

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik A
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. E. Berdel-

**Expression und Regulation von Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)
beim Multiplen Myelom.**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von George, Britta (geb. Dreyer)
aus Warendorf
2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. V. Arolt

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. J. Kienast

2. Berichterstatter: Frau Univ.-Prof. Dr. med. G. Köhler

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2008

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik A
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. W. E. Berdel-
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. J. Kienast
Koreferent: Frau Univ.-Prof. Dr. med. G. Köhler

Zusammenfassung

Expression und Regulation von Bone Morphogenetic Proteins (BMPs)
beim Multiplen Myelom.
Britta George

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), Mitglieder der TGF- β -Superfamilie, sind Zytokine, die Wachstum, Differenzierung, Adhäsion und Apoptose verschiedener Zelltypen regulieren. Die Wirkungen von exogenen BMPs auf Myelomzellen wurden bereits eingehend untersucht. BMP-2, -4, -5, -6 und -7 können bei bestimmten Myelomzelllinien und nativem Patientenmaterial Apoptose induzieren und das Zellwachstum hemmen. Eine endogene Expression von BMPs wurde bislang für das Multiple Myelom nicht untersucht.

In dieser Arbeit wurde erstmalig die endogene BMP-2- und -4-Transkription und Regulation sowie die intra- und extrazelluläre BMP-2-Protein Regulation bei Apoptoseinduktion durch Rezeptortyrosinkinaseinhibition (RTKI), Dexamethason oder all-trans-Retinolsäure bzw. bei Stimulation von Proliferation durch Interleukin-6 (IL-6) für verschiedene Myelomzelllinien und natives Patientenmaterial beschrieben und mittels Real-Time-PCR-Technik bzw. ELISA quantifiziert. Als Kontrolle fand eine Bestimmung von Bcl-x_L, einem anti-apoptotischen Protein, das die exogene BMP-Wirkung auf Myelomzellen vermitteln soll, statt.

Für zwei Myelomzelllinien, KMS-11 und KMS-18, bei denen sich durch RTK-Inhibition signifikant Apoptose induzieren ließ (KMS-11: P=0,011; KMS-18: P=0,008), konnte eine signifikante Steigerung der BMP-2-Transkription gezeigt werden, und zwar für KMS-11 nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit 1 μ M des RTKI auf das 3,2fache (P=0,028) und für KMS-18 nach 24 Stunden mit 0,5 μ M BIBF1000 auf mehr als das Doppelte (P=0,028). Auch die Induktion von Apoptose durch Dexamethason oder ATRA führte zu einer Heraufregulation der BMP-2 Transkription. Des Weiteren ließ sich für die Linie KMS-11 nach 120 Stunden Inkubation mit 0,5 μ M RTKI ein Anstieg der BMP-4-Transkription gegenüber nativen Bedingungen auf das 4,2fache nachweisen. Zudem konnte gezeigt werden, dass für die Bcl-x_L-Transkription eine der BMP-2- und -4-Expression inverse Regulation vorliegt. Die genannten Ergebnisse ließen sich bei Myelomzellen von an Multiplem Myelom erkrankten Patienten reproduzieren. Zusätzlich konnte bei KMS-11-Zellen ein intra- und extrazellulärer Anstieg von BMP-2-Protein bei Induktion von Apoptose durch den RTKI nachgewiesen werden.

Somit unterliegen sowohl das BMP-2- und -4-Transkript als auch das BMP-2-Protein von Myelomzellen bei Induktion von Apoptose durch die eingesetzten Substanzen einer Regulation in Form einer vermehrten Expression.

Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Multiples Myelom	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Pathogenese und Klassifikation	1
1.1.3	Therapie	3
1.1.4	Anti-apoptotische Zytokine	5
1.1.5	Pro-apoptotische Proteine	6
1.2	Fragestellungen	8
2	Material und Methoden.....	10
2.1	Zellkultur.....	10
2.1.1	Eigenschaften und Kulturbedingungen der verschiedenen Zelltypen.....	10
2.1.2	Subkultur von adhärenenten Zellen und Zellen in Suspension	11
2.1.3	Zellzählung mit der Neubauer-Kammer.....	12
2.1.4	Isolation von mononukleären Zellen aus Knochenmark.....	12
2.1.5	Magnetic Cell Sorting (MACS): Isolation von menschlichen CD138 ⁺ Plasmazellen.....	13
2.1.6	Stimulation von Zellkulturen	14
2.2	Zellpräparation und Apoptose-Assay mit Annexin-V-FITC und Propidiumiodid mittels Flow Cytometry	15
2.3	Proliferations-Assay	17
2.4	Gentechnik.....	17
2.4.1	Ernten von Zellen für die RNA-Isolation	17
2.4.2	RNA-Isolation	18
2.4.3	cDNA-Synthese	18
2.4.4	RT-PCR.....	19
2.4.5	Acrylamidgelelektrophorese	21
2.4.6	TaqMan TM PCR Assay.....	22
2.5	Immunchemie.....	27
2.5.1	Proteinextraktion.....	27
2.5.2	Bestimmung des Proteingehaltes der Extrakte mittels pH-modifiziertem Bradford Assay nach Stoschek.....	28
2.5.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Proteinauftrennung...29	

Inhaltsverzeichnis

2.5.4	Semitrockener Proteintransfer (Elektroblot-Verfahren)	31
2.5.5	Immunoblotanalyse.....	32
2.5.6	Sandwich-ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay).....	34
3	Ergebnisse.....	35
3.1	Inhibition der Proliferation verschiedener Myelomzelllinien durch den RTKI BIBF1000	36
3.2	Induktion von Apoptose durch den RTKI BIBF1000 bei verschiedenen Myelomzelllinien.....	37
3.3	RTKI-induzierte Inhibition der MAPK (p44/42)-Phosphorylierung bei t(4;14)-positiven Myelomzellen.....	38
3.4	Induktion von Apoptose durch Dexamethason und all-trans-Retinolsäure bei Myelomzellen	40
3.5	Qualitative Expressionsanalyse von BMP-2- und BMP-4-Transkript bei fünf Myelomzelllinien.....	41
3.6	Quantitative Expressionsanalyse von BMP-2-Transkript.....	42
3.6.1	Effekte des RTKI BIBF1000 auf die BMP-2-Transkription von t(4;14)-positiven Myelomzelllinien.....	42
3.6.2	Effekte des RTKI BIBF1000 auf die BMP-2-Transkription von t(4;14)-negativen Myelomzelllinien.....	44
3.6.3	Wirkungen von Dexamethason, ATRA und/oder RTKI auf die BMP-2-Transkription der t(4;14)-translozierten Myelomzelllinie KMS-11	45
3.7	Quantitative Expressionsanalyse von BMP-4-Transkript.....	47
3.8	Quantitative Expressionsanalyse von Bcl-x _L -Transkript.....	48
3.9	Quantitative Expressionsanalyse von BMP-2, BMP-4- und Bcl-x _L -Transkript bei Myelomzellen von an Multiplem Myelom erkrankten Patienten	49
3.10	RTKI-vermittelte Effekte auf die BMP-2-Produktion und -Sekretion von zwei Myelomzelllinien.....	52
4	Diskussion	54
5	Literatur.....	61

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	kDa	Kilodalton
ActR-IA(ALK-2)	Aktivin-Rezeptor, BMP-Rezeptor	KM	Knochenmark
ActR-II	Aktivin-Rezeptor, BMP-Rezeptor	K-RAS	Onkogen
ActR-IIB	Aktivin-Rezeptor, BMP-Rezeptor	l	Liter
A.d.	Aqua destillata	M	Molar
Akt	Activin-like-kinase	mA	Milliampere
al.	alumni	mafB	Transkriptionsfaktor
APS	Ammoniumpersulfat	MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
As ₂ O ₃	Arsentrioxid	2ME2	2-Methoxy-Estradiol-2
ATRA	all-trans-Retinolsäure	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Bcl-2	Apoptose inhibierendes Protein	MGUS	Monoklonale Gammopathie unbekannter Signifikanz
Bcl-x _L	anti-apoptotisches Protein	µCi	Mikrocurie
Bcr/Abl-Gen	Onkogen, Fusionsgen auf Chromosom 22	µg	Mikrogramm
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor	µl	Mikroliter
BIBF1000	Small Compound Tyrosinkinase Inhibitor	µM	Mikromolar
BMP-2-7	Bone Morphogenetic Protein 2-7	ml	Milliliter
BMPR-IA (ALK-3)	BMP-Rezeptor	min	Minute
BMPR-IB	BMP-Rezeptor	MNC	Mononukleäre Zelle
BMPR-II	BMP-Rezeptor	MMSET	potentielles Onkogen
bp	base pair	mRNA	messenger Ribonukleinsäure
°C	Grad Celsius	n	Anzahl
CCND1, CCND 3	Gen zu Cyclin D1 bzw. D3	NaCl	Natriumchlorid
CD	Cluster of Differentiation	NaF	Natriumfluorid
cDNA	complementary DNA	NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge
cm ²	Quadratzentimeter	Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat, Phosphotyrosin-Phosphatase-Inhibitor
c-maf	Transkriptionsfaktor	ng	Nanogramm
c-myc	Onkogen	nM	Nanomolar
CO ₂	Kohlendioxid	nm	Nanometer
C _T	Threshold Cycle	NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
ddH ₂ O	didestilliertes Wasser	Noggin	BMP-Antagonist
Dex	Dexamethason	N-RAS	Onkogen
DNS/A	Desoxyribonukleinsäure/-acid	n.s.	nicht signifikant
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	³² P	³² Phosphor
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor	P	Signifikanzniveau
6-FAM	6-Carboxy-Fluorescein	p18	Cyclin-abhängiger Kinaseinhibitor
FCS	Fetales Kälberserum	p53	Tumorsuppressorgen
FET	Fluoreszenzenergietransfer	PCR	Polymerasekettenreaktion
FGFR1-4	Fibroblast Growth Factor Receptor 1-4	PD173074	Tyrosinkinaserzeptorinhibitor
FITC	Fluoreszeinthiocyanat	PDGFRα	Platelet Derived Growth Factor Receptor α
g	Erdbeschleunigung 9,81 m/s ²	pg	Picogramm
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-dehydrogenase	pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Go/G1-Phase	Zellzyklusphase	PI	Propidiumiodid
Gp120	Glykoprotein 130	PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
GW654652	Tyrosinkinaserzeptorinhibitor	pMAPK	phosphorylierte MAPK
³ H	Wasserstoffisotop	PS-341	Proteasomeninhibitor
h	Stunde	PTK787/ZK222584	Rezeptortyrosinkinaseinhibitor
HCl	Salzsäure	PVDF	Polyvinylidendifluorid
H ₂ O	Wasser	raf	zentrales Signaltransduktionsprotein, ras-aktivierte Proteinkinase
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1	ras	Onkogen, GTP-bindendes Protein
IFN-γ	Interferon γ	R _n	normalisiertes Reportersignal
Ig	Immunglobulin	RNA	Ribonukleinsäure
IGF	Insulin-like-growth-factor	RTKI	Rezeptortyrosinkinaseinhibitor
IL-6	Interleukin-6	18S	housekeeping gene
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor	SDS	Dodecylsulfat-Natrium-Salz
IL-2	Interleukin-2	SEM	standard error of mean
IMiDs	Immunomodulatory Derivatives	siRNA	small interfering RNA
INBC20	Janus-Kinase-Inhibitor	Smad1, 5, 4	Transkriptionsfaktoren, die TGF-β-Signale übermitteln
JAK1, JAK2	Januskinase 1 bzw. 3, Proteintyrosinasen		

Abkürzungsverzeichnis

STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3	U	Unit
STi571	Imatinib	U	Umdrehungen
SU 5416	kleinmolekularer Rezeptortyrosinkinaseinhibitor	V	Volt
TAMRA	6-Carboxy-tetramethylrhodamin	VAD	Vincristin, Doxorubicin und hochdosiertes Dexamethason
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin	VCAM-1	Vaskuläres Adhäsionsmolekül 1
TNF- α	Tumornekrosefaktor α	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
TGF- β	Transforming Growth Factor β	VEGFR (flt-1)	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1
TKR	Tyrosinkinase-rezeptor	VEGFR2 (KDR/flk-1)	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	VIC	2,7-Dimethoxy-dichloro-6-carboxyfluorescein
TTBS	Tris buffered Saline + Tween	vs	versus
TYK2	Tyrosinkinase 2, Januskinase		

1 Einleitung

1.1 Multiples Myelom

1.1.1 Definition

Das Multiple Myelom gehört zu den B-Zell-Neoplasien und ist durch eine langsame Proliferation und Akkumulation von malignen, terminal differenzierten Plasmazellen im Knochenmark gekennzeichnet (20). Mit einem Anteil von 10 % ist es die häufigste B-Zell-Erkrankung innerhalb der malignen hämatopoetischen Neoplasien des fortgeschrittenen Lebensalters (61), der oftmals ein prämalignes Stadium, die Monoklonale Gammopathie unbekannter Signifikanz (MGUS), vorausgeht. Hierbei handelt es sich um eine Entität, die mit einer Prävalenz von 3,4 % in der Bevölkerung mit einem Alter von über 50 Jahren häufig zu finden ist. Monoklonale Gammopathien sind gewöhnlich asymptomatisch, gehen aber mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,6 % bis 3 % (Median 1 %) pro Jahr, abhängig vom monoklonalen Ig-Spiegel, in ein Multiples Myelom über. Fortgeschrittene Krankheitssymptome des Multiplen Myeloms bestehen aus Anämie, Osteolysen mit Hyperkalzämie, Niereninsuffizienz und rekurrierenden Infektionen aufgrund von schwerwiegender Immundysregulation (53).

1.1.2 Pathogenese und Klassifikation

Gruppe	Primäre Translokationen	Gen(e) am Bruchpunkt	D-Cyclin	Ploidiegrad	Häufigkeiten ¹ in %
TC1	11q13	CCND1	D1	n. h. ²	15
	6p21	CCND3	D3	n. h. ²	3
TC2	keine	keine	D2	h. ³	37
TC3	keine	keine	D2	h. ³ = n. h. ²	22
TC4	4p16	FGFR3/MMSET	D2	n. h. ² > h. ³	16
TC5	16q23	c-maf	D2	n. h. ²	5
	20q11	mafB	D2	n. h. ²	2

Tabelle 1. TC-Klassifikation des Multiplen Myeloms anhand Translokationen und Cyclin-D-Expression.

¹ Häufigkeit der jeweiligen TC-Gruppe bei Erstdiagnosen von Multiplen Myelom

² nicht hyperploid

³ hyperploid

(modifiziert nach Bergsagel und Kuehl, 2003)

Einleitung

Neue Erkenntnisse bezüglich der Pathogenese des Multiplen Myeloms haben zu der Annahme einer schrittweisen neoplastischen Transformation von der B-Zelle des Keimzentrums bis hin zur Myelomzelllinie geführt (52). Hierbei wurden zwei grundsätzlich unterschiedliche Gruppen primärer Ereignisse beschrieben: Einerseits die Translokationen im Bereich der Immunglobulin-Schwerketten-Region des Chromosoms 14 mit fünf gut definierten Partnern, 11q13 (Cyclin D1), 6p21 (Cyclin D3), 4p16 („fibroblast growth factor receptor 3“ (FGFR3) und MMSET), 16q23 (c-maf) und 20q11 (mafB) (95), und andererseits die Entstehung von hyperploiden Tumoren, die mit Trisomien der Chromosomen 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 und 21 assoziiert sind (25,88,89). Im Zuge der Tumorprogression kommt es nachfolgend zu sekundären Chromosomentranslokationen, die zu der steigenden Autonomie und Aggressivität des entsprechenden Plasmazellklons beitragen (Abb. 1). Hier sind Mutationen von N- und K-RAS zu nennen, die den Übergang eines MGUS in ein Multiples Myelom anzeigen, wenn nicht sogar verursachen können. Späte onkogene Veränderungen beinhalten Inaktivierungen von p18 und p53, sowie Translokationen, die c-myc dysregulieren können (52,87).

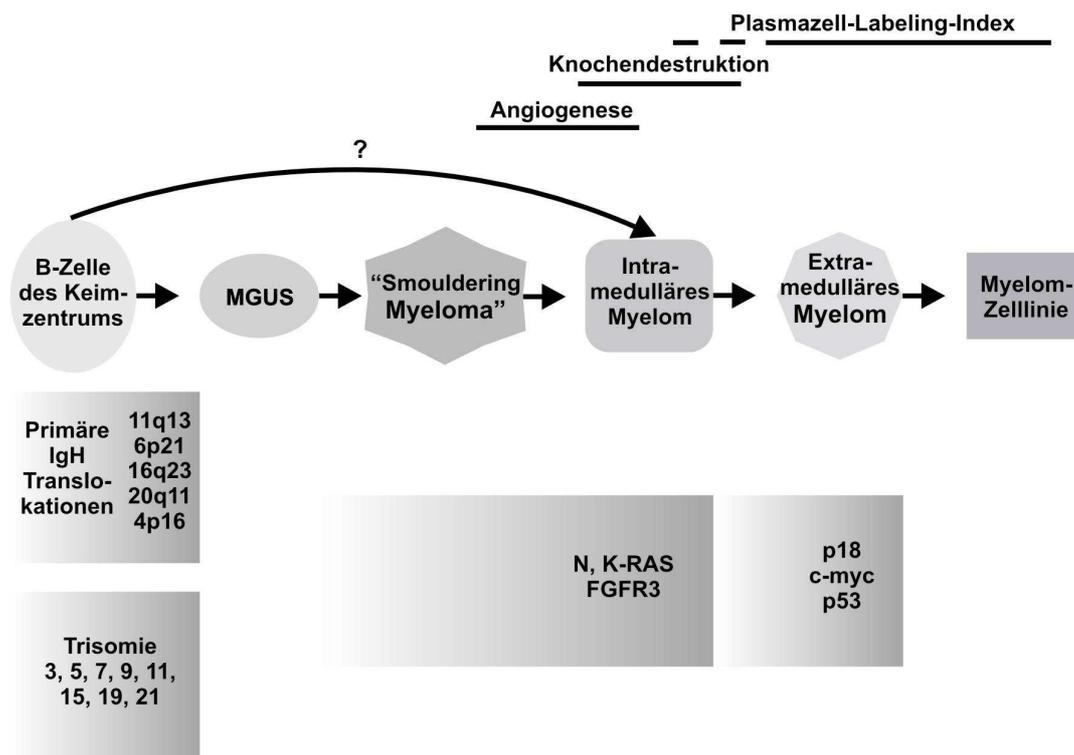


Abbildung 1. Modell der schrittweisen malignen Transformation (moduliert nach Bergsagel und Kuehl, 2003).

Einleitung

Vor diesem Hintergrund wurden fünf Myelom-Subtypen unter Berücksichtigung der primären Translokationen, der Cyclin-D-Expression und des Ploidiegrades neu klassifiziert (Tab. 1) (37).

Die Translokation (4;14)(p16.3;q32) scheint zwei potentielle Onkogene, MMSET und FGFR3, zu dysregulieren. Diese als TC4 klassifizierte Myelomzellsubpopulation kann bei 16 % aller neu diagnostizierten Fälle von Multiplem Myelom identifiziert werden und geht mit einer schlechten Prognose einher (24,48,63).

1.1.3 Therapie

Die Einführung von Melphalan und Prednisolon (MP) im Jahre 1969 durch Alexanian et al. war ein entscheidender Schritt in der konventionellen Chemotherapie des Multiplen Myeloms (3). Durch Modifikation dieses Schemas, z. B. im VAD-Protokoll (Vincristin, Doxorubicin und hochdosiertes Dexamethason), konnte die Überlebenszeit der Patienten aber nicht mehr signifikant verbessert werden (1). Hochdosistherapie gefolgt von der Transplantation autologer Blutstammzellen erhöhte die Rate kompletter Remissionen auf etwa 40 % im Vergleich zu 5 bis 10 % nach konventioneller Chemotherapie und die Überlebenszeit der Patienten von drei bis vier auf vier bis fünf Jahre (4,33,56). Da das mittlere Alter bei Erstdiagnose des Multiplen Myeloms mehr als 60 Jahre beträgt und viele Patienten zusätzlich an anderen gesundheitlichen Problemen leiden, ist die Hochdosistherapie häufig keine Option. So bleibt das Multiple Myelom mit der möglichen Ausnahme der allogenen Knochenmarktransplantation weiterhin unheilbar (29).

Durch ein besseres Verständnis der biologischen Prozesse im Mikromilieu des Knochenmarks konnten in der letzten Zeit einige neuartige, viel versprechende Wirkstoffe entwickelt werden, die speziell eine Beeinflussung der Myelomzellen und ihrer Umgebung im Knochenmark zum Ziel haben.

Hier sind unter anderen Thalidomid und seine Analoga IMiDs („immunomodulatory derivatives“), Proteasomeninhibitoren wie PS-341, Arsentrioxid (As_2O_3) und 2-Methoxyestradiol-2 (2ME2) zu nennen. Diese Substanzen wirken durch folgende Interaktionsmechanismen (Abb. 2):

- Thalidomid, PS-341 und As_2O_3 führen zu einer verminderten Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle durch Knochenmark-Stromazellen, wodurch die Adhäsion zwischen diesen und Myelomzellen und konsekutiv die Interleukin-6 (IL-6) Sekretion durch beide Zelltypen abnimmt (84).
- Des Weiteren hemmen diese drei Wirkstoffe auch direkt die Produktion von IL-6 und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) durch Knochenmark-Stromazellen (84).
- Zusätzlich wird sowohl durch Thalidomid, PS-341 und As_2O_3 als auch durch 2ME2 die Wirkung von IL-6 und TNF- α auf Myelomzellen abgeschwächt bzw. blockiert (84).

Einleitung

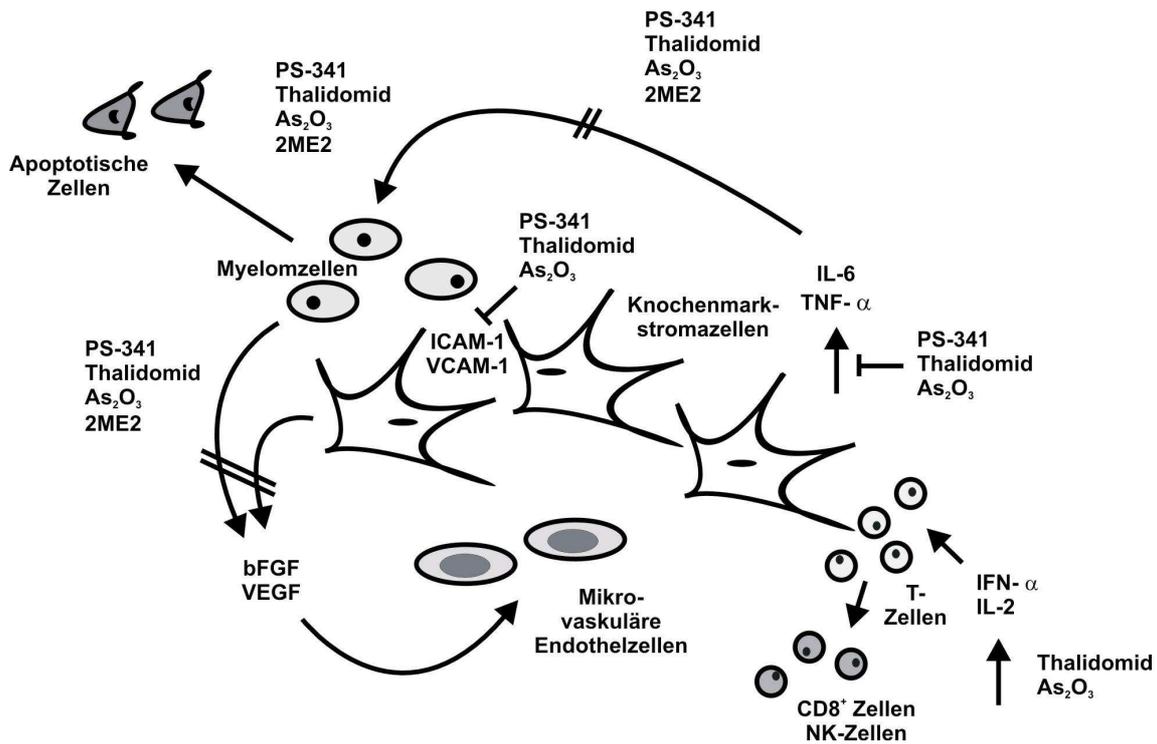


Abbildung 2. Neue Therapieansätze beim Multiplen Myelom (modifiziert nach Ryoo und Anderson, 2002).

- Thalidomid, PS-341, As₂O₃ und 2ME2 hemmen ebenfalls die Angiogenese im Knochenmark durch eine Herunterregulation der angiogenen Zytokine „basic fibroblast growth factor“ (bFGF) und „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) (84).
- Thalidomid und As₂O₃ besitzen außerdem immunmodulatorische Kapazitäten. Sie aktivieren vermittelt durch Interferon-γ (IFN-γ) und Interleukin-2 (IL-2) Myelomzell-spezifische CD8⁺ T-Lymphozyten und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) (84).
- Alle vier Wirkstoffe induzieren bei Myelomzellen nicht nur indirekt, sondern auch direkt Apoptose (84).

Eine weitere Substanzgruppe, zu der die Rezeptortyrosinkinase- und Farnesyltransferaseinhibitoren gehören, beeinflusst das Myelomzellwachstum und -überleben durch Rezeptor-Liganden-Interaktion (37).

Kleinmolekulare Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren (RTKI) sind zurzeit Gegenstand einer Reihe viel versprechender Forschungsprojekte, sowohl das Multiple Myelom als auch weitere hämatologische Neoplasien betreffend. Als bedeutendes Beispiel ihres therapeutischen Potentials ist Imatinib (früher STi571) zu nennen, das sich durch Inhibition und Dysregulation der Abl-Kinase durch Fusion des Bcr/Abl-Gens als bemerkenswert effektiv in der Behandlung

von Chronischer Myeloischer Leukämie erwiesen hat (22). Ein weiterer kleinmolekularer Rezeptortyrosinkinaseinhibitor, SU5416, weist biologische und klinische Aktivität bei Patienten mit refraktärer Akuter Myeloischer Leukämie und Myelodysplastischem Syndrom auf. In multizentrischen Phase II Studien zeigte SU5416 aber sowohl bei Patienten mit Akuter Myeloischer Leukämie als auch mit Myelodysplastischem Syndrom toxische Nebenwirkungen Grad 3 bis 4, die wahrscheinlich auf die galenische Zusammensetzung des Präparates zurückzuführen sind (30,31).

