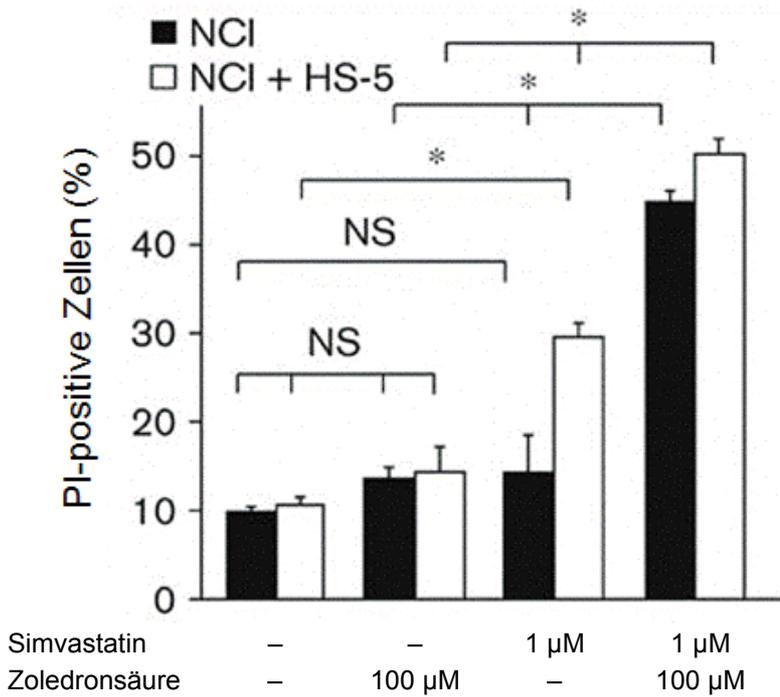


Abbildung 3.12b

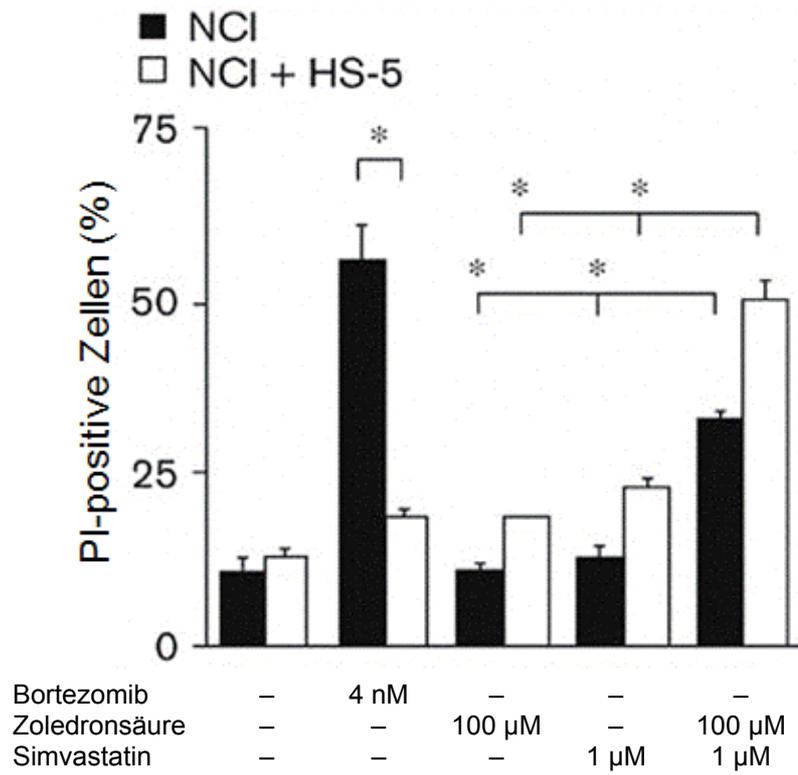


Abbildung 3.12c

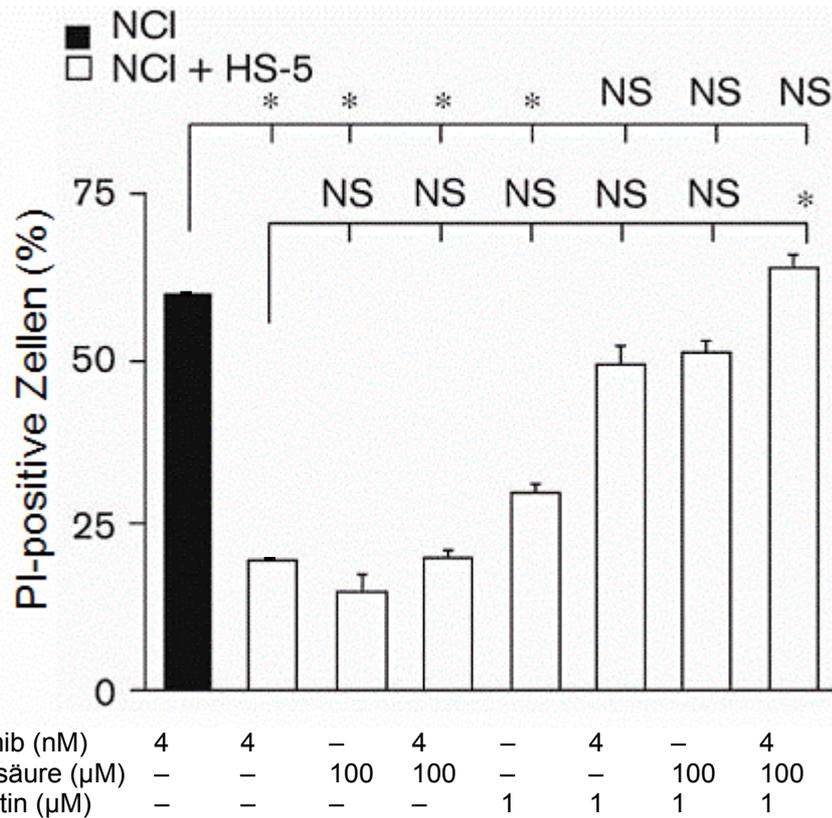


Abbildung 3.12d

Abbildung 3.12a-d: Synergistische Wirkung von Simvastatin und Zoledronsäure bezüglich Apoptoseinduktion und Überwindung der CAM-DR

a) NCI-Zellen wurden wie dargestellt mit Zoledronsäure und Simvastatin über 48 Stunden inkubiert. Nach AnnexinV-FITC- und PI-Färbung wurde der Anteil apoptotischer Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Repräsentative Daten aus vier Versuchen mit vergleichbaren Ergebnissen sind abgebildet. b) NCI-H929 Zellen wurden mit Zoledronsäure und Simvastatin in An- und Abwesenheit von HS-5 Stromazellen, wie dargestellt, behandelt. Nach PI-Färbung erfolgte durchflusszytometrisch die Bestimmung der Apoptoserate. c) NCI-H929 Zellen wurden mit Bortezomib, Zoledronsäure und Simvastatin in An- und Abwesenheit von HS-5 Stromazellen wie dargestellt inkubiert. Nach 48h erfolgte die Apoptosebestimmung. d) NCI-H929 Zellen wurden mit Bortezomib, Zoledronsäure und Simvastatin in An- und Abwesenheit von HS-5 Stromazellen, wie dargestellt, kultiviert. Nach 48h wurden die Zellen mit CD38-FITC/PI gefärbt. Die Bestimmung der Apoptoserate erfolgte durchflusszytometrisch. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Versuchen.

*) statistisch signifikant ($P < 0,05$); NS: nicht-signifikant

4. Diskussion

4.1. Zelladhäsionsvermittelte Chemoresistenz in Myelomzellen

Im klinischen Alltag limitiert die primäre Chemoresistenz die Prognose des Multiplen Myeloms. Die dafür entscheidenden Mechanismen konnten bisher nicht endgültig geklärt werden. Das Multiple Myelom ist eine Erkrankung des Knochenmarks. Das Knochenmarkmilieu bietet die notwendigen Bedingungen für das Wachstum und die Proliferation von Myelomzellen (Hazlehurst, *et al.*, 2003; Dalton, 2003). Das Knochenmarkmilieu besteht größtenteils aus hämatopoetischen Zellen, Stromazellen (hBMSC) und extrazellulären Matrixproteinen, die sich in einem dauerhaften Wechselspiel befinden. Um die Mechanismen der primären Chemoresistenz zu erforschen, war die Entwicklung eines an den realen Bedingungen angelehnten *in vitro* Modells notwendig. Hierzu wurde ein Kokulturmodell aus Myelomzellen und Knochenmarkstromazellen etabliert, in dem die Möglichkeit der Interaktion zwischen Myelomzellen und Knochenmarkstromazellen gegeben war. Im Rahmen dieses Versuchsmodells wurde gezeigt, dass die Myelomzellen primär durch Adhäsion an Stromazellen chemoresistent werden. Wenngleich lösliche Faktoren, wie z.B. der Wachstumsfaktor Interleukin-6 als resistenzverursachend gelten, stellte sich heraus, dass ihre Bedeutung im Vergleich zur zelladhäsionsvermittelten Chemoresistenz gering ist bzw., dass die Adhäsion Voraussetzung für die Sezernierung der löslichen Faktoren ist (Baumann, 2006). Weder konditioniertes Medium noch ein Austausch von Mediatoren zwischen Stromazellen und Myelomzellen durch eine permeable Membran, die den direkten Zell-Zell-Kontakt verhinderte, konnten eine Chemoresistenz verursachen (Baumann, 2006). Der direkte Zell-Zell-Kontakt scheint somit für die Entstehung der CAM-DR hauptverantwortlich zu sein.

