

Biologie

**Charakterisierung der Genexpression und
funktionellen Regulation von MAP4K im
Multiplen Myelom**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Dirk Gustavus
aus Bad Muskau

- 2011 -

Dekan:	Prof. Dr. Christian Klämbt
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Andreas Püschel
Zweiter Gutachter:	PD Dr. Guido Bisping
Tag der Disputation:	17.10.2011
Tag der Promotion:	21.10.2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Multiples Myelom	1
1.1.1	Definition.....	1
1.1.2	Pathogenese des Multiplen Myeloms: Modell der schrittweisen Transformation.....	1
1.1.3	Molekulare Klassifikation des Multiplen Myeloms	2
1.2	Das Knochenmarkmikromilieu.....	3
1.3	Zielgerichtete Beeinflussung anti-apoptotischer Signale in Myelomzellen	5
1.4	Hämatopoetische Progenitor Kinase (HPK1, MAP4K1).....	7
1.4.1	Struktur und Funktion von HPK1	7
1.4.2	HPK1: gewebespezifische Expression - allgemein.....	9
1.4.3	Charakterisierung und Regulation von HPK1, SAPK und NFκB in T-Zellen	10
1.4.4	Charakterisierung und Regulation von HPK1 in B-Zellen.....	11
1.4.5	HPK1 und Multiples Myelom.....	12
2	Fragestellungen und Ziele der Arbeit	14
3	Ergebnisse.....	15
3.1	HPK1 im Multiplen Myelom.....	15
3.1.1	Untersuchungen zur mRNA- und Proteinexpression von HPK1 in humanen und murinen Myelomzellen.....	15
3.2	Charakterisierung der funktionellen Eigenschaften von Myelomzellen nach HPK1-Überexpression	18
3.2.1	Phänotypische Veränderungen von MPC-11 mit überexprimierter HPK1 (HPK1 ^{high} & HPK1 ^{high(K46E)}) im Vergleich zu HPK1 ^{wt}	19
3.2.2	Veränderung der Proliferationsaktivität und Apoptosesensitivität von Myelomzellen gegenüber anti-myelomatösen Substanzen durch überexprimierte HPK1	20
3.2.3	Einfluss überexprimierter HPK1 auf das Tumorwachstum im syngenem, murinen MPC-11/BALB/c-Modell.....	25
3.2.4	Effekte überexprimierter HPK1 auf intrazelluläre Signalwege in Myelomzellen.....	29
3.2.5	Effekte überexprimierter HPK1 auf das Transkriptom der Myelomzellen.....	31
3.3	Charakterisierung von Effekten selektiv herunterregulierter HPK1 in Myelomzellen (HPK1-knock-down mittels RNAi)	35
3.3.1	Phänotypische Veränderungen von MPC-11 mit reduziert exprimierter HPK1 (HPK1 ^{low}) im Vergleich zu HPK1 ^{wt}	35
3.3.2	Veränderung der Proliferationsaktivität und Apoptosesensitivität von Myelomzellen gegenüber anti-myelomatösen Substanzen durch selektiv reduzierte HPK1 (HPK1-knock-down mittels RNAi).....	36

Inhaltsverzeichnis

3.3.3	Effekte vermindert exprimierter HPK1 auf intrazelluläre Signalwege in Myelomzellen.....	40
3.3.4	Effekte reduzierter HPK1-Expression auf das Transkriptom der Myelomzellen.....	41
4	Diskussion.....	42
4.1	Zelluläre Effekte auf die Überexpression von HPK1 beim Multiplen Myelom	43
4.2	HPK1-beeinflusste Proliferation und Apoptose in murinen Myelomzellen	46
4.3	HPK1 reguliert Proliferationsaktivität und Apoptosesensitivität	48
4.4	HPK1 und Tumorwachstum <i>in vivo</i>	51
4.5	HPK1-knock-down: Einfluss auf das Multiple Myelom	52
4.6	HPK1: Einfluss auf die zelluläre Differenzierung	52
5	Material und Methoden.....	56
5.1	Material.....	56
5.1.1	Chemikalien.....	56
5.1.2	Lösungen und Puffer.....	58
5.2	Methoden	61
5.2.1	Zellkulturarbeiten	61
5.2.1.1	Haltung eukaryotischer Zelllinien	61
5.2.1.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zelllinien	61
5.2.2	Dichtegradienten-Zentrifugation von Zellkulturen und primären Knochenmark- aspiraten.....	62
5.2.3	Bestimmung der Zellzahl (Zählkammer Neubauer „Improved“)	62
5.2.4	Inhibitionsversuche	62
5.2.5	Isolierung von CD138 ⁺ -MM-Zellen und CD19 ⁺ -B-Lymphozyten aus primären Knochenmark („magnetic bead activated cell sorting“, MACS).....	63
5.2.6	³ [H]-Thymidin-Proliferations-Assay	63
5.2.7	Durchflusszytometrische Analysen	64
5.2.7.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	64
5.2.7.2	Annexin V (FITC) /7-AAD-Apoptose-Assay.....	65
5.2.7.3	Messung der Transfektionseffizienz mittels Tag-Nachweis.....	66
5.2.8	Einzelgen- und Transkriptom-Expressionsuntersuchungen.....	66
5.2.8.1	RNA-Isolierung und Konzentrationsmessung	66
5.2.8.2	Reverse Transkription.....	67
5.2.8.3	Quantitative Real-Time-PCR (TaqMan [®] -Analyse)	67
5.2.8.4	Sonden- und Primer-Design.....	69
5.2.8.5	Transkriptom-Analyse	70
5.2.9	Protein-Expressionsuntersuchungen	70

Inhaltsverzeichnis

5.2.9.1	Protein-Extraktion.....	70
5.2.9.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	70
5.2.9.3	Immunoblot und Detektionsmethode.....	71
5.2.9.4	Ablösen von Antikörpern von PVDF-Membranen (Stripping)	72
5.2.10	Mikrobiologische Methoden.....	72
5.2.10.1	Herstellung chemo-kompetenter Zellen.....	72
5.2.10.2	Transformation kompetenter Bakterien mittels Hitzeschock.....	72
5.2.10.3	Kultivierung von transformierten Bakterien	72
5.2.11	DNA-Plasmid-Präparation.....	73
5.2.11.1	Plasmidisolierung in präparativem Maßstab („Maxi-Präparation“)	73
5.2.11.2	Plasmid-Konzentrationsbestimmung	73
5.2.12	Transfektion muriner Myelomzelllinien	73
5.2.12.1	Herstellung von überexprimierender Zellen mittels Elektroporation	73
5.2.12.2	Anwendung der RNA-Interferenz zur Reduzierung der Genexpression	74
5.2.12.3	Herstellung stabil transfizierter Zelllinien.....	74
5.2.13	Untersuchung der Phospho-Protein-Expression mittels Multi-Panel-Proteinarrays.....	75
5.2.14	Untersuchungen des Tumorwachstums <i>in vivo</i>	75
5.2.15	Statistik	76
6	Zusammenfassung	78
	Abbildungsverzeichnis.....	80
	Tabellenverzeichnis.....	82
	Abkürzungsverzeichnis	83
	Anhang.....	86
	Literaturverzeichnis.....	94
	Danksagung.....	102
	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung

1.1 Multiples Myelom

1.1.1 Definition

Das Multiple Myelom (MM) zählt zu den häufigsten hämatopoetischen Neoplasien des fortgeschrittenen Lebensalters (Landis u. a., 1999). Es ist als B-Zell-Erkrankung durch klonale Expansion terminal differenzierter Plasmazellen im Knochenmark, Expression monoklonaler Immunglobuline und osteolytische Knochendestruktionen gekennzeichnet (Goldschmidt u. a., 2003). Die Erkrankung bleibt bislang trotz Anwendung von Hochdosischemotherapie mit nachfolgender autologer und/oder allogener Blutstammzelltransplantation und neuer zielgerichteter biologisch basierter Verfahren nicht heilbar.

1.1.2 Pathogenese des Multiplen Myeloms: Modell der schrittweisen Transformation

In der Pathogenese des MM geht man von einer schrittweisen neoplastischen Transformation aus, die einerseits durch Translokationen im Bereich der Immunglobulin-Schwerketten(IgH)-Region auf dem Chromosom 14, andererseits durch Hyperplodien/Trisomien mit nachfolgender Etablierung eines Plasmazellklons und anschließender Aktivierung autonomer Proliferation bzw. Inhibition des programmierten Zelltods (Apoptose) charakterisiert ist (Abb. 1; Bergsagel und Kuehl, 2003).

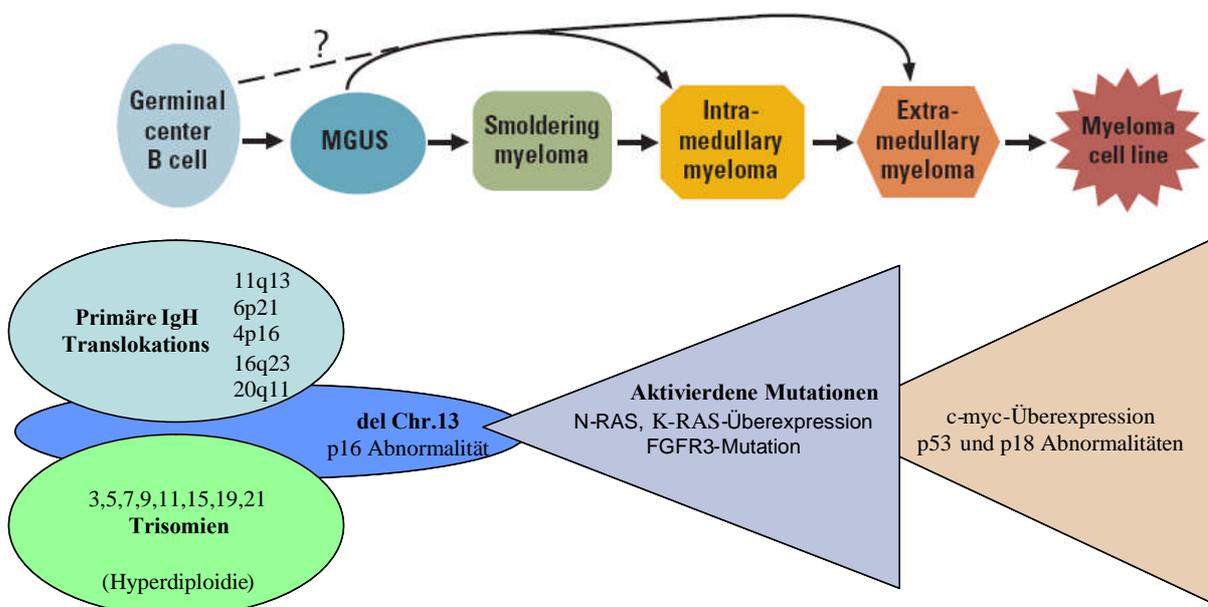


Abbildung 1: Modell der schrittweisen malignen Transformation (modifiziert nach Bergsagel und Kuehl, 2003)

1.1.3 Molekulare Klassifikation des Multiplen Myeloms

Die Identifizierung früher genetischer Translokationsereignisse hat zu einer neuen molekularen Klassifizierung des Multiplen Myeloms beigetragen, die zum einen die mit der Translokation assoziierten Genüberexpressionen, zum anderen die assoziierte Cyclin D-Dysregulation und den Ploidiegrad berücksichtigt (Tab. 1; Kuehl und Bergsagel, 2002; Bergsagel und Kuehl, 2003; Barillé-Nion u. a., 2003).

Tabelle 1: Molekulare Translokation/Cyclin D-Dysregulations (TC)-Klassifikation des Multiplen Myeloms anhand einer hierarchischen Clusteranalyse der entsprechenden Translokationspartner des Chromosom 14(q32) und des dysregulierten Cyclin D.

	Primäre Translokation	Gene am Bruchpunkt	Cyclin D-Form	Ploidiegrad	% MM
TC1	11q13	<i>ccnD1</i>	D1	nicht hyperploid	15
	6p21	<i>ccnD3</i>	D3	nicht hyperploid	3
TC2	Keine	Keine	D1	hyperploid	37
TC3	Keine	Keine	D2	hyperploid	22
				=	
TC4	4p16	<i>fgfr3/mmset</i>	D2	nicht hyperploid	16
				>	
TC5	16q23	<i>c-maf</i>	D2	nicht hyperploid	5
	20q11	<i>mafB</i>	D2	nicht hyperploid	2

adaptiert nach Bergsagel, 2003

Eine prognostisch ungünstige Bedeutung für den Erkrankungsverlauf ergibt sich insbesondere durch die Translokation t(4;14)(p16.4;q32) mit onkogen transformierender Überexpression des Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor 3 (FGFR3) (Li u. a., 2001; Chesi u. a., 2001) und durch eine Translokation t(14;16)(q32;q23) mit assoziierter Überexpression von c-MAF (Hurt u. a., 2004; Kienast und Berdel, 2004).

1.2 Das Knochenmarkmikromilieu

Interaktionen zwischen Myelomzellen, Extrazellulärer Matrix und sogenannten akzessorischen Zellen des Knochenmarks (Stromazellen, Osteoblasten, Osteoklasten) fördern die Proliferation, Migration und Adhäsion von Myelomzellen. Diese Umgebung bildet auch die Grundlage der Resistenz gegenüber konventionellen Chemotherapeutika und der osteolytischen Knochendestruktion im Verlauf der Myelomprogression.

So perpetuiert die Adhäsion von Myelomzellen an Knochenmarkstromazellen - vermittelt durch Interaktionen vom Leukozyten Funktions-assoziierten Antigen-1 (LFA1) und dem Integrin VLA-4 auf der Myelomzelloberfläche sowie vom Vasculären Zell Adhäsions-Molekül 1 (VCAM-1) und dem Interzellulären Adhäsions-Molekül 1 (ICAM-1) auf der Seite des Knochenmarkstromas - die autokrine und parakrine Zytokinsekretion aus beiden Kompartimenten.

Interleukin-6 (IL-6) vermittelt parakrin die Proliferation und das Überleben von Myelomzellen durch Aktivierung des Ras-Raf-MAPK- und Jak/STAT-Weges. IL-6 induziert in MM-Zellen weiterhin die Sekretion angiogener Zytokine wie dem Vasculären Endothelialen Wachstums-Faktor (VEGF) und dem basischen Fibroblasten Wachstums-Faktor (bFGF). VEGF stimuliert neben der Knochenmarkneoangiogenese über einen autokrinen Mechanismus direkt Wachstum und Migration von Myelomzellen. VEGF und bFGF induzieren in wechselseitiger Interaktion wiederum die Sekretion von IL-6 in Stromazellen (parakrine IL-6-VEGF-/bFGF-Kreislauf) (Chauhan u. a., 1996; Ogata u. a., 1997; Dankbar u. a., 2000; Gupta u. a., 2001; Hideshima u. a., 2001c; Podar u. a., 2001; Bisping u. a., 2003). TNF- α , neben IL-1 β einer der potentesten Induktoren des nuklearen Transkriptionsfaktors κ B (NF κ B), verstärkt die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Zytokinsekretion durch die Aktivierung von NF κ B (Hideshima u. a., 2001b). Insulin Wachstums-Faktor 1 (IGF1), von Stromazellen sezerniert, inhibiert die Myelomzellapoptose durch eine Aktivierung des Ras- und PI3K-Signalweges (Mitsiades u. a., 2002). Außerdem wird auf diesem Weg die Adhäsion und die Migration von MM-Zellen induziert (Tai u. a., 2003).

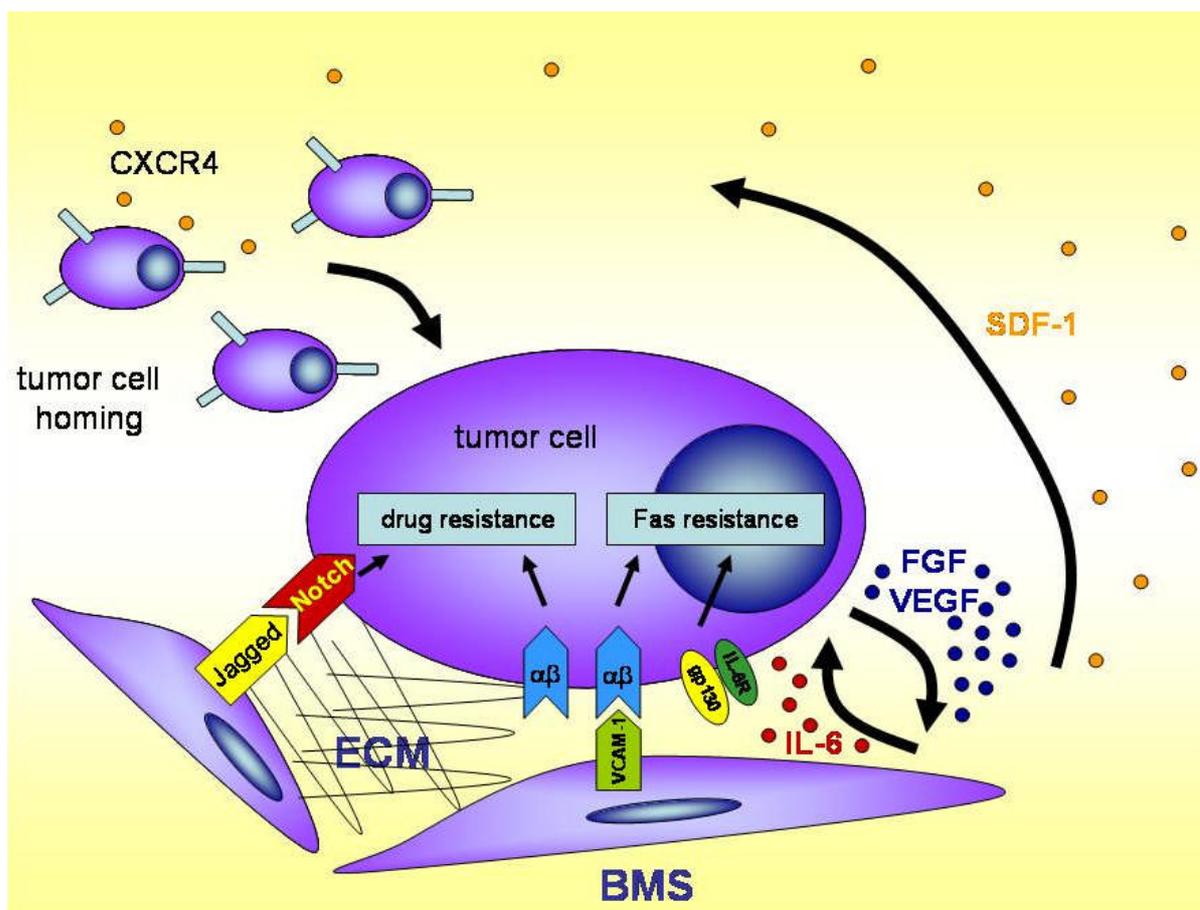


Abbildung 2: Interaktionen zwischen Myelomzellen, Knochenmarkstromazellen („bone marrow stroma cells“ - BMS cells) und Extrazellulärer Matrix (ECM) - Mechanismen von Chemotherapieresistenz (Lin u. a., 2002; Hideshima u. a., 2002; Podar u. a., 2004; Bisping u. a., 2006; Meads u. a., 2008).

Myelomzellen schaffen sich durch anti-apoptotisch wirksame parakrine Zytokin-Interaktionen günstige Mikromilieubedingungen. Eine zentrale Bedeutung ist der Ausschüttung von VEGF und FGF aus Myelomzellen beizumessen, was zu einer gesteigerten IL-6 Sekretion aus Stromazellen führt. Durch eine IL-6-abhängige IL-6-Rezeptor/gp130-Stimulation wird die Heraufregulation von Bcl2-11 induziert, was zur Apoptose-Resistenz beiträgt. Im Sinne einer Verstärkerschleife induziert die Sekretion von Chemokin Ligand 12 („stromal cell-derived factor 1“, SDF-1) das Anheften von Myelomzellen (die den SDF-1 Rezeptor CXCR-4 exprimieren) an Knochenmarkstroma. Neben löslichen Faktoren vermitteln Interaktionen zwischen Oberflächenrezeptoren ($\alpha\beta$ -Integrinen und VCAM-1) direkt die sogenannte Mikromilieu-vermittelte Chemotherapieresistenz von Myelomzellen (modifiziert nach Meads, 2008).

Das vielschichtige Netzwerk der Interaktionen unterstreicht zahlreiche Möglichkeiten der Aktivierung zentraler proliferativ und anti-apoptotisch wirksamer Signalwege im MM. Ihre Vielschichtigkeit erfordert für eine anti-myelomatöse Therapiestrategie ein effizientes Inhibieren zentraler Signalknotenpunkte durch:

- a) zielgerichtete Hemmung von Signalen nahe am Rezeptor (sogenannte „upstream-Targets“)
- b) Inhibition mehrerer relevanter Signalwege (sogenanntes „pleiotropes Targeting“)

1.3 Zielgerichtete Beeinflussung anti-apoptotischer Signale in Myelomzellen

Im Folgenden werden zentrale Überlebenssignale von Myelomzellen und exemplarische Wirkmechanismen anti-myelomatöser Strategien dargestellt.

Eine erste Strategie ist die Anwendung von „klassischen“ Chemotherapeutika. Der Einsatz von Melphalan (DNA-Alkylanz) verursacht die Alkylierung von Guaninen. In den betroffenen Zellen werden dadurch die Replikation und Zellteilung/-vermehrung gestört bzw. verhindert. Bei Anwendung in der Krebstherapie zielt man damit auf die Hemmung einer abnormen Vermehrung der Tumorzellen. Im klinischen Gebrauch wird Melphalan heute in der Erstlinientherapie älterer Patienten mit Multiplem Myelom in Kombination mit einem synthetischen Corticosteroid (Prednison) und dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib oder dem Angiogenese-Hemmer Thalidomid angewendet. Darüber hinaus kommt Melphalan bei jüngeren Patienten mit Multiplem Myelom im Rahmen von Hochdosistherapien zum Einsatz.

Eine Blockade parakriner und autokriner Effekte von IL-6 durch Anwendung von Glucocorticoiden ist ein Beispiel für eine mehr oder minder selektive Rezeptor-Hemmung. Durch Bindung dieser Moleküle (z.B. Dexamethason) an die Glucocorticoid-Rezeptoren (GR) wird die Transkription von IL-6 unterdrückt. Dies führt erstens zur Unterbrechung der parakrinen VEGF-IL-6- und bFGF-IL-6-Interaktionen aufgrund der unmittelbaren Suppression der Sekretion von IL-6 aus Knochenmarkstromazellen, einem der Hauptwachstumsfaktoren für MM-Zellen, und dadurch zur Inhibition der Migration und verminderter Adhäsion der MM-Zellen an das Knochenmarkstroma; zweitens zur direkten Apoptose-Induktion durch Suppression zentraler MAPK- und P70S6K-Signalwege (Ray u. a., 1990; Hardin u. a., 1994; Chauhan u. a., 1997). *In vitro* kann die Dexamethason-induzierbare Apoptose bei Anwesenheit von exogenen IL-6 durch Aktivierung des PI3K-AKT-Signalweges verhindert werden.

Der Transkriptionsfaktor NF κ B ist aktiviert beim MM (vgl. Kap. 1.2). Nach TNF- α -abhängiger Phosphorylierung und nachfolgender Ubiquitinierung von I κ B, dem zytoplasmatischen Inhibitor von NF κ B (P50/P65), erfolgt die Degradation von I κ B durch das 26S-Proteasom. Hierdurch kann NF κ B in den Zellkern einwandern. Es kommt nachfolgend zur transkriptionellen Induktion von Zytokinen, von Adhäsionsmolekülen und zur Inhibition vom programmierten Zelltod (Apoptose). 26S-Proteasom-spezifische Inhibitoren wie Bortezomib (PS-341) verhindern durch Inhibition der Degradation von I κ B die Aktivierung und nukleäre Translokation von NF κ B. Proteasom-Inhibitoren zeichnen sich durch einen relativ unspezifischen Ansatz biologisch basierter „zielgerichteter“ Hemmung von Überlebensmechanismen des MM aus (Inhibierung von Protein-Degradation), erreichen aber durch die Blockade pleiotroper NF κ B-Effekte (Zytokin-Sekretion, Adhäsion, Apoptose-Regulation) eine hohe therapeutische Effizienz (Adams u. a., 1999; Hideshima u. a., 2001a + 2002 + 2003; LeBlanc u. a., 2002).

Die Signaltransduktion mittels MAP-Kinasen beeinflusst eine enorme Bandbreite zellulärer Prozesse, wie die Transkription, die Organisation des Zytoskeletts, die metabolische Homöostase, das Zellwachstum und die Apoptose. MAP-Kinase-Signalwege spielen eine große Rolle in der Pathogenese von Malignomen, Diabetes, Ischämie, Arthritis und septischem Schock (Platanias, 2003). Sie sind in der Evolution der eukaryotischen Zellen hoch konserviert. Den Kern dieser Signalwege bilden sogenannte Kern-Signal-Module („Core signaling modules“). Diese bestehen aus mehreren hierarchisch angeordneten Kinasen der MAPK-Superfamilie, die jeweils die nachgeschaltete Kinase durch Phosphorylierung enzymatisch aktivieren. So sind die prototypischen ERK1/2 Kinasen Substrate der MAPK-ERK-Kinasen (MEKs) und werden durch diese aktiviert. MEKs wiederum werden ihrerseits durch MEK-Kinasen (MEKKs) aktiviert. Innerhalb der Hierarchie erfüllen MEKKs die Funktion einer MAP-Kinase Kinase Kinase (MAP3Ks), etc. Von den mindestens fünf in Säugerzellen exprimierten MAPK-Modulen wurden bislang drei MAPK-Familien sehr detailliert charakterisiert:

die ERKs,

die Stress-aktivierte Protein-Kinasen (SAPKs, alias c-Jun-N-terminale Kinasen oder JNKs)

die P38 Kinasen

Mechanismen der Aktivierung von ERK und dessen Funktion im Ras-Signalweg und damit der Tyrosinrezeptor-Signalübertragung sind gut charakterisiert. SAPKs und P38 Kinasen werden vorzugsweise durch Umwelteinflüsse (z.B. ionisierende Strahlung, Hitze-Schock, oxidativer Stress), Entzündungsmediatoren (z.B. TNF, Interleukin-1, CD40L), und durch vaskuläre Prozesse aktiviert (z.B. Angiotensin 1L, Endothelin). SAPKs und p38s aktivieren verschiedene Transkriptionsfaktoren, besonders das Aktivator-Protein-1 (AP-1) (Tibbles und Woodgett, 1999).

Eine Möglichkeit der Untersuchung und Beeinflussung der Weiterleitung von extrazellulären Stimuli ist die spezifische Hemmung involvierter Kaskaden-Proteine. Zur Blockierung der Signalweiterleitung durch die MEK1 wurde der Inhibitor PD98059 eingesetzt. PD98059 bindet an die unphosphorylierte/inaktive Form der MEK1 und verhindert die Phosphorylierung nachgeschalteter Signalproteine (z.B. ERK1/2). Damit werden das Zellwachstum und die -differenzierung gestört.

Diese Beispiele veranschaulichen die Bedeutung der oben genannten Signalwege für Tumortransformation und -überleben und die therapeutische Nutzung einer gezielten Signalinterferenz.

1.4 Hämatoetische Progenitor Kinase (HPK1, MAP4K1)

1.4.1 Struktur und Funktion von HPK1

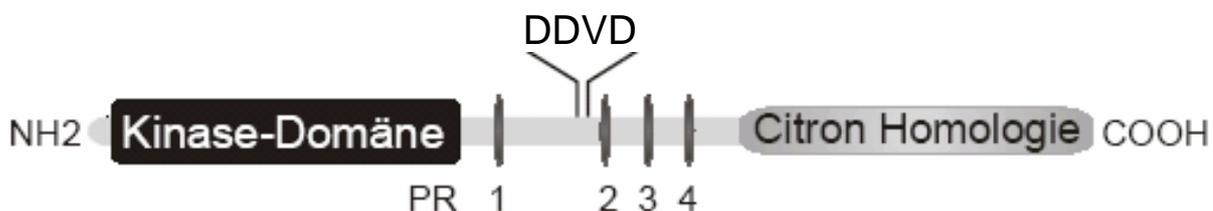


Abbildung 3: Schema zum Aufbau und Struktur von HPK1 (PR = Prolin-reiche Region; DDVD = Caspase 3-Spaltsequenz) (modifiziert nach Schulze-Luehrmann u. a., 2002)

Die murine und humane Hämatoetische Progenitor Kinase (HPK1, alias MAP4K1) wurde 1996 in zwei Arbeitsgruppen aus cDNA-Bibliotheken isoliert und charakterisiert (Kiefer u. a., 1996; Hu u. a., 1996). Die Gen- und Protein-Sequenzen von murinem und humanem HPK1 sind nahezu homolog.

Das 97kDa Protein unterteilt sich in 2 Domänen. Die N-terminale Domäne besitzt die Kinase-Funktionseinheit; am C-Terminus befindet sich die regulatorische Domäne, welche in die Citron-Homologie-Domäne (CHD) und in eine Sequenz mit vier Prolin-reichen Regionen (PR) unterteilt werden kann. Zwischen der ersten und der zweiten PR befindet sich eine Caspase-3-Spaltsequenz (-DDVD-) (Abb. 3).

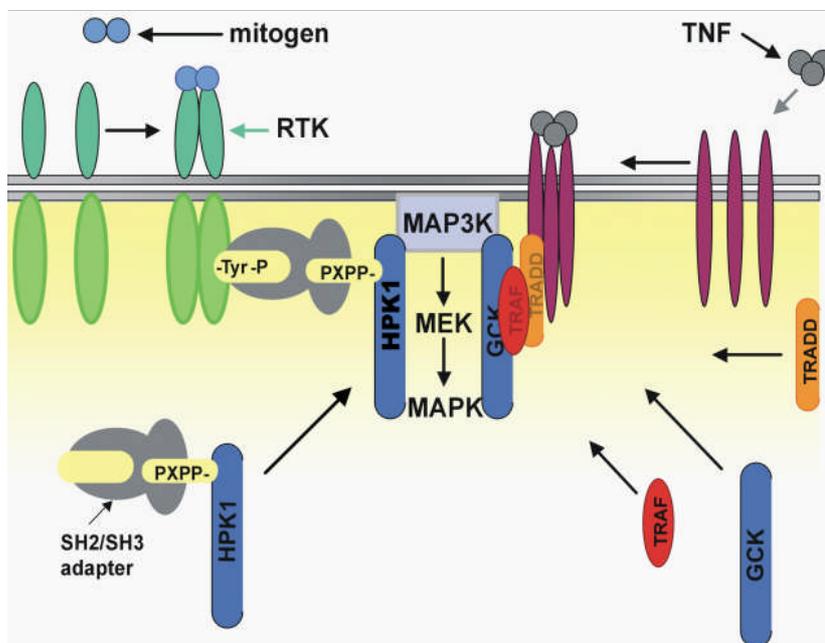


Abbildung 4: Hypothetisches Modell für Regulation und Funktion der Germinal Center Kinasen (GCKs). Für GCKs (wie HPK1) wird eine Membrantranslokation durch Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK), Zytokinrezeptoren, Immunorezeptoren oder Rezeptorkomponenten der TNF-Rezeptor (TNFR) Familie wie TRAF und TRADD postuliert. In der Folge wird die Kinaseaktivität der GCKs stimuliert. GCKs können direkt mit MAP3K interagieren und diese phosphorylieren. Die Natur dieser Phosphorylierungsereignisse ist noch nicht ausführlich untersucht, allerdings steht außer Zweifel, dass die Aktivierung der nachgeschalteten MAP-Kinasen Kaskade strikt von der Kinase-Aktivität der GCKs abhängig ist (modifiziert nach Kyriakis, 1999).

HPK1 gehört zur Gruppe der Germinal Center Kinasen (GCKs), die gemeinsam mit den p21-aktivierten Kinasen (PAK) die Familie der Ste20 (Sterile 20 Protein) Kinasen bilden (Kyriakis, 1999; Dan u. a., 2001). Sie ist in hämatopoetischen Zellen und perinatal im ZNS exprimiert. HPK1 vermag auf der Ebene einer MAP Kinase Kinase Kinase Kinase (MAP4K) die stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPKs) sehr selektiv zu aktivieren. HPK1 wiederum wird nach Stimulation von Antigenrezeptoren in T- und B-Lymphozyten in unmittelbarer Umgebung der Rezeptoren aktiviert (Abb. 4; Liou u. a., 2000; Tsuji u. a., 2001).

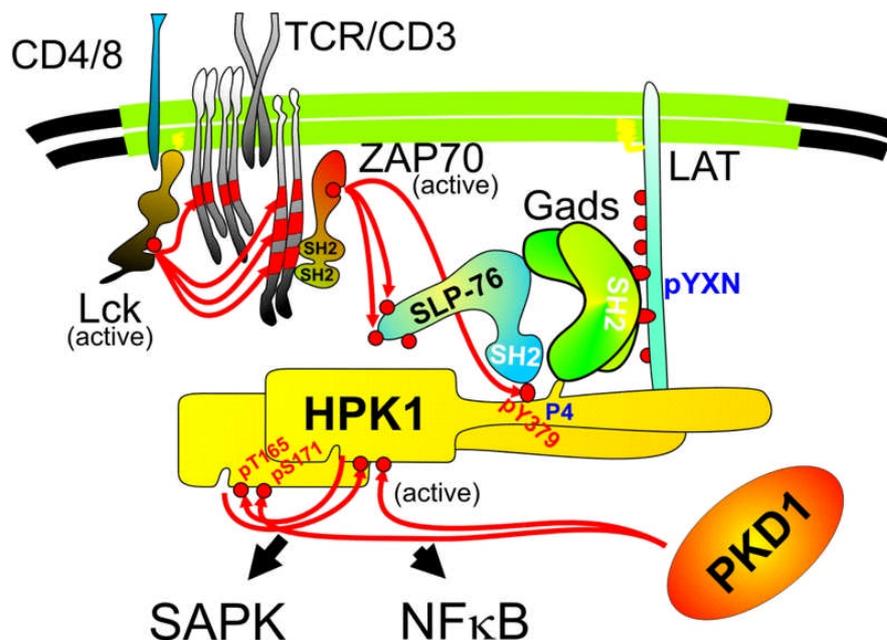


Abbildung 5: Übersichtsschema über die Wechselwirkungen verschiedener Proteine nach Einwirkung extramembranaler Stimuli bei T-Zellen (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Kiefer (MPI Münster))

In der münsteraner Arbeitsgruppe von Kiefer und Mitarbeitern wurde der exakte Mechanismus der Aktivierung von HPK1 nach Immunrezeptor-Stimulation bei T-Zellen entschlüsselt, wobei die Translokation zur Zellmembran ein initiales Ereignis der Aktivierung darstellt. Entscheidend für die Rekrutierung zur Membran sind Adaptorproteine der Grb2- und Slp76-Familie, die direkte Wechselwirkungen mit HPK1 eingehen. Grb2-Adaptoren erkennen mit ihren C-terminalen SH3-Domänen Prolin-reiche Sequenzmotive der zentralen Region von HPK1. An der Membran wird HPK1 zum Substrat von Tyrosin-Kinasen der Src/Syk-Familie und an Tyrosin 379 phosphoryliert. Dieser neu geschaffene Phosphotyrosinrest wird durch die C-terminale SH2-Domäne von Slp76-Adaptoren gebunden, was zu einer deutlichen Verstärkung der Membran-Translokation führt und für die nachfolgende enzymatische Aktivierung von unerlässlicher Bedeutung ist. Obgleich die Phosphorylierung an Tyrosin 379 nicht direkt die Aktivierung der HPK1-Kinasedomäne zur Folge hat, so ist sie doch eine unverzichtbare Vorbedingung.

Die eigentliche enzymatische Aktivierung geschieht durch Phosphorylierung von Threonin 165 und Serin 171 in der Aktivierungsschleife der HPK1-Kinasedomäne. Dabei stellt die Phosphorylierung

von Serin 171 eine Vorbedingung für die zur vollen Aktivierung nötige Auto-Phosphorylierung von Threonin 165 dar (Kiefer u. a., 1996; Liou u. a., 2000).

1.4.2 HPK1: gewebespezifische Expression - allgemein

Die mRNA-Expression von HPK1 wurde mittels Microarray-Analysen in zahlreichen humanen, adulten Geweben untersucht (Abb. 6). Die HPK1-Expression zeigt eine relativ hohe Gewebespezifität (Gesamtblut, Milz, Thymus, T- und B-Zell-Kompartiment).

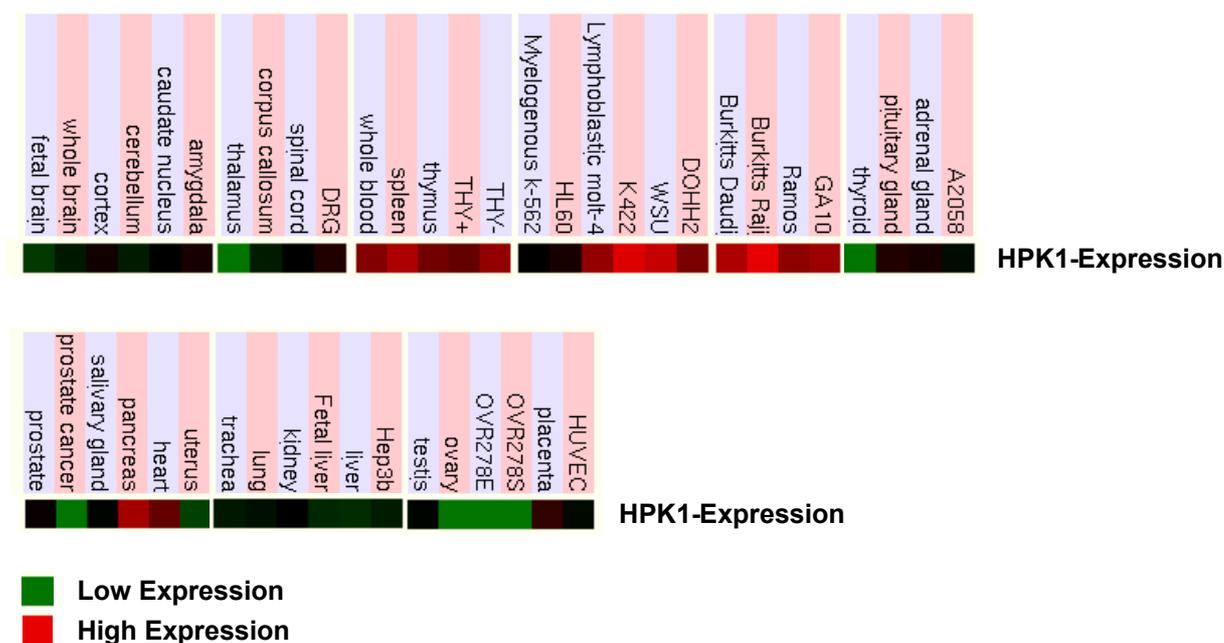


Abbildung 6: HPK1-Transkript-Expression in verschiedenen Geweben (Affymetrix U95 Chip) Quelle: <http://genome.ucsc.edu>

Auch in einer weiteren HPK1-Expressionsanalyse, mit besserer Auflösung im Bereich der Lymphozytensubpopulationen und genauer abgebildeten lymphomatösen und leukämischen Entitäten, konnte eine sehr spezifische hohe Expression von HPK1 in CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten, NK-Zellen, Monozyten, dendritischen Zellen, lymphoblastischen Leukämien und Burkitt-Lymphomen nachgewiesen werden. Im endothelialen und erythroiden Kompartiment wurde hingegen eine schwache Expression aufgezeigt (Abb. 7). Die Expression von HPK1 in Multiplen Myelomen wird in dieser Gewebsauswahl nicht erfasst.