Auch für das Multiple Myelom wird der Einfluss von verschiedenen RTKI untersucht. Hier sind Wirkstoffe wie PTK787/ZK222584, das Wachstum und Migration der malignen Zellen durch Blockade des „vascular endothelial growth factor receptor“ VEGFR1 (flt-1) bewirkt, GW654652, ein Pan-Inhibitor von VEGF-Rezeptoren, PD173074, ein Inhibitor des FGFR3, der Janus-Kinase-Inhibitor INBC20, der sowohl selektiv JAK1 bis 3 und TYK2 als auch die IL-6-induzierte Phosphorylierung von STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) hemmt, und BIBF1000, das sowohl die VEGF-Rezeptoren 1 bis 3 als auch FGFR 1 und 3 und den „platelet derived growth factor receptor alpha“ (PDGFR α) blockiert, zu nennen (10,59,73,94).

1.1.4 Anti-apoptotische Zytokine

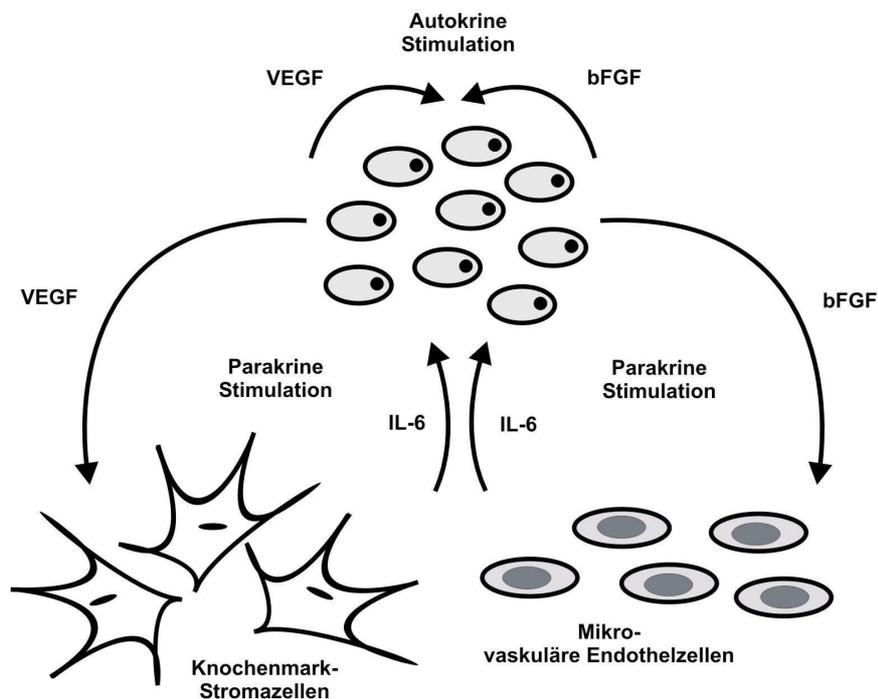


Abbildung 3. Para- und autokrine Interaktionen im Knochenmark (11,21).

Ein dysregulierter programmierter Zelltod ist ein wichtiges Kennzeichen einer Tumorzelle. Die fehlgesteuerte Apoptose gestattet es den Zellen, unter Mikromilieubedingungen wie z.B. unter Sauerstoff- oder Zytokinenzug zu überleben und Resistenzen gegen zytotoxische Therapien zu zeigen (45).

Verschiedene Mediatoren sollen im Multiplen Myelom eine potentielle Rolle in der Prävention von Apoptose spielen (14,15).

Die Wachstumsfaktoren IL-6, VEGF und bFGF sind hier besonders hervorzuheben:

IL-6 wird als bedeutendes Zytokin für das Multiple Myelom aufgefasst (27,38,39,50). Es wirkt als Überlebensfaktor, inhibiert die Apoptose dieser malignen Zellen und die Höhe seines Spiegels und der seines Rezeptors (IL-6R) korreliert mit dem Krankheitsstadium (28,58,70,79).

Patienten, die an Multiplem Myelom leiden, weisen eine erhöhte Gefäßdichte im Knochenmark auf, die mit dem Fortschreiten des Tumorleidens und einer schlechten Prognose im Verhältnis steht (65,80,95,96).

Die Zytokine VEGF und bFGF besitzen ein großes angiogenes Potential und werden durch Myelomzellen exprimiert und sezerniert (7,13,21,67). Hierdurch stimulieren sie Knochenmark-Stromazellen, die VEGF- und bFGF-Rezeptoren besitzen, IL-6 zu produzieren. Das von den KM-Stromazellen sezernierte IL-6 wiederum verstärkt bei den Myelomzellen die Expression und Abgabe von VEGF und bFGF (11,21).

Neben diesen parakrinen Interaktionen werden für IL-6, VEGF und bFGF außerdem autokrine Wirkungen auf Myelomzellen vermutet (11,26,74,75).

IL-6 überträgt sein Signal, indem es an einen seiner Rezeptoren an der Zelloberfläche bindet. Hierbei nimmt das Glykoprotein 130 (gp 130) eine zentrale Rolle ein. Durch diesen Vorgang können nach heutigen Erkenntnissen mindestens drei unterschiedliche Pfade der Signaltransduktion beschritten werden, der JAK/STAT-Weg, die ras-raf-MAPK- und die PI3K/Akt-Kaskade (36).

Sowohl VEGF als auch bFGF sind Agonisten an Tyrosinkinaserzeptoren. VEGF vermittelt seine Wirkungen über VEGFR1 (flt-1) und VEGFR2 (KDR/flk-1), bFGF über die Rezeptoren FGFR-1 bis 4 (7,43).

Beide Zytokine aktivieren ähnlich wie IL-6 sowohl den Signaltransduktionsweg über ras-raf-MAPK als auch PI3K (57,97) (Abb. 3).

1.1.5 Pro-apoptotische Proteine

Als Gegenspieler anti-apoptotischer Zytokine haben sich Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) in den letzten Jahren zu einem Gegenstand intensiver onkologischer Forschungsbemühungen entwickelt.

BMPs sind Mitglieder der „transforming growth factor β “ (TGF- β) Superfamilie. Diese Gruppe von Zytokinen reguliert Wachstum, Differenzierung, Adhäsion und Apoptose vieler Zelltypen (62). BMPs wurden im Zusammenhang mit ihrer Potenz entdeckt, ektopische Knochen- und Knorpelneubildung induzieren zu können (Huggins 1931, Urist 1965). Ihr Name könnte zu der Annahme fehlleiten, dass diese Aufgabe ihre einzige wichtige Funktion darstellt. BMPs

Einleitung

sind aber als multifunktionelle Zytokine einzustufen, die von der Eingeweideentwicklung während der Embryonalzeit, Zellproliferation, Apoptose, Differenzierung und Morphogenese bis hin zu der ihnen seit einiger Zeit zugesprochenen signifikanten Beteiligung bei hämatologischen Prozessen eine wichtige Bedeutung besitzen (41,77). Bis heute sind bei Säugetieren ungefähr 20 BMPs beschrieben worden (83). Hierbei handelt es sich um 30-38 kDa schwere Heterodimere, die als Präpropeptide mit einer Länge von ungefähr 400-525 Aminosäuren synthetisiert werden (102,103).

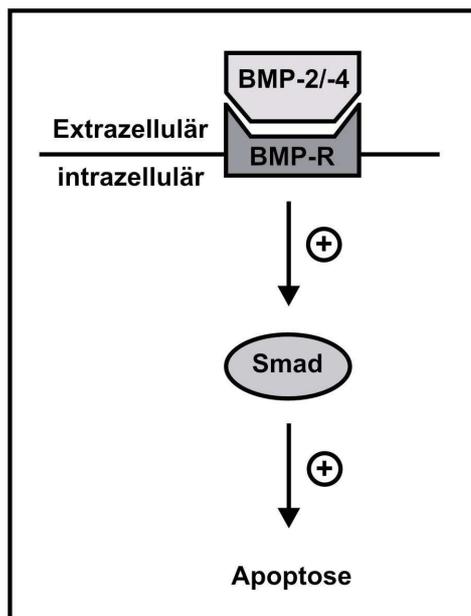


Abbildung 4. Wirkung von exogenem BMP-2 und -4 auf Myelomzellen.

BMPs übertragen ihre Signale mittels Serin-/Threoninkinaserezeptoren auf Zellen. Es gibt drei Typ-I-Rezeptoren, die BMPs als Liganden binden können: BMPR-IA (Alk-3), BMPR-IB und einen Aktivin-Rezeptor ActR-IA (Alk-2). Auch drei Typ-II-Rezeptoren wurden identifiziert, und zwar der Typ-II-BMP-Rezeptor BMPR-II und zwei Typ-II-Aktivin-Rezeptoren (ActR-II und ActR-IIB). Während BMPR-IA, -IB und -II Liganden-spezifisch für BMPs sind, fungieren ActR-IA, -II, und -IIB auch als Aktivin-Rezeptoren. Nach Bindung des Liganden bilden BMP-Rezeptoren heterotetramere aktivierte Komplexe, die aus jeweils zwei Typ-I- und zwei Typ-II-Rezeptoren bestehen. Hierdurch werden intrazellulär so genannte Smad-Proteine, Smad 1 und 5, phosphoryliert, die wiederum einen Komplex mit Smad 4 bilden, der daraufhin in den Nukleus transloziert wird und dort mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren interagiert (17) (Abb. 4). BMP-2 und BMP-4 gehören zu der Subgruppe von BMPs, die ihre Signale über die Rezeptoren Alk-3 und Alk-6 vermittelt (81).

Einleitung

Die Wirkungen von exogenen BMPs auf Myelomzellen wurden bereits eingehend untersucht. Mehrere Proteine dieser Gruppe, wie das BMP-2, -4, -5, -6 und -7, können bei bestimmten Myelomzelllinien und nativem Patientenmaterial Apoptose induzieren und das Zellwachstum hemmen (40,47,81).

Exogenes BMP-2 vermittelt diese Wirkungen auf Myelomzellen durch einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase. Es verändert außerdem die Expression von Bcl-x_L, einem anti-apoptotischen Mitglied der Bcl-2-Familie, und inaktiviert STAT3, das Bestandteil der IL-6-Signaltransduktion ist. Exogenes BMP-4 initiiert ebenfalls eine Dephosphorylierung von STAT3 und bewirkt einen Zellzyklusarrest der Myelomzellen in der G1/G0-Phase (40,47).

So mediierten BMPs beim Multiplen Myelom Effekte, die einer Tumorprogression entgegen wirken. Sie könnten auch vorteilhafte Wirkungen auf die Knochendestruktion besitzen, da sie einerseits eine wichtige Rolle bei der Frakturheilung und Knochenregeneration in vivo spielen (46,104), andererseits eine Inaktivierung von STAT3 und konsekutive Unterbrechung der IL-6-Signaltransduktion bewirken. IL-6 ist nicht nur ein bedeutender Wachstumsfaktor beim Multiplen Myelom, sondern auch an der Pathogenese von Knochenläsionen durch Osteoklastenaktivierung beteiligt (5,6). Somit ergibt sich eine fundierte Rationale für eine weitere Untersuchung der Bedeutung dieser Proteine beim Multiplen Myelom.

Tumorzellen einer Reihe verschiedener Neoplasien exprimieren BMP-Transkripte. So lässt sich zum Beispiel bei Zellen des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms, des Kolonkarzinoms und des Medulloblastoms BMP-2-Transkript, bei Ovarialkarzinomzellen BMP-4-mRNA und bei Neoplasmen peripherer Nerven BMP-2-, -3-, -4- und -5-Transkript nachweisen (34,35,44,54,86).

Die endogene BMP Expression wurde bislang für das Multiple Myelom noch nicht untersucht.

1.2 Fragestellungen

Da für das Multiple Myelom bislang umfangreiche Daten nur zu Reaktionen von Myelomzellen auf exogene BMPs vorliegen, und die endogene Expression bislang nicht untersucht wurde, stellt sich die folgende Frage:

- Exprimieren verschiedene Myelomzelllinien und natives Patientenmaterial überhaupt in detektierbarem Umfang BMP-mRNA?

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war der Nachweis von BMP-2- bzw. BMP-4-Transkript in Myelomzellen.

Der dysregulierte programmierte Zelltod ist ein wichtiges Kennzeichen, das eine Tumorzelle von einer gesunden Zelle unterscheidet. So ergeben sich im

Einleitung

Kontext einer BMP-mRNA-Expression durch Myelomzellen weitere Überlegungen:

- Wie verhält sich die BMP-mRNA-Expression von apoptotischen Myelomzellen?
- Zeigen sich unter Bedingungen, die die Myelomzellproliferation fördern, Veränderungen in der BMP-Transkription?

Um die Regulation der endogenen BMP-Transkription von Myelomzellen anhand von BMP-2 und BMP-4 beschreiben zu können, wurde mit einem Zellkultursystem gearbeitet, in dem bei verschiedenen Myelomzelllinien und im folgenden auch bei nativem Patientenmaterial durch bestimmte Substanzen Apoptose unterdrückt bzw. induziert wurde. Als Wachstumsfaktor diente IL-6, dem eine herausragende Bedeutung in der Hemmung des programmierten Todes von Myelomzellen zugesprochen wird (38,39,50). Für die Induktion von Apoptose wurde in diesem Modell hauptsächlich ein Tyrosinkinase-rezeptorinhibitor, ein präklinisch eingesetztes „small compound drug“ namens BIBF1000, verwendet. Dieser RTKI bewirkt unter anderem eine Blockade des Tyrosinkinase-rezeptors FGFR3 (10), der durch die Translokation t(4;14)(p16.3;q32) überexprimiert wird. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit erfolgten im Schwerpunkt an Myelomzelllinien, die zu dieser als TC4 klassifizierten Untergruppe des Multiplen Myeloms gehören. Diese Subgruppe geht mit einer schlechten Prognose einher.

Der Wirkungsnachweis des RTKI in Form einer Induktion von Apoptose, einer Proliferationshemmung und einem Antagonismus der durch IL-6 induzierten MAPK-Aktivierung für die untersuchten Myelomzelllinien wurde mittels Durchflusszytometrie, Proliferationsassay und Western Blot geführt.

Da bekannt ist, dass eine Überexpression des FGFR3 beim Multiplen Myelom eine Hochregulation der endogenen Bcl-x_L-Expression bedingt und exogenes BMP-2 die Bcl-x_L-Transkription herunterreguliert, wurde als Kontrolle zudem das Bcl-x_L-Transkript mitbestimmt.

Es stellte sich im Verlauf die Frage, ob weitere Substanzen, die bei Myelomzellen Apoptose induzieren, gleichartige Regulationen der endogenen BMP Expression bewirken (2,51,90). Deswegen erfolgte eine Untersuchung, bei der Apoptose bei Myelomzellen durch Dexamethason bzw. all-trans Retinolsäure (ATRA) ausgelöst wurde.

Nach Analyse der Expression und Regulation von BMPs auf transkriptioneller Ebene schließen sich diese weiteren Überlegungen konsequent an:

- Kann BMP-Protein in Myelomzellen bzw. Zellkulturüberständen nachgewiesen werden?
- Lässt sich durch pro-apoptische Stimuli eine Regulation des intra- bzw. extrazellulären BMP-Proteins feststellen?

Unter dieser Fragestellung wurden Myelomzellextrakte und Kulturüberstände auf BMP-2-Protein untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Im Bereich der Zellkultur fanden alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen statt.

2.1.1 Eigenschaften und Kulturbedingungen der verschiedenen Zelltypen

Die in RPMI-1640 Medium (Zusätze s. u.) kultivierten Myelom-Zelllinien RPMI-8226, U-266, OPM-2, KMS-11 und KMS-18 zeichneten sich durch unterschiedliche Wachstumseigenschaften aus. Während RPMI-8226, OPM-2 und KMS-18 sich in Suspension befanden, war die Linie U-266 schwach und die Zelllinie KMS-11 stark adhärent. Ausserdem differierten diese Zelllinien in der Expression verschiedener Mutationen. KMS-11, KMS-18 und OPM-2 zeigten alle die Translokation t(4;14). KMS-11-Zellen wiesen die Mutation Y373C auf, die den FGFR3 durch eine konstitutive Dimerisierung in der Abwesenheit des Liganden aktiviert. OPM-2 exprimierten die Mutation K650E, die in der Kinasedomäne des Rezeptors auftritt und die inhibitorische Konformation der Kinase aufheben soll, was ebenfalls zu einer konstitutiven Aktivierung führt. KMS-18-Zellen zeigten die Mutation G384D des FGFR3. Transfektionsversuche zeigen, dass diese Mutation nur schwach transformierende Eigenschaften aufweist (94).

Von Myelom-Patientenzellen wurde nach Knochenmarkpunktion eine Primärkultur angelegt. Dieses native Material benötigte ebenfalls RPMI-1640-Medium.

Des Weiteren fand eine Kultur der Osteosarkomlinie U2-OS, die ebenfalls stark adhärent wuchs, in McCoy's Medium statt (Zusätze s. u.).

Alle oben genannten Zellen wurden im Brutschrank in einer H₂O-gesättigten Atmosphäre von 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

Die verwendeten Zellkultur-Medien hatten folgende Zusätze (Ausnahmen für bestimmte Versuchsansätze sind in den entsprechenden Abschnitten aufgeführt):

RPMI-1640 Medium, ohne Glutamin (Biochrom AG)
+ 10 % Foetal Bovine Serum (Gibco)
+ 2 mmol/l L-Glutamin (Gibco)
+ 100 U/l // 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG)

MCCOY's 5A Medium (Gibco)
+ 10 % Foetal Bovine Serum (Gibco)
+ 2 mmol/l L-Glutamin (Gibco)
+ 100 U/l // 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG)

2.1.2 Subkultur von adhärennten Zellen und Zellen in Suspension

Material:

Zellen

Kulturmedium (s. o.)

Gewebekulturflaschen 250 ml, 75 cm² (Greiner)

PBS DULBECCO`s (Gibco)

Trypsin EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) (Cascade Biologics. Inc.)

Pipetus (Hirschmann Laborgeräte)

Sterile 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml Einwegpipetten (Falcon)

Cell Scraper (Corring Incorporated)

Mikroskop Axiovert 25 (Zeiss)

Zentrifuge 4K15C (Sigma)

Durchführung

Nach mikroskopischer Begutachtung der Myelomzelllinien hinsichtlich Vitalität, Prüfung auf Kontamination des Mediums und Zelldichte erfolgte je nach Dauer der Generationszeit eine Auftrennung entweder im Verhältnis 1:10 bzw. 1:5, indem ein Teil in eine neue Gewebekulturflasche überführt, frisches Serumhaltiges Medium hinzu gegeben und die alte Kultur verworfen wurde. Vor Umsetzen der adhärennt wachsenden U-266 und KMS-11 wurde zur Resuspension eventuell ein Cell-Scraper eingesetzt.

Bei der täglichen mikroskopischen Beurteilung der am Boden der Gewebekulturflaschen adhärennt wachsenden Zellen der Osteosarkom-Linie U2-OS wurde die Farbe des Mediums, die Morphologie der einzelnen Zellen sowie die Gesamt-Konfluenz beachtet. Das Umsetzen der Zellen in eine neue Gewebekulturflasche erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 90 %, da sich die Zellen im Weiteren aufgrund der Wachstumsdichte durch Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten und konsekutiver Ausschüttung von Wachstumsinhibitoren in ihrer Proliferation und Differenzierung behindert hätten.

Das verbrauchte Medium wurde entfernt und verworfen, die Zellschicht mit 10 ml PBS gespült, um Serumreste und Detritus zu entfernen, und 3 ml Trypsin/EDTA (im Wasserbad auf +37°C erwärmt) hinzugegeben. Vorher erfolgte eine Verdünnung der 10 x Trypsin/EDTA Lösung auf einfache Konzentration.

Mit Hilfe des Mikroskops wurde der Zeitpunkt der Ablösung der Zellen vom Flaschenboden verfolgt und die tryptische Digestion durch Zugabe von 10 ml serumhaltigen Mediums gestoppt.

Die Zellsuspension wurde in ein 10 ml Reaktionsgefäß überführt, für 5 Minuten bei 1800 U/min. zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen im entsprechenden Medium aufgenommen.

Die weitere Kultur fand im Brutschrank bei +37°C, 5% CO₂ in H₂O-gesättigter Atmosphäre statt.

2.1.3 Zellzählung mit der Neubauer-Kammer

Material

Neubauer Zählkammer mit Objektträgergläschen (Marienfeld)
Reaktionsgefäß 1 ml (Eppendorf)
Mikroskop Axiovert 25 (Zeiss)
Cellcounter (manuell)
Trypan Blue Solution (Merck)
Pipetten 1 ml, 500 µl, 100 µl, 10 µl (Eppendorf)

Methode

Die Neubauerkammer besteht aus vier großen Quadraten mit jeweils sechzehn Feldern. Es werden bei einer Zellzählung jeweils vier Sechzehnerfelder mit einer Vergrößerung von 1:100 bei Phasenkontrast ausgezählt, wobei Zellen an zwei von vier Kanten nicht zu berücksichtigen sind.

Dies entspricht einer Zellzahl pro 0,1 µl, da jedes Sechzehnerfeld eine Fläche von 1 mm² besitzt und ergibt bei einer Tiefe von 0,1 mm ein Volumen von 0,1 µl.

Durchführung

Die zu zählenden Zellen wurden vereinzelt, resuspendiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und im Verhältnis 1:10 mit Trypan Blue Solution versetzt. Die Neubauer-Kammer wurde angehaucht, das Objektträgerglas aufgelegt und leicht angedrückt, so dass sich Newton-Ringe bildeten. Am Ober- und Unterrand des Objektträgers ließ sich jetzt Suspension ansaugen. Danach erfolgte die Zählung der Zellen wie oben beschrieben.

2.1.4 Isolation von mononukleären Zellen aus Knochenmark

In dieser Arbeit wurden CD 138⁺ Zellen aus dem Knochenmarkaspirat von drei an Multiplem Myelom erkrankten Patienten isoliert. Die Patienten gaben vor der medizinisch indizierten Knochenmarkpunktion ihr schriftliches Einverständnis, das Restmaterial für die Untersuchungen zu verwenden.

Material

Patientenmaterial der KM-Punktion
PBS DULBECCO's (Gibco)
BIOCOLL Separating Solution (Biochrom AG)
Sterile Einwegpipetten (Falcon)
50 ml Reaktionsgefäße (Greiner)
Gewebekulturflasche (Greiner)

Material und Methoden

Zentrifuge 4K15C (Sigma) Durchführung

5 ml Knochenmark wurde in ein Reaktionsgefäß gegeben und 1:1 mit PBS verdünnt. In einem weiteren Reagenzglas folgte die Überschichtung von 15 ml BIOCOLL mit dem verdünnten Knochenmark, wobei streng beachtet werden mußte, dass sich die beiden Phasen nicht mischten.

Im Anschluss fand ein ungebremstes Zentrifugieren der Probe bei 2500 U/min. für 15 Minuten statt. Mit einer Einweg-Pipette wurde der Überstand aus serösen Bestandteilen entfernt. Die weißlich trübe Interphase, in der sich die mononukleären Zellen angesammelt hatten, wurde vorsichtig abgenommen und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Falls Knochenmarkbröckchen vorhanden waren, erfolgte eine Homogenisierung durch eine sterile Spritze in einem gesonderten Röhrchen.

Die Reaktionsgefäße wurden mit PBS auf 50 ml aufgefüllt, bei 1800 U/min. zentrifugiert, die Überstände abgegossen, die Zellhaufen zusammengegeben, erneut mit PBS gewaschen und mit derselben Umdrehungszahl ein zweites Mal zentrifugiert. Diese Prozedur war erforderlich, um die für die Zellen toxischen BIOCOLL Reste zu beseitigen.

Die Zellen wurde in 10 ml RPMI-1640 Medium mit FCS-Zusatz resuspendiert, in eine Zellkulturflasche überführt und unter den oben aufgeführten Bedingungen im Brutschrank inkubiert.

2.1.5 Magnetic Cell Sorting (MACS): Isolation von menschlichen CD138⁺-Plasmazellen.

Material

Material nach BIOCOLL-Dichtegradienten-Zentrifugierung

MidiMACS-Puffer: 485,5 ml PBS DULBECCO's (Gibco)

+ 12,5 ml HAS (20%) (Sigma)

+ 2,0 ml EDTA (0,5M) anschließend steril filtrieren (Sigma)

CD138 MicroBeads (Miltenyi Biotec)

CD19 MicroBeads (Miltenyi Biotec)

MidiMACS Trennsäule (Miltenyi Biotec)

Pipetten und Spitzen, Röhrchen (siehe oben)

Methode

Humane Plasma- und Myelomzellen exprimieren an ihrer Zelloberfläche CD138, auch bekannt als Syndecan-1, während zirkulierende B-Zellen, T-Zellen und Monozyten diese Struktur nicht besitzen (69,85,101).

CD138 wird ebenfalls an der basolateralen Oberfläche von Endothel-, embryonalen mesenchymalen, vaskulären glatten Muskel-, Endothel- und neuronalen Zellen exprimiert (9,19). Mittels kolloidaler super-paramagnetischer MicroBeads, die mit monoklonalem Maus-CD138-Antikörper konjugiert sind,

Material und Methoden

kann die Plasma-/Myelomzellfraktion von den restlichen Bestandteilen des aufbereiteten Knochenmarks (Zustand nach Isolation der mononukleären Zellen mittels BIOCOLL) abgetrennt werden. Diese magnetisch markierten CD138⁺ Zellen werden im magnetischen Feld des MidiMACS-Separators in der Trennsäule festgehalten, während die unmarkierten Zellen die Säule ungehindert passieren. Nach Entfernen der Säule aus dem magnetischen Feld können die CD138-positiven Zellen aus der Säule eluiert werden.

Durchführung

Eingesetzt wurde eine Zellsuspension von mononukleären Zellen, die durch MNC-Isolation (s. o.) aus Knochenmark von Myelom-kranken Patienten gewonnen worden war. Unbedingt zu beachten war die Kapazität der Säule, die auf eine maximale Zellzahl von $1 \cdot 10^8$ Zellen pro 500 μ l beschränkt ist, da die Säule sonst verstopft, was mit Zellverlusten einhergeht.