Neben der direkten Antimyelomaktivität neuer Substanzen stellt die Ausschaltung von Signalen und Unterbindung von Interaktionen mit dem Microenvironment eine Hauptzielrichtung bei der Entwicklung neuer, zielgerichteter Medikamente dar. Zu den neuen Substanzen gehört Bortezomib, das bei Krankheitsrückfall als Rezidivtherapie oder bei therapierefraktärem Multiplen Myelom zugelassen ist. Allerdings erweist sich Bortezomib nicht nur in der Rezidivtherapie oder bei Therapierefraktärität als sehr effektiv. Bortezomib als Einzelsubstanz oder in Kombination mit Hochdosis-Dexamethason wird in der Literatur als eine sehr effektive Myelomtherapie beschrie-

ben (Corso *et al.*, 2007; Gotoh *et al.*, 2007). Klinische Erfahrungen zeigen, dass Bortezomib auch in der Erstlinien-Therapie bei Einzelgabe oder in Kombination mit anderen Substanzen sehr wirkungsvoll ist (Read *et al.*, 1995; Merchionne *et al.*, 2007). Eine Bortezomibkombinationstherapie mit Steroiden als Induktionstherapie vor geplanter autologer Stammzelltransplantation oder als Erhaltungstherapie im Anschluss an Stammzelltransplantation werden bereits durchgeführt (Hulin *et al.*, 2007; Raab *et al.*, 2007). Auch die Kombination von Bortezomib mit Melphalan und Prednison bei älteren Patienten ist vielversprechend (Mateos *et al.*, 2006). Ob die ersten Ergebnisse des Bortezomib-Einsatzes in der Erstlinien-Therapie zu einer Verlängerung des Gesamtüberlebens führen und die autologe Stammzelltransplantation als Mittel der ersten Wahl ersetzt wird, bleibt abzuwarten (Nefedova *et al.*, 2003).

In den *in vitro*-Versuchen führt die Proteasomhemmung zu einer Expressionminderung der Oberflächenrezeptoren wie z.B. VCAM-1 und ICAM-1 (Read *et al.*, 1995), die die Interaktion zwischen Myelomzellen und Stromazellen vermitteln. Darüberhinaus reduziert Proteasomhemmung die NF- κ B vermittelte Transkription und Ausschüttung des Wachstumsfaktors IL-6 (Hideshima *et al.*, 2001), die durch Adhäsion von Myelomzellen an Stromazellen getriggert wird. Gen-Microarray-Analysen zeigen, dass Bortezomib ferner zu einer Abnahme der Transkription von Proteinen der Wachstums- und Antiapoptosesignalwege führt, während die proapoptotischen Kaskaden und die Expression der Gene für Hitze-Schock-Proteine hochreguliert werden (Mitsiades *et al.*, 2002).

Im Kokulturmodell mit HS-5 Stromazellen und Myelomzellen wurden die Substanzen Bortezomib und Dexamethason getestet. Die proapoptotische Wirkung von Dexamethason, einem wichtigen Bestandteil der Myelomtherapie, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Unter Dexamethason-Wirkung werden Myelomzellen, abhängig von der Substanzkonzentration, nach 72 Stunden Inkubationsdauer zunehmend apoptotisch (Abb.3.4). Im Kokulturmodell mit HS-5-Stromazellen und Myelomzellen wurde der proapoptotische Effekt sowohl von Bortezomib als auch von Dexamethason durch CAM-DR um etwa 60% reduziert. Bei Koinkubation mit primären Stromazellen, die aus Knochenmarkspalten von vier an Multiplem Myelom erkrankten Patienten isoliert wurden, zeigten die Myelomzellen analog zu der HS-5-Kokultur ebenfalls Chemoresistenz (Abb. 3.2).

Es konnte gezeigt werden, dass durch CAM-DR sowohl die frühe als auch die späte Apoptose reduziert wird (Baumann, 2006). Nefedova *et al.* wiesen für den Topoiso-

merase-II Inhibitor Mitoxantrone, der nicht zu den üblichen Chemotherapeutika der MM-Therapie zählt, ebenso die apoptosereduzierende Wirkung der CAM-DR von mehr als 50% im Vergleich zu den Zellen in Monokultur nach (Nefedova *et al.*, 2003). Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass durch CAM-DR der Zytostatika-induzierte Zelltod von Doxorubicin, Melphalan, Gemcitabine und Treosulfan um bis zu 63 % reduziert wird (Baumann, 2006; Meinhardt *et al.*, 2003).

In der Literatur wird Bortezomib als eine Substanz beschrieben, die nicht nur Apoptose induziert, sondern überdies zu einer Ausschaltung bzw. zu einer Minderung der extrazellulären Stimuli im Microenvironment führt, die das Tumorwachstum fördern (Gotoh *et al.*, 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte unter Bortezomib-Wirkung CAM-DR in der Kokultur nicht überwunden werden. Bortezomib-induzierte Apoptose wird durch Adhäsion an Stromazellen aufgehoben. CAM-DR stellt trotz des Einsatzes des als sehr wirksam geltenden Zytostatikums Bortezomib nach wie vor eine große Herausforderung in der Myelomtherapie dar.

Primäre Stromazellen, die in der B-Zell-Entwicklung eine Rolle spielen und sich aus Knochenmarksproben isolieren lassen, stellen sich in Knochenmarkskulturen als adhärenente Zellen mit fibroblastenähnlicher Morphologie dar (Friedenstein *et al.*, 1966; Friedenstein *et al.*, 1976). Nach einer Kultivierungsdauer von ca. 2 Wochen sind aus dem Knochenmarksaspirat durch die kurze *in vitro* Überlebensdauer der verbliebenen hämatopoetischen Zellen lediglich Stromazellen in der Kultur vertreten (Friedenstein *et al.*, 1966; Friedenstein *et al.*, 1976). Die Vorbereitung der Stromazelllayer nimmt eine lange Inkubationsdauer von circa 8 Wochen in Anspruch. Dahingegen sind HS-5 Stromazellen eine relativ schnell proliferierende Zelllinie, deren Zellzahl sich innerhalb von Tagen auf die benötigte Menge expandiert und demzufolge sich für ein Kokulturmodell sehr gut eignet. Reproduzierbarkeit, einfache Durchführbarkeit des Versuchsaufbaus sowie Auswertung am Durchflusszytometer sollten in solch einem Versuchsmodell ebenfalls gegeben sein. In den Vorversuchen wurden die Dauer der Kultivierung und die Substanzkonzentrationen solange variiert, bis optimale zytotoxische Effekte auf Myelomzellen beobachtet werden konnten.

Trotz ihrer raschen Wachstumsrate zeigen HS-5-Stromazellen genauso wie die primären Stromazellen mit einer niedrigeren Proliferationsrate, im Vergleich zu Myelomzellen eine geringere Chemosensibilität gegenüber einer großen Zahl von Zytostatika (Baumann, 2006). Die primären Knochenmarkstromazellen sind etwas weniger chemosensibel als die HS-5-Stromazellen, was vermutlich auf die langsamere Prolifera-

tionsaktivität zurückzuführen ist (Baumann, 2006). Insbesondere Chemotherapeutika aus der Gruppe der Alkylantien bewirken einen dosisabhängigen Anstieg der Apoptoserate, während Gemcitabin, Cytarabin und Doxorubicin ungeachtet weiterer Dosiserhöhung keine Wirkung zeigen (Baumann, 2006). Die protektive Funktion der Stromazellen bleibt somit unbeeinträchtigt. Nicht zuletzt wird wegen der großen Zahl der von den HS-5 Zellen ebenso wie von den primären Stromazellen sezernierten Zytokine eine *in vivo* Situation nachgestellt (Roedklein *et al.*, 1995).

4.2 Antimyelomeffekt von Simvastatin

Simvastatin, ein Statinderivat, blockiert die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym A (HMG-CoA) Reduktase, wodurch die Konversion von HMG-CoA zu Mevalonat unterbunden wird. Statine verfügen neben der lipidsenkenden Wirkung über antiinflammatorische, antioxidative und antikoagulatorische Eigenschaften. Es wird angenommen, dass der antiinflammatorische Effekt von Statinen zum Teil durch Herabregulierung von bestimmten Adhäsionsmolekülen hervorgerufen wird, wodurch die Interaktion zwischen Leukozyten und dem Gefäßendothel inhibiert wird (Rezaie-Majd *et al.*, 2003).

In resistenten Myelomzellen findet eine Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen statt (Damiano *et al.*, 1999). Innerhalb der Arbeitsgruppe gelang der Nachweis einer parallelen Erhöhung der korrespondierenden Oberflächenmarker auf Stromazellen, wodurch das Ausmaß der Zelladhäsion vergrößert wird. Unter dem Einfluss von Simvastatin kommt es zu einer Herabsetzung der Liganden LFA-1 und VLA-4 auf Myelomzellen (Baumann, 2006). Die entsprechenden Rezeptoren auf den Stromazellen, ICAM-1 und VCAM-1, vermitteln die Adhäsion der B-Zellen an das Stromakompartiment. Die Senkung der Integrinexpression auf Myelomzellen unter Simvastatin-Einwirkung müsste unweigerlich die CAM-DR beeinträchtigen. Blockierung des LFA-1-Oberflächenmarkers durch LFA703 führt zu einem geringen Rückgang der CAM-DR. Dem Statinderivat LFA703 fehlt die Fähigkeit zur Hemmung der HMG-CoA-Reduktase (Weitz-Schmidt, *et al.*, 2001). Obwohl bekannt ist, dass Statine wie Lovastatin Integrininteraktionen inhibieren können (Kallen *et al.*, 1999), ist die Beeinträchtigung der CAM-DR durch LFA703 nicht sehr ausgeprägt. Inhibition des LFA-1-Integrins auf den Leukozyten wird in der klinischen Praxis hauptsächlich zur Behand-

lung der Krankheiten mit inflammatorischen Prozessen eingesetzt (Wan *et al.*, 2003; Frenette, 2001; Li X *et al.*, 2004). Da das Resistenzverhalten der Myelomzellen durch Modulation der Intergrinexpressionen nicht wesentlich beeinflusst wird, spielen möglicherweise andere molekulare Mechanismen bei der Entstehung der CAM-DR eine Rolle.