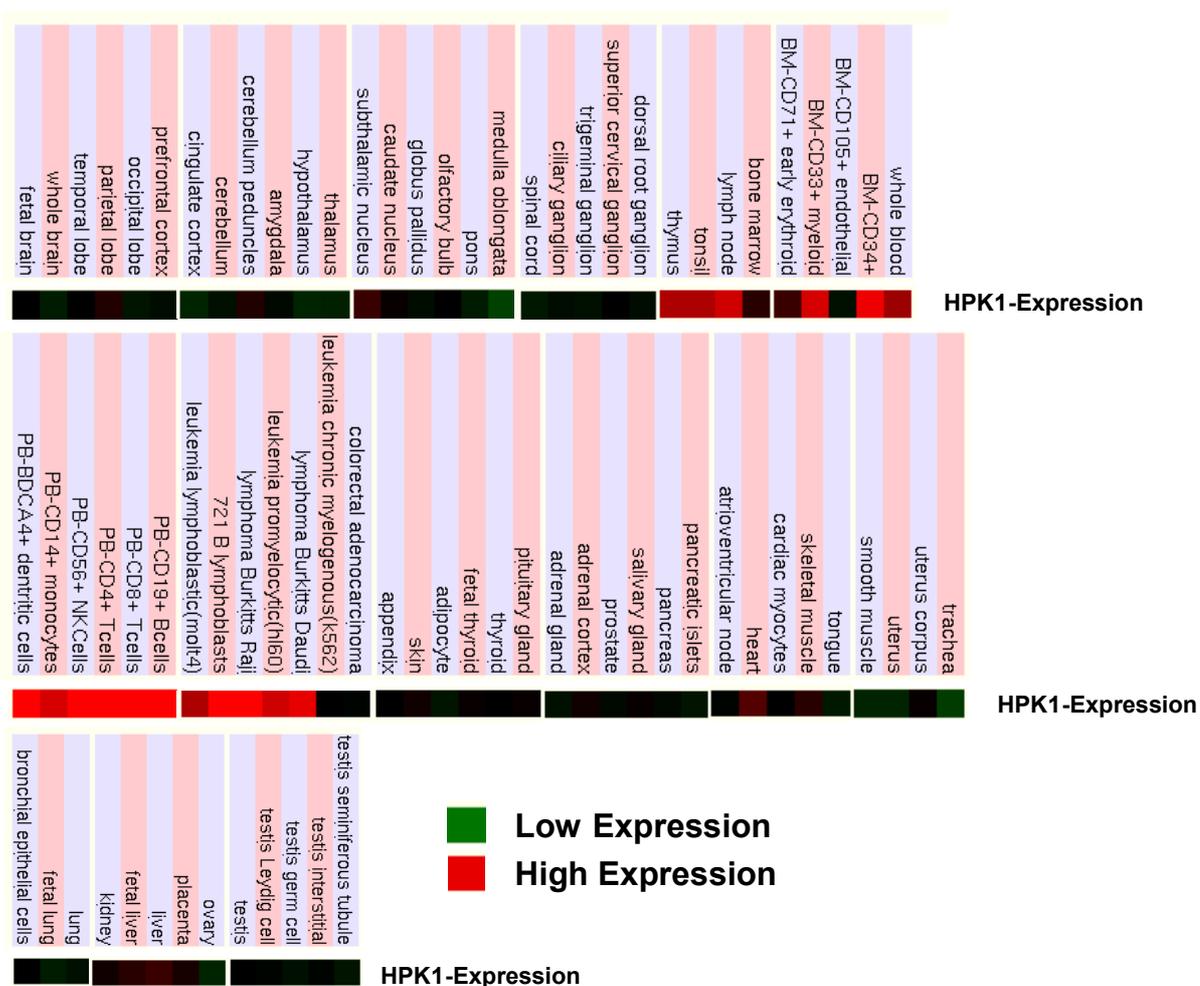


Abbildung 7: HPK1-Transkript-Expression in verschiedenen Geweben und Zellkompartimenten (Affymetrix U133 A und GNF1H Chips) Quelle: <http://genome.ucsc.edu>

1.4.3 Charakterisierung und Regulation von HPK1, SAPK und NFκB in T-Zellen

SAPK-Signale sind bislang in T-Zellen vielfach mit der Induktion von Apoptose in Zusammenhang gebracht worden, während NFκB ein anti-apoptotisches Signal darstellt. So demonstrierten Schulze-Luehrmann und Mitarbeiter durch Überexpression in murinen CD4⁺-T-Lymphozyten und EL4-Thymomzellen, dass HPK1 durch Aktivierung des JNK-Weges und Inhibition der NFκB-Signal-Kaskade in T-Zellen Apoptose induziert (Schulze-Luehrmann u. a., 2002). Von Arnold und Mitarbeitern wurde gezeigt, dass der NFκB-Signalweg in hämatopoetischen Zelllinien, namentlich Jurkat T-Zellen und in myeloischen FDC-P1 Progenitorzellen, durch HPK1 oberhalb des IκB-Komplexes aktiviert wird. Während zur Aktivierung von SAPK/JNK nur die isolierte Kinasedomäne ausreicht, ist zur Aktivierung von NFκB Gesamt-HPK1 mit aktiver Kinasedomäne notwendig. Im Rahmen von Apoptose erfolgt eine Caspasen-vermittelte Spaltung von HPK1 in einen Proteinabschnitt, der die Kinasedomäne beinhaltet, sowie einen C-terminalen Anteil, der im Gegensatz zur Gesamt-HPK1 NFκB inhibiert (Arnold u. a., 2001).

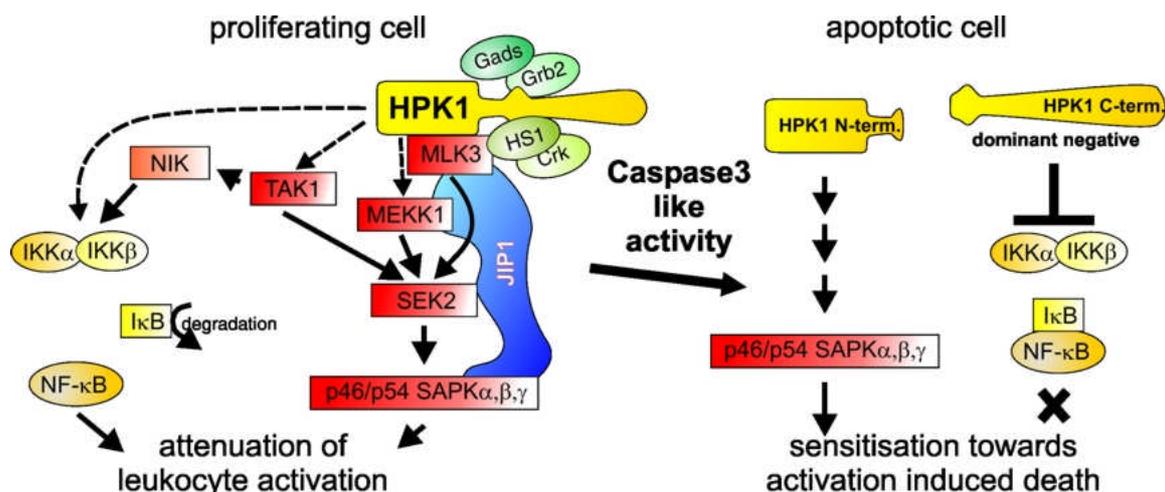


Abbildung 8: Übersichtsschema über die verschiedenen Proteinfunktionen des intakten, N- und C-terminalen HPK1 (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Kiefer (MPI Münster))

Im Jahr 2004 wurde durch Zhou und Mitarbeiter mit der Protein Phosphatase 4 (PP4) ein positiver Regulator von HPK1 in Jurkat T-Zellen identifiziert. PP4 führt in T-Zellen zur Stabilisierung und Kinaseaktivierung von wildtyp-HPK1 durch PP4-abhängige Inhibition von HPK1-Ubiquitinierung und -Degradation (Zhou u. a., 2004).

Kürzlich konnte durch Patzak und Mitarbeiter eine neue negativ-regulierende Funktion von HPK1 bei der Aktivierung des Leukozyten Funktions-assoziierten Antigen-1 (LFA-1) gezeigt werden. HPK1 schwächt die Aktivierung des Ras-verwandten Protein-1 (Rap-1) und reduziert dadurch die LFA-1-Aktivierung. Infolgedessen wird die Zelladhäsion an ICAM-1 und die Zellausbreitung nach T-Zell-Rezeptor(TCR)-Stimulus gehemmt (Patzak u. a., 2010).

1.4.4 Charakterisierung und Regulation von HPK1 in B-Zellen

Verschiedene Gruppen untersuchten die HPK1-Expression in B-Zellen und ihre Aktivierung durch Antigen-Rezeptor-Stimulation. Es wurde gezeigt, dass B-Zell-Rezeptor-Signale durch ein komplexes Zusammenspiel von Co-Rezeptoren, Toll-like-Rezeptoren, Integrinen und Zytokin-Rezeptoren in Abhängigkeit vom Differenzierungsgrad der B-Zelle moduliert werden (Geisberger u. a., 2003). Eine enge Assoziation besteht zwischen der HPK1 und Oberflächenrezeptoren in B-Zellen, wobei durch Phagendisplay-Untersuchungen eine Interaktion der HPK1 mit dem zytoplasmatischen Anteil des membranständigen IgG (mIgG) und IgE (mIgE) gezeigt werden konnte. Für mIgM, das auf unreifen B-Zellen exprimiert wird, ist eine Apoptose-induzierende Wirkung gezeigt worden. In reifen B-Zellen, die sowohl mIgM als auch mIgD exprimieren, ist die IgD-getriggerte Apoptoseinhibition dominant gegenüber Apoptose auslösenden IgM-Signalen (Geisberger u. a., 2002).

Die HPK1 besitzt als Aktivator der SAPK- und NFκB-Signalwege vielfältige regulatorische Funktionen. In B-Zellen wurde gezeigt, dass eine HPK1-abhängige Aktivierung der IKKβ (Ik Kinase β) zur Degradation von IκB und nachfolgender Aktivierung von NFκB führt (Tsuji u. a., 2001).

Interessanterweise wird in apoptotischen Zellen HPK1 durch Caspasen gespalten, das dabei entstehende C-terminale Fragment supprimiert den NFκB-Weg während der N-Terminus weiterhin einen potenten SAPK-Aktivator darstellt (vergleichbar dem Wirkmechanismus nach TCR-Stimuli).

Entsprechend der Entdeckung einer neuen Funktion von HPK1 bei der Adhäsion von T-Zellen nach TCR-Stimulus (vgl. Kap. 1.4.3) wurde durch Königsberger und Mitarbeiter eine Regulation der B-Zell-Adhäsion durch HPK1 beschrieben (Königsberger u. a., 2010).

1.4.5 HPK1 und Multiples Myelom

Im Myelomtransformationsmodell von Bergsagel sind initiale Schlüsselereignisse der malignen Transformation von B-Zellen noch unzureichend charakterisiert (Bergsagel und Kuehl, 2003). In den Keimzentren der Lymphknoten („Germinal Center“) finden die B-Zell-Differenzierung, -Selektion und Immunglobulin-Klassen-Wechsel statt. Diese elementaren Prozesse werden unter anderem durch Rezeptoren der TNFR-Familie gesteuert, die auch GCKs aktivieren (Matsumoto u. a., 1996). In der Folge werden SAPKs von GCKs wie der HPK1 selektiv aktiviert (Pombo u. a., 1995). Weitergehende Untersuchungen zur Rolle von HPK1 in der Pathogenese des MM liegen bisher nicht vor. Erstmals zeigte Tiedemann und Mitarbeiter Anfang 2010 eine mögliche essenzielle Funktion von HPK1 im Myelom. Durch Verwendung der RNAi-Technologie wurden in Myelomzelllinien zahlreiche Kinasen in ihrer Expression selektiv herunterreguliert. Bei der anschließenden Analyse der reduziert-exprimierten Kinasen konnte HPK1 (MAP4K1) als eine Kinase, die nach Herunterregulation in INA6-Zellen einen letalen Myelomzell-Phänotyp zeigt, nachgewiesen werden (Abb. 9; Tiedemann u. a., 2010).

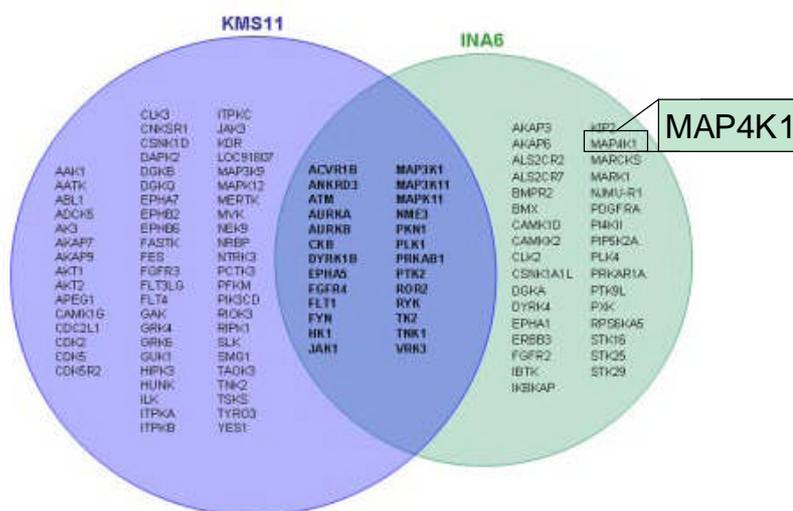


Abbildung 9: Untersuchungen überlebenswichtiger, anfälliger Kinasen in Myelomzellen (modifiziert nach Tiedemann u. a., 2010)

Eine Beteiligung von SAPKs an der malignen Transformation wird derzeit in zunehmendem Maße untersucht. So konnte in chronischen myeloischen Leukämien gezeigt werden, dass die BCR/ABL-Kinase Ras, ERK und SAPK aktiviert (Cortez u. a., 1997). In Mamma-Karzinomen ist ein Zusammenhang zwischen überexprimiertem HER2/neu-Rezeptor und der Aktivierung von ERK und SAPK beschrieben (O'Hagan und Hassell, 1998). Ferner konnte in Bronchialkarzinomzellen durch Blockade der SAP Kinase eine Inhibition der EGF-abhängigen Proliferation nachgewiesen werden (Bost u. a., 1997). Eine Arbeitsgruppe demonstrierte in verschiedenen Tumoren mit mutiertem und hyperaktiviertem EGFRvIII eine Reversion des malignen Phänotyps durch Inhibition von SAPK (Antonyak u. a., 1998). In Kaposi-Sarkomen aktivieren IL-6, VEGF und bFGF die SAP Kinase (Liu u. a., 1997).

2 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

Das Multiple Myelom ist eine bislang – bis auf wenige Ausnahmen - nicht heilbare hämatopoetischen Neoplasie. Neben der Entwicklung neuer medikamentöser Strategien in den letzten Jahren kommt der Identifizierung neuer Zielstrukturen eine grundlegende Bedeutung für neue innovative Therapieansätze zu.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es einerseits, einen Beitrag zum besseren Verständnis relevanter Signalwege beim Multiplen Myelom (MM) zu leisten, wobei der Schwerpunkt auf der Regulation der Weiterleitung extrazellulärer Signale durch die MAP4K und deren mögliche selektive Modulation liegt.

Einleitend wird hierzu die mRNA- und Proteinexpression von HPK1 (MAP4K1) in *ex vivo* und *in vitro*-Proben untersucht. Eine veränderte HPK1-Expression in Myelomzellen im Vergleich zu anderen hämatologischen Zellentitäten legt einen möglichen Einfluss von HPK1 in der Pathogenese des MM nahe. Des Weiteren soll diese MAP4K als potenziell therapeutisch nutzbare Zielstruktur näher charakterisiert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit werden Effekte selektiver HPK1-Modulationen auf die MAPK-Kaskade, weitere assoziierte Überlebenssignale und nachfolgende Veränderungen des Myelom-Phänotyps analysiert. In Untersuchungen mit murinen MPC-11-Zellen werden HPK1-abhängige Effekte auf die Proliferationsaktivität und Apoptosesensitivität geprüft (durch Kinase-aktive HPK1-Überexpression und durch selektiven HPK1-knock-down mittels RNAi). Unter Berücksichtigung, dass Gesamt-HPK1 und Teile des Proteins differenzielle Effekte auf die Apoptose-Induktion zeigen, wird eine Kinase-defiziente Form von HPK1 (K46E) in die Untersuchung einbezogen (Kiefer u. a., 1996; Arnold u. a., 2001).

Auf Grundlage bekannter parakriner Interaktionen zwischen Myelomzellen und dem Knochenmarkmikromilieu werden Myelomzellen mit modulierter HPK1-Expression in einem murinen Modell auf Tumorwachstum und -progression untersucht (Charakterisierung des MM-Phänotyps *in vivo*). Bei Bestätigung eines Einflusses modulierter HPK1-Expression auf den Phänotyp der Myelomzellen *in vivo* ergänzen molekularbiologische Methoden zur Untersuchung des Kinoms und Transkriptoms diese Arbeit.

Letztlich soll die potenzielle Eignung von HPK1 als Zielstruktur künftiger anti-myelomatöser Strategien beim MM evaluiert werden.

3 Ergebnisse

3.1 HPK1 im Multiplen Myelom

3.1.1 Untersuchungen zur mRNA- und Proteinexpression von HPK1 in humanen und murinen Myelomzellen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression, Regulation und Funktion der Hämatopoetischen Progenitor Kinase 1 (HPK1, alias MAP4K1) im Multiplen Myelom (MM) untersucht.

Erste Daten von mRNA aus CD138⁺-sortierten Knochenmark(KM)-Myelomzellen zeigten eine deutlich verringerte HPK1-Expression (im Vergleich zum Referenzgen 18S rRNA) in nicht behandelten Multiplen Myelomen (Material bei Diagnosestellung gewonnen; Abb. 10). Untersuchte Myelome unter/nach Therapie (Abb. 10) zeigten im CD138⁺ KM-Myelomzellkompartiment höhere HPK1-Expressionen, die in der Höhe vergleichbar ist mit der Expression in CD19⁺/CD20⁺/CD5⁺ koexprimierenden Zellen einer B-Zell Chronischen Lymphatischen Leukämie (B-CLL; Abb. 10). Alle untersuchten B-Zell-Neoplasien zeigten geringere HPK1-Expressionen im Vergleich zu den untersuchten peripheren B-Lymphozyten (PBBL; Abb. 10).

Wie in Abschnitt 1.4.2 beschrieben, wurden außerhalb der eigenen Arbeitsgruppe Nicht-B-Zell-Neoplasien mittels Microarrays auf HPK1-Transkript-Expression untersucht. In den eigenen Experimenten wurden in den Proben aus der Gruppe der Nicht-B-Zell-Neoplasien (andere Tumorentitäten; z.B. Ewing- und Osteosarkomen, Medullo- und Glioblastomen, Adenokarzinome vom Pankreas und Colon) die geringsten HPK1-Expressionen nachgewiesen und können je nach Sensitivität der angewandten Methode in der Nähe der unteren Nachweisgrenze der verwendeten Untersuchungsmethode liegen und als Negativkontrollen gewertet werden (andere Tumorentitäten; Abb. 10A).

Die in Abbildung 10A dargestellte geringere HPK1-Expression in mRNA-Proben aus dem CD138⁺-Kompartiment unbehandelter Myelome zeigten sich auch bei der Untersuchung der HPK1-Proteinexpression dieser Proben gegenüber der Kontrollproben peripherer B-Lymphozyten (Abb. 10B).

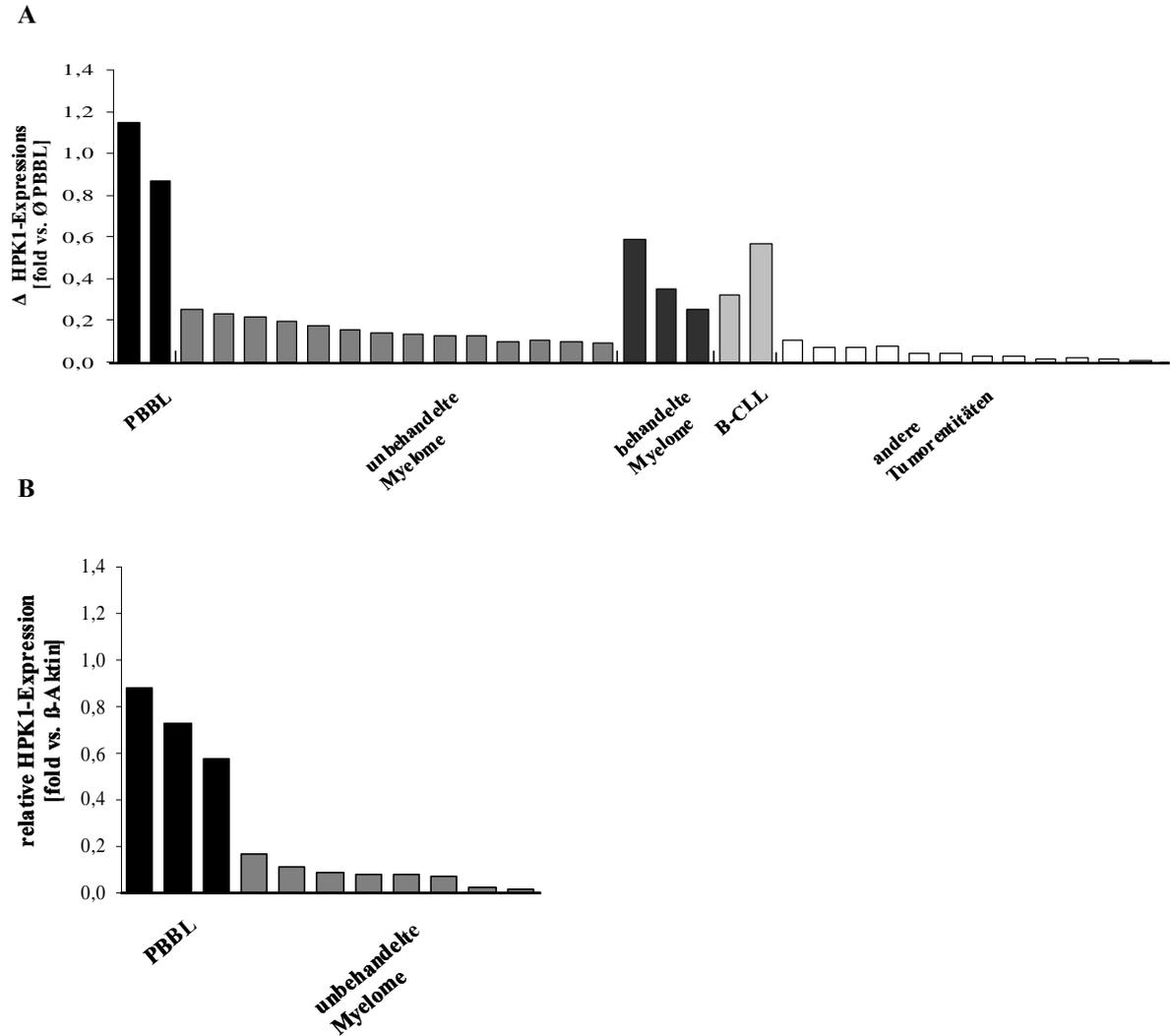


Abbildung 10: A. mRNA-Expression von HPK1 (vs. 18S rRNA) mittels quantitativer RT-PCR in PBBLs (■), CD138⁺ MM-Zellen aus dem KM unbehandelter Patienten mit Multiplem Myelom (■), behandeltem Myelom (CD138⁺-MM-Zellen aus KM-Aspiraten (■)), CD19⁺/CD20⁺/CD5⁺ B-CLL-Zellen (■) und Zellen anderer Tumorentitäten (□).

B. Darstellung einer densitometrischen Auswertung eines Western-Blotes zur Protein-Expression von HPK1 (vs. β -Aktin in peripheren CD19⁺ B-Lymphozyten (PBBL (■)) und CD138⁺ MM-Zellen aus dem KM unbehandelter Patienten mit Multiplem Myelom (■)).

Für die Analysen zur Charakterisierung der HPK1-Expression wurden in dieser Arbeit humane und murine Myelomzelllinien verwendet. Der Vorteil gegenüber Primärmaterial ist die mittel- bzw. langfristige Beständigkeit der kultivierten Zellen, wodurch eine Patienten-unabhängige *in vitro*-Analyse möglich ist.

Die HPK1-Expression verschiedener MM-Zelllinien zeigte unterschiedlich stark exprimierte HPK1-mRNA bzw. -Proteinniveau (Abb. 11 A + B). Für eine zu untersuchende Korrelation zwischen den HPK1-Expression und dem Karyotyp der Zelllinien wurde die HPK1-mRNA- und -Protein-expression der humane Myelomzelllinie U266 auf den relativen Wert 1,0 festgelegt. U266 besitzt keine numerischen oder strukturellen Chromosomen-Aberrationen und eignet sich daher als Referenz-Zelllinien. Es konnte in den vorliegenden Untersuchungen keine Korrelation zwischen dem spezifischen Karyotyp jeder Myelomzelllinie und der Expressionsstärke von HPK1 ermittelt werden.

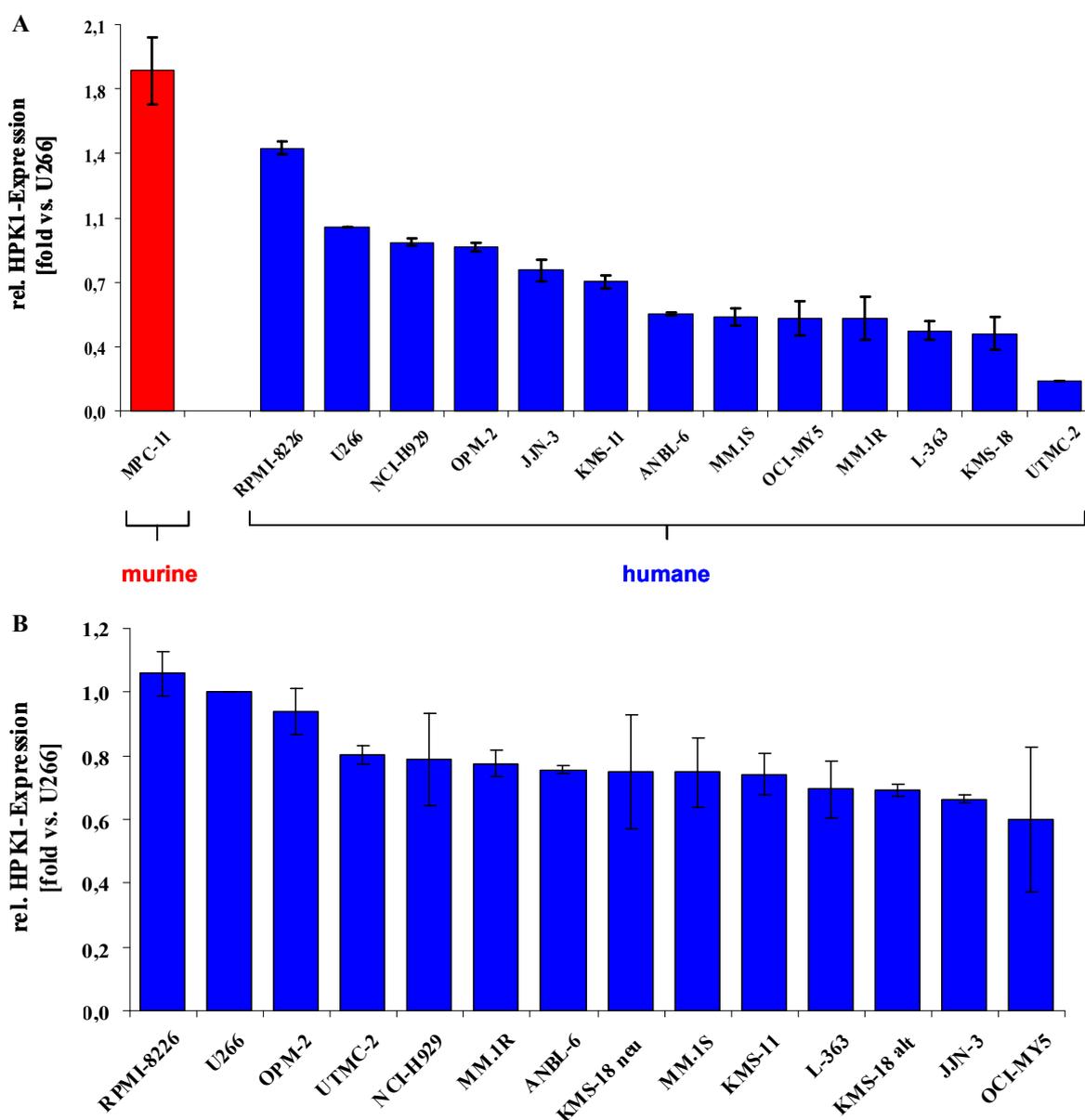


Abbildung 11: HPK1-mRNA- (A) und -Protein-Expression (B) in murinen bzw. humanen Myelomzelllinien (Expression von HPK1 in U266 auf 1,0 normiert); (drei unabhängige Versuche)

3.2 Charakterisierung der funktionellen Eigenschaften von Myelomzellen nach HPK1-Überexpression

Die in Abbildung 10 abgebildete geringere Expression von HPK1 im CD138⁺-Kompartiment unbehandelter Myelome lässt einen weiter zu untersuchenden Effekt der reduzierten Expression von HPK1 bei der Pathogenese des Multiplen Myeloms vermuten.

Zur Differenzierung von HPK1-abhängigen Effekten an Myelomzellen wurde murines HPK1 in murinen MPC-11-Zellen zunächst überexprimiert. Wie im Abschnitt 1.4.3 beschrieben, ist HPK1 nicht nur als gesamtes Protein funktionell; beide voneinander getrennte Domänen haben spezifische Effekte auf HPK1-nachfolgende Signalwege mit unterschiedlichen phänotypischen Ausprägungen. Dafür wurde eine Kinase-aktive und eine Kinase-defiziente Variante von HPK1 in die Myelomzelllinie MPC-11 transfiziert (nachfolgend HPK1^{high} und HPK1^{high(K46E)} (Aminosäure-Austausch von Lysin an Position 46 in Glutaminsäure; K46E) genannt). Die Vektoren stammen von unserem Kooperationspartner Prof. Kiefer (MPI Münster) (Kiefer u. a., 1996; Liou u. a., 2000) und kodieren für die murine HPK1 als Fusionsprotein mit einem C-terminalen-tandem HA-Epitop-Tag. Der Zelllinie HPK1^{wt}-MPC-11 wurde mit dem Leervektor, pcDEF, transfiziert und diente in den Versuchen mit überexprimierter HPK1 als Kontrollzelllinie.

Die Zelllysate der beiden HPK1 überexprimierenden Myelomzelllinien zeigten im Western-Blot eine deutlich überrepräsentierte zusätzliche HPK1-Bande (durch HA-Tag oberhalb 97kDa; Abb. 12) und in der durchflusszytometrischen Analyse konnte in den transfizierten Zellen eine deutliches HA-FITC-Fluoreszenzsignal, des HPK1:HA-Fusionsproteins, nachgewiesen werden (Abb. 13).

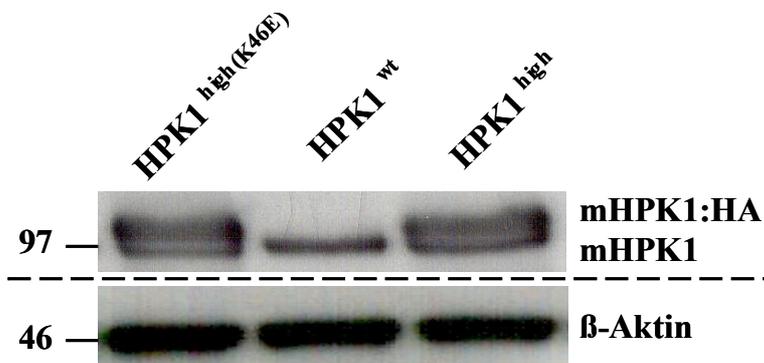


Abbildung 12: Immunoblot von Lysaten von HPK1^{wt} und MPC-11 mit überexprimiertem HPK1 mit gegen HPK1 gerichtete Antikörper (β -Aktin als Ladekontrolle; Molekulargewichte in kDa)

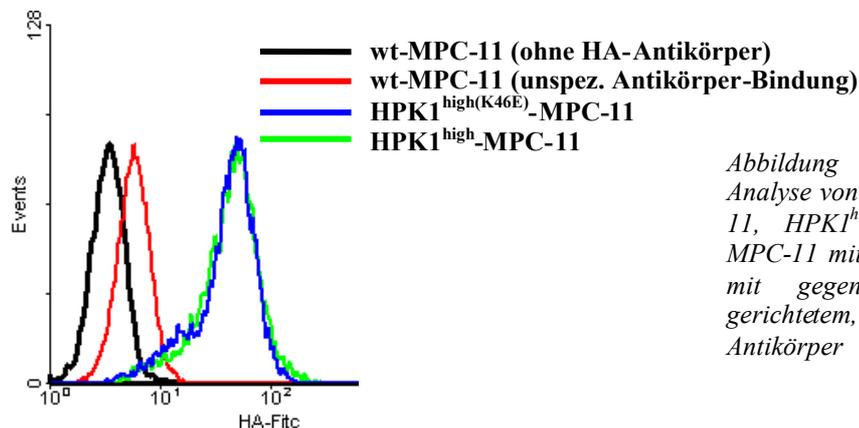


Abbildung 13: Histogramm der Analyse von Zellproben von wt-MPC-11, HPK1^{high}- und HPK1^{high(K46E)}-MPC-11 mittels Durchflusszytometrie mit gegen Hämagglutinin (HA) gerichtetem, FITC-konjugiertem Antikörper

3.2.1 Phänotypische Veränderungen von MPC-11 mit überexprimierter HPK1 (HPK1^{high} & HPK1^{high(K46E)}) im Vergleich zu HPK1^{wt}

Tumorzellen sind charakterisiert durch ein atypisches Proliferationsverhalten und eine Anti-Tumor-Therapie versucht u.a. diese pathologische Proliferation zu reduzieren. Zur Charakterisierung der Effekte einer Überexpression von HPK1 in MPC-11 wurde die Proliferationsrate mittels der ³[H]-Thymidin-Aufnahme der Myelomzellen gemessen.

Bei dieser Untersuchung zeigte sich in den HPK1^{high(K46E)}-Zellen keine Veränderung des proliferativen Phänotyps gegenüber der Kontrollzelllinie HPK1^{wt}. Dagegen wurde eine reduzierte Proliferationsrate von HPK1^{high} im Vergleich zu HPK1^{wt} unter gleichen Zellkulturbedingungen (relative ³[H]-Thymidin-Aufnahme: 55% vs. 100%; HPK1^{high} vs. HPK1^{wt}; entsprechend einer 45%igen Abnahme der Proliferation bei HPK1^{high}; Abb. 14) nachgewiesen.

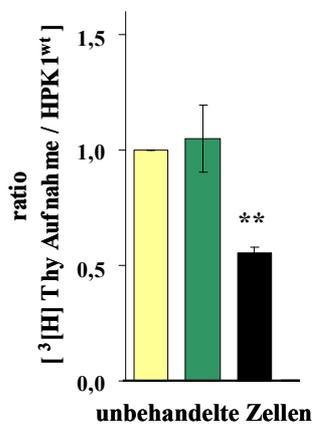


Abbildung 14: Schema der relativen Proliferationsrate von MPC-11 mit Kinase-defizienter HPK1- (HPK1^{high(K46E)} (■)), sowie Kinase-aktiver HPK1-Überexpression (HPK1^{high} (■)) vs. HPK1-wildtyp-Expression (HPK1^{wt} (■)).

** $p \leq 0,01$ (drei unabhängige Versuche)

3.2.2 Veränderung der Proliferationsaktivität und Apoptosesensitivität von Myelomzellen gegenüber anti-myelomatösen Substanzen durch überexprimierte HPK1

a) bei der Proliferation

Neben einer Charakterisierung der HPK1-Expression im Multiplen Myelom und dessen funktionellen Einfluss auf eine Myelomzelle ist die Identifikation der Hämatopoetischen Progenitor Kinase als eine mögliche Zielstruktur für die Therapie des Myeloms Teil dieser Arbeit.

Als nächster Schritt wurde die Proliferationshemmung der Myelomzellen mit überexprimierter HPK1 nach Zugabe verschiedener biologischer und chemischer Wirkstoffe untersucht. Diese Hemmung wurde in $HPK1^{high(K46E)}$ und $HPK1^{high}$ ebenso wie in der $HPK1^{wt}$ in Anwesenheit der Substanzen PD98059 (MEK1-Inhibitor), Dexamethason (Inhibitor von Glucocorticoid-Rezeptoren[GR]), Bortezomib (Proteasom-Inhibitor) und Melphalan (DNA-interkalierende Substanz) gemessen. Zur Darstellung der Proliferationsänderung wurden die Proliferationsraten der Zelllinien-Proben ohne Substanz (w/o-Proben in Abb. 15) auf den relativen Wert 1,0 festgelegt und die behandelten Proben relativ zu dieser Probe berechnet und abgebildet.

Nach Zugabe von $10\mu\text{M}$ Dexamethason konnte eine reduzierte Proliferationsrate der $HPK1^{wt}$ -MPC-11 nachgewiesen werden (1,0 vs. 0,34; w/o vs. $10\mu\text{M}$ Dexamethason, Abb. 15). Dagegen blieb sie bei den beiden HPK1-überexprimierenden Zelllinien unter gleichen Dexamethason-Bedingungen nahezu unverändert (Abb. 15). Das Zytostatikum Melphalan ($10\mu\text{M}$) zeigte in allen untersuchten Myelomzelllinien eine Reduktion der Proliferationsrate von bis zu 91% (Abb. 15). Unter Zugabe des MEK1-Inhibitors (PD98059, $20\mu\text{M}$) bzw. des Proteasom-Inhibitors (Bortezomib, 2nM) zeigte sich keine veränderte Proliferationsrate bei den $HPK1^{high(K46E)}$ -, $HPK1^{high}$ - und $HPK1^{wt}$ -Zellen (Abb. 15).

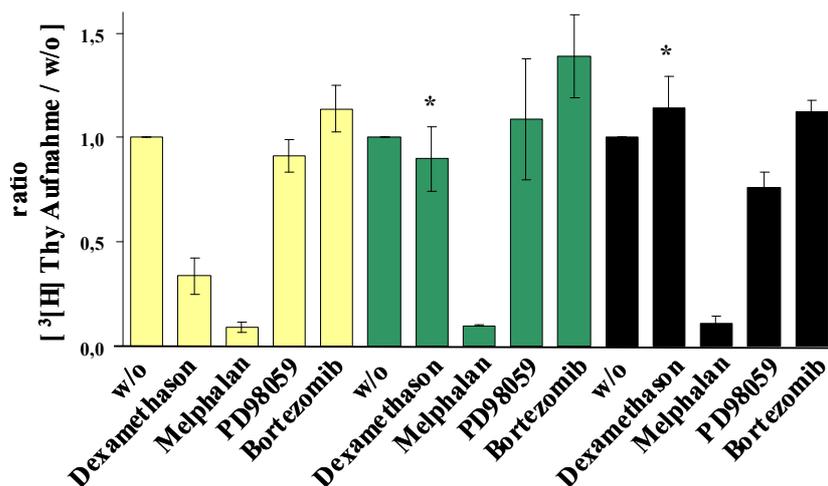


Abbildung 15: Veränderung der relativen Proliferationsrate durch Zugabe spezifischer Inhibitoren bzw. anti-myelomatöser Substanzen in MPC-11 mit Kinase-defizienter HPK1- ($HPK1^{high(K46E)}$; ■), sowie Kinase-aktiver HPK1-Überexpression ($HPK1^{high}$; ■) vs. HPK1-wildtyp-Expression ($HPK1^{wt}$; □).

* $p \leq 0,05$ (drei unabhängige Versuche)

b) bei der Apoptose

Als mögliche Zielstruktur in der Myelom-Therapie wird im Folgenden geprüft, ob das zu untersuchende Molekül (HPK1) einen Einfluss auf die Apoptose-Induktion aufweist.

Zum Nachweis eines solchen Effektes auf die Myelomzelle wurden die Zelllinien mit der erhöhten HPK1-Expression in einem Dosisitrationsversuch mit den Substanzen aus dem Proliferationsversuch behandelt und mit dem Verhalten der HPK1^{wt}-MPC-11 verglichen.

Bei der Untersuchung der Apoptose-Induktion zeigte sich in HPK1^{high(K46E)} nach Zugabe von Dexamethason im gesamten Dosisitrationsbereich zwischen 2,5µM und 30µM eine geringere Zunahme an apoptotischen Zellen im Vergleich zu den HPK1^{wt}-MPC-11 (Abb. 16; Tab. 2). Außerdem ist der Unterschied in der Zunahme an apoptotischen Zellen gegenüber der HPK1^{wt} bei einer Zugabe von 5µM, 10µM und 20µM statistisch signifikant (5µM: $p \leq 0,05$; 10µM: $p \leq 0,01$; 20µM: $p \leq 0,05$).

Bei den HPK1^{high}-Myelomzellen wurde ebenso ein Unterschied in der Apoptosehäufigkeit nach einer Zugabe von 10µM bis 30µM Dexamethason nachgewiesen (Abb. 16; Tab. 2). Bei einer Konzentration von 10µM Dexamethason konnte ein statistisch signifikanter Unterschied in der Zunahme an apoptotischen Myelomzellen zwischen HPK1^{high} und HPK1^{wt} aufgezeigt werden ($p \leq 0,05$).