Von der mononukleären Zellphase wurden $1 \cdot 10^7$ Zellen in MidiMACS-Puffer aufgenommen, im Verhältnis 1:4 mit CD138 Microbeads versetzt und bei 4°C für 20 Minuten inkubiert.

Dann folgte das Waschen der Zellen mit jeweils 10-20fachem Volumen, das Zentrifugieren mit 1800 Umdrehungen für 5 Minuten und das Resuspendieren in MACS-Puffer. Hiermit war die Markierung abgeschlossen.

Nun fand die magnetische Aufreinigung statt. Dazu wurde die Säule im Magnetfeld platziert, der sterile Filter aufgesetzt, mit 5 ml gekühltem Puffer gewaschen und das Eluat verworfen. Als nächstes wurde die gefärbte Zellsuspension durch den Filter auf die Säule gegeben, bis zur vollständigen Elution abgewartet und mehrmals mit Puffer nachgespült. Diese Zellsuspension wurde erneut verworfen. Dann folgte die Entnahme der Säule und des Filters aus dem Magnetfeld. Beides wurde auf ein 10 ml Röhrchen aufgesetzt, 5 ml Puffer auf den Filter gegeben und mit den markierten Zellen mittels sterilen Stempels kräftig durch die Säule gedrückt. In diesem Eluat befand sich nun die gewünschte Population. Nach der Aufnahme in RPMI-1860 Medium konnten diese Zellen direkt für einen Versuch verwendet werden.

2.1.6 Stimulation von Zellkulturen

Material

Zellen (s.o.)

BIBF1000 (Small Compound Receptortyrosinkinase Inhibitor)

Interleukin-6 (R&S Systems)

Dexamethason (Sigma)

All-Trans-Retinoic Acid (Sigma)

RPMI-1640 Medium (Biochrom AG)

Pipetus (Hirschmann Laborgeräte)

Sterile Einwegpipetten (Falcon)

15 ml Röhrchen, 50 ml Röhrchen (Greiner)

Material und Methoden

24-Loch Kulturplatte (Nunc)
Neubauer-Zählkammer, Deckgläschen (Marienfeld)
Mikroskop Axiovert 25 (Zeiss)
Zentrifuge 4K15C (Sigma)

Durchführung

Für einen Versuch mit einer der verschiedenen Myelomzelllinien wurde die Zellsuspension aus der Kulturflasche jeweils in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 1800 U/min. für fünf Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Verwerfen des Mediumüberstandes erfolgte die Re-Suspension des Zellhaufens, die Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer-Kammer (siehe 2.1.3) und die Einstellung der Zellzahl auf $2 \cdot 10^5$ Zellen pro ml. Jedes Loch einer 24-Loch-Platte erhielt eine Füllung von einem ml Zellsuspension. Prinzipiell wurden alle Experimente mit FCS-freiem Medium angesetzt.

Die zur Stimulation bzw. Inhibition genutzten Substanzen wurden in den im Folgenden aufgeführten finalen Konzentrationen eingesetzt:

IL-6: 10 ng/ml

Rezeptortyrosinkinaseinhibitor BIBF1000: 125, 250, 500 nM und 1 μ M

Dexamethason: 10 μ M

All-trans-Retinolsäure: 1 μ M

2.2 Zellpräparation und Apoptose-Assay mit Annexin-V-FITC und Propidiumiodid mittels Flow Cytometry.

Material

Zellen

PBS DULBECCO'S (Gibco)

Annexin V-FITC (Fluoreszeinthiocyanat) Apoptosis Detection KIT I (PharMingen)

FACS-Röhrchen (Falcon)

Cytometer Typ FACSCalibur (Becton Dickinson)

FACS Flow Spüllösung (Becton Dickinson)

Pipetus (Hirschmann Laborgeräte)

Sterile Einwegpipetten (Falcon)

Pipetten 1 ml, 100 μ l, 10 μ l (Eppendorf)

Methode

Annexin-V, ein 35-36 kDa schweres calciumabhängiges phospholipidbindendes Protein, hat eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin. Dieses Membranlipid befindet sich bei vitalen Zellen vor allem auf der Innenseite der Zellmembran und wird in der frühen Phase der Apoptose von der Innenseite auf die

Material und Methoden

Außenseite der Membran transloziert. Damit ist Annexin-V eine sensitive Sonde zur Messung der Phosphatidylserin-Exposition auf der Zellmembran und somit der Apoptose. Zur Detektion durch das Cytometer wird es mit FITC, einem fluoreszierenden Farbstoff, gekoppelt (71). Propidiumiodid (PI) ist ein fluoreszierender DNS-bindender Farbstoff, für den die Zellmembran nekrotischer Zellen permeabel ist, was bei Zellen in der Initialphase der Apoptose und vitalen Zellen nicht der Fall ist (98).

Durch die Doppelfärbung mit Annexin-V-FITC und PI können apoptotische von nekrotischen bzw. vitalen Zellpopulationen unterschieden werden. Vitale Zellen sind sowohl Annexin-V als auch PI negativ, apoptotische Zellen sind Annexin-V positiv und PI negativ und nekrotische Zellen sind Annexin-V und PI positiv.

Durchführung

Die Apoptose-Messung erfolgte nach dem von Vermes et al. (1998) beschriebenen Protokoll (98).

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit einer Zellzahl von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Annexin-V Binding Buffer (1:10) resuspendiert. Dann fand die Färbung mit Annexin V-FITC im Verhältnis 1:100 und Propidiumiodid im Verhältnis 1:200 (färbende Substanz: Zellsuspension) statt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur und unterbundener Lichtexposition wurden die Zellen einmal mit Puffer gewaschen und innerhalb einer Stunde mit dem Flow Cytometer mit den folgenden Geräteeinstellungen analysiert:

Detektors/Amps:

Parat	Detektor	Voltage	AmpGain	Mode
P1	FSC	E00	1.00	Linear
P2	SSC	350	1.00	Linear
P3	FL1*	643	1.00	Logarithmisch
P4	FL2*	484	1.00	Logarithmisch
P5	FL3	705	1.00	Logarithmisch
P6	FL2-A		1.00	Linear
P7	FL2-W		1.00	Linear

*FL1: AnnexinV–FITC

*FL2: Propidiumiodid

Schwelle:

Erster Parameter: FSC
Spannung (Voltage): 52
Zweiter Parameter: keiner

Kompensation:

FL1 – 1.8 % FL2
FL2 – 52.5 % FL1
FL2 – 0.0 % FL3
FL3 – 0.0 % FL2

2.3 Proliferations-Assay

Material

96-Loch-Kulturplatten (Nunc)
RPMI-1640 Kulturmedium (Biochrom AG)
Zellen der Linien KMS-11, OPM-2, RPMI-8226 und U-266
0,625 μCi ^3H -Thymidin (Amersham Pharmacia)
BIBF1000 in verschiedenen Konzentrationen
Microbeta 1450 Zähler (Wallac)

Durchführung

Von Myelomzellen der Linien KMS-11, OPM-2, RPMI-8226 und U-266 wurden auf 96-Loch-Platten $5 \cdot 10^4$ Zelle pro Loch ausgesät, und jeder Ansatz mit 0,625 μCi ^3H -Thymidin versetzt. Mit diesen derartig vorbehandelten Zellen fand je eine Kulturreihe ohne und unter Einfluss aufsteigenden Konzentrationen des RTKI BIBF1000 (5, 50, 125, 250, 500 1000 nM) über eine Versuchszeit von 72 Stunden statt. Nach abgeschlossener Inkubation wurden die Zellen geerntet, die ^3H -Thymidin-Inkorporation pro Ansatz mit dem Microbeta-1450-Zähler als Dreifachbestimmung aufgenommen und für jede Zelllinie für die Kontrollen normalisiert.

2.4 Gentechnik

2.4.1 Ernten von Zellen für die RNA-Isolation

Material

Zellkulturplatte nach Inkubation
TRIzol Reagent (Invitrogen)
1 ml bzw. 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf)
Einfrierröhrchen, 1,5 ml bzw. 1,8 ml (Nunc)
Pipetten und sterile Pipettenspitzen (Eppendorf)

Durchführung

Die Myelomzellen wurden auf der jeweiligen Kulturplatte resuspendiert, je Loch in ein Reaktionsgefäß überführt, bei 1800 U/min. für vier Minuten zentrifugiert und der Mediumüberstand in Einfrierröhrchen überführt. Dann folgten das einmalige Waschen mit PBS sowie die Homogenisierung der Zellen in 300 bzw. 500 μl TRIzol.

Die Mediumüberstände wurden bei -20°C , das TRIzol-Gemisch für 10 Minuten bei Raumtemperatur und dann bei -80°C gelagert.

2.4.2 RNA-Isolation

Material

Chloroform 99% (Sigma)
2-Propanol 99% (Merck)
Ethanol 99,8% (Roth)
Pellet Paint Co-Precipitant (Novagen)
3M NaOH (Novagen)
RNase-freies H₂O
1,5 ml bzw. 1,8 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf)
Pipetten und zugehörigen Spitzen (Eppendorf)
Photometer (Eppendorf)
Küvette (Uvette 220-1600 nm) (Eppendorf)
Zentrifuge (s.o.)

Durchführung

Die totale RNA-Isolierung aus den Kulturzellen erfolgte mittels TRIzol-Methode (Gibco) modifiziert nach Chomezynski und Sacchi (1987).

Für die Phasenseparation wurden die vorher homogenisierten Proben für 5 Minuten bei 15-30° C inkubiert, um die vollständige Dissoziation der Nucleoproteinkomplexe zu ermöglichen. Es wurden 0,2 ml Chloroform pro ml TRIzol-Reagenz hinzugefügt, die Proben gut durchmischt, dann für 2-3 Minuten bei 15-30°C inkubiert und bei 12.000*g für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

Das Material trennte sich hierdurch in drei Phasen auf: Eine obere wässrige Phase mit totaler RNA, eine weißliche Interphase, die Proteine enthielt und eine untere rötliche Phenol-Chloroform-Phase mit der genomischen DNA.

Die RNA verblieb ausschließlich in der wässrigen Phase. Diese wurde abgenommen, mit 0,5 ml Isopropanol pro ml TRIzol zur Präzipitation versetzt und bei 15-30°C 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Zur erleichterten Sichtbarkeit des Zellpellets wurde Pellet Paint Co-Precipitant benutzt.

Es setzte sich ein RNA-Pellet ab. Nach einem Waschvorgang mit 75%igem Ethanol, wobei 1 ml Ethanol pro ml TRIzol hinzugegeben wurde, fünfminütigem Zentrifugieren bei 7500*g bei 4°C wurde das Pellet 5-10 Minuten luftgetrocknet und in 20 µl RNase freiem Wasser gelöst.

Die Lagerung der Proben fand bei -80°C statt.

2.4.3 cDNA-Synthese

Material

RNA

Master Mix: 4 µl First strand buffer (5x) (Invitrogen)
 + 2 µl DTT (100 mM) (Invitrogen)

Material und Methoden

- + 1 µl dNTP Mix (80mM) (Amersham Pharmacia)
- + 1 µl Random hexamers (100pM) (Amersham Pharmacia)
- + 2 µl BSA dil. (1mg/ml) (Amersham Pharmacia)
- + 1 µl RNA guard (40 U/µl) (Amersham Pharmacia)
- + 1 µl M-MLV (200 U/µl) (Invitrogen)

PBS Dulbecco's (Gibco)

Photometer, Pipetten (Eppendorf)

Küvetten (Uvette 220-1600 nm) (Eppendorf)

Wasserbad (Memmert)

Blockthermostat BT200 (Kleinfeld Labortechnik)

DEPC A. d.

Durchführung

Die zu verwendenden RNA-Proben wurden langsam auf Eis aufgetaut und der Inhalt jeder Probe mittels Photometer quantifiziert, indem jeweils 1 µl der gelösten RNA in einem Verhältnis von 1:60 in einer Küvette mit PBS verdünnt und gegen einen Leerwert mit PBS gemessen wurde. Die Herstellung des Master Mixes fand unmittelbar vor Synthesebeginn statt. Zu diesem wurden 2 µg RNA-Extrakt hinzugefügt und auf ein Gesamtvolumen von 20 µl mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Eine Ausnahme stellten die Proben für die U2-OS-Standardkurve der TaqMan-PCR dar. Die cDNA-Synthese hierfür erfolgte nur mit 1 µg RNA-Extrakt.

Es fand eine Inkubation der Gemische für 60 Minuten in einem 37°C warmen Wasserbad statt. Danach musste die Reverse-Transkriptase bei 95°C fünf Minuten lang inaktiviert werden. Die Proben wurden auf Eis gelagert und bei -20°C verwahrt.

2.4.4 RT-PCR

Material

100 µl, 500 µl, 1 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf)

Pipetten 1 ml, 200 µl, 100 µl, 20 µl, 10 µl (Eppendorf)

PCR Cycler (Biometra Tgradient)

- Master Mix:
- 5 µl Gene Amp 10x PCR Buffer (Applied Biosystems)
 - + 4 µl MgCl₂ (Applied Biosystems)
 - + 5 µl DNTPs (10 mM) (Amersham Pharmacia)
 - + 2 µl Primer1 (25pmol/µl) (TibMolBiol)
 - + 2 µl Primer2 (25pmol/µl) (TibMolBiol)
 - + 0,25 µl Gold Taq (Applied Biosystems)
 - + 29,75 µl A. bidestillata

Material und Methoden

Qualitative PCR:

cDNA nativer Proben der Zelllinien U-266, RPMI1860, OPM-2, KMS-11 und KMS-18

Primer: BMP-2 (forward) 5'- TCA TAA AAC CTg CAA CAg CCA ACT Cg
BMP-2 (reverse) 5'- gCT gTA CTA gCg ACA CCC AC (TibMolBiol)
BMP-4 (forward) 5'- TgA TAC CTg AgA Cgg ggA Ag (TibMolBiol)
BMP-4 (reverse) 5'- CCA gAC TgA AgC Cgg TAA Ag
GAPDH (forward) 5'- gAA ggT gAA ggT Cgg AgT C
GAPDH (reverse) 5'- gAA gAT ggT gAT ggg ATT TC (TibMolBiol)

Test der TaqMan-PCR-Primer:

BMP-Primer:	BMP-2 (forward)	5'- gAC Tgg ATT gTg gCT CCC C
	BMP-2 (reverse)	5'- TCA gCC AgA ggA AAA ggg C
	BMP-4 (forward)	5'- ggC CTT CTA CTg CCA Tgg g
	BMP-4 (reverse)	5'- gCA Tgg TTg gTT gAg TTg Agg (TibMolBiol, Primer Express)
GAPDH-Primer:	GAPDH (forward)	5'- gAA ggT gAA ggT Cgg AgT C
	GAPDH (reverse)	5'- gAA gAT ggT gAT ggg ATT TC (TibMolBiol, Primer Express)
Bcl-x _L -Primer:	BCL-x _L (forward)	5'- CgC ACA gCA gCA gTT Tgg
	BCL-x _L (reverse)	5'- TCC CTC AgC gCT TgC TTT AC (TibMolBiol, Primer Express)

Methode

Dieses auf Mullis et al. zurückgehende Verfahren beruht auf der Amplifikation der nach reverser Transkription nachzuweisenden cDNA (64). Dazu wird die cDNA in sukzessiven Zyklen zur Doppelstrangtrennung bei ca. 95°C denaturiert. Nach der Primer-Bindung kommt es bei 50-75°C zur Hybridisierung zweier komplementärer Oligodesoxyribonukleotide an auseinanderliegenden Regionen des Doppelstranges, der dabei exponentiell amplifiziert wird.

Als Enzym wird hierbei die thermostabile Taq-DNA-Polymerase verwendet, die die notwendigen hohen Temperaturen verträgt.

Durchführung

Die benötigten cDNA Proben wurden auf Eis langsam aufgetaut, der Master Mix vor der PCR frisch angesetzt und 2µl cDNA auf ein Gesamtvolumen von 50µl Master Mix gegeben.

Material und Methoden

Die Amplifikation fand nach folgendem Protokoll statt:

94°C	5,0 min.	Denaturierung
36 Zyklen		
94°C	45 sec.	Denaturierung
54°C	60 sec.	Primer-Bindung
72°C	1,5 min.	Synthese/Elongation
72°C	7,0 min.	Synthesebeendigung
4°C	Ende	

Die Proben wurden nach abgelaufener PCR bis zur Auftrennung mittels Acrylamidgelelektrophorese bei +4°C aufbewahrt.

2.4.5 Acrylamidgelelektrophorese

Material

Qualitative PCR:

RT-PCR-Amplifikate nativer Proben von U-266, RPMI-8226, OPM-2, KMS-11 und KMS-18.

Test der TaqMan-PCR-Primer:

Hierzu wurden cDNA-Proben von nativen U2-OS-Zellen eingesetzt, da diese hinreichend BMP-2-Transkript exprimieren.

GeneRuler™ 100bp DNA Ladder : 2,0 µl GeneRuler™ 100bp DNA
(Fermentas) DNA

0.5 µl 6 x Färbereagenz

0,5 µl destilliertes H₂O

Probenpuffer 6 x Ficoll-Dye: 0.15 % Bromphenolblau (Sigma)

0.15 % Xylen-Cyanol (Sigma)

15 % Ficoll Typ 400 (Sigma)

Acrylamid 30% (BIO-RAD)

10xTBE, pH 8,0: 108 g/l Tris (Sigma)

55 g/l Borat (Sigma)

9,3 g/l EDTA (Sigma)

Klebgel: 2 ml 30 % Acrylamid-Stammlösung (Bio-Rad)

(11,9%ig) 3 ml ddH₂O

5 µl TEMED (Sigma)

50 µl 10 % Ammoniumpersulfat (Sigma)

Trenngel: 6,6 ml 30 % Acrylamid-Stammlösung (Bio-Rad)

(7,9%ig) 15,7 ml ddH₂O

Material und Methoden

2,5 ml 10 x TBE (s. o.)
12 µl TEMED (Sigma)
175 µl 10 % APS (Sigma)

Gelapparatur, Spacer, Klammern, Kamm (Bio-Rad)
Ethidiumbromidlösung 1 % (Roth)

Durchführung

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte über Polyacrylamid-Gele mit einer Dicke von 0,8 mm. Zunächst wurden die Gelplatten mit destilliertem Wasser und dann mit Ethanol behandelt. Um die Spacer wurde das Klebgel zum Abdichten gegeben und bis zur vollständigen Polymerisation abgewartet. Das Trenngel wurde luftblasenfrei zwischen die Platten gegossen, der Probenkamm eingesetzt und abgewartet, bis auch hier die endgültige Polymerisation erfolgte. Vor dem Einspannen in die Gelkammer wurden die Spacer entfernt, dann das PCR-Produkt mit Probenpuffer im Verhältnis 1:6 versetzt und ebenso wie die 100 bp DNA-Leiter und ein nukleinsäurefreier Leerwert aufgetragen. Die Auftrennung fand bei 250 V für ca. eine Stunde statt. Das Gel wurde fünf Minuten in Ethidiumbromid gefärbt und dann mit dem Programm GelDoc fotografiert.

2.4.6 TaqMan™ PCR Assay

Material

cDNA der zu untersuchenden Proben

Pipetten: 10 µl, 20 µl, 100µl, 200 µl, 1000 µl und entsprechende Spitzen (Eppendorf)

Reaktionsgefäße 1 ml, 0,5 ml und 0,1 µl (Eppendorf)

ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems)

MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate (Applied Biosystems)

MicroAmp Caps (8 Caps/Strip) (Applied Biosystems)

TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)

Dest. Wasser

Primer:

BMP-Primer: BMP-2 (forward) 5´- gAC Tgg ATT gTg gCT CCC C
BMP-2 (reverse) 5´- TCA gCC AgA ggA AAA ggg C
BMP-4 (forward) 5´- ggC CTT CTA CTg CCA Tgg g
BMP-4 (reverse) 5´- gCA Tgg TTg gTT gAg TTg Agg
(TibMolBiol)

GAPDH-Primer: GAPDH (forward) 5´- gAA ggT gAA ggT Cgg AgT C
GAPDH (reverse) 5´- gAA gAT ggT gAT ggg ATT TC
(TibMolBiol)

Bcl-x_L-Primer: BCL-x_L (forward) 5´- CgC ACA gCA gCA gTT Tgg
BCL-x_L (reverse) 5´- TCC CTC AgC gCT TgC TTT AC
(TibMolBiol)

Material und Methoden

Sonden :

BMP-Sonde:	BMP-2	5´- TCA CGC CTT TTA CTG CCA CGG AGA A - 3´
	BMP-4	5´- ACT GCC CCT TTC CAC TGG CTG ACC - 3´ (TibMolBiol)
GAPDH-Sonde:	GAPDH	5´- CAA gCT TCC CgT TCT CAg CC - 3´ (TibMolBiol)
BCL-x _L -Sonde:	BCL-x _L	5´- TGC CCG GGA GGT GAT CCC C - 3´ (TibMolBiol)

Die BMP-2-, BMP-4- und Bcl-x_L-Primer sind folgendermaßen modifiziert:
5´ 6-FAM* (Reporter); 3´ TAMRA* (Quencher).

Die GAPDH-Sonde trägt am 5´ Ende VIC* (Reporter), und am 3´Ende TAMRA* (Quencher).

*6-FAM:	6-Carboxy-Fluorescein
*TAMRA:	6-Carboxy-tetramethylrhodamin
*VIC:	2,7-Dimethoxy-4,5-dichloro-6-carboxyfluorescein

Methode

Die Technik des sogenannten TaqManTM PCR Assay wurde von Lee et al. 1993 entwickelt und basiert auf dem erstmalig von Holland et al. 1991 beschriebenen 5´ Nuklease PCR Assay, der die 5´Exonukleaseaktivität der Taq Polymerase zur Detektion der Sequenz-spezifischen Amplifikation ausnutzt (42,55). Hierbei ist allerdings nach der durchgeführten PCR eine aufwendige Technik zur Detektion des Sondenabbaus nötig, z.B. mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie.

Im Gegensatz zu den ³²P-markierten Sonden bei dem 5´Nuklease PCR Assay, werden bei der TaqManTM PCR spezielle fluorogene Sonden eingesetzt, die aus einem Oligonukleotid bestehen, das am 5´Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) und am 3´Ende mit einem Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) und einem blockierenden Phosphatrest markiert sind. Dieses Protokoll macht sich ebenfalls die 5´-3´-Exonukleaseaktivität der AmpliTaq DNA Polymerase zu Nutze.

Der Reporter-Farbstoff der intakten Sonde wird bei einer Wellenlänge von 488nm zur Fluoreszenz angeregt, die aber durch die räumliche Nähe zum Quencher durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt wird.

Während der PCR bildet sich zuerst ein Hybrid aus Sonde und Primer mit dem Matrizen-Strang. In der Extensionsphase trifft die Taq Polymerase auf die Sonde, wodurch ihre 5´3´-Exonukleaseaktivität aktiviert und die Sonde hydrolysiert wird. Nicht-hybridisierte Sonde kann hingegen nicht geschnitten werden (60).

Durch die Hydrolyse kommt es zur Unterbrechung der räumlichen Nähe zwischen Reporter und Quencher, und damit unterbleibt auch der FET. Somit steigt die Fluoreszenz der Probe durch die Amplifikation des PCR-Produktes mit jedem PCR-Zyklus. Das Signal ist strikt Sequenz-spezifisch und wird mit

Material und Methoden

Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detectors im geschlossenen Reaktionsgefäß in jedem Zyklus erfasst.

Etablierung

Um Erkenntnisse darüber zu gewinnen, ob die Zelllinien U-266, RPMI-8226, OPM-2, KMS-18 und KMS-11 überhaupt in detektierbarem Umfang BMP-2-Transkript bildeten, fand zunächst eine umfassende Untersuchung mittels qualitativer PCR und anschließender Acrylamidgelelektrophorese statt, bei der native Proben der genannten Zelllinien analysiert wurden. Für die Untersuchung der Bcl-x_L-Transkripte erfolgten keine der quantitativen PCR vorausgehenden Analysen mittels qualitativer PCR und Acrylamidgelelektrophorese.

Die bei der TaqMan-PCR eingesetzten Primer wurden alle vor ihrer Verwendung für diese mittels qualitativer PCR getestet.

Die Verdünnungsreihen der Standards und die Probenverdünnungen für die Untersuchungen der Kulturen mit Zelllinien und mit Patientenzellen auf GAPDH, 18S, BMP-2, BMP-4 und Bcl-x_L wurden vor Beginn der eigentlichen Analysen empirisch ermittelt (siehe unten). Hier wurden nur die erprobten optimalen Verdünnungen für die unterschiedlichen Messungen angegeben.

Zuerst wurde versucht, für die Standardreihen cDNA der jeweils zu analysierenden Zelllinien ein zu setzen. Das gemessene Signal war aber bei der Verwendung der cDNA der Linie U-266 für die Standardreihe zu schwach, so dass im weiteren für alle Messungen cDNA der Osteosarkomlinie U2-OS verwendet wurde, bei der sich, wie vorher vermutet, ein starkes Signal zeigte. Auch für Analysen des GAPDH-, BMP-4- und Bcl-x_L-Amplifikates erwies sich das Extrakt dieser Zelllinie für die Messung der Standards als geeignet.

Durchführung

Mastermix:	MasterMix	11,5 µl
	Forward Primer	0,5 µl (10 µM)
	Reverse Primer	0,5 µl (10 µM)
	Sonde	1,0 µl (10 µM)
	A.d.	6,75
		<hr/>
		20,25 µl + 2,5 µl cDNA

Versuche mit Zelllinien:

Standardverdünnungsreihe: 1:10, 1: 40, 1:160, 1:640, 1:2560, 1:10240 (U2-OS)

Probenverdünnung GAPDH: 1:40

Probenverdünnung BMP-2, BMP-4 und Bcl-x_L: 1:4

Versuche mit Patientenmaterial:

Standardverdünnungsreihe: 1:10, 1: 40, 1:160, 1:640, 1:2560, 1:10240 (U2-OS)

Probenverdünnung GAPDH: 1:10 bzw. 1:4

Probenverdünnung BMP-2, BMP-4 und Bcl-x_L: unverdünnt

Material und Methoden

Aus cDNA der Osteosarkom-Zelllinie U2-OS wurde die jeweils beschriebene Verdünnungsstandardreihe hergestellt und die Proben verdünnt (s.o.; beides mit Aqua dest.). Sowohl zu BMP-2 als auch zu BMP-4 und zu Bcl-x_L fand eine Bestimmung des entsprechenden Vergleichsgens statt. Jede Messung wurde als Doppelbestimmung durchgeführt.