Der Mevalonat-Signalweg bzw. die Aktivierung der Acetyl-CoA/HMG-CoA/Mevalonat-Geranylgeranylpyrophosphat-Kaskade, die folglich mit einer erhöhten Expression der HMG-CoA-Reduktase einhergeht, scheint der Hauptgrund für die Resistenzhöhung der adhärennten Myelomzellen und damit für den antiapoptotischen Effekt zu sein. Mit Hilfe von Oligonucleotid-Microarray-Analysen konnte gezeigt werden, dass die *de novo* und erworbene Chemoresistenz mit einer Erhöhung der HMG-CoA Reduktase-Genexpression assoziiert ist (Hazlehurst *et al.*, 2003). Die zelladhäsionsvermittelte Chemoresistenz wird auch bei zahlreichen anderen Tumoren für die primäre Resistenz verantwortlich gemacht, so zum Beispiel bei der akuten und chronischen Leukämie, bei Lymphomen und bei Lungen- und Brustkrebs (Hazlehurst, *et al.*, 2003; Dalton, 2003). Über die weitergehenden Mechanismen ist darüber in der Literatur nicht viel bekannt. Folglich könnte eine Hemmung der Mevalonat-Signal-Kaskade sowohl durch Statine als auch durch Bisphosphonate die zelladhäsionsvermittelte Chemoresistenz reduzieren.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass Simvastatin bei den Myelomzellen Apoptose induziert, die Zellproliferation hemmt und die zelladhäsionsvermittelte Chemoresistenz überwindet. Statine wirken auf unterschiedliche Myelomzellen proapoptotisch (Gronich *et al.*, 2004; Cafforio *et al.*, 2005; Janosi *et al.*, 2004; van de Donk *et al.*, 2002; van de Donk *et al.*, 2003). Darüber hinaus hemmen Statine die Zellproliferation, überwinden sowohl die primäre (Baumann, 2006) als auch die sekundäre (van de Donk *et al.*, 2002) Chemoresistenz und führen zusammen mit einigen anderen Substanzen zur Wirkungsstärkung ihrer Zytotoxizität (Cafforio *et al.*, 2005; van de Donk *et al.*, 2002).

Die zytotoxische Wirkung von Statinen weist alle Merkmale einer Apoptose auf (Cafforio *et al.*, 2005). Statine hemmen die HMG-CoA-Reduktase, die das Schlüsselenzym im Mevalonat-Signalweg darstellt. Die Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges führt zur Entstehung des Zwischenproduktes Geranylgeranylpyrophosphat, GG-PP (Corsini *et al.*, 1999; Goldstein *et al.*, 1990). Es konnte gezeigt werden, dass bei der Entstehung der CAM-DR in Myelomzellen Geranylgeranylierung und nicht

Farnesylierung bestimmter Proteine von entscheidender Wichtigkeit ist (Baumann, 2006). Die Geranylgeranylierung kann durch Y-27632 inhibiert werden. Der Einsatz von Y-27632 führt zu einem fast vollständigen Rückgang der CAM-DR, was die Bedeutung der Geranylgeranylierung bei der Entstehung der CAM-DR verdeutlicht. Aus diesem Grund lag die Vermutung nahe, dass die Inhibition des Mevalonatsignaltransduktionswegs sowohl durch Statine als auch Bisphosphonate letztlich die Sensibilität der Myelomzellen wieder herstellen müsste. Infolge einer Inhibition von Proteinprenylierung kommt es zum Beispiel unter Mevastatin-Einfluss zur Apoptose der Osteoklasten, wodurch die Knochenresorption unterbunden wird (Marshall *et al.*, 1998).

Simvastatin ist eines der potentesten Statine mit Antimyelom-Wirkung. Simvastatin wirkt auf unterschiedliche Myelomzelllinien toxisch. Die Simvastatin-induzierte Apoptose bei den Myelomzellen wird nicht durch den schützenden Effekt der Knochenmarkstromazellen beeinträchtigt. Unsere Beobachtungen stehen im Einklang mit den Veröffentlichungen, in denen gezeigt wurde, dass weder Adhäsion an Fibronectin noch der Zusatz von Zytokinen vor der Simvastatin-induzierten Apoptose schützen (Dmoszynska *et al.*, 2004). Bisher wurde die zelladhäsionsvermittelte Chemoresistenz bei allen in der Myelomtherapie gängigen Chemotherapeutika beobachtet. Eine Kombination von klassischen Zytostatika mit Simvastatin verspricht erfolgreiche Resultate bezüglich Reduktion der Tumorlast und Eliminierung der sich ständig selbst-erneuernden Myelom-(Stamm-)Zellen, die einen Krankheitsrückfall verursachen. Myelomzellen mit sekundärer Resistenz lassen ebenfalls eine hohe Chemosensibilität gegenüber Statine erkennen (Holmberg *et al.*, 1994). Statine führen darüber hinaus bei einigen malignen Erkrankungen wie zum Beispiel bei Melanomen (Felezko *et al.*, 2002), beim Schilddrüsenkarzinom (Li *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003), beim Kolonkarzinom (Swamy *et al.*, 2002; Agarwal *et al.*, 2002), beim squamösen Zellkarzinom (Dimitoulakos *et al.*, 2002), beim Brustkrebs (Gray-Bablin *et al.*, 1997), bei akuten myeloiden Leukämien (Park, *et al.*, 1999), bei malignen Lymphomen (van de Donk *et al.*, 2003) und beim Multiplen Myelom in *in vitro* Experimenten zum Zelltod (van de Donk *et al.*, 2002; van de Donk *et al.*, 2003). Die in den *in vitro* Versuchen verwendeten Konzentrationen von Statinen liegen bei 100 µmol/l und sind damit möglicherweise zu hoch für eine Anwendung bei Menschen, zumal tatsächlich erreichbare Serumspiegel von Simvastatin in zugelassener Dosierung im niedrigen Mikromolarbereich liegt (Corsini *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu vielen Publikationen zur Aufhebung der

CAM-DR bei den *in vitro* Versuchen wurden in der vorliegenden Arbeit Statine in niedrigen Konzentrationen eingesetzt, die vergleichbar sind mit den im Menschen erreichbaren Plasmaspiegeln. Bei den Experimenten mit Simvastatin kam nach einer entsprechenden Dosisfindung stets eine Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ zum Einsatz.

Der programmierte Zelltod spielt während der Zellentwicklung, bei der Immunoselektion oder bei der Eliminierung von gealterten bzw. geschädigten Zellen eine große Rolle. Am programmierten Zelltod sind unterschiedliche Signaltransduktionswege beteiligt, die alle letztendlich in eine Aktivierung der Caspase-3, einer Zystein-Aspartat spezifischen Protease, münden (Kasper *et al.*, 2005). Eine dieser Signalkaskaden läuft über das mitochondriale Cytochrom C ab, dessen zytosolische Freisetzung hauptsächlich durch die Bcl-2-Familie reguliert wird. Diese besteht sowohl aus Inhibitoren als auch Promotoren der Apoptose (Kasper *et al.*, 2005). Das Membranprotein Bcl-2 ist neben dem Zellkern und der Außenmembran von Mitochondrien mit dem endoplasmatischen Retikulum verknüpft, welches den Apoptosevorgang reguliert (Korsmeyer *et al.*, 1992). Eine Überexpression von Bcl-2 in Krebszellen kann Chemoresistenz verursachen und Zellen vor Apoptose schützen. Bekannt ist eine Reihe von Bcl-2 assoziierten Proteinen, die zum einen antiapoptotisch (Bcl-X_L, Mcl-1, NR-13, A1, Bcl-W) wirken, zum anderen Apoptose induzieren können (Bax, Bcl-X_S, Bak, Bad) (Gajewski *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1996).

In der Literatur gibt es nur wenige Publikationen, die sich mit der Frage des Expressionsmusters von Regulatorproteinen des programmierten Zelltodes unter Statinen beschäftigen. Agarwal *et al.* konnten in Kolonkarzinomzellen zeigen, dass Lovastatin bei einer Konzentration von 10 μM zu einer verminderten Expression von BCL-2 führt, während der Gehalt an BAX ansteigt (Agarwal *et al.*, 1999). Tanaka *et al.* konnten zeigen, dass Lovastatin-induzierte Apoptose bei Nervenzellen mit einer erhöhten Expression von BAX assoziiert ist (Tanaka *et al.* 2000). Van de Donk *et al.* erforschten den Effekt von Lovastatin auf drei Plasmazelllinien und auf acht MM-Patienten. Sie konnten zeigen, dass BCL-2 lediglich in der U266-Zelllinie reduziert wird. Durch Zusatz von Mevalonat konnte die Bcl-2-Expression in den U266-Zellen wieder angehoben werden. Der BCL-2-Level blieb allerdings in L363 und in XG.1 unverändert. Nur bei zwei unter acht untersuchten Patienten konnte nach einer Aufreinigung von Plasmazellen *ex vivo* eine Abnahme von BCL-2 ohne Beeinflussung der BAX-Expression festgestellt werden. In der Literatur gibt es keine klare Aussage über einen Zusammenhang von Statinwirkung und Veränderungen der Bcl-2- und BAX-

Expression. In der vorliegenden Arbeit lässt das Ergebnis der Western-Blot-Analyse vermuten, dass der Grund für den Zelltod unter Simvastatin möglicherweise in einem Anstieg von Bax bei gleichzeitiger Verminderung der Expression von BAD liegen könnte (siehe Abb. 3.7). Ferner scheint die Hochregulierung der antiapoptotischen Proteine Bcl-2, Mcl-1, Bcl-xL und IAP-1 bei der zytotoxischen Wirkung vom Simvastatin eine untergeordnete Rolle zu spielen.