Tabelle 2: Veränderung der Apoptosehäufigkeit nach Zugabe von Dexamethason in unterschiedlichen Konzentrationen; drei unabhängige Versuche mit jeweils Doppelbestimmung

Dexamethason-Konzentration in µM	Veränderung der Apoptosehäufigkeit in % (\pm Standardabweichung)		
	HPK1 ^{wt}	HPK1 ^{high(K46E)}	HPK1 ^{high}
2,5	17,8 (\pm 5,3)	5,7 (\pm 1,7)	14,9 (\pm 4,0)
5,0	23,7 (\pm 0,3)	9,5 (\pm 4,0)*	18,2 (\pm 0,5)
10,0	31,4 (\pm 1,8)	9,8 (\pm 0,1)**	18,9 (\pm 0,6)*
20,0	38,4 (\pm 3,1)	18,6 (\pm 5,7)*	23,2 (\pm 4,3)
30,0	42,7 (\pm 7,7)	23,6 (\pm 3,1)	25,2 (\pm 2,6)

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

Nach Zugabe von 30µM Melphalan zeigten die HPK1^{high(K46E)}-Myelomzellen eine statistisch signifikant reduzierte Apoptosehäufigkeit gegenüber der HPK1^{wt}-MPC-11 (13,5% vs. 21,3%; HPK1^{high(K46E)} vs. HPK1^{wt}; $p \leq 0,05$; Abb. 16; Tab. 3). Dagegen konnten bei HPK1^{high}-Zellen nach einer Zugabe von 30µM Melphalan eine höhere Apoptosehäufigkeit nachgewiesen werden (32,4% vs. 21,3%; HPK1^{high} vs. HPK1^{wt}; $p \leq 0,05$; Abb. 16; Tab. 3).

Tabelle 3: Veränderung der Apoptosehäufigkeit nach Zugabe von Melphalan in unterschiedlichen Konzentrationen; drei unabhängige Versuche mit jeweils Doppelbestimmung

Melphalan- Konzentration in μM	Veränderung der Apoptosehäufigkeit in % (\pm Standardabweichung)		
	HPK1 ^{wt}	HPK1 ^{high(K46E)}	HPK1 ^{high}
2,5	16,7 (\pm 1,9)	12,9 (\pm 1,4)	13,6 (\pm 1,5)
5,0	19,9 (\pm 4,7)	14,6 (\pm 4,8)	13,5 (\pm 1,3)
10,0	19,3 (\pm 2,9)	13,1 (\pm 3,3)	18,9 (\pm 0,3)
20,0	22,4 (\pm 3,4)	14,3 (\pm 5,2)	14,9 (\pm 10,7)
30,0	21,3 (\pm 1,2)	13,5 (\pm 0,7)*	32,4 (\pm 0,5)*

* $p \leq 0,05$

Des Weiteren wurde eine verringerte Apoptoserate nach Zugabe des MEK1-Inhibitors (PD98059) in den HPK1^{high(K46E)}-Myelomzellen nachgewiesen. Die Reduktion von 6,4% bzw. 8,4% gegenüber einer Apoptose-Zunahme von 4,5% bzw. 10,5% bei 40 μM bzw. 50 μM PD98059-Zugabe weist einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen HPK1^{high(K46E)}- und HPK1^{wt}-Myelomzellen nach (40 μM : $p \leq 0,01$; 50 μM : $p \leq 0,05$; Abb. 16; Tab. 4).

Die HPK1^{high}-Myelomzelllinie zeigte keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den HPK1^{wt}-MPC-11 (Abb. 16; Tab. 4).

Tabelle 4: Veränderung der Apoptosehäufigkeit nach Zugabe von PD98059 in unterschiedlichen Konzentrationen; drei unabhängige Versuche mit jeweils Doppelbestimmung

PD98059- Konzentration in μM	Veränderung der Apoptosehäufigkeit in % (\pm Standardabweichung)		
	HPK1 ^{wt}	HPK1 ^{high(K46E)}	HPK1 ^{high}
10,0	0,9 (\pm 1,3)	-2,2 (\pm 0,2)	0,8 (\pm 2,0)
20,1	0,5 (\pm 0,9)	-4,3 (\pm 2,7)	3,9 (\pm 0,7)
30,0	2,9 (\pm 0,6)	-5,3 (\pm 3,1)	5,4 (\pm 0,3)
40,0	4,5 (\pm 1,1)	-6,4 (\pm 0,5)**	4,4 (\pm 0,3)
50,0	10,5 (\pm 3,5)	-8,4 (\pm 0,9)*	10,0 (\pm 3,9)

* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$

Nach der Zugabe des Proteasom-Inhibitors (Bortezomib) zeigten alle MPC-11-Myelomzellen ab einer Konzentration von 6nM einen starken Anstieg der Apoptosehäufigkeit (Abb. 16; Tab. 5). Dabei zeigte sich aber kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden HPK1-überexprimierenden Zelllinien und der HPK1^{wt}-Myelomzelllinie.

Tabelle 5: Veränderung der Apoptosehäufigkeit nach Zugabe von Bortezomib in unterschiedlichen Konzentrationen; drei unabhängige Versuche mit jeweils Doppelbestimmung

Bortezomib- Konzentration in nM	Veränderung der Apoptosehäufigkeit in % (\pm Standardabweichung)		
	HPK1 ^{wt}	HPK1 ^{high(K46E)}	HPK1 ^{high}
1,0	5,6 (\pm 0,2)	0,8 (\pm 7,1)	5,1 (\pm 3,8)
2,0	3,9 (\pm 5,1)	0,7 (\pm 3,7)	2,0 (\pm 3,8)
4,0	4,5 (\pm 7,9)	0,4 (\pm 0,5)	0,6 (\pm 2,1)
6,0	57,6 (\pm 10,0)	42,5 (\pm 0,8)	58,5 (\pm 1,1)
8,0	65,2 (\pm 3,1)	69,8 (\pm 0,4)	63,9 (\pm 1,0)

Zusammenfassend lässt sich zeigen, dass die Überexpression von HPK1 ein unterschiedliches phänotypisches Verhalten der Myelomzellen bei Inkubation mit anti-myelomatöser Substanzen bewirkt. Während bei HPK1^{wt} nach Zugabe des Glucocorticoid-Rezeptor-Inhibitors (Dexamethason) die Proliferation gehemmt und die Apoptose deutlich erhöht wurde, zeigten beide überexprimierenden Zelllinien keine Proliferation-Inhibition und eine reduzierte Apoptose-Sensitivität gegenüber Dexamethason. HPK1^{high}-Myelomzellen zeigten bei niedriger Dexamethason-Konzentration eine HPK1^{wt}-ähnliche Apoptosehäufigkeit und mit steigender Konzentration erhöhte sich der Unterschied in der Dexamethason-induzierten Apoptose beider Zelllinien. Dagegen konnte bei den HPK1^{high(K46E)}-Zellen bereits bei einer niedrigen Dexamethason-Konzentration eine geringere Apoptose-Induktion im Vergleich zu HPK1^{wt}-MPC-11 nachgewiesen werden.

Nach Zugabe von Melphalan wurde in allen drei Zelllinien die Proliferation annähernd zu 100% gehemmt. Bei der Apoptose-Induktion zeigte sich ein unterschiedlich starkes Ansprechen bei der höchsten Konzentration. Während die HPK1^{high(K46E)} eine geringere Steigerung der Apoptosehäufigkeit aufzeigte, wurde bei den HPK1^{high}-Myelomzellen eine höhere Apoptosehäufigkeit nachgewiesen (im Vergleich zur HPK1^{wt}-Zelllinie).

Des Weiteren wurde eine verringerte Apoptoserate nach Zugabe von PD98059 in den Myelomzellen mit der Kinase-defizienten HPK1-Überexpression nachgewiesen (Reduktion der Apoptoserate von bis zu 8% bei HPK1^{high(K46E)}, gegenüber einer Steigerung von mehr als 10% bei HPK1^{wt}-MPC-11), aber einen Einfluss auf die Proliferation konnte nicht gezeigt werden.

Durch Zugabe des Proteasom-Inhibitors (Bortezomib) wurde in den HPK1^{high} und HPK1^{high(K46E)} keine veränderte Proliferationshemmung bzw. Apoptosehäufigkeit gegenüber HPK1^{wt}-Myelomzellen nachgewiesen.

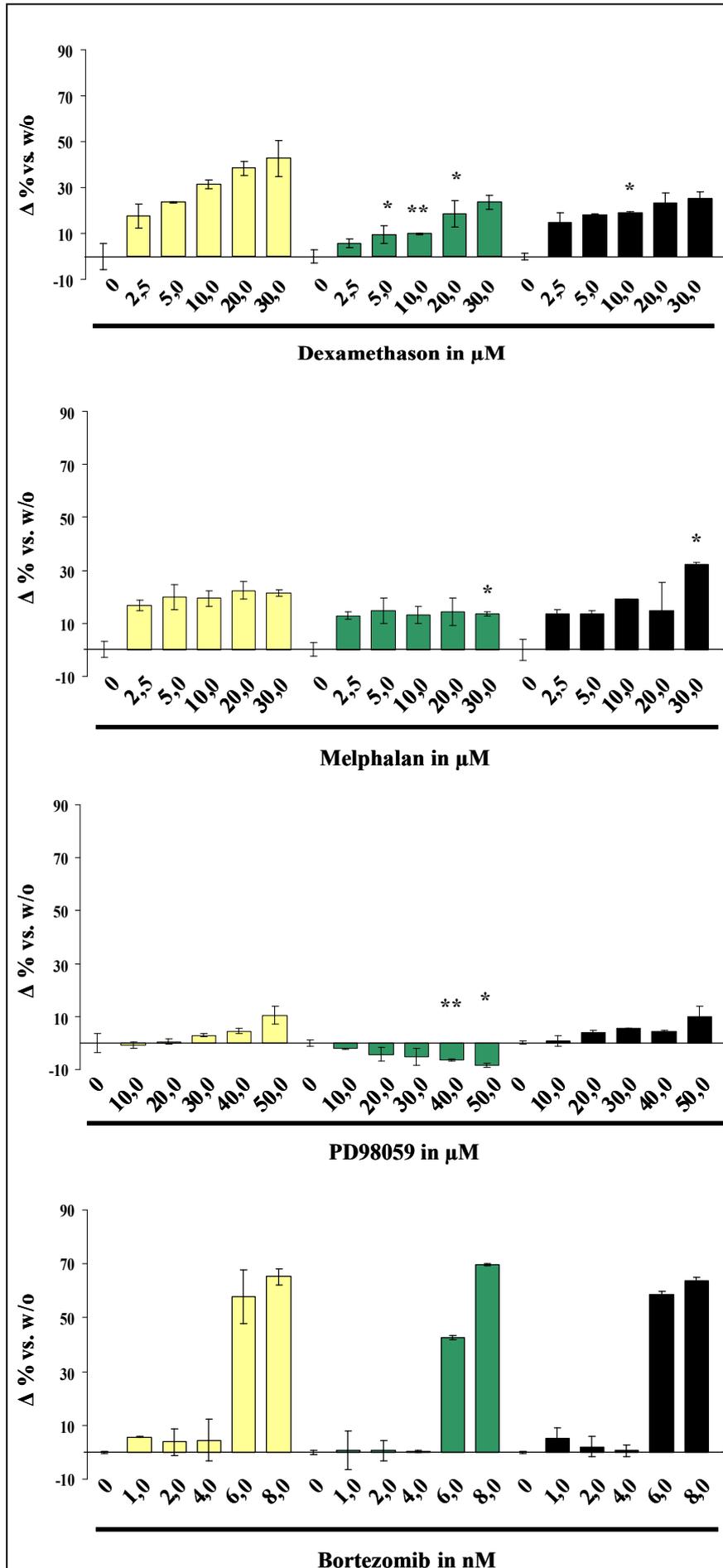


Abbildung 16:
 Dosisabhängige Änderung
 der Substanz-vermittelten
 Apoptoserate von MPC-11
 nach Erhöhung der HPK1-
 Expression (HPK1^{wt}; ■),
 HPK1^{high(K46E)}; ■) und
 HPK1^{high}; (■);
 * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$
 (drei unabhängige
 Versuche)

3.2.3 Einfluss überexprimierter HPK1 auf das Tumorwachstum im syngenem, murinen MPC-11/BALB/c-Modell

Zur Untersuchung des Effektes einer HPK1-Überexpression auf die Tumorprogression wurden die Bildung und das Wachstum eines subkutanen Tumors durch applizierte Myelomzellen in einem syngenem BALB/c-Tiermodell verfolgt.

Für die Gewährleistung einer stabilen Transfektion der verwendeten Zelllinien und einer gleichbleibenden HPK1-Überexpression im gesamten Tierversuchszeitraum (maximal 28 Tage nach Zellapplikation) wurden die Zelllinien mehrere Wochen ohne Selektionsmedium kultiviert. Der prozentuale Anteil an Zellen mit einem positiven HA-FITC-Fluoreszenzsignal reduzierte sich innerhalb der 30-tägigen Untersuchung in den $HPK1^{high(K46E)}$ um bis zu 22% (Abb. 17). Bei den $HPK1^{high}$ -Zellen wurde ein Verlust von 3% HA-positive Zellen nachgewiesen (Abb. 17).

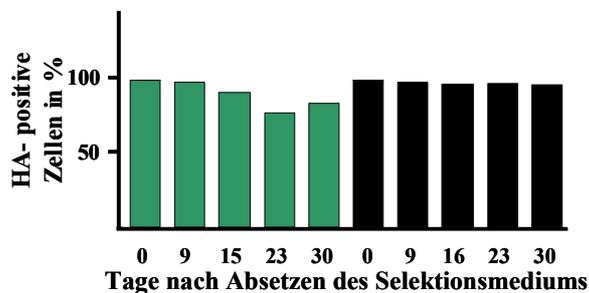


Abbildung 17: grafische Darstellung der prozentualen Anteile HA-positiver, transfizierter Myelomzellen ($HPK1^{high(K46E)}$ (■), $HPK1^{high}$ (■))

Bei *in vivo*-Untersuchungen zum Effekt der Überexpression von HPK1 auf das Tumorwachstum subkutan applizierter Myelomzellen konnte ein erhöhtes Tumolvolumen bei Myelomzellen mit Kinase-aktiven HPK1 schon 5 Tage nach Auftreten des ersten Tumors (Ø 10 Tage nach Applikation) ermittelt werden (Steigerung auf 219% am Tag 5 bzw. auf 194% am Tag 7 vs. 100% bei $HPK1^{wt}$, Abb. 18).

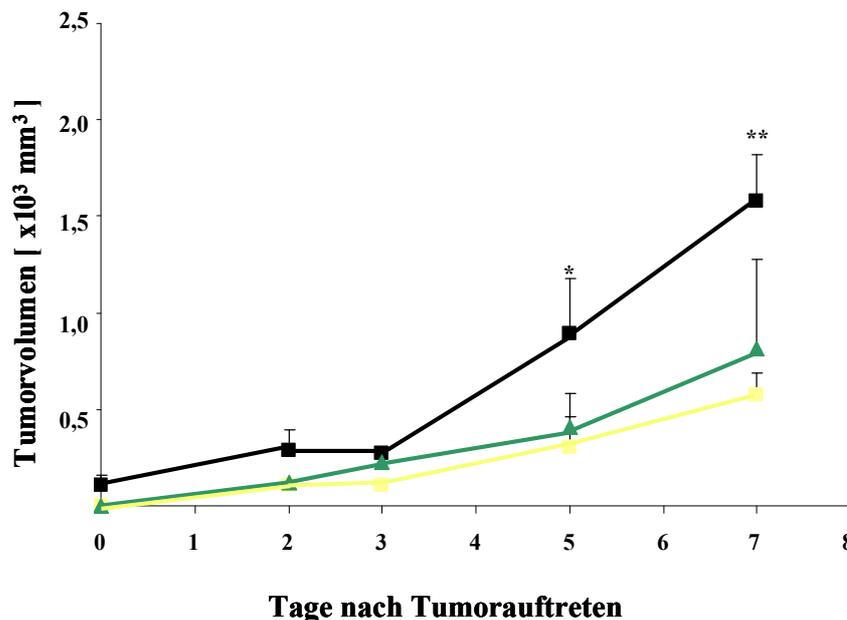


Abbildung 18: Wachstumsverlauf subkutan applizierter Myelomzellen (1×10^6 Myelomzellen pro Tier).

Verstärktes Tumorwachstum von MPC-11 durch intakte HPK1-Überexpression ($HPK1^{high}$ (■)), aber keine Veränderung des Tumorstwachstums durch Überexpression von Kinase-defizientem HPK1 in murinen Myelomzellen ($HPK1^{high(K46E)}$ (■); $HPK1^{wt}$ (■)).

** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,05$ (drei unabhängige Versuche; 6 Tiere pro Kohorte)

Ein verändertes Tumorwachstum nach Applikation von Myelomzellen mit einer Überexpression des Kinase-defizienten HPK1 konnte nicht gezeigt werden (Abb. 18).

Zur Kontrolle der *in vitro*-Daten des Stabilitätstestes (Abb. 17) wurden nach dem *in vivo*-Versuch 2 Tumoren pro Kohorte resuspendiert und mittels Western-Blot auf die Überexpression von HPK1 und den Nachweis des HPK1:HA-Fusionsproteins analysiert.

Bei der Western-Blot-Analyse der insgesamt sechs Tumoren wurde eine unterschiedlich starke HPK1-Proteinexpression in den 3 Gruppen/Kohorten ermittelt. Die HPK1^{wt}-Zellproben beider entsprechender Tumoren zeigten nahezu kein detektierbares HPK1-Signal (Abb. 19). In den Zelllysaten der HPK1^{high(K46E)}-Tumoren konnte ein schwaches HPK1(Überexpressions)-Signal nachgewiesen werden (Abb. 19). Das HPK1-Signal der HPK1^{high}-Tumoren zeigte eine deutliche HPK1-Überexpression (Abb. 19).

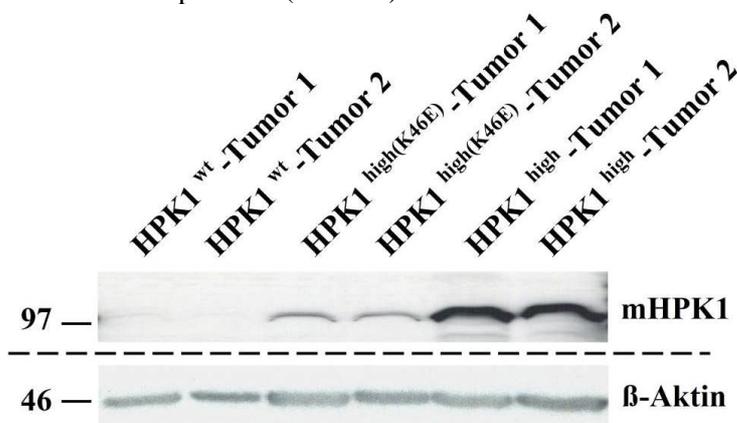


Abbildung 19: Immunoblot von Lysaten von resuspendierten Tumoren subkutan applizierter Myelomzellen mit gegen HPK1 gerichtete Antikörper; je 2 Tumoren von HPK1^{wt}- (Bahn 1 & 2), HPK1^{high(K46E)} (Bahn 3 & 4) und HPK1^{high} (Bahn 5 & 6). (HPK1-Bande (durch HA-Tag) oberhalb 97kDa; β-Aktin als Ladekontrolle; Molekulargewichte in kDa)

Zusätzlich wurden die resuspendierten Tumoren mit Hilfe der Durchflusszytometrie auf Nachweisbarkeit des HA-Tags analysiert. Zur methodischen Kontrolle der Durchflusszytometer-Analyse wurden außerdem Zellen der subkutan applizierten Myelomzellen aus der *in vitro*-Zellkultur untersucht. Bei diesen Proben konnte gezeigt werden, dass CD138-positive Myelomzellen mit bzw. ohne HA-Fusionsprotein voneinander unterscheidbar und das die eingesetzten Fluorochrom-konjugierten Antikörper nutzbar waren (Abb. 20).

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnten bei der Analyse der resuspendierten Tumoren folgende Zellpopulationen unterschieden werden:

- i) CD138⁺/HA⁻-Myelomzellen (ohne Fusionsprotein),
- ii) CD138⁺/HA⁺-Myelomzellen (mit HPK1:HA-Fusionsprotein) und
- iii) CD138⁻/HA⁻-Zellen (entsprechend andere Zellarten im und um den Tumor)

Bei der Untersuchung der 2 Tumoren der HPK1^{wt}-Myelomzellen konnte vorrangig CD138-positive und HA-negative Myelomzellen gezeigt werden (Abb. 21; links). Die Tumoren der HPK1^{high(K46E)}-Zellen wiesen neben einer deutlichen CD138⁺/HA⁻-Zellpopulation nur eine kleine CD138⁺/HA⁺-Population auf (Abb. 21; mitte). Dagegen wurden bei den Tumoren der HPK1^{high}-Myelomzellen eine klar überrepräsentative CD138⁺/HA⁺-Zellpopulation nachgewiesen (Abb. 21; rechts).

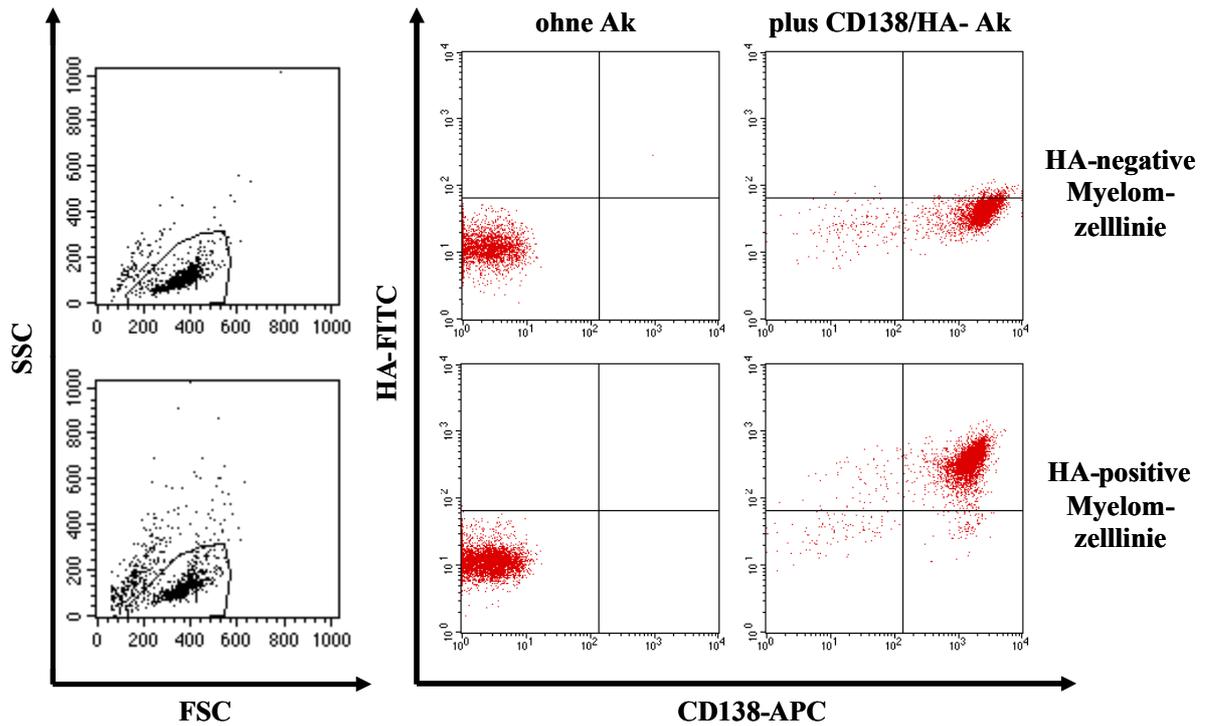


Abbildung 20: beispielhafte Darstellung der Durchflusszytometer-Analyse von Zelllinien, welche in je 6 Mäuse subkutan appliziert wurden; analysiert wurden der Myelommarker CD138 und der Transfektionsmarker Hämagglutinin (HA) mittels entsprechender Fluorochrom-konjugierter Antikörper; dargestellt sind die Messpunkte in SSC/FSC- (links) und in HA-FITC/CD138-APC-Abtragung (mitte und rechts); (Ak = Antikörper)

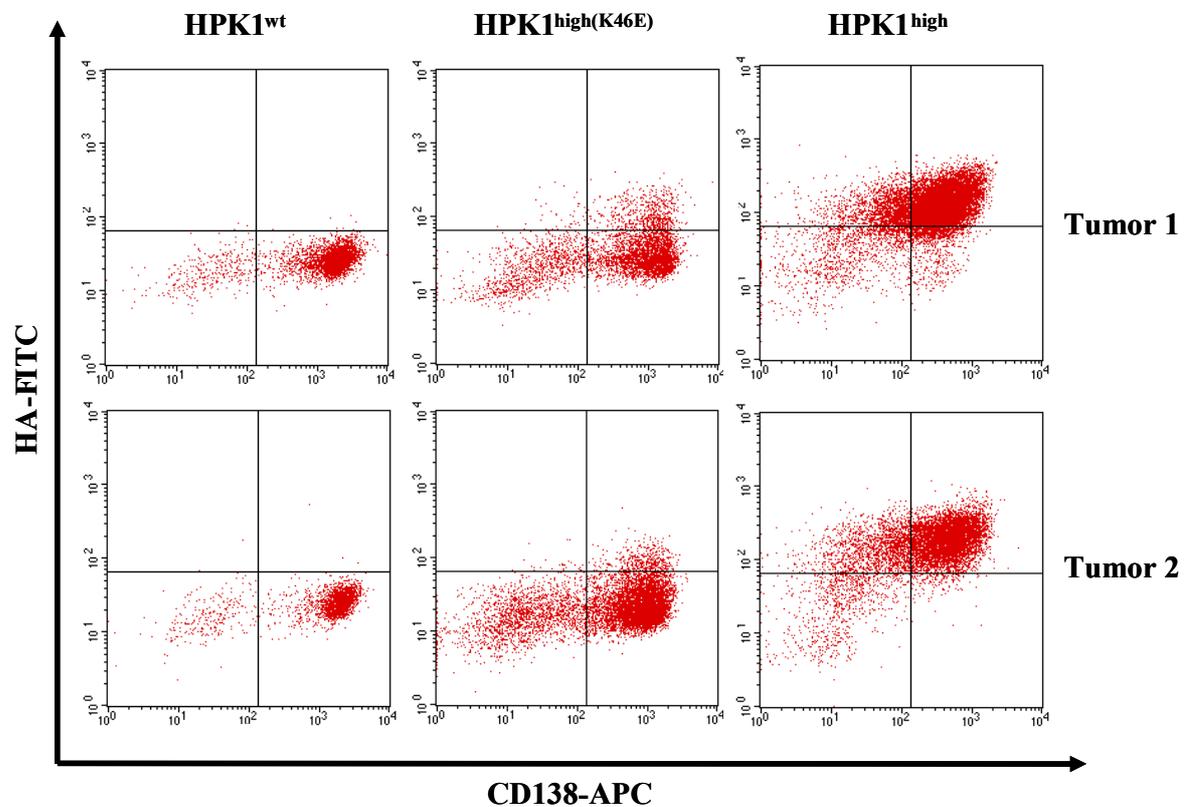


Abbildung 21: beispielhafte Darstellung der Durchflusszytometer-Analyse von resuspendierten Tumoren; analysiert wurden der Myelommarker CD138 und der Transfektionsmarker Hämagglutinin (HA) mittels entsprechender Fluorochrom-konjugierter Antikörper

Bei der Untersuchung des Einflusses überexprimierter HPK1 konnte ein verstärktes Tumorwachstum von subkutan applizierter HPK1^{high}-Myelomzellen nachgewiesen werden. Die transfizierten Zellen zeigten im *in vitro*-Vorversuch über 4 Wochen eine stabile Expression und die Tumoren wiesen nach dem 4-wöchigen *in vivo*-Versuch überwiegend Myelomzellen mit einem überexprimierten, HA-positiven HPK1-Protein auf. Die HPK1^{high(K46E)}-Myelomzellen zeigten bei Zellkulturbedingungen ohne Selektionsdruck (ohne Antibiotikum) einen Verlust von einem fünftel der HA-positiven Zellen. Nach dem *in vivo*-Versuch konnten nur wenige Zellen mit diesem Signal identifiziert werden und es konnte auch kein Unterschied in der Progression der Tumoren *in vivo* gegenüber den HPK1^{wt}-Tumoren ermittelt werden.

3.2.4 Effekte überexprimierter HPK1 auf intrazelluläre Signalwege in Myelomzellen

Zur Charakterisierung der phänotypisch ermittelten Unterschiede zwischen $HPK1^{wt}$ und der beiden $HPK1$ -überexprimierenden Myelomzelllinien wurden Untersuchungen auf zellbiologisch-biochemischer Ebene vorgenommen. Dafür wurden die aktiven und die Gesamt-Proteinspiegel von Kinasen, speziell MAP Kinasen, untersucht. Dabei konnten deutlich veränderte Expressions- bzw. Aktivitätslevel verschiedener Kinasen (u.a. der MAPK-Kaskade) in den $HPK1^{high}$ -Zellen gegenüber der $HPK1^{wt}$ ermittelt werden (Abb. 22 + 23).

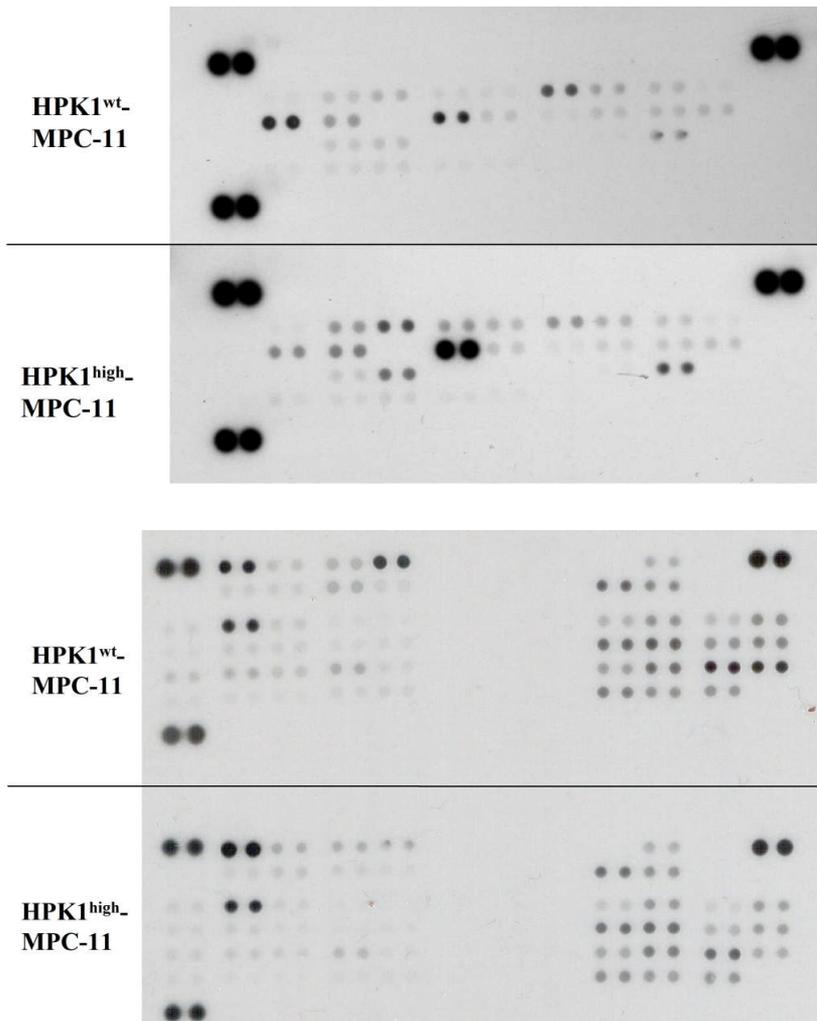


Abbildung 22: beispielhafte Darstellung der verwendeten Phospho-Arrays der Firma R&D Systems; Proteome Profiler™ Human Phospho-MAPK- (oben) & Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase-Array-Kit (unten); hybridisiert wurde Zellysate von $HPK1^{wt}$ und $HPK1^{high}$

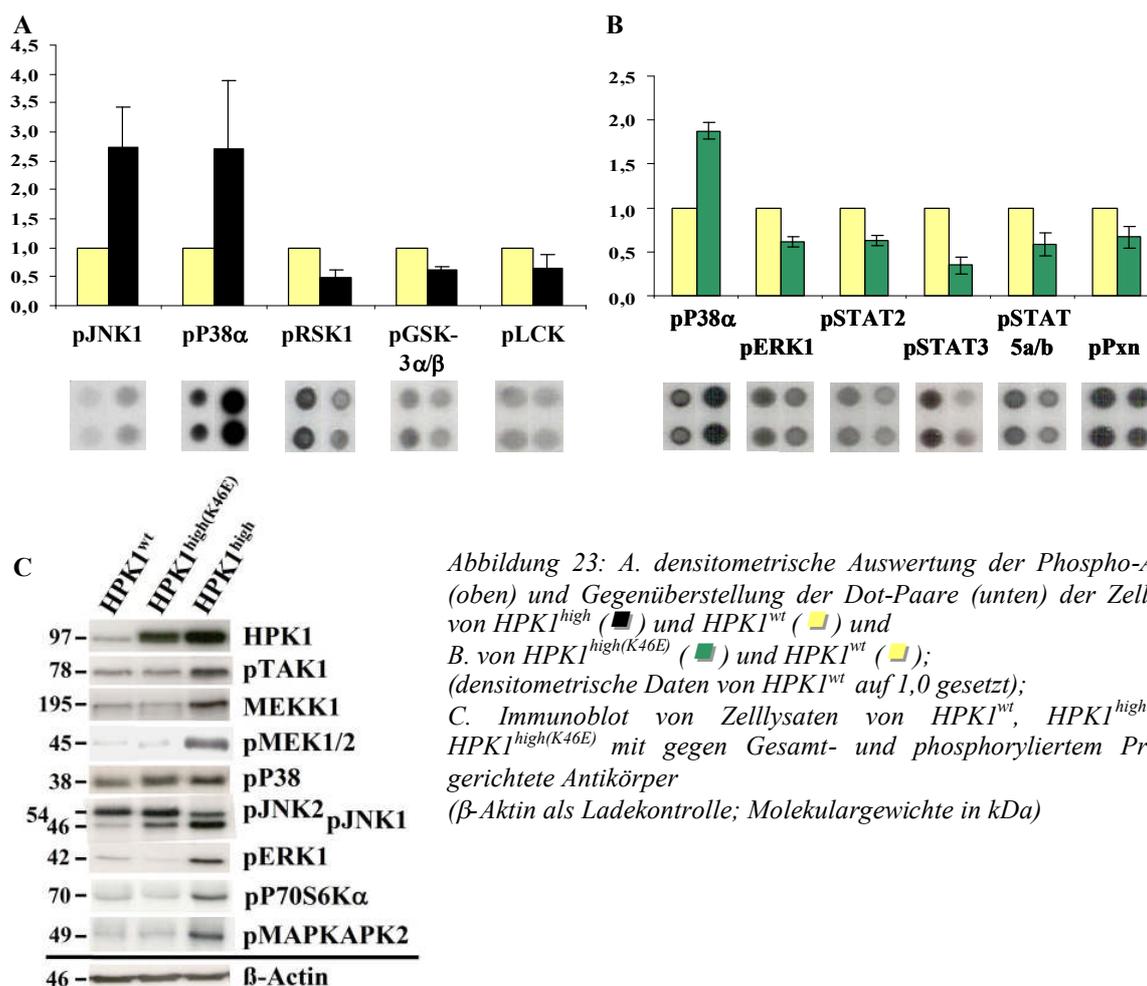


Abbildung 23: A. densitometrische Auswertung der Phospho-Arrays (oben) und Gegenüberstellung der Dot-Paare (unten) der Zelllysate von HPK1^{high} (■) und HPK1^{wt} (■) und B. von HPK1^{high(K46E)} (■) und HPK1^{wt} (■); (densitometrische Daten von HPK1^{wt} auf 1,0 gesetzt); C. Immunoblot von Zelllysaten von HPK1^{wt}, HPK1^{high} und HPK1^{high(K46E)} mit gegen Gesamt- und phosphoryliertem Proteine gerichtete Antikörper (β-Aktin als Ladekontrolle; Molekulargewichte in kDa)

Nach der Überexpression der Kinase-aktiven HPK1-Variante wurden ein verstärktes Vorkommen der phosphorylierten, aktiven Formen der c-Jun N-terminal Kinase-1 (pJNK1) und der P38α Kinase (pP38α) nachgewiesen (Abb. 23A). Ein verstärktes Signal bei pP38α konnte auch bei der HPK1^{high(K46E)}-Zelllinie aufgezeigt werden (Abb. 23B).

Dagegen wurden weniger phosphorylierte, aktive Proteine der Ribosomal S6 Kinase-1 (pRSK1), der Glykogen Synthase Kinase-3α und -3β (pGSK-3α/β) und der Lymphozyten-spezifische Protein-Tyrosin Kinase (pLCK) in HPK1^{high} nachgewiesen (Abb. 23A). In den HPK1^{high(K46E)}-Zelllysaten wurde ein verringertes Signal der Extrazellulär Signal-regulierte Kinase-1 (pERK1), des Signal-Umwandler und -Aktivator der Transkription, Variante 2, 3, 5a und 5b, (pSTAT2, 3, 5a/b) und von Paxillin (pPxn) ermittelt (Abb. 23B). Alle Vergleiche wurden gegen die Signale der einzelnen Proteine aus der Analyse von HPK1^{wt} gebildet.

Einige Kinasen wurden ebenfalls mittels Western-Blot analysiert. Dabei wurden neben der Bestätigung der Phospho-Array-Ergebnisse, differenzielle Aktivitäts- bzw. Gesamtprotein-Signale weiterer Kinasen nachgewiesen. So konnte eine höhere Gesamtproteinmenge der Mitogen-aktivierten Kinase Kinase Kinase-1 (MEKK1) und ein höheres Aktivitätslevel der TGF β-aktivierten Kinase-1 (pTAK1), der Mitogen-aktivierten Protein Kinase Kinase-1 und -Kinase-2 (alias ERK Kinase-1/2;

pMEK1/2), der P70 S6 Kinase α (pP70S6K α) und der Mitogen-aktivierten Protein Kinase-aktivierten Protein Kinase-2 (pMAPKAPK2) in HPK1^{high} aufgezeigt werden (Abb. 23C). Diese veränderten Signale wurden in HPK1^{high(K46E)} nicht nachgewiesen.

Bedingt durch eine Überexpression von HPK1 in Myelomzellen entstanden veränderte Zustände innerhalb der nachgeschaltete Signaltransduktionswege. So zeigte sich bei HPK1^{high} eine veränderte Signalweiterleitung in verschiedensten Signalwegen, u.a. im P38- und JNK-Signalweg. Durch den Verlust der Kinaseaktivität von HPK1 in HPK1^{high(K46E)} wurde dagegen ein abweichendes Aktivierungs-Profil nachgewiesen. In Myelomzellen mit einer Überexpression des Kinase-defizienten HPK1-Form konnte ein differenzielles Aktivierungsniveau von z.B. Proteinen des JAK/STAT- und ERK-Signalweges gezeigt werden.

3.2.5 Effekte überexprimierter HPK1 auf das Transkriptom der Myelomzellen

Zur Unterstützung der ermittelten Daten der phänotypischen und proteinbiochemischen Analysen (siehe 3.2.1 bis 3.2.4) wurden die Transkriptom der HPK1^{high}, HPK1^{high(K46E)} und HPK1^{wt} mittels „Genechip Mouse 1.0 st“-Microarrays untersucht. Die Analysen der extrahierten RNAs wurden am Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF), Technologieplattform und Serviceeinheit "Integrierte Funktionelle Genomik" (IFG), Abteilung Genexpressionsanalytik durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit freundlicher Unterstützung von PD Dr. Korsching vom Institut für Bioinformatik des Universitätsklinikums Münster.

Wie im Kapitel 5.2.15 beschrieben sind mit jedem Array 35556 Transkript-Cluster analysiert worden. Durch die statistische Auswertung von 6 unabhängigen RNA-Proben jeder Zelllinie und der anschließenden Vergleichsanalyse von HPK1^{high} bzw. HPK1^{high(K46E)} mit der Kontrollzelllinie HPK1^{wt} wurden differenziell exprimierte Transkript-Cluster identifiziert. Bei der Untersuchung der HPK1^{high}-Zellen wurden 2041 Transkript-Cluster mit einer differenziellen Expression im Vergleich zu HPK1^{wt}-Myelomzellen ermittelt (Abb.24A).