Zuerst wurden pro Loch 2,5 µl der jeweiligen cDNA für die Standardreihe und die Proben des Vergleichs- und interessierenden Gens auf die spezielle TaqMan-Mikrotiterplatte gegeben.

Hinzugefügt wurden jeweils 20 µl des zuvor angesetzten Master Mixes (s.o.), die Platte mit den dafür vorgesehenen Deckeln verschlossen, bei 1000 Umdrehungen pro Minute für eine Minute zentrifugiert und in den programmierten Detektor gestellt.

Die Amplifikation erfolgte nach diesem Protokoll:

	Temperatur	Zeit	Anzahl der Wiederholungen
1. Schritt:	50°C	2 min.	0
2. Schritt:	95°C	10 min.	0
3. Schritt:	95°C	15 sec.	40
	60°C	1 min.	

Auswertung

Die Messungsaufnahme und -auswertung erfolgte mit der ABI PRISMTM Sequence Detection Software (Vers. 1.6).

Das Gerät detektierte als Signal so genannte R_n-Werte (normalisierter Reporterfarbstoff), die die Veränderungen in der Fluoreszenz-Emission des Reporter-Farbstoffes aufgrund der Hydrolyse der sequenz-spezifischen Sonde repräsentierten. Störende Fluktuationen der Fluoreszenz wurden mit Hilfe eines dem Reaktionspuffer zugesetzten passiven Referenzfarbstoffes ausgeglichen.

$$R_n = \frac{\text{Emissions-Intensität des Reporterfarbstoffes}}{\text{Emissions-Intensität des Referenzfarbstoffes}}$$

Im Weiteren arbeitete das Programm mit den ΔR_n -Werten. Hier wurden die innerhalb der ersten paar PCR-Zyklen erstellten Hintergrundsignale vom jeweiligen R_n-Wert subtrahiert, um weitere Schwankungen auszugleichen.

Aus den ΔR_n -Werten der für jede TaqMan-Platte und jedes Messobjekt (z. B. GAPDH) neu erstellten Verdünnungsreihen (sechs Proben die im Verhältnis 1:4 verdünnt wurden) und diesen willkürlich im Rahmen der Verdünnungsstufen zugeordneten Startkopienzahlen, erstellte das Programm einen so genannten „Amplification Plot“ (Abb. 5).

Für die Standards war nur eine exakte Angabe der Verdünnungsstufen, nicht aber die absolute Startkopienzahl notwendig, da es sich bei diesem Auswertungsverfahren um eine relative Quantifizierung handelte. In den Amplification Plots musste die Schwelle für die Berechnung der C_T-Werte festgelegt werden. Ein C_T-Wert (Threshold Cycle) ist die Zykluszahl, bei der

zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über die festgelegte Schwelle erfasst wird. Die C_T -Werte, die in dem Amplifikation Plot abgelesen werden konnten, wurden vom Programm für die Erstellung der Standardkurve verwendet.

Über diese Interpolation konnte im Weiteren nun den zu untersuchenden Proben die jeweilige relative Startkopienzahl (dimensionslos) zugeordnet werden.

Sowohl die Standardverdünnungsreihen, als auch die Proben und die Leerwertkontrollen wurden für jedes zu messende Objekt (GAPDH, BMP-2, BMP-4, Bcl-x_L) eigens erstellt und ausgewertet. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmungen aufgenommen.

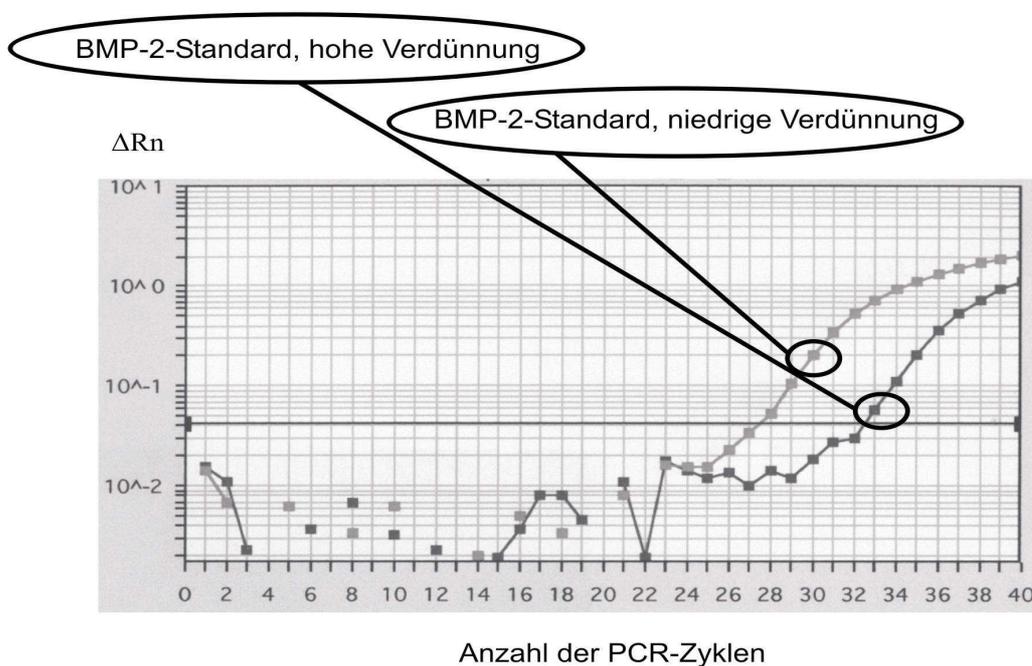


Abbildung 5. Exemplarischer Amplifikation Plot.

Aufgetragen sind die ΔRn -Werte auf der Ordinate gegen die Anzahl der PCR-Zyklen auf der Abszisse zweier BMP-2-Standards der Osteosarkomzelllinie U2-OS in unterschiedlicher Verdünnung.

Aus den Doppelbestimmungen wurden die Mittelwerte berechnet. Zu jedem der interessierenden Amplifikate (BMP-2, BMP-4, Bcl-x_L) wurde ein Vergleichsgen mitbestimmt, in der Modellvorstellung, dass dieses in einer Zelle in einer immer konstant bleibenden Menge transkribiert wird, unabhängig davon, ob sich die Zelle in der Wachstumsphase oder in Apoptose befindet. Hierdurch sollten statistische Schwankungen in der Zellzahleinstellung und Einstellung der Menge der RNA für die cDNA-Synthese ausgeglichen werden, so dass die

Material und Methoden

Mengen an interessierendem Transkript einzelner Stimulationen unmittelbar vergleichbar wurden.

Für Versuche, die mindestens dreimal unabhängig voneinander stattfanden, erfolgte eine Auswertung mit dem Programm SPSS 11.05. Mit diesen Daten wurde der Wilcoxon-Test für paarig verbundene Stichproben durchgeführt, wobei als asymptotische zweiseitige Signifikanz $P=0,05$ festgelegt wurde (für weitere Informationen siehe Abschnitt Ergebnisse).

2.5 Immunchemie

Für die Bestimmung von pMAPK wurden die Myelomzellen der Linien KMS-11, OPM-2 und RPMI-8226 vor Beginn des Versuches für 4 Stunden in RPMI-1860-Medium ohne FCS-Zusatz inkubiert, dann für fünf Minuten mit bzw. ohne IL-6 (10 ng/ml) und/oder B1B1000 (39 nM bis 20 μ M) bebrütet. Danach erfolgten das Ernten der Zellen, das dreimalige Waschen mit PBS und die Lyse in RIPA-Puffer (siehe unten).

2.5.1 Proteinextraktion

Material

RIPA-Puffer: 150 mM NaCl (Merck)
 1,0 % Nonidet P-40 (Sigma)
 0,5 % Deoxycholat (Sigma)
 0,1 % SDS (Serva)
 50 mM Tris Base (Roth)
 pH 8,0 einstellen

frisch dazu:

1 Tbl. Complete Inhibitor Roche 1873580 in zwei ml ddH₂O
25 nM NaF (Sigma)
2,5 nM Na₃VO₄ (Sigma)
6-Loch-Platte (Nunc)
Behältnis mit Eis
Zentrifuge 4K15C (Sigma)
1 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf)

Durchführung

Die einzelnen Versuchsansätze wurden jeweils von der 6-Loch-Platte in Reaktionsgefäße überführt, die Zellen gezählt und für vier Minuten bei 1800 U/Min. zentrifugiert. Es folgte das Aufnehmen von $1 \cdot 10^7$ Zellen in einem ml RIPA-Extraktionspuffer. Die Suspensionen wurden während einer Zeitspanne von 30 Minuten auf Eis aufbewahrt, mehrmals geschüttelt, anschließend für 15

Material und Methoden

Minuten bei 15.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, der Proteinüberstand aliquotiert, die Zellreste verworfen und die Aliquots bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.5.2 Bestimmung des Proteingehaltes der Extrakte mittels pH-modifiziertem Bradford Assay nach Stoschek.

Material

Coomassie Brilliant Blue G Reagenz: 10 mg Serva Blue G (Serva)
10 ml Phosphorsäure 85 % (Merck)
5 ml Ethanol 95 % (Roth)
ad 100 ml Aqua dest. (Millipore-Anlage)

10 M NaOH (Merck)
0,1 % BSA (Sigma)
Reaktionsgefäße (Eppendorf)
Küvette (Uvette 220-1600 nm) (Eppendorf)
Photometer (Eppendorf)

Methode

Die Quantifizierung des Proteingehaltes der Proben erfolgt mittels kolorimetrischem pH-modifiziertem Bradford-Assay nach Stoschek (92). Diese Methode geht auf die Feststellung von Bradford zurück, dass sich das Absorptionsmaximum des Coomassie Brilliant Blue G Reagenzes bei Bindung an Protein von 465 nm zu 595 nm verschiebt (12). Ein Problem dieser Methode ist die Variabilität der Messergebnisse bei der Analyse unterschiedlicher Proteine. Proben verschiedener Proteine, die die gleiche Konzentration aufweisen, führen zu abweichenden Resultaten. Die Variabilität lässt sich durch die Zugabe von NaOH zu den Ansätzen (Stoschek, 1990) reduzieren und die Sensitivität des Proteinnachweises erhöhen.

Durchführung

Zuerst wurde eine Standardkurve ermittelt. In sechs Reaktionsgefäße wurden 1 ml Coomassie Brilliant Blue G und 7 μl 10 M NaOH vorgelegt. Zu den verschiedenen Ansätzen wurden jeweils 1, 2, 4, 8, 16, 25 μl BSA 0,1 % hin zu gegeben. Nach vorsichtigem Durchmischen und einer Inkubationsdauer von 15 Minuten bei Raum-Temperatur erfolgte die Extinktionsmessung bei 595 nm. Es wurde mit Microsoft Excel eine Standardkurve in halblogarithmischer Form erstellt, indem durch die Messwerte eine Regressionsgerade gelegt wurde. Für die Proteinbestimmung im Extrakt wurde zunächst ein Leerwert zur Äquilibration des Photometers bestimmt, indem eine Messung der Extinktion von 1 ml Coomassie Brilliant Blue G und 7 μl 10 M NaOH stattfand. Danach folgte die Extinktionsmessung der Proben bei 595 nm. In die der Probenanzahl entsprechenden Menge an Reaktionsgefäßen wurden ein ml

Material und Methoden

Coomassie Brilliant Blue G und 7 µl 10 M NaOH vorgelegt und jeweils 2 µl der einzelnen Proteinextraktionsgemische zugegeben. Nach vorsichtigem Durchmischen und einer Inkubationsdauer von 15 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Messung bei 595 nm. Die der Extinktion entsprechenden Proteinkonzentrationen konnten anhand der Standardkurve ermittelt werden.

2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Proteinauftrennung

Material

Proteinextrakt

Prestained SDS-Page Standard (Bio-Rad)

Lower Tris (1,5 M) 18,17 g Tris-HCL (Sigma)
(=Tris-hydroxymethyl-aminomethan)-HCL
pH 8,8 einstellen
ad 100 ml Aqua dest.

Upper Tris (0,5 M) 6,06 g Tris-HCL (Sigma)
pH 6,8 einstellen
ad 100 ml Aqua dest.

30 % Acrylamide/Bis Solution (Bio-Rad)

Proteingellaufpuffer (10x) 72 g Glycin (Roth)
15 g Tris-HCL (Sigma)
5 g SDS (Dodecylsulfat Na-Salz) (Serva)
pH 8,6 einstellen
ad 500 ml Aqua dest.

Proteinprobenpuffer (2x)
(Nach Laemmli) 0,125 M Tris-HCL (Sigma)
4 % SDS (Serva)
20 % Glycerol (Merck)
0,004 % Bromphenolblau (Sigma)
10 % β-Mercaptoethanol (Sigma)
pH 6,8 einstellen
ad 10 ml Aqua dest.

APS 10 % (Ammoniumpersulfat) (Sigma)

TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin, 99 %) (Sigma)

n-Butanol (Sigma)

Aqua dest.

Eis

Zentrifuge 4K15C (Sigma)

0,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf)

Gelapparatur, Zehn-Loch-Kamm 0,75 mm (Bio-Rad)

Power Supply

Blockthermostat BT200 (Kleinfeld Labortechnik)

Methode

Polyacrylamidgele entstehen durch Polymerisation von Acrylamid und Vernetzung der linearen Polymere durch N, N'-Methylenbisacrylamid. Der Vernetzungsgrad variiert, und damit kann die Maschenweite der Gele der Größe der zu trennenden Proteine bzw. Nukleinsäuren angepasst werden. Die Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid wird durch Ammoniumpersulfat, das leicht Radikale bildet, initiiert. Als Katalysator dient dabei N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin. Sauerstoff inhibiert diesen Prozess.

Die Acrylamidkonzentration im Polymerisationsansatz bestimmt die Länge der Polyacrylamidketten, die Bisacrylamidkonzentration den Vernetzungsgrad, beide zusammen die Porengröße, Elastizität und Dichte. Mit linearem Gradienten von 5-12% Gesamtkonzentration an Acrylamid und Bisacrylamid (40:1) können Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 20-150 kDa getrennt werden.

Methode der Wahl für die Analyse von Proteinen ist die von Ornstein und Davis entwickelte diskontinuierliche Zonenelektrophorese in ihrer Variante als SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Das großporige Sammelgel und engporige Trenngel unterscheiden sich hierbei in ihrer Zusammensetzung. Letzteres hat eine geringere Porengröße, eine höhere Salzkonzentration und einen höheren pH. Im Proteingellaufpuffer befinden sich Glycin- und im Sammel- und Trenngel Chloridionen. Beim Anlegen einer Spannung wandern die Chloridionen schnell zur Anode, während Glycin nur langsam in das Sammelgel eindringt und sich dort nur langsam bewegt, weil es bei pH 6,8 überwiegend als Zwitterion vorliegt. Zwischen Glycin- und Chloridionen entsteht eine an Ionen verarmte Zone. Im Sammelgel übernehmen die Proteine in der Zwischenzone den Ladungstransport, wobei sie sich direkt hintereinander gemäß ihrer elektrophoretischen Mobilität anordnen. Es resultiert ein Konzentrierungseffekt. Im Trenngel überholen die Glycinionen, die bei pH 8,8 negativ geladen sind, die Proteine. Diese werden im Trenngel gemäß ihrer unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeit vereinzelt.

Durchführung

Die Präparation der 8*10 cm großen Polyacrylamidgele erfolgte nach gründlicher Reinigung und Zusammenbau des Gelelektrophoresezubehörs. Das Stopf- und Trenngel wurden 8 %ig und das Sammelgel 5 %ig gegossen.

Rezeptur:

	Stopfgel	Trenngel	Sammelgel
Lower Tris 1,5 M, pH 8,8	25 %	25 %	0 %
Upper Tris 0,5 M, pH 6,8	0 %	0 %	25 %
Acrylamidlösung (100 %)	8 %	8 %	5 %
SDS 10 %	1 %	1 %	1 %
APS 10 % (-80°C)	2 %	1 %	1 %
TEMED (4°C)	0,3 %	0,1 %	0,1 %
Ad Aqua dest.			

Material und Methoden

Zuerst wurde in den unteren freien Zwischenraum der zwei Glasplatten mit integriertem seitlichem Abstandhalter vorsichtig frisch angesetztes flüssiges Stopfgel pipettiert und abgewartet, bis dies vollständig polymerisiert war. Dann erfolgte die Überschichtung mit Trenngel und, um einen glatten Gelabschluss zu erreichen, mit ca. 200 µl Isobutanol. Nach Aushärten des Trenngels wurde das Isobutanol durch wiederholtes gründliches Spülen mit destilliertem Wasser eliminiert.

In den verbleibenden 1,5 cm großen Freiraum oberhalb des Trenngels wurde das Sammelgel eingebracht und der Plastikkamm eingesetzt.

Es erfolgte die Verdünnung der Proteinextrakte (30 µg pro Spur) 1:1 oder 1:5 mit SDS-Probenpuffer nach Laemmli. Alle Proben wurden vor Auftragen auf das Gel für 10 Minuten bei 95°C denaturiert und kurz zentrifugiert.

Das ausgehärtete Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt, diese mit Proteingellaufpuffer (Ansatz 1:10 verdünnt) gefüllt und der Kamm entfernt. Pro Spur konnte ein maximales Volumen von 20 µl aufgetragen werden, so dass das Extraktvolumen auf 10 µl beschränkt blieb. Es wurden 5 µl SDS-Marker auf die Außenspuren gegeben.

Die Proteingelektrophorese erfolgte bei 20 mA für etwa eine Stunde.

Nach der Auftrennung wurden die Glasplatten aus der Apparatur gelöst, das Gel freigelegt, Lauffront und das Sammelgel mit einem Skalpell entfernt und die Banden des SDS-Markers maßstabgetreu auf ein Papier übertragen. Hieran konnte die Qualität der Proteinauftrennung beurteilt werden.

Bis zum semitrockenen Proteintransfer wurde das Gel in Kathodenpuffer aufbewahrt.

2.5.4 Semitrockener Proteintransfer (Elektroblot-Verfahren)

Material

SDS-Polyacrylamidgel mit elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen

Kathodenpuffer: 0,1 M Arginin (Merck)
0,01 % SDS (Serva)
ad 500 ml Aqua dest.

Anodenpuffer-1: 0,3 M Tris-HCL (Sigma)
20 % Methanol (Merck)
ad 500 ml Aqua dest.

Anodenpuffer-2: 0,025 M Tris-HCL (Sigma)
20 % Methanol (Merck)
ad 500 ml Aqua dest.

Whatman Filterpapier

PVDF-Membran (Immobilon-P, 0,45 µm PS) (Millipore)

100 % Methanol (Merck)

Plastikschalen 10x15 cm

Elektrobloteinheit TRANS-BLOT SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad)

Power Supply

Methode

Die Technik des semitrockenen Proteintransfers wurde erstmals von H. Towbin et al. 1979 und W. Burnette 1981 beschrieben. Der Transfer erfolgt von einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidendifluorid- (PVDF) Membran. Der Vorteil dieses Transfers liegt in der einfacheren, besser zugänglichen und sensitiveren Analysemöglichkeit von membrangebundenen Proteinen. Für die Transferprozedur werden das SDS-Gel und die Membran horizontal zwischen Puffer-getränkten Papieren platziert (Sandwich-Aufbau), an die ein elektrisches Feld angelegt wird. Zu beachten ist, dass die Transfargeschwindigkeit von der Proteingröße und von der Stromstärke abhängt. Gemäß der negativen Ladung der Proteine im SDS-Gel wandern sie im elektrischen Feld in Richtung Anode. Sie werden aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an die Membranoberfläche gebunden. Dieser Effekt wird durch vorherige Methanolaktivierung der Membran verstärkt.

Durchführung

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 15 Minuten in Kathodenpuffer äquilibriert, die PVDF-Membran auf die exakte Größe des Proteingels zugeschnitten, für 5 Sekunden zur Aktivierung der Membranoberfläche im Methanolbad gelagert, zwei Minuten in Aqua dest. geschwenkt und anschließend für kurze Zeit zur pH-Angleichung in Anodenpuffer 2 gegeben. Es folgte der Elektrobplot-Sandwichaufbau. Auf die sich bei dieser Apparatur unten befindende Anode wurden zwei Lagen Anodenpuffer1-getränktes und vier Lagen Anodenpuffer2-getränktes Whatman-Papier aufgebracht, die etwas größer als das Gel und die Membran waren. Darauf wurden vorsichtig erst die Membran und dann das Gel platziert. Dabei war auf absolute Luftblasenfreiheit zwischen den einzelnen Schichten zu achten, um Transfereinbußen zu vermeiden. Der Sandwich-Aufbau wurde durch sechs Lagen Kathodenpuffer-getränktes Whatman-Papier vervollständigt. Der Transfer erfolgte über 2 Stunden bei $0,8 \text{ mA/cm}^2$.

2.5.5 Immunoblotanalyse

Material

PVDF Membran mit transferierten Proteinen

Plastikschalen

Western Blot Luminol Reagent (Santa Cruz)

BioMax Light Film (Kodak)

TTBS-Blockierungspuffer

2 % Magermilchpulver (Roth)
50 mM Tris-HCL (Sigma)
0,15 M NaCl (Merck)
0,05 % Tween-20 (Sigma)
pH 7,5 einstellen

Material und Methoden

TTBS-Waschpuffer	ad 1000 ml Aqua dest. 50 nM Tris-HCL (Sigma) 0,15 M NaCl (Merck) 0,05 % Tween-20 (Sigma) pH 7,5 einstellen ad 1000 ml Aqua dest.
Primäre Antikörperlösung (Aktin):	monoclonal mouse anti-human- β -Aktin
pMAPK; p44/p42:	ad 2 ml TTBS-Waschpuffer (Sigma) polyclonal rabbit-anti-human-phospho-MAPK ad 2 ml TTBS-Waschpuffer (Sigma)
Sekundäre Antikörperlösung:	rabbit anti-mouse-HRP (abcam) ad 10 ml TTBS-Waschpuffer goat-anti-rabbit-HRP (Sigma) ad 10 ml TTBS-Waschpuffer

Durchführung

Nach dem semitrockenen Proteintransfer wurde die Membran für kurze Zeit mit PBS (1x) gespült. Danach fand die Blockierung der Membran in TTBS-Blockierungspuffer über eine Stunde bei 20 U/min bei Raumtemperatur statt. Die Blockierungslösung wurde verworfen, die Membran zweimal mit TTBS-Puffer gewaschen und die jeweilige primäre Antikörperlösung hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C und 20 Umdrehungen pro Minute. Anschließend wurde die Antikörperlösung verworfen, die Membran viermal 10 Minuten in TTBS-Waschpuffer geschwenkt, für zwei Stunden bei Raumtemperatur bei 20 U/min. mit dem jeweiligen sekundären Antikörper inkubiert und im Anschluss erneut viermal für 10 Minuten in TTBS-Waschpuffer geschwenkt.

Die Luminol-Reagenzien A und B wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, ein Gesamtvolumen von 1 ml pro Membran zu diesen gegeben, 1 Minute inkubiert, der Überstand vorsichtig abgegossen und die Membran zwischen durchsichtige Gefrierfolie gelegt. Der Transport zum Entwicklungsgerät erfolgte in einer Entwicklungsbox. In der Dunkelkammer fand die Exposition des vorsichtig auf die sich in der Gefrierfolie befindende Membran gelegten Films statt, wobei darauf geachtet werden musste, dass die Seite der Membran, an der die Proteine hafteten, zum Film zeigte. Die Exposition dauerte je nach benutztem Erstantikörper wenige Sekunden bis Minuten. Der exponierte Film wurde vorsichtig in das Entwicklungsgerät gegeben.

2.5.6 Sandwich-ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay)

Material

Zellkulturüberstände

Proteinextrakte

Quantakine BMP-2 Kit (R&S Systems)

Pipetten 1 ml, 200 µl 100 µl, 20 µl, 10 µl und Spitzen (Eppendorf)

Shaker

Aqua dest.

Medgenix 400 (Medgenix Diagnostics)

Durchführung

Alle Reagentien wurden wie in der Produktbeschreibung aufgeführt zubereitet. In jedes Loch der mit monoklonalen Antikörpern gegen BMP-2 beschichteten Mikrotiterplatte wurden 100 µl Assay Diluent RD1-19 gegeben. Die Verdünnung der Proteinextrakte mit Calibrator Diluent RD5P (1X) erfolgte so, dass in jeder aufzutragenden Probe die gleiche Menge Gesamtprotein enthalten war. Zellkulturüberstände blieben unverdünnt. Mittels BMP-2-Standard (20.000 pg/ml) wurde eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen von 4000 pg/ml, 2000 pg/ml, 1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml und 62,5 pg/ml hergestellt. Es wurden entweder 50 µl von den verdünnten Proteinextrakten, von den Zellkulturüberständen oder von den Standards in ein Loch gegeben, und für zwei Stunden bei Raumtemperatur bei 500 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Nach Abnehmen der Überstände und viermaligem Waschen mit Waschpuffer (1x) wurden jeweils 200 µl BMP-2 Konjugat, in dem ein weiterer spezifisch bindender, an ein Enzym gekoppelter, monoklonaler Antikörper gegen BMP-2 enthalten war, pro Loch auf die Mikrotiterplatte gegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von zwei Stunden bei 500 Umdrehungen pro Minute, erneutem Aspirieren des Überstandes und viermaligem Waschen erfolgte die Zugabe von 200 µl Substrat-Lösung pro Loch, die das spezifisch von dem an den BMP-2 Antikörper gebundenen Enzym umgesetzte Substrat enthielt. Das Gemisch wurde über 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur unter ständiger Kontrolle, um ein Verlassen des linearen Messbereiches zu verhindern, inkubiert. Der Farbumschlag verhielt sich proportional zur Menge des enthaltenen Antigens. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 50 µl Stopp-Lösung hinzugegeben. Die Messung der optischen Dichte fand bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Korrektur von 540 nm statt.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wird die Bedeutung von endogenem BMP im Multiplen Myelom beschrieben. Zur Induktion von Apoptose wurde hauptsächlich ein RTKI, das BIBF1000, eingesetzt, der die VEGF-Rezeptoren 1 bis 3, die FGF-Rezeptoren 1 und 3 und den PDGF-Rezeptor α inhibiert.