4.3 Antimyelomeffekt von Bisphosphonaten

In der Literatur herrschen widersprüchliche Aussagen über einen Antimyelomeffekt von Zoledronsäure, die möglicherweise in Abweichungen in der Messmethode, in der Dauer der Inkubation sowie der eingesetzten Zelllinie und schließlich in der verwendeten Dosis begründet sind. Bisphosphonate interferieren mit dem Mevalonsäurezyklus und führen zu einer Hemmung des HMG-CoA Reduktase-Signalwegs. Die Parallelität im Wirkmechanismus zwischen Bisphosphonaten und Statinen war der Anlass, eine eventuell vorhandene Antimyelomaktivität von Bisphosphonaten zu evaluieren. Zudem könnten Bisphosphonate als Inhibitoren des Mevalonatsignalweges ähnlich wie Simvastatin, die primäre zell-adhäsionsvermittelte Chemoresistenz reduzieren. Interventionen in den Mevalonatsignalweg durch die Statinderivate Simvastatin und Lovastatin, die durch Hemmung der HMG-CoA-Reduktase den Signalfluss unterbrechen, führen zur Überwindung der primären zell-adhäsionsvermittelten Chemoresistenz (Baumann, 2006).

Gordon *et al.*, konnten in ihren Experimenten zeigen, dass Bisphosphonate den Mevalonat-Signalweg hemmen und sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Apoptose induzieren (Gordon *et al.*, 2002). Die Abbildung 4.1 zeigt eine Übersicht über den HMG-CoA Signalweg (Baumann, 2006). Unter einer Therapie mit Bisphosphonaten nimmt die Isoprenylation des Rap1A-Proteins ab (Gordon *et al.*, 2002). Eine Beeinträchtigung der Prenylation des Rho-Proteins ist bis jetzt nicht beschrieben (Gordon *et al.*, 2002). Im Mevalonat-Signalweg werden die distal der HMG-CoA-Reduktase gelegenen Moleküle Farnesiol und Geranylgeraniol im Zytoplasma der vitalen Zellen pyrophosphoryliert. Im Gegensatz zu FOH führt GGOH zu einem Rückgang der durch Simvastatin verursachten Verminderung der CAM-DR (Baumann, 2006). Der Rho-Kinase-

Inhibitor Y-27632 reduziert analog zu Simvastatin die CAM-DR. Beide Substanzen greifen somit in denselben Signalweg ein (Baumann, 2006).

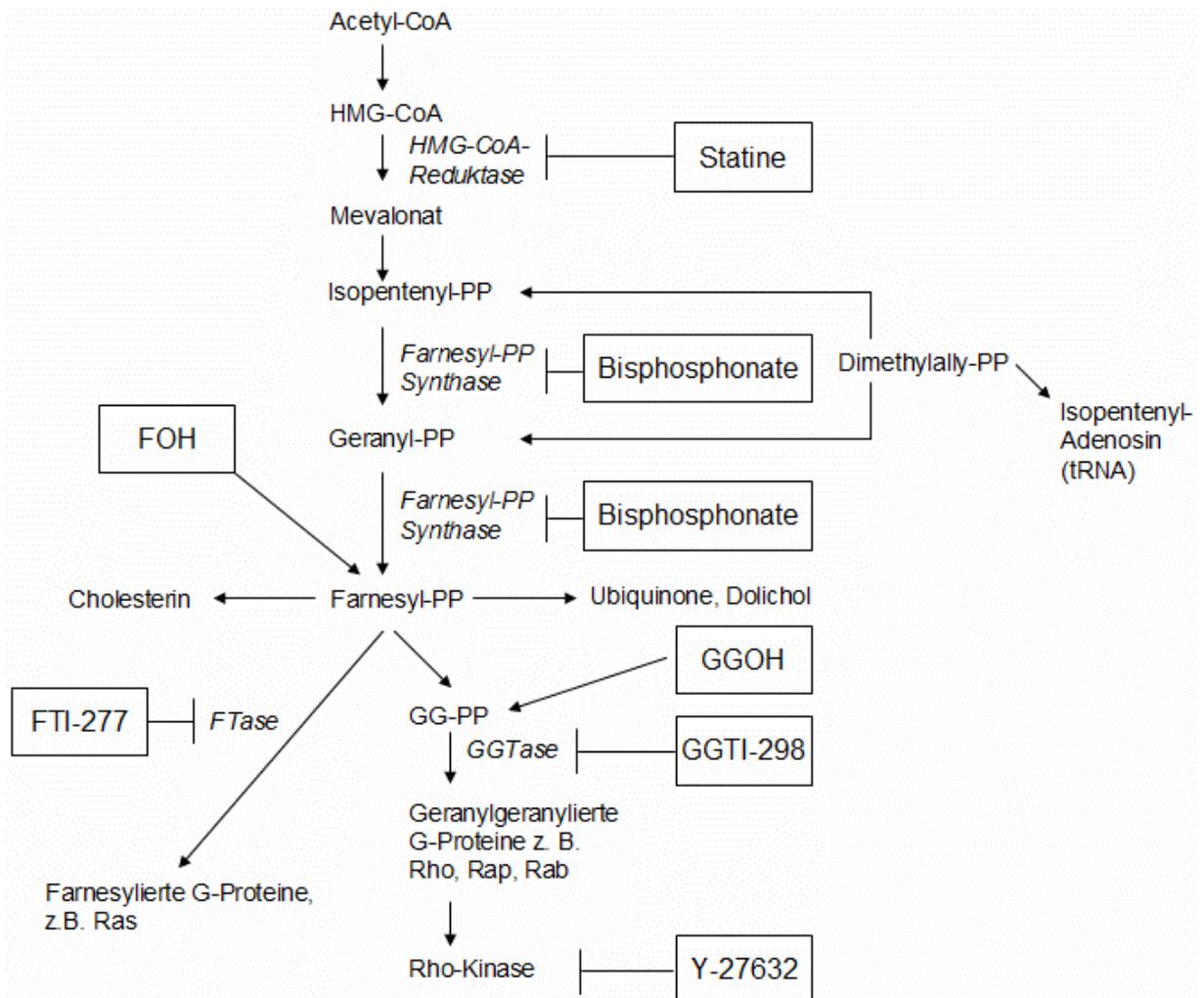


Abbildung 4.1: GG-PP/Rho/Rho-Kinase-Signalweg nach Schmidmaier *et al.*, 2004 (modifiziert)

Schematisch dargestellt ist der Mevalonat-Signalweg. Bisphosphonate hemmen die Farnesyl-diphosphatsynthase (FPPS). Statine hemmen die HMG-CoA-Reduktase, FOH und GGOH sind die Vorformen von Farnesylpyrophosphat und Geranylgeraniolpyrophosphat, die in der Zelle phosphoryliert werden. FTI-277 hemmt die Farnesyltransferase. GGTI-298 hemmt die Geranylgeranioltransferase. Y-27632 ist ein Rho-Kinase Inhibitor.

Trotz eingehender Untersuchung unterschiedlicher Bisphosphonate und umfassender Variierung der Inkubationsdauer und Substanzkonzentrationen, konnte in der vorliegenden Arbeit weder eine Zytotoxizität von Bisphosphonaten auf Myelomzellen noch eine Beeinflussung der CAM-DR festgestellt werden.

Bei einer Therapie mit Zoledronsäure ist eine Dosiserhöhung über den Standard von 4 mg möglich. Der Peak-Serum-Spiegel von Zoledronsäure im Menschen beträgt nach einer Standardinfusionsgeschwindigkeit von 4 mg über 15 Minuten etwa 1