Zur Identifikation der durch die differenziellen Transkript-Cluster am stärksten vertretenen Signalwege wurden die Gensymbole mit dem Online-Portal Pantherdb.org analysiert. Dabei wurden von den 2041 differenziell exprimierten Transkript-Cluster der HPK1^{high} 1366 Gene (mehrere Cluster pro Gen möglich) mit 661 Signalwegs-Treffern identifiziert (pro Gen mehrere Treffer möglich). Die am häufigsten vertretenen Signalwege waren (Genzuordnung siehe Tab. 19 – Anhang):

- | | |
|---|-------------------------|
| i) Chemokin und Cytokin vermittelte Entzündungsreaktionen (P00031) | mit 37 Treffern |
| ii) der Wnt-Signalweg (P00057) | mit 27 Treffern |
| iii) Signalwege der Angiogenese (P00005) | mit 26 Treffern |
| iv) PDGF- bzw. Integrin-Signalwege (P00017 bzw. P00034) | jeweils mit 17 Treffern |
| v) Apoptose- bzw. T-Zell-Aktivierungs-Signalwege (P00006 bzw. P00053) | jeweils mit 15 Treffern |

Beim Vergleich von $HPK1^{high(K46E)}$ und $HPK1^{wt}$ konnten 343 differenziell exprimierte Transkript-Cluster ermittelt werden (Abb. 24B) und mit Hilfe des Online-Portals wurden 254 Gene identifiziert und 138 Signalwegs-Treffern zugeordnet. Die 5 Signalwege mit der höchsten Anzahl an Treffern waren (Genzuordnung siehe Tab. 20 – Anhang):

- | | |
|--|------------------------|
| i) Apoptose- bzw. PDGF-Signalwege | jeweils mit 8 Treffern |
| ii) Chemokin und Cytokin vermittelte Entzündungsreaktionen | mit 7 Treffern |
| iii) der FGF- bzw. EGFR- bzw. Integrin- bzw. TGF- β - bzw. Wnt-Signalwege (P00021 bzw. P00018 bzw. P00034 bzw. P00052 bzw. P00057) | jeweils mit 5 Treffern |
| iv) Signalwege der Angiogenese bzw. B-Zell-Aktivierung (P00005 bzw. P00010) | jeweils mit 4 Treffern |
| v) Endothelin- bzw. T-Zell-Aktivierungs- bzw. Toll-Rezeptor- bzw. VEGF- bzw. p53-Signalwege (P00019 bzw. P00053 bzw. P00054 bzw. P00056 bzw. P00059) | jeweils mit 3 Treffern |

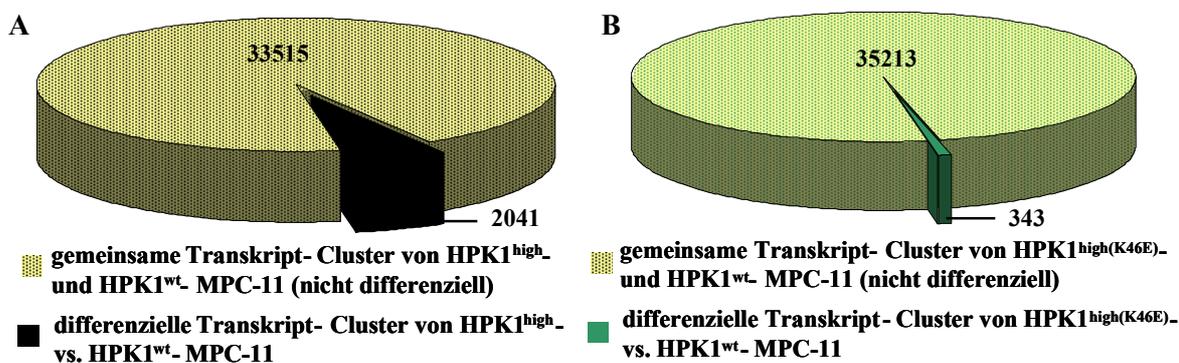


Abbildung 24: schematische Darstellung der Vergleichsanalyse von $HPK1^{high}$ (A) und $HPK1^{high(K46E)}$ (B) mit $HPK1^{wt}$; hervorgehoben ist der Anteil der differenziell exprimierten Transkript-Cluster am Gesamt-Transkript-Cluster-Ausmaß der Microarrays

Mittels der Microarrays konnten auch die Transkript-Expressionen der untersuchten Proteine aus Kapitel 3.2.4 ermittelt werden. Durch die Überexpression von $HPK1$ zeigten die Gene *jnk1* und 2, *p38 α* , *p70s6k α* , *stat2*, *stat3*, *stat5a* und 5*b*, *gsk-3 α* und -3 β , *lck*, *erk1*, *rsk1*, *tak1*, *mek1* und 2, *mapkapk2* und *pxn* keine unterschiedlichen Transkript-Expressionen im Vergleich zu den Expressionen in den $HPK1^{wt}$ -Myelomzellen (Abb. 25 + 26).

Ausnahmen sind die Gene von *hpk1* und *mekk1*. Diese Gene waren als Transkript (Abb. 25) und Protein (Abb. 23) in $HPK1^{high}$ überexprimiert (*hpk1*: \log_2 ratio = 1,14; $p < 3,5 \times 10^{-5}$; *mekk1*: \log_2 ratio = 1,07; $p < 0,002$).

In $HPK1^{high(K46E)}$ war nur das Gen von *hpk1* überexprimiert (\log_2 ratio = 1,14; $p < 1,6 \times 10^{-4}$; Abb. 26); das Gen von *mekk1* war nicht differenziell exprimiert (identisch mit der unveränderten Proteinexpression im Western-Blot (Kap. 5.2.4); Abb. 26).

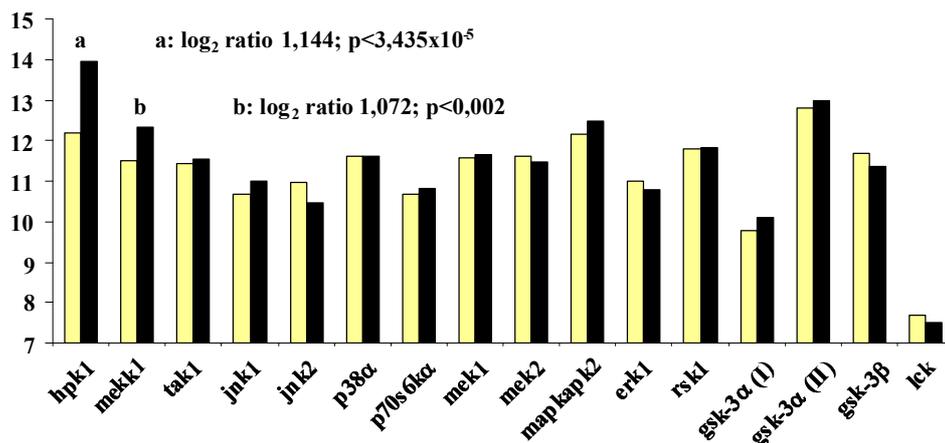


Abbildung 25: Transkript-Expressionen von ausgewählten Kinasen in $HPK1^{high}$ (■) und $HPK1^{wt}$ (■) mittels „Genechip Mouse 1.0 st“-Microarrays analysiert; a: Differenz $\log_2 \text{ratio} = 1,144$; $p < 3,435 \times 10^{-5}$; b: Differenz $\log_2 \text{ratio} = 1,072$; $p < 0,002$; (jeweils 5 unabhängige mRNA-Proben pro Zelllinie)

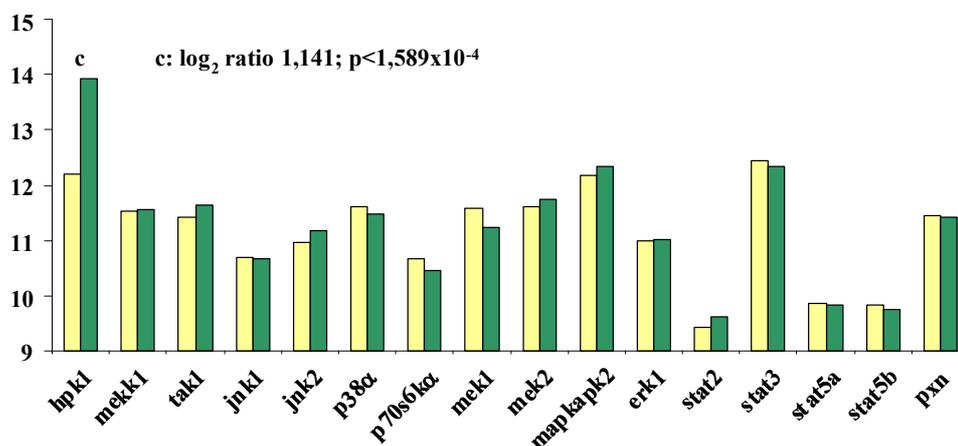


Abbildung 26: Transkript-Expressionen von ausgewählten Kinasen in $HPK1^{high(K46E)}$ (■) und $HPK1^{wt}$ (■) mittels „Genechip Mouse 1.0 st“-Microarrays analysiert; c: Differenz $\log_2 \text{ratio} = 1,141$; $p < 1,589 \times 10^{-4}$; (jeweils 5 unabhängige mRNA-Proben pro Zelllinie)

Insgesamt unterstützen diese Ergebnisse der Transkriptom-Analyse die Daten der Western-Blot-Untersuchungen (Kap. 3.2.4) und können für die Phosphoprotein-Analysen als Kontrolle des jeweiligen Gesamtproteinniveaus (sogenannte „Pan“-Kontrolle) fungieren.

Basierend auf Literaturrecherchen zu HPK1 und seiner regulatorischen Aktivität wurden die Expressionsdaten folgender Gene in den HPK1^{high} und HPK1^{high(K46E)} als besonders relevant erachtet.

Tabelle 6: wichtige differenzielle Gene der Transkriptom-Analysen

Gensymbol	Veränderung der Transkript-Expression (Differenz log ₂ ratio*; p-Wert)	
	HPK1 ^{high} vs. HPK1 ^{wt}	HPK1 ^{high(K46E)} vs. HPK1 ^{wt}
<i>ask1</i>	1,057 (p < 0,002)	1,059 (p < 0,015)
<i>gadd45γ</i>	1,080 (p < 0,002)	-
<i>p21</i>	1,179 (p < 0,015)	-
<i>mcl-1</i>	1,037 (p < 0,002)	-
<i>bcl-2l1</i>	-	1,042 (p < 0,02)

* positive Werte bedeuten eine Überexpression in der entsprechenden HPK1-Transfektanten

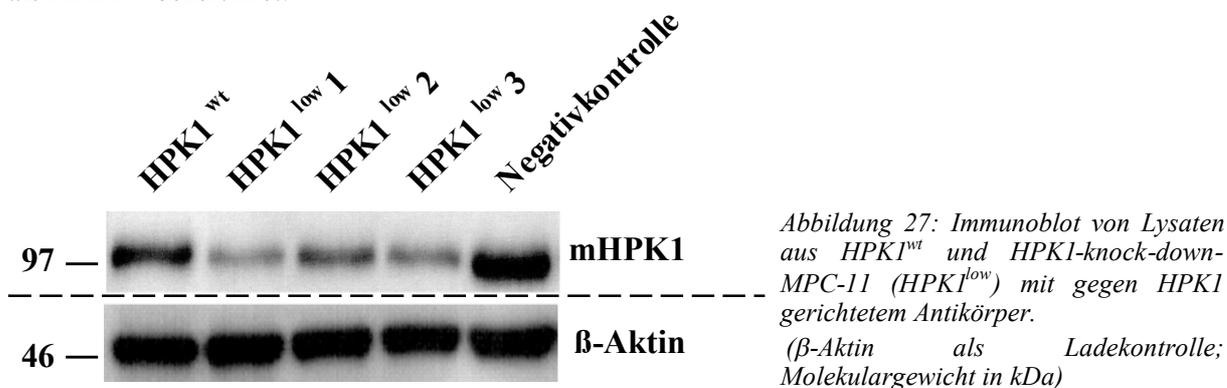
Die Überexpression von Kinase-aktiver HPK1 verursachte in den Myelomzellen eine Überexpression von *ask1* (alias *map3k5*), *gadd45γ* (Wachstumsarrest und DNA-Schaden induziertes Gen 45 gamma), *mcl-1* (myeloische Leukämie Sequenz 1) und *p21* (alias *cip1*) (Tab. 6).

Neben einer erhöhten Transkript-Expression von *ask1* (gemein mit HPK1^{high}) war das Transkript von *bcl-2l1* („bcl-2 like 1“) in HPK1^{high(K46E)} im Vergleich zu HPK1^{wt} überexprimiert (Tab. 6).

3.3 Charakterisierung von Effekten selektiv herunterregulierter HPK1 in Myelomzellen (HPK1-knock-down mittels RNAi)

Eine weitere Möglichkeit der Modulation der HPK1-Expression ist die Reduktion der Expression mittels RNA-Interferenz (RNAi).

Dafür wurden drei verschiedene RNAi-Konstrukte auf ihre Funktionalität/knock-down-Effektivität getestet. Alle drei RNAi-Konstrukte zeigten eine reduzierte HPK1-Expression mit unterschiedlicher knock-down-Effektivität. Die Negativkontrolle (Zellen mit AllStars-Negative-Control siRNA behandelt, Fa. Qiagen) zeigte wie erwartet keine Expressionsverringering (Abb. 27) und diente als HPK1^{wt} in den Versuchen mit reduzierter HPK1-Expression als Kontrolle. Für die weiteren Untersuchungen wurde die siRNA #3 ausgewählt, weil sie die HPK1-Expression über einem Zeitraum von 72h am schnellsten und effektivsten hemmte. Die daraus entstandene transfizierte Zelllinie wurde als HPK1^{low} bezeichnet.



3.3.1 Phänotypische Veränderungen von MPC-11 mit reduziert exprimierter HPK1 (HPK1^{low}) im Vergleich zu HPK1^{wt}

Entsprechend der Proliferationsuntersuchungen nach HPK1-Überexpression (Kap. 3.2.1) wurde auch die HPK1^{low}-Myelomzellen phänotypisch charakterisiert.

Die HPK1^{low}-Myelomzelllinie zeigte kein verändertes Proliferationsverhalten gegenüber der HPK1^{wt} (Abb. 28).

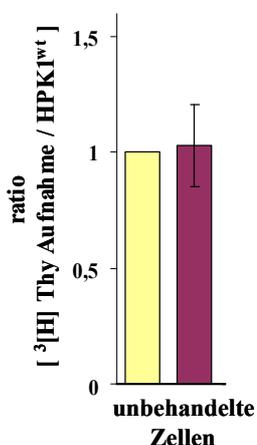


Abbildung 28: Schema der relativen Proliferationsrate in MPC-11 mit reduzierter HPK1-Expression (HPK1^{low} (■)) vs. HPK1-wildtyp-Expression (HPK1^{wt} (□)). (drei unabhängige Versuche)

3.3.2 Veränderung der Proliferationsaktivität und Apoptosesensitivität von Myelomzellen gegenüber anti-myelomatösen Substanzen durch selektiv reduzierte HPK1 (HPK1-knock-down mittels RNAi)

a) bei der Proliferation

Es wurden in MPC-11-Myelomzellen Effekte reduzierter HPK1-Expression auf die Hemmung der Proliferation ($^3\text{[H]}$ -Thymidin-Aufnahme) analysiert. Die Untersuchungen wurden in HPK1^{low} ebenso wie in der HPK1^{wt} in Anwesenheit von Dexamethason, Melphalan, PD98059 und Bortezomib durchgeführt.

Zur Darstellung der Proliferationsänderung wurden die Proliferationsraten der Zelllinien-Proben ohne Substanz (w/o-Proben in Abb. 29) auf den relativen Wert 1,0 festgelegt und die behandelten Proben relativ zu dieser Probe berechnet und abgebildet.

Bei Untersuchungen der Effekte reduziert-exprimierter HPK1 in MPC-11-Myelomzellen auf die Proliferation konnte nach Zugabe von Dexamethason ($10\mu\text{M}$) und PD98059 ($20\mu\text{M}$) eine verringerte Aufnahme von $^3\text{[H]}$ -Thymidin gegenüber HPK1^{wt} gezeigt werden (Abb. 29). Diese Unterschiede sind nicht statistisch signifikant. Melphalan ($10\mu\text{M}$) zeigte in allen untersuchten Myelomzelllinien eine Reduktion der Proliferationsrate von über 99%. Der Proteasom-Inhibitor Bortezomib (2nM) verursachte keine Proliferationshemmung (Abb. 29).

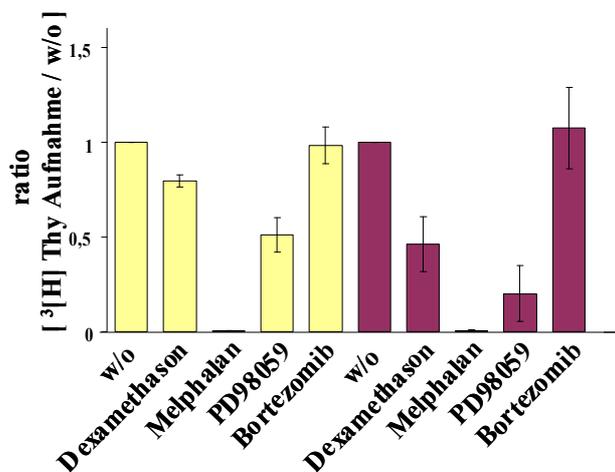


Abbildung 29: Veränderung der relativen Proliferationsrate durch Zugabe spezifischer Inhibitoren bzw. anti-myelomatöser Substanzen in MPC-11 mit reduzierter HPK1-Expression (HPK1^{low} (■)) vs. HPK1-wildtyp-Expression (HPK1^{wt} (□)).

Ein statistisch signifikanter Effekt der reduzierten HPK1-Expression auf die Proliferation der Myelomzellen im Vergleich zu HPK1^{wt} -Myelomzellen konnte nach Zugabe der vier Anti-Myelom-Therapeutika nicht nachgewiesen werden.

b) bei der Apoptose

Zum Nachweis eines Einflusses einer reduzierten HPK1-Expression auf die Apoptose-Induktion der Myelomzelle wurde die HPK1^{low}-Zelllinie in einem Dosistitrativversuch mit den Substanzen aus dem Proliferationsversuch behandelt und mit dem Verhalten der wildtypisch HPK1-exprimierenden Myelomzelllinie verglichen.

Bei der Untersuchung der Apoptose-Induktion zeigte sich bei HPK1^{low} nach Zugabe von Dexamethason im gesamten Dosistitrativbereich zwischen 2,5µM und 30µM kein Unterschied beim prozentualen Anstieg der Apoptosehäufigkeit im Vergleich zu den HPK1^{wt}-Myelomzellen (Abb. 30; Tab. 7).

Tabelle 7: Veränderung der Apoptosehäufigkeit nach Zugabe von Dexamethason in unterschiedlichen Konzentrationen; drei unabhängige Versuche mit jeweils Doppelbestimmung

Dexamethason-Konzentration in µM	Veränderung der Apoptosehäufigkeit in % (± Standardabweichung)	
	HPK1 ^{wt}	HPK1 ^{low}
2,5	12,5 (± 0,3)	10,5 (± 0,5)
5,0	12,9 (± 2,1)	8,1 (± 1,4)
10,0	14,2 (± 0,5)	10,9 (± 0,2)
20,0	11,8 (± 0,2)	12,3 (± 0,7)
30,0	17,4 (± 4,5)	13,1 (± 2,1)

Nach Zugabe von Melphalan zeigten die Myelomzellen mit einer reduzierten HPK1-Expression keine veränderte Apoptosehäufigkeit gegenüber der HPK1^{wt}-Zellen (Abb. 30; Tab. 8).

Tabelle 8: Veränderung der Apoptosehäufigkeit nach Zugabe von Melphalan in unterschiedlichen Konzentrationen; drei unabhängige Versuche mit jeweils Doppelbestimmung

Melphalan-Konzentration in µM	Veränderung der Apoptosehäufigkeit in % (± Standardabweichung)	
	HPK1 ^{wt}	HPK1 ^{low}
2,5	12,5 (± 4,0)	14,4 (± 4,1)
5,0	15,7 (± 1,0)	16,6 (± 0,1)
10,0	17,9 (± 1,3)	16,1 (± 2,7)
20,0	30,1 (± 0,6)	22,6 (± 1,5)
30,0	36,6 (± 0,5)	27,6 (± 0,2)

Des Weiteren wurde keine veränderte Apoptoserate nach Zugabe des MEK1-Inhibitors (PD98059) in den HPK1^{low} im Vergleich zu HPK1^{wt} nachgewiesen (Abb. 30; Tab. 9).

Tabelle 9: Veränderung der Apoptosehäufigkeit nach Zugabe von PD98059 in unterschiedlichen Konzentrationen; drei unabhängige Versuche mit jeweils Doppelbestimmung

PD98059- Konzentration in μM	Veränderung der Apoptosehäufigkeit in % (\pm Standardabweichung)	
	HPK1 ^{wt}	HPK1 ^{low}
10,0	1,8 (\pm 0,0)	1,8 (\pm 0,8)
20,1	0,7 (\pm 0,0)	1,0 (\pm 0,2)
30,0	4,0 (\pm 1,8)	2,5 (\pm 0,9)
50,0	3,3 (\pm 0,1)	2,0 (\pm 0,6)

Nach Inkubation mit dem Proteasom-Inhibitor (Bortezomib) zeigten alle MPC-11-Myelomzellen ab einer Konzentration von 4nM einen deutlichen Anstieg der Apoptosehäufigkeit (Abb. 30; Tab. 10). Dabei zeigte sich aber kein signifikanter Unterschied zwischen der HPK1^{low} und der HPK1^{wt}.

Tabelle 10: Veränderung der Apoptosehäufigkeit nach Zugabe von Bortezomib in unterschiedlichen Konzentrationen; drei unabhängige Versuche mit jeweils Doppelbestimmung

Bortezomib- Konzentration in nM	Veränderung der Apoptosehäufigkeit in % (\pm Standardabweichung)	
	HPK1 ^{wt}	HPK1 ^{low}
1,0	-1,8 (\pm 0,7)	0,8 (\pm 2,0)
2,0	-1,6 (\pm 0,6)	3,4 (\pm 2,4)
4,0	18,8 (\pm 1,2)	16,0 (\pm 0,5)
6,0	56,7 (\pm 4,4)	57,0 (\pm 2,4)
8,0	68,3 (\pm 0,9)	66,2 (\pm 1,1)

Bei Untersuchungen von MPC-11-Myelomzellen mit reduzierter HPK1-Expression (HPK1^{low}) konnten keine statistisch signifikante Unterschiede in der Apoptosehäufigkeit nach Zugabe der verschiedenen Apoptose-Induktoren gegenüber HPK1^{wt} mit „scrambled“-siRNA nachgewiesen werden (Abb. 30).

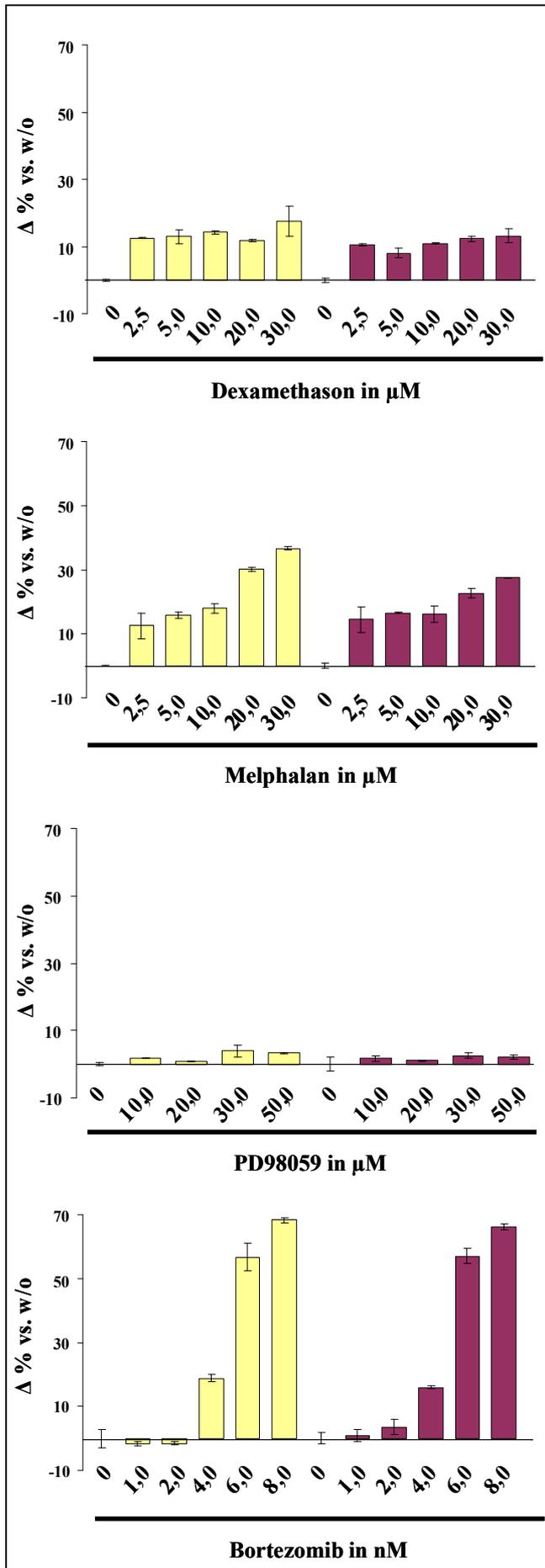


Abbildung 30: Dosisabhängige Änderung der Substanz-vermittelten Apoptoserate von MPC-11 nach Herunterregulation der HPK1-Expression (HPK1^{wt} mit „scrambled“-siRNA (■) und HPK1^{low} (■)); (drei unabhängige Versuche)

3.3.3 Effekte vermindert exprimierter HPK1 auf intrazelluläre Signalwege in Myelomzellen

Ebenso wie die HPK1-Überexpressions-Transfektanten wurden die HPK1^{low}-Zellen mittels proteinbiochemischer Methoden untersucht.

Dabei konnten ein sehr ähnliches Expressions- bzw. Aktivitätsmuster verschiedener Kinasen in HPK1^{low} und HPK1^{wt} ermittelt werden (Abb. 31 + 32).

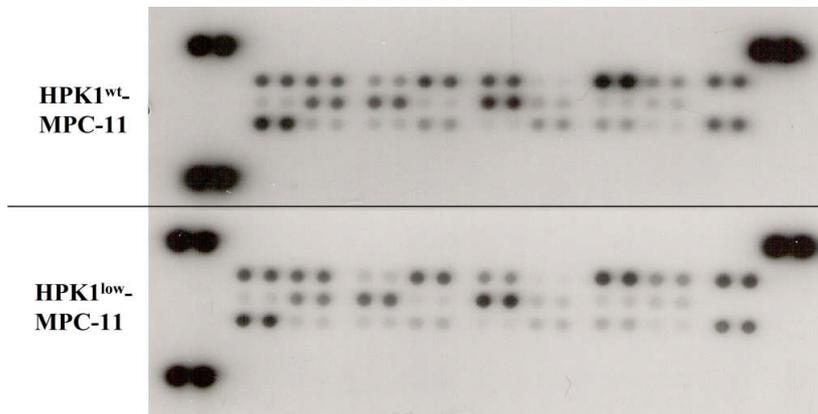


Abbildung 31: beispielhafte Darstellung des verwendeten Phospho-Arrays der Firma R&D Systems; Proteome ProfilerTM Human Phospho-MAPK-Array-Kit; hybridisiert wurde Zellysate von HPK1^{wt} und HPK1^{low}

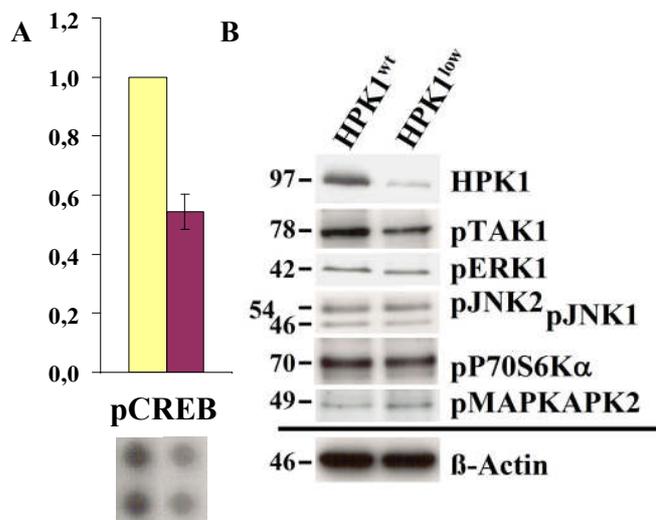


Abbildung 32: A. densitometrische Auswertung der Phospho-Arrays (oben) und Gegenüberstellung der Dot-Paare (unten) der Zellysate von HPK1^{low} (■) und HPK1^{wt} (□) und B. Immunoblot von Zellysaten von HPK1^{wt} und HPK1^{low} mit gegen totale und phosphorylierte Proteine gerichtete Antikörper (β-Aktin als Ladekontrolle; Molekulargewichte in kDa)

Unterschiede im Aktivitätslevel zwischen HPK1^{low} und HPK1^{wt} wurde bei der cAMP Response Element Binding Protein-Kinase (pCREB) und bei der TGF β-aktivierten Kinase-1 (pTAK1) nachgewiesen (Abb. 32 A + B). Die Phospho-Proteine pJNK1/2, pERK1, pP70S6Kα und pMAPKAPK2 zeigten kein differenziell reguliertes Aktivitätsniveau in HPK1^{low}-Myelomzellen im Vergleich zu HPK1^{wt} (Abb. 32B).

3.3.4 Effekte reduzierter HPK1-Expression auf das Transkriptom der Myelomzellen

Entsprechend der Analysen der HPK1-Überexpressions-Zelllinien wurde auch HPK1^{low} auf Veränderungen des Transkriptoms untersucht.

Diese Untersuchungen wurden wiederum mit Unterstützung der Abteilung für Genexpressionanalytik (IZKF-IFG) und dem Institut für Bioinformatik durchgeführt.

Bei der Vergleichsanalyse von HPK1^{low} und HPK1^{wt} wurde 1 von 35556 Transkript-Cluster als differenziell exprimiert identifiziert. Das zugehörige Gen gehört zur ATPase, Klasse II, Typ 9A (\log_2 ratio = 1,06; $p < 0,018$).

Aufgrund der Daten aus den genetischen und proteinbiochemischen Untersuchungen, sowie der fehlenden signifikanten Unterschiede bei der Proliferationshemmung und der Apoptose-Induktion von HPK1^{low} wurde auf die *in vivo*-Versuche zum Einfluss von reduzierter HPK1-Expression auf das Tumorstadium in einem syngenem, murinen MPC-11/BALB/c-Modell in der vorliegenden Arbeit verzichtet.

4 Diskussion

Bei der Entwicklung neuer zielgerichteter Therapiestrategien kommt der Identifizierung neuer Zielstrukturen eine grundlegende Bedeutung zu (Chauhan u. a., 1997; Dankbar u. a., 2000; Hideshima u. a., 2001c; Bisping u. a., 2003). Besonders hervorzuhebende Signalkaskaden beim Multiplen Myelom sind der JAK-STAT3-, der Ras-Raf-ERK-, der JNK/SAPK- und der PI3K-AKT-Signalweg (Puthier u. a., 1999; Tu u. a., 2000; Hu u. a., 2003; Lentzsch u. a., 2004). Neue therapeutische Strategien mit Inhibitoren oder Antikörpern sind darauf ausgerichtet, Schlüsselregulatoren in anti-apoptischen Signalwegen selektiv auszuschalten, mit dem Ziel i) eine primäre Induktion von Apoptose in Myelomzellen hervorzurufen, ii) die Sensitivität gegenüber konventionellen Chemotherapeutika wiederherzustellen oder iii) das Knochenmarkmikromilieu so zu verändern, dass einerseits parakrin vermittelte anti-apoptische Signale (IL-6, IGF, VEGF) blockiert, andererseits die Adhäsion zwischen Knochenmarkstroma und Myelomzellen verhindert wird (Villunger u. a., 1996; Bruno u. a., 2004).

Bislang sind entsprechende frühe, aktivierende oder von der Selbstregulation (*feed back*) entkoppelte Signalereignisse in der Entstehung des Multiplen Myeloms unzureichend untersucht. Gut charakterisiert sind dagegen proliferative Signale in differenzierten B-Lymphozyten durch Interaktionen zwischen B-Zell-Rezeptor (CD79) und membranständigen oder zur Plasmamembran rekrutierten Kinasen. Biochemisch als auch in B-Zellen konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Hämatopoetischen Progenitor Kinase 1 (HPK1) durch B-Zell-Rezeptor-vermittelte Signale unmittelbar reguliert wird (Sauer u. a., 2001; Tsuji u. a., 2001; Han u. a., 2003). Die mögliche pathogenetische Rolle von HPK1 in der Entstehung von B-Zell-Neoplasien (wie dem Multiplen Myelom) und insbesondere ihre Interaktion mit Oberflächenrezeptoren der malignen B-Zellen sind bislang nicht untersucht.

Die cDNA der murinen HPK1 wurde durch subtraktive Hybridisierung aus Knochenmarkszellen in der Arbeitsgruppe von Prof. Kiefer (MPI, Münster) isoliert. Nachdem die initiale Charakterisierung HPK1 als selektiven SAPK- und NF κ B-Aktivator identifiziert hatte, konnte eine Regulation von HPK1 durch Immunorezeptoren gezeigt werden. Interessanterweise wird in apoptotischen Zellen HPK1 durch Caspasen gespalten. Das dabei entstehende C-terminale Fragment supprimiert den NF κ B-Weg während der N-Terminus weiterhin einen potenten JNK/SAPK-Aktivator darstellt. Ferner wurde im Labor von Prof. Kiefer der exakte Mechanismus der Aktivierung von HPK1 nach Immunorezeptor-Stimulation entschlüsselt (Kiefer u. a., 1996; Liou u. a., 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die mRNA- und Protein-Expression der Hämatopoetischen Progenitor Kinase 1 im Multiplen Myelom untersucht und mit anderen hämatologischen bzw. malignen Zelltypen verglichen. HPK1 zeigte auf mRNA- und Protein-Ebene eine reduzierte Expression gegenüber nicht malignen, hämatologischen Zellen (PBLL, Abb. 10). Auch in Zellen anderer maligner hämatologischer B-Zell-Entitäten (B-CLL) und in Myelomen während bzw. nach Therapie ist die HPK1-Expression höher als in Myelomzellen nach Diagnosenstellung (Abb. 10). Dieses Expressionsverhalten spricht für eine Funktion von HPK1 als Tumorsuppressorgen. Durch die Reexpression von HPK1 kann eine Reduzierung oder Aufhebung des malignen Phänotyps der Tumorzellen erwartet werden.

Für eine Überexpression von HPK1 wurden murine Zelllinien mit murinem, Kinase-aktivem (HPK1-high) bzw. Kinase-defizientem (Aminosäureaustausch K46E; HPK1-K46E), HPK1 generiert. Zur Kontrolle wurde eine murine Zelllinie mit dem Vektor ohne zusätzliche, kodierende Sequenz („Leervektor“) transfiziert (HPK1-wt). Die HPK1-Transfektanten, intakt bzw. mutiert, synthetisieren ein HA-getagtes HPK1-Fusionsprotein (Abb. 12 + 13). Durch den HA-Tag wurde die durchflusszytometrische Analyse dieser Zelllinien erleichtert.

4.1 Zelluläre Effekte auf die Überexpression von HPK1 beim Multiplen Myelom

Die Transfektion von Kinase-aktivem HPK1 verursachte zahlreiche molekular-biochemische und zellbiologische Veränderungen in der Myelomzelle.

Als Mitglied der MAP Kinase-Kaskade erhöhte die Überexpression von Kinase-aktivem HPK1 die Transkript- und Protein-Expression von MEKK1 (alias MAP3K1, Abb. 23 + 25), sowie die Transkript-Expression von *ask1* (alias *map3k5*, Tab. 6). Außerdem änderte sich die Häufigkeit von phosphorylierten Proteinen (Abb. 23) in HPK1-high- gegenüber HPK1-wt-Myelomzellen. Dabei wurde die jeweilige mRNA-Expression der Phospho-Proteine nicht erhöht (Abb. 25). Auch Proteine anderer Signalwege (z.B. Wnt- oder PI3K/AKT-Signalweg) wurden durch die erhöhte Expression von HPK1 in ihrer Aktivität bzw. ihrer Transkript-Expression beeinflusst.

HPK1 reguliert die MAPK-Familien

Die 3 betroffenen MAPK-Familien sind i) die SAPK/JNK-, ii) die P38- und iii) die ERK-Familie.

Die Aktivierung von JNK1 wurde bereits durch Kiefer bzw. Hu und Mitarbeiter 1996 beschrieben (Kiefer u. a., 1996; Hu u. a., 1996). In der Literatur werden zahlreiche Möglichkeiten dieser Aktivierung aufgeführt und können durch Einzelergebnisse in dieser Arbeit auch für das Myelom bestätigt werden. Whitmarsh und Kelkar beschreiben in ihren Arbeiten eine Aktivierung von JNK1 durch HPK1 nach Initiierung einer räumlichen Nähe von HPK1, MLK3 und JNK1. Vermittelt wird diese Nähe durch die Bindung der 3 Proteine an das Gerüstprotein JIP („JNK interacting-protein“) (Whitmarsh u. a., 1998; Kelkar u. a., 2000).

Eine weitere Möglichkeit der Aktivierung von JNK1 besteht durch die Überexpression von MEKK1 bzw. durch die Hyperaktivierung von TAK1 (alias MAP3K7, Abb. 23) (Zhou u. a., 1999). Diese Befunde konnten durch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit in den HPK1-high-Myelomzellen bestätigt werden.

Auch die zweite MAPK-Familie (P38-Familie) wurde in Myelomzellen durch die Überexpression von Kinase-aktivem HPK1 in ihrer Expression an aktiviertem Protein reguliert (Abb. 23; Kiefer u. a., 1996; Hu u. a., 1996).

Von mehreren unabhängigen Arbeitsgruppen wurde die Aktivierung von MAPKAPK2 durch die P38-Kinase beschrieben und auch in der vorliegenden Arbeit konnte neben einer Steigerung der aktiven P38 α -Proteinexpression eine Erhöhung von phosphoryliertem MAPKAPK2 detektiert werden (Abb. 23; Freshney u. a., 1994; Rouse u. a., 1994). Eine weitere für diese Arbeit wichtige Beziehung von P38, ist bereits seit 1998 nach einer Veröffentlichung von Kültz und Mitarbeitern bekannt; P38 wird durch GADD45 γ aktiviert (Abb. 33; Kültz u. a., 1998; Bulavin u. a., 2003; Cretu u. a., 2009). *Gadd45 γ* (Wachstumsarrest und DNA-Schaden induziertes Gen 45 gamma) konnte in der vorliegenden Arbeit als überexprimiertes Transkript in HPK1-high-Zellen detektiert werden (Tab. 6). Damit steigert das überexprimierte HPK1 die Expression von GADD45 γ , welches wiederum die Aktivität von JNK und P38 α fördert (Abb. 33; Cretu u. a., 2009).

Eine Regulierung der Expression bzw. Aktivität von ERK (die 3. MAPK-Familie) durch die Überexpression von Kinase-aktivem HPK1 konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Eine Ursache könnte der geringe Einfluss des MEK/MAPK-Signalweges in murinen Myelomzellen sein.

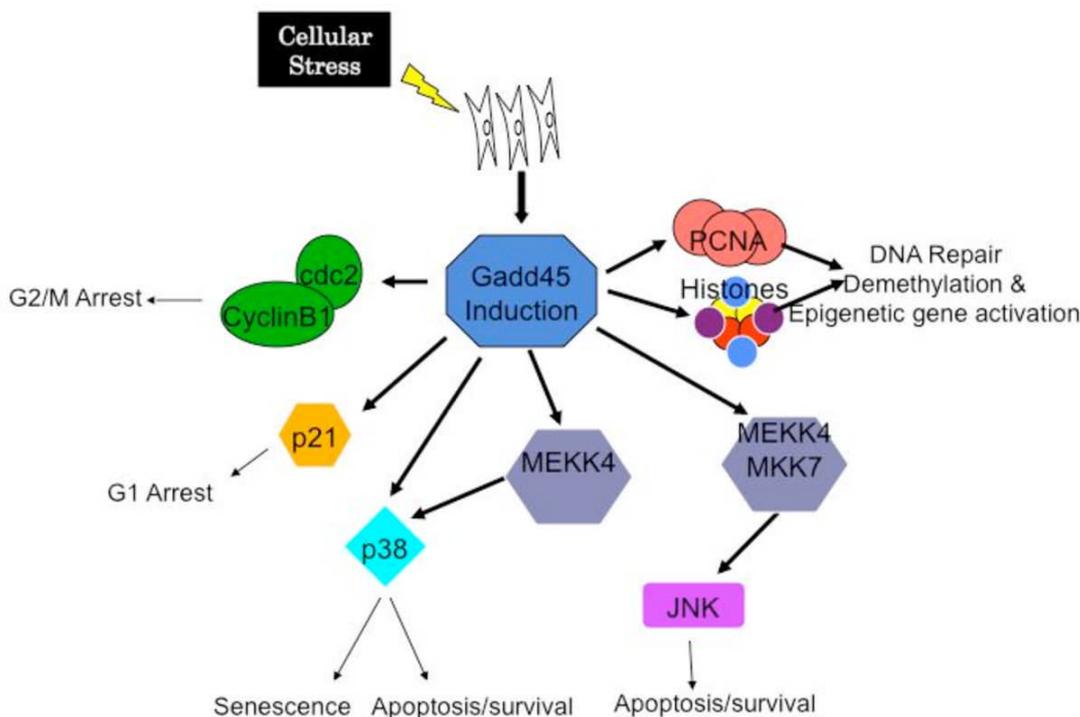


Abbildung 33: grafische Übersicht über eine Auswahl von Interaktionspartner und den daraus resultierenden zellulären Funktionen der GADD45-Familie (Cretu u. a., 2009)

HPK1-Einfluss auf andere Signalwege

Der Wnt-Signalweg ist ein Transduktionswege, der erst in jüngster Zeit entdeckt und untersucht wurde. Die Überexpression von Kinase-aktivem HPK1 verursachte eine reduzierte Phosphorylierung von GSK-3 α/β (Abb. 23). Eine Phosphorylierung von Serin 9 (pS9; α -Form) bzw. Serin 21 (pS21; β -Form) inaktiviert die Glykogen-Synthase Kinase 3 (Stambolic und Woodgett, 1994; Cross u. a., 1995; Srivastava und Pandey, 1998). Der in dieser Arbeit eingesetzte MAPK-Array detektierte die relative Häufigkeit der inaktivierten GSK-3 α/β (Tab. 18 – Anhang). Die aufgezeigte, reduzierte Expression von inaktivem pS9/pS21-GSK-3 (Abb. 23) ermöglicht dieser GSK andere Proteine zu phosphorylieren und sie dadurch zu inaktivieren bzw. ihre Degradation einzuleiten. Beispiele für GSK-3 inaktivierte Proteine sind β -Catenin und c-Myc (Polakis, 2000; Cantley, 2002; Kikuchi u. a., 2006). Eine Inaktivierung und Degradation von β -Catenin führt unter anderem zur reduzierten DNA-Bindung des lymphoiden Verstärker-Faktors („lymphoid enhancer factor“, LEF) und dadurch zur geringeren Transkription von *c-myc* und Cyclin D1 (He u. a., 1998; Shtutman u. a., 1999; Tetsu und McCormick, 1999). LEF kann neben β -Catenin auch durch Prostaglandin E₂-induzierte Wachstumsstimulation aktiviert werden.