Vergleichend wurden die Effekte des RTKI bei Myelomzellen, die durch die Translokation t(4;14)(p16.3;q32) den FGF-Rezeptor FGFR3 überexprimieren, und bei Myelomzellen, die diese Translokation nicht aufweisen, untersucht.

Zur Kontrolle wurde die Transkriptionsrate des anti-apoptotischen Proteins Bcl-x_L bestimmt. Zudem ist bekannt, dass exogenes BMP-2 bei Myelomzellen die Bcl-x_L-Transkription herunterreguliert und eine Überexpression des FGFR3 eine vermehrte endogene Bcl-x_L-Transkription bedingt.

Um zu überprüfen, ob es sich um Substanz-spezifische Effekte des RTKI auf die BMP Expression handelt, wurde Apoptose mit zwei weiteren Substanzen bei Myelomzellen induziert, und zwar mit Dexamethason und Retinolsäure.

Da BMP-2 und BMP-4 zu derselben Untergruppe von BMPs gehören, wurde des Weiteren untersucht, ob sich für die BMP-4-Transkription gleichsinnige Effekte wie für die BMP-2-Transkription aufzeigen lassen.

Die Ergebnisse für die Myelomzelllinien bezüglich der BMP-2 und BMP-4-Transkript Regulation wurden an Myelomzellen von an Multiplem Myelom erkrankten Patienten verifiziert.

Zudem wurden Zellextrakte und Kulturüberstände auf BMP-2 Protein untersucht und dieses quantifiziert.

3.1 Inhibition der Proliferation verschiedener Myelomzelllinien durch den RTKI BIBF1000.

Zunächst wurde der Einfluss des RTKI BIBF1000 auf die Proliferation von verschiedenen Myelomzelllinien untersucht.

Myelomzellen der Linien RPMI-8226, U-266, OPM-2 und KMS-11 wurden für 72 Stunden mit dem RTKI in den Konzentrationen 5, 50, 125, 250, 500 und 1000 nM versetzt und die ³H-Thymidin-Aufnahme bestimmt (Abb. 6). Dabei erfolgten Vergleiche der mit unterschiedlichen Konzentrationen von BIBF1000 inhibierten Ansätze zu den jeweiligen Kontrollen ohne den RTKI.

Während sich RPMI-8226-Zellen als relativ resistent gegen die Hemmung durch BIBF1000 zeigten, war bei U-266 eine mittlere Sensitivität mit Abnahme der Proliferation um 20 bis 40 % durch 500 und 1000 nM BIBF1000 zu verzeichnen. Die größten Effekte des RTKI auf die Proliferation wurden bei den t(4;14)-positiven, FGFR3-überexprimierenden Zellen KMS-11 und OPM-2 beobachtet. Bei diesen Zelllinien konnte durch 1000 nM BIBF1000 eine Inhibition der Proliferation um mehr als 70 % gezeigt werden (P<.001 für jede Zelllinie versus Kontrolle ohne BIBF1000).

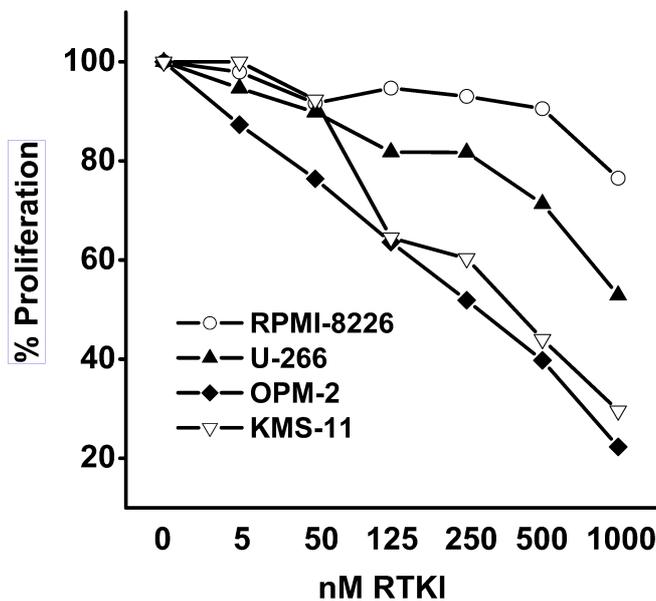


Abbildung 6. Konzentrationsabhängige Inhibition der Myelomzellproliferation durch den RTKI BIBF1000.

Dargestellt ist jeweils die ³H-Thymidin-Aufnahme von RPMI-8226, U-266, OPM-2 und KMS-11 nach 72 Stunden Kultur als Mittelwert aus Dreifachbestimmungen zweier unabhängiger Experimente pro Zelllinie. Die ³H-Thymidin-Aufnahme wurde jeweils zu einer Kontrolle ohne den RTKI in Bezug gesetzt.

3.2 Induktion von Apoptose durch den RTKI BIBF1000 bei verschiedenen Myelomzelllinien

Zelllinie	t(4;14)	Apoptotische Zellen (% , Mittelwert +/- SEM), Annexin V positiv				
		nativ	BIBF1000			
			500 nM	P1*	500 nM + IL-6	P2*
KMS-11	+	17,8 +/- 3,4	41,9 +/- 8,0	0,011	33,6 +/- 5,8	n. s.
KMS-18	+	10,4 +/- 2,5	37,5 +/- 14,3	0,008	31,8 +/- 12,1	n. s.
OPM-2	+	15,4 +/- 2,2	34,1 +/- 7,6	0,026	25,2 +/- 10,4	n. s.
RPMI-8226	-	8,6 +/- 2,7	8,7 +/- 3,3	n. s.	10,9 +/- 2,4	n. s.
U-266	-	6,9 +/-1,0	8,5 +/- 1,6	n. s.	10,1 +/- 1,5	n. s.

Tabelle 2. Durchflusszytometrische Quantifizierung der Apoptoseinduktion bei fünf verschiedenen Myelomzelllinien durch den RTKI BIBF1000.

Die Daten sind als Mittelwert +/- Standardabweichung (SEM) für drei voneinander unabhängige Experimente pro Zelllinie dargestellt (*P1: native Kontrolle versus 500 nM BIBF1000; *P2: 500 nM BIBF1000 versus 500 nM BIBF1000 + IL-6 (10 ng/ml); n. s.: nicht signifikant).

Ergänzend zu den Effekten des RTKI auf die Proliferation konnte bei den t(4;14)-positiven Zelllinien KMS-11, KMS-18 und OPM-2 eine signifikante Induktion von Apoptose durch Inkubation mit dem RTKI (500 nM) festgestellt werden. Bei KMS-11 Zellen kam es zu einer Zunahme der Apoptose um 24,1 % (P1=0,011), bei KMS-18 um 27,1 % (P1=0,008) und bei OPM-2 um 18,7 % (P1=0,026). Alle Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt (Tabelle 2).

Die Kontrollversuche mit RPMI-8226 und U-266 zeigten keine signifikante proapoptotische Wirkung des BIBF1000 (500 nM) auf diese nicht t(4;14)-translozierten Zelllinien (Tabelle 2).

Die durch BIBF1000 induzierte Apoptose war bei KMS-11, KMS-18 und OPM-2 durch die Stimulation mit IL-6 (10 ng/ml) partiell, aber nicht signifikant reversibel (Tabelle 2).

3.3 RTKI-induzierte Inhibition der MAPK (p44/42)-Phosphorylierung bei t(4;14)-positiven Myelomzellen.

IL-6 ist ein bedeutender Wachstumsfaktor im Multiplen Myelom und die Signaltransduktion wird unter anderem über eine Phosphorylierung der MAPK vermittelt.

Der apoptotische Stimulus des RTKI BIBF1000 wird zum Teil durch Interleukin-6 aufgehoben (siehe Tabelle 2).

In Ergänzung der Daten zur Proliferation und Apoptose wurden Ansätze der t(4;14)-positiven Linien KMS-11 und OPM-2 und der nicht t(4;14)-dysregulierten RPMI-8226 mit 500 nM BIBF1000 und/oder IL-6 (10 ng/ml) versetzt und aus den jeweiligen Zellextrakten pMAPK (p44/42) und als Vergleich β -Aktin durch Western Blot nachgewiesen.

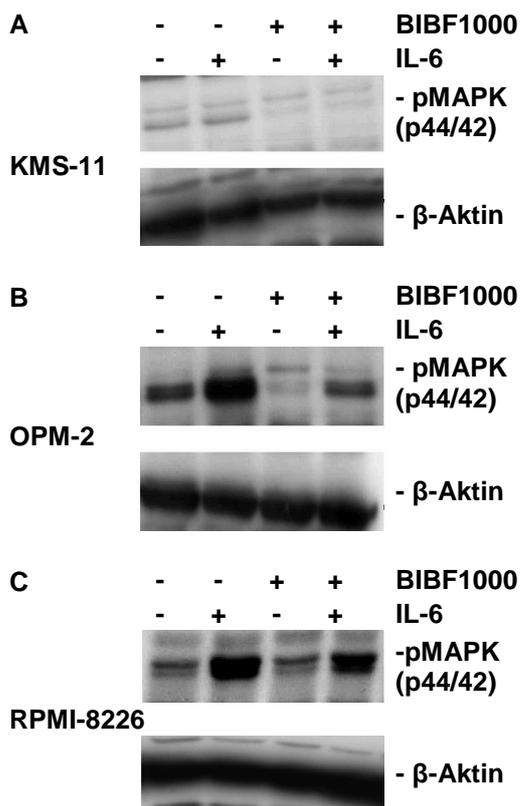


Abbildung 7. BIBF1000-induzierte Inhibition der MAPK (p44/42)-Phosphorylierung bei t(4;14)-positiven Myelomzellen.

Gezeigt sind Western Blots der Zelllinien KMS-11 (A), OPM-2 (B) und RPMI-8226 (C). Die Zellen wurden jeweils unterschiedlichen Kombinationen von BIBF1000 (500 nM) und IL-6 (10 ng/ml) exponiert.

Bei Zellen der Linie KMS-11, die durch die Translokation t(4;14) den Rezeptor FGFR3 übermäßig exprimieren, induzierte IL-6 im Vergleich zum nativen Versuch die MAPK-Phosphorylierung. In Konzentrationen, in denen der RTKI auch signifikant zu Apoptose führt (Tabelle 2), vermindert er die

Ergebnisse

Phosphorylierung der MAPK gegenüber der nativen Kontrolle und kann den anti-apoptotischen Stimulus des IL-6 fast vollständig aufheben (Abb. 7A).

Auf die gleichermaßen (4;14)-translozierten Zellen der Myelomlinie OPM-2 besaß der RTKI eine gleichsinnige, noch stärker ausgeprägte Wirkung als auf KMS-11. Hier konnte durch IL-6 ebenfalls eine vermehrte MAPK-Phosphorylierung verzeichnet werden, die durch 500 nM BIBF1000 stark antagonisiert wurde (Abb. 7B).

BIBF1000 nahm bei der t(4;14)-negativen Zelllinie RPMI-8226 keinen erkennbaren Einfluss auf die MAPK-Phosphorylierung (Abb. 7C).

3.4 Induktion von Apoptose durch Dexamethason und all-trans-Retinolsäure bei Myelomzellen.

Beispielhaft wurde für die Myelomzelllinie KMS-11 gezeigt, dass sowohl Dexamethason (10 μM) als auch all-trans-Retinolsäure (1 μM) Apoptose induzieren. Hier wurden sieben voneinander unabhängige Experimente durchgeführt und die Rate apoptotischer Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Durch Retinolsäure stieg die Rate apoptotischer Zellen von 14,9 % auf 27,5 % und durch Dexamethason von 14,9 % auf 29,2 % (Abb. 8A).

Zur Kontrolle wurde die Steroid-resistente Zelllinie RPMI-8226 untersucht. Hier ließ sich, wie zu erwarten, keine Apoptose nach Inkubation der Zellen für 24 h mit Dexamethason auslösen. Auch auf all-trans-Retinolsäure reagierten die Zellen nicht (Abb. 8B).

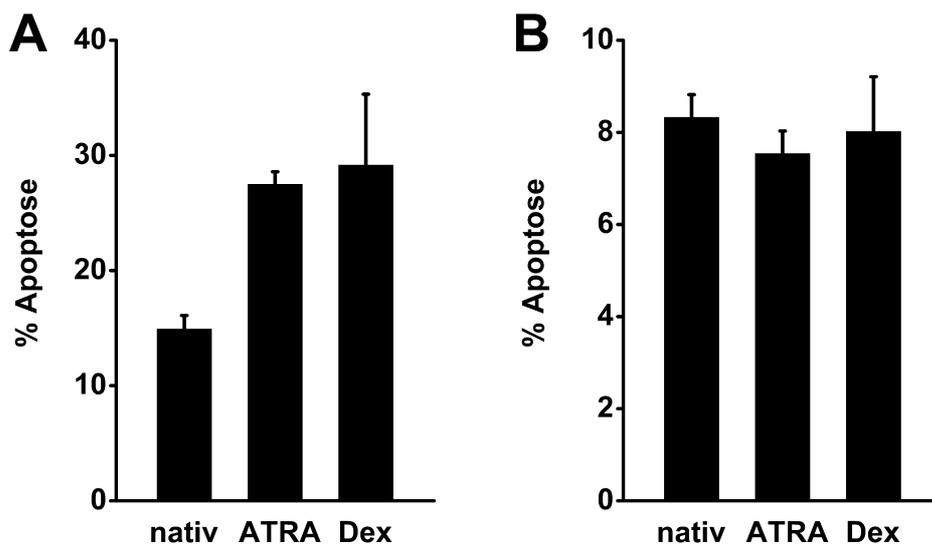


Abbildung 8. Induktion von Apoptose durch Dexamethason und Retinolsäure.

Dargestellt ist jeweils die Apoptose in % bei Myelomzellen der Linie KMS-11(A) und RPMI-8226 (B) unter nativen Bedingungen, nach Stimulation für 24 h mit Retinolsäure (1 μM) oder mit Dexamethason (10 μM) (Quantifikation mittels Durchflusszytometrie).

3.5 Qualitative Expressionsanalyse von BMP-2- und BMP-4-Transkript bei fünf Myelomzelllinien.

Es ist bekannt, dass exogenes BMP-2 und BMP-4 bei Myelomzellen Apoptose induzieren. Bislang liegen keine Untersuchungen zu einer endogenen BMP Expression im Multiplen Myelom vor.

Deswegen wurde in dieser Arbeit zunächst exemplarisch überprüft, ob folgenden fünf gut charakterisierte Myelomzelllinien, RPMI-8226, U-266, OPM-2, KMS-11 und KMS-18, in detektierbarem Umfang BMP-2- und BMP-4-Transkript exprimieren. Mittels qualitativer PCR und nachfolgender Polyacrylamidgelelektrophorese erfolgte eine Detektion des BMP-2- und BMP-4-Transkriptes der fünf genannten Zelllinien. Als Kontrolle diente jeweils die Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase-mRNA (GAPDH).

Es zeigte sich, dass alle untersuchten Myelomzelllinien unter nativen Kulturbedingungen in messbarem Umfang sowohl BMP-2- als auch BMP-4-Transkript exprimieren (Abb. 9).

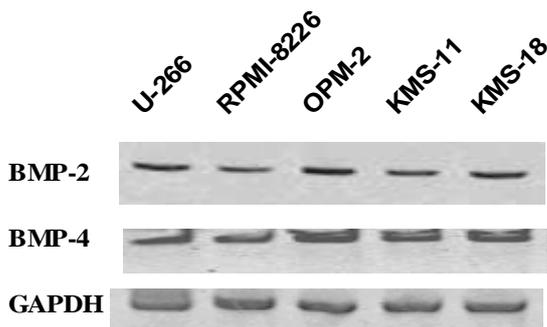


Abbildung 9. Expression von BMP-2- und BMP-4-Transkript durch fünf Myelomzelllinien.

Dargestellt sind Photographien von Acrylamidgelen nach qualitativer RT-PCR mit nativem Material der Myelomzelllinien KMS-11, KMS-18, OPM-2, PRMI-8226 und U-266. Es wurden jeweils die BMP-2-, BMP-4- und GAPDH-mRNA detektiert.

3.6 Quantitative Expressionsanalyse von BMP-2-Transkript

Nachdem der qualitative Nachweis von BMP-2-Transkript bei verschiedenen Myelomzelllinien gelungen war, wurde die Regulation unter apoptotischen bzw. Proliferations-permissiven Zellkulturbedingungen untersucht und mittels TaqMan™ PCR Assay analysiert.

Die unter Punkt 3.6.1 und 3.6.2 beschriebenen Versuche fanden jeweils dreimal voneinander unabhängig als Doppelbestimmungen statt. Die Verhältnisse von BMP-2- zu Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase-(GAPDH)-Transkript wurden ermittelt, die Ergebnisse durch den Wilcoxon-Test für paarig verbundene Stichproben ausgewertet und im Folgenden als Mittelwerte dargestellt. Als zweiseitig asymptotisch signifikant gilt ein P-Wert von kleiner oder gleich 0,05. Die Daten wurden auf den jeweiligen Nativwert normiert.

Stimulationen mit Dexamethason (10 µM), all-trans-Retinolsäure (1µM) und BIBF1000 (0,5 µM) unter 3.6.3 wurden zweimal voneinander unabhängig als Doppelbestimmungen durchgeführt. Bei diesen Daten handelt es sich ebenfalls ausnahmslos um Quotienten aus BMP-2- zu GAPDH-mRNA. Auf eine teststatistische Auswertung wurde auf Grund der geringen Fallzahl verzichtet.

3.6.1 Effekte des RTKI BIBF1000 auf die BMP-2-Transkription von t(4;14)-positiven Myelomzelllinien.

Um Veränderungen der Menge des BMP-2-Transkriptes durch den RTKI BIBF1000 bei den Myelomzellen KMS-11 und KMS-18 zu analysieren, erfolgte eine Zeitkinetik über 24, 48 und 72 Stunden in Präsenz von 500 nM oder 1000 nM BIBF1000. Zur Kontrolle wurden gleichzeitig jeweils ein nativer Ansatz sowie eine Stimulation nur mit IL-6 (10 ng/ml) durchgeführt.

Bei den t(4;14)-FGFR3-mutierten KMS-11 zeigte sich nach 24 Stunden durch Inhibition mit 500 nM BIBF1000 ein 2,5facher und mit 1 µM BIBF1000 ein 3,2facher jeweils signifikanter Anstieg des BMP-2-GAPDH-Verhältnisses gegenüber der nativen Kontrolle (Abb. 10A; nativ vs. 500 nM BIBF1000: P=0,046; nativ vs. 1 µM BIBF1000: P=0,028).

Nach 48 Stunden war bei KMS-11 ebenfalls eine signifikante Zunahme der Menge der BMP-2-mRNA zu verzeichnen, und zwar durch 500 nM BIBF1000 auf das 2,9fache und durch 1 µM BIBF1000 auf das 2,1fache im Vergleich zur BMP-2-Grundexpression der nativen Zellen (Abb. 10B; nativ vs. 500 nM BIBF1000: P=0,028; nativ vs. 1 µM BIBF1000: P=0,028).

Bei einer Expositionszeit von 72 Stunden wurde der stimulierende Effekt des RTKI auf die BMP-2-mRNA-Expression von KMS-11 am deutlichsten. Durch Exposition gegenüber 500 nM BIBF1000 stieg das Verhältnis von BMP-2 zu

Ergebnisse

GAPDH auf das 4,6fache und durch 1 μM BIBF1000 auf das 11,7fache gegenüber der Kontrolle ohne den RTKI (Abb. 10C; nativ vs. 500 nM BIBF1000: $P=0,028$; nativ vs. 1 μM BIBF1000: $P=0,046$).

Durch Stimulation der KMS-11-Zellen mit IL-6 (10 ng/ml) konnte sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden eine Abnahme der BMP-2-mRNA-Expression nachgewiesen werden.

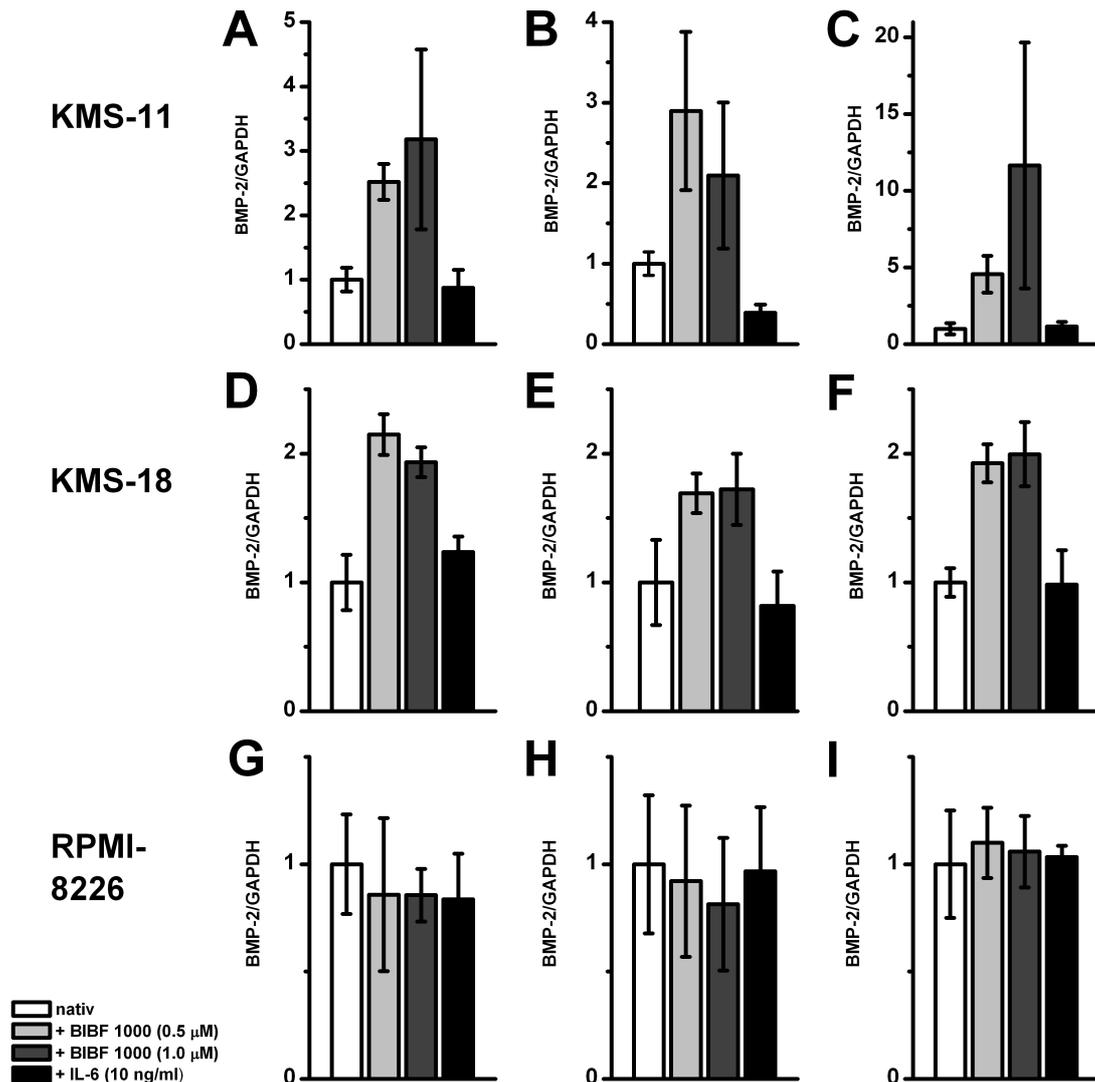


Abbildung 10. Signifikant gesteigerte Expression von BMP-2-Transkript durch den RTKI bei Myelomzelllinien mit der Translokation t(4;14).

Dargestellt sind quantitative BMP-2-RT-PCR Daten der t(4;14)-positiven Myelomzelllinien KMS-11 (A,B,C), KMS-18 (D,E,F) und der t(4;14)-negativen RPMI-8226 (G,H,I) nach Exposition gegenüber dem RTKI BIBF1000 (0, 500, 1000 nM) oder IL-6 (10 ng/ml). Gezeigt werden die BMP-2-GAPDH-Quotienten als Mittelwerte mit den jeweiligen Standardabweichungen.

Ergebnisse

Die Menge des BMP-2 betrug nach 24 Stunden noch 87 % und nach 48 Stunden 39 % (signifikant) des nativen Ansatzes (Abb. 10A, 10B; 48h: nativ vs. IL-6, $P=0,028$). Nach 72 Stunden war eine leichte Zunahme der BMP-2-Transkription zu detektieren, und zwar um 15 % (Abb. 10C).

Die ebenfalls die Translokation (4;14) aufweisenden und den FGFR3 überexprimierenden Zellen der Myelomlinie KMS-18 zeigten insgesamt, ähnlich wie KMS-11, einen Anstieg der Expression von BMP-2-Transkript durch den RTKI BIBF1000.

Bei einer Versuchszeit von 24 Stunden konnte durch 500 nM BIBF1000 eine signifikante Zunahme des BMP-2-GAPDH-Verhältnisses auf 215 % und durch 1 μ M BIBF1000 auf 193 % im Vergleich zu dem nativen BMP-2-mRNA-Spiegel beobachtet werden (Abb. 10D; nativ vs. 500 nM BIBF1000: $P=0,028$; nativ vs. 1 μ M BIBF1000: $P=0,028$).

Nach 48h zeigte sich ein jeweils nicht signifikanter Anstieg des BMP-2-Transkriptes auf das 1,7fache (sowohl bei 500 nM als auch bei 1 μ M BIBF1000) (Abb. 10E).

Durch die lange Inkubationszeit von 72 Stunden stellte sich der stimulierende Effekt des RTKI BIBF1000 auf die BMP-2-mRNA-Expression der KMS-18 nicht stärker dar als nach 24 Stunden. Durch die Inkubation mit 500 nM BIBF1000 stieg das gemessene BMP-2-GAPDH-Verhältnis im Vergleich zu dem basalen BMP-2-Spiegel signifikant auf 193 % und durch 1 μ M BIBF1000 ebenfalls signifikant auf 200 % (Abb. 10F; nativ vs. 500 nM BIBF1000: $P=0,028$; nativ vs. 1 μ M: $P=0,028$).