$\mu\text{mol/l}$; $8 \mu\text{mol/l}$ ist bei einer Infusion von 16 mg über 15 min erreichbar (Chen *et al.*, 2002). Entsprechend ihrer Affinität ist die lokale Konzentration von Bisphosphonaten im Knochen wahrscheinlich viel höher. Es wird angenommen, dass Konzentrationen bis $0,1\text{-}1\text{mmol/l}$ (Alendronat) an der Oberfläche, der so genannten „clear zone“ des trabekulären und kortikalen Knochens erreicht werden (Sato *et al.*, 1991). Von den mikroskopischen Untersuchungen weiß man, dass die Myelomzellen nicht strikt in der „clear zone“ zwischen Osteoklasten und Knochen lokalisiert sind, vielmehr sind sie über das gesamte Knochenmark verstreut. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit eine maximale Zoledronsäure-Dosis von $100 \mu\text{mol/l}$ verwendet, die zwischen der im Serum gemessenen und an der Knochenoberfläche, in den Resorptionslakunen erreichbaren Konzentrationen liegt. Bei diesen Konzentrationen konnte kein *in vitro* Antimyelomeffekt beobachtet werden. Ural *et al.* stellten hingegen eine Abnahme der metabolischen Aktivität (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltertrazolium bromide assay) der MM-Zellen ARH-77 und RPMI-8226 fest, nachdem diese mit Zoledronsäure inkubiert wurden (Ural *et al.*, 2003). Im Gegensatz hierzu berichten Aparicio *et al.*, dass ARH-77-Zellen gegenüber der zytotoxischen Wirkung von Pamidronat resistent sind (Aparicio *et al.* 1998). Obwohl sich Zoledronsäure stets als die potentere Substanz erweist, zeigte diese genauso keine Wirkung auf die ARH-77-Zellen. Tassone *et al.* gelang der Nachweis einer signifikanten Hemmung der Zellproliferation um 45% bei den Myelomzellen XG-1, XG-1a, U266 und IM-9 (Tassone *et al.*, 2000). Die Inkubationszeit betrug hierbei sechs Tage. Corso *et al.* zeigten, dass es bei den RPMI-8226-Zellen nach einer kalkulierten Zoledronsäure- LD_{50} von $62 \mu\text{mol/l}$ bei einer Inkubationsdauer von 72 Stunden zum Zelltod kommt (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltertrazolium bromide assay) (Corso *et al.*, 2005). Die Annexin V-Analyse der primären Myelomzellen von drei Patienten ergab nach Zoledronsäure-Behandlung mit $100 \mu\text{mol/l}$ nach 4 Tagen eine Apoptoserate von lediglich 8%. Zoledronsäure $100 \mu\text{mol/l}$ bewirkte nach 3 Tagen morphologische Veränderungen unter den RPMI-8226-Zellen in Form von Schrumpfung, Kernverdichtung und -fragmentation (Salomo *et al.*, 2003). Die adhärennten U266-Zellen erwiesen sich als resistent gegenüber der Bisphosphonat-induzierten Apoptose, deren verhältnismäßig fehlende Chemosensibilität mehrmals bestätigt wurde. Im Laufe langer Inkubationsperioden kam es zur Selektion von Subklonen, die gegenüber Bisphosphonaten resistent waren. Allerdings zeigten diese Subklone in Bezug auf Hemmung der Zellproliferation und Induktion von Apoptose keine vergleichbare Resistenz gegen die kon-

ventionellen Zytostatika und insbesondere nicht gegen den HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Mevastatin. Derenne *et al.*, unterstrichen in ihrer Arbeit den antiproliferativen Effekt von Bisphosphonaten nach einer Erhöhung der Konzentration auf 500 $\mu\text{mol/l}$, der bei den LP-1, JJN-3 und OPM-2-Zellen auftrat (Derenne *et al.*, 1999). Hierbei wurden Zoledronsäure und Pamidronat eingesetzt, wobei lediglich Zoledronsäure gegenüber den menschlichen Myelomzellen proapoptotisch wirkte. Erst eine Dosiserhöhung von Zoledronsäure auf 500 $\mu\text{mol/l}$ induzierte bei den OPM-2 und LP-1 Zellen Apoptose, während bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{mol/l}$ keine zytotoxische Wirkung beobachtet wurde. Vergleichsweise hohe Konzentrationen von Pamidronat und Incadronat hemmten die Zellproliferation von U266-, RPMI-8226 und KPMM2-Zellen (Takahashi *et al.*, 2001). Unter den U266-Zellen konnte bei Konzentrationen von 100 $\mu\text{mol/l}$ keine Abnahme der Proliferationsrate beobachtet werden, erst bei 500 und 1000 $\mu\text{mol/l}$ war diese jedoch signifikant erniedrigt. Ähnliche Ergebnisse zeigte Pamidronat nach einer Inkubation mit RPMI-8226 und KPMM2-Zellen. Die durchflusszytometrische Auswertung gemäß dem Annexin V/PI-Protokoll ergab bei einer Inkubation von 500 $\mu\text{mol/l}$ Pamidronat nach 48 und 72 Stunden nur eine Annexin V-Positivität, die Zellen wurden hingegen nicht PI positiv. Pamidronat rief bei einer Dosis von 100 $\mu\text{mol/l}$ über 72 Stunden eine leichte Abnahme der Zellzahl (JJN-3, HS-Sultan, U266-B1) hervor, wobei Clodronat keine *in vitro* Antimyelomaktivität zeigte (Shipman *et al.*, 1997). Pamidronat (500 $\mu\text{mol/l}$) führte zu einer Minderung der HS-Sultan-Zellzahl auf 70% des Zellanteils in der Kontrolle. Etwa 80% der JJN-3- und U266-B1-Zellen blieben dagegen vital. Obwohl YM529 (Minodronat) zu einer starken Hemmung der Zellproliferation führte und darüber hinaus bei den Myelomzellen U266, HS-Sultan und RPMI-8226 Apoptose induzierte, reduzierte Incadronat nur leicht die Zellteilung und führte erst bei einer Konzentration von 500 $\mu\text{mol/l}$ zum Zelltod (Iguchi *et al.* 2003).

Man erkennt, dass es ausgesprochen widersprüchliche Angaben über den *in vitro* Antimyelomeffekt von Bisphosphonaten vorherrschen. Darüber hinaus gibt es auch keine klare Aussage über die entsprechenden *in vivo* Konzentrationen. *In vivo* Experimente mit Mäusen zeigten für Ibadronat eine fehlende Zytotoxizität in Myelomzellen (Lévy *et al.*, 2005). Auf der anderen Seite führte Pamidronat-Infusion in den *in vivo* Versuchen zu einer leichten Erhöhung der Apoptoserate der Myelomzellen im Knochenmark (Koreth *et al.*, 2007). Pamidronat und in ausgeprägtem Maße auch Zoledronsäure induzierten unter *in vitro* Verhältnissen (100 $\mu\text{mol/l}$ 24h) Apoptose bei

den primären Myelomzellen. Ob klinisch relevante Antimyelomeffekte durch Bisphosphonate erreicht werden können, bleibt zu beantworten. Lediglich randomisierte Phase III-Studien sind zur Beantwortung dieser Frage in der Lage (Sezer *et al.*, 2003).

4.4 Synergistische Wirkung von Simvastatin und Zoledronsäure

Bisphosphonate sind ein wesentlicher Bestandteil der Myelomtherapie. Ebenso finden Statine im klinischen Alltag hauptsächlich zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen eine breite Anwendung. Die *in vitro* bewiesenen Antimyelomeffekte sowohl von Bisphosphonaten als auch von Statinen, wie sie in der vorliegenden Arbeit für Statine gezeigt und in anderen Laboratorien auch für Bisphosphonate beschrieben werden, treten erst bei sehr hohen Konzentrationen auf. Diese Substanzen können in der Myelomtherapie als Einzelsubstanz nicht in solch hohen Dosen verabreicht werden. Unter der Annahme einer eventuell vorhandenen synergistischen Wirkung könnten gängige Dosierungen aus der klinischen Praxis zum Einsatz kommen. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass Simvastatin und Zoledronsäure, zwei unterschiedliche Inhibitoren des Mevalonat-Signalweges, bei Myelomzellen synergistisch Apoptose induzieren. Bemerkenswert ist hierbei allerdings eine fehlende Beeinträchtigung der toxischen Wirkung dieser unterschiedlichen Substanzklassen in Gegenwart von Knochenmarkstromazellen im Sinne von zelladhäsionsvermittelten Chemoresistenz. In der MM-Therapie sind nur ganz wenige Chemotherapeutika verfügbar, für die CAM-DR keine Hemmung ihrer Wirkung darstellt. Die Kombination beider Substanzen überwindet vollständig die zelladhäsionsvermittelte Chemoresistenz unter Bortezomib-Einfluss. Hieraus kann gefolgert werden, dass durch Einbeziehung beider Präparate in relativ niedrigen Dosen, das Problem der zu geringen Serum- oder Gewebe-Konzentration von Statinen und Bisphosphonaten als Einzelsubstanzen umgangen werden kann. Außerdem verspricht eine Kombinationstherapie eine effizientere Therapieoption bezüglich Induktion von Apoptose und Minimierung von Resistenzbildung.

5. Zusammenfassung

Trotz der Fortschritte in der Myelomtherapie ist das Multiple Myelom eine unheilbare Erkrankung. Die Myelomzellen sind bis auf Ausnahmen hauptsächlich im Knochenmark lokalisiert, wo sie akkumulieren und durch ihr verdrängendes Wachstum zur Knochendestruktion und Beeinträchtigung der Hämatopoese führen. Die Wechselwirkung zwischen Myelomzellen und Knochenmarkmicroenvironment ist für die Pathogenese und Pathophysiologie des Multiplen Myeloms von entscheidender Bedeutung. In den letzten Jahren haben sich Hinweise gehäuft, dass durch direkten Zell-Zell-Kontakt zwischen Myelomzellen und Knochenmarkstromazellen die Empfindlichkeit der Myelomzellen gegenüber Zytostatika reduziert wird. Die zelladhäsionsvermittelte Chemoresistenz stellt in der Therapie des Multiplen Myeloms eine große Herausforderung dar. Unter der Hochdosis-Chemotherapie und der Einführung neuer Medikamente hat sich die Prognose des MM verbessert. Dennoch spricht lediglich ein Drittel der Patienten auf eine Monotherapie der neuen Substanzen an. Bei fast allen Patienten kommt es nach einer Hochdosis-Chemotherapie zu einem Krankheitsrückfall. Eine Kombinationstherapie mit den gängigen Substanzen in niedrigen Konzentrationen bietet in der Myelomtherapie eine gute Möglichkeit, die Nebenwirkungen bei einer Monotherapie zu minimieren.