Prostaglandin E₂ ist auch ein Aktivator von HPK1. Im Gegensatz dazu inhibiert HPK1 aber eine PGE₂-induzierte Promotor-Aktivität von AP-1. Eine Überexpression von HPK1 verursacht dementsprechend eine reduzierte AP-1-Promotor-Aktivität und hemmt eine PGE₂-vermittelte LEF-Bindungs-Aktivität. Dadurch ist HPK1 ein negativer Regulator von B-Zell-Rezeptor-vermittelten, AP-1-abhängigen Gentranskription (Sawasdikosol u. a., 2003 + 2007). Diese Funktion scheint auch in Myelomzellen zu bestehen.

Kinase-defiziente HPK1 und der veränderte Effekt auf die Signaltransduktion

Wie bereits im Ergebnisteil beschrieben, wurde in der vorliegenden Arbeit eine murine Myelomzelllinie mit einer Überexpression von Kinase-defizientem HPK1 generiert.

Die Signalwege, die durch die Überexpression von HPK1-K46E beeinflusst werden, unterscheiden sich von den Beobachtungen der Kinase-aktiven HPK1-Form.

Die MAPK-Familie der JNKs wurde weder in der Intensität der Transkript-Expression, noch in der Häufigkeit der aktiven, phosphorylierten Proteine reguliert (Abb. 26 + 23). Dagegen war die Aktivierung von Proteinen der P38- und ERK-Familie verändert, ohne einen HPK1-Einfluss auf die entsprechende Transkript-Expression zu zeigen (Abb. 23 + 26). P38 α war in beiden HPK1-tranfizierten Zelllinien verstärkt aktiviert (Abb. 23). Dies legt einen Einfluss von anderen funktionellen Proteinsequenzen von HPK1, als die Kinase-Domäne, nahe. Die vier prolinreichen Regionen zwischen der Kinase- und der Citron-Domäne (vgl. Kap. 1.4.1) sind durch den Aminosäureaustausch von Lysin-46 zu Glutaminsäure nicht betroffen und können SH3-Domänen von Adaptorproteinen binden. Entsprechend ist zu vermuten, dass die Aktivierung von P38 und ERK durch die Adaptorfunktion der prolinreichen Regionen reguliert wird.

Diese Funktion wird bei Schulze-Luehrmann als Ursache für die gesteigerte ERK-Aktivität von Kinase-defizientem HPK1 in B-Zellen (ohne Stimulus) beschrieben (Schulze-Luehrmann 2002, Dissertation; urn:nbn:de:bvb:20-opus-3074). Im Gegensatz zu dieser Beobachtung wurde die Aktivität von ERK1 in den HPK1-K46E-Myelomzellen in der vorliegenden Arbeit negativ reguliert (Abb. 23). Als Ursache für diese konträren Regulationsmechanismen sind Differenzierung und Transformation von B-Lymphozyten zu malignen Plasmazellen vorstellbar.

Die beschriebene *ask1*-Überexpression in den HPK1-high-Zellen war ebenfalls in den HPK1-K46E-Myelomzellen nachweisbar (Tab. 6), außerdem konnte eine Deaktivierung verschiedener Proteine der STAT-Familie aufgezeigt werden (Abb. 23). Ahmed und Ivashkiv beschreiben eine reduzierte Aktivierung als Folge der Aktivierung von P38 (Ahmed und Ivashkiv, 2000), resultierend in dem Verlust von MCL-1-Protein-Expression und -Phosphorylierung (Tiedemann u. a., 2010). Eine reduzierte *mcl-1*-Transkript-Expression konnte aber in der vorliegenden Arbeit in den K46E-Myelomzellen nicht nachgewiesen werden.

4.2 HPK1-beeinflusste Proliferation und Apoptose in murinen Myelomzellen

Tumorzellen sind charakterisiert durch ein abnormes Proliferations- und Apoptoseverhalten. Anti-Tumor-Strategien sind darauf ausgerichtet die Proliferation von Tumorzellen so zu regulieren, dass sie dem Verhalten nicht-maligner Zellen entspricht. Außerdem soll der immortale Phänotyp von Tumorzellen durch Verstärkung von pro-apoptotischen bzw. durch Inhibition von anti-apoptotischen Signaltransduktionswegen eliminiert werden.

Die Myelomzellen mit einer Überexpression von Kinase-aktivem HPK1 zeigten eine reduzierte Proliferation (korrespondierende ³[H]-Thymidin-Aufnahme), aber zunächst keine Änderung im Apoptoseverhalten unter Nativ-Bedingungen.

In der vorliegenden Arbeit konnte nach Überexpression von Kinase-aktivem HPK1 eine Hyperaktivierung von JNK1 und P38 α nachgewiesen werden (Abb. 23). In vielen Publikationen wird die Aktivierung dieser beiden MAP Kinasen mit pro-apoptotischen Signalen assoziiert (Hakem u. a., 1998; Chen und Tan, 2000; Li u. a., 2000; Desbiens u. a., 2003). Eine zweite Hypothese zum Effekt einer P38-Aktivierung wird durch die Veröffentlichung von Bulavin und Mitarbeitern aufgezeigt. Sie konnten eine Assoziation der P38-Aktivierung mit dem Auftreten von Zellzyklus(G2)-Arrest beschreiben (Bulavin u. a., 2001). Die vorliegenden Ergebnisse zeigten keine Apoptose-Induktion durch Hyperaktivierung von P38 α . Damit unterstützen die Daten dieser Arbeit den von Bulavin beschriebenen P38-vermittelte Zellzyklus-Arrest.

Neben P38 α wurden mehrere Proteine/Gene durch die Überexpression von HPK1 verstärkt exprimiert bzw. hyperaktiviert, deren Funktionen in einem Zellzyklus-Arrest resultieren. *Gadd45 γ* war in HPK1-high-Myelomzellen überexprimiert (Tab. 6), aktivierte P38 und zeigte eine Blockierung der G1/S-Transition in HeLa-Zellen nach Serumentzug, sowie unter normalen Zellkulturbedingungen eine

Blockierung der G2/M- oder G1/M-Transition (Fan u. a., 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden die Proliferations-/Thymidin-Aufnahme-Versuche unter Serummangel-Bedingungen durchgeführt.

Gemäß den Erkenntnissen von Fan und Mitarbeitern in HeLa-Zellen wurde in den untersuchten HPK1-high-Myelomzellen, als Folge der Aktivierung von P38 durch GADD45 γ , der Übergang in die DNA-Replikations(S)-Phase gehemmt und dadurch die nachweisbare Thymidin-Aufnahme reduziert.

Außerdem resultiert eine Bindung von GADD45 γ an das Zellzyklus-Protein Cip21, alias P21 (Abb. 28) in einem Zellzyklus-Arrest (Cretu u. a., 2009). *P21* war ebenfalls in HPK1-high-Myelomzellen überexprimiert (Tab. 6). Dessen Einfluss auf den Zellzyklusarrest ist ausführlich in verschiedenen Veröffentlichungen beschrieben worden (Suzuki u. a., 1998; Dotto, 2000; Gartel und Tyner, 2002).

P21 wird am C-Terminus phosphoryliert und kann anschließend an eine Untereinheit der DNA-Polymerase δ (PCNA, „proliferating nuclear antigen δ “) reversibel binden. Damit wird die DNA-Replikation direkt durch P21 inhibiert. Eine solche DNA-Replikationshemmung verursachte ebenfalls die in dieser Arbeit nachgewiesene reduzierte Thymidin-Aufnahme. Diese reversible Bindungs-Inhibition erlaubt der Zelle, unter bestimmten Bedingungen, wieder einen neuen Zellzyklus inklusive Replikations(S)-Phase zu durchlaufen. Somit stellt der P21-induzierte Zellzyklusarrest bzw. der verringerte Thymidin-Einbau in die DNA keinen intrazellulären Apoptose-Stimulus für die Zelle dar und deshalb konnte keine gesteigerte basale Apoptosehäufigkeit nachgewiesen werden.

Eine weitere Funktion/Eigenschaft von P21 erklärt ebenfalls die nicht nachweisbare Apoptose-Induktion nach Zellzyklusarrest durch Überexpression von *p21* und *gadd45 γ* .

P21 hemmt durch direkte Bindung die Prozessierung von Procaspase 3 und 8. Eine Caspase-vermittelte Apoptose-Induktion ist so nicht möglich. P21 besitzt eine Caspase 3-Spaltsequenz und zeigt nach seiner Spaltung eine Translokation vom Nukleus in das Zytosol. Den gleichen Effekt hat eine Phosphorylierung von P21 durch AKT. Im Zytosol kann gespaltenes P21 die JNK-Kaskade und die Apoptose, induziert durch TNF- α und anderen Stimuli, inhibieren (Suzuki u. a., 1998).

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit eine Hyperaktivierung von P70S6K α in HPK1-high-Myelomzellen aufgezeigt werden (Abb. 23). Eine Aktivierung von P70S6K α durch mTOR wurde mit einer Transition von der G1- zur S-Phase assoziiert (Dumont und Su, 1996). Diesem Zusammenhang folgend wird die P21-abhängige Hemmung der Replikation aufgehoben und die Zellen durchlaufen den Zellzyklus ohne Arrest-vermittelte Apoptose-Induktion.

In den Myelomzellen mit der Überexpression von mutiertem HPK1 konnte keine *p21* oder *gadd45 γ* -Überexpression nachgewiesen und auch keine Veränderung der unstimulierten Proliferation bzw. Apoptose aufgezeigt werden.

4.3 HPK1 reguliert Proliferationsaktivität und Apoptosesensitivität

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der Hämatopoetischen Progenitor Kinase 1 als mögliche, künftig therapeutisch nutzbare Zielstruktur für das Multiple Myelom. Dafür wurden bekannte anti-myelomatös wirksame Substanzen und Inhibitoren auf ihre Wirksamkeit nach HPK1-Überexpression untersucht.

Dexamethason

Dexamethason ist ein Glucocorticoid und hemmt im Multiplen Myelom die Expression von IL-6 (einem autokrin und parakrin wirksamen Zytokin, einem essenziellen „Überlebensfaktor“ von Myelomzellen) (Ray u. a., 1990). Außerdem inhibiert Dexamethason die Aktivität von ERK und P70S6K α (Chauhan u. a., 1997; Strömberg u. a., 2004). Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Hyperaktivierung von P70S6K α in HPK1-high-Zellen (Abb. 23) wird die Sensitivität der Myelomzellen gegenüber Dexamethason-Einfluss reduziert. Dadurch wird die Proliferationshemmung durch Dexamethason aufgehoben (Abb. 15) und die Apoptose-Induktion in einem Dexamethason-Konzentrationsgradienten tendenziell verringert (Abb. 16, oberes Diagramm + Tab. 2).

Die Hyperaktivierung von JNK1 und P38 α nach Überexpression von Kinase-aktivem HPK1 haben bei der Dexamethason-induzierten Apoptose keinen Einfluss auf die Sensitivität. Chauhan und Mitarbeiter konnte eine JNK/P38-unabhängige Regulation der Apoptose durch Dexamethason aufzeigen (Chauhan u. a., 1997). Außerdem induziert Dexamethason durch Konformationsänderung von BAX und BAK (zwei pro-apoptotischen Proteinen) den intrinsischen Apoptoseweg u.a. durch Caspase 3-Aktivierung.

Die Überexpression von P21 und dessen Bindung an Procaspasen hemmte in den HPK1-high-Myelomzellen diesen Weg. Der durch die P21-Überexpression verursachte Zellzyklusarrest stellt bei Gartel und Tyner einen Schutz der Zelle vor exogenen Stressoren z.B. Chemotherapeutika dar (Gartel und Tyner, 2002).

Bei der Transkriptomanalyse konnte in den HPK1-high-Zellen eine Überexpression von *mcl-1* identifiziert werden (Tab. 6). MCL-1 hemmte ebenfalls den intrinsischen Apoptoseweg durch Stabilisierung des BIM-MCL-1-Komplexes (López-Royuela u. a., 2010).

HPK1-K46E-Myelomzellen zeigten nach Dexamethason-Zugabe eine unveränderte Proliferation/Thymidin-Aufnahme gegenüber einer unbehandelten Vergleichsprobe (Abb. 15), sowie eine reduzierte Sensitivität auf Dexamethason-vermittelte Apoptose-Induktion (Abb. 16, oberes Diagramm + Tab. 2).

Bei den Untersuchungen von HPK1-K46E mittels Genexpressions-Microarray konnte eine Überexpression von *bcl-2l1* („bcl-2 like 1“) nachgewiesen werden (Tab. 6). Diese Überexpression hemmte die Dexamethason-induzierte Cytochrom c-Ausschüttung aus den Mitochondrien und dadurch dessen pro-apoptotische Wirkung (Feinman u. a., 1999).

Melphalan

Melphalan ist eine alkylierende, DNA-interkalierende Substanz und verursacht eine Proliferationshemmung bzw. Apoptose-Induktion durch Störung der DNA-Replikation und Induzierung von DNA-Schäden.

Die HPK1-high-Zellen zeigten eine deutliche Proliferationshemmung nach Melphalan-Zugabe, welche sich aber in ihrer Ausprägung nicht von der Kontrollzelllinie unterschied (Abb. 15). Bei der Untersuchung der Apoptose-Induktion konnte eine signifikant höhere Melphalan-induzierte Apoptoserate in HPK1-high-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 16, 2. Diagramm + Tab. 3).

Gartel und Tyner stellten durch Untersuchungen mit *cis*-Platin einen Zusammenhang zwischen P21-Überexpression und der Apoptosehäufigkeit nach DNA-Schädigung her (Gartel und Tyner, 2002).

Dementsprechend verursachte die *p21*-Überexpression nach Transfektion von Kinase-aktivem HPK1 in Myelomzellen eine erhöhte Melphalan-Sensitivität. Eine DNA-Schädigung (z.B. durch Melphalan) resultiert in einer JNK-vermittelten Apoptose und die Hyperaktivierung von JNK1 (Abb. 23) fördert diese Apoptose-Induktion in HPK1-high-Myelomzellen (Abb. 34; Benhar u. a., 2001).

Eine deutliche Proliferationshemmung durch Inkubation mit Melphalan wurde auch in Kinase-defizienten HPK1-Myelomzellen nachgewiesen (Abb. 15). Diese Veränderung in der Thymidin-Aufnahme unterscheidete sich nicht von der Aufnahme der Melphalan-behandelten Kontrollzelllinie.

Im Gegensatz zu den HPK1-high- zeigte sich in HPK1-K46E-Myelomzellen eine reduzierte Apoptosehäufigkeit nach Inkubation mit Melphalan (Abb. 16, 2. Diagramm + Tab. 3) und keine nachweisbare Veränderung der Aktivität von JNK (Abb. 23). Vergleichend zum oben angeführten Zusammenhang zwischen JNK-Hyperaktivierung und Apoptose-Steigerung nach Melphalan-Inkubation ist keine verstärkte Apoptosehäufigkeit in K46E-Myelomzellen zu erwarten (Benhar u. a., 2001).

Eine Melphalan-Insensitivität/-Resistenz wird in der Literatur in cMyc-deregulierten Myelomzellen beschrieben. Die Deregulation von cMyc induziert nach DNA-Schädigung eine Hyperaktivierung von P38 und ASK1 (Desbiens u. a., 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte keine Deregulation von cMyc nachgewiesen werden, aber es liegt eine Hyperaktivierung von P38 α (Abb. 23) und eine Überexpression von *ask1* (Tab. 6), in den K46E-Myelomzellen im Vergleich zu HPK1-wt, vor.

Zusammenfassend lassen sich die eigenen Ergebnisse und die Literaturdaten wie folgt darstellen: die nachgewiesene P38-Hyperaktivierung verursacht nach DNA-Schädigung einen Zellzyklus(G2)-Arrest und keine Apoptose. Dadurch werden die K46E-Zellen von Melphalan-induzierter Apoptose geschützt (Abb. 34).

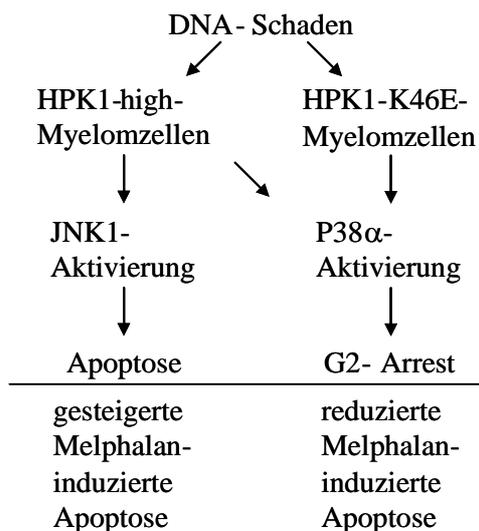


Abbildung 34: Übersichtsschema zum Einfluss der HPK1-Aktivität auf die Melphalan-induzierte Apoptose

MEK1-Inhibitor, PD98059

PD98059 verursachte in allen murinen Myelomzelllinien keine Proliferationshemmung (Abb. 15). Die Fraktion apoptierender Zellen nach PD98059-Exposition lag bei HPK1-wt und HPK1-high jeweils bei nur bis zu 10% (Abb. 16, 3. Diagramm + Tab. 4). Es ist möglich, dass die Konzentration von 50µM PD98059 nicht ausreichend für eine signifikante Apoptose-Induktion (humane Zellen zeigen i.d.R. bei 20µM eine deutliche Apoptoserate) oder der MEK/MAPK-Signalweg in murinen MPC-11-Myelomzellen nur ein Signalweg mit geringerer Relevanz in der Signalhierarchie ist. Das zeigte sich auch an dem nicht nachweisbaren Effekt der hyperaktivierten MEK1/2 nach Überexpression von Kinase-aktiver HPK1 (Abb. 23). Bei Hyperaktivierung dieser MAP2 Kinasen sollte erwartungsgemäß eine Inhibition mit PD98059 eine reduzierte Apoptose-Induktion bei HPK1-high-Zellen verursachen und dadurch einen Unterschied in der Apoptosehäufigkeit zwischen HPK1-high und HPK1-wt aufzeigen.

In HPK1-K46E-Myelomzellen scheint die Hemmung von MEK1/2 sogar eine Inhibition der Apoptose zu verursachen (Abb. 16, 3. Diagramm + Tab. 4). Die unbehandelten K46E-Zellen zeigten keine veränderte Aktivität von MEK1/2, aber eine Hypoaktivierung von ERK1 (Abb. 23) und zusammen mit einer Hemmung der Apoptose nach PD98059-Zugabe ist es zu vermuten, dass in murinen K46E-Myelomzellen die Hemmung des MEK1/2 ein Überlebenssignal darstellt.

Bortezomib

Bortezomib ist ein Proteasom-Inhibitor (Hemmung des 26S-Proteasoms) und beeinflusst das Überleben maligner Zellen durch Hemmung der Proteinubiquitinierung und -degradation.

Die Inkubation der drei transfizierten, murinen Zelllinien mit diesem Proteasom-Inhibitor verursachte keine Proliferationshemmung (Abb. 15) und die Intensität der Apoptose-Induktion war bei allen untersuchten Zelllinien ähnlich (Abb. 16, unteres Diagramm + Tab. 5). Das legt nahe, dass die Überexpression von Kinase-aktivem bzw. -defizienten HPK1 keinen Einfluss auf posttranskriptionelle Ubiquitinierung und Proteindegradation im Multiplen Myelom hat.

4.4 HPK1 und Tumorwachstum *in vivo*

Zur Charakterisierung von HPK1 als Kandidatengen für die Progression des Multiplen Myeloms wurde das Wachstum subkutaner Tumoren durch Applikation von Myelomzellsuspensionen in weiblichen Mäusen mit BALB/c-Hintergrund (syngen zu den Myelomzelllinien) verfolgt.

Die Tumoren der HPK1-high-Zellsuspension zeigten bereits nach der Hälfte des Messzeitraumes ein erhöhtes Tumolvolumen und am Versuchsende konnte das doppelte Volumen bei HPK1-high-Tumoren im Vergleich zu HPK1-wt-Kontrolltumoren ermittelt werden (Abb. 18). Mittels Durchflusszytometrie und Western-Blot konnte eine HPK1-HA-Fusionsprotein-Überexpression nachgewiesen werden (Abb. 20 + 21). In der Literatur ist kein vergleichbares Beispiel von HPK1-Überexpression in hämatologischen Tumorentitäten beschrieben.

Eine Ursache für das unterschiedliche Tumorwachstum von HPK1-high- und HPK1-wt-Zellen könnte in einer veränderten Tumor-Immunantwort begründet sein. Eine weitere Untersuchung zur Kontrolle dieser Annahme z.B. durch Messung der T-Zell-Infiltration der Tumoren steht derzeit noch aus.

Die Untersuchung der K46E-Myelomtransfektante zeigte kein verändertes Tumorwachstum gegenüber HPK1-wt (Abb. 18). Am Endpunkt einer jeden *in vivo*-Untersuchung wurden die Tumoren ebenfalls mittels Durchflusszytometrie und Western-Blot analysiert. Dabei konnte in der K46E-Versuchsgruppe ein Verlust des HPK1-HA-Fusionsproteins nachgewiesen werden, womit möglicherweise eine ähnliche Tumorentwicklung im Vergleich zu den HPK1-wt-Myelomtumoren erklärbar ist (Abb. 20 + 21). Die Ursache für dieses Phänomen bleibt weiter zu untersuchen.

Eine solche deutliche Reduzierung der Fusionsprotein-tragenden Zellen konnte in *in vitro*-Vorversuchen zur Stabilität der Transfektion ohne Selektionsdruck nicht ermittelt werden (Abb. 17). Falls Kinase-aktives HPK1 eine T-Zell-vermittelte Anti-Tumor-Antwort unterdrückt (s.o.), könnte eine Kinase-defiziente HPK1-Form möglicherweise die Anti-Tumor-Immunantwort fördern. Dadurch würden *in vivo* die HPK1-K46E-Myelomzellen selektioniert werden (Negativselektion). Die nicht HPK1-K46E-tragenden Zellen werden nicht attackiert und könnten einen Tumor bilden. Damit ließe sich das HPK1-wt-ähnliche Tumorwachstum der applizierten HPK1-K46E-Myelomzellsuspension erklären.

Weil kein eindeutiger Nachweis dieser Hypothese erbracht werden konnte, besteht auch hier die Notwendigkeit weiterer Untersuchungen zur Erklärung der Unterschiede zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Ergebnissen.

4.5 HPK1-knock-down: Einfluss auf das Multiple Myelom

Entsprechend der Beobachtung von Tiedemann und Mitarbeiter zum letalen Phänotyp von HPK1-knock-down-Myelomzellen (Tiedemann u. a., 2010) wurde hier der Einfluss von siRNA-vermittelten HPK1-knock-down in einer murinen Zelllinie untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Transfektions- und knock-down-Effizienz bis zu einer Dauer von 72h erreicht werden (Abb. 27).

Ein Effekt auf Proliferation, basale sowie induzierte Apoptose konnte in den HPK1-knock-down-Myelomzellen allerdings nicht nachgewiesen werden (Abb. 28 – 30). Auch die ergänzenden Proteom- und Transkriptom-Analysen ergaben keine richtungsweisenden Resultate einer differenziellen Expression und Regulation in Myelomzellen durch selektive Reduktion von HPK1 (Abb. 32 + vgl. Kap. 3.3.4). Auf *in vivo*-Untersuchungen wurde aufgrund dieser *in vitro*-Ergebnisse verzichtet. Das Ausbleiben signifikanter Effekte durch den HPK1-knock-down hängt möglicherweise mit einer für eine umfangreiche zellbiologische bzw. molekularbiochemische Veränderung der Myelomzellen nicht ausreichenden Transfektion-Inkubation von 24h zusammen (vgl. Kap. 5.2.12.2).

Derzeit wird in der Arbeitsgruppe versucht mittels der short hairpin(sh)RNA-Technologie eine stabile Transfektante herzustellen, um anschließend die gezeigten Daten zu bestätigen, zu ergänzen oder zu korrigieren.

4.6 HPK1: Einfluss auf die zelluläre Differenzierung

Neben der aufgezeigten Funktion als Regulator von Proliferation/Replikation und Apoptose im Multiplen Myelom kann P21 als Marker für die Differenzierung im hämatologischen System angesehen werden. Außerdem fördert P21 die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen (Mantel u. a., 1996). Während der Myelopoese konnten zwei Expressionsmaxima von P21 identifiziert werden. Das erste Maximum wurde in ruhenden hämatopoetischen Stammzellen („quiescent HSC“, Abb. 35) nachgewiesen. Danach reduziert sich die P21-Expression bis zur Differenzierung von frühen Progenitor-Zellen. Anschließend steigert sie sich wieder, parallel zur Proliferationsrate und Differenzierungsgrad, auf ein zweites Maximum bei terminal-differenzierten Zellen (Furukawa u. a., 2000; Steinman, 2002). Nach der terminalen Differenzierung sinkt seine Expression wieder (Abb. 35; Yaroslavskiy u. a., 1999).

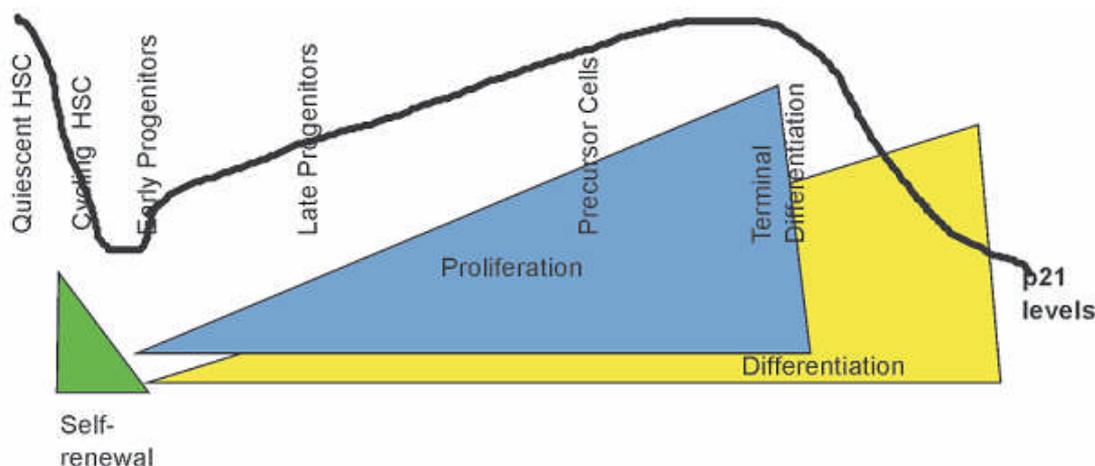


Abbildung 35: P21-Expression im Verlauf der Myeloese; Expressionslevel von P21 in Abhängigkeit von Zelltyp, Proliferations- und Differenzierungspotential (modifiziert nach Steinman, 2002)

GADD45 γ weist, abgesehen von der aufgezeigten Regulatorfunktion, die Eigenschaft als Tumorrepressor auf (Ying u. a., 2005). Laut Untersuchungen von Cretu ist eine Herunterregulation von *gadd45 γ* nach Hypermethylierung des Promotors mit dem Auftreten eines kanzerogenen Phänotypes (z.B. in hepatozellulären Karzinomen, anaplastischen Schilddrüsentumoren und Non-Hodgkin-Lymphomen, wie dem Multiplen Myelom) assoziiert. Im Gegensatz dazu konnte in epithelialen Zelllinien, Normalgeweben sowie in mononukleären Zellen des peripheren Blutes keine Herunterregulation nachgewiesen werden (Cretu u. a., 2009). Eine Überexpression von GADD45 γ in embryonalen Karzinomzellen führte zur Überexpression von Differenzierungs- und Zellzyklus-Genen (Jung u. a., 2010).

Die Überexpression von Kinase-aktivem HPK1 verursachte im Multiplen Myelom eine erhöhte Expression von *p21* und *gadd45 γ* . Für HPK1 ist in der Literatur auch ein eventueller Einfluss auf die Differenzierung von hämatologischen Zellen gezeigt. Untersuchungen von Hu und Mitarbeitern wiesen in hämatopoetischen Stammzellen (HSC) ein hochexprimiertes HPK1 nach. Des Weiteren wird in der 1996 veröffentlichten Arbeit eine Verringerung der HPK1-Expression während der Differenzierung von HSC zu verschiedenen Effektorzellen beschrieben (Hu u. a., 1996).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine reduzierte HPK1-Expression in Myelomzellen gegenüber B-Lymphozyten gezeigt werden (Abb. 10). Außerdem zeigten therapierte Myelome und B-CLL-Zellen eine HPK1-Expressionsstärke zwischen denen von B-Lymphozyten und therapienaiven CD138⁺-Myelomzellen (Abb. 10A).

Ein hypothetisches Modell zum Zusammenhang zwischen HPK1-Expression und Zelldifferenzierung während der Hämatopoese ist in Abbildung 36 dargestellt.

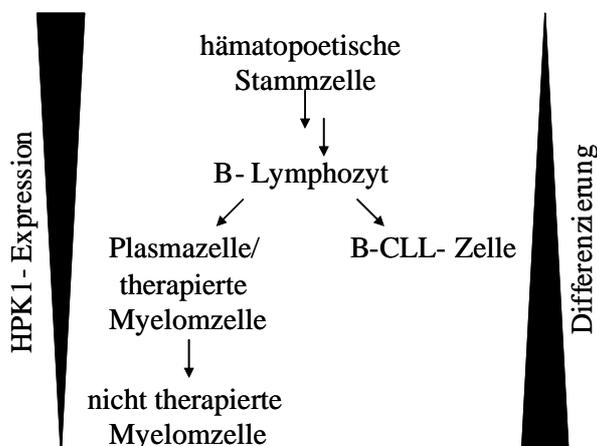


Abbildung 36: Schema des hypothetischen Zusammenhangs zwischen HPK1-Expression und der Zelldifferenzierung während der Hämatopoese (→ = Differenzierungsschritte)

Ein unmittelbarer Einfluss von HPK1 auf die Differenzierung von HSCs wurde durch eine Arbeit von Schmittwolf nicht bestätigt. In ihrer Arbeit wurde keine Veränderung der *in vivo* Reproduktionsaktivität und Linienverteilung von HSC nach HPK1-Überexpression nachgewiesen. Dagegen scheint die verwendete Kinase-defiziente Variante der HPK1-Überexpression einen negativen Effekt auf das Langzeitpopulationsverhalten zu zeigen (Schmittwolf 2004, Dissertation; urn:nbn:de:bvb:20-opus-8812).

Ein weiterer Anhaltspunkt für einen geringeren Differenzierungsgrad der Transfektanten gegenüber der HPK1-wt-Myelomzelllinie ergibt sich aus Beobachtungen eigener Untersuchungen. HPK1-high-Zellen zeigten eine geringere Sensitivität gegenüber Dexamethason-Behandlung im Vergleich zu den „Leervektor“-Zellen (Abb. 11 + Tab. 7). Eine ähnliche Tendenz kann man bei dem Vergleich von B-Lymphozyten und Myelomzellen erkennen (nicht publizierte Daten der Arbeitsgruppe). Vermutlich ist durch die Überexpression von HPK1 der Differenzierungsgrad der Myelomzellen verändert worden.

Zusammenfassend kann kein direkter Einfluss der HPK1-Expression auf die Differenzierung von hämatopoetischen Zellen gezeigt werden. Eine Veränderung der HPK1-Expression während der Differenzierung von HSC zum B-Lymphozyten und weiter zu malignen Myelomzellen, sowie ein potenzieller Einfluss von HPK1 auf die variable P21-Expression (Abb. 35) ist gut denkbar und sollte genauer untersucht werden.

Abschließend ist festzustellen, dass eine Reexpression von HPK1 keinen eindeutigen Einfluss auf die Malignität/Progression von Myelomzellen aufzeigt. Somit kann die anfangs beschriebene Tumorsuppressor-Funktion von HPK1 weder bestätigt noch widerlegt werden.

Die reduzierte basale Expression von HPK1 in nicht-therapierten gegenüber therapierten Myelomen bzw. B-Lymphozyten (PBBL) spricht für eine Tumorsuppressorgen-Funktion, andererseits zeigte eine gesteigerte Expression ein höheres Tumorstadium *in vivo* (entsprechend einer onkogenen Rolle von HPK1 beim Multiplen Myelom). Die reduzierte Dexamethason-Sensitivität könnte ein Anzeichen für einen geringeren Differenzierungsgrad der untersuchten Myelomzellen (entsprechend der reduzierten Dexamethason-induzierten Apoptose bei B-Lymphozyten) sein (weder Suppressor- noch Onkogen-Funktion) oder eine verminderte Sensitivität gegenüber induzierter Apoptose aufzeigen (onkogene Wirkung). Die herabgesetzte Proliferation von HPK1-high-Myelomzellen impliziert eine Reduzierung des hyperproliferativen Phänotypes von Tumoren (Suppressor-Eigenschaft) oder einen Resistenzmechanismus durch Zellzyklusarrest (Schutz gegen Chemotherapeutika durch P21-Überexpression; onkogener Effekt).

Eine Untersuchung von stabilen HPK1-knock-down-Transfektanten könnten eine eindeutigere Erklärung zum Einfluss von HPK1 auf die Progression des Multiplen Myeloms und somit einen Ansatz für eine mögliche, HPK1-selektive Anti-Tumor-Strategie liefern.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien

Bortezomib (Velcade®)	Millennium Pharmaceuticals, Inc.
Dexamethason	Sigma Aldrich
PD98059	Calbiochem
Melphalan-HCl (Alkeran®)	Glaxo Smith Kline
³ [H]-Thymidin	Amersham-GE Healthcare
Printed Filtermat A	Wallac, Perkin Elmer
MultiLex™ A Melt-on Scintillator Sheets	Wallac, Perkin Elmer
Sample Bag for MicroBeta® Trilux	Wallac, Perkin Elmer
7-Aminoactinomycin (7-AAD)	BD Pharmingen
Moloney Murine Leukemia Virus	Amersham-GE Healthcare und
Reverse Transkriptase (M-MLV RT)	USB-Affymetrix
nukleasefreies Wasser	Merck und 5Prime
RNase Inhibitor	Amersham-GE Healthcare und USB-
	Affymetrix
desoxyNukleotide (dNTPs)	Invitrogen
30% Acryl-/Bisacrylamid-Lösung	BioRad
Precision Plus Protein dual color standards (Längenmarker)	BioRad
Immobilon Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Millipore
3MM-Whatmanpapier™	Whatman
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz
ECL Röntgenfilme	Amersham-GE Healthcare
HiPerFect Transfektions Reagenz	Qiagen
3,7% gepuffertes Formaldehyd	Fischar

Tabelle 11: Verwendete Enzyme und Kits

Kit	Verwendung	Hersteller
QIAamp® RNA Blood Mini Kit & RNeasy® Mini Kit	RNA-Extraktion	Qiagen
TaqMan® Ribosomal RNA Control Reagents	qRT-PCR	Applied Biosystems
DyNAmo™ Flash Probe qPCR Kit	qRT-PCR	Finnzymes-Biozym
„Z-Competent <i>E. coli</i> Transformation“-Kit	Herstellung kompetenter Zellen	ZymoResearch
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Plasmid-Präparation	Qiagen
Proteome Profiler™ Human Phospho-MAPK- & Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase-Array-Kit	phospho-spezifische Proteinanalyse	R&D Systems

Tabelle 12: Verwendete Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Zellkulturplatten (Nunc TM Δ Surface)	Nunc
Zellkulturflaschen (verschiedene Größen)	Greiner Bio-One
LS+-MidiMACS®-Trennsäule	Miltenyi Biotec
MidiMACS®-Separators	Miltenyi Biotec
Pre-Separation Filter	Miltenyi Biotec
Neubauer „Improved“ Zählkammer	Carl Roth
1450 MicroBeta [®] Trilux	Wallac-Perkin Elmer
FACS Calibur inkl. CellQuest Pro Software	BD Bioscience
Biophotometer	Eppendorf
7500 Fast Real-Time PCR System inkl. Software	Applied Biosystems
MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode	Applied Biosystems
MicroAmp® Optical Adhesive Film	Applied Biosystems
Trans-Blot® SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	BioRad
Mini Protean Cell (Gelelektrophoresekammern) mit Glas- und Plastikzubehör	BioRad
GenePulser	BioRad
0,4cm Elektroporationsküvetten	BioRad
Gel Doc 2000-System inkl. Quantity-One Software	BioRad
Schiebelehre	

Tabelle 13: Verwendete Antikörper (unkonjugiert; phosphorylierte Aminosäuren gemäß verwendeten R&D Arrays, siehe Anhang)

Antikörpername (anti-):	Wirt:	Spezifität: ^a	verwendete Verdünnung:	Herkunft:
Actin (Monoclonal β-)	M	Dog, Gp, Hi, Cat, Pig, Carp, C, S, Rb, B, H, M, R	1:5000	Sigma Aldrich
phospho-p38 MAPK (T180/Y182)	Rb	H, M, R	1:2000	R&D Systems
HA-Tag (6E2)	M	All	1:1000	Cell Signaling
HPK1	Rb	H, M	1:1000	Cell Signaling
MEK Kinase-1 (C-22): sc-252	Rb		1:500	Santa Cruz
Phospho-Akt (Ser473)	Rb	H, M, R, Hm, C	1:1000	Cell Signaling
Phospho-c-Raf (Ser338)	Rb		1:1000	Cell Signaling
Phospho-GSK-3 (Ser21/9)	Rb	H, M, R, Mk, Z	1:1000	Cell Signaling
Phospho-MAPKAPK-2 (Thr334)	Rb	H, M, R, Mk	1:1000	Cell Signaling
Phospho-MEK 1/2 (Ser217/221)	Rb		1:1000	Cell Signaling
Phospho-MSK1 (Thr581)	Rb		1:1000	Cell Signaling
Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204)	Rb	H, M, R, Hm, C, Z	1:1000	Cell Signaling
Phospho-p70 S6 (Thr421/Ser424)	Rb	H, M, R, Mk	1:1000	Cell Signaling
Phospho-p90RSK (Ser380)	Rb		1:1000	Cell Signaling
Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	M	H, M, R, Hm, Sc	1.2000	Cell Signaling
Phospho-TAK1 (Ser412)	Rb	H, M, R	1:1000	Cell Signaling

^a H = Mensch, M = Maus, R = Ratte, Hm = Hamster, C = Huhn, Mk = Affe, Z = Zebrafisch, Gp = Meerschwein, Hi = Blutegel, S = Schaf, Rb = Kaninchen, B = Rind, Sc = *Saccharomyces cerevisiae*

Antikörper/Protein mit konjugiertem Fluorochrom:	
Annexin-V-FITC (1µl pro Test)	BD Pharmingen
HA-Tag (Klon HA-7) mit FITC konjugiert (1µg/ml pro Test)	Sigma Aldrich
APC Rat anti-Mouse CD138	BD Pharmingen

5.1.2 Lösungen und Puffer

Allgemeine Lösungen und Puffer:

RIPA Lyse-Puffer	150mM NaCl 1% NP-40 0,5% DOC 0,1% SDS 50mM Tris-Base 4% Roche Complete Inhibitor 4% NaF-Lösung 4% Na ₃ VO ₄ -Lösung
10x Elektrophorese-Laufpuffer (pH 8,6):	72g Glycin 15g Tris-Base 5g SDS ad 500ml aqua bidest
6x Proteinprobenpuffer (nach Laemmli):	1ml 1M Tris-Base (pH 6,8; eingestellt mit HCl) 2ml 20% SDS 20mg Bromphenolblau 3ml Glycerin 500µl β-Mercaptoethanol ad 10ml aqua bidest
10% APS:	1g Ammoniumpersulfat ad 10ml aqua bidest
Tris-Puffer (pH 8,8):	18,17g Tris-Base (pH 8,8; eingestellt mit HCl) 4ml 10% SDS ad 100ml aqua bidest
Tris-Puffer (pH 6,8):	6,06g Tris-Base (pH 6,8; eingestellt mit HCl) ad 100ml aqua bidest
Polyacrylamid-Gel:	
10%iges Trenngel (pH 8,8):	1,9ml aqua bidest 1,7ml 30% Acryl-/Bisacrylamid-Lösung 1,3ml Lower-Tris (pH 8,8) 50µl 10% SDS-Lösung 50µl 10% Ammoniumpersulfate 2µl TEMED
5%iges Sammelgel (pH 6,8):	2,78ml aqua bidest 0,87ml 30% Acryl-/Bisacrylamid-Lösung 1,25ml Upper-Tris (pH 6,8) 50µl 10% SDS-Lösung 50µl 10% Ammoniumpersulfate 3µl TEMED

1x Transferpuffer:	39mM Glycin 48mM Tris-Base 20% Ethanol ad 2l aqua bidest
T-PBS:	500ml D-PBS 250µl Tween-20
Stripping-Puffer:	100mM Glycerin (pH 2,9)
0,5M EDTA pH 8,0:	186,1g EDTA ad 1l aqua bidest mit NaOH-Pellets auf pH 8,0 einstellen
MACS-Puffer:	485,5ml PBS 12,5ml 20% HSA 2ml 0,5M EDTA
10x Annexin-V-Bindungspuffer:	0,1M HEPES (pH 7,4) 1,4M NaCl 25mM CaCl ₂ steril filtriert
Zellkulturmedien und -lösungen: (alle Medienbestandteile stammen von PAA, Pasching, Österreich)	
alpha-MEM-complete:	alpha-MEM 10% FCS 2mM L-Glutamin 100µg/ml Penicillin-Streptomycin
RPMI-1640-complete:	RPMI-1640 10% FCS 2mM L-Glutamin 100µg/ml Penicillin-Streptomycin
RPMI-1640-murine:	RPMI-1640 10% FCS 2mM L-Glutamin 100µg/ml Penicillin-Streptomycin 2mM Nartiumpyruvat
RPMI-1640-transfektant:	RPMI-1640 10% FCS 2mM L-Glutamin 100µg/ml Penicillin-Streptomycin 2mM Nartiumpyruvat 500µg/ml G418-Sulfat
Versen'sche Lösung (pH 7,2):	10mM EDTA 13,7mM NaCl 2,6mM KCl 8,1mM NaH ₂ PO ₄ 1,4mM KH ₂ PO ₄ 1,1mM Glukose steril filtriert

Tabelle 14: Verwendete Primer und Sonden

Die Primer wurden bei TIB MolBiol (Berlin, Deutschland) und die Sonden bei Eurogentec (Seraing, Belgien) synthetisiert und jeweils mit einer Konzentration von 250nM (Primer) bzw. 500nM (Sonde) in den Reaktionen verwendet.