Für diese Zelllinie fanden ebenfalls Vergleiche des BMP-2-Transkript-Spiegels zwischen den Kontrollen und mit IL-6 (10 ng/ml) stimulierten Ansätzen statt. Dabei ließen sich keine signifikanten Unterschiede der BMP-2-mRNA-Expression erkennen (Abb. 10D, 10E, 10F; 24h: + IL-6 (1,24); 48h: + IL-6 (0,82); 72h: + IL-6 (1,0)).

3.6.2 Effekte des RTKI BIBF1000 auf die BMP-2-Transkription von t(4;14)-negativen Myelomzelllinien.

Auch mit den nicht t(4;14)-translozierten Zellen der Myelomlinie RPMI-8226 und U-266 fanden, äquivalent zu den oben beschriebenen Versuchsreihen, Experimente über 24, 48 und 72 Stunden statt. Eingesetzt wurde der RTKI BIBF1000, 500 nM und 1 μ M, und IL-6 (10 ng/ml), aber keine Kombinationen dieser Stoffe (Abb. 10G; 10H, 10I).

Bei einem Vergleich zwischen den BMP-2-GAPDH-Quotienten des jeweiligen nativen Experimentes mit einem mit 500 nM BIBF1000 oder mit 1 μ M BIBF1000 versetzten Ansatz, konnte zu keiner Zeit eine Regulation der BMP-2-Expression

Ergebnisse

durch diese Substanz festgestellt werden (RPMI-8226: 24 h: nativ (1,0), + 500 nM BIBF1000 (0,9), + 1 μ M BIBF1000 (0,9), + IL-6 (0,8); 48h: nativ (1,0), + 500 nM BIBF1000 (0,9), + 1 μ M BIBF1000 (0,8), + IL-6 (1,0); 72h: nativ (1,0), + 500 nM BIBF1000 (1,1), + 1 μ M BIBF1000 (1,1), + IL-6 (1,0)).

Die folgenden Daten zu U-266 sind graphisch nicht dargestellt (U-266: 24 h: nativ (0,7), + 500 nM BIBF1000 (1,2), + 1 μ M BIBF1000 (0,5), + IL-6 (0,4); 48 h: nativ (0,9), + 500 nM BIBF1000 (1,6), + 1 μ M BIBF1000 (0,5), + IL-6 (0,5); 72 h: nativ (1,5), + 500 nM BIBF1000 (1,0), + 1 μ M BIBF1000 (1,1), + IL-6 (0,8);).

Bei der Zelllinie U-266 ließ sich eine Herunterregulation der BMP-2-Transkription durch IL-6 sowohl nach 24 h, als auch nach 48 und 72 h erkennen.

3.6.3 Wirkungen von Dexamethason, ATRA und/oder RTKI auf die BMP-2-Transkription der t(4;14)-translozierten Myelomzelllinie KMS-11.

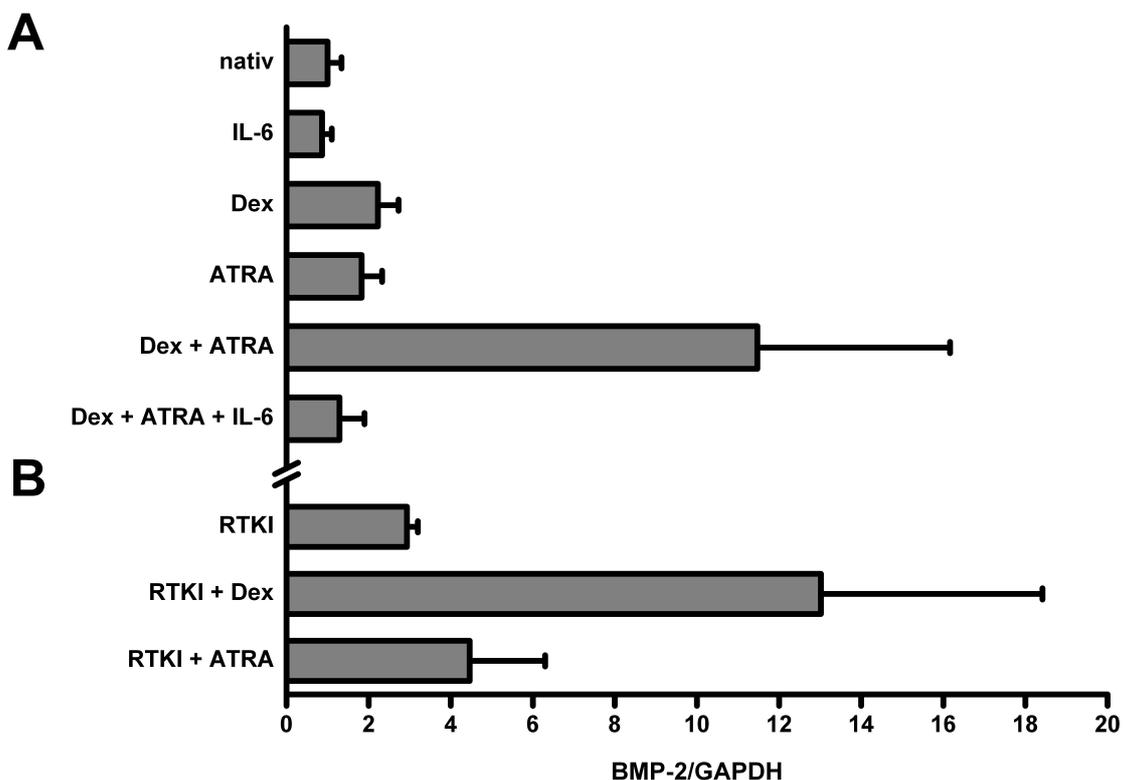


Abbildung 11. Effekte von Dexamethason, Retinolsäure und BIBF1000 auf die BMP-2-Transkription von Myelomzellen der t(4;14) FGFR3-dysregulierten Linie KMS-11.

Dargestellt sind quantitative PCR-Daten von Ansätzen mit KMS-11 über 24 Stunden, die Kombinationen von 10 μ M Dexamethason und 1 μ M ATRA (A) bzw. Kombinationen von 10 μ M Dexamethason, 1 μ M ATRA und 500 nM BIBF1000 (B) exponiert wurden. Gezeigt sind die jeweiligen BMP-2-GAPDH-Quotienten als Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Ergebnisse

Nachdem deutlich wurde, dass der RTKI einen hochregulierenden Effekt auf die Expression von BMP-2-Transkript durch Myelomzellen, die die Translokation (4;14) aufweisen, besaß, ergab sich die Fragestellung, ob weitere Substanzen, die bei Myelomzellen Apoptose induzieren, ebenfalls Regulationen erkennen ließen und ob diese Effekte additiv waren. Dazu fanden Ansätze mit Dexamethason, ATRA und Kombinationen dieser Stoffe untereinander und 500 nM BIBF1000 statt. Die Versuche erfolgten als Doppelbestimmungen mit Zellen der Linie KMS-11 über 24 Stunden. Zur Analyse wurden die Quotienten von BMP-2 zu GAPDH aus den jeweiligen Mittelwerten der Doppelbestimmungen berechnet. Oben angegebene Konzentrationen der eingesetzten Substanzen blieben für alle in diesem Abschnitt beschriebenen Ansätze konstant.

Durch Inhibition von Myelomzellen der Linie KMS-11 mit Dexamethason ohne BIBF1000 bzw. mit ATRA ohne BIBF1000 zeigte sich gegenüber dem basalen BMP-2-mRNA-Spiegel jeweils eine Zunahme des BMP-2-Transkriptes auf das 2,2 bzw. 1,8fache (Abb. 11A: nativ (1,0), + Dex (2,2), + ATRA (1,8)). Bei Inkubation der Zellen mit Dex und ATRA ohne BIBF1000 war im Vergleich zu dem nativen Wert ein Anstieg des BMP-2-GAPDH-Quotienten auf das 11,5fache zu verzeichnen (Abb. 11A: nativ (1,0), + Dex + ATRA (11,5)).

Zusätzlich fanden Ko-Inkubationen von Zellen der Linie KMS-11 mit Dexamethason, ATRA und BIBF1000 statt. Bei Inhibition dieser Myelomzellen mit Dexamethason und BIBF1000 stieg die Expression von BMP-2-Transkript im Vergleich zu nativen Bedingungen auf das 13fache (Abb. 11B: + BIBF1000 (2,9), + BIBF1000 + Dex (13,0)).

Nach Inkubation von KMS-11 mit BIBF1000 und ATRA zeigte sich verglichen mit dem nativen Ansatz eine Zunahme der BMP-2-mRNA auf 450 % (Abb. 11B: + BIBF1000 (2,9), + BIBF1000 + ATRA (4,5)).

Insgesamt zeigte sich im Vergleich zu dem Ansatz, bei dem die KMS-11 Zellen nur mit Dexamethason und/oder ATRA versetzt wurden, deutlich, dass zusätzliche Inkubation der Myelomzellen mit BIBF1000 zu einer basalen Erhöhung der BMP-2-Transkription führte, zu der sich gleichsinnige Effekte der beiden anderen Substanzen addierten.

3.7 Quantitative Expressionsanalyse von BMP-4-Transkript

Da BMP-2 und BMP-4 zu derselben Untergruppe von BMPs gehören, stellt sich die Frage, ob die endogene BMP-4- die BMP-2-Expression widerspiegelt.

Hierzu wurden Zellen von der t(4;14)-translozierten Myelomlinie KMS-11 mit dem RTKI BIBF1000 in den Konzentrationen 500 nM oder 1000 nM für 120 Stunden inkubiert (kürzere Inkubationszeiten zeigten keine Effekte auf die BMP-4 Transkription, Daten nicht gezeigt).

Die BMP-4-mRNA wurde mittels TaqMan™ PCR Assay quantifiziert und relativ zu der als Kontrolle bestimmten GAPDH dargestellt. Die Versuche wurden jeweils zweimal unabhängig voneinander als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Für die Zelllinie KMS-11 konnte sowohl für den RTKI 500 nM als auch 1000 nM ein Anstieg des BMP-4 Transkriptes gegenüber der nativen Kontrolle festgestellt werden, und zwar jeweils um das 4,2fache bzw. das 7,5fache (Abb. 12).

Die BMP-4 Transkription wurde außerdem unter anti-apoptotischen Bedingungen untersucht. Hier ließ sich keine Regulation feststellen (BMP-4/GAPDH: + IL-6 1,0).

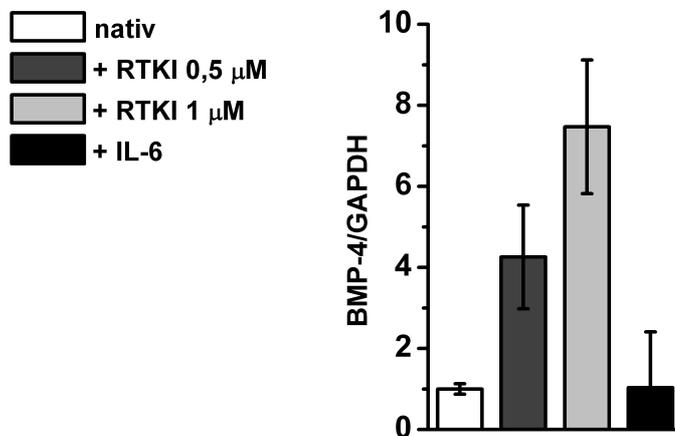


Abbildung 12. Effekte des RTKI bzw. IL-6 auf die BMP-4-Transkription von Myelomzellen der t(4;14) FGFR3-dysregulierten Linie KMS-11.

Dargestellt sind quantitative PCR-Daten von Ansätzen mit KMS-11 über 120 Stunden, die mit dem RTKI BIBF1000 jeweils in den Konzentrationen 500 nM bzw. 1000 nM oder IL-6 (10 ng/ml) stimuliert wurden. Gezeigt sind die jeweiligen BMP-4-GAPDH-Quotienten als Mittelwerte aus Doppelbestimmungen zweier unabhängiger Versuche mit Standardabweichung.

3.8 Quantitative Expressionsanalyse von Bcl-x_L-Transkript

Zur Kontrolle wurde die Regulation der Bcl-x_L-Transkription, einem anti-apoptotischen Mitglied der Bcl-2-Familie, untersucht. Die Messungen wurden exemplarisch an zwei Myelomzelllinien, KMS-11 und RPMI-8226, durchgeführt. Die Bcl-x_L-mRNA wurde mittels TaqMan™ PCR Assay quantifiziert und relativ zu der als Kontrolle bestimmten GAPDH dargestellt. Die Versuche wurden jeweils dreimal unabhängig voneinander als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Bei der Myelomzelllinie KMS-11 zeigte sich sowohl nach Induktion von Apoptose mit dem RTKI in der Konzentration 500 nM als auch für die Stimulation mit ATRA (1 µM) oder Dexamethason (10 µM) für 24 h eine Abnahme der Bcl-x_L-Transkription. Für den RTKI fiel diese auf 46 %, für ATRA auf 40 % und für Dexamethason auf 37 % des nativen Ansatzes (Abb. 13A; nativ 1,0; + ATRA 0,40; + Dex 0,37; + RTKI 0,46).

Für Zellen der Linie RPMI-8226 ließ sich für keine der Substanzen eine relevante Beeinflussung der Bcl-x_L- mRNA Expression nachweisen (Abb. 13B; nativ 1,0; + ATRA 0,93; + Dexamethason 1,17; + RTKI 0,83).

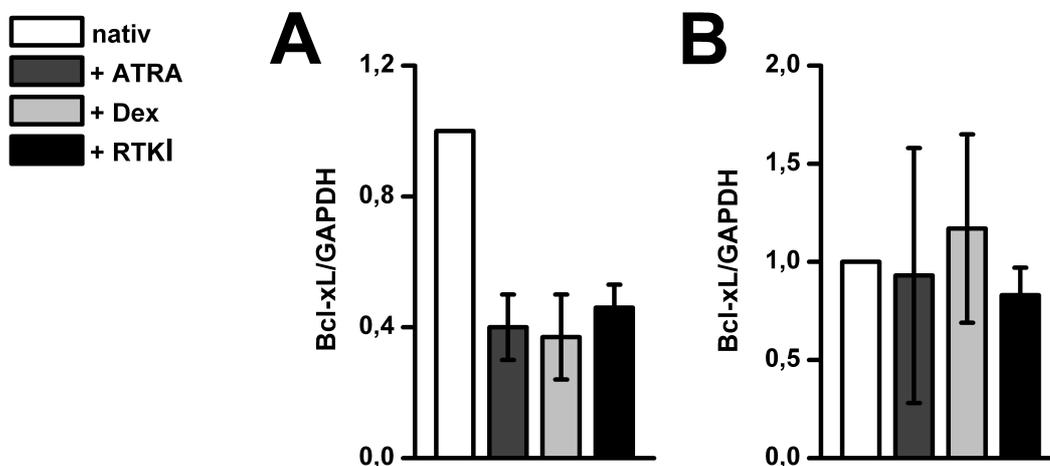


Abbildung 13. Quantitative Expressionsanalyse von Bcl-x_L.

Dargestellt sind quantitative PCR-Daten von Ansätzen mit KMS-11 (A) und RPMI-8226 (B) über 24 Stunden, die mit dem RTKI BIBF1000 (500 nM), all-trans-Retinolsäure (1 µM) bzw. Dexamethason (10 µM) stimuliert wurden. Gezeigt sind die jeweiligen Bcl-x_L-GAPDH-Quotienten als Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dreier unabhängiger Versuche.

3.9 Quantitative Expressionsanalyse von BMP-2, BMP-4- und Bcl-x_L-Transkript bei Myelomzellen von an Multiplem Myelom erkrankten Patienten.

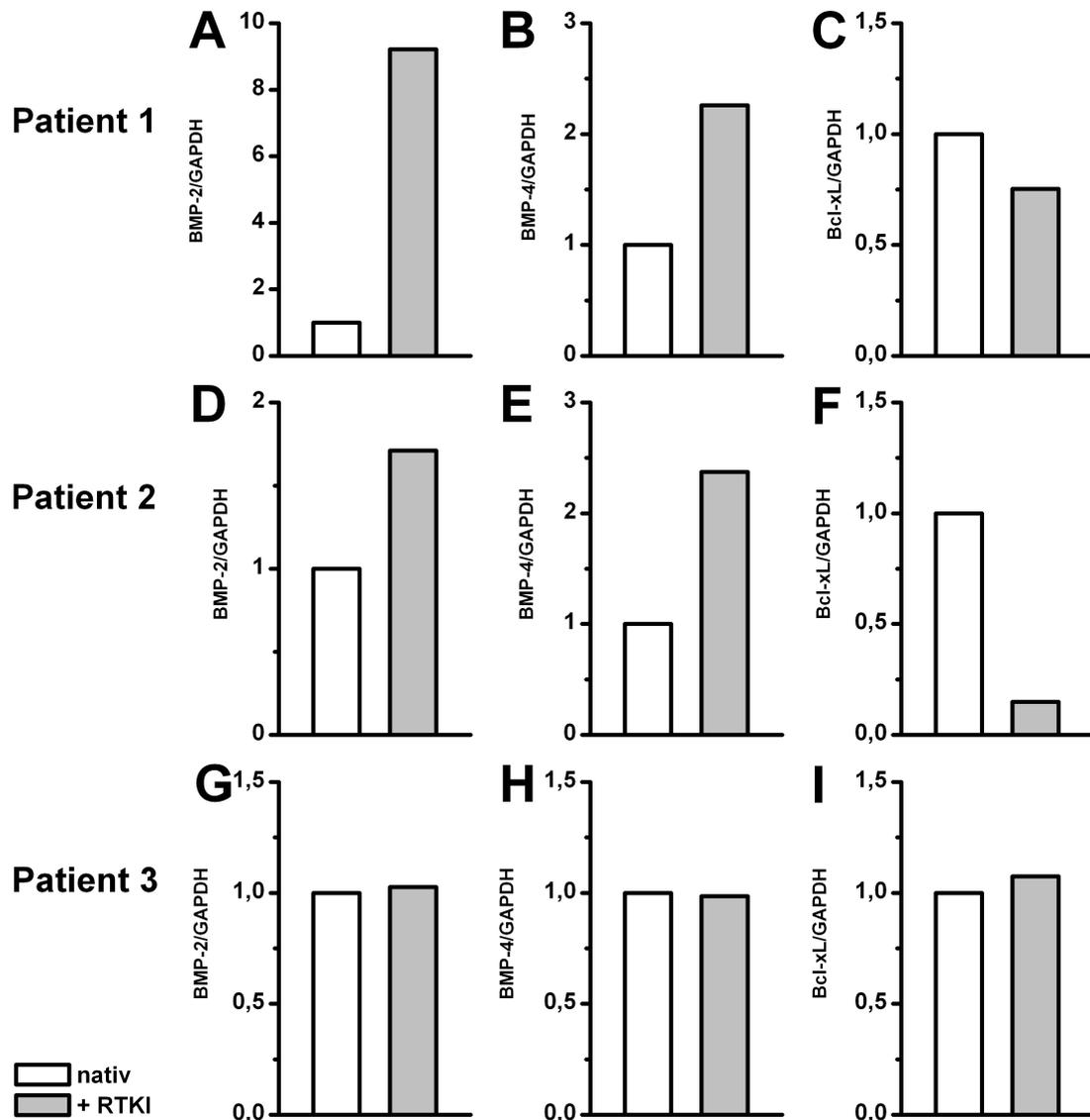


Abbildung 14. Quantitative Expressionsanalyse von BMP-2, BMP-4 und Bcl-x_L bei Myelomzellen von drei an Multiplem Myelom erkrankten Patienten.

Dargestellt sind quantitative PCR-Daten von Ansätzen mit Myelomzellen von drei an Multiplem Myelom erkrankten Patienten, die mit dem RTKI BIBF1000 in Konzentrationen zwischen 125 bis 1000 nM stimuliert wurden. Gezeigt sind die jeweiligen BMP-2- (A,D,G), BMP-4- (B,E,H) und Bcl-x_L-GAPDH-Quotienten (C,F,I) als Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

Ergebnisse

Um zu überprüfen, ob sich die an Myelomzelllinien erhobenen Daten auf Myelomzellen von Patienten übertragen lassen, wurden CD 138⁺ Zellen von an Multiplem Myelom erkrankten Patienten untersucht.

Apoptose wurde mit dem RTKI in Konzentrationen zwischen 125 bis 1000 nM induziert. Die BMP-2-, BMP-4 und Bcl-x_L-mRNA wurde mittels TaqMan™ PCR Assay quantifiziert und relativ zu der als Kontrolle bestimmten GAPDH dargestellt. Die Versuche wurden jeweils 72 h inkubiert und als Doppelbestimmungen durchgeführt. Zum Teil waren die Patientenmyelomzellen IL-6-abhängig und wurden zusätzlich mit IL-6 (10 ng/ml) inkubiert. Dann wurde der Ansatz, der mit RTKI und IL-6 stimuliert wurde, mit einem Experiment verglichen, das allein mit IL-6 für 72 h inkubiert wurde.

Zwei von drei Patienten zeigten nach Induktion von Apoptose mit dem RTKI eine Zunahme der BMP-2- und BMP-4-Transkription und eine Abnahme der Bcl-x_L-mRNA und spiegeln somit die Ergebnisse der an Myelomzelllinien erhobenen Daten wider. Bei Zellen eines dritten an Multiplem Myelom erkrankten Patienten ließen sich keine Veränderungen in der BMP-2, BMP-4 und Bcl-x_L-Expression detektieren.

Patient 1 zeigte nach Kultur der Myelomzellen mit dem RTKI einen Anstieg der BMP-2 Transkription auf das 9,2fache, der BMP-4 mRNA auf das 2,3fache und einen Abfall der Bcl-x_L-Expression auf 75 % des nativen Wertes (Abb. 14 A, B, C; BMP-2: nativ 1,0, + RTKI 9,21; BMP-4: nativ 1,0, + RTKI 2,26; Bcl-x_L: nativ 1, + RTKI 0,75).

Die Myelomzellen des Patienten 2 reagierten auf eine Stimulation mit dem RTKI mit einer Zunahme der BMP-2 Transkription auf das 1,7fache, der BMP-4 Expression auf das 2,4fache und mit einer Herunterregulation des Bcl-x_L-Transkriptes auf 15 % des nativen Ansatzes (Abb. 14 D, E, F; BMP-2: nativ 1,0, + RTKI 1,71; BMP-4: nativ 1,0, + RTKI 2,37; Bcl-x_L: nativ 1,0, + RTKI 0,15).

Bei Patient 3 ließen sich durch Kultur der Zellen mit dem RTKI keine Regulationen der BMP-2, BMP-4 oder Bcl-x_L Expression erkennen (Abb. 14 G, H, I; BMP-2: nativ 1,0, + RTKI 1,03; BMP-4 nativ 1,0, + RTKI 0,99; Bcl-x_L: nativ 1,0, + RTKI 1,08).

Die Myelomzellen der drei genannten Patienten wurden zudem mit IL-6 für 72 h inkubiert. Hier zeigte sich für die Zellen aller getesteten Patienten ein deutlicher Abfall des BMP-2- und BMP-4-Transkriptes (Abb. 15).

Die Expression von BMP-2-mRNA fiel bei den Myelomzellen des Patienten 1 durch Stimulation mit IL-6 auf 4 % (Abb. 15 A), bei Patient 2 auf 6 % (Abb. 15 C) und bei Patient drei auf 37 % (Abb. 15 E). Auch die BMP-4-Transkription ging zurück, und zwar für Myelomzellen des Patienten 1 auf 21 % (Abb. 15 B), des Patienten 2 auf 12 % (Abb. 15 D) und des Patienten 3 auf 24 % (Abb. 15 F).

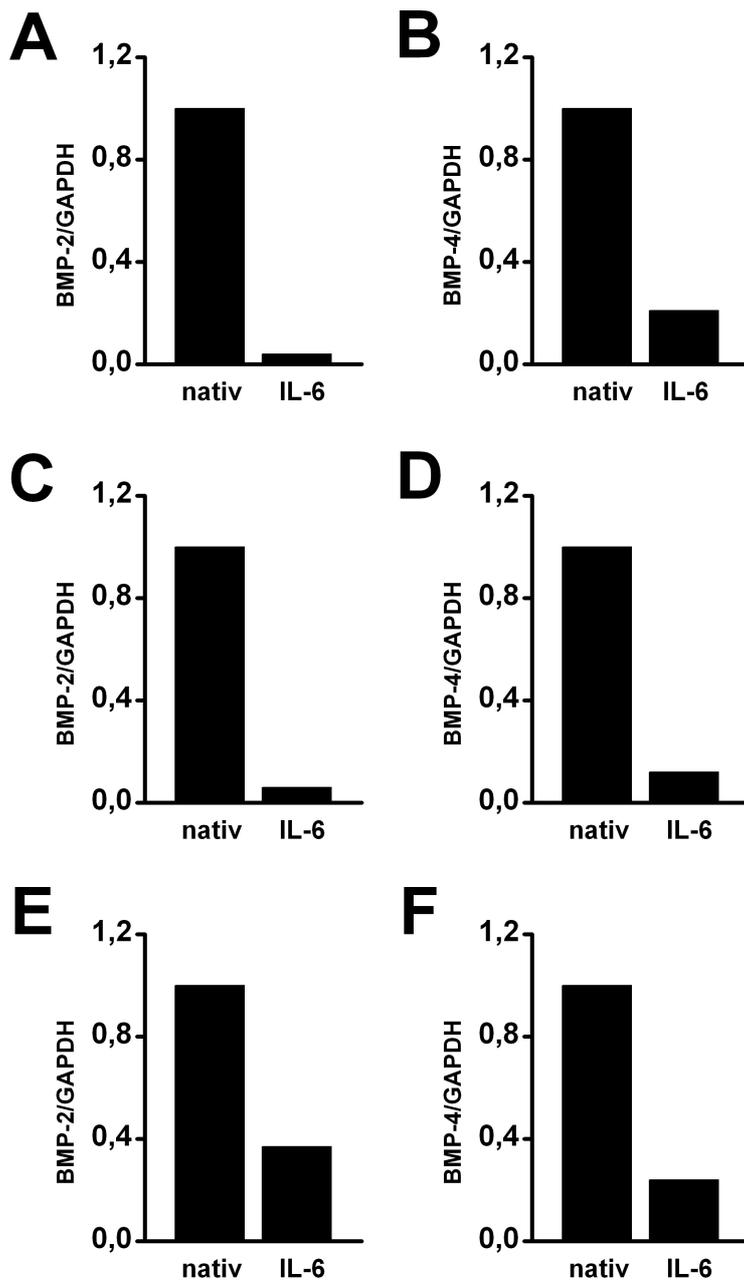


Abbildung 15. Quantitative Expressionsanalyse von BMP-2 und BMP-4 bei Myelomzellen von drei an Multiplem Myelom erkrankten Patienten.