Die Fähigkeit der Bisphosphonate, die osteoklastäre Aktivität zu hemmen, hat sie zu einem festen Bestandteil der Myelomtherapie gemacht. Bisphosphonate und Statine greifen in den Mevalonatsignalweg ein und hemmen diesen an unterschiedlichen Stellen. In der Literatur wird beschrieben, dass in adherenten, de novo resistenten Zellen die HMG-CoA-Reduktase hoch reguliert wird. Basierend auf diesem Phänomen wurde Simvastatin bezüglich einer potentiellen Antimyelomwirkung getestet. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Statine antiproliferativ wirken und in Myelomzellen Apoptose induzieren. Darüber hinaus überwinden sie im Kokulturmodell die zelladhäsionsvermittelte Chemoresistenz. Dabei wirken Statine in der Kokultur über eine Hemmung des HMG-CoA-Reduktase/GG-PP/Rho/Rho-Kinase-Signalweges. Obwohl bekannt ist, dass Bisphosphonate mit dem Mevalonatsignalweg interferieren, zeigten sie weder in der Monokultur noch in der Kokultur einen Antimyelomeffekt.

Antimyelomwirkung der Bisphosphonate wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Um biologisch wirksame Konzentrationen zu erreichen, wurde die Dosis der Bisphosphonate erhöht. Da Dosiserhöhungen im Menschen aufgrund der damit ein-

hergehender Nebenwirkungen nicht möglich sind, wurde in der vorliegenden Arbeit Zoledronsäure in Kombination mit Simvastatin in niedrigen, klinisch einsetzbaren Dosen verabreicht. In dieser Zusammensetzung zeigten sie einen synergistischen proapoptischen Effekt sowohl in der Monokultur als auch in der Kokultur.

Die erhobenen Daten können in der Therapie des Multiplen Myeloms als Grundlage für eine Kombinationschemotherapie aus Bisphosphonaten und Statinen dienen. Die Blockade von CAM-DR durch eine kombinierte Verabreichung von Bisphosphonaten und Statinen könnte auch bei anderen Tumorentitäten zu besseren Therapieergebnissen führen.

6. Literaturverzeichnis

Agarwal B, Bhendwal S, Holmes B, Moss SF, Ramey WG, Holt PR. Lovastatin augments apoptosis induced by chemotherapeutic agents in colon cancer cells. *Clin Cancer Res.* 1999; 5: 2223-2229

Agarwal B, Halmos B, Feoktistov AS, Protiva P, Ramey WG, Chen M, Pothoulakis C, Lamont JT, Holt PR. Mechanism of lovastatin-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *Carcinogenesis.* 2002; 23: 521-528.

Alexanian R, Bonnet J, Gehan E, Haut A, Hewlet J, Lane M, Monto R, Wilson H. Combination chemotherapy for multiple myeloma. *Cancer.* 1972; 30: 382-389

Aparicio A, Gardner A, Tu Y, Savage A, Berenson J, Lichtenstein A. In vitro cytoreductive effects on multiple myeloma cells induced by bisphosphonates. *Leukemia.* 1998; 12: 220-229

Attal M, Harousseau JL, Stoppa AM, Sotto JJ, Fuzibet JG, Rossi JF, Casassus P, Maisonneuve H, Facon T, Ifrah N, Payen C, Bataille R. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med.* 1996; 335: 91-97

Avet-Loiseau H. Role of genetics in prognostication in myeloma. *Best Practice & Research Clinical Haematology.* 2007; 20: 625-635

Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, Charbonnel C, Garban F, Hulin C, Leyvraz S, Michallet M, Yakoub-Agha I, Garderet L, Marit G, Michaux L, Voillat L, Renaud M, Grosbois B, Guillemin G, Benboubker L, Monconduit M, Thieblemont C, Casassus P, Caillot D, Stoppa AM, Sotto JJ, Wetterwald M, Dumontet C, Fuzibet JG, Azais I, Dorvaux V, Zandecki M, Bataille R, Minvielle S, Harousseau JL, Facon T, Mathiot C. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Blood.* 2007; 109: 3489-95.

Barlogie B, Kyle RA, Anderson KC, Greipp PR, Lazarus HM, Hurd DD, McCoy J, Moore DF Jr, Dakhil SR, Lanier KS, Chapman RA, Cromer JN, Salmon SE, Durie B, Crowley JC. Standard chemotherapy compared with high-dose chemoradiotherapy for multiple myeloma: final results of phase III US Intergroup Trial S9321. *J Clin Oncol.* 2006; 24: 929-936

Baumann P. Modulation des HMG-CoA-Reduktase/GGPP/ Rho-Signalwegs zur Apoptoseinduktion in adhärennten Myelomzellen. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München 2006

Berenson JR, Lichtenstein A, Porter L, Dimopoulos MA, Bordoni R, George S, Lipton A, Keller A, Ballester O, Kovacs M, Blacklock H, Bell R, Simeone JF, Reitsma DJ, Heffernan M, Seaman J, Knight RD. Long-term pamidronate treatment of advanced multiple myeloma patients reduces skeletal events. Myeloma Aredia Study Group. *J Clin Oncol.* 1998; 16: 2572-2573

Berenson JR. Myeloma bone disease. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2005; 18: 653-672

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

Cafforio P, Damacco F, Gernone A, Silvestris F. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis.* 2005; 26: 883-91

Chen T, Berenson J, Vescio R, Swift R, Gilchick A, Goodin S, LoRusso P, Ma P, Ravera C, Deckert F, Schran H, Seaman J, Skerjanec A. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with bone metastases. *J Clin Pharmacol.* 2002; 42: 1228-1236

Child JA, Morgan GJ, Davies FE, Owen RG, Bell SE, Hawkins K, Brown J, Drayson MT, Selby PJ; Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2003; 348: 1875-1883

Corsini A, Bellosta S, Beatta R, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F. New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol Ther.* 1999; 84: 413-428

Corso A, Ferretti E, Lunghi M, Zappasodi P, Mangiacavalli S, De Amici M, Rusconi C, Varettoni M, Lazzarino M. Zoledronic acid down-regulates adhesion molecules of bone marrow stromal cells in multiple myeloma: a possible mechanism for its antitumor effect. *Cancer.* 2005; 104: 118-125

Corso A, Varettoni M. The impact of new emerging drugs in the treatment of multiple myeloma: is there still a role for PBSC transplantation? *Curr Stem Cell Res Ther.* 2007; 2: 1-11

Dalton WS. The tumor microenvironment: focus on myeloma. *Cancer Treat Rev.* 2003; 29: 11-19

Damiano JS, 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: 1658-1667

Derenne S, Amiot M, Barillé S, Collette M, Robillard N, Berthaud P, Harousseau JL, Bataille R. Zoledronate is a potent inhibitor of myeloma cell growth and secretion of IL-6 and MMP-1 by the tumoral environment. *J Bone Miner Res.* 1999; 14: 2048-2056

Dhodapkar MV, Singh J, Mehta J, Fassas A, Desikan KR, Perlman M, Munshi NC, Barlogie B. Anti-myeloma activity of pamidronate in vivo. *Br J Haematol.* 1998; 103: 530-532

Dimitroulakos J, Marhin WH, Tokunaga J, Irish J, Gullane P, Penn LZ, Kamel-Reid S. Microarray and biochemical analysis of lovastatin-induced apoptosis of squamous cell carcinomas. *Neoplasia.* 2002; 4: 337-346

Dmoszynska A, Podhorecka M, Rolinski J, Soroka- Woytaszko M. Influence of Lovastatin on BCL-2 and BAX expression by plasma cells and T-Lymphocytes in short-term cultures of multiple myeloma bone marrow mononuclear cells. *Polish Journal of Pharmacology.* 2004; 56: 485-489

Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment and survival. *Cancer.* 1975; 36: 842-854

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

Feleszko W, Młynarczuk I, Olszewska D, Jalili A, Grzela T, Lasek W, Hoser G, Korczak-Kowalska G, Jakóbisiak M. Lovastatin potentiates antitumor activity of doxorubicin in murine melanoma via an apoptosis-dependent mechanism. *Int J Cancer.* 2002; 100: 111-118.

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

Frenette PS. Locking a leukocyte integrin with statins. *N Engl J Med.* 2001; 345: 1419-1421

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976; 4: 267-274

Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 1966; 16: 381-390

Gajewski TF, Thompson CB. Apoptosis meets signal transduction: elimination of a BAD influence. *Cell.* 1996; 87: 589

Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990; 343: 425-430

Gordon S, Helfrich MH, Sati HI, Greaves M, Ralston SH, Culligan DJ, Soutar RL, Rogers MJ. Pamidronate causes apoptosis of plasma cells in vivo in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2002; 119: 475-483

Gotoh A, Ohyashiki K. The role of bortezomib in the treatment of multiple myeloma *Nippon Rinsho*. 2007; 65: 2309-14

Gray-Bablin J, Rao S, Keyomarsi K. Lovastatin induction of cyclin-dependent kinase inhibitors in human breast cells occurs in cell cycle independent fashion. *Cancer Res*. 1997; 57: 604-609

Gregory WM, Richards MA, Malpas JS. Combination chemotherapy versus melphalan and prednisone in the treatment of multiple myeloma: an overview of published trials. *J Clin Oncol*. 1992; 10: 334-342

Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, Crowley JJ, Barlogie B, Blade J, Boccadoro M, Child JA, Avet-Loiseau H, Kyle RA, Lahuerta JJ, Ludwig H, Morgan G, Powles R, Shimizu K, Shustik C, Sonneveld P, Tosi P, Turesson I, Westin J. International staging system for multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*. 2005; 23: 3412-3420

Gronich N, Drucker L, Shapiro H, Radnay J, Yarkoni S, Lishner M. Simvastatin induces death of multiple myeloma cell lines. *J Investig Med*. 2004; 52: 335-344