Oligoname	Sequenz in 5'-3'-Richtung
mHPK1-Primer for	-TggCTTACCATggCAGTTACC-
mHPK1-Primer rev	-ACCggCTCCACAGaATTCC-
mHPK1-Sonde	-6-FAM-CTggCTgCAGAAgCTgTggATCTgC-TAMRA-
HPK1-Primer for	-AAATTCCTgCTTgTCCggC-
HPK1-Primer rev	-AgCgCgAACACggACAg-
HPK1-Sonde	-6-FAM-TgCTgTTCCCACTgCCgACgC-TAMRA-

Tabelle 15: Myelomzelllinien

Zelllinie	Herkunft
MPC-11	ATCC, Rockville, Maryland, USA
RPMI-8226	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
U266	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
NCI-H929	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
OPM-2	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
JJN-3	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
L-363	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
KMS-11	T.Otsuki, Kawasaki Medical School, Okayama, Japan
KMS-18	T.Otsuki, Kawasaki Medical School, Okayama, Japan
ANBL-6	M. Chatterjee, MDC, Berlin-Buch, Deutschland
MM.1S	N. L. Krett & R. H. Lurie, Comprehensive Cancer Center, Chicago, Illinois, USA
MM.1R	N. L. Krett & R. H. Lurie, Comprehensive Cancer Center, Chicago, Illinois, USA
OCI-MY5	L. Bergsagel, Mayo Clinic, Scottsdale, Arizona, USA
UTMC-2	L. Bergsagel, Mayo Clinic, Scottsdale, Arizona, USA

prokaryotische Zellen:

DH5 α (K12 Derivat von *Escherichia coli*)

Genotyp: *fhuA2* Δ (*argF-lacZ*) *U169 phoA glnV44* Φ 80 Δ (*lacZ*) *M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*

MicroBeads:

CD138 (Syndecan-1) MicroBeads

Miltenyi Biotec

CD19 MicroBeads

Miltenyi Biotec

Versuchstiere:

Mausstamm BALB/c

Plasmide: (pcDEF3.1-Derivate/ -Leervektor)

pcDEF3.1-mHPK1:HA (kodiert für Fusionsprotein von murinem HPK1 und HA-Tag; dankend von Prof. Kiefer, MPI-Münster erhalten) (Liou u. a., 2000)

pcDEF3.1-mHPK1(K46E):HA (kodiert für Fusionsprotein von murinem Kinase-defizientem HPK1 und HA-Tag; HPK1 mit Aminosäureaustausch von Lysin-46 in Glutaminsäure verändert; dankend von Prof. Kiefer, MPI-Münster erhalten) (Liou u. a., 2000)

siRNA:

Die verwendeten siRNAs und die Negativ-Kontrolle wurden bei der Firma Qiagen bezogen (Katalog-Nummer: SI01300271, SI01300278, SI01300292, AllStar Negative Control).

5.2 Methoden

5.2.1 Zellkulturarbeiten

Sämtliche Arbeiten wurden unter einer Laborwerkbank mit Laminarflow-Technologie durchgeführt.

5.2.1.1 Haltung eukaryotischer Zelllinien

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in geeigneten Zellkulturgefäßen bei 37°C und 5% CO₂ im Feuchtbrutschrank (90% Luftfeuchtigkeit). Die Kulturen wurden zweimal in der Woche in einem angemessenen Verhältnis passagiert und mit Zellkulturmedium auf das entsprechende Volumen aufgefüllt.

Die murine Zelllinie MPC-11 wurde mit dem Kulturmedium RPMI-1640-murine, die humanen Myelomzelllinien mit RPMI-1640-complete und die transfizierten MPC-11-Zelllinien mit RPMI-1640-transfektant gehalten.

Zur Lebendbestimmung während der Kulturhaltung diente die Einfärbung der Zellen mit Trypanblau. Lebende Zellen mit intakter Zellmembran sind impermeabel für diesen Stoff, während bei toten Zellen das Typanblau in die Zelle diffundiert und das Zellplasma blau anfärbt. Unter dem Mikroskop kann dann das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen ermittelt werden.

5.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zelllinien

Die Kryokonservierung der Zelllinien erfolgte in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff. Dazu wurde die Zellsuspension zu gleichen Teilen in Einfriermedium, bestehend aus 66% FCS und 33% DMSO, aufgenommen. Die Aliquots wurden langsam in einer Einfrierbox (mit Isopropanol) bei -80°C eingefroren und dann in flüssigen Stickstoff überführt. Diese tiefgefrorenen Kulturen sind mehrere Jahre haltbar.

Für die Rekultivierung wurden die Zellen zügig aufgetaut, in 10 - 15ml vorgewärmten Kulturmedium überführt und durch Zentrifugation pelletiert. Der DMSO-haltige Überstand wurde entfernt, die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen und in geeigneten Zellkulturgefäßen kultiviert.

Diese Vorgehensweise entspricht dem empfohlenen Ablauf der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ).

5.2.2 Dichtegradienten-Zentrifugation von Zellkulturen und primären Knochenmarkspiraten

In ein 50ml-Zentrifugenröhrchen wurde 15ml BIOCOLL Separation Solution (Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland) vorgelegt und vorsichtig mit der Zellkultur- bzw. Knochenmarkszellsuspension (1:1 mit PBS verdünnt) überschichtet. Das Röhrchen wurde 15 Minuten bei 1250xg (ohne Bremse, 15°C) zentrifugiert.

Die Interphase oberhalb der BIOCOLL Separation Solution, die die mononukleären lebenden Zellen enthält, wurde mit einer Transferpipette abgenommen. Die lebenden Zellen wurden mit bis zu 50ml PBS gewaschen. Die Zellkonzentration wurde bestimmt und die Zellen in geeigneter Konzentration in Zellkulturgefäßen kultiviert.

5.2.3 Bestimmung der Zellzahl (Zählkammer Neubauer „Improved“)

Ein Aliquot der Zellsuspension wurde 1 : 9 (Verdünnungsfaktor = 10) mit Trypanblau verdünnt. Die Zählkammer wurde mit 10µl dieser Verdünnung befüllt. Vier große Eckquadrate des Zählgitters wurden ausgezählt (nur vitale Zellen; ermittelte Zahl = n) und die Konzentration (Zellzahl pro ml) nach folgender Formel berechnet:

$$n/4 \times 10 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10^4 = \text{Zellzahl pro ml}$$

5.2.4 Inhibitionsversuche

Für die Inhibitionsversuche mit den verschiedenen Myelomzelllinien wurde das RPMI-1640-Kulturmedium mit 10% FCS durch RPMI-1640-Serummangel-Medium (0,5% FCS) ersetzt. Nach der Einstellung der benötigten Zellzahl pro ml und dem Ausplattieren in die entsprechenden Kulturgefäße (24- bzw. 96-Lochplatte) wurden die Zellen, für die Äquilibration, für 2h bei 37°C und 5% CO₂ im Feuchtbrutschrank (90% Luftfeuchtigkeit) kultiviert.

Als Inhibitoren für die Untersuchungen zur Proliferation und Apoptose von Myelomzelllinien wurden Dexamethason, Melphalan, Bortezomib und der spezifische MEK1-Inhibitor PD98059 eingesetzt (vgl. Kap. 4.2.6 und 4.2.7.2). Die Substanzen wurden gemäß den Herstellerangaben gelöst. Das entsprechende Lösungsmittel wurde mit einer Konzentration von 0,1% (DMSO) oder 1% (Ethanol) als Substanz-„Null“-Wert (w/o) untersucht (bei Melphalan und Bortezomib wurde PBS als Lösungsmittel verwendet).

5.2.5 Isolierung von CD138⁺-MM-Zellen und CD19⁺-B-Lymphozyten aus primären Knochenmark („magnetic bead activated cell sorting“, MACS)

Die CD138⁺-Zellen wurden mittels eines immunomagnetischen Selektionsverfahrens aus den mononukleären Zellen isoliert. CD138, Syndecan-1, wird von physiologischen und malignen Plasmazellen exprimiert, nicht dagegen von z.B. zirkulierenden B-Zellen, T-Zellen oder Monozyten. Somit stellt es einen adäquaten Marker für die Isolierung der Plasmazellfraktion dar. Zur Separation der CD138⁺-Zellen wurde mit CD138-Microbeads und dem MidiMACS[®]-Separators gearbeitet. Das Selektionsprinzip basiert auf der immunologischen Antigen-Antikörper-Bindung zwischen den Beadgekoppelten CD138-Antikörpern und den CD138 (Antigen)-tragenden Zellen. Die CD138⁺-Zellen werden durch das magnetische Feld des MidiMACS[®]-Separators innerhalb der LS⁺-MidiMACS[®]-Trennsäule von den CD138⁻-Zellen separiert. Zur Aufreinigung der CD138⁺-Zellen wurde ein MACS-Puffer verwendet. Die mononukleären Zellen wurden nach dem letzten Waschschriff, je nach Größe des Zellpellets, in 1 - 5ml MACS- Puffer aufgenommen und anschließend ihre Zellzahl ermittelt. Die Positiv-Selektion von CD138-Zellen erfolgte nach den Herstellerangaben für die Plasmazell-Isolation (CD138 (Syndecan-1) MicroBeads). Die Zellen der Positiv- und Negativfraktion wurden gewaschen, gezählt und der Zellzahl entsprechend aliquotiert. Die Negativfraktion wurde einer weiteren, analogen CD19-Separation mittels CD19-Microbeads unterzogen. Die CD138⁺- und CD19⁺-Zellfraktion wurden anschließend im entsprechenden Lysepuffer für die RNA-Isolation bzw. Protein-Extraktion bei -80°C eingefroren und bis zur Verwendung gelagert.

5.2.6 ³[H]-Thymidin-Proliferations-Assay

Die murinen Myelomzelllinien wurden auf einer 96-Lochplatte kultiviert (5x10⁴ pro Vertiefung) und vor Beginn des Experimentes zwei Stunden unter Serumangel (0,5% FCS)-Bedingungen kultiviert. Zur Inhibition der Proliferation wurden die Zellen mit 10µM Dexamethason, 10µM Melphalan, 2nM Bortezomib und 20µM PD98059 für 48h inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen unter Zusatz von 25µl radioaktiv markierten ³[H]-Thymidin (0,625µCi pro Vertiefung) für weitere 8h kultiviert. Das im Rahmen einer Proliferation der Myelomzellen eingebaute radioaktiv markierte ³[H]-Thymidin diente bei dessen Quantifizierung im späteren Verlauf als Marker für die Rekombination der DNA der untersuchten Zellkulturen.

Nach der Inkubation mit dem ³[H]-Thymidin wurden die 96 Proben mittels Vakuum-Pumpe aus der 96-Lochplatte auf Mikrofilter-Matten (Filtermat A) transferiert. Danach wurde die Mikrofilter-Matte getrocknet, mit einer Wachsschicht überzogen und eingeschweißt (MeltiLexTM A Melt-on Scintillator Sheets), sodass im Anschluss ihre radioaktive Strahlung (counts per minute; cpm) mit einem Wallac 1450 MicroBeta Trilux gemessen werden konnte. Jeder Messpunkt wurde als Triplikon analysiert.

5.2.7 Durchflusszytometrische Analysen

5.2.7.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Mit der Durchflusszytometrie können Zellen gleichzeitig hinsichtlich ihrer relativen Zellgröße, ihrer Granularität und der Expression von verschiedenen Antigenen untersucht werden.

Bei der Messung werden die suspendierten Zellen samt Trägerflüssigkeit vom Durchflusszytometer aus dem Proberöhrchen durch eine Messkapillare gesaugt und beschleunigt, wodurch ein laminarer Strom aus einzelnen, hintereinander gereihten Zellen entsteht. In diesen Flüssigkeitsstrom strahlt am Analysepunkt ein Laserstrahl definierter Wellenlänge ein, der durch die Zellen abgelenkt wird. Das Ausmaß der Lichtstreuung wird durch Photodetektoren erfasst. Diese messen zum einen den Anteil des parallel zum eingestrahlten Laser gestreuten Lichts, das sogenannte Vorwärtsstreulicht („Forward Light Scatter“, FSC). Es dient als Maß für die Zellgröße. Zum anderen werden rechtwinklig abgelenkte Lichtstrahlen erfasst, das sogenannte Seitwärtsstreulicht („Side Light Scatter“, SSC), das die Morphologie und Granularität der Zelle widerspiegelt. Insgesamt gilt: das Ausmaß der Lichtstreuung nimmt mit steigender Zellgröße bzw. Granularität zu. Die durch die Photodetektoren gesammelten Informationen werden in elektronische Signale umgewandelt, verstärkt und digitalisiert. Sie können daraufhin am zugehörigen Computer in Form unterschiedlicher Grafiken aufgerufen werden (Abb. 37). Oberflächenmoleküle der Zellen können mit Fluorochrom-konjugierten, monoklonalen Antikörpern markiert werden. Durch den Laser werden die Fluorochrome angeregt und emittieren Licht bestimmter Wellenlänge. Photodetektoren messen die Wellenlänge und die Intensität des ausgestrahlten Lichts, die sogenannte Fluoreszenzintensität. Sie entspricht der Anzahl der gebundenen Antikörper und damit der Höhe der Antigenexpression.

Bei dieser Arbeit wurden die folgenden fluoreszierenden Substanzen verwendet: Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und 7-Aminoactinomycin (7-AAD), deren Emissionsmaxima bei 518nm und 650nm liegen. Da die Fluoreszenzkanäle des Durchflusszytometers Photodetektoren mit größter Empfindlichkeit für unterschiedliche Wellenlängen besitzen, können bei geeigneter Kombination der fluoreszierenden Substanzen die verschiedenen Emissionswellenlängen unterschieden und die jeweilige Fluoreszenzintensitäten getrennt voneinander bestimmt werden.

5.2.7.2 Annexin V (FITC) /7-AAD-Apoptose-Assay

Die Apoptose wurde ursprünglich als eine besondere Form des Zelltods mit charakteristischen morphologischen Veränderungen definiert. Vitale Zellen zeichnen sich durch eine charakteristische Asymmetrie ihrer Zellmembran aus. Kennzeichnend ist das Vorkommen von Phosphatidylserin (PS) auf der Innenseite der Membran. Der programmierte Zelltod wird durch einen Verlust der Membranasymmetrie eingeleitet, wobei PS auf die Außenseite verschoben wird („Flip-Flop“ der Membranlipide).

Das Protein Annexin V ist mit dem Fluorochrom FITC konjugiert und ist in der Lage nach dem „Flip-Flop“ der Zellmembran an das PS zu binden. Bricht die Membranintegrität zusammen, so kann 7-AAD in die Zelle diffundieren und sich als DNA-Interkalator an die DNA der Zelle anlagern.

Während FITC nach optischer Laseranregung grün fluoresziert, ist 7-AAD ein rot fluoreszierender Farbstoff.

Bei einer kombinierten Anwendung beider Farbstoffe können verschiedene Zellpopulation identifiziert werden:

- vitale Zellen: Annexin V-FITC^{low}/7-AAD^{low} Markierung
- früh apoptotische Zellen: Annexin V-FITC^{high}/7-AAD^{low} Markierung
- spät apoptotische/nekrotische Zellen: Annexin V-FITC^{high}/7-AAD^{high} Markierung

Die murinen Myelomzelllinien wurden auf einer 24-Lochplatte kultiviert (3x10⁵ pro Vertiefung) und vor Beginn des Experimentes zwei Stunden unter Serummangel(0,5% FCS)-Bedingungen kultiviert.

Im durchgeführten Apoptose-Assay wurden die zu untersuchenden Myelomzellen nach der Zugabe verschiedener Apoptose-induzierender Substanzen für 48h inkubiert.

Die verwendeten Konzentrationen der verschiedenen Substanzen sind in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16: Übersicht der verwendeten Konzentrationen verschiedener inhibierender Substanzen

Substanz (Wirkstoffnahme)	Konzentrationen						
Dexamethason (in µM):	0,0	2,5	5,0	10,0	20,0	30,0	30,0
Melphalan (in µM):	0,0	2,5	5,0	10,0	20,0	30,0	30,0
Bortezomib (in nM):	0,0	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	8,0
PD98059 (in µM):	0,0	10,0	20,0	30,0	^a 40,0	50,0	50,0

^a entfällt bei den HPK1^{low}-Experimenten

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurden die Zellen für 15 Minuten mit Annexin V-FITC und 7-AAD im Annexin-Bindungspuffer inkubiert. Die Quantifizierung der markierten Myelomzellen wurde mittels einer FACS CaliburTM-Messeinheit durchgeführt. Mit Hilfe der CellQuestTM-Pro Software wurden die prozentualen Anteile der verschiedenen Populationen (s.o.) an der Gesamtprobe ermittelt. Eine Aussage über die Effektivität der Apoptose-Induktion der verwendeten Substanzen erhält man nach einem Vergleich der Annexin V-FITC^{high}/7-AAD^{low}- und Annexin V-FITC^{high}/7-AAD^{high}-Populationsanteile nach Substanzzugabe mit den Annexin V-FITC^{high}/7-AAD^{low}- und Annexin V-FITC^{high}/7-AAD^{high}-Populationsanteile der unbehandelten Zellprobe.

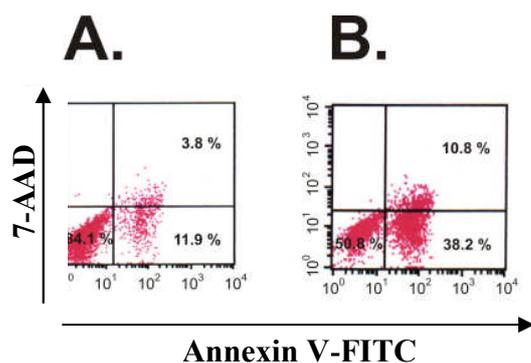


Abbildung 37: Schema einer beispielhaften durchflusszytometrische Messung von Apoptose an MM-Zellen. (A) Messung einer Probe mit geringer Fraktion apoptotischer Zellen (Kontrolle).

(B) Apoptose-Induktion nach Zugabe eines Proteasominhibitors. Der Vergleich der beiden Messungen zeigt einen Anstieg der Annexin V-FITC^{high}-Zellpopulationen in den beiden rechten Quadranten vom Abb. B.

5.2.7.3 Messung der Transfektionseffizienz mittels Tag-Nachweis

Zur Transfektion der murinen Zelllinie MPC-11 für die Überexpression des HPK1-Proteins wurden Plasmide mit einem Fusionsprotein (HPK1 mit einem Hämagglutinin (HA)-Tag) verwendet. Zur Untersuchung der Transfektionseffizienz mittels Durchflusszytometrie wurden transfizierte Zellen in 3,7%-igem Formaldehyd (20 Minuten, RT) fixiert und anschließend mit dem HA-spezifischen, FITC-gekoppelten Antikörper (20 Minuten, RT, abgedunkelt) inkubiert. Diese Vorgehensweise ist sowohl mit transient als auch mit stabil transfizierten Zellen durchgeführt worden.

5.2.8 Einzelgen- und Transkriptom-Expressionsuntersuchungen

5.2.8.1 RNA-Isolierung und Konzentrationsmessung

Die Gesamt-RNA der zu untersuchenden Primär- und Myelomzelllinien-Proben für die RT-PCR-Experimente wurde mit dem QIAamp[®] RNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Zellysate mit 2×10^7 Zellen pro ml RNA-Lysepuffer (RLT-Puffer; QIAamp[®] Kit) wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert. Die RNA-Isolierung wurde gemäß den Herstellerangaben des QIAamp[®] Kits durchgeführt. Zur Elution der RNA wurden $30\mu\text{l}$ Diethylpyrocarbonat-Wasser (DEPC) direkt auf die Membran der Spin-Säule pipettiert. Nach einer zehnminütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde diese Säule eine Minute bei $8.000 \times g$ zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde erneut auf die Spin-Säule gegeben und nach einer weiteren zehnminütigen Inkubation wiederholt zentrifugiert. Die Lagerung des Eluats erfolgte bei -80°C .

Mittels einer spektralphotometrischen Messung (Biophotometer) wurde die Konzentration und Qualität der isolierten RNA ermittelt. Dazu wurde ein Aliquot von $2\mu\text{l}$ RNA mit $78\mu\text{l}$ PBS versetzt. Diese Verdünnung wurde nun im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260nm vermessen. Aus der $\text{OD}_{260\text{nm}}$ wurde die Konzentration berechnet. Dabei berechnet das Spektralphotometer die RNA-Menge pro Volumen, indem der Extinktionswert mit dem Verdünnungsfaktor, 40, und der spezifischen Konzentration multipliziert wird. Die spezifische Konzentration von RNA bei einer $\text{OD}_{260\text{nm}}$ von 1 beträgt $40\mu\text{g}$ pro ml.

Weil auch aromatische Aminosäuren bei der Wellenlänge von 260nm Energie absorbieren, wurde zusätzlich die Extinktion bei 280nm bestimmt (die Absorption ist bei Proteinen höher als bei Nukleinsäuren). Ist der Quotient (=Reinheitsfaktor) aus OD_{260} und OD_{280} kleiner als 1,8, so deutet dies auf eine erhöhte Konzentration von Proteinen in der RNA-Probe hin. Die RNA-Proben für die Analyse mittels Microarrays (GeneChip Mouse 1.0st; Fa. Affymetrix, USA) wurden mittels RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert.

5.2.8.2 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription synthetisiert das Enzym Reverse Transkriptase einen, zur einzelsträngigen RNA-Matrize komplementären, DNA-Strang (cDNA). Die cDNA wurde bei Anwesenheit eines oligo d(T)_n- bzw. eines randomisierten Hexamer-Primers (oligo d(N)₆) gebildet. Die verwendete Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase (M-MLV RT) synthetisiert Erststrang-cDNA bis zu 7 Kilobasen (kb) Länge. Der Reaktionsansatz setzte sich aus 2µg RNA-Probe (ad 8µl DEPC-Wasser) und 12µl RT-Mastermix zusammen. Der Reaktionsansatz wurde 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Mit einer anschließenden Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase bei 95°C für 5 Minuten wurde die Reverse Transkription beendet. Der Reaktionsansatz wurde auf Eis gekühlt und die cDNA bei -20°C gelagert.

5.2.8.3 Quantitative Real-Time-PCR (TaqMan®-Analyse)

Ziel der quantitativen RT-PCR ist es, aus der Menge an amplifiziertem PCR-Produkt Rückschlüsse auf die eingesetzte RNA- bzw. cDNA-Menge zu ziehen und so die mRNA-Expression der untersuchten Zielgene zu bestimmen. In der quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR) mittels TaqMan®-Technologie kommt neben einem genspezifischen Primerpaar eine ebenfalls sequenzspezifische Fluoreszenzsonde zum Einsatz. Diese ist am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff sowie am 3'-Ende mit einem Quencher-Molekül bzw. mit einem zweiten Fluoreszenzfarbstoff konjugiert. Wird der Reporter mit Licht einer definierten Energie (definierte Wellenlänge; λ) angeregt, so emittiert er ein Licht mit einem geringeren Energieniveau (längere Wellenlänge; λ'). In der intakten Sonde wird ein Teil der emittierten Lichtenergie aufgrund des Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers (FRET) durch den Quencher/2. Fluoreszenzfarbstoff (nicht fluoreszierender [dark]-Quencher, z.B. Deep Dark Quencher™ [Fa. Eurogentec S.A., Belgien] bzw. fluoreszierender Farbstoff, z.B. TAMRA™) aufgenommen. Bei der Verwendung eines Quenchers wird dann keine messbare Fluoreszenzenergie an die Umgebung abgegeben. Wird die Fluoreszenzenergie des Reporters dagegen an einen zweiten fluoreszierenden Farbstoff übertragen, emittiert dieser eine Fluoreszenz mit einer in den längerwelligen Bereich des Lichtspektrums verschoben Wellenlänge (λ''). Da der Gerätedetektor nur die Lichtemission bei λ' misst, wird jedoch noch kein Signal detektiert.

Im Verlauf der PCR kommt es dann in jeder Annealingphase zur Anlagerung von der Fluoreszenzsonde an den komplementären Nukleinsäure-Strang. In der folgenden Elongationsphase wird die Sonde durch die eingesetzte Polymerase vom DNA-Strang verdrängt und anschließend durch deren RNase H-Funktion hydrolysiert. Reporter und Quencher/2. Fluoreszenzfarbstoff werden dadurch getrennt. Das vom Reporter emittierte Licht wird nicht mehr gequencht/übertragen und liefert ein detektierbares Lichtsignal in einem kürzerwelligen Bereich (λ') des Lichtspektrums. Während der gesamten Reaktion kann die Bildung des PCR-Produkts durch die Zunahme der Fluoreszenz gemessen werden. Für die Erstellung einer Standardkurve wurden auf jede Mikrotiterplatte Verdünnungsreihen einer Zelllinie pipettiert. Zur Auswertung der PCR wurden einzelne Messdaten (C_T) aus der exponentiellen Phase der Proben der Verdünnungsreihe (mit fiktiven, vordefinierten cDNA-Kopienzahl) bestimmt und damit eine Regressionsgrade erstellt. Mit der 7500 Fast System SDS Software wurden die C_T -Werte jeder einzelnen Probe der Mikrotiterplatte auf der Standardkurve identifiziert und anschließend die fiktive cDNA-Kopienzahl (n) extrapoliert. Die fiktiven Kopienzahlen wurden anschließend mit einem Tabellenkalkulationprogramm analysiert. Hierbei wurden folgende Schritte durchgeführt:

- Bildung der Mittelwerte der fiktiven Kopienzahl (n) der identischen Replikate
- Bestimmung des Verhältnisses zwischen HPK1 und dem Referenzen (18S rRNA):

$$\Rightarrow n' = n(\text{Probe}) / n(18S \text{ rRNA})$$

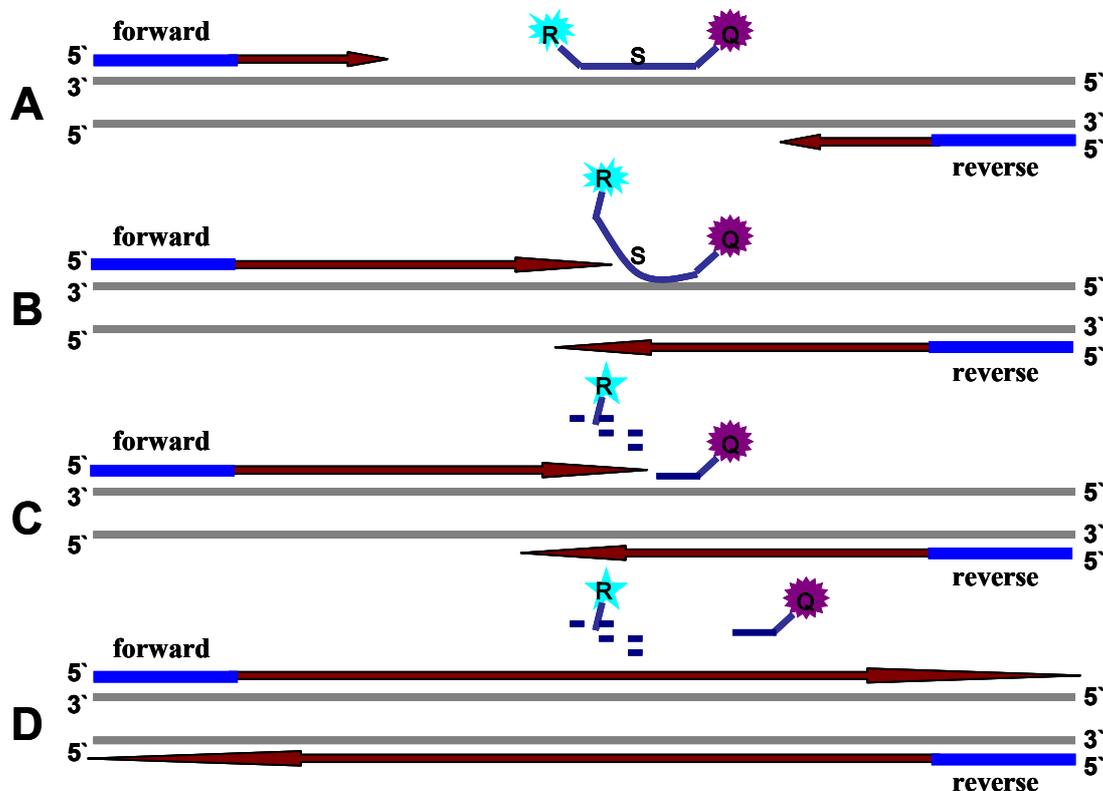


Abbildung 38: Graphische Darstellung der TaqMan®-Reaktion.

(A) Elongationsstart; (B) Sondenverdrängung; (C) Sondenhydrolyse; (D) Ende der Elongation.

Die Abkürzungen bedeuten Vorwärtsprimer (forward), Reverser Primer (reverse), Reporter-FAMTM (R) und Quencher-TAMRATM (Q)

5.2.8.4 Sonden- und Primer-Design

Das Design der Primer und Sonden für die Amplifikation der Gene wurde durch die Primer Express Software von Perkin Elmer Applied Biosystems unterstützt.

Hierbei gelten folgende Bedingungen für das Design einer 5' FAMTM-3'TAMRATM-markierten Sonde:

- Das 5'-Ende der Sonde sollte maximal 50 Basenpaare vom 3'-Ende des Primers liegen, um sicherzustellen, dass die Sonde durch die erste gebundene Polymerase hydrolysiert wird.
- Sie sollte bei einer Länge von 20 bis 30 Basen einen GC-Gehalt von 40 bis 60% und einen Schmelzpunkt von 70°C aufweisen.
- Daneben gilt es, Komplementaritäten zwischen Sonde und Primern zu vermeiden und keine Sequenzen mit auffälliger Sekundärstruktur zu verwenden. Drei aufeinanderfolgende Basen eines Typs wirken ebenfalls negativ auf die Hybridisierung.

Für das Design der Primer gelten folgende allgemein gültige Regeln:

- Das PCR-Produkt sollte eine Länge von 50 bis 150 Basenpaare haben. Dies stellt sicher, dass die PCR in jedem Zyklus vollständig erfolgt.
- Die Länge der Primer sollte 18 bis 22 Basen betragen.
- Die Primer sollten so ausgewählt werden, dass sie ca. einen 50% GC-Gehalt, jedoch keine poly T-Bereiche, aufweisen.
- Palindromische Sequenzabschnitte und 3'-Komplementaritäten sollten vermieden werden.
- Beide Primer sollten ähnliche Schmelztemperaturen aufweisen. Es ist aber zu beachten, dass sie einen um mindestens 5 Kelvin niedrigeren Schmelzpunkt als die Sonde haben müssen.

In der nachfolgenden Abbildung ist die Struktur des Amplikons graphisch dargestellt.

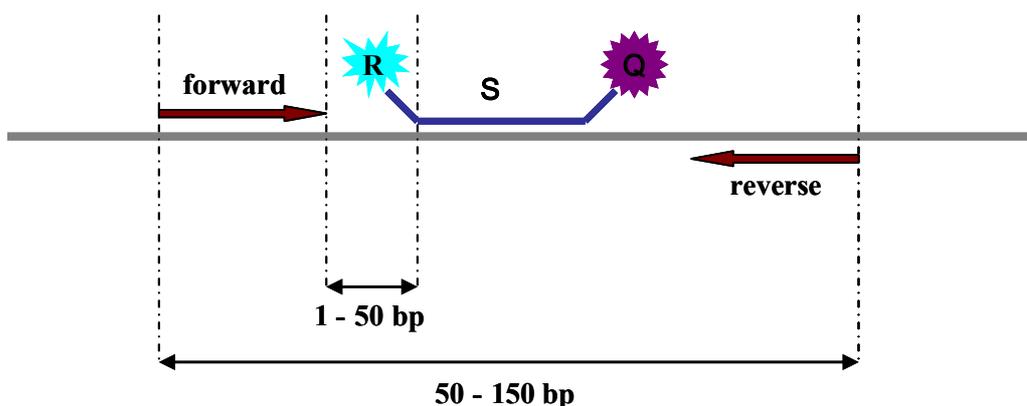


Abbildung 39: Graphische Darstellung des Amplikons für die TaqMan®-Analyse
Die Abkürzungen bedeuten Vorwärtsprimer (forward), Reverser Primer (reverse), Reporter-FAMTM (R) und Quencher-TAMRATM (Q) (verändert nach den Betriebsunterlagen für den PE SDS 7700).

Die erhaltenen Primer und Sonden wurden im Rahmen einer „Blast“-Suche auf eine mögliche Hybridisierung mit anderen Sequenzen als den Zielgenen untersucht und solche Primer-Sonden Triplets ausgewählt, die die geringste Komplementarität zu anderen Sequenzen aufweisen (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma TIB MolBiol (Berlin), die Sondenherstellung durch die Firma Eurogentec S.A. (Seraing, Belgien). Als Kontrolle wurde das TaqMan[®] Ribosomal RNA Control Reagents (VIC[™]) (Fa. Applied Biosystems) eingesetzt.

5.2.8.5 Transkriptom-Analyse

Die Analyse des Transkriptoms von HPK1^{wt}-, HPK1^{high}- und HPK1^{high(K46E)}-Myelomzellen wurde als Serviceleistung am Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF), Technologieplattform und Serviceeinheit "Integrierte Funktionelle Genomik" (IFG), Abteilung Genexpressionsanalytik erledigt. Als Leistung wurde die Konzentrationsmessung, die Qualitätskontrolle und die Reverse Transkription der RNA-Proben (vgl. Kap. 4.2.8.1), sowie die Hybridisierung der cDNAs mit den GeneChip Mouse 1.0st-Arrays und dessen Auslesung durchgeführt. Die Auswertung und statistische Analyse wurde am Institut für Bioinformatik des Universitätsklinikums Münster bewerkstelligt (vgl. Kap. 4.2.15).

5.2.9 Protein-Expressionsuntersuchungen

5.2.9.1 Protein-Extraktion

Die Zellpellets wurden zur Lyse in Protease-, Phosphatase- und Proteinaseinhibitoren-haltigem RIPA-Puffer in einer Konzentration von $1 - 2 \times 10^7$ Zellen pro ml aufgenommen, 30 Minuten auf Eis inkubiert und dabei in regelmäßigen Abständen gut durchmischt. Die nach vollständiger Lyse der Zellen entstandenen Zellfragmente wurden 15 Minuten bei $15.000 \times g$ und $4^\circ C$ abzentrifugiert und der Überstand bis zur Weiterverwendung bei $-80^\circ C$ gelagert.

5.2.9.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteingemischen nach dem Molekulargewicht der einzelnen Proteine. $20 \mu l$ der fraktionierten Proteinextrakte wurden mit $4 \mu l$ 1x Laemmli-Probenpuffer (SDS-haltig) versetzt und zusammen für 5 Minuten auf $95^\circ C$ erhitzt und anschließend in einen Slot des Geles gegeben. Durch das denaturierende Agens SDS werden die Proteine in eine zylindrische Form aufgefaltet und mit einer Hülle aus SDS-Molekülen umgeben. Dadurch erhalten die Proteine, eine etwa proportional ihrer Größe entsprechende, negative Ladung und können in einem elektrischen Feld innerhalb einer Gelmatrix aufgetrennt werden. Die Verwendung eines diskontinuierlichen Gelsystems erlaubt die Aufkonzentration der verschiedenen Proben an der Grenze zwischen dem sogenannten Sammelgel und

dem folgenden Trenngel. Aufgrund des im Sammelgel herrschenden pH-Wertes liegen die Proteine als Zwitterion vor und werden unter dem Einfluss des elektrischen Feldes fokussiert. Beim Erreichen des Trenngels kommt es zu einem pH-Sprung von pH 6,8 auf 8,8. Die entstandenen Proteinanionen wandern nun im Trenngel unter dem Einfluss des angelegten elektrischen Feldes und werden entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Es wurde stets ein 10%-iges Trenn- und ein 5%-iges Sammelgel verwendet, deren Polymerisation durch 10% w/v APS induziert und durch die Verwendung von TEMED katalysiert wurde. Nach dem Gellauf von ca. 110 Minuten bei 120V wurde das Polyacrylamid-Gel im Western-Blot verwendet. Zur Längenabschätzung wurde noch 5µl des Längenmarkers Precision Plus Protein dual color standards (Fa. BioRad) auf das Gel aufgetragen.

5.2.9.3 Immunoblot und Detektionsmethode

Die Western-Blot-Analyse dient dem qualitativen bzw. quantitativen Nachweis von Proteinen. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes wurden in einer SemiDry-Elektroblotkammer die Proteine aus der Gelmatrix auf eine PVDF-Membran transferiert. Die immobilisierten Proteine können anschließend durch die Bindung spezifischer Antikörper und der Verwendung geeigneter Detektionssysteme dargestellt werden. Mehrere 3MM-WhatmanpapiereTM und eine auf Gelgröße zugeschnittene, aktivierte PVDF-Membran wurden in Transferpuffer getränkt. Auf die SemiDry-Elektroblotkammer wurden drei 3MM-WhatmanpapiereTM, die PVDF-Membran, das Gel und drei weitere 3MM-WhatmanpapiereTM luftblasenfrei gelegt. Dieser Stapel wurde zwischen die Elektroden der SemiDry-Elektroblotkammer eingespannt. Der Proteintransfer erfolgte unter konstantem Stromfluss bei 80mA für 90 Minuten. Nach Beendigung des Transfers wurden freie Protein-Bindungsstellen auf der PVDF-Membran durch eine 60-minütige Inkubation bei Raumtemperatur (RT) mit einer Blockierungs-Lösung (5% BSA in T-PBS) abgesättigt. Der Immunonachweis verschiedener Proteine auf der Membran erfolgte durch spezifische Antikörper.