Dargestellt sind quantitative PCR-Daten von Ansätzen mit Myelomzellen von drei an Multiplem Myelom erkrankten Patienten (Patient 1 A und B, Patient 2 C und D, Patient 3 E und F), die mit IL-6 (10 ng/ml) stimuliert wurden. Gezeigt sind die jeweiligen BMP-2- (A,C,E) und BMP-4-GAPDH-Quotienten (B,D,F) als Mittelwerte aus Doppelbestimmungen.

3.10 RTKI-vermittelte Effekte auf die BMP-2-Produktion und -Sekretion von zwei Myelomzelllinien.

Mittels ELISA wurde die Menge des BMP-2 aus Zellextrakten und Zellkulturüberständen zweier Myelomzelllinien nach Kultur mit und ohne den RTKI BIBF1000 (500 nM) über 72 Stunden bestimmt.

Sowohl die untersuchten Zellen der t(4;14)-positiven Linie KMS-11 als auch die t(4;14)-negativen RPMI-8226 wiesen BMP-2 im Zellextrakt und Überstand auf.

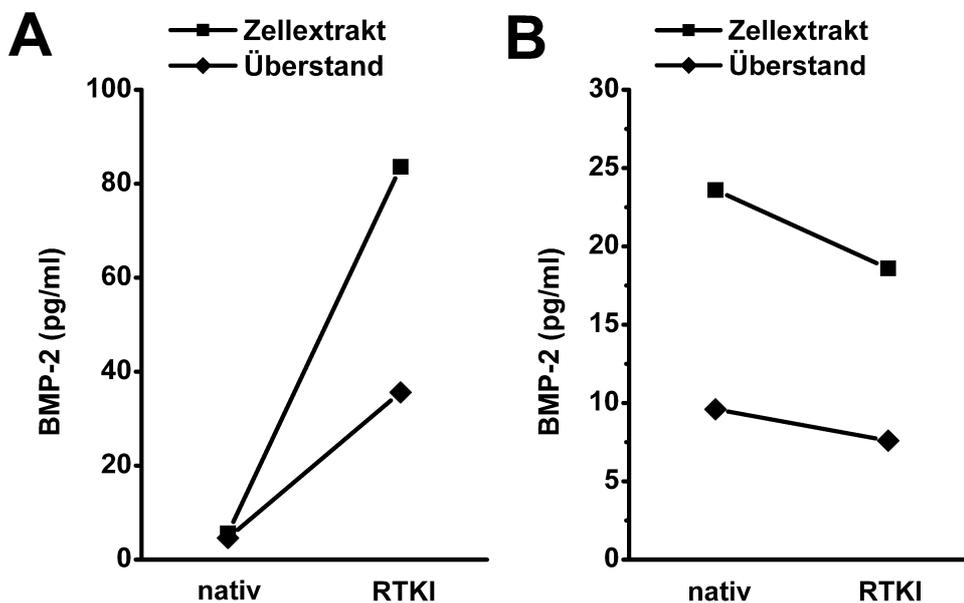


Abbildung 16. RTKI-vermittelte Effekte auf die BMP-2-Produktion und -Sekretion von zwei Myelomzelllinien.

Dargestellt ist das BMP-2 in pg/ml, das jeweils in Zellextrakten und Kulturmediumüberständen der t(4;14)-positiven Myelomzelllinie KMS-11 (A) und den t(4;14)-negativen RPMI-8226 (B) unter nativen Bedingungen und nach Inhibition der Zellen mit 500 nM BIBF1000 gemessen wurde.

Durch Inhibition von KMS-11 mit 500 nM BIBF1000 stieg die Menge des im Zellextrakt exprimierten BMP-2 im Vergleich zu nativen Bedingungen auf mehr als das 14fache und die des in den Überstand sezernierten auf mehr als das 7fache (Abb. 16A; KMS-11-Extrakt: nativ (5,6 pg/ml), + 500 nM BIBF1000 (83,6 pg/ml); KMS-11-Überstand: nativ (4,6 pg/ml), + 500 nM BIBF1000 (35,6 pg/ml)).

Ergebnisse

Im Gegensatz zu dem deutlichen Effekt von BIBF1000 auf die den FGFR3 überexprimierenden KMS-11, hatte eine Kultur von Zellen der nicht (4;14)-translozierten Linie RPMI-8226 mit 500 nM BIBF1000 im Vergleich zu nativen Bedingungen keinen bedeutenden Einfluss auf die BMP-2-Expression dieser Zellen in Extrakt und Überstand. Sowohl im Extrakt als auch im Überstand sank die Menge des BMP-2 durch Inhibition von RPMI-8226 durch 500 nM BIBF1000 im Vergleich zu der Kontrolle auf 81 bzw. 82 % (Abb. 16 B; RPMI-8226-Extrakt: nativ (23,6 pg/ml), + 500 nM BIBF1000 (18,6 pg/ml); RPMI-8226-Überstand: nativ (9,6 pg/ml), + 500 nM BIBF1000 (7,6 pg/ml)).

Ebenfalls auffällig war bei beiden Myelomzelllinien die geringere BMP-2-Konzentration im Mediumüberstand im Vergleich zum Zellextrakt.

4 Diskussion

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), Mitglieder der TGF- β -Familie, spielen als multifunktionelle Zytokine eine wichtige Rolle bei Prozessen der Zellproliferation, Apoptose und Differenzierung (40,77). Durch diese Funktionen sind BMPs in den Blickpunkt des Interesses der onkologischen Forschung gerückt.

Eine endogene Expression verschiedener BMP-Transkripte wurde bereits bei einigen Neoplasien nachgewiesen (18,34,35,54,86). BMPs scheinen bei diesen Tumoren keine grundsätzlich gleichartigen Funktionen zu übernehmen, sondern mediiern bei einem Teil der malignen Erkrankungen eine Zunahme des Tumorwachstums und der Metastasierung, während sie bei anderen Neoplasien eine Induktion von Apoptose und eine Hemmung der Zellproliferation vermitteln.

So unterstützt BMP-4 einerseits bei Ovarialkarzinomzellen die Metastasierung, BMP-2 im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom das Tumorwachstum und BMP-6 bei Mammakarzinomzellen die neoplastische Progression und Metastasierung (18,54,86). Andererseits fördert BMP-2 bei Kolonkarzinom- und Medulloblastomzellen die Apoptose und unterdrückt ein fortschreitendes Tumorwachstum, und BMP-6 vermittelt in der Cutis den programmierten Zelltod und mediiert dadurch die Tumoresistenz (34,35,99).

Die Expression endogener BMPs wurde bislang beim Multiplen Myelom noch nicht untersucht. Da bekannt ist, dass exogenes BMP-2, -4, -5, -6 und -7 bei Myelomzellen Apoptose induzieren und die Proliferation inhibieren, wird allgemein eine anti-neoplastische Wirkung von BMPs im Multiplen Myelom angenommen (40,47,81).

In dieser Arbeit konnte detailliert belegt werden, dass Myelomzellen BMP-Transkripte exprimieren. Sowohl verschiedene Myelomzelllinien, wie KMS-11, KMS-18, OPM-2, RPMI-8226 und U-266, als auch primäres Patientenmaterial wiesen in messbarem Umfang BMP-2- und BMP-4-mRNA auf.

Ebenso fehlten bislang Erkenntnisse bezüglich einer Regulation der endogenen BMP-Expression bei Myelomzellen. Um diese Fragestellung untersuchen zu können, wurde vorab ein Zellkultursystem etabliert, in dem bei Myelomzellen eine Apoptoseinduktion durch den Einsatz eines RTKI bzw. eine Steigerung der Proliferation mittels Interleukin-6 erfolgte. Hierbei wurden zunächst die Effekte des RTKI BIBF1000 auf Myelomzellen beschrieben:

Es konnte gezeigt werden, dass BIBF1000 bei den Zelllinien OPM-2 und KMS-11, die die Translokation t(4;14) aufweisen, durch die der Rezeptor FGFR3 konstitutiv aktiviert wird, in höherer Konzentration eine signifikante Proliferationshemmung bewirkt (mehr als 70 % bei 1 μ M BIBF1000 versus Kontrolle ohne RTKI; $P < .001$). Im Gegensatz hierzu reagierten die Zellen der Linien U-266 und RPMI-8226, die diese entsprechende Translokation nicht zeigen, gering bzw. nicht auf die Rezeptortyrosinkinaseinhibition. In Konkordanz mit den Proliferationsdaten induzierte BIBF1000 bei KMS-11, KMS-18 und OPM-2 signifikant Apoptose, während bei den t(4;14)-negativen Myelomzelllinien U-266 und RPMI-8226 wiederum kein Effekt zu beobachten

war (nativ vs. 500 nM BIBF1000; KMS-11: $P=.011$; KMS-18: $P=.008$; OPM-2= $.026$). Die pro-apoptotische Wirkung des RTKI auf die t(4;14)-dysregulierten Myelomzellen ist unter anderem MAPK-vermittelt, da durch RTK-Inhibition dieser Zellen der Nachweis einer Hypophosphorylierung der MAPK gelang. Die Ergebnisse dieser Arbeit zu den Effekten des BIBF1000 stimmen mit den bereits beschriebenen Wirkungen anderer RTKI auf Myelomzellen überein. So induziert der RTKI PD173074, der ebenso wie BIBF1000 den Rezeptor FGFR3 blockiert, bei Myelomzellen analog zu BIBF1000 Apoptose und führt zu einer Hemmung der Zellproliferation. In Kongruenz mit den Resultaten der vorliegenden Untersuchung zeigte diese Arbeitsgruppe für PD173074 ebenfalls einen MAPK-vermittelten Mechanismus der RTK-Inhibition am FGFR3 auf (94). Auch für zwei weitere RTK-Inhibitoren, GW654652 und PTK787/ZK222584, die allerdings nicht bFGF- sondern VEGF-Rezeptoren inhibieren, wurde bereits eine dem BIBF1000-ähnliche Wirkung auf Myelomzellen nachgewiesen (59,73).

Bei der im Mittelpunkt dieser Arbeit stehenden Untersuchung der BMP-Expression durch Myelomzellen bei Apoptoseinduktion durch RTK-Inhibition bzw. Wachstumsstimulus durch IL-6 konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die BMP-2-Transkription von t(4;14)-positiven Zelllinien im Gegensatz zu Linien, die diese genetische Abnormalität nicht aufweisen, einer Regulation unterliegt. Nach Induktion von Apoptose durch RTK-Inhibition stieg die Menge der durch die Linien KMS-11 und KMS-18 exprimierten BMP-2-mRNA konzentrationsabhängig signifikant an, während bei U-266- und RPMI-8226-Zellen, bei denen durch RTK-Inhibition keine Apoptose ausgelöst werden konnte, keine Veränderungen der BMP-2-Transkription zu verzeichnen waren (Anstieg der BMP-2-mRNA nach 24-stündiger Inkubation mit BIBF1000 1 μM bei KMS-11 auf das 3,2fache ($P=.028$) und bei KMS-18 auf mehr als das Doppelte im Vergleich zu den jeweils nativen Bedingungen ($P=.028$)).

Zudem konnte am Beispiel der t(4;14)-translozierten Myelomzelllinie KMS-11 nachgewiesen werden, dass nicht nur RTK-Inhibition, sondern auch andere Wirkstoffe, die bei Myelomzellen Apoptose hervorrufen, die endogene BMP-2-Transkription hochregulieren. So führte sowohl die Kultur der Zellen mit Dexamethason als auch mit all-trans-Retinolsäure zu einem Anstieg der BMP-2-mRNA. Bei einer kombinierten Behandlung der Zellen mit Dexamethason und ATRA zeigte sich sogar ein überproportionaler Effekt auf die Regulation des BMP-2-Transkriptes (Anstieg der BMP-2-mRNA auf das 11,5fache durch Kultur mit Dexamethason 10 μM und ATRA 1 μM versus der nativen Kontrolle).

Im Weiteren wurde zum ersten Mal beschrieben, dass die BMP-4-Transkription von t(4;14)-positiven Myelomzelllinien durch Induktion von Apoptose mittels RTK-Inhibition ebenfalls beeinflusst und hierbei die Regulation der endogenen BMP-2-mRNA imitiert wird. Durch Kultur mit BIBF1000 konnte ein deutlicher konzentrations-abhängiger Anstieg des BMP-4-Transkriptes verzeichnet werden, und zwar bei KMS-11 nach 120 Stunden auf das 7,5fache (BIBF1000 1 μM vs. nativer Kontrolle).

Eine Regulation der intrazellulären BMP-mRNA durch Inhibition von Tyrosinkinaserzeptoren wurde bisher nur bei verschiedenen Mammakarzinomzelllinien beschrieben (18). Bei diesen Zelllinien wird die BMP-6-Transkription durch Stimulation mit Epidermalem Wachstumsfaktor (EGF)

bzw. durch Inhibition der EGF-Rezeptoren mit dem RTKI AG1517 jeweils gegenteilig beeinflusst. BMP-6 übt auf Mammakarzinomzellen allerdings eine Tumor-progressive Wirkung aus, so dass in der genannten Studie eine der in dieser Arbeit an Myelomzellen beschriebenen konträre Regulation detektiert wurde. Stimulation der Zellen mit EGF erhöhte den BMP-6-mRNA-Spiegel, während eine RTK-Inhibition diesen abfallen ließ (18). Wie bereits erwähnt, scheinen unterschiedliche BMPs bei verschiedenen Neoplasien bzw. Zelltypen (auch für B-Lymphozyten wurde eine Regulation der endogenen BMP-6-Transkription schon gezeigt (49)) durchaus derart differierende Wirkungen auszulösen. Trotz dieser grundsätzlich unterschiedlichen Effekte von BMPs auf Tumorzellen ist die Koinzidenz einer Regulation der BMP-Transkription durch RTK-Inhibition auffällig und unterstreicht die Bedeutung von BMPs bei onkologischen Prozessen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich einer vermehrten endogenen BMP-2-Transkription durch Myelomzellen bei Apoptoseinduktion mittels all-trans-Retinolsäure stimmen mit den Resultaten ähnlicher Versuchsreihen an Medulloblastomzellen und embryonalen Hühnerzellen überein (34,82). So kommt es bei einer Behandlung von Medulloblastomzellen mit ATRA, ebenso wie hier an Myelomzellen gezeigt, zu einem deutlichen Anstieg des BMP-2-Transkriptes. Ein gleichartiger Effekt wurde auch schon bei Hühnerembryonen beschrieben, wo es nach Implantation eines ATRA-getränkten Kügelchens in die interdigitale Region zur Apoptose kam, der eine vermehrte BMP-Gen-Expression vorausging.

Im Weiteren konnte zum ersten Mal beschrieben werden, dass die Bcl-x_L-Transkription von t(4;14)-positiven Myelomzellen durch den RTKI BIBF1000 gesenkt wird. Durch Kultur von Zellen der Linie KMS-11 mit 500 nM BIBF1000 fiel die Menge der Bcl-x_L-mRNA auf 46 % der nativen Kontrolle ab. Im Gegensatz dazu übte dieser RTKI auf die Myelomzelllinie RPMI-8226, die die Translokation t(4;14) nicht aufweist, keinen Effekt aus.

Es existieren einige Untersuchungen zu der Frage nach einer regulierten Expression von Bcl-x_L-Transkript im Multiplen Myelom. So ist bekannt, dass eine vermehrte Expression des Onkogens FGFR3 zu einer Heraufregulation der endogenen Bcl-x_L-mRNA von Myelomzellen führt (76,91). Vor diesem Hintergrund erscheint die in der vorliegenden Arbeit gezeigte verminderte Produktion von Bcl-x_L-Transkript nach Hemmung des FGFR3 durch den RTKI BIBF1000 logisch. Außerdem wurde von einer anderen Arbeitsgruppe bereits eine verminderte Bcl-x_L-Expression nach Behandlung von Myelomzellen mit Dexamethason und einem monoklonalen Insulin-like-growth-factor-1(IGF-1)-Rezeptor-Antikörper nachgewiesen (66). Dieses Ergebnis ließ sich bestätigen. Für die Zelllinie KMS-11 konnte eine Herunterregulation des endogenen Bcl-x_L nach Induktion von Apoptose durch Dexamethason bzw. ATRA gezeigt werden.

Eine Regulation der BMP-2-, BMP-4- und Bcl-x_L-Transkription nach Induktion von Apoptose bzw. Wachstumsstimulation konnte nicht nur für Myelomzelllinien sondern auch für zwei von drei an Multiplem Myelom erkrankte Patienten gezeigt werden. Auch bei diesen Zellen ließ sich nach RTK-Inhibition ein deutlicher Anstieg des BMP-2- und BMP-4-mRNA-Spiegels bzw. ein Abfall des

exprimierten Bcl-x_L-Transkriptes nachweisen. Bei Stimulation der Patientenzellen mit IL-6 verhielt sich die Expression, wie schon für verschiedene Myelomzelllinien gezeigt, erneut genau konträr zu der Expression unter apoptotischen Bedingungen. Dass die Regulation von BMPs bzw. Bcl-x_L auf transkriptioneller Ebene nicht nur für Myelomzelllinien sondern auch für primäres Patientenmaterial nachgewiesen werden konnte, unterstreicht die Relevanz der Erkenntnisse für das Multiple Myelom. Es demonstriert, dass die Regulation dieser Transkripte von der Myelomzelllinie, die nach vielfacher Subkultur kein ideales Modell für derartige Untersuchungen darstellt, auf direkt von Patienten gewonnene Myelomzellen übertragen werden kann.

In dieser Arbeit konnte außerdem erstmalig sowohl intrazellulär als auch im Kulturüberstand von zwei Myelomzelllinien BMP-2-Protein gemessen werden. Dieses unterlag bei der t(4;14)-positiven Linie KMS-11 bei Induktion von Apoptose intra- und extrazellulär einer Regulation, in der sich die Veränderungen des BMP-Transkriptes unter denselben Bedingungen widerspiegelten. Und zwar konnte gezeigt werden, dass der BMP-2-Spiegel durch RTK-Inhibition (72 Stunden Inkubation mit 500 nM BIBF1000) im Vergleich zu der jeweiligen nativen Kontrolle intrazellulär auf mehr als das 14fache und extrazellulär auf mehr als das 7fache anstieg. Bei der t(4;14)-negativen Myelomzelllinie RPMI-8226 wurde in den Zellen und auch im Überstand ebenfalls BMP-2-Protein nachgewiesen. Hier ließ sich aber keine Regulation beschreiben.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die BMP-mRNA bei Myelomzellen tatsächlich einer Translation unterliegt, und dass eventuelle Regulationen der Transkription dabei auf die Menge des resultierenden intrazellulären Proteins übertragen werden. Des Weiteren kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass intrazelluläres BMP-2 durch Myelomzellen in das umgebende Medium sezerniert wird, und zwar in Abhängigkeit von der Quantität des in der Zelle exprimierten BMP-2. Myelomzellen scheinen allerdings nicht das gesamte translatierte Protein in den Überstand abzugeben, da der extrazelluläre BMP-2-Spiegel bei KMS-11 und RPMI-8226 sowohl unter nativen Bedingungen als auch nach Induktion von Apoptose deutlich unter dem des intrazellulären lag. Diese intrazelluläre Akkumulation vergrößerte sich bei RTK-Inhibition der Zellen noch weiter, denn hierbei wurde prozentual ein noch geringerer Teil des translatierten BMP-2 sezerniert (Zunahme des BMP-2-Spiegels intrazellulär auf mehr als das 14fache im Gegensatz zu extrazellulär nur auf mehr als das 7fache durch Inkubation mit 500 nM BIBF1000 über 72 Stunden). Die Konstellation dieser Daten impliziert, dass die BMP-2-Expression zusätzlich post-transkriptionell bzw. -translationell durch bisher nicht bekannte Faktoren reguliert wird. Ein post-translationeller Regulationsmechanismus der BMP-Aktivität soll, zumindest in der Embryonalentwicklung, durch Noggin vermittelt sein. Dieser BMP-Antagonist kann BMPs im Extrazellulärraum binden und somit deren Interaktionen mit den entsprechenden Rezeptoren inhibieren. Zusätzlich bindet Noggin an Heparansulfat-Proteoglykane und ist dadurch in der Lage, einen BMP-Aktivitätsgradienten zu erzeugen (68).

Insgesamt sprechen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit dafür, dass sowohl eine durch RTK-Inhibition als auch durch Dexamethason oder all-trans-Retinolsäure induzierte Apoptose von Myelomzellen BMP-2, eventuell auch BMP-4 mediiert erfolgt, da sowohl BMP-2 als auch BMP-4 im Rahmen von Apoptose deutlich reguliert werden. Eine durch Interleukin-6 ausgelöste Wachstumsstimulation dieser Zellen scheint ebenfalls die Expression von BMPs bei einigen Zelllinien und den getesteten Patienten zu beeinflussen. Die Daten dieser Untersuchung, die eine sich vom Transkript bis hin zum extrazellulären Protein fortsetzende Regulation der BMP-2-Expression von Myelomzellen beschreiben, und der bereits bekannte pro-apoptotische Effekt von exogenem BMP-2 auf diese Zellen, lassen an einen BMP-2-mediierten autokrinen Mechanismus im Sinne einer Verstärkung des apoptotischen Stimulus denken. Der Nachweis einer autokrinen bzw. parakrinen Wirkung von BMPs wäre für das Multiple Myelom ein Novum. Bei anderen Neoplasien wurden derartige Regulationen bereits gezeigt, so dass eine analoge Deutung der Ergebnisse dieser Arbeit nahe liegt. Die Untersuchung von Hallahan et al. ist in diesem Kontext besonders interessant, da BMP-2 bei Medulloblastom- ebenso wie bei Myelomzellen eine pro-apoptotische Wirkung besitzt. So wird dem BMP-2 im Medulloblastom ein mediiender parakriner Effekt bei Retinoid-induzierter Apoptose zugeschrieben. Durch all-trans-Retinolsäure und konsekutive Apoptose steigt sowohl die intrazelluläre BMP-2-mRNA als auch die BMP-2-Expression im Kulturüberstand an, wobei das extrazelluläre BMP-2 als Agens einer parakrinen Wirkung auf Zellen einer weiteren Medulloblastomlinie isoliert werden konnte (34). Des Weiteren wurde ein autokriner Mechanismus für BMP-2 bei reifen Kolonepithelzellen beschrieben, der ebenfalls eine Tumorsuppression bewirkt bzw. Apoptose fördert (35).

Das Modell der autokrin durch BMPs gesteigerten Apoptose von Myelomzellen lässt sich ebenfalls zur Erklärung der Regulation der Bcl-x_L-Transkription heranziehen. Zwei verschiedene Vorstellungen könnten in diesem Zusammenhang die Abnahme der endogenen Bcl-x_L-mRNA-Produktion durch Myelomzellen bei Induktion von Apoptose erklären. Einerseits könnte das Bcl-x_L-Transkript durch RTK-Inhibition direkt im Sinne eines Abschaltens bzw. einer Unterbrechung der Aktivierung transkriptionsfördernder Elemente beeinflusst werden. Andererseits ließe sich eine verminderte mRNA-Detektion dieses anti-apoptotischen Proteins dadurch erklären, dass es durch den RTKI und konsekutive Induktion von Apoptose zu einem Anstieg des BMPs im Zellkulturüberstand kommt und exogenes BMP bei Myelomzellen Apoptose durch Herunterregulation von Bcl-x_L vermittelt (40,47). Dann wäre die Abnahme des intrazellulären Bcl-x_L-Transkriptes indirekt durch einen autokrinen BMP-Effekt mediiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung könnten somit durch das beschriebene Modell ausnahmslos erklärt werden. Ein derartiger Zusammenhang lässt sich mit den hier erhobenen Daten und dem Wissen über ähnliche Konnexionen bei anderen Neoplasien zwar vermuten, um die Hypothese zu untermauern, müssten aber noch weitere Untersuchungen stattfinden.

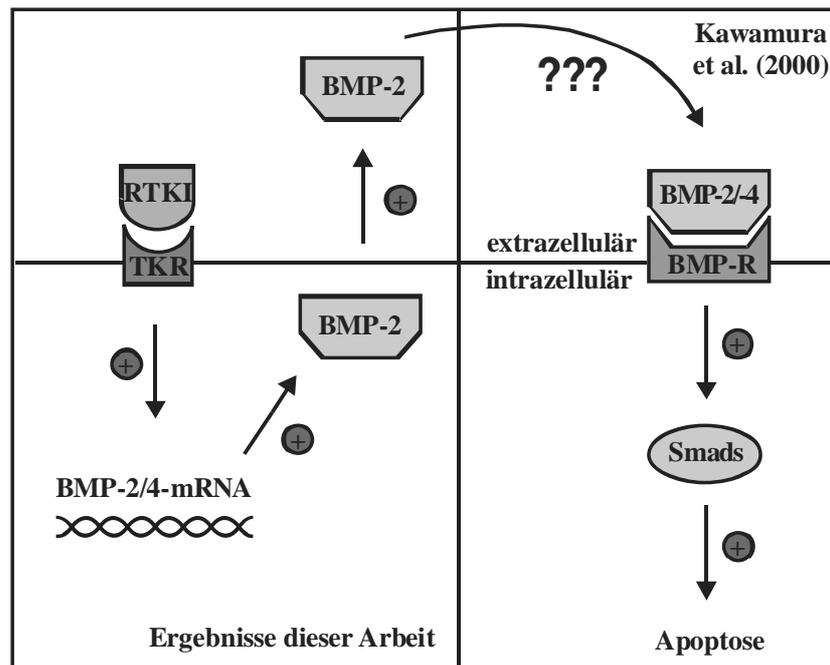


Abbildung 17. Hypothetisches Modell einer RTKI-induzierten BMP-2-vermittelten Apoptose von Myelomzellen.