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

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; 22: 7396-7402

Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood*. 2004; 104: 607-618

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

Holmberg M, Sandberg C, Nygren P, Larsson R. Effects of lovastatin on a human myeloma cell line: increased sensitivity of a multidrug-resistant subline that expresses the 170 kDa P-glycoprotein. *Anticancer Drugs*. 1994; 5: 598-600

Hulin C. New treatment of multiple myeloma. *Rev Med Interne*. 2007; 28: 682-688

Iguchi T, Miyakawa Y, Yamamoto K, Kizaki M, Ikeda Y. Nitrogen-containing bisphosphonates induce S-phase cell cycle arrest and apoptosis of myeloma cells

by activating MAPK pathway and inhibiting mevalonate pathway. *Cell Signal*. 2003; 15: 719-727

International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *British Journal of Haematology*. 2003; 121: 749-757

Jánosi J, Sebestyén A, Bocsi J, Barna G, Nagy K, Vályi-Nagy I, Kopper L. Mevastatin induced apoptosis in U266 human myeloma cell line. *Magy Oncol*. 2004; 48: 333-337

Kallen J, Welzenbach K, Ramage P, Geyl D, Kriwacki R, Legge G, Cottens S, Weitz-Schmidt G, Hommel U. Structural basis for LFA-1 inhibition upon lovastatin binding to the CD11a I-domain. *J Mol Biol*. 1999; 292: 1-9

Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL. Herausgegeben von Dietel M, Suttrop N, Zeitz M. *Harrisons-Innere Medizin*. Deutsche Ausgabe in Zusammenarbeit mit der Charité. 16. Auflage. 2005

Koreth J, Cutler CS, Djulbegovic B, Behl R, Schlossman RL, Munshi NC, Richardson PG, Anderson KC, Soiffer RJ, Alyea EP 3rd. High-dose therapy with single autologous transplantation versus chemotherapy for newly diagnosed multiple myeloma: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007; 13: 183-196

Korsmeyer SJ. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. *Blood*. 1992; 80: 879

Lévy V, Katsahian S, Femand JP, Mary JY, Chevret S. A meta-analysis on data from 575 patients with multiple myeloma randomly assigned to either high-dose therapy or conventional therapy. *Medicine (Baltimore)*. 2005; 84: 250-260

Li X, Klintman D, Weitz-Schmidt G, Schramm R, Thorlacius H. Lymphocyte function antigen-1 mediates leukocyte adhesion and subsequent liver damage in endotoxemic mice. *Br J Pharmacol*. 2004; 141: 709-716

Li X, Liu L, Tupper JC, Bannerman DD, Winn RK, Sebti SM, Hamilton AD, Harlan JM. Inhibition of protein geranylgeranylation and RhoA/RhoA kinase pathway induces apoptosis in human endothelial cells. *J Biol Chem*. 2002; 277: 15309-15316.

Lokhorst HM, Lamme T, de Smet M, Klein S, de Weger RA, van Oers R, Bloem AC. Primary tumor cells of myeloma patients induce interleukin-6 secretion in long-term bone marrow cultures. *Blood*. 1994 84: 2269-2277

Marshall C. Protein prenylation: a mediator of protein-protein interactions. *Science*. 1998; 259: 1865-1866

Mateos MV, Hernández JM, Hernández MT, Gutiérrez NC, Palomera L, Fuertes M, Díaz-Mediavilla J, Lahuerta JJ, de la Rubia J, Terol MJ, Sureda A, Bargay J, Ribas P, de Arriba F, Alegre A, Oriol A, Carrera D, García-Laraña J, García-Sanz R,

Bladé J, Prósper F, Mateo G, Esseltine DL, van de Velde H, San Miguel JF. Bortezomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: results of a multicenter phase 1/2 study. *Blood*. 2006; 108: 2165-2172

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: 892-899

Merchionne F, Perosa F, Dammacco F. New therapies in multiple myeloma. *Clin Exp Med*. 2007; 7: 83-97

Mitsiades CS, Mitsiades N, Poulaki V, Schlossman R, Akiyama M, Chauhan D, Hideshima T, Treon SP, Munshi NC, Richardson PG, Anderson KC. Activation of NF-kappaB and upregulation of intracellular anti-apoptotic proteins via the IGF-1/Akt signaling in human multiple myeloma cells: therapeutic implications. *Oncogene*. 2002; 21: 5673-5683

Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R, Akiyama M, Hideshima T, Chauhan D, Joseph M, Libermann TA, García-Echeverría C, Pearson MA, Hofmann F, Anderson KC, Kung AL. Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies and solid tumors. *Cancer Cell*. 2004; 5: 221-230

Mitsiades N, Mitsiades CS, Poulaki V, Chauhan D, Fanourakis G, Gu X, Bailey C, Joseph M, Libermann TA, Treon SP, Munshi NC, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC. Molecular sequelae of proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99: 14374-14379

Multiple Myeloma Research Foundation MMRF

Myeloma Trialists' Collaborative Group. Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6,633 patients from 27 randomized trials. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 3832-3842

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; 17: 1175-1182

Osgood EE. The survival time of patients with plasmocytic myeloma. *Cancer Chemother Rep*. 1960; 9: 1-10

Palumbo A, Bringhen S, Caravita T, Merla E, Capparella V, Callea V, Cangialosi C, Grasso M, Rossini F, Galli M, Catalano L, Zamagni E, Petrucci MT, De Stefano V, Ceccarelli M, Ambrosini MT, Avonto I, Falco P, Ciccone G, Liberati AM, Musto P, Boccadoro M; Italian Multiple Myeloma Network, GIMEMA. Oral melphalan and prednisone chemotherapy plus thalidomide compared with melphalan and prednisone alone in elderly patients with multiple myeloma: randomised controlled trial. *Lancet*. 2006; 367: 825-831

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

Palumbo A, Falco P, Corradini P, Falcone A, Di Raimondo F, Giuliani N, Crippa C, Ciccone G, Omedè P, Ambrosini MT, Gay F, Bringhen S, Musto P, Foà R, Knight R, Zeldis JB, Boccadoro M, Petrucci MT; GIMEMA--Italian Multiple Myeloma Network. Melphalan, prednisone, and lenalidomide treatment for newly diagnosed myeloma: a report from the GIMEMA--Italian Multiple Myeloma Network. *J Clin Oncol*. 2007; 25: 4459-4465

Park WH, Lee YY, Kim ES, Seol JG, Jung CW, Lee CC, Kim BK. Lovastatin-induced inhibition of HL-60 cell proliferation via cell cycle arrest and apoptosis. *Anticancer Res*. 1999; 19: 3133-3140

Podar K, Tai YT, Davies FE, Lentzsch S, Sattler M, Hideshima T, Lin BK, Gupta D, Shima Y, Chauhan D, Mitsiades C, Raje N, Richardson P, Anderson KC. Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood*. 2001; 98: 428-435

Raab MS, Breitkreutz I, Anderson KC. Targeted treatments to improve stem cell outcome: old and new drugs. *Bone Marrow Transplant*. 2007; 40: 1129-1137

Read MA, Neish AS, Luscinskas FW, Palombella VJ, Maniatis T, Collins T. The proteasome pathway is required for cytokine-induced endothelial-leukocyte adhesion molecule expression. *Immunity*. 1995; 2: 493-506

Rezaie-Majd A, Prager GW, Bucek RA, Schernthaner GH, Maca T, Kress HG, Valent P, Binder BR, Minar Erich, Maghessian M. Simvastatin Reduces the Expression of Adhesion Molecules in Circulating Monocytes From Hypercholesterolemic Patients. *Vascular Biology*. 2003; 23: 397-403

Roecklein BA, Torok-Storb B. Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6E7 genes. *Blood*. 1995; 85: 997-1005

Russell NH, Mifflin G, Stainer C, McQuaker JG, Bienz N, Haynes AP, Bessell EM. Allogeneic bone marrow transplant for multiple myeloma. *Blood*. 1997; 89: 2610-2611

Salomo M, Jurlander J, Nielsen LB, Gimsing P. How myeloma cells escape bisphosphonate-mediated killing: development of specific resistance with preserved sensitivity to conventional chemotherapeutics. *Br J Haematol*. 2003; 122: 202-210

Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, Golub E, Rodan GA. Bisphosphonate action. Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest*. 1991; 88: 2095-2105

Sezer O, Jakob C, Zavrski I, Heider U, Fleissner C, Freund M. Bisphosphonates in early multiple myeloma. *Eur J Haematol.* 2003; 71: 231-232

Shipman CM, Rogers MJ, Apperley JF, Russell RG, Croucher PI. Bisphosphonates induce apoptosis in human myeloma cell lines: a novel anti-tumour activity. *Br J Haematol.* 1997; 98: 665-672

Sonneveld P, Suci S, Weijermans P, Beksac M, Neuwirtova R, Solbu G, Lokhorst H, van der Lelie J, Dohner H, Gerhartz H, Segeren CM, Willemze R, Lowenberg B. Cyclosporin A combined with vincristine, doxorubicin and dexamethasone (VAD) compared with VAD alone in patients with advanced refractory multiple myeloma: An EORTC-HOVON randomized phase III study (06914) *British Journal of Haematology.* 2001; 115: 895-902

Stewart AK, Bergsagel PL, Greipp PR, Dispenzieri A, Gertz MA, Hayman SR, Kumar S, Lacy MQ, Lust JA, Russell SJ, Witzig TE, Zeldenrust SR, Dingli D, Reeder CB, Roy V, Kyle RA, Rajkumar SV, Fonseca R. A practical guide to defining high-risk myeloma for clinical trials, patient counseling and choice of therapy. *Leukemia.* 2007; 21: 529-534