Die Antikörperverdünnungen wurden in Blockierungs-Lösung angesetzt. Nach Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C wurde diese dreimal mit T-PBS gewaschen. Anschließend wurde der primäre Antikörper über einen sekundären, Meerrettichperoxidase(HRP)-gekoppelten Antikörper nachgewiesen (verdünnt in T-PBS).

Nach 90 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Membran erneut 3mal gewaschen und die Proteine mittels des ECLTM-Systems detektiert. ECL ist eine lichtemittierende, nicht radioaktive Methode zur Detektion immobilisierter Antigene, die direkt oder indirekt an HRP-gekoppelte Antikörper gebunden sind. Durch die Peroxidase wird die Oxidation von Luminol unter alkalischen Bedingungen katalysiert. Nach der Oxidation befindet sich Luminol in einem angeregten Zustand, von dem es unter Licht-Emission wieder in den Grundzustand zurückfällt. Das so erzeugte Licht kann durch die Exposition auf einem Röntgenfilm detektiert werden. Für die Analyse von unterschiedlichen Bandenintensitäten wurden die Röntgenfilme für bis zu 5min durch die emittierten Photonen belichtet. Als Ladekontrolle wurde das Protein β -Aktin in jeder Probe analysiert.

5.2.9.4 Ablösen von Antikörpern von PVDF-Membranen („Stripping“)

Um auf einer bereits markierten PVDF-Membran weitere Proteine nachzuweisen, muss der vorher gebundene Antikörper entfernt werden. Dazu wurde die Membran 30 Minuten bei RT im frisch angesetzten Stripping-Puffer inkubiert. Im Anschluss wurde diese 3mal für 10 Minuten mit einem Überschuss an T-PBS gewaschen, um nach erneutem Blockieren weitere Proteine nachweisen zu können (s. Kap. 4.2.9.3).

5.2.10 Mikrobiologische Methoden

5.2.10.1 Herstellung chemo-kompetenter Zellen

Die Herstellung chemo-kompetenter DH5 α -*Escherischia coli* (*E.coli*)-Bakterien erfolgte gemäß der Angaben des „Z-Competent *E. coli* Transformation“-Kit. Die Bakterien wurden in 100 μ l Aliquots bei -80°C gelagert.

5.2.10.2 Transformation kompetenter Bakterien mittels Hitzeschock

Transformation von Plasmid-DNA in chemo-kompetente DH5 α -*Escherischia coli* (*E.coli*)-Bakterien erfolgte mittels Hitzeschocktransformation nach einem Protokoll der Firma Invitrogen. Dabei wurden 500ng Plasmid-DNA und 100 μ l chemo-kompetente Bakterien verwendet. Die transformierten Zellen wurden zur Selektion plasmidtragender Bakterienkolonien auf LB-Agarplatten mit 50 μ g pro ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht (ü.N.) bei 37°C inkubiert.

5.2.10.3 Kultivierung von transformierten Bakterien

Für die Vermehrung von Plasmid-tragenden Bakterien wurde eine 3ml Flüssigkultur (mit 50 μ g Ampicillin pro ml Kultur) mit einer Einzelkolonie von der LB-Agarplatte angeimpft und bei 180rpm und 37°C in einem Schüttelinkubator inkubiert. Das Wachstum der Bakterien in der Flüssigkultur wurde durch die Messung der optischen Dichte (OD = Extinktion) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 580$ nm mittels Photometer überprüft. Als Referenz diente das jeweilige sterile Nährmedium, in dem die Bakterien kultiviert wurden. Bei *E. coli* entspricht eine OD von 0,1 einem Lebendtiter von ca. 2×10^7 Zellen pro ml. Nach Erreichen einer OD von 0,6 wurde eine 125ml Hauptkultur (mit 50 μ g Ampicillin pro ml Kultur) angeimpft und bei 150rpm, 37°C ü.N. inkubiert.

5.2.11 DNA-Plasmid-Präparation

5.2.11.1 Plasmidisolierung in präparativem Maßstab („Maxi-Präparation“)

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus der Übernacht-Bakterienkultur mittels „Maxi-Präparation“ wurde mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit (Fa. Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Am Ende der Aufreinigungsschritte wurde die gefällte DNA je nach Größe des Pellets in einem adäquaten Volumen TE-Puffer aufgenommen und photometrisch vermessen. Die kurzzeitige Lagerung der DNA-Lösungen erfolgte im Kühlschrank bei 4° C, ansonsten bei -20°C.

5.2.11.2 Plasmid-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der Plasmid-Lösungen wurde vergleichend der RNA-Konzentrationsmessung ermittelt. Die spezifische Konzentration von doppelsträngiger DNA bei einer OD_{260nm} von 1 beträgt 50µg pro ml. Aus dem Extinktionswert, dem Verdünnungsfaktor und der spezifischen Konzentration wurde die Plasmid-Konzentration berechnet. Außerdem wurde aus dem Verhältnis der OD_{260nm} und der OD_{280nm} der Reinheitsfaktor ermittelt (siehe RNA-Konz.). Eine qualitativ hochwertige Probe besitzt einen Reinheitsfaktor größer gleich 2,0.

5.2.12 Transfektion muriner Myelomzelllinien

Die Übertragung von reiner DNA in eine Zelllinie bezeichnet man als Transfektion.

Es gibt mehrere Transfektionsmethoden (z.B. Mikroinjektion, Calciumphosphat-Präzipitation, Elektroporation, Lipofektion).

5.2.12.1 Herstellung von überexprimierender Zellen mittels Elektroporation

Um die Plasmide in die Zellen zu übertragen, wurde die Elektroporationsmethode angewendet.

Die zu elektroporierenden Zellen wurden auf eine Zellkonzentration von 1×10^7 Zellen pro ml mit RPMI-1640-Medium ohne Antibiotikum eingestellt. Zusammen mit 20µg Plasmid wurden 700µl Zellsuspension in eine Elektroporationsküvette mit 0,4cm Elektrodenabstand überführt. Die Elektroporation erfolgte mit Hilfe des BioRad Gene Pulsers bei 250V und 950µF. Die Zell-DNA-Suspension wurde nach der Elektroporation in 10ml frischem, vorgewärmtem RPMI-1640-murine-Medium aufgenommen und in einem geeigneten Zellkulturgefäß bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

5.2.12.2 Anwendung der RNA-Interferenz zur Reduzierung der Genexpression

Die RNA-Interferenz oder kurz RNAi ist ein zelleigener, natürlicher Mechanismus und dient der Zelle zum Schutz gegen virale Infektionen. Dabei wird virale, in die Zelle eingeführte dsRNA nach Anlagerung an 21-23nt-langen, komplementären RNA-Molekülen (micro-RNAs, miRNA) von einem zelleigenen Proteinkomplex (RISC-Komplex) abgebaut, wodurch schließlich die genetische Information der viralen RNA nicht translatiert werden kann. Die Verwendung in der Molekularbiologie erlaubt eine gezielte Beeinflussung der Expression von Genen. Dabei wird die Wirkung der zelleigenen miRNA durch synthetische, 21 - 23nt-lange siRNAs („short interfering“ RNA) erzielt. Auf diese Weise wird gezielt die Translation der mRNA eines Zielgens gehemmt und es können phänotypische Untersuchungen durchgeführt werden, die zur Aufklärung der Funktion des betroffenen Gens führen.

Zur transienten Transfektion muriner Zellen wurden das Transfektionsreagenz HiPerFect und die synthetische siRNA für die murine Form der HPK1 der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers für die Transfektion von Suspensionszellen verwendet. Dafür wurden 1×10^5 Zellen pro Vertiefung einer 24-Lochplatte ausplattiert, transfiziert und nach einer entsprechend ermittelten Inkubationszeit (37°C, 5% CO₂) in den entsprechenden Versuchen verwendet.

Die Reduzierung der Proteinexpression nach siRNA-Anwendung wurde in Vorversuchen mit einer Inkubationszeit von 24h, 48h und 72h mittels Western-Blot überprüft und danach die optimale Zeit für alle Versuche ausgewählt. Für die Inhibitionsversuche wurde eine Inkubationszeit von 24h ausgewählt, weil im Anschluß weitere 48 Stunden bis zur entsprechenden Analyse vergehen sollten. Nach einer Gesamt-Transfektionszeit von mehr als 72h, steigt die HPK1-Proteinexpression wieder an und die zu untersuchenden Effekte gehen möglicherweise verloren.

5.2.12.3 Herstellung stabil transfizierter Zelllinien

Für die Herstellung von Zelllinien mit stabil überexprimierten Protein wurden die Zellen 48h nach Transfektion mit einer geringen Konzentration (100µg pro ml) G418-Sulfat inkubiert. Die verwendeten Vektoren besitzen ein Neomycin-Resistenzgen, wodurch erfolgreich transfizierte Zellen unter der Zugabe von G418 (ein Neomycin-Analogon) überleben. Nach einer Haltungsdauer von zwei Wochen unter geringer G418-Konzentration wurde diese stufenweise auf 500µg pro ml G418 erhöht (2 Wochen 250µg pro ml, anschließend 500µg pro ml). Für die Herstellung einer klonalen Zelllinie wurden die nunmehr stabil transfizierten Zellen mehrfach vereinzelt und klonal vermehrt.

Für den Nachweis eines chromosomalen Einbaus der Vektor-DNA wurde die klonale Zelllinie über vier Wochen ohne Selektionsmedium gehalten und in regelmäßigen Abständen auf die Stärke des exogenen Proteins mittels Durchflusszytometrie (HA-Tag-FITC) und Western-Blot (HPK1; HA-Tag) untersucht.

5.2.13 Untersuchung der Phospho-Protein-Expression mittels Multi-Panel-Proteinarrays

Zur Untersuchung des Einflusses einer modulierten HPK1-Expression auf bestimmte Signalwege bzw. Proteingruppen wurden zwei Arrays der Firma R&D Systems verwendet. Dabei wurden 2×10^7 Zellen pro ml lysiert und nach Herstellerangaben mit dem Proteome Profiler™ Human Phospho-Kinase- und dem Proteome Profiler™ Human Phospho-MAPK-Array-Kit analysiert. Die mittels ECL-Methode detektierten Signale wurden anschließend digitalisiert und mit Hilfe der Software Quantity-One und dem Gel Doc 2000-System densitometrisch ausgewertet.

5.2.14 Untersuchungen des Tumorwachstums *in vivo*

Die Durchführung der tierexperimentellen Versuche erfolgte in enger Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Kiefer (MPI Münster) und der dort ansässigen Tierexperimentellen Einrichtung. Für alle Versuche bestand ein genehmigter Tierversuchsantrag der zuständigen Genehmigungs- und Kontrollbehörde und die Haltung der Mäuse erfolgte unter Standardbedingungen. Für die Experimente wurden die Zelllinien mit über- und wildtypisch-exprimierender HPK1-Proteinmenge verwendet. Für die Untersuchungen zum Tumorwachstum wurden jeweils 6 weiblichen Mäusen des BALB/c-Stammes $100 \mu\text{l}$ mit 1×10^5 Zellen, der *in vitro* veränderten Zelllinien (wildtypisch bzw. erhöht HPK1 exprimierend; in RPMI-1640 mit 0,5% FCS), subkutan appliziert. Im Verlauf von 28 Tagen wurden die aufgetretenen Tumoren mittels Schiebelehre vermessen und die Tiere auf ihren allgemeinen Gesundheitszustand untersucht. Bei Verschlechterung des Befindens (Fellveränderungen, sichtbarer Gewichtsverlust usw.) wurde der Versuch abgebrochen. Als Messgrößen dienen die Tumolvolumenquantifizierung und die Betrachtung des Überlebens der Tiere. Das Tumolvolumen wurde wie folgt berechnet:

$$\begin{aligned} &\text{Tumolvolumen (in mm}^3\text{)} \\ &= \frac{1}{2} ((\text{kleinster Tumordurchmesser (in mm)})^2 \times \text{größter Tumordurchmesser (in mm)}) \end{aligned}$$

Am Ende des Versuches wurden die Tiere mittels CO_2 getötet und die Tumoren präpariert. Die isolierten Tumoren wurden für zukünftige Versuche über Nacht in 3,7% Paraformaldehyd fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet oder nach der Präparation bei -80°C kryokonserviert.

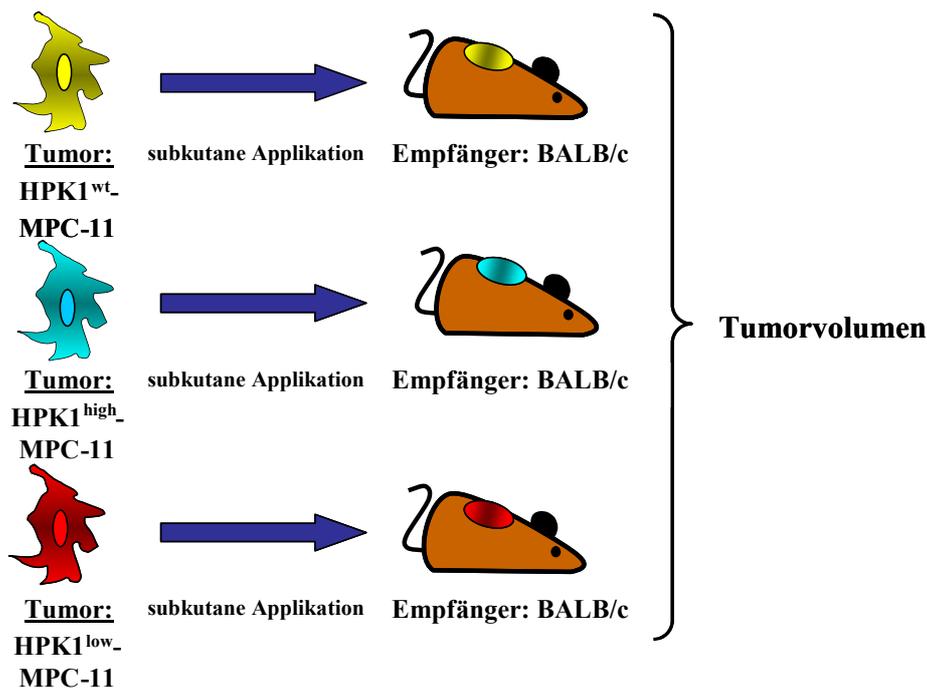


Abbildung 40: Schematische Übersicht der durchgeführten *in vivo*-Versuche

5.2.15 Statistik

Die Daten der Apoptoseversuche wurden anhand eines repräsentativen Beispiels der prozentualen Häufigkeitsänderungen \pm Standardabweichungen angegeben. Bei den Proliferationsversuchen wurden beispielhaft die relativen Änderungen (fold-change) zwischen behandelter und unbehandelter Probe als gemittelter Messwert (\pm Standardabweichung) und bei den *in vivo*-Versuchen zum Tumorwachstum die Mittelwerte der Tumorumfänge (\pm Standardabweichung) grafisch dargestellt. Alle Berechnungen, inklusive der statistischen Signifikanz, wurden zwischen HPK1-Expressions-modifizierter Zelllinie und der entsprechenden Kontrollzelllinie mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel berechnet. Zur Bestimmung eines Effektes der HPK1-modulierten Expression auf den gemessenen Phänotyp wurden die relativen Änderungen gegenüber der Kontrollzelllinie bestimmt.

Werte, die eine Log-Ratio zur Basis 2 von $\leq -0,585$ oder $\geq 0,585$ aufwiesen, wurden als unterschiedlich definiert. Werte mit Log-Ratio zwischen $-0,585$ und $0,585$ galten als nicht verändert.

Zur Signifikanzanalyse der differenziellen Ergebnisse wurde ein zweiseitiger Student's *t*-Test für unabhängige Stichproben (mit gleicher Varianz) angewandt, wobei das Signifikanzniveau auf $p \leq 0,05$ gesetzt wurde.

Microarray-Analyse

Die statistische Auswertung der Genexpressions-Microarrays wurde mit freundlicher Unterstützung von PD Dr. Korsching vom Institut für Bioinformatik durchgeführt (modifiziert nach Korsching u. a., 2005; Seitz u. a., 2006).

Zur Evaluation, Standardisierung und statistischen Auswertung wurden Software-Pakete von Affymetrix und TIBCO verwendet. Jede Zelllinie (HPK1^{wt}-, HPK1^{high}- und HPK1^{high(K46E)}-MPC-11) wurden anhand 5 unabhängiger Replikate analysiert. Die Vergleichsanalyse wurde zwischen den Mittelwerten jeder HPK1-expressionsmodifizierten Zelllinien und den Mittelwerten der entsprechenden Kontrollzelllinie, HPK1^{wt}-MPC-11, berechnet.

Bei der Identifikation von differenziell exprimierten Transkript-Clustern wurden folgende Kriterien angewendet (Angaben zu den entsprechenden Mittelwerten):

- p-Wert im Student's *t*-Test $\leq 0,05$
- Log-Ratio zur Basis 2 von $\leq -1,0$ oder $\geq 1,0$
- Unterschied zwischen den Gruppen (Log zur Basis 2) von $\geq 0,1$

6 Zusammenfassung

Das Multiple Myelom ist eine bislang nicht heilbare lymphohämatopoetischen Neoplasie. Neben einer Entwicklung verbesserter klinischer Antimyelom-Strategien kommt der Identifizierung neuer Zielstrukturen eine grundlegende Bedeutung bei der Therapierung des Multiplen Myeloms zu.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Hämatopoetische Progenitor Kinase 1 als differenziell exprimierte Kinase beim Multiplen Myelom im Vergleich zu B-Lymphozyten und Myelomen während/nach Therapie identifiziert werden. Die genaue Funktion dieser MAP4 Kinase bei der Entstehung und Progression des Myeloms ist bislang nicht untersucht. Erste veröffentlichte Daten beschreiben einen letalen Effekt einer Reduzierung der HPK1-Expression auf die Myelomzelle und unterstreichen, neben unseren eigenen Daten, die Hypothese einer funktionellen Relevanz dieser Kinase beim Multiplen Myelom (Tiedemann u. a., 2010).

Als möglicher Ansatz zur Behebung des myelomatösen Phänotypes wurde HPK1 in murinen Myelomzellen reexprimiert. Außerdem wurde eine Kinase-defiziente Variante von HPK1, zur Untersuchung des Einflusses der HPK1-Kinase-Aktivität bzw. der HPK1-Spaltprodukte auf die Myelomzelle, transfiziert. Anschließend folgten Transkriptom- und Proteom-Analysen, mit besonderem Augenmerk auf das Kinom, zur Charakterisierung der transfizierten Myelomzellen. Der Phänotyp wurde anhand von Proliferations-/Thymidin-Aufnahme- und Apoptose-Experimenten in Anwesenheit von antimyelomatöser Substanzen untersucht.

Es wurde ferner in HPK1-überexprimierenden Myelomzellen eine verminderte Sensitivität gegenüber der Apoptose-Induktion durch Glucocorticoid-Rezeptor(GR)-Inhibition und eine erhöhte Apoptosesensitivität gegenüber DNA-interkalierenden Substanzen im Vergleich zur wildtypisch exprimierende Kontrollzelllinie nachgewiesen. Außerdem konnte eine verstärkte Aktivität phosphorylierter, pro-apoptotischer Signalproteine (wie der Mitogen-aktivierten Protein Kinase 14 [p38] und der Jun-N-terminalen Kinase [JNK]) aufgezeigt werden. Eine nachweisbare Überexpression von Zell-Zyklus-assoziierten Genen (wie das Wachstums-Arrest und DNA-Schaden induzierbare Gen 45 γ [GADD45 γ] und Cip1 [P21]), und dem bekannten Onkogen MCL-1, blockieren die pro-apoptotischen Effekte der Hyperaktivierung von JNK und P38 durch Hemmung der Caspase-abhängigen Apoptosewege und schützen die Myelomzelle vor Dexamethason-induzierter Apoptose.

Eine Überexpression von Kinase-defizientem HPK1 resultiert ebenfalls in einer reduzierten Sensitivität gegenüber GR-Inhibition vergleichbar mit dem Apoptoseverhalten der Kinase-aktiven HPK1-Zelllinie. Gegensätzliche Ergebnisse konnten nach Inkubation mit der DNA-interkalierenden Substanzen aufgezeigt werden. Die fehlende Kinase-Aktivität von HPK1 verursachte eine verminderte Sensitivität bei der Apoptose-Induktion nach DNA-Schädigung. Dabei spielt die Überexpression des anti-apoptotischen Gens bcl-2l1 („bcl-2 like 1“) eine bedeutende Rolle.

Außerdem bewirkte eine nachweisbare MAP3K7-Überexpression und die Hyperaktivierung von P38 einen Schutzmechanismus gegen diese Ursache für Zelloptose.

Basierend auf den *in vitro* erhobenen Ergebnissen wurden im Laufe des Projektes Effekte der Überexpression von HPK1 im murinen Myelommodell untersucht. Hierzu kamen Messungen der Tumorumfänge zur Beurteilung der Tumorexpansion zum Einsatz. Die Kinase-aktiven HPK1-Myelomzellen zeigten ein doppelt so hohes Tumorstadium im Vergleich zur Kontrollzelllinie.

Die zusammengetragenen Ergebnisse bestätigen die Hypothese einer Beteiligung von HPK1 in der Pathogenese des Multiplen Myeloms nicht. Andererseits kann ein Einfluss von HPK1 auf die Progression dieser B-Zell-Neoplasie nicht ausgeschlossen werden. Weiterführende Untersuchungen sind in Arbeit und sollen zur Erarbeitung einer HPK1-basierten Antimyelom-Strategie beitragen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Modell der schrittweisen malignen Transformation	1
Abbildung 2: Interaktionen zwischen Myelomzellen, Knochenmarkstromazellen und Extrazellulärer Matrix.....	4
Abbildung 3: Schema zum Aufbau und Struktur von HPK1	7
Abbildung 4: Hypothetisches Modell für Regulation und Funktion der Germinal Center Kinasen (GCKs).....	7
Abbildung 5: Übersichtsschema über die Wechselwirkungen verschiedener Proteine nach Einwirkung extramembranaler Stimuli bei T-Zellen	8
Abbildung 6: HPK1-Transkript-Expression in verschiedenen Geweben.....	9
Abbildung 7: HPK1-Transkript-Expression in verschiedenen Geweben und Zellkompartimenten.....	10
Abbildung 8: Übersichtsschema über die verschiedenen Proteinfunktionen des intakten, N- und C-terminalen HPK1.....	11
Abbildung 9: Untersuchungen über lebenswichtiger, anfälliger Kinasen in Myelomzellen.....	12
Abbildung 10: mRNA-Expression und densitometrischen Auswertung der Protein-Expression von HPK1 in primären Zellproben.....	16
Abbildung 11: HPK1-mRNA- und -Protein-Expression verschiedener Myelomzelllinien.....	17
Abbildung 12: Immunoblot von Lysaten von HPK1 ^{wt} und MPC-11 mit überexprimiertem HPK1	18
Abbildung 13: Histogramm der Durchflusszytometer-Analyse von Zellproben mit modulierter HPK1-Expression.....	18
Abbildung 14: Schema der relativen Proliferationsrate von MPC-11 mit Kinase-defizienter HPK1-, sowie Kinase-aktiver HPK1-Überexpression	19
Abbildung 15: Veränderung der relativen Proliferationsrate durch Zugabe spezifischer Inhibitoren bzw. anti-myelomatöser Substanzen in MPC-11 mit Kinase-aktiver HPK1-, sowie Kinase-defizienter HPK1-Überexpression	20
Abbildung 16: Dosisabhängige Änderung der Substanz-vermittelten Apoptoserate von MPC-11 nach Erhöhung der HPK1-Expression	24
Abbildung 17: grafische Darstellung der prozentualen Anteile HA-positiver, transfizierter MPC-11-Myelomzellen („Stabilitätstest“).....	25
Abbildung 18: Wachstumsverlauf subkutan applizierter Myelomzellen	25
Abbildung 19: Immunoblot von Lysaten von resuspendierten Tumoren.....	26
Abbildung 20: beispielhafte Darstellung der Durchflusszytometer-Analyse von Zelllinien	27
Abbildung 21: beispielhafte Darstellung der Durchflusszytometer-Analyse von resuspendierten Tumoren	27

Abbildung 22: beispielhafte Darstellung der verwendeten Phospho-Arrays (I)	29
Abbildung 23: Immunoblot und densitometrische Auswertung der Phospho-Arrays von Zelllysaten von HPK1 ^{wt} , HPK1 ^{high} , HPK1 ^{high(K46E)}	30
Abbildung 24: schematische Darstellung der Transkriptom-Vergleichsanalyse von HPK1- überexprimierenden Myelomzellen.....	32
Abbildung 25: Transkript-Expressionen von ausgewählten Kinasen in HPK1 ^{high}	33
Abbildung 26: Transkript-Expressionen von ausgewählten Kinasen in HPK1 ^{high(K46E)}	33
Abbildung 27: Immunoblot von Lysaten aus HPK1 ^{wt} und HPK1 ^{low}	35
Abbildung 28: Schema der relativen Proliferationsrate in MPC-11 mit reduzierter HPK1- Expression	35
Abbildung 29: Veränderung der relativen Proliferationsrate durch Zugabe spezifischer Inhibitoren bzw. anti-myelomatöser Substanzen in MPC-11 mit reduzierter HPK1-Expression.....	36
Abbildung 30: Dosisabhängige Änderung der Substanz-vermittelten Apoptoserate von MPC-11 nach Herunterregulation der HPK1-Expression.....	39
Abbildung 31: beispielhafte Darstellung des verwendeten Phospho-Arrays (II).....	40
Abbildung 32: Immunoblot und densitometrische Auswertung der Phospho-Arrays von Zelllysaten von HPK1 ^{wt} und HPK1 ^{low}	40
Abbildung 33: grafische Übersicht über eine Auswahl von Interaktionspartner und den daraus resultierenden zellulären Funktionen der GADD45-Familie	44
Abbildung 34: Übersichtsschema zum Einfluss der HPK1-Aktivität auf die Melphalan- induzierte Apoptose.....	50
Abbildung 35: P21-Expression im Verlauf der Myelopoese	53
Abbildung 36: Schema des hypothetischen Zusammenhangs zwischen HPK1-Expression und der Zelldifferenzierung während der Hämatopoese	54
Abbildung 37: Schema einer beispielhaften durchflusszytometrische Messung von Apoptose an MM-Zellen.	66
Abbildung 38: Graphische Darstellung der TaqMan [®] -Reaktion.....	68
Abbildung 39: Graphische Darstellung des Amplikons für die TaqMan [®] -Analyse	69
Abbildung 40: Schematische Übersicht der durchgeführten <i>in vivo</i> -Versuche.....	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Molekulare Tranlokation/Cyclin D-Dysregulations (TC)-Klassifikation des Multiplen Myeloms	2
Tabelle 2: Veränderung der Apoptosehäufigkeit von HPK1 ^{high} , HPK1 ^{high(K46E)} und HPK1 ^{wt} nach Zugabe von Dexamethason	21
Tabelle 3: Veränderung der Apoptosehäufigkeit von HPK1 ^{high} , HPK1 ^{high(K46E)} und HPK1 ^{wt} nach Zugabe von Melphalan	22
Tabelle 4: Veränderung der Apoptosehäufigkeit von HPK1 ^{high} , HPK1 ^{high(K46E)} und HPK1 ^{wt} nach Zugabe von PD98059	22
Tabelle 5: Veränderung der Apoptosehäufigkeit von HPK1 ^{high} , HPK1 ^{high(K46E)} und HPK1 ^{wt} nach Zugabe von Bortezomib	23
Tabelle 6: wichtige differenzielle Gene der Transkriptom-Analysen von HPK1 ^{high} , sowie HPK1 ^{high(K46E)} versus HPK1 ^{wt}	34
Tabelle 7: Veränderung der Apoptosehäufigkeit von HPK1 ^{low} und HPK1 ^{wt} nach Zugabe von Dexamethason	37
Tabelle 8: Veränderung der Apoptosehäufigkeit von HPK1 ^{low} und HPK1 ^{wt} nach Zugabe von Melphalan	37
Tabelle 9: Veränderung der Apoptosehäufigkeit von HPK1 ^{low} und HPK1 ^{wt} nach Zugabe von PD98059	38
Tabelle 10: Veränderung der Apoptosehäufigkeit von HPK1 ^{low} und HPK1 ^{wt} nach Zugabe von Bortezomib	38
Tabelle 11: Verwendete Enzyme und Kits	56
Tabelle 12: Verwendete Laborgeräte	57
Tabelle 13: Verwendete Antikörper	57
Tabelle 14: Verwendete Primer und Sonden	60
Tabelle 15: Myelomzelllinien	60
Tabelle 16: Übersicht der verwendeten Konzentrationen verschiedener inhibierender Substanzen	65
Tabelle 17: Kreuzreaktivität der verwendeten humanen Proteome Profiler® Phospho-MAPK-Arrays	86
Tabelle 18: untersuchte Proteine mit entsprechenden Phospho-Stellen	87
Tabelle 19: differenzielle Transkripte der Transkriptom-Analyse von HPK1 ^{high} versus HPK1 ^{wt}	87
Tabelle 20: differenzielle Transkripte der Transkriptom-Analyse von HPK1 ^{high(K46E)} versus HPK1 ^{wt}	91

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin	AP-1	Aktivator-Protein-1
APC	Allophycocyanin	APS	Ammoniumpersulfat
<i>ask1</i>	Mitogen-aktiviertes Protein 3 Kinase 5, MAP3K5	ATCC	Amerikanische Zellkultursammlung
BAK	BCL2 Antagonisten Killer	BAX	BCL2-assoziertes X Protein
B-CLL	B-Zell Chronischen Lymphatischen Leukämie	<i>bcl-2l1</i>	bcl-2 Homolog 1, bcl-xl
bFGF	basischen Fibroblasten Wachstums-Faktor	BMSC	Knochenmarkzellen
<i>cdc2</i>	Cyclin-abhängige Kinase 1; CDK1	cDNA	komplementäre DNA
DEPC	Diethylpyrocarbonat	dNTP	desoxyNukleotide
DOC	Desoxycholat	DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dsRNA	doppel-strängige RNA	CaCl ₂	Calciumchlorid
CHD	Citron-Homologie-Dömane	Cip21/ P21	Cyclin-abhängige Kinase Inhibitor 1A; CDKN1A
CREB	cAMP Response Element Binding Protein-Kinase	CXCR-4	Chemokin, CXC Motiv, Rezeptor 4
DNA	Desoxyribonukleinsäure	ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	EGF	epidermaler Wachstums-Faktor
EGFR	EGF-Rezeptor	ERK1/2	Mitogen-aktiviertes Protein Kinase 3/1
ECM	Extrazelluläre Matrix	Fa.	Firma
FCS	fötales Kälberserum	FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers
FGFR3	Fibroblasten Wachstums-Faktor Rezeptor 3	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
for	vorwärts gerichtet	FSC	Forward Light Scatter
<i>gadd45γ</i>	Wachstumsarrest und DNA- Schaden induziertes Gen 45 γ	GADs	Glutamat-Decarboxylasen
GCK	Keimzentrumskinasen	GSK-3 α/β	Glykogen Synthase Kinase-3 α und -3 β
GR	Glucocorticoid-Rezeptor	Grb2	Wachstums-Faktor Rezeptor- gebundenes Protein 2
h	Stunden	HA	Hämagglutinin
HCl	Salzsäure	HER2/neu	humaner EGF-Rezeptor 2, erb- B2
HEPES	Hydroxyethylpiperazinylethan- sulfonsäure	HPK1	Hämatopoetische Progenitor Kinase 1, MAP4K1
HRP	Meerrettichperoxidase	HSA	humanes Serumalbumin
HSC	hämatopoetischen Stammzellen	ICAM-1	Interzellulären Adhäsions- Molekül 1
IGF1	Insulin-ähnlicher Wachstums- Faktor 1	IGF1R	IGF1-Rezeptor
IgH	Immunglobulin-Schwerkette	I κ B	Inhibitor von NF κ B
IKK β	I κ Kinase β	IL-1 β	Interleukin 1 β

IL-6	Interleukin-6	Jak	Janus Kinase
JIP1	JNK interagierendes-Protein	JNK	c-Jun-N-terminale Kinasen
kb	Kilobasen	KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton	KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KM	Knochenmark	LCK	Lymphozyten-spezifische Protein-Tyrosin Kinase
LEF	lympoiden Verstärker-Faktor	LFA1	Leukozyten Funktions-assoziierten Antigen-1
MACS	magnetische Zellseparation	MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MAPKAPK2	MAPK-aktivierte Protein Kinase-2	μCi	Mikrocurie
MEK	MAPK Kinase, MKK	MEKK	MEK Kinase
mIgG/E/M/D	membranständigen Immunglobulin G/E/M/D	miRNA	mikro RNA
MLK3	MEKK Kinase 3	MM	Multiplres Myelom
M-MLV RT	Reverse Transkriptase aus dem Moloney Mäuse Leukemie Virus	mRNA	Boten RNA
NaCl	Natriumchlorid	NaF	Natriumfluorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat	NaOH	Natriumhydroxid
Na ₃ VO ₄	Natriumvanadat	NFκB	nuklearen Transkriptionsfaktors κB
NIK	HPK-ähnliche Kinase	NK-Zellen	natürlichen Killerzellen
NP-40	Nonylphenolethoxylat mit 40g/mol	nt	Nukleotid
OD	optische Dichte	P70S6K	ribosomale Protein S6 Kinase 1 mit 70kDa
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	PAK	p21-aktivierten Kinasen
PBBL	peripheren B-Lymphozyten aus Blut	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCNA	DNA-Polymerase δ	PCR	Polymerasen-Ketten-Reaktion
PDGF	Blutplättchen-Wachstums-Faktor	PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase	PP4	Protein Phosphatase 4
PR	Prolin-reichen Regionen	PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rap-1	Ras-verwandten Protein-1	rev	rückwärts gerichtet
RNAi	RNA interferenz	rRNA	ribosomale RNA
RSK1	ribosomale Protein S6 Kinase 1 mit 90kDa	RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RT	Raumtemperatur	RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SAPK	Stress-aktivierte Protein-Kinase	SSC	Side Light Scatter
SDF-1	Chemokin Ligand 12	SDS	Natriumdodecylsulfat
SEK2	MAPK Kinase 4	Ser	Serin
SH2	Src-Homolog 2	SH3	Src-Homolog 3
shRNA	RNA mit kurzer Haarnaderstruktur	siRNA	kurze interferierende RNA
Slp76	zytosolische Lymphozyten-Protein	STAT	Signal-Umwandler und Aktivator der Transkription
Syk	Milz Tyrosin Kinase	TAK1	TGF β-aktivierten Kinase-1
TCR	T-Zell-Rezeptor	TE	Tris-EDTA

TEMED	Tetramethylethylendiamin	TGF β	transformierender Wachstums- Faktor β
Thr	Threonin	TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TNFR	TNF-Rezeptor	TRADD	TNFR-assoziiertes Todesdomänen Protein
TRAF	TNFR-assoziiierter Faktor	Tyr	Tyrosin
ü.N.	über Nacht	VCAM-1	Vaskulären Zell Adhäsions- Molekül 1
vgl.	vergleichend mit	vs.	versus
w/o	ohne Zusatz	wt	wildtyp
ZNS	Zentrale Nervensystem		

Anhang

Tabelle 17: Kreuzreaktivität der verwendeten humanen Proteome Profiler® Phospho-MAPK-Arrays der Firma R&D Systems für die Untersuchungen der murinen Zelllysate (Angaben der Hersteller); eine Übersicht über die Kreuzreaktivität des humanen Proteome Profiler® Phospho-Kinase-Arrays ist nicht verfügbar

	Human	Mouse	Rat
ERK1	x	x	x
ERK2	x	x	x
JNK1	x	x	x
JNK2	x	x	x
JNK3	x	NA	NA
JNK pan	x	x	x
MSK2	x	x	x
RSK1	x	NA	NA
RSK2	x	x	NA
p38 γ	x	x	x
p38 δ	x	x	x
p38 α	x	x	x
p38 β	x	NA	NA
GSK-3 α/β	x	x	x
GSK-3 β	x	x	x
Akt1	x	x	x
Akt2	x	x	x
Akt3	x	x	x
Akt pan	x	x	x
HSP27	x	NA	NA
p70 S6 Kinase	x	-	-

x \triangleq kreuzreaktiv und für entsprechende Spezies

NA \triangleq nicht getestet

- \triangleq nicht kreuzreaktiv mit entsprechender Spezies

Tabelle 18: untersuchte Proteine mit entsprechenden Phospho-Stellen für die verwendeten Proteome Profiler®-Arrays der Firma R&D Systems

Gensymbol	phosphorylierte Aminosäure	Gensymbol	phosphorylierte Aminosäure
JNK1	Thr183/Tyr185	ERK1	Thr202/Tyr204
P38 α	Thr180/Tyr182	STAT2	Tyr689
RSK1	Ser380	STAT3	Tyr705
GSK-3 α/β	Ser21/Ser9	STAT5a/b	Tyr699
LCK	Tyr394	Pxn	Tyr118

Tabelle 19: differenzielle Transkripte der Transkriptom-Analyse von HPK1^{high} versus HPK1^{wt}

Gensymbol	Genname	Veränderung der Transkript-Expression	
		Differenz log ₂ ratio*	p-Wert
Chemokin und Cytokin vermittelte Entzündungsreaktionen (P00031)			
<i>gnγ3</i>	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-3	1,076	< 0,038
<i>pak1</i>	Serine/threonine-protein kinase PAK 1	1,095	< 0,013
<i>grap2</i>	GRB2-related adaptor protein 2	1,199	< 0,001
<i>junD</i>	Transcription factor jun-D	1,026	< 0,039
<i>ikke</i>	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon	1,095	< 0,011
<i>plc-1l</i>	inactive phospholipase C-like protein 1	1,018	< 0,038
<i>m-ras</i>	Ras-related protein M-Ras	1,118	< 0,002
<i>pla2g4a</i>	Lysophospholipase	1,035	< 0,030
<i>pak6</i>	Serine/threonine-protein kinase PAK 6	1,073	< 0,004
<i>gnγ5</i>	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-5	1,032	< 0,013
<i>pkCζ I</i>	Protein kinase C zeta type, transcript I	1,034	< 0,006
<i>pkCζ II</i>	Protein kinase C zeta type, transcript II	1,095	< 0,001
<i>vav2</i>	Guanine nucleotide exchange factor VAV2	1,063	< 0,026
<i>rhoB</i>	Rho-related GTP-binding protein RhoB	1,175	< 0,001
<i>camk2γ</i>	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II gamma chain	1,057	< 0,001
<i>cxcr3</i>	C-X-C chemokine receptor type 3	1,082	< 0,002
<i>ifnγr1</i>	Interferon-gamma receptor alpha chain	1,071	< 0,022
<i>gnγ2</i>	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-2	1,076	< 0,038
<i>alox5ap</i>	Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein	1,249	< 0,001
<i>gnβ3</i>	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-3	1,265	< 0,001
<i>arrβ1</i>	Beta-arrestin-1	1,076	< 0,001
<i>ccr4</i>	C-C chemokine receptor type 4	1,046	< 0,040
<i>myh7</i>	Myosin-7	1,051	< 0,018
<i>vav3</i>	Guanine nucleotide exchange factor VAV3	1,065	< 0,004
<i>grk5</i>	G protein-coupled receptor kinase 5	1,086	< 0,013
<i>nfkB2</i>	Nuclear factor NF-kappa-B p52 subunit	1,032	< 0,040
<i>plCβ3</i>	Phospholipase C, beta-3	1,031	< 0,021
<i>rhoC</i>	Rho-related GTP-binding protein RhoC	1,074	< 0,002
<i>grk4</i>	G protein-coupled receptor kinase 4	1,178	< 0,021
<i>nfkB1</i>	Nuclear factor NF-kappa-B p50 subunit	1,022	< 0,016
<i>mpp1</i>	55 kDa erythrocyte membrane protein	1,052	< 0,009
<i>pik3δ</i>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta isoform	1,077	< 0,001

Tabelle 19 – Fortsetzung (I)