Die Daten dieser Arbeit lassen davon ausgehen, dass das BMP-2-Transkript von Myelomzellen zum Teil einer Translation unterliegt und danach in den Extrazellulärraum gelangt. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, könnte bei einer Myelomzelllinie, die eine Regulation von BMPs nach Apoptoseinduktion zeigt, mittels Transfektion von siRNA eine Inaktivierung der BMP-2-Transkripte erreicht werden. Wenn nach einem derartigen Versuch das intra- und extrazellulär messbare BMP-2 abfallen würde, wäre ein kausaler Zusammenhang der Ereignisse im Sinne einer Translation und Sekretion dieses Proteins belegt. Um eine autokrine Funktion des BMP-2 zu zeigen, könnte nun nach entsprechender Transfektion eine RTKI-Behandlung durchgeführt und danach die Rate apoptotischer Zellen bestimmt werden. Wenn sich hierbei ein geringerer Anteil apoptotischer Myelomzellen als nach RTK-Inhibition nicht transfizierter Zellen zeigte, spräche dies für die genannte Hypothese.

Die Expression verschiedener BMP-Rezeptoren durch Myelomzelllinien und primäres Patientenmaterial wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt. BMP-2 und -4 gehören zu der Subgruppe von BMPs, die ihre Wirkung über die Rezeptoren Alk-3 (Activin-like-kinase) und Alk-6 vermittelt (81). Da der Rezeptorstatus der in dieser Arbeit verwendeten Myelomzelllinien nicht untersucht wurde, müsste für die Beschreibung einer autokrinen BMP-Regulation der Nachweis von BMP-2-Rezeptoren auf den entsprechenden Zellen noch erbracht werden. Des Weiteren wäre erneut die exogene Wirkung von BMP-2 auf die entsprechenden Myelomzellen im Sinne einer Induktion von Apoptose nachzuweisen. Zusätzlich könnte eine Bestimmung der Expression

von Bestandteilen des BMP-Signaltransduktionsweges, wie Smad 1, 4 und 5 (46), durch Myelomzellen nach Apoptoseinduktion im Vergleich zu nativen Kulturbedingungen einen Hinweis auf den Aktivierungszustand der Kaskade geben. Dies ließe Rückschlüsse im Sinne eines Zusammenhangs zwischen dem Auslösen der BMP-Signaltransduktion und der vorangegangenen Vermittlung von Apoptose durch RTK-Inhibition zu und könnte somit die oben genannte Modellvorstellung ebenfalls stärken.

Interessant wäre auch die Untersuchung, ob der Kulturüberstand einer RTKI-sensitiven Myelomzelllinie, z. B. OPM-2 oder KMS-11, bei der entsprechend durch RTK-Inhibition Apoptose hervorgerufen wurde, bei einer gegenüber RTK-Inhibition resistenten Linie, z. B. RPMI-8226, Apoptose induzieren kann. Da Kawamura et al. zeigten, dass RPMI-8226-Zellen auf exogenes BMP-2 mit Apoptose reagieren und in der vorliegenden Arbeit im Kulturüberstand von RTKI-sensitiven Zellen nach entsprechender RTK-Inhibition vermehrt BMP-2 nachgewiesen wurde, wäre bei einer Zunahme der Apoptoserate nach Stimulation von RTKI-resistenten Myelomzellen mit konditioniertem Mediumüberstand das BMP-2 als Mediator dieser Wirkung wahrscheinlich. Hiermit könnte in Analogie zum Medulloblastom (34) für das Multiple Myelom eine durch BMP-2 parakrin vermittelte RTKI-induzierte Apoptose nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lassen die vorliegenden Untersuchungen vermuten, dass die Induktion von Apoptose durch RTK-Inhibition, Dexamethason und all-trans-Retinolsäure bei Myelomzellen BMP-2- und BMP-4-mediert erfolgt. Für alle den programmierten Zelltod auslösenden hier verwendeten Substanzen konnte eine Wirkung in Form einer Heraufregulation von BMPs nachgewiesen werden, während Interleukin-6 als Wachstumsfaktor bei einigen Myelomzelllinien einen genau gegenteiligen Effekt auf die Expression dieser pro-apoptotischen Proteine besaß. Ob sich hier ein universeller Mechanismus für das Multiple Myelom abzeichnet, der von keinem speziellen Wirkstoff abhängig ist, sondern allgemein bei Induktion von Apoptose auftritt bzw. dem durch Stimulation des Myelomzellüberlebens entgegengewirkt wird, bleibt abzuwarten.

Da exogenes BMP durch seinen anti-proliferativen und apoptotischen Stimulus sowie die Beteiligung am Knochenstoffwechsel ein interessantes potentiell Therapeutikum für das Multiple Myelom darstellt, ist ein besseres Verständnis seiner endogenen Bedeutung wichtig. Die hier erstmalig gezeigten Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von endogenen BMPs im Multiplen Myelom und sind ein Anreiz für nachfolgende Untersuchung.

5 Literatur

- 1 Alexanian R, Barlogie B, Tucker S (1990) VAD-based regimens as primary treatment for multiple myeloma. *American Journal of Hematology* 33:86-89
- 2 Alexanian R, Dimopoulos MA, Delasalle K, Barlogie B (1992) Primary dexamethasone treatment of multiple myeloma. *Blood* 80:887-890
- 3 Alexanian R, Dreicer R (1984) Chemotherapy for multiple myeloma. *Cancer* 53:583-588
- 4 Barlogie B, Jagannath S, Desikan KR, et al. (1999) Total therapy with tandem transplantation for newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 93:55-65
- 5 Bataille R, Chappard D, Klein B (1992) Mechanisms of bone lesions in multiple myeloma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 6: 285-295
- 6 Bataille R, Harousseu J-L (1997) Multiple Myeloma. *N. Engl. J. Med.* 336: 1657-1664
- 7 Bellamy WT, Richter L, Frutiger Y, Grogan TM (1999) Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res.* 59:728-733
- 8 Bergsagel PL, Kuehl WM (2003) Critical roles for immunoglobulin translocations and cyclin D dysregulation in multiple myeloma. *Immunol Rev.* 194:96-104
- 9 Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose EJ (1992) Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:365-93
- 10 Bisping G, Kropff M, Wenning D, Dreyer B, Spiering D, Bessonov S, Hilberg F, Roth GJ, Munzert G, Stefanic M, Stelljes M, Scheffold C, Mesters RM, Berdel WE, Kienast J. (2006) Targeting receptor kinases by a novel indolinone derivative in multiple myeloma: Abrogation of stroma-derived interleukin-6 secretion and induction of apoptosis in cytogenetically defined subgroups. *Blood* 107(5): 2079-89
- 11 Bisping G, Leo R, Wenning D, Dankbar B, Padro T, Kropff M, Scheffold C, Kröger M, Mesters RM, Berdel WE, Kienast J (2003) Paracrine interactions of basic fibroblast growth factor and interleukin-6 in multiple myeloma. *Blood* 101(7): 2775-2783
- 12 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-54
- 13 Carmeliet P, Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 07:249-257
- 14 Chauhan D, Kharbanda S, Ogata A, et al. (1997) Cytochrome-c dependent induction of apoptosis in multiple myeloma cells. *J Biol Chem.* 272:29995-97
- 15 Chauhan D, Kharbanda S, Ogata A, et al. (1997) Interleukin-6 inhibits Fas-induced apoptosis and SAP kinase activation in multiple myeloma cells. *Blood* 89:227-234

Literatur

- 16 Chauhan D, Pandey P, Ogata A, et al. (1997) Dexamethasone induces apoptosis of multiple myeloma cells in a JNK/SAP kinase independent mechanism. *Oncogene* 15:837-843
- 17 Chen D, Zhao M, Mundy GR (2004) Bone Morphogenetic Proteins. *Growth Factors* 22(4): 233-241
- 18 Clement JH, Sanger J, Hoffken K (1999) Expression of bone morphogenetic protein 6 in normal mammary tissue and breast cancer cell lines and its regulation by epidermal growth factor. *Int. J. Cancer* 80:250-256
- 19 Couchman JR, Woods A. (1996) Syndecans, signaling, and cell adhesion. *J. Cell Biochem.* 61(4):578-84
- 20 Dalton WS, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC, Harousseau JL (2001) Multiple Myeloma. *Hematology*
- 21 Dankbar B, Padro T, Leo R, Feldmann B, Kropff M, Mesters RM, Serve H, Berdel WE, Kienast J (2000) Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood* 95(8): 2630-36
- 22 Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ (2001) Efficacy and safety of specific inhibitor of the bcl-abl tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 344:1031-1037
- 23 Fisher DE (1994) Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold. *Cell* 78:539-542
- 24 Fonseca R, Blood E, Rue M, et al. (2003) Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in multiple myeloma. *Blood* 101:4569-4575
- 25 Fonseca R, Debes-Marun CS, Picken EB, et al. (2003) The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood* 102:2562-2567
- 26 Frassanito MA, Cusmai A, Iodice G, Dammacco F (2001) Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma: relation with resistance to drug-induced apoptosis. *Blood* 97(2):483-89
- 27 Gado K, Gyula D, Hargita H, Falus A (2000) Role of interleukin-6 in the pathogenesis of multiple myeloma. *Cell Biology International* 24(4):195-209
- 28 Gaillard JP, Bataille R, Brailly H, et al. (1993) Increased and highly stable levels of functional soluble interleukin-6 receptor in sera of patients with monoclonal gammopathy. *Eur J Immunol.* 23:820-824
- 29 Gharion G, Tura S, Ljungman P, Belanger C, Brandt L, Cavo M, Falcon T, Granena A, Gore M, Gratwohl A, Lowenberg b, Nikoskelainen J, Reiffers JJ, Samson D, Verdonck L, Volin L (1991) Allogeneic bone marrow transplantation in multiple myeloma. *New England Journal of Medicine* 325:1267-1273
- 30 Giles FJ, Cooper MA, Silverman L, Karp JE, Lancet JE, Zangari M, Shami PJ, Khan KD, Hannah AL, Cherrington JM, Thomas DA, Garcia-Manero G, Albitar M, Kantarjian HM, Stopeck AT (2003) Phase II study of SU5416 – a small-molecule, vascular endothelial growth factor tyrosine-kinase receptor inhibitor – in patients with refractory myeloproliferative diseases. *Cancer* 97(8):1920-28
- 31 Giles FJ, Stopeck AT, Silverman LR, Lancet JE, Cooper MA, Hannah AL, Cherrington JM, O'Farrell A-M, Yuen HA, Louie SG, Hong W, Cortes JE, Verstovsek S, Albitar M,

Literatur

- O'Brian SM, Kantarjian HM, Karp JE (2003) SU5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, has biologic activity in patients with refractory acute myeloid or myelodysplastic syndromes. *Blood* 102(3):795-801
- 32 Grcevic D, Marusic A, Grahovac B, Jaksic B, Kusec R (2003) Expression of bone morphogenetic proteins in acute promyelocytic leukemia before and after combined all trans-retinoic acid and cytotoxic treatment. *Leukemia Research* 27: 731-738
- 33 Gregory WM, Richards MA, Malpas JS (1992) Combination chemotherapy versus melphalan and prednilolone in the treatment of multiple myeloma: an overview of published trials. *J Clin Oncol* 10:334-342
- 34 Hallahan AR, Pritchard JI, Chandraratna RAS, Ellenbogen RG, Greyer JR, Overland RP, Strand AD, Tapscott SJ, Olson JM (2003) BMP-2 mediates retinoid-induced apoptosis in medulloblastoma cells through a paracrine effect. *Nature Medicine* 9(8):1033-38
- 35 Hardwick JC, Van Den Brink GR, Bleuming SA, Ballester I, Van Den Brande JM, Keller JJ, Offerhaus GJ, Van Deventer SJ, Peppelenbosch MP (2004) Bone morphogenetic protein 2 is expressed by, and acts upon, mature epithelial cells in the colon. *Gastroenterology* 126(1):111-21
- 36 Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F (2003) Principles of interleukin (II)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374:1-20
- 37 Hideshima T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Anderson KC (2004) Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications. *Blood* 104(3):607-618
- 38 Hilbert DM, Kopf M, Mock BA, Köhler G, Rudikoff S (1995) Interleukin-6 is essential for in vivo development of B lineage neoplasms. *J Exp Med.* 182:243-248
- 39 Hirano T, Akira S, Taga T, Kishimoto T (1990) Biological and clinical aspects of interleukin-6. *Immunol Today* 1:443-449
- 40 Hjertner Ö, Hjorth-Hansen H, Börset M, Seidel C, Waage A, Sundan A (2001) Bone morphogenetic protein-4 inhibits proliferation and induces apoptosis of myeloma cells. *Blood* 97(2):516-22
- 41 Hogan BLM (1996) Bone morphogenetic proteins: multi-functional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* 10(13):1580-94
- 42 Holland PM et al. (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of *Thermus Aquaticus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7276-7270
- 43 Ibrahimi OA, Zhang F, Lang Hrstka SC, Mohammadi M, Linhardt RJ (2004) Kinetic model for FGF, FGFR and proteoglycan signal transduction complex assembly. *Biochemistry* 43:4724-30
- 44 Jin Y, Lu H, Tipoe GL, Li Y (2000) Analysis of the expression of BMP-2,3,4,5 in nerve sheath tumors of maxillofacial region. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 18(5):307-9
- 45 Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW (2002) Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* 108:153-164
- 46 Kawabata M, Imamura T, Miyazono K (1998) Signal Transduction by Bone Morphogenetic Proteins. *Cytokine&Growth Factor Reviews* 9(1):49-61

Literatur

- 47 Kawamura C, Kizaki M, Yamato K, Uchida H, Fukuchi Y, Hattori Y, Koseki T, Nishihara T, Ikeda Y (2000) Bone morphogenetic protein-2 induces apoptosis in human myeloma cells with modulation of STAT3. *Blood* 96(6):2005-2011
- 48 Keats JJ, Reiman T, Maxwell CA, et al. (2003) In multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression. *Blood* 101:1520-1529
- 49 Kersten C, Sivertsen EA, Hystad ME, Forfang L, Smeland EB, Myklebust JH (2005) BMP-6 inhibits growth of mature human B cells; induction of Smad phosphorylation and upregulation of Id1. *BMC Immunology* 6(1):9
- 50 Klein B, Zhang XG, Lu ZY, Bataille R (1995) Interleukin-6 in human multiple myeloma. *Blood* 85:443-449
- 51 Koskela K, Pelliniemi TT, Pulkki K, Remes K (2004) Treatment of multiple myeloma with all-trans retinoic acid alone and in combination with chemotherapy: a phase I/II trial. *Leuk Lymphoma* 45(4):749-54
- 52 Kuehl WM, Bergsagel PL (2002) Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* 2:175-187
- 53 Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, et al. (2002) A long-term study of prognosis I monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med.* 346:564-569
- 54 Langenfeld EM, Calvano SE, Abou-Nukta F, Lowry SF, Amenta P, Langenfeld J (2003) The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cell. *Carcinogenesis* 24(9).1445-54
- 55 Lee LG, Connell CR, Bloch W (1993) Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 21(16):3761-6
- 56 Lenhoff S, et al. (2000) Impact on survival of high-dose therapy with autologous stem cell support in patients younger than 60 years with newly diagnosed multiple myeloma: a population-based study. *Blood* 95:7-11
- 57 Lentzsch S, Chatterjee M, Gries M, Bommert K, Gollasch H, Dörken B, Bargou RC (2004) PI3-K/Akt/FKHR and MAPK signaling cascades are redundantly stimulated by a variety of cytokines and contribute independently to proliferation and survival of multiple myeloma cell. *Leukemia* 18:1883-90
- 58 Lichtenstein A, Tu Y, Fady c, Vesico R, Berenson J (1995) Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells. *Cell Immunol.* 162(2):248-55
- 59 Lin B, Podar K, Gupta D, Tai Y-T, Li S, Weller E et al. (2002) The vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor PTK787/ZK222584 inhibits growth and migration of multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Cancer research* 62:5019-26
- 60 Livak K et al. (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Meth. And Applic.* 4(6):357-362
- 61 Malpas J, Bergsagel DE, Kyle RA (1998) *Myeloma: Biology and Management*. Oxford, England: Oxford University Press

Literatur

- 62 Miyazono K (2000) Commentary: Positive and negative regulation of TGF- β signaling. *Journal of Cell Science* 113:1101-1109
- 63 Moreau P, Facon T, Leleu X, et al. (2002) Recurrent 14q32 translocations determine the prognosis of multiple myeloma, especially in patients receiving intensive chemotherapy. *Blood* 100:1579-1583
- 64 Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Herb Symp Quant Biol*; 51 pt 1:263-73
- 65 Munshi N, Wilson C, Penn J, et al. (1998): Angiogenesis in newly diagnosed multiple myeloma: poor prognosis with increased microvessel density in bone marrow biopsies (abstract). *Blood* 92:98a
- 66 Ogawa M, Nishiura T, Oritani K, Yoshida H, Yoshimura M, Okajima Y, Ishikawa J, Hashimoto K, Matsumura I, Tomiyama Y, Matsuzawa Y (2000) Cytokines prevent dexamethasone-induced apoptosis via the activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in a new multiple myeloma cell line. *Cancer research* 60:4262-4269
- 67 Otsuki T, Yamada O, Yata K, et al. Expression of fibroblast growth factor and FGF-receptor family genes in human myeloma cells, including lines possessing t(4;14)(p16.3;q32.3) and FGFR3 translocation. *Int J Oncol.* 15:1205-1212
- 68 Paine-Saunders S, Viviano BL, Economides AN, Saunders S (2002) Heparan sulfate proteoglycans retain noggin at the cell surface. *J. Biol. Chem.* 277(3):2089-96
- 69 Pellat-Deceunynck C, Bataille R, Robillard N, Harousseau JL, Rapp MJ, Juge-Morineau N, Wijdenes J, Amiot M (1999) Expression of CD28 and CD40 in human myeloma cells: a comparative study with normal plasma cells. *Blood* 84(8):2597-603
- 70 Pelliniemi TT, Irljala K, Mattila K, et al. (1995) Immunoreactive interleukin-6 and acute phase proteins as prognostic factors in multiple myeloma. *Blood* 85:765-771
- 71 Pepper C, Thomas A, Tucker H, Hoy T, Bentley P (1998) Flow cytometric assessment of three different methods for t measurement of in vitro apoptosis. *Leuk. Res.* 22(5):439-44
- 72 Pingoud A, Urbanke C (1997) *Arbeitsmethoden der Biochemie.* De Gruyter, Berlin New York
- 73 Podar K, Catley LP, Tai Y-T, Shringarpure R, Carvalho P, Hayashi T, Burger R, Schlossman RL, Richardson PG, Pandite LN, Kumar R, Hideshima T, Chauhan D, Anderson KC (2004) GW654652, the pan-inhibitor of VEGF receptors, blocks the growth and migration of multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Blood* 103(9):3474-79
- 74 Podar K, Yu-Tzu T, Davies FE, Lentzsch S, Sattler M, Hideshima T, Lin BK, Gupta D, Shima Y, Chauhan D, Mitsiades C, Raje N, Richardson P, Anderson KC (2001) Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood* 98(2):428-435
- 75 Podar K, Yu-Tzu T, Sattler M, Treon SP, Mitsiades C, Davies FE (2000) The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the pathophysiology of multiple myeloma. *Blood* 96:836a

Literatur

- 76 Pollett JB, Zhu YX, Gandhi S, Bali M, Masih-Khan E, Li Z, Wen XY, Stewart AK (2003) RU486-inducible retrovirus-mediated caspase-3 overexpression is cytotoxic to bcl-xL-expressing myeloma cells in vitro and in vivo. *Mol Ther.* 8(2):230-7
- 77 Reddi AH (1998) Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration. *Nat. Biotechnol.* 16(3):247-52
- 78 Reddi AH (1994) Bone and cartilage differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4: 737-744.
- 79 Reibnegger G, Krainer M, Herold M, Ludwig H, Wachter H, Huber H (1991) Predictive value of interleukin-6 and neopterin in patients with multiple myeloma. *Cancer Res.* 51: 6250-6253
- 80 Ribatti D, Vacca A, Nico B, et al. (1999) Bone marrow angiogenesis and mast cell density increase simultaneously with progression of human multiple myeloma. *Br J Cancer* 79:451-455
- 81 Ro TB, Holt RU, Brenne A-T, Hjorth-Hansen H, Waage A, Hjertner O, Sundan a, Borset M (2004) Bone morphogenetic protein-5, -6 and -7 inhibit growth and induce apoptosis in human myeloma cells. *Oncogene* 23:3024-3032
- 82 Rodriguez-Leon J, Merino R, Macias D, Ganan Y, Santesteban E, Hurlé JM (1999) Retinoic acid regulates programmed cell death through BMP signalling. *Nature Cell Biology* 1:125-126
- 83 Rosen V, Thies RS (1992) The BMP proteins in bone formation and repair. *Trends Genet.* 8(3):97-102
- 84 Ryou JJ, Cole CE, Anderson KC (2002) Novel therapies for multiple myeloma. *Blood Reviews* 16: 167-174
- 85 Schneider U, van Lessen A, Huhn D, Serke S (1997) Two subsets of peripheral blood cells defined by different expression of CD45 antigen. *Br. J. Haematol.* 97(1):56-64
- 86 Shepherd TG, Nachtigal MW (2003) Identification of a putative autocrine bone morphogenetic protein-signaling pathway in human ovarian surface epithelium and ovarian cancer cells. *Endocrinology* 144(8):3306-3314
- 87 Shou Y, Martelli ML, Gabrea A, et al. (2000) Diverse karyotypic abnormalities of the c-myc locus associated with c-myc dysregulation and tumor progression in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:228-233
- 88 Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C, Leroux D, Fruchart C (2001) Hyperdiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 98:2229-2238
- 89 Smadja NV, Leroux D, Soulier J, et al. (2003) Further cytogenetic characterization of multiple myeloma confirms that 14.32 translocations are a very rare event in hyperdiploid cases. *Genes Chromosomes Cancer* 38:234-239
- 90 Smith MR, Xie T, Joshi I, Schilder RJ (1998) Dexamethasone plus retinoids decrease Il-6/Il-6 receptor and induce apoptosis in myeloma cells. *British Journal of Haematology* 102:1090-97
- 91 Spets H, Strömberg T, Georgii-Hemming P, Siljason J, Nilsson K, Jernberg-Wiklund H (2002) Expression of the bcl-2 family of pro-and anti-apoptotic genes in multiple myeloma and normal plasma cells. *Eur J Haematol.* 69:76-89

Literatur

- 92** Stoscheck CM (1990) Increased Uniformity in the Response of the Coomassie Blue G Protein Assay to Different Proteins. *Analytical Biochemistry* 184:111-116
- 93** Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76(9):4350-4
- 94** Trudel S, Ely S, Farooqi Y, Affer M, Robbiani DF, Chesi M, Bergsagel PL (2004) Inhibition of fibroblast growth factor receptor 3 induces differentiation and apoptosis in t(4;14) myeloma. *Neoplasia* 103(9):3521-28
- 95** Vacca A, Ribatti D, Presta M, et al. (1999) Bone Marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood* 93: 3064-3073
- 96** Vacca A, Ribatti D, Roncali L, et al (1994) Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. *Br J Haematol.* 87:503-508
- 97** Vara JAF, Casado E, de Castro J, Cejas P, Pelda-Iniesta C, Gonzalez-Baron M (2004) PI3K/Akt signaling pathway in cancer. *Cancer treatment reviews* 30:193-204
- 98** Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 17;184(1):39-51
- 99** Wach S, Schirmacher P, Protschka M, Blessing M (2001) Overexpression of bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) in murine epidermis suppresses skin tumor formation by induction of apoptosis and downregulation of fos/jun family members. *Oncogene* 20:7761-7769
- 100** Wang AM, Doyle MV, Mark DF (1989) Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86(24):9717-21
- 101** Wijdenes J, Vooijs WC, Clement C, Post J, Morard F, Vita N, Laurent P, Sun RX, Klein B, Dore JM (1996) A plasmocyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br. J. Haematol.* 94(2):318-23
- 102** Wozney JM (1989) Bone morphogenetic proteins. *Prog. Growth Factor Res.* 1(4):267-80
- 103** Yamashita H, Ten Dijke P, Heldin CH, Miyazono K (1996) Bone morphogenetic Protein Receptors. *Bone* 19(6):569-574
- 104** Yokouchi Y, Sakiyama J, Kameda T, et. al. (1996) BMP-2/-4 mediate programmed cell death in chicken limb buds. *Development* 122: 3725-3734

Curriculum Vitae

18.07.1979	geboren in Warendorf
1986-90	Grundschule Westkirchen
1990-93	Gymnasium Laurentianum Warendorf
1993-99 1999	Freiherr-vom-Stein-Gymnasium Hamm Allgemeine Hochschulreife
1999-2005	Studium der Humanmedizin an der Westfälischen- Wilhelms-Universität Münster
2004-2005	Absolvierung des Praktischen Jahres am Universitätsklinikum Münster und der Tulane University School of Medicine: Klinik und Poliklinik für Neurologie, Univ.-Prof. Dr. med. E. B. Ringelstein, Medizinische Klinik und Poliklinik D, Univ.-Prof. Dr. med. H. Pavenstädt, Tulane University School of Medicine, Department of Surgery, New Orleans, USA
2002-2007	Dissertation in der Medizinischen Klinik und Poliklinik A des Universitätsklinikums Münster, Direktor Univ.-Prof. Dr. med. W. E. Berdel
Leitung	Univ.-Prof. Dr. med. J. Kienast
Thema	Expression und Regulation von Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) beim Multiplen Myelom.
seit 2005	verheiratet mit Sebastian George
seit 2006	Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Medizinischen Klinik und Poliklinik D des Universitätsklinikums Münster Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Pavenstädt
Münster, 02.09.2007	

Danksagung

Danksagung

Besonderen Dank sagen möchte ich Herrn Professor Kienast für die Überlassung dieses interessanten Themas und seine hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Mein persönlicher Dank gilt auch Herrn Dr. Bisping, der mir bei allen Fragen stets produktiv und motivierend zur Seite stand.

Bei Herrn Dr. Kropff möchte ich mich für die Zurverfügungstellung der Knochenmarkbiopsieproben ganz herzlich bedanken.

Des Weiteren vielen Dank an das gesamte Labor-Team des Knochenmarktransplantationszentrums.

In großem Maße haben meine Eltern, Dieter und Vera Dreyer, sowie mein Ehemann Sebastian George durch ihre fortwährende Unterstützung diese Arbeit ermöglicht. Hierfür bedanke ich mich ganz herzlich.