Swamy MV, Cooma I, Reddy BS, Rao CV. Lamin B, caspase 3 activity, and apoptosis induction by a combination of HMG-CoA reductase inhibitor and COX-2 inhibitors: a novel approach in developing effective chemopreventive regimens. *Int J Oncol.* 2002; 20: 753-759

Takahashi R, Shimazaki C, Inaba T, Okano A, Hatsuse M, Okamoto A, Hirai H, Ashihara E, Nakagawa M. A newly developed bisphosphonate, YM529, is a potent apoptosis inducer of human myeloma cells. *Leuk Res.* 2001; 25: 77-83

Tanaka T, Tatsuno I, Uchida D, Moroo I, Morio H, Nakamura S, Noguchi Y, Yasuda T, Kitagawa M, Saito Y, Hirai A. Geranylgeranyl-pyrophosphate, an isoprenoid of mevalonate cascade, is a critical compound for rat primary cultured cortical neurons to protect the cell death induced by 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibition. *J. Neurosci.* 2000; 20: 2852-2859

Tassone P, Forciniti S, Galea E, Morrone G, Turco MC, Martinelli V, Tagliaferri P, Venuta S. Growth inhibition and synergistic induction of apoptosis by zoledronate and dexamethasone in human myeloma cell lines. *Leukemia.* 2000; 14: 841-844

Ural AU, Yilmaz MI, Avcu F, Pekel A, Zerman M, Nevruz O, Sengul A, Yalcin A. The Bisphosphonate Zoledronic Acid Induces Cytotoxicity in Human Myeloma Cell Lines with Enhancing Effects of Dexamethasone and Thalidomide. *Hematology.* 2003; 78: 443-449

van de Donk NW, MMJ Kamphuis, HM Lokhorst and ACBloem. The cholesterol lowering drug lovastatin induces cell death in myeloma plasma cells. *Leukemia.* 2002; 16: 1362-1371

van de Donk NW, Schotte D, Kamphuis MM, van Marion AM, van Kessel B, Bloem AC, Lokhorst HM. Protein geranylgeranylation is critical for the regulation of sur-

vival and proliferation of lymphoma tumor cells. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 5735-5748.

van de Donk NWCJ, Kamphuis MMJ, van Kessel B, Lokhorst HM, Bloem AC. Inhibition of protein geranylgeranylation induces apoptosis in myeloma plasma cells by reducing Mcl-1 protein levels. *Blood.* 2003; 102: 3354-3362

Wan MX, Schramm R, Klintman D, Welzenbach K, Weitz-Schmidt G, Thorlacius H. A statin-based inhibitor of lymphocyte function antigen-1 protects against ischemia/reperfusion-induced leukocyte adhesion in the colon. *Br J Pharmacol.* 2003; 140: 395-401

Wang C, Zhong W, Chang T, Lai S, Tsai Y. Lovastatin, a 3-hydroxy-3 methylglutaryl coenzyme. A reductase inhibitor, induces apoptosis and differentiation in human anaplastic thyroid carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003; 88: 3021-3026

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. *Nat Med.* 200; 7: 687-692

Yang E, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: A discourse on the bcl-2 family and cell death. *Blood.* 1996; 88: 386-401

7. Anhang

7.1 Verwendete Materialien und Methoden

7.1.1 Zellkultur

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

7.1.2 Zytostatika

NAME	HANDELSNAME	FIRMA
Bortezomib	Velcade [®]	<i>Millenium, Cambridge, MA</i>
Dexamethason	Fortecortin [®] (E1-126)	<i>Biomol, Hamburg, D</i>
Melphalan	Alkeran [®] (M2011)	<i>Sigma, Taufkirchen, D</i>
Treosulfan	Ovostat [®]	<i>Medac, Hamburg, D</i>

7.1.3 Inhibitoren und Aktivatoren

NAME	BESTELLNUMMER	FIRMA
Simvastatin	567021	<i>Calbiochem, Schwalbach, D</i>
Lovastatin	438186	Dto.
Zoledronsäure	405780	<i>Novartis Pharma, Nürnberg, D</i>
Pamidronat	04915A-DE	<i>Mayne Pharma, München, D</i>
Clodronat	4299668	<i>Schering, Berlin, D, Vertrieb: Medac, Hamburg, D</i>

7.1.4 Antikörper für Oberflächenmessungen

ANTIKÖRPER	KLON	BESTELLNUM- MER	FIRMA
CD38-FITC	T16	IM0775	<i>Beckman Coulter, Krefeld, D</i>
CD138-FITC	MI15	347214	<i>Pharmingen, Heidelberg, D</i>

7.1.5 Antikörper für die Western Blot Analyse

7.1.5.1 Primärantikörper

ANTIKÖRPER	KLON	BESTELLNUM- MER	FIRMA
Bcl-2	4C11	Sc-578	<i>SantaCruz Biotechnology, California, USA</i>
Bcl-XL	A20	Sc-7122	Dto.
Bax	N20	Sc-493	Dto.
Mcl-1	S19	Sc-819	Dto.
Aktin	I19	Sc-1616	Dto.
Bad	C20	Sc-943	Dto.
IAP-1	H83	sc-7943	Dto.
IAP-2	F20	sc-1957	Dto.

7.1.5.2 Sekundärantikörper

ANTIKÖRPER	BESTELLNUMMER	FIRMA
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

ENZYM	BESTELLNUMMER	FIRMA
Trypsin-EDTA	T3924	<i>Sigma, Taufkirchen, D</i>

7.1.7 Kits

KIT	BESTELLNUM- MER	FIRMA
ECL	RPN2106	<i>Amersham, Little Chalfont, UK</i>
Annexin-FITC Apoptosekit	65874X	<i>BD Pharmingen, Heidelberg, D</i>
WST-1 Proliferationskit	1644807	<i>Roche Diagnostics, Penzberg, D</i>
Bio-Rad, Marker	161-0373	<i>Bio-Rad Labs, München, D</i>
Bio-RAD Proteinfär- beagens	500-0006	<i>Bio-RAD, München, D</i>

7.1.8 Chemikalien

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

7.1.9 Sonstige Artikel für den Western Blot

ARTIKEL	BESTELLNUM- MER	FIRMA
Kamm, 10 wells,	165-3359	<i>Biorad, München, D</i>

1mm		
Spacer Plates	165-3311	Dto.
Schwämme, 8 x 11cm	170-3933	Dto.
SDS-PAGE Stan- dards, broad range	161-0318	Dto.
Immobilon-P PVDF Membran	IPVH00010	Millipore, Schwalbach, D
Hyperfilm ECL	RPN2103	Amersham Biosciences, Uppsala, S
NaCl	S7581	Mallinckrodt, Hazelwood, USA
NaF	S1504	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Na ₃ VO ₄	S6508	Dto.
Na ₄ P ₂ O ₇	S6422	Dto.
Tris, pH 7,5 1M	351-006-100	Quality Biological, Inc. Gaithersburg, USA

7.1.10 Geräte

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

7.2 Erklärung

Hiermit bestätige ich, Meral Simsek, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst erstellt wurde und dass ich bei der Anfertigung keine anderen Quellen als die angegeben verwendet habe.

München, den 06.06.2008

(Meral Simsek)

7.3 Danksagungen

Danken möchte ich

- Prof. Dr. med. Bertold Emmerich, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, die vorliegenden Arbeit im Forschungslabor durchzuführen.
- PD Dr. Gerold Meinhardt für die Übernahme der Doktorvaterschaft, die hervorragende Betreuung und die Ermöglichung dieser Arbeit.
- PD Dr. Ralf Schmidmaier ebenfalls für die hervorragende Betreuung während dieser Arbeit.
- Ismail Delipoyraz für die hervorragende technische Unterstützung im Umgang mit Word und das geduldige Zuhören und die Aufmunterung.

7.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Meral Simsek
 Geburtsdatum/-ort 09.07.1977 in München
 E-Mail meral.simsek@gmx.de

Berufliche Tätigkeit

seit 07/2007 Assistenzärztin im Universitätsklinikum Regensburg, Abteilung für Hämatologie/Onkologie unter Leitung von Prof. Dr. med. R. Andreesen

Studium

05/2000 Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
 04/2002 Ärztliche Vorprüfung
 04/2003 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
 09/2005 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
 11/2006 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

10-02/2005 Hämatologie/Onkologie, Medizinische Klinik Innenstadt München, unter Leitung von Prof. Dr. med. B. Emmerich
 02-05/2006 Gynäkologie und Geburtshilfe am Klinikum der LMU München, I Frauenklinik Innenstadt, unter Leitung von Prof. Dr. med. K. Friese
 05-08/2006 Memorial University of Newfoundland Faculty of Medicine, St. John`s, Newfoundland Canada

Wissenschaftliche Tätigkeit

Publikationen:

09/2004 Schmidmaier R, Baumann P, Simsek M, Dayyani F, Emmerich B, Meinhardt G. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin overcomes cell adhesion mediated drug resistance in multiple myeloma by geranylgeranylation of Rho protein and activation of Rho kinase. *Blood* 2004; 104: 1825-1832. Impact Factor: 10.370 (2006)

07/2006 Schmidmaier R, Simsek M, Baumann P, Emmerich B, Meinhardt G. Synergistic anti-myeloma effects of zoledronate and simvastatin. *Anti-Cancer Drugs* 2006; 17: 621-629. Impact Factor: 2.245 (2006).

Abstracts (DGHO 2004 und 2006):

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

Schmidmaier R, Simsek M, Emmerich B, Meinhardt G. Simvastatin induziert Apoptose ohne zell-adhäsionvermittelte Chemoresistenz bei Myelomzellen in Kokultur mit Knochenmarkstromazellen und wirkt diesbezüglich tendenziell synergistisch mit Bisphosphonaten.