Gensymbol	Genname	Veränderung der Transkript-Expression	
		Differenz log ₂ ratio*	p-Wert
Chemokin und Cytokin vermittelte Entzündungsreaktionen (P00031)			
<i>nf-atc2</i>	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 2	1,045	< 0,009
<i>c3a-r1</i>	C3a anaphylatoxin chemotactic receptor	1,050	< 0,003
<i>c-jun</i>	Transcription factor AP-1	1,184	< 0,001
<i>pkCδ</i>	Protein kinase C delta type	1,082	< 0,008
<i>pkaCβ</i>	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit beta	1,246	< 0,017
<i>camk2α</i>	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II alpha chain	1,057	< 0,001
Wnt-Signalweg (P00057)			
<i>gnγ3</i>	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-3	1,076	< 0,038
<i>tle2</i>	Transducin-like enhancer protein 2	1,028	< 0,035
<i>ccnD1</i>	G1/S-specific cyclin-D1	1,274	< 0,014
<i>acvr1B</i>	Activin receptor type-1B	1,120	< 0,015
<i>chd11</i>	Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1-like	1,048	< 0,023
<i>dact1</i>	Dapper homolog 1	1,102	< 0,029
<i>cdh15</i>	Cadherin-15	1,067	< 0,025
<i>gnγ5</i>	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-5	1,032	< 0,013
<i>pkCζ I</i>	Protein kinase C zeta type, transcript I	1,034	< 0,006
<i>pkCζ II</i>	Protein kinase C zeta type, transcript II	1,095	< 0,001
<i>ctnna1</i>	Catenin alpha-1	1,146	< 0,015
<i>gnγ2</i>	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-2	1,076	< 0,038
<i>bcl9</i>	B-cell CLL/lymphoma 9 protein	1,153	< 0,002
<i>gnβ3</i>	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-3	1,265	< 0,001
<i>arrβ1</i>	Beta-arrestin-1	1,076	< 0,001
<i>csnk1γ3</i>	Casein kinase I isoform gamma-3	1,030	< 0,007
<i>tle6</i>	Transducin-like enhancer protein 6	1,110	< 0,006
<i>adssl1</i>	Adenylosuccinate synthetase isozyme 1	1,166	< 0,004
<i>myh7</i>	Myosin-7	1,051	< 0,018
<i>plCβ3</i>	1-phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate phosphodiesterase beta-3	1,031	< 0,021
<i>tcf7l2</i>	Transcription factor 7-like 2	1,202	< 0,001
<i>cdh17</i>	Cadherin-17	1,154	< 0,001
<i>nf-atc2</i>	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 2	1,045	< 0,009
<i>fzd7</i>	Frizzled-7	1,118	< 0,003
<i>pkCδ</i>	Protein kinase C delta type	1,082	< 0,008
<i>hdac2</i>	Histone deacetylase 2	1,034	< 0,040
<i>smarca1</i>	Probable global transcription activator SNF2L1	1,043	< 0,018
<i>kremen1</i>	kringle containing transmembrane protein 1	1,094	< 0,002
Angiogenese-Signalwege (P00005)			
<i>pak1</i>	Serine/threonine-protein kinase PAK 1	1,095	< 0,013
<i>grap2</i>	GRB2-related adaptor protein 2	1,199	< 0,001
<i>rbpj1</i>	Recombining binding protein suppressor of hairless-like protein	1,062	< 0,048
<i>plD2</i>	Phospholipase D2	1,076	< 0,001
<i>epHB2</i>	Ephrin type-B receptor 2	1,195	< 0,001
<i>ets-1</i>	Protein C-ets-1	1,033	< 0,026
<i>pla2g4a</i>	Lysophospholipase	1,035	< 0,030

Tabelle 19 – Fortsetzung (II)

Gensymbol	Genname	Veränderung der Transkript-Expression	
		Differenz log ₂ ratio*	p-Wert
Angiogenese-Signalwege (P00005)			
<i>pak6</i>	Serine/threonine-protein kinase PAK 6	1,073	< 0,004
<i>pkCζ I</i>	Protein kinase C zeta type, transcript I	1,034	< 0,006
<i>pkCζ II</i>	Protein kinase C zeta type, transcript II	1,095	< 0,001
<i>mekk1</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	1,072	< 0,002
<i>rhoB</i>	Rho-related GTP-binding protein RhoB	1,175	< 0,001
<i>dll3</i>	Delta-like protein 3	1,059	< 0,031
<i>pik3r3</i>	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit gamma	1,246	< 0,001
<i>pkD3</i>	Serine/threonine-protein kinase D3	1,117	< 0,001
<i>ephB4</i>	Ephrin type-B receptor 4	1,084	< 0,009
<i>plD1</i>	Phospholipase D1	1,117	< 0,030
<i>tcf7-l2</i>	Transcription factor 7-like 2	1,202	< 0,001
<i>pi4kb</i>	Phosphatidylinositol 4-kinase beta	1,013	< 0,035
<i>rhoC</i>	Rho-related GTP-binding protein RhoC	1,074	< 0,002
<i>pik3r2</i>	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit beta	1,059	< 0,002
<i>pik3d</i>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta isoform	1,077	< 0,001
<i>notch2</i>	Notch 2 intracellular domain	1,044	< 0,046
<i>c-jun</i>	Transcription factor AP-1	1,184	< 0,001
<i>pkCd</i>	Protein kinase C delta type	1,082	< 0,008
<i>src</i>	Neuronal proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	1,043	< 0,027
<i>hSH2d</i>	Hematopoietic SH2 domain-containing protein	1,070	< 0,004
PDGF-Signalweg (P00017)			
<i>ehf</i>	ETS homologous factor	1,039	< 0,020
<i>grap2</i>	GRB2-related adaptor protein 2	1,199	< 0,001
<i>ets-1</i>	Protein C-ets-1	1,033	< 0,026
<i>pkCζ I</i>	Protein kinase C zeta type, transcript I	1,034	< 0,006
<i>pkCζ II</i>	Protein kinase C zeta type, transcript II	1,095	< 0,001
<i>vav2</i>	Guanine nucleotide exchange factor VAV2	1,063	< 0,026
<i>rhoB</i>	Rho-related GTP-binding protein RhoB	1,175	< 0,001
<i>pik3r3</i>	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit gamma	1,246	< 0,001
<i>vav3</i>	Guanine nucleotide exchange factor VAV3	1,065	< 0,004
<i>mnk2</i>	MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 2	1,045	< 0,003
<i>rhoC</i>	Rho-related GTP-binding protein RhoC	1,074	< 0,002
<i>pik3r2</i>	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit beta	1,059	< 0,002
<i>pik3d</i>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta isoform	1,077	< 0,001
<i>erf</i>	ETS domain-containing transcription factor ERF	1,093	< 0,008
<i>c-jun</i>	Transcription factor AP-1	1,184	< 0,001
<i>pkCd</i>	Protein kinase C delta type	1,082	< 0,008
<i>arhgap26</i>	Rho GTPase-activating protein 26	1,187	< 0,001
<i>elf3</i>	ETS-related transcription factor Elf-3	1,197	< 0,001
Integrin-Signalweg (P00034)			
<i>grap2</i>	GRB2-related adaptor protein 2	1,199	< 0,001
<i>dnaJC27</i>	DnaJ homolog subfamily C member 27	1,041	< 0,022
<i>mekk1</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	1,072	< 0,002
<i>rhoB</i>	Rho-related GTP-binding protein RhoB	1,175	< 0,001
<i>pik3r3</i>	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit gamma	1,246	< 0,001

Tabelle 19 – Fortsetzung (III)

Gensymbol	Genname	Veränderung der Transkript-Expression	
		Differenz log ₂ ratio*	p-Wert
Integrin-Signalweg (P00034)			
<i>lims1</i>	LIM and senescent cell antigen-like-containing domain protein 1	1,030	< 0,025
<i>mek6</i>	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 6	1,150	< 0,007
<i>ask1</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	1,057	< 0,002
<i>rhoC</i>	Rho-related GTP-binding protein RhoC	1,074	< 0,002
<i>pik3r2</i>	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit beta	1,059	< 0,002
<i>pik3d</i>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta isoform	1,077	< 0,001
<i>src</i>	Neuronal proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src	1,043	< 0,027
<i>itga6</i>	Integrin alpha-6 light chain	1,245	< 0,001
<i>itga3</i>	Integrin alpha-3 light chain	1,125	< 0,001
<i>itga5</i>	Integrin alpha-5 light chain	1,317	< 0,001
<i>arhgap26</i>	Rho GTPase-activating protein 26	1,187	< 0,001
<i>rhoN</i>	Rho-related GTP-binding protein RhoN	1,052	< 0,046
Apoptose-Signalweg (P00006)			
<i>mcl-1</i>	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1 homolog	1,037	< 0,002
<i>hpk1</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 1	1,144	< 0,001
<i>bag-4</i>	BAG family molecular chaperone regulator 4	1,064	< 0,020
<i>pkCζ I</i>	Protein kinase C zeta type, transcript I	1,034	< 0,006
<i>pkCζ II</i>	Protein kinase C zeta type, transcript II	1,095	< 0,001
<i>mekk1</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	1,072	< 0,002
<i>trail</i>	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10	1,225	< 0,001
<i>mek6</i>	Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 6	1,150	< 0,007
<i>nfkB2</i>	Nuclear factor NF-kappa-B p52 subunit	1,032	< 0,040
<i>ask1</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	1,057	< 0,002
<i>nfkB1</i>	Nuclear factor NF-kappa-B p50 subunit	1,022	< 0,016
<i>pik3d</i>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta isoform	1,077	< 0,001
<i>traf2</i>	TNF receptor-associated factor 2	1,068	< 0,003
<i>cradd</i>	Death domain-containing protein CRADD	1,100	< 0,008
<i>c-jun</i>	Transcription factor AP-1	1,184	< 0,001
<i>pkCd</i>	Protein kinase C delta type	1,082	< 0,008
T-Zell-Aktivierungs-Signalweg (P00053)			
<i>pak1</i>	Serine/threonine-protein kinase PAK 1	1,095	< 0,013
<i>grap2</i>	GRB2-related adaptor protein 2	1,199	< 0,001
<i>pak6</i>	Serine/threonine-protein kinase PAK 6	1,073	< 0,004
<i>pkCζ I</i>	Protein kinase C zeta type, transcript I	1,034	< 0,006
<i>pkCζ II</i>	Protein kinase C zeta type, transcript II	1,095	< 0,001
<i>vav2</i>	Guanine nucleotide exchange factor VAV2	1,063	< 0,026
<i>pik3r3</i>	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit gamma	1,059	< 0,002
<i>vav3</i>	Guanine nucleotide exchange factor VAV3	1,065	< 0,004
<i>nfkB2</i>	Nuclear factor NF-kappa-B p52 subunit	1,032	< 0,040
<i>pik3r2</i>	Phosphatidylinositol 3-kinase regulatory subunit beta	1,059	< 0,002
<i>nfkB1</i>	Nuclear factor NF-kappa-B p50 subunit	1,022	< 0,016
<i>pik3d</i>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta isoform	1,077	< 0,001
<i>nf-atc2</i>	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 2	1,050	< 0,003
<i>c-jun</i>	Transcription factor AP-1	1,184	< 0,001

Tabelle 19 – Fortsetzung (IV)

Gensymbol	Genname	Veränderung der Transkript-Expression	
		Differenz log ₂ ratio*	p-Wert
T-Zell-Aktivierungs-Signalweg (P00053)			
<i>pkCd</i>	Protein kinase C delta type	1,082	< 0,008
<i>h2-DMa</i>	Class II histocompatibility antigen, M alpha chain	1,122	< 0,001

* positive Werte deuten auf eine Überexpression hin

Tabelle 20: differenzielle Transkripte der Transkriptom-Analyse von HPK1^{high(K46E)} versus HPK1^{wt}

Gensymbol	Genname	Veränderung der Transkript-Expression	
		Differenz log ₂ ratio*	p-Wert
Apoptose-Signalwege (P00006)			
<i>trail-r2</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B	1,058	< 0,019
<i>hpk1</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	1,141	< 0,001
<i>igf2r</i>	Cation-independent mannose-6-phosphate receptor	1,040	< 0,017
<i>bcl-2l1</i>	Apoptosis regulator Bcl-X	1,042	< 0,020
<i>ask1</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	1,059	< 0,015
<i>traf2</i>	TNF receptor-associated factor 2	1,062	< 0,035
<i>c-jun</i>	Transcription factor AP-1	1,149	< 0,011
<i>pkCδ</i>	Protein kinase C delta type	1,050	< 0,020
PDGF-Signalwege (P00017)			
<i>vav2</i>	Guanine nucleotide exchange factor VAV2	1,098	< 0,016
<i>rasal1</i>	RasGAP-activating-like protein 1	1,057	< 0,024
<i>mnk2</i>	MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 2	1,047	< 0,029
<i>rab25</i>	Ras-related protein Rab-25	1,046	< 0,036
<i>c-jun</i>	Transcription factor AP-1	1,149	< 0,011
<i>pkCδ</i>	Protein kinase C delta type	1,050	< 0,020
<i>arhgap26</i>	Rho GTPase-activating protein 26	1,118	< 0,044
<i>elf3</i>	ETS-related transcription factor Elf-3	1,300	< 0,002
Chemokin und Cytokin vermittelte Entzündungsreaktionen (P00031)			
<i>ifn-r1</i>	Interferon-alpha/beta receptor alpha chain	1,057	< 0,038
<i>junD</i>	Transcription factor jun-D	1,044	< 0,008
<i>arpc5l</i>	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	1,034	< 0,013
<i>vav2</i>	Guanine nucleotide exchange factor VAV2	1,098	< 0,016
<i>grk5</i>	G protein-coupled receptor kinase 5	1,089	< 0,014
<i>c-jun</i>	Transcription factor AP-1	1,149	< 0,011
<i>pkCδ</i>	Protein kinase C delta type	1,050	< 0,020
FGF-Signalweg (P00021)			
<i>ppp2r3α</i>	Serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit B'' subunit alpha	1,081	< 0,035
<i>p38β</i>	Mitogen-activated protein kinase 11	1,065	< 0,034
<i>rasal1</i>	RasGAP-activating-like protein 1	1,057	< 0,024
<i>ask1</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	1,059	< 0,015
<i>pkCδ</i>	Protein kinase C delta type	1,050	< 0,020
EGFR-Signalweg (P00018)			
<i>pkD3</i>	Serine/threonine-protein kinase D3	1,106	< 0,009
<i>p38β</i>	Mitogen-activated protein kinase 11	1,065	< 0,034

Tabelle 20 – Fortsetzung (I)

Gensymbol	Genname	Veränderung der Transkript-Expression	
		Differenz log ₂ ratio*	p-Wert
EGFR-Signalweg (P00018)			
<i>rasal1</i>	RasGAP-activating-like protein 1	1,057	< 0,024
<i>ask1</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	1,059	< 0,015
<i>pkCδ</i>	Protein kinase C delta type	1,050	< 0,020
Integrin-Signalwege (P00034)			
<i>arpc5l</i>	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	1,034	< 0,013
<i>p38β</i>	Mitogen-activated protein kinase 11	1,065	< 0,034
<i>ask1</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5	1,059	< 0,015
<i>itgα5</i>	Integrin alpha-5 light chain	1,237	< 0,001
<i>arhgap26</i>	Rho GTPase-activating protein 26	1,118	< 0,044
TGF-β-Signalwege (P00052)			
<i>tgfb1</i>	transforming growth factor, beta 1	1,059	< 0,015
<i>junD</i>	Transcription factor jun-D	1,044	< 0,008
<i>bmp1</i>	Bone morphogenetic protein 1	1,092	< 0,001
<i>p38β</i>	Mitogen-activated protein kinase 11	1,065	< 0,034
<i>c-jun</i>	Transcription factor AP-1	1,149	< 0,011
Wnt-Signalweg (P00057)			
<i>nlk</i>	Serine/threonine kinase NLK	1,014	< 0,044
<i>frat-1</i>	Proto-oncogene FRAT1	1,140	< 0,010
<i>lrp-6</i>	Low-density lipoprotein receptor-related protein 6	1,046	< 0,002
<i>tle4</i>	Transducin-like enhancer protein 4	1,052	< 0,042
<i>pkCδ</i>	Protein kinase C delta type	1,050	< 0,020
Signalwege der Angiogenese (P00005)			
<i>pkD3</i>	Serine/threonine-protein kinase D3	1,106	< 0,009
<i>p38β</i>	Mitogen-activated protein kinase 11	1,065	< 0,034
<i>c-jun</i>	Transcription factor AP-1	1,149	< 0,011
<i>pkCδ</i>	Protein kinase C delta type	1,050	< 0,020
B-Zell-Aktivierungs-Signalwege (P00010)			
<i>vav2</i>	Guanine nucleotide exchange factor VAV2	1,098	< 0,016
<i>p38β</i>	Mitogen-activated protein kinase 11	1,065	< 0,034
<i>c-jun</i>	Transcription factor AP-1	1,149	< 0,011
<i>pkCδ</i>	Protein kinase C delta type	1,050	< 0,020
Endothelin-Signalweg (P00019)			
<i>pkD3</i>	Serine/threonine-protein kinase D3	1,106	< 0,009
<i>pkCδ</i>	Protein kinase C delta type	1,050	< 0,020
<i>furin</i>	Furin	1,041	< 0,031
T-Zell-Aktivierungs-Signalweg (P00053)			
<i>vav2</i>	Guanine nucleotide exchange factor VAV2	1,098	< 0,016
<i>c-jun</i>	Transcription factor AP-1	1,149	< 0,011
<i>pkCδ</i>	Protein kinase C delta type	1,050	< 0,020

Tabelle 20 – Fortsetzung (II)

Gensymbol	Genname	Veränderung der Transkript-Expression	
		Differenz log ₂ ratio*	p-Wert
Toll-Rezeptor-Signalweg (P00054)			
<i>p38β</i>	Mitogen-activated protein kinase 11	1,065	< 0,034
<i>c-jun</i>	Transcription factor AP-1	1,149	< 0,011
<i>traf2</i>	TRAF family member-associated NF-kappa-B activator	1,081	< 0,034
VEGF-Signalweg (P00056)			
<i>pkD3</i>	Serine/threonine-protein kinase D3	1,106	< 0,009
<i>p38β</i>	Mitogen-activated protein kinase 11	1,065	< 0,034
<i>pkCδ</i>	Protein kinase C delta type	1,050	< 0,020
p53-Signalweg (P00059)			
<i>trail-r2</i>	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B	1,058	< 0,019
<i>bai3</i>	Brain-specific angiogenesis inhibitor 3	1,689	< 0,036
<i>traf2</i>	TNF receptor-associated factor 2	1,062	< 0,035

* positive Werte deuten auf eine Überexpression hin

Literaturverzeichnis

Adams J, Palombella VJ, Sausville EA, Johnson J, Destree A, Lazarus DD, Maas J, Pien CS, Prakash S, Elliott PJ. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 59: 2615-2622, 1999.

Ahmed ST, Ivashkiv LB. Inhibition of IL-6 and IL-10 signaling and Stat activation by inflammatory and stress pathways. *J. Immunol* 165: 5227-5237, 2000.

Antonyak MA, Moscatello DK, Wong AJ. Constitutive activation of c-Jun N-terminal kinase by a mutant epidermal growth factor receptor. *J. Biol. Chem* 273: 2817-2822, 1998.

Arnold R, Liou J, Drexler HC, Weiss A, Kiefer F. Caspase-mediated cleavage of hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) converts an activator of NFkappaB into an inhibitor of NFkappaB. *J. Biol. Chem* 276: 14675-14684, 2001.

Barillé-Nion S, Barlogie B, Bataille R, Bergsagel PL, Epstein J, Fenton RG, Jacobson J, Kuehl WM, Shaughnessy J, Tricot G. Advances in biology and therapy of multiple myeloma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. .

Benhar M, Dalyot I, Engelberg D, Levitzki A. Enhanced ROS production in oncogenically transformed cells potentiates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation and sensitization to genotoxic stress. *Mol. Cell. Biol* 21: 6913-6926, 2001.

Bergsagel PL, Kuehl WM. Critical roles for immunoglobulin translocations and cyclin D dysregulation in multiple myeloma. *Immunol. Rev* 194: 96-104, 2003.

Bisping G, Kropff M, Wenning D, Dreyer B, Bessonov S, Hilberg F, Roth GJ, Munzert G, Stefanic M, Stelljes M, Scheffold C, Müller-Tidow C, Liebisch P, Lang N, Tchinda J, Serve HL, Mesters RM, Berdel WE, Kienast J. Targeting receptor kinases by a novel indolinone derivative in multiple myeloma: abrogation of stroma-derived interleukin-6 secretion and induction of apoptosis in cytogenetically defined subgroups. *Blood* 107: 2079-2089, 2006.

Bisping G, Leo R, Wenning D, Dankbar B, Padró T, Kropff M, Scheffold C, Kröger M, Mesters RM, Berdel WE, Kienast J. Paracrine interactions of basic fibroblast growth factor and interleukin-6 in multiple myeloma. *Blood* 101: 2775-2783, 2003.

Bost F, McKay R, Dean N, Mercola D. The JUN kinase/stress-activated protein kinase pathway is required for epidermal growth factor stimulation of growth of human A549 lung carcinoma cells. *J. Biol. Chem* 272: 33422-33429, 1997.

Bruno B, Rotta M, Giaccone L, Massaia M, Bertola A, Palumbo A, Boccadoro M. New drugs for treatment of multiple myeloma. *Lancet Oncol* 5: 430-442, 2004.

Bulavin DV, Higashimoto Y, Popoff IJ, Gaarde WA, Basrur V, Potapova O, Appella E, Fornace AJ Jr. Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature* 411: 102-107, 2001.

Bulavin DV, Kovalsky O, Hollander MC, Fornace AJ Jr. Loss of oncogenic H-ras-induced cell cycle arrest and p38 mitogen-activated protein kinase activation by disruption of Gadd45a. *Mol. Cell. Biol* 23: 3859-3871, 2003.

Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296: 1655-1657, 2002.

Chauhan D, Pandey P, Ogata A, Teoh G, Treon S, Urashima M, Kharbanda S, Anderson KC. Dexamethasone induces apoptosis of multiple myeloma cells in a JNK/SAP kinase independent mechanism. *Oncogene* 15: 837-843, 1997.

Chauhan D, Uchiyama H, Akbarali Y, Urashima M, Yamamoto K, Libermann TA, Anderson KC. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood* 87: 1104-1112, 1996.

Chen YR, Tan TH. The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling (review). *Int. J. Oncol* 16: 651-662, 2000.

Chesi M, Brents LA, Ely SA, Bais C, Robbiani DF, Mesri EA, Kuehl WM, Bergsagel PL. Activated fibroblast growth factor receptor 3 is an oncogene that contributes to tumor progression in multiple myeloma. *Blood* 97: 729-736, 2001.

Cortez D, Reuther G, Pendergast AM. The Bcr-Abl tyrosine kinase activates mitogenic signaling pathways and stimulates G1-to-S phase transition in hematopoietic cells. *Oncogene* 15: 2333-2342, 1997.

Cretu A, Sha X, Tront J, Hoffman B, Liebermann DA. Stress sensor Gadd45 genes as therapeutic targets in cancer. *Cancer Ther* 7: 268-276, 2009.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378: 785-789, 1995.

Dan I, Watanabe NM, Kusumi A. The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends Cell Biol* 11: 220-230, 2001.

Dankbar B, Padró T, Leo R, Feldmann B, Kropff M, Mesters RM, Serve H, Berdel WE, Kienast J. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood* 95: 2630-2636, 2000.

Desbiens KM, Deschesnes RG, Labrie MM, Desfossés Y, Lambert H, Landry J, Bellmann K. c-Myc potentiates the mitochondrial pathway of apoptosis by acting upstream of apoptosis signal-regulating kinase 1 (Ask1) in the p38 signalling cascade. *Biochem. J* 372: 631-641, 2003.

Dotto GP. p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim. Biophys. Acta* 1471: M43-56, 2000.

Dumont FJ, Su Q. Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin. *Life Sci* 58: 373-395, 1996.

Fan W, Richter G, Cereseto A, Beadling C, Smith KA. Cytokine response gene 6 induces p21 and regulates both cell growth and arrest. *Oncogene* 18: 6573-6582, 1999.

Feinman R, Koury J, Thames M, Barlogie B, Epstein J, Siegel DS. Role of NF-kappaB in the rescue of multiple myeloma cells from glucocorticoid-induced apoptosis by bcl-2. *Blood* 93: 3044-3052, 1999.

Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, Saklatvala J. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* 78: 1039-1049, 1994.

Furukawa Y, Kikuchi J, Nakamura M, Iwase S, Yamada H, Matsuda M. Lineage-specific regulation of cell cycle control gene expression during haematopoietic cell differentiation. *Br. J. Haematol* 110: 663-673, 2000.

Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol. Cancer Ther* 1: 639-649, 2002.

Geisberger R, Cramer R, Achatz G. Models of signal transduction through the B-cell antigen receptor. *Immunology* 110: 401-410, 2003.

Geisberger R, Prlic M, Achatz-Straussberger G, Oberndorfer I, Luger E, Lamers M, Cramer R, Appenzeller U, Wienands J, Breitenbach M, Ferreira F, Achatz G. Phage display based cloning of proteins interacting with the cytoplasmic tail of membrane immunoglobulins. *Dev. Immunol* 9: 127-134, 2002.

Goldschmidt H, Cremer FW, Möhler TM, Ho AD. [Multiple myeloma. Diagnosis and therapy]. *Internist (Berl)* 44: 599-600, 603-616; quiz 617-618, 2003.

Gupta D, Treon SP, Shima Y, Hideshima T, Podar K, Tai YT, Lin B, Lentzsch S, Davies FE, Chauhan D, Schlossman RL, Richardson P, Ralph P, Wu L, Payvandi F, Muller G, Stirling DI, Anderson KC. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia* 15: 1950-1961, 2001.

Hakem R, Hakem A, Duncan GS, Henderson JT, Woo M, Soengas MS, Elia A, de la Pompa JL, Kagi D, Khoo W, Potter J, Yoshida R, Kaufman SA, Lowe SW, Penninger JM, Mak TW. Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell* 94: 339-352, 1998.

Han A, Saijo K, Mecklenbräuker I, Tarakhovsky A, Nussenzweig MC. Bam32 links the B cell receptor to ERK and JNK and mediates B cell proliferation but not survival. *Immunity* 19: 621-632, 2003.

Hardin J, MacLeod S, Grigorieva I, Chang R, Barlogie B, Xiao H, Epstein J. Interleukin-6 prevents dexamethasone-induced myeloma cell death. *Blood* 84: 3063-3070, 1994.

He B, Meng YH, Mivechi NF. Glycogen synthase kinase 3beta and extracellular signal-regulated kinase inactivate heat shock transcription factor 1 by facilitating the disappearance of transcriptionally active granules after heat shock. *Mol. Cell. Biol* 18: 6624-6633, 1998.

Hideshima T, Chauhan D, Schlossman R, Richardson P, Anderson KC. The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. *Oncogene* 20: 4519-4527, 2001c.

Hideshima T, Nakamura N, Chauhan D, Anderson KC. Biologic sequelae of interleukin-6 induced PI3-K/Akt signaling in multiple myeloma. *Oncogene* 20: 5991-6000, 2001b.

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

Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, Mitsiades C, Mitsiades N, Hayashi T, Munshi N, Dang L, Castro A, Palombella V, Adams J, Anderson KC. NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J. Biol. Chem* 277: 16639-16647, 2002.

Hideshima T, Mitsiades C, Akiyama M, Hayashi T, Chauhan D, Richardson P, Schlossman R, Podar K, Munshi NC, Mitsiades N, Anderson KC. Molecular mechanisms mediating antimyeloma activity of proteasome inhibitor PS-341. *Blood* 101: 1530-1534, 2003.

Hu L, Shi Y, Hsu J-hsin, Gera J, Van Ness B, Lichtenstein A. Downstream effectors of oncogenic ras in multiple myeloma cells. *Blood* 101: 3126-3135, 2003.

Hu MC, Qiu WR, Wang X, Meyer CF, Tan TH. Human HPK1, a novel human hematopoietic progenitor kinase that activates the JNK/SAPK kinase cascade. *Genes Dev* 10: 2251-2264, 1996.

Hurt EM, Wiestner A, Rosenwald A, Shaffer AL, Campo E, Grogan T, Bergsagel PL, Kuehl WM, Staudt LM. Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell* 5: 191-199, 2004.

Jung M, Peterson H, Chavez L, Kahlem P, Lehrach H, Vilo J, Adjaye J. A data integration approach to mapping OCT4 gene regulatory networks operative in embryonic stem cells and embryonal carcinoma cells. *PLoS ONE* 5: e10709, 2010.

Kelkar N, Gupta S, Dickens M, Davis RJ. Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3. *Mol. Cell. Biol* 20: 1030-1043, 2000.

Kiefer F, Tibbles LA, Anafi M, Janssen A, Zanke BW, Lassam N, Pawson T, Woodgett JR, Iscove NN. HPK1, a hematopoietic protein kinase activating the SAPK/JNK pathway. *EMBO J* 15: 7013-25, 1996.

Kienast J, Berdel WE. c-maf in multiple myeloma: an oncogene enhancing tumor-stroma interactions. *Cancer Cell* 5: 109-110, 2004.

Kikuchi A, Kishida S, Yamamoto H. Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. *Exp. Mol. Med* 38: 1-10, 2006.

Königsberger S, Peckl-Schmid D, Zaborsky N, Patzak I, Kiefer F, Achatz G. HPK1 associates with SKAP-HOM to negatively regulate Rap1-mediated B-lymphocyte adhesion. *PLoS ONE* 5, 2010.

Korsching E, Packeisen J, Liedtke C, Hungermann D, Wülfing P, van Diest PJ, Brandt B, Boecker W, Buerger H. The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *J. Pathol* 206: 451-457, 2005.

Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat. Rev. Cancer* 2: 175-187, 2002.

Kültz D, Madhany S, Burg MB. Hyperosmolality causes growth arrest of murine kidney cells. Induction of GADD45 and GADD153 by osmosensing via stress-activated protein kinase 2. *J. Biol. Chem* 273: 13645-13651, 1998.

Kyriakis JM. Signaling by the germinal center kinase family of protein kinases. *J. Biol. Chem* 274: 5259-5262, 1999.

Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics, 1999. *CA Cancer J Clin* 49: 8-31, 1, 1999.

LeBlanc R, Catley LP, Hideshima T, Lentzsch S, Mitsiades CS, Mitsiades N, Neuberg D, Goloubeva O, Pien CS, Adams J, Gupta D, Richardson PG, Munshi NC, Anderson KC. Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model. *Cancer Res* 62: 4996-5000, 2002.

Lentzsch S, Chatterjee M, Gries M, Bommert K, Gollasch H, Dörken B, Bargou RC. 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 cells. *Leukemia* 18: 1883-1890, 2004.

Li K, Li Y, Shelton JM, Richardson JA, Spencer E, Chen ZJ, Wang X, Williams RS. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell* 101: 389-399, 2000.

Li Z, Zhu YX, Plowright EE, Bergsagel PL, Chesi M, Patterson B, Hawley TS, Hawley RG, Stewart AK. The myeloma-associated oncogene fibroblast growth factor receptor 3 is transforming in hematopoietic cells. *Blood* 97: 2413-2419, 2001.

Lin B, Podar K, Gupta D, Tai Y-T, Li S, Weller E, Hideshima T, Lentzsch S, Davies F, Li C, Weisberg E, Schlossman RL, Richardson PG, Griffin JD, Wood J, Munshi NC, Anderson KC. 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 Res* 62: 5019-5026, 2002.

Liou J, Kiefer F, Dang A, Hashimoto A, Cobb MH, Kurosaki T, Weiss A. HPK1 is activated by lymphocyte antigen receptors and negatively regulates AP-1. *Immunity* 12: 399-408, 2000.

Liu ZY, Ganju RK, Wang JF, Ona MA, Hatch WC, Zheng T, Avraham S, Gill P, Groopman JE. Cytokine signaling through the novel tyrosine kinase RAFTK in Kaposi's sarcoma cells. *J. Clin. Invest* 99: 1798-1804, 1997.

López-Royuela N, Balsas P, Galán-Malo P, Anel A, Marzo I, Naval J. Bim is the key mediator of glucocorticoid-induced apoptosis and of its potentiation by rapamycin in human myeloma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1803: 311-322, 2010.

Mantel C, Luo Z, Canfield J, Braun S, Deng C, Broxmeyer HE. Involvement of p21cip-1 and p27kip-1 in the molecular mechanisms of steel factor-induced proliferative synergy in vitro and of p21cip-1 in the maintenance of stem/progenitor cells in vivo. *Blood* 88: 3710-3719, 1996.

Matsumoto M, Mariathasan S, Nahm MH, Baranyay F, Peschon JJ, Chaplin DD. Role of lymphotoxin and the type I TNF receptor in the formation of germinal centers. *Science* 271: 1289-1291, 1996.

Meads MB, Hazlehurst LA, Dalton WS. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clin. Cancer Res* 14: 2519-2526, 2008.

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

O'Hagan RC, Hassell JA. The PEA3 Ets transcription factor is a downstream target of the HER2/Neu receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 16: 301-310, 1998.

- Ogata A, Chauhan D, Teoh G, Treon SP, Urashima M, Schlossman RL, Anderson KC.** IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J. Immunol* 159: 2212-2221, 1997.
- Patzak IM, Königsberger S, Suzuki A, Mak TW, Kiefer F.** HPK1 competes with ADAP for SLP-76 binding and via Rap1 negatively affects T-cell adhesion. *Eur. J. Immunol* 40: 3220-3225, 2010.
- Platanias LC.** Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* 101: 4667-4679, 2003.
- Podar K, Tai YT, Davies FE, Lentzsch S, Sattler M, Hideshima T, Lin BK, Gupta D, Shima Y, Chauhan D, Mitsiades C, Raje N, Richardson P, Anderson KC.** Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood* 98: 428-435, 2001.
- 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.** GW654652, the pan-inhibitor of VEGF receptors, blocks the growth and migration of multiple myeloma cells in the bone marrow microenvironment. *Blood* 103: 3474-3479, 2004.
- Polakis P.** Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 14: 1837-1851, 2000.
- Pombo CM, Kehrl JH, Sánchez I, Katz P, Avruch J, Zon LI, Woodgett JR, Force T, Kyriakis JM.** Activation of the SAPK pathway by the human STE20 homologue germinal centre kinase. *Nature* 377: 750-754, 1995.
- Puthier D, Bataille R, Amiot M.** IL-6 up-regulates mcl-1 in human myeloma cells through JAK / STAT rather than ras / MAP kinase pathway. *Eur. J. Immunol* 29: 3945-3950, 1999.
- Ray A, LaForge KS, Sehgal PB.** On the mechanism for efficient repression of the interleukin-6 promoter by glucocorticoids: enhancer, TATA box, and RNA start site (Inr motif) occlusion. *Mol. Cell. Biol* 10: 5736-5746, 1990.
- Rouse J, Cohen P, Trigon S, Morange M, Alonso-Llamazares A, Zamanillo D, Hunt T, Nebreda AR.** A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78: 1027-1037, 1994.
- Sauer K, Liou J, Singh SB, Yablonski D, Weiss A, Perlmutter RM.** Hematopoietic progenitor kinase 1 associates physically and functionally with the adaptor proteins B cell linker protein and SLP-76 in lymphocytes. *J. Biol. Chem* 276: 45207-45216, 2001.
- Sawasdikosol S, Pyarajan S, Alzabin S, Matejovic G, Burakoff SJ.** Prostaglandin E2 activates HPK1 kinase activity via a PKA-dependent pathway. *J. Biol. Chem* 282: 34693-9, 2007.
- Sawasdikosol S, Russo KM, Burakoff SJ.** Hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) negatively regulates prostaglandin E2-induced fos gene transcription. *Blood* 101: 3687-3689, 2003.
- Schulze-Luehrmann J, Santner-Nanan B, Jha MK, Schimpl A, Avots A, Serfling E.** Hematopoietic progenitor kinase 1 supports apoptosis of T lymphocytes. *Blood* 100: 954-960, 2002.
- Seitz S, Korsching E, Weimer J, Jacobsen A, Arnold N, Meindl A, Arnold W, Gustavus D, Klebig C, Petersen I, Scherneck S.** Genetic background of different cancer cell lines influences the gene set involved in chromosome 8 mediated breast tumor suppression. *Genes Chromosomes Cancer* 45: 612-627, 2006.

- Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A.** The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96: 5522-5527, 1999.
- Srivastava AK, Pandey SK.** Potential mechanism(s) involved in the regulation of glycogen synthesis by insulin. *Mol. Cell. Biochem* 182: 135-141, 1998.
- Stambolic V, Woodgett JR.** Mitogen inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta in intact cells via serine 9 phosphorylation. *Biochem. J* 303 (Pt 3): 701-704, 1994.
- Steinman RA.** Cell cycle regulators and hematopoiesis. *Oncogene* 21: 3403-3413, 2002.
- Strömberg T, Dimberg A, Hammarberg A, Carlson K, Osterborg A, Nilsson K, Jernberg-Wiklund H.** Rapamycin sensitizes multiple myeloma cells to apoptosis induced by dexamethasone. *Blood* 103: 3138-3147, 2004.
- Suzuki A, Tsutomi Y, Akahane K, Araki T, Miura M.** Resistance to Fas-mediated apoptosis: activation of caspase 3 is regulated by cell cycle regulator p21WAF1 and IAP gene family ILP. *Oncogene* 17: 931-939, 1998.
- Tai Y-T, Podar K, Catley L, Tseng Y-H, Akiyama M, Shringarpure R, Burger R, Hideshima T, Chauhan D, Mitsiades N, Richardson P, Munshi NC, Kahn CR, Mitsiades C, Anderson KC.** Insulin-like growth factor-1 induces adhesion and migration in human multiple myeloma cells via activation of beta1-integrin and phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT signaling. *Cancer Res* 63: 5850-5858, 2003.
- Tetsu O, McCormick F.** Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398: 422-426, 1999.
- Tibbles LA, Woodgett JR.** The stress-activated protein kinase pathways. *Cell. Mol. Life Sci* 55: 1230-1254, 1999.
- Tiedemann RE, Zhu YX, Schmidt J, Yin H, Shi C-X, Que Q, Basu G, Azorsa D, Perkins LM, Braggio E, Fonseca R, Bergsagel PL, Mousses S, Stewart AK.** Kinome-wide RNAi studies in human multiple myeloma identify vulnerable kinase targets, including a lymphoid-restricted kinase, GRK6. *Blood* 115: 1594-1604, 2010.
- Tsuji S, Okamoto M, Yamada K, Okamoto N, Goitsuka R, Arnold R, Kiefer F, Kitamura D.** B cell adaptor containing src homology 2 domain (BASH) links B cell receptor signaling to the activation of hematopoietic progenitor kinase 1. *J. Exp. Med* 194: 529-539, 2001.
- Tu Y, Gardner A, Lichtenstein A.** The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase pathway in multiple myeloma plasma cells: roles in cytokine-dependent survival and proliferative responses. *Cancer Res* 60: 6763-6770, 2000.
- Villunger A, Egle A, Kos M, Hittmair A, Maly K, Greil R.** Constituents of autocrine IL-6 loops in myeloma cell lines and their targeting for suppression of neoplastic growth by antibody strategies. *Int. J. Cancer* 65: 498-505, 1996.
- Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Tournier C, Yasuda J, Davis RJ.** A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science* 281: 1671-1674, 1998.
- Yaroslavskiy B, Watkins S, Donnenberg AD, Patton TJ, Steinman RA.** Subcellular and cell-cycle expression profiles of CDK-inhibitors in normal differentiating myeloid cells. *Blood* 93: 2907-2917, 1999.

Ying J, Srivastava G, Hsieh W-S, Gao Z, Murray P, Liao S-K, Ambinder R, Tao Q. The stress-responsive gene GADD45G is a functional tumor suppressor, with its response to environmental stresses frequently disrupted epigenetically in multiple tumors. *Clin. Cancer Res* 11: 6442-6449, 2005.

Zhou G, Lee SC, Yao Z, Tan TH. Hematopoietic progenitor kinase 1 is a component of transforming growth factor beta-induced c-Jun N-terminal kinase signaling cascade. *J. Biol. Chem* 274: 13133-13138, 1999.

Zhou G, Boomer JS, Tan T-H. Protein phosphatase 4 is a positive regulator of hematopoietic progenitor kinase 1. *J. Biol. Chem* 279: 49551-49561, 2004.

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. W. E. Berdel, Prof. Dr. J. Kienast und besonders PD Dr. G. Bisping für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Überlassung des überaus interessanten Themas für meine Dissertation, sowie die Unterstützung während der Durchführung dieser Arbeit.

Prof. Dr. A. Püschel danke ich für die Übernahme des Gutachtens und der Betreuung seitens des Fachbereiches Biologie der WWU Münster.

Prof. Dr. F. Kiefer und seinen Mitarbeitern danke ich herzlichst für die sehr fruchtbaren Diskussionen und Hilfestellungen.

Frau Svenja Edelmann und Frau Dr. D. Wenning danke ich für ihren unermüdlichen Einsatz und für die praktische Hilfe. Der großen Schar aktueller und ehemaliger Laborkollegen danke ich für den unkomplizierten Umgang, die sehr gute Arbeitsatmosphäre und die immerwährende Bereitschaft mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

Den lieben Kollegen des KMT-Teams der Pädiatrischen Onkologie danke ich für ihre interdisziplinäre Unterstützung und ihrer Hilfe bei meiner Dissertation.

Im Besonderen aber gilt mein Dank allen, die mich in dieser Zeit unterstützt und mit mir durchgehalten haben: meinen Eltern, meiner Schwester und vor allem meiner Freundin Claudia